

УДК 577.212.3, 577.15.08, 577.2.08

КАНАЛЬНЫЕ И МОТОРНЫЕ БЕЛКИ ДЛЯ ТРАНСЛОКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ТЕХНОЛОГИИ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Д.В. Баркова*, М.С. Андрианова, Н.В. Комарова, А.Е. Кузнецов

(Научно-производственный комплекс «Технологический центр»; *e-mail: daria.barkhova@gmail.com)

Рассматриваются используемые в нанопоровом секвенировании каналные белки, их модификации, а также вспомогательные белки, регулирующие процесс транслокации нуклеиновой кислоты. В процессе нанопорового секвенирования расшифровка первичной структуры анализируемой ДНК или РНК осуществляется при транслокации молекулы нуклеиновой кислоты через интеркалированную в мембрану нанопору. Нанопора представляет собой белковый трансмембранный канал, проницаемый для воды, низкомолекулярных ионов и одноцепочечной ДНК или РНК.

Ключевые слова: нанопоровое секвенирование, органическая нанопора, трансмембранный белок, моторный белок.

Возможность использовать белковые трансмембранные каналы для детекции ДНК была впервые продемонстрирована в 1996 г. [1], а первые версии коммерческого нанопорового секвенатора были анонсированы только в 2012 г. компанией «Oxford Nanopore» [2]. При этом первые версии коммерчески доступных нанопоровых секвенаторов допускали большое число ошибок [3, 4], что требовало дальнейших улучшений как самой технологии секвенирования, так и алгоритмов обработки сырых данных. В последние годы удалось достичь значительного повышения качества прочтений и производительности нанопоровых секвенаторов. Они стали более применимы для решения широкого спектра научных задач [5, 6], в том числе для прямого секвенирования РНК [7], поиска модифицированных оснований [8] и крупных хромосомных перестроек [9]. При этом помимо представленной на рынке линейки секвенаторов «Oxford Nanopore» в настоящее время активно продолжают изучаться другие нанопоровые системы для чтения первичной структуры нуклеиновых кислот.

Нанопоровый секвенатор представляет собой ячейку, заполненную буфером и разделенную липидной мембраной на два отсека, которые сообщаются друг с другом через одиночную пору, проницаемую для воды, ионов и оцДНК (РНК) (рис. 1). Под действием напряжения, прикладываемого к электродам, через нанопору в мембране начинает протекать ионный ток. Изменение силы тока ионов при фиксированном напряжении можно рассматривать как измеряемый сигнал. Когда

анализируемая молекула нуклеиновой кислоты попадает в нанопору, она занимает свободное пространство, препятствуя прохождению других ионов. Возможность распознавания отдельного нуклеотида в цепи связана с разной способностью блокировать ионный ток отдельным нуклеотидом. По мере того как оцДНК транслоцируется через поры, ток ионного канала уменьшается на величину, составляющую до ~90% от значения тока открытого канала [10, 11]. Таким образом регистрируется электрофоретическая транслокация ДНК (РНК) через одиночный трансмембранный канал. Продолжительность прохождения ДНК (РНК) сквозь пору служит мерой длины нуклеиновой кислоты. Зависимость изменения тока от времени, зарегистрированная во время транслокации отдельной молекулы ДНК, теоретически может иметь четыре различных уровня блокады тока, каждый из которых соответствует одному из четырех оснований: аденин (А), тимин (Т), гуанин (G) и цитозин (С). Идентификация соответствующих значений силы тока, их положение на временной шкале и продолжительность могут быть декодированы в первичную нуклеотидную последовательность [1].

С точки зрения структуры канала чувствительность детекции определяется следующими параметрами: наименьшим диаметром канала (далее чувствительный или считывающий участок), продолжительной длиной наиболее узкого участка канала, а также числом таких чувствительных участков [12]. Чем ближе диаметр поры к реальному размеру детектируемой молекулы, тем сильнее меня-

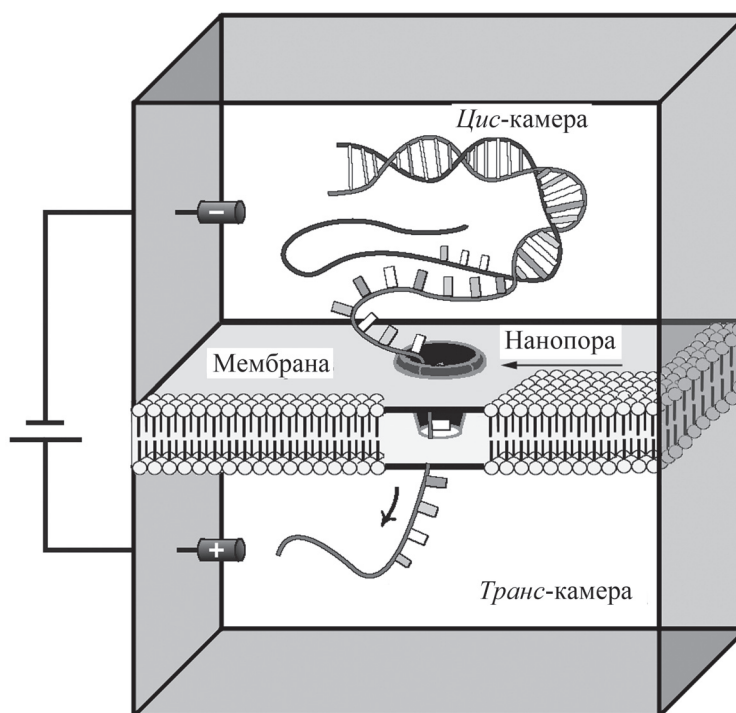


Рис. 1. Схема нанопорового секвенирования

ется пропускная способность поры для ионов при транслокации нуклеиновой кислоты, а чем короче чувствительный участок канала, тем выше разрешение выходного сигнала. Кроме того, применяемый для нанопорового секвенирования трансмембранный белок должен быть способен к самосборке и интеркаляции в мембрану, а также как можно дольше сохранять работоспособность в условиях работы секвенатора [13].

Помимо разработки архитектуры трансмембранного канала, значительную проблему представляет большая скорость прохождения нуклеиновой цепи через пору (1–3 мкс/основание), которая существенно ограничивает разрешающую способность нанопорового секвенирования и не может обеспечить достаточное соотношение сигнал/шум для идентификации единичного основания [14]. Для уменьшения скорости транслокации наибольшее распространение получил подход с использованием моторных белков, которые при взаимодействии с нуклеиновой кислотой вблизи поры замедляют ее прохождение.

В настоящее время можно выделить следующие направления исследований, направленных на улучшение технологии нанопорового секвенирования с использованием белковых пор: поиск трансмембранных каналов с подходящей архитектурой и свойствами, генная инженерия известных канальных белков, поиск и исследование вспомогательных (моторных) белков и систем на их ос-

нове, подбор физических условий для снижения скорости транслокации.

Белковые трансмембранные каналы, применяющиеся для нанопорового секвенирования

Альфа-гемолизин. Возможность транслокации ДНК через белковую пору впервые продемонстрирована на α -гемолизине [15–17]. В природе это порообразующий токсин, секретлируемый бактерией *Staphylococcus aureus*. Он вызывает лизис клеток, встраиваясь в мембраны и нарушая их целостность [18]. Интеркалированный в мембрану α -гемолизин представляет собой гомогептамер грибовидной формы, состоящий из двух структурных доменов: гидрофильного кэп-домена на цис-стороне мембраны и мембранного домена, образованного β -бочонком из 14 антипараллельных тяжей [19] (рис. 2, а). Собранный олигомерный канал стабилизирован ионными, водородными и гидрофобными связями, благодаря чему сохраняет стабильную конформацию вплоть до 100 °С в широком диапазоне рН раствора [20]. Структура канала с узким участком диаметром 1,4 нм, способность белка к самосборке, интеркаляции в мембрану, а также стабильность в широком диапазоне условий сделали α -гемолизин идеальным модельным нанопоровым каналом для изучения эффекта транслокации ДНК. Однако из-за протяженности чувствительного региона в

