

Ковалентное связывание модифицированных нуклеиновых кислот с белками как метод изучения специфических белково-нуклеиновых взаимодействий

Т.С.Зацепин, Н.Г.Долинная, Е.А.Кубарева, М.Г.Ивановская, В.Г.Метелев, Т.С.Орецкая

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского
119992 Москва, Ленинские горы, факс (095) 939–3181

Обсуждены методы специфического ковалентного связывания модифицированных нуклеиновых кислот с белками и ферментами, сохраняющими нативную структуру. Рассмотрены возможности применения синтетических нуклеиновых кислот, содержащих в определенных позициях фотоактивируемые или реакционноспособные (нуклеофильные и электрофильные) группы, для тестирования белково-нуклеиновых контактов и изучения функционирования белков. Описаны структуры белково-нуклеиновых конъюгатов, образующихся в ходе ферментативных реакций. Обобщены методы выделения и анализа ковалентно связанных белково-нуклеиновых комплексов. Особое внимание уделено методам идентификации участка белка, присоединенного к нуклеиновой кислоте. Библиография — 226 ссылок.

Оглавление

I. Введение	84
II. Ковалентное связывание модифицированных нуклеиновых кислот с белками	85
III. Природные конъюгаты белков и нуклеиновых кислот, образующиеся в ходе ферментативных реакций	95
IV. Определение участка белка, ковалентно связанного с нуклеиновыми кислотами	96

I. Введение

Белково-нуклеиновые взаимодействия определяют многие процессы, протекающие в клетке, — репликацию, транскрипцию и трансляцию ДНК, а также процессинг РНК. Для определения аминокислотных остатков, участвующих в образовании белково-нуклеиновых комплексов, применяют различные методы. Эти методы можно разделить на две группы: инструментальные (например, рентгеноструктур-

ный анализ, спектроскопия ЯМР и др.) и молекулярно-биологические (сайт-специфический мутагенез белка, метод ковалентных «сшивок» и т.д.).

Безусловно, наиболее достоверная информация о структуре НК-белкового конъюгата может быть получена методом РСА, однако выделение и кристаллизация соответствующего комплекса возможны далеко не всегда.[†] Кроме того, РСА часто не позволяет выявить конформационные перестройки белков при их взаимодействии с НК и влияние нуклеотидной последовательности НК, фланкирующих участок связывания белка.² Для изучения динамики белково-нуклеиновых комплексов в растворе обычно применяют спектроскопию ЯМР, однако она не всегда может быть использована для исследования сложных мультисубъединичных комплексов, а также процессов, в ходе которых происходит значительное изменение структуры биополимеров. Другие спектроскопические методы, такие как флуоресцентная спектроскопия (в том числе метод остановленной струи), комбинационное и малоугловое рентгеновское рассеяние, методы электронной микроскопии, как правило, дают ограниченную информацию о структуре НК-белкового комплекса.

Среди молекулярно-биологических методов анализа НК-белковых взаимодействий наиболее активно используются сайт-специфический мутагенез и направленная химическая модификация белков, однако они весьма трудоемки и в ряде случаев дают некорректную информацию из-за изменения структуры биополимеров, вызванного заменой функцио-

Т.С.Зацепин. Кандидат химических наук, научный сотрудник кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ. Телефон: (095)939–3148, e-mail: tsz@yandex.ru

Н.Г.Долинная. Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник той же кафедры. Телефон: (095)939–5407, e-mail: dolinnaya@hotmail.com

Е.А.Кубарева. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник НИИ ФХБ. Телефон: (095)939–3148, e-mail: kubareva@belozersky.msu.ru

М.Г.Ивановская. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник того же института. Телефон: (095)939–3152, e-mail: img@genebee.msu.ru

В.Г.Метелев. Доктор химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ. Телефон: (095)939–5407, e-mail: metelev@belozersky.msu.ru

Т.С.Орецкая. Доктор химических наук, профессор той же кафедры. Телефон: (095)939–5411, e-mail: oretskaya@belozersky.msu.ru

Область научных интересов авторов: синтез модифицированных нуклеозидов и их аналогов, автоматический твердофазный синтез модифицированных олигонуклеотидов, белково-нуклеиновые взаимодействия.

Дата поступления 9 марта 2003 г.

[†] В последние годы достигнуты определенные успехи в кристаллизации ковалентно связанных НК-белковых комплексов и изучении их структур методом РСА. Эти работы подробно рассмотрены в обзоре Вердайна и Нормана.¹

нальных остатков аминокислот. Кроме того, в этих случаях необходимо локализовать домен белка, участвующий в связывании. К этой группе методов относится также ковалентное связывание белка с НК. Существует ряд задач, для решения которых этот метод на сегодняшний день представляется оптимальным. Прежде всего, он позволяет идентифицировать домен белка и даже отдельные аминокислоты, взаимодействующие с заданным фрагментом НК в НК-белковом комплексе.^{3–7} Он применяется также при изучении мультибелковых комплексов, образующихся при репликации, трансляции и т.д.; в частности, с его помощью можно определять белковый компонент, взаимодействующий с определенным участком НК.⁸ Этот подход можно использовать при изучении клеточных экстрактов (для нахождения белков, селективно взаимодействующих с определенной нуклеотидной последовательностью), а также в технологии SELEX[‡] (для селекции олигонуклеотидов со специфической первичной структурой — НК-аптамеров, — необратимо связывающихся с белком).^{9,10}

Метод ковалентного связывания белков с НК используется для изучения НК-белковых взаимодействий практически с момента зарождения молекулярной биологии (с середины 1960-х годов).¹¹ К настоящему времени наибольшее распространение получил метод фотоаффинной модификации белков, в основе которого лежит ковалентное связывание немодифицированных нуклеиновых кислот с белками под действием УФ-излучения.¹² Однако этот метод вряд ли можно признать универсальным из-за низких выходов конъюгатов, деструкции биополимеров под воздействием облучения и необходимости определять нуклеотидное звено, к которому присоединен белок. Более перспективным представляется использование фотоактивируемых аналогов НК, которые под воздействием УФ-света генерируют радикалы и бирадикалы. В этом случае отпадает необходимость в определении нуклеотидного звена, участвующего в связывании, а кроме того, уменьшается вероятность деструкции биополимера, так как облучение можно проводить в щадящем режиме (УФ-светом с большой длиной волны). Известно несколько обзоров, посвященных синтезу,¹³ свойствам¹⁴ и применению^{15–17} фотоактивируемых аналогов НК.

Химические методы присоединения белков к НК основаны либо на использовании неспецифических связывающих агентов (например, формальдегида^{18–20}), либо на селективном введении в состав белка или НК реакционноспособных групп. В последнее время разработан новый способ ковалентного присоединения белков к НК в присутствии металлокомплексов.²¹ Было найдено, что УФ-облучение ДНК в присутствии комплексов металлов платиновой группы приводит к специфичному окислению остатков гуанозина в составе олигонуклеотидной цепи.^{22–24} При сближении таких нуклеотидов с белком происходит сшивка. Несмотря на оригинальность, данный метод не нашел широкого применения из-за низких выходов белково-нуклеиновых конъюгатов и коммерческой недоступности наиболее эффективных металлокомплексов.

Настоящий обзор посвящен использованию модифицированных НК для изучения специфических белково-нуклеиновых взаимодействий (мы не рассматриваем методы, основанные на применении химически модифицированных белков^{25–27}). В 1996 г. был опубликован обзор Шефляна и соавт.³ по методам ковалентного присоединения нуклеиновых кислот и их производных к белкам, однако за прошедшие 7 лет было синтезировано много новых производных НК и, что самое главное, была окончательно сформулирована и реализована методология определения аминокислотных остатков, ковалентно связанных с НК.

II. Ковалентное связывание модифицированных нуклеиновых кислот с белками

1. Методы введения функциональных групп в структуру нуклеиновых кислот

Модифицированные НК могут быть синтезированы химическим или ферментативным путем. В первом случае сначала получают модифицированные нуклеозиды (как правило, в виде 3'-амидофосфитных производных), которые затем используют в автоматическом олигонуклеотидном синтезе. Такие нуклеозиды должны быть устойчивы в условиях синтеза и постсинтетических обработок, что не всегда возможно. Кроме того, данный метод позволяет получать только олигомеры длиной до 80–100 нуклеотидных звеньев.

Ферментативный подход предполагает включение модифицированных 5'-трифосфатов нуклеозидов в состав НК с помощью различных полимераз. Как правило, используют C(5)-замещенные пиримидиновые и C(7)-замещенные пуриновые нуклеозиды. Описано также применение производных цитидина, модифицированных по N(4)-положению. В этом случае длина синтезируемой НК может достигать тысячи нуклеотидов. Однако и при ферментативном наращивании цепи существует ряд ограничений, связанных с невозможностью встраивания некоторых модифицированных нуклеотидов в цепь. Ферментативный метод синтеза позволяет проводить статистическую функционализацию НК, причем в случае, когда 5'-трифосфат нуклеозида терминирует рост олигонуклеотидной цепи, модифицированным оказывается 3'-конец НК.

Заместители в состав НК могут быть введены также в процессе постсинтетических обработок. В качестве заместителей могут выступать различные реакционноспособные группы — алифатические аминогруппы, тиольные группы, тиофосфатные межнуклеотидные группировки и др. В лаборатории З.А.Шабаровой в МГУ был разработан оригинальный метод введения реакционноспособных межнуклеотидных группировок при химическом лигировании модифицированных олигонуклеотидов (см. обзор²⁸ и раздел II.3).

2. Фотоактивируемые производные нуклеиновых кислот

Выше уже отмечалась перспективность применения фотоактивируемых производных НК для изучения специфических белково-нуклеиновых взаимодействий. В опубликованном в 1997 г. исчерпывающем обзоре Мейзенхаймер и Коха¹⁴ подробно рассмотрены механизм и селективность образования ковалентных связей между боковыми группами аминокислотных остатков полипептидной цепи и фотоактивируемыми группировками модифицированных нуклеотидных звеньев в составе нуклеиновых кислот.

Наибольшее распространение среди фотоактивируемых аналогов НК получили различные арилазидные производные, что обусловлено их высокой реакционной способностью.[§] Нуклеозиды, содержащие арилазидные группировки, можно ввести в состав НК как ферментативным, так и химическим путем.

К основным недостаткам арилазидных производных НК следует отнести отсутствие селективности в связывании с белками, а также значительный размер арилазидной группировки, что может привести к нарушению локальной структуры НК-белкового комплекса, а также к появлению ковалентных сшивок с удаленными фрагмента белка. Тем не

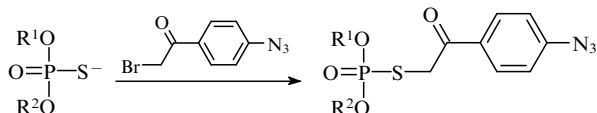
[‡] SELEX — Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment.

[§] При облучении арилазидных групп образуется высокоактивный короткоживущий бирадикал арилнитрен, который реагирует с большинством аминокислот.

менее, данный тип модифицированных НК широко применяется для изучения структуры белково-нуклеиновых комплексов.

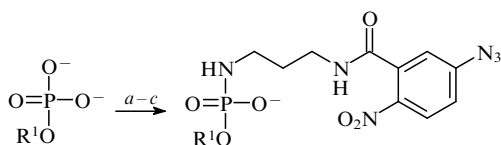
Арилизиды могут быть введены в состав НК несколькими способами:

— по межнуклеотидной тиофосфатной связи модифицированных олигонуклеотидов^{29–31}

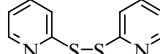


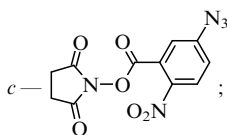
R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной цепи;

— по 5'-фосфатной группе олигонуклеотидов

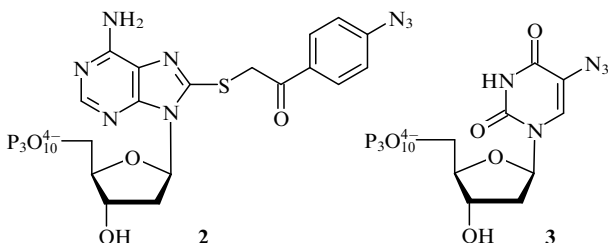
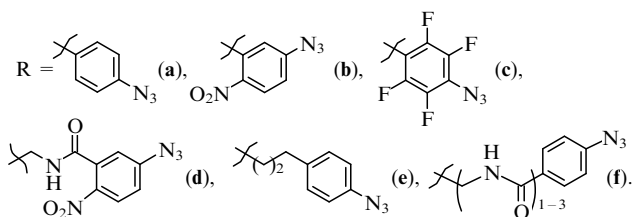
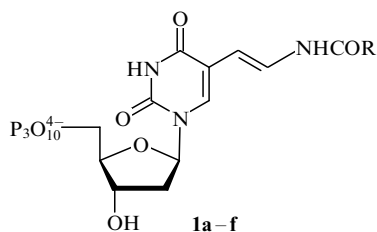


R^1 — фрагмент олигонуклеотидной цепи;

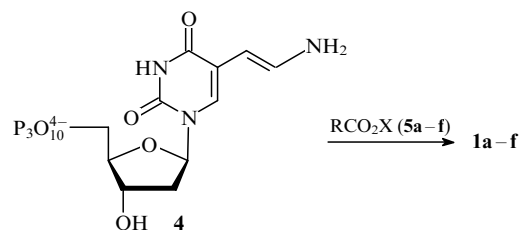
a — Ph_3P , ; b — $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$;



— в процессе полимеразной реакции с использованием в качестве одного из компонентов 5'-трифосфатов нуклеозидов **1–3**, модифицированных по гетероциклическому основанию (см. работы^{32–43}).



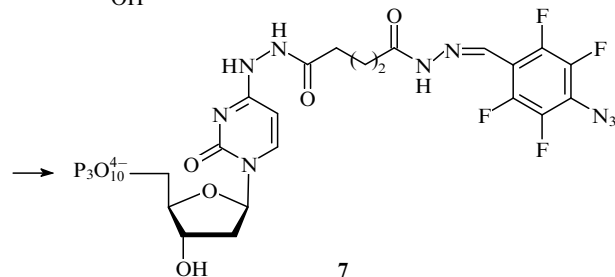
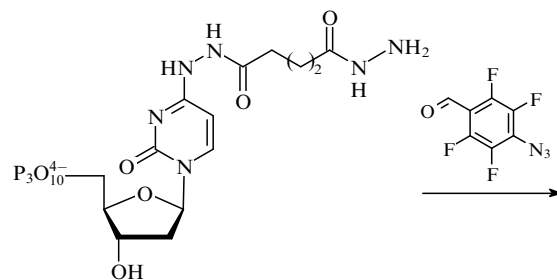
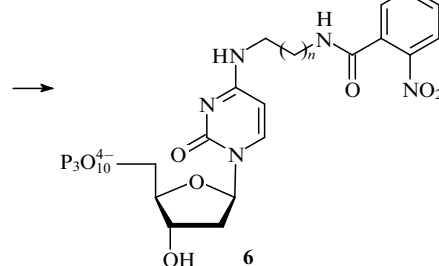
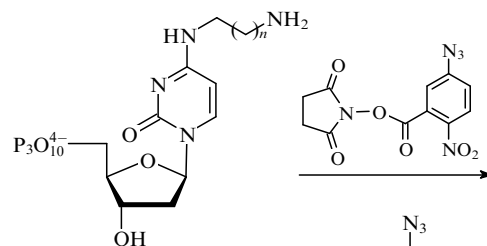
Фотоактивируемые трифосфаты **1a–f** были получены ацилированием 5-(2-аминовинил)-2'-деоксиуридин-5'-трифосфата (**4**) активированным эфиром соответствующей азидобензойной кислоты (**5a–f**).



$X = \text{C}_6\text{F}_5$, сукцинимидо.

