

УДК 577.151.4

ВЫСОКООШИБОЧНЫЙ СИНТЕЗ ДНК НА КЛИК-ЛИГИРОВАННЫХ МАТРИЦАХ

© 2024 г. А. В. Ендуткин¹, А. О. Яковлев^{1, 2}, Т. Д. Жарков¹, В. М. Голышев¹, А. В. Юдкина¹,
член-корреспондент РАН Д. О. Жарков^{1, 2, *}

Поступило 10.05.2024 г.

После доработки 30.05.2024 г.

Принято к публикации 30.05.2024 г.

Клик-лигирование – метод соединения фрагментов ДНК, основанный на азид-алкиновом циклоприсоединении. В наиболее распространенном варианте клик-лигирование вводит 4-метил-1,2,3-триазольную группу (trз) вместо фосфодиэфирной связи между двумя нуклеозидами. Хотя такая связь считается биосовместимой, практически ничего не известно о возможности ее узнавания системами репарации ДНК или о потенциале блокирования и ошибок ДНК-полимераз. В работе показано, что trз-связь устойчива к нескольким эндонуклеазам, участвующим в репарации ДНК бактерий и человека. В то же время она сильно блокирует некоторые ДНК-полимеразы (Pfu, ДНК-полимераза β), но проходит другими (полимераза фага RB69, фрагмент Кленова). Все полимеразы, за исключением ДНК-полимеразы β, с высокой частотой ошибаются при прохождении trз-связи, включая dAMP вместо следующего комплементарного нуклеотида. Таким образом, от клик-лигирования можно ожидать низкой точности в технологиях генного синтеза.

Ключевые слова: клик-химия; ДНК-полимеразы; репликация ДНК; мутации; репарация ДНК; АП-эндонуклеазы.

DOI: 10.31857/S2686738924050186

Катализируемая медью(I) реакция циклоприсоединения между азидами и алкинами с образованием 1,2,3-триазолов [1, 2] оказалась настолько региоселективной и эффективной, что породила целую область “клик-химии”. В настоящее время клик-реакции успешно используются в том числе для высокоэффективной постсинтетической функционализации модифицированных алкиновыми группами оснований ДНК или ненуклеотидных линкеров [3, 4]. Большой интерес в качестве инструмента молекулярной биологии представляет клик-лигирование – соединение фрагментов ДНК с образованием межнуклеозидной триазольной (trз-) связи (рис. 1а) [5, 6]. Несмотря на то, что по своей химической природе она радикально отличается от канонической фосфодиэфирной межнуклеозидной связи, структурные исследования показывают, что конформация ДНК, содержащей одну trз-связь, практически идентична конформации стандартной В-ДНК (рис. 1б) [7].

Клик-лигирование может применяться для сборки из олигонуклеотидов протяженных фрагментов ДНК, ДНК- и РНК-конструкций сложной пространственной структуры и т. п. [5, 8].

Для применения реакций клик-лигирования в молекулярно-биологических технологиях критически важно понимание принципов взаимодействия белков, действующих на нуклеиновые кислоты, с ДНК, содержащей trз-связи. Сообщалось о том, что некоторые ДНК-полимеразы – Taq, Pfu, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli* (KF) – способны вести синтез при наличии trз-связи в ДНК-матрице, при этом секвенирование полученных таким образом ПЦР-ампликонов не выявляет нуклеотидных замен [5]. Активность РНК-полимеразы бактериофага T7 подавляется присутствием trз-связи в промоторе, но не в матрице при элонгации [9]. Отсутствие мутаций и нормальная транскрипция наблюдаются и при трансфекции *E. coli* плазмидой, содержащей единичную trз-связь [5, 6]. Однако такие результаты плохо согласуются с известными структурами ДНК- и РНК-полимераз, в активном центре которых матричная цепь обычно сильно изломана, что может быть затруднительно для нестандартной trз-связи [10]. Дополнительные проблемы могут возникать при

