

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова**

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Хомякова Елена Алексеевна

**МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ,
СОДЕРЖАЩИЕ 1,2-ДИОЛЬНЫЕ, АЛЬДЕГИДНЫЕ И ГИДРАЗИДНЫЕ
ГРУППИРОВКИ. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА**

02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

МОСКВА – 2012

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научные руководители:

доктор химических наук, профессор
Орецкая Татьяна Семёновна

кандидат химических наук
Зубин Евгений Михайлович

Официальные оппоненты:

доктор химических наук
Формановский Андрей Альфредович

кандидат химических наук
Хандажинская Анастасия Львовна

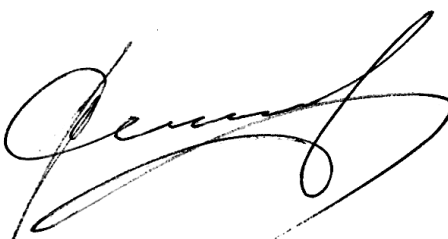
Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Защита состоится 28 февраля в 16.00 на заседании Диссертационного совета Д 501.001.41 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, аудитория 501.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Учёный секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук,
доцент



Смирнова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Модифицированные производные нуклеиновых кислот (НК) широко используются в молекулярной биологии и медицинских исследованиях, так как обладают уникальными свойствами, в том числе, способностью регулировать экспрессию генов, избирательно связываясь с белками и комплементарными последовательностями ДНК и РНК.

Одним из направлений исследований в химии нуклеиновых кислот является разработка методов синтеза и изучение свойств 2'-модифицированных олигонуклеотидов, содержащих в своем составе химически активные группировки. Использование таких производных для получения конъюгатов с различными молекулами представляется перспективным подходом для направленного изменения свойств НК-фрагментов. Ранее в лаборатории химии нуклеиновых кислот химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова была разработана стратегия синтеза реакционноспособных производных ДНК, в рамках которой предложены эффективные методы синтеза олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих амино-, карбоксильную, 1,2-диольную и альдегидную группы.

Успешное использование данного синтетического подхода позволяет продолжить создание способов получения новых химически активных производных ДНК, что является актуальной задачей химии нуклеиновых кислот. Кроме того, важным представляется разработка методов синтеза новых реакционноспособных аналогов РНК, так как число работ, посвященных синтезу таких соединений, ограничено.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является разработка методов синтеза модифицированных производных ДНК и РНК, содержащих в 2'-положении 1,2-диольные, альдегидные и гидразидные группировки. Отдельной частью работы было изучение физико-химических свойств олигонуклеотидов и характера их взаимодействия с различными низкомолекулярными соединениями и биомолекулами.

Основными этапами работы были: а) синтез олигодезокси- и олигорибонуклеотидов, содержащих диольные, альдегидные и гидразидные группировки; б) исследование физико-химических свойств 2'-диольных олигодезокси- и олигорибонуклеотидов; в) изучение закономерностей ковалентного связывания 2'-альдегидных олигонуклеотидов с ДНК- и РНК-узнающими белками, на примере ДНК-метилтрансферазы SsoII (M.SsoII) и белка бактериальной рибонуклеазы Р, и оценка перспективности их использования для аффинной модификации; г) разработка методики конъюгации олигонуклеотидов, содержащих гидразидные группировки, с карбонильными соединениями для дальнейшего получения новых НК-производных с заранее заданными свойствами. Необходимым этапом было сравнение результатов исследования 2'-диоксиазапентильных производных с данными, полученными для 2'-оксоэтильных аналогов в рамках настоящей и предшествующих работ.

Научная новизна и практическая значимость работы. С использованием 3'-амидофосфита 2'-*O*-[2-(2,3-диацетоксипропил)амино-2-оксоэтил]-5'-*O*-(4,4'-диметокситри-тил)-*N*3-пивалоилоксиметилуридина впервые синтезированы модифицированные олигорибонуклеотиды, содержащие в 2'-положении углеводного фрагмента 1,2-диольные и альдегидные группировки. Встраивание в олигонуклеотидную цепь модифицированных

остатков уридина, содержащих 1,2-диольные группировки, существенно не влияет на термическую стабильность ДНК-, РНК- и гибридных дуплексов.

В настоящей работе впервые изучено взаимодействие 2'-диоксоазепентильных ДНК- и РНК-производных с метилтрансферазой SsoII и белком бактериальной РНКазы P, соответственно. Проведено сравнительное исследование свойств альдегидных олигонуклеотидов нового типа и 2'-оксоэтильных производных, описанных ранее. Данные, полученные при проведении кросс-линкинга в присутствии ДНК-конкурентов, показывают, что реакция 2'-альдегидных дуплексов с метилтрансферазой SsoII носит неизбирательный характер, что свидетельствует о снижении специфичности узнавания на фоне параллельного протекания химической реакции или о возможном наличии двухстадийного механизма узнавания белком ДНК-лиганда. Следует отметить, что различие в строении модифицированных звеньев не сказывается на специфичности взаимодействия ДНК-дуплексов с M.SsoII.

В представленной работе предложен новый эффективный метод получения 2'-гидразидных производных ДНК и РНК. Показано, что 2'-гидразидные олигонуклеотиды могут быть успешно применены для конъюгации с различными ароматическими и алифатическими альдегидами.

Полученные результаты могут быть использованы для создания новых типов биологически активных производных нуклеиновых кислот. Разработка методов синтеза и изучение свойств 2'-модифицированных альдегидных и гидразидных олигонуклеотидов способствует дальнейшему развитию методов конъюгации биомолекул с различными соединениями. Альдегидные производные РНК могут применяться для присоединения пептидов и белков, что может использоваться для эффективной и адресной доставки малых интерферирующих РНК в клетки и ткани. Кроме того, встраивание модифицированных олигорибонуклеотидов в протяженную молекулу РНК позволяет вводить в состав нуклеиновой кислоты разнообразные функциональные группировки. Такие протяженные РНК, содержащие химически активные или репортерные группы, могут быть применены для решения различных задач молекулярной биологии и химии нуклеиновых кислот.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликованы 2 статьи в российском и международном периодических изданиях. Результаты работы были представлены на следующих конференциях: Spring-Meeting and Workshop "Protein-protein interactions" of International Research Training Group, 09.03.–12.03.2008, Rauschholzhausen, Germany; IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, 11.05.–15.05.2008, Новосибирск, Россия; Workshop "Enzyme and enzyme complexes acting on nucleic acids" of International Research Training Group, 16.05.–19.05.2010, Vilnius, Lithuania; Sixth Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology, 04.09.–07.09.2011, Queens' College Cambridge, UK.

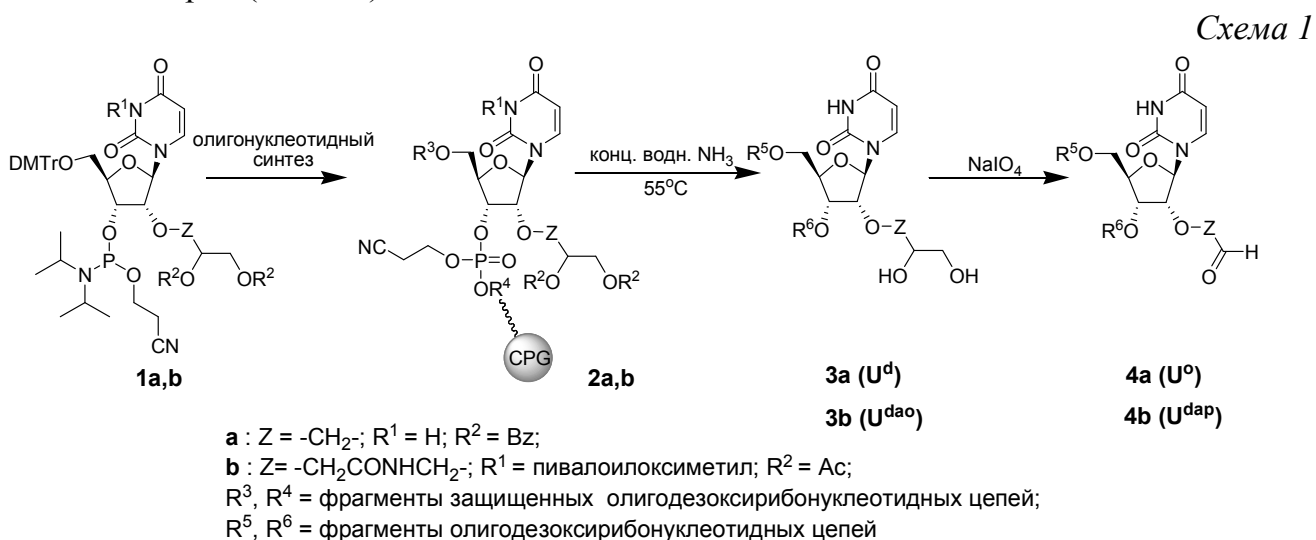
Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, посвященного современным методам исследования структуры белково-нуклеиновых комплексов, обсуждения результатов, экспериментальной части, приложения, выводов и списка цитируемой литературы (251 ссылка), содержит 29 рисунков, 16 схем, 17 таблиц.