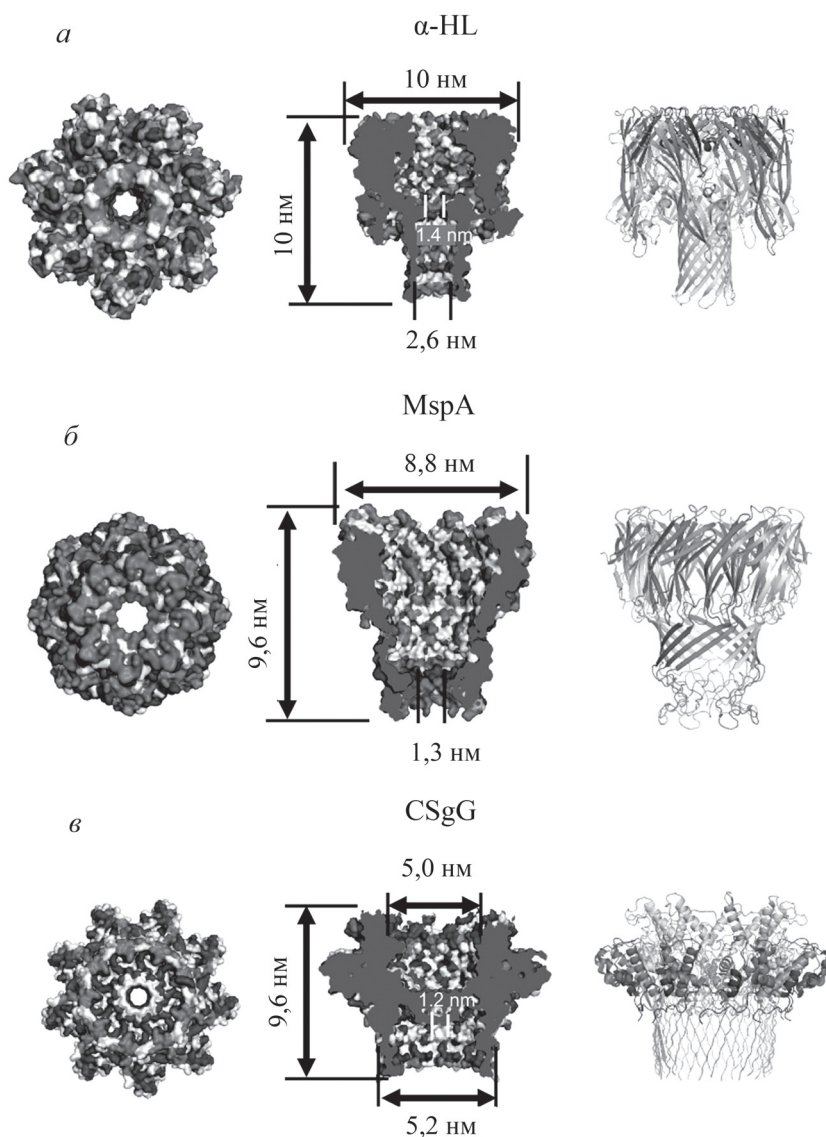


Рис. 2. Структура белков, используемых для нанопорового секвенирования (вид снизу, поперечное сечение и вид сбоку [21]): *a* – α -гемолизин (PDB: 3ANZ); *б* – порин А *Mycobacterium smegmatis* (PDB: 1UUN); *в* – CsgG (PDB: 4UV3)

5,2 нм (эквивалент длины цепи из 12 нуклеотидов) и высокой скорости транслокации ДНК через пору (1–3 мкс/нт) [19] α -гемолизин дикого типа не подходит для использования в технологии нанопорового секвенирования. В связи с этим был проведен ряд исследований по его модификации в целях улучшения архитектуры канала.

Для α -гемолизина наиболее удачной оказалась модификация E111N/K147N/M113Y. В полученной мутантной форме α -гемолизина заряженные аминокислоты узкого сегмента удалены и пора расширена до 1,8 нм. Из-за расширения поры в канале формируются дополнительные сайты распознавания нуклеотидов ниже первоначального, на которых также можно детектировать существенное ограничение проходящего

тока [22]. Кроме того, мутант с заменой в положении 113 способен эффективно взаимодействовать с адаптером (β -циклодекстрином) с формированием более узкого сайта детекции нуклеотидов [23]. β -Циклодекстрин – циклический семичленный олигосахарид, который нековалентно взаимодействует с аминокислотными остатками канала и существенно сужает просвет поры (приблизительно до 0,66 нм) [23]. С помощью этого гибридного канала удалось добиться лучшего для α -гемолизина разрешения между всеми нуклеотидами ДНК [24] и дискриминации эпигенетически модифицированных нуклеотидов ДНК – 5-метилцитозина и 5-гидроксиметилцитозина [8]. Более того, с помощью этого мутанта удалось провести секвенирование РНК

с идентификацией помимо четырех стандартных нуклеотидов РНК (гуанин, цитозин, аденин и урацил) модифицированных рибонуклеиновых оснований: инозина, N(6)-метиладенозина и N(5)-метилцитозина [25, 26].

Трансмембранный порин из *Mycobacterium smegmatis* (MspA). Трансмембранный порин из *Mycobacterium smegmatis* формирует в мембране бактерии канал, проницаемый для гидрофильных молекул и ионов, в том числе нутриентов [27]. Как и гемолизин, он стабилен в разных условиях (сохраняет активность в диапазоне pH от 0 до 14 после получасовой экстракции при 100 °С, а также в течение пятнадцатиминутной инкубации в 2%-м SDS при 80 °С [28]), способен к самосборке и интеркаляции в мембрану [29]. Канал представляет собой октамер и аналогично гемолизину состоит из двух структурных доменов: мембранного β -бочонка и гидрофильного кэп-домена с укладкой типа β -сэндвич (рис. 2, б). Наиболее узкий участок канала – транс-ворота диаметром порядка 1,2 нм. Протяженность этого участка канала составляет около 3,7 нм [29], что в полтора раза меньше протяженности чувствительного участка канала α -гемолизина. Таким образом, в чувствительном участке канала в момент транслокации находятся около четырех нуклеотидов. Для свободного канала белка дикого типа характерны спонтанные блокады при потенциале >60 мВ. Для решения этой проблемы спроектирован мутантный белок D90N/D91N/D93N, у которого отрицательно заряженные аспартаты заменены аспарагинами в зоне сужения поры [30]. Кроме того, в вестибуле канала отрицательно заряженные аминокислотные остатки заменены положительными (D118R/D134R/E139K), благодаря чему увеличивается скорость захвата ДНК порой. Это позволяет уменьшить минимальную концентрацию аналита приблизительно в 100 раз [31]. Для канала прописан профиль сигнала, соответствующий всем возможным комбинациям олигонуклеотидов цепи ДНК, находящихся одновременно в чувствительном отделе канала [27]. Скорость транслокации молекул нуклеиновых кислот сквозь MspA выше, чем в случае α -гемолизина. Это обусловлено архитектурой канала с достаточно широким вестибулем и коротким сужением, а также отсутствием в поровом сужении положительных зарядов [30], поэтому для канала, сформированного MspA, особенно актуальна проблема замедления транслокации. Канал MspA в качестве нанопоры показывает большую дисперсию сигналов для разных нуклеотидов, чем при использовании α -гемолизина [32].

Мутантный MspA также способен дискриминировать модификации ДНК – 5-метилцитозин и 5-гидроксиметилцитозин [33].

Бактериальный амилоид-секретирующий канал (CsgG). Канал CsgG формируется во внешней мембране некоторых штаммов энтеробактерий и является частью системы экскреции во внешнюю среду белковых фибрилл (curli), используемых для формирования матрикса биопленок бактериальных сообществ [34, 35]. CsgG – гомономерный трансмембранный канал с пороформирующим β -бочонком и короной α -спиралей, обращенных в периплазматическое пространство. Канал, имеющий структуру β -бочонка, содержит 36 трансмембранных тяжей и представляет собой самую крупную известную структуру такого типа (рис. 2, в). При этом в средней части канала в полость поры обращены выпетливания полипептидных цепей мономеров, формирующие узкое кольцо в поре диаметром 1,2 нм и длиной ~2 нм [36]. Рабочие версии коммерческих нанопоровых секвенаторов, разработанных компанией «Oxford Nanopore», с 2016 г. содержат в качестве нанопоры модифицированный CsgG [6, 37], который используют под кодовым названием R9.4. Согласно релизу компании, мутантный канал выбран в результате скрининга 1200 различных вариантов [38], но итоговая структура белка не раскрывается.

Другие трансмембранные каналы, способные к транслокации оцДНК

В последнее время были описаны еще несколько белков, которые можно считать потенциально перспективными каналами для нанопорового секвенирования. Однако их еще не использовали для определения первичной структуры нуклеиновых кислот.

Аэролизин. Аэролизин, как и α -гемолизин, является порообразующим токсином, формирующим в мембране канал структуры типа β -бочонка, но не содержит сужающегося вестибуля, поэтому доступен для диффузии различных аналитов [39] (рис. 3, б). Изначально аэролизин использовался для детекции пептидов [40–42], однако показана способность этого соединения детектировать олигонуклеотидные молекулы [43]. Предполагается, что в результате модификаций аэролизин будет способен дискриминировать нуклеотиды, входящие в состав анализируемой молекулы нуклеиновой кислоты [44].

ДНК-упаковывающий моторный белок бактериофага phi29. Известен ряд работ с исполь-

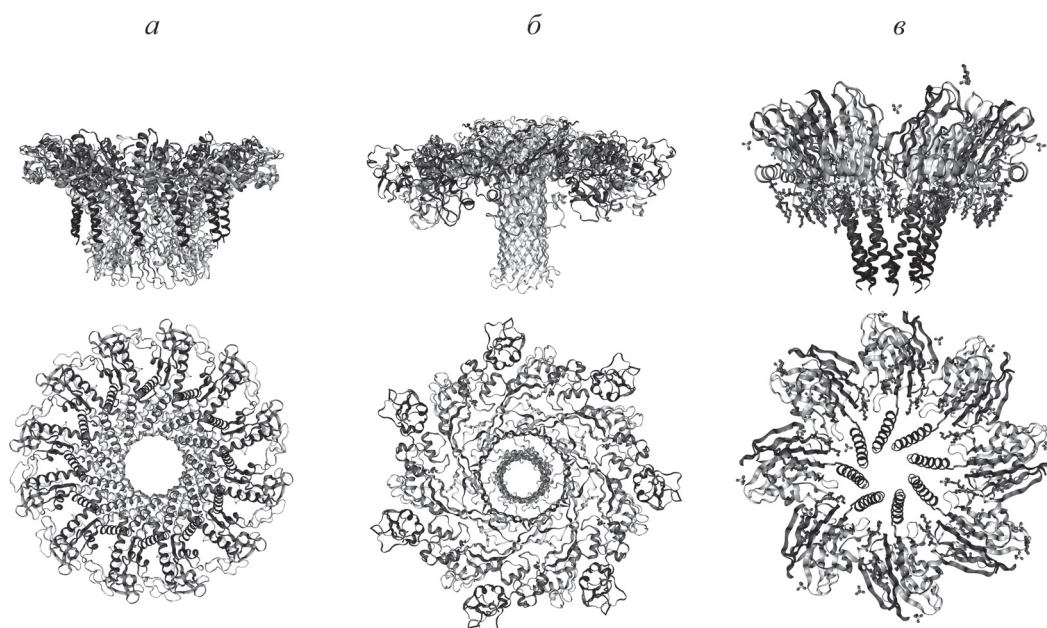


Рис. 3. Структура трансмембранных белков – кандидатов для нанопорового секвенирования: *a* – ДНК-упаковывающий мотор бактериофага phi29 (PDB: 1IJG); *б* – аэролизин (PDB: 5JZT); *в* – Fragaceatoxin C (PDB: 4TSY)