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

*e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru

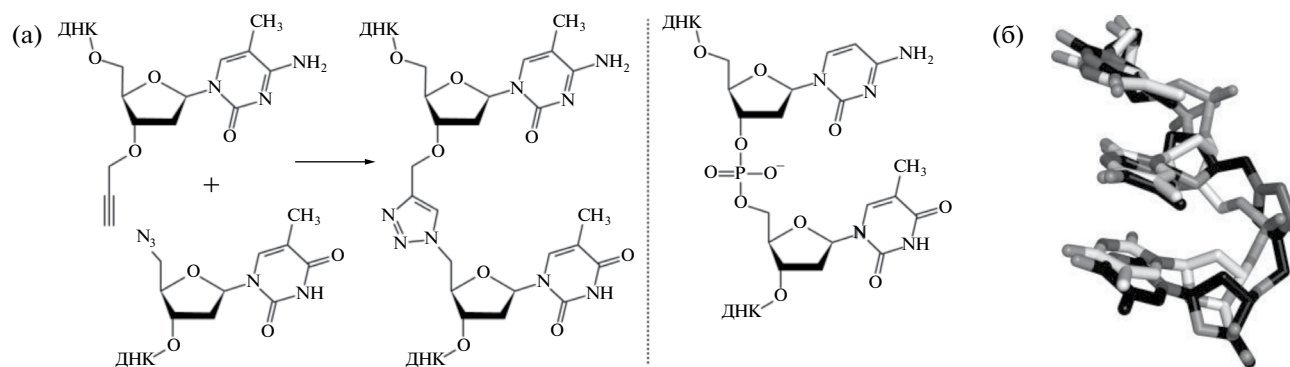


Рис. 1. а – схема получения олигонуклеотида с триазольной межнуклеозидной связью и ее структура в сравнении с природной фосфодиэфирной связью. б – конформация trz-связи в сравнении с фосфодиэфирной связью по данным спектроскопии ядерного магнитного резонанса [7]. Приведено строение части немодифицированного ДНК-дуплекса (код структуры в базе данных Protein Data Bank 2KUZ, атомы углерода окрашены в белый цвет) и дуплекса с trz-связью (код 2L8I, атомы углерода окрашены в черный цвет).

попадании ДНК с trz-связями в клетку, поскольку модификация клеточного генома находится под плотным контролем со стороны систем репарации и ответа на повреждения ДНК. Любой неканонический нуклеотид в составе ДНК воспринимается как повреждение и удаляется. Таким образом, активность ДНК-полимераз и ферментов репарации в отношении ДНК с синтетической trz-связью нуждается в изучении.

В работе была исследована способность эндонуклеаз репарации ДНК – APE1 человека, Xth и Nfo *E. coli* – расщеплять ДНК в области trz-связи и способность ДНК-полимераз разных структурных семейств – KF, ДНК-полимеразы бактериофага RB69 (RBpol), Pfu и ДНК-полимеразы β человека (Pol β) – проходить trz-связь при синтезе ДНК. Выделение всех использованных в работе белков и источники коммерчески доступных ферментов описаны ранее [11]. В случае KF и RBpol в последовательность белка были внесены аминокислотные замены (D355A/E357A и D222A/D327A соответственно) для подавления 3'→5'-экзонуклеазной активности, которая зачастую гидролизует праймеры при невозможности их удлинения. Для получения олигонуклеотида с 3'-концевым остатком 3'-пропаргил-5-метил-2'-дезоксирибозитидина (mod3, последовательности всех олигонуклеотидов сведены в табл. 1) использовали соответствующий твердофазный носитель (Glen Research, США). Для получения олигонуклеотида с 5'-концевым остатком 5'-азидо-2'-дезокситимидина использовали амидофосфит 5'-иодо-2'-дезокситимидина (Glen Research, США). Для конверсии в азидное производное после получения 5'-иодсодержащего олигонуклеотида (mod5) носитель обрабатывали насыщенным раствором NaN_3 в диметилфосфате в течение ночи при комнатной температуре, далее отмывали от NaN_3 и обрабатывали

концентрированным раствором аммиака при 55°C в течение ночи для отщепления олигонуклеотида. Очистку проводили обращеннофазовой хроматографией на колонке Zorbax SB-C18 (Agilent, США). Далее 3'-пропаргил- и 5'-азидсодержащие олигонуклеотиды отжигали с комплементарным немодифицированным олигонуклеотидом длиной 26 нуклеотидов (T1) в соотношении 1:1:1.2 и проводили клик-реакцию в условиях: 100 мкМ комплекс ДНК, 200 мМ триэтиламмонийацетат (pH 7.0), 50%-ный диметилсульфоксид, 0.5 мМ аскорбиновая кислота, 0.5 мМ Cu(II)-трис(бензилтриазилил)амин. Смесь барботировали аргоном и оставляли на ночь при комнатной температуре. Продукт осаждали 2%-ным LiClO_4 в ацетоне, полученный конъюгат длиной 33 нуклеотида (33trz) отделяли от непрореагировавших и комплементарных олигонуклеотидов электрофорезом в денатурирующем 20%-ном полиакриламидном геле.

