

УДК 577.112.4

## РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ КОМПОНЕНТОВ КАК АДРЕСОВАННЫЕ РЕАГЕНТЫ

*Кнорре Д. Г., Власов В. В.*

Обзор посвящен производным нуклеиновых кислот и их компонентов — нуклеотидов, нуклеозидтрифосфатов и олигонуклеотидов, несущим реакционноспособные группы. Такие производные являются важными инструментами исследования белково-нуклеиновых взаимодействий, функциональной топографии сложных белковых и нуклеопротеидных структур, открывая перспективу высокоизбирательного воздействия на живые организмы, в том числе на нуклеиновые кислоты и нуклеопротеиды генетического аппарата. В обзоре рассмотрены основные группы таких реагентов, методы их получения и свойства, определяющие возможность их применения для избирательной (аффинной) модификации биополимеров. На примерах аффинных реагентов нуклеотидной природы проанализированы общие принципы конструирования аффинных реагентов и их использования.

Библиография — 121 ссылка.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1426
II. Некоторые физико-химические характеристики процесса аффинной модификации	1421
III. Основные задачи, решаемые методом аффинной модификации, и общие принципы конструирования и использования аффинных реагентов	1426
IV. Реакционноспособные производные нуклеозидов, нуклеозидмоно-, ди- и трифосфатов	1434
V. Реакционноспособные производные олигонуклеотидов	1439
VI. Реакционноспособные производные нуклеиновых кислот	1442

### I. ВВЕДЕНИЕ

Среди неисчерпаемого многообразия белков живой природы большая группа белков обладает способностью к специфическому взаимодействию с нуклеотидами и нуклеиновыми кислотами определенной структуры. Субстратами или эффекторами сотен ферментов различной специфичности являются нуклеотиды, нуклеозидди- и трифосфаты, нуклеотидные коферменты. В селективном взаимодействии с нуклеиновыми кислотами участвуют практически все белки и нуклеопротеиды, обеспечивающие хранение, умножение и реализацию наследственной информации клеток и вирусов — ферменты системы репликации ДНК, ферменты транскрипции и последующего процессинга образующихся РНК, ферменты репарации, обеспечивающие удаление поврежденных участков ДНК и их регенерацию, все макромолекулярные компоненты, участвующие в биосинтезе белков, в том числе аминоксил-тРНК-синтетазы, рибосомы, многочисленные факторы трансляции. Поэтому изучение механизма и в первую очередь структурных основ селективного взаимодействия нуклеиновых кислот и нуклеотидов с белками, часто называемого белково-нуклеиновым узнаванием, является одной из центральных задач молекулярной биологии и биоорганической химии.

Не менее кардинальное, хотя и не столь многоплановое значение в обеспечении ключевых процессов жизнедеятельности имеет селективное взаимодействие между нуклеиновыми кислотами. Достаточно напомним

нить, что специфическое взаимодействие комплементарных последовательностей нуклеотидов лежит в основе установленной Уотсоном и Криком [1] двуспиральной структуры ДНК.

Одним из наиболее эффективных методов изучения специфических взаимодействий биополимеров с низкомолекулярными или полимерными партнерами (лигандами) является химическая модификация биополимеров с помощью реагентов, сохраняющих основные структурные черты специфического лиганда и тем самым сродство к биополимеру (аффинность) и одновременно несущих реакционноспособную группу, способную к химическому взаимодействию с биополимером в условиях, близких к реальным условиям функционирования биополимера. Такие реагенты получили название аффинных, а сам метод обычно называют аффинным мечением или аффинной модификацией [2, 3]. В комплексе биополимера с аффинным реагентом химическая реакция с биополимером проходит вблизи участка специфического взаимодействия (узнавания), ковалентно закрепляя лиганд в этом участке. Фрагмент аффинного реагента, обеспечивающий специфичное сродство к биополимеру, направляет реагент на определенный участок поверхности белковой молекулы или на определенную последовательность нуклеотидов в нуклеиновой кислоте и тем самым является своего рода адресом, помогающим реагирующей группе найти мишень. Поэтому аффинные реагенты можно также называть адресованными реагентами.

В связи с этим реакционноспособные производные нуклеиновых кислот и их компонентов являются важными инструментами исследования белково-нуклеинового узнавания и взаимодействия между нуклеиновыми кислотами. Эти производные также открывают перспективу высокоизбирательного воздействия на многие ключевые биохимические и молекулярно-генетические процессы в живых организмах.

Настоящий обзор посвящен химии адресованных реагентов нуклеотидной природы, содержащих в качестве адреса нуклеотиды, нуклеозидтрифосфаты, олигонуклеотиды и нуклеиновые кислоты, методам их получения, свойствам, существенным для их использования при проведении аффинной модификации. Обзор не преследует цели систематически описать все многочисленные приложения реагентов для решения задач биохимии, молекулярной и клеточной биологии, медицины. Эти применения фигурируют лишь в качестве отдельных наиболее демонстративных и существенных примеров. В значительной мере обзор основан на исследованиях, выполненных в отделе биохимии Новосибирского института органической химии СО АН СССР, в настоящее время преобразованном в Новосибирский институт биоорганической химии.

Реакционноспособные производные нуклеиновых кислот и их компонентов являются одной из наиболее систематически исследованных групп аффинных реагентов. Поэтому в ходе изучения особенно четко выявились основные принципы их конструирования, проблемы, возникающие при использовании таких производных и пути их решения. В связи с этим специальный раздел обзора посвящен общим вопросам аффинной модификации на примерах адресованных реагентов нуклеотидной природы.

## **II. НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОЦЕССА АФФИННОЙ МОДИФИКАЦИИ**

Согласно основной идее метода аффинной модификации реакция биополимера Р протекает в комплексе с аффинным реагентом, закрепленным системой нековалентных взаимодействий в области узнавания биополимером некоторого природного лиганда L. Образование комплекса PL может быть зафиксировано либо рядом физико-химических методов, либо по проявлению биологической функции, обусловленной взаимодействием Р с L. В большинстве последующих примеров речь будет идти о ферментативной активности, количественной характеристикой которой является скорость катализируемой ферментом реакции. Эта

скорость пропорциональна концентрации комплекса фермент — субстрат или, в случае реакции, идущей с участием двух субстратов, концентрации комплекса фермента с обоими субстратами. Область узнавания в этом случае является частью активного центра фермента.

Концентрация комплекса PL:

$$[PL] = K[L]P_t / (1 + K[L])$$

где  $K$  — константа ассоциации  $P$  с  $L$ ,  $P_t$  — полная концентрация биополимера.

Аффинный реагент, построенный на основе природного лиганда  $L$  и содержащий реакционноспособную группу  $X$ , может быть представлен как  $L-X$ . Этот реагент конкурирует с  $L$  за область узнавания. В присутствии обоих соединений концентрации комплексов  $P$  с  $L$  и  $L-X$  равны:

$$[PL] = K[L]P_t / (1 + K[L] + K_x[L-X])$$

$$[P \cdot L-X] = K_x[L-X]P_t / (1 + K[L] + K_x[L-X])$$

$K_x$  — константа ассоциации  $P$  с  $L-X$ .

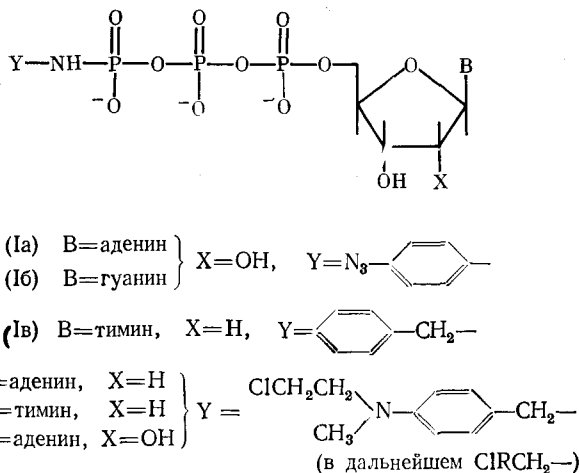
Если некоторая количественная характеристика биологической функции  $F$  пропорциональна концентрации комплекса, то в общем случае, когда комплекс  $P \cdot L-X$  также функционально активен,

$$F = \alpha[PL] + \alpha_x[P \cdot L-X]$$

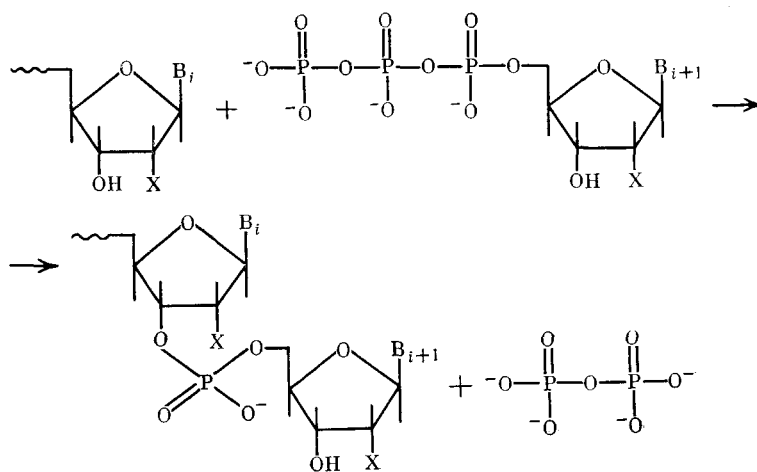
где  $\alpha$  и  $\alpha_x$  — коэффициенты пропорциональности. В случае ферментативной реакции таковыми являются константы скорости превращения комплексов  $PL$  и  $P \cdot L-X$  в комплекс фермент — продукт реакции. Если  $\alpha_x = 0$ , т. е. комплекс с реагентом функционально неактивен, то  $L-X$  ведет себя как конкурентный ингибитор по отношению к  $L$ .

Для систем, в которых исследовались реакционноспособные производные нуклеиновых кислот и их компонентов, известно несколько случаев функциональной активности аффинных реагентов.

Производные нуклеозид-5'-трифосфатов, в первую очередь соединения (Ia—e), нашли широкое применение при изучении полимераз нуклеиновых кислот.



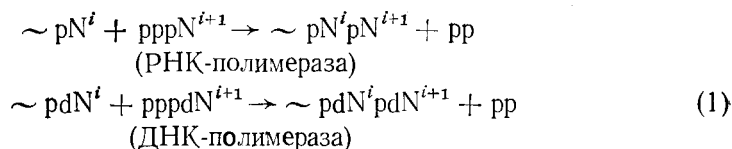
Полимеразы нуклеиновых кислот катализируют синтез молекул ДНК (ДНК-полимеразы) или РНК (РНК-полимеразы) путем переноса нуклеотидного остатка от нуклеозид-5'-трифосфата на растущую полинуклеотидную цепочку:



X = Н для ДНК-полимераз

X = OH для РНК-полимераз

В дальнейшем в обзоре будет широко использоваться номенклатура, принятая в химии нуклеиновых кислот и утвержденная Международным союзом чистой и прикладной химии (IUPAC) и Международным союзом по биохимии (IUB) [4]. Согласно этой номенклатуре остаток ортофосфорной кислоты обозначается р, остаток нуклеозида — заглавной буквой его названия. Символ р слева от символа нуклеозида означает, что фосфат связан 5'-оксигруппой, а справа — с 3'-оксигруппой рибозы или дезоксирибозы. В случае дезоксирибонуклеозидов перед символом нуклеозида ставится буква d. В этой записи реакция, катализируемая полимеразой, имеет вид:



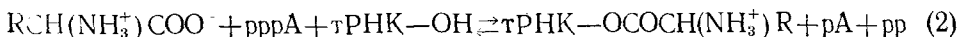
Важнейшей особенностью полимераз нуклеиновых кислот является зависимость их от матричной нуклеиновой кислоты, РНК или ДНК. В соответствии с этим различают РНК-зависимые и ДНК-зависимые полимеразы. Матричная нуклеиновая кислота на каждом этапе роста цепи способствует отбору фрагментов для включения в растущую цепь одного из четырех мономеров, комплементарного нуклеотиду матрицы, находящемуся в декодирующем участке фермента. Так как после присоединения нового мономерного фрагмента матрица смещается на одно звено относительно декодирующего участка и отбор проводится следующим нуклеотидом матрицы, то синтезируется нуклеиновая кислота с последовательностью нуклеотидов, комплементарной матричной нуклеиновой кислоте.

