

Получение реакционноспособных производных нуклеиновых кислот и их использование для исследования структуры и функций биополимеров

И.Э.Каневский, С.А.Кузнецова

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

Обобщены сведения по синтезу реакционноспособных производных нуклеиновых кислот и их использованию в структурно-функциональных исследованиях биополимеров. Представлены основные типы таких производных: фотоактивируемые (реагенты, содержащие арилазидо-, галогено-, меркаптогруппы, псорален и его производные), реагенты на основе платины, а также аналоги нуклеиновых кислот, содержащие либо замещенные пирофосфатные, либо ацилфосфатную межнуклеотидные группы. Рассмотрены механизмы взаимодействия этих соединений с белками и нуклеиновыми кислотами. Обсуждаются перспективы использования реакционноспособных производных нуклеиновых кислот в системах *in vivo*.

Библиография — 76 ссылок.

Оглавление

I. Введение	688
II. Фотоактивируемые производные нуклеиновых кислот	688
III. Pt-Содержащие производные нуклеиновых кислот	698
IV. Реакционноспособные производные нуклеиновых кислот, содержащие замещенные пирофосфатные и ацилфосфатную группировки	700
V. Перспективы использования реакционноспособных производных нуклеиновых кислот как реагентов для направленной модификации биополимеров <i>in vivo</i>	703

I. Введение

Синтетические фрагменты нуклеиновых кислот (НК), содержащие модифицированные звенья, широко используются для решения различных задач молекулярной биологии, биотехнологии и медицины. Особый интерес среди них вызывают производные НК, содержащие активные группировки. Эти соединения обладают способностью к образованию ковалентных связей с реакционноспособными группами биополимеров и являются перспективными реагентами для изучения топографии активных центров белков, их функциональных особенностей, а также молекулярного механизма ДНК-белкового узнавания. В последние годы, в связи с развитием сенсоров биотехнологии интерес к подобному роду соединениям резко возрос. Основное внимание уделяется поиску новых активных групп и разработке методов их направленного введения в нуклеиновые кислоты.

И.Э.Каневский. Кандидат химических наук, стажер Международного биотехнологического центра, Химический факультет МГУ. Телефон: (095)939–3153.

С.А.Кузнецова. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ. Телефон: (095)939–3153.

Область научных интересов авторов: направленная модификация олигонуклеотидов; дизайн, синтез и исследование свойств реакционноспособных фрагментов нуклеиновых кислот; аффинная модификация НК-узнающих белков.

Дата поступления 9 сентября 1997 г.

В обзоре рассматриваются основные типы реакционноспособных производных НК: фотоактивируемые реагенты, реагенты на основе платины, а также новые перспективные аналоги НК, содержащие замещенные пирофосфатные, либо ацилфосфатную межнуклеотидные группы. В обзоре рассмотрено также применение реакционноспособных производных НК для изучения белков и нуклеиновых кислот и перспективы их дальнейшего применения в системах *in vivo*. За рамками настоящего обзора остался целый класс алкилирующих реагентов, предложенных в конце 60-х годов Гриневой и Кнорре, поскольку этот материал достаточно подробно изложен в ранее опубликованных обзорах (см., например,^{1,2}). По этой же причине в обзор не вошли реагенты с окислительно-восстановительным механизмом действия.^{1,2}

II. Фотоактивируемые производные нуклеиновых кислот

Реакционноспособные производные НК, имеющие фотоактивируемые группировки, в последние годы получили широкое распространение для направленной модификации белков и НК и изучения структуры и функций этих биополимеров. Обычно используют группировки, для активации которых необходимо облучение светом с длиной волны более 300 нм. Это позволяет исключить возможность различных фотохимических превращений самих биополимеров.

Среди фотоактивируемых соединений наиболее широко используются производные НК, содержащие арилазидные, галогено- или меркаптогруппы, а также различные производные псоралена.

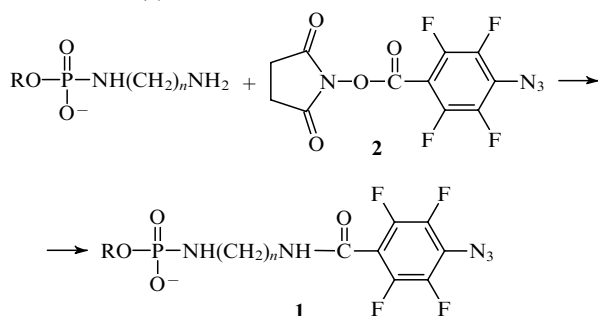
1. Производные нуклеиновых кислот, содержащие азидогруппу

Реакционноспособные азидопроизводные олигонуклеотидов представляют собой синтетические олигонуклеотиды, модифицированные по сахаро-фосфатному остову или по гетероциклическим основаниям реагентами, содержащими азидогруппу. Под действием облучения они превращаются в активные промежуточные продукты (нитрены), которые могут реагировать с реакционноспособными группами белков и НК.

а. Введение арилизидных групп в нуклеиновые кислоты

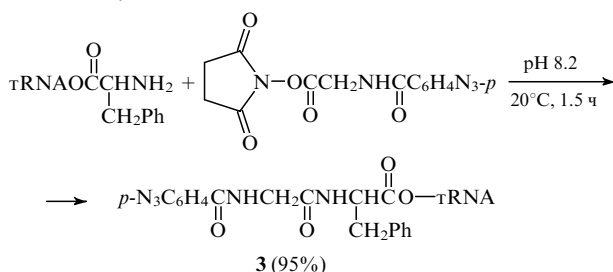
Арилизидные группы вводят в структуру синтетических олигонуклеотидов либо в процессе их синтеза, используя модифицированные нуклеотидные компоненты,³ либо путем постсинтетической модификации олигонуклеотидов различными производными арилизидов. Среди последних наиболее распространенными являются реагенты, содержащие 4-азидо-, 2-нитро-5-азидофенильные, азидоперфторфенильные группы^{4,5} или азидопрофлавин.⁶

Для синтеза азидопроизводных олигонуклеотидов используют реакционноспособные группы, содержащиеся в самих олигонуклеотидах или введенные в них в процессе синтеза. В качестве последних широко применяют алифатические amino- или меркаптогруппы. Так, азидоперфторфенильное производное олигодезоксирибонуклеотида **1** получали ацилированием концевой аминогруппы, предварительно введенной в структуру этого олигонуклеотида, *N*-гидроксисукцинимидным эфиром *n*-азидотетрафторбензойной кислоты (**2**).⁵



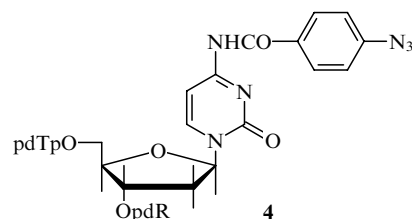
R — остаток олигодезоксирибонуклеотида, $n = 2, 6$.

Азидопроизводное тРНК^{Phe} *E. coli* **3** было получено ацилированием аминогруппы введенного в тРНК остатка фенилаланина *N*-гидроксисукцинимидным эфиром *N*-(*n*-азидобензоил)глицина.⁷



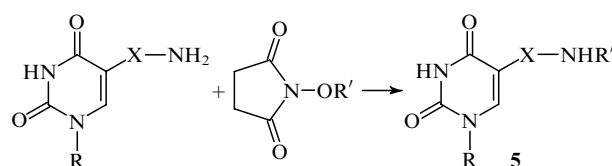
Аналогичный подход был использован для введения азидогруппы по экзоциклической аминогруппе цитидина. В качестве ацилирующего агента использовали *N*-гидроксисук-

цинимидный эфир *n*-азидобензойной кислоты. Таким образом было получено азидопроизводное пентануклеотида **4**.⁸

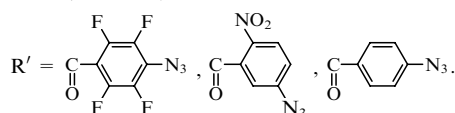


R — TAG.

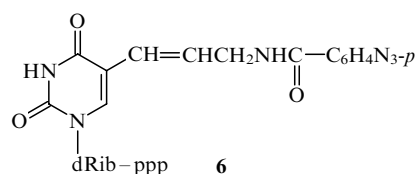
Различные азидопроизводные олигонуклеотида d(UCCAATT) **5** получали ацилированием с помощью *N*-гидроксисукцинимидных эфиров *n*-азидотетрафтор-, 2-нитро-5-азидо- или *n*-азидобензойных кислот^{4,9} аминогруппы, присоединенной по положению C(5) концевой остатка дезоксиуридина.



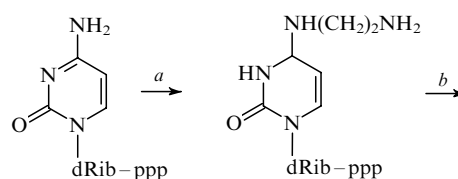
R = d(CCACTT); X = CH₂, CH₂OCH₂CH₂, CH₂NHCOCH₂CH₂;

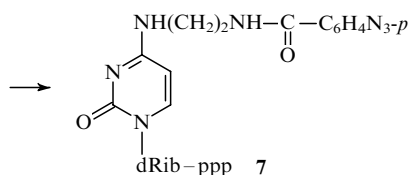


Для введения азидогруппы в структуру гена SUP4 тРНК^{Tyr} был использован 5-[3-(*n*-азидобензоил)амино-1-пропенил]дезоксиуридин-5'-трифосфат (**6**), который был получен при взаимодействии 5-(3-амино-1-пропенил)дезоксиуридин-5'-трифосфата с *N*-гидроксисукцинимидным эфиром *n*-азидобензойной кислоты (ДМФА, pH 8.5, 20°C, 3 ч в темноте).¹⁰ Затем соединение **6** было с помощью Т4 ДНК-полимеразы введено в структуру ДНК. Модифицированную таким образом ДНК использовали для зондирования контактов ДНК-белок в специфическом транскрипционном комплексе, образованном этой ДНК, РНК-полимеразой III и рядом транскрипционных факторов.



Недавно было предложено¹¹ использовать для этой цели новый азидосодержащий реагент — 4-[2-(*n*-азидобензоил)аминоэтил]дезокситидин-5'-трифосфат (**7**). Это соединение было также получено с использованием *N*-гидроксисукцинимидного эфира азидобензойной кислоты.

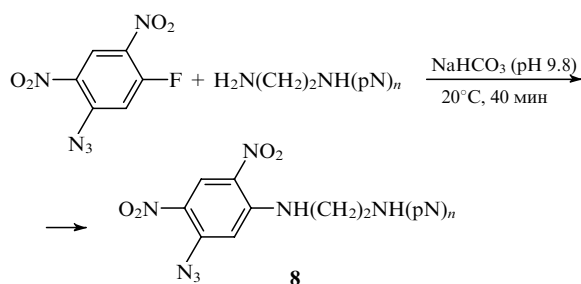




a) $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, NaHSO_3 ; b)  $\text{NOCOC}_6\text{H}_4\text{N}_3\text{-p}$, pH 8.5, 3 ч, 20°C.

На первой стадии проводили катализируемое бисульфитом переаминирование аминогруппы дезоксицитидин-5'-трифосфата этилендиамином с последующим выделением целевого продукта колоночной хроматографией. Реакцию 4-(2-аминоэтил)дезокситидин-5'-трифосфата с 10-кратным избытком *N*-гидроксисукцинимидного эфира *n*-азидобензойной кислоты проводили при пониженном освещении. Целевой продукт **7** также выделяли колоночной хроматографией и анализировали методом ТСХ. Соединение **7** было введено в участок гена SUP4 тРНК^{Tyr}. Полученную модифицированную ДНК использовали для зондирования контактов ДНК – белок в транскрипционном комплексе.

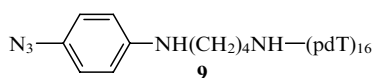
В работе¹² при взаимодействии 2,4-динитро-5-фторфенилазида с аминогруппой этилендиаминового спейсера, присоединенного к концевой фосфатной группе олигорибонуклеотидов были получены фотоактивируемые аналоги мРНК **8** — производные олигорибонуклеотидов разной длины, содержащие арилазидогруппу на 5'-конце олигорибонуклеотидного фрагмента.



pN = pA, $n = 5$; pN = pU, $n = 4, 7, 8$.

Реагенты **8** применяли для аффинной модификации 5'-области мРНК-связывающего центра рибосомы *E. coli*.

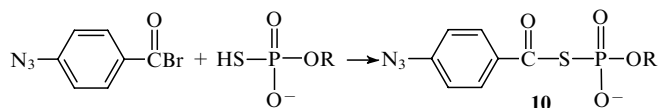
Для исследования локализации белкового окружения ДНК в составе хроматина авторы работы¹³ использовали фотоактивируемое производное гексадекатимидилата **9**, в котором остаток *n*-азидоанилина присоединен к 5'-концевой фосфатной группе через спейсерное звено — бутандиамин-1,4.



Соединение **9** получали фосфорилированием 4-(*n*-азидоанилино)бутанамина фосфо-*N*-метилимидазолидом олигонуклеотида. Ранее Годовиковой с соавт.¹⁴ была изучена способность к модификации аминокислотных остатков производными олигонуклеотидов, в которых фрагмент *n*-азидоанилина был связан с концевой фосфатной группой олигонуклеотида не через спейсер, а непосредственно. Было установлено, что при облучении светом такие реагенты образуют *n*-бензохинонимидные производные, в результате чего при взаимодействии с аминокислотами происходит отщепление реагента от олигонуклеотида. Напротив, модификация белков реагентами типа **9** протекает специфично с образованием ковалентно-связанных комплексов НК – белок.¹³

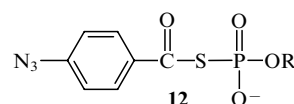
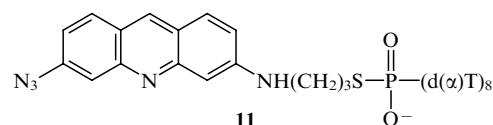
Наряду с арилированием и ароилированием алифатических аминогрупп для получения азидопроизводных олиго-

нуклеотидов используют также реакции алкилирования или ацилирования предварительно введенной в олигонуклеотиды меркаптогруппы соответствующими азидопроизводными ароилгалогенидов. Так, ацилированием *n*-азидобензоилбромидом 5'-концевого тиофосфата олиготимидилата было получено *n*-азидобензоильное производное **10**.¹⁵



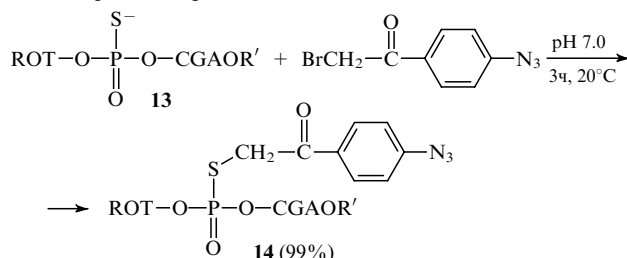
R — остаток олиготимидилата.

