

Диальдегидсодержащие нуклеиновые кислоты и их компоненты: синтез, свойства, аффинная модификация белков

О.М.Гриценко, Е.С.Громова

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

Описаны получение, структура и химические свойства диальдегидных производных нуклеозидов. Обсуждаются способы введения альдегидных групп в олигонуклеотиды. Рассмотрены методы аффинной модификации белков периодат-окисленными производными нуклеиновых кислот.
Библиография — 48 ссылок.

Оглавление

I. Введение	267
II. Введение альдегидных групп в углеводный фрагмент нуклеиновых кислот	267
III. Аффинная модификация белков и полипептидов окисленными периодатом производными нуклеиновых кислот	273
IV. Заключение	277

I. Введение

Изучение природы специфического взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами (НК) является одной из важных проблем современной молекулярной биологии. Существует сравнительно небольшое число методов, позволяющих определять функциональные группы в белке, участвующие в белково-нуклеиновом узнавании. Эффективным методом является ковалентное присоединение белков к НК.¹ Он заключается в том, что с помощью модификации одного из компонентов белково-нуклеинового комплекса или при добавлении «сшивающего» агента белок ковалентно и специфично присоединяется к НК. Затем модифицированный таким образом белок гидролизуют протеиназами и определяют аминокислотный состав пептида, присоединенного к НК, — участка активного центра или узнающего домена белка. Метод ковалентных «сшивок» позволяет также провести анализ топографии белково-нуклеиновых комплексов и определить их стехиометрию.

Главное требование к способу «пришивки» белка к НК — создание оптимальных условий для белково-нуклеинового узнавания. При этом модифицирование не должно серьезно искажать структуру компонентов комплекса, нарушая тем самым процесс узнавания аналогов НК специфичными белками. Одним из способов ковалентного присоединения белков к НК является аффинная модификация немодифицированных белков нуклеиновыми кислотами при УФ-облучении.¹ Другой способ состоит во введении химически или

фотоактивных групп в белок или НК и в последующем проведении соответствующих реакций. Активные группы вводят в остатки гетероциклических оснований НК, в фосфатные группы или в углеводные остатки. Первые два типа активации НК и образование с участием этих производных продуктов ковалентного присоединения рассмотрены в обзорах^{1–3}. В настоящей работе будут рассматриваться производные НК с двумя альдегидными группами в углеводном фрагменте: их получение, свойства, а также аффинная модификация ими белков.

Ранее диальдегидные производные НК широко использовались для установления мономерных компонентов нуклеиновых кислот, а также для анализа и разделения смесей олигонуклеотидов. С помощью окисления 3'-концевого нуклеотидного звена РНК и последующего расщепления прилегающей к нему фосфодиэфирной связи с определением гетероциклического основания были установлены нуклеотидные последовательности, прилегающие к 3'-концу молекулы.⁴ В настоящее время диальдегидные производные НК чаще всего используются для введения в НК различных функциональных групп, а также для аффинной модификации белков.

II. Введение альдегидных групп в углеводный фрагмент нуклеиновых кислот

Хорошо известны методы введения двух альдегидных групп в нуклеозиды и мононуклеотиды, а также в 3'- и 5'-концевые остатки олигонуклеотидов, а недавно был разработан метод введения альдегидных групп в любое положение олигонуклеотидной цепи.

1. Получение и структура диальдегидных производных нуклеозидов и нуклеотидов

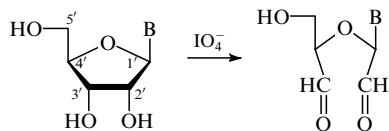
В основе получения диальдегидных производных нуклеозидов лежит окисление рибонуклеозидов и их производных солями иодной кислоты:⁴

О.М.Гриценко. Аспирантка кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ.

Е.С.Громова. Доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник той же кафедры. Телефон: 939–3144,
e-mail: gromova@dnaenzym.genebee.msu.su

Область научных интересов авторов: механизм узнавания нуклеиновых кислот белками, использование синтетических олигонуклеотидов для изучения ДНК-белковых взаимодействий.

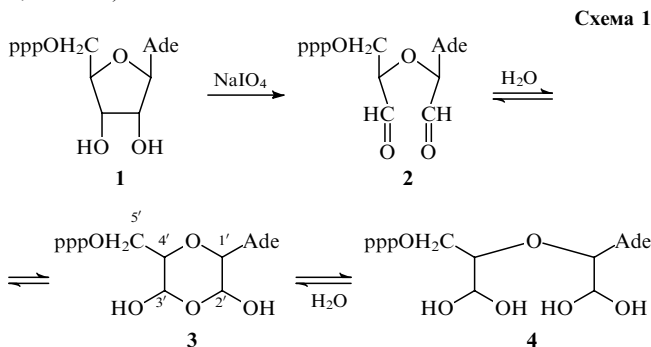
Дата поступления 26 октября 1998 г.



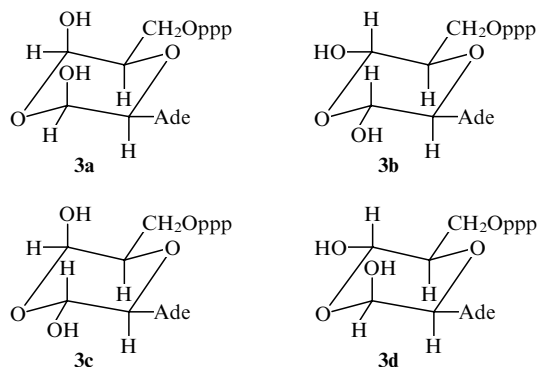
B — здесь и далее гетероциклическое основание.

Реакция между аденозин-5'-трифосфатом (**1**) и периодатом натрия имеет второй порядок (константа скорости $k_2 = 1.06 \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$).⁵ В работе⁵ реакцию окисления проводили, используя эквимольное количество или небольшой избыток периодата натрия, в течение одного часа при 4°C. В работе⁶ моно- и динуклеотиды окисляли 20-кратным избытком периодата натрия в течение одного часа при 0°C. Избыток периодата натрия удаляли, добавляя этиленгликоль,⁶ небольшой избыток рамнозы⁶ или 4-кратный молярный избыток NaAsO_2 (см.⁷). Полученные растворы окисленных производных нуклеозидов использовали непосредственно или продукты очищали с помощью гель-хроматографии.

Альдегидные группы в различных окисленных периодатом рибонуклеотидах гидратированы:^{8–10} так, продукт окисления аденозин-5'-трифосфата (оАТР) может существовать как равновесная смесь гидратов диальдегидов (структуры **3** и **4**, схема 1).^{5,9}



В спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C оАТР отсутствуют резонансные сигналы, типичные для свободных альдегидных групп; полимерная форма оАТР в растворе не обнаружена. Циклический полуацеталь **3** может существовать как смесь четырех диастереомеров **3a–d**.



Эти конформеры являются предпочтительными, так как в них остатки аденина и группа CH_2Oppr находятся в экваториальных положениях.⁹ Константы спин-спинового взаимодействия отвечают структурам **3b–d** (табл. 1). Структура **3a**, по-видимому, не реализуется из-за стерического напряжения, возникающего при аксиальном расположении двух гидроксильных групп. Структуры **3c** и **3d** являются предпочтительными, так как в 1,4-диооксанах и сахарах была замечена тенденция полуацетальных гидроксильных групп находиться в аксиальных положениях (так называемый аномерный эффект).¹¹ В спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C обнаружены

Таблица 1. Конформационный анализ гидратированных форм оАТР. Предсказанные и экспериментальные значения констант спин-спинового взаимодействия.⁹

Соединение	Положение ОН-групп ^a		Предсказанные КССВ (J, Гц)		Экспериментальные КССВ (J, Гц)	
	2'-ОН	3'-ОН	$J_{1',2'}$	$J_{3',4'}$	$J_{1',2'}$	$J_{3',4'}$
3a	<i>a</i>	<i>a</i>	< 4	< 4	Не найдены	
3b	<i>e</i>	<i>e</i>	> 6	> 6	7.5	8.0
3c	<i>e</i>	<i>a</i>	> 6	< 4	8.0	1.7
3d	<i>a</i>	<i>e</i>	< 4	> 6	1.8	8.1
4	—	—	3–6	3–6	4.1	5.0

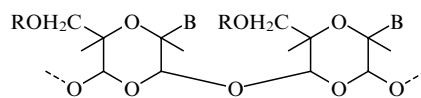
^a *a* — аксиальное, *e* — экваториальное.

также сигналы, относящиеся к дигидрату диальдегида **4**. Таким образом, оАТР существует в растворе как смесь четырех соединений: трех диастереомеров циклического полуацетала **3b–d** и дигидрата **4**, находящихся в равновесии друг с другом и с небольшим количеством свободного диальдегида **2**.

УФ-Спектр оАТР в водном растворе при pH 7 подобен УФ-спектру АТР.⁵

В спектрах кругового дихроизма (КД) диальдегидных производных аденозина, уридина и цитидина обнаружены значительно уменьшенные эффекты Коттона по сравнению с наблюдаемыми для соответствующих нуклеозидов.¹² Это указывает на увеличение свободного вращения гетероциклического основания вокруг гликозидной связи. В случае диальдегидного производного гуанозина, наоборот, амплитуда максимума КД увеличивалась, что указывало, по мнению авторов,¹² на самоассоциацию с образованием олигомеров.

