

Двуспиральные нуклеиновые кислоты с ковалентно связанными цепями — синтез и применение в молекулярной биологии

С.И.Анцыпович, Т.С.Орецкая

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет
119899 Москва, Ленинские горы, факс (095)939–3181

Обобщены литературные данные о методах связывания между собой цепей протяженных ДНК, а также о методах получения олигонуклеотидных дуплексов с ковалентными связями между цепями. Проведена систематизация известных методов, обсуждены их преимущества и недостатки. Приведены примеры применения ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями для изучения процессов белково-нуклеинового узнавания и механизмов действия НК-связывающих белков, для получения информации о пространственной структуре НК и решения ряда других задач молекулярной биологии.

Библиография — 131 ссылка.

Оглавление

I. Введение	274
II. Основные методы получения ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями	275
III. Методы получения модифицированных олигонуклеотидов	275
IV. Использование псораленов для получения ковалентно связанных ДНК-дуплексов	276
V. НК-дуплексы с ковалентно связанными цепями, получаемые с помощью производных пиррола	279
VI. Основные методы получения НК-дуплексов, содержащих шивки в заранее заданных положениях двойной спирали	282
VII. Использование сульфидрильных производных для получения НК-дуплексов с ковалентно связанными цепями	286
VIII. Синтез НК-дуплексов с ковалентно связанными цепями с использованием углеводных остатков нуклеозидов	289
IX. Заключение	291

I. Введение

Для исследования деталей тонких клеточных процессов, связанных с экспрессией и процессингом генетической информации, необходимо создание модифицированных олигонуклеотидных производных нового поколения, способных служить инструментами в таких исследованиях.

В связи с этим в последние годы наряду с физико-химическими методами, такими как рентгеноструктурный анализ и спектроскопия ЯМР, стал широко применяться химический подход, основанный на использовании модифицированных олигонуклеотидов для изучения механизмов взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами (НК). Направленное изменение химической структуры НК в белково-нуклеиновых комплексах и изучение свойств сконструированных систем дает возможность получить информацию о пространственном строении таких комплексов и природе нуклеиново-белковых (НК-белковых) контактов. Направленная модифи-

кация позволяет придавать олигонуклеотидам такие полезные свойства, как устойчивость к нуклеазной деградации, повышенная термодинамическая стабильность образуемых ими дуплексов, малая токсичность, способность к проникновению через клеточные мембраны. Она также способствует селективному узнаванию и сайт-специфичному (в том числе и ковалентному) связыванию молекул ДНК с белками.^{1–9}

Олигонуклеотиды и их реакционноспособные производные являются важными инструментами исследования белково-нуклеиновых взаимодействий в процессах репликации, транскрипции, трансляции, репарации, рекомбинации, модификации нуклеиновых кислот. До сравнительно недавнего времени для этих целей в основном использовались производные одонитевых олигонуклеотидов. Между тем большее число процессов (репарация, рекомбинация, инициация транскрипции с помощью соответствующих факторов) протекает с участием двунитевых нуклеиновых кислот. Следовательно, в качестве моделей для изучения перечисленных процессов и аффинных реагентов в этих случаях должны применяться именно двунитевые структуры.

Модифицированные НК-дуплексы находят применение при изучении механизмов действия ферментов, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами, и выявления закономерностей НК-белкового узнавания. Одним из перспективных и широко применяющихся методов исследования НК-белковых взаимодействий является метод, заключающийся в использовании двуспиральных НК, тяжи которых соединены между собой ковалентными связями. ДНК-дуплексы с ковалентно связанными тяжами могут быть применены в качестве моделей для изучения большинства перечисленных выше клеточных процессов, а также для

С.И.Анцыпович. Кандидат химических наук, научный сотрудник кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ. Телефон: (095)939–3148.

Т.С.Орецкая. Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник той же кафедры. Телефон: (095)939–3148.

Область научных интересов авторов: синтез модифицированных нуклеозидов и их аналогов, автоматический твердофазный синтез модифицированных олигонуклеотидов, создание инструментов изучения механизмов действия НК-взаимодействующих ферментов и ДНК-белковых комплексов.

Дата поступления 11 февраля 1997 г.

создания аффинных реагентов и «ловушек» для белков, связывающихся с двутяжевой ДНК.^{10–16}

Например, если механизм действия фермента предполагает расплетание двойной спирали ДНК, то ковалентные связи между цепями препятствуют такому расплетанию. Это может вызвать существенное затруднение действия фермента. Дуплексы, стабилизированные поперечными связями, могут служить мощными ингибиторами белков, связывающихся с нуклеиновыми кислотами.^{10,13} Перспективно использование дуплексов с ковалентно связанными цепями для выделения белков методом аффинной хроматографии. Ковалентные связи в заданных участках способны стабилизировать термодинамически неустойчивые структуры ДНК.^{15,17}

Существует два основных метода создания таких соединений. Исторически первым из них стала неспецифическая обработка достаточно длинных молекул ДНК бифункциональными алкилирующими агентами, такими как производные псораленов, пирролов и ряд других.^{1–5,18} Второй метод, приводящий к образованию ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями, основан на использовании производных модифицированных олигонуклеотидов, содержащих химически активные группировки.

Российские ученые Сибирского отделения Академии наук под руководством академика Д.Г.Кнорре более 30 лет назад одними из первых начали изучать реакции между олигонуклеотидными цепями в составе дуплекса.^{1–3,19–23} Эти работы положили начало методу «адресованной химической модификации», который применялся для изучения строения нуклеиновых кислот. По сути, данный метод связан с созданием синтетических аналогов нуклеаз, специфичных к определенному типу оснований ДНК. Позднее на смену методу «адресованной модификации» пришел метод «комплементарно адресованной модификации».^{1–3,24–31} Суть последнего заключается в присоединении активной алкилирующей группы к олигонуклеотиду, которая после гибридизации взаимодействует с ДНК-мишенью сайт-специфично, т.е. алкилирует ее в заранее заданном положении.

Таким образом, большинство работ, посвященных использованию алкилирующих реагентов для модификации НК, направлено на получение высокоактивных производных, взаимодействие с которыми нуклеиновой кислоты-мишени приводит к лабильности гликозидной связи одного из нуклеозидов и, как следствие, к расщеплению фосфодиэфирных связей олигонуклеотида.^{1–3} Независимо от природы алкилирующего агента образующиеся двутяжевые комплексы с ковалентно связанными цепями являются неустойчивыми структурами и подвергаются самопроизвольному гидролизу в водных растворах. Такие работы содержали информацию о реакциях между цепями двуспиральных НК, однако в них не ставилась задача получения ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями. Поэтому в настоящем обзоре они подробно не рассматриваются.

Данный обзор охватывает круг работ, посвященных в основном получению синтетических олигонуклеотидных дуплексов с ковалентно связанными цепями и методам неспецифического связывания цепей протяженных ДНК между собой. В настоящем обзоре не рассматриваются ковалентно замкнутые структуры НК, а именно циклические олигонуклеотиды и гантелеобразные структуры («дамблы»), поскольку данное направление является самостоятельной областью исследования. В последнее время оно также получило значительное развитие.

II. Основные методы получения ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями

Известно, что бифункциональные алкилирующие агенты, способные давать поперечные связи между цепями (такие как 2-хлорэтилнитрозомочевина и др.), могут ингибировать

процессы биосинтеза НК. Во многих случаях эти вещества эффективны как противоопухолевые препараты.^{5,6,32–34} Это связано с тем, что неспецифическое сшивание цепей ДНК между собой является высокотоксичным для клетки,^{5,34} так как препятствует экспрессии генетического материала. Способность образовывать поперечные связи в двучепочной ДНК является причиной цитотоксичности многих соединений, использующихся в клинической практике.

Описано большое число соединений, способных связывать цепи НК между собой. В настоящее время для этого наиболее широко применяют производные псораленов^{7,11,12,18,35–64} и пирролов.^{34,65–71} Для образования межтяжевых связей в двуспиральных НК применяются также: азиридилилбензохиноны, такие как 2,5-бис(азиридин-1-ил)-1,4-бензохинон^{72,73} или алкилазиридилил-1,4-бензохиноны;⁷⁴ азиридилилнитробензамиды (5-(азиридин-1-ил)-2-нитро-4-нитробензамид и 5-(азиридин-1-ил)-4-гидроксиламино-2-нитробензамид⁷⁵); антрациклины (дауномицин,⁷⁶ адриамицин,⁷⁷ антрамицин,^{78,79} митомицин С^{80–83} и его аналоги⁸⁴); производные меламина, например трисгидроксиметил(триметил)меламин;⁸⁵ производные акридина, например 1-нитро-9-(3-*N,N*-диметиламинопропил)аминоакридин;⁸⁶ хлорамбуцил,^{87,88} 4-гидропероксициклофосфамид,⁸⁹ азотистый иприт,^{90,91} 1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевина,⁹² 2-аминометилпирролидин-(1,1-циклобутандикарбокси)платина(II),⁹³ цисплатин,^{34,80,92,94} *цис*-диаминодихлороплатина(II).⁹⁵

Наиболее удобными инструментами для изучения структуры и функций генов являются синтетические олигонуклеотидные дуплексы с ковалентно связанными цепями. Их использование имеет ряд очевидных преимуществ перед неспецифическим алкилированием НК. Известные бифункциональные электрофильные реагенты обычно узнают в НК последовательности длиной не более двух нуклеотидных остатков. В результате реакций этих реагентов с НК, как правило, образуются примеси моноаддуктов, а также продукты внутрицепочечных сшивок. Так, отмечается,¹⁸ что гетерогенность реакционной смеси после алкилирования ДНК неспецифическими бифункциональными агентами часто затрудняет изучение эффектов отдельных связей между цепями на процессинг ДНК.

В настоящее время получение олигонуклеотидных дуплексов с цепями, связанными в заданных положениях двойной спирали, осложнено рядом проблем: часто связи между цепями либо нестабильны,⁹⁶ либо вносят заметные искажения во вторичную структуру ДНК.^{35,36} В последние годы появились новые подходы к синтезу ДНК-дуплексов, содержащих межтяжевые связи, которые позволяют получить связи между цепями в любых заранее заданных местах ДНК-дуплекса и, в том числе, вводить несколько таких связей в один и тот же дуплекс.

Можно сформулировать следующие основные требования к методам синтеза модифицированных олигонуклеотидов, которые используются для получения дуплексов с ковалентно связанными цепями: 1) возможность направленного включения модифицированных звеньев в любое заданное положение олигонуклеотидной цепи; 2) сохранение стандартных процедур олигонуклеотидного синтеза; 3) возможность встраивания нескольких модифицированных звеньев в один и тот же олигонуклеотид для последующего получения олигонуклеотидного дуплекса с несколькими связями между цепями.

III. Методы получения модифицированных олигонуклеотидов

В общем случае олигонуклеотид может быть модифицирован по гетероциклическим основаниям, по фосфатным группам (межнуклеотидным или концевым) и по углеводным остаткам. Возможности современного химического синтеза

фрагментов НК таковы, что в олигонуклеотид можно направленно ввести одно или несколько модифицированных звеньев как одинаковой, так и различной природы.

Для связывания цепей дуплекса между собой используют соединения, содержащие первичные алифатические аминогруппы, а также альдегидные, карбоксильные, тио- и фосфатные группы. Для создания сшивки, как правило, необходима локализация активной группы на конце спейсера (связывающей ножки). В зависимости от взаимного расположения реагирующих групп в дуплексе длина спейсера может существенно различаться. Так, в случае псораленов для взаимодействия с противоположной цепью достаточно относительно короткого спейсера длиной в два углеродных атома.^{37, 38}

Функциональная группа может быть введена в олигонуклеотид следующими методами:⁸

а) использование в ходе химического олигонуклеотидного синтеза модифицированного нуклеотидного компонента, имеющего соответствующую функциональную группу;

б) встраивание в олигомерную цепь соединения-предшественника, из которого при обработке синтезированного олигонуклеотида соответствующими реагентами получается целевое модифицированное звено в процессе синтеза или после его окончания;

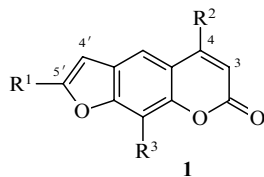
в) постсинтетическая модификация олигонуклеотида.

Возможности последнего метода ограничены. Он может быть использован лишь для получения олигонуклеотидных аналогов, несущих множество статистически модифицированных звеньев (например, в этих звеньях модифицированы идентичные гетероциклические основания). В первых двух методах та или иная модификация заранее заложена в схему химического синтеза олигонуклеотида.

Наиболее универсальным является первый метод. Он базируется на предварительном получении модифицированных звеньев и их последующем введении в олигонуклеотид в процессе синтеза. Метод не ограничивает ни количество, ни химическую природу звеньев, которые могут быть направленно введены в олигонуклеотидную цепь. При использовании этого метода существенно облегчается и выделение целевого продукта. Побочные реакции в ходе олигонуклеотидного синтеза сведены к минимуму благодаря тому, что все химически активные функциональные группы олигонуклеотида предварительно блокируют. Предварительная модификация вводимого нуклеозида в большинстве случаев проводится в безводных условиях. Это позволяет использовать широкий спектр модифицирующих реагентов, в отличие от постсинтетических модификаций в водных растворах.

IV. Использование псораленов для получения ковалентно связанных ДНК-дуплексов

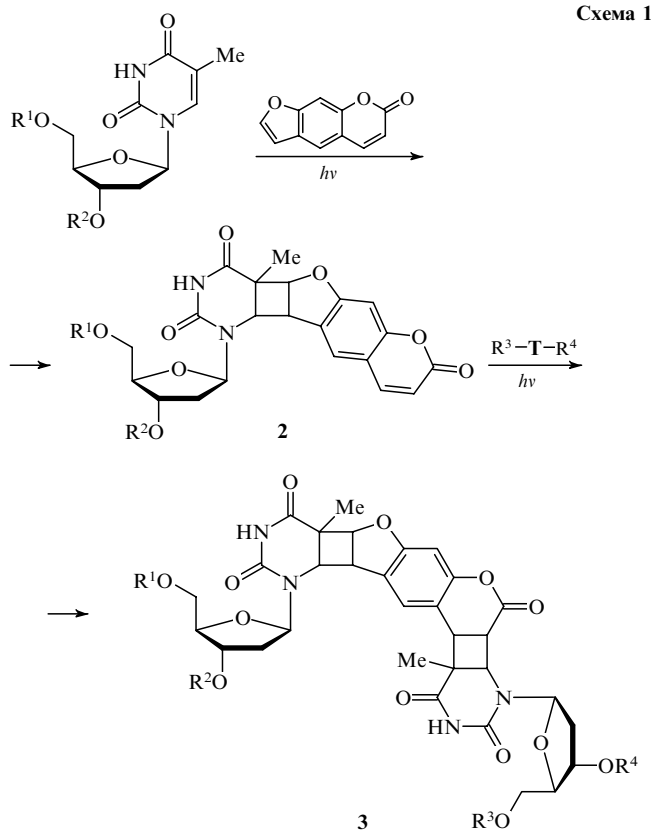
Псоралены (7*H*-фуро[3,2-*g*][1]бензопиран-7-оны)[†] — полициклические ароматические соединения общей формулы **1** — имеют плоскую структуру и способны интеркалировать между парами оснований двуцепочечных НК.^{36, 39–41}



$R^1, R^2, R^3 = H, \text{Alk.}$

Они специфичны к остаткам тимидина и уридина. При облучении ДНК-дуплексов УФ-светом с длиной волны 320–360 нм псорален встраивается в двойную спираль и

ковалентно связывается с пиримидиновыми основаниями ДНК, предпочтительно с тимином по положениям 5 и 6 с образованием четырехчленных циклов (схема 1).^{37, 42, 43}



$R^1 - R^4$ — фрагменты олигонуклеотидных цепей.

Псоралены способны вступать в реакции фотоприсоединения с цитидином. Однако эта реакция идет в 15 раз медленнее, чем с тимидином.⁴⁴ В ДНК псоралены предпочтительно связываются с последовательностью 5'-d(TrpA).^{40, 43, 45, 46} Эффективность фотоприсоединения псоралена к данной последовательности по крайней мере на порядок выше, чем к тимидину в другом окружении. Эти же закономерности сохраняются и при получении ковалентно связанных РНК-дуплексов.^{11, 12, 47, 48}

Поскольку псорален является бифункциональным реагентом, фотоиндуцируемая реакция может привести либо к моноаддукту типа **2**, когда молекула псоралена присоединяется лишь к одной из цепей НК, либо к бисаддукту общей формулы **3**. В последнем случае получается дуплекс с ковалентно связанными цепями. Образование бисаддукта **3** происходит в две стадии (схема 1),^{7, 11, 45} причем для этого необходимо поглощение двух фотонов.⁴⁹ Если на первой стадии в реакцию вступает пирановое кольцо псоралена, то бисаддукт не образуется, поскольку в таком моноаддукте фурановое кольцо становится неспособным к поглощению УФ-излучения.¹¹

Необходимым условием реакции между цепями является интеркаляция псоралена в двойную спираль, которая, как правило, вызывает повышение термодинамической стабильности дуплекса. Наряду с образованием аддуктов возможна фотоинактивация псоралена, которая выражается в фотохимической деградации пиранового кольца.³⁸ Аддукты нуклеиновых кислот с псораленом разлагаются на исходные компоненты под действием УФ-облучения с длиной волны, зависящей от структуры производного псоралена;^{39, 40, 42, 45} она составляет, как правило, 254 нм. Таким образом, процесс

[†] Далее в тексте приводятся названия, принятые в оригинальных работах.