Аналогичным образом, при взаимодействии 3-азидо-6-(3-бромпропиламино)акридина⁶ или *n*-азидобензоилбромида¹⁶ с концевой тиофосфатной группой олиго-(α)-тимидилата были получены соответственно азидопрофлавиновые (**11**) или *n*-азидобензоильные (**12**) производные олигонуклеотидов.



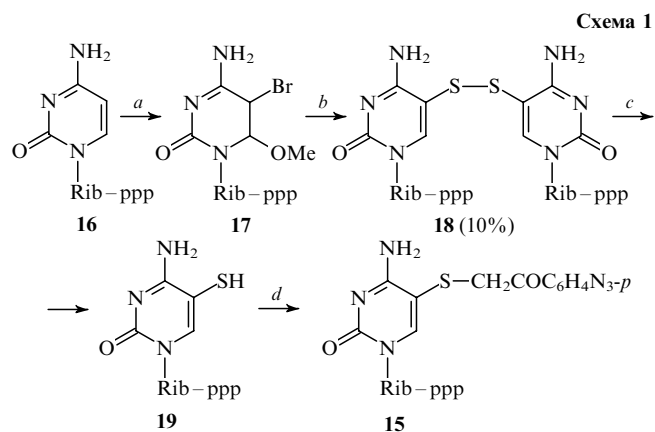
R — остаток олигодезоксирибонуклеотида.

Для модификации олигонуклеотида **13**, содержащего межнуклеотидную тиофосфатную группу, введенную в него в процессе олигонуклеотидного синтеза, был использован *n*-азидофенилбромид.¹⁷



R, R' — фрагменты олигонуклеотидной последовательности.

Азидогруппа может быть введена в гетероциклическое основание. Так, 5-[(4-азидофенил)тио]цитидин-5'-трифосфат (**15**) синтезирован¹⁸ согласно схеме 1 (все реакции проводили в темноте или при слабом освещении).



a) MeOBr, 4°C, 12–24 ч; b) Na_2S_2 , 4°C, 5 ч; 20°C, 48 ч; c) NaBH_4 , H_2O , 0°C, 3 ч; d) $\text{BrCH}_2\text{COC}_6\text{H}_4\text{N}_3\text{-p}$, DMSO, 4°C, 12 ч.

Обработка цитидин-5'-трифосфата **16** метилгипобромитом приводила к бромметоксипроизводному **17**. Выделение продукта реакции соединения **17** с дисульфидом натрия осуществляли экстракцией и колоночной хроматографией. Выход 5,5''-дитиобис(цитидин-5'-трифосфата) (**18**) составил 10%. Низкий выход продукта **18** авторы работы¹⁸ объясняют тем, что обе реагирующие молекулы отрицательно заряжены. В работе¹⁸ был использован также альтернативный путь синтеза дисульфида **18** исходя из нуклеозида. Выход продуктов аналогичной реакции для нуклеозидов оказался существенно выше. Затем защищали 2'- и 3'-ОН-группы рибозы, а 5'-ОН-группу дисульфидного производного фосфорилировали. Последняя стадия в этом случае оказалась более сложной и трудоемкой за счет большего числа стадий очистки и сложности выделения промежуточных соединений при сравнительно одинаковых выходах 5,5''-дитиобис(цитидин-5'-трифосфата) (**18**). Для получения 5-меркаптоцитидин-5'-трифосфата (**19**) соединение **18** восстанавливали боргидридом натрия. Затем реакционную смесь обрабатывали раствором *n*-азидофенацилбромидом в ДМСО. Целевой продукт **15** выделяли экстракцией и колоночной хроматографией (выход 80%). Азидопроизводное нуклеозидтрифосфата **15** вводили в различные положения РНК в процессе полимеразного синтеза.

Таким образом, к настоящему времени разработаны методы введения арилазидогрупп как в гетероциклические основания НК, так и в сахарофосфатный остов. Они включают в себя ацилирование аминогрупп в составе НК *N*-гидроксисукцинимидными эфирами азидобензойной кислоты и ее производных или алкилирование (ацилирование) введенной в структуру НК меркаптогруппы галогенпроизводными соответствующих арилазидов. Как правило, эти реакции проходят с высокой эффективностью (выход продуктов 80–99%). Однако если в первом случае для введения азидогрупп могут быть использованы экзоциклические аминогруппы гетероциклических оснований НК, то при использовании галогенпроизводных арилазидов необходима дополнительная стадия введения меркаптогруппы в структуру НК, что может усложнить процедуру синтеза и привести к снижению выходов целевых продуктов.

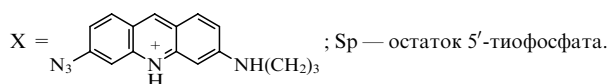
6. Ковалентное присоединение производных НК, содержащих азидогруппы, к биополимерам

Соединения, содержащие арилазидогруппы, при облучении светом (фотолизе) генерируют высокоактивные короткоживущие радикалы — нитрены. Время жизни нитренов в синглетном состоянии зависит от природы заместителей в ароматическом ядре и изменяется от нано- до микросекунд.¹⁹ Такое состояние нитрен-радикалов крайне нестабильно и они либо участвуют во внутримолекулярных перегруппировках с образованием различных реакционноспособных интермедиатов, либо реагируют с реакционноспособными группами ближайшего окружения. В последнем случае становится возможным образование межмолекулярной ковалентной связи. На примере азидофенильных производных было показано, что введение в бензольное кольцо атомов фтора или нитрогрупп снижает вероятность внутримолекулярных перегруппировок; тем самым увеличивается вероятность участия нитрена в межмолекулярных взаимодействиях.²⁰

Впервые азидопроизводные олигонуклеотидов были использованы при исследовании образования ковалентно связанных ДНК-дуплексов **20** из 27-звенного матричного олигонуклеотида и комплементарного его участку окта(α-тимидилата), несущего остаток азидопрофлавина, связанного с 5'-тиофосфатной группой α-аномера через спейсерное звено.⁶

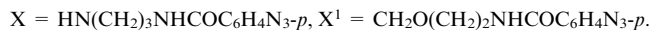
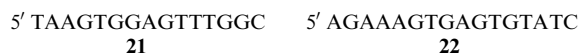


20



После облучения олигонуклеотидов, входящих в систему **20**, УФ-светом с длиной волны выше 300 нм в 0.1 М NaCl зафиксировано образование между ними ковалентной связи. Продукт фотоприсоединения был обработан щелочью, что привело к избирательному расщеплению по участкам модификации. Показано, что основными точками расщепления являются остатки Т⁹ и Т¹⁸ ДНК-матрицы в отношении 1 : 3. Для объяснения такого соотношения было сделано предположение о возможности параллельной и антипараллельной ориентации олигонуклеотидного зонда при формировании комплементарного комплекса или об образовании триплексной структуры. Дальнейшие исследования показали, что второе предположение является более вероятным, поскольку, как оказалось, окта(α-тимидилат) в 0.1 М NaCl способен к образованию тройных комплексов с матрицей.

Было проведено²¹ исследование фотомодификации пентадека- (**21**) и гексадекануклеотида (**22**) производными олигонуклеотидов **23–28**, содержащими азидогруппу в различных положениях олигонуклеотидного зонда.



В работе²¹ использованы олигонуклеотидные производные, содержащие азидогруппу, присоединенную к 3'(5')-концевым фосфатам (реагенты **23**, **25** и **26**), к атому С(5) дезоксиуридина (реагент **24**) или находящуюся внутри цепи (реагенты **27** и **28**). Были использованы также пары реагентов, комплементарные соседним участкам мишени (тандемы реагентов **23** + **25** и **23** + **26**). При УФ-облучении (λ = 303–365 нм) во всех случаях образуются продукты ковалентного присоединения к мишени одного или двух (в случае тандемов) реагентов. Эффективность фотоприсоединения реагентов **23** и **26**, содержащих азидогруппу соответственно на 5'- и 3'-концах, к пентадекануклеотиду примерно одинакова, и выходы продуктов фотоприсоединения составляют ~ 70%. Однако при использовании тандема этих реагентов эффективность фотомодификации возрастает до 80%. Модификации преимущественно подвергается остаток G⁹ олигонуклеотида **21**, не вовлеченный в образование комплементарного комплекса. При использовании реагентов **27** и **28**, содержащих азидопроизводное остатка уридина внутри цепи, выход аддуктов снижается до 55 и 51% соответственно. Снижение эффективности фотореакции, по-видимому, связано с тем, что модифицируемое основание участвует в комплементарном взаимодействии. Подтверждением этому является тот факт, что для реагента **24**, содержащего азидонуклеотид на 5'-конце, эффективность фотоприсоединения достигает 69%. При этом модификации подвергается в основном остаток G⁷ олигонуклеотида **22**, в

то время как остаток G⁸ модифицируется в незначительной степени.

Высокоактивные нитрены, генерируемые азидопроизводными олигонуклеотидов в результате фотолиза, способны мгновенно реагировать с реакционноспособными группами ближайшего окружения, в том числе и с остатками аминокислот в составе комплекса ДНК – белок.

Исследование структуры фактора транскрипции TFIIIC РНК-полимеразы III было проведено с помощью геномной ДНК-последовательности SUP4 тРНК^{Tyr} дрожжей, содержащей один или несколько азидопроизводных дезоксиуридина 6.¹⁰ Комплекс модифицированной ДНК с белком облучали в течение 5 мин УФ-светом с длиной волны $\lambda = 254$ нм. Анализ продуктов фотоприсоединения позволил идентифицировать 4 субъединицы TFIIIC и их позиционное расположение относительно SUP4 в составе комплекса ДНК – белок. Это исследование было продолжено с использованием геномной ДНК-последовательности SUP4, содержащей азидопроизводные цитидина 7.¹¹ В отличие от предыдущего примера, для модификации применяли неочищенную фракцию белка. В результате анализа продуктов фотоприсоединения идентифицирован белок с массой 40 кДа, который не был обнаружен при использовании очищенного TFIIIC. Предполагается, что этот белок является компонентом транскрипционного комплекса.

В работе¹² изучена аффинная модификация 5'-области мРНК-связывающего центра рибосомы *E. coli* с помощью [2-(2,4-динитро-5-азидофенил)аминоэтил]-5'-фосфоамидов олигоуридилатов 8. Было показано, что соединения 8 ($N = U, n = 4, 7, 8$) способны стимулировать связывание кодоспецифичной аминоацил-тРНК с рибосомой. После облучения тройного комплекса рибосома – реагент 8 – тРНК УФ-светом с $\lambda > 350$ нм происходило ковалентное присоединение реагента 8 к рибосоме. До 10% реагента, связавшегося в тройной комплекс, сшивалось с рибосомными белками 30S- и 50S-субчастиц. Установлено, что в 30S-субчастице модификации подвергаются белки S3, S4, S9, S11, S12, S14, S17, S19, S20. В 50S-субчастице модифицируются белки L2, L13, L16, L27, L32, L33. Набор модифицированных белков существенно зависит от длины олигонуклеотидной части реагента и от занятости участка A рибосомы молекулой тРНК.

Благодаря способности к образованию прочных ковалентных связей с реакционноспособными группами белков азидопроизводные олигонуклеотидов успешно применяются для идентификации аминокислотных остатков, входящих в активные центры ДНК-узнающих белков. Так, для идентификации аминокислотных остатков эндонуклеазы рестрикции *TaqI*, взаимодействующих с участком узнавания, был использован¹⁷ фотореагент 13, содержащий азидогруппу непосредственно в месте расщепления *TaqI*. Комплементарный комплекс олигонуклеотидного зонда 13 с матричной ДНК после 5 мин инкубации с *TaqI* облучали УФ-светом ($\lambda = 306$ нм) в течение 5 мин. Эффективность образования ковалентно связанного комплекса ДНК – белок составила 15–20%. В результате анализа продуктов фотоприсоединения аминокислотный остаток, участвующий в образовании ковалентной связи с олигонуклеотидным зондом, был идентифицирован как Tyr¹⁶¹.

Для фотоаффинной модификации РНК-полимераз T7 и *E. coli* были использованы¹⁸ модифицированные фрагменты РНК, содержащие на 3'-конце или в середине цепи остатки 5-(4-азидофенил)тиоцитидина. Комплекс модифицированной РНК и РНК-полимераз T7 и *E. coli* облучали УФ-светом ($\lambda = 302$ нм) 2–4 мин при 20°C. В результате анализа полученных продуктов фотоприсоединения установлены РНК-связывающие домены в исследуемых РНК-полимеразах.

В последние годы азидопроизводные олигонуклеотидов находят применение для модификации белков, входящих в

структуру хроматина. Так, реагент 9 был использован для изучения структурных перестроек хроматина в ходе клеточного цикла.¹³ С этой целью было проведено сопоставление спектра белков, которые модифицировали в ядрах, выделенных из клеток HeLa в двух разных фазах клеточного цикла: в S-фазе и в области перехода от фазы G₁ к S-фазе (G₁/S). При модификации белков в составе ядер, выделенных из клеток в S-фазе, обнаружено пять ядерных белков с молекулярными массами 160, 87, 72, 59 и 46 кДа. Показано, что модификация этих белков протекает специфично. При переходе от S-фазы к границе фаз G₁/S наблюдалось изменение спектра модифицируемых белков. В частности, модификация белка с массой 160 кДа в этом случае не была зафиксирована. Результаты, полученные авторами работы¹³, демонстрируют перспективность применения фотоактивируемых производных олигонуклеотидов для структурно-функциональных исследований хроматина.