Исследования, проведенные с тремя полимеразой нуклеиновых кислот из кишечной палочки *Escherichia coli*, показали, что  $\gamma$ -амиды нуклеозидтрифосфатов, в частности реакционноспособные производные (Ia) и (Iб), являются субстратами ДНК-зависимой РНК-полимеразы [5, 6]. В то же время соединения (Iв) и (Iг) являются эффективными афинными реагентами ДНК-зависимой ДНК-полимеразы (ДНК-полимераза I) [7] и РНК-зависимой ДНК-полимеразы [8]. Субстратных свойств у  $\gamma$ -амида dTTP (Iв) по отношению к ДНК-полимеразе I не обнаружено. На примере  $\gamma$ -анилида аденозин-5'-трифосфата<sup>1</sup> показано, что при

<sup>1</sup> Аденозин-5'-трифосфат (АТФ) является субстратом или эффектором сотен различных ферментативных реакций и его реакционноспособные производные и аналоги широко используются при изучении этих ферментов.

синтезе РНК из этого аналога освобождается не пирофосфат, а его анион.

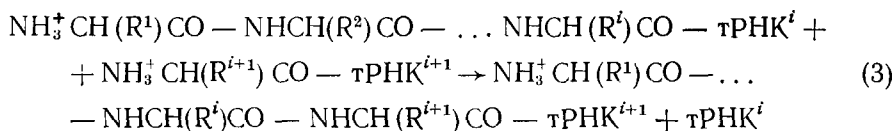
Ключевым ферментом биосинтеза белков являются аминоксил-тРНК-синтетазы. Каждый из них катализирует присоединение определенной аминокислоты к соответствующей транспортной РНК путем образования сложноэфирной связи между карбоксилем аминокислоты и ОН-группой на 3'-конце РНК. Процесс происходит сопряженно с гидролизом АТР до аденозин-5'-монофосфата (АМР) и пирофосфата:



Реагент (Ia) является конкурентным ингибитором широкого спектра аминоксил-тРНК-синтетаз и не может заменять АТР в качестве субстрата [9—11]. Однако в случае лейцил-тРНК-синтетаз, выделенных из хлоропластов и цитоплазмы *Euglena gracilis* [12], (Ia) оказался субстратом, способным заменять АТР в реакции (2).

Биосинтез белка происходит на рибосомах и программируется матричной (информационной) РНК (мРНК). Последовательность аминокислот в синтезируемом белке запрограммирована в мРНК в виде последовательности триплектоидов (кодона), которые отбирают из смеси аминоксил-тРНК одну, имеющую антикодон, специфично опознаваемый соответствующим кодоном. Тем самым отбирается и соответствующая аминокислота. Например, полиуридилловая кислота  $(pU)_n$  способствует отбору фенилаланил-тРНК с антикодоном —  $pGrArA$ —.

Аналогично полиадениловая кислота  $(pA)_n$  способствует отбору рибосомной лизил-тРНК. Отобранная аминоксил-тРНК реагирует с растущей полипептидной цепью, находящейся на рибосоме в виде пептидил-тРНК по реакции:



Поэтому в присутствии полиуридилловой кислоты и даже ее коротких фрагментов вплоть до  $(pU)_3$  фенилаланил-тРНК связывается с рибосомой. В присутствии полиадениловой кислоты с рибосомой связывается Lys-тРНК. Было найдено, что алкилирующие производные олигонуклеотидов  $(pN)_n$ , несущие либо на 5'-, либо на 3'-конце N-2-хлорэтил-N-метиламинофенильный фрагмент ClR, также стимулируют связывание кодируемых ими аминоксил-тРНК с рибосомой, т. е. введение реакционно-способной группы в 3'- или 5'-положение не нарушает функциональной активности олигонуклеотида [13—15].

Таким образом, афинные реагенты  $L-X$  либо функционируют наравне с лигандом  $L$ , либо являются конкурентными ингибиторами выполняемой биополимером функции. Естественно, что обратимое ингибирование нужно изучать в условиях, когда не проявляется химическая активность  $L-X$ , в результате которой происходит ковалентное связывание  $L-X$  с областью узнавания биополимера. Это нетрудно сделать в случае фотоактивных реагентов, например реагентов (Ia, б), которые вступают в реакцию при УФ-облучении, переводящем химически инертный в физиологических условиях азид в высокореакционноспособный бирадикал нитрен. Для этого достаточно проводить исследование функциональной активности  $P$  в присутствии  $L$  и  $L-X$  в темноте. В противном случае следует использовать достаточно быстрые тесты на функциональную активность, проводимые за время, существенно меньшее, чем время химического превращения  $L-X$  в комплексе с  $P$ . В случае некоторых реагентов можно реакционноспособное производное превратить в очень сходное по структуре неактивное производное. Например, выдержав реагенты  $(Ig-e)$  в воде время, достаточное для гидролиза связи  $C-Cl$ , можно получить из  $ClRCH_2NHpppN$  близкое по структуре, а тем самым и по сродству к биополимеру производное  $HORCH_2NHpppN$

и исследовать его ингибирующее действие на функцию изучаемого биополимера  $n$ , следовательно, оценить его сродство к биополимеру.

Скорость афинной модификации равна:

$$v = k[P \cdot L - X] = \frac{kK_x [L - X] P_t}{1 + K[L] + K_x [L - X]}$$

где  $k$  — константа скорости реакции  $L - X$  с  $P$  в составе комплекса  $P \cdot L - X$ .

В случае, если афинный реагент (и природный лиганд, если он введен в реакционную смесь) находятся в достаточном избытке по сравнению с полимером и не претерпевает побочных превращений:

$$v = \frac{kK_x [L - X]_0 P_t}{1 + k[L]_0 + K_x [L - X]_0}$$

где  $[L]_0$ ,  $[L - X]_0$  — начальные концентрации. Поскольку в случае афинной модификации полная концентрация биополимера убывает:

$$P_t = (P_t)_0 - [L - X - P]$$

где  $(P_t)_0$  — начальная концентрация биополимера,  $L - X - P$  — продукт афинной модификации. Процесс в этом случае является реакцией псевдопервого порядка:

$$v = \frac{d[L - X - P]}{dt} = \frac{kK_x [L - X]_0}{1 + K[L]_0 + K_x [L - X]_0} \{(P_t)_0 - [L - X - P]\}$$

Как следует из этого выражения, зависимость кажущейся константы скорости от концентрации афинного реагента имеет гиперболический характер, а природный лиганд тормозит процесс афинной модификации (как принято говорить, защищает полимер от афинной модификации). Оба эти факта являются важными критериями, выполнение которых свидетельствует о том, что изучаемый процесс протекает по механизму афинной модификации.

Если в результате афинной модификации адресующая часть реагента оказывается фиксированной в области узнавания, то это существенно затрудняет или делает вообще невозможным взаимодействие природного лиганда  $L$  с биополимером  $P$ , т. е. делает биополимер функционально неактивным. Считая, что функциональная активность биополимера, сохранившаяся к определенному моменту времени, пропорциональна концентрации немодифицированного биополимера, можно следить за ходом афинной модификации по инактивации биополимера, которая при достаточном избытке  $L - X$  по отношению к полимеру описывается кинетическим уравнением реакции псевдопервого порядка

$$-\frac{dF}{dt} = k_{\text{инак}} F = \{kK_x [L - X]_0 / (1 + K_x [L - X]_0)\} F$$

Все приведенные уравнения выведены в предположении, что  $L - X$  расходуется только в реакции с полимером в составе комплекса  $P \cdot L - X$ . Если реагент взят в избытке к  $P$ , реакция будет идти до полного израсходования полимера. На самом деле, однако, достаточно активные группы  $X$  как правило могут реагировать также и с водой, с компонентами, создающими буферность среды, а также с самим биополимером без предварительного комплексообразования, в том числе и с участками, не имеющими прямого отношения к области узнавания. Превращению при этом подвергается группа  $X$ , теряющая свою реакционную способность, в то время как адрес не претерпевает изменения, т. е. сродство к биополимеру сохраняется. Образующийся продукт превращения  $L - R$  становится ингибитором афинной модификации с некоторой константой  $K_r$ , являющейся константой ассоциации  $L - R$  с  $P$ . Кинетический анализ такого процесса проведен в работе [16] в предположении, что реагент взят в существенном избытке. Уравнение кинетической кривой

для общего случая, когда  $K_r \neq K_x$ , имеет вид:

$$[L - X - P]/(P_t)_0 = 1 - \left[ \frac{1 + K_x [L - X]_0}{1 + K_r [L - X]_0 - (K_r - K_x) [L - X]_0 \exp(-k_0 t)} \right]^{\frac{\gamma K_x}{K_r - K_x}}$$

В этом случае реакция не доходит до конца, т. е. степень превращения  $P$  в  $L - X - P$  даже в пределе не достигает единицы.

$$\{[L - X - P]/(P_t)_0\}_{t=\infty} = 1 - \left( \frac{1 + K_x [L - X]_0}{1 + K_r [L - X]_0} \right)^{\frac{\gamma K_x}{K_r - K_x}} \quad (4)$$

где  $k_0$  — константа скорости псевдопервого порядка для превращения  $L - X$  в растворе с водой и другими компонентами,  $k_0 \gamma$  — константа скорости превращения комплекса  $P \cdot L - X$  в продукт афинной модификации. Степень превращения в конце реакции может быть измерена с достаточной степенью точности даже в случае, если афинная модификация протекает очень быстро и получить кинетические характеристики процесса затруднительно. Видно, что в подходящей области концентрации из зависимости (4) можно получить значения констант ассоциации  $K_x$  и  $K_r$  и величину  $\gamma$ , которые входят в (4) в качестве независимых параметров.

Кинетика афинной модификации в еще большей степени усложняется, если взаимодействие  $P$  с  $L - X$  является сложной реакцией, идущей через образование активных промежуточных частиц. Рассмотрение такого процесса, выходящее за рамки данного обзора, проведено в работах [17, 18].

### III. ОСНОВНЫЕ ЗАДАЧИ, РЕШАЕМЫЕ МЕТОДОМ АФИННОЙ МОДИФИКАЦИИ, И ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АФИННЫХ РЕАГЕНТОВ

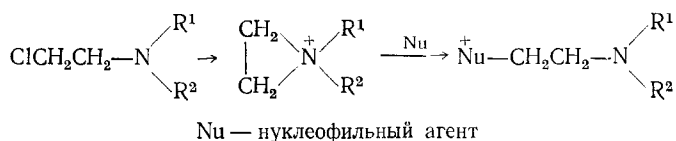
Природа реакционноспособной группы афинного реагента, способ введения этой группы в природный лиганд или его аналог, носитель сродства к биополимеру (адрес) и способ проведения афинной модификации в значительной мере определяют, какая задача должна решаться с помощью этого реагента. Поэтому прежде, чем переходить к систематическому описанию различных типов реакционноспособных производных нуклеиновых кислот и их компонентов, рассмотрим основные задачи, для решения которых применяется метод афинной модификации, и вытекающие из них требования к афинным реагентам и способам проведения афинной модификации.

Начнем с вопроса об изучении области специфического взаимодействия биополимера с лигандом с помощью реакционноспособного производного лиганда. В предельно упрощенном виде этот подход предполагает, что происходит достаточно жесткая фиксация адресующей части реагента в области узнавания за счет нековалентных взаимодействий, после чего биополимер атакуется реагирующей группой и реагент ковалентно закрепляется в той же области. Для биополимера с известной первичной структурой после этого устанавливается, какой именно аминокислотный или нуклеотидный остаток оказался химически модифицированным. Тем самым находится мономерный фрагмент, расположенный в области узнавания или ее ближайшей окрестности. Если известна пространственная структура биополимера и имеются данные или достаточно надежные представления о конформации реагента, то можно определить всю область взаимодействия биополимера с адресом.

Ясно, что жесткая фиксация адреса должна резко ограничивать область контакта биополимера с реагирующей группой и, тем самым, область, в которой может пройти химическая модификация. Для того, чтобы она действительно прошла, необходимо, чтобы в этой области

оказалась хотя бы одна группа, в принципе способная к химическому взаимодействию с используемым реагентом. А это тем более вероятно, чем менее селективна реагирующая группа.

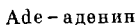
Среди гетеролитических процессов с этой точки зрения наиболее благоприятны реакции сильных и мало селективных электрофилов с многочисленными нуклеофильными центрами белков и нуклеиновых кислот. К числу последних относятся имидазольные кольца остатков гистидина,  $\epsilon$ -аминогруппы остатков лизина, карбоксильные группы остатков аспартата и глутамата, оксигруппы остатков серина, треонина, тирозона, SH-группы остатков цистеина, карбонильный кислород пептидных связей и остатков глутамина и аспарагина, концевые amino- и карбоксильные группы полипептидных цепей, многие положения гетероциклических оснований нуклеиновых кислот, фосфодиэфирные межнуклеотидные и концевые фосфомоноэфирные группы полинуклеотидных цепей. Среди реагирующих групп этого типа в афинных реагентах на основе нуклеиновых кислот и их компонентов наибольшее применение нашли к настоящему времени умеренно реакционноспособные группы  $\text{CH}_2\text{ICO}$  и  $\text{CH}_2\text{BrCO}$  и ароматические и алифатические 2-хлорэтиламиногруппы. Первые реагируют по прямому механизму, вторые — через промежуточное образование высокоэлектрофильных этилениммониевых катионов:



В случае ароматических 2-хлорэтиламинов первая стадия является лимитирующей [19], промежуточные катионы чрезвычайно реакционноспособны и не накапливаются в измеримых концентрациях, практически мгновенно реагируя с нуклеофилами, в том числе с водой, неизменно присутствующей при проведении афинной модификации биополимеров. Реакционную способность их по отношению к нуклеофилам принято характеризовать величиной фактора конкуренции, представляющего собой отношение скорости реакции с нуклеофилом к скорости реакции с водой, деленное на концентрацию нуклеофила [20].