По соображениям доступности мономеров для синтеза все исследуемые субстраты содержали с 5'-стороны от trz-связи 5-метил-2'-дезоксирибозитидин (mC). Этот минорный нуклеозид встречается в ДНК, где выполняет регуляторные функции и не оказывает заметного влияния на активность ферментов обмена нуклеиновых кислот. Как следствие, такие олигонуклеотиды представляются вполне подходящими для изучения действия ДНК-полимераз и нуклеаз на субстраты, содержащие trz-связь. По сравнению с дуплексом 33mC//T2, содержащим лишь фосфодиэфирные связи, дуплекс 33trz//T2 был несколько менее стабилен ($T_{\text{пл}} = 77.9^\circ\text{C}$ и 75.2°C соответственно; $T_{\text{пл}}$ измеряли на спектрофотометре Cary 300-Bio Melt по поглощению при 260 нм), однако это не должно заметно влиять на количество дуплекса при 37 °C.

Таблица 1. Последовательности олигодезоксирибонуклеотидов, использованных в работе

Код	Последовательность, 5'→3'	Модификация
mod3	CCAGTGGTAATCTAX	X = 3'-пропаргил-5-метил-dC
mod5	YGGGACGGAACAGCTTTG	Y = 5'-иодо-dT
33trz	CCAGTGGTAATCTAM[trz]TGGGACGGAACAGCTTTG	M = 5-метил-dC [trz] = триазольная межнуклеозидная связь
33mC	CCAGTGGTAATCTAMTGGGACGGAACAGCTTTG	M = 5-метил-dC
T1	CTGTTCCGTCCCAGTAGATTACCACT	
T2	CAAAGCTGTTCCGTCCCAGTAGATTACCACTGG	
P1	CAAAGCTGTTCCG	
P2	CAAAGCTGTTCCGTCCCA	
M15	CCAGTGGTAATCTAC	
M16	CCAGTGGTAATCTACT	
M33	CCAGTGGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTG	

Апурин-апирииминовые (АП-) эндонуклеазы в процессе эксцизионной репарации оснований ДНК расщепляют АП-сайты, возникающие после удаления поврежденных оснований, а также способны гидролизовать ДНК с 5'-стороны от некоторых окислительных повреждений, например, α-аномерных нуклеотидов [12]. При исследовании способности эндонуклеаз репарации расщеплять одно- и дуплетные олигонуклеотиды в районе trz-связи выяснилось, что апурин-апирииминовая эндонуклеаза человека APE1 малоактивна в отношении такой ДНК (рис. 2). Лишь при 20-кратном молярном избытке над дуплетным субстратом и длительной инкубации в присутствии Mg^{2+} появлялись продукты размером менее 15 нуклеотидов, что соответствует гидролизу связи с 5'-стороны от mC и дальнейшему проявлению экзонуклеазной активности фермента (рис. 2, дорожка 6). Эндонуклеаза IV *E. coli* (Nfo) была неспособна гидролизовать субстраты с trz-связью (данные не приведены). Экзонуклеаза III *E. coli* (Xth) — гомолог APE1 — помимо эндонуклеазной, обладает сильной 3'→5'-экзонуклеазной активностью по отношению к дуплетной ДНК. При действии Xth на дуплекс 33trz//T2 образовывался продукт, подвижность которого была заметно меньше, чем у 16-звенного олигонуклеотидного маркера M16 (рис. 2, дорожка 10). Поскольку при гидролизе 33trz с 3'-стороны от места модификации ^{32}P -меченый продукт содержит одну незаряженную trz-связь, что снижает его электрофоретическую подвижность, Xth в данном случае предположительно, проявляет именно свою экзонуклеазную активность, но останавливается за 1–2 нуклеотида до trz-связи. С этим объяснением также согласуется и то, что при замене Mg^{2+}