Таким образом, азидопроизводные НК благодаря достаточно хорошо разработанным методам их получения и высокой реакционной способности находят широкое применение для исследования взаимодействий как НК – НК, так и НК – белок. Однако высокая активность нитренов, генерируемых при фотореакциях азидопроизводных, в некоторых случаях может приводить к снижению специфичности взаимодействия, что накладывает определенные ограничения на использование арилазидопроизводных НК в структурно-функциональных исследованиях биополимеров.

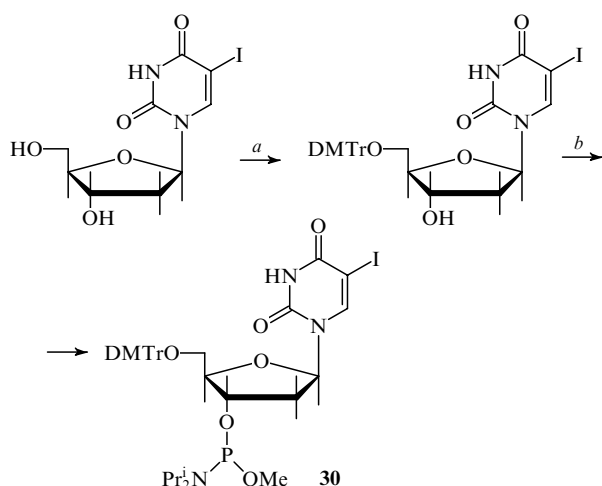
2. Производные нуклеиновых кислот, содержащие галогено- или меркаптогруппы

В последние годы для изучения взаимодействий НК – белок или НК – НК широко используются фотоактивируемые бром-, иод- или тиозамещенные производные олигонуклеотидов. Интерес к таким соединениям обусловлен тем, что в процессе облучения длинноволновым УФ-светом они генерируют свободнорадикальные интермедиаты, которые могут образовывать ковалентные связи с электронодонорными группами белков и НК. Взаимодействия по радикальному механизму возможны лишь при очень близком (несколько Å) расположении реагирующих групп.²² Это обстоятельство позволяет использовать галогено- и тиопроизводные олигонуклеотидов для определения непосредственных контактов НК – НК или НК – белок.

а. Получение галогено- и меркаптопроизводных олигонуклеотидов

Производные олигонуклеотидов, содержащие галогено- или меркаптогруппы, как правило, получают в процессе их химического или ферментативного синтеза, используя модифицированные нуклеотидные компоненты, например, 4-меркапто- или 5-бром(иод)замещенные производные уридина или цитидина. Производные ДНК, содержащие галогено- или меркаптогруппы, получают в процессе твердофазного амидофосфитного синтеза, используя в качестве амидофосфитных мономерных компонентов бром-, иод- или меркаптодезоксирибонуклеозидамидофосфиты. Так, в работе²³ были получены 5-бром-2'-дезоксирибонуклеотиды (5-BrdU) производные ДНК, содержащие участок узнавания фактора транскрипции NF-κB. Модифицированный уридин был введен в различные положения ДНК в процессе твердофазного синтеза с использованием 5-BrdU-амидофосфитов.

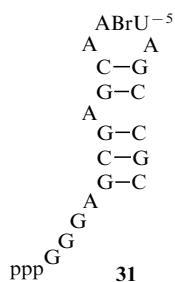
5-Иод-2'-дезоксирибонуклеотидное производное олигодезоксирибонуклеотида GCTCACCGAA – IdU – GC (29) было синтезировано аналогичным образом²⁴ с использованием соединения 30, которое получали с количественным выходом по следующей схеме:



a) DMTTrCl = (*p*-MeOC₆H₄)₂C(Ph)Cl, Py; b) (Pr₂N)₂P(Cl)OMe, Pr₂NEt, CH₂Cl₂, 20°C, 10 мин.

Необходимо отметить, что чувствительность ароматических иодидов к нуклеофильному замещению не позволяет использовать стандартную процедуру удаления защитных групп с межнуклеотидного фосфата и гетероциклических оснований путем обработки NH₄OH при 55°C. Удаление защитных групп с выходом к олигомеру **29** осуществляли обработкой NH₄OH при комнатной температуре в течение 48 ч. В таких условиях не происходит нуклеофильного замещения иода в ароматическом ядре, в то же время фосфатные группы и гетероциклические основания полностью деблокируются.

Галогено- или меркаптопроизводные олигорибонуклеотидов также получают, используя модифицированные нуклеозидтрифосфаты в качестве субстратов T7 РНК-полимеразы в процессе полимеразного синтеза РНК. Так, для идентификации аминокислотных остатков участка связывания белка оболочки бактериофага R17 с геномной РНК был синтезирован 19-звенный олигорибонуклеотид **31**, содержащий 5-бромуридин (5-BrU) в позиции (–5).²⁵ Синтез соединения **31** проводили, используя 5-бромуридин-5'-трифосфат в процессе T7 РНК-полимеразного синтеза на синтетической ДНК-матрице.



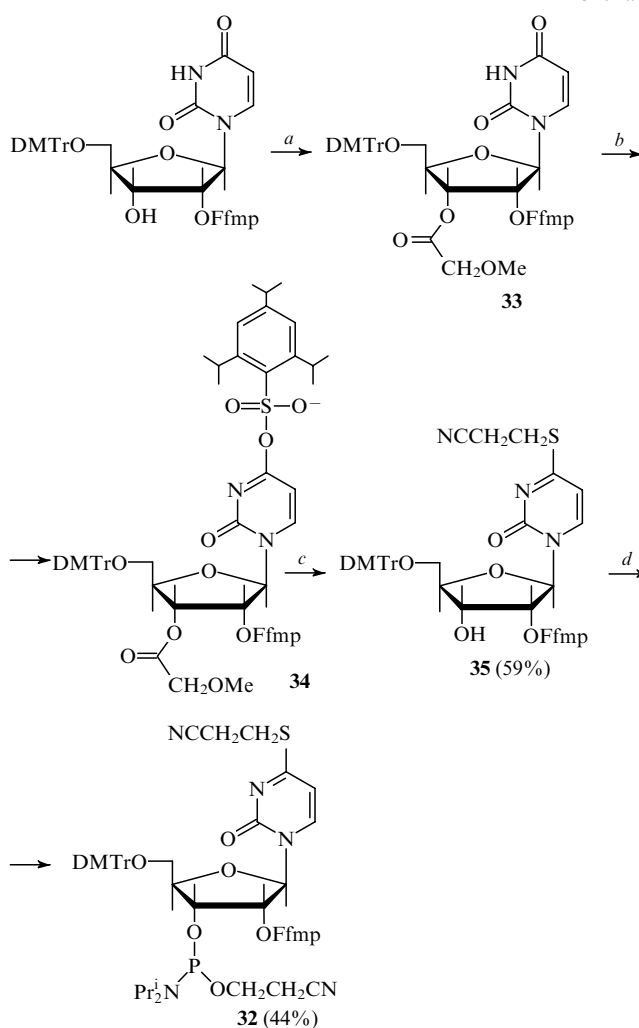
Этим же путем были получены олигорибонуклеотиды с нуклеотидной последовательностью, аналогичной соединению **31**, но содержащие в позиции (–5) 5-иодпроизводные остатков U или C.²⁶

Недавно²⁷ был предложен метод получения амидофосфата 4-(2-цианоэтил)тиоуридина **32** (схема 2). Это соединение затем применили в процессе химического синтеза модифицированных РНК. Для защиты 2'-ОН-группы рибозы использована 1-(2-фторфенил)-4-метоксипиперидин-4-ильная (Ffmp) защита. Для защиты меркаптогруппы уридина использовали 2-цианоэтильную группу.

Взаимодействие 2'-*O*-[1-(2-фторфенил)-4-метоксипиперидин-4-ил]-5'-*O*-диметокситриптилуридина с метоксиуксусным ангидридом в абсолютном пиридине приводило к производному **33** с количественным выходом. Для получения производного уридина **35**, содержащего цианоэтильную группу в

положении 4, соединение **33** сначала обрабатывали 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлоридом, а затем проводили реакцию сульфата **34** с 3-меркаптопропионитрилом. Полученное производное для снятия защитной группы с 3'-гидроксильной группы рибозы обрабатывали раствором аммиака в метаноле. Фосфитирование 3'-ОН-группы защищенного рибонуклеозида **35** проводили 2-цианоэтилбис(*N,N*-диизопропиламидо)фосфитом. Соединение **32** после выделения и очистки было получено с выходом 44%. Оно было затем использовано в процессе твердофазного амидофосфитного синтеза для получения фотоактивируемых производных РНК, содержащих 4-меркаптоуридин в различных положениях участков узнавания белка Rev ВИЧ и белка оболочки бактериофага MS2.

Схема 2

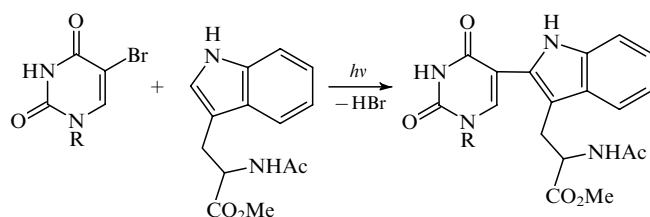


a) (MeOCH₂CO)₂, Py, 20°C, 24 ч; b) 2,4,6-Pr₃C₆H₂SO₂Cl, Me₂N-C₆H₄-N, Pr₂NEt, 20°C, 12 ч; c) 1. HS(CH₂)₂CN, MeCN, Pr₂NEt, 20°C, 12 ч; 2. NH₃, MeOH, 20°C, 9 ч; d) (Pr₂N)₂PO(CH₂)₂CN, CH₂Cl₂, 20°C, 48 ч.

6. Использование галогено- и меркаптопроизводных олигонуклеотидов для ковалентного присоединения к белкам и нуклеиновым кислотам

Как уже упоминалось выше, бром(иод)- или меркаптопроизводные олигонуклеотидов при УФ-облучении генерируют активные интермедиаты. Последние способны реагировать с

реакционноспособными группами белков и НК. На примере производного олигонуклеотида, содержащего 5-BrU, было показано, что механизм фотоактивируемого взаимодействия галогенпроизводных с аминогруппами белка находится в прямой зависимости от длины волны.²⁸ Так, при облучении УФ-светом с длиной волны $\lambda = 308$ нм, молекула 5-BrU переходит через низкоэнергетическое синглетное состояние в активное триплетное состояние π, π^* , которое ответственно за связывание BrU–DNA с ассоциированным белком, вероятно, через первоначальный перенос электрона. Межмолекулярная ковалентная связь BrU с остатками аминокислот, таких как цистеин, глутатион или триптофан происходит с отщеплением молекулы HBr.



R — остаток олигонуклеотида.

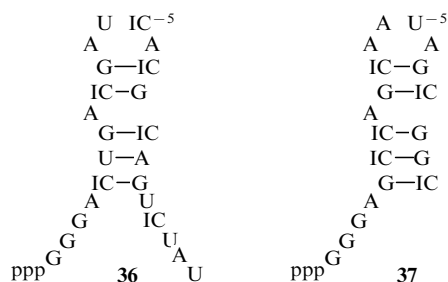
При облучении УФ-светом с длиной волны $\lambda = 254$ нм молекула 5-BrU переходит в высокоэнергетическое синглетное состояние π, π^* , что приводит к расщеплению связи C–Br с образованием свободных радикалов U[•] и атома Br. Высокоактивный радикал U[•] либо реагирует с реакционноспособными группами ближайшего окружения (в том числе и с образованием ковалентной связи с аминогруппами белка) или переходит в триплетное состояние $^3\pi, \pi^*$.²⁹

В работе³⁰ для изучения ковалентно связанных комплексов ряда факторов транскрипции гена альбумина (HNF1, APF, vAPF, α 1TEB, HPI) с промоторными участками этого гена использовали синтетические аналоги промоторного участка ДНК, содержащие несколько остатков 5-BrdU. В задачу исследования входило также выявление полипептидных цепей, участвующих в комплексообразовании vAPF и APF, и нуклеотидных остатков, вовлеченных во взаимодействие с белком. Комплексы производных ДНК с белками облучали светом с длиной волны $\lambda = 312$ нм. После анализа продуктов ковалентного присоединения было установлено, что точки контактов ДНК–белок расположены несимметрично на псевдопалиндромном участке узнавания: нуклеотиды, играющие решающую роль в узнавании, расположены в центре псевдопалиндромной последовательности, но внутри участка узнавания есть и другие контакты белка с несколькими нуклеотидами.

Для изучения образования ковалентно связанных комплексов белка оболочки с оператором транскрипции бактериофага R17 (R17 РНК) и определения аминокислотного остатка, участвующего в образовании ковалентной связи, было предложено использовать синтетический аналог R17 РНК, содержащий в положении (–5) остаток 5-BrU (соединение 30).²⁵ Комплекс соединения 30 с белком оболочки облучали светом с длиной волны $\lambda = 308$ нм в течение 5 мин. После этого концентрацию белка увеличивали и комплекс повторно облучали 5 мин. Эффективность образования ковалентно связанного комплекса составила 22%. Аминокислотный остаток, участвующий в образовании ковалентной связи, был идентифицирован как Tyr85. Показано,²⁵ что при использовании белка, в котором Tyr85 заменен на остаток Ser, ковалентно связанный комплекс не образуется. Эти данные хорошо согласуются с описанным выше механизмом фотоиндуцируемого взаимодействия производных олигонуклеотидов, содержащих 5-BrU, с аминокислотными остатками белка, согласно которому при облучении светом с длиной волны $\lambda = 308$ нм производные

5-BrU образуют ковалентные связи только с ароматическими аминокислотами.²⁹

Ранее было установлено,³¹ что производные олигонуклеотидов, содержащие остатки 5-IU, являются более эффективными реагентами для ковалентного присоединения к белкам, чем аналогичные соединения, содержащие остатки 5-BrU. Эффективность ковалентного фотоприсоединения иодсодержащих реагентов, как правило, в 3–5 раз выше, чем их бромсодержащих аналогов. В связи с этим авторы работы²⁶ заменили в соединении 30 остаток 5-BrU в положении (–5) на остаток 5-IC. Для демонстрации специфичности образования ковалентно связанного комплекса в различные позиции РНК 36 были введены пять дополнительных остатков 5-IC.