В последнее время в качестве реагирующей группы афинных реагентов для атаки на нуклеофильные центры предложены также производные  $\text{Pt}^{2+}$  [21, 22].

По данным, полученным в безводных модельных системах, еще менее селективным является синглетный нитрен  $\text{R}-\text{N}:$ , способный к введению по связям  $\text{X}-\text{H}$ , в том числе по связям  $\text{C}-\text{H}$ . В связи с этим широкое применение в качестве афинных реагентов нашли производные арилазидов, которые при УФ-облучении генерируют нитрены. Потенциально синглетный нитрен может модифицировать даже боковые радикалы гидрофобных аминокислот — аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, пролина. Однако проведенные недавно исследования поведения нитренов в водном растворе показали, что им свойственны быстро протекающие вторичные превращения, существенно зависящие от природы других радикалов в том же фенильном кольце [23, 24]. Так, было установлено, что соединение (Ia) —  $\gamma$ -*n*-азидоанилид АТР — при УФ-облучении водного раствора быстро превращается в хинони-минимид [25].



На примере реагента (Ia) видно, что помимо адреса, которым в данном случае является остаток АТР, и реагирующей группы в нем имеется соединительный фениламидный фрагмент (спейсер). При жесткой фиксации адреса модификация в этом случае пройдет вне участка узнавания. Такие реагенты получили название экзореагентов. Для попадания в активный центр желательно иметь реагирующую группу в составе самого адреса, т. е. использовать эндореагент. Естественно, что это можно сделать лишь за счет некоторого искажения части адреса, убедившись, что такое искажение не вызывает резкого изменения сродства к биополимеру. Примерами эндореагентов могут служить аденозин-5'-триметафосфат (II) (АТМР) или продукт окисления АТР периодатом по *цис*-диольной группе (oАТР).

 $\text{oATP}$ 

Описан ряд попыток прямой фотохимической сшивки нуклеиновых кислот и их компонентов в комплексе с биополимерами. В силу малого времени жизни возбужденного состояния можно ожидать, что модификация произойдет непосредственно в участке взаимодействия хромофора с биополимером. Однако природа образующихся продуктов, их стабильность, в том числе в условиях, необходимых для последующей

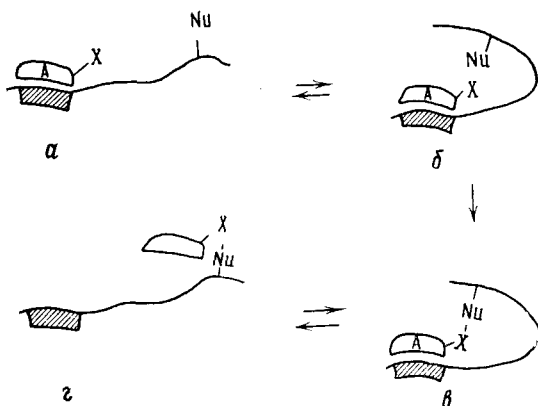


Рис. 1

Рис. 2

Рис. 1. Схематическое изображение модификации биополимера по нуклеофильному центру Nu-реагентом, состоящим из адреса А и электрофила Х, приводящее к фиксации адреса вне области узнавания (заштрихована): а — преобладающая конформация комплекса биополимер — реагент; б — мало заселенная конформация с благоприятным взаимным расположением реагирующих групп; в — та же конформация после реакции; г — преобладающая конформация продукта модификации

Рис. 2. Положения в структуре фенилаланиновой тРНК из *E. coli* остатков гауозина (черные точки), по которым производится статистическое введение фотоактивируемых групп при получении афинного реагента азидо-тРНК [37]

идентификации и локализации модифицированного фрагмента, пока что мало изучены и сегодня еще нельзя оценить перспективность использования этого подхода для определения области узнавания.

Как уже отмечалось, представление о жесткой фиксации адреса само по себе не является бесспорным. Всякое узнавание обеспечивается многоточечным взаимодействием. Поэтому в комплексе биополимер — лиганд наряду с состоянием, в котором реализованы все точки контакта, должны существовать менее заселенные состояния с взаимодействием по неполному набору точек. В результате этого реагирующая группа может приобрести существенную подвижность. Биополимеры также не являются жесткими молекулами и представлены популяцией конформаций, о чем свидетельствует способность многих биополимеров к направленным конформационным переходам. Поэтому комплекс биополимер — лиганд может быть представлен множеством состояний с различными взаимными ориентациями реагирующей группы и реакционно-способных участков биополимера. Вероятность афинной модификации определяется не только заселенностью того или иного состояния, но и тем, сколь благоприятно это состояние для химического превращения. Поэтому в результате модификации биополимера афинным реагентом адрес может оказаться закрепленным в состоянии, существенно отличающемся от функционально значимого и даже может оказаться выведенным из области узнавания, как это схематично представлено на рис. 1.

Из всего сказанного выше следует, что даже небольшие изменения как в области узнавания биополимера и ее ближайшего окружения, так и в структуре реагента, могут кардинально повлиять на течение процесса и результат афинной модификации. Приведем несколько примеров.

Соединение (Ia), как уже указывалось, является конкурентным ингибитором аминоацил-тРНК-синтетаз, в том числе наиболее изученных в этом плане фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* [9] и триптофанил-тРНК-синтетазы из поджелудочной железы быка [10]. В обоих случаях при УФ-облучении комплекса (Ia) с ферментом происходит ковалентное присоединение реагента к ферменту. Однако, если во втором случае оно сопровождается инактивацией фермента, то в случае фенилаланил-тРНК-синтетазы присоединение до 20 остатков реагента

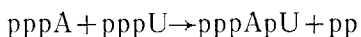
не приводит к потере кинетической активности, т. е. адрес оказывается закрепленным вне области узнавания АТР. Замена остатка *n*-азидо-анилина в (Ia) на остаток *n*-азидо-*N*-метилбензиламина дает реагент, который фотохимически присоединяется к фенилаланил-тРНК-синтазе и инактивирует фермент [26].

Реагенты (Id) и (Ig) при УФ-облучении инактивируют РНК-зависимую ДНК-полимеразу и ДНК-полимеразу (I) из *E. coli*. Однако для получения одинакового уровня инактивации фермента в первом случае нужна в 50 раз меньшая концентрация реагента, чем во втором.

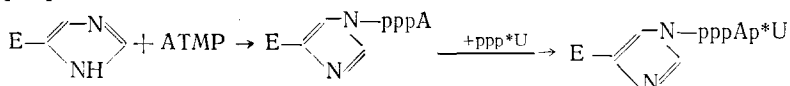
Реагент (Ie) был исследован как афинный реагент по отношению к дрожжевой гексокиназе — ключевому ферменту углеводного обмена, катализирующему перенос остатка ортофосфата с АТР на 6-оксигруппу глюкозы. В зависимости от рН среды фермент существует в форме мономера или димера. Оказалось, что (Ie) не является конкурентным ингибитором мономерной гексокиназы и в соответствии с этим не инактивирует активный центр фермента. В то же время (Ie) обладает соизмеримым с АТР сродством к димерной форме гексокиназы и необратимо ингибирует этот фермент [27]. Интересно отметить, что аналогичное производное АМР, ClRCH<sub>2</sub>NHrA, необратимо ингибирует по механизму афинной модификации мономерную форму гексокиназы и не действуют на ее димерную форму [28].

Таким образом, один и тот же реагент может вести себя резко differently по отношению к биополимерам, выполняющим однотипные функции, или к разным состояниям одного и того же биополимера. В то же время, как видно из приведенных примеров, вводя некоторые изменения в структуру адреса или спейсерного фрагмента, обычно удается найти подходящий афинный реагент для исследуемого биополимера.

Наряду с изменением структуры можно повлиять на результат афинной модификации, изменяя способ ее проведения. В работе [29] предложен прием, который может найти достаточно широкое применение при афинной модификации ферментов, катализирующих двух- и трех-субстратные реакции. Исследовалась начальная фаза реакции, катализируемой РНК-полимеразой *E. coli*, причем в присутствии субстратов rppA и rppU при используемой матрице (фрагмент ДНК бактериофага T7) фермент катализировал реакцию:



Использование в качестве афинного реагента АТМР (II) в силу его высокой реакционной способности может привести к неспецифичной модификации. Однако, если АТМР присоединился к ферменту, последующее присоединение второго звена полинуклеотидной цепи возможно лишь в случае связывания фрагмента rppA в районе активного центра фермента. При использовании нерадиоактивного АТМР и УТР, меченого <sup>32</sup>P в α-положении трифосфатного фрагмента, радиоактивная метка окажется только в участке, соответствующем активному центру фермента. Было показано, что присоединение проходит по остатку гистидина [29].



Е—фермент с остатком гистидина

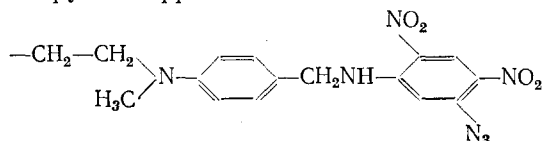
Все сказанное демонстрирует, что создание и применение афинных реагентов, пригодных для локализации отдельных остатков мономеров в области узнавания, является далеко не тривиальной задачей, как могло бы показаться из упрощенной модели афинной модификации. Поэтому неудивительно, что на этом пути до сих пор получено ограниченное число надежно трактуемых результатов.

Существенно проще выглядит задача выяснения с помощью афинной модификации функциональной значимости отдельных субъединиц в многосубъединичных структурах. В этом случае достаточно, чтобы реак-

ция прошла в пределах той субъединицы, которая взаимодействует с адресом. Наибольшее число исследований такого рода выполнено с рибосомами, в особенности с рибосомами из *E. coli*, для которых в настоящее время известна первичная структура всех трех составляющих рибосому молекул РНК (рибосомные РНК или рРНК) и всех 53 белков. Первоочередной интерес представляет выяснение областей связывания мРНК, двух молекул тРНК, несущих в соответствии с уравнением (3) пептидный и аминокислотный остатки (Р- и А-сайты рибосом), и области, катализирующей перенос пептидного остатка на аминокислотную группу аминоацил-тРНК, так называемого пептидилтрансферазного центра. Для изучения этих областей методом афинной модификации нужны реакционноспособные производные тРНК и мРНК. Поскольку наибольшее значение в области узнавания мРНК имеет район, в котором осуществляется кодон-антикодонное взаимодействие, то широко используются реакционноспособные производные олигонуклеотидов, содержащих один или несколько кодонов. Так как идентификация модифицированных белков и фрагментов рРНК проводится с использованием электрофореза и основана на определении электрофоретической подвижности, то существенно, чтобы перед идентификацией модифицированных компонентов был удален большой олиго- или полинуклеотидный адрес. В этой связи удобно пользоваться реагентами, у которых адрес может быть отщеплен от реагента в достаточно мягких условиях. Этому условию в частности удовлетворяют упомянутые в предыдущем разделе производные олигорибонуклеотидов  $\text{ClRCH}_2\text{NH}(\text{pN})_n$  и  $(\text{pN})_n > \text{CHNCl}$ , у которых алкилирующий фрагмент связан с адресом либо фосфамидной, либо ацетальной связью. Оба типа связи достаточно устойчивы в условиях афинной модификации, но легко гидролизуются в слабо кислой среде.

Во многих случаях область взаимодействия полимерного адреса со сложной субъединичной структурой является достаточно протяженной. В частности, области взаимодействия мРНК и тРНК с рибосомой захватывают ряд компонентов рибосомы, как рРНК, так и белков. Для выявления этой области в традиционном варианте, основанном на использовании в качестве афинного реагента индивидуального соединения, необходим набор реагентов с разными положениями реагирующей группы относительно адреса. Так, при изучении области связывания мРНК с рибосомами из *E. coli* и из печени крысы [14, 30—32] с помощью алкилирующих производных олигоуридилатов оказалось, что как распределение метки между рРНК и белками, так и наборы модифицированных белков резко различаются в зависимости от того, к какому из концов, 3' или 5', олигонуклеотидного адреса присоединен N-2-хлорэтил-N-метиламинофенильный фрагмент.