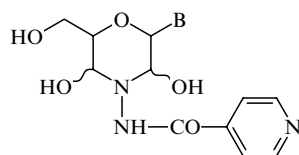
В твердом состоянии диальдегидные производные аденозина, гуанозина, цитидина и уридина полностью полимеризованы.¹²



2. Некоторые химические свойства окисленных периодатом производных нуклеозидов

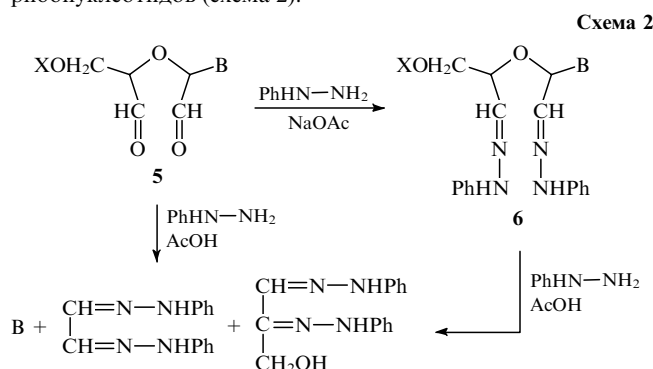
Химические свойства окисленных периодатом производных нуклеозидов и нуклеотидов, например, взаимодействие с гидразинами и аминами, расщепление в щелочной среде и восстановление альдегидных групп, хорошо известны.^{4,13} Рассмотрим некоторые модельные реакции, которые представляют интерес с точки зрения аффинной модификации белков.

Диальдегиды нуклеозидов и нуклеотидов легко взаимодействуют с гидразидами, причем структура продуктов реакции зависит от природы исходных реагентов и условий проведения реакции. При взаимодействии диальдегидного производного нуклеозида с гидразидом изоникотиновой кислоты происходит присоединение одной молекулы гидразида к нуклеозиду с образованием морфолинового производного.⁴



Аналогичный продукт получен и при реакции диальдегидных производных нуклеозидов с тиосемикарбазидом.⁴

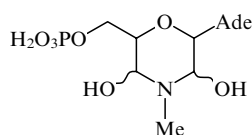
Диальдегидные производные нуклеозидов и нуклеотидов **5** реагируют с фенилгидразином^{13, 14} с образованием бисфенилгидразонов. При добавлении избытка фенилгидразина происходит деградация диальдегидов рибонуклеозидов или рибонуклеотидов (схема 2).¹⁴



X — остаток фосфорной кислоты или H.

Аналогично производные **5** реагируют с семикарбазидом.⁴

Продукты периодатного окисления рибонуклеозидов и -нуклеотидов очень легко взаимодействуют с аминами. При реакции аденозин-5'-фосфата с метиламином было выделено морфолиновое производное аденозин-5'-фосфата.⁴



При совместном действии первичных аминов и периодата натрия, взятого в избытке, на диальдегидное производное рибонуклеотида происходит его деградация с отщеплением свободного основания (схема 3).¹⁵

В работе¹⁶ с помощью спектральных методов были установлены продукты реакции периодат-окисленного аденозина с глицином в присутствии и в отсутствие цианборгидрида натрия, NaBH_3CN . На схеме 4 показаны возможные

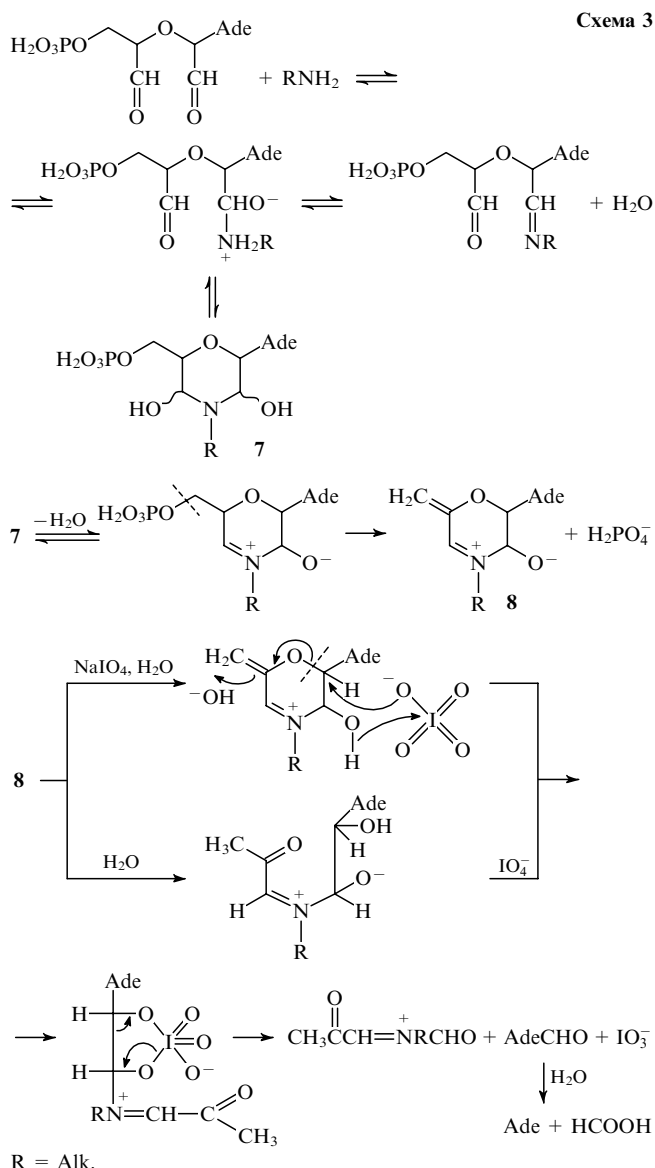
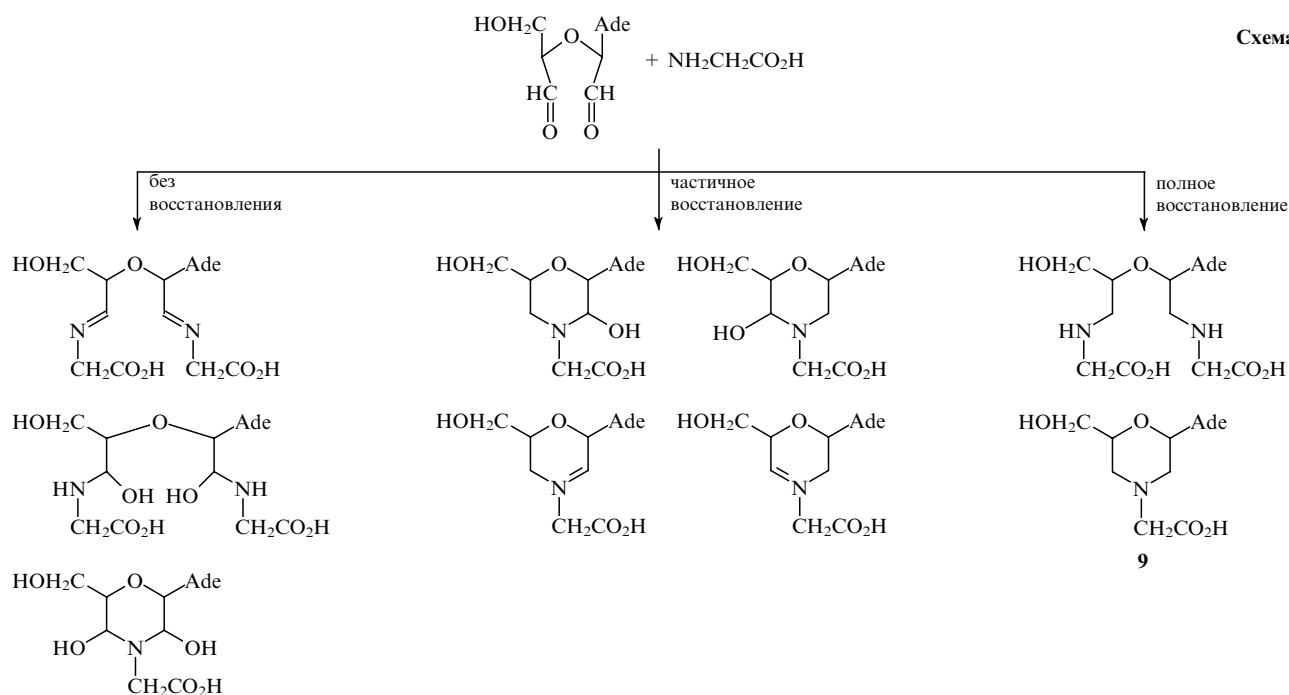


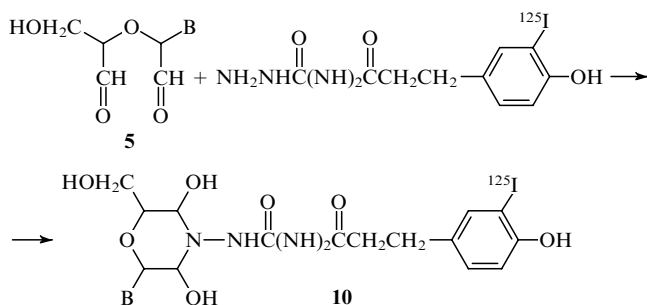
Схема 4



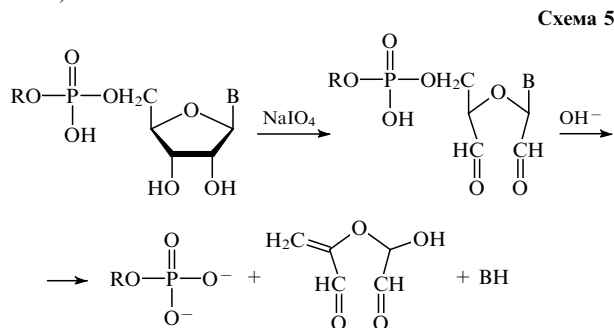
продукты конденсации. Найдено, что основным продуктом реакции является 2-аденин-6-гидроксиметил-4-карбоксиметилморфолин (9).