Комплекс белка оболочки с соединением 36 облучали УФ-светом ($\lambda = 325$ нм) в течение 2 ч. Эффективность ковалентного присоединения составила 75–95%. При этом образование ковалентно связанного комплекса сопровождалось частичным расщеплением цепи РНК. При использовании аналогичной РНК, не содержащей остатка 5-IC в позиции (–5) (соединение 37), ковалентно связанный комплекс РНК–белок не образуется.

Производные олигонуклеотидов, содержащие 4-меркаптоуридин, при облучении светом с длиной волны $\lambda > 300$ нм реагируют по свободнорадикальному механизму с образованием ковалентной связи с реакционноспособными группами белка и НК.³² В случае НК наиболее эффективно связывание осуществляется с ближайшими остатками уридина или аденина. Это обстоятельство позволяет использовать меркаптопроизводные олигонуклеотидов для изучения не только контактов НК–белок, но и НК–НК. Так, для изучения образования ковалентных связей между мРНК и 18S РНК в составе комплекса с 80S рибосомой был синтезирован ряд модельных мРНК, содержащих в различных положениях остатки 4-меркаптоуридина (рис. 1).³³ Синтезированные мРНК содержали кодирующие последовательности глицина и/или триптофана (GGG и ACC соответственно).

Комплекс мРНК с 80S рибосомой облучали УФ-светом с длиной волны $\lambda = 320–365$ нм как в присутствии тРНК^{Gly} и/или тРНК^{Thr}, так и в их отсутствие. Эффективность образования ковалентно связанного комплекса мРНК и 18S РНК зависела от наличия тРНК только для производного мРНК 9' и составляла в присутствии тРНК — 20, а в отсутствие — 40% соответственно. В остальных случаях такой зависимости не наблюдалось. Эффективность ковалентного присоединения составляла 8 и 14% для производных мРНК 8' и мРНК 10 соответственно. Было показано, что ковалентная связь образуется с U630 и U1111/A1112 18S рРНК 80S рибосомы.

Синтетические аналоги НК, содержащие реакционноспособные меркаптогруппы в своем составе, широко используются для изучения структуры и функции рибосом. Так, для исследования участков связывания 5S РНК с 50S-субъединицей рибосомы были синтезированы модельные РНК,³⁴ в которых 18% остатков уридина были статистически заменены на остатки 4-меркаптоуридина. Комплекс 5S РНК с 50S-субъединицей рибосомы облучали светом с длиной волны

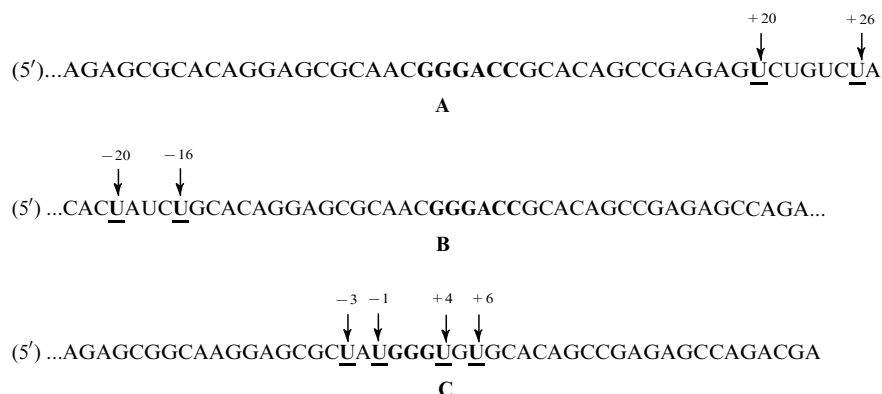


Рис. 1. Модельные мРНК, содержащие остатки 4-меркаптоуридина: А — мРНК 8'; В — мРНК 9'; С — мРНК 10'. Жирным шрифтом выделены кодирующие последовательности, модифицированные основания подчеркнуты.

$\lambda = 300$ нм в течение 10 мин. Выход продукта ковалентного присоединения 5S РНК к 23S РНК рибосомы составил более 75% (структуры образующихся продуктов установлены не были). Показано, что в образовании ковалентной связи принимают участие субъединицы рибосомы U89 5S РНК и U2477 23S РНК 50S.

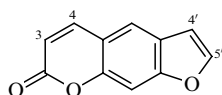
Таким образом, несомненным преимуществом галогено- и меркаптопроизводных НК является сочетание их высокой реакционной способности с возможностью действия на «нулевом» расстоянии, т.е. возможность зондирования непосредственных контактов НК–белок. В то же время высокая реакционная способность интермедиатов может приводить к неспецифической модификации белков и других компонентов клетки, а также к их частичной деградации.²⁶ Кроме того, необходимость дополнительной активации светом определенной длины волны ограничивает применение галогено- и меркаптопроизводных НК *in vivo*.

3. Псораленовые производные нуклеиновых кислот

Производные НК, содержащие в своей структуре остатки псоралена или его производных, являются одними из наиболее эффективных и селективных фотореагентов и в настоящее время находят широкое применение для аффинной модификации НК и изучения их структуры.

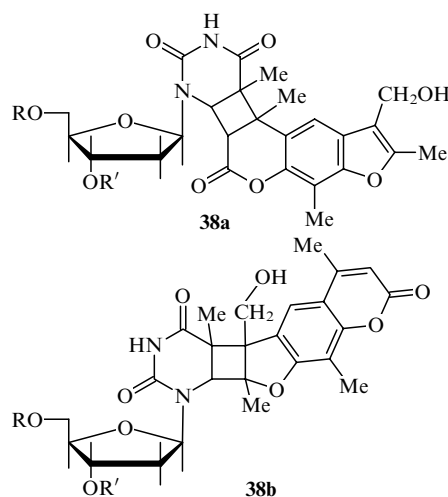
а. Введение псораленовой группировки в олигонуклеотиды

Псоралены (7H-фууро[3,2-g][1]бензопиран-7-оны)[†] представляют собой ароматические соединения, состоящие из трех линейно-конденсированных циклов α -пирона, бензола и фурана и содержат две фотоактивируемые двойные связи: C(3)=C(4) в пирановом кольце и C(4')=C(5') — в фурановом.



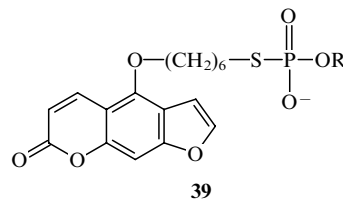
Обе эти связи способны к реакциям циклоприсоединения к C(5)=C(6)-связи тимидина или уридина с образованием циклобутанового кольца при облучении длинноволновым УФ-светом ($\lambda = 300–365$ нм). Так были получены псораленовые производные **38a** и **38b** додекануклеотида, содержащего единственный остаток тимидина.^{35,36}

При фотохимическом введении псоралена реакционноспособные производные получают только в том случае,



R = d(GAAGC); R' = d(ACGAGC).

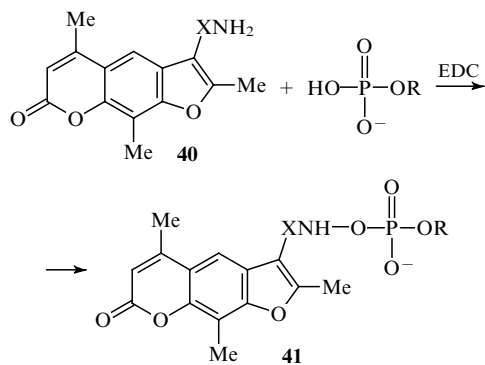
если в реакции с остатком тимидина участвует связь C(4')=C(5') фуранового кольца. При циклоприсоединении тимидина к связи C(3)=C(4) пиранового кольца полученное производное псоралена неспособно к дальнейшему фотохимическому присоединению.³⁷ В связи с этим большее распространение получили методы, основанные на введении псоралена по концевым фосфатным группам олигонуклеотидов, так как при этом остается возможность для последующих модификаций с участием реакционноспособных центров молекулы псоралена. Так, псораленовое производное 16-звенного олигонуклеотида **39** было синтезировано в результате алкилирования его 5'-концевой тиофосфатной группы 5-(ω -иодгексилокси)псораленом.³⁸



R = TTTTCTTTTCCCCCT.

4'-Аминоалкиламино-4,5',8-триметилпсорален (**40**) был присоединен к 5'-фосфатной группе метилфосфонатного аналога олигонуклеотида с использованием 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимида (КДИ) в качестве активирующего агента.³⁹

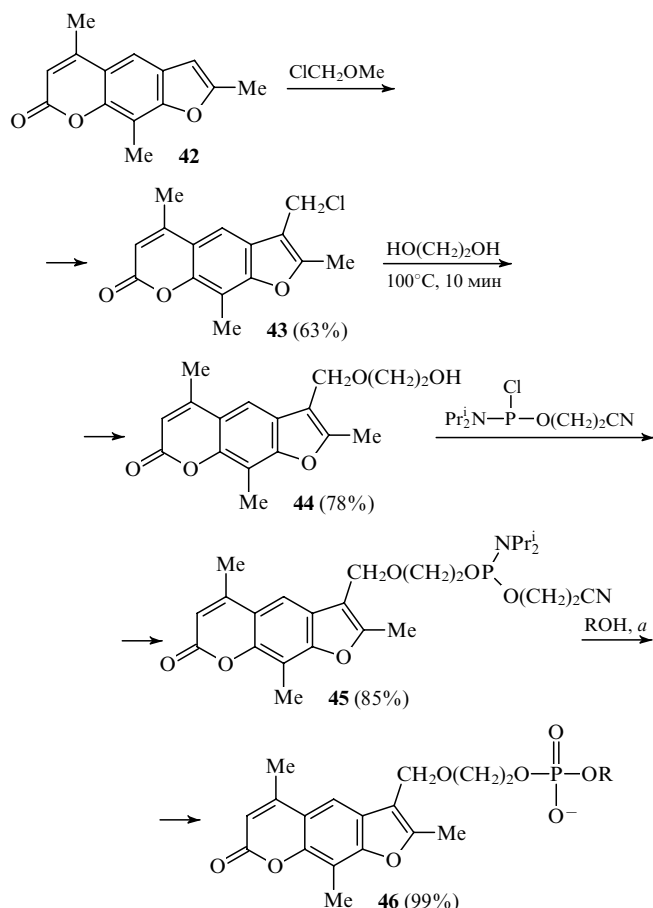
[†] Далее в тексте приводятся названия, принятые в оригинальных работах.



X = NH-CH₂, NH-(CH₂)_n-NHCH₂, n = 2, 4; R — метилфосфонатный аналог олигодезоксирибонуклеотида;
EDC = EtN=C=N(CH₂)₂CHNMe₂.

Реакцию проводили в лутидин-гидрохлоридном буфере (pH 7.5) 14 ч при 20°C. Выход соединения **41** составил 85%.

Присоединение псоралена к 5'-концу олигонуклеотида может происходить также в процессе твердофазного олигонуклеотидного синтеза. Так, в работе⁴⁰ остаток 4,5',8-триметилпсоралена (**42**) вводили в олигонуклеотид в процессе амидофосфитного синтеза, используя на последней стадии β-цианоэтил-*N,N*-диизопропиламинофосфит псоралена **45**.

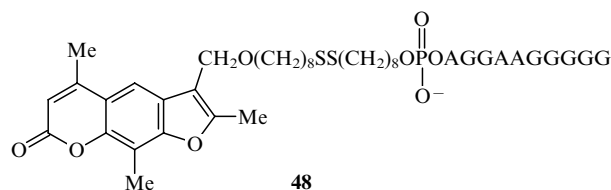
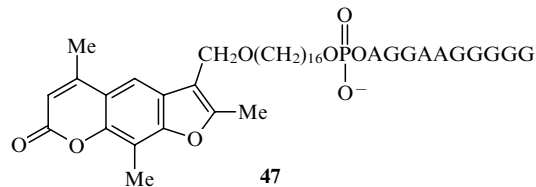


a) 1. тетразол; 2. I₂; 3. NH₃, 55°C, 6 ч;
R = d(TAGCCGCTATCGGTTAGT).

На первой стадии проводили хлорметилирование 4,5',8-триметилпсоралена (**42**) метилхлорметилловым эфиром. Затем в полученное соединение **43** вводили линкерную группу. Фосфитирование 4'-(2-гидроксиэтоксиметил)-4,5',8-триметилпсоралена **44** с помощью β-цианоэтил-*N,N*-диизопропиламинохлорфосфита проводили в присутствии

диизопропилэтиламина при 20°C в течение 30 мин. Псораленовое производное олигонуклеотида **46** синтезировали на автомате-синтезаторе ДНК, используя стандартную амидофосфитную схему синтеза. Амидофосфит псоралена **45** вводили в 5'-конец олигонуклеотида на последней стадии синтеза. После окисления и снятия защитных групп концентрированным раствором аммиака было получено 5'-псораленовое производное **46** с выходом 99%.

Аналогичная стратегия была использована⁴¹ для получения производных олигонуклеотидов **47** и **48**.



Соединение **48**, содержащее дисульфидную связь, было синтезировано с использованием тиолсодержащего амидофосфита, который был введен в автоматический олигонуклеотидный синтез перед добавлением производного псоралена.

Таким образом, псораленовые производные НК могут быть получены как в результате фотохимического циклоприсоединения молекулы псоралена к гетероциклическим основаниям НК, так и путем химического присоединения производных псоралена по концевым фосфатным группам НК. Последний метод получил в настоящее время более широкое распространение, поскольку в этом случае полностью сохраняется способность псоралена к последующему фотохимическому присоединению. Кроме того, при фотохимической модификации псораленом гетероциклических оснований НК *N*-гликозидная связь становится более лабильной, что в некоторых случаях может привести к деструкции полинуклеотидной цепи.