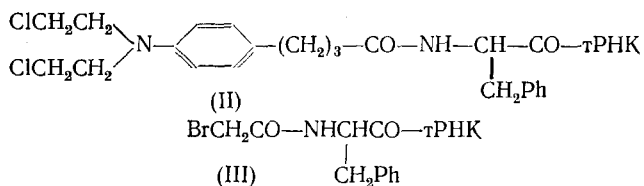
Получение широкого набора производных с разными фиксированными положениями реакционноспособных групп в случае полимерного адреса, например, в случае тРНК, является весьма трудоемкой задачей. Поэтому в качестве реагентов для первого этапа исследования удобно использовать производные, у которых активные группы разбросаны по всей полимерной молекуле статистически. Число таких групп на каждой отдельной молекуле тРНК должно быть небольшим, не более 2—3, чтобы не нарушить способность тРНК к специфическому взаимодействию с рибосомой. Для этой цели были созданы производные тРНК, содержащие фотоактивируемые фрагменты:



ковалентно привязанные к многочисленным остаткам гуанина тРНК (рис. 2) [33]. При наличии на молекулах фенилаланиновой тРНК из *E. coli* 1—2 таких остатков они сохраняют способность ферментативно

присоединять фенилаланин, а образующаяся фенилаланил-тРНК в присутствии поли-U селективно связывается с рибосомой. Эти производные (азидо-тРНК) нашли широкое применение для изучения области связывания тРНК с рибосомой в различных функциональных состояниях рибосом [34, 35].

С помощью азидо-тРНК был решен также вопрос об области взаимодействия фенилаланиновой тРНК с фенилаланил-тРНК-синтетазой из *E. coli* [33]. Этот фермент состоит из двух типов субъединиц —  $\alpha$  и  $\beta$ . Первоначально вопрос исследовался с помощью алкилирующих производных тРНК, несущих реакционноспособные группы на аминоконцевом фрагменте:



Были получены на первый взгляд противоречащие друг другу результаты — первый реагент алкилировал преимущественно  $\alpha$ -субъединицу [36], второй —  $\beta$ -субъединицу [37]. Использование азидо-тРНК показало, что при облучении комплекса фермента с этими производными тРНК присоединяется исключительно по  $\beta$ -субъединице [33]. То обстоятельство, что при малом размере заместителя при  $\alpha$ -аминогруппе алкилируется также  $\beta$ -субъединица, а при увеличении размера заместителя — преимущественно  $\alpha$ -субъединица, дополнительно позволило заключить, что акцепторный конец тРНК в комплексе с ферментом локализован недалеко от области контакта субъединиц.

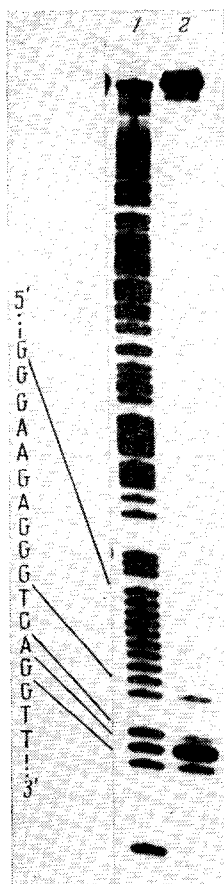
Еще одной задачей, при решении которой аффинные реагенты могут найти широкое применение, является установление первичной структуры больших полимерных молекул, например ДНК. Важным этапом при установлении первичной структуры является селективное расщепление большой полимерной молекулы на фрагменты умеренной длины. Применительно к ДНК это решается с использованием специальных ферментов рестрикции, которые селективно расщепляют ДНК вблизи определенных последовательностей нуклеотидов. В то же время существует ряд химических методов расщепления ДНК. Например, алкилирование пуриновых оснований приводит к элиминированию этих оснований, что позволяет в щелочных условиях расщепить ДНК по апуриновым участкам. ДНК расщепляется также в присутствии ионов  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{O}_2$ , причем  $\text{Fe}^{2+}$  должен быть хелатирован, что достигается либо с помощью специальных антибиотиков, например блеомицина, либо с помощью модельных хелатов, таких как этилендиаминтетрауксусная кислота [38]. Недавно описано расщепление ДНК с помощью красителей при облучении лазером 337 нм с высокой плотностью облучения [39]. Расщепление происходит в результате поглощения красителем двух квантов и последующего безызлучательного переноса энергии возбуждения на  $\sigma$ -связи рибозофосфатного остова.

Присоединение соответствующих реакционноспособных групп к олигонуклеотидам определенного строения открывает перспективу селективного расщепления ДНК и РНК вблизи участков, комплементарных адресующему олигонуклеотиду. На рис. 3 приведены результаты, полученные при действии на фрагмент ДНК адресованного алкилирующего реагента, комплементарного одонитевому участку этого фрагмента [40].

Во всех описанных выше случаях речь шла об использовании афинных реагентов как инструмента исследования. Однако начинает интенсивно развиваться и другая область их использования — направленное воздействие на биологические процессы. Этот аспект мы рассмотрим на примере подходов к направленному воздействию на нуклеиновые кислоты, т. е. на генетический аппарат.

Известно, что химические воздействия на нуклеиновые кислоты находят широкое применение для получения измененных форм живых организмов в результате изменения структуры ДНК (мутаций). Воздействия на нуклеиновые кислоты используются в онкологии для подавления размножения клеток злокачественных опухолей, в некоторых специальных ситуациях для подавления иммунного ответа организма, например, в целях предотвращения отторжения пересаженных хирургическим путем почек, в качестве регулятора размножения вирусов при вирусных инфекциях. Во всех описанных случаях речь идет о мало селективных реагентах, которые наносят удары по всем нуклеиновым кислотам. Так, при химическом мутагенезе изменения происходят статис-

Рис. 3. Результаты электрофоретического анализа в полиакриламидном геле (автордиограф) продуктов расщепления 303-нуклеотидного одноцепочечного фрагмента ДНК, меченного по 3'-концу радиоизотопом  $^{32}\text{P}$ , после комплементарно-адресованного алкилирования реагентом  $\text{ClRCH}_2\text{NHd}(\text{pTrGrArCrCrCrTrCrTrTrCrCrCrAr})$ , комплементарным последовательности фрагмента  $\text{TrGrGrGrArArGrArGrGrGrTrCrAr}$  и обработки пиперидином для расщепления по алкилированным пуринам: 1 — продукты частичной деградации фрагмента по пуриновым нуклеотидам (маркер для определения положений расщепления); 2 — продукты деградации фрагмента, полученные с помощью комплементарно адресованной модификации [40]



тически по всем генам, порождая многочисленные, как правило неблагоприятные или даже смертельные изменения генетического аппарата. Однако, когда речь идет о микроорганизмах или растениях, то последующим отбором можно выявить те немногочисленные мутации, которые сообщают организму какой-либо интересный с практической точки зрения признак. Последующая селекция может привести к созданию новых форм растений и микроорганизмов. При использовании химических реагентов, действующих на нуклеиновые кислоты — производных 2-хлорэтиламина, *цис*-диамминодихлорплатины и других — в отдельных случаях удается подобрать дозы, которые уже эффективно задерживают рост опухоли, но еще не являются смертельными для человеческого организма в целом. В тех немногочисленных случаях, когда это удастся сделать, химиотерапия позволяет продлить жизнь, а иногда и радикально излечить больного.

Заманчивой представляется перспектива повысить селективность таких реагентов и в идеале создать реагенты, которые подавляли бы размножение вируса или раковых клеток, не повреждая здоровые клетки,

а также подавляли бы размножение тех иммунокомпетентных клеток (Т-лимфоцитов), которые нацелены на отторжение пересаженного органа, но не действовали бы на клетки, выполняющие другие многочисленные защитные функции в живом организме. Один из мыслимых путей к этому — создание комплементарно-адресованных реагентов на основе олигонуклеотидов или нуклеиновых кислот, комплементарных к поражаемой мишени. Общая постановка этого вопроса впервые дана в работе [41].

Для реализации в полной мере этой перспективы предстоит решить ряд новых задач. Заметим прежде всего, что речь идет о создании реагентов, действующих на нуклеиновые кислоты, но одновременно имеющих в качестве адреса те же по химическому составу компоненты. Необходимо максимально предотвратить воздействие реагирующей группы на сам адрес, особенно при многочисленных предварительных операциях. Одним из возможных приемов является применение реагирующих групп с регулируемой тем или иным путем реакционной способностью. В работе [42] с этой целью предложено применять N-2-хлорэтилалкиламинофенильную группу, несущую в пара-положении фенильного кольца формильный остаток. В результате сильного электроноакцепторного эффекта формильной группы алкилирующие свойства 2-хлорэтиламиногруппы слабо выражены. Это позволяет получить интересные экспериментатора производные нуклеиновой кислоты, практически не опасаясь алкилирования адреса. Непосредственно перед использованием реагента можно восстановить формильную группу до оксиметильной, что на два порядка повышает реакционную способность *n*-N-2-хлорэтил-N-метиламинофенильного остатка.

Если думать о будущем использовании комплементарно-адресованных реагентов в качестве медицинских препаратов или для получения мутаций в живых организмах, а не у изолированных молекул ДНК, нужно при создании реагентов принять во внимание возможность деградации адреса под действием нуклеаз и необходимость прохождения реагента через наружную и внутренние мембраны клеток-мишеней.

Исследования по афинной модификации с живыми объектами находятся в самой начальной фазе. На примере алкилирования производными олиготимидилатов с одним остатком уридина на 3'-конце, несущими на этом конце алкилирующие группы  $(dTr)_nUCHRCl$ , было показано, что они модифицируют в клетках асцитной карциномы Кребса комплементарные полиадениловые фрагменты, которые обычно находятся на 3'-конце мРНК высших организмов [43]. При этом была показана сохранность адреса и продемонстрирована высокая избирательность алкилирования: степень модификации фрагментов поли-А на два порядка превышала степень модификации остальных нуклеиновых кислот в клетках. Для повышения проникаемости через мембрану были использованы олигонуклеотиды с этилированными межнуклеотидными фосфатами  $[dTr(C_2H_5)]_nUCHRCl$  [44]. При этом проникновение в клетки было существенно лучше, чем в случае неэтилированного отрицательно заряженного адреса. Первые положительные данные о возможности эффективной модификации вирусных нуклеиновых кислот в клетках и определенных мРНК клеток были получены в опытах по подавлению развития вируса гриппа в клетках куриных фибробластов [45] и по подавлению синтеза иммуноглобулинов в опухолевых клетках миеломы мыши [46].

#### IV. РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ НУКЛЕОЗИДОВ, НУКЛЕОЗИДМОНО-, ДИ- И ТРИФОСФАТОВ

Нуклеозиды и нуклеозидмоно-, ди- и трифосфаты являются наиболее простыми соединениями, содержащими характерные для нуклеиновых кислот химические структуры: гетероциклическое основание, рибозу или дезоксирибозу и остатки фосфорной кислоты. С целью получения афин-

ных реагентов возможно введение реакционноспособных групп в каждую из этих структур.

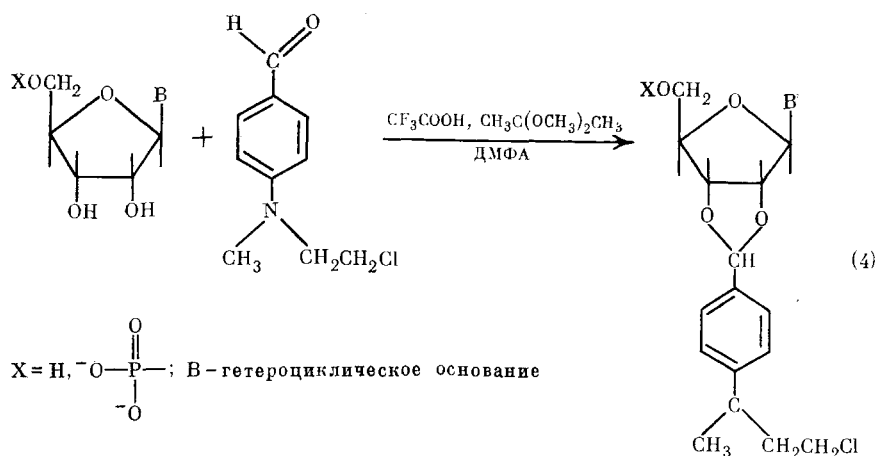
Введение реакционноспособных групп в гетероциклические основания часто производят путем их галогенирования и последующего замещения галогенированных соединений. Примерами производных, полученных таким путем, могут служить широко применяемые производные пуриновых нуклеозидполифосфатов, несущие азидогруппы в положении 8, а также производные пуриновых нуклеозидполифосфатов, несущие SH-или азидогруппы в положении 6.