на Ca^{2+} , что снижает экзонуклеазную активность Xth гораздо больше, чем эндонуклеазную, образовывалась смесь еще более длинных продуктов. Активность APE1 и Xth по отношению к одноцепочечному субстрату была гораздо ниже, чем к дуплетному (рис. 2, дорожки 17–19, 21–23). Таким образом, trz-связь, по всей вероятности, устойчива к действию системы эксцизионной репарации оснований. Ранее сообщалось, что эта модификация также не удаляется из ДНК по другому ферментативному пути — системой эксцизионной репарации нуклеотидов [5].

Наличие trz-связи с 3'-стороны от mC также подавляло активность ДНК-гликозилазы ROS1 из *Nicotiana tabacum* — растительного фермента, который катализирует гидролиз N-гликозидной связи и элиминирование 3'-фосфатной группы mC-нуклеотидов в ДНК (данные не приведены). При связывании ДНК ROS1 образует водородные связи с этим фосфатом, необходимые для выворачивания субстратного основания в активный центр фермента [13], что может объяснять исчезновение активности при замене фосфатной группы на метилтриазольную.

Способность ДНК-полимераз KF, RVpol, Pfu и Pol β вести синтез по матрице, содержащей trz-связь, исследовали в двух постановках эксперимента, отражающих два режима синтеза. В первом случае 3'-конец праймера был удален от места модификации на 5 нуклеотидов (субстрат P1//33trz), а во втором (субстрат P2//33trz) — находился непосредственно перед неканонической межнуклеозидной связью. Эксперименты первого типа позволяют установить, с какой эффективностью ДНК-полимеразы способны преодолевать модифицированные звенья в матрице при доступности