зованием в качестве биологической нанопоры упаковывающего моторного белка вируса phi29 [45, 46] (рис. 3, *a*). Этот стабильный белковый комплекс [47] связывает хвост и капсид фага, отвечая за транслокацию генома фага в капсид в процессе сборки. Транслокация ДНК в нативном вирусе опосредуется гидролизом АТФ и протекает со скоростью примерно 5–10 мс/нп [48]. Белок вируса представляет собой тороидальный канал диаметром около 3,6 нм, состоящий из двенадцати субъединиц, собранных в пропеллерообразную четвертичную структуру. Внутренняя поверхность канала несет в основном отрицательный заряд, за исключением двух лизиновых колец, расположенных на расстоянии 2 нм друг от друга [49]. Наличие гидрофобного наружного пояса позволяет встраивать канал в липидную мембрану путем последовательного включения белка в липосому и слияния липосомы с мембраной [45]. Внедренный в мембрану моторный белок phi29 – первый пример нанопоры, которая не является ни ионным каналом, ни мембранным белком. Диаметр поры в 3,6 нм не позволяет использовать его нативную форму для секвенирования одноцепочечной ДНК или РНК, тем не менее, белок phi29 применялся для анализа двухцепочечных молекул ДНК и нуклеопротеинов [45, 50]. Реинжиниринг канала в результате удаления внутренней петли дает возможность получить пору на 60% уже, чем у белка дикого типа. Для такого мутантного канала показана способность детектировать транслокацию одноцепочечных нуклеиновых кислот в режиме реального времени на уровне олигонуклеотида [51].

кислот в режиме реального времени на уровне олигонуклеотида [51].

Порообразующий токсин морских анемонов

Для детекции ДНК использовали гемолитический порообразующий токсин морских анемонов (Fragaceatoxin C, FraC) [52], структура которого была разрешена в 2015 г. [53] (рис. 3, *в*). Канал FraC представляет собой воронкообразную октамерную структуру, образованную трансмембранными α -спиралями [53] с *цис*-вестибюлем диаметром 5,5 нм и *транс*-вестибюлем диаметром 1,2 нм. Водорастворимые мономеры FraC олигомеризуются в липосоме только в присутствии сфингомиелина, после чего липосома может быть диссоциирована в билипидной мембране [52]. Канал, формируемый белком дикого типа, не способен транслоцировать ДНК из-за отрицательного заряда аспартата в области сужения поры, но для его мутантной формы D10R/K159E показана способность транслоцировать ДНК. В D10R отрицательный заряд поры замещен на положительный, а K159E представляет собой случайную компенсирующую мутацию, возвращающую мутанту FraC D10R способность к формированию трансмембранных пор [52]. Значения сдвига ионного тока для полинуклеотидов аденина, тимина и цитозина различаются, что позволяет дискриминировать нуклеотиды при их транслокации сквозь канал (авторам [52] не удалось протестировать гуаниновые

олигонуклеотиды из-за образования стабильных вторичных структур). Кроме того, канал проницаем для двухцепочечной ДНК, что можно объяснить упругой деформацией канала при транслокации молекулы дцДНК [52].

Таким образом, в последние годы под нанопоровые структуры удалось адаптировать принципиально новые белки, в том числе с α -спиральной организацией канала вместо β -бочонков, и даже те белки, которые не являются в принципе трансмембранными структурами в природе.

Моторные белки, используемые для изменения скорости транслокации нуклеиновой кислоты

Как указывалось ранее, ни один из описанных каналов, применяемых для нанопорового секвенирования, не позволяет достичь достоверного определения последовательности секвенируемой ДНК (РНК). Это обусловлено в первую очередь небольшой разницей в степени блокады ионного тока различными нуклеотидами (<10%) [54] и высокой скоростью транслокации при стандартных электрофоретических условиях (приблизительно +100 мВ). Коррекция физических условий транслокации дает положительный результат (например, повышение вязкости раствора [55], снижение температуры [11], добавление органических солей [56]), однако при этом транслокация замедляется недостаточно. Наиболее эффективным способом замедления и контроля транслокации ДНК для нанопорового секвенирования с однонуклеотидным разрешением оказалось использование вспомогательных моторных белков [57, 58].

Моторный белок связывается с оцДНК/РНК в растворе и взаимодействует с порой как комплекс белок – субстрат. При этом олигонуклеотидная нить протягивается через пору медленнее по мере того, как белок взаимодействует с цепью, и именно скорость взаимодействия ДНК с белком определяет скорость транслокации. Кроме того, вместо непрерывного движения нитей оцДНК/РНК через поры ферментативный контроль может производить прерывистое движение, при котором нуклеотид делает остановку в поре, что позволяет получить более точный сигнал, создаваемый каждым основанием. Для использования в нанопоровом секвенировании моторные белки должны оставаться активными, работая и при высоком напряжении (+100–180 мВ), и в высокомолярных солевых растворах (100 мМ – 1 М), поскольку измеряемый сигнал зависит от концентрации соли [59].

Одной из первых попыток контролировать транслокацию ДНК через пору стало перемещение биотинсодержащей ДНК через пору α -гемолизина и модифицированного α -гемолизина E111N/K147N [24]. Для остановки полной транслокации ДНК в *транс*-пространство использовали комплекс биотина и стрептавидина, который в силу своих размеров не мог пройти через пору. Такой подход обеспечивает лучшее разрешение гомополимерных последовательностей благодаря длительному по времени наблюдению за последовательностью нуклеотидов, находящихся в поре. На основании вышеизложенного было высказано предположение, что центральное сужение, содержащее остатки Lys-147, Glu-111 и Met-113, образует один из сайтов узнавания нуклеотидов при прохождении ДНК через пору α -гемолизина.

Исследователи обнаружили, что связывание экзонуклеазы I *Escherichia coli* (ExoI) с оцДНК (при условии, что фермент неактивен в связи с отсутствием в среде ионов Mg^{2+}) замедляет транслокацию цепи в поре α -гемолизина примерно в 6 раз [60]. Отдельно следует отметить, что была показана способность фермента связываться с ДНК с достаточной силой в условиях эксперимента, несмотря на то, что комплекс ExoI – ДНК диссоциировал через несколько миллисекунд после захвата нанопорой.

Позже в работе [61] было продемонстрировано, что модифицированная β -циклодекстрином пора α -гемолизина способна различать отдельные dNMP (с последующим анализом их количественного соотношения), полученные путем расщепления оцДНК под действием ExoI в растворе. Несмотря на достаточно успешные эксперименты с экзонуклеазой ее дальнейшее использование для секвенирования ДНК было отложено. Во-первых, исходная последовательность необратимо разрушается и не может быть использована повторно для множественных прочтений. Во-вторых, для секвенирования требуется точная последовательная подача отдельных нуклеотидов в поры, что в силу броуновского движения сложно реализовать [62].

Другим моторным белком, работающим в условиях транслокации ДНК, оказался фрагмент Кленова из *Escherichia coli*. ДНК-полимераза I из *E. coli*, обработанная субтилизином, распадается на несколько фрагментов, один из которых – фрагмент Кленова (полимераза семейства A), который сохраняет 5'–3'-полимеразную активность, но не обладает 5'–3'-экзонуклеазной активностью [63].

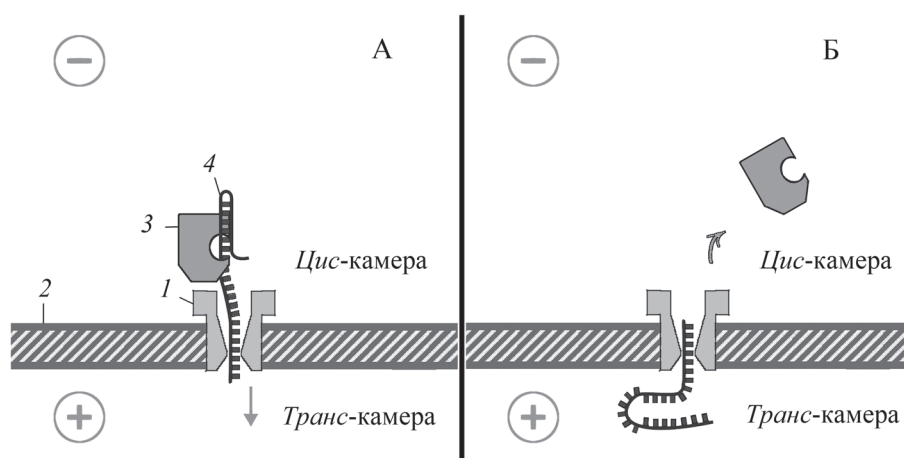


Рис. 4. Схематическое изображение комплекса фрагмента Кленова с оцДНК, частично транслоцированной в нанопору (А), и диссоциации комплекса с последующей полной транслокацией ДНК (Б). Обозначения: 1 – α -гемолизин (нанопора), 2 – билипидный слой, 3 – фрагмент Кленова, 4 – оцДНК-матрица в виде шпильки

Кинетические исследования фрагмента Кленова показали, что он распознает двухнитевой участок дцДНК/оцДНК с образованием бинарного комплекса (рис. 4), к которому затем присоединяется дезоксирибонуклеозид трифосфат (dNTP) с образованием тройного комплекса [64].