Такие производные являются афинными реагентами эндо-типа, так как наиболее специфичным фрагментом структуры нуклеозидполифосфатов, узнаваемым ферментами, являются их гетероциклические основания. Второй подход к введению реакционноспособных групп в гетероциклические основания приводит к получению реагентов экзо-типа и основан на применении гетеробифункциональных реагентов, содержащих две отличающиеся по химическим свойствам группы. Одна из групп реагента обеспечивает присоединение его к гетероциклическому основанию, а вторая соответственно становится реакционноспособной группой полученного афинного реагента. Так, фотоактивируемые и арилирующие афинные реагенты получали ацилированием аминогрупп пуриновых нуклеозидполифосфатов с помощью галогенгидридов соответствующих замещенных карбоновых кислот [47].

При исследовании свойств производных нуклеозидполифосфатов, несущих реакционноспособные группы в гетероциклических основаниях, обнаружено, что они как правило резко отличаются от нормальных субстратов по способности взаимодействовать с ферментами. Например, аналог гуанозинтрифосфата, несущий 4-азидобензильный остаток на аминогруппе, не удалось использовать для афинной модификации фермента аденилатциклазы, так как он имел слишком низкое сродство к этому ферменту [47]. Это не удивительно, поскольку известно, что гетероциклические основания играют основную роль в обеспечении специфичности подобных взаимодействий. Введение заместителей в гетероциклические основания должно влиять на их взаимодействие с ферментами и может влиять на их конформационное состояние. Так, упомянувшиеся 8-азидопроизводные пуриновых нуклеозидполифосфатов имеют, в отличие от нормальных субстратов, не *анти*-, а *син*-конформацию [48]. Синтез и свойства производных нуклеозидполифосфатов, несущих реакционноспособные группы в гетероциклических основаниях, недавно рассматривались в ряде обзоров [48—50] и в данном обзоре обсуждаться не будут.

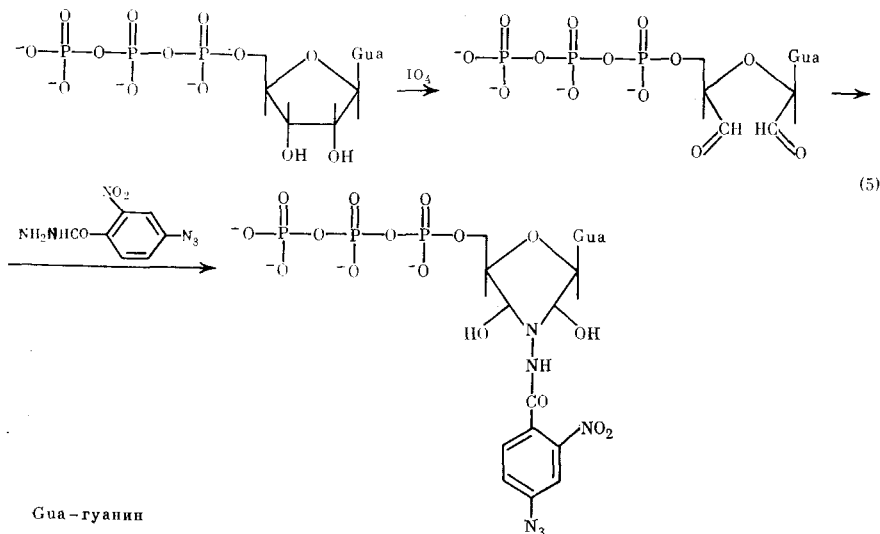
Основным методом модификации рибозы и дезоксирибозы является ацилирование их оксигрупп. Ацилированием аденозинполифосфатов был получен ряд производных, несущих сульфонилирующие и арилазидные группы в 2' (3')-положениях рибозы [49]. Ацилированием аденозина и последующим разделением продуктов были получены производные, несущие алкилирующие или сульфонилирующие группы в 5'- или в 2' (3')-положениях рибозы [51, 52].

Разработан метод введения алкилирующего фрагмента по 2',3'-цис-диольной группе. С этой целью нуклеозид или нуклеотид обрабатывают в безводном диметилформамиде 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензальдегидом в присутствии  $\text{CF}_3\text{COOH}$  и диметилосипропана. Так получены производные уридина, аденозина, цитидина и всех четырех 5'-нуклеотидов [53—56]:

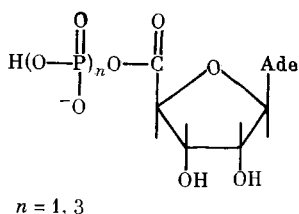


Однако как аффинные реагенты они испытаны лишь на уровне олиго- и полинуклеотидов и будут рассмотрены в следующем разделе.

Окисление нуклеозидов и их полифосфатов периодатом приводит к расщеплению фуранозного цикла по 2',3'-диольной группе с образованием реакционноспособного центра — диальдегидной группы. Эта группа может сама по себе обратимо взаимодействовать с аминогруппами белков путем образования оснований Шиффа. Восстановление шиффовых оснований боргидридом приводит к необратимому связыванию реагентов с аминопроизводными. Окисленные по остатку рибозы нуклеозидполифосфаты были применены для аффинной модификации ряда ферментов [49]. В результате реакции окисленного по рибозе гуанозинтрифосфата с гидразидным бифункциональным реагентом получено производное, несущее арилазидную группу [57]:



Фосфорилированием аденозина, окисленного по 5'-углеродному атому, были получены производные аденозинмоно- и трифосфата, способные реагировать с нуклеофильными группами белков [58, 59].

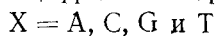
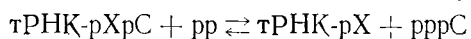
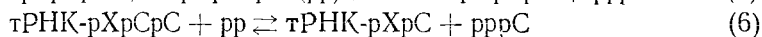
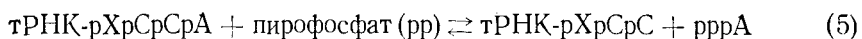


Введение реакционноспособных групп в структуру нуклеозидполифосфатов может быть осуществлено заменой всей фосфатной группировки или части фосфатных групп. Большое число реагентов такого типа описано в обзорах [48—50] и многие из них были применены в качестве афинных. Многочисленные факты свидетельствуют, однако, о том, что такой путь введения реакционноспособных групп в структуру нуклеозидполифосфатов неоптимален, так как уменьшение общего отрицательного заряда молекулы существенно сказывается на ее взаимодействии с ферментами. Очевидно, наиболее рациональным путем получения афинных реагентов — производных нуклеозидполифосфатов — является введение реакционноспособных групп по их концевым фосфатам. Наибольший интерес представляют производные нуклеозидтрифосфатов, субстратов сотен ферментативных реакций, которые несут реакционноспособные группы на  $\gamma$ -фосфатном остатке. Можно ожидать, что у таких производных в наименьшей степени нарушена способность молекулы в целом к специфическим взаимодействиям, поскольку в них не затронуты ни основание, ни углеводная часть молекулы и лишь на единицу уменьшен заряд трифосфатной группы [60]. Подавляющее число ферментативных реакций с участием нуклеозидтрифосфатов представляют собой либо перенос фосфата, либо перенос остатка нуклеотида на некоторый акцептор, в связи с чем трифосфатная группа должна располагаться непосредственно в активном центре фермента вблизи центра связывания акцептора. Поэтому реакционноспособные  $\gamma$ -производные нуклеозидтрифосфатов могут быть использованы и для исследования участков связывания акцепторов.

Для получения производных нуклеозид-5'-трифосфатов, содержащих различные заместители, связанные с  $\gamma$ -фосфатом, разработан простой общий метод, основанный на их превращении с помощью карбодимидов в нуклеозид-5'-триметафосфаты. Реакция может проходить и в безводной среде с использованием дициклогексилкарбодимидом, и в водном растворе при действии водорастворимого карбодимидом. Полученный нуклеозид-5'-триметафосфат легко реагирует с аминами с образованием соответствующих  $\gamma$ -амидов. Примерами полученных таким способом соединений являются соединения (Ia — e) [61—63].

В соответствии с общими соображениями оказалось, что такие  $\gamma$ -амиды обладают сродством к большинству исследованных ферментов из класса гидролаз, фосфотрансфераз, синтетаз и, как уже указывалось, в отдельных случаях даже являются субстратами этих ферментов (см. гл. II). Материалы, опубликованные до 1980 г., систематизированы в обзоре [64]. За прошедшее с тех пор время круг исследованных ферментов и белковых факторов расширился.

Показано, что производное (Ie) является афинным реагентом по отношению к ферменту, катализирующему обратимый фосфоролиз концевой группировки рСрСрА, свойственной всем транспортным РНК (АТР, СТР : тРНК-нуклеотидилтрансфераза) [65]:

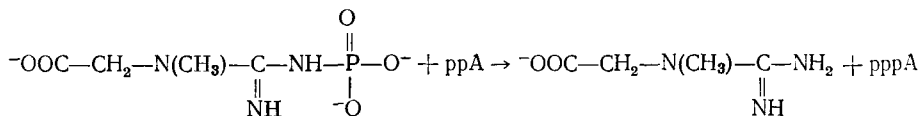


по отношению к ацетилкофермент А-карбоксилазе, катализирующей превращение ацетил-КоА в малонил-КоА [66]:

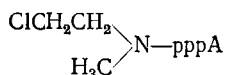


и имеющей ключевое значение для биосинтеза жирных кислот, а также по отношению к  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -зависимой АТФазе, играющей основную роль в трансмембранном переносе ионов натрия и калия [67]. Было установлено, что соединение (I6), фотоактивное производное GTP, афинно модифицирует зависящий от GTP белковый фактор инициации, принимающий участие в начальной стадии биосинтеза белков у эукариотиче-

ских организмов, причем из трех субъединиц фактора модифицируется исключительно  $\gamma$ -субъединица [68]. На примере креатинкиназы — важного фермента биоэнергетических процессов в мышцах, катализирующего перенос фосфата с креатинфосфата на ADP и пополняющего таким образом запасы мышечной АТР.



было продемонстрировано, что не только реакционноспособные производные с ароматическим спейсером типа (1a — e), но и производные алифатических 2-хлорэтиламинов, например:

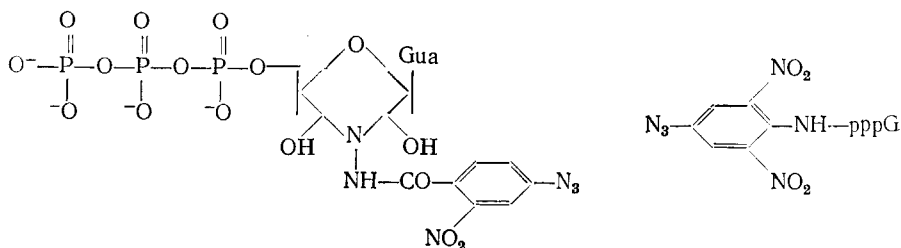


являются эффективными афинными реагентами по отношению к АТР-зависимым ферментам [69].

Как уже отмечалось в гл. III, афинными реагентами являются и сами нуклеозид-5'-триметафосфаты. Помимо уже упоминавшейся РНК-полимеразы это было продемонстрировано на примере нуклеотид-тРНК-трансферазы [65] и фенилаланил-тРНК-синтетазы из *E. coli* [70].

Нуклеотиды являются достаточно большими по размеру молекулами и область контакта с «узнающим» их белком может быть довольно протяженной. Поэтому данные, полученные с помощью реагентов, несущих реакционноспособные группы в разных частях молекулы, могут существенно дополнять друг друга.

В качестве примера можно привести исследования, выполненные с белковым фактором элонгации EF-G, который в комплексе с GTP способствует тому, чтобы образовавшаяся на рибосоме по реакции (3) удлиненная на одно аминокислотное звено молекула пептидил-тРНК, которая первоначально находится в А-сайте рибосомы, переместилась в Р-сайт (это необходимо, чтобы мог начаться следующий цикл элонгации пептидной цепи с отбором следующей молекулы аминоксил-тРНК). Чтобы после этого перемещения фактор EF-G диссоциировал с рибосомы, необходим гидролиз молекулы GTP до GDP и ортофосфата. Такая активность действительно свойственна комплексу рибосомы с EF-G. Однако, чтобы установить, находится ли соответствующий каталитический центр на рибосоме или на самом факторе, важно определить, где расположена область связывания GTP. Эксперименты по афинной модификации, выполненные с производными, несущими реакционноспособные группы на трифосфатном фрагменте и на остатке рибозы, показали, что в обоих случаях афинное мечение проходит по фактору, а не по рибосоме, т. е. на основном своем протяжении GTP связан именно с фактором [57, 71].