Электроакцепторные группы в бензольном кольце арилизиды стабилизируют образующийся при облучении азид нитрен, что приводит к увеличению выхода белково-нуклеиновых конъюгатов.⁴⁴

Другим подходом к синтезу трифосфатов, содержащих арилизидную группировку, является введение amino- и гидразидных групп по C(4)-атому пиримидина с последующим их ацилированием или алкилидированием. Синтез соответствующих соединений **6, 7** описан в работах^{45–49}.



Фотореагенты **1–3, 6, 7** были использованы для изучения репликационного белка А человека,^{32,50–53} обратной транскриптазы ВИЧ-1,⁵⁴ ДНК-полимераз,^{55,56} хеликазы Rep из *E. coli*³⁵ и белков эксцизионной репарации (BER, Base Excision Repair).^{57,58} Полученные ранее данные о структуре ДНК-полимераз отражены в обзоре⁵⁹. Использование арилизидных производных НК для структурно-функциональных исследований описано также в обзоре^{15–18}.

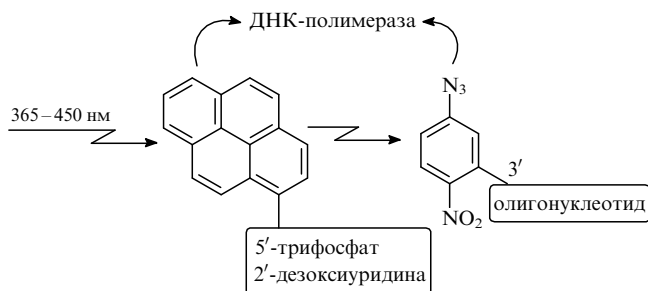
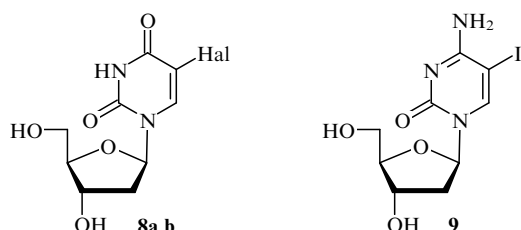


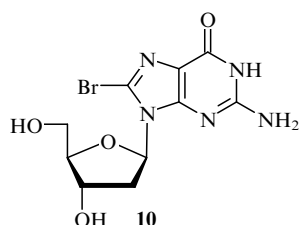
Рис. 1. Сенсibilизированная модификация ДНК-полимеразы.

Лаврик и соавт.⁶⁰ разработали оригинальный метод сенсibilизированной фотомодификации НК арилизидными группами. Сначала с помощью ДНК-полимеразы β на 3'-конец праймера вводится нуклеотид с арилизидной группировкой. Затем в реакционную смесь добавляют пиренсодержащий уридинтрифосфат, который связывается полимеразой, и образовавшийся комплекс облучают светом с длиной волны 365–450 нм. Облучение приводит к возбуждению пиренильного остатка и резонансному переносу энергии флуоресценции (FRET) на арилизидную группировку (рис. 1). Активация последней индуцирует ковалентное присоединение 3'-конца праймера к ДНК-полимеразе. Использование такой бинарной системы позволило значительно увеличить длину волны облучения, необходимую для образования НК-белкового конъюгата, по сравнению с обычно используемой для фотоактивации арилизидных производных (325–350 нм). Это привело к уменьшению фотоповреждений ДНК и белков и к увеличению (на порядок) выхода продукта фотоприсоединения. В дальнейшем этот подход неоднократно использовался при изучении функционирования ДНК-полимераз как в модельных системах, так и в клеточных экстрактах.^{54, 61–65}

Среди других широко используемых фотоактивируемых производных НК следует отметить 5-галогенпиримидиновые и 8-галогенпуриновые нуклеозиды, например 5-бром- (8a)^{33, 66–72} и 5-иод-2'-дезоксисуридин (8b),^{31, 40, 67, 73–95} 5-иод-2'-дезоксидитидин (9)^{77, 96} и 8-бромгуанозин (10).⁹⁷



Hal = Br (a), I (b).

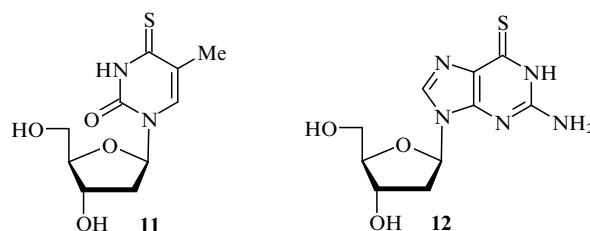


При фотолизе таких фотоактивируемых НК образуются устойчивые радикалы, которые способны взаимодействовать с электронодонорными остатками аминокислот в составе белка (ароматическими и серосодержащими боковыми группами). Оптимальная длина волны УФ-излучения, необходимая для отрыва атома галогена, для бромпроизводных составляет 308 нм, для иодпроизводных — 325 нм.

Увеличение длины волны приводит к уменьшению фотоповреждений белка или НК, но снижает выход продуктов фотоприсоединения. Благодаря небольшому размеру (ван-дер-ваальсовы радиусы атомов иода и брома примерно соответствуют метильной группе) атомы галогена не вызывают существенных изменений в структуре НК и не препятствуют белково-нуклеиновому узнаванию. Это делает галогенпроизводные НК весьма привлекательными для зондирования белково-нуклеиновых контактов в участке связывания биополимеров.

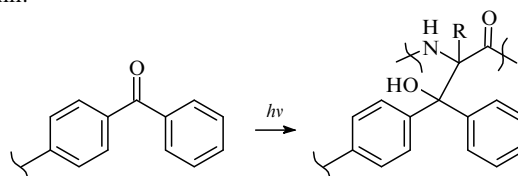
С помощью галогенпроизводных НК изучен широкий спектр НК-узнающих белков: фактор транскрипции NF- κ B;³³ фактор транскрипции, связывающий ССААТ-мотив ДНК (CBF);⁶⁹ ферменты рестрикции — модификации EcoP15I,⁶⁶ EcoRI,^{78, 87} EcoRII,^{93, 94, 96} EcoRV,^{84, 95} SsoII,⁸⁸ CviBII и TaqI;⁸¹ эндонуклеаза генной конверсии PI-SceI;^{79, 80} белок эукариотической рибосомы L5;⁸⁹ субкомплекс хеликазы — праймаза вируса герпеса;^{83, 90} терминатор репликации Tus;⁶⁷ интегразы ВИЧ-1;^{74, 77} белок репарации MutS;⁷⁷ белок HMG1;⁹¹ репликационный белок A;⁸² белки рекомбинации RAG1 и RAG2;⁸⁵ теломераза из *Euplotes aediculatus*;⁷⁵ белок SSB;⁹² фактор роста фибробластов (bFGF₁₅₅);⁷⁰ виментин;⁷¹ белок оболочки фага MS2;⁷³ а также мультибелковый комплекс центромеров (CBF3).⁶⁸

Производные нуклеозидов, в которых оксогруппа в гетероциклическом основании заменена на тиоксогруппу, — 4-тиотимидин (11)^{34, 98–100} и 6-тио-2'-дезоксигуанозин (12)^{101–103} — являются еще одним типом фотоактивируемых производных НК.

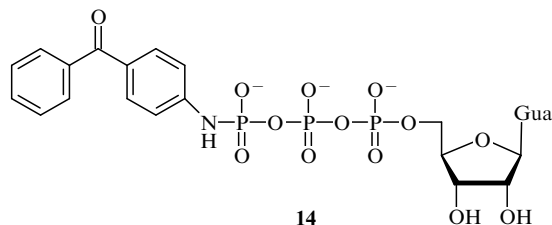
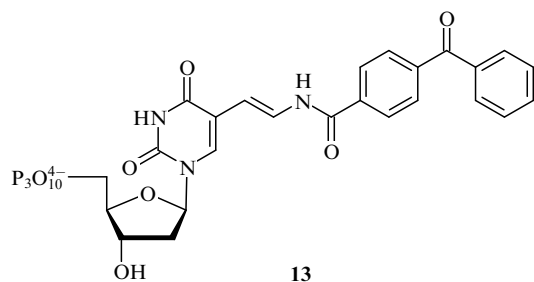


Замена атома кислорода на атом серы приводит к минимальным структурным изменениям биополимера, что в сочетании с высокой реакционной способностью тионов делает их весьма перспективными соединениями. Такие производные при облучении светом с длиной волны > 300 нм реагируют с белком по свободнорадикальному механизму. Они были успешно использованы при изучении участка связывания TAR РНК с Tat-белком ВИЧ-1^{98, 103} (тестирование НК-белковых контактов в большой бороздке двойной спирали РНК); при исследовании ДНК-метилтрансферазы EcoR124I,¹⁰² фактора транскрипции SRF,¹⁰¹ интегразы бактериофага лямбда,¹⁰⁰ белка Rev ВИЧ-1.⁹⁹

Известно, что остаток бензофенона, включенный в структуру НК,^{40, 104} при облучении УФ-светом способен взаимодействовать с α -углеродными атомами полипептидной цепи.¹⁰⁵

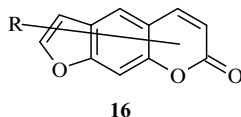
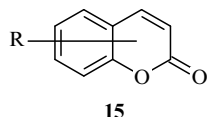


В этой связи представляло интерес рассмотреть возможности использования таких НК для изучения НК-белковых взаимодействий. Так, трифосфаты 13 и 14, содержащие остаток бензофенона, были испытаны в качестве фотореагентов при изучении транскрипционного комплекса РНК-полимеразы III дрожжей⁴⁰ и РНК-связывающего участка РНК-полимеразы T7.¹⁰⁴



За редким исключением выходы продуктов ковалентного присоединения таких производных НК к белкам крайне низки, поэтому они не нашли широкого применения.

Кумарины (**15**) и фурукумарины (**16**, псоралены)*[¶]



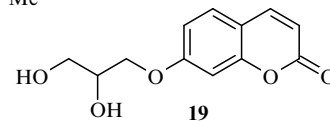
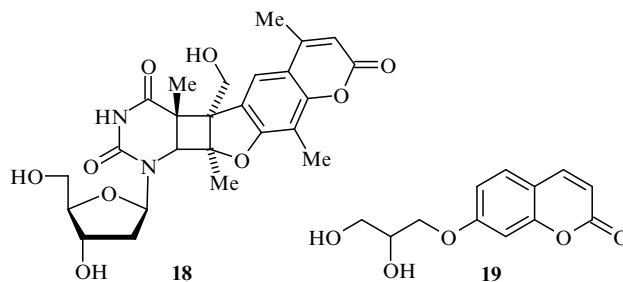
широко используются для введения различных нерадиоактивных меток,^{107, 108} для получения ковалентно связанных НК,¹⁰⁹ а также в фотохимиотерапии¹¹⁰ и диагностике генетических заболеваний.¹¹¹

Псоралены содержат две фотоактивируемые двойные связи, с помощью которых они могут присоединяться к двойной связи C(5)=C(6) тимина с образованием соединения **17** (схема 1). Реакция протекает при УФ-облучении ($\lambda = 300 - 340$ нм). В работах¹¹²⁻¹¹⁵ для фотоаффинной модификации белков было предложено использовать фрагменты ДНК, содержащие остаток тимидина **18**, модифицированный 4'-гидроксиметил-4,5',8-триметилпсораленом.

Кумарин можно ввести в НК путем непосредственного встраивания в олигонуклеотидную цепь соединения **19**, имитирующего углеводный фрагмент.^{111, 116}

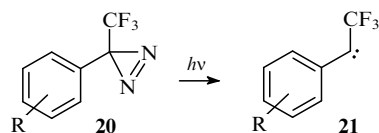
Модифицированные псораленом (или кумарином) НК были использованы для изучения Т7 РНК-полимеразы,^{106, 112-114} белков RecA и Max,¹¹⁴ а также белков комплекса TFIIH.¹¹⁵

* Псоралены применяются также для модификации белковых цепей *in vivo*.¹⁰⁶

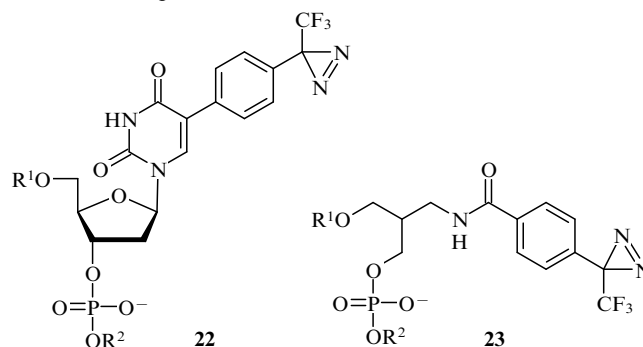


Оптимальная длина волны УФ-облучения, необходимая для индуцирования белково-нуклеиновых сшивок, составляет 300 нм. Механизм и селективность фотоприсоединения аминокислотных остатков белков к псораленсодержащим НК не установлены.

Еще одним фоточувствительным реагентом, применяемым для модификации НК, является арил(трифторметил)диазирин. Под действием УФ-облучения диазирины **20** превращаются в реакционноспособные карбены **21**, которые взаимодействуют практически с любыми молекулами.



В 2000 г. был опубликован обзор¹¹⁷, посвященный использованию арил(трифторметил)диазиринов для изучения НК-белковых взаимодействий. Позже появились еще три работы^{94, 118, 119} по применению НК **22** и **23**, содержащих остатки диазирина.

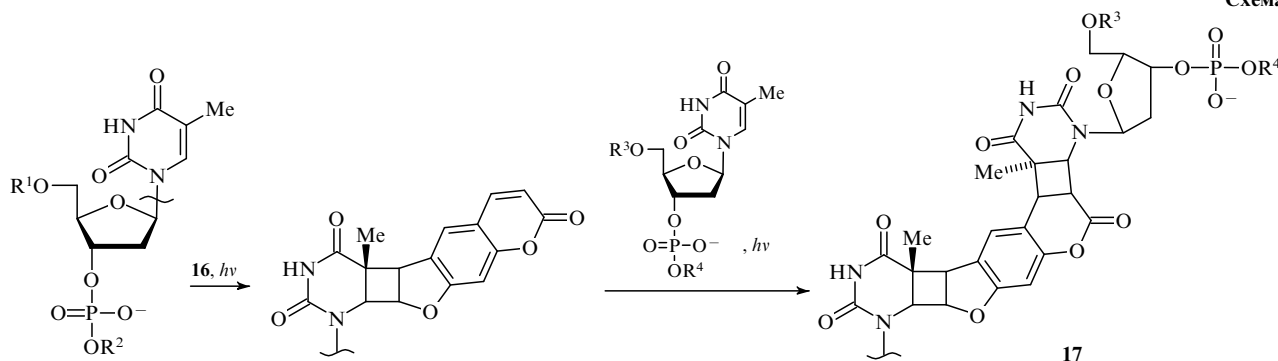


R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

В качестве объектов исследования выступали ДНК-метилтрансфераза EcoRII⁹⁴ и интегразы ВИЧ-1.¹¹⁸

К сожалению, из-за протекания побочных реакций карбенов с молекулами воды выходы продуктов ковалентного связывания диазириновых производных НК с белками низки.

Схема 1



R¹ — R⁴ — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

3. Химическая модификация нуклеиновых кислот

Основным недостатком описанных выше фотоактивируемых НК-реагентов является их неспецифичность. Кроме того, для их активации требуется УФ-облучение, которое может вызывать деструкцию биополимеров. В отличие от них НК-реагенты, содержащие химически активные группы, способны селективно взаимодействовать с пространственно сближенными аминокислотными остатками белка без каких-либо внешних воздействий. Вводя активную группировку в заранее выбранное положение олигонуклеотидной цепи, можно зондировать точечные контакты между различными участками биомолекул, а изменяя химическую природу активной группы — избирательно связывать определенный тип аминокислотных остатков в составе НК-белкового комплекса.

Реакционноспособные группы могут быть введены в любое положение НК — в гетероциклическое основание, в углеводородный остов и по концам олигонуклеотидной цепи. Наиболее перспективным является введение таких группировок в углеводородный остов НК; модификация гетероциклических оснований может нарушить как комплементарные взаимодействия НК, так и специфические взаимодействия в белково-нуклеиновом комплексе.