Работа выполнена при поддержке программы РФФИ-ННИО «Международные исследовательские группы с участием молодых ученых».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Одним из направлений исследований в химии нуклеиновых кислот является разработка методов синтеза олигонуклеотидов, содержащих в своем составе химически активные группировки. Ранее в лаборатории химии нуклеиновых кислот Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова были разработаны эффективные методы получения 2'-оксоэтильных и 2'-диоксозапентильных олигодезоксирибонуклеотидов – производных нуклеиновых кислот, содержащих в 2'-положении углеводного фрагмента альдегидную группу [Dolinnaya, N.G. et al., 2009]. Такие реакционноспособные аналоги применялись для получения конъюгатов с различными низкомолекулярными соединениями и для исследования закономерностей ковалентного связывания с ДНК-узнающими белками.

Для получения 2'-альдегидных производных ДНК в олигомерную цепь в процессе автоматического твердофазного синтеза встраивают соединение-предшественник, содержащее 1,2-диольную группировку, которую в дальнейшем окисляют до альдегида периодатом натрия (схема 1).



В рамках настоящей работы данная синтетическая схема была взята за основу, а затем соответствующим образом модифицирована для разработки методов синтеза новых 2'-альдегидных олигорибонуклеотидов и 2'-гидразидных ДНК- и РНК-производных. Основной особенностью предложенного в данной работе подхода является возможность использования 3'-амидофосфита **1b** для получения последовательно 1,2-диольных, альдегидных и гидразидных аналогов ДНК и РНК за счет комбинирования приемов твердофазного олигонуклеотидного синтеза и методик постсинтетической модификации фрагментов нуклеиновых кислот.

Следует отметить, что в то время как в литературе описано достаточно много способов получения производных ДНК, содержащих альдегидные группы, число подходов к синтезу модифицированных РНК такого типа ограничено. Основным из них является окисление 3'-концевого звена, которое приводит к образованию реакционноспособной диальдегидной группировки. К недостаткам данного подхода можно отнести формирование нескольких продуктов в реакциях с аминоксодержащими соединениями. В

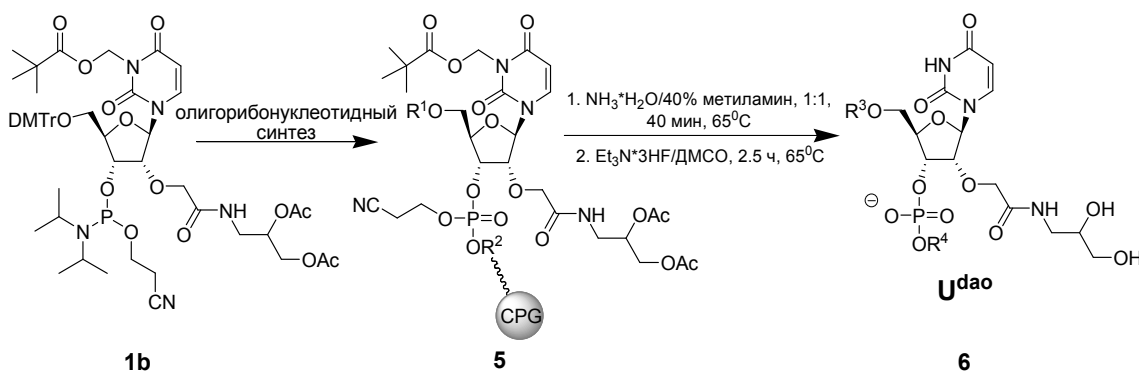
этой связи актуальным представляется разработка новых методов синтеза 2'-альдегидных производных РНК.

1. Синтез модифицированных фрагментов ДНК и РНК, содержащих в 2'-положении 1,2-диольные и альдегидные группировки

Синтез модифицированных ДНК-фрагментов, содержащих 1,2-диольные группировки, осуществляли в рамках метода, представленного на схеме 1.

Для получения модифицированных РНК-производных использовали аналогичный подход, основными преимуществами которого являются простота и универсальность, так как модифицированный 3'-амидофосфит **1b** встраивается в олигорибонуклеотидную цепь без существенного изменения стандартного регламента (схема 2).

Схема 2



R¹, R² = фрагменты защищенных олигорибонуклеотидных цепей;
R³, R⁴ = фрагменты олигорибонуклеотидных цепей

Для получения олигорибонуклеотидов в твердофазном синтезе использовали 0.1 М растворы стандартных 3'-амидофосфитов 2'-*O*-*трет*-бутилдиметилсилильных производных рибонуклеозидов и 0.2-0.5 М раствор модифицированного амидофосфита **1b** в абсолютном ацетонитриле и синтетический цикл, в котором время присоединения модифицированного звена к растущей цепи увеличивали до 30-60 мин. В этих условиях степень превращения на стадии конденсации, определенная по оптическому поглощению диметокситриил-катиона, составляла приблизительно 95-97%.

Необходимым шагом после завершения твердофазного синтеза является деблокирование полученных РНК-фрагментов. Для решения этой задачи мы исследовали возможность использования двух вариантов: 1) обработка смесью концентрированного водного аммиака и этанола (3:1, *v/v*) в течение 17 ч при 25°C; 2) обработка смесью концентрированного водного аммиака и 40%-ного водного метиламина (1:1, *v/v*) (АМА) в течение 40 мин при 65°C. Удаление *трет*-бутилдиметилсилильных защитных групп осуществляли тригидрофторидом триэтиламина по стандартной методике. Необходимо подчеркнуть, что используемые для защиты имидной и 1,2-диольной группировок амидофосфита **1b** пивалоилоксиметильная и ацетильные группы успешно удаляются в процессе деблокирования под действием аммиака или АМА. Тем не менее, второй способ предпочтителен из-за меньшего времени обработки. Таким образом, был предложен метод получения 1,2-диольных олигорибонуклеотидов.

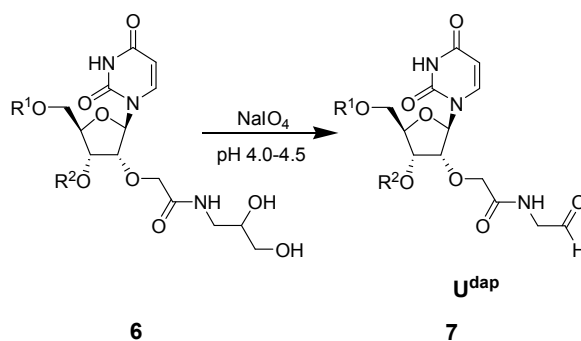
Для решения поставленных задач нами был синтезирован ряд модифицированных олигодезокси- и олигорибонуклеотидов, содержащих остатки 2'-O-[2-(2,3-дигидроксипропил)амино-2-оксоэтил]уридина (U^{dao}) (табл. 1). Строение полученных олигонуклеотидов подтверждали данными масс-спектрометрии MALDI-TOF.

Таблица 1. Данные масс-спектрометрии модифицированных олигонуклеотидов.

№	Олигонуклеотидная последовательность (5'→3')	MALDI-TOF MS, вычисл./найден.
I	d(ACGTTCCU ^{dao} GGCTATTGACTGC)	6522.2/6522.1
II	d(GCACCTCGGAAU ^{dao} GTCCCCTCT)	-
III	d(ATCAAAACAGGACAAATU ^{dao} GTCCTAAAACCAA)	-
IV	d(CG AU ^{dao} TTCGGCCTATTGGT)	5630.7/5630.8
V	d(GCAU ^{dao} TCTAGTTGTGGTTTGTCC)	6872.5/6872.6
VI	r(GAU ^{dao} AGAUGAUUACCGCCGGAGUACGAGGCGCA)	10497.4/10498.0
VII	r(GAUAGA U ^{dao} GAUUACCGCCGGAGUACGAGGCGCA)	10497.4/10496.0
VIII	r(GAUAGAUGAU ^{dao} UACCGCCGGAGUACGAGGCGCA)	10497.4/10497.0
IX	r(GAUAGAUGAUU ^{dao} ACCGCCGGAGUACGAGGCGCA)	10497.4/10496.0
X	r(GUUAUCAUGCUCGGGUAUUCGUCGCGGCCGGUUU ^{dao} C)	11627.9/11628.0
XI	r(UGGU ^{dao} AGGGGCACCUUCCCGAA)	6859.2/6858.5
XII	r(GUUAUCAUGCUCGGGUAU ^{dao} CGCUGC)	8413.1/8410.6
XIII	r(GUUAUCAUGCUCGGGUAUUCGU ^{dao} GC)	8413.1/8410.6
XIV	r(GUUAUCAUGCUCGGGUAU ^{dao} CGCUG)dC	8397.1/8396.2
XV	r(GUUAUCAUGCUCGGGUAUUCGU ^{dao} G)dC	8397.1/8399.7
XVI	r(GUUAU ^{dao} CAUGCUCGGGUAUUCGUCUG)dC	8397.1/8400.3
XVII	r(ACGUCCU ^{dao} GGCUAUUGACUG)dC	6742.1/6745.5
XVIII	r(GCAGCGAUUACCCGU ^{dao} GCAUGAUUAA)dC	8403.1/8403.4

Для получения альдегидсодержащих производных ДНК и РНК проводили окисление 1,2-диольной группировки в составе олигонуклеотидов под действием периодата натрия в течение 1 ч при 25°C (схема 3).