В качестве второго примера можно привести данные, полученные на АТР(СТР): тРНК-нуклеотидилтрансферазе. Этот фермент, как видно из схемы (5) и (6), катализирует как минимум две реакции — перенос остатка СМР от СТР на молекулу тРНК с нестроенным рСрС-фрагментом и перенос остатка АМР от АТР на тРНК с построенным рСрС-фрагментом. До сих пор не установлено, имеет ли фермент два различ-

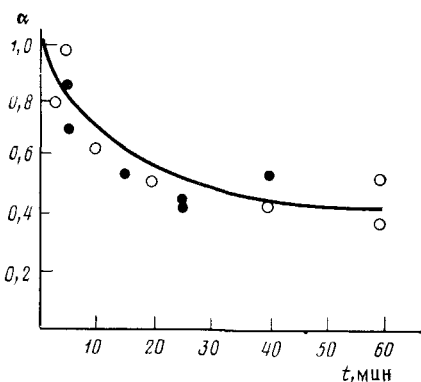


Рис. 4

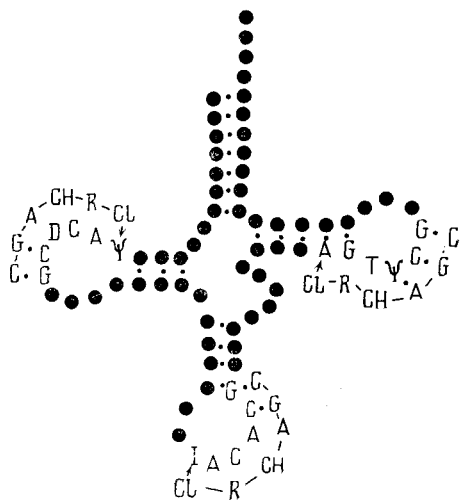


Рис. 5

Рис. 4. Кинетическая кривая инактивации тРНК-нуклеотидилтрансферзы в присутствии  $10^{-3}$  M реагента (Ie) при  $37^\circ\text{C}$ : черные точки — остаточная активность, определенная по включению  $[^3\text{H}]\text{AMP}$ , светлые точки — то же по  $[^3\text{H}]\text{CMP}$  в тРНК [65]

Рис. 5. Направления алкилирования комплементарно адресованным реагентом dCpdGpGACHRCI в структуре дрожжевой валиновой тРНК [89]: буквами обозначены только нуклеотиды в областях связывания реагента

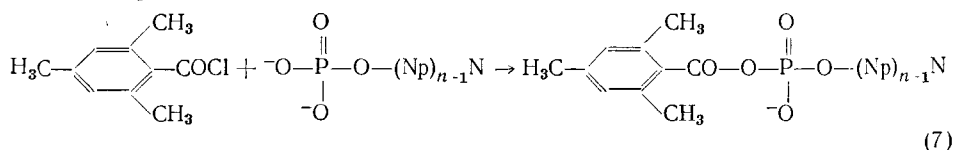
ных центра для осуществления этих двух реакций или все события разыгрываются на одном центре, специфичность которого изменяется в зависимости от природы концевой фрагмента тРНК. Использование окисленных периодатом АТР и СТР, оАТР и оСТР, содержащих диальдегидные группы в модифицированном рибозном фрагменте, показало, что оба соединения инактивируют фермент. Однако использование оАТР приводит преимущественно к инактивации фермента в реакции (5), а использование оСТР — к инактивации в реакции (6). Эти данные указывают, что СТР и АТР связываются, по крайней мере частично, в разных областях [72].

В то же время исследования, выполненные с помощью производного (Ie) с алкилирующей группой, связанной с  $\gamma$ -фосфатом, а также с помощью АТМР и СТМР, показали, что модификация фермента в равной степени подавляет оба рода активности. В качестве примера на рис. 4 приведены результаты исследования кинетики инактивации фермента производным (Ie), измеренные по включению в тРНК, частично лишенную рСрСрА-конца меченых АМР и СМР. Видно, что в пределах погрешности эксперимента данные, полученные по обоим тестам, совпадают. Этот результат свидетельствует о том, что при использовании производных с реагирующей группой на трифосфатном фрагменте подвергается атаке группа, в равной мере существенная для протекания реакций (5) и (6) [65].

## V. РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

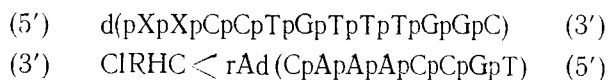
Первые реакционноспособные производные олигонуклеотидов были получены Гриневой с соавт. в связи с предложенным и разработанным ею методом комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот [73, 74]. Для получения алкилирующих производных олигонуклеотидов с реакционноспособной группой на 3'-конце была использована реакция (4), которая в общих чертах оказалась пригодной и в этом случае. Единственной существенной модификацией при переходе от мономеров и коротких олигомеров к более длинным олигонуклеотидам было использование цетавлоновых солей олигонуклеотидов для улучшения растворимости их в диметилформамиде [75]. Метод применен

также к более доступным дезоксирибоолигонуклеотидам с 3'-концевым рибонуклеотидным фрагментом [76]. Для получения производных, несущих алкилирующую группу на 5'-конце, была разработана реакция *n*-(N-2-хлорэтил-N-метиламино) бензиламина ( $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$ ) с 5'-концевой фосфатной группой олигонуклеотида в присутствии конденсирующих реагентов. В качестве последних были использованы первоначально дифенилхлорфосфат [77], позднее — мезитоилхлорид, приводящий к образованию смешанного ангидрида между 5'-концевым фосфатом и мезитиленкарбоновой кислотой [78].



Обработка получаемого смешанного ангидрида амином  $\text{ClRCH}_2\text{NH}_2$  приводит к получению целевого продукта. При использовании рибоолигонуклеотидов эти конденсирующие реагенты, как показано в работах [79—81], образуют внутримолекулярные циклические фосфотриэфиры с участием 2'-оксигруппы, которые в воде гидролизуются с частичным расщеплением межнуклеотидных связей и изомеризацией природной межнуклеотидной связи 3'→5' в связь 2'→5'. В последнее время такие производные преимущественно получают использованием в качестве конденсирующего реагента смеси трифенилфосфина и дипиридилдисульфида [30], которая не атакует межнуклеотидную связь в присутствии сильно основных аминов [82].

С помощью этих реагентов были установлены многие важные характеристики комплементарно-адресованной модификации. На примере реакции с рибосомными РНК из *E. coli* [83] было показано, что алкилирование последней производными олигоаденилатов  $(\text{pA})_n\text{CHRCI}$  протекает как типичная внутрикомплексная реакция — степень модификации рибосом как функция концентрации реагента достигает плато и не возрастает при дальнейшем увеличении избытка реагента. При небольших избытках реагента около 90% его расходуется на алкилирование рибосом, хотя в соответствии с фактором конкуренции для промежуточных этилениммониевых катионов эта величина должна была бы составить доли процента, если бы реакция шла без предварительного комплексообразования [83]. Резко изменяется состав алкилированных оснований. Если при алкилировании тРНК аналогичными производными уридина или метилового эфира UMP преимущественно или даже исключительно алкилируются остатки гуанина [84, 85], то при реакции в комплексе, когда направление атаки определяется в первую очередь не относительной реакционной способностью оснований, а доступностью их для атаки алкилирующей группой, достаточно жестко фиксированной адресом, в соизмеримой степени алкилируются аденин, гуанин и цитозин [86]. Аналогичные результаты были получены при исследовании алкилирования ДНК [87, 88]. На примере реакции дрожжевой валиновой тРНК (рис. 5) с реагентом  $\text{dCpdGpGpACHRCI}$ , взаимодействующим с C—G-фрагментами тРНК, было показано, что алкилируются четвертые, считая от участка комплексообразования, остатки в направлении 5'-конца молекулы-мишени [89]. Позднее эти данные были подтверждены на синтетической модели:

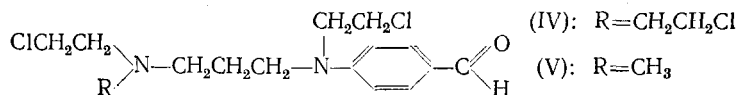


Здесь и на следующей аналогичной схеме символ d поставлен перед всей дезоксиолигонуклеотидной последовательностью, rA означает рибонуклеозид аденозин, в скобках отмечены 5'- и 3'-концы двух антипараллельных комплементарных цепей. Во всех исследованных случаях в комплексе алкилировался только фрагмент d(pXpX) [90].

Алкилирование ДНК производными олигонуклеотидов с последующим расщеплением по точкам алкилирования было предложено использовать как общий метод селективного расщепления ДНК по участкам, примыкающим к комплементарным адресу нуклеотидным последовательностям [91].

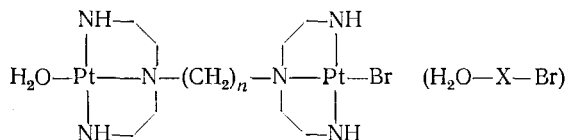
Описано еще несколько способов введения реакционноспособных групп в концевые фрагменты олигонуклеотидов. Так, для введения фотоактивной арилазидогруппы по 3'-концевому *цис*-диолю использовано периодатное окисление с последующей обработкой N-(4-азидобензоил)-глицилгидразидом [92] и ацилирование *цис*-диольной группы имидазолидом *n*-азидобензойной кислоты [93].

Описано введение алкилирующей группы в олигонуклеотид по 5'-концу путем алкилирования трифункциональным агентом (IV) [42] с регулируемой активностью одной из 2-хлорэтиламиногрупп:

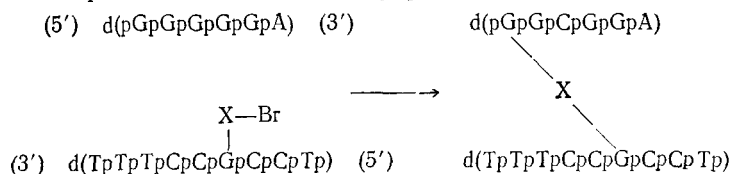


Фосфат алкилируется реакционноспособной алифатической группой (вторая связь C—Cl при этом гидролизуетея), а затем в полученном производном реакционную способность ароматической 2-хлорэтиламиногруппы повышают восстановлением боргидридом натрия формильной группы в оксиметильную [94].

Для введения реакционноспособных остатков во внутренние участки олигонуклеотида предложено использовать бифункциональное производное платины [22]:



Вода легко замещается на остаток гуанина в олигонуклеотиде, выступающем в качестве адреса. Связь Pt — Br существенно более прочна и реагирует с основаниями нуклеиновых кислот только в условиях прочного контакта, создаваемого комплементарным комплексом. Таким способом осуществлена комплементарно-адресованная модификация в комплексе, при этом из четырех гуанинов олигонуклеотида-мишени модифицированным оказался только один, находящийся в наиболее благоприятном для реакции положении внутри комплекса.

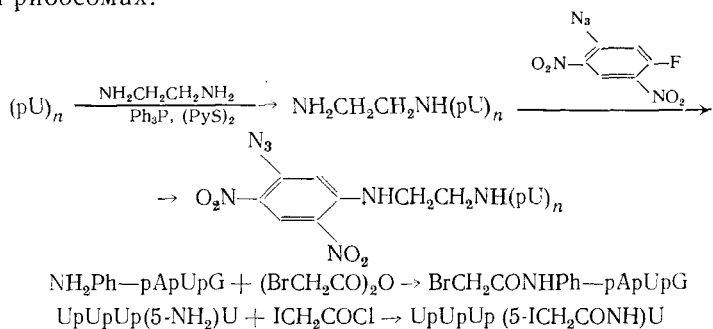


Получены производные олигонуклеотидов, несущие остаток диметиламинафталинсульфонил (дансил, DNS). На примере производного DNS —  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2(\text{pT})_9$  [95] показано, что при двухквантовом возбуждении лазером с длиной волны 337 нм в присутствии этого реагента происходит расщепление комплементарной адресу полиадениловой кислоты, но при этом не расщепляются полиуридиловая и полицитидиловая кислоты.

Осуществлено также присоединение к олиготимидилату хелатирующего фрагмента — этилендиаминтетрауксусной кислоты. В присутствии  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{O}_2$  это производное расщепляет комплементарный полиаденилат и, в существенно меньшей мере, некомплементарные полинуклеотиды [96].

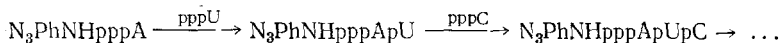
В ряде случаев при синтезе реакционноспособных производных олигонуклеотидов в них предварительно вводят специальную группу, по ко-

торой можно провести высокоселективную реакцию с гетеробифункциональным реагентом, несущим будущий реакционноспособный фрагмент адресованного реагента. Для этой цели используют алифатические или ароматические аминогруппы, которые можно ввести либо по концевому фосфату [97—99], либо в гетероциклическое основание, например, синтезируя олигонуклеотид, содержащий вместо одного из остатков урацила 5-аминоурацил [100]. В качестве примера можно привести производные, использованные для аффинной модификации области связывания мРНК на рибосомах:



С этой же целью предложено использовать производные, в которых концевой фосфат заменен фосфотиоатным остатком. Так, в частности, получены производные дезоксиолигорибонуклеотидов путем алкилирования фосфотиоатов реагентами (IV) или (V) с последующей активацией ароматической 2-хлорэтиламиногруппы посредством восстановления ее боргидридом [101, 102].