Была проверена гидролитическая устойчивость продуктов конденсации окисленного аденозина или оАТР с диаминогексаном после их восстановления цианборгидридом натрия и без восстановления.¹⁶ Оказалось, что устойчивые продукты реакции образуются только после восстановления NaBH_3CN .

Для идентификации и количественного определения периодат-окисленных рибонуклеозидов и РНК был разработан реагент, содержащий ^{125}I — 3-(3-иод-4-гидроксифенил)пропионилкарбогидразид.⁷ При взаимодействии диальдегидных производных рибонуклеозидов с этим реагентом образуется морфолиновое производное **10**, устойчивое в нейтральной и слабокислой среде, но подвергающееся быстрой деградации в щелочной среде, в присутствии аммиака или первичных аминов.



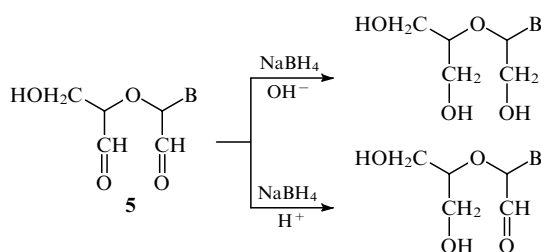
Диальдегиды нуклеозид-5'-фосфатов и их производные легко расщепляются в щелочной среде ($\text{pH} > 7$), причем одновременно происходит разрыв гликозидной связи и отщепление остатка RPO_4^{2-} (β -элиминирование) (схема 5).^{4, 13}



$\text{R} = \text{H}$ или олигорибонуклеотид.

Эффективными катализаторами такого расщепления являются первичные амины.

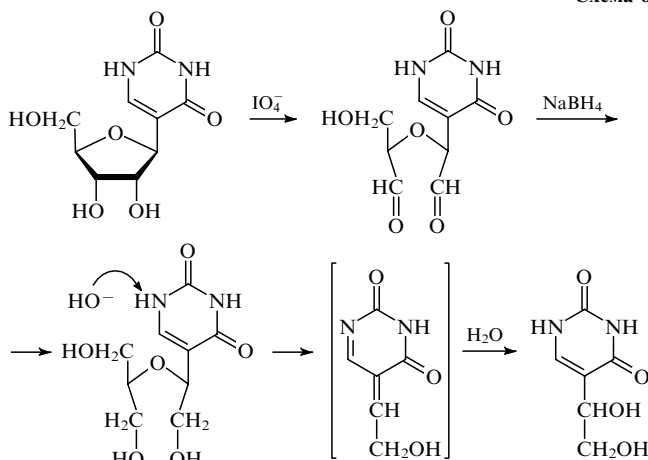
В зависимости от pH среды возможно полное или частичное восстановление двух альдегидных групп диальдегидных производных нуклеозидов и нуклеотидов.¹⁴ При этом образуются соответствующие триолы или дигидроксиальдегиды.



Окисление псевдоуридина периодатом приводит к соответствующему диальдегиду; наряду с диальдегидом образуются два продукта неуставленного строения.⁴

После обработки диальдегида боргидридом натрия и щелочью с небольшим выходом образуется 5-(α,β -дигидроксиэтил)урацил (схема 6).

Схема 6

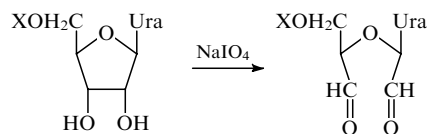


3. Введение диальдегидного фрагмента в олигонуклеотиды

а. Введение альдегидных групп в концевые нуклеотидные остатки

Введение диальдегидного фрагмента в 3'-конец РНК или олигорибонуклеотидов осуществляется с помощью периодатного окисления. Для введения такого фрагмента в 3'-конец олигодезоксирибонуклеотидов или в 5'-конец олигорибо- и олигодезоксирибонуклеотидов необходимо их сначала нарастить, введя рибонуклеотидный остаток, а затем окислить его периодатом. Условия окисления РНК практически не отличаются от условий окисления рибонуклеозидов и их производных.¹⁷

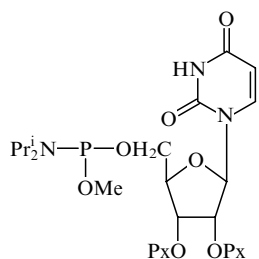
Так, в работе¹⁸ для введения двух альдегидных групп в 3'-конец олигодезоксирибонуклеотида к нему присоединяли рибонуклеотид. Для этого олигодезоксирибонуклеотид инкубировали с рибонуклеозид-5'-трифосфатом в присутствии концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы. В работе¹⁹ к олигодезоксирибонуклеотиду присоединяли цитидин-3',5'-дифосфат (pCr) с помощью T4 РНК-лигазы, 3'-концевую фосфатную группу полученного 5'(oligodeoxyribonucleotide)-pCr3' удаляли с помощью щелочной фосфатазы. Затем проводили периодатное окисление 2',3'-*цис*-диольной группы. Реакцию проводили с олигодезоксирибонуклеотидами, содержащими на 3'-конце остатки цитидина^{18–20} или уридина.¹⁸



$\text{X} = 5'(\text{oligodeoxyribonucleotide})3'$.

Для окисления использовали эквимолярное количество или небольшой избыток периодата натрия. Реакция проходила практически полностью при комнатной температуре за 30 мин,¹⁸ а при 0–4°C за 2 ч.¹⁹ Для удаления избытка периодата натрия добавляли раствор этиленгликоля.¹⁸

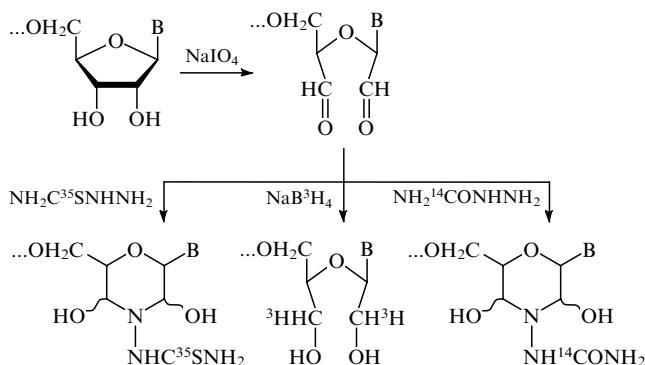
В работе²¹ диальдегидный фрагмент вводили в 5'-конец олигодезоксирибонуклеотида. В процессе автоматического твердофазного амидофосфитного синтеза к олигодезоксирибонуклеотиду присоединяли остаток уридина, используя фосфорамидит с защищенными 2'-ОН- и 3'-ОН-группами.



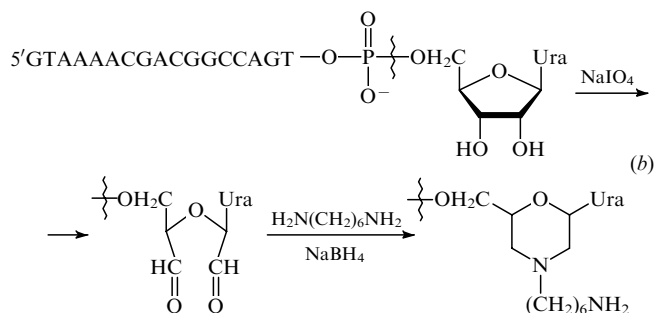
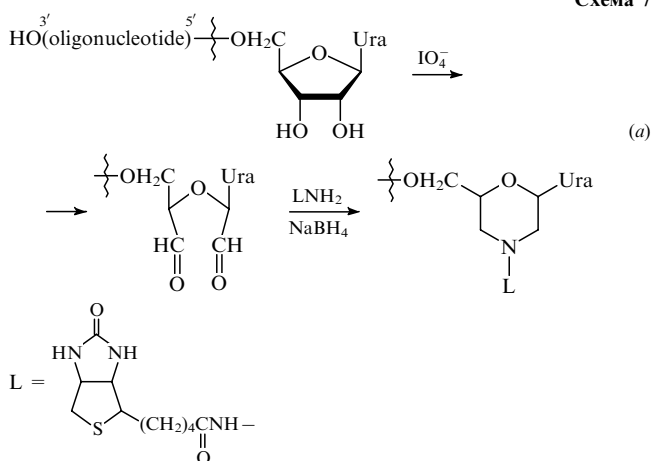
Px — 9-фенилксантен-9-ил (пиксил).

При этом 5'-конец рибонуклеозида присоединялся к 5'-концу олигодезоксирибонуклеотида. После деблокирования защитных групп остаток рибозы окисляли периодатом и получали диальдегидное производное.