Используемые для сшивки с белками НК-реагенты должны обладать рядом свойств:

- 1) специфически взаимодействовать со сближенными в пространстве функциональными группами аминокислот белка;
- 2) образовывать устойчивый конъюгат с белком без дополнительной активации при физиологических значениях pH (6.0–8.0);
- 3) сохранять стабильность в нейтральных водных растворах в течение длительного времени без потери реакционной способности.

а. Модификация нуклеиновых кислот по межнуклеотидной фосфодиэфирной связи

Известно, что неспецифические взаимодействия вносят существенный вклад в структурную организацию и устойчивость практически всех макромолекулярных комплексов, в том числе НК-белковых. В связи с этим модификация фосфатных групп НК, которые в большинстве случаев участвуют в этих взаимодействиях, представляется важной для изучения НК-белковых контактов. В начале 1990-х годов Шабаровой и сотр.^{120–123} было предложено заменить природные 3',5'-фосфодиэфирные связи в НК на тризамещенные пирофосфатные (ТЗП) группировки.

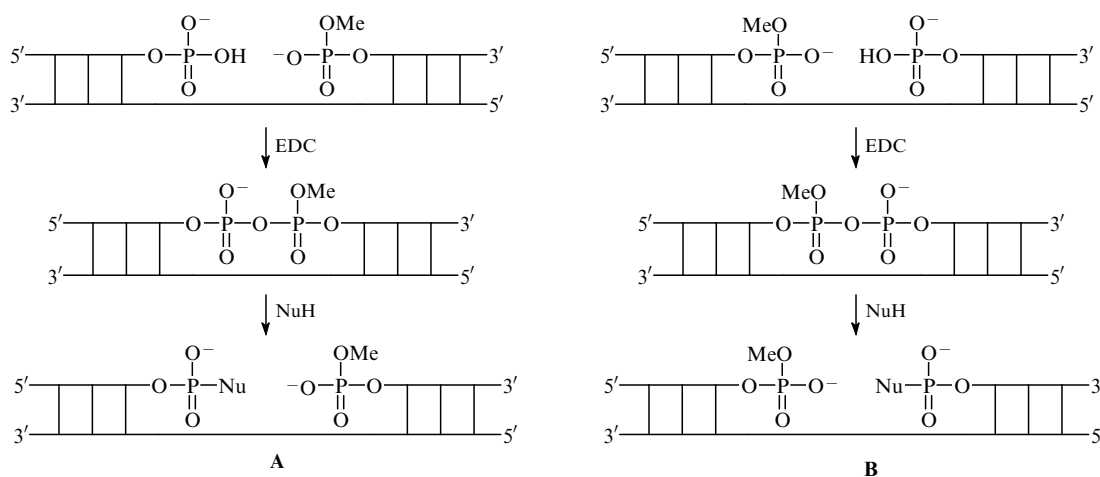
Тризамещенная пирофосфатная группа обладает всеми необходимыми свойствами для взаимодействия с белком: она устойчива в водной среде и легко расщепляется под действием аминов. Было установлено, что олигонуклеотиды, содержащие ТЗП-группу, взаимодействуют только с остатками лизина и гистидина, а также с концевой α -аминогруппой белка,¹²⁴ причем нуклеофильное замещение протекает только по дизамещенному фосфату с образованием ковалентно связанного комплекса белок–олигонуклеотид. Если в образовании фосфамидной связи участвует ϵ -аминогруппа Lys или концевая α -аминогруппа белка, то такая связь устойчива при pH > 4, если аминогруппа His — то связь расщепляется в слабокислой среде или под действием *N*-метилимидазола, что позволяет дискриминировать остатки лизина и гистидина.¹²⁵

Для введения ТЗП-группировки в заданную позицию олигонуклеотида используют метод матрично-направленной конденсации олигонуклеотидов, содержащих моно- и дизамещенные концевые фосфатные группы, под действием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом (EDC) (схема 2, химическое лигирование). В обзорах^{3,18,126} детально описано использование метода химического лигирования для получения различных одно- и двухспиральных ТЗП-модифицированных олигонуклеотидов.

В зависимости от того, какой из концевых фосфатных остатков (3'- или 5'-) в исходном олигонуклеотиде этерифицирован, возможно образование двух изомерных ТЗП-содержащих олигонуклеотидов **A** и **B** (см. схему 2). Установлено, что синтез изомера **B** протекает намного эффективнее, чем изомера **A**, что связано с различной реакционной способностью и доступностью реагирующих моно- и дизамещенных фосфатных остатков. В то же время легко образующийся изомер **B** медленнее реагирует с аминогруппой лизина, чем изомер **A**.

В качестве белка-мишени в работах^{127,128} был использован фактор транскрипции NF- κ B человека. Он относится к классу многофункциональных белков эукариот (семейство Rel), которые регулируют экспрессию генов и играют важную роль в таких процессах, как иммунный ответ,¹²⁹ программируемая смерть клеток,¹³⁰ клеточный рост¹³¹ и пролиферация.¹³⁰ Показано, что синтетические ДНК-дуплексы, содержащие ТЗП-группы в различных положениях внутри участка узнавания фактора транскрипции NF- κ B, резко различаются по эффективности ковалентного связывания с белком. Так, для изомеров **A** выход белково-нуклеинового конъюгата составил 35%, а для изомеров **B** — не более 7%. Обнаруженная закономерность учитывалась в дальнейшем при дизайне ДНК-реагентов с ТЗП-группами.

Схема 2



NuH — остатки Lys и His в составе белка.

Серия ДНК-дуплексов, содержащих *O*-метилпирофосфат в разных положениях участка связывания фактора транскрипции HNF-1, была использована для зондирования контактов ДНК с этим белком в ядерном экстракте из печени крыс,¹³² а также для изучения контактов ДНК с формамидо-ДНК-гликозилазой.¹³³

В работе Шабаровой и сотр.¹³⁴ описан синтез ТЗП-содержащих производных РНК. С использованием ТЗП-содержащих производных РНК были подтверждены контакты отдельных фосфатных групп РНК в комплексе TAR РНК с Tat-пептидом,¹³⁵ предсказанные на основании данных спектроскопии ЯМР. Целью этого исследования было уточнение архитектуры природного комплекса TAR РНК – Tat-белок. Для определения аминокислот, взаимодействующих с РНК-дуплексом, были использованы методы химического и ферментативного расщепления белкового фрагмента в ковалентно связанном комплексе с последующим анализом конъюгата методом масс-спектрометрии.¹³⁵ Природный комплекс TAR РНК – Tat-белок играет ключевую роль в активации транскрипции вируса иммунодефицита человека. Установлено, что Tat-белок после комплексобразования с TAR РНК опосредованно активирует РНК-полимеразу II.¹³⁶ Этот процесс является определяющим в инициации транскрипции ВИЧ-1, так как при отсутствии Tat-белка не происходит элонгации транскрипции.

В последние годы ведутся активные исследования структурного полиморфизма белков, в том числе возникающего в результате облучения и кристаллизации. Можно надеяться, что использование нуклеиновых кислот, содержащих ТЗП-группировки, позволит уточнить отдельные контакты между биополимерами в белково-нуклеиновом комплексе, находящемся в нативном состоянии в водной среде, и сравнить полученные результаты с данными РСА. Преимуществами реагентов такого типа являются селективность взаимодействия (Lys или His) и отсутствие протяженных спейсеров между фосфатной группой, участвующей в связывании, и нуклеофильными группами белков. Так, с помощью синтетических фрагментов промотора (10–20 н.п.), содержащих ТЗП-группу в позициях, которые, по данным РСА, сближены с определенными аминокислотами, были подтверждены некоторые контакты остатков Lys и His в РНК-полимеразе бактериофага T7 с фосфатными группами промотора.¹³⁷ Функциональная важность таких контактов была ранее доказана в биохимических исследованиях.

Указанный подход был применен также для изучения комплекса фактора транскрипции NF-κB с ДНК-дуплексами с различной первичной структурой.¹²⁸ Метод ковалентного связывания позволил выявить принципиально важный факт, заключающийся в том, что структура комплекса NF-κB с ДНК определяется не только нуклеотидной последовательностью участка связывания белка, но и фланкирующими областями. Позже этот факт был подтвержден данными РСА.^{138–141}

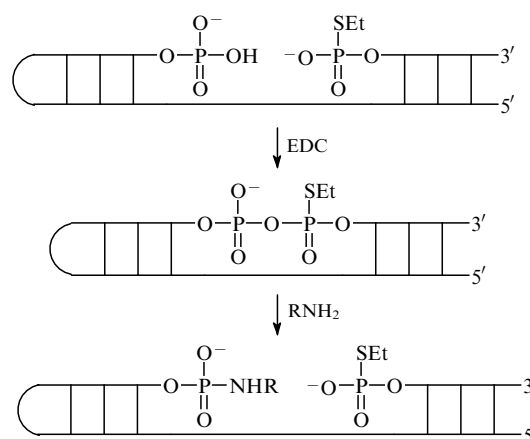
Шабарова и соавт.¹⁴² показали, что ДНК-дуплексы, содержащие ТЗП-группировку, являются перспективными реагентами для зондирования конформационных изменений фермента в фермент-субстратном комплексе в процессе его функционирования. В качестве объекта исследования в работе¹⁴² использовали эндонуклеазу рестрикции MvaI (R.MvaI), а в качестве субстрата — 14-звенный ДНК-дуплекс, содержащий участок узнавания фермента и ТЗП-группировку вместо одной из расщепляемых фосфодиэфирных связей. С помощью этой системы были изучены конформационные изменения эндонуклеазы рестрикции MvaI в фермент-субстратном комплексе в зависимости от концентрации ионов магния (последний является кофактором расщепления ДНК). Показано, что ионы магния стимулируют конформационную перестройку белка, в результате которой одна из нуклеофильных групп каталитического центра R.MvaI (пред-

положительно гистидин) оказывается сближенной с модифицированной связью в ДНК-субстрате.

Для увеличения реакционной способности межнуклеотидных связей было предложено заменить ТЗП-группы в ДНК-дуплексах на их серосодержащие аналоги.¹⁴³ Олигонуклеотиды, содержащие тиоаналоги ТЗП-группы, оказались более активными по отношению к алифатическим аминам, поскольку диалкилтиофосфорная кислота является более сильной по сравнению с диалкилфосфорной и, следовательно, лучшей уходящей группой.

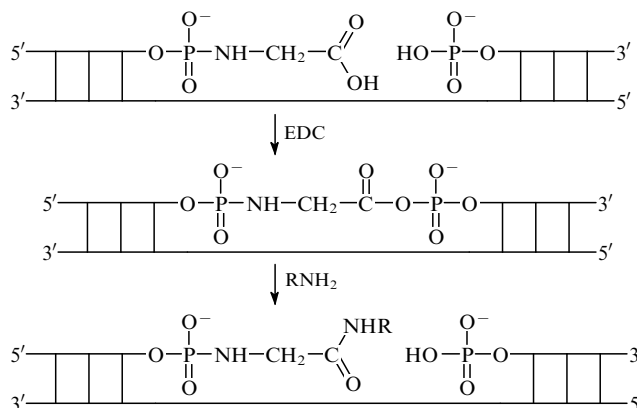
Шпильчатые ДНК-дуплексы, несущие участок узнавания фактора транскрипции человека NF-κB, в которых положение модификации (серосодержащей ТЗП-группы) соответствовало максимально сближенной с остатком лизина позиции, ковалентно связывались с белком (схема 3). В отличие от кислородсодержащих ТЗП, в этой реакции эффективно участвовали оба изомера, различающиеся положением тризамещенного фосфатного остатка. Однако лабильность серосодержащих ТЗП-групп и относительная сложность их введения в олигонуклеотиды препятствует широкому распространению этого типа ДНК-реагентов.

Схема 3



В работах^{124, 144} для изучения НК-белковых взаимодействий было предложено использовать олигонуклеотиды, содержащие вместо одной фосфодиэфирной связи химически активную ацилфосфатную группировку. Эту группу вводили в заданную позицию углеводфосфатного остова путем матрично-направленного химического лигирования двух олигонуклеотидов, один из которых служил донором фосфатного, а другой — донором карбоксильного остатков (схема 4).¹²⁴ Образующийся смешанный ангидрид при действии аминов в водной среде (pH ≥ 8) расщепляется, давая амид карбоновой (а не фосфорной) кислоты (см. схему 4).¹²⁴ В реакциях с аминами такие ацилфосфатсодержащие производные олиго-

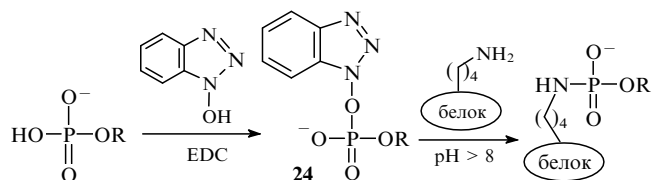
Схема 4



нуклеотидов выполняют роль мягких ацилирующих агентов. Сравнение свойств ДНК-дуплексов, содержащих в одной и той же позиции участка узнавания фактора транскрипции NF-κB ацилфосфатную или ТЗП-группу, показало, что выход белково-нуклеиновых конъюгатов с участием ацилфосфатсодержащих ДНК втрое ниже, чем с участием ТЗП-содержащих.¹²⁴ Более низкая реакционная способность, а также образование побочных продуктов при синтезе ацилфосфатных производных олигонуклеотидов послужили причинами того, что они оказались мало пригодными для ковалентного связывания с белками.[†]

6. Модификации нуклеиновых кислот по концевой фосфатной группе

Более доступными реакционноспособными фосфорилирующими агентами являются производные олигонуклеотидов, в которых активирована концевая фосфорная группа. Из реагентов такого типа самыми распространенными являются *N*-гидроксibenзотриазольные эфиры (НОВТ-производные) олигонуклеотидов **24**. Последние получают в одну стадию из олигонуклеотид-3'- или 5'-фосфатов и *N*-гидроксibenзотриазола под действием водорастворимого карбодиимида в водно-органической среде.^{147, 148}



R — остаток олигонуклеотида.

В реакциях с аминокислотами, пептидами и белками НОВТ-производные олигонуклеотидов **24** проявляют фосфорилирующую активность. При этом взаимодействие с белком протекает либо по N-концевой α-аминогруппе, либо по ε-аминогруппе Lys, либо по остатку имидазола в гистидине.¹⁴⁹

Активные *N*-гидроксibenзотриазольные эфиры олигонуклеотидов успешно использовали для изучения ДНК-¹²⁵ и РНК-связывающих¹⁴⁹ белков. Авторы работы¹²⁵ изучали структуру комплекса РНК-полимеразы из *E. coli* с ДНК-промотором. Ими была получена большая серия гидроксibenзотриазольных производных одно- и двухцепочечных олигонуклеотидов из различных областей промотора, ответственных за разные этапы инициации транскрипции (–35 и –10 относительно точки начала транскрипции). По результатам ковалентного связывания РНК-полимеразы, состоящей из пяти субъединиц (холофермент), с каждым из полученных олигонуклеотидов определяли субъединицу РНК-полимеразы и аминокислотные остатки, участвующие в образовании связи с каждым олигонуклеотидом.¹²⁵ Результаты, полученные с помощью гидроксibenзотриазольных производных, были подтверждены Нарышкиным с соавт.,¹⁵⁰ которые для решения той же задачи использовали фотоактивируемые арилизидные аналоги ДНК.

Применению гидроксibenзотриазольных производных РНК для изучения РНК-связывающего белка посвящена также работа¹⁴⁹, в которой описано связывание Tat-белков с фрагментом TAR РНК. Высокая эффективность ковалентного связывания РНК с пептидом дает основание полагать, что указанный тип производных может использоваться для создания «ловушек», замедляющих транскрипцию вируса иммунодефицита в зараженных клетках.