Оригинальный способ получения реакционноспособных производных олигорибонуклеотидов предложен в работе [6, 103]. Он основан на субстратной активности  $\gamma$ -производных нуклеозид-5'-трифосфатов в реакции, катализируемой РНК-полимеразой. При синтезе РНК на матрице ДНК с использованием вместо природного субстрата его производного, несущего реакционноспособную группу, получается продукт, сохраняющий эту группу на 5'-конце:

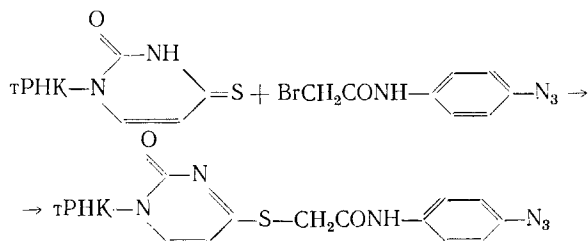


В некоторых случаях активные производные могут быть получены путем соответствующей обработки комплекса олигонуклеотида или его производного с биополимером. Так, аффинная модификация области связывания мРНК осуществлена в работе [104] обработкой комплекса рибосом *E. coli* с фенилаланиновой тРНК и  $\text{pp}(\text{pU})_7$  водорастворимым карбодимидом, переводящим концевую трифосфатную группу в триметафосфатную.

## VI. РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В настоящее время наибольшее число реакционноспособных производных описано для транспортных РНК в связи с изучением их взаимодействия с рибосомами и аминоацил-тРНК-синтетазами. Перечень синтезированных производных можно найти в обзорах [105, 106]. Наибольшее число их получено путем присоединения соответствующих гетеробифункциональных реагентов непосредственно по *цис*-диольной группе, например, по реакции (4) [107] или с предварительным окислением периодатом, и по  $\alpha$ -аминогруппе аминоацил-тРНК. Примерами таких производных являются соединения (II) и (III). С помощью соединения (II), впервые описанного в работе [108], осуществлена первая аффинная модификация рибосом и получены сведения о локализации пептидилтрансферазного центра [109]. Используется также селективное присоединение бифункциональных реагентов по некоторым так называемым минорным основаниям, которыми богаты транспортные РНК. Так, для тРНК из *E. coli* характерно наличие в положении 8 от 5'-кон-

ца молекулы 4-тиоуридина, который может быть селективно проалкилирован реагентом, несущим арилазидо-группу [9]:



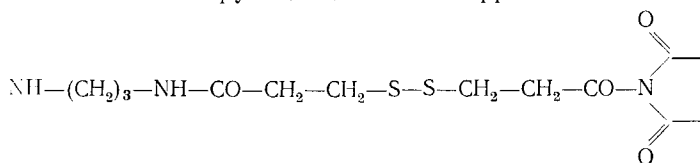
Для исследования взаимодействия тРНК с аминоксил-тРНК-синтетазой был использован также метод прямой фотосшивки [110]. Детальный анализ данных, получаемых этим методом, можно найти в статье Реми с соавт. в монографии [3]. Следует подчеркнуть, что УФ-облучение в области 260 нм существенно повреждает нуклеиновые кислоты и белки и к результатам, полученным методом прямых фотосшивок, следует относиться с большой осторожностью. Метод несомненно привлекателен своей простотой, отсутствием каких-либо возмущений в лиганде до момента освещения, возможностью очень быстрого проведения процесса при использовании мощных световых импульсов. Однако, как уже указывалось, требуется предварительное детальное исследование природы протекающих реакций и свойств образующихся продуктов фотосшивок.

В настоящее время более привлекательными представляются методы, основанные на селективном возбуждении некоторых специфических хромофоров, присутствующих в тРНК в виде минорных компонентов и поглощающих в длинноволновой УФ-области спектра, достаточно удаленной от области поглощения остальных оснований и белков. Примером такой группы является уже упоминавшийся 4-тиоуридин. В работе [9] показано, что облучение фенилаланиновой тРНК из *E. coli* в комплексе с фенилаланил-тРНК-синтетазой приводит к сшивке этих двух макромолекул. По данным [111] тРНК, содержащая в 5'-положении кодона производное уридина, 5-карбоксиметоксиуридин, в составе тройного комплекса с рибосомой и мРНК при УФ-облучении сшивается с рРНК малой субъединицы рибосом. Облучение рибосом в комплексе с дрожжевой фенилаланиновой тРНК и полиуридиловой кислотой приводит к сшиванию последней с примыкающим со стороны 3'-конца к антикодону нуклеозидом вайбутозином [112].

Как уже говорилось в гл. III, многие проблемы белково-нуклеинового узнавания и направленного воздействия на нуклеиновые кислоты могут быть решены с использованием производных полинуклеотидов и нуклеиновых кислот, в которые реакционноспособные группы введены статистически.

Полинуклеотиды такого типа могут быть получены сополимеризацией с мономерами, содержащими химически активные группы. Так, описана сополимеризация ADP с 8-азидо-ADP и инозин-5'-дифосфата с 8-азидоинозиндифосфатом [113]. Полученные сополимеры были использованы для аффинной модификации РНК-полимеразы *E. coli*.

Производные фенилаланиновой тРНК из *E. coli* со статистически присоединенными арилазидогруппами уже описаны в гл. III. В работе [114] обладающий ацилирующим действием фрагмент

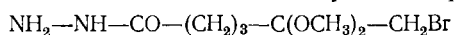


введен статистически по доступным (не участвующим в образовании вторичной структуры) остаткам цитозина инициаторной метиониновой

тРНК из *E. coli*. Полученное производное использовано для афинной модификации метионил-тРНК-синтетазы из того же источника. Наличие S—S-мостика позволяет после осуществления афинной модификации отщепить тРНК от белка обработкой тиолами. В эту же тРНК обработкой сероводородом были статистически введены остатки 4-тиоурацила, образующиеся из остатков цитозина при обработке тРНК сероводородом. С помощью такой тРНК осуществлена фотоафинная модификация рибосом [115].

В работах [116, 117] описано применение мРНК фага Т7, содержащей алкилирующие радикалы, введенные обработкой мРНК реагентом (IV), для направленного мутагенеза по определенным генам. Аналогичные производные получены из фрагмента ДНК, содержащего ген устойчивости к тетрациклину [118]. Эти реагенты были использованы для направленной индукции мутаций в плазмиде рВР 322, широко используемой в генно-инженерных исследованиях. Хотя все проведенные эксперименты выполнены с изолированными фаговыми и плазмидными ДНК, очевидно, что этот подход открывает перспективу мутагенеза в живых организмах, направленного на определенные гены, равно как и перспективу блокирования работы определенных генов. Статистический характер распределения реакционноспособных групп при решении подобных задач особенно существен, так как обычно заранее не известно, в какие именно точки гена нужно внести изменения для получения интересных мутаций или для исключения его работы.

Сходная идея реализована в работе [119], в которой осуществлена модификация остатков цитозина в мРНК фага Т7 реагентом:



После введения реагента по цитозинам адреса его активировали кислотной обработкой, приводящей к превращению кетала в кетон, что повышает электрофильный характер связи С — Вг. Статистическое введение альдегидных групп в ДНК в составе хроматина было осуществлено обработкой диметилсульфатом с последующим выщеплением 7-метилгуанинов. Альдегидные группы легко образуют основания Шиффа с находящимися в контакте с ними аминогруппами белков хроматина. Обработка боргидридом натрия приводит к образованию стабильных алкиламинов, т. е. к ковалентному связыванию ДНК с белками. Анализ продуктов взаимодействий позволил получить важную информацию о структурной организации нуклеосом — нуклеопротеидных комплексов, в которые упакована ДНК в клетках высших организмов [120].

\*       \*

\*

Приведенные в обзоре данные показывают, что органическая и биорганическая химия вооружили исследователей широким арсеналом тонких химических инструментов исследования проблемы белково-нуклеинового узнавания для разработки принципиально новых подходов к воздействию на генетический аппарат живых организмов. Число известных к настоящему времени реакционноспособных производных нуклеиновых кислот и их компонентов столь велико, что авторы не имели возможности описать или даже перечислить все такие производные и вынуждены были ограничиться описанием их основных типов. В то же время методология применения этих инструментов для исследовательских целей еще нуждается в глубоких физико-химических и биохимических исследованиях. По мнению авторов, к числу наиболее острых проблем относится исследование механизмов реакций, используемых для афинной модификации биополимеров, а также изучение современными физическими методами структуры комплексов биополимеров с афинными реагентами и структуры образующихся продуктов. Подобные исследования сегодня становятся возможными в отношении производных не только нуклеотидов, но и олигонуклеотидов, что явля-

ется результатом впечатляющих успехов в области их химического синтеза.

Комплексы производных олигонуклеотидов с комплементарными олигонуклеотидами и нуклеиновыми кислотами являются уникальными моделями для изучения общих закономерностей протекания внутрикомплексных реакций, моделирующих по своей направленности природные ферментативные реакции. Фактически уже начала формироваться новая область биоорганической химии — органическая химия дуплексов нуклеиновых кислот [121].

Возможность получать олигонуклеотиды и их производные в количествах, измеряемых десятками и сотнями миллиграммов, позволяет начать систематические исследования таких производных как биологически активных веществ. Возможность установления первичной структуры практически любых нуклеиновых кислот обеспечивает целенаправленное создание олиго- и полинуклеотидных адресов к самым разнообразным участкам генетического аппарата живых организмов и разработку на этой основе методов воздействия на биологические объекты, которые по своей селективности существенно превосходят другие химические методы и приближаются по уровню избирательности к самым совершенным антибиотикам и ферментам. Авторы надеются, что данный обзор привлечет внимание химиков самых различных профилей — органиков и неоргаников, физико-химиков и аналитиков — к этой новой, интенсивно развивающейся и имеющей весьма заманчивые перспективы области химии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Watson J. D., Crick F. H. *Nature*, 1953, v. 171, p. 737.
2. *Methods in enzymology*, v. 56/Ed. by Jakoby W. B., Wilchek M. New York — London — San Francisco: Acad. Press Inc., 1977.
3. Афинная модификация биополимеров/Под ред. Кнорре Д. Г. Новосибирск: Наука, 1983.
4. *Biochemical Nomenclature and related documents*. London, Colchester and Beccles: Spottiswoode Ballantyne Press, 1978.
5. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г., Стариков В. В. *Мол. биол.*, 1980, т. 14, с. 575.
6. Свердлов Е. Д., Царев С. А., Модянов Н. Н., Липкин В. М., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г. *Биоорг. химия*, 1978, т. 4, с. 1278.
7. Бунева В. Н., Кудряшова И. В., Курбатов В. А., Ромащенко А. Г. *Биохимия*, 1978, т. 43, с. 2261.
8. Бунева В. Н., Демидова Т. В., Кнорре Д. Г., Кудряшова И. В., Ромащенко А. Г., Старообразова М. Г. *Мол. биол.*, 1980, т. 14, с. 1080.
9. Budker V. G., Knorre D. G., Kravchenko V. V., Lavrik O. I., Nevinsky K. A., Teplova N. M. *FEBS Letters*, 1974, v. 49, p. 159.
10. Ахвердян В. З., Киселев Л. Л., Кнорре Д. Г., Лаврик О. И., Невинский Г. А. *Мол. биол.*, 1977, т. 113, с. 475.
11. Будычев И. А., Лаврик О. И., Невинский Г. А. Там же, 1980, т. 14, с. 558.
12. Krauspe R., Lavrik O. I. *Eur. J. Biochem.*, 1983, v. 132, p. 545.
13. Будкер В. Г., Кнорре Д. Г., Яснова С. И. *Мол. биол.*, 1972, т. 6, с. 581.
14. Gimautdinova O. I., Karpova G. G., Knorre D. G., Kobetz N. D. *Nucl. Acids Res.*, 1981, v. 9, p. 3465.
15. Будкер В. Г., Гринев Н. И., Кобец Н. Д., Ломакина Т. С., Маев С. П. *Биохимия*, 1978, т. 43, с. 761.
16. Knorre D. G., Chinitova T. A. *FEBS Letters*, 1981, v. 131, p. 249.
17. Кнорре Д. Г., Чимитова Т. А. *Мол. биол.*, 1978, т. 12, с. 814.
18. Горшкова И. И., Кнорре Д. Г. *Биоорг. химия*, 1980, т. 6, с. 230.
19. Росс У. *Биологические алкилирующие вещества*. М.: Изд-во Медицина, 1964.
20. Эмануэль Н. М., Кнорре Д. Г. *Курс химической кинетики*. М.: Изд-во Высшая школа, 1984, с. 274.
21. Власов В. В., Казиков С. А. *Биоорг. химия*, 1982, т. 8, с. 499.
22. Vlassov V. V., Gorn V. V., Ivanova E. M., Kazakov S. A., Mamaev S. V. *FEBS Letters*, 1983, v. 162, p. 286.
23. Галль Т. С., Грицан Н. П., Мызина С. Д., Бажин Н. М., Немцева Е. В. *Докл. АН СССР*, 1983, т. 273, с. 883.
24. Nielson P. E., Buchardt O. *Photochem. Photobiol.*, 1982, v. 35, p. 317.
25. Badashkeyeva A. G., Gall T. S., Efimova E. V., Knorre D. G., Lebedev A. V., Mysina S. D. *FEBS Letters*, 1983, v. 155, p. 263.
26. Anilova V. N., Knorre D. G., Kravchenko V. V., Lavrik O. I., Nevinsky G. A. *Ibid.*, 1975, v. 60, p. 172.
27. Бунева В. Н., Кнорре Д. Г., Пача И. О. *Биохимия*, 1980, т. 45, с. 1004.