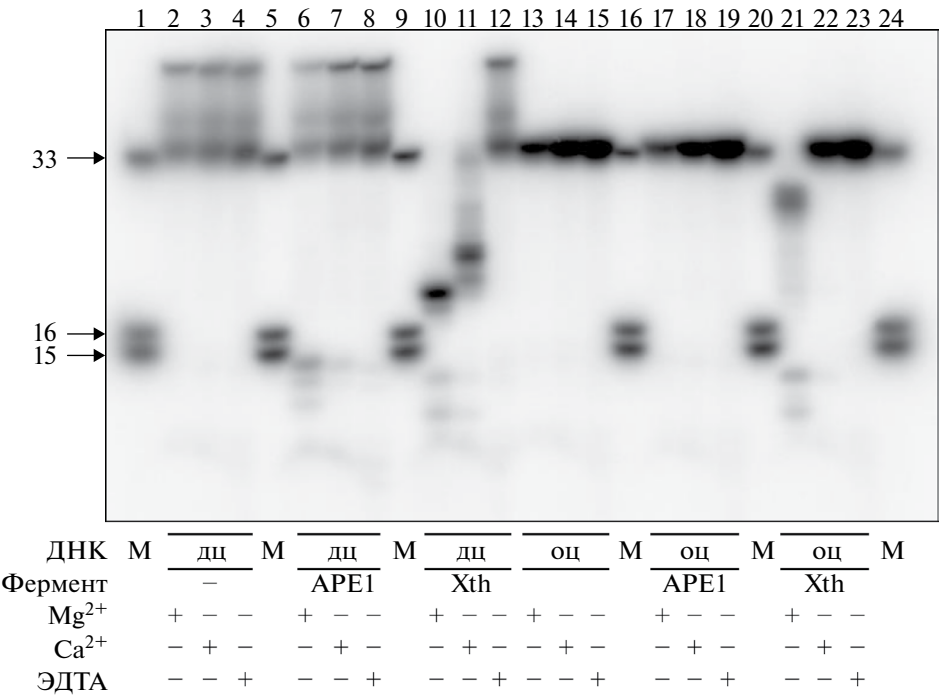


Рис. 2. Репрезентативный радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов расщепления ³²P-меченой цепи ДНК с trz-связью эндонуклеазами APE1 и Xth. Реакцию вели при 37°C в течение 1 ч в буфере, содержащем 20 мМ HEPES–КОН (рН 8.0), 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂ либо CaCl₂ либо 1 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), 1 мМ дитиотреитол (DTT) и 100 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина. Концентрация ДНК-субстрата составляла 50 нМ, ферментов – 1 мкМ APE1 либо 10 нМ Xth. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20%-ном полиакриламидном геле в присутствии 7 М мочевины и анализировали с помощью установки радиолюминесцентного сканирования Typhoon 9500 (GE Healthcare, США). М – смесь маркеров подвижности длиной 15, 16 и 33 нуклеотида (M15, M16 и M33, табл. 1; соответствующие полосы отмечены стрелками); оц – одноцепочечный ДНК-субстрат (33trz, табл. 1); дц – двуцепочечный ДНК-субстрат (33trz//T2, табл. 1).

всех dNTP и в отсутствие влияния модификации на связывание с 3'-концом праймера. В экспериментах второго типа модифицированное звено может изменять как сродство фермента к ДНК-субстрату, так и эффективность стадии включения dNMP, однако в этом случае становится возможным с использованием отдельных dNTP дополнительно установить, какие нуклеотиды преимущественно используются для синтеза напротив неканонического элемента матрицы. Исследованные ферменты относятся к трем основным структурным суперсемействам ДНК-полимераз: А (KF), В (RVpol и Pfu) и Х (Pol β). Главные репликативные полимеразы эукариот (α, δ и ε) входят в суперсемейство В, поэтому RVpol часто используют в качестве удобной модели для исследования механизма действия и субстратной специфичности ДНК-полимераз человека.

KF и RVpol достаточно эффективно удлиняли оба праймера и синтезировали продукты, электрофоретическая подвижность которых указывает на прохождение модифицированного звена и продолжение синтеза после этого (рис. 3а, дорожки 6, 8, 14, 16). Однако на геле была хорошо заметна

полоса, соответствующая удлинению праймера Р2 на 1 звено, что указывает на затрудненный синтез после включения первого нуклеотида. В случае KF и праймера Р1 также наблюдалась полоса, совпадающая по своей подвижности с праймером Р2. Таким образом, KF частично блокируется межнуклеозидной trz-связью, хотя и способен ее проходить. Фермент RVpol, отличающийся очень высокой процессивностью, показывал более высокую способность к прохождению trz-связи при использовании обоих праймеров и не демонстрировал заметных пауз при использовании праймера Р1. Напротив, ДНК-полимераза Pfu, несмотря на свое структурное сходство с RVpol, практически полностью блокировалась trz-связью в обоих режимах синтеза (рис. 3б, дорожки 6, 8), что может быть связано с субоптимальными температурными условиями (37 °С) для этого термофильного фермента. Наряду с этим в отсутствие dNTP отчетливо проявлялась экзонуклеазная активность Pfu (рис. 3б, дорожки 1, 7). Низкопроцессивная ДНК-полимераза β показывала невысокую степень удлинения праймера Р2 и блокировалась при синтезе с праймера Р1 (рис. 3а, дорожки 22, 24).