[†] Методы введения карбоксильных групп в ДНК и химические свойства таких производных изучены достаточно широко.^{145, 146}

Следует отметить, что НОВТ- и ТЗП-производные нуклеиновых кислот с модифицированными фосфатными группами как внутри цепи НК, так и по ее концам являются единственными в настоящее время реагентами, с помощью которых можно тестировать контакты остатков Lys и His белка. Высокая эффективность образования белково-нуклеиновых конъюгатов (выход до 50%), селективность связывания с белками, наличие химической базы для анализа продуктов ковалентного связывания открывает перспективы для дальнейшего использования таких реагентов для выявления структуры и изучения конформационных перестроек НК-белковых комплексов в процессе их функционирования или при изменении внешних условий.

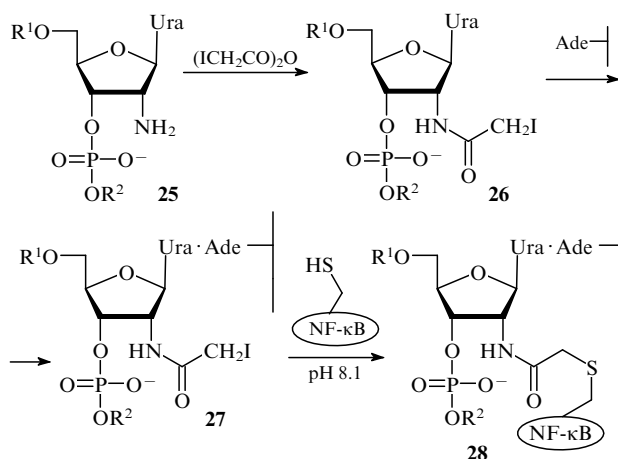
в. Модификация углеводного фрагмента нуклеиновых кислот

К настоящему времени получено лишь незначительное количество НК-реагентов, содержащих активные группировки в углеводном фрагменте. Вместе с тем известно, что НК-узнающие белки взаимодействуют с НК именно путем образования гидрофобных и ван-дер-ваальсовых контактов с рибозным остатком.¹⁵¹ Особый интерес представляют НК-реагенты, модифицированные по 2'-положению рибозы. Именно это положение является главным при дискриминации белками молекул ДНК и РНК.

В работе¹⁵² для селективного ковалентного присоединения белков, содержащих остаток цистеина в активном центре, предложено использовать 2'-иодацетамидную группировку в составе ДНК-дуплексов. Иодацетамидная группировка была выбрана потому, что она более активна в реакции алкилирования тиольной группы цистеина, чем бромацетамидная.¹⁵³ В качестве исходных соединений для направленного введения иодацетамидной группировки были использованы синтетические олигонуклеотиды, содержащие в заданном положении вместо тимидина 2'-амино-2'-дезоксисуридин **25** (данный подход позволяет легко менять положение реакционного центра в заданной олигонуклеотидной последовательности). 2'-Дезокси-2'-иодацетамидуридиновые производные **26** получали ацилированием аминогруппы избытком ангидрида иодуксусной кислоты (схема 5).

При изучении реакций ДНК-реагентов, содержащих в положении 2' уридинового остатка иодацетамидную группу, с разнообразными низкомолекулярными нуклеофилами (в том числе с аминокислотами и пептидами) было найдено, что они взаимодействуют только с тиолсодержащими соединениями, в частности, с цистеинсодержащими белками. Следует отметить, что введенные в 2'-положение углеводного фосфатного остова ДНК иодацетамидные группировки реагируют с остатками цистеина белка только в составе

Схема 5



R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

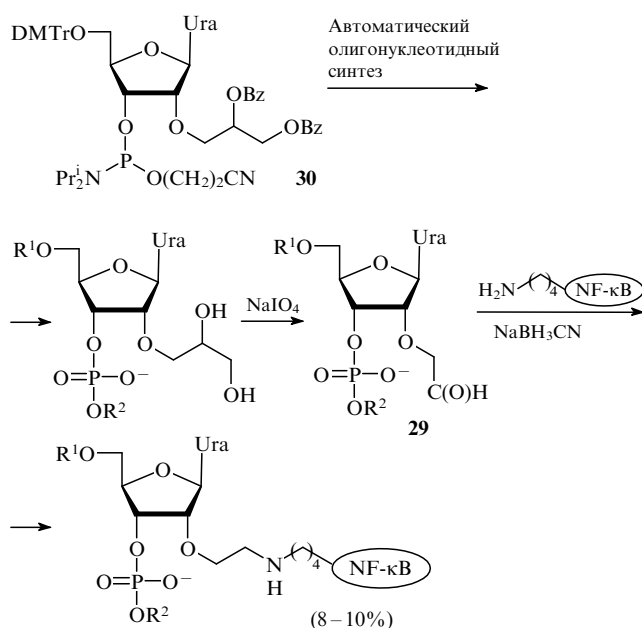
специфического белково-нуклеинового комплекса (например, в составе дуплекса **27**, см. схему 5).

Такие ДНК-дуплексы были использованы для аффинной модификации ряда ДНК-узнающих цистеинсодержащих белков: фактора транскрипции NF-κB, фермента рестрикции — модификации SsoII, урацил-ДНК-гликозилазы.¹⁵² Так, реакция модифицированных ДНК-дуплексов **27** с фактором транскрипции NF-κB протекает при pH 8.1 за 15 мин с образованием ковалентно связанных аддуктов **28**. Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что данная реакция протекает эффективно (выход конъюгатов достигает 25%) и высокоспецифично.

Во взаимодействие с углеводофосфатным остовом ДНК могут быть вовлечены также аминогруппы остатков лизина ДНК-узнающих белков. В этом случае в углеводофосфатный остов ДНК вводят, как правило, альдегидные группы. Синтез и свойства олигонуклеотидов, содержащих диальдегидные группы, рассмотрены в обзорах^{154–156}.

В работах^{157, 158} описан синтез олигодезоксирибонуклеотидов **29**, содержащих 2-оксоэтильную группу при атоме O(2'). В качестве исходного соединения в олигонуклеотидном синтезе таких ДНК использовали защищенное амидофосфитное производное 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)уридина **30** (схема 6).

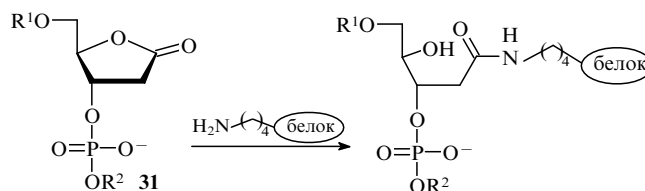
Схема 6



Окисление диольной группировки в альдегидную проводили в мягких условиях действием двукратного избытка периодата натрия. Полученные олигонуклеотиды **29** эффективно реагируют с различными аминсоединениями.¹⁵⁹ В работе¹⁶⁰ продемонстрирована возможность ковалентного присоединения ДНК, содержащих 2'-O-(2-оксоэтил)уридиновый фрагмент, к фактору транскрипции NF-κB (см. схему 6). Олигонуклеотид **29** оказался более эффективным в реакции с NF-κB, чем диальдегидные производные, поскольку в этом случае исключается возможность протекания реакции β-элиминирования, а небольшой размер 2'-O-(2-оксоэтильного) остатка позволяет ε-аминогруппам лизина максимально приблизиться к ДНК. Сильной стороной этого подхода является возможность варьирования положения модифицированного звена и количества модификаций в олигонуклеотиде. Выходы продуктов присоединения фактора транскрипции NF-κB к ДНК-лигандам составили 8–10%.

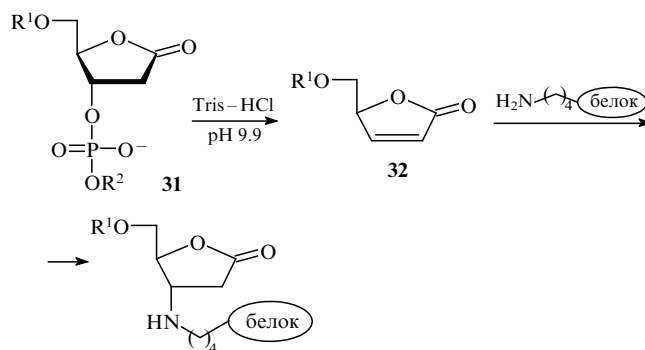
Авторы работы¹⁶¹ предложили использовать ДНК-лиганды **29** для изучения механизма функционирования ДНК-метилтрансферазы SsoII. С помощью серии дуплексов с одной и двумя модификациями в участке узнавания удалось получить два типа ДНК-белковых конъюгатов (выходы достигали 70%). На основании измерения молекулярного веса таких конъюгатов было высказано предположение о том, что ДНК-метилтрансфераза SsoII взаимодействует с ДНК в виде димера.

Олигонуклеотиды **31**, содержащие 2-дезоксирибонуклеотидное звено, использовали для ковалентного связывания ряда ферментов репарации.^{162, 163}



R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной цепи; белок — эндонуклеаза III или ДНК-полимераза человека.

Такие олигонуклеотиды оказались универсальными для ковалентного присоединения различных белков эксцизионной репарации. Авторы работы¹⁶⁴ предложили использовать олигонуклеотиды **31** для синтеза олигонуклеотидов **32**, содержащих на 3'-конце цепи фуран-2(5H)-он.



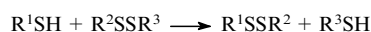
R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

Последние являются субстратами только тех ферментов BER, которые катализируют β,δ-элиминирование апуринового участка, что позволяет селективно связывать эти белки, в том числе и в клеточных экстрактах.

г. Модификация нуклеиновых кислот по гетероциклическому основанию

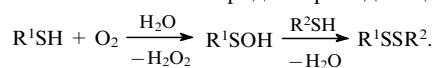
Выше отмечалось, что введение реакционноспособных групп в гетероциклические основания редко используется для модификации НК. Тем не менее такие примеры известны. В частности, для ковалентного связывания цистеинсодержащих белков с ДНК с образованием дисульфидного мостика в гетероциклическое основание нуклеотидного звена ДНК вводили заместители, содержащие группы —SH или —SS—. Введение таких групп в состав олигонуклеотида позволяет осуществлять ковалентное связывание олигонуклеотида и белка либо по механизму тиол-дисульфидного обмена, либо в результате окисления тиольных групп под действием кислорода воздуха.

Тиол-дисульфидный обмен

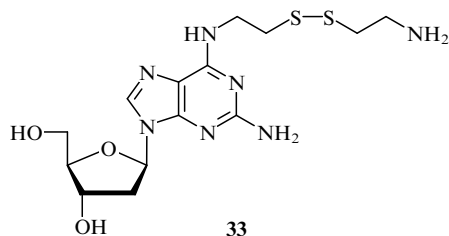


эффективно протекает при комнатной температуре в воде при физиологических значениях pH, несмотря на то что в основе этой реакции лежит расщепление и образование

прочной ковалентной связи S—S с энергией 60 ккал·моль⁻¹ (см. работу¹⁶⁵). Образование дисульфидной связи через окисление тиолов кислородом проходит в две стадии.¹⁶⁶



Впервые образование дисульфидной связи в ДНК-белковом комплексе было использовано для доказательства специфичности связывания модифицированного олигонуклеотидного лиганда с активным центром ДНК-метилгуанинметилтрансферазы (МГМТазы) *E. coli*, содержащей остаток цистеина.¹⁶⁷ Действие этого важного фермента системы репарации направлено на удаление метильной и других алкильных групп из положений O(6) гуанина или O(4) тимина путем их переноса на остаток цистеина в активном центре белка. В «нерабочем» состоянии остаток цистеина находится внутри белковой глобулы.¹⁶⁸ Предполагалось, что при связывании с субстратом или в процессе репарации в МГМТазе происходят конформационные перестройки, однако информация об их природе отсутствовала. Для подтверждения этого предположения в 21-звенный олигодезоксирибонуклеотид в процессе автоматического синтеза вместо дезоксигуанозина ввели 2'-дезоксид-β-D-рибофуранозил-2-амино-6-(цистамино)пурин (33).

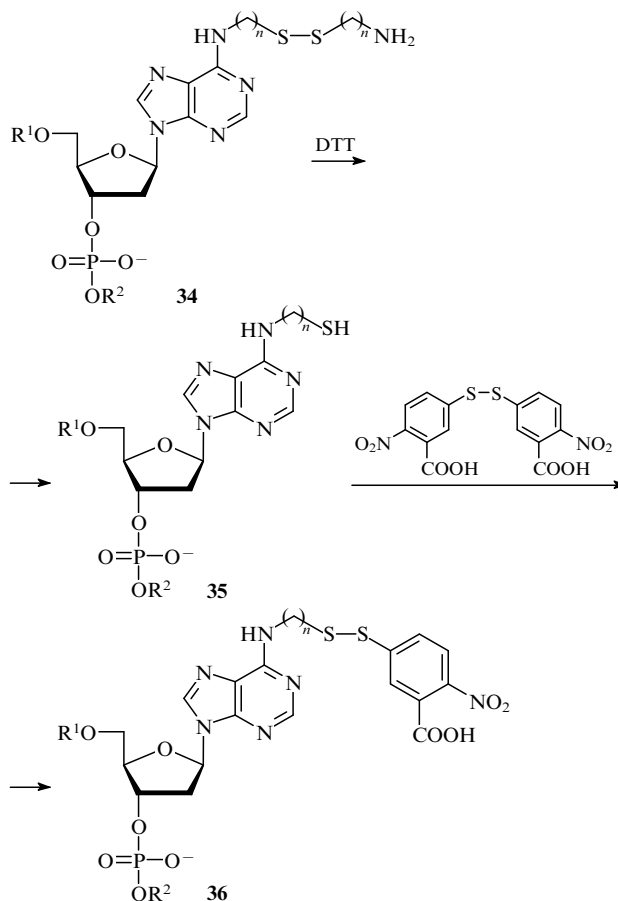


Модифицированный олигонуклеотид, содержащий фрагмент 33, вводили в цепь НК и восстанавливали дисульфидную связь дитиотреитом (ДТТ). Под действием кислорода воздуха между модифицированным двухспиральным олигонуклеотидом и МГМТазой возникала ковалентная связь (выход НК-белкового конъюгата низкий). Образование дисульфидной связи между ДНК и белком подтверждено ее расщеплением под действием ДТТ. Анализ первичной структуры ковалентно связанного с олигонуклеотидом полипептидного фрагмента подтвердил, что именно цистеин участвует в образовании дисульфидного мостика. Другим доказательством участия именно этого аминокислотного остатка в формировании ковалентного комплекса МГМТазы – ДНК явились результаты следующего эксперимента. Цистеин активного центра метилировали путем предварительной инкубации белка с олигомером, несущим остаток O(6)-метилгуанозина. Такой белок был неспособен образовывать конъюгат с восстановленным ДНК-субстратом, содержащим аналог нуклеозида 33 со свободной тиольной группой. Таким образом, проведенные исследования показали, что МГМТазы в процессе функционирования претерпевают конформационные перестройки, при которых остаток цистеина сближается с алкилированным производным гуанозина.¹⁶⁷

Аналогичный подход, основанный на сайт-специфическом присоединении белка к химически активным аналогам ДНК с образованием дисульфидных связей, был применен авторами работы¹⁶⁹ для установления контактов в активном комплексе интегразы ВИЧ с кДНК вируса. Сначала методом сайт-направленного мутагенеза в определенные положения аминокислотной цепи интегразы ввели дополнительные остатки цистеина, а в определенные участки ДНК в ходе автоматического синтеза ввели модифицированные звенья 2'-дезоксиденозина, содержащего в составе заместителя при атоме N(6) дисульфидную группу. Предполагалось, что в ДНК-белковом комплексе введенный

остаток цистеина будет располагаться рядом с местом модификации ДНК, поскольку тиол-дисульфидный обмен требует более «тесного» расположения двух взаимодействующих групп, чем фотоактивируемое ковалентное присоединение.