связывания цепей ДНК между собой с участием псоралена является обратимым.

Псоралены нетоксичны в отсутствие УФ-излучения. Способность к образованию поперечных связей между цепями ДНК дает возможность применять эти соединения для изучения структуры ДНК *in vitro* и *in vivo*. Псоралены используются как в медицине для фотохимиотерапии ряда заболеваний,^{39, 40, 50, 51} так и для исследования ряда молекулярно-биологических процессов. Псорален применяли для изучения вторичной структуры РНК,^{35, 47, 48, 50–52} для исследования строения транскрипционного комплекса ДНК – РНК-полимераза.^{12, 53–55} В последнее время производные псоралена применяются для изучения вторичной и третичной структуры НК, а также — механизмов репарации ДНК.^{56–58}

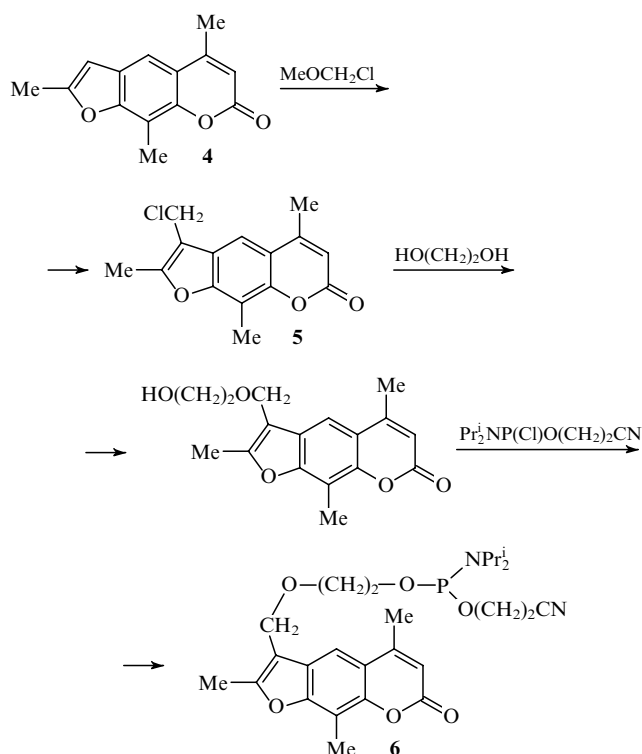
Наибольший интерес представляют методы направленного введения псоралена в олигонуклеотиды: непосредственно в процессе олигонуклеотидного синтеза либо после его окончания и удаления защитных групп. Моноаддукт псоралена с олигонуклеотидом получают постсинтетически с использованием активирующего агента.^{12, 59, 60} Так, в работе⁶⁰ такой моноаддукт синтезировали реакцией 5'-фосфорилированного самокомплементарного олигонуклеотида с 4'-аминоалкил-4,5',8-триметилпсораленом в присутствии гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламино)пропилкарбодимида $\text{EtN}=\text{C}=\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NMe}_2 \cdot \text{HCl}$ (водорастворимого карбодимида, КДИ). После гибридизации и облечения образуется ДНК-дуплекс, связанный с обоих концов.

Второй метод обычно заключается в присоединении псоралена к 5'-концу олигонуклеотида в процессе олигонуклеотидного синтеза. Для этой цели используют амидофосфитное производное псоралена в последнем цикле синтеза.^{37, 38} В работе³⁸ была применена характерная синтетическая схема для включения псоралена в олигонуклеотид. Производное псоралена — 4,5',8-триметилпсорален **4** — превращали в амидофосфит **6** (схема 2), который и использовали в олигонуклеотидном синтезе.

4,5',8-Триметилпсорален **4** присоединяли к 5'-концу 18-звенного олигонуклеотида и вводили полученный олигонуклеотид **7** в реакцию между цепями ДНК-дуплекса (схема 3). 4,5',8-Триметилпсорален, как было показано в работе³⁸, устойчив в условиях синтеза и постсинтетических обработок олигонуклеотида. Отметим, что для псораленсодержащих олигонуклеотидов типа **7** характерно повышение гидрофобности, что проявляется в увеличении времен удерживания при анализе методом ВЭЖХ³⁸ по сравнению с немодифицированными аналогами.

В работе⁶¹ нуклеотидная последовательность олигонуклеотидов, составлявших дуплекс, была выбрана таким

Схема 2

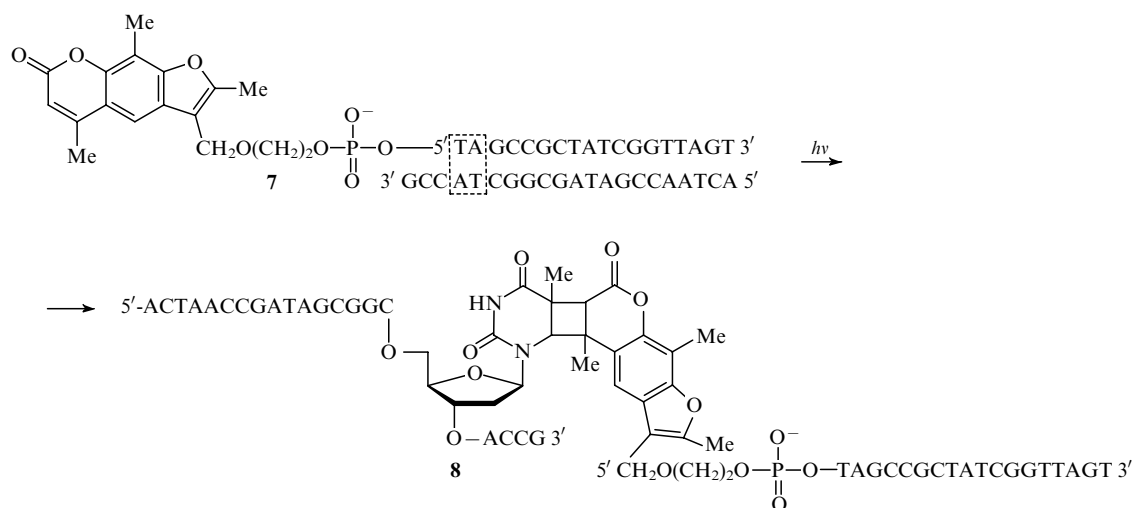


образом, что псорален **4** интеркалировал в двойную спираль и реагировал с тимидином в составе последовательности 5'-d(TrA)/3'-d(ApT). Оказалось, что максимальный выход ДНК-дуплекса **8** достигается при использовании группы $\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2$ в качестве спейсера для присоединения псоралена к олигонуклеотиду (см. схему 3).

Выход продукта **8**, как правило, возрастает в первые 10–30 мин после начала облучения (360 нм, 60 мин, 20°C), достигая 70–80%. Количественный выход не наблюдается даже при 100-кратном избытке модифицированного олигонуклеотида **7** по отношению к ДНК-матрице.³⁸ Последнее обстоятельство связано с частичной инактивацией псоралена при облучении.

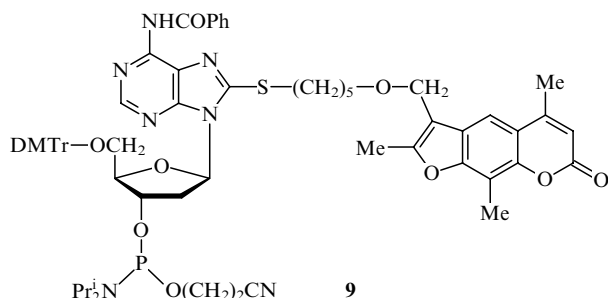
Последовательности 5'-d(TrA)/3'-d(ApT) содержатся в сигнальных последовательностях многих генов. Они являются потенциальными мишенями для модифицированных псораленом олигонуклеотидов типа **7**. Таким образом,

Схема 3



олигонуклеотиды типа **7** могут быть использованы как удобные зонды для исследований экспрессии генов.

Предложен³⁷ метод синтеза псораленсодержащих олигонуклеотидов с использованием модифицированного амидофосфита дезоксиаденозина[‡] (**9**).



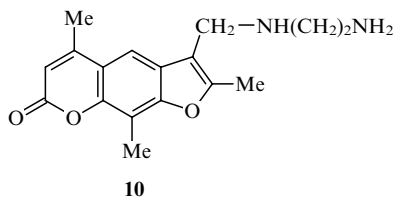
DMTr = (4-MeOC₆H₄)₂PhC.

4,5',8-Триметилпсорален **4** присоединяли к атому С(8) дезоксиаденозина через атом серы и пентаметиленовую связующую ножку. Последующее фосфитирование приводило к соединению **9**. На стадии присоединения амидофосфита **9** к олигонуклеотиду для достижения максимального выхода (90%) во время синтеза вместо тетразола использовали 5-(4-нитрофенил)-(1*H*)-тетразол; время конденсации составляло 8 мин.

Оптимальная длина связующего спейсера была найдена с помощью молекулярного моделирования. В данном случае для интеркаляции псоралена в участок 5'-d(TA)/3'-d(AT) оптимальной является длина спейсера в пять углеродных атомов. Аналогичное производное дезоксиаденозина типа **9**, но с длиной спейсера в два углеродных атома, отличалось очень слабой способностью к образованию сшивки. Эффективность реакции фотоприсоединения к комплементарной матричной цепи составила более 90% после облучения УФ-светом с длиной волны 345 нм в течение 1 ч. Отмечается образование нескольких продуктов, соответствующих различным возможностям встраивания псоралена в двойную спираль. Оказалось, что псорален эффективно встраивается как в участок 5'-d(TA)/3'-d(AT), так и в участок 5'-d(AT)/3'-d(TA), реагируя при этом как с остатком тимидина, расположенным в противоположной цепи, так и с соседним.

Благодаря тому, что концы ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями со структурой типа **8** остаются свободными, к ним легко присоединять различные метки (радиоактивную, флуоресцентную или любую другую). Кроме того, такие дуплексы могут быть встроены в более протяженные структуры ДНК.³⁷

Было изучено¹² взаимодействие олигонуклеотидметилфосфонатов (ОМФ), несущих на 5'-конце производное псоралена (ПС-ОМФ), а именно, 4'-[N-(2-аминоэтил)аминометил]-4,5',8-триметилпсорален (**10**), с одно- и двуцепочечной ДНК.



Соединение **10** присоединяли к 5'-концу ОМФ, несущего на 5'-конце фосфатную группу, получая **11** (схема 4). Для активации фосфатной группы использовали водораствори-

мый КДИ. Показано, что связь Р—N устойчива к действию нуклеаз, однако в кислой среде расщепляется с образованием исходного 5'-фосфорилированного ОМФ.

При облучении ПС-ОМФ специфично вступали в реакцию с матрицей. Наличие в дуплексе менее прочных пар нуклеотидов, например G·T или G·A, приводило к снижению выхода дуплекса с ковалентно связанными цепями.¹² Это объясняется понижением термодинамической стабильности исходного дуплекса. Количество побочных продуктов, появление которых обусловлено реакцией между цепями в неканонических дуплексах, зависит от температуры. Если при 20°C наблюдается образование побочных продуктов, то при 40°C они уже не появляются. Это вызвано распадом менее прочных неканонических дуплексов при повышении температуры. В случае канонического дуплекса зависимость выхода ковалентно сшитого дуплекса от температуры не наблюдается ниже температуры его плавления. При температурах больших, чем температура плавления исходного дуплекса, выход целевого продукта резко падает. На эффективность реакции между цепями ДНК-дуплекса влияет также соотношение скорости данной реакции и скорости фотоинактивации псоралена. Выход ДНК-дуплекса с ковалентно связанными цепями возрастает с ростом концентрации ПС-ОМФ. Однако при концентрации ПС-ОМФ в два раза большей, чем концентрация матрицы, происходит насыщение матрицы и дальнейшего увеличения выхода целевого продукта не наблюдается.¹²

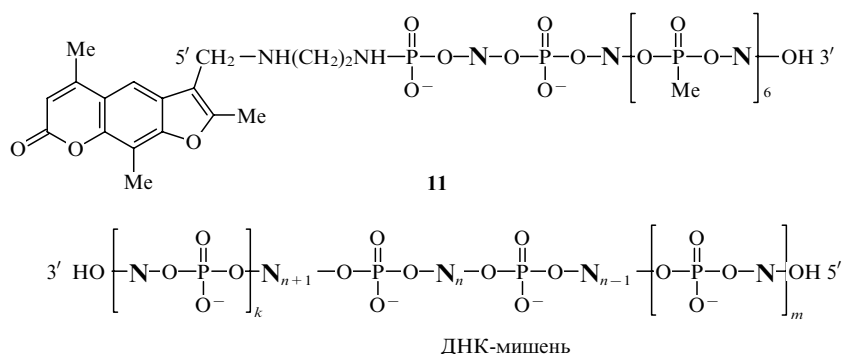
Для разных олигонуклеотидов эффективность реакции с матрицей сильно различалась в одних и тех же условиях,¹² хотя при температуре 4°C различия в нуклеотидных последовательностях не должны были бы сказываться. Молекулярное моделирование показало,¹² что псорален может встраиваться между нуклеотидами мишени двумя путями: либо между концевыми нуклеотидами N_{n+1} и N_n, либо между нуклеотидами N_n и N_{n-1}, где N_{n+1} — 3'-концевой нуклеозид мишени, N_n — нуклеозид, комплементарный 5'-концевому нуклеотиду ПС-ОМФ (см. схему 4). В первом случае возникает наиболее выгодная для фотоприсоединения псоралена пространственная структура реакционного центра. Реакция между цепями протекает наиболее эффективно, если и в позиции матрицы (n+1), и в позиции (n-1) по отношению к звену, модифицированному псораленом, находятся остатки тимидина, а в позиции n — аденозин. В этом случае реакция идет сразу по обоим возможным направлениям. При этом выход дуплекса с ковалентно связанными цепями достигает 95%.

Олигонуклеотиды типа **11** использовали для изучения вторичной структуры НК.¹² В частности, было показано, что сшивка с одноцепочечным районом ДНК идет в 10–30 раз эффективнее, чем с двуцепочечным. Так как ОМФ обладают повышенной устойчивостью в клетках, такие олигонуклеотидные производные, по мнению авторов¹², могут найти применение в опытах *in vivo*.

Был синтезирован набор ПС-ОМФ, комплементарных участкам кодирующей и не кодирующей цепей 57-звенного ДНК-дуплекса, содержащего 17-звенный T7-промотор РНК-полимеразы.¹² Были изучены эффекты, оказываемые ПС-ОМФ на процесс транскрипции *in vitro*. Показано, что ПС-ОМФ, ковалентно связанный с кодирующим участком ДНК, эффективно подавляет транскрипцию, тогда как олигонуклеотид, связанный с не кодирующим участком, имеет малый ингибирующий эффект. Таким образом, олигонуклеотид, ковалентно связанный с матрицей в районе промотора, препятствует связыванию полимеразы с двойной спиралью ДНК либо непосредственно, либо изменяя ее конформацию в районе промотора.

Как агент, взаимодействующий непосредственно с ДНК, псорален способен вызывать различные мутации.¹¹ Изучение

[‡] Здесь и далее под дезоксинуклеозидами понимаются 2'-дезоксирибонуклеозиды.



N — остатки дезоксирибонуклеотидов; $m \geq 6$, $k \geq 0$.

процессов мутагенеза необходимо для понимания закономерностей возникновения рака, наследственных заболеваний, эволюционных процессов.^{11, 56, 57} Было неизвестно, какие из псорален-индуцируемых мутаций возникают под действием моноаддукта, а какие — из-за наличия связей между цепями.