Олигодезокси- и олигорибонуклеотиды, содержащие окисленные остатки рибозы, нашли ряд практических применений. Модифицированные олигодезоксирибонуклеотиды с альдегидными группами на 3'-конце использовали для введения фосфатной группы в 3'-конец олигодезоксирибонуклеотида, для чего олигодезоксирибонуклеотид с 3'-концевым окисленным остатком рибонуклеозида обрабатывали первичным амином. При этом были получены олигонуклеотид-3'-фосфат, диальдегидное производное рибозы и гетероциклическое основание.^{18,20} Для введения радиоактивной метки по 3'-концевому нуклеозидному остатку в РНК использовали способность альдегидных групп окисленного нуклеозидного остатка взаимодействовать с такими реагентами, как ³⁵S-тиосемикарбазид, ¹⁴C-семикарбазид, ³H-гидразид изоникотиновой кислоты или ³H-боргидрид натрия.⁴



Диальдегидные производные олигодезоксирибо- или олигорибонуклеотида можно использовать для введения нерадиоактивной метки путем обработки нуклеотидов соединением, содержащим аминогруппу и нерадиоактивную метку, например, гидразидом биотина LNH₂ (схема 7,²¹



или путем предварительного введения в олигонуклеотид первичной аминогруппы и последующего присоединения какой-либо нерадиоактивной метки (схема 7,^b).²²

Рибонуклеиновые кислоты (и олигорибонуклеотиды) могут быть расщеплены по межнуклеотидной связи с 3'-конца полирибонуклеотидной цепи при совместном действии периодата и первичных аминов или при действии периодата натрия в щелочной среде (см. схему 5).^{4,13} При этом образуется олиго- или полинуклеотид, «укороченный» с 3'-конца на одно нуклеотидное звено. Весь цикл превращений может быть повторен. От продукта превращения бывшего концевой нуклеотидного звена при действии кислоты (pH < 3) или щелочи (pH > 11) отщепляют основание, определяемое обычными аналитическими методами. Это свойство диальдегидных производных РНК легло в основу одного из подходов к определению последовательности нуклеотидов в коротких олигорибонуклеотидах. Метод ступенчатой деградации с 3'-конца цепи был применен для анализа концевых последовательностей в различных тРНК и РНК вируса табачной мозаики.⁴

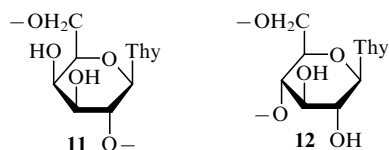
Изучено влияние ряда основных аминокислот и первичных аминов, pH среды и температуры на скорость расщепления фосфодиэфирной связи в диальдегидах ряда олигорибонуклеотидов.⁴ Было показано, что расщепление желаемой фосфодиэфирной связи в присутствии лизина, циклогексил-амин или метиламина наиболее эффективно протекает при повышенной температуре (45°C), а в присутствии анилина — при температуре 24°C (в интервале pH 6–9).⁴ При комнатной температуре не наблюдалось никаких побочных реакций. При повышении температуры могут наблюдаться побочные процессы — расщепление звеньев ψU и гетероциклических ядер других нуклеозидных звеньев.⁴

б. Введение альдегидных групп в любое положение олигонуклеотидной цепи

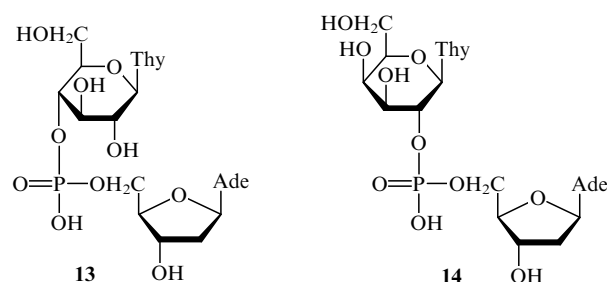
Методы введения альдегидных групп в любое нужное положение олигодезоксирибонуклеотида стали разрабатываться только в последнее время. Использовали два типа олигонуклеотидов: 1) олигонуклеотиды с гексопиранозильным остатком в олигонуклеотидной цепи^{23–25} вместо остатка дезоксирибозы и 2) олигорибонуклеотиды с дополнительным остатком рибозы в 2'-положении.²⁶ Простейший способ основан на вставке галактозных остатков в олигонуклеотидную цепь.²³ В процессе олигонуклеотидного синтеза гидроксильные группы, предназначенные для последующего окисления, защищают с помощью подходящих защитных групп. В работе²⁴ было предложено вводить в олигонуклеотид не только *цис*-гликольную группу (в виде остатка D-галактозы), но и *транс*-гликольную группу (в виде остатка D-глюкозы).

Исходя из D-галактозы и D-глюкозы, был осуществлен препаративный синтез 1-(3,4-O-изопропилиден-β-D-галактопиранозил)тимина²³ и 1-(2,3-ди-O-ацил-β-D-глюкопиранозил)тимина²⁴ соответственно. Затем с использованием стандартных методик амидофосфитного синтеза были получены 14–21-звенные олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие остаток 1-(β-D-галактопиранозил)тимина (**11**)^{23,25}

или 1-(β-D-глюкопиранозил)тимина (12)²⁴ в определенном положении олигонуклеотидной цепи.



Остаток 1-(β-D-галактопиранозил)тимина был введен в олигонуклеотидную цепь через 2'- и 6'-ОН-группы, а остаток 1-(β-D-глюкопиранозил)тимина — через 4'- и 6'-ОН-группы. Для подробного исследования периодатного окисления были синтезированы модельные динуклеозидфосфаты: 1-(β-D-глюкопиранозил)тимин-4'-O-фосфорил-(4'-5')-2'-дезоксиаденозин (13)²⁴ и 1-(β-D-галактопиранозил)тимин-2'-O-фосфорил-(2'-5')-2'-дезоксиаденозин (14).²³



Окисление *транс*-диольной группы в соединении 13 10-кратным избытком периодата натрия при 20°C протекало очень медленно, время полуреакции — 9–10 ч.²⁴ В случае соединения 14, содержащего *цис*-диольную группу, реакция окисления в упомянутых выше условиях проходила полностью за 1.5 ч.²³ Это обусловило использование олигонуклеотидов с остатком галактопиранозы для получения диальдегидсодержащих реагентов для аффинной модификации белков.

Окисление 14-звенных олигонуклеотидов с остатком галактозы проводили в 20–200 мМ растворе NaIO₄ в течение 1.5–2.5 ч при 25–37°C.²⁵ Выходы продуктов окисления оценивались с помощью расщепления фосфодиэфирной связи с 5'-конца от окисленного остатка галактозы в 10%-ном пиперидине при 95°C в течение 25 мин и составляли 65–75%. В этих условиях олигонуклеотиды с неокисленным остатком галактозы оставались устойчивыми. Структура олигонуклеотидов, содержащих окисленный остаток галактозы, была подтверждена селективным расщеплением фосфодиэфирной связи, соседней с окисленной галактозой (рис. 1). Для этого использовались условия β-элиминирования, аналогичные применяемым в химическом методе секвенирования РНК.²⁷ Реакция была проведена в 1М анилин-ацетатном буфере (pH 4.5) в течение 15 мин при 95°C.²⁵ В противоположность олигонуклеотидам 15–17 с остатком галактозы 14-звенные олигонуклеотиды 15*–17* с окисленным остатком галактозы в различных положениях олигонуклеотидной цепи расщеплялись, и их расщепление приводило соответственно к ³²P-меченым тетра- (из 15*), гепта- (из 16*) и ундекануклеотиду (из 17*) с 3'-фосфатной группой (см. рис. 1). В контрольных экспериментах наблюдалось незначительное разложение окисленных периодатом олигонуклеотидов в течение гель-электрофореза.²⁵

Другой способ региоспецифического введения дополнительных *цис*-диольных групп в олигонуклеотиды основан на использовании дисахаридных нуклеозидов 18.^{26, 28, 29}

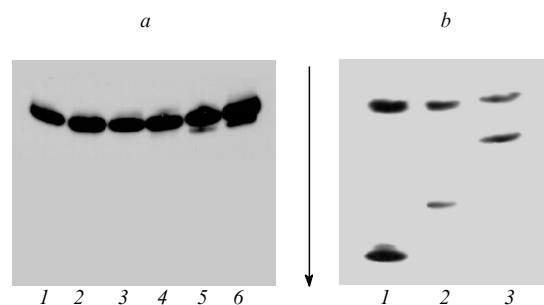
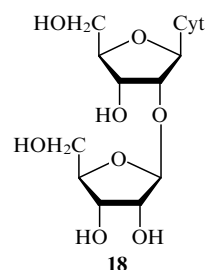


Рис. 1. Анализ с помощью гель-электрофореза устойчивости олигонуклеотидов 5'GCCAXCCTGGCTCT3' (15, 15*), 5'GCCAACCXGGCTCT3' (16, 16*) и 5'GCCAACCTGGCXCT3' (17, 17*), содержащих неокисленный (15–17) или окисленный (15*–17*) остаток 1-(β-D-галактопиранозил)тимина (X).

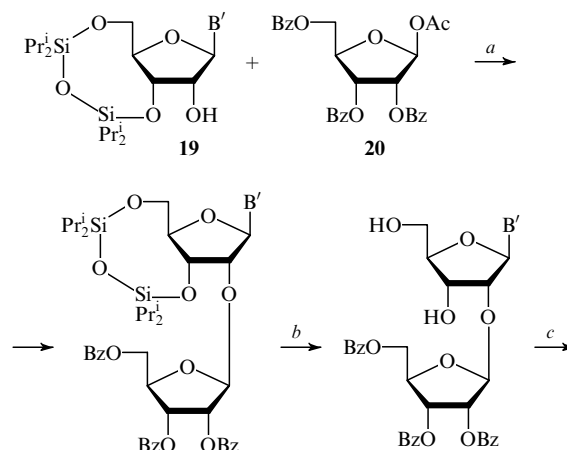
a — инкубация олигонуклеотидов с остатком галактозы: 1, 3, 5 — в анилин-ацетатном буфере, pH 4.5, 95°C, 15 мин; 2, 4, 6 — в 40 мМ Tris-HCl буфере, pH 7.9, 5 мМ дитиотреитол, 50 мМ NaCl, 15 мМ MgCl₂, 95°C, 25 мин. 1, 2 — олигонуклеотид 15; 3, 4 — олигонуклеотид 16; 5, 6 — олигонуклеотид 17.