б. Ковалентное присоединение псораленовых производных олигонуклеотидов к биополимерам

Псораленовые производные олигонуклеотидов используются прежде всего для направленной модификации нуклеиновых кислот. Детальное изучение реакций ковалентного присоединения псораленсодержащих олигонуклеотидов к комплементарным участкам НК было проведено в работе³⁵. Для этой цели использовали додекануклеотид GAAGCT*ACGAGC, содержащий остаток псоралена, присоединенный к тимидину как по пирановому, так и по фурановому циклам (соединения **38a** и **38b** соответственно). Модифицированные олигонуклеотиды **38a** и **38b** гибридизовали с комплементарной матрицей и облучали монохроматическим светом с различными длинами волн. Было показано, что при облучении комплекса НК с олигонуклеотидом **38a** светом в широком диапазоне длин волн происходит в основном отщепление остатка 4'-гидроксиметил-4,5',8-триметилпсоралена. Образование ковалентной связи между комплементарными олигонуклеотидами в этом случае проходит с крайне низкой эффективностью. При облучении комплементарного комплекса НК с олигонуклеотидом **38b** светом с длиной волны λ < 313 нм одновременно происходит отщепление остатка псоралена и образование ковалентной связи олигонуклеотид–НК. При облучении светом с длиной волны λ > 313 нм в последнем случае с высокой

эффективностью образуется ковалентно связанный комплекс олигонуклеотид–НК, причем отщепления псораленового производного в этом случае не наблюдается. Полученные результаты согласуются с данными по устойчивости моноаддукта псоралена с тимидином. Показано, что при облучении светом с длиной волны $\lambda < 313$ нм, псораленовое производное тимидина по фурановому циклу (типа **38b**) более устойчиво, чем аналогичное производное (типа **38a**) по пироновому циклу. Введение псораленового производного тимидина в состав олигонуклеотида лишь незначительно повышает устойчивость моноаддукта к фоторасщеплению.⁴²

Описано использование псораленовых производных олигонуклеотидов для изучения транскрипции ДНК РНК-полимеразой *E. coli*.³⁶ 4'-(Гидроксиэтоксиметил)-4,5',8-триметилпсорален вводили в одну из цепей 140-звенного ДНК-дуплекса, содержащего промотор РНК-полимеразы *E. coli*. При облучении светом с длиной волны $\lambda = 320–380$ нм псорален, введенный по определенному остатку тимидина в одну из цепей дуплекса, взаимодействовал с ближайшим остатком тимидина комплементарной цепи. Выход ковалентно связанного ДНК-дуплекса составил 80%. Было показано, что транскрипция ковалентно связанного ДНК-дуплекса блокируется на расстоянии одного нуклеотида от места создания ковалентной связи.

Метилфосфонатные аналоги олигонуклеотидов, имеющие на 5'-конце производные псоралена, присоединенные к фосфатной группе олигонуклеотида через различные спейсерные группы, были использованы для ковалентного присоединения к двум 35-звенным дезоксирибонуклеотидам.³⁹



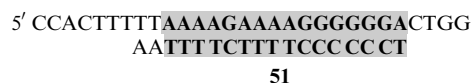
X = NHCH₂, NH(CH₂)_nNHCH₂, n = 2, 4;

Ps — остаток 4,5',8-триметилпсоралена. Подчеркнуты фрагменты олигонуклеотидов, содержащие метилфосфонатные межнуклеотидные группы.

Ковалентно связанный комплекс получали при облучении дуплексов **49** и **50** светом с длиной волны $\lambda = 365$ нм в течение 20 мин при 4°C. Выход продуктов фотоприсоединения сильно зависел от длины спейсерного звена и достигал максимальных значений при n = 4 (75 и 80% для системы **49** и **50** соответственно). Исследование температурной зависимости реакции фотоприсоединения показало, что эффективность образования ковалентно связанных ДНК-дуплексов зависит от прочности образующегося комплементарного комплекса. При облучении продуктов фотоприсоединения светом с длиной волны $\lambda = 254$ нм происходит расщепление ковалентно связанных ДНК-дуплексов с образованием исходных соединений. На основании этих результатов было сделано предположение, что ковалентное присоединение модифицированных олигонуклеотидов происходит в результате образования циклобутанового кольца между связью C(5)–C(6) тимина и связью C(3)–C(4) пиренового кольца псоралена. Аддукт с фурановым кольцом псоралена, по-видимому, не образуется в силу стерических затруднений.

Псорален, присоединенный по положению C(5) к концевой фосфатной группе олигонуклеотида, сохраняет способность к образованию бисаддукта. Поэтому псораленовые производные олигонуклеотидов такого типа в составе триплексов могут образовывать ковалентно связанный тройной олигонуклеотидный комплекс. При этом структура триплекса стабилизирована за счет интеркаляции остатков псоралена в двойную спираль ДНК. Так, псораленовое производное 16-звенного гомопиримидинового олигонук-

леотида **39** было использовано для ковалентного присоединения к двухспиральному участку ДНК провируса иммунодефицита человека **51**³⁸ (жирным шрифтом выделен участок, на котором происходит образование триплексной структуры).



Последовательность **51** содержит участок узнавания эндонуклеазы рестрикции *DraI* (TTTAAA), перекрываемый двумя или тремя нуклеотидами при образовании триплекса с олигонуклеотидом **39**. Плазмиды pLTR и pBT1, содержащие одну или соответственно две копии последовательности **51**, инкубировали с олигонуклеотидом **39** с последующим облучением УФ-светом с длиной волны $\lambda > 310$ нм. Фотомодифицированные плазмиды были использованы в качестве субстратов фермента рестрикции *DraI*. Оказалось, что фотомодификация псораленовым производным **39** селективно ингибирует ферментативное расщепление в участке, перекрывающемся триплексной структурой.

Способность псораленовых производных олигонуклеотидов к образованию ковалентно связанных триплексных структур применена для сайт-специфического введения мутаций в клетки животных с целью изучения механизма их репарации.⁴¹ Для этого было проведено сравнение частоты и спектра мутаций, возникающих в результате действия псораленовых производных олигонуклеотидов в клеточных линиях с различными нарушениями процесса репарации (вариант *xeroderma pigmentosum* (XPV) и линии группы A *xeroderma pigmentosum* (XPA)) с нормальными клетками и клетками *Fanconi anemia* (FA). Исследования проводили с использованием соединений **47** и **48**, способных к образованию триплексов с участком 167–176 гена *supF*. Необходимо отметить, что в соединении **48** остаток псоралена соединен с олигонуклеотидом дисульфидной связью, которую можно расщепить действием дитиотреита. Это позволяет исследовать мутагенез в отсутствие адресующей олигонуклеотидной части зонда. Триплексную структуру соединения **47** (или **48**) с геном *supF* в составе вектора pSP189 облучали длинноволновым УФ-светом или светом видимого диапазона. При УФ-облучении ковалентно связанный триплекс был получен с выходом 65%. При облучении видимым светом выход продукта составил не более 1%. Было показано, что ковалентная связь образуется между 166 и 167 остатками тимидина. Модифицированный таким образом вектор ДНК был трансформирован в соответствующие культуры клеток человека. В результате анализа мутагенеза в линии XPV была обнаружена необычно высокая частота мутаций (более 30%) с уникальным спектром, отличающимся от спектра мутаций в XPA, FA или в нормальных клетках. На основании полученных данных авторы работы⁴¹ считают, что такой подход может быть полезен для характеристики дефектов репарации в клетках XPV и для других генетических исследований в клетках человека.

Реакционноспособное производное олигонуклеотида **46**, модифицированное по 5'-концу 4'-гидроксиэтоксиметил-4,5',8-триметилпсораленом, было использовано для получения ковалентно связанного ДНК-дуплекса в составе комплементарного комплекса **52**. Ковалентно связанный ДНК-дуплекс получен с выходом 75% при УФ-облучении ($\lambda = 350$ нм) комплекса **52** при 20°C.⁴⁰



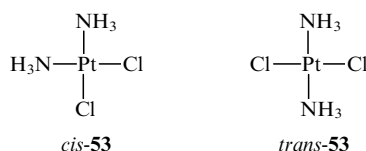
X — 4'-гидроксиэтоксиметил-4,5',8-триметилпсорален.

Гликозидная связь нуклеотида, участвующего в образовании ковалентной связи псораленовых производных олигонуклеотидов с НК, становится более лабильной. Это свойство было использовано в работе³⁵ для сайт-специфического расщепления ДНК. При этом место расщепления в основном определялось длиной спейсерной группы между остатком псоралена и концом олигонуклеотида.

Таким образом, благодаря своей способности к селективному циклоприсоединению по остаткам тимидина или уридина псораленовые производные НК активно используются для изучения структуры и функций нуклеиновых кислот. Возможность получения бисаддуктов позволяет их применять также для изучения механизма образования триплексных структур.

III. Pt-Содержащие производные нуклеиновых кислот

Для создания Pt-содержащих производных олигонуклеотидов широко используются *цис*- (цисплатин, *цис*-**53**) и *транс*-диаминодихлорплатины(II) (*транс*-**53**) и ее аналоги.



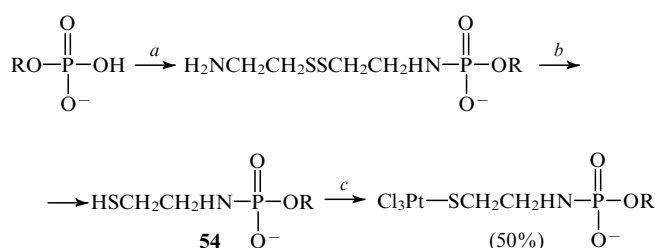
Как известно, реагенты на основе цисплатина, в отличие от *транс*-изомеров, имеют терапевтическое применение и являются эффективными противоопухолевыми препаратами.⁴³ В последние годы большое количество исследований посвящено изучению особенностей взаимодействия *цис*- и *транс*-изомеров диаминодихлорплатины(II) с двухспиральными последовательностями ДНК.

При взаимодействии с ДНК-дуплексами бифункциональные соединения платины, такие как *цис*- и *транс*-**53**, способны к образованию ковалентных связей как между соседними основаниями одной цепи, так и между пространственно сближенными основаниями комплементарных цепей дуплекса. В случае использования *цис*-**53** преимущественно образуется ковалентная связь между двумя соседними остатками гуанина, либо аденина и гуанина одной цепи, а также, в незначительных количествах, между двумя остатками гуанина одной цепи, разделенными одним нуклеотидом, и между сближенными остатками гуанина комплементарных цепей. При действии *транс*-**53** в основном происходит образование ковалентных связей между сближенными остатками гуанина и цитидина комплементарных цепей и, в меньшей степени, между двумя остатками гуанина одной цепи, разделенными одним нуклеотидом. Различие во взаимодействии *цис*- и *транс*-стереоизомеров диаминодихлорплатины(II) с ДНК приводит к изменению конформации модифицированных ДНК-дуплексов. В свою очередь, это влияет на связывание таких дуплексов с ДНК-узнающими белками.⁴⁴ Недавно было показано,^{44,45} что некоторые белки нуклеинового обмена хорошо узнают ДНК с ковалентными связями, индуцированными *цис*-**53**. В то же время ДНК с ковалентными связями, индуцированными обоими изомерами, узнается этими белками гораздо менее эффективно.

На основании этих исследований можно предположить, что различия в конформационных состояниях нативных клеточных ДНК, возникающие в результате взаимодействия *цис*- и *транс*-изомеров диаминодихлорплатины(II), играют определяющую роль в терапевтической эффективности этих соединений как противоопухолевых препаратов.

1. Методы введения Pt-содержащих реагентов в олигонуклеотиды

Производные диаминодихлорплатины(II) представляют собой бифункциональные реагенты, способные вступать в реакции с нуклеофилами. Для модификации олигонуклеотидов такими реагентами используются как нуклеофильные центры остатков А, Г и С, так и предварительно введенные в олигонуклеотиды меркаптогруппы. Так, для введения в 16-звенный олигонуклеотид алифатической меркаптогруппы он был обработан цистамином в присутствии *N*-метилимидазола и водорастворимого карбодимида с последующим восстановлением образующегося соединения дитиотреитом.⁴⁶ Взаимодействие соединения **54** с K_2PtCl_4 в водной среде при pH 7–8 приводило к реакционноспособному нуклеотидному производному, содержащему на 5'-конце спейсерную 2-тиоэтиламиногруппу. Синтез проводили по следующей схеме:

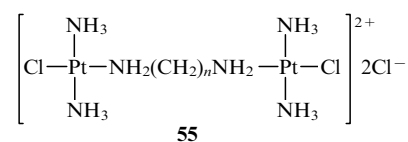


R — остаток олигонуклеотида;

a) $[\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{S}]_2$, N^{Me} , EDC; b) $[\text{HSCCH}_2\text{CH}(\text{OH})]_2$;

c) K_2PtCl_4 , pH 7–8, 20°C, 2 ч.

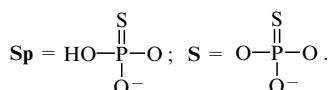
Биядерный комплекс Pt **55** был использован для модификации олигонуклеотидов **56–59**, содержащих 5'-концевую или межнуклеотидную тиофосфатные группы.⁴⁷



$n = 4, 5, 6$.

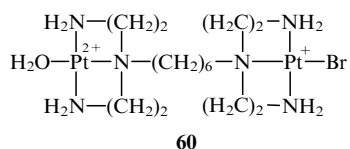
5' SpCCTTTTCCTTCCTTTT **56** 5' CACAATTCSCACACAAAC **57**

5' SpCACAATTCACACAAAC **58** 5' SpGCTCACAATTCACAC **59**

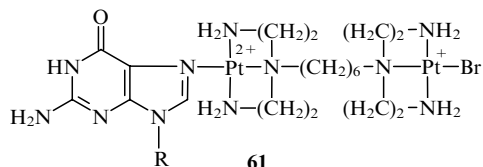


Реакцию между модифицированными олигонуклеотидами **56–59** и соединением **55** проводили в водной среде в присутствии KCN при 37°C в течение 90 или 60 мин. В первом случае образующиеся Pt-содержащие производные олигонуклеотидов использовали для ковалентного присоединения к комплементарным фрагментам ДНК вируса иммунодефицита человека без выделения из реакционной смеси, во втором — их предварительно выделяли диализом.