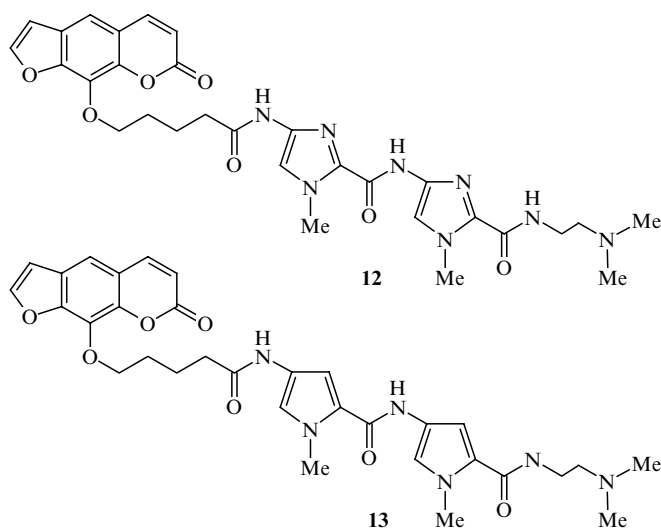
Благодаря использованию плазмиды, содержащей единственное определенное место повреждения, удалось найти связь между начальным повреждением ДНК, индуцированным псораленом, и возникновением последующих мутаций.¹¹ В случае использования статистически модифицированной ДНК невозможно было сопоставить характер мутации с типом аддукта. Кольцевая замкнутая двучепочная плазида, содержащая сайт-специфически встроенный псорален в виде моно- или бисаддукта (в последнем случае образуется связь между тяжами плазмиды) была синтезирована *in vitro* и введена в клетки *E. coli*. Сконструированная ДНК содержала единственный сайт с тиминным моноаддуктом псоралена. Синтез плазмиды, содержащей псорален, вели с помощью Т4-ДНК-полимеразы, используя в качестве праймера олигонуклеотид с псораленом на 3'-конце. В данном случае псорален не оказывал влияния на процесс наращивания цепи и на последующее лигирование. Моноаддукт переводили в бисаддукт облучением УФ-светом; плазмиду с ковалентно соединенными цепями выделяли, используя ее приобретенную способность к обратимой термической денатурации. В отличие от плазмиды со связанными цепями обычная плазида денатурирует необратимо. Имея две молекулы ДНК с различными типами псорален-индуцированных повреждений, авторы¹¹ проследили за типом и частотой возникающих мутаций. Оказалось, что оба типа повреждений ДНК с участием псоралена (как образование моноаддукта, так и формирование связей между цепями) могут привести к серьезным генотоксическим эффектам. Полученный результат совпадает с данными других авторов.^{58, 62, 63}

Мутация, вызванная образованием моноаддукта, была исправлена репарирующим механизмом клетки. В случае же бисаддукта появлялось большое количество вторичных мутаций (делеции, замены и инверсии). Уровень активности ДНК со связанными цепями составил 1.6% от контроля.¹¹

Таким образом, показано, что токсичность псоралена определяется именно бисаддуктами, образование которых является серьезным повреждением ДНК. Имеются данные о том, что обработка НК псораленом препятствует протеканию процессов репликации и транскрипции.¹¹

Предложено⁶⁴ присоединять псорален к дистамицин-подобным производным имидазола (соединение 12) и пиррола (соединение 13) для доставки псоралена к определенным

последовательностям ДНК. Как и олигопептид дистамицин, эти соединения связываются с ДНК в районе малой бороздки.



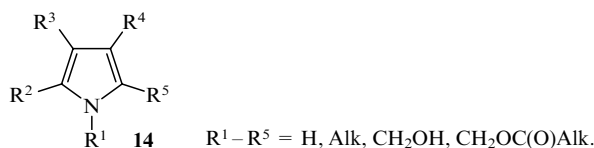
При использовании олигонуклеотидов для доставки псоралена к определенным последовательностям ДНК из-за низкой способности олигонуклеотидов к проникновению через гидрофобные клеточные мембраны и их подверженности нуклеазному гидролизу возникает ряд проблем. Это ограничивает возможности применения подобных соединений.

Производные 12 и 13 лишены этих недостатков и способны направлять псорален как к GC-богатым (имидазольные аналоги дистамицина, 12), так и к АТ-богатым (пиррольные аналоги, 13) участкам ДНК. Оказалось, что производное 12 в 10 раз более эффективно модифицирует ДНК, чем псорален, а производное 13 — в 1000 раз более эффективно, чем псорален, и в 100 раз более эффективно, чем производное 12. Таким образом, псорален, связанный с реагентами, аффинными к ДНК, способен с повышенной эффективностью образовывать множественные связи между цепями в протяженных ДНК.

V. НК-дуплексы с ковалентно связанными цепями, получаемые с помощью производных пиррола

Бифункциональные производные пиррола (ПП) 14 наряду с производными псоралена довольно широко применяются

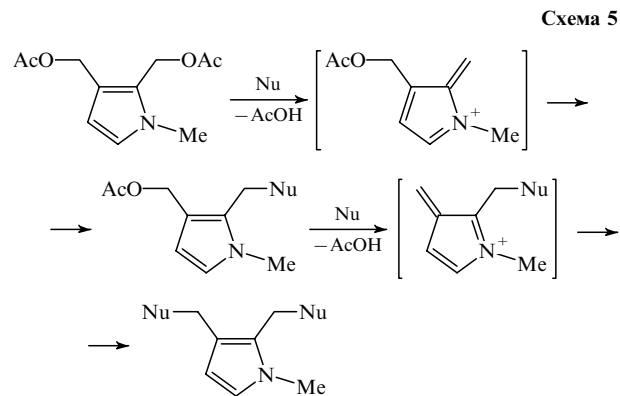
для создания поперечных связей между цепями двуцепевых НК.^{34, 65–71} Связывать цепи НК между собой способны лишь бифункциональные ПП.



Реакция между цепями с участием ПП **14** затрагивает экзоциклические аминогруппы гетероциклических оснований ДНК, как правило, дезоксигуанозина, и протекает с участием тех функциональных групп ПП, которые способны подвергаться нуклеофильной атаке. Таким образом, ПП являются алкилирующими агентами. Предложен⁶⁵ вероятный механизм реакции (схема 5).

Производные пиррола сами по себе не являются специфичными агентами и могут взаимодействовать со многими реакционными центрами ДНК. В связи с этим обработку ДНК бифункциональными ПП типа **14** нельзя использовать для введения поперечных связей между цепями в заранее заданные места ДНК. Основным недостатком ПП с точки зрения их применения в качестве противоопухолевых агентов является их низкая селективность (сродство к последовательностям длиной не более двух нуклеотидов). Высокая вероятность появления коротких нуклеотидных последовательностей в геноме является причиной ограниченной селективности ПП.

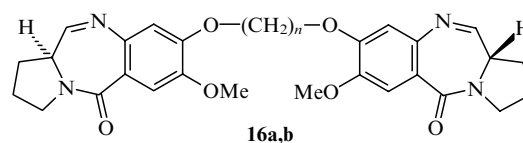
Повышение селективности бифункциональных ПП является важной задачей, в том числе для их применения в качестве терапевтических препаратов. Этого можно добиться более точным адресованием их к определенному геномному сайту-мишени, т. е. к нуклеотидной последовательности малой частоты появления. Однако решение этой задачи требует увеличения сродства таких агентов к НК.^{2, 34, 65–71} Как правило, достаточно добиться селективного взаимодействия сшивающего агента с последовательностями протяженностью более четырех нуклеотидных пар. Основной подход к решению проблемы селективности связан с присоединением бифункционального алкилирующего агента (не имеющего или имеющего малое сродство к НК) к соединениям, обладающим высоким сродством к определенным последовательностям ДНК (например, к олигонуклеотидам).^{34, 65–70}



Nu — экзоциклический атом азота гуанинового основания.

Описан⁶⁶ синтез нового агента необратимого действия **15**, который относится к группе пирролобензодиазепиновых димеров (ПБД-димеров). Он связывается с ДНК через малую бороздку и реагирует с аминогруппой гуанина (схема 6). Предпочтительная последовательность для связывания данного соединения — Pu-G-Pu-триплет, где Pu — пуриновый нуклеотид (А или Г). Выход продукта реакции между цепями составляет ~ 50%.

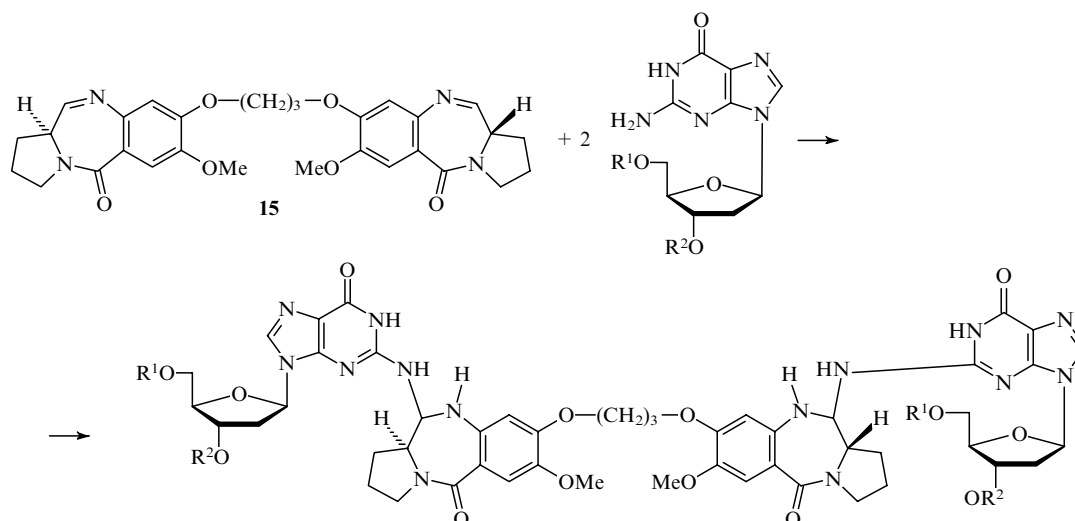
Теми же авторами⁶⁷ описан синтез гомологичных соединению **15** C(8)-связанных ПБД-димеров типа **16** и показано их относительно высокое сродство к ДНК. Наибольшая эффективность реакции между цепями достигается при использовании соединения **15** с длиной связующей цепочки (линкера) в три углеродных атома и соединения **16b**.



$n = 4(a), 5(b).$

Обработка двуцепочечных ДНК любыми ПБД-димерами вызывает повышение температуры плавления дуплексов.⁶⁷ В случае линейной двуцепочечной ДНК, полученной из кольцевой плазмиды, наличие поперечных связей дает эффект быстрой ренатурации в двуцепочечную форму при

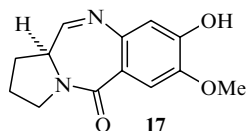
Схема 6



R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидных цепей.

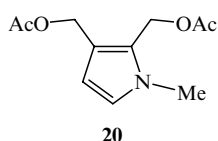
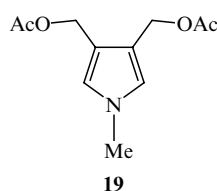
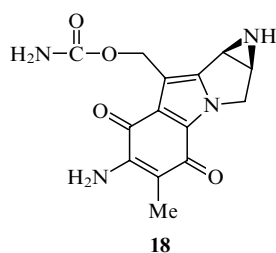
понижении температуры (после предварительной термической денатурации).⁶⁷ Способность протяженной ДНК к быстрой ренатурации является признаком наличия связей между тяжами. Таким образом, ПБД-димеры способны стабилизировать двуцепочечные ДНК.

Данные⁶⁷ по цитотоксичности коррелируют с данными по выходу дуплексов с ковалентно связанными цепями. Наибольшую цитотоксичность проявляет ПБД-димер с $n = 3$, т.е. соединение **15**. С другой стороны, мономер типа **17** не оказывает практически никакого влияния на стабильность ДНК-дуплексов и не обладает токсичностью.

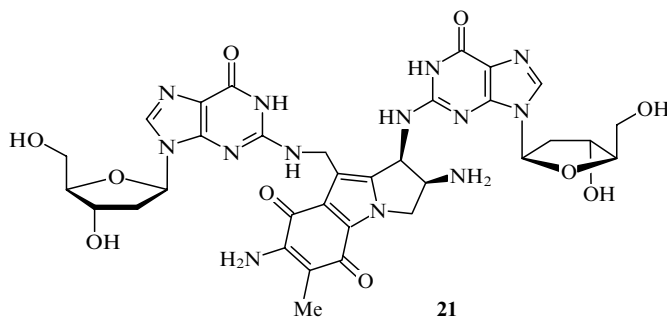


Таким образом, имеется возможность применения этих соединений для лечения опухолей. Существенным недостатком, однако, является их относительно низкое сродство к ДНК.

Изучен механизм образования связей между цепями ДНК с помощью бифункциональных ПП.⁶⁵ Оказалось, что все ПП как природные, например антиопухолевый антибиотик митомицин **С** **18**, так и синтетические пирролы **19** и **20** взаимодействуют с ДНК по одному и тому же механизму и имеют общий участок связывания и место алкилирования. Митомицин **С** превращается в бифункциональный алкилирующий агент, претерпевая восстановление под действием специфических ферментов. Авторам⁶⁵ удалось идентифицировать в молекулах ДНК общий район связывания для всех изучавшихся ПП.



Общим участком-мишенью в ДНК для всех алкилирующих ПП является экзоциклический атом азота дезоксигуанозина в последовательности 5'-d(CG)/3'-d(GC).⁶⁵ Для образования ковалентно связанного дуплекса должны прореагировать обе экзоциклические аминогруппы дезоксигуанозина, участвующих в реакции с ПП. Ниже приведена структура аддукта **21** двух молекул дезоксигуанозина с митомицином **С**.

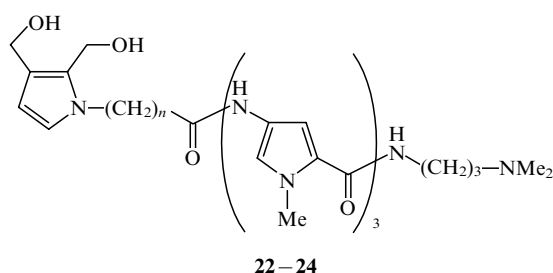


В работе⁶⁵ были исследованы ДНК-дуплексы, содержащие в своем составе только аденозиновые и тимидиновые звенья. Эти ДНК-дуплексы различаются природой нуклеотидов в нескольких нуклеотидных парах. Для доказательства участия в реакции между цепями экзоциклического атома азота гуанина дезоксигуанозин заменяли на инозин, получая при этом дуплексы, содержащие фрагменты 5'-d(ACGT)/3'-d(TICA) и 5'-d(ACIT)/3'-d(TICA). Замена хотя бы одного дезоксигуанозина на инозин приводит к полному исчезновению продукта межцепочечной сшивки. Показано также,⁶⁵ что в последовательности 5'-d(CG)/3'-d(GC) реакция протекает по крайней мере в 10 раз эффективнее, чем в любой другой.

Строение полученных соединений было подтверждено анализом продуктов исчерпывающего ферментативного гидролиза дуплексов с ковалентно связанными цепями в сочетании с данными масс-спектропии. Именно таким способом⁶⁵ была установлена структура соединения **21**. Тем же методом доказана структура аддуктов синтетических производных пиррола **19** и **20**. Следует подчеркнуть, что компьютерное моделирование ДНК-дуплекса с ковалентно связанными цепями показало довольно существенное искажение нативной В-формы спирали ДНК независимо от природы ПП, связанное с торсионной реорганизацией структуры ДНК.

К сожалению, понять причины наблюдаемой специфичности не удалось. Реакция между цепями — многостадийный процесс, включающий образование моно-, а затем бисаддукта. Каждая из этих стадий может быть ответственной за специфичность. Поскольку одинаковую специфичность проявляют как синтетические ПП **19** и **20**, так и их природные аналоги с более сложной структурой, был сделан вывод,⁶⁵ что специфичность действия производных пиррола заложена в общих элементах структуры. Возможно, это связано с наличием асимметрических атомов углерода. С другой стороны, существенные различия в эффективности действия ПП как агентов, сшивающих цепи ДНК между собой, указывают на важность индивидуальных особенностей строения ПП.

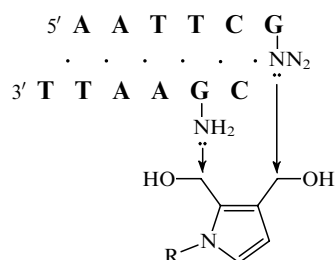
Последние работы^{68,69} в этой области направлены в основном на повышение селективности действия ПП. Чтобы повысить эффективность аффинного связывания алкилирующего агента с НК-мишенью, предлагается^{68,69} получать его конъюгат с олигопептидом, который узнает именно малую бороздку двойной спирали. Получен^{68,69} аффинный агент **22**, в структуру которого входит олигопептид дистамицин, узнающий последовательность 5'-d(AATT) (через малую бороздку), и ПП, которое узнает последовательность 5'-d(CG).



$n = 2$ (**22**), 3 (**23**), 4 (**24**).

Таким образом, аффинный агент **22** селективно узнает нуклеотидную последовательность 5'-d(CGAATT)/3'-d(GCTTAA) и создает поперечную связь между цепями. Активность этого агента была проверена как на синтетическом дуплексе, так и на линеаризованной плазмиде. Оказалось, что производное **22** в качестве сшивающего агента на три порядка более эффективно, чем ПП, несвязанное с пептидом. После термической денатурации и последующего охлаждения плазмиды, обработанная этим агентом, претер-

пелава быструю ренатурацию в двуцепочечную форму, что объясняется наличием связей между цепями.