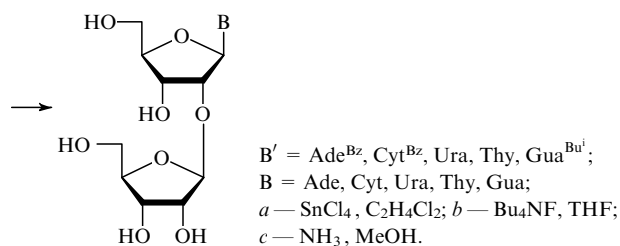
b — инкубация олигонуклеотидов с окисленным остатком галактозы в анилин-ацетатном буфере, pH 4.5, 95°C, 15 мин. 1 — олигонуклеотид 15*; 2 — олигонуклеотид 16*; 3 — олигонуклеотид 17*.



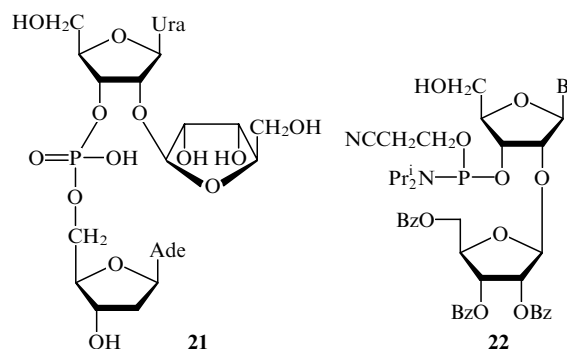
В этих соединениях гидроксильные группы в *цис*-положении после окисления превращаются в альдегидные. Дисахаридные нуклеозиды были обнаружены в тРНК как минорные компоненты; некоторые антибиотики также имеют дисахаридную структуру. Синтез 2'-O-рибофуранозилцитидина 18 проводили в три стадии, используя в качестве исходных соединений 3',5'-O-блокированный *N*-ацилрибонуклеозид (19) и небольшой избыток 1-O-ацетил-2,3,5-три-O-бензоил-β-D-рибофуранозы (20) в присутствии тетрахлорида олова.^{28, 29} Защитные группы снимали в две стадии. Реакция гликозилирования проходила стереоспецифично с образованием β-D-гликозидной связи (схема 8).

Схема 8





Реакция периодатного окисления была изучена на модельном динуклеозидфосфате, содержащем дисахаридный остаток **21**.²⁹



Модельный динуклеозидфосфат окислялся периодатом натрия за 10 мин при 20°C. 14–22-Звенные олигонуклеотиды, содержащие остатки 2'-*O*-рибофуранозилцитидина, были синтезированы амидофосфитным методом с использованием в качестве модифицированного фосфорамидита — соединения **22**.²⁶

На базе олигонуклеотидов, содержащих в определенном положении нуклеотидной цепи две альдегидные группы, были сформированы ДНК-дуплексы, которые затем использовались для аффинной модификации ряда ДНК-связывающих белков.

III. Аффинная модификация белков и полипептидов окисленными периодатом производными нуклеиновых кислот

Окисленные периодатом производные нуклеотидов, содержащие альдегидные группы, были применены для аффинной модификации ферментов, использующих в качестве кофактора или субстрата нуклеозидтрифосфаты, и транскрипционных факторов. Кроме того, получен конъюгат 13- и 15-звенных олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих на 3'-конце альдегидные группы, с поли(L-Lys) для изучения регуляции экспрессии генов.¹⁹ 14- и 22-Звенные ДНК-дуплексы с альдегидными группами в середине олигонуклеотидной цепи использовались для ковалентного присоединения к эндонуклеазам рестрикции, метилазам *EcoRII* и *MvaI*,²⁵ а также к РНК-полимеразе бактериофага T7.³⁰

1. Ковалентное присоединение белков к диальдегидным производным нуклеотидов

Главный процесс, обеспечивающий биоэнергетические потребности живых организмов, практически универсален для всей живой природы. Это гидролиз одной из пирофосфатных связей в молекулах аденозин-5'-трифосфата (АТФ) или, реже, гуанозин-5'-трифосфата (GTP). Существует много примеров энергетического обеспечения многочисленных биохимических процессов за счет гидролиза нуклеозидтрифосфатов.

2',3'-Диальдегидные производные АТФ, АДФ, GTP и GDP (оАТФ, оАДФ, оGTP и оGDP соответственно) использовали для аффинной модификации ряда ферментов, в основном с

целью изучения их кофактор-связывающих или активных центров.

Диальдегидное производное АТФ ковалентно присоединяли к митохондриальной АТФазе и гистонкиназе для изучения активных центров этих ферментов.^{31, 32} Чтобы пируваткарбоксилаза, ацетил-СоА-карбоксилаза и NAD-зависимая изоцитратдегидрогеназа могли действовать, в качестве кофактора требуется АТФ (для каталитической реакции необходима энергия гидролиза АТФ). Эти ферменты имеют несколько субстратов и несколько кофакторов. Для ковалентного присоединения к аллостерическому центру этих ферментов и для изучения взаимодействия этого аллостерического центра с другими центрами использовали оАТФ и оАДФ.^{8, 33, 34} Фосфатная группа АТФ присоединяется к 5-рибулозофосфатному фрагменту с помощью фосфорилбулокиназы, при этом образуется рибулозо-1,5-дифосфат. Для аффинной модификации центра связывания одного из субстратов фосфорилбулокиназы использовали оАТФ.³⁵

Для связывания аминоксил-тРНК с рибосомами необходим фактор элонгации EF-Tu. Этот процесс сопровождается гидролизом GTP. 2',3'-Диальдегидное производное GTP было ковалентно присоединено к фактору элонгации EF-Tu для обнаружения участка связывания кофактора.³⁶ Гидролиз GTP сопровождается также действием белка с-H-ras p21 человека. Этот белок локализован в цитоплазматической мембране. Его функция состоит в том, что он воспринимает извне стимулирующие клеточный рост сигналы и передает их на белки-мишени внутри клетки, инициируя ее рост и деление. Для более подробного исследования взаимодействия GTP и GDP с этим белком была проведена аффинная модификация этого белка периодат-окисленными производными GTP и GDP.³⁷ Периодат-окисленное производное 1,N⁶-этенаденозин-5'-монофосфата (оeAMP) использовалось для ковалентного присоединения к щелочной фосфатазе плаценты человека.³⁸

В зависимости от объекта исследования для ковалентного присоединения используют различные соотношения белков и периодат-окисленных компонентов НК (табл. 2). Время инкубации белков с мономерными аналогами НК, содержащими альдегидные группы, составляло в среднем от 5 мин до 2 ч. Для изучения кинетики реакции оАДФ с изоцитратдегидрогеназой время инкубации варьировали от 1 до 8 ч.³⁴ Кинетическая кривая инактивации этого фермента (состоящего из четырех субъединиц) имела бифазный характер: быстрая фаза, связанная с ковалентным присоединением оАДФ к одной из субъединиц фермента, и последующая медленная фаза, связанная с ковалентным присоединением оАДФ к остальным трем субъединицам фермента и приводящая к полностью неактивному ферменту.

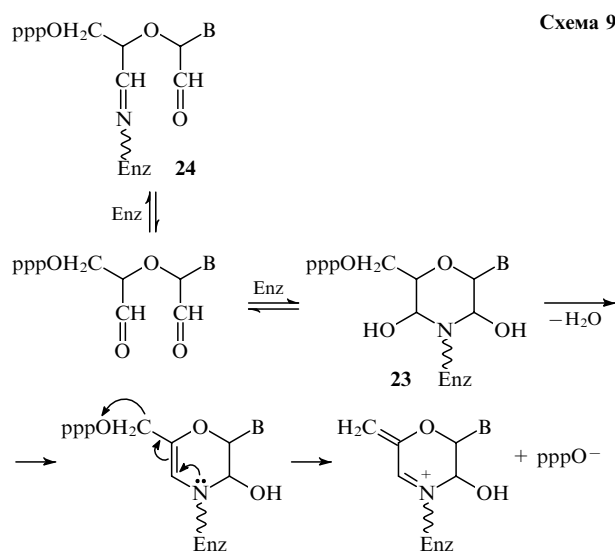
Обычно для ковалентного присоединения к белкам использовали компоненты НК, содержащие радиоактивную метку (¹⁴C, ³H или ³²P). Степень аффинной модификации определяли по радиоактивности после проведения электрофореза в 8–10%-ном полиакриламидном геле, содержащем 0.1%-ный раствор SDS,³¹ гель-фильтрации^{19, 32} или промывки фильтров с нанесенными реакционными смесями.³⁶ Авторы работы⁸ определяли степень аффинной модификации пируваткарбоксилазы при различных концентрациях оАТФ по остаточной активности фермента. Условия получения ковалентных комплексов и последующего специфического расщепления ковалентно связанных белков обобщены в табл. 2.

Рассмотрим механизм взаимодействия свободных NH₂-групп белков с диальдегидными производными мономерных компонентов НК, предложенный в работе³⁹ (схема 9). Как видно из схемы 9, при взаимодействии NH₂-группы белка с периодат-окисленным производным нуклеотида образуется либо дигидроксиморфолиновое производное **23**, либо основание Шиффа **24**.

Таблица 2. Условия получения ковалентных комплексов белков с периодат-окисленными производными мононуклеотидов и условия специфического расщепления ковалентно связанных белков.