Аналогично построенный биядерный комплекс **60**, в котором две платины находятся в разном лигандном окружении и сильно различаются по реакционной способности, был предложен⁴⁸ для непосредственной модификации гетероциклических оснований олигонуклеотидов.

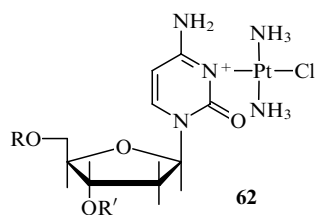


Соединение **60** за счет группы, содержащей Pt^{2+} , наиболее эффективно присоединяется к атому N(7) гуанинового основания с образованием аддуктов типа **61** с практически количественными выходами (H_2O , pH 5.0, 4 ч, 20°C).



Модификации могут также подвергаться нуклеофильные центры остатков аденина и цитозина.

В некоторых случаях для получения моноаддуктов олигонуклеотидов с *транс*-диамминодихлорплатиной соединения платины предварительно (или непосредственно в реакционной смеси, содержащей олигонуклеотидный материал) обрабатывают AgNO_3 в присутствии NaClO_4 (см., например,^{49, 50}). Реакцию проводят в ацетатном буфере (pH 3.6) при 37°C 15–30 мин. При этом диамминодихлорплатина переходит в аквадиамминохлорплатиновое производное $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$. Последнее избирательно модифицирует остатки гуанина олигонуклеотидной последовательности. Платинированные олигонуклеотиды затем выделяют ионообменной хроматографией. В то же время при использовании *цис*-аквадигидроксидиамминохлорплатины (*цис*- $[(\text{NH}_3)_2\text{PtOH}(\text{H}_2\text{O})]$) модификации подвергаются все остатки G, C и A, входящие в состав олигонуклеотида. В этом случае возможно образование ковалентной связи также между нуклеотидами одной цепи. Реагенты, несущие один остаток платины, могут быть получены при использовании олиготимидилатов, содержащих лишь один остаток G, C или A. Так, в результате обработки олиготимидилата с единственным остатком цитидина 10-кратным избытком нитрата *цис*-аквадигидроксидиамминохлорплатины⁵¹ было получено соединение (**62**). Степень превращения исходного олигонуклеотида составила 97–99%.



$\text{R} = \text{d}(\text{TT})$, $\text{R}' = \text{TTTTTTT}$.

Реакцию проводили в водной среде (pH 7.0) при 30°C в течение 24 ч с последующим анализом степени превращения вещества и гомогенности конечного продукта микроколоночной хроматографией. Соединение **62** использовали для модификации ДНК-полимеразы α плаценты человека.

Таким образом, к настоящему времени разработаны методы введения Pt как в гетероциклические основания, так и в заданную позицию сахарофосфатного остова НК. В последнем случае для получения производных платины необходима предварительная стадия введения меркапто-групп в сахарофосфатный остов.

2. Ковалентное присоединение Pt-содержащих производных олигонуклеотидов к биополимерам

Для получения ковалентно связанных комплексов НК–НК или НК–белок во многих случаях используются бифункциональные Pt-содержащие соединения.^{52, 53} Создание на основе соединений Pt олигонуклеотидных производных позволяет значительно повысить эффективность и селективность модификации биополимеров этими реагентами.

Ковалентное присоединение Pt-содержащих производных олигонуклеотидов к биополимерам можно осуществить двумя способами: 1) непосредственным воздействием Pt-содержащих олигонуклеотидов на комплементарные участки НК или ДНК-узнающие белки и 2) обработкой бифункциональными реагентами Pt уже сформированного комплекса биополимера с олигонуклеотидным зондом, содержащим в заданном положении нуклеофильные SH- или NH_2 -группы. Так, при обработке K_2PtCl_4 комплементарного комплекса **63**, сформированного 322-звенной ДНК-мишенью и 16-звенным олигонуклеотидным зондом, несущим на 5'-конце остаток цистамина, образование ковалентного комплекса происходило с эффективностью от 10 до 50% в зависимости от концентрации K_2PtCl_4 .⁴⁶

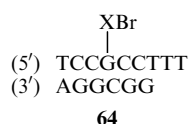


$\text{X} = \text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$.

В процессе реакции координированная с тремя атомами хлора Pt присоединялась к 5'-SH-группе олигонуклеотидного зонда с последующей модификацией ДНК-мишени.

Аналогичная стратегия была использована в работе⁵⁴ для аффинной модификации Pt-содержащими производными олигонуклеотидов факторов транскрипции CREB и JUN. В каждый CRE- и TRE-участок узнавания транскрипционных факторов CREB и JUN ковалентнозамкнутых ДНК-дуплексов были введены шесть тиофосфатных межнуклеотидных групп. Комплексы олигонуклеотидных зондов с соответствующими белками обрабатывали либо K_2PtCl_4 , либо *транс*- или *цис*-диамминодихлорплатиной(II). Эффективность образования ковалентной связи между олигонуклеотидами и белками при взаимодействии K_2PtCl_4 или *транс*-**53** составила от 30 до 50% в зависимости от концентрации реагента; обработка комплекса ДНК–белок *цис*-**53** не приводила к образованию ковалентных связей. При использовании аналогичных олигонуклеотидных зондов, не содержащих межнуклеотидных тиофосфатных групп, эффективность ковалентного связывания была в несколько раз ниже. Авторы работы⁵⁴ полагают, что этот подход может быть применен для выделения ДНК-узнающих белков.

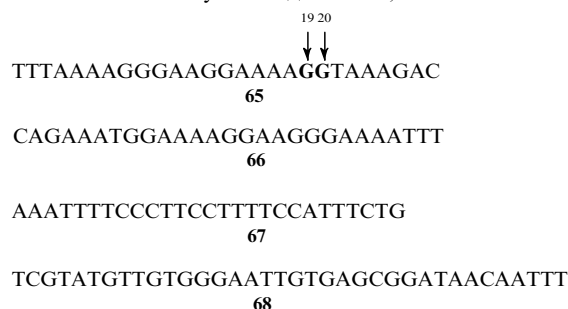
Для модификации комплементарного гексануклеотида GGCGGA в составе двухспирального комплекса **64** был использован Pt-содержащий нонануклеотид **61** ($\text{R} = \text{TCCGCCTTT}$). Выход ковалентно связанного комплекса составил 80%.⁴⁸



В отличие от действия псораленовых производных, платинирование остатков гуанина матричного олигонуклеотида стабилизирует гликозидную связь. Это позволяет, анализируя продукты частичного расщепления матрицы по пурино-

вым основаниям, определить, какие именно остатки гуанина подвергались модификации. Было установлено,⁴⁸ что в образовании ковалентной связи участвует один из двух 5'-концевых остатков гуанина матрицы.

Детальное исследование ковалентного присоединения к комплементарным фрагментам ДНК олигонуклеотидов, модифицированных реагентом **55** по 5'-концевой или между-нуклеотидной тиофосфатным группам, было проведено в работе⁴⁷. Реакцию проводили как в составе ДНК-дуплексов, так и в составе тройных комплексов. Для этой цели были использованы олигонуклеотиды **56**–**59**, а также **65**–**68**.



На примере дуплекса **65**–**56** было показано, что ковалентное присоединение протекает наиболее эффективно (выход 64%) с использованием реагента **55** при $n = 6$. Он был выбран для дальнейших исследований. Реакцию проводили в течение 60 мин при 37°C в присутствии NaClO_4 . Модификации подвергались остатки G^{19} и G^{20} олигонуклеотида **65** (выделен жирным шрифтом). В этих же условиях эффективность образования ковалентной связи в дуплексах **58**–**68** и **59**–**68** была значительно ниже и составила 46 и 41% соответственно. Снижение эффективности образования ковалентно связанных комплексов в этом случае авторы работы⁴⁷ объясняют образованием внутрицепочечных сшивок в олигонуклеотидах **58** и **59**, содержащих пуриновые основания. При использовании олигонуклеотида **57**, идентичного по нуклеотидному составу олигонуклеотиду **58**, но содержащего Pt-реагент внутри цепи (поскольку тиофосфатная группа в этом случае находится в середине сахарофосфатного остова), эффективность ковалентного присоединения снижается до 37%. В данном случае снижение эффективности, по-видимому, связано с тем, что модифицируемое основание принимает участие в комплементарном взаимодействии. Тройной комплекс был сформирован олигонуклеотидами **66**, **67** и Pt-содержащим олигонуклеотидом **56**, в котором все остатки цитидина были заменены на 5-метилцитидин — олигонуклеотид **69**. Такая замена приводит к значительной стабилизации структуры триплекса. В результате реакции (25°C, 60 мин) в этой системе с эффективностью 53–68% происходило ковалентное присоединение олигонуклеотида **69** к обогащенной пуриновыми нуклеотидами цепи **66**. Было показано, что эффективность реакции сильно зависит от стабильности триплексной структуры. Так, увеличение температуры до 37°C приводило к резкому снижению выхода продуктов ковалентного присоединения. Замена олигонуклеотидного зонда **69** на зонд **56** также приводила к снижению выхода до нескольких процентов.

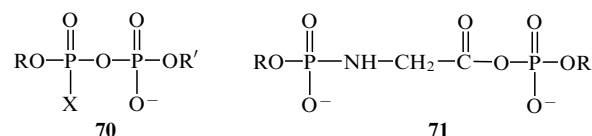
Как видно из приведенных выше данных, наиболее интересна модификация ДНК производными *цис*-диамминодихлорплатины (*цис*-**53**). Однако предпринимаются попытки получения белково-нуклеиновых комплексов, в которых молекулы ДНК модифицированы *транс*-диамминодихлорплатиной (*транс*-**53**). Основной проблемой остается выяснение причины, по которой ДНК, модифицированная *транс*-**53**, плохо узнается ДНК-связывающими белками. Так, из детального исследования⁴⁹ следует, что модификация с помощью *транс*-**53** снижает термическую устойчивость

модифицированных ДНК-дуплексов и вносит значительные искажения в геометрию двойной спирали. Возможно, эти конформационные эффекты являются причиной низких выходов ковалентно связанных комплексов белков с модифицированной *транс*-**53** ДНК.

Таким образом, аффинная модификация биополимеров реагентами на основе Pt может быть осуществлена как при непосредственном воздействии Pt-содержащих производных НК на биополимеры, так и в результате обработки соединениями Pt уже сформированных комплексов НК–НК или НК–белок с использованием производных НК, содержащих SH- или NH_2 -группы. Внимание исследователей в основном сосредоточено на изучении механизма взаимодействия Pt-содержащих производных НК с биополимерами и влияния такого взаимодействия на функциональные свойства последних. Мы полагаем, что исследования в этом направлении позволят расширить сферу применения Pt-содержащих производных НК и откроют новые перспективы их терапевтического использования в системах *in vivo*.

IV. Реакционноспособные производные нуклеиновых кислот, содержащие замещенные пирофосфатные и ацилфосфатную группировки

Новый тип производных олигонуклеотидов, содержащих активные группы в сахарофосфатном остове был разработан и предложен для аффинной модификации белков в конце 80-х годов в лаборатории химии нуклеиновых кислот МГУ.^{55–57} Соединения этого типа содержат замещенные пирофосфатные (**70**) либо ацилфосфатную (**71**) между-нуклеотидные группировки.

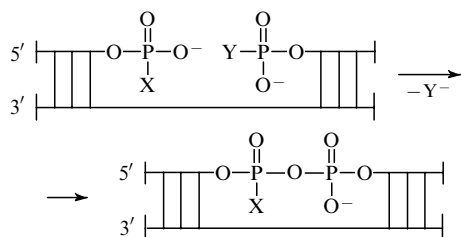


R, R' — остатки олигонуклеотидов; X — остаток алифатического спирта или амина.

Характерными особенностями такого рода соединений являются стабильность в водных растворах в отсутствие сильных нуклеофилов в течение длительного времени без потери активности, способность к взаимодействию с нуклеофильными группами белка на «нулевом» расстоянии в условиях, близких к физиологическим, а также отсутствие необходимости в какой-либо дополнительной активации. В связи с этим такие соединения являются перспективными реагентами для изучения структуры и функций НК-узнающих белков и их аффинной модификации. Кроме того, в перспективе они могут найти применение в сенсоровой биотехнологии и медицине в качестве терапевтических препаратов для лечения генетических, онкологических заболеваний и СПИДа.

1. Направленное введение замещенных пирофосфатных и ацилфосфатной группировок в олигонуклеотиды

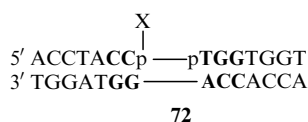
В основе получения фрагментов НК, содержащих в заданном положении сахарофосфатного остова реакционноспособные замещенные пирофосфатные группировки, лежит метод химического лигирования (ХЛ), заключающийся в конденсации двух олигонуклеотидов, концы которых сближены на комплементарной матрице. При этом один из олигонуклеотидов содержит на 3'(5')-концевой фосфатной группе остатки алифатического спирта или амина, а 5'(3')-конец другого — соответственно фосфорилирован.^{55, 58} Реакция протекает по следующей схеме:



X — остаток алифатического спирта или амина;
Y — остаток конденсирующего реагента.