Схема 3



R^1, R^2 = фрагменты олигодезокси- или олигорибонуклеотидных цепей

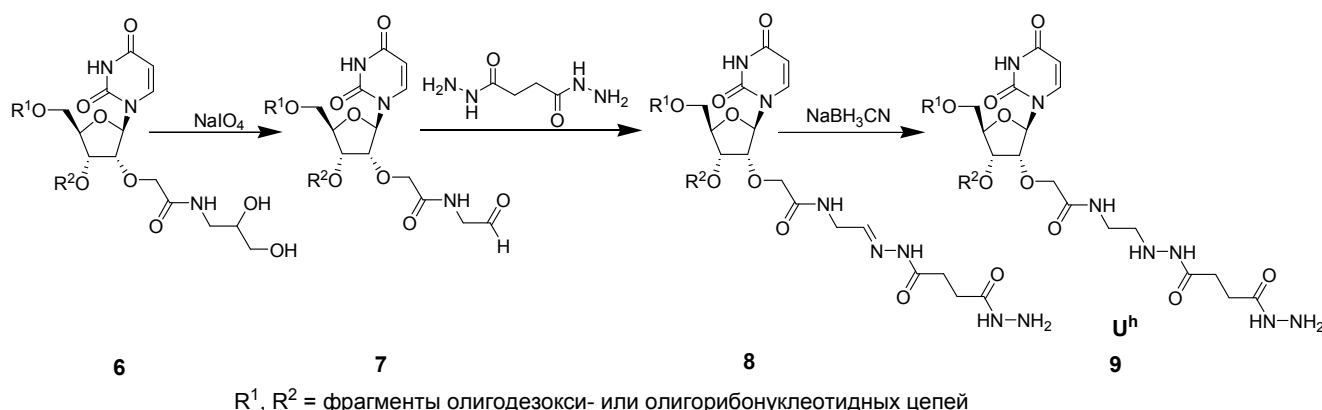
2. Синтез модифицированных фрагментов ДНК и РНК, содержащих в 2'-положении гидразидную группировку

Задачей данной части исследования являлась разработка метода синтеза 2'-гидразидных олигодезокси- и олигорибонуклеотидов – аналогов, содержащих

реакционноспособную нуклеофильную группировку, для дальнейшего получения с их помощью новых НК-производных с заранее заданными свойствами. В литературе описано два основных метода получения гидразидных олигонуклеотидов. Первый предполагает встраивание в олигонуклеотидную цепь в процессе твердофазного автоматического синтеза модифицированного амидофосфита, содержащего гидразидную группировку. Второй вариант – постсинтетическая модификация олигонуклеотида с помощью соединения, в состав которого входит остаток гидразида.

В настоящей работе для получения 2'-гидразидных производных ДНК и РНК был использован второй подход. Олигодезокси- и олигорибонуклеотиды (**I**, **IV**, **V**, **XIV-XVI**, **XVIII**), содержащие 2'-*O*-[2-(2,3-дигидроксипропил)амино-2-оксоэтил]уридин, обрабатывали периодатом натрия для получения 2'-альдегидной группировки (схема 4). Для последующего превращения альдегидной группы в гидразидную к 2'-альдегидным олигонуклеотидам **7** добавляли дигидразид янтарной кислоты в присутствии полярного апротонного растворителя диметилсульфоксида (ДМСО) и проводили реакцию в течение 18 ч при комнатной температуре (рН 4.0-4.5). Образовавшиеся в результате реакции гидразоны **8** восстанавливали цианборгидридом натрия в течение 30 мин при 25°C.

Схема 4



В результате были получены модифицированные олигонуклеотиды, содержащие остатки 2'-*O*-(2-((2-(2-(4-гидразинил-4-оксобутаноил)гидразинил)этил)амино)-2-оксоэтокси)уридина (**U^h**). Степень превращения, определенная методом обращено-фазовой ВЭЖХ, составляла 70-80%. Строение ряда полученных олигонуклеотидов подтверждали данными масс-спектрометрии MALDI-TOF (табл. 2).

Таблица 2. Данные масс-спектрометрии модифицированных олигонуклеотидов.

№	Олигонуклеотидная последовательность (5'→3')	MALDI-TOF MS, вычисл./найден.
XIX	d(CGAU ^h TTCGGCCTATTGGT)	5728.8/5727.9
XX	d(GCAU ^h TCTAGTTGTGGTTTGTCC)	-
XXI	d(ACGTTCCU ^h GGCTATTGACTGC)	-
XXII	r(GUUA AU ^h CAUGCUCGGGUA AU CGCUG)dC	8495.2/8494.9
XXIII	r(GCAGCGAUUACCCGU ^h GCAUGAUUAA)dC	8501.2/8501.4
XXIV	r(GUUA AU CAUGCUCGGGUA AU ^h CGCUG)dC	-
XXV	r(GUUA AU CAUGCUCGGGUA AU CGCU ^h G)dC	-

Таким образом, был предложен эффективный метод получения 2'-гидразидных олигодезокси- и олигорибонуклеотидов, основанный на периодатном окислении 1,2-диольной группы и дальнейшем превращении 2'-альдегида в гидразид с использованием дигидразида янтарной кислоты.

3. Физико-химические свойства олигонуклеотидов, содержащих остатки 2'-O-[2-(2,3-дигидроксипропил)амино-2-оксоэтил]уридина*

Термическую стабильность дуплексов **A-H**, образованных немодифицированными и модифицированными олигонуклеотидами с комплементарными ДНК- или РНК-матрицами, определяли путем регистрации изменений УФ-поглощения исследуемого образца от температуры (табл. 3). Термическую стабильность дуплексов **C** и **D** изучали по изменению флуоресценции красителя SYBR Green I.

Таблица 3. Термическая стабильность ДНК-, РНК- и РНК-ДНК-дуплексов.

Шифр	ДНК-, РНК-, РНК-ДНК-дуплекс (5'→3'/3'→5')	T _{пл} (±1), °C	h ₂₆₀ (±1), %	
A	d (ACGTTCCCTGGCTATTGACTGC) d (TGCAAGGACCGATAACTGACG)	70	25	
B	I	d (ACGTTCCU ^{dao} GGCTATTGACTGC) d (TGCAAGGA--CCGATAACTGACG)	68	25
C	d (ATCAAAACAGGACAAATTGTCCTAAAACCAA) d (TAGTTTTGTCCTGTTTAAACAGGATTTTGGTT)	76	–	
D	III	d (ATCAAAACAGGACAAATU ^{dao} GTCCTAAAACCAA) d (TAGTTTTGTCCTGTTTAA--CAGGATTTTGGTT)	76	–
E	r (A---CGUCCUGGCUAUUGACUG) dC T-r (GCAAGGACCGAUAACUGAC--G)	80	27	
F	XVII	r (A---CGUCCU ^{dao} GGCUAUUGACUG) dC T-r (GCAAGGA--CCGAUAACUGAC--G)	81	26
G	r (ACGUCCUGGCUAUUGACUG) dC d (TGCAAGGACCGATAACTGAC--G)	64	27	
H	XVII	r (ACGUCCU ^{dao} GGCUAUUGACUG) dC d (TGCAAGGA--CCGATAACTGAC--G)	65	26

Введение в состав олигонуклеотидов остатка 2'-O-[2-(2,3-дигидроксипропил)амино-2-оксоэтил]уридина не вызывает заметной дестабилизации ДНК-, РНК- или смешанных РНК-ДНК-дуплексов. Температура плавления меняется в пределах 2°C, а величина гипохромного эффекта – в пределах 1% (табл. 3). Эти результаты согласуются с данными по изучению термической стабильности дуплексов, содержащих остатки 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)уридина [Zatsepin, T.S. et al., 2002].