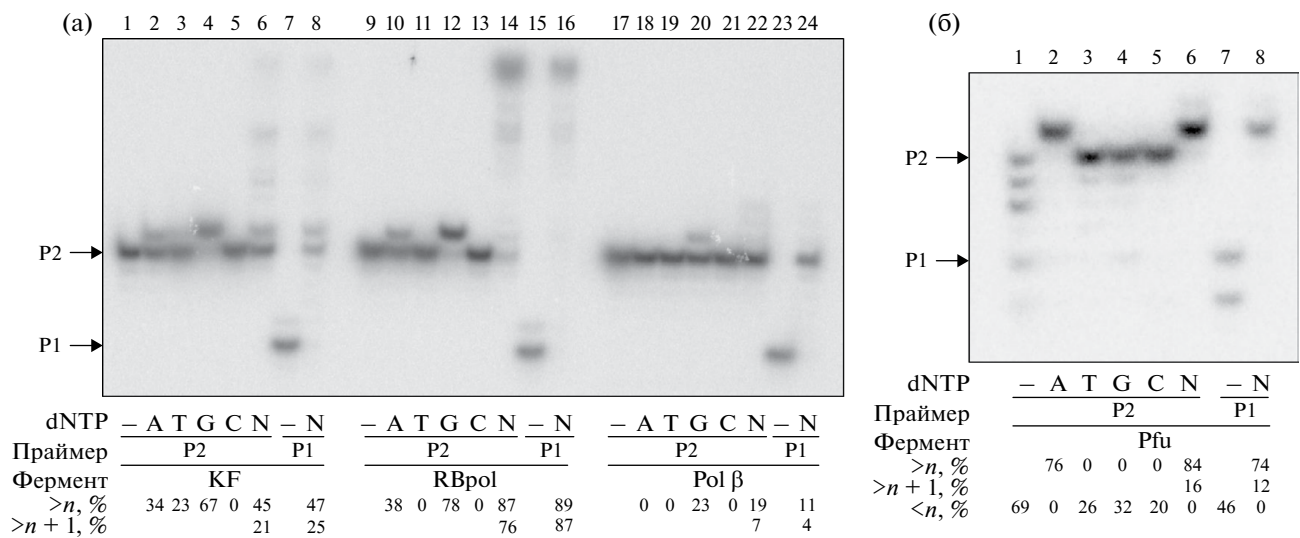


Рис. 3. Репрезентативные радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения продуктов синтеза ДНК-полимеразами KF, RBpol, Pol β (а) и Pfu (б) на матрицах с trz-связью. Реакцию вели при 37°C в течение 10 мин (20 мин для Pfu) в буфере, содержащем 50 мМ Трис–HCl (pH 7.5), 5 мМ MgCl₂ (для KF и RBpol) либо 10 мМ MgCl₂ (для Pol β), 1 мМ DTT; либо 20 мМ Трис–HCl (pH 8.8), 10 мМ KCl, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgSO₄, 0.1 %-ный Три-тон X-100 для Pfu. Концентрация ДНК-субстрата с ³²P-меченым праймером составляла 50 нМ, dNTP – 500 мкМ (индивидуальные dNTP либо их эквимольная смесь), ДНК-полимераз – 0.1 ед. акт./мкл (Pfu) либо 10 нМ (прочие полимеразы). Продукты реакции анализировали, как описано выше. P1, P2 – праймеры. Числа под изображениями отражают интенсивность полос, соответствующих включению хотя бы одного нуклеотида при прохождении через trz-связь (> n), одного нуклеотида с последующим удлинением хотя бы одного нуклеотида при прохождении через trz-связь (> n + 1) и экзонуклеолитической деградации праймера (< n).

Использование отдельных dNTP позволило выявить очень высокую частоту ошибок ДНК-полимераз при прохождении trz-связи. Поскольку в матрице в позиции, непосредственно направляющей включение, находится mC, напротив него должен включаться dGMP. В составе ДНК с обычным сахарофосфатным остовом mC узнается ДНК-полимеразами, как обычный C; так, частота ошибочного включения dAMP напротив mC (по сравнению со включением dGMP) составляет ~2.6×10⁻⁴ для KF, ~1.3×10⁻³ для RBpol и ~7.1×10⁻³ для Pol β [14–16]. Однако при наличии trz-связи полимераз RBpol, помимо dGMP, с достаточно высокой эффективностью, включала и dAMP, а полимераз Pfu – исключительно dAMP (рис. 3а, дорожки 10, 12, 3б, дорожка 2). Интересно,

что в присутствии dAMP или смеси dNTP экзонуклеазная активность Pfu не выявлялась, что указывает на повторение цикла удаления и включения dAMP напротив mC[trz] либо на подавление переноса конца праймера в экзонуклеазный центр фермента или гидролиза фосфодиэфирной связи неверно включенного нуклеотида. KF, помимо dGMP, также включал dAMP и dTMP (рис. 3а, дорожки 2–4). Лишь Pol β включала только комплементарный матрице dGMP. Эффективность включения dGMP и dAMP ферментами KF и RBpol также исследовали в режиме стационарной кинетики (табл. 2). Полученные данные в целом соответствуют сравнительным количествам продуктов, образуемых в описанных выше экспериментах, и подтверждают способность KF и RBpol

Таблица 2. Кинетические параметры включения dNMP ДНК-полимеразами при наличии межнуклеозидной триазольной связи