Белок или полипептид (концентрация)	Модифицированный аналог НК (концентрация)	Восстановитель	Количество восстановителя	Время восстановления, мин	Ферменты или химические реагенты для специфического расщепления белкового фрагмента	Ссылки
Митохондриальная аденозинтрифосфатаза (100 мкг·мл ⁻¹)	Mg-оАТР (9.4 или 2.5 мкм)	—	—	—	—	31
NAD-Зависимая изоцитратдегидрогеназа (0.4–0.5 мг·мл ⁻¹)	оАДР в присутствии MnSO ₄ (0.2 ммоль·л ⁻¹)	—	—	—	Проназа, карбоксипептидаза А, карбоксипептидаза В, аминопептидаза	34
Пируваткарбоксилаза (10–20 ед·мл ⁻¹ или 13.3 ед·мг ⁻¹)	Mg-оАТР (2 ммоль·л ⁻¹)	NaBH ₄	10-Кратный избыток относительно оАТР	35	Трипсин, химотрипсин, проназа, α-аминопептидаза	8
Гистонкиназа	20-Кратный избыток оАТР относительно фермента	NaBH ₄	20-Кратный избыток относительно оАТР	60	Трипсин	32
Фактор элонгации из <i>T.thermophilus</i> (20 ммоль·л ⁻¹)	АТР ^a (10 ммоль·л ⁻¹)	NaBH ₃ CN	20 ммоль·л ⁻¹	1	BrCN	36

^a Окисление периодатом натрия проводилось после инкубации фактора элонгации EF-Tu и АТР (время инкубации 10 мин, время окисления 1 мин).



Enz — фермент.

В работах ^{31, 33–35} подчеркивалось, что устойчивые морфолиновые производные ферментов с оАТР или оАДР образуются без восстановления. При этом после присоединения окисленного производного нуклеотида к ферменту удаление три- или дифосфат-аниона в результате β-элиминирования происходит быстрее, чем в отсутствие фермента, что связано с участием в процессе отщепления три(ди)фосфат-аниона пары электронов атома азота морфолинового производного (см. схему 9).

В других работах ^{8, 32, 36} указывалось, что для образования устойчивой ковалентной связи фермента с нуклеотидом необходимо восстановление боргидридами (NaBH₄ или NaBH₃CN) промежуточных дигидроксиморфолинового производного или основания Шиффа.

Какую же информацию можно получить, используя ковалентное присоединение белков к периодат-окисленным мононуклеотидам? Прежде всего, проводя специфическое расщепление белка, ковалентно связанного с нуклеотидом, ферментами или химическими реагентами, можно локализо-

вать аминокислоты или участок белка, формирующие активный или кофактор-связывающий центр фермента. Ферментативное расщепление проводят с помощью трипсина или других специфических протеиназ; химическое расщепление белка по остаткам метионина — с помощью BrCN (см. табл. 2).

При ферментативном расщеплении модифицированного и восстановленного конъюгата образуется небольшой пептид, ковалентно связанный с нуклеотидом. Затем определяют аминокислотную последовательность пептида, к которому присоединено диальдегидное производное. Для этого проводят кислотный гидролиз пептида, ковалентно связанного с радиоактивно меченым оАТР, затем дансильрование полученной смеси и разделение с помощью двумерного гель-электрофореза с последующим определением дансиламинокислот.³² Подвижность радиоактивно меченого дансильрованного производного совпадала с подвижностью синтезированного дансильрованного производного ковалентного аддукта лизина с оАТР. В работе ³⁷ определение аминокислотной последовательности пептида, ковалентно связанного с оGDP или оGTP, проводили с помощью деградации по Эдману.

После протеолиза продуктов ковалентного присоединения оАТР к гистонкиназе ³² и пируваткарбоксилазе,⁸ а также оGDP и оGTP к белку c-H-gas p21 ³⁷ было определено, какие остатки лизина вовлечены в ковалентное связывание с периодат-окисленными производными нуклеозидов. Было высказано предположение, что обнаруженные в активном или кофактор-связывающем центрах ферментов остатки лизина благодаря основным свойствам ε-аминогруппы лизина служат для связывания фосфатных групп АТР.

Выше уже отмечалось, что при действии BrCN на конъюгат белка с нуклеотидом происходит расщепление ковалентно связанного белка по остаткам метионина (Met). Так как Met встречается в белках относительно редко, то обычно образуются крупные фрагменты белка. С помощью этого метода было показано, что GTP-связывающий домен фактора элонгации Tu локализован в N-конце белка.³⁶

Аффинная модификация кофактор-связывающего или активного центров пируваткарбоксилазы,⁸ митохондриальной АТФазы,³¹ изоцитратдегидрогеназы,³⁴ фосфорibuлки-

назы³⁵ и щелочной фосфатазы плаценты человека³⁸ 2',3'-диаальдегидным производным АТР, АDР или оАМР приводила к ингибированию этих ферментов. Существует ряд аналогов нуклеотидов, которые содержат активную группу и могут быть использованы для ковалентного присоединения к нуклеотид-связывающим центрам белков. Только некоторые из них являются ингибиторами, специфически взаимодействующими с активным центром. Существует два критерия сайт-направленной модификации. Рассмотрим эти критерии на примере оАТР. Во-первых, АТР должен защищать белок от инактивации оАТР. Во-вторых, оАТР должен являться субстратом этого фермента. На основании выполнения этих двух критериев было показано, что оАТР является сайт-направленным ингибитором митохондриальной АТРазы³¹ и фосфорibuлокиназы,³⁴ а оАМР — сайт-направленным ингибитором щелочной фосфатазы плаценты человека.³⁸ В ряде работ была изучена зависимость инактивации многосубъединичных белков, например пируваткарбоксилазы⁸ и NAD-зависимой изоцитратдегидрогеназы,³⁵ от концентрации оАТР или оАDР, влияние на аффинную модификацию этих белков с помощью оАТР или оАDР других кофакторов и субстратов ферментов (многосубъединичные белки имели несколько кофакторов и субстратов). На основании аффинной модификации этих белков диаальдегидными производными нуклеотидов было сделано предположение о взаимном расположении активного и кофактор-связывающего центров ферментов.^{8,35}

Таким образом, используя аффинную модификацию белков периодат-окисленными производными нуклеотидов, в ряде случаев удалось определить участки активного или кофактор-связывающего центров ферментов, ковалентно связанные с периодат-окисленными производными мононуклеотидов, и сделать предположения относительно локализации оАТР-связывающего (кофактор-связывающего) центра в многосубъединичных белках.

2. Аффинная модификация белков и полипептидов диальдегидсодержащими олигонуклеотидами

В 1980-х годах в лаборатории Мирзабекова с целью определения структуры хроматина были разработаны методы ковалентного присоединения гистонов к ДНК, содержащей статистически введенные альдегидные группы.^{40–45} Ввести альдегидные группы в ДНК можно несколькими способами. Один из них основан на кислотной обработке ДНК, которая приводит к ее апуринизации, сопровождающейся образованием альдегидных групп в углеводном фрагменте. Однако использование такого подхода для ковалентного присоединения ДНК к белкам затруднено, так как низкие значения pH мешают образованию ДНК-белковых комплексов. Другой способ статистического введения альдегидных групп в середину цепей ДНК основан на метилировании ДНК по пуриновым остаткам диметилсульфатом с последующей апуринизацией.⁴⁰ Для установления контактов ДНК с гистонами ядра клеток обрабатывали диметилсульфатом, затем проводили апуринизацию в нейтральной среде с последующим восстановлением боргидридом натрия.^{41–43} При этом происходило ковалентное присоединение альдегидных групп ДНК к аминокислотным остаткам гистонов, контактирующим с ДНК. Такой же подход был использован для установления ДНК-белковых контактов в комплексах РНК-полимеразы с промотором *lacUV5*,⁴⁶ в комплексе *lac* репрессора с ДНК,⁴⁷ а также в вирусе коревой оспы.⁴⁸

В последнее время исследовано взаимодействие диальдегидсодержащих ДНК-дуплексов и олигонуклеотидов с белками и полипептидами.^{19, 25, 30} Альдегидные группы вводились региоспецифично как в концевые, так и в неконцевые положения олигонуклеотидной цепи. Возможность введения

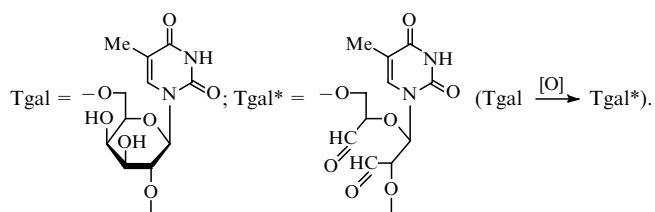
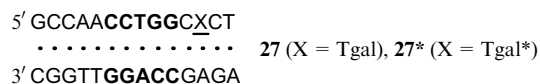
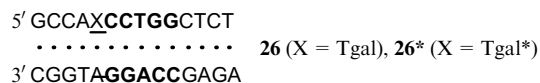
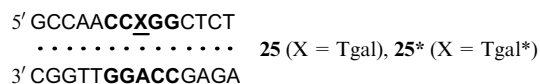
альдегидных групп в любое положение олигонуклеотидной цепи позволила изучать матричные ферменты (РНК-полимеразы) и ферменты, узнающие любые специфические последовательности в ДНК (ферменты рестрикции-модификации ДНК). Преимуществом диальдегидных реагентов является их специфичность к сближенным ε-аминогруппам остатков лизина белка. Следует также отметить способность таких реагентов образовывать стабильные ковалентные комплексы с белком после восстановления. Путем введения альдегидных групп в определенный углеводный остаток ДНК-дуплекса и последующего ковалентного присоединения модифицированного дуплекса к белкам можно исследовать сближенность определенных углеводных остатков ДНК к остаткам лизина активного или ДНК-связывающего центров белков.

Специфичность диальдегида к аминокгруппе лизина была использована для эффективного ковалентного присоединения поли(L-Lys) к двум альдегидным группам на 3'-конце олигонуклеотида.¹⁹

Проведено²⁵ зондирование функциональных центров ферментов рестрикции-модификации ДНК *EcoRII* и *MvaI*, которые узнают в ДНК последовательность.