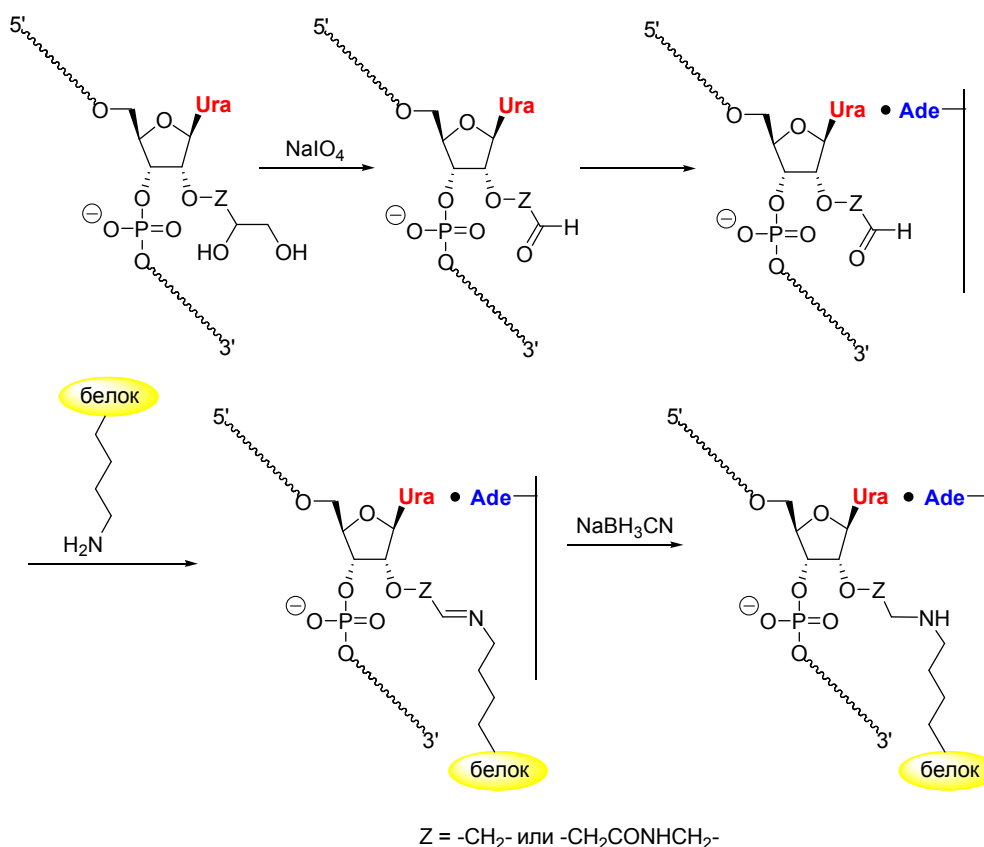
* Для изучения физико-химических свойств использовали 2'-диольные олигонуклеотиды, так как альдегидные аналоги могут быть нестабильны в условиях проведения эксперимента.

4. Взаимодействие метилтрансферазы SsoII с ДНК-дуплексами, содержащими 2'-диольную и 2'-альдегидную группировки

Селективное взаимодействие ϵ -аминогруппы остатков лизина белка с 2'-альдегидной группой в модифицированной ДНК приводит к образованию основания Шиффа, которое затем восстанавливают до вторичного амина цианборгидридом натрия (схема 5).

В ряде предыдущих работ [Dolinnaya, N.G. et al., 2009] была исследована возможность использования 2'-оксоэтильных олигонуклеотидов для аффинной модификации субъединицы p50 фактора транскрипции NF- κ B, эндонуклеазы рестрикции SsoII и метилтрансферазы SsoII. Было обнаружено, что 2'-оксоэтильная группировка в составе модифицированного нуклеотидного остатка, введенного в центральное положение участка узнавания ДНК, образует ковалентную связь с остатками лизинов, которые удалены от ДНК-узнающего центра белка при образовании специфического ДНК-белкового комплекса. В этой связи интересным представлялось оценить, каким образом использование 2'-диоксозапентильного нуклеозида – модифицированного звена другого строения, влияет на эффективность и специфичность кросс-линкинга.

Схема 5



M.SsoII может не только катализировать метилирование ДНК, но и выступать в качестве фактора транскрипции, который связывается с промоторной областью генов системы рестрикции-модификации SsoII. При этом происходит ингибирование собственного синтеза и активация транскрипции гена эндонуклеазы рестрикции SsoII. Основное число контактов с M.SsoII обеспечивает локализованный внутри промоторной области 15-звенный инвертированный повтор (регуляторный участок).

Перед изучением ковалентного связывания необходимо было исследовать влияние введения модифицированного звена в ДНК на комплексообразование с M.SsoII. Для этой цели использовали 2'-диольные олигонуклеотиды, так как альдегидные аналоги проявляют высокую реакционную способность, и в этом случае оценить эффективность образования специфического комплекса не представляется возможным из-за параллельного протекания химической реакции. Степень связывания немодифицированного ДНК-дуплекса С, содержащего регуляторный участок, составляла 78%. Введение модифицированных звеньев – 2'-O-[2-(2,3-дигидроксипропил)амино-2-оксоэтил]уридина (U^{dao}) и 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)уридина (U^d), в состав ДНК-дуплексов D (табл. 3) и J (5'-ATCAAAACAGGACAAATU^dGTCCTAAAACCAA-3'/3'-TAGTTTTGTCCTGTTTAAACAGGATTTTGGTT-5'), соответственно, снижает эффективность образования специфического комплекса с M.SsoII примерно в 1.5 раза. Это может быть связано с тем, что согласно модели [Karyagina, A.S. et al., 2003] модифицированные нуклеотидные остатки находятся в месте предполагаемых контактов с белком, а также, по-видимому, вызывают локальные изменения структуры двойной спирали. Степень связывания фермента с дуплексом K (5'-GCACCTCGGAU^{dao}GTCCCCTCT-3'/3'-GAGCCTTTCAGGGGAGATG-5'), не содержащим участок узнавания, составляет 3%.

Для изучения ковалентного связывания M.SsoII с 2'-альдегидными производными ДНК нами были сконструированы олигонуклеотидные дуплексы L-O, содержащие остатки 2'-O-(2,5-диоксо-3-азапентил)уридина (U^{dap}) или 2'-O-(2-оксоэтил)уридина (U^o) в определенных положениях олигонуклеотидной цепи (табл. 4). Место введения модификации, как и в случае 2'-диольных олигонуклеотидов, было выбрано на основании предложенной модели.

Таблица 4. Эффективность ковалентного связывания ДНК-дуплексов с ДНК-метилтрансферазой SsoII.

Шифр		ДНК (5'→3'/3'→5')	Выход ДНК-белкового конъюгата*, %
L	L1	GCACCTCGGAU ^{dap} GTCCCCTCT	3
	L2	GAGCCTTT--CAGGGGAGATG	
M	M1	ATCAAAACAGGACAAATU ^{dap} GTCCTAAAACCAA	27
	M2	TAGTTTTGTCCTGTTTAA--CAGGATTTTGGTT	
	M1	ATCAAAACAGGACAAATU ^{dap} GTCCTAAAACCAA	8
N	N1	ATCAAAACAGGACAAATU ^o GTCCTAAAACCAA	40
	N2	TAGTTTTGTCCTGTTTAA-CAGGATTTTGGTT	
	N1	ATCAAAACAGGACAAATU ^o GTCCTAAAACCAA	20
O	O1	CTCCAGGC ^o CAAAT	4
	O2	GAGGGTCCGA-GTTTA	

*Приведены средние значения, полученные не менее чем в трех независимых экспериментах. Ошибка измерений не превышала 15%. Регуляторный участок метилтрансферазы SsoII подчеркнут.

Обработку оптимальных условий получения ковалентно связанных комплексов M.SsoII с ДНК проводили с использованием дуплекса **М** (с регуляторным участком M.SsoII). Отношение концентраций ДНК и M.SsoII варьировали от 1:2 до 1:100. Наибольший выход продукта достигался при соотношении дуплекс – белок 1:100.

В табл. 4 приведена эффективность кросс-линкинга различных ДНК-лигандов с метилтрансферазой SsoII. Дуплексы **М** и **Н** содержали регуляторный участок M.SsoII, дуплексы **Л** и **О** не содержали участков узнавания и служили отрицательным контролем. Было показано, что при взаимодействии M.SsoII с ДНК-дуплексами **М** и **Н**, содержащими регуляторный участок, выходы ДНК-белковых конъюгатов составляли 27 и 40%, соответственно (табл. 4, рис. 1). Неспецифические дуплексы **Л** и **О** реагировали с более низкой эффективностью (выход продукта 3% и 4%, табл. 4). Одноцепочечные олигонуклеотиды **М1** и **Н1** также образовывали конъюгаты с M.SsoII с выходами 8 и 20% (табл. 4), хотя их диольные аналоги – олигонуклеотиды **III** (табл. 1) и **XXVI** (5'-ATCAAAACAGGACAAATU^dGTCCTAAAACCAA-3') не формировали комплекс с белком. Следует отметить, что в случае 2'-оксоэтильного ДНК-дуплекса **Н** ковалентное связывание проходило с большей эффективностью. M.SsoII образует с ДНК-дуплексами три конъюгата с различной подвижностью в денатурирующем ПААГ (рис. 1), что связано, по-видимому, с взаимодействием нескольких молекул ДНК с различными остатками лизина мономера M.SsoII, расположенными в НК-узнающем центре или на поверхности белка.