Фермент	dNTP	K_M , мкМ	k_{cat} , с ⁻¹ , ×10 ³	k_{sp} , мкМ ⁻¹ ·с ⁻¹ , ×10 ⁴	$k_{sp(dGTP)}/k_{sp(dATP)}$
KF	dATP	11 ± 2	1.7 ± 0.1	1.5 ± 0.3	2.7
	dGTP	12 ± 2	4.8 ± 0.2	4.0 ± 0.7	
RBpol	dATP	66 ± 21	2.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	8.5
	dGTP	82 ± 34	28 ± 5	3.4 ± 1.5	

Приведена средняя и стандартная ошибка определения коэффициентов нелинейной регрессии по 3 независимым экспериментам

проходить межнуклеозидную trz-связь в высокоошибочном режиме. При этом RVpol показывала более высокую точность (соотношение констант специфичности для правильного и неправильного включения), что было обусловлено более высокой константой скорости реакции.

Таким образом, trz-связь индуцирует поведение ДНК-полимераз KF, RVpol и Pfu, напоминающее “правило А” — предпочтительное включение dAMP (и в меньшей степени dGMP) при невозможности образовать комплементарные связи [17]. Механизмы этого явления изучены достаточно хорошо и отличаются для ДНК-полимераз суперсемейств А и В: первые подставляют вместо матричного азотистого основания консервативный остаток Туг для образования псевдокомплементарной пары в активном центре, а вторые предпочитают dAMP из-за высокой энергии стэкинга основания Ade с основанием 3'-концевого нуклеотида праймера [18, 19]. Вполне возможно, что планарная структура триазольной группы и возможность вращения вокруг ее связей с нуклеозидами с 5'- и 3'-стороны позволяет активным центрам ДНК-полимераз образовывать с ней стабилизирующие псевдокомплементарные или стэкинг-взаимодействия и включать нуклеотиды, не соответствующие следующему матричному основанию. Любопытно, что праймер Р2, 3'-конец которого находится непосредственно вблизи trz-связи, образовывал с матричной цепью 33trz более стабильный дуплекс, чем с цепью 33mC ($T_{пл} = 73.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $71.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ соответственно), что может указывать на стэкинг-взаимодействие триазольного кольца с терминальным азотистым основанием праймера. Pol β не использует механизмы стэкинга и замещения основания при прохождении неинструктивных нуклеотидов [20], что может объяснять ее относительно более высокую точность при наличии trz-связи.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что trz-связи могут быть не столь хорошо совместимы с молекулярно-генетическими процессами, как предполагалось ранее. Вероятно, они действительно не подвергаются репарации в клетках, по крайней мере по путям эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов. Однако при синтезе цепи ДНК-полимеразами разных семейств в области trz-связей могут легко возникать замены, что снижает точность сборки генов с помощью клик-лигирования и несет риск мутаций при репликации такой синтетической ДНК *in vivo*.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 21-74-10104 (биохимические эксперименты) и частично госзадаaniem ИХБФМ СО РАН (121031300056-8).

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Соблюдение этических стандартов: в данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., et al. A step-wise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective ligation of azides and terminal alkynes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, vol. 41, no. 14, pp. 2596–2599.
2. Tornøe C.W., Christensen C., and Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides, *J. Org. Chem.* 2002, vol. 67, no. 9, pp. 3057–3064.
3. Gierlich J., Burley G.A., Gramlich P.M.E., et al. Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA, *Org. Lett.*, 2006, vol. 8, no. 17, pp. 3639–3642.
4. Seela F., and Sirivolu V.R. DNA containing side chains with terminal triple bonds: Base-pair stability and functionalization of alkynylated pyrimidines and 7-deazapurines, *Chem. Biodivers.*, 2006, vol. 3, no. 5, pp. 509–514.
5. El-Sagheer A.H., Sanzone A.P., Gao R., et al. Biocompatible artificial DNA linker that is read through by DNA polymerases and is functional in *Escherichia coli*, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, vol. 108, no. 28, pp. 11338–11343.
6. Sanzone A.P., El-Sagheer A.H., Brown T., and Tavasoli A. Assessing the biocompatibility of click-linked DNA in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, 2012, vol. 40, no. 20, pp. 10567–10575.
7. Dallmann A., El-Sagheer A.H., Dehmel L., et al. Structure and dynamics of triazole-linked DNA: Biocompatibility explained, *Chemistry*, 2011, vol. 17, no. 52, pp. 14714–14717.
8. El-Sagheer A.H., and Brown T. New strategy for the synthesis of chemically modified RNA constructs exemplified by hairpin and hammerhead ribozymes, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 2010, vol. 107, no. 35, pp. 15329–15334.
9. El-Sagheer A.H., and Brown T. Efficient RNA synthesis by *in vitro* transcription of a triazole-modified DNA template, *Chem. Commun.*, 2011, vol. 47, no. 44, pp. 12057–12058.
10. Rothwell P.J., and Waksman G. Structure and mechanism of DNA polymerases, *Adv. Protein Chem.*, 2005, vol. 71, pp. 401–440.

