

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

Регулирование активности нуклеазы BspD6I с помощью синтетических фрагментов ДНК

Мигур Анжела Юрьевна

Студент

МГУ - Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,

Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: anzhelamigur@mail.ru

Разработан подход для направленного регулирования активности эндонуклеаз, основанный на использовании модифицированных ДНК-дуплексов. В качестве объекта исследования была выбрана гетеродимерная эндонуклеаза рестрикции BspD6I (R.BspD6I), состоящая из двух различающихся по размеру и функциям субъединиц. Большая субъединица R.BspD6I в отсутствие малой субъединицы осуществляет разрыв («ник») только в одной цепи двуцепочечной ДНК, то есть является никующей эндонуклеазой (никазой). Никаза BspD6I гидролизует одну цепь ДНК на расстоянии 4 пар нуклеотидов от участка узнавания 5'-GAGTC-3'/5'-GACTC-3' в направлении 3'-конца [1]. Благодаря своим уникальным свойствам никующие эндонуклеазы нашли широкое применение в молекулярной биологии и генетической инженерии и представляют собой перспективные ферменты в генной терапии. В связи с этим актуальным является решение задачи регулирования активности этих ферментов.

Идея предложенного подхода заключается в создании негидролизуемого аналога субстрата никазы BspD6I, который будет выступать в качестве «ловушки», закрывающей ДНК-связывающий центр белка. Стабильный в условиях проведения реакции ДНК-дуплекс, должен прочно, но непродуктивно связываться с ферментом, то есть не подвергаться гидролизу. При больших избытках такого аналога субстрата относительно фермента ДНК-связывающий центр никазы будет блокирован негидролизуемым дуплексом, и целевая (например, геномная) ДНК не сможет подвергнуться расщеплению. Негидролизуемый аналог субстрата должен быть подобран таким образом, чтобы небольшое изменение температуры реакции приводило к дестабилизации и, как следствие, диссоциации дуплекса. В результате стабильность комплекса никазы с синтетическим фрагментом ДНК существенно понизится. «Ловушка», закрывающая ДНК-связывающий центр, «приоткроется», и фермент сможет связаться с целевой ДНК и гидролизовать её.

В ходе работы синтезирован негидролизуемый аналог субстрата – ДНК-дуплекс, содержащий ненуклеозидную вставку в месте гидролиза никазы BspD6I. Показано, что модификация не влияет на эффективность комплексообразования дуплекса с ферментом. Эффект терморегуляции активности никазы продемонстрирован при добавлении негидролизуемого аналога субстрата - двуспирального фрагмента ДНК, состоящего из пяти олигодезоксирибонуклеотидов.

Тезисы доклада основаны на материалах исследований, проведенных при поддержке гранта РФФИ-ННИО в рамках образовательной программы «Международные исследовательские группы с участием молодых ученых».

Литература

1. Железная Л.А. Сайт-специфическая нуклеиновая кислота из штамма *Bacillus species D6*. // Биохимия. 2001. № 66. С. 1215-1220.