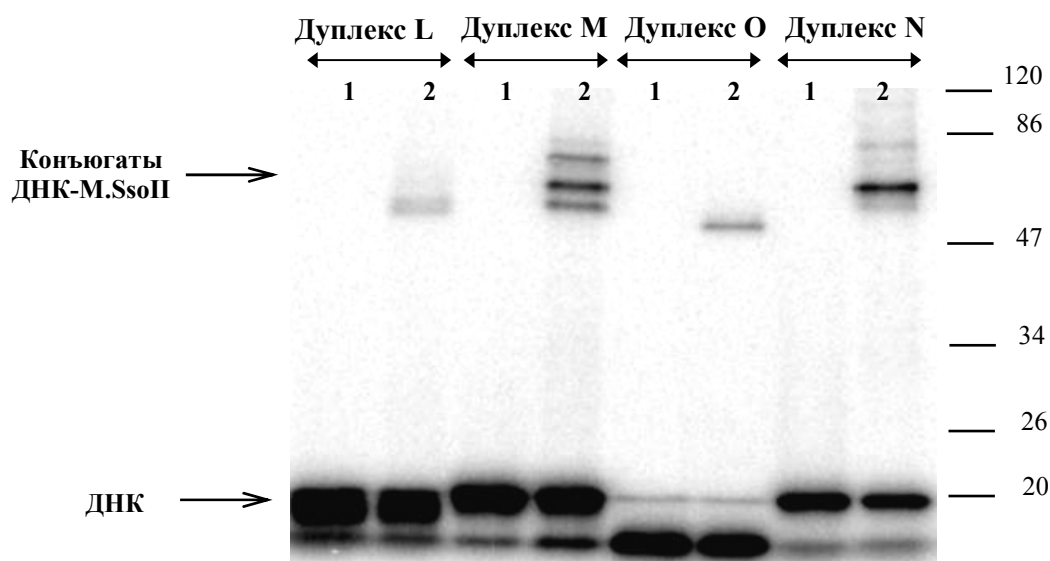


Рис. 1. Радиоавтограф электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ в присутствии додецил сульфата натрия (ДСН) продуктов ковалентного связывания M.SsoII с модифицированными ДНК-дуплексами **Л**, **М**, **О** и **Н**. Дорожки 1 – ДНК-дуплексы **Л**, **М**, **О**, **Н** в отсутствие белка. Дорожки 2 – ДНК-дуплексы **Л**, **М**, **О**, **Н** в присутствии M.SsoII. Положения белков-маркеров и их молекулярные массы в кДа указаны справа. (Маркеры предварительно окрашены синим хромофором.)

5. Изучение ингибирования реакции 2'-альдегидных фрагментов ДНК с метилтрансферазой SsoII в присутствии ДНК-конкурентов

Образование ковалентной связи при взаимодействии M.SsoII со специфическими и неспецифическими ДНК-дуплексами может свидетельствовать о протекании реакции, как в составе специфического комплекса, так и вне его. Кроме того, наблюдается образование

конъюгатов с одноцепочечными олигонуклеотидами, не являющимися лигандами данного фермента. В этой связи необходимым представлялось детально изучить специфичность ковалентного связывания модифицированных фрагментов ДНК, содержащих регуляторный участок, с M.SsoII.

Кросс-линкинг ^{32}P -меченных модифицированных лигандов **М** и **Н** с M.SsoII исследовался в присутствии возрастающих количеств немеченых ДНК-дуплексов (рис. 2). В роли последних выступали: а) немодифицированный ДНК-дуплекс **С** с участком узнавания; б) немодифицированный ДНК-дуплекс **Р** (5'-GATCAGTACTAATTAGCATTA TAAAGGATCA-3'/3'-CTAGTCATGATTAATCGTAATATTTCCSTAGT-5') без участка узнавания; в) модифицированные ДНК-дуплексы **Л**, **О** без участка узнавания. Такой подход является стандартным для определения специфичности ковалентного связывания НК с белком.

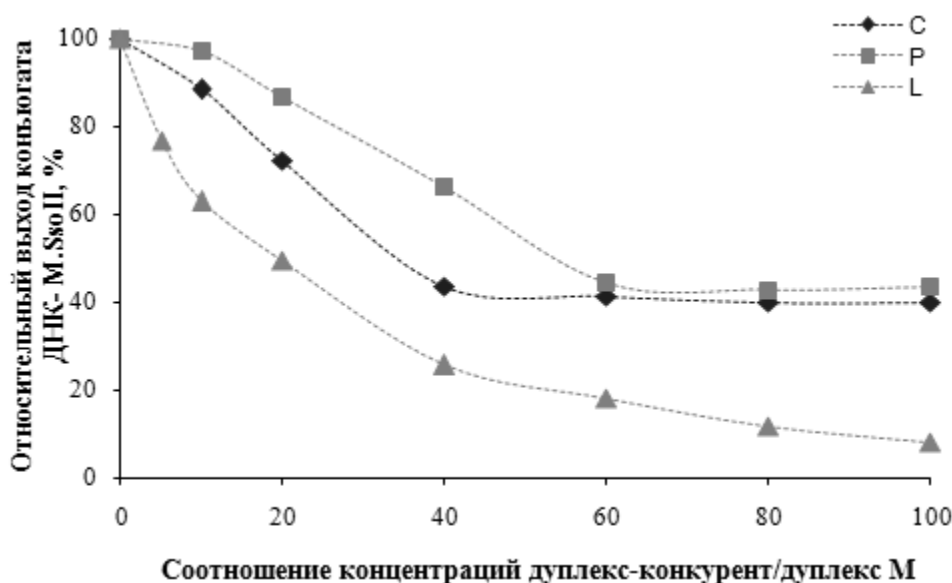


Рис. 2. Зависимость относительного выхода ДНК-белковых конъюгатов от соотношения концентраций ДНК-конкурент/дуплекс **М**. Исследование ковалентного связывания M.SsoII с ДНК-дуплексом **М**, содержащим остаток U^{dap} , в присутствии конкурентов **С**, **Р** и **L**; **Р** – ДНК-дуплекс, не содержащий участок связывания M.SsoII; **С** – ДНК-дуплекс, содержащий регуляторный участок M.SsoII; **L** – реакционноспособный неспецифический ДНК-дуплекс, содержащий остаток U^{dap} . Ошибка измерений не превышала 15%. За 100% принимали максимальный выход комплекса ДНК-белок без добавления ингибитора.

Добавление в реакцию смесь немодифицированных конкурентов снижает выход конъюгата не более чем на 60%. Возможно, изменение характера кривой ингибирования и выход ее на плато при 40-60-кратных избытках конкурента связано с тем, что образование основания Шиффа происходит достаточно быстро, и дуплекс без модификации не способен эффективно конкурировать с ^{32}P -меченным модифицированным фрагментом ДНК. Снижение эффективности кросс-линкинга M.SsoII с ДНК-дуплексом **М** при добавлении в реакцию смесь немодифицированного неспецифического дуплекса **Р**, вероятно, происходит в результате электростатического взаимодействия большого избытка ДНК-конкурента с поверхностью белка. Наибольший ингибирующий эффект наблюдался при добавлении в инкубационную смесь реакционноспособного ДНК-

дуплекса без участка узнавания (рис. 2, кривая L). Аналогичный характер ингибирования ковалентного связывания наблюдался в случае 2'-оксоэтильных производных.

Неизбирательный характер взаимодействия M.SsoII с 2'-оксоэтильными и 2'-диоксоазапентильными дуплексами, может быть связан с тем, что реакция альдегидных групп олигонуклеотидов с ε-аминогруппами остатков лизина происходит параллельно с формированием специфического комплекса ДНК-белок. Возможно, быстрое протекание химической реакции препятствует взаимодействию ДНК-связывающего белка со специфическим лигандом. Кроме того, подобный характер ингибирования может быть связан с тем, что химическая реакция происходит одновременно с протеканием первой стадии узнавания белком ДНК-лиганда в рамках двухстадийного механизма, когда более прочный специфический комплекс образуется на второй стадии. Подобный механизм показан для ряда белков, таких как репликационный белок А, ТАТА-связывающий белок, эндонуклеаза рестрикции EcoRV, метилтрансфераза EcoKI.

Обобщая полученные экспериментальные результаты, можно сделать вывод о снижении специфичности узнавания на фоне параллельного протекания химической реакции. Такой характер взаимодействия альдегидных производных ДНК с M.SsoII связан с тем, что активная группировка в составе ДНК-фрагмента реагирует не только с остатками лизина ДНК-узнающего центра после образования специфического комплекса, а с любыми доступными лизинами при столкновении молекул белка и ДНК в растворе. Невозможность различить продукты кросс-линкинга, образовавшиеся в рамках специфического комплекса и вне его, затрудняет применение 2'-альдегидных производных ДНК для структурно-биологических исследований.