28. Buneva V. N., Dobrikova E. Yu., Knorre D. G., Pacha I. O., Chimitova T. A. FEBS Letters, 1981, v. 135, p. 159.
29. Grachev M. A., Mustaev A. A. Ibid., 1982, v. 137, p. 89.
30. Гимаутдинова О. И., Карпова Г. Г., Козырева Н. А. Мол. биол., 1982, т. 16, с. 752.
31. Stahl J., Kobetz N. D. FEBS Letters, 1981, v. 123, p. 269.
32. Stahl J., Kobetz N. D. Molec. Biol. Rep., 1984, v. 9, p. 219.
33. Власов В. В., Лаврик О. И., Мамаев С. В., Чижиков В. Е., Ходырева С. Н. Мол. биол., 1980, т. 14, с. 531.
34. Карпова Г. Г. Там же, 1984, т. 18, с. 1194.
35. Babkina G. T., Bausk E. V., Graifer D. M., Karpova G. G., Matasova N. B. FEBS Letters, 1984, v. 170, p. 290.
36. Baltzinger M., Fasiolo F., Remy P. Europ. J. Biochem., 1979, v. 97, p. 481.
37. Лаврик О. И., Ходырева С. Н. Биохимия, 1979, т. 44, с. 570.
38. Chlou S.-H. J. Biochem., 1984, v. 96, p. 1307.
39. Stockmann M. I. Phys. Letters, 1980, v. 76A, p. 191.
40. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В. Докл. АН СССР, 1985, в печати.
41. Summerton J. J. Theor. Biol., 1979, v. 78, p. 77.
42. Галль А. А., Курбатов В. А., Мустаев А. А., Шишкин Г. В. Изв. СО АН СССР, Сер. хим. н., 1979, вып. 2, с. 99.
43. Иванова Е. М., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Попова В. С., Райт А. С., Стефанович Л. Е. Мол. биол., 1984, т. 18, с. 613.
44. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Пичко Н. П., Райт А. С. Биоорган. химия, 1981, т. 7, с. 1512.
45. Власов В. В., Горн В. В., Кутявин И. В., Юрченко Л. В., Шарова Н. К., Букринская А. Г. Молек. генет., микробиол. и вирусол., 1984, № 11, с. 36.
46. Власов В. В., Годовица А. А., Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В. Докл. АН СССР, 1984, т. 276, с. 1263.
47. Pfeuffer T., Eckstein F. FEBS Letters, 1976, v. 67, p. 354.
48. Colman R. F. Ann. Rev. Biochem., 1983, v. 52, p. 67.
49. Соколова Н. И., Третьякова С. С. Биоорган. химия, 1983, т. 9, d. 1157.
50. Scheit K. H. Nucleotide Analogs: Synthesis and Biological Function. New York: John Wiley and Sons, 1980.
51. Pal P. K., Reischer R. J., Wechter W. J., Colman R. F. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, p. 6644.
52. Colman R. F., Pal P. K., Wyatt J. L. In: Methods in Enzymology/Ed. by Jacoby W. B., Wilchek M. New York — London: Acad. Press, 1977, v. 46, p. 240.
53. Беликова А. М., Гринева Н. И. Изв. Сиб. отд. АН СССР, Сер. хим. н., 1966, вып. 3, с. 79.
54. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Журн. общ. хим., 1970, т. 40, с. 215.
55. Беликова А. М., Гринева Н. И. Изв. СО АН СССР, Сер. хим. н., 1971, вып. 5, с. 119.
56. Веняминова А. Г., Гринева Н. И. Там же, 1971, вып. 4, с. 111.
57. Гиршович А. С., Поздняков В. А., Овчинников Ю. А. Докл. АН СССР, 1974, т. 219, с. 481.
58. Hampton A., Harper P. J., Sasaki T., Howgate P. In: Methods in Enzymology/Ed. by Jacoby W. B., Wilchek M. New York — London: Acad. Press, 1977, v. 46, p. 302.
59. Hampton A., Harper P. J., Sasaki T., Howgate P., Preston R. K. J. Biochem., 1979, v. 10, p. 259.
60. Бабкина Г. Т., Кнорре В. Л., Кнорре Д. Г., Лаврик О. И. Докл. АН СССР, 1974, т. 216, с. 1165.
61. Бабкина Г. Т., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Биоорган. химия, 1975, т. 1, с. 611.
62. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Лебедев А. В., Самуков В. В., Шишкин Г. В. Там же, 1975, т. 1, с. 793.
63. Knorre D. G., Kurbatov V. A., Samukov V. V. FEBS Letters, 1976, v. 70, p. 105.
64. Grachev M. A., Knorre D. G., Lavrik O. I. In: Soviet Scientific Reviews, section D, Biology Reviews, v. 2. Ed. by Skulachev V. P. Amsterdam: OPA, 1981, p. 107.
65. Бунева В. Н., Горшкова И. И., Кнорре Д. Г., Пача И. О. Докл. АН СССР, 1982, т. 267, с. 1492.
66. Бунева В. Н., Рабинков А. Г., Яценко И. А., Либинзон Р. Е., Горяченкова Е. В. Там же, 1984, т. 277, с. 1256.
67. Джанджугазян К. Н., Модянов Н. Н., Мустаев А. А. Биологические мембраны, 1981, т. 1, с. 823.
68. Kurzchalia T. V., Bommer V. A., Babkina G. T., Karpova G. G. FEBS Letters, 1984, v. 175, p. 313.
69. Невинский Г. А., Газарянц М. Г., Лаврик О. И. Биоорган. химия, 1984, т. 10, с. 656.
70. Ходырева С. Н., Сычева Е. А., Анкилова В. Н., Лаврик О. И. Мол. биол., 1984, т. 18, с. 1316.
71. Girshovich A. S., Pozdnyakov V. A., Ovchinnikov Yu. A. Europ. J. Biochem., 1976, v. 69, p. 321.
72. Masiakovski P., Deutscher M. P. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 11240.
73. Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I. Tetrahedron Letters, 1967, № 37, p. 3557.
74. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. Изв. Сиб. отд. АН СССР, Сер. хим. н., 1968, вып. 5, с. 118.

75. Райт В. К., Карпова Г. Г., Гринева Н. И. Биооргани. химия, 1977, т. 3, с. 31.
76. Зарытова В. Ф., Соколова Н. И., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Шабарова З. А. Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., 1968, вып. 6, с. 102.
77. Гринева Н. И., Ломакина Т. С. Журн. общ. хим., 1972, т. 42, с. 1630.
78. Гимаутдинова О. И., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Ломакина Т. С., Шелпакова Е. Л. Биооргани. химия, 1978, т. 4, с. 917.
79. Будкер В. Г., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Кобец Н. Д., Рязанкина О. И. Там же, 1977, т. 3, с. 618.
80. Друца В. Л., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Соколова Н. И., Шабарова З. А. Докл. АН СССР, 1977, т. 233, с. 595.
81. Зарытова В. Ф., Райт В. К., Черникова Т. С. Биооргани. химия, 1977, т. 3, с. 1626.
82. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. Там же, 1979, т. 5, с. 886.
83. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. Мол. биол., 1974, т. 8, с. 832.
84. Беликова А. М., Гринева Н. И. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1971, вып. 5, с. 119.
85. Vlassov V. V., Grineva N. I., Knorre D. G. FEBS Letters, 1972, v. 20, p. 66.
86. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. Биооргани. химия, 1975, т. 1, с. 588.
87. Гринева Н. И., Мызина С. Д. Мол. биол., 1972, т. 9, с. 502.
88. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Мызина С. Д., Чемасова А. Н. Биооргани. химия, 1975, т. 1, с. 1707.
89. Grineva N. I., Karпова G. G., Kuznetsova L. M., Venkstern T. V., Bayev A. A. Nucleic Acids Res., 1977, v. 4, p. 1609.
90. Горн В. В., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Пичко Н. П. Докл. АН СССР, 1983, т. 270, с. 613.
91. Гринева Н. И. Вестн. АМН СССР, 1972, № 2, с. 83.
92. Towbin H., Elson D. Nucleic Acids Res., 1978, v. 5, p. 3389.
93. Готтих М. Б., Ивановская М. Г., Вейко В. П., Шабарова З. А. Биооргани. химия, 1981, т. 7, с. 1310.
94. Ошевский С. И., Грачев М. А., Мустаев А. А. Там же, 1983, т. 9, с. 958.
95. Булычев Н. В., Лебедев А. В., Бенимецкая Л. З., Козионов А. Л., Нестерихин Ю. Е., Новожилов С. Ю., Раутиан С. Г., Штокман М. И. Там же, 1984, т. 10, с. 520.
96. Boutorin A. S., Vlassov V. V., Kazakov S. A., Kutyavin I. V., Podymonogin M. A. FEBS Letters, 1984, v. 172, p. 43.
97. Прокофьев М. А., Шабарова З. А. Мол. биол., 1978, т. 12, с. 245.
98. Pongs O., Lanka E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, p. 1505.
99. Гимаутдинова О. И., Зенкова М. А., Карпова Г. Г., Подуст Л. М. Мол. биол., 1984, т. 18, с. 907.
100. Lührmann R., Schwarz U., Gassen H. G. FEBS Letters, 1973, v. 32, p. 55.
101. Oschevski S. I. Ind., 1982, v. 143, p. 119.
102. Власов В. В., Галь А. А., Годовиков А. А., Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Мотовилова И. П., Шишкин Г. В. Докл. АН СССР, 1984, т. 274, с. 1244.
103. Grachev M. A., Mustaev A. A. FEBS Letters, 1982, v. 137, p. 89.
104. Гимаутдинова О. И., Карпова Г. Г., Комарова Н. И., Фролова С. Б. Биооргани. химия, 1985, т. 11, с. 499.
105. Kuechler E., Ofengand J. In: Transfer RNA: Structure, Properties and Recognition, Cold Spring Harbor, 1979, p. 413.
106. Knorre D. G., Lavrík O. I. In: Theory and Practice in Affinity Techniques/Ed. by Sundaram R. V., Eckstein F. London — New York — San Francisco: Acad. Press, 1978, p. 169.
107. Власов В. В., Гринева Н. И., Карпова Г. Г. Мол. биол., 1974, т. 8, с. 752.
108. Grachev M. A., Ryvkin M. I. Nucleic Acids Res. 1975, v. 2, p. 1237.
109. Bockkareva E. S., Budker V. G., Girschovich A. S., Knorre D. G., Teplova N. M. FEBS Letters, 1971, v. 19, p. 121.
110. Budzik G. P., Lam S. S. M., Schoemaker H. J. P., Schimmel P. R. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, p. 4433.
111. Ofengand J., Liou R. Biochemistry, 1980, v. 21, p. 4814.
112. Matzke A. J. M., Barta A., Kuechler E. J. Biochem., 1980, v. 112, p. 169.
113. Cartwright I. L., Hutchinson D. W. Nucleic Acids Res., 1980, v. 8, p. 1675.
114. Valenzuela D., Leon O., Schulman L. D. H. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984, v. 119, p. 677.
115. Barrilault D., Buckingham R. H., Favre A., Thomas G. Biochimie, 1981, v. 63, p. 587.
116. Дианов Г. Л., Овчинникова Л. П., Воронина Е. Н., Коккоза Е. Б., Салганик Р. И. Докл. АН СССР, 1979, т. 248, с. 465.
117. Salganik R. I., Dianov G. L., Ovchinnikova L. P., Voronina E. N., Kokoza E. B., Mazin A. V. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, p. 2796.
118. Салганик Р. И., Мазин А. В., Дианов Г. Л., Овчинникова Л. П. Докл. АН СССР, 1984, т. 274, с. 197.
119. Summerton J., Bartlett P. A. J. Mol. Biol., 1978, v. 122, p. 145.
120. Mirzabekov A. D., Shick V. V., Belyavsky A. V., Bavykin S. G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, p. 4184.
121. Кнорре Д. Г., Шабарова З. А. Биооргани. химия, 1984, т. 10, с. 129.