R — олигопептид.

Было испытано действие соединения **22** на образцы ДНК с различными нуклеотидными последовательностями. Оказалось, что только ДНК, содержащая последовательность 5'-d(CGAATTCG)/3'-d(GCTTAAGC), эффективно вступает в реакцию с **22** (выход сшитого продукта около 70% в расчете на ДНК). Эта последовательность содержит как участок связывания дистамицина — 5'-d(AATT), так и консенсусный участок связывания ПП — 5'-d(CG). Было отмечено постоянное возникновение побочных продуктов реакции. Оказалось, что последние образуются в результате реакции соединения **22** с двумя дезоксигуанозиновыми звеньями одной и той же цепи ДНК.

Описан⁶⁹ синтез ряда сходных с соединением **22** бифункциональных агентов, в которых 2,3-бис(гидроксиметил)пиррол связан с олигопептидом дистамицином. Эти соединения (**23**, **24**) отличаются от **22** лишь длиной звена, соединяющего ПП с олигопептидом. Соединения **22–24** на три порядка более эффективны, а также и более селективны, чем обычные ПП. Они могут образовывать как внутрицепочечные, так и межцепочечные связи между цепями ДНК в зависимости от последовательности нуклеотидов в участке связывания ПП. В дуплексе, содержащем последовательность 5'-d(CGAATT)/3'-d(GCTTAA), образуется межцепочечная связь, а при наличии последовательности 5'-d(GGAATT)/3'-d(CCTTAA) — внутрицепочечная.

Нуклеозиды, связанные между собой посредством ПП и выделенные после исчерпывающего ферментативного гидролиза межнуклеотидных связей, имеют идентичную структуру как в случае гидролиза продукта реакции между цепями, так и в случае гидролиза продукта реакции внутри одной и той же цепи. Сравнение эффективности связывания различных субстратов с каждым из соединений **22–24** показало, что важны оба сайта связывания — как 5'-d(CG)/3'-d(GC) (ПП), так и 5'-d(AATT)/3'-d(TTAA) (дистамицин). Замена нуклеотидов в любом из них (CG на GC или замена пары A·T на G·C) резко снижали эффективность процесса. Таким образом, консенсусной оказалась последовательность 5'-d(CGAATTCG)/3'-d(GCTTAAGC).⁶⁹

Соединения **22–24** вводили в реакцию с линеаризованной плазмидой, содержащей 27 сайтов 5'-d(AATT)/3'-d(TTAA), сопряженных с 5'-d(GC)/3'-d(CG).⁶⁹ Эффективность реакции между цепями оценивали по методу Хартли,^{5,70,71} который основан на способности ДНК с ковалентно связанными цепями быстро ренатурировать в двуцепочечную форму после термической денатурации. Увеличение эффективности процесса наблюдали при увеличении соотношения агент : ДНК до 5 : 1 (в этих условиях происходит насыщение пептид-связывающих сайтов). Наибольший выход (80%) наблюдали при действии соединения **22** на олигонуклеотидные дуплексы, содержащие последовательность 5'-d(CGAATTCG)/3'-d(GCTTAAGC). Для последовательности 5'-d(CGAAAAACG)/3'-d(GCTTTTTCG) выход сшитого продукта составил ~ 50%, а для последовательностей 5'-d(GC...)/3'-d(CG...) — не более 10%. В случае соединения **23** выход для последовательности 5'-d(CGAATTCG)/3'-d(GCTTAAGC) составил 40%. Авторы⁶⁹ не смогли найти объяснение такому снижению эффективности

процесса при увеличении длины линкера. Возможно, это связано с геометрическим разориентированием ПП в реакционном центре.

Структуру полученных соединений анализировали путем исследования состава продуктов исчерпывающего ферментативного гидролиза дуплексов с ковалентно связанными цепями. Отмечается, что даже продолжительный гидролиз ДНК с ковалентно связанными цепями смесью фосфодиэстеразы змеиного яда и щелочной фосфатазы не разлагает ее на нуклеозиды полностью. Чтобы добиться полного гидролиза фосфодиэфирных связей дуплекса, использовали увеличенные количества фосфодиэстеразы змеиного яда в сочетании с эндонуклеазами: ДНКазой I и ДНКазой II. Тем не менее цитотоксичность данных соединений оказалась относительно невелика и сравнима с таковой для природных ПП.

Использование соединений типа **22–24** для связывания цепей ДНК между собой имеет ряд преимуществ по сравнению с применением производных псоралена. Псорален узнает большую бороздку ДНК и связывает остатки тимидина в последовательности 5'-d(TA)/3'-d(AT), встраиваясь внутрь двойной спирали. Напротив, производные пиррола, связанные с пептидами **22–24**, узнают малую бороздку. При этом узнается более протяженная последовательность (шесть нуклеотидов), а сам агент остается снаружи двойной спирали ДНК, не вызывая ее дестабилизации. Однако в настоящее время использование таких агентов направленного действия ограничено в связи с отсутствием общей концепции дизайна олигопептидов, связывающихся с заданной последовательностью НК.³⁴

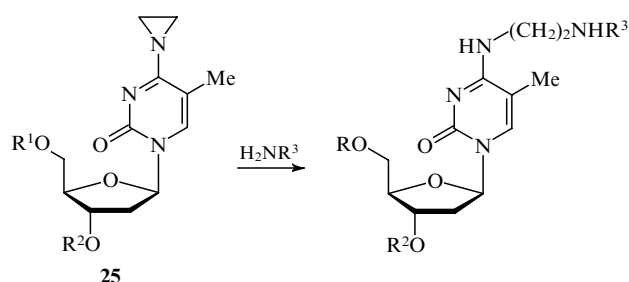
Таким образом, к настоящему времени описан ряд соединений, способных связывать цепи НК между собой.^{11, 12, 18, 34–95} Каждое из них реагирует с дуплексом в определенном участке и образует с той или иной эффективностью ковалентные связи с двумя нуклеотидами из противоположных цепей. Однако большинство описанных соединений обладает рядом недостатков. Они не способны связываться с высокой специфичностью с уникальным участком НК. Это, как правило, приводит к образованию множественных связей между тяжами, в том числе и внутрицепочечных. Эти реагенты не являются универсальными, так как не способны образовывать связь между цепями НК в заданном положении, а взаимодействуют только с какими-либо определенными гетероциклическими основаниями. В ряде случаев они дестабилизируют двойную спираль в месте образовавшейся связи между цепями, что нарушает геометрию канонической пространственной структуры НК. Псоралены, а также производные пиррола и другие упомянутые выше соединения находят применение как в клинической практике (в качестве противоопухолевых агентов), так и при изучении механизмов функционирования ряда молекулярно-биологических систем. Однако для изучения особенностей структурной организации и механизмов функционирования внутриклеточных структур на молекулярном уровне необходимы инструменты исследования нового поколения. Такими инструментами являются химически сконструированные синтетические системы, лишенные описанных выше недостатков.

VI. Основные методы получения НК-дуплексов, содержащих сшивки в заранее заданных положениях двойной спирали

Для изучения процессов белково-нуклеинового узнавания и механизмов действия ферментов, взаимодействующих с НК, наиболее перспективно использование НК-дуплексов с цепями, связанными в заранее заданных положениях двойной спирали. Для получения таких дуплексов, как правило, необходимо использование активных производных олигонуклеотидов, содержащих модифицированные нуклеозиды. Метод, в котором используются такие активные олигонук-

леотидные производные, дает ряд преимуществ перед рассмотренными выше методами. В частности, обеспечивается полный контроль за локализацией вводимых поперечных связей между цепями и за полнотой протекания процесса. К настоящему времени предложены различные типы таких активных производных.

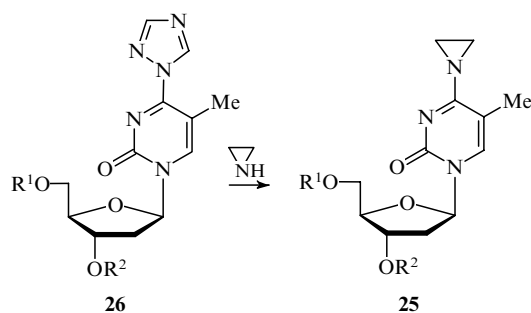
Описан^{97–99} синтез серии олигонуклеотидов, содержащих *N*⁴,*N*⁴-этан-5-метилдезокситидин **25**. Олигонуклеотид **25** способен реагировать с нуклеотидом из комплементарной цепи ДНК, расположенным в противоположной позиции по отношению к остатку *N*⁴,*N*⁴-этан-5-метилдезокситидина. Олигонуклеотид **25** с остатком *N*⁴,*N*⁴-этан-5-метилдезокситидина вступает в реакцию непосредственно после гибридизации с комплементарным олигонуклеотидом-мишенью в мягких условиях и без обработки какими-либо активирующими реагентами.⁹⁷ Авторы⁹⁷ называют данный метод «алкилирование, фиксирующее гибридизацию».



$R^1 - R^3$ — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

Для синтеза олигонуклеотидов типа **25** использовали амидофосфитное производное 5-метилдезокситидина, содержащее остаток триазола в положении N(4). Показана стабильность олигонуклеотидов **26**, содержащих такой остаток, в условиях амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов.

Обработка этиленмином олигонуклеотида **26** превращает его в олигонуклеотид **25** с количественным выходом.⁹⁷ Это позволяет вводить в олигонуклеотид активную кислотолабильную группу после всех стадий обработки кислотой, необходимых для удаления диметокситрильной группы в процессе олигонуклеотидного синтеза.



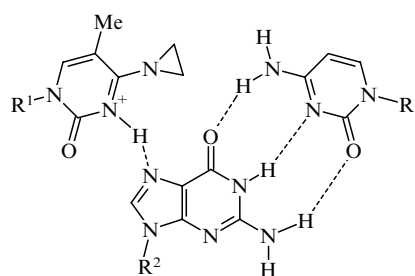
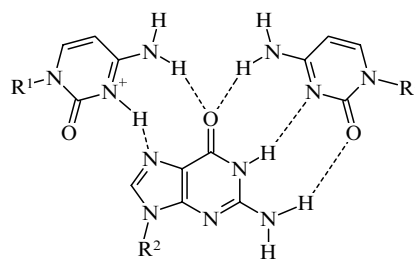
R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

*N*⁴,*N*⁴-Этан-5-метилдезокситидин нестабилен в условиях стандартной обработки олигонуклеотидов аммиаком (5 ч, 55°C, NH_4OH конц.). В связи с этим для защиты экзотических аминогрупп нуклеозидов использовали 9-флуоренилметилоксикарбонильную (ФМОК) группу, которая удаляется быстрее и в более мягких условиях β-элиминирования, чем применяемая обычно бензоильная защитная группа.⁹⁷ Были синтезированы ФМОК-защищенные амидофосфиты дезоксиаденозина и дезокситидина. Для дезоксигуанозина не удалось получить ФМОК-производное с достаточным выходом. Были подобраны условия удаления защитных групп, позволяющие сохранить этиленминовый цикл соединения **25**.

Реакция с олигонуклеотидом-матрицей протекает в течение нескольких дней; период полупревращения составляет около 30 ч при 24°C.⁹⁸ Эффективность реакции между цепями существенно зависит от природы нуклеотида, вступающего в реакцию с соединением **25**. Найдена следующая зависимость эффективности процесса от природы нуклеотида: $A \approx T \gg C \approx G$. В той или иной степени реакция протекает с каждым из четырех оснований. В некоторых случаях наблюдается образование одного побочного продукта реакции между цепями. Полагают,⁹⁸ что в этом случае реакция происходит не только с противоположным основанием другой цепи дуплекса, но и с одним из соседних. Температура плавления дуплексов с поперечно связанными цепями возрасла в среднем на 15°C (с 22 до 37°C для 21-звенного дуплекса АТ-богатого состава — 15 А·Т пар и 6 Г·С пар).

Основной недостаток данного метода связан с заменой амидофосфитов стандартных нуклеозидов на ФМОК-содержащие. ФМОК-группа слишком лабильна, поэтому выходы ФМОК-защищенных нуклеозидов низки; вместо дезоксигуанозина приходится применять дезоксиинозин. Кроме того, скорость реакции между цепями слишком мала (время полуреакции 30 ч) для того, чтобы использовать такие олигонуклеотиды, как ингибиторы экспрессии мРНК *in vitro*. С другой стороны, предложенный⁹⁷ способ образования связей между цепями лишен таких недостатков как необходимость активации алкилирующей функции и недостаточный уровень специфичности. Последний бывает связан, как правило, с чрезмерно высокой активностью алкилирующей группы.

Большинство известных методов получения дуплексов с ковалентно соединенными цепями заключается во взаимодействии олигодезоксирибонуклеотида, содержащего активную группу, с одноцепочечной ДНК. С другой стороны, существует возможность пришивки олигонуклеотида к двуцепочечной ДНК в составе тройной спирали (триплекса), сообщения о которой появились недавно.^{7,88,100–109} Так, предложен метод специфичной пришивки олигонуклеотидов к двуцепочечным ДНК в составе триплекса с использованием описанных выше олигонуклеотидов типа **25**, содержащих *N*⁴,*N*⁴-этан-5-метилдезокситидин (dC^e).¹⁰⁰ В данном случае узнавание осуществляется с помощью Хугстиновских пар; олигонуклеотид встраивается в большую бороздку ДНК-дуплекса-мишени. В тройке $\text{dC}^e \cdot \text{G} \cdot \text{C}$ электрофильная метиленовая группа *N*⁴,*N*⁴-этан-5-метилдезокситидина оказывается сближена с N(7)- и O(6)-нуклеофильными центрами дезоксигуанозина.

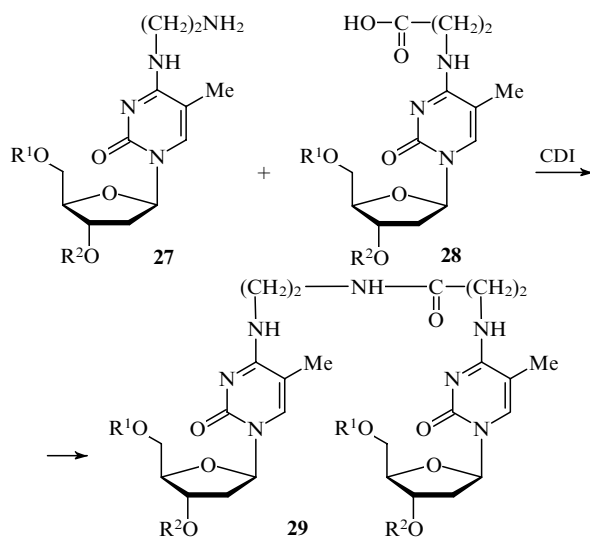


$R^1 - R^3$ — олигонуклеотиды.

Этиленминовый цикл взаимодействует с одним из гуаниновых оснований двойной спирали ДНК-мишени. Реакция между цепями протекает в физиологических условиях с выходом более 95% за 16 ч. Данный метод, по мнению авторов^{100,101}, может оказаться удобным для специфичного ингибирования транскрипции и репликации ДНК *in vivo* с помощью образования нерасплетаемого триплекса.

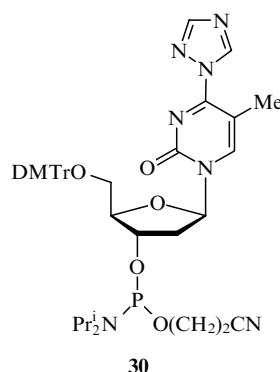
Как уже отмечалось, одна из основных проблем, связанных с введением новых функциональных групп в олигонуклеотид, заключается в том, что в процессе автоматического синтеза растущая цепочка ДНК подвергается воздействию кислот, оснований и электрофильных реагентов. Вводимая функциональная группа должна выдерживать эти обработки либо сама по себе, либо в заблокированном состоянии. В связи с тем, что N^4,N^4 -этан-5-метилдезокситидин чувствителен к нуклеофилам,¹⁰¹ его можно вводить только в олиготимидилаты, а не в олигонуклеотиды, содержащие нуклеозиды всех четырех типов, поскольку в случае олиготимидилатов не требуется аммиачная обработка после синтеза для удаления защитных групп. Это ограничивает возможные применения таких олигонуклеотидов в качестве субстратов, способных ковалентно связываться с ДНК-матрицей. Попытка применить ту же синтетическую схему для дезоксиаденозина была еще менее удачна.¹¹⁰ Оказалось, что N^6,N^6 -этан-5-метилдезокситидин является более слабым электрофилом, чем N^4,N^4 -этан-5-метилдезокситидин.