Таким образом, нами были синтезированы производные ДНК, содержащие в своем составе остатки 2'-O-(2,5-диоксо-3-азапентил)уридина. Впервые было изучено их взаимодействие с метилтрансферазой SsoII. Проведено сравнительное исследование свойств альдегидных олигонуклеотидов двух типов: 2'-оксоэтильных и 2'-диоксоазапентильных. В случае оксоэтильных дуплексов выходы продуктов ковалентного связывания были примерно в 1.5 раза выше. Однако различие в строении модифицированных звеньев не сказывается на специфичности взаимодействия ДНК-дуплексов с M.SsoII.

6. Ковалентное связывание 2'-альдегидных олигонуклеотидов с белком бактериальной рибонуклеазы Р*

Для изучения свойств новых реакционноспособных олигорибонуклеотидов было проведено исследование взаимодействия 2'-альдегидных производных РНК с белком бактериальной рибонуклеазы Р.

Рибонуклеаза Р (РНКаза Р) *in vivo* формирует рибонуклеопротеиновый комплекс, состоящий из одной субъединицы РНК и одной молекулы белка. Функцией данного фермента является каталитическое отщепление 5'-концевой последовательности претРНК. В качестве модельного объекта для изучения особенностей ковалентного связывания использовали бактериальную рибонуклеазу Р, в состав которой входят РНК-компонента из *Bacillus stearothermophilus* и белок из *Bacillus subtilis* (Р-белок).

* Данная часть работы была проведена в рамках совместных исследований с лабораторией профессора Роланда Хартмана, Университет имени Филиппа, Марбург, Германия.

При изучении ковалентного связывания РНК *B. stearothermophilus* с белком *B. subtilis* РНКазы Р в состав РНК-компоненты в одно из положений было встроено модифицированное звено (U^{dap}), содержащее альдегидную группировку. Остаток 2'-диоксиазепентильного нуклеозида был включен в положения 20 или 24 РНК, непосредственно сближенные с Р-белком (рис. 3). Положения модификаций в РНК были выбраны на основе модели, предложенной в работе [Buck, A.N. et al., 2005]. Модифицированное звено было также введено в положение 6 РНК, не контактирующее с белком (рис. 3). Такую РНК планировалось использовать в качестве отрицательного контроля.

Были предложены два метода формирования полноразмерной РНК, содержащей в своем составе модифицированное звено (рис. 3). Первый подход предполагал лигирование РНК-транскрипта – фрагмента РНК РНКазы Р из *B. stearothermophilus*, кодируемого геном *rnpB* и не содержащего 26 нуклеотидов с 5'-конца (*Bstea-rnpB*[Δ 1-26]), и модифицированного олигонуклеотида, содержащего 1,2-диольную группу, с помощью фермента Т4 ДНК-лигазы на ДНК-матрице. Окисление диольной группировки до альдегидной предполагалось проводить после формирования полноразмерной РНК.

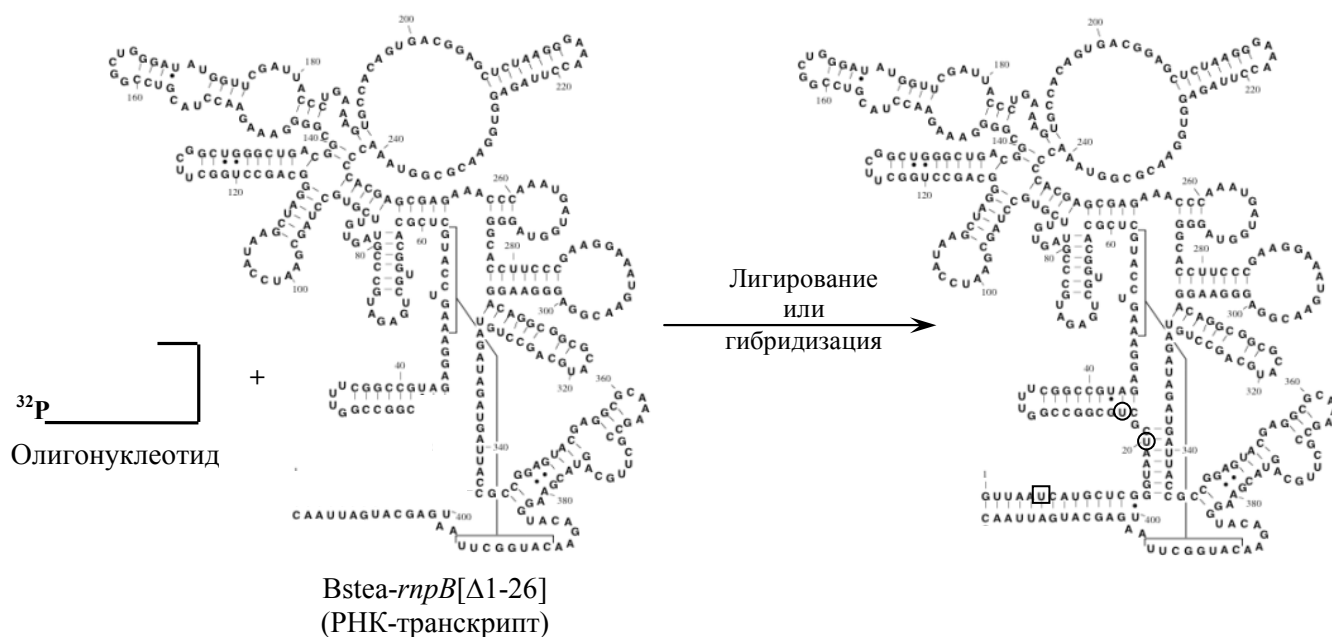


Рис. 3. Формирование полноразмерной РНК *B. stearothermophilus*. Остатки U^{dap} , вовлеченные во взаимодействие с белком *B. subtilis* РНКазы Р, выделены овалом (○). Квадратом (□) отмечен остаток U^{dap} , не контактирующий с белком согласно модели.

Второй способ получения полноразмерной РНК РНКазы Р основан на формировании комплекса между РНК-транскриптом и предварительно окисленным модифицированным олигонуклеотидом, содержащим на 3'-конце дезоксирибонуклеотидное звено, за счет комплементарных взаимодействий в процессе гибридизации (рис. 3). С этой целью модифицированный или немодифицированный олигонуклеотид добавляли к транскрипту *Bstea-rnpB*[Δ 1-26] в соотношении 1:20, соответственно. Встраивание 2'-дезоксирибонуклеотида необходимо, чтобы не допустить образования 3'-концевой диальдегидной группировки в процессе периодатного окисления. Данный метод формирования полноразмерной РНК позволяет избежать лигирования и должен упростить

идентификацию аминокислотных остатков после проведения ковалентного связывания между РНК и белковой компонентой рибонуклеазы Р.

Анализ наблюдаемых констант скорости реакции ферментативного гидролиза пре-РНК рибонуклеопротеиновыми комплексами РНКазы Р, содержащими лигированную и нелигированную РНК, показал, что вне зависимости от способа формирования структуры такие РНК проявляют активность в составе рибонуклеопротеинового комплекса, сопоставимую с активностью холофермента, содержащего РНК дикого типа. Введение модифицированного звена U^{dao} в состав РНК-компоненты не влияет на ферментативную активность РНКазы Р. В этой связи в дальнейшем для получения РНК-белковых конъюгатов полноразмерную РНК формировали за счет комплементарных взаимодействий.

Ковалентное связывание белка РНКазы Р с 2'-диоксоазептильными олигонуклеотидами XXVII-XXIX (табл. 5, рис. 4) проводили в рамках метода, представленного на схеме 5 (соотношение олигорибонуклеотид – белок 1:100). Олигонуклеотид XXIX служил отрицательным контролем, так как в этом случае модификация, согласно предложенной модели, локализована в области, не взаимодействующей с белком (рис. 3).

В табл. 5 приведена эффективность кросс-линкинга различных РНК-лигандов, отличающихся положением модифицированного звена, с белком *B. subtilis* рибонуклеазы Р.

Таблица 5. Эффективность ковалентного связывания РНК и ДНК-дуплексов с белком рибонуклеазы Р.

Шифр	РНК-транскрипт	Олигорибонуклеотид (5'→3') или ДНК (5'→3'/3'→5')	Выход НК-белкового конъюгата*, %
XXVII	+	r (GUUAAUCAUGCUCGGGUAAU ^{dap} CGCUG) dC	9
XXVII	-	r (GUUAAUCAUGCUCGGGUAAU ^{dap} CGCUG) dC	6
XXVIII	+	r (GUUAAUCAUGCUCGGGUAAUCGCU ^{dap} G) dC	8
XXVIII	-	r (GUUAAUCAUGCUCGGGUAAUCGCU ^{dap} G) dC	6
XXIX	+	r (GUUAAU ^{dap} CAUGCUCGGGUAAUCGCUG) dC	9
XXIX	-	r (GUUAAU ^{dap} CAUGCUCGGGUAAUCGCUG) dC	5
L	-	GCACCTCGGAAU ^{dap} GTCCCCTCT GAGCCTTT--CAGGGGAGATG	15
M	-	ATCAAAACAGGACAAATU ^{dap} GTCCSTAAAACCAA TAGTTTTGTCCCTGTTTAA--CAGGATTTTGTT	10

*Приведены средние значения, полученные не менее чем в трех независимых экспериментах. Ошибка измерений не превышала 15%.