Реакционную способность ДНК 34, содержащих дисульфидную функцию, можно увеличить, переведя ее в тиольную форму под действием ДТТ (ДНК 35 реагирует с остатком цистеина белка при окислении кислородом воздуха). Если подействовать на ДНК 35 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой), то можно получить еще более реакционноспособное производное — ДНК 36.



R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной цепи; n = 2, 3.

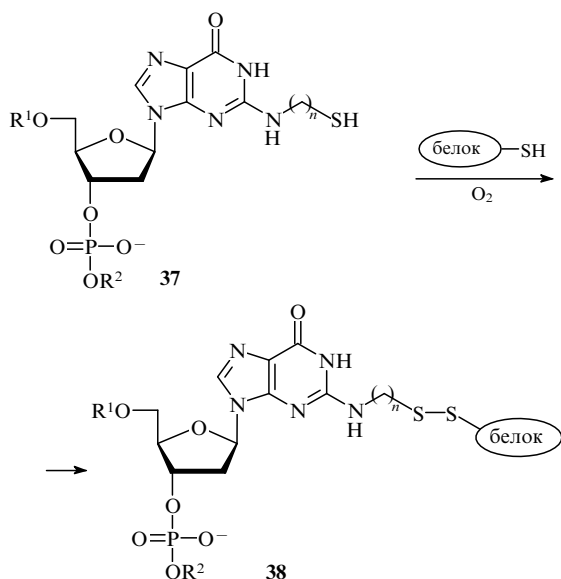
Следует отметить, что введение рассматриваемых активных группировок по атому N(6) аденина не нарушает его способности образовывать уотсон-криковские водородные связи.

Установлено, что выход продуктов ковалентного связывания высокорекционноспособных субстратов 36 со всеми мутантными формами интегразы, содержащими единичные дополнительные остатки цистеина, примерно одинаков. Для повышения специфичности ковалентного связывания лучше использовать менее активные субстраты 35 или 34. Так, для наименее реакционноспособных олигонуклеотидов 34 была достигнута требуемая специфичность ковалентного взаимодействия: значительный выход конъюгата наблюдался только для одной комбинации мутантной формы интегразы. Было также показано, что использование пропиленового линкера вместо этиленового значительно повышает выход белково-нуклеинового конъюгата. В работе¹⁶⁷ изучено также влияние добавок 2-меркаптоэтанола на выход белково-нуклеиновых конъюгатов. Показано, что присутствие значительных количеств 2-меркаптоэтанола (> 5 ммоль·л⁻¹) полностью блокирует образование продукта реакции, однако в небольших количествах (2 ммоль·л⁻¹) он повышает специфичность ковалентного связывания HS- и SS-содержащих

ДНК. В этих условиях реакция образования белково-нуклеинового комплекса обратима и единственным требованием для его получения становится пространственная близость реагирующих групп.

Проведенные исследования показали, что между кДНК вируса и интегразой осуществляется транс-взаимодействие. Это означает, что фермент-субстратный комплекс представляет собой ДНК, связанную с С-концевым доменом одного мономера интегразы и с каталитическим доменом другого мономера интегразы. Кроме того, с помощью сайт-специфического ковалентного связывания были выявлены конформационные изменения в комплексе интегразы – ДНК, сопровождающие реакцию концевой процессинга.

Метод окисления тиольных групп под действием кислорода воздуха был успешно использован для получения ковалентно связанного комплекса обратной транскриптазы ВИЧ-1 с ДНК-дуплексом, представляющим собой матрицу и праймер. Реакция проводилась в присутствии дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, что обеспечивало формирование функционально активного супрамолекулярного ассоциата.^{170, 171} Активная меркаптоалкильная группировка вводилась по аминогруппе, находящейся в положении 2 гуанина (соединение 37). Эта группировка располагалась в малой бороздке ДНК и была пространственно сближена с остатком цистеина[‡] спирали Н обратной транскриптазы. Один из конъюгатов (комплекс 38) был закристаллизован и изучен методом РСА, что позволило определить структуру комплекса обратной транскриптазы с праймером, ДНК-матрицей и трифосфатом 2'-дезоксинуклеотида.

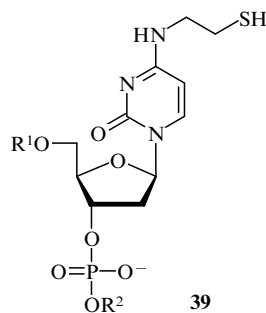


R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной цепи; $n = 2, 3$;
белок — обратная транскриптаза ВИЧ-1.

Аналогичная стратегия была использована при изучении конформационных изменений обратной транскриптазы, происходящих при ее связывании с трифосфатом 2'-дезоксинуклеотида.^{172, 173}

Хи и Вердайн¹⁷⁴ для исследования N-терминального домена мутантного Ada-белка из *E. coli* использовали олигонуклеотид 39, содержащий остаток модифицированного по аминогруппе цитидина. Изучение специфичного ковалентного присоединения модифицированных ДНК 39 к мутантным белкам позволило установить ряд ДНК-белковых контактов.

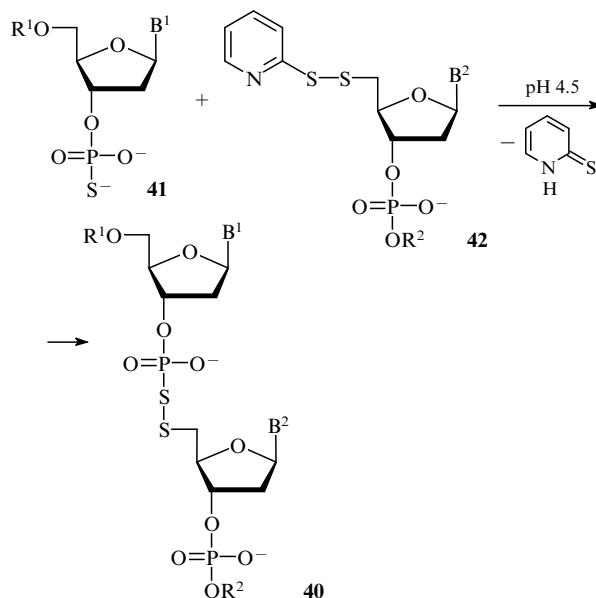
[‡] Остаток цистеина вводили вместо остатка глутамина в нативном ферменте с помощью сайт-направленного мутагенеза.



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

д. Другие примеры модификации нуклеиновых кислот

В работах^{175–178} для селективного связывания цистеина в белках и пептидах было предложено использовать олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие фосфорилдисульфидные и дифосфорилдисульфидные группировки в углеводофосфатном остове. Для исследования взаимодействия ДНК-метилтрансферазы SsoII с ДНК, содержащей участок метилирования, была получена серия ДНК-дуплексов, в которых одна из фосфодиэфирных межнуклеотидных связей заменена на фосфорилдисульфидную (ФДС) группу (один из тяжёлых дуплексов представлял собой модифицированный олигонуклеотид 40).^{179, 180} Модифицированная связь вводилась в позиции, непосредственно фланкирующие метилируемый цитидиновый остаток, путем тиол-дисульфидного обмена между 3'-тиофосфорилированным олигонуклеотидом 41 и 2-пиридилтиозамещенным олигонуклеотидом 42.



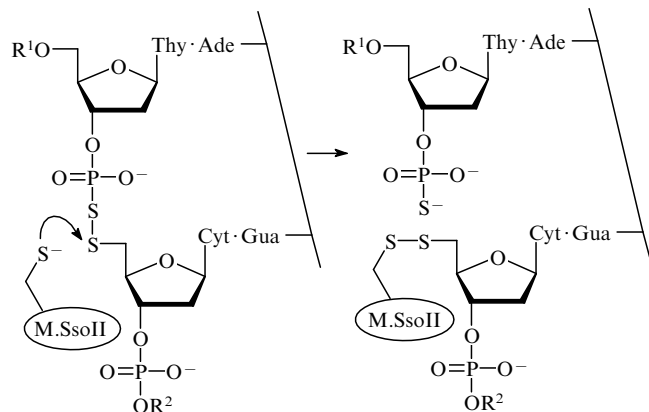
R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной цепи; B^1, B^2 — гетероциклические основания.

Реакция протекала одинаково эффективно как в присутствии, так и в отсутствие матричного олигонуклеотида.^{177, 178, 180} Было показано, что ФДС-содержащие ДНК-дуплексы образуют конъюгаты с M.SsoII с различной степенью эффективности, зависящей от места введения модификации.¹⁷⁹

Известно, что расщепление смешанного дисульфида R^1SSR^2 нуклеофильным тиолат-ионом R^3S^- сопровождается образованием более устойчивого аниона R^1S^- и нового смешанного дисульфида R^3SSR^2 (см.^{165, 181}). В применении к ФДС-содержащим ДНК-дуплексам это означает, что атаке тиолат-иона должен подвергаться атом серы, связанный с атомом углерода, а не фосфора, так как тиофосфат является

значительно более сильной кислотой, чем тиол. Это было доказано экспериментально путем анализа (электрофорез в ПААГ и масс-спектрометрия) конъюгатов ФДС-содержащих ДНК-дуплексов с M.SsoII (схема 7) и с трипептидом глутатионом (простая модель цистеинсодержащего белка).¹⁷⁹

Схема 7



R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

Межнуклеотидная ФДС-связь в составе ДНК селективна по отношению к остаткам цистеина и не реагирует с ε-аминогруппой лизина.¹⁷⁹

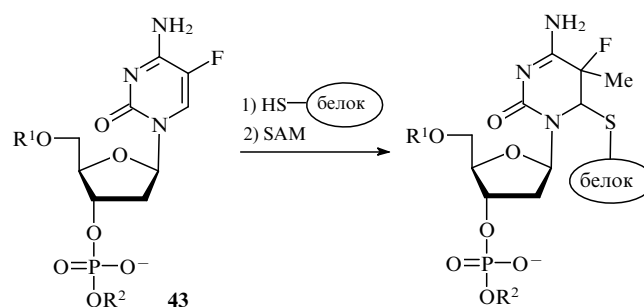
Следует отметить, что образование новой дисульфидной связи между цистеином белка и ФДС-группой возможно только в случае их пространственного сближения в супрамолекулярном ДНК-белковом комплексе. В работе¹⁸² было показано, что конъюгат эндонуклеазы рестрикции SsoII (R.SsoII) и ДНК-дуплекса, содержащего ФДС-группу в участке узнавания, образуется с крайне низкой эффективностью. Авторы объясняют это удаленностью остатка Cys от центра связывания и каталитического центра R.SsoII. Подтверждением этой гипотезы служит тот факт, что мутантные формы R.SsoII, в которых остатки Arg(116, 117, 119) или Lys-122, взаимодействующие с углеводофосфатным остовом ДНК, были заменены на остаток Cys, образуют конъюгаты с ФДС-содержащими ДНК-субстратами с высокими выходами.¹⁸²

III. Природные конъюгаты белков и нуклеиновых кислот, образующиеся в ходе ферментативных реакций

При взаимодействии некоторых ферментов с НК образуются неустойчивые интермедиаты — ковалентно связанные комплексы биополимеров. В ряде случаев благодаря модификации НК можно заблокировать распад такого интермедиата и изучить его.

Классическим примером ферментативной реакции, сопровождающейся образованием стабильного ковалентно связанного белково-нуклеинового комплекса, является перенос метильной группы тимидилат-синтетазой на 5-фтор-2'-дезоксинуридинмонофосфат.¹⁸³ Замена атома водорода в 2'-дезоксинуридинмонофосфате на атом фтора делает невозможным расщепление связи нуклеотид — фермент.¹⁸⁴ К числу ферментов, образующих конъюгаты с олигонуклеотидами, относятся также ДНК-(С(5)-цитозин)метилтрансферазы и метилтрансферазы, которые взаимодействуют с РНК. Олигонуклеотиды, содержащие 5-фторцитидиновый или 5-фтор-2'-дезоксцитидиновый остатки (соединение 43), широко применяются для стабилизации таких конъюгатов.

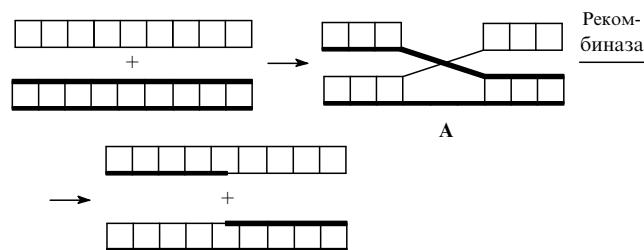
Более подробно механизм этих процессов рассмотрен в обзорах^{10, 185}, а также в работе¹⁸⁶.



R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной цепи, белок — ДНК-(С(5)-цитозин)метилтрансфераза, SAM — S-аденозил-L-метионин.

Ланди и соавт.^{187–189} изучали ковалентное связывание ДНК с рекомбиназами, катализирующими гомологичную рекомбинацию ДНК в образующихся крестообразных структурах А (структуры Холлидея) (схема 8), в результате которой фрагменты из одного участка генома оказываются перенесенными на другой участок.

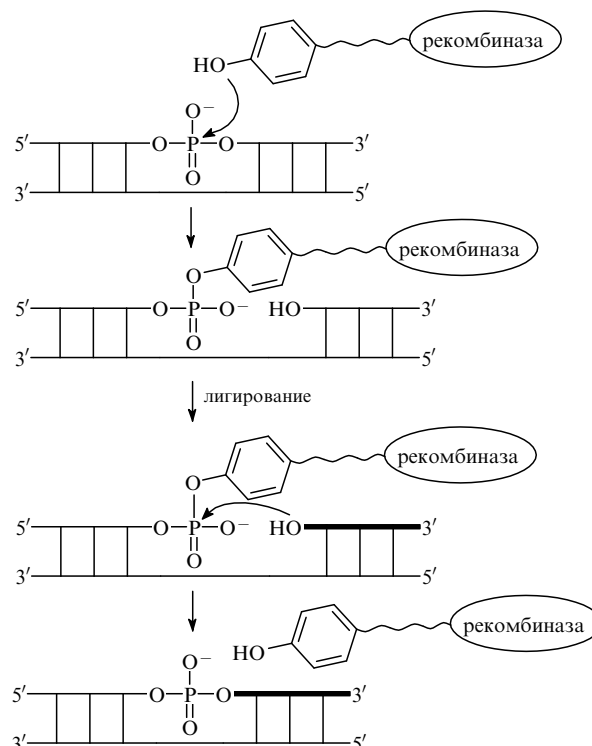
Схема 8



Здесь и далее — тяжи рекомбинирующих фрагментов ДНК.

Механизм действия рекомбиназ заключается в атаке межнуклеотидного фосфатного остатка ДНК гидроксильной группой тирозина (схема 9), приводящей к разрыву фосфодиэфирной связи и образованию конъюгата между 5'-конце-

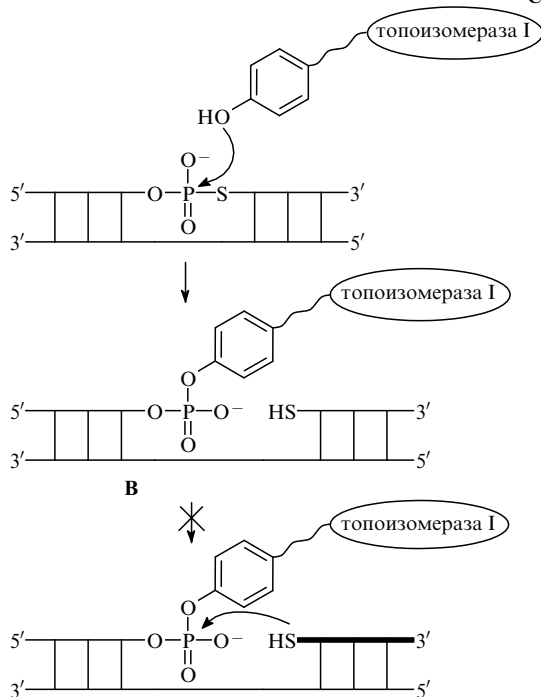
Схема 9



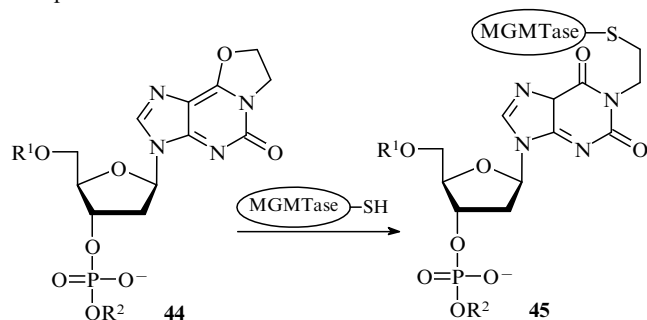
вым участком ДНК и рекомбиназой с последующим лигированием рекомбинантных ДНК-фрагментов и высвобождением рекомбиназы. Авторы предложили использовать укороченные олигонуклеотиды, при одноцепочечном разрыве которых происходит диссоциация короткого 3'-концевого фрагмента ДНК. Это приводит к ингибированию рекомбинации на стадии лигирования, а следовательно, к стабилизации конъюгата рекомбиназы с ДНК.