В работе [65] показано, что фрагмент Кленова образует комплекс с ДНК (с двуцепочечным участком оцДНК в виде шпильки) в отсутствие необходимых для полимеразной реакции ионов Mg^{2+} . Комплекс ДНК – фрагмент Кленова в присутствии dNTP замедляет транслокацию оцДНК через пору α -гемолизина приблизительно в 100 раз. Продемонстрирована возможность различать изменение уровней тока при прохождении через пору оцДНК, а также оцДНК в составе бинарных комплексов ДНК – фрагмент Кленова (рис. 4) и оцДНК в составе тройных комплексов ДНК – фрагмент Кленова – dNTP.

Авторы [66] впервые наблюдали полимеразную реакцию – до 9 последовательно катализируемых фрагментом Кленова удлинений с высокой чувствительностью и пространственным разрешением ($\leq 2,4 \text{ \AA}$). В качестве матрицы использовали зафиксированную в пору α -гемолизина оцДНК (в *цис*-камере находится праймер, в *транс*-камере – стрептавидин). В режиме полимеразной реакции (разница потенциалов *цис*-/*транс*-камера -30 мВ) фрагмент Кленова обеспечивает удлинение праймера только в присутствии определенного dNTP, комплементарного матрице. В режиме измерения удлинения (разница потенциалов *цис*-/*транс*-камера $+40 \text{ мВ}$) определяли изменения ионного тока, обусловленные произошедшим удлинением: дуплекс матрица / удлиненный праймер не проходит внутри узкого канала поры, каждое удлинение

праймера останавливает дуплекс на новом расстоянии от узкого канала поры. При таком подходе происходит детекция результата полимеразной реакции, но не сам каталитический цикл. Однако полученные результаты служат важным доказательством того, что полимеразная реакция возможна в условиях работы нанопорового секвенатора.

Использование нанопор α -гемолизина позволило провести успешные исследования кинетики связывания фрагмента Кленова с ДНК [67]. Установлена зависимость времени пребывания цитозинсодержащей оцДНК в поре от концентрации dGTP и фрагмента Кленова [68], получены сведения об уровне токов для областей сахаро-фосфатного остова без оснований (abasic regions) в комплексах ДНК – фрагмент Кленова [69].

Эти эксперименты имеют ценность для понимания механизма активности фрагмента Кленова. Однако для секвенирования в реальном времени требуется разработка надежных средств защиты, способных предотвратить удлинение или расщепление матриц ДНК до начала транслокации. Решение этой задачи найдено путем использования блокирующего олигомера, комплементарного оцДНК-матрице (5'-конец матрицы оставался свободным для захвата и частичной транслокации порой) и содержащего 7 некомплементарных оснований (цитозин) на 3'-конце (что способствовало последующей дегибридации). Олигомер располагается смежно с праймером через зазор (nick gap). Авторы [57] установили, что в этом случае не происходит репликации ДНК фрагментом Кленова и T7 ДНК-полимеразой в объеме раствора (по крайней мере, в течение 10 мин для содержащего диакридин блокирующего олигомера).

Попадая в пору α -гемолизина, блокирующий олигомер дегибридизовался от ДНК-матрицы из-за пространственных ограничений поры и действующего напряжения (+160 мВ). Комплекс ДНК – матрица/праймер сохранялся в нанопоре неопределенно долго, что позволило зафиксировать ДНК-матрицу в поре и гибридизовать ее транслоцированный 5'-конец в *транс*-камере с комплементарным зондом (+45 мВ). Как только ДНК-матрица фиксировалась подобным образом в поре, мембранный потенциал изменяли с +45 мВ на –20 мВ. Это привело к отдалению комплекса ДНК – матрица/праймер от входа в пору в объем раствора, где дуплекс связывается с полимеразой (рис. 5). Далее авторы [57] представили два подхода к детектированию результатов полимеразной реакции:

– подход, описанный ранее в [66], с определением результата полимеразной реакции при инверсиях напряжения в *цис*-/*транс*-камерах;

– подход с наблюдением полимеразной реакции в реальном времени с постоянным положительным напряжением в *транс*-камере (в данном случае полимеразы вытягивает ДНК обратно из поры, противодействуя внешнему напряжению). Фрагмент Кленова последовательно добавлял нуклеотиды только при контролируемых инверсиях напряжения.

Активность Т7 ДНК-полимеразы можно было наблюдать в реальном времени при постоянном напряжении +80 мВ в *транс*-камере. Среднее время паузы оцДНК-матрицы в поре, вызванное добавлением 300 мкМ dGTP для удлинения под действи-

ем Т7 ДНК-полимеразы было заметно меньше (16,7 мс), чем для комплексов фрагмента Кленова при той же концентрации dGTP (300 мс). Авторы [57] также отметили, что бинарные комплексы дцДНК-Т7 и ДНК-полимеразы лабильны в условиях эксперимента при концентрации КСl 300 мМ. Это подтверждается ранее известной информацией об активности данного фермента [69, 70]. Различия в поведении двух полимераз семейства А могут быть обусловлены свойствами, связанными с их функциональными ролями *in vivo*, где Т7 ДНК-полимераза проявляет себя как высокопроцессивный репликативный фермент, а фрагмент Кленова является менее процессивным репаративным ферментом [71]. Однако важным результатом проделанных экспериментов стала возможность наблюдения полимеразной реакции в реальном времени, что в перспективе секвенирования дает новый толчок для использования полимераз.

Проблемы, связанные со стабильностью и процессивностью фрагмента Кленова и полимеразы Т7, побудили исследователей заменить эти полимеразы на ϕ 29 ДНК-полимеразу [72].

ϕ 29 ДНК-полимераза (~66,5 кДа, полимеразы семейства В) обладает 5'-3'-полимеразной и 3'-5'-экзонуклеазной активностью [73]. Образование бинарных комплексов полимеразы с ДНК-субстратами может осуществляться в отсутствие двухвалентных катионов, необходимых для проявления ее активности, которая не наблюдается при 1 мМ ЭДТА в отсутствие Mg^{2+} [74]. Высокая процессивность (синтезирует до 70 кб [74]) и проч-

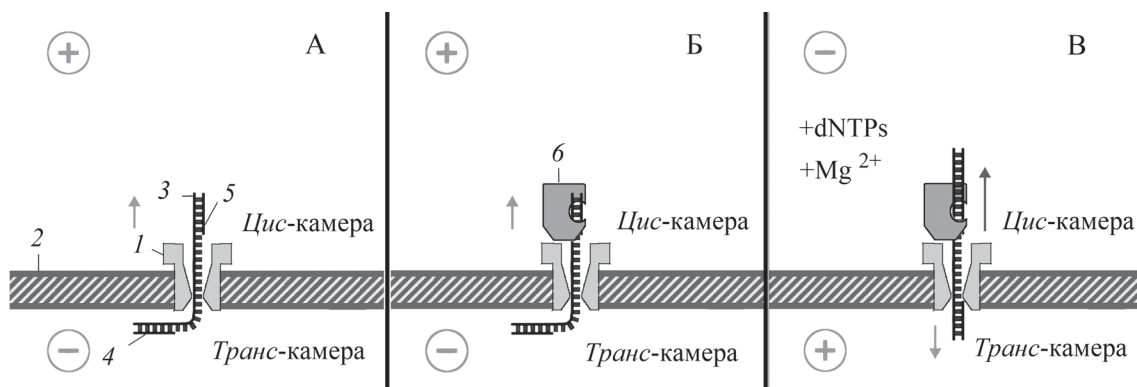


Рис. 5. Схематическое изображение для Т7 ДНК полимеразы, синтезирующей вторую цепь на основе зафиксированной в нанопоре α -гемолизина оцДНК-матрицы: А – зафиксированная в нанопоре оцДНК-матрица, напряжение инверсировано, комплекс оцДНК-матрица/праймер под действием напряжения (короткая стрелка) уходит в объем раствора для связывания с полимеразой; Б – связывание комплекса оцДНК-матрица/праймер с полимеразой; В – инверсия напряжения, на ДНК действуют сила притяжения в *транс*-камеру под действием напряжения (короткая стрелка) и сила действия полимеразы (длинная стрелка), вытягивающая ДНК из поры в *цис*-камеру. Обозначения: 1 – α -гемолизин (нанопора), 2 – билипидный слой, 3 – оцДНК-матрица, 4 – комплементарный матрице олигомер в транс-камере, 5 – праймер, 6 – Т7 ДНК полимеразы

ные ДНК-связывающие свойства phi29 ДНК-полимеразы позволили предположить, что она перспективна для контроля транслокации ДНК в нанопоре α -гемолизина [72]. В ходе своего исследования авторы [72] использовали экзонуклеазную активность phi29 ДНК-полимеразы. Во-первых, они обнаружили, что 3'-Н-концевой субстрат оцДНК (структура – шпилька, 5'-конец не гибридизован) отщепляется медленнее в объеме раствора, чем 3'-ОН-концевой субстрат (в отсутствие dNTP, но при наличии ионов Mg^{2+}). Эта функция обеспечивает временную защиту (~20 мин) ДНК в растворе от деградации и дает время для захвата порой комплексов ДНК-phi29 и ДНК-полимеразы при сохранении исходного праймера. При наличии / добавлении dNTP реакция полимеризации начинает преобладать над деградацией [75, 76]. Авторы [72] наблюдали элонгацию ДНК-матрицы под действием phi29 ДНК-полимеразы в режиме реального времени, детектируя вытягивание оцДНК из поры по мере прохождения синтеза над порой при высоком положительном напряжении (до +200 мВ) в *транс*-камере. В результате скорость перемещения оцДНК в пору снизилась в 10 000 раз по сравнению со свободно перемещающейся ДНК.