Было показано, что при взаимодействии Р-белка с РНК, сформированной из транскрипта с олигонуклеотидами XXVII и XXVIII, выходы РНК-белковых конъюгатов составляли 9 и 8%, соответственно (рис. 4). Применявшийся в качестве отрицательного

контроля олигонуклеотид **XXIX**, входящий в состав РНК РНКазы Р, реагировал с такой же эффективностью (выход продукта 9%, табл. 5). Кроме того, Р-белок образовывал конъюгаты с модифицированными одноцепочечными олигорибонуклеотидами **XXVII-XXIX** без добавления транскрипта *Bstea-rnpB*[\Delta1-26], что исключает формирование РНК-составляющей фермента и образования специфического РНК-белкового комплекса. Выходы продуктов ковалентного связывания Р-белка с олигонуклеотидами **XXVII-XXIX** снижались незначительно и составляли 5-6% (табл. 5). Из данных литературы известно, что Р-белок может взаимодействовать с короткими одноцепочечными фрагментами РНК или ДНК, однако, эффективность связывания с олигодезоксирибонуклеотидами значительно ниже, чем с РНК-фрагментами [Spitzfaden, С. et al., 2000]. Кроме того, было обнаружено, что ДНК-дууплексы **L** и **M**, содержащие остаток 2'-*O*-(2,5-диоксо-3-азапентил)уридина, также образовывали конъюгаты с Р-белком с выходами 10 и 15%, соответственно (табл. 5).

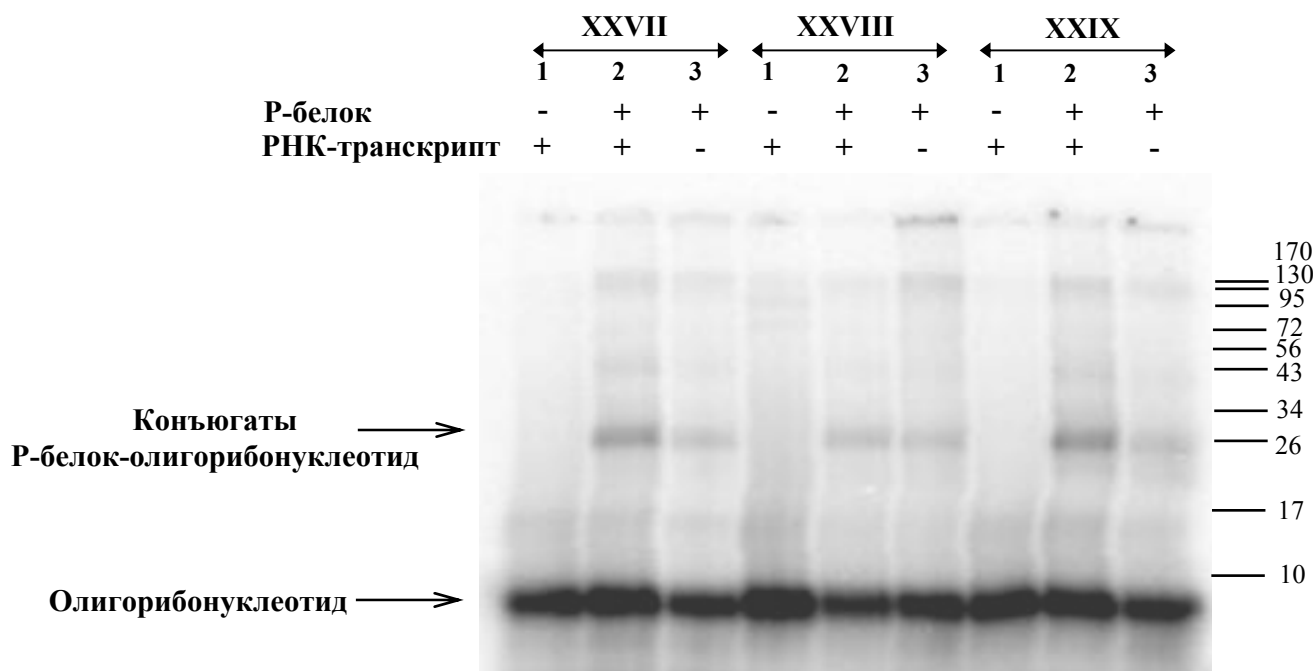


Рис. 4. Анализ методом электрофореза в 13%-ном ПААГ в присутствии ДСН продуктов ковалентного связывания белка *B. subtilis* РНКазы Р с модифицированными ³²Р-меченными фрагментами РНК **XXVII-XXIX**. Олигорибонуклеотиды **XXVII-XXIX** в присутствии транскрипта *Bstea-rnpB*[\Delta1-26] (дорожки 1), в присутствии транскрипта *Bstea-rnpB*[\Delta1-26] и Р-белка (дорожки 2), в присутствии Р-белка (дорожки 3). Положения белков-маркеров и их молекулярные массы в кДа указаны справа. Представлен радиоавтограф геля.

Таким образом, нами были впервые синтезированы производные РНК, содержащие в своем составе остатки 2'-*O*-[2-(2,3-дигидроксипропил)амино-2-оксоэтил]уридина, и изучено их взаимодействие в составе РНК-субъединицы *Bacillus stearothermophilus* с белком рибонуклеазы Р из *Bacillus subtilis*.

Данные, полученные при проведении кросс-линкинга, показывают, что реакция 2'-альдегидсодержащих олигорибонуклетидов с белком РНКазы Р носит неспецифический характер. По-видимому, как и для ДНК-узнающих белков, быстрое протекание химической реакции препятствует взаимодействию РНК-связывающего белка со специфическим лигандом. Возможно, неизбирательное протекание химической реакции происходит также

на фоне низкой специфичности связывания Р-белка с РНК-лигандами в выбранных условиях.

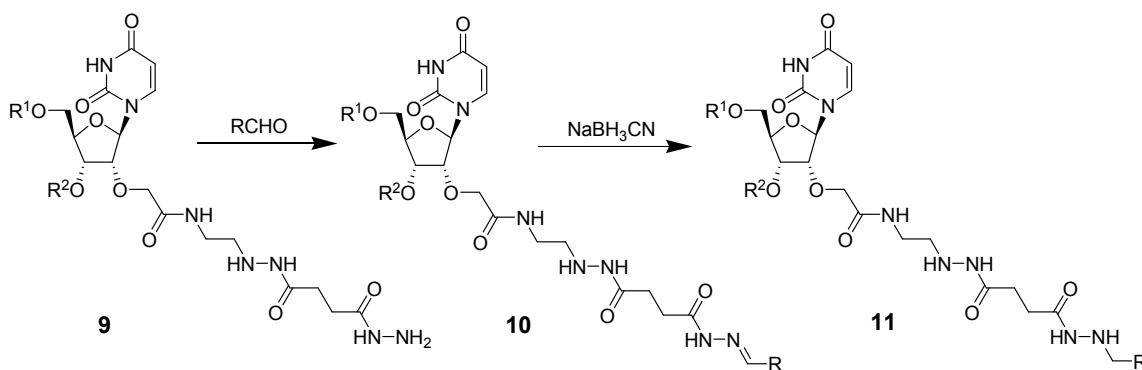
Тем не менее, высокая реакционная способность полученных соединений позволит использовать их для получения конъюгатов с различными низкомолекулярными соединениями, которые направленно изменяют свойства НК-фрагментов. Кроме того, альдегидные производные РНК могут применяться для присоединения пептидов и белков для последующей эффективной и адресной доставки малых интерферирующих РНК в клетки и ткани.

7. Получение конъюгатов 2'-гидразидных олигонуклеотидов с карбонильными соединениями

В настоящее время получение конъюгатов олигонуклеотидов с различными молекулами представляется достаточно перспективным подходом к направленному изменению физико-химических и субстратных свойств фрагментов нуклеиновых кислот, что, в свою очередь, является необходимым условием для использования последних в молекулярно-биологических и медицинских исследованиях. Перспективным подходом для получения конъюгатов олигонуклеотидов с различными молекулами является метод хемоселективного лигирования. В этом случае образование конъюгата происходит благодаря взаимодействию уникальной пары химически активных групп, избирательно реагирующих с высоким выходом за короткий промежуток времени. Примерами таких реакций могут выступать 1,3-диполярное циклоприсоединение по Хьюсгену, реакции Дильса-Альдера, Штаудингера, малеимидных производных с тиольными группами, а также реакция карбонильных соединений с различными нуклеофилами: гидразинами, гидразидами, аминокси- и 1,2-аминотиольными соединениями.