В работах^{190, 191} для изучения ковалентного связывания топоизомераз[§] было предложено использовать модифицированные ДНК, содержащие тиофосфатные межнуклеотидные связи (схема 10). После образования белково-нуклеинового конъюгата **В** лигирование не происходило, так как замещение связи P—O на P—S энергетически невыгодно. Это позволило селективно ингибировать топоизомеразу I и получить конъюгат с высоким выходом.

Схема 10



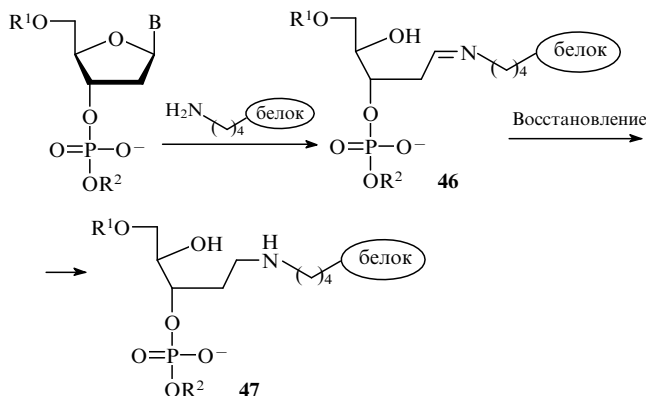
В работе¹⁹² для изучения действия МГМТазы использовали модифицированный олигонуклеотид **44**. При взаимодействии олигонуклеотида **44** с МГМТазой, содержащей в активном центре остаток цистеина, был получен конъюгат **45**. Реакция протекала медленно (48 ч) при использовании 10-кратного избытка белка.



R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

В обзоре¹⁹³, посвященном исследованию бифункциональных ДНК-гликозилаз, обладающих N-гликозилазной и β-лиазной активностями, в качестве ключевой реакции рассматривалось образование основания Шиффа **46** за счет взаимодействия боковой аминогруппы лизина в составе

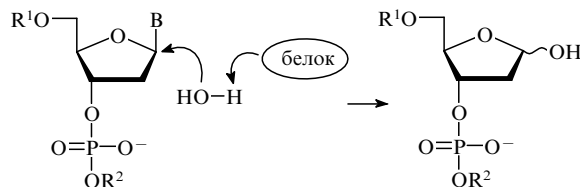
ДНК-гликозилазы с апуриновым участком олигонуклеотида и его последующее восстановление с целью получения устойчивого конъюгата **47**.



R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной цепи, белок — ДНК-гликозилаза.

Упрочение связи между ферментом и субстратом путем восстановления основания Шиффа было использовано также в работах^{194–197}. Детальный механизм этой реакции, изученный с помощью модельных пептидов, представлен в работе¹⁹⁸. Практически все исследования гликозилаз¹⁹³ проводились на примере MutY из *E. coli*^{194–196} и эндонуклеазы III человека.¹⁹⁷ Изучение 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы позволило впервые зафиксировать участие одного из продуктов реакции — 8-оксогуанина — в каскаде реакций, обусловленных β-лиазной активностью этого фермента.¹⁹⁹

Следует отметить, что описанный подход не может быть использован в случае монофункциональных ДНК-гликозилаз, поскольку они действуют по другому механизму, включающему участие молекулы воды в процессе разрыва N-гликозидной связи.



R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной цепи, белок — ДНК-гликозилаза.

IV. Определение участка белка, ковалентно связанного с нуклеиновыми кислотами

Существуют прямые и косвенные методы определения аминокислотных остатков в белке, участвующих в образовании комплекса с НК. Прямой метод подразумевает выделение НК-белкового конъюгата, частичное расщепление белка, выделение олигонуклеотид-пептидного фрагмента, определение первичной структуры пептида и аминокислоты, участвующей в образовании ковалентной связи. Косвенные методы предполагают использование мутантных белков, а также данных PCA. В первом случае в белке заменяют аминокислотный остаток, который, как предполагают, взаимодействует с ДНК, на нереакционноспособный и проверяют, исчезает ли при этом ковалентная связь между белком и олигонуклеотидом.^{162, 163} Очевидно, что этот метод не применим для фотоактивируемых НК, которые реагируют с любыми аминокислотами. Данные PCA о расположении боковых групп аминокислотных остатков используются в качестве одного из доказательств сближенности определенной аминокислоты белка с определенным фрагментом НК.

§ Топоизомеразы инициируют одноцепочечные разрывы в ДНК.

Рассмотрим более подробно прямой метод анализа белково-нуклеиновых конъюгатов. Для выделения НК-белкового конъюгата, как правило, используют электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях (табл. 1).

Анализ данных, приведенных в табл. 1, показывает, что чаще всего выделение белково-нуклеинового конъюгата проводят в условиях, аналогичных или близких к условиям разделения белков в ПААГ по методу Леммли (12.5% ПААГ, 250 мМ Трис–HCl, 0.1% додецилсульфата натрия, pH 8.8).²⁰² Для выделения конъюгата из геля обычно используют буферный раствор, в котором далее проводят частичное расщепление белка. В ряде случаев продукт выделения обессоливают. Наиболее удачным и универсальным вариантом следует признать диализ.

Для выделения конъюгатов применяют также методы ионообменной хроматографии среднего давления (FPLC MonoQ HR5/5)²⁰³ и анионообменной ВЭЖХ (Porous HQ, PerSeptive Biosystems),²⁰⁴ которые позволяют отделить ДНК-белковый конъюгат от непрореагировавшего белка.

В работах^{69, 74, 205} осаждение белка и ковалентно связанного комплекса биополимеров проводили с помощью 10%-ной трихлоруксусной кислоты или антител, что позволило отделить значительную часть непрореагировавшей НК. Можно использовать также диализ реакционной смеси.¹⁰⁰ Для очистки НК-белкового конъюгата от избытка белка применяли олигонуклеотиды, содержащие биотин на 3'-конце, с последующей иммобилизацией белка (как в свободном состоянии, так и в составе конъюгата) на магнитные частицы, покрытые авидином.⁷⁴ Авторы работы⁷⁶ выделяли НК и НК-белковый конъюгат методом аффинной хроматографии. Для этого на 3'-конец модифицированного олигонуклеотида вводили олигоаденилатную последовательность (олиго-dA) и проводили хроматографическое разделение реакционной смеси на микроколоне с олиготимидилат-целлюлозой (олиго-dT). В данном случае очистка

комплекса от НК достигалась за счет образования дуплекса олиго-dA · олиго-dT.

Следует отметить, что очистка ковалентно связанного комплекса белок–НК проводится не всегда и в ряде случаев^{12, 79, 88, 206} после проведения ковалентного присоединения переходят непосредственно к следующей стадии — частичному расщеплению белка химическим или ферментативным путем.

В табл. 2 представлены методы расщепления белка в составе белково-нуклеинового конъюгата.

Из данных табл. 2 следует, что наиболее часто для частичной деградации белковой составляющей конъюгата используют такие протеазы, как трипсин и химотрипсин. Ферментативную обработку проводят в слабощелочных растворах при денатурирующих условиях. В ряде случаев осуществляют предварительную денатурацию белка, восстановление дисульфидных связей и алкилирование тиольных групп цистеина иодуксусной кислотой или иодацетамидом, что позволяет уменьшить время протеолиза и получить более гомогенный белково-нуклеиновый конъюгат. Несмотря на то что для обработки аналитических количеств белково-нуклеиновых конъюгатов часто используется протеиназа К, в крупномасштабных экспериментах этот фермент не применяется из-за его низкой специфичности (низкая специфичность приводит к образованию смеси пептидо-нуклеиновых конъюгатов и, как следствие, к невозможности идентификации ковалентно связанного участка белка). Тем не менее использование протеиназы К позволяет оценить устойчивость ДНК-белкового конъюгата по сравнению с исходным белком, что в дальнейшем облегчает подбор условий трипсинолиза конъюгата.

После частичного расщепления белка проводят очистку пептидо-олигонуклеотидного конъюгата. Для этих целей применяют обращенно-фазовую ВЭЖХ, гель-фильтрацию, анионообменную ВЭЖХ и электрофорез в ПААГ (табл. 3). Перед определением первичной структуры по Эдману или масс-спектрометрически необходимо выделять и обессоли-

Таблица 1. Выделение НК-белкового конъюгата методом гель-электрофореза.

Белок	Состав геля ^a	Условия выделения из геля	Условия обессоливания	Ссылки
Белок Тах вируса лейкемии	10% ПААГ, 250 мМ Трис–HCl, 0.1% ДСН, pH 8.8	10 мМ Трис–HCl, 1 мМ ЭДТА, 0.1% ДСН, pH 7.0, 4°C, 18 ч	Не проводилось	37
Терминатор репликации Tus	10% ПААГ, 250 мМ Трис–HCl, 0.1% ДСН, pH 8.8	H ₂ O, 37°C, 24 ч (3 раза)	Осаждение 0.3 М AcONa, EtOH	67
ДНК-метилтрансфераза EcoRI	12% ПААГ, 250 мМ Трис–HCl, 0.1% ДСН, pH 8.8	—	Диализ против буфера 50 мМ NH ₄ HCO ₃ , pH 7.8, 4°C, 8 ч	87
ДНК-метилтрансфераза EcoRII	12% ПААГ, 90 мМ Трис–HCl, 90 мМ H ₃ BO ₃ , 2 мМ ЭДТА, 7 М мочевины, pH 8.0	См. ^b	Не проводилось	96
	12% ПААГ, 100 мМ Трис–HCl, 0.1% ДСН, pH 8.8	1% ДСН, 37°C, 5–7 ч	То же	94, 200
Интеграза ВИЧ-1	NuPage 4–12% МЭС-гель (Novex, Inc.), pH 6.4	20 мМ Трис–HCl, 0.5% ДСН, pH 8.5, 37°C, 18 ч	Осаждение 10%-ной CCl ₃ CO ₂ H, ацетон	77
Tat-белок ВИЧ-1	20% ПААГ, 100 мМ Трис–HCl, 0.1% ДСН, pH 8.3	45 мМ Трис–H ₃ BO ₃ , 1 мМ ЭДТА, 3 М AcONa, pH 5.5	Обращенно-фазовая ВЭЖХ	98
Ttk-белок <i>Drosophila melanogaster</i>	16% ПААГ, 250 мМ Трис–HCl, 0.1% ДСН, 7 М мочевины	10 мМ Трис–HSCH ₂ CO ₂ H, 0.1 мМ ЭДТА, 0.1% Тритон X-100, 0.1 мМ PMSF, ^c pH 8.0, 45°C, 4 ч	Не проводилось	201

^a Принятые обозначения: ПААГ — полиакриламидный гель; Трис — трис(гидроксиметил)аминометан; ДСН — додецилсульфат натрия; МЭС — морфолинэтансульфокислота. ^b Конъюгат не элюировали из геля. ^c PMSF — фенилметилсульфонилфторид.

Таблица 2. Расщепление белкового компонента в НК-белковом конъюгате.

Реагент или фермент (А)	Белок (В)	c_A или А : В (см. ^а)	Условия реакции	Ссылки
Химотрипсин	Эндонуклеаза генной конверсии PI-SceI	40 мкг · мл ⁻¹ ,	50 мМ Трис – HCl, 1 мМ CaCl ₂ , pH 8.0, 37°C, 2 ч	79
	ДНК-метилтрансферазы CviBIII и TaqI	1 : 1	10 мМ Трис – HCl, 20 мМ CaCl ₂ , pH 8.0, 37°C, 16 ч	81
	Эндонуклеаза рестрикции SsoII	500 мкг · мл ⁻¹	100 мМ NH ₄ HCO ₃ , 37°C, 2 ч	88
Химотрипсин (см. ^б)	Белок U1 малого ядерного рибонуклеопротеида	1 : 20	50 мМ Трис – HCl, 1 М мочевины, 1 мМ ДТТ, 1 мМ CaCl ₂ , pH 7.5, 37°C, 16 ч	205
BrCN	ДНК-метилтрансфераза EcoRII	1 М	HCOOH, 25°C, 48 ч	94, 200
	Интеграза ВИЧ-1	100 мМ	70%-ная CF ₃ CO ₂ H, 70°C, 45 мин	77
Протеаза Glu-C	То же	1 : 5	50 мМ Трис – HCl, 1 М NaCl, 5 мМ ЭДТА, 5 мМ ДТТ, 0.1% ДСН, pH 8.5, 37°C, 12 ч	77
	»	1 : 5	50 мМ Трис – HCl, 1 М NaCl, 5 мМ ЭДТА, 5 мМ ДТТ, 0.01% ДСН, pH 8.0, 37°C, 12 ч	74
БНФС-скатол (см. ^с)	ДНК-метилтрансфераза EcoRII	70 мг · мл ⁻¹	1% ДСН, 70% AcOH, 37°C, 2 ч	94
Трипсин (см. ^д)	То же	1 : 25	400 мМ NH ₄ HCO ₃ , 2 М мочевины, 0.1 мМ CaCl ₂ , 37°C, 24 ч	12
Трипсин (см. ^с)	»	1 : 1 → 1 : 10	50 мМ Трис – HCl, 1 мМ CaCl ₂ , 10% MeCN, pH 8.5, 37°C, 16 ч	96
Трипсин	Ttk-белок <i>Drosophila melanogaster</i>	5 мкг · мл ⁻¹	100 мМ NH ₄ HCO ₃ , 0.2% Тритон X-100, 1 мМ ДТТ, 37°C, 6 ч	201
	ДНК-метилтрансфераза EcoRI	1 : 20	50 мМ NH ₄ HCO ₃ , pH 7.8, 37°C, 12 ч	87
	Tat-белок ВИЧ-1	0.05 мкг · мл ⁻¹	100 мМ Трис – HCl, 10 мМ CaCl ₂ , pH 7.8, 25°C, 4 ч	98
	То же		100 мМ Трис – HCl, pH 8.5, 37°C, 24 ч	67
	»		100 мМ NH ₄ HCO ₃ , 2 М мочевины, pH 7.8, 37°C, 24 ч	100
	ДНК-полимераза β	1 : 10	50 мМ NH ₄ HCO ₃ , 10% MeCN, pH 8, 37°C, 3 ч	203
	ДНК-эндонуклеаза VIII	1 : 6	20 мМ Трис – HCl, 3.4 М мочевины, pH 7.5, 37°C, 18 ч	204
Трипсин (см. ^б)	Tat-белок ВИЧ-1	1 : 20	50 мМ Трис – HCl, 1 М мочевины, 1 мМ ДТТ, 1 мМ CaCl ₂ , pH 7.5, 37°C, 16 ч	205
	То же	5 мкг · мл ⁻¹	2.5 мМ Трис – HCl, 5 мМ CaCl ₂ , 0.25 мМ ЭДТА, 0.025% ДСН, pH 8.0, 37°C, 2 ч	37
	»	160 мкг · мл ⁻¹	50 мМ Трис – HCl, 2 мМ CaCl ₂ , pH 8.0, 37°C, 18 ч	76
Клострипаин	Белок репарации MutS	80 мкг · мл ⁻¹	30 мМ Трис – HCl, 2 мМ CaCl ₂ , 2 мМ ДТТ, 0.5% ДСН, pH 7.5, 37°C, 18 ч	76
Протеиназа К	Эндонуклеаза генной конверсии PI-SceI	2 мг · мл ⁻¹	50 мМ Трис – HCl, 1 мМ CaCl ₂ , pH 8.0, 37°C, 16 ч	79

^а Концентрация реагента (c_A) или соотношение фермент : субстрат (А : В). ^б Осуществляют предварительную денатурацию белково-нуклеинового конъюгата. ^с Функционализован 3-бром-3-метил-2-(2-нитрофенилсульфенил)-3*H*-индолом. ^д Осуществляют предварительную денатурацию белково-нуклеинового конъюгата и обработку иодуксусной кислотой. ^е Белково-нуклеиновый конъюгат предварительно обрабатывают иодацетамидом.

