

Синтез ДНК-дуплексов с новым типом связи между цепями¹

Болаева Кермен Валериевна, Хомякова Елена Алексеевна

студент, аспирант

Московский государственный университет им М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: bolaeva@yandex.ru

Синтетические ДНК-лиганды являются перспективными соединениями для направленного обратимого ингибирования ДНК-узнающих белков («сенсовый» подход). Применение немодифицированных олигонуклеотидных дуплексов для ингибирования белков *in vivo* осложнено необходимостью использования их в больших концентрациях, что является губительным для клетки. Существенно снизить концентрацию «ДНК-ловушек» позволяет использование ковалентно «связанных» олигонуклеотидных дуплексов. Необходимое соединение цепей приводит к увеличению устойчивости дуплексов к действию экзонуклеаз и предотвращает их диссоциацию, происходящую до взаимодействия с белком.

Основными недостатками большинства подходов к созданию ковалентной связи между цепями ДНК являются образование непредсказуемых и неоднородных по составу продуктов. Следовательно, разработка удобных и эффективных методов создания «ковалентно сшитых» дуплексов остается актуальной задачей. Кроме того, поиск реакций, обеспечивающих ковалентное взаимодействие между отдельными фрагментами нуклеиновой кислоты, сближенными в пространстве, необходим для изучения пространственной структуры сложно организованных молекул ДНК и РНК.

В основе метода ковалентного связывания цепей ДНК-дуплекса, разрабатываемого в настоящей работе, лежит реакция между альдегидной и амиоокси-группами, сближенными в пространстве. Образование оксима происходит в коротком временном интервале без дополнительной активации. Разработку методики получения «ковалентно сшитого» дуплекса проводили на модельной системе. Эта система представляет собой две 30-звенные комплементарные цепи ДНК. Одна цепь содержит в определенных позициях остатки 2'-O-(2-аминоокси)этилуридина, другая – остатки 2'-O-{2-оксо-2[(2-оксоэтил)амино]этил}уридина.

Подобраны оптимальные условия образования ковалентной связи между цепями ДНК-дуплекса. Установлено, что при инкубации модифицированного ДНК-дуплекса в натрий-ацетатном буфере (рН 4,5) в течении 1 часа при 20°C наблюдается максимальный выход ковалентно связанного продукта. Восстановление полученной в результате реакции двойной связи между цепями ДНК приводит к повышению выхода «сшитого» дуплекса с 6 до 24 %.

О наличии ковалентной связи между цепями ДНК-дуплексов свидетельствует повышенная термостабильность синтезированных «сшитых» дуплексов, их устойчивость к деградации смесью щелочной фосфатазы и фосфодиэстеразы змеиного яда, изменение картины расщепления эндонуклеазами рестрикции, ухудшение субстратных свойств в реакциях с ДНК-метилтрансферазой SsoII и урацил-ДНК-гликозилазой.

¹ Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных в рамках грантов Российского Фонда Фундаментальных Исследований (гранты № 06-04-49196-а и 07-04-00545-а).