11. Endutkin A.V., Yudkina A.V., Zharkov T.D., et al. Recognition of a clickable abasic site analog by DNA polymerases and DNA repair enzymes, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, vol. 23, no. 21, 13353.
12. Ishchenko A.A., Ide H., Ramotar D., et al. α -Anomeric deoxynucleotides, anoxic products of ionizing radiation, are substrates for the endonuclease IV-type AP endonucleases, *Biochemistry*, 2004, vol. 43, no. 48, pp. 15210–15216.
13. Du X., Yang Z., Xie G., et al. Molecular basis of the plant ROS1-mediated active DNA demethylation, *Nat. Plants*, 2023, vol. 9, no. 2, pp. 271–279.
14. Shen J.-C., Creighton S., Jones P.A., and Goodman M.F. A comparison of the fidelity of copying 5-methylcytosine and cytosine at a defined DNA template site, *Nucleic Acids Res.*, 1992, vol. 20, no. 19, pp. 5119–5125.
15. Zahn K.E., Averill A., Wallace S.S., and Doublié S. The miscoding potential of 5-hydroxycytosine arises due to template instability in the replicative polymerase active site, *Biochemistry*, 2011, vol. 50, no. 47, pp. 10350–10358.
16. Howard M.J., Foley K.G., Shock D.D., et al. Molecular basis for the faithful replication of 5-methylcytosine and its oxidized forms by DNA polymerase β , *J. Biol. Chem.*, 2019, vol. 294, no. 18, pp. 7194–7201.
17. Taylor J.-S. New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions, *Mutat. Res.*, 2002, vol. 510, no. 1–2, pp. 55–70.
18. Obeid S., Baccaro A., Welte W., et al. Structural basis for the synthesis of nucleobase modified DNA by *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 2010, vol. 107, no. 50, pp. 21327–21331.
19. Xia S., Vashishtha A., Bulkley D. et al. Contribution of partial charge interactions and base stacking to the efficiency of primer extension at and beyond abasic sites in DNA, *Biochemistry*, 2012, vol. 51, no. 24, pp. 4922–4931.
20. Beard W.A., Shock D.D., Batra V.K. et al. DNA polymerase β substrate specificity: Side chain modulation of the “A-rule”, *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, no. 46, pp. 31680–31689.

ERROR-PRONE DNA SYNTHESIS ON CLICK-LIGATED TEMPLATES

A. V. Endutkin¹, A. O. Yakovlev^{1, 2}, V. M. Golyshev¹, T. D. Zharkov¹,
A. V. Yudkina¹, Corresponding Member of the RAS D. O. Zharkov^{1, 2, #}

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russian Federation*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation*

[#]*e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru*

Click ligation is a technology of joining DNA fragments based on azide–alkyne cycloaddition. In the most common variant, click ligation introduces a 4-methyl-1,2,3-triazole (trz) group instead of the phosphodiester bond between two adjacent nucleosides. While this linkage is believed to be biocompatible, little is known about the possibility of its recognition by DNA repair systems or its potential for DNA polymerase stalling and miscoding. Here we report that trz linkage is resistant to several human and bacterial endonucleases involved in DNA repair. At the same time, it strongly blocks some DNA polymerases (Pfu, DNA polymerase β) while allowing bypass by others (phage RB69 polymerase, Klenow fragment). All polymerases except for DNA polymerase β showed high frequency of misinsertion at the trz site, incorporating dAMP instead of the next complementary nucleotide. Thus, click ligation may be expected to produce a large amount of errors if used in custom gene synthesis.

Keywords: click chemistry; DNA polymerases; replication; mutations; DNA repair; AP endonucleases.