Таким образом, комплексы phi29 ДНК-полимеразы с ДНК остаются стабильными при высоком напряжении, при этом сохраняется синтетическая активность фермента при нагрузках до 37 пН [74, 77], что достаточно для противодействия электрофоретической силе, необходимой для продвижения ДНК через поры. Это отличает комплексы phi29 ДНК-полимеразы с ДНК от T7 ДНК-полимеразы, которая с трудом сохраняется поверх поры даже при более низком напряжении. Показано, что комплексы phi29 ДНК-полимеразы с ДНК на 3–4 порядка стабильнее (время жизни ~20 с), чем комплексы фрагмента Кленова с ДНК (время жизни миллисекунды) при захвате в электрическом поле (+180 мВ) нанопорой α -гемолизина.

Результаты этого исследования показали, что phi29 ДНК-полимераза имеет свойства, подходящие для перемещения длинных нитей ДНК через наноразмерные поры со скоростью, совместимой с идентификацией оснований. Однако такой подход обеспечивает только 20 мин для захвата ДНК из объемной фазы до начала ее деградации, что недостаточно для секвенирования в коммерческом устройстве.

Позже, используя пору α -гемолизина и phi29 ДНК-полимеразу, авторы [58] предложили стратегию, позволяющую проводить и детектировать

прямую (*цис*- → *транс*-направление) и обратную (*транс*- → *цис*-направление) транслокации оцДНК (рис. 6). Стратегия подразумевает использование комплементарных оцДНК-матрицы дидезокси 3'-Н-концевого праймера и блокирующего олигомера, примыкающего к праймеру. Матрица оцДНК перемещается как в прямом направлении (средняя скорость 400 мс/нт): 5'-3'-направление через нанопору под действием приложенного напряжения, при этом комплементарный блокирующий олигомер удаляется, так и в обратном направлении (средняя скорость 25 мс/нт): 5'-3'-направление через нанопору при начале репликации под действием phi29 ДНК-полимеразы в *цис*-камере рядом с порой. И хотя исследователям удалось замедлить транслокацию ДНК до скорости, которая должна быть совместима с секвенированием (25–400 мс/нт), они не смогли напрямую связать уровень тока с отдельными нуклеотидами. Важным оказалось то, что использование блокирующего олигомера исключает необходимость активно контролировать напряжение для осуществления связывания полимеразы с ДНК в *цис*-камере, а также позволяет автоматизировать прямую и обратную транслокацию оцДНК с прочтением одной и той же последовательности несколько раз. Кроме того, можно объединять все компоненты реакции репликации (ДНК-матрицу, dNTP, Mg^{2+} , полимеразу) в *цис*-камере с самого начала и проводить длительный анализ (несколько часов) многих шаблонов ДНК.

В работе [78] придерживались той же стратегии с phi29 ДНК-полимеразой, что и работе [58], однако вместо α -гемолизина они использовали мутированную версию поры белка MspA (M2-NNN MspA), которая имеет другую геометрию. Одно из отличий дизайна эксперимента в [78] заключается в праймере, представляющем собой 5'-конец оцДНК-матрицы и образующем «шпильку» для предотвращения действия полимеразы на двухцепочечный конец ДНК. Кроме того, блокирующий олигомер не содержит акридиновых оснований. Длительность стадии дегибридации блокирующего олигомера обычно больше, чем длительность стадии синтеза ДНК (средняя скорость транслокации 28 мс/нт), что совпадает с предыдущими исследованиями [58]. Отмечено, что достаточно часто во время стадии элонгации (транслокации оцДНК-матрицы в *цис*-камеру) ток ненадолго возвращается на предыдущий уровень. Эти легко идентифицируемые паттерны переключения соответствуют корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активности phi29 ДНК-полимеразы. В итоге полученные результаты оказались более сложными,

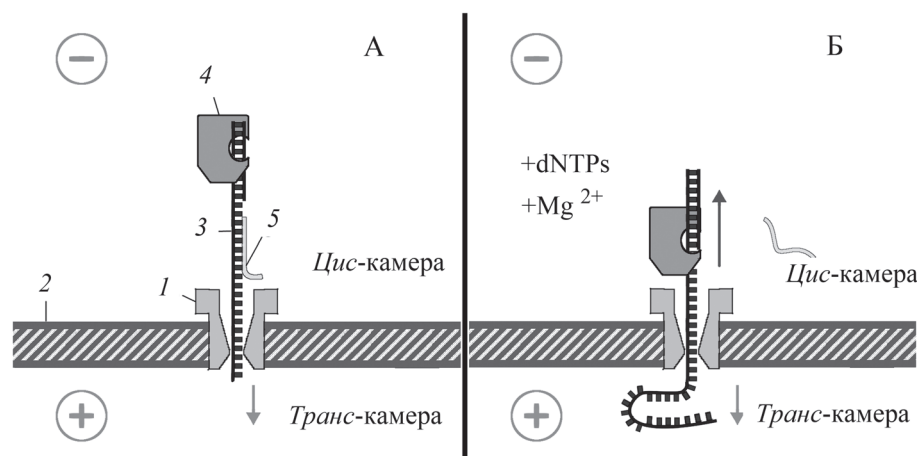


Рис. 6. Схематическое изображение эксперимента с phi29 ДНК полимеразой: А – связывание phi29 ДНК полимеразы с ДНК-матрицей, матрица содержала праймер и блокирующий олигомер, 5'-конец оцДНК-матрицы вытягивается в пору под действием напряжения (короткая стрелка); Б – под напряжением блокирующий олигомер диссоциирует от матричной цепи и полимеразы начинают синтез, вытягивая оцДНК из нанопоры (длинная стрелка) в обратном приложенному напряжению направлении. Обозначения: 1 – α -гемолизин (нанопора), 2 – билипидный слой, 3 – оцДНК-матрица, 4 – phi29 ДНК полимеразы, 5 – блокирующий олигомер

чем предполагалось: наблюдались не четыре уровня тока, соответствующие четырем основаниям, а гораздо большее их число, что, вероятно, можно объяснить влиянием соседних нуклеотидов.

Известно, что MspA имеет область сужения длиной около 0,6 нм. Это означает, что измеренная в любой момент величина ионного тока составляет в среднем ~ 4 нт. Расшифровка уровней тока требует применения алгоритма, чтобы различить 256 возможных перестановок из четырех нуклеотидов. С учетом составленной карты уровней тока для всех квадромеров авторы [27] смогли успешно упорядочить и отобразить части генома phi X174 с длиной считывания до 4500 оснований (и средней длиной прочтения ~ 1300 оснований) на основе модифицированной поры MspA и phi29 ДНК-полимеразы. Библиотека генома phi X174 для нанопорового секвенирования сконструирована с помощью метода «дробовика» с легированием (shotgun-ligation) при добавлении ассиметричных адаптеров к дцДНК: ник-шпилечного адаптера (nicked hairpin adaptor) и концевой адаптера с холестерином. Концевой адаптер с холестерином совместно с одной из цепей дцДНК выполняет роль блокирующего олигомера. Предполагалось, что холестерин на 3'-конце улучшает связывание с билипидным слоем и способствует увеличению концентрации ДНК рядом с нанопорой [79]. Прямая транслокация оцДНК заканчивается при достижении разрыва в ник-шпилечном адаптере, далее под действием phi29 ДНК-полимеразы начинается второе прочтение оцДНК в обратном направлении. Существуют некоторые различия

между прогнозированными (карта квадромеров) и измеренными уровнями токов (образец ДНК). Тщательный анализ показал, что это вызвано либо изменением расположения ДНК в сужении поры из-за ее вторичной структуры, либо взаимодействием ДНК с вестибулем поры или сужением. В некоторых случаях нуклеотиды вне квадромера также оказывают небольшое влияние. Кроме того, большая часть дисперсии уровней тока была связана с ошибочным и стохастическим движением полимеразы. Стоит отметить, что на данном этапе только амплитуда уровней ионного тока сама по себе не дает достаточно информации для прямого секвенирования *de novo*, т.е. необходимы выравнивание и сравнение ДНК-последовательностей.

Авторы проведенных исследований впервые продемонстрировали очень предсказательную карту квадромеров (коэффициент корреляции для улучшенной версии 0,9936) и осуществили секвенирование природного образца дцДНК в режиме реального времени. С использованием комбинации MspA и phi29 ДНК-полимеразы изучены эпигенетические модификации цитозина [33, 80] и оптимизирован состав рабочих буферов [81].

Показано, что phi29 ДНК-полимераза обладает некоторыми недостатками, в частности возможностью пропуска или двойного чтения оснований в цепи ДНК из-за флуктуаций в скорости синтеза и 3'-5'-экзонуклеазной активностью, что может вызвать несоответствие в чтении гомополимерных областей молекулы ДНК. Чтобы свести к минимуму ошибки считывания можно

использовать альтернативные белковые моторы, способные монотонно транслоцировать нуклеиновые кислоты.

Белком, на который было обращено внимание исследователей, стала геликаза Hel308 – процессивная 3'-5'-транслоказа/геликаза (АТФ-зависимая Ski2-like superfamily II (SF2)), обнаруженная у архей и эукариот [82]. Предполагается, что она участвует в перезапуске остановленного механизма репликации [83, 84]. Известна ее кристаллическая структура [85].