Оригинальная работа¹³ по получению олигонуклеотидных дуплексов с ковалентно связанными цепями также касается модификации гетероциклических оснований дезоксицитидинов. Предложены два подхода к конструированию ДНК-дуплексов, содержащих связи между олигонуклеотидами в заданных положениях двойной спирали. Первый подход предполагает образование амидной связи между находящимися в противоположных цепях амино- и карбоксильной группами модифицированных оснований, а второй — образование ковалентного «мостика» в виде основания Шиффа между двумя аминогруппами с помощью диальдегидов алифатического ряда. В состав самокомплементарного олигонуклеотида 5'-d(TAATGCATTA) вместо дезоксицитидина вводили производное 5-метилдезокситидина **27**, содержащее алифатическую аминогруппу (олигонуклеотид $10''$), или **28** с карбоксильной группой (10^c). Эти функциональные группы были локализованы на конце спейсера, связанного с экзоциклическим атомом азота 5-метилдезокситидина. При образовании ДНК-дуплекса **29** карбоксильная и аминогруппы оказывались сближенными, что позволяло провести реакцию с образованием амидной связи между цепями.



R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидов.
CDI = $\text{EtN}=\text{C}=\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NMe}_2 \cdot \text{HCl}$.

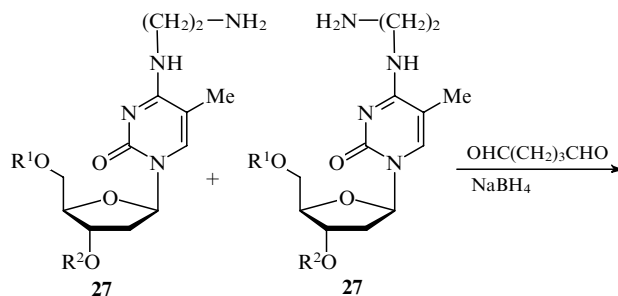
Синтез общего для **27** и **28** самокомплементарного олигонуклеотида-предшественника 5'-d(TAATGC*ATTA), где C* — N(4)-триазольный остаток, был проведен амидофосфитным методом; в реакцию вводили триазольное производное тимидина **30**.

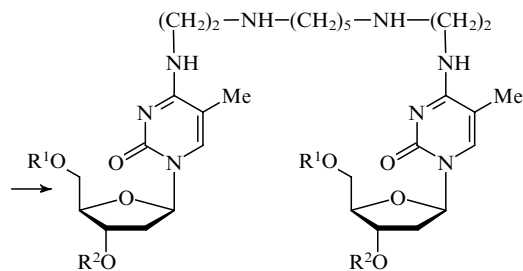


После завершения синтеза полимер с иммобилизованным олигонуклеотидом делили на две равные части. Одну из них обрабатывали этилендиамином, получая **27**, а вторую — β -аминопропионовой кислотой, получая **28**. Реакцию между цепями проводили с использованием водорастворимого КДИ в качестве конденсирующего агента при 0°C , что благоприятствовало образованию двуспирального комплекса.

Следует отметить, что в данной системе принципиально возможно образование трех видов олигонуклеотидных дуплексов: $(10''):(10^c)$, $(10''):(10'')$, $(10^c):(10^c)$, поскольку исходный олигонуклеотид самокомплементарен. Оказалось, что наиболее прочным является комплекс $(10''):(10'')$, предположительно за счет электростатических контактов аминогрупп с фосфатными группами противоположных цепей. Низкий выход целевого продукта, который получается из комплекса $(10''):(10^c)$, объясняется преобладанием в растворе комплекса $(10''):(10'')$. Оптимальные значения pH для этой реакции лежат в интервале 5.5–6.0. Отклонение от этих значений приводит к увеличению количества побочных продуктов в результате модификации гетероциклических оснований карбодимидом. Кроме того, наблюдался побочный процесс образования аддукта олигонуклеотида (10^c) с карбодимидом по карбоксильной группе.

При другом подходе реакцию между цепями дуплекса 5'-d(TAATGC*ATTA)/3'-d(ATTAC*GTAAT)–($10''$):($10''$) проводили с использованием глутарового альдегида. Образующееся первоначально основание Шиффа восстанавливают боргидридом натрия до устойчивого вторичного амина. Выход целевого дуплекса с ковалентно соединенными цепями удалось довести до 20%.



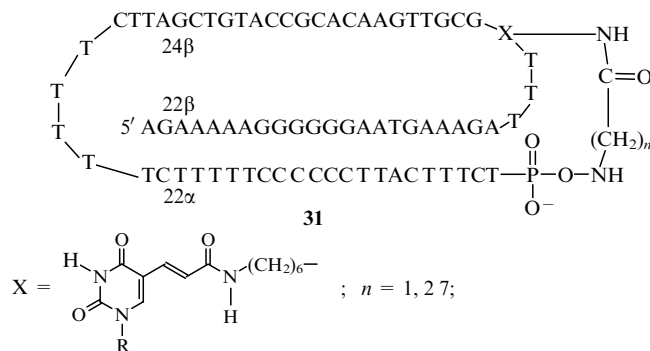


R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидов.

Невысокий выход может быть объяснен несколькими причинами. Во-первых, кроме введенных алифатических аминогрупп, в олигонуклеотидах имеются и другие реакционные центры, способные взаимодействовать с глутаровым альдегидом (например, экзоциклические атомы азота гетероциклических оснований). Во-вторых, трудно подобрать условия, в которых две алифатические аминогруппы модифицированного дуплекса реагировали бы с одной и той же молекулой глутарового альдегида, поскольку реакцию проводят в условиях избытка альдегида. В-третьих, оптимальное взаимное расположение реагирующих аминогрупп скорее всего не было достигнуто, так как они находились в соседних парах оснований. В настоящее время обязательно проводить предварительное молекулярное моделирование оптимального взаиморасположения реагирующих групп в реакционном центре.

В работе¹³ продемонстрирована возможность использования олигонуклеотидов, содержащих алифатическую амино- и карбоксильную группы, для получения ДНК-дуплексов с амидной связью между тяжами. Следует отметить, что исходно дизайн системы был проведен таким образом, чтобы иметь возможность полимеризации дуплекса с ковалентно связанными цепями под действием ДНК-лигазы. При этом образуется ДНК-подобный полимер, содержащий повторяющуюся консенсусную последовательность Прибоу, которая является основным участком связывания РНК-полимеразы в процессе инициации транскрипции. Этот процесс предусматривает расплетание двойной спирали ДНК с образованием открытого комплекса. Поскольку наличие поперечных связей между цепями ДНК препятствует расплутанию, предложенные соединения могут послужить инструментами для изучения процесса инициации транскрипции и, возможно, активного воздействия на него.

Авторы работы¹¹¹ синтезировали оригинальное олигонуклеотидное производное **31** с ковалентно связанными цепями. Соединение обладает «улиткоподобной» структурой и представляет собой химерный олигонуклеотид, содержащий кластер из α -нуклеотидов. α -Олигонуклеотид и β -олигонуклеотид образуют, в отличие от обычной ДНК, параллельный дуплекс, что позволяет такому химерному олигонуклеотиду существовать в виде внутримолекулярного дуплекса. Связь в нем образована между аминогруппой, локализованной с помощью спейсера на одном из остатков тимидина в одноцепочечном участке, и 3'-концевым фосфатом α -фрагмента. Как и предполагали,¹¹¹ непосредственно между данными группами реакция не протекает по стерическим соображениям. В связи с этим к концевому фосфату α -фрагмента присоединяли аминокислоту $H_2N-(CH_2)_n-COOH$, где $n = 1, 2, 7$. Она взаимодействовала с фосфатной группой в виде активного N -гидроксibenзотриазолового эфира. Далее проводили реакцию между введенными карбоксильной и аминогруппами, используя водорастворимый КДИ в качестве конденсирующего агента.

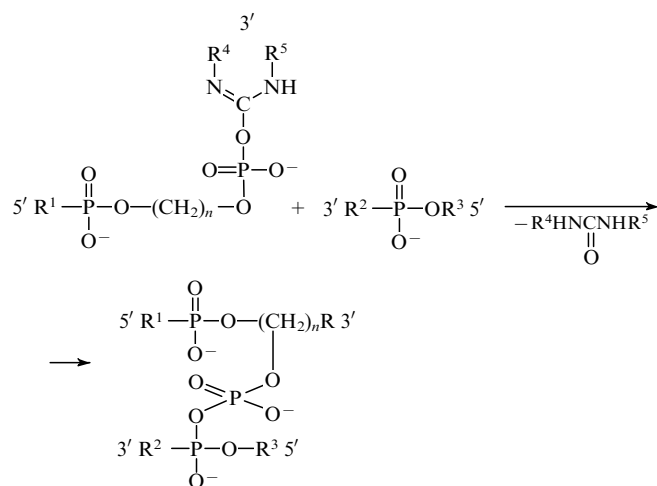


R — остаток дезоксирибозы.

Благодаря наличию в структуре соединения **31** связи между цепями оно обладает очень высокой устойчивостью к нуклеазной деградации. Показано, что фермент РНКазы Н расщепляет олигорибонуклеотид в химерном дуплексе, образованном с участием полученного соединения. Работа¹¹¹ является примером того, как с помощью сшивки олигонуклеотидных цепей можно придать соединению полезные свойства. По мнению авторов,¹¹¹ олигонуклеотидное производное **31** можно будет эффективно использовать для регуляции экспрессии РНК.

В работе⁹⁶ разработан метод синтеза ДНК-дуплексов, цепи которых связаны через замещенную пирофосфатную группировку (схема 7). Реакция протекает между активированной концевой фосфатной группой, связанной с олигонуклеотидом через спейсерную группу, и пространственно сближенной с ней межузлеотидной фосфатной группой комплементарного олигонуклеотида. Активацию концевой фосфатной группы осуществляли с помощью водорастворимого КДИ.

Схема 7

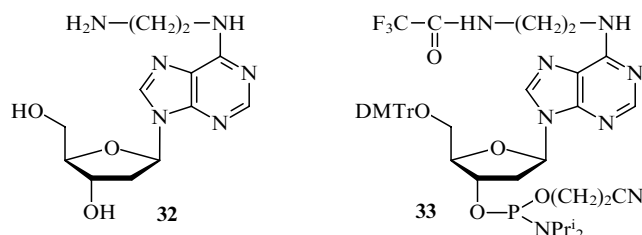


R^1-R^3 — фрагменты олигонуклеотидов; $n = 3, 4, 7, 12$.

ДНК-дуплексы, содержащие в одной из цепей тризамещенную пирофосфатную межузлеотидную группировку, устойчивы в водных буферных растворах в диапазоне pH 6.0–8.75 в отсутствие сильных нуклеофилов. В то же время они легко избирательно расщепляются по ней под действием таких нуклеофильных агентов как N -метилимидазол, амины и некоторые аминокислоты. В данном случае реакция нуклеофильного замещения затрагивает обе фосфатные группы тризамещенной пирофосфатной группировки с разрывом

связи между цепями и переносом одного из остатков дуплекса на нуклеофил.⁹⁶ В отличие от ДНК-дуплексов, содержащих в одной из цепей дизамещенную пирофосфатную межнуклеотидную группировку, реакция нуклеофильного замещения у атома фосфора в ДНК-дуплексах, содержащих тризамещенную пирофосфатную межнуклеотидную группировку между цепями, может протекать с участием как дизамещенной, так и тризамещенной фосфатных групп с образованием сложной смеси олигонуклеотидов — продуктов распада дуплекса с ковалентно связанными цепями. Эти ДНК-дуплексы, очевидно, будут нестабильны в клеточных культурах. Таким образом, этот метод позволяет получать ДНК-дуплексы, содержащие реакционноспособную группировку между цепями. Интерес к получению таких соединений объясняется возможностью их использования для связывания с белками.

Предложен метод получения дуплексов с ковалентно связанными цепями за счет взаимодействия остатков дезоксиаденозинов.¹¹² Используют амидофосфитное производное **33** *N*⁶-(2-аминоэтил)дезоксиаденозина (**32**), которое можно ввести в олигонуклеотид направленно в любое заданное положение. *N*⁶-(2-Аминоэтил)дезоксиаденозин **32** был получен действием этилендиамина на 6-ноддезоксиаденозин с последующей обработкой продукта реакции *S*-этилтрифтороацетатом. Отмечается, что трифторацетильная защита идеальна для введенной алифатической аминокислоты.



В работе¹¹² синтезировали динуклеозидмонофосфат, содержащий модифицированный по положению *N*⁶ дезоксиаденозин **32**, несущий алифатическую аминогруппу. Синтез проводили амидофосфитным методом в растворе; выход составил 95%. Несмотря на то что в этой работе олигонуклеотиды не синтезировали, она является модельным исследованием по введению в олигонуклеотиды соединения **33** как потенциального агента для образования связей между цепями.

Показано,¹¹² что при использовании в олигонуклеотидном синтезе амидофосфитного производного **33** не происходит каких-либо побочных реакций. Однако неясно, сколь эффективна будет данная модификация для получения дуплексов с ковалентно связанными цепями. Реакцию между цепями предложено¹¹² осуществлять следующим образом: алифатическая аминогруппа после гибридизации с матрицей должна быть локализована вблизи пиримидинового основания комплементарной цепи. Взаимодействие этого основания с бисульфит-ионом по положениям 5 и 6 облегчает последующую нуклеофильную атаку положения 4. В качестве нуклеофила выступает алифатическая аминогруппа *N*⁶-(2-аминоэтил)дезоксиаденозина **32**. Такой метод образования связи между цепями не должен вносить существенных искажений в структуру двойной спирали. Недостатком является неприменимость данного подхода для пришивки олигонуклеотида к протяженной ДНК, так как дезоксицитидин в одноцепочечных участках может под действием бисульфит-иона претерпевать побочное превращение в 2'-дезоксипуридин, что нежелательно.

VII. Использование сульфгидрильных производных для получения НК-дуплексов с ковалентно связанными цепями

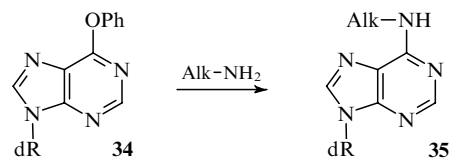
В последние годы олигонуклеотиды, содержащие группы SH, получили большое распространение. Они позволяют синтезировать не только олигонуклеотидные производные различной природы, но и ДНК-дуплексы с ковалентно связанными цепями в заданных положениях двойной спирали. Распространенным методом получения таких олигонуклеотидов является так называемый метод «превращаемого нуклеотида».¹¹³ Суть метода заключается в том, что в процессе синтеза в олигонуклеотид вместо необходимого модифицированного нуклеотида с группой SH вводится его предшественник, несущий какую-либо иную группу, как правило, более устойчивую к синтетическим и постсинтетическим обработкам олигонуклеотида. В дальнейшем, иногда даже после гибридизации с матрицей, предшественник превращается в целевой нуклеотид с группой SH, которая принимает участие в реакции между цепями.

Эта стратегия представляется перспективной. Она позволяет из одного и того же олигонуклеотида-предшественника получать множество модифицированных олигонуклеотидов различной природы благодаря тому, что введение линкера с функциональной группой осуществляют после окончания олигонуклеотидного синтеза. При таком подходе для изменения длины линкера или природы функциональной группы не нужно синтезировать новый исходный мономер, а также новый модифицированный олигонуклеотид. Преимуществом является также то, что постсинтетически к таким олигонуклеотидным производным можно присоединять лиганды (олигопептиды и др.), которые не способны выдерживать обработки, применяемой в ходе олигонуклеотидного синтеза.

Особенностью метода является то, что используемый мономер содержит уходящую группу, подвергшуюся нуклеофильному замещению. При использовании бифункционального нуклеофила образуются активные олигонуклеотидные производные. При этом бифункциональный нуклеотид одновременно является линкером.

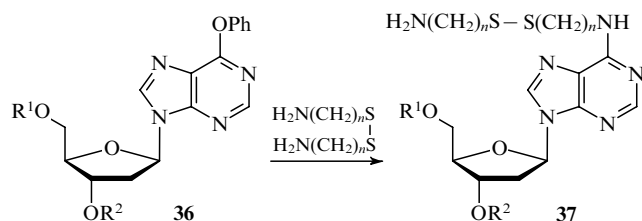
Для достижения максимальной эффективности метода следует соблюдать ряд условий.¹¹³ Превращаемый нуклеотид должен быть стабилен в условиях автоматического синтеза ДНК и достаточно быстро и полно превращаться в активное производное под действием нуклеофила. Введение линкера должно минимально искажать структуру двойной спирали ДНК. Как правило, введение линкера не должно затрагивать концевые звенья олигонуклеотида для того, чтобы сохранить возможность проведения по ним в дальнейшем ферментативных реакций (например, радиоактивное мечение, достройку олигонуклеотида или его включение в плазмиду).

В работе¹¹³ применяли «превращение» дезоксиинозина в модифицированный дезоксиаденозин. Ранее теми же авторами¹¹⁴ было показано, что *O*⁶-фенилдезоксиинозин **34** при аминолизе алкиламинами количественно переходит в *N*⁶-алкилдезоксиаденозин **35**.