Эндонуклеаза рестрикции *EcoRII* (*R.EcoRII*) расщепляет фосфодиэфирные связи в положениях, указанных стрелками. ДНК-Метилтрансферазы *EcoRII* (*M.EcoRII*) и *MvaI* (*M.MvaI*) метилируют внутренние остатки цитозина по атому углерода C(5) (*M.EcoRII*) или по атому азота N(4) (*M.MvaI*). Осуществлено ковалентное присоединение этих ферментов к ДНК-дуплексам (аналогам субстрата) с окисленным остатком 1-(β -D-галактопиранозил)тимина.²⁵ Положение модифицированного углеводного остатка варьировали, располагая его в участке узнавания (дуплекс **25***) или в прилегающих к нему нуклеотидных последовательностях (дуплексы **26*** и **27***).

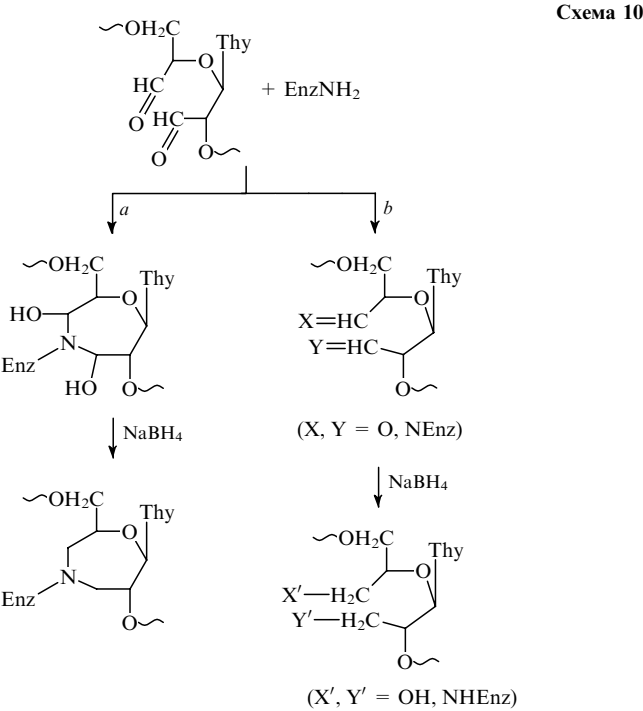


Для исследования активного и ДНК-связывающего центров РНК-полимеразы бактериофага Т7 альдегидные группы, содержащиеся в окисленном остатке 2'-*O*-рибофуранозилцитидина, вводили в ДНК-дуплексы в определенные положения (–11, +1, +2) кодирующей цепи Т7-консенсусного промотора.³⁰



Затем проводили ковалентное присоединение таких дуплексов к Т7 РНК-полимеразе, а также к ее мутантной форме, в которой один из аминокислотных остатков (Тур639), необходимых на начальных стадиях синтеза РНК, заменили на лизин.

Основываясь на механизме взаимодействия альдегидных групп модифицированных мономерных компонентов НК с лизиновыми остатками белков, авторы работы²⁵ предложили следующую схему взаимодействия ДНК-дуплексов — аналогов субстрата с ферментами рестрикции-модификации ДНК (схема 10):



На первой стадии возможно образование циклического производного (путь *a*) или основания Шиффа (путь *b*). Образование семичленного цикла, по-видимому, менее вероятно. Следующей стадией является восстановление ДНК-белкового конъюгата NaBH_4 для получения устойчивого комплекса.

Условия ковалентного присоединения ДНК-дуплексов и олигонуклеотидов к ДНК-связывающим белкам и полипептиду приведены в табл. 3. Для ковалентного присоединения поли(L-Lys) к 3'-концу олигодезоксирибонуклеотида, к которому присоединен окисленный остаток рибозитидина, использовали двукратный избыток полипептида. Одновременно с поли(L-Lys) было введено избыточное количество восстановителя NaBH_3CN (~100-кратный избыток).¹⁹ Реакцию аффинной модификации ферментов рестрикции-модификации *EcoRII* и *MvaI* проводили, используя избыточное количество белков по отношению к ДНК-дуплексу. Эндонуклеазу *EcoRII* и метилазу *EcoRII* и *MvaI* инкубировали с модифицированными реагентами 5 мин при комнатной температуре и еще 15 мин при 0°C. Затем проводили восстановление, используя 1000-кратный избыток NaBH_4 относительно белка, в течение 40 мин при 0°C.²⁵ Восстановление ковалентного комплекса Т7 РНК-полимеразы с ДНК-дуплексом, содержащим окисленный остаток 2'-*O*-рибофуранозилцитидина, проводили, используя 100-кратный избыток NaBH_4 , в течение 1 ч при комнатной температуре.³⁰

Каких же результатов удалось достичь с помощью ковалентного присоединения диальдегидсодержащих олигонуклеотидов к поли(L-Lys) и диальдегидсодержащих ДНК-дуплексов к различным ферментам? Каково использование этих результатов?

Ковалентное присоединение 13–15-звенных синтетических олигодезоксирибонуклеотидов с двумя альдегидными группами на 3'-конце, комплементарных области инициации трансляции мРНК белка вируса везикулярного стоматита, к поли(L-Lys) позволило значительно повысить эффективность введения этих олигонуклеотидов в клетки.¹⁹ Такие конъюгаты проявляют антивирусную активность. При инкубации клеток, содержащих вирус везикулярного стоматита, со смесью олигодезоксирибонуклеотида и поли(L-Lys) антивирусной активности не наблюдалось, т.е. ковалентное связывание модифицированного олигонуклеотида с полипептидом является необходимым условием для проявления антивирусной активности.¹⁹

Таблица 3. Условия получения ковалентных комплексов ДНК-связывающих белков с диальдегидсодержащими олигонуклеотидами.

Белок или полипептид (концентрация)	Модифицированный аналог НК (концентрация)	Восстановитель	Количество восстановителя	Время восстановления, мин	Выход «пришивки», %	Ссылки
Поли(L-Lys) (80 нмоль)	Олигодезоксирибонуклеотиды: 5' CATTTTGATTACTGTC* 3' 5' AACGAGGCACATTC* 3' (40 нмоль), где С* — окисленный остаток рибозитидина	NaBH_3CN	10 мкмоль	120	25–30	19
Метилазы <i>EcoRII</i> или <i>MvaI</i> (М. <i>EcoRII</i> — 3.16 мкмоль · л ⁻¹ ; М. <i>MvaI</i> — 3.3 мкмоль · л ⁻¹)	14-Звенный ДНК-дуплекс, содержащий окисленный остаток галактозы (0.23 мкмоль · л ⁻¹) (дуплексы 25* и 27*)	NaBH_4	3.75 мкмоль · л ⁻¹	40	9–20	25
Эндонуклеаза рестрикции <i>EcoRII</i> (3.16 мкмоль · л ⁻¹)	14-Звенный ДНК-дуплекс, содержащий окисленный остаток галактозы (0.23 мкмоль · л ⁻¹) (дуплекс 27*)	NaBH_4	3.75 мкмоль · л ⁻¹	40	4	25
РНК-Полимераза бактериофага Т7 (0.1–0.5 мкмоль · л ⁻¹)	22-Звенный ДНК-дуплекс, содержащий окисленный остаток 2'- <i>O</i> -рибофуранозилцитидина (0.1–0.5 мкмоль · л ⁻¹)	NaBH_4	0.05 мкмоль · л ⁻¹	60	—	30

ДНК-Дуплексы с окисленным остатком галактозы в участке узнавания ферментов рестрикции-модификации *EcoRII* (или *MvaI*) (дуплекс 25*) или в прилегающей к нему нуклеотидной последовательности (дуплекс 27*) ковалентно присоединялись к метилазам *EcoRII* и *MvaI* с высокими выходами (см. табл. 3).²⁵ Эффективность ковалентного присоединения зависела от локализации активной группы и природы фермента и коррелировала с эффективностью связывания этих ферментов с указанными реагентами. Для исследования специфичности ковалентного присоединения к *M.EcoRII* ДНК-дуплексов 25* и 27* проверяли возможность конкурентного ингибирования аффинной модификации ферментов ДНК-дуплексами с каноническим участком узнавания и без него. Так, субстрат с участком узнавания, взятый в 20-кратном избытке, практически полностью ингибировал ковалентное присоединение ДНК-дуплексов, содержащих альдегидные группы, к метилазе *EcoRII*. Дуплекс без участка узнавания, взятый в 10-кратном избытке, не изменял способности ДНК-дуплексов 25* и 27* к ковалентному присоединению к *M.EcoRII*. Полученные данные подтверждают специфичность ковалентного присоединения *M.EcoRII* к ДНК-дуплексам с альдегидными группами.

Проведено частичное расщепление белковых фрагментов ковалентных комплексов метилазы *MvaI* и ДНК-дуплексов 25* и 27* химическими реагентами, специфически расщепляющими пептидные связи по остаткам метионина, цистеина или триптофана.[†] Предварительные данные по частичному расщеплению позволили локализовать область ковалентного присоединения ДНК-дуплексов 25* и 27* с альдегидными группами к *M.MvaI*. Оказалось, что эта область одинакова для обоих комплексов и находится в участке белка между Met422 и Met439.

Аффинная модификация эндонуклеазы рестрикции *EcoRII* осуществлялась только реагентом, содержащим альдегидные группы во фланкирующей нуклеотидной последовательности (ДНК-дуплекс 27*).²⁵ При этом выход «пришивки» не зависел от присутствия кофактора этого фермента — ионов Mg^{2+} . Это позволило авторам работы²⁵ сделать предположение, что ковалентное присоединение ДНК-дуплексов с альдегидными группами происходит не к активному центру *R.EcoRII*.