Реакцию 2'-гидразидных олигонуклеотидов **9** с серией алифатических и ароматических альдегидов проводили в водном растворе (рН 4.5-5.5) или в смеси с ДМСО в течение 18 ч при 25°C. Образовавшийся в результате реакции гидразон **10** восстанавливали 50 мМ раствором NaBH₃CN в течение 30 мин при 25°C (схема 6). В случае ароматических альдегидов восстановление не требовалось, так как гидразоны, образованные ароматическими альдегидами, стабильны в широком интервале рН. Реакционные смеси анализировали методами гель-электрофореза в 20%-ном ПААГ в присутствии 7 М мочевины или обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Схема 6



R¹, R² = фрагменты олигодезокси- или олигорибонуклеотидных цепей

Строение полученных конъюгатов **10** и **11** подтверждали данными масс-спектрометрии MALDI-TOF (табл. 6). Степень превращения в среднем составляла 60-90%.

Анализ данных масс-спектрометрии (табл. 6) показывает, что в ряде случаев в процессе реакции образуется несколько продуктов, отличающихся по массе на 1, 2 или 3 алкильных или алкилиденовых остатка, что может быть связано с множественным алкилированием экзоциклических аминогрупп гетероциклических оснований.

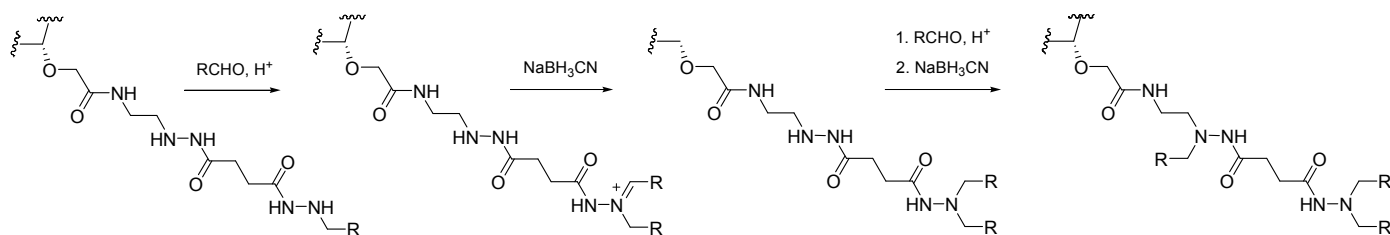
Чтобы проверить это предположение, были проведены реакции немодифицированного олигонуклеотида той же последовательности, что и олигонуклеотид **XX** и других олигонуклеотидов случайной последовательности с 4-гидрокси-3-метоксибензальдегидом и пирен-1-карбальдегидом с добавлением или без добавления NaBH_3CN . При анализе реакционных смесей методами обращенно-фазовой ВЭЖХ, гель-электрофореза в 20%-ном ПААГ, масс-спектрометрии MALDI-TOF продуктов алкилирования гетероциклов обнаружено не было (данные не приведены).

Таблица 6. Данные масс-спектрометрии конъюгатов 2'-гидразидных олигонуклеотидов с низкомолекулярными соединениями.

Олигонуклеотид ^a	Присоединяемая молекула	MALDI-TOF MS, вычисл./найден.
XIX	2-Гидрокси-1-нафтальдегид	5884.9/5882.6
XIX	Антрацен-9-карбальдегид	5919.0/5918.6
XIX	4-Диметиламинокоричный альдегид	5888.0/5887.3 6047.2/6046.9 ^c 6206.5/6206.4 ^d
XIX	3-(4- <i>трет</i> -Бутилфенил)пропаналь	5903.1/5903.5 6077.3/6075.4 ^c 6251.6/6251.9 ^d
XIX	4-Гидрокси-3-метоксибензальдегид ^b	5862.9/5862.6 6000.1/5997.1 ^c 6135.2/6134.2 ^d
XIX	4-Гидрокси-3-метоксибензальдегид	6001.1/6000.2 ^c 6137.2/6136.1 ^d
XX	Перилен-3-карбальдегид ^b	7232.9/7232.6
XX	Пирен-1-карбальдегид ^b	7182.8/7182.8
XXI	Пирен-1-карбальдегид ^b	6832.6/6832.1
XXII	4-Гидрокси-3-метоксибензальдегид	8631.3/8633.0 8767.5/8767.6 ^c
XXIV	Перилен-3-карбальдегид ^b	8757.5/8758.5
XXV	Пирен-1-карбальдегид ^b	8707.4/8706.7

^a нуклеотидная последовательность см. табл. 2; ^b без восстановления NaBH_3CN ; ^c две алкильные или алкилиденовые группы; ^d три алкильные или алкилиденовые группы

В связи с этим можно предположить, что в процессе реакции протекает множественное алкилирование остатков гидразидов. Возможный механизм реакции представлен на схеме 7. Это может быть использовано для присоединения флуоресцентных молекул, когда множественное включение приводит к увеличению интенсивности сигнала.



R = алкильный или арильный остаток

Таким образом, было показано, что 2'-гидразидные олигонуклеотиды могут быть успешно применены для конъюгации с различными ароматическими и алифатическими альдегидами.

ВЫВОДЫ:

1. С использованием 3'-амидофосфита 2'-*O*-[2-(2,3-диацетоксипропил)амино-2-оксоэтил]-5'-*O*-(4,4'-диметокситритил)-*N*3-пивалоилоксиметилуридина впервые синтезированы модифицированные олигорибонуклеотиды, содержащие в 2'-положении углеводного фрагмента 1,2-диольные и альдегидные группировки.
2. Показано, что встраивание в олигонуклеотидную цепь модифицированных остатков уридина, содержащих 1,2-диольные группировки, существенно не влияет на термическую стабильность ДНК-, РНК- и гибридных дуплексов.
3. Данные, полученные при проведении кросс-линкинга в присутствии ДНК-конкурентов, показывают, что реакция 2'-оксоэтильных и 2'-диоксозапентильных дуплексов с метилтрансферазой SsoII носит неизбирательный характер, что свидетельствует о снижении специфичности узнавания на фоне параллельного протекания реакции между ϵ -аминогруппой остатка лизина белка и альдегидной группировкой или о возможном наличии двухстадийного механизма узнавания белком ДНК-лиганда.
4. Ковалентное связывание 2'-диоксозапентильных олигорибонуклеотидов с белком РНКазы Р носит неизбирательный характер, так как, по-видимому, быстрое протекание химической реакции препятствует специфическому взаимодействию белка с лигандом.
5. Предложен новый эффективный метод получения 2'-гидразидных производных ДНК и РНК. Показано, что 2'-гидразидные олигонуклеотиды могут быть успешно применены для конъюгации с различными ароматическими и алифатическими альдегидами.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Статьи

1. Хомякова Е.А., Казанова Е.В., Зубин Е.М., Кубарева Е.А., Молочков Н.В., Рязанова Е.М., Орецкая Т.С. 2'-Альдегидные олигонуклеотиды. Синтез и применение для аффинной модификации ДНК-узнающих белков. // *Биоорганическая химия* (2010) **36**, N 3, С. 343-353.
2. Е.А. Khomyakova, E.M. Zubin, I.P. Smirnov, G.E. Pozmogova, D.A. Stetsenko, T.S. Oretskaya. DNA or RNA oligonucleotide 2'-hydrazides for chemoselective click-type ligation with carbonyl compounds. // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* (2011) **30**, N. 7-8. P. 577-584.

Тезисы конференций

1. Е.А. Khomyakova, E.M. Zubin, I.P. Smirnov, G.E. Pozmogova, T.S. Oretskaya, D.A. Stetsenko. "DNA or RNA oligonucleotide 2'-hydrazides for chemoselective click-type ligation with carbonyl compounds", Sixth Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology, 04.09.–07.09.2011, Queens' College Cambridge, UK, Poster abstract 65.
2. Е. Khomyakova, E. Zubin, N. Dolinnaya, L. Pavlova, E. Kubareva, R. Hartmann, T. Oretskaya. "2'-Modified oligoribonucleotides: synthesis, properties and cross-linking with RNase P", Workshop "Enzymes and enzyme complexes acting on nucleic acids" of the International Research Training Group Gießen/Marburg-Moscow (DFG/RFBR-funded), 16.05.–19.05.2010, Vilnius, Lithuania.
3. Е.А. Хомякова, Е.В. Казанова, А.В. Качалова, Е.М. Зубин. "2'-Модифицированные олигонуклеотиды. Синтез и применение." // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, 11.05.–15.05.2008, Новосибирск, Россия, С. 159.
4. Орецкая Т.С., Ле Тхи Хиен, Ян Фань, Федотова Е.А., Хомякова Е.А. "Модифицированные олигонуклеотиды: химия и молекулярно-биологические исследования", IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, 11.05.–15.05.2008, Новосибирск, Россия, С. 151.
5. Е. Khomyakova, E. Zubin, E. Kubareva, S. Müller, R. K. Hartmann, T. Oretskaya. "Synthesis of reactive 2'-aldehyde oligonucleotides for cross-linking with DNA methyltransferase SsoII and ribonuclease P", Spring-Meeting and Workshop "Protein-protein interactions" of the International Research Training Group, 09.03.–12.03.2008, Rauschholzhausen, Germany, P. 6.