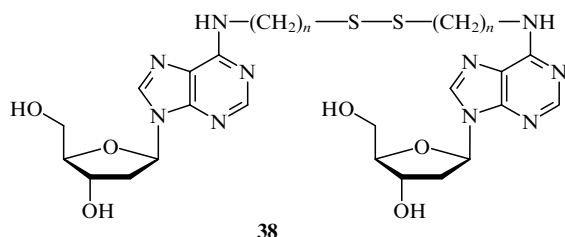
dR — остаток 2'-дезоксирибозы.

Был получен 3'-амидофосфит *O*⁶-фенилдезоксиинозина, который вводили в автоматический синтез и получали олигонуклеотид 5'-d(GCGAI*TTTCGC) **36**, где I* — остаток нуклеозида **34**. После окончания синтеза и выделения олигонуклеотид **36** обрабатывали бис(2-аминоэтил)дисульфидом или бис(2-аминопропил)дисульфидом, что приводило к соединению **37**.



R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной цепи; $n = 2, 3$.

Полученный олигонуклеотид **37** самокомплементарен и образует дуплекс, в котором модифицированные звенья находятся в соседних парах оснований. Обработка дуплекса дитиотреитолом превращала дисульфид в тиол; далее окислением кислородом воздуха замыкали дисульфидную связь между цепями. Такое связывание является обратимым: новая обработка дуплекса дитиотреитолом приводит к разрыву связи между цепями. Показано,¹¹³ что в продуктах ферментативного гидролиза ДНК-дуплекса с ковалентно связанными цепями присутствует динуклеозид **38**, форма спирали ДНК-дуплекса соответствует В-форме ДНК, а модифицированные основания образуют обычные Уотсон-Криковские пары.



$n = 2, 3$.

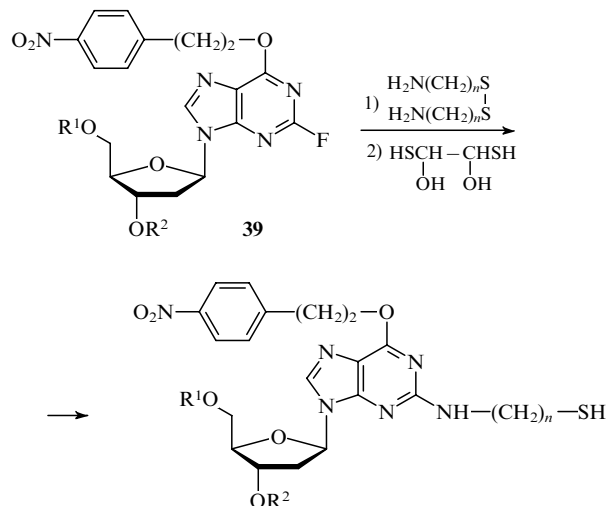
Компьютерное моделирование показало, что линкер располагается в большой бороздке ДНК и не вызывает существенных искажений пространственной структуры дуплекса. Исходный дуплекс и дуплекс с ковалентно связанными цепями имеют одинаковые профили кривых плавления. Это указывает на то, что связь между цепями сама по себе не вносит искажений в структуру дуплекса. При этом температура плавления дуплекса с ковалентно связанными цепями (75°C) в 1 M NaCl оказалась на 18°C выше, чем для исходного дуплекса, а в 0.1M NaCl — на 30°C выше.

Таким образом, метод образования дисульфидной связи между цепями имеет ряд преимуществ. Во-первых, происходит существенное упрочнение ДНК-дуплекса. Во-вторых, отсутствуют серьезные искажения в структуре ДНК. ДНК-дуплексы с цепями, соединенными дисульфидными связями, можно использовать для изучения процессов, включающих расплетание ДНК ферментами, таких как транскрипция, репликация и рекомбинация.

Описан и другой способ¹⁴ получения ДНК-дуплекса с ковалентно связанными цепями методом «превращаемого нуклеозида». В процессе олигонуклеотидного синтеза *O*⁶-[2-(4-нитрофенил)этил]-2-фтордезоксиинозин, синтез которого описан в работах^{115, 116}, был направленно введен в самокомплементарный 18-звенный олигонуклеотид **39**. Обработка этого олигонуклеотида обсуждавшимися выше диаминодисульфидами (схема 8) или (2-метилтиоэтил)амином приводила к замещению атома фтора на *N*-алкилдисульфид либо (2-метилтиоэтил)аминогруппу.¹⁴

После обработки дитиотреитолом проводили реакцию между цепями под действием кислорода воздуха. Наличие связи между цепями ДНК-дуплекса доказывали сопоставлением значения температуры плавления дуплекса с ковалентно связанными цепями с данными по способности таких связей энтропийно стабилизировать ДНК.¹¹⁷

Схема 8



R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной цепи; $n = 2, 3$.

Температура плавления дуплекса с цепями, соединенными бис(2-аминоэтил)дисульфидным линкером, была ниже, чем дуплекса с бис(2-аминопропил)дисульфидным линкером. По-видимому, более короткий линкер вносит большее торсионное напряжение в структуру ДНК. Сравнение с олигонуклеотидным дуплексом, содержащим (2-метилтиоэтил)аминогруппы, показало, что такая модификация сама по себе оказывает незначительное влияние на температуру плавления дуплекса.¹⁴

Полученные таким образом ДНК-дуплексы с ковалентно связанными цепями применяли для изучения метилирования ДНК. Этот процесс играет важную роль в развитии млекопитающих и в устойчивости бактерий к вирусным инфекциям.¹⁴ Посредником переноса метильной группы от *S*-аденозил-*L*-метионина на цитозин является ДНК-5-цитозин-метилтрансфераза (ЦМТаза). Фермент узнает симметричный участок ДНК 5'-d(GGCC)/3'-d(CCGG) и переносит метильную группу на внутренний остаток дезоксицитидина каждой цепи. Было сделано предположение,¹⁴ что если участок метилирования при переносе метильной группы во время каталитического акта будет содержать связь между цепями, то расплетание цепей, как элемент механизма действия фермента, будет существенно затруднено.

Оказалось, что фермент действительно индуцирует искажение двойной спирали. Для оценки эффекта связи между цепями на узнавание участка метилирования ферментом были проведены пробы равновесного связывания в некаталитических условиях. Было показано, что дуплекс с дитиогексаметиленовым мостиком между цепями связывается с ферментом так же хорошо, как немодифицированный дуплекс, а дуплекс с дитиотетраметиленовым мостиком — в 43 раза слабее. Таким образом, наличие тяжа между цепями не сказывается на процессе связывания фермента с ДНК (по крайней мере, в случае более длинного линкера). Более того, в последнем случае наличие тяжа между цепями аллостерически активирует связывание белка. Скорее всего, это обусловлено тем, что наличие тяжа индуцирует определенное торсионное напряжение, которое понижает термодинамический барьер расплетания ДНК. Однако метилирование, в отличие от связывания, протекает значительно медленнее по сравнению с природным дуплексом. Тем не менее в

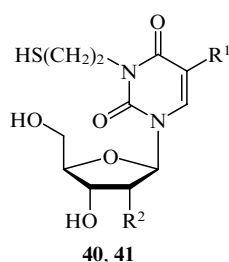
условиях субстратного насыщения оба дуплекса с ковалентно связанными цепями являются субстратами для ЦМТазы и степень их метилирования составляет 10% по сравнению с немодифицированным дуплексом. Данная работа иллюстрирует возможность использования ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями для исследования механизмов действия ДНК-узнающих ферментов.

Теми же авторами¹⁴ было проведено компьютерное моделирование пространственного строения ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями. Полученные данные были сопоставимы с результатами рентгеноструктурного анализа.¹¹⁸ Методами молекулярной динамики было изучено влияние связи между цепями на вторичную структуру ДНК. Это дало возможность оценить степень нарушений, вносимых поперечной связью в структуру дуплекса, а также ее влияние на динамическое поведение ДНК. Была изучена пространственная структура самокомплементарного 10-звенного олигонуклеотида 5'-d(GCGAATTCGC) в виде дуплекса и двух модифицированных дуплексов той же первичной структуры, связанных дисульфидными связями между цепями через экзоциклические атомы азота остатков дезоксиаденозина в центральной А·Т-паре. Длина линкера (не считая атомов азота) составила шесть или восемь атомов (дитиотетраметиленовый или дитиогексаметиленовый линкер соответственно).

Показано,¹¹⁸ что для всех изученных ДНК-дуплексов сохраняется как каноническая В-форма ДНК, так и Уотсон–Криковский тип спаривания оснований. Параметры спирали дуплексов с ковалентно связанными цепями, параметры большой и малой бороздок, торсионные углы связей углеводо-фосфатного остова и параметры пар оснований также в основном аналогичны соответствующим параметрам для кристаллической структуры немодифицированного дуплекса. Наличие связей между цепями все же вносит некоторые возмущения в геометрию двойной спирали. Найденные отклонения незначительны: не более 1.2 Å от канонической В-формы ДНК и не более 1.3 Å от полученных параметров для кристалла немодифицированного дуплекса. Изменения более существенны в случае более короткого связующего линкера между цепями. Динамические свойства дуплексов с ковалентно связанными цепями и немодифицированного дуплекса также похожи. Некоторые различия проявляются в непосредственной близости к участку связи между цепями и наиболее выражены для дуплекса с более коротким линкером. Структурные искажения, имеющие общий характер независимо от длины линкера, выражаются в появлении общего уменьшения подвижности в районе связи между цепями.

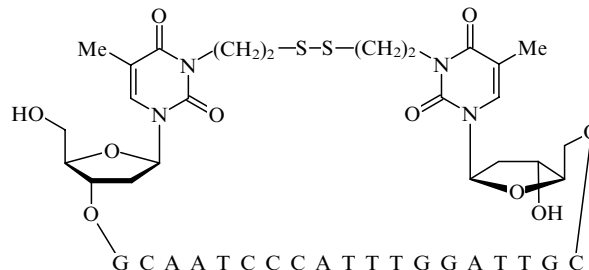
Таким образом, изменения структурных параметров в основном обусловлены модификацией аминогрупп дезоксиаденозинов, а не наличием поперечной связи между цепями. В целом наличие связи между цепями вносит слабые изменения в структуру дуплекса. Это, по мнению авторов¹¹⁸, позволит использовать дуплексы с ковалентно связанными цепями для изучения белков, взаимодействующих с НК.

Предложен еще один оригинальный метод¹¹⁹ получения ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями на основе тиопроизводных. В олигодезоксирибонуклеотид вводили два остатка N³-(2-тиоэтил)тимидина (**40**) или в олигорибонуклеотид — два остатка N³-(2-тиоэтил)уридина (**41**).



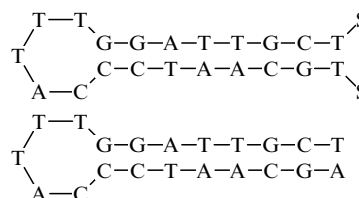
40: R¹ = Me, R² = H;
41: R¹ = H, R² = OH.

Амидофосфитное производное соединения **40** в процессе автоматического синтеза вводили по 5'- и 3'-концам олигодезоксирибонуклеотида. Дисульфидную связь между цепями замыкали окислением тиогрупп кислородом воздуха. Структура связи между цепями на конце шпильки, образованной с участием двух остатков соединения **40**, приведена ниже.



Структуры полученной ковалентно замкнутой шпильки и ее природного аналога приведены на схеме 9. Конформационное строение шпилек было изучено методом ЯМР-спектроскопии. Оказалось, что в обеих шпильках 8-звенный двуцепочечный участок находится в канонической В-форме, причем обе шпильки оказались полностью структурно изоморфны.

Схема 9

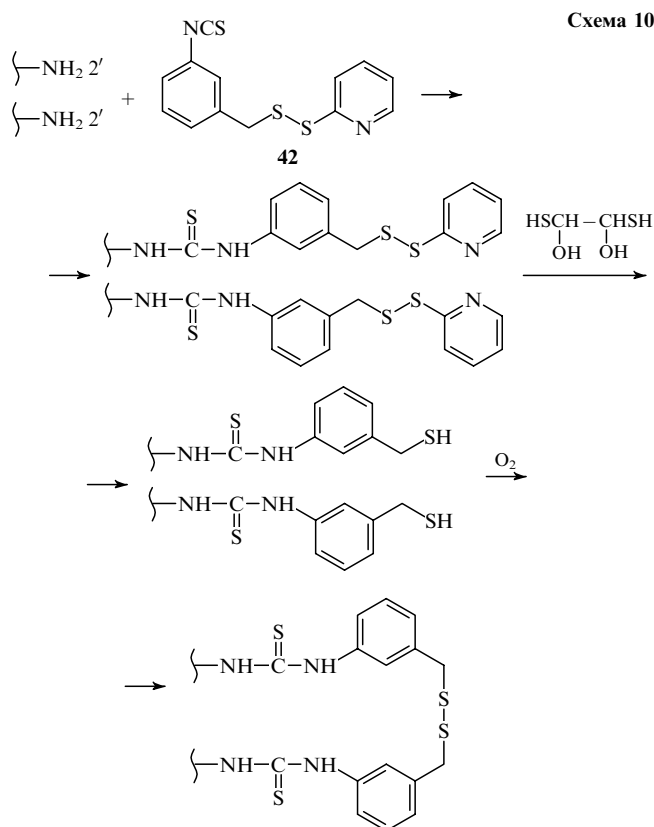


В данном случае наличие связи между цепями не влияет на пространственную структуру шпильки и не нарушает нативную В-конформацию двойной спирали. Отметим, что хотя в этой работе была получена связь на конце ДНК-дуплекса, использованный модифицированный нуклеозид можно ввести в олигонуклеотид направленно в любое заданное положение. Это позволяет применять данный метод для получения набора различных олигонуклеотидных дуплексов с ковалентно соединенными цепями.

Таким образом, метод получения дуплексов с ковалентно связанными цепями на основе сульфидрильных производных обладает рядом преимуществ по сравнению с использованием алкилирующих агентов, применение которых, как правило, не позволяет достичь сиквенс-специфичного связывания цепей. Последнее обстоятельство ограничивает их применение для инженерии межцепочечных связей.

В работе¹⁷ дисульфидным методом связывали между собой фрагменты цепи РНК рибозима. Реакцию проводили между пространственно сближенными, но не комплементарными участками цепи РНК. Таким образом, хотя в этой работе речь идет не об образовании связей между цепями РНК в составе дуплекса, метод столь изыскан, что на его описании нельзя не остановиться. Авторы¹⁷ использовали модификацию положений 2' определенных сахарных остатков. Были синтезированы олигорибонуклеотиды с включениями 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеотидов. Синтез самих 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеотидов описан в работах^{120–126}.

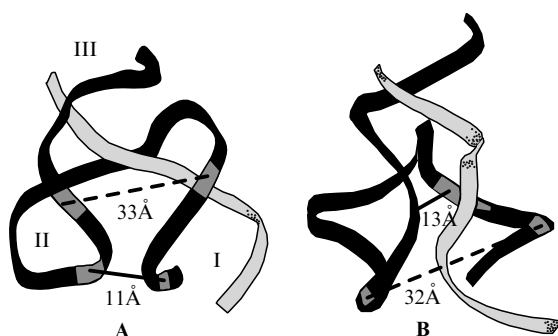
Для введения сульфидрильных групп олигорибонуклеотиды обрабатывали бифункциональным агентом **42** (схема 10), содержащим изотиоцианатную и блокированную сульфидрильную группу. Показано,¹⁷ что соединение **42** селективно взаимодействует с 2'-аминогруппами модифицированных рибонуклеотидов.



Реакцию между цепями инициировали дитиотреитолом, под действием которого происходит удаление блокирующей группировки с сульфгидрильной группы. Это позволяет в присутствии кислорода воздуха провести реакцию между двумя остатками агента **42**, присоединенными к рибозиму (схема 10). Наличие связи между цепями подтверждали ограниченным щелочным гидролизом. Одно расщепление цепи рибозима на участке между модифицированными звеньями давало единственный продукт с тем же молекулярным весом, что и исходный рибозим.

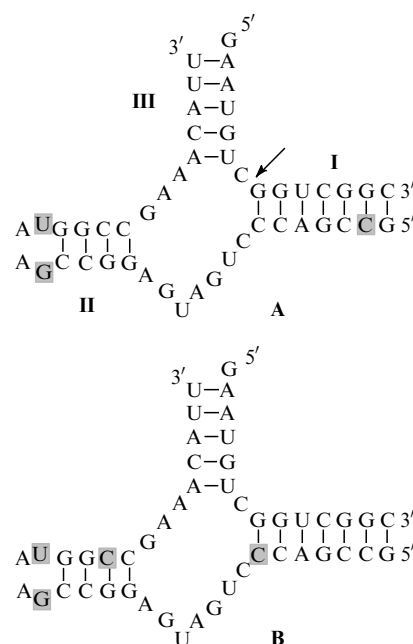
Рибозимы с ковалентно связанными цепями, полученные по описанной выше процедуре, были использованы для изучения третичной структуры рибозима при выяснении каталитического механизма расщепления РНК. Полученные ранее методом рентгеновской кристаллографии (А, схема 11) и методом флуоресценции (В, схема 11) параметры третичной структуры рибозима различались между собой. При этом обе возможные структуры имели одинаковую общую геометрию. Различие заключалось в ориентации двух спиральных участков РНК друг относительно друга (спирали I и II, схема 11). Для сравнения этих двух пространственных моделей рибозима и выбора той, которая соответствует реальной биологически активной структуре, были использованы синтетические рибозимы с ковалентно связанными цепями.