Относительно недавно были проведены работы [81, 86–88] с использованием Hel308 в сочетании с нанопорой модифицированного MspA, и самые первые исследования были связаны непосредственно с изучением действия фермента [86]. Обнаружено, что Hel308 протягивает ДНК через нанопору MspA в два этапа на один транслоцированный нуклеотид. При этом электрическая сила в диапазоне ~30–65 пН, действующая на ДНК (~0,2 пН/мВ), не влияет на активность Hel308 рядом с нанопорой MspA [87]. В случае использования Hel308 при перемещении ДНК через пору наблюдается почти вдвое большее число уровней, чем при использовании phi29 ДНК-полимеразы. Согласно [86], эти незначительные движения ДНК являются результатом конформационных изменений Hel308, для работы которой требуется АТФ. Стоит также отметить, что кинетика перемещения Hel308 вдоль оцДНК зависит от состава нуклеотидной последовательности. Все эти особенности фермента могут быть использованы для замедления транслокации и секвенирования ДНК

в нанопоре. Так, при использовании Hel308 время паузы нуклеотида в поре MspA составляет 44–70 мс (в зависимости от типа нуклеотида) [88].

В типичном эксперименте [86–88] Hel308 связывается с удлиненным 3'-концом оцДНК матрицы, которая содержит комплементарный олигомер, имеющий на 5'-конце остаток холестерина (рис. 7). Hel308 начинает разматывать дцДНК в 5'-направлении, при этом 5'-конец ДНК-матрицы втягивается в пору под действием напряжения, что приводит к диссоциации цепей [89]. Затем Hel308 функционирует как транслоказа, вытягивая оцДНК из нанопоры в обратном приложенному напряжению направлении (в *цис*-камеру).

На основе Hel308 запатентован метод характеристики (секвенирования) полинуклеотидов с использованием поры [59]. Авторы [59] продемонстрировали, что Hel308 может контролировать перемещение полинуклеотида управляемым и ступенчатым образом через поры при приложенном напряжении в растворе с высокой концентрации соли (до 2 М), что важно для нанопорового секвенирования. При подаче напряжения Hel308 может транслоцировать полинуклеотид в двух направлениях: геликаза движется вдоль ДНК в направлении 3'-5', но ориентация ДНК в нанопоре зависит от того, какой ее конец захватывается порой. Это означает, что фермент может перемещать ДНК из нанопоры против силы действия поля или в нанопору совместно с силой действия поля. В изобретении упоминается о высокой устойчивости Hel308 к воздействию электрического поля: нежелательные движения «назад»

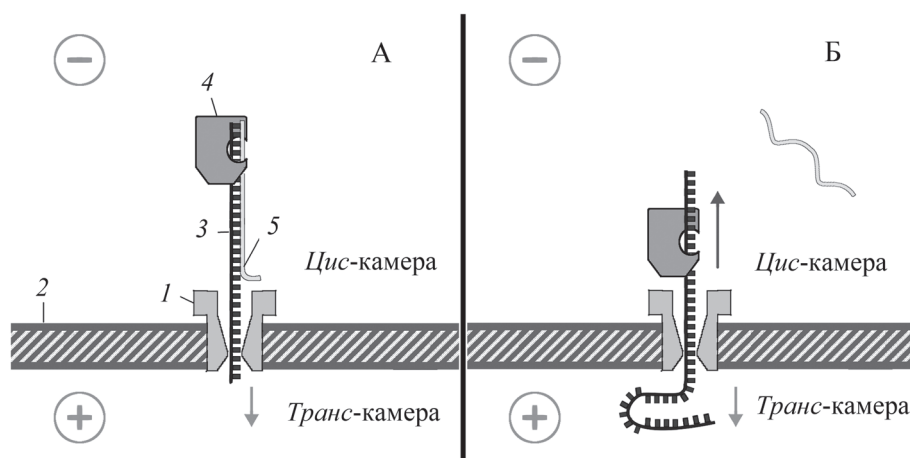


Рис. 7. Схематическое изображение эксперимента с Hel308: А – Hel308 связывается с удлиненным 3'-концом оцДНК-матрицы, матрица содержит комплементарный олигомер, 5'-конец оцДНК-матрицы втягивается в пору под действием напряжения (короткая стрелка); Б – под действием Hel308 и напряжения олигомер диссоциирует от матричной цепи, Hel308 вытягивает оцДНК из нанопоры (длинная стрелка) в обратном приложенному напряжению направлении.

Обозначения: 1 – нанопора, 2 – билипидный слой, 3 – оцДНК-матрица, 4 – Hel308, 5 – комплементарный олигомер

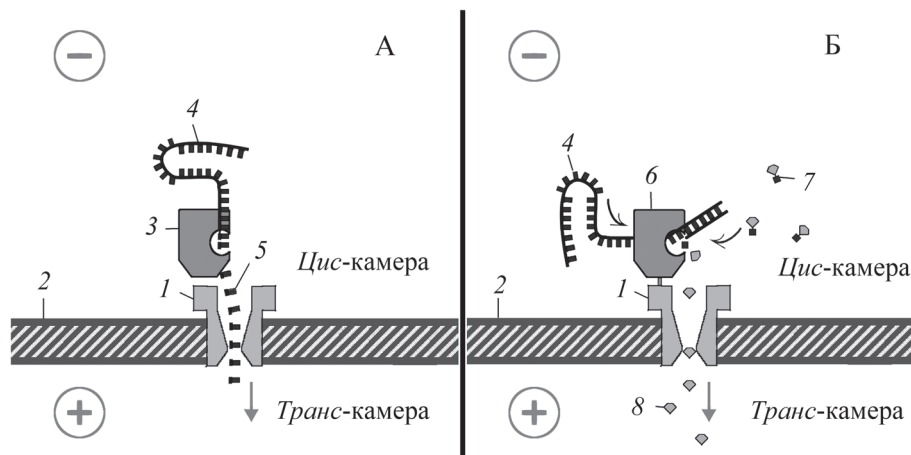


Рис. 8. Схематическое изображение действия ферментов на ДНК рядом с нанопорой: А – расщепление оцДНК под действием *EcoI* и прохождение отщепленных нуклеотидов через пору; Б – полимерная реакция иммобилизованной рядом с порой α -гемолизина *phi29* ДНК-полимеразы, которая в качестве dNTP использует меченые нуклеотиды. Метка в результате синтеза выделяется в среду и транслицирует через пору. Каждый нуклеотид (А, Т, G, С) имеет свою уникальную метку. Обозначения: 1 – нанопора, 2 – билипидный слой, 3 – *EcoI*, 4 – оцДНК-матрица, 5 – одиночный нуклеотид, 6 – иммобилизованная *phi29* ДНК-полимераза, 7 – меченый dNTP, 8 – отщепленная метка

вдоль полинуклеотида при его перемещении против силы действия поля минимальны. Отмечено, что длина перемещаемого полинуклеотида может быть любая. Авторы отмечают, что *Hel308* можно ковалентно иммобилизовывать на пору, но предпочтительно этого не делать.

В работе [90] показано, что *phi29* ДНК-полимераза и *Hel308* способны контролировать движение ДНК, содержащей синтетические основания dNaM и d5SICS через пору *MspA* (модификация M2-NNN). При этом одного чтения достаточно, чтобы обнаружить наличие и местоположение dNaM и d5SICS внутри цепи ДНК.

Все описанные прежде белковые моторы находились в неиммобилизованном состоянии в *цис*-камере. Существует подход с использованием поры α -гемолизина и иммобилизованной у входа в пору *phi29* ДНК-полимеразы [91] (рис. 8). ДНК-полимераза синтезирует новую цепь на основе матрицы и праймера, используя в качестве добавляемых нуклеотидов меченые основания [92]. В результате синтеза полимерная метка выделяется в среду и свободно проходит через пору, обеспечивая сигнал для конкретной стадии синтеза ДНК. Каждый нуклеотид (А, Т, G, С) имеет свою специфическую метку. Чтобы увеличить вероятность того, что каждая метка будет измерена в последовательном порядке, одна молекула полимеразы ковалентно присоединяется к нанопоре на соответствующем расстоянии. Такая система секвенирования весьма перспективна, хотя имеет

много параметров, которые в дальнейшем можно оптимизировать.

Параллельно с транслокацией оцДНК исследовалась транслокация РНК. Авторы [93] изучали связывание РНК с РНК-зависимой АТФазой Р4 из бактериофага $\phi 8$ с использованием нанопоры α -гемолизина: длительность связывания зависела от многих факторов (концентрации моторного белка, добавления АТФ, длины нуклеотида). Средняя длительность блокады составляла $\sim 0,5$ мс, хотя наблюдались блокады до 10–100 мс. Основная проблема, отмеченная в работе, заключалась в быстрой диссоциации комплекса РНК – АТФаза в условиях эксперимента.

Выводы

Белковые каналы, использованные для нанопорового секвенирования, обладают сходной архитектурой. Все три канала (α -гемолизин, *MspA*, *CsgG*) представляют собой трансмембранные каналы прокариотического происхождения со структурой типа β -бочонок.

При классической схеме эксперимента (транслокация анализируемой цепи через пору) лучшее соотношение сигнал/шум обеспечивают белки с наиболее узким и коротким чувствительным участком – *MspA* и *CsgG*. Во всех случаях белки дикого типа подвергались реинжинирингу в целях оптимизации их структуры для нанопорового секвенирования.