вать конъюгат. Из хроматографических методов наиболее эффективными являются методы, позволяющие использовать буферные растворы на основе летучих солей, таких как формиат аммония или ацетат триэтиламмония. В этом случае для обессоливания выделенного с помощью ВЭЖХ конъюгата достаточно несколько раз его отогнать с водой или водным этанолом. Однако в ряде случаев при применении обращенно-фазовой ВЭЖХ и гель-фильтрации не удается удалить белковые примеси. Более надежной следует признать двухступенчатую схему очистки: сначала с помощью анионообменной ВЭЖХ или электрофореза в ПААГ выделяют конъюгат, который далее обессоливают либо на микроколонках для гель-фильтрации или

обращенно-фазовой хроматографии, либо ультрацентрифугированием. Описан перенос конъюгата на поли(дифторвинилиден)овую (PVDF) мембрану (блоттинг) с последующим определением первичной структуры пептида в иммобилизованном НК-пептидном комплексе. Используется также перенос конъюгата на анионообменный фильтр.²⁰⁷

Заключительным этапом анализа является определение первичной структуры ковалентно присоединенного пептида. Для этих целей используют химическое или ферментативное секвенирование белков. В работах^{37, 67, 74, 76, 79, 81, 87, 88, 96, 100, 201, 205} для определения первичной структуры белков был применен метод секвенирования

Таблица 3. Выделение пептидо-олигонуклеотидного конъюгата.

Метод выделения	Условия разделения	Способ детектирования ^a	Метод обессоливания	Ссылки
Анионообменная ВЭЖХ				
Vydac 301VHP552	25 мМ Et ₃ NH ⁺ AcO ⁻ , pH 8.0; градиент (0.5 М NaCl): 0 → 60% (40 мин)	СФ (215 + 260)	Обращенно-фазовая хроматография на патроне C ₁₈ (Sep-Pak Plus, Waters), осаждение этанолом	87
Mono Q (Amersham-Pharmacia-Biotech)	50 мМ Трис–HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 7.5; градиент (1 М NaCl): 0 → 80% (40 мин)	РА	Осаждение этанолом или гель-фильтрация на патроне NAP-10, 10 мМ NH ₄ HCO ₃	79, 88
Sychrom AX 300	20 мМ NaH ₂ PO ₄ , pH 6.8, 20% MeCN; градиент (NaCl): 0 (30 мин) → 1 М (60 мин), 1 М (20 мин.)	СФ (254)	—	100
Poros HQ10 (PerSeptive Biosystems)	10 мМ Трис–HCl, pH 7.4; градиент (1 М KCl): 0% (5 мин), 0 → 100% (15 мин)	СФ(260)	Ультрафильтрация (Microsep 3K, Pall-Gelmann Sciences)	81
Гель-фильтрация				
Superose 12 (Amersham-Pharmacia-Biotech)	0.1 М NH ₄ HCO ₃ , 2 М мочеви́на, 1 М NaCl, pH 8.0	—	Гель-фильтрация на колонке Sephadex G25, 10 мМ HEPES, ^b 10 мМ NaCl	12
	20 мМ Трис–HCl, 50 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, 8 М мочеви́на, pH 7.8	СФ (254)	Осаждение этанолом	205
Обращенно-фазовая ВЭЖХ				
C ₁₈ , Vydac	0.1%-ная CF ₃ COOH, 5% MeCN; градиент (MeCN): 5% (30 мин), 5 → 45% (120 мин), 45 → 90% (20 мин)	СФ (220, 260)	Обессоливание не проводилось	205
	10 мМ Et ₃ NH ⁺ AcO ⁻ ; градиент (MeCN): 0 → 30%	СФ (254)	То же	100
C ₁₈ , Phenomenex	0.1% HCOOH; градиент (MeCN): 0 → 40%, 20 мин	МС	—	70
μКЗС C ₂ /C ₁₈ SC 2.1/10 (Amersham-Pharmacia-Biotech)	5 мМ K ₂ CO ₃ , pH 7.0; градиент (MeCN): 0 → 70%, 50 мин	СФ(214, 254, 280)	—	206
Электрофорез				
10% ПААГ	—	РА	Обессоливание не проводилось	76
12% ПААГ	45 мМ Трис–H ₃ BO ₃ , 1 мМ ЭДТА, 6 М мочеви́на, 1 мМ HSCH ₂ CO ₂ H, pH 7.0	—	Гель-фильтрация на колонке Sephadex G25, 10 мМ NH ₄ HCO ₃	79, 88
	50 мМ Трис–H ₃ BO ₃ , 1 мМ ЭДТА, 8 М мочеви́на	РА	Извлечение из геля буфером 20 мМ NH ₄ HCO ₃ , 10%-ный MeCN, pH 8.5, упаривание	37
20% ПААГ	50 мМ Трис–H ₃ BO ₃ , 1 мМ ЭДТА, 8 М мочеви́на	СФ	Извлечение из геля буфером 10 мМ Трис–HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 7.5	204
	50 мМ Трис–H ₃ BO ₃ , 1 мМ ЭДТА, 8 М мочеви́на	РА	Извлечение из геля буфером 45 мМ Трис–H ₃ BO ₃ , 1 мМ ЭДТА, 3 М AcONa, pH 5.5; обращенно-фазовая хроматография на патроне C ₁₈	98
NuPage 4–12% МЭС-гель (Novex, Inc.)	—	РА	Перенос на PVDF-мембрану (Trans-Blot, Bio-Rad Laboratories)	77
15% Трис-Tricin (Novex, Inc.)	—	РА	Перенос на PVDF-мембрану	74

^aПринятые обозначения: СФ — спектрофотометрическое детектирование (в скобках указана длина волны в нанометрах), РА — радиоавтографическое детектирование, МС — масс-спектрометрическое детектирование. ^b HEPES — 2-[4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинил]этансульфоновая кислота.

путем химической деградации по Эдману.²⁰⁸ Как правило, используют автоматические секвенаторы, что требует значительных количеств конъюгата — 50–150 пмоль. При этом замещенную аминокислоту определяют по отсутствию стандартного *N*-фенилтиокарбамоильного производного, т.е. «пустого цикла» секвенирования. При неполной очистке

конъюгата (т.е. при одновременном присутствии в растворе набора олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, отличающихся на 1–2 аминокислоты) использование этого подхода значительно усложняется.

Интересный подход к определению первичной структуры связанного пептида был продемонстрирован Мюке и соавт.⁹⁶

Авторы проводили сравнительный анализ продуктов расщепления трипсином свободной эндонуклеазы рестрикции EcoRII и ее конъюгата с олигонуклеотидом методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Поскольку короткий белково-нуклеиновый конъюгат не удерживался на колонке, можно было однозначно определить «лишний» фрагмент, присутствовавший в продуктах расщепления свободного белка. На основании данных по секвенированию этого пептида была идентифицирована аминокислота, прореагировавшая с 5-иодпиримидиновым остатком НК. К сожалению, данный метод не является универсальным, так как при наличии в определяемом пептиде нескольких реакционноспособных остатков вопрос о строении конъюгата останется открытым.

Для секвенирования пептидов можно использовать также масс-спектрометрические методы.^{209–215} Сравнение ряда подходов к определению замещенной аминокислоты с помощью масс-спектрометрии проведено в работе⁹². На сегодняшний день для определения молекулярной массы и секвенирования биополимеров наиболее широко используют два варианта масс-спектрометрии — ионизацию методом лазерной матричной десорбции (MALDI)²⁰⁹ и методом электрораспыления (ESI).²¹⁰ При использовании метода MALDI MS биомолекулу изолируют от соседних молекул матрицами — различными низкомолекулярными ароматическими соединениями, способными возбуждаться под действием лазерного излучения. При облучении образца происходит ионизация биомолекулы с преимущественным образованием однозарядного иона. При использовании метода ESI MS раствор, содержащий биополимер, подают в ионизационную камеру масс-спектрометра через капилляр. При действии на раствор биополимера сильного электростатического поля на конце капилляра образуется ионизированный аэрозоль. После испарения растворителя биополимер ионизируется.

Главной проблемой при использовании MS для характеристики белково-нуклеиновых конъюгатов является то, что при анализе белков регистрируют положительно заряженные ионы, а при анализе олигонуклеотидов — отрицательные. Тем не менее в ряде работ^{216–218} было показано, что методы MALDI MS и ESI MS можно применять для детектирования и секвенирования таких конъюгатов. При секвенировании белково-нуклеиновых конъюгатов с помощью метода MALDI MS актуальной задачей является выбор эффективной матрицы, так как не существует универсальных матриц, которые могут быть использованы при детектировании и пептидов, и олигонуклеотидов. Для облегчения масс-спектрометрического анализа белково-нуклеинового конъюгата с помощью метода ESI MS обычно предварительно удаляют нуклеиновый компонент ферментативной деградацией НК.^{70, 83, 87, 219, 220} Преимуществом метода ESI MS является возможность его использования при детектировании фракций после высокоэффективной жидкостной хроматографии или электрофореза.

В работе⁹² с помощью масс-спектрометрии была определена структура ДНК-белкового конъюгата. После частичного трипсинолиза выделенного конъюгата реакционные смеси анализировали методом MALDI TOF (времетраплетной) MS и сравнивали с аналогичными данными для свободного белка. Этот подход позволил определить пептидный фрагмент, ковалентно связанный с ДНК. Замена трипсина на протеиназу К позволила уменьшить пептидный фрагмент до 4 аминокислотных остатков. Однако только после полной деструкции ДНК фосфодиэстеразой и щелочной фосфатазой и последующего секвенирования полученного ДНК-белкового конъюгата методом тандемной nanoESI MS[†] удалось

определить аминокислоту, ковалентно связанную с олигонуклеотидом.

Тандемная MS подразумевает наличие двух последовательно расположенных детекторов, между которыми расположена ионизационная ячейка. Первый детектор пропускает в ионизационную ячейку только ионы с определенным отношением массы к заряду. Эти ионы подвергаются фрагментации в ионизационной ячейке. Продукты ионизации (так называемые дочерние ионы) попадают во второй детектор для определения первичной структуры пептида. Как правило, данным методом можно определить последовательность аминокислот в белке, содержащем до 30 аминокислот.

Тандемная ESI MS является наиболее эффективным методом определения структуры пептидо-олигонуклеотидного конъюгата и, как следствие, целевой аминокислоты. Применение наноэлектрораспылительной тандемной MS⁹² позволило определить структуру белка при его содержании в растворе в количестве менее 10^{-10} моль. Однако невысокий выход конъюгата и неизбежные потери при многочисленных промежуточных операциях требуют проводить эксперименты на фемтомольных количествах белка. Масс-спектрометрические методы оказались значительно чувствительнее, чем методы традиционного секвенирования по Эдману (они позволяют проводить прямое определение присоединенной аминокислоты по ее молекулярной массе (тандемная MS), а также прямое секвенирование как олигонуклеотида, так и пептида и не требуют тщательной очистки препаратов).

Использование метода масс-спектрометрии для определения структуры присоединенного пептида рассмотрено также в работах^{206, 207, 219, 221, 222}. Однако несмотря на явные преимущества масс-спектрометрии для анализа и определения структуры пептидо-олигонуклеотидных конъюгатов, данный метод не нашел широкого применения, что обусловлено малой доступностью тандемных масс-спектрометров.[†]

Кроме традиционных времетраплетных масс-спектрометров с линейным детектором для исследования биомолекул применяются гибридные приборы — квадрупольные времетраплетные (Q-TOF) масс-спектрометры,⁹² приборы ионциклотронного резонанса с использованием Фурье-преобразований (FTICR) и квадрупольные ионные ловушки (QIT). Метод FTICR MS дает значительно большую точность определения молекулярных масс (> 10 кДа), чем метод TOF MS, но высокая стоимость и сложность калибровки приборов для определения пептидо-олигонуклеотидных конъюгатов делают их маловостребованными, по крайней мере в настоящее время. Масс-спектрометры с квадрупольными ионными ловушками обычно не позволяют добиться такого же разрешения, что и TOF MS. Более подробно использование различных методов масс-спектрометрии для изучения структуры белково-нуклеиновых комплексов и конъюгатов описано в обзорах^{224–226}.

* * *

Обзор написан при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты №№ 03-04-48957, 04-04-48714, 02-03-32950) и программы «Университеты России» (грант 07.03.066).

Литература

1. G.L.Verdine, D.P.G.Norman. *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 337 (2003)
2. M.Deibert, S.Grazulis, G.Sasnauskas, V.Siksnys, R.Huber. *Nature Struct. Biol.*, **7**, 792 (2000)
3. Г.Я.Шефлян, Е.А.Кубарева, Е.С.Громова. *Успехи химии*, **65**, 765 (1996)

[†] Приставка «nano» означает, что раствор в капилляре подается со скоростью нл · с⁻¹ (это позволяет уменьшить требуемые количества белка и увеличить чувствительность детектора).

[†] В последние несколько лет значительные капиталовложения были направлены на исследования в области протеомики,²²³ что позволило значительно увеличить парк тандемных масс-спектрометров.