Схема 11



Авторам¹⁷ удалось зафиксировать пространственную структуру рибозима в соответствии с каждой из двух возможных моделей. После гибридизации модифицированных рибозимов с нерасщепляемым аналогом субстрата, содержащим в реакционном центре дезоксинуклеозид, была проведена 30-часовая обработка реакционных смесей кислородом. Это позволило с высокой эффективностью провести реакцию между цепями независимо от локализации модифицированных звеньев в структуре рибозимов (схема 12). После всех стадий очистки выход рибозимов с ковалентно соединенными цепями достигал 15%.

Схема 12



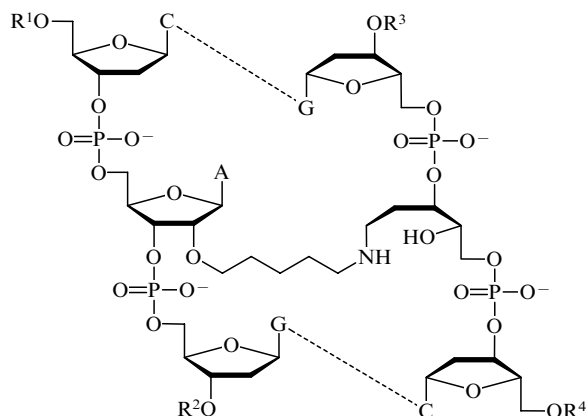
Связи между цепями фиксировали пространственную структуру рибозима в соответствии с заданной, что дало возможность измерить каталитическую активность двух синтетических рибозимов с различной пространственной структурой. Как и ожидалось, каталитическая активность рибозима зависит от локализации связи между цепями. Связь между близко расположенными участками спиралей в соответствии с рентгеновской моделью (А, схемы 11 и 12) практически не оказывала влияния на каталитическую активность рибозима. С другой стороны, связь между нуклеотидами, расположенными рядом в соответствии с другой моделью (В, схемы 11 и 12), уменьшала скорость расщепления рибозимом соответствующего субстрата на три порядка. На этом основании был сделан вывод о том, что правильной является рентгеновская модель. Авторы¹⁷ отмечают, что применявшиеся ранее методы изучения третичной структуры РНК не могли быть использованы для решения поставленной задачи. Результаты работы¹⁷ послужили основой для дальнейших исследований рибозимов.¹²⁷

VIII. Синтез НК-дуплексов с ковалентно связанными цепями с использованием углеводных остатков нуклеозидов

В отличие от работ, посвященных модификации гетероциклических оснований и фосфатных групп олигонуклеотида, сообщения о реакциях между цепями, затрагивающих углеводные остатки олигонуклеотида, немногочисленны.

В работе¹⁵ предложен метод получения дуплекса с ковалентно связанными цепями за счет связи между аминогруппой, присоединенной с помощью линкера к положению 2 сахарного остатка аденозина, и альдегидной группой, лока-

лизированной на ненуклеозидной вставке в комплементарной цепи. Этот метод запатентован также в работе ¹⁶.



$R^1 - R^4$ — фрагменты олигонуклеотидных цепей.

В данном случае альдегидная группа образуется при ферментативном элиминировании урацила урацил-ДНК-гликозилазой из предварительно введенного в состав олигонуклеотида 2'-дезоксисуридина. При элиминировании гетероциклического основания происходит раскрытие сахарного кольца с образованием альдегидной группы. При действии на последнюю первичного амина получают основание Шиффа, которое восстанавливают до устойчивого вторичного амина. Стадия ферментативной обработки не позволяет пока выйти на препаративный уровень синтеза таких соединений, что ограничивает их использование в качестве терапевтических средств.

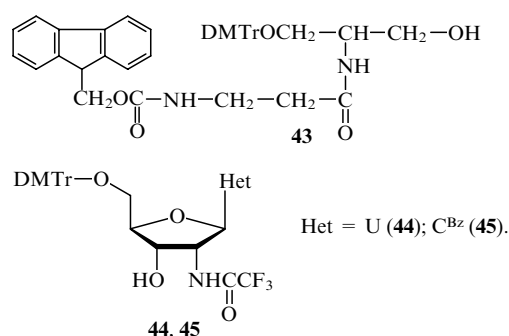
Как уже отмечалось, основным недостатком многих методов получения ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями является низкая специфичность. Именно специфичное связывание цепей ДНК позволяет создавать наиболее удобные инструменты для изучения белково-нуклеиновых взаимодействий. В связи с этим в последние годы большинство работ направлено на развитие методов сайт-специфичного связывания цепей в синтетических ДНК-дуплексах.

Работы ¹²⁸⁻¹³¹ посвящены разработке нового эффективного метода получения ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями, затрагивающего углеводные остатки нуклеозидов. Метод предусматривает получение модифицированных по углеводному фрагменту олигонуклеотидов, содержащих первичную алифатическую amino- или карбоксильную группу. Разработанные методики включения модифицированных звеньев в олигонуклеотиды позволяют вводить их в любые заранее заданные положения олигонуклеотидной цепи, а также встраивать несколько модифицированных звеньев в один и тот же олигонуклеотид при сохранении стандартных процедур амидофосфитного твердофазного олигонуклеотидного синтеза.

Реакция между первичной amino- и карбоксильной группами, выбранная для соединения цепей дуплекса между собой, активируется водорастворимым КДИ и приводит к образованию амидной связи между цепями (схема 13).

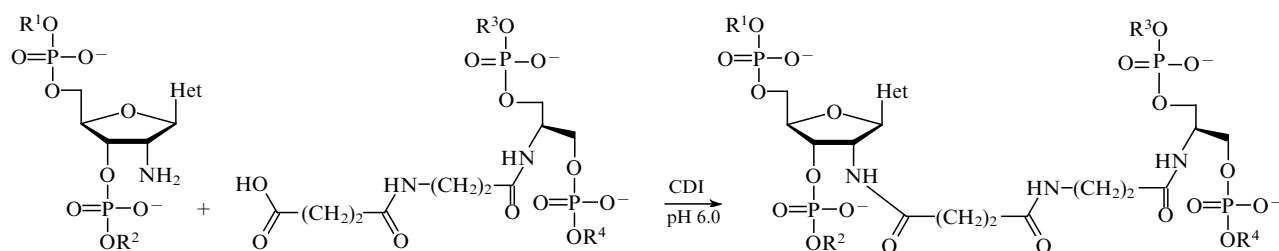
К началу 90-х годов были разработаны методы синтеза 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозидов. ¹²⁰⁻¹²⁶ Высокая реакционная способность 2'-аминогруппы 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозидов в реакциях ацилирования ¹²⁰⁻¹²² привела к идее создания связи между 2'-аминогруппой, локализованной в одной цепи, и карбоксильной группой, образующейся при ацилировании ангидридом дикарбоновой кислоты 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозида комплементарной цепи. Оказалось, однако, что метод получения пуриновых 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозидов, сопряженный с реакцией трангликозилирования (замещения гетероциклического основания) предварительно синтезированного 2'-амино-2'-дезоксисуридина, ^{123,124} неизбежно приводит к образованию сложной смеси веществ и к крайне низкому выходу целевого продукта.

В связи с этим вместо пуриновых 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозидов была применена ненуклеозидная вставка. С одной стороны, при этом происходит нарушение водородных связей в паре, где отсутствует одно из гетероциклических оснований. С другой стороны, использование такой замены нуклеозида дает ряд преимуществ. Соединение (43) можно синтезировать, используя совокупность простых химических реакций, протекающих с высокими выходами. ^{128,129} В структуре ненуклеозидной вставки сохранена дистанция в три углеродных атома между фосфатными группами, характерная для природных олигонуклеотидов. Данное соединение устойчиво в процессе синтетических и постсинтетических обработок олигонуклеотида.



В работах ^{120,121} описано получение соответствующим образом блокированных пиримидиновых 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозидов 44, 45. Для осуществления реакции между тяжами модифицированного дуплекса вначале в одну из цепей вводили карбоксильную группу путем ацилирования ангидридом дикарбоновой кислоты aminoгруппы, предварительно включенной в состав олигонуклеотида. На основании данных молекулярного моделирования в качестве ацилирующего агента был выбран янтарный ангидрид.

Схема 13



Het = U, C^{Bz}; $R^1 - R^4$ — фрагменты олигонуклеотидных цепей.

Реакцию между цепями осуществляли в морфолинэтилсульфонатном буферном растворе (рН 5.0–6.7) в течение 24–72 ч при 0°–20°С с использованием водорастворимого КДИ в качестве конденсирующего агента.

В работах^{128, 129} было показано, что реакция между тяжами модифицированных ДНК-дуплексов, одна из цепей которых содержит первичную алифатическую аминогруппу, а вторая — карбоксильную группу, протекает значительно эффективнее с участием свободной 2'-аминогруппы 2'-амино-2'-дезокситидина. Это было объяснено тем, что значение pK_a для нее (6.2¹²¹) намного ниже, чем pK_a аминогруппы алифатических аминов и в условиях реакции она в значительной степени остается в депротонированной форме.

Было изучено влияние на эффективность реакции между тяжёлыми факторами, как положение модифицированных звеньев друг относительно друга, их количество, нуклеотидное окружение, термодинамическая устойчивость дуплекса-предшественника и др.^{130, 131} В оптимальных условиях выход соответствующих ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями для отдельных систем достигал 85%.

Выход целевого продукта для 20-звенной и 25-звенной систем значительно различается (26% и 85% соответственно), что объясняется большей эффективностью реакции при более высокой температуре плавления исходного модифицированного дуплекса.

В зависимости от нуклеотидного окружения модифицированных звеньев выход целевого продукта колеблется от 50 до 85%.^{130, 131} Замена 2'-амино-2'-дезоксисуридина на 2'-амино-2'-дезоксипарабино-аденозин существенно не сказывается на выходе ДНК-дуплекса с ковалентно связанными цепями.

Термодинамическая устойчивость ДНК-дуплексов с включениями модифицированных звеньев во всех случаях ниже по сравнению с немодифицированными дуплексами соответствующей первичной структуры. Степень снижения температуры плавления зависит от длины и состава ДНК-дуплекса. Для дуплексов с ковалентно связанными цепями, напротив, наблюдали увеличение температуры плавления, которая оказалась выше температуры плавления как соответствующих модифицированных, так и немодифицированных дуплексов. Увеличение температуры плавления по сравнению с природными аналогами составило от 4 до 8°С, а с соответствующими модифицированными дуплексами — от 15 до 33°С.^{128, 129}

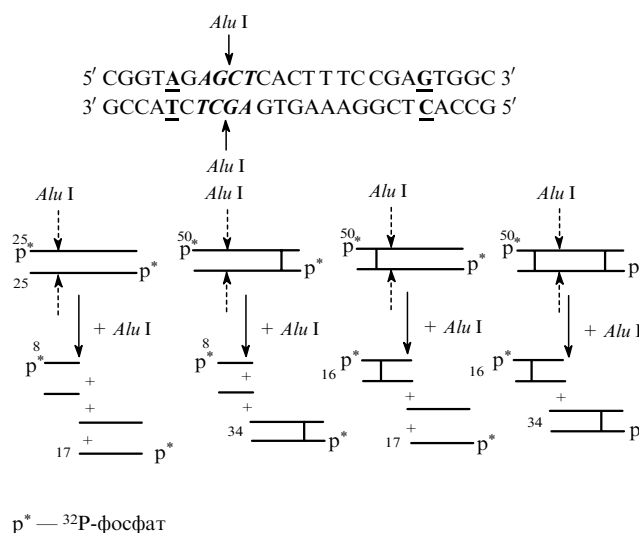
Дуплексы с ковалентно связанными цепями существенно устойчивее к действию смеси фосфодиэстеразы змеиного яда и щелочной фосфатазы по сравнению с дуплексами, не содержащими межцепочечных связей. В условиях, когда природные и модифицированные дуплексы полностью гидролизуются до нуклеозидов, дуплексы с ковалентно связанными цепями не менее чем на 70% сохраняются без изменения. Столь незначительная степень гидролиза в этих условиях вызвана наличием связи между цепями.

В работе¹³² было проведено сравнительное изучение кинетики реакции ферментативного гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда 25-звенного дуплекса с ковалентно-связанными цепями и немодифицированного дуплекса аналогичной первичной структуры. В выбранных условиях ферментативный гидролиз одноцепочечных олигонуклеотидов и немодифицированного дуплекса протекает с большой скоростью. Одноцепочечные олигонуклеотиды полностью гидролизуются до нуклеотидов уже за 5 мин, в то время как дуплексы с ковалентно-связанными цепями в тех же условиях не гидролизуются полностью даже за три часа. Наблюдается лишь сравнительно легкое отщепление двух–трех звеньев и накопление продуктов частичного гидролиза, укороченных не более чем на три–восемь звеньев. После отщепления восьми звеньев процесс заметно замедляется. Таким образом, наличие связи между цепями вызывает существенное торможение действия фосфодиэстеразы змеиного яда.

Авторами^{130, 131} для доказательства способности полученных соединений служить субстратами ферментов, связывающихся с уникальными нуклеотидными последовательностями ДНК, а также для подтверждения структуры синтезированных соединений был проведен эксперимент по сайт-специфичному расщеплению ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями эндонуклеазой рестрикции *Alu I*. Первичная структура ковалентно сшитых ДНК-дуплексов соответствовала 25-звенному немодифицированному ДНК-дуплексу, нуклеотидная последовательность которого приведена на схеме 14. Участок узнавания эндонуклеазы рестрикции выделен курсивом, места введения соответствующих модифицированных звеньев **43, 44** — чертой.

Положение связей между цепями относительно участка узнавания эндонуклеазы рестрикции *Alu* I в ДНК-дуплексах определяет состав гидролизата. Образование олигонуклеотидов — продуктов гидролиза различной длины при расщеплении ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями и немодифицированного дуплекса иллюстрируется схемой 14.

Схема 14



Состав реакционных смесей для всех ДНК-дуплексов соответствовал теоретической схеме 14. Таким образом, показано, что наличие связей между цепями в полученных ДНК-дуплексах не препятствует их расщеплению эндонуклеазой рестрикции *Alu I*. Образование набора продуктов определенной длины подтверждает наличие и положение связей между цепями в полученных ДНК-дуплексах.

Результаты работ^{128–131}, позволяющие сделать вывод о возможности использования ДНК-дуплексов предложенного строения с ковалентно связанными цепями в качестве эффективных «ловушек» белков, связывающихся с НК.

IX. Заключение

На основании данных, приведенных в настоящем обзоре, можно заключить, что в настоящее время существует набор эффективных методов получения ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями. Сшивание цепей ДНК может быть осуществлено как неспецифически (статистически), так и в заранее заданных положениях двойной спирали.

Благодаря разработанным методикам синтез таких соединений уже не представляется задачей повышенной сложности. ДНК-дуплексы с ковалентно связанными цепями становятся удобными инструментами для изучения процессов белково-нуклеиновых взаимодействий. Перспективность такого подхода со всей очевидностью вытекает из работ, представленных в обзоре.

Работа выполнена в рамках программы «Ведущие научные школы» (грант 96–15–97707).