Поскольку скорость транслокации нуклеиновой кислоты через белковую нанопору очень

высока, то необходимо использовать моторные белки, контролирующие перемещение кислот и снижающие скорость перемещения до такого значения, при котором возможно секвенирование. Показано, что перспективны такие моторные белки, как ϕ 29 ДНК-полимераза и геликаза Hel308.

При проведении исследований важно было создать алгоритмы обработки исходного сигнала.

Эти алгоритмы весьма сложны, однако от них зависит качество получаемого секвенирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (уникальный номер проекта RFMEFI60419X0218).

Конфликта интересов нет.

Дополнительных материалов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kasianowicz J.J., Brandin E., Branton D., Deamer D.W. // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1996. Vol. 93. N 24. P. 13770.
2. Eisenstein M. // Nat. Biotechnol. 2012. Vol. 30. N 4. P. 295.
3. Ip C.L.C., Loose M., Tyson J.R., de Cesare M., Brown B.L., Jain M., Leggett R.M., Eccles D.A., Zalunin V., Urban J.M., Piazza P., Bowden R.J., Paten B., Mwaigwisya S., Batty E.M., Simpson J.T., Snutch T.P., Birney E., Buck D., Goodwin S., Jansen H.J., O'Grady J., Olsen H.E. // F1000Res. 2015. Vol. 4. N 1075. P. 36.
4. Laver T., Harrison J., O'Neill P.A., Moore K., Farbos A., Paszkiewicz K., Studholme D.J. // Biomol. Detect. Quantif. 2015. Vol. 3. P. 1.
5. Magi A., Semeraro R., Mingrino A., Giusti B., D'Aurizio R. // Brief. Bioinform. 2017. Vol. 19. N 6. P. 1256.
6. Carter J.-M., Hussain S. // Wellcome Open Res. 2018. Vol. 2. P. 23.
7. Garalde D.R., Snell E.A., Jachimowicz D., Sipos B., Lloyd J.H., Bruce M., Pantic N., Admassu T., James P., Warland A., Jordan M., Ciccone J., Serra S., Keenan J., Martin S., McNeill L., Wallace E.J., Jayasinghe L., Wright C., Blasco J., Young S., Brocklebank D., Juul S., Clarke J., Heron A.J., Turner D.J. // Nat. Methods. 2018. Vol. 15. N 3. P. 201.
8. Wallace E.V.B., Stoddart D., Heron A.J., Mikhailova E., Maglia G., Donohoe T.J., Bayley H. // Chem. Commun. 2010. Vol. 46. N 43. P. 8195.
9. Norris A.L., Workman R.E., Fan Y., Eshleman J.R., Timp W. // Cancer Biol. Ther. 2016. Vol. 17. N 3. P. 246.
10. Akeson M., Branton D., Kasianowicz J.J., Brandin E., Deamer D.W. // Biophys. J. 1999. Vol. 77. N 6. P. 3227.
11. Meller A., Nivon L., Brandin E., Golovchenko J., Branton D. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000. Vol. 97. N 3. P. 1079.
12. Wang Y., Yang Q., Wang Z. // Front. Genet. 2014. Vol. 5. N 449. P. 20.
13. Jordan B. // Medecine/Sciences. 2017. Vol. 33. N 8–9. P. 801.
14. Astier Y., Braha O., Bayley H. // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 128. N 5. P. 1705.
15. Deamer D.W., Akeson M. // Trends in Biotechnol. 2000. Vol. 18. N 4. P. 147.
16. Wang H., Branton D. // Nat. Biotechnol. 2001. Vol. 19. N 7. P. 622.
17. Ashkenasy N., Sánchez-Quesada J., Bayley H., Ghadiri M.R. // Angew. Chemie - Int. Ed. 2005. Vol. 44. N 9. P. 1401.
18. Dahlberg D., Mariussen E., Goverud I.L., Tønjum T., Mæhlen J., Antal E.A., Hassel B. // Neurotoxicology. 2015. Vol. 48. P. 61.
19. Song L., Hobaugh M.R., Shustak C., Cheley S., Bayley H., Gouaux J.E. // Science. 1996. Vol. 274. N 5294. P. 1859.
20. Kang X.F., Gu L.Q., Cheley S., Bayley H. // Angew. Chemie - Int. Ed. 2005. Vol. 44. N 10. P. 1495.
21. Wang S., Zhao Z., Haque F., Guo P. // Curr. Opin. Biotechnol. 2018. Vol. 51. P. 80.
22. Stoddart D., Maglia G., Mikhailova E., Heron A.J., Bayley H. // Angew. Chemie - Int. Ed. 2010. Vol. 49. N 3. P. 556.
23. Banerjee A., Mikhailova E., Cheley S., Gu L.Q., Montoya M., Nagaoka Y., Gouaux E., Bayley H. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2010. Vol. 107. N 18. P. 8165.
24. Stoddart D., Heron A.J., Mikhailova E., Maglia G., Bayley H. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2009. Vol. 106. N 19. P. 7702.
25. Ayub M., Bayley H. // Nano Lett. 2012. Vol. 12. N 11. P. 5637.
26. Ayub M., Hardwick S.W., Luisi B.F., Bayley H. // Nano Lett. 2013. Vol. 13. N 12. P. 6144.
27. Laszlo A.H., Derrington I.M., Ross B.C., Brinkerhoff H., Adey A., Nova I.C., Craig J.M., Langford K.W., Samson J.M., Daza R., Doering K., Shendure J., Gundlach J.H. // Nat. Biotechnol. 2014. Vol. 32. N 8. P. 829.
28. Heinz C., Engelhardt H., Niederweis M. // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. N 10. P. 8678.
29. Faller M., Niederweis M., Schulz G.E. // Science. 2004. Vol. 303. N 5661. P. 1189.
30. Butler T.Z., Pavlenok M., Derrington I.M., Niederweis M., Gundlach J.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. Vol. 105. N 52. P. 20647.
31. Laszlo A.H., Derrington I.M., Gundlach J.H. // Methods. 2016. Vol. 105. P. 75.
32. Manrao E.A., Derrington I.M., Pavlenok M., Niederweis M., Gundlach J.H. // PLoS One. 2011. Vol. 6. N 10. P. 7.
33. Laszlo A.H., Derrington I.M., Brinkerhoff H., Langford K.W., Nova I.C., Samson J.M., Bartlett J.J., Pavlenok M., Gundlach J.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2013. Vol. 110. N 47. P. 18904.
34. Olsén A., Jonsson A., Normark S. // Nature. 1989. Vol. 338. N 6217. P. 652.
35. Jain M., Fiddes I.T., Miga K.H., Olsen H.E., Paten B., Akeson M. // Nat. Methods. 2015. Vol. 12. N 4. P. 351.
36. Cao B., Zhao Y., Kou Y., Ni D., Zhang X.C., Huang Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2014. Vol. 111. N 50. P. E5439.
37. Jain M., Tyson J.R., Loose M., Ip C.L.C., Eccles D.A., O'Grady J., Malla S., Leggett R.M., Wallerman O., Jansen H.J., Zalunin V., Birney E., Brown B.L.,