Алкиловые эфиры олигонуклеотидов, используемые в этой реакции, получают либо постсинтетической модификацией 3'-фосфорилированных олигонуклеотидов спиртами под действием конденсирующих реагентов,⁵⁹ либо в процессе автоматического синтеза олигонуклеотидов.⁶⁰ Амиды олигонуклеотидов обычно получают постсинтетической модификацией 3'-фосфорилированных олигонуклеотидов аминами под действием конденсирующих реагентов.⁵⁹

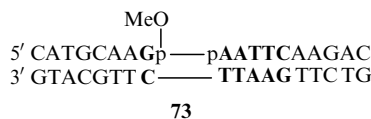
Метод ХЛ был использован для получения олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих *O*-этил- или *N*-алкилзамещенные пирофосфатные группировки.⁵⁵ Исследования выполнены на системе **72**, содержащей участок узнавания ферментов рестрикции/модификации *EcoRII*, *SsoII* и *MvaI* (выделен жирным шрифтом).



X = OEt, NH(CH₂)₃Me, NHCH₂COOEt, —N—.

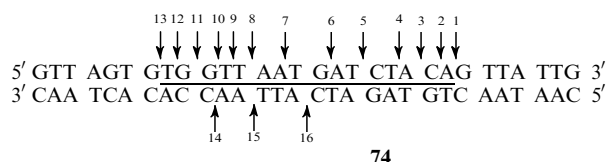
Для синтеза соединений с замещенной пирофосфатной группой использовали два метода активации фосфата: действием КДИ или действием *N*-гидроксibenзотриазоловых эфиров. Наиболее эффективно реакция протекает при использовании в качестве конденсирующего агента КДИ. Выходы продуктов ХЛ в этом случае составляли 35–80% в зависимости от природы ненуклеотидного заместителя. При использовании триазоловых эфиров выходы снижались до 10–15%.

Аналогично были получены реакционноспособные ДНК-дуплексы **73**, содержащие *O*-метилзамещенную пирофосфатную группировку в участке узнавания ферментов рестрикции — модификации *EcoRI* и *RsrI*⁵⁶ (выделен жирным шрифтом).



В качестве ненуклеотидного заместителя в данном случае была использована метоксигруппа, поскольку она вносит наименьшее искажение в геометрию двойной спирали. Это важно для последующего изучения взаимодействия модифицированных ДНК-дуплексов с белками. Модифицированный олигонуклеотид, содержащий *O*-метилзамещенную пирофосфатную группировку, был получен с выходом 25–30%.

Для зондирования контактов ДНК с транскрипционным фактором HNF-1 был синтезирован ряд ДНК-дуплексов **74**, содержащих *O*-метилзамещенную пирофосфатную группировку в различных положениях участка узнавания HNF-1⁶¹ (участок узнавания HNF-1 отмечен прямой линией). Положение модифицированной группы указано стрелками).

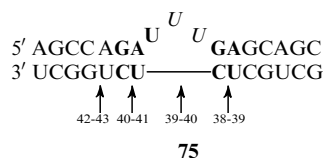


74

Активную группировку вводили методом ХЛ как в верхнюю, так и в нижнюю цепь дуплексов. При этом каждый модифицированный дуплекс содержал только одну замещенную пирофосфатную группу. Выход продуктов ХЛ в среднем составил 15%.

Метод ХЛ был также использован для введения замещенной пирофосфатной группы в ДНК-дуплексы другой длины и состава.^{58, 62}

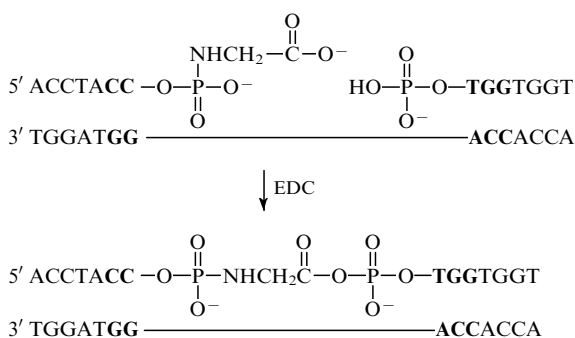
Введение замещенной пирофосфатной группировки в структуру РНК было впервые описано в работе⁶³. Для изучения взаимодействий TAR РНК с Tat-белком ВИЧ-1 был получен ряд РНК-дуплексов **75**, содержащих активную группу в различных положениях участка узнавания Tat-белка (участок узнавания выделен жирным шрифтом, положение активной группы показано стрелками).



75

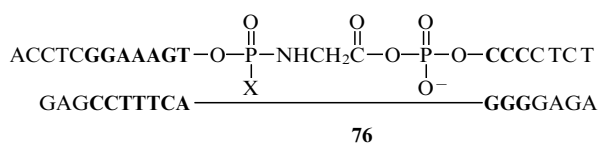
Поскольку эффективность ХЛ олигорибонуклеотидов оказалась крайне низкой (1–2%), для введения замещенной пирофосфатной группы в РНК-дуплексы были использованы олигорибонуклеотиды, содержащие на 3'-конце остаток 3'-*O*-алкилфосфат-2'-дезоксисуридина. Кроме того, лигирование проводили на олигодезоксирибонуклеотидной матрице. Затем модифицированную цепь выделяли и для получения РНК-дуплексов добавляли эквимольное количество комплементарного олигорибонуклеотида. Продукты ХЛ были получены с выходами от 35 до 55%.

Аналогичным образом в структуру дуплекса вводили ацилфосфатную межнуклеотидную группу в результате ХЛ, но с использованием модифицированного олигонуклеотида, содержащего на 3'-конце остаток глицина.⁵⁷



Модифицированный олигонуклеотид, содержащий остаток глицина, получали прямой конденсацией гептануклеотида ACCTACCp с этиловым эфиром глицина под действием КДИ с последующим омылением сложноэфирной связи. Конденсацию олигонуклеотидов в ДНК-дуплексе также проводили под действием КДИ. Выход продукта ХЛ составил 24%.

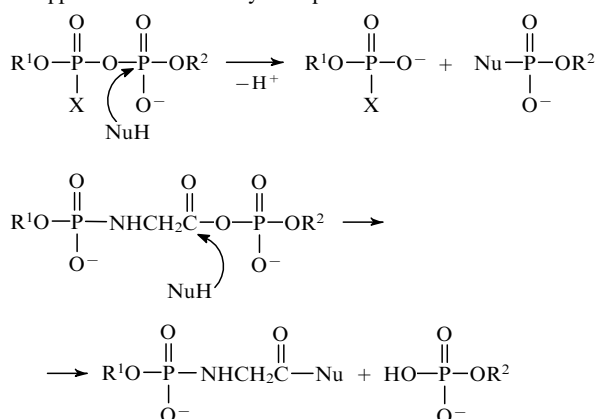
Этот же метод был использован для получения ДНК-дуплекса **76**, содержащего в участке узнавания NF-kB (kB-участок выделен жирным шрифтом) реакционноспособную ацилфосфатную группировку.⁶⁴



Исходный олигонуклеотид, модифицированный по 3'-концевой фосфатной группе остатком глицина, был получен с использованием *N*-оксибензотриазоловых эфиров.⁵⁹

2. Аффинная модификация НК-специфичных белков с использованием фрагментов нуклеиновых кислот, содержащих замещенные пирофосфатные, либо ацилфосфатную межнуклеотидные группировки

Исследование свойств реакционноспособных производных НК, содержащих замещенные пирофосфатные или ацилфосфатные группировки, показало, что модифицированная группа в составе таких соединений устойчива в водных буферных растворах в отсутствие сильных нуклеофилов при pH 6.00–8.75. В то же время без какого-либо дополнительного воздействия она легко и количественно расщепляется под действием первичных и вторичных аминов, включая нуклеофильные аминокислоты белка. При этом расщепление модифицированной группировки сопровождается переносом фрагмента НК на нуклеофил.^{55, 57}



X — остаток алифатического спирта или амина; R¹, R² — остатки олигонуклеотидов.

Благодаря своей способности к образованию ковалентной связи с нуклеофильными аминокислотными остатками НК-узнающих белков такие соединения успешно применяются в настоящее время для изучения ферментов нуклеинового обмена, а также для аффинной модификации и зондирования участков связывания факторов транскрипции. Так, реакционноспособный ДНК-дуплекс **73** использовали для аффинной модификации ферментов рестрикции/модификации *R.EcoRI*, *R.RsrI*, *M.EcoRI* и *M.RsrI*.⁵⁶ Комплекс белка с модифицированным субстратом инкубировали при 25–37°C в течение 20–24 ч. Максимальные выходы ковалентно связанных комплексов наблюдались для метилтрансфераз *M.EcoRI* и *M.RsrI* (40 и 30% соответственно). Было установлено, что ковалентная связь между остатком олигонуклеотида и белком имеет фосфоамидную природу.

Аффинная модификация фермента эндонуклеазы рестрикции *EcoRII* (*R.EcoRII*) реакционноспособным ДНК-дуплексом **72** была осуществлена Шабаровой с соавт.⁶⁵ Дуплекс **72**, содержащий *O*-этилзамещенную пирофосфатную группу в участке узнавания *R.EcoRII*, инкубировали с этим ферментом 18 ч при 37°C. Реакцию проводили в водных буферных растворах, один из которых содержал *N*-метилимидазол, поскольку этот реагент может катализировать реакции нуклеофильного замещения, протекающие в водной среде.⁶⁶ Эффективность ковалентного присоединения моди-

фицированного дуплекса **72** к *R.EcoRII* в присутствии *N*-метилимидазола составила 15%. В то же время выход продукта ковалентного присоединения в буфере, не содержащем *N*-метилимидазола, не превышал 1%. Этот результат подтверждает каталитическую роль *N*-метилимидазола в реакциях нуклеофильного замещения в водной среде, протекающих с участием олигонуклеотидов.⁵⁶

Зондирование активного центра фактора транскрипции HNF-1 было проведено в работе⁶¹ с использованием набора ДНК-дуплексов **74**, содержащих *O*-метилзамещенную пирофосфатную группировку в различных положениях (1–16) участка узнавания HNF-1. Исследования проводили как с белком, полученным генно-инженерным путем и представляющим собой ДНК-связывающий домен HNF-1, так и с белками ядерного экстракта из печени крысы. Модифицированные субстраты инкубировали с белком или с ядерным экстрактом при 4°C, а также при 20°C в течение 10 мин или 12 ч. В результате реакции ковалентно связанный комплекс был получен как для ДНК-связывающего домена HNF-1, так и для HNF-1 из ядерного экстракта. При этом образование комплекса наблюдалось только для ДНК-дуплекса, содержащего активную группировку в позиции 10. Выход продукта ковалентного присоединения составил 40% от эффективности нековалентного связывания. Впервые было показано, что ковалентное связывание модифицированного субстрата с HNF-1 из ядерного экстракта происходит специфично, при этом модификация других компонентов ядерного экстракта не происходит. Этот результат открывает перспективы применения олигонуклеотидов с замещенными пирофосфатными группами в системах *in vivo* и создания на их основе терапевтических препаратов нового поколения.

Соединения, содержащие замещенную пирофосфатную группировку, были также использованы для определения положения контактов фактора транскрипции NF-κB с ДНК.⁵⁸

Для аффинной модификации биополимеров в качестве реакционноспособных производных могут применяться также дуплексы РНК, содержащие замещенные пирофосфатные группировки. Так, было изучено⁶³ взаимодействие модельных дуплексов РНК TAR **75** с Tat-белком и Tat-пептидом (37–72) ВИЧ-1. Комплекс РНК–белок инкубировали в течение 18–24 ч при 10°C. Ковалентное связывание с Tat-пептидом (37–72) наиболее эффективно происходило при использовании РНК-дуплекса, содержащего модифицированную группировку в позиции 38–39. Выход продукта в этом случае составил ~50%. В результате анализа комплекса было показано, что в образовании ковалентной связи участвует Lys⁵¹ основного региона Tat-пептида.

Недавно появилось первое сообщение⁶⁴ об успешном использовании ДНК-дуплекса, содержащего ацилфосфатную группировку, для аффинной модификации субъединицы p50 NF-κB. Для ковалентного присоединения к белку был использован ДНК-дуплекс **76**, содержащий реакционноспособную ацилфосфатную группировку в положении 6 kV-участка. Эффективность ковалентного присоединения составила 10%. Соединения, содержащие ацилфосфатные группы, являются ацилирующими реагентами.⁵⁷ Ковалентная связь, образующаяся в результате взаимодействия этих реагентов с нуклеофильными аминокислотами белка, имеет амидную природу и, в отличие от фосфоамидной связи, относительно устойчива в кислых средах. Использование производных НК с ацилфосфатной группировкой для аффинной модификации ДНК-узнающих белков может существенно облегчить процедуру выделения белково-нуклеиновых комплексов и последующую идентификацию аминокислот, взаимодействующих с активной группой.

Таким образом, реакционноспособные производные НК, содержащие замещенные пирофосфатные или ацилфосфатные группировки, в настоящее время успешно применяются для изучения взаимодействий НК–белок. Вместе с тем

следует отметить, что введение этих групп в сахарофосфатный остов нуклеиновых кислот приводит к увеличению длины межнуклеотидной связи, что в свою очередь может приводить к снижению эффективности связывания с белком.⁶¹ Этого можно избежать при использовании НК-дуплексов, содержащих активные группировки в других положениях участка связывания белка.⁶¹

V. Перспективы использования реакционноспособных производных нуклеиновых кислот как реагентов для направленной модификации биополимеров *in vivo*

Одним из наиболее интересных аспектов применения реакционноспособных производных олигонуклеотидов является создание на их основе противовирусных и противоопухолевых препаратов, действие которых основано на ингибировании экспрессии генетического материала вирусов или онкогенных клеток. Способность реакционноспособных производных олигонуклеотидов ковалентно связываться с белками нуклеинового обмена может приводить к ингибированию действия последних и таким образом оказывать направленное влияние на экспрессию генетического материала. Так, было показано,⁶⁷ что тРНК^{Lys} человека, содержащая остатки 4-меркаптоуридина, эффективно взаимодействует с обратной транскриптазой ВИЧ с образованием ковалентно связанного комплекса. В результате такого взаимодействия в обратной транскриптазе блокируется регион, ответственный за инициацию обратной транскрипции ВИЧ.