Литература

- В.В.Власов, М.А.Грачев, О.И.Лаврик. *Аффинная модификация биополимеров*. (Под ред. Д.Г.Кнорре). Наука, Новосибирск, 1983
- Д.Г.Кнорре, В.Ф.Зарытова, А.Г.Бадашкева, О.С.Федорова. *Биотехнология*. Т.37. (*Итоги науки и техники*). (Под ред. З.А.Шабаровой). Изд-во ВИНТИ, Москва, 1991
- Н.И.Гринева. *Вестн. АМН СССР*, **2**, 83 (1981)
- P.B.Dervan. *Science*, **232**, 464 (1986)
- L.H.Hurley. *J. Med. Chem.*, **32**, 2027 (1989)
- Z.A.Shabarova. *Biochimie*, **70**, 1323 (1988)
- M.Takasugi, A.Guendouz, M.Chassignol, J.L.Decout, J.Lhomme, N.T.Thuong, C.Helene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5602 (1991)
- J.Goodchild. *Bioconjugate Chem.*, **1**, 165 (1990)
- B.S.Sproat, A.I.Lamond, B.Beijer, P.Neuner, U.Ryder. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 3373 (1989)
- И.А.Козлов, М.Г.Ивановская, Е.А.Кубарева, Е.М.Волков, З.А.Шабарова. *Молекуляр. биология*, **30**, 503 (1996)
- J.Piette, H.B.Gamper, A.Van de Vorst, J.E.Hearst. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 9961 (1988)
- B.L.Lee, K.R.Blake, P.S.Miller. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 10681 (1988)
- О.Н.Королева, Е.М.Волков, Т.С.Орецкая, З.А.Шабарова. *Биорг. химия*, **20**, 40 (1994)
- D.A.Erlanson, L.Chen, G.L.Verdine. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 12583 (1993)
- M.Manoharan, L.K.Johnson, P.D.Cook. In *International Conference of Nucleic Acids Medical Applications (Abstract of Reports)*, Mexico, 1993. P.1
- WO PCT 93 18052; *Chem. Abstr.*, **121**, 180122 (1994)
- S.Th.Sigurdsson, T.Tuschl, F.Eckstein. *RNA*, **1**, 575 (1995)
- R.B.Meyer, J.C.Tabone, G.D.Hurst, T.M.Smith, H.Gamper. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8517 (1989)
- А.М.Беликова, Н.И.Гринева. *Изв. СО АН СССР. Сер. хим.*, **3**, 79 (1966)
- Н.И.Гринева, Г.Г.Карпова, С.Д.Мызина, И.Фодор, А.А.Баев. *Докл. АН СССР*, **223**, 1477 (1975)
- N.I.Grineva, G.G.Karpova. *FEBS Lett.*, **32**, 351 (1973)
- N.I.Grineva, G.G.Karpova, L.M.Kuznetsova, T.V.Venkstern, A.A.Bayev. *Nucl. Acids Res.*, **5**, 1609 (1977)
- Н.И.Гринева, Г.Г.Карпова. *Молекуляр. биология*, **8**, 832 (1974)
- Л.З.Бенимечкая, Л.М.Герасимова, Н.И.Гринева, Г.Г.Карпова. *Молекуляр. биология*, **12**, 988 (1978)
- Л.З.Бенимечкая, Л.М.Герасимова, Г.Г.Карпова, А.И.Крутилина, Н.И.Гринева. *Биохимия*, **44**, 803 (1979)
- В.Г.Будкер, Н.Д.Кобец, И.Е.Коллекчонок, Г.Г.Карпова, Н.И.Гринева. *Молекуляр. биология*, **14**, 400 (1980)
- Г.Г.Карпова, Н.П.Пичко, Т.А.Чимитова, Н.И.Гринева. *Молекуляр. биология*, **13**, 1012 (1979)
- Г.М.Дымшиц, Г.В.Румянцев, Л.А.Фрумгарц, А.Д.Груздев, Г.А.Зайниев, И.Е.Шилова, Г.Г.Карпова, В.И.Ямкова, Н.И.Гринева. *Молекуляр. биология*, **15**, 66 (1981)
- J.Sumerton, P.A.Bartlett. *J. Mol. Biol.*, **122**, 145 (1978)
- M.A.Grachev, A.A.Mustaev, S.I.Oshevski. *Nucl. Acids Res.*, **8**, 3413 (1980)
- В.В.Власов, А.А.Галль, А.А.Годовиков, В.Ф.Зарытова, И.В.Кутявин, И.П.Мотовилова, Г.В.Шишкин. *Биохимия*, **48**, 1244 (1983)
- Н.К.Кочетков, Э.И.Будовский, Е.Д.Свердлов, Н.А.Симукова, М.Ф.Турчинский, В.Н.Шибяев. *Органическая химия нуклеиновых кислот*. Химия, Москва, 1970
- З.А.Шабарова, А.А.Богданов. *Химия нуклеиновых кислот и их компонентов*. Химия, Москва, 1978
- K.W.Kohn. *Molecular Aspects of Anticancer Drug Action*. (Eds S.Neidle, M.J.Waring). Macmillan, London, 1983. P.315
- J.P.Bachelier, J.F.Thompson, M.R.Wegnez, J.E.Hearst. *Nucl. Acids Res.*, **9**, 2207 (1981)
- S.Peckler, B.Graves, D.Kanne, H.Rapoport, J.E.Hearst, S.H.Kim. *J. Biol. Chem.*, **162**, 157 (1982)
- U.Pieles, B.S.Sproat, P.Neuner, F.Cramer. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 8967 (1989)
- U.Pieles, U.English. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 285 (1989)
- P.S.Song, K.J.Tapley. *Photochem. Photobiol.*, **29**, 1177 (1979)
- J.E.Hearst. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **10**, 69 (1981)
- B.H.Johnston, M.A.Johnson, C.B.Moore, J.E.Hearst. *Science*, **197**, 906 (1977)
- Y.Shi, J.E.Hearst. *Biochemistry*, **26**, 3786 (1987)
- Y.Shi, J.E.Hearst. *Biochemistry*, **26**, 3792 (1987)
- Y.Shi, J.E.Hearst. *Biochemistry*, **25**, 5895 (1986)
- D.Kanne, K.Straub, J.E.Hearst, H.Rapoport. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6754 (1982)
- G.D.Cimino, Y.Shi, J.E.Hearst. *Biochemistry*, **25**, 3013 (1986)
- J.F.Thompson, J.E.Hearst. *Cell*, **32**, 1355 (1983)
- G.D.Cimino, H.B.Gamper, S.T.Isaacs, J.E.Hearst. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 1151 (1985)
- J.W.Tessman, S.T.Issacs, J.E.Hearst. *Biochemistry*, **24**, 1669 (1985)
- E.Garret-Wheeler, R.E.Lochar, A.Kumar. *Nucl. Acids Res.*, **12**, 3405 (1984)
- C.Shen, J.E.Hearst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2649 (1976)
- J.Piette, J.E.Hearst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5540 (1983)
- Y.Shi, H.Gamper, J.E.Hearst. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 6843 (1987)
- Y.Shi, H.Gamper, J.E.Hearst. *J. Biol. Chem.*, **263**, 527 (1988)
- Y.Shi, J.E.Hearst. *J. Mol. Biol.*, **199**, 277 (1988)
- B.Van Houten, H.Gamper, J.E.Hearst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8077 (1986)
- B.Van Houten, H.Gamper, J.E.Hearst, A.Sancar. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14135 (1986)
- R.S.Cole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 1064 (1973)
- J.M.Kean, A.Murakami, K.R.Blake, C.D.Murakami, P.S.Miller. *Biochemistry*, **27**, 9113 (1988)
- B.L.Lee, A.Murakami, K.R.Blake, S.B.Lin, P.S.Miller. *Biochemistry*, **27**, 3197 (1988)
- E.Sage, E.Moustacchi. *Biochemistry*, **26**, 3307 (1987)
- T.Seiki, K.Noza, S.Kondo. *Photochem. Photobiol.*, **27**, 19 (1978)
- J.Piette, D.Decuyper-Debergh, H.Gamper. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7355 (1985)
- M.Lee, M.C.Roldan, M.K.Haskell, S.R.McAdam, J.A.Hartley. *J. Med. Chem.*, **37**, 1208 (1994)
- J.Woo, S.Th.Sigurdsson, P.B.Hopkins. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3407 (1993)
- D.S.Bose, A.S.Thompson, J.S.Ching, J.A.Hartley, M.D.Berardini, T.C.Jenkins, S.Neidle, L.H.Hurley, D.E.Thurston. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4939 (1992)
- D.S.Bose, A.S.Thompson, M.Smelie, M.D.Berardini, J.A.Hartley, T.C.Jenkins, S.Neidle, D.E.Thurston. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1518 (1992)
- S.Th.Sigurdsson, S.M.Rink, P.B.Hopkins. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 12633 (1993)
- S.Th.Sigurdsson, P.B.Hopkins. *Tetrahedron*, **50**, 12065 (1994)
- J.A.Hartley. *Biochemistry*, **30**, 11719 (1991)
- J.A.Hartley, M.D.Berardini, R.L.Souhami. *Anal. Biochem.*, **193**, 131 (1991)
- S.C.Alley, K.A.Brameld, P.B.Hopkins. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2734 (1994)
- M.Yuki, V.Grukhin, C.S.Lee, I.S.Haworth. *Arch. Biochem. Biophys.*, **325**, 39 (1996)
- S.P.Mayalarp, R.H.Hargreaves, J.Butler, C.C.O'Hare, J.A.Hartley. *J. Med. Chem.*, **39**, 531 (1996)
- R.J.Knox, F.Friedlos, P.J.Biggs, W.D.Flitter, M.Gaskell, P.Goddard, L.Davies, M.Jarman. *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 797 (1993)
- A.Skladanowski, J.Konopa. *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 2279 (1994)
- A.Van Rosmalen, C.Cullinane, S.M.Cutts, D.R.Phillips. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 42 (1995)
- J.D.Farmer, G.R.Gustafson, A.Conti, M.B.Zimmt, J.W.Suggs. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 899 (1991)
- J.D.Farmer, S.M.Rudnicki, J.W.Suggs. *Tetrahedron Lett.*, **29**, 5105 (1988)
- P.B.Hopkins, T.J.Millard, J.Woo, M.F.Weidner, J.J.Kirchner, S.T.Sigurdsson, S.Raucher. *Tetrahedron*, **47**, 2475 (1991)
- J.T.Millard, M.F.Weidner, S.Raucher, P.B.Hopkins. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 3637 (1990)

82. M.Tomasz, R.Lipman, D.Chowdary, J.Pawlak, G.L.Verdine, K.Nakanishi. *Science*, **235**, 1204 (1987)
83. M.F.Weidner, S.T.Sigurdsson, P.B.Hopkins. *Biochemistry*, **29**, 9225 (1990)
84. H.Huang, T.K.Pratum, P.B.Hopkins. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2703 (1994)
85. H.M.Coley, N.Brooks, D.H.Phillips, A.Hewer, T.C.Jenkins, M.Jarman, I.R.Judson. *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 1203 (1995)
86. M.Walicka, L.Szmigiero, E.Ciesielska, I.Gradzka. *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 615 (1993)
87. M.G.Remias, C.S.Lee, I.S.Haworth. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **12**, 911 (1995)
88. I.V.Kutyavin, H.B.Gamper, A.A.Gall, R.B.Meyer. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 9303 (1993)
89. Q.Dong, N.Bullock, F.Ali-Osman, O.M.Colvin, D.D.Bigner, H.S.Friedman. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **37**, 242 (1996)
90. A.Masta, P.J.Gray, D.R. Phillips. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 3880 (1994)
91. S.M.Rink, M.S.Solomon, M.J.Taylor, S.B.Rajur, L.W.McLaughlin, P.B.Hopkins. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 2551 (1993)
92. F.Ali-Osman, A.Rairkar, P.Young. *Cancer Biochem. Biophys.*, **14**, 231 (1995)
93. Y.Fujiwara, M.Nakamura, S.Yokoo. *Br. J. Cancer*, **67**, 1285 (1993)
94. G.N.Rudd, J.A.Hartley, R.L.Souhami. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **35**, 323 (1995)
95. M.Nakamura, M.Yamamoto. *Exp. Eye Res.*, **59**, 53 (1994)
96. И.Э.Каневский, С.А.Кузнецова, Е.М.Волков, З.А.Шабарова. *Молекуляр. биология*, **30**, 1144 (1996)
97. T.R.Webb, M.D.Matteucci. *Nucl. Acids Res.*, **14**, 7661 (1986)
98. T.R.Webb, M.D.Matteucci. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2764 (1986)
99. J.F.Milligan, M.D.Matteucci, J.C.Martin. *J. Med. Chem.*, **36**, 1923 (1993)
100. J.-P.Shaw, J.F.Milligan, S.H.Krawczyk, M.D.Matteucci. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 7765 (1991)
101. D.Praseuth, L.Perrouault, T.Le Doan, M.Chassignol, N.Thuong, C.Helene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1349 (1988)
102. S.H.Krawczyk, J.F.Milligan, S.Wadwani, C.Moulds, B.C.Froehler, M.D.Matteucci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3761 (1992)
103. S.L.Young, S.H.Krawczyk, M.D.Matteucci, J.J.Toole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10023 (1991)
104. O.S.Fedorova, D.G.Knorre, L.M.Podust, V.F.Zarytova. *FEBS Lett.*, **228**, 273 (1988)
105. S.A.Strobel, P.B.Dervan. *Science*, **249**, 73 (1990)
106. T.Le Doan, L.Perrouault, D.Praseuth, H.Habhouh, J.L.Decout, N.T.Thuong, J.Lhomme, C.Helene. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 7749 (1987)
107. H.E.Moser, P.B.Dervan. *Science*, **238**, 645 (1987)
108. M.Poidot-Forget, M.Chassignol, M.Takasugi, N.T.Thuong, C.Helene. *Gene*, **72**, 361 (1988)
109. T.J.Povsic, P.B.Dervan. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9428 (1990)
110. M.D.Matteucci, T.R.Webb. *Tetrahedron*, **28**, 2469 (1987)
111. M.B.Gottikh, O.A.Fedorova, M.V.Baud-Demattei, S.Giorgi-Renault, J.R.Bertrand, Z.A.Shabarova, C.Malvy. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2126 (1996)
112. R.Cosstick, M.E.Douglas. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1035 (1991)
113. A.E.Ferentz, G.L.Verdine. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4000 (1991)
114. A.M.McMillan, G.L.Verdine. *Tetrahedron*, **47**, 2603 (1991)
115. C.M.Harris, L.Zhou, E.A.Strand, T.M.Harris. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4328 (1991)
116. H.Lee, M.Hinz, J.J.Stezowski, R.G.Harvey. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 6773 (1990)
117. A.E.Ferentz, T.A.Keating, G.L.Verdine. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 9006 (1993)
118. A.E.Ferentz, J.Wiorkiewicz-Kuczera, M.Karplus, G.L.Verdine. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7569 (1993)
119. R.J.Cain, E.R.P.Zuiderweg, G.D.Glick. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 2153 (1995)
120. Л.Г.Кузнецова, Е.М.Волков, Е.А.Романова, В.Н.Ташлицкий, Т.С.Орецкая, З.А.Шабарова. *Биорг. химия*, **17**, 1289 (1991)
121. Л.Г.Кузнецова, Е.А.Романова, Е.М.Волков, В.Н.Ташлицкий, Т.С.Орецкая, Н.Ф.Крынецкая, З.А.Шабарова. *Биорг. химия*, **19**, 455 (1993)
122. H.Aurup, T.Tuschl, F.Benseler, J.Ludwig, F.Eckstein. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 20 (1994)
123. F.Benseler, D.M.Williams, F.Eckstein. *Nucleosides Nucleotides*, **11**, 1333 (1992)
124. M.Imazawa, F.Eckstein. *J. Org. Chem.*, **44**, 2039 (1979)
125. H.Aurup, D.M.Williams, F.Eckstein. *Biochemistry*, **31**, 9636 (1992)
126. O.Heidenreich, F.Benseler, A.Fahrenholz, F.Eckstein. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2131 (1994)
127. S.Th.Sigurdsson, F.Eckstein. *Trends Biotechnol.*, **13**, 286 (1995)
128. С.И.Анцыпович, Е.М.Волков, Т.С.Орецкая, Е.А.Романова, В.Н.Ташлицкий, М.Блюменфельд, З.А.Шабарова. *Биорг. химия*, **21**, 774 (1995)
129. S.I.Antsyppovich, T.S.Oretskaya, E.M.Volkov, E.A.Romanova, V.N.Tashlitsky, M.Blumenfeld, Z.A.Shabarova. *Nucleosides Nucleotides*, **15**, 923 (1996)
130. С.И.Анцыпович, Т.С.Орецкая, Е.А.Романова, Е.М.Волков, В.Н.Ташлицкий, М.Вассер, З.А.Шабарова. *Биорг. химия*, **22**, 264 (1996)
131. S.I.Antsyppovich, T.S.Oretskaya, E.A.Romanova, E.M.Volkov, V.N.Tashlitsky, M.Vasser, Z.A.Shabarova. *FEBS Lett.*, **378**, 224 (1996)

DOUBLE-STRANDED CROSS-LINKED NUCLEIC ACIDS. SYNTHESIS AND APPLICATIONS IN THE MOLECULAR BIOLOGY

S.I.Antsyppovich, T.S.Oretskaya

M.V.Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry
 Leninskie Gory, 119899 Moscow, Russian Federation, Fax (095)939-3181

The literature devoted to methods of the DNA – DNA cross-linking and to the methods of obtaining cross-linked oligonucleotides duplexes have been considered. The systematisation of methods known has been performed, their advantages and disadvantages have been discussed. The examples of the applications of the cross-linked DNA duplexes for the investigations of the processes of the protein – nucleic acid recognition and mechanisms of action of nucleic acids-interacting proteins, for obtaining the information about structure of nucleic acids and for solving the number of other molecular-biology problems have been demonstrated.

Bibliography — 131 references.

Received 11th February 1997