- Snutch T.P., Olsen H.E.* // F1000Res. 2017. Vol. 6. N 760. P. 18.
38. <https://nanoporetech.com/about-us/news/highlights-clive-g-browns-technical-update>.
39. *Parker M.W., Buckley J.T., Postma J.P.M., Tucker A.D., Leonard K., Pattus F., Tsernoglou D.* // Nature. 1994. Vol. 367. N 6460. P. 292.
40. *Stefureac R., Long Y.T., Kraatz H.B., Howard P., Lee J.S.* // Biochemistry. 2006. Vol. 45. N 30. P. 9172.
41. *Cressiot B., Braselmann E., Oukhaled A., Elcock A.H., Pelta J., Clark P.L.* // ACS Nano. 2015. Vol. 9. N 9. P. 9050.
42. *Merstorf C., Cressiot B., Pastoriza-Gallego M., Oukhaled A., Betton J.M., Auvray L., Pelta J.* // ACS Chem. Biol. 2012. Vol. 7. N 4. P. 615.
43. *Cao C., Ying Y.L., Hu Z.L., Liao D.F., Tian H., Long Y.T.* // Nat. Nanotechnol. 2016. Vol. 11. N 8. P. 713.
44. *Cao C., Cirauqui N., Marcaida M.J., Buglakova E., Duperré A., Radenovic A., Dal Peraro M.* // Nat. Commun. 2019. Vol. 10. N 1. P. 11.
45. *Wendell D., Jing P., Geng J., Subramaniam V., Lee T.J., Montemagno C., Guo P.* // Nat. Nanotechnol. 2009. Vol. 4. N 11. P. 765.
46. *Haque F., Geng J., Montemagno C., Guo P.* // Nat. Protoc. 2013. Vol. 8. N 2. P. 373.
47. *Jing P., Haque F., Vonderheide A.P., Montemagno C., Guo P.* // Mol. Biosyst. 2010. Vol. 6. N 10. P. 1844.
48. *Zhang H., Schwartz C., De Donatis G.M., Guo P.* // Adv. Virus Res. 2012. Vol. 83. P. 415.
49. *Guasch A., Pous J., Ibarra B., Gomis-Rüth F.X., Valpuesta J.M., Sousa N., Carrascosa J.L., Coll M.* // J. Mol. Biol. 2002. Vol. 315. N 4. P. 663.
50. *Feng Y., Zhang Y., Ying C., Wang D., Du C.* // Genom. Proteom. Bioinf., 2015. Vol. 13. N 1. P. 4.
51. *Geng J., Wang S., Fang H., and Guo P.* // ACS Nano. 2013. Vol. 7. N 4. P. 3315.
52. *Wloka C., Mutter N.L., Soskine M., Maglia G.* // Angew. Chemie - Int. Ed. 2016. Vol. 55. N 40. P. 12494.
53. *Tanaka K., Caaveiro J.M.M., Morante K., González-Maniñes J.M., Tsumoto K.* // Nat. Commun. 2015. Vol. 6. P. 6337.
54. *Purnell R.F., Mehta K.K., Schmidt J.J.* // Nano Lett. 2008. Vol. 8. N 9. P. 3029.
55. *Kawano R., Schibel A.E.P., Cauley C., White H.S.* // Langmuir. 2009. Vol. 25. N 2. P. 1233.
56. *De Zoysa R.S.S., Jayawardhana D.A., Zhao Q., Wang D., Armstrong D.W., Guan X.* // J. Phys. Chem. B. 2009. Vol. 113. N 40. P. 13332.
57. *Olasagasti F., Lieberman K.R., Benner S., Cherf G.M., Dahl J.M., Deamer D.W., Akeson M.* // Nat. Nanotechnol. 2010. Vol. 5. N 11. P. 798.
58. *Cherf G.M., Lieberman K.R., Rashid H., Lam C.E., Karplus K., Akeson M.* // Nat. Biotechnol. 2012. Vol. 30. N 4. P. 344.
59. *Moysey R., Heron A.J.* // EP 2 768 977 B1.
60. *Hornblower B., Coombs A., Whitaker R.D., Kolomeisky A., Picone S.J., Meller A., Akeson M.* // Nat. Methods. 2007. Vol. 4. N 4. P. 315.
61. *Clarke J., Wu H.C., Jayasinghe L., Patel A., Reid S., Bayley H.* // Nat. Nanotechnol. 2009. Vol. 4. N 4. P. 265.
62. *Reiner J.E., Balijepalli A., Robertson J.W.F., Drown B.S., Burden D.L., Kasianowicz J.J.* // J. Chem. Phys. 2012. Vol. 137. N 21. P. 214903.
63. *Klenow H., Henningsen. I.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1970. Vol. 65. N 1. P. 168.
64. *Dahlberg M.E., Benkovic S.J.* // Biochemistry. 1991. Vol. 30. N 20. P. 4835.
65. *Benner S., Chen R.J.A., Wilson N.A., Abu-Shumays R., Hurt N., Lieberman K.R., Deamer D.W., Dunbar W.B., Akeson M.* // Nat. Nanotechnol. 2007. Vol. 2. N 11. P. 718.
66. *Cockroft S.L., Chu J., Amorin M., and Ghadiri M.R.* // J. Am. Chem. Soc. 2008. Vol. 130. N 3. P. 818.
67. *Wilson N.A., Abu-Shumays R., Gyarfás B., Wang H., Lieberman K.R., Akeson M., Dunbar W.B.* // ACS Nano. 2009. Vol. 3. N 4. P. 995.
68. *Hurt N., Wang H., Akeson M., Lieberman K.R.* // J. Am. Chem. Soc. 2009. Vol. 131. N 10. P. 3772.
69. *Gyarfás B., Olasagasti F., Benner S., Garalde D., Lieberman K.R., Akeson M.* // ACS Nano. 2009. Vol. 3. N 6. P. 1457.
70. *Datta K., LiCata V.J.* // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. N 8. P. 5694.
71. *Beard W.A., Wilson S.H.* // Biochemistry. 2014. Vol. 53. N 17. P. 2768.
72. *Lieberman K.R., Cherf G.M., Doody M.J., Olasagasti F., Kolodji Y., Akeson M.* // J. Am. Chem. Soc. 2010. Vol. 132. N 50. P. 17961.
73. *Blasco M.A., Lazaro J.M., Blanco L., Salas M.* // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. N 22. P. 16763.
74. *Blanco L., Bernad A., Lazaro J.M., Martin G., Garmendia C., Salas M.* // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264. N 15. P. 8935.
75. *Garmendia C., Bernad A., Esteban J.A., Blanco L., Salas M.* // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. N 4. P. 2594.
76. *Truniger V* // Nucleic Acids Res. 2002. Vol. 30. N 7. P. 1483.
77. *Ibarra B., Chemla Y.R., Plyasunov S., Smith S.B., Lázaro J.M., Salas M., Bustamante C.* // EMBO J. 2009. Vol. 28. N 18. P. 2794.
78. *Manrao E.A., Derrington I.M., Laszlo A.H., Langford K.W., Hopper M.K., Gillgren N, Pavlenok M., Niederweis M., Gundlach J.H.* // Nat. Biotechnol. 2012. Vol. 30. N 4. P. 349.
79. *Yusko E.C., Johnson J.M., Majd S., Prangko P., Rollings R.C., Li J., Yang J., Mayer M.* // Nat. Nanotechnol. 2011. Vol. 6. N 4. P. 253.
80. *Schreiber J., Wescoe Z.L., Abu-Shumays R., Vivian J.T., Baatar B., Karplus K., Akeson M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2013. Vol. 110. N 47. P. 18910.
81. *Nova I.C., Derrington I.M., Craig J.M., Noakes M.T., Tickman B.I., Doering K., Higinbotham H., Laszlo A.H., Gundlach J.H.* // PLoS One. 2017. Vol. 12. N 7. P. e0181599.
82. *Woodman I.L., Bolt E.L.* // Biochem. Soc. Trans. 2011. Vol. 39. P. 140.
83. *Guy C.P., Bolt E.L.* // Nucleic Acids Res. 2005. Vol. 33. N 11. P. 3678.
84. *Tafel A.A., Wu L., McHugh P.J.* // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286. N 18. P. 15832.
85. *Büttner K., Nehring S., Hopfner K.P.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2007. V. 14. N 7. P. 647.
86. *Derrington I.M., Craig J.M., Stava E., Laszlo A.H., Ross B.C., Brinkerhoff H., Nova I.C., Doering K, Tickman B.I., Ronaghi M., Mandell J.G., Gunderson K.L., Gundlach J.H.* // Nat. Biotechnol. 2015. Vol. 33. N 10. P. 1073.
87. *Craig J.M., Laszlo A.H., Brinkerhoff H., Derrington I.M., Noakes M.T., Nova I.C., Tickman B.I., Doering K., De Leeuw N.F., Gundlach J.H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2017. Vol. 114. N 45. P. 11932.
88. *Craig J.M., Laszlo A.H., Nova I.C., Brinkerhoff H., No-*

- akes M.T., Baker K.S., Bowman J.L., Higinbotham H.R., Mount J.W., Gundlach J.H. // *Nucleic Acids Res.* 2019. Vol. 47. N 5. P. 2506.
89. Mathé J., Visram H., Viasnoff V., Rabin Y., Meller A. // *Biophys. J.* 2004. Vol. 87. N 5. P. 3205.
90. Craig J.M., Laszlo A.H., Derrington I.M., Ross B.C., Brinkerhoff H., Nova I.C., Doering K., Tickman B.I., Svet M.T., Gundlach J.H. // *PLoS ONE.* 2015. Vol. 10. N 11. P. e0143253.
91. Fuller C.W., Kumar S., Porel M., Chien M., Bibillo A., Stranges P.B., Dorwart M., Tao C., Li Z., Guo W., Shi S., Korenblum D., Trans A., Aguirre A., Liu E., Harada E.T., Pollard J., Bhat A., Cech C., Yang A., Arnold C., Palla M., Hovis J., Chen R., Morozova I., Kalachikov S., Russo J.J., Kasianowicz J.J., Davis R., Roeber S., Church G.M., Ju J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016. Vol. 113. N 19. P. 5233.
92. Kumar S., Tao C., Chien M., Hellner B., Balijepalli A., Robertson J.W.F., Li Z., Russo J.J., Reiner J.E., Kasianowicz J.J., Ju J. // *Sci. Rep.* 2012. Vol. 2. P. 684.
93. Astier Y., Kainov D.E., Bayley H., Tuma R., Howorka S. // *ChemPhysChem.* 2007. Vol. 8. N 15. P. 2189.

Поступила в редакцию 10.01.2020

Получена после доработки 12.01.2020

Принята к публикации 20.01.2020

CHANNEL AND MOTOR PROTEINS FOR TRANSLOCATION OF NUCLEIC ACIDS IN NANOPORE SEQUENCING TECHNOLOGY

D.V. Barkhova*, M.S. Andrianova, N.V. Komarova, A.E. Kuznetsov

(Scientific-Manufacturing Complex Technological Centre; *e-mail: daria.barkhova@gmail.com)

In the process of nanopore sequencing, the primary structure of the analyzed DNA or RNA is decrypted by translocation of a nucleic acid molecule through a nanopore intercalated into the membrane. A nanopore is a protein transmembrane channel that is permeable to water, low molecular weight ions, and single-stranded DNA or RNA. This review discusses the channel proteins used in nanopore sequencing, their modifications, as well as assisting proteins that regulate the process of nucleic acid translocation.

Key words: слова: nanopore sequencing, organic nanopore, transmembrane protein, motor protein.

Сведения об авторах: Баркова Дарья Валерьевна – аспирант, инженер НПК «Технологический центр» (daria.barkhova@gmail.com); Андрианова Мария Сергеевна – науч. сотр. НПК «Технологический центр», канд. хим. наук (smariika1987@gmail.com); Комарова Наталья Владимировна – ст. науч. сотр. НПК «Технологический центр», канд. хим. наук (nat.v.kom@gmail.com); Кузнецов Александр Евгеньевич – начальник лаборатории интегральных биохимических наносенсоров НПК «Технологический центр», канд. хим. наук (kae@tcen.ru).