Наибольший интерес представляет использование реакционноспособных производных олигонуклеотидов в системах *in vivo*. Первые исследования в этом направлении показали, что существует ряд ограничений, связанных со слабой проницаемостью этих реагентов через клеточную мембрану и их чувствительностью к действию клеточных экзонуклеаз. Кроме того, одной из проблем остается возможность неспецифической модификации этими реагентами различных функциональных компонентов клеточных структур.⁶⁸ Увеличить проницаемость удастся за счет использования гидрофобных производных олигонуклеотидов (см., например,⁶⁹). Для стабилизации фрагментов ДНК в клетке в настоящее время применяют несколько подходов, например, конструирование ковалентно замкнутых ДНК-дуплексов типа гантелей,⁷⁰ циклических ДНК,⁷¹ а также ДНК-дуплексов с ковалентно связанными цепями.⁷²

Существенным ограничением применения *in vivo* широкого ряда производных олигонуклеотидов, содержащих активные группы, является необходимость дополнительного воздействия (облучение УФ-светом, нагревание, обработка химическими реагентами) для их активации. Учитывая эти факторы, можно предположить, что наиболее перспективными реагентами для применения *in vivo* являются производные платины и реакционноспособные производные НК, содержащие замещенные пирофосфатные либо ацилфосфатные группировки. Эти соединения не требуют дополнительной активации, достаточно хорошо изучены механизмы их взаимодействия с НК-узнающими белками, а также имеются данные по их использованию в экстракте ядер клеток.^{54, 61} Однако следует отметить, что модификация белков Рт-производными олигонуклеотидов в ядерном экстракте не во всех случаях протекает специфично.⁵⁴ К тому же она малоэффективна без использования меркаптопроизводных НК. В то же время в работе⁶¹ было продемонстрировано, что модификация фактора транскрипции HNF-1 в ядерном экстракте из печени крысы протекает высокоспецифично и эффективно. Это дает основания полагать, что такие соединения будут перспективны для использования *in vivo*. Возможно, с целью

повышения их устойчивости к действию клеточных экзонуклеаз будет необходимо изменить их структуру, например, сконструировать на их основе ковалентно замкнутые ДНК-дуплексы или синтезировать ДНК-дуплексы с ковалентно связанными цепями. Методы синтеза таких соединений уже разработаны,^{73–75} и в настоящее время получены первые положительные результаты по использованию таких структур с замещенными пирофосфатными группами для аффинной модификации белков нуклеинового обмена.⁷⁶

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

Авторы благодарят ведущего научного сотрудника Института биоорганической химии им. Шемякина и Овчинникова д.х.н. В.К.Потапова за помощь при написании обзора и сделанные им ценные замечания и дополнения.

Литература

1. Д.Г.Кнорре, В.Ф.Зарытова, А.Г.Бадашкеева, О.С.Федорова. В кн. *Биотехнология. Т.37. (Итоги науки и техники)*. Изд-во ВИНТИ, Москва, 1991. С.1
2. D.G.Knorre, V.V.Vlasov, V.F.Zarytova, A.V.Lebedev, O.S.Fedorova. In *Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994. P.366
3. L.A.Sylvers, J.Wower. *Bioconjug. Chem.*, **4**, 411 (1993)
4. D.R.Tabatadze, M.I.Dobrikov, A.S.Levina, T.A.Prikhodko, G.V.Shishkin, V.F.Zarytova. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **24**, 247 (1991)
5. М.И.Добриков, В.Ф.Зарытова, Н.И.Комарова, А.С.Левина, С.Г.Лохов, Т.А.Приходько, Г.В.Шишкин, Д.Р.Табатадзе, М.М.Заалишвили. *Биорг. химия*, **18**, 540 (1992)
6. T.Le Doan, L.Perrouault, D.Praseuth, N.Habhouh, J.-L.Decout, N.T.Thuong, J.Lhomme, C.Helene. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 7749 (1987)
7. P.Mitchell, K.Stade, M.Osswald, R.Brimacombe. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 887 (1993)
8. М.Г.Ивановская, Н.И.Соколова, З.А.Шабарова. *Биорг. химия*, **5**, 35 (1979)
9. В.Ф.Зарытова, А.С.Левина, Л.М.Халимская, З.А.Сергеева. *Биоорг. химия*, **18**, 640 (1992)
10. V.Bartholomew, G.A.Kassavetis, B.R.Braun, E.P.Geiduschek. *Embo J.*, **9**, 2197 (1990)
11. B.J.Lannutti, J.Persinger, V.Bartholomew. *Biochemistry*, **35**, 9821 (1996)
12. О.И.Гимаутдинова, М.А.Зенкова, Г.Г.Карпова, Л.М.Подуст. *Молекул. биология*, **18**, 907 (1984)
13. Н.Д.Кобец, А.В.Горожанкин, Т.С.Годовикова, В.Н.Сильников, Д.Г.Кнорре. *Докл. АН*, **349**, 822 (1996)
14. Т.С.Годовикова, М.В.Березовский, Д.Г.Кнорре. *Биорг. химия*, **21**, 858 (1995)
15. D.Praseuth, M.Chassignol, M.Takasugi, T.Le Doan, N.T.Thuong, C.Helene. *J. Mol. Biol.*, **196**, 939 (1987)
16. A.S.Boutorin, T.Le Doan, J.P.Battioni, D.Mansuy, D.Dupre, C.Helene. *Bioconjug. Chem.*, **1**, 350 (1990)
17. A.N.Mayer, F.Barany. *Gene*, **153**, 1 (1995)
18. M.M.Hanna, Y.Zhang, J.C.Reidling, M.J.Thomas, J.Jou. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 2073 (1993)
19. A.Reizer, H.M.Wagner. In *The Chemistry of the Azido Group*. (Ed. S.Patai). Interscience, New York, 1971. P.441
20. T.-Y.Liang, G.B.Schuster. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7803 (1987)
21. А.С.Левина, Д.Р.Табатадзе, В.Ф.Зарытова, М.И.Добриков, В.Н.Горн, Л.М.Халимская. *Биорг. химия*, **20**, 21 (1994)
22. Y.L.Dubreuil, A.Expert-Bezancon, A.Favre. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 3653 (1991)
23. J.Liu, M.Sodeoka, W.S.Lane, G.L.Verdine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 908 (1994)
24. R.D.Sheardy, N.C.Seeman. *J. Org. Chem.*, **51**, 4301 (1986)
25. M.C.Willis, K.A.LeCuyer, K.M.Meisenheimer, O.C.Uhlenbeck, T.H.Koch. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 4947 (1994)
26. K.M.Meisenheimer, P.L.Meisenheimer, M.C.Willis, T.H.Koch. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 981 (1996)
27. A.McGregor, M.V.Rao, G.Duckworth, P.G.Stockley, B.A.Connolly. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 3173 (1996)

28. T.M.Dietz, R.J.von Trebra, B.J.Swanson, T.H.Koch. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 1793 (1987)
29. T.M.Dietz, T.H.Koch. *Photochem. Photobiol.*, **46**, 971 (1987)
30. S.Cereghini, M.Blumenfeld, M.Yaniv. *Genes Develop.*, **2**, 957 (1988)
31. M.C.Willis, B.J.Hicke, O.C.Uhlenbeck, T.R.Cech, T.H.Koch. *Science*, **262**, 1255 (1993)
32. O.Dontsova, A.Kopylov, R.Brimacombe. *Embo J.*, **10**, 2613 (1991)
33. D.M.Graifer, D.I.Juzumiene, P.Wollenzien, G.G.Karpova. *Biochemistry*, **33**, 3878 (1994)
34. O.Dontsova, V.Tishkov, S.Dokudovskaya, A.Bogdanov, T.Doring, J.Rinke-Appel, S.Thamm, B.Greuer, R.Brimacombe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4125 (1994)
35. Y.B.Shi, J.E.Hearst. *Biochemistry*, **26**, 3792 (1987)
36. Y.B.Shi, V.Gamper, J.E.Hearst. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 6843 (1987)
37. D.Kanne, K.Straub, J.E.Hearst, H.Rapoport. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6754 (1982)
38. C.Giovannangeli, N.T.Thuong, C.Helene. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 4275 (1992)
39. B.L.Lee, A.Murakami, K.R.Blake, S.B.Lin, P.S.Miller. *Biochemistry*, **27**, 3197 (1988)
40. U.Pieles, U.Englisch. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 285 (1989)
41. M.Raha, G.Wang, M.M.Seidman, P.M.Glazer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2941 (1996)
42. Y.B.Shi, J.E.Hearst. *Biochemistry*, **26**, 3786 (1987)
43. A.L.Pinto, S.J.Lippard. *Biochim. Biophys. Acta.*, **780**, 167 (1985)
44. J.Kasparkova, V.Brabc. *Biochemistry*, **34**, 12379 (1995)
45. B.A.Donahue, M.Augot, S.F.Bellon, D.K.Treiber, J.H.Toney, S.J.Lippard, J.M.Essigmann. *Biochemistry*, **29**, 5872 (1990)
46. B.C.Chu, L.E.Orgel. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 4783 (1989)
47. E.S.Gruff, L.E.Orgel. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 6849 (1991)
48. V.V.Vlassov, V.V.Gorn, E.M.Ivanova, S.A.Kazakov, S.V.Mamaev. *FEBS Lett.*, **162**, 286 (1983)
49. V.Brabc, M.Leng. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5345 (1993)
50. M.Boudvillain, R.Dalbies, C.Aussourd, M.Leng. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 2381 (1995)
51. Г.А.Невинский, В.Н.Подуст, А.С.Левина, О.В.Халабуда, О.И.Лаврик. *Биоорг. химия*, **12**, 357 (1986)
52. F.Oshita, A.Eastman. *Oncol. Res.*, **5**, 111 (1993)
53. V.Brabc, V.Kleinwachter, J.L.Butour, N.P.Johnson. *Biophys. Chem.*, **35**, 129 (1990)
54. B.C.Chu, L.E.Orgel. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 2497 (1992)
55. С.А.Кузнецова, М.Г.Ивановская, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **16**, 219 (1990)
56. A.A.Purmal, Z.A.Shabarova, R.I.Gumport. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 3713 (1992)
57. С.А.Кузнецова, М.Г.Ивановская, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **17**, 1633 (1991)
58. И.А.Козлов, Е.А.Кубарева, М.Г.Ивановская, З.А.Шабарова. *Молекуляр. биология*, **31**, 63 (1997)
59. M.G.Ivanovskaya, M.B.Gottikh, Z.A.Shabarova. *Nucleosides Nucleotides*, **6**, 913 (1987)
60. Н.А.Нарышкин, М.Г.Ивановская, Т.С.Орецкая, Е.М.Волков, М.Дж.Гейт, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **22**, 691 (1996)
61. S.A.Kuznetsova, C.Catherine, U.Edgardo, I.Elias, M.Vasseur, M.Blumenfeld, Z.A.Shabarova. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 4783 (1996)
62. E.A.Kubareva, O.A.Fedorova, M.B.Gottikh, H.Tanaka, C.Malvy, Z.A.Shabarova. *FEBS Lett.*, **381**, 35 (1996)
63. N.A.Naryshkin, M.A.Farrow, M.G.Ivanovskaya, T.S.Oretskaya, Z.A.Shabarova, M.J.Gait. *Biochemistry*, **36**, 3496 (1997)
64. М.Г.Ивановская, И.А.Козлов, Е.А.Кубарева, Е.А.Таран, Т.В.Саразев, З.А.Шабарова. *Молекуляр. биология*, **31**, 435 (1997)
65. З.А.Шабарова, Г.Я.Шефлян, С.А.Кузнецова, Е.А.Кубарева, О.Н.Сысоев, М.Г.Ивановская, Е.С.Громова. *Биоорг. химия*, **20**, 413 (1994)
66. Z.A.Shabarova, M.G.Ivanovskaya, M.G.Isagulians. *FEBS Lett.*, **154**, 288 (1983)
67. Y.Mishima, J.A.Steitz. *Embo J.*, **14**, 2679 (1995)
68. D.E.Wilman, T.A.Connors. In *Molecular Aspects of Anti-Cancer Drug Action*. Verlag Chemie, Weinheim, 1983
69. A.S.Boutorin, L.V.Gus'kova, E.M.Ivanova, N.D.Kobetz, V.F.Zarytova, A.S.Ryte, L.V.Yurchenko, V.V.Vlassov. *FEBS Lett.*, **254**, 129 (1989)
70. B.C.F.Chu, L.E.Orgel. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 5857 (1992)
71. N.G.Dolinnaya, M.Blumenfeld, I.N.Merenkova, T.S.Oretskaya, N.F.Krynetskaya, M.G.Ivanovskaya, M.Vasseur, Z.A.Shabarova. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 5403 (1993)
72. С.И.Анцыпович, Т.С.Орецкая. *Успехи химии*, **67**, 274 (1998)
73. С.А.Кузнецова, И.Э.Каневский, Т.С.Орецкая, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **22**, 532 (1996)
74. И.Э.Каневский, С.А.Кузнецова, Е.М.Волков, З.А.Шабарова. *Молекуляр. биология*, **30**, 1144 (1996)
75. S.A.Kuznetsova, I.E.Kanevskii, T.S.Oretskaya, Z.A.Shabarova. *Nucleosides Nucleotides*, **22**, 1231 (1996)
76. И.Э. Каневский. Дис. канд. хим. наук. МГУ, Москва, 1996

SYNTHESIS OF REACTIVE DERIVATIVES OF NUCLEIC ACIDS AND THEIR APPLICATION FOR THE STUDY OF STRUCTURE AND FUNCTIONS OF BIOPOLYMERS

I.E. Kanevskii, S.A. Kuznetsova

Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University
 Leninskie Gory, 119899 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)939-3181

The data on the synthesis of reactive derivatives of nucleic acids and their application for the study of structure and functions of biopolymers are generalised. The main types of derivatives (photoactivated reagents containing arylazido, halogen, thio groups), psoralen and its derivatives, platinum-containing derivatives as well as nucleic acid analogues containing substituted internucleotide pyrophosphate or acyl phosphate groups, are presented. The mechanisms of interaction of these compounds with proteins and nucleic acids are considered. The prospects of application of reactive derivatives of nucleic acids in various systems *in vivo* are discussed.

Bibliography — 76 references.

Received 9th September 1997