Не наблюдалось аффинной модификации T7 РНК-полимеразы ни одним из ДНК-дуплексов, содержащих окисленный остаток 2'-*O*-рибофуранозилцитидина.³⁰ Однако имело место ковалентное присоединение ДНК-дуплекса, содержащего окисленный остаток 2'-*O*-рибофуранозилцитидина в положении +2 консенсусного промотора, к мутантной форме РНК-полимеразы T7 (Tyr639 → Lys). В ферменте дикого типа Tyr639 является одним из аминокислотных остатков, необходимых на начальных стадиях синтеза РНК, что позволяет предполагать, что модифицируется именно Lys639.³⁰

Первые результаты по аффинной модификации ДНК-связывающих белков важны для определения специфических контактов ДНК — белок и структуры активных центров ферментов, а также для изучения механизма катализа ферментами рестрикции-модификации и РНК-полимеразами.

IV. Заключение

Введение в НК активных альдегидных групп позволяет использовать их для присоединения флуоресцентной или какой-либо другой метки. Кроме того, диальдегидсодержащие олигонуклеотиды удобны для синтеза антисенсовых олигонуклеотидов. Аффинная модификация белков с использованием ДНК-дуплексов с направленно введенными альдегидными группами проходит с достаточно высокими выходами, при этом образуется устойчивая ковалентная

связь. Результаты по ковалентному присоединению реагентов данного типа к белкам позволяют рекомендовать их в качестве эффективного и гибкого инструмента для изучения широкого спектра ДНК-белковых взаимодействий.

Обзор написан при финансовой поддержке Медицинского института Говарда Хьюза (грант ННМИ 75195-545501) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 98-04-49108а).

Литература

1. Г.Я.Шефлян, Е.А.Кубарева, Е.С.Громова. *Успехи химии*, **65**, 765 (1996)
2. K.M.Meisenheimer, T.H.Koch. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **32**, 101 (1997)
3. D.G.Knorre, T.S.Godovikova. *FEBS Lett.*, **433**, 9 (1998)
4. Н.К.Кочетков, Э.И.Будовский, Е.Д.Свердлов, Н.А.Симукова, М.Ф.Турчинский, В.Н.Шibaев. *Органическая химия нуклеиновых кислот*. Химия, Москва, 1970
5. P.N.Lowe, R.B.Beechey. *Bioorg. Chem.*, **11**, 55 (1982)
6. G.Keith, A.-L.Glasser, J.Desgres, K.C.Kuo, C.W.Genrke. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 5989 (1990)
7. K.Randerath. *Anal. Biochem.*, **115**, 391 (1981)
8. S.B.Easterbook-Smith, J.C.Wallace, D.B.Keech. *Eur. J. Biochem.*, **62**, 125 (1976)
9. P.N.Lowe, H.Baum, R.B.Beechey. *Biochem. Soc. Trans.*, **7**, 1131 (1979)
10. O.Howarth, A.S.Jones, R.T.Walker, P.G.Wyatt. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 261 (1984)
11. H.R.Greenberg, A.S.Perlin. *Carbohydr. Res.*, **35**, 195 (1974)
12. F.Hansske, F.Cramer. *Carbohydr. Res.*, **54**, 75 (1977)
13. З.А.Шабарова, А.А.Богданов. *Химия нуклеиновых кислот и их компонентов*. Химия, Москва, 1978
14. J.X.Khym, W.E.Cohn. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 6380 (1960)
15. M.Uziel. *Biochemistry*, **12**, 938 (1973)
16. R.Rayford, D.D.Anthony, R.E.O.Neil, W.C.Merrick. *J. Biol. Chem.*, **260**, 15708 (1985)
17. G.Keith, P.T.Gilham. *Biochemistry*, **13**, 3601 (1974)
18. N.F.Krynetskaya, G.V.Zayakina, T.S.Oreyskaya, E.M.Volkov, Z.A.Shabarova. *Nucleosides Nucleotides*, **5**, 33 (1986)
19. M.Lemaitre, B.Bayard, B.Lebled. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 648 (1987)
20. G.R.Gough, M.J.Brunden, P.T.Gilham. *Tetrahedron Lett.*, **24**, 5317 (1983)
21. А.В.Коршун, Ю.В.Берлин. *Биоорг. химия*, **20**, 565 (1994)
22. S.Agrawal. *Methods in Molecular Biology. Protocols for Oligonucleotide Conjugates. Synthesis and Analytical Techniques. Vol. 26*. Humana Press, Totowa, NJ, 1994. P.105
23. S.N.Mikhailov, E.V.Efimtseva, B.S.Ermolinsky, M.V.Fomicheva, O.M.Gritsenko, M.G.Brevnov, E.S.Gromova, G.Schepers, A.van Aerschot, P.Herdewijn. *Collect. Czech. Chem. Commun., Special Issue*, **61**, 210 (1996)
24. B.S.Ermolinsky, M.V.Fomicheva, E.V.Efimtseva, S.V.Meshkov, S.N.Mikhailov, D.S.Esipov, E.F.Boldyreva, V.G.Korobko. *Nucleosides Nucleotides*, **15**, 1619 (1996)
25. M.G.Brevnov, O.M.Gritsenko, S.N.Mikhailov, E.V.Efimtseva, B.S.Ermolinsky, A.van Aerschot, P.Herdewijn, A.V.Repyk, E.S.Gromova. *Nucl. Acids Res.*, **25**, 3302 (1997)
26. E.V.Efimtseva, B.S.Ermolinsky, M.V.Fomicheva, S.V.Meshkov, N.S.Padyukova, S.N.Mikhailov, A.van Aerschot, J.Rozenski, P.Herdewijn. *Collect. Czech. Chem. Commun., Special Issue*, **61**, 206 (1996)
27. З.А.Шабарова, А.А.Богданов, А.С.Золотухин. *Химические основы генетической инженерии*. Изд-во МГУ, Москва, 1994
28. S.N.Mikhailov, A.DeBruyn, P.Herdewijn. *Nucleosides Nucleotides*, **14**, 481 (1995)
29. S.N.Mikhailov, E.V.Efimtseva, G.V.Gurskaya, M.V.Fomicheva, S.V.Meshkov. *J. Carbohydr. Chem.*, **16**(1), 75 (1997)
30. S.N.Kochetkov, S.O.Gudima, E.E.Rusakova, D.A.Kostyuk, S.N.Mikhailov, V.L.Tunitskaya. In *The Meeting of International Research Scholars from the Baltics, Central Europe and the Former Soviet Union. (Abstracts of Reports)*. Budapest, 1998. P.68
31. P.N.Lowe, R.B.Beechey. *Biochemistry*, **21**, 4073 (1982)

† О.М.Гриценко, Е.С.Громова, неопубликованные данные.

32. S.N.Kochetkov, T.V.Bulargina, L.P.Sashchenko, E.S.Severin. *Eur. J. Biochem.*, **81**, 111 (1977)
33. A.G.Rabinkov, S.V.Amontov. *Biochem. Biophys Acta*, **1037**, 216 (1990)
34. M.M.King, R.F.Colman. *Biochemistry*, **22**, 1656 (1983)
35. H.M.Miziorko, C.A.Brodt, T.J.Krieger. *J. Biol. Chem.*, **265**, 3642 (1990)
36. L.Seidler, M.Peter, F.Meissner, M.Sprinzi. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 9263 (1987)
37. A.Low, M.Sprinzi, H.G.Faulhammer. *Eur. J. Biochem.*, **215**, 473 (1993)
38. G.G.Chang, M.S.Shiao, K.R.Lee, J.J.Wu. *Biochem. J.*, **272**, 683 (1990)
39. M.R.Gregory, E.T.Kaiser. *Arch. Biochem. Biophys.*, **196**, 199 (1979)
40. A.D.Mirzabekov, S.G.Bavykin, V.L.Karpov, O.V.Preobrazhenskaya, K.K.Ebralidse, V.M.Tuneev, A.F.Melnikova, E.G.Goguadze, A.A.Chenchick, R.S.Beabealashvili. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **47**, 503 (1982)
41. K.K.Ebralidse, S.A.Grachev, A.D.Mirzabekov. *Nature (London)*, **331**, 365 (1988)
42. A.D.Mirzabekov, D.V.Pruss, K.K.Ebralidze. *J. Mol. Biol.*, **211**, 479 (1990)
43. K.K.Ebralidse, T.R.Hebbes, A.L.Clayton, A.W.Thorne, C.Crane-Robinson. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 4734 (1993)
44. A.D.Mirzabekov, S.G.Bavykin, A.V.Belyavsky, V.L.Karpov, O.V.Preobrazhenskaya, V.V.Shick, K.K.Ebralidse. *Methods Enzymol.*, **170**, 386 (1989)
45. G.A.Nacheva, D.Y.Guschin, O.V.Preobrazhenskaya, V.L.Karpov, K.K.Ebralidse, A.D.Mirzabekov. *Cell*, **58**, 27 (1989)
46. A.A.Chenchick, R.S.Beabealashvili, A.D.Mirzabekov. *FEBS Lett.*, **128**, 46 (1981)
47. D.E.Kamashev, N.G.Esipova, K.K.Ebralidse, A.D.Mirzabekov. *FEBS Lett.*, **375**, 27 (1995)
48. A.N.Chkheidze, G.G.Prikhodko, V.L.Karpov, S.K.Vassilenko, A.D.Mirzabekov. *FEBS Lett.*, **336**, 340 (1993)

DIALDEHYDE-CONTAINING NUCLEIC ACID AND THEIR COMPONENTS: SYNTHESIS, PROPERTIES AND AFFINITY MODIFICATION OF RPOTEINS

O.M.Gritsenko, E.S.Gromova

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

Synthesis, structure and chemical properties of dialdehyde nucleoside derivatives are described. The ways of aldehyde group introduction into oligonucleotides are discussed. The methods for the affinity modification of proteins by periodate-oxidised derivatives of nucleic acids are considered.

Bibliography — 48 references.

Received 26th October 1998