

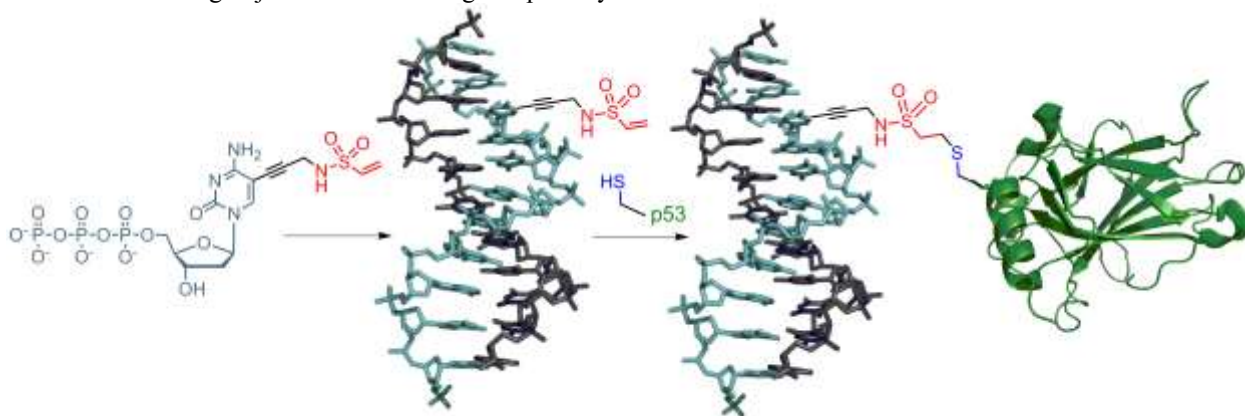


Nové reaktivní DNA sondy pro vychytávání vazebných proteinů

Vědci ze Společné laboratoře bioorganické a medicínské chemie nukleových kyselin Ústavu organické chemie a biochemie AVČR a Přírodovědecké fakulty UK (tým doc. Hoceka) ve spolupráci s kolegy z Biofyzikálního ústavu AVČR a CEITEC MU Brno (tým doc. Fojty) vyvinuli nové velmi reaktivní modifikované DNA sondy, které lze využít k selektivnímu vychytávání proteinů vážících se na danou sekvenci DNA. Připravili DNA nesoucí velmi reaktivní chemické skupiny (tzv. vinylsulfonamidy), na které lze snadno a za fyziologických podmínek chemicky připojit jiné molekuly obsahující thiolové skupiny, tedy např. proteiny obsahující aminokyselinu cystein. Tato metodika byla otestována na biokonjugaci DNA sond s proteinem p53, což je důležitý supresor nádorů. Práce byla přijata k publikaci v prestižním časopise *Angewandte Chemie International Edition* (IF = 13.7).

DNA je biologická makromolekula, která je nositelkou genetické informace. Je tvořena dvěma vlákny svinutými do dvoušroubovice. DNA v buňce interaguje s mnoha proteiny, které zprostředkovávají její kopírování, přepis, opravy apod. Klíčovou úlohu má zejména rozpoznání sekvence DNA tzv. transkripčními faktory, což jsou proteiny, které spouštějí nebo naopak brzdí biosyntézu bílkovin. Jedním z nejdůležitějších a nejvíce zkoumaných faktorů je protein p53, jenž potlačuje tvorbu nádorů, a jeho nedostatek nebo nefunkční mutanty se vyskytují ve většině typů rakoviny.

Nová metodika vědců z ÚOCHB AVČR, PrF UK, BFÚ AVČR a CEITEC umožňuje snadnou přípravu různých konjugátů nukleových kyselin s peptidy nebo proteiny. Zároveň lze reaktivní DNA sondy použít k selektivnímu vychytávání proteinů, které se specificky váží na danou sekvenci (např. transkripčních faktorů) a obsahují aminokyselinu cystein ve vhodné poloze. Metoda přípravy DNA sond, obsahujících reaktivní vinylsulfonamidové skupiny, je velmi rychlá a skládá se z pouhých dvou stupňů. Prvním krokem je příprava modifikovaného nukleosid trifosfátu, který je ve druhém kroku využit při enzymatické výstavbě DNA kalýzované DNA polymerázou. Vinylsulfonamidové skupiny ochotně a kvantitativně reagují s thiol (reakce je známa jako Michaelova adice) za tvorby pevných kovalentních aduktů a to za fyziologických podmínek (podobných jako uvnitř buněk). Protože řada důležitých DNA-vazebných proteinů obsahuje cystein, jsou takto modifikované DNA sondy vhodné k vychytávání těchto proteinů vazbou cysteinu na vinylsulfonamidovou skupinu. Tento princip byl úspěšně otestován na případě nádorového supresoru p53 vážícího se na specifické DNA sondy. Plně funkční protein p53 byl efektivně navázán, zatímco jeho neaktivní mutanty vazbu neposkytovaly. Tato metodika by mohla najít široké uplatnění např. v designu účinných (nevratných) inhibitorů některých tumorogenních faktorů či enzymů modifikujících DNA (např. DNA methyltransferázy) a v tzv. DNA-proteomice, zabývající se hledáním dosud neznámých proteinů vážících se na určitou sekvenci DNA a regulujících některé biologické procesy.



Publikace:

Dadová, J.; Orság, P.; Pohl, R.; Brázdová, M.; Fojta, M.; Hocek, M. "Vinylsulfonamide and acrylamide modification of DNA for cross-linking with proteins" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 10515-10518. DOI: 10.1002/anie.201303577.

Další informace:

Doc. Ing. Michal Hocek, DSc., Ústav organické chemie a biochemie AVČR, v. v. i., Flemingovo nám. 2, 16610 Praha 6, tel. +420 220183324, e-mail: hocek@uochb.cas.cz

Doc. RNDr. Miroslav Fojta, CSc., Biofyzikální ústav AVČR, v. v. i., Královopolská 135, 62500 Brno, tel. +420 541517197, e-mail: fojta@ibp.cz