4. Д.Г.Кнорре, Н.В.Кудряшова, О.И.Лаврик. *Успехи химии*, **67**, 486 (1998)
5. D.G.Knorre, T.S.Godovikova. *FEBS Lett.*, **433**, 9 (1998)
6. Д.Г.Кнорре, Т.С.Годовикова. *Изв. АН. Сер. хим.*, 1225 (1999)
7. Д.Г.Кнорре, Н.Д.Кобец. *Успехи химии*, **68**, 365 (1999)
8. S.R.Kassabov, N.M.Henry, M.Zofall, T.Tsukiyama, B.Bartholomew. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 7524 (2002)
9. M.C.Golden, B.D.Collins, M.C.Willis, T.H.Koch. *J. Biotechnol.*, **81**, 167 (2000)
10. D.Smith, B.D.Collins, J.Heil, T.H.Koch. *Mol. Cell. Proteomics*, **2**, 11 (2003)
11. K.C.Smith. *Photochem. Photobiol.*, **3**, 415 (1964)
12. W.M.Rehrauer, S.C.Kowalczykowski. *J. Biol. Chem.*, **271**, 11996 (1996)
13. L.A.Sylvers, J.Wower. *Bioconjugate Chem.*, **4**, 411 (1993)
14. K.M.Meisenheimer, T.H.Koch. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **32**, 101 (1997)
15. N.Naryshkin, Y.Kim, Q.Dong, R.H.Ebright. *Methods Mol. Biol.*, **148**, 337 (2001)
16. F.Robert, B.Coulombe. *Methods Mol. Biol.*, **148**, 383 (2001)
17. J.Persinger, B.Bartholomew. *Methods Mol. Biol.*, **148**, 363 (2001)
18. F.Gohring, F.O.Fackelmayer. *Biochemistry*, **36**, 8276 (1997)
19. M.-H.Kuo, C.D.Allis. *Methods*, **19**, 425 (1999)
20. V.Orlando. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 99 (2000)
21. I.M.Gavin, S.M.Melnik, N.P.Yurina, M.I.Khabarova, S.G.Bavykin. *Anal. Biochem.*, **263**, 26 (1998)
22. R.P.Hikerson, C.L.Chepanoske, S.D.Williams, S.S.David. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9901 (1999)
23. K.L.Nguyen, M.Steryo, K.Kurbanyan, K.M.Nowitzki, S.M.Butterfield, S.R.Ward, E.D.A.Stemp. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 3585 (2000)
24. E.M.Boon, M.A.Pope, S.D.Williams, S.S.David, J.K.Barton. *Biochemistry*, **41**, 8464 (2002)
25. D.Bastia. *Structure*, **4**, 661 (1996)
26. Y.-B.Zhou, S.E.Gerchman, V.Ramakrishnan, A.Travers, S.Muyldermans. *Nature (London)*, **395**, 402 (1998)
27. A.F.Ghetu, D.C.Arthur, T.K.Keppola, J.N.M.Glover. *RNA*, **8**, 816 (2002)
28. И.Э.Каневский, С.А.Кузнецова. *Успехи химии*, **67**, 688 (1998)
29. L.M.Hales, R.I.Gumport, J.F.Gardner. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1780 (1996)
30. T.S.Heuer, P.O.Brown. *Biochemistry*, **37**, 6667 (1998)
31. A.M.Kimzey, W.S.Dynan. *J. Biol. Chem.*, **273**, 13768 (1998)
32. D.L.Kolpashchikov, S.N.Khodyreva, D.Yu.Klimankov, M.S.Wold, A.Favre, O.I.Lavrik. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 373 (2001)
33. I.A.Udalova, J.C.Knight, V.Vidal, S.A.Nedospasov, D.Kwiatkowski. *J. Biol. Chem.*, **273**, 21178 (1998)
34. O.I.Lavrik, D.M.Kolpashchikov, H.P.Nasheuer, K.Wiesshart, A.Favre. *FEBS Lett.*, **441**, 186 (1998)
35. I.Wong, T.M.Lohman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10051 (1996)
36. M.S.Bartlett, M.Thomm, E.P.Geiduschek. *Nature Struct. Biol.*, **7**, 782 (2000)
37. A.L.Kimzey, W.S.Dynan. *J. Biol. Chem.*, **274**, 34226 (1999)
38. J.Persinger, B.Bartholomew. *J. Biol. Chem.*, **271**, 33039 (1996)
39. T.Lagrange, T.K.Kim, G.Orphanides, Y.W.Ebright, R.H.Ebright, D.Reinberg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10620 (1996)
40. J.J.Tate, J.Persinger, B.Bartholomew. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1421 (1998)
41. S.M.Sengupta, J.Persinger, B.Bartholomew, C.L.Peterson. *Methods*, **19**, 434 (1999)
42. C.Costas, E.Yuriev, K.L.Meyer, T.S.Guion, M.M.Hanna. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1849 (2000)
43. M.M.Hanna, K.Liu. *J. Mol. Biol.*, **282**, 227 (1998)
44. M.M.Hanna. *Methods Enzymol.*, **274**, 403 (1996)
45. W.A.Wlassoff, M.I.Dobrikov, I.V.Safronov, R.Y.Dudko, V.S.Bogachev, V.V.Kandaurova, G.V.Shishkin, G.M.Dymshits, O.I.Lavrik. *Bioconjugate Chem.*, **6**, 352 (1995)
46. И.В.Сафронов, Н.В.Щербик, С.Н.Ходырева, В.А.Власов, М.И.Добриков, Г.В.Шишкин, О.И.Лаврик. *Биоорг. химия*, **23**, 576 (1997)
47. Д.М.Колпашиков, А.Л.Захаренко, С.В.Дежуров, Н.И.Речкунова, С.Н.Ходырева, С.Х.Дегтярев, В.В.Литвак, О.И.Лаврик. *Биоорг. химия*, **25**, 129 (1999)
48. Д.М.Колпашиков, Л.А.Александрова, Н.Ф.Закирова, С.Н.Ходырева, О.И.Лаврик. *Биоорг. химия*, **26**, 151 (2000)
49. D.M.Kolpashchikov, T.M.Ivanova, V.S.Boghachev, H.P.Nasheuer, K.Weissart, A.Favre, P.E.Pestryakov, O.I.Lavrik. *Bioconjugate Chem.*, **11**, 445 (2000)
50. O.I.Lavrik, D.M.Kolpashchikov, K.Weissart, H.P.Nasheuer, S.N.Khodyreva, A.Favre. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4235 (1999)
51. Д.М.Колпашиков, П.Е.Пестряков, В.А.Власов, С.Н.Ходырева, О.И.Лаврик. *Биохимия*, **65**, 160 (2000)
52. D.M.Kolpashchikov, P.Hughes, A.Favre, G.Baldacci, O.I.Lavrik. *J. Mol. Recognit.*, **14**, 239 (2001)
53. И.А.Драчкова, И.О.Петрусева, И.В.Сафронов, А.И.Захаренко, Г.В.Шишкин, О.И.Лаврик, С.Н.Ходырева. *Биоорг. химия*, **27**, 197 (2001)
54. А.Л.Захаренко, Д.М.Колпашиков, С.Н.Ходырева, О.И.Лаврик, Л.Менендес-Ариас. *Биохимия*, **66**, 999 (2001)
55. Д.Ю.Хлиманков, Н.И.Речкунова, С.Н.Ходырева, И.О.Петрусева, Ж.К.Назаркина, Е.А.Белоусова, О.И.Лаврик. *Мол. биология*, **36**, 1044 (2002)
56. S.Doerhoefer, S.Khodyreva, I.V.Safronov, W.A.Wlassov, R.Anarbaev, O.I.Lavrik, E.Holler. *Microbiology*, **144**, 3181 (1998)
57. Д.Ю.Хлиманков, Н.И.Речкунова, Д.М.Колпашиков, С.Н.Ходырева, Е.А.Белоусова, О.И.Лаврик. *Биохимия*, **66**, 733 (2001)
58. O.I.Lavrik, R.Prasad, R.W.Sobol, J.K.Horton, E.J.Ackerman, S.H.Wilson. *J. Biol. Chem.*, **276**, 25541 (2001)
59. В.А.Власов, Г.М.Дымшиц, О.И.Лаврик. *Мол. биология*, **32**, 5 (1998)
60. D.M.Kolpashchikov, N.I.Rechkunova, M.I.Dobrikov, S.N.Khodyreva, N.A.Lebedeva, O.I.Lavrik. *FEBS Lett.*, **448**, 141 (1999)
61. Н.И.Речкунова, Д.М.Колпашиков, Н.А.Лебедева, И.О.Петрусева, М.И.Добриков, С.Х.Дегтярев, О.И.Лаврик. *Биохимия*, **65**, 244 (2000)
62. N.A.Lebedeva, D.M.Kolpashchikov, N.I.Rechkunova, S.N.Khodyreva, O.I.Lavrik. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **287**, 530 (2001)
63. Н.А.Лебедева, Д.М.Колпашиков, Н.И.Речкунова, С.Н.Ходырева, О.И.Лаврик. *Биохимия*, **67**, 807 (2002)
64. O.I.Lavrik, D.M.Kolpashchikov, R.Prasad, R.W.Sobol, S.H.Wilson. *Nucleic Acids Res.*, **30**, U73 (2002)
65. N.A.Lebedeva, N.I.Rechkunova, S.N.Khodyreva, A.Favre, O.I.Lavrik. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **297**, 714 (2002)
66. I.Ahmad, D.N.Rao. *J. Mol. Biol.*, **259**, 229 (1996)
67. L.J.Duggan, P.T.Asmann, T.M.Hill, P.A.Gottlieb. *Biochemistry*, **35**, 15391 (1996)
68. C.W.Espelin, K.B.Kaplan, P.K.Sorger. *J. Cell Biol.*, **139**, 1383 (1997)
69. S.G.Liang, S.N.Maity. *J. Biol. Chem.*, **273**, 31590 (1998)
70. M.C.Golden, K.A.Resing, B.B.Collins, M.C.Willis, T.H.Koch. *Protein Sci.*, **8**, 2806 (1999)
71. Q.Wang, R.Shoeman, P.Traub. *Biochemistry*, **39**, 6645 (2000)
72. G.Mass, T.Nethanel, O.I.Lavrik, M.S.Wold, G.Kaufmann. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3892 (2001)
73. K.M.Meisenheimer, P.L.Meisenheimer, M.C.Willis, T.H.Koch. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 981 (1996)
74. T.M.Jenkins, D.Esposito, A.Engelman, R.Craigie. *EMBO J.*, **16**, 6849 (1997)
75. P.W.Hammond, T.N.Lively, T.R.Cech. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 296 (1997)
76. V.A.Malkov, I.Biswas, R.D.Camerini-Otero, P.Hsieh. *J. Biol. Chem.*, **272**, 23811 (1997)
77. D.Esposito, R.Craigie. *EMBO J.*, **17**, 5832 (1998)
78. D.L.Wong, J.G.Pavlovich, N.O.Reich. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 645 (1998)
79. V.Pingoud, H.Thole, F.Christ, W.Grindl, W.Wende, A.Pingoud. *J. Biol. Chem.*, **274**, 10235 (1999)
80. F.Christ, S.Schoettler, W.Wende, S.Steuer, A.Pingoud, V.Pingoud. *EMBO J.*, **18**, 6908 (1999)
81. B.Holz, N.Dank, J.E.Eickhoff, G.Lipps, G.Krauss, E.Wienhold. *J. Biol. Chem.*, **274**, 15066 (1999)
82. U.Schweizer, T.Hey, G.Lipps, G.Krauss. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3183 (1999)
83. N.Biswas, S.K.Weller. *J. Biol. Chem.*, **274**, 8068 (1999)
84. A.Jeltsch, M.Roth, T.Friedrich. *J. Mol. Biol.*, **285**, 1121 (1999)
85. Q.M.Eastman, I.J.Villey, D.G.Shatz. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 3788 (1999)

86. S.Yoo, A.Kimzey, W.S.Dynan. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20034 (1999)
87. D.L.Wong, N.O.Reich. *Biochemistry*, **39**, 15410 (2000)
88. E.A.Kubareva, H.Thole, A.S.Karyagina, T.S.Oretskaya, A.Pingoud, V.Pingoud. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1085 (2000)
89. E.L.Lin, S.W.Lin, A.Lin. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2510 (2001)
90. N.Biswas, S.K.Weller. *J. Biol. Chem.*, **276**, 17610 (2001)
91. Y.Mikata, Q.He, S.J.Lippard. *Biochemistry*, **40**, 7533 (2001)
92. H.Steen, J.Petersen, M.Mann, O.E.Jensen. *Protein Sci.*, **10**, 1989 (2001)
93. O.V.Babkina, C.A.Chutko, A.A.Shashkov, M.S.Dzhidzoev, R.Eritja, E.S.Gromova. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1**, 636 (2002)
94. E.V.Koudan, O.M.Subach, G.A.Korshunova, E.A.Romanova, R.Eritja, E.S.Gromova. *J. Biomol. Struct., Dynamics*, **20**, 421 (2002)
95. C.Beck, A.Jeltsch. *Biochemistry*, **41**, 14103 (2002)
96. M.Mucke, V.Pingoud, G.Grelle, R.Kraft, D.H.Kruger, M.Reuter. *J. Biol. Chem.*, **277**, 14288 (2002)
97. A.S.Bernards, J.K.Miller, K.K.Bao, I.Wong. *J. Biol. Chem.*, **277**, 20960 (2002)
98. Z.Wang, T.M.Rana. *Biochemistry*, **35**, 6491 (1996)
99. A.McGregor, M.V.Rao, G.Duckworth, P.G.Stockley, B.A.Connolly. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3173 (1996)
100. M.J.Kovach, R.Tirumalai, A.Landy. *J. Biol. Chem.*, **277**, 14530 (2002)
101. M.A.Cahill, A.Nordheim, Y.-Z.Xu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **229**, 170 (1996)
102. D.R.Mernagh, I.A.Taylor, G.G.Kneale. *Biochem. J.*, **336**, 719 (1998)
103. Z.Y.Wang, T.M.Rana. *Biochemistry*, **37**, 4235 (1998)
104. S.Sastry, B.M.Ross. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9111 (1998)
105. G.D.Prestwich, G.Dorman, J.T.Elliott, D.M.Marecak, A.Chaudhary. *Photochem. Photobiol.*, **65**, 222 (1997)
106. I.M.Schmitt, S.Chimenti, F.P.Gasparro. *J. Photochem. Photobiol. B*, **27**, 101 (1995)
107. R.E.Wellinger, R.Lucchini, R.Dammann, J.M.Sogo. *Methods Mol. Biol.*, **119**, 161 (1999)
108. R.P.van Gijlswijk, E.G.Talman, P.J.Janssen, S.S.Snoeijers, J.Killian, H.J.Tanke, R.J.Heetebrij. *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, **1**, 81 (2001)
109. С.И.Анцыпович, Т.С.Орепкая. *Успехи химии*, **67**, 274 (1998)
110. D.Bethea, B.Fullmer, S.Syed, G.Seltzer, J.Tiano, C.Rischko, L.Gillespie, D.Brown, F.P.Gasparro. *J. Dermatol. Sci.*, **19**, 78 (1999)
111. J.Zehnder, R.van Atta, C.Jones, H.Sussman, M.Wood. *Clin. Chem.*, **43**, 1703 (1997)
112. S.S.Sastry, H.P.Spielmann, Q.S.Hoang, A.M.Phillips, A.Sancar, J.E.Hearst. *Biochemistry*, **32**, 5526 (1993)
113. S.S.Sastry. *Biochemistry*, **35**, 13519 (1996)
114. S.S.Sastry, B.M.Ross, A.Parraga. *J. Biol. Chem.*, **272**, 3715 (1997)
115. J.T.Reardon, A.Sancar. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 5938 (2002)
116. C.Wylenzek, M.Engelmann, D.Holten, R.van Atta, M.Wood, B.Gathof. *Clin. Chem.*, **46**, 1853 (2000)
117. Г.А.Коршунова, Н.В.Сумбатян, А.Н.Топин, М.Т.Мчедлидзе. *Мол. биология*, **34**, 966 (2000)
118. Ю.Ю.Агапкина, Д.В.Агапкин, А.В.Загородников, Я.И.Алексеев, Г.А.Коршунова, М.Б.Готтих. *Биоорг. химия*, **28**, 324 (2002)
119. М.Тараненко, А.Рыклевская, М.Мчедлидзе, J.Laval, S.Kuznetsova. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 2945 (2003)
120. С.А.Кузнецова, М.Г.Ивановская, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **16**, 219 (1990)
121. З.А.Шабарова. *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, **24**, 99 (1991)
122. A.A.Purmal, Z.A.Shabarova, R.I.Gumport. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3713 (1992)
123. G.Y.Sheflyan, E.A.Kubareva, E.M.Volkov, T.S.Oretskaya, Z.A.Shabarova. *Gene*, **157**, 187 (1995)
124. М.Г.Ивановская, И.А.Козлов, Е.А.Кубарева, Е.А.Таран, Т.В.Серазев, З.А.Шабарова. *Мол. биология*, **31**, 436 (1997)
125. Е.А.Рудакова, М.Г.Ивановская, М.В.Козлов, М.В.Хоретоненко, Т.С.Орепкая, В.Г.Никифоров. *Биохимия*, **65**, 753 (2000)
126. З.А.Шабарова. *Nucleosides Nucleotides*, **17**, 2063 (1998)
127. I.A.Kozlov, E.A.Kubareva, M.G.Ivanovskaya, Z.A.Shabarova. *Antisense Nucleic Acids Drug. Dev.*, **7**, 279 (1997)
128. И.А.Козлов, Е.А.Кубарева, М.Г.Ивановская, З.А.Шабарова. *Мол. биология*, **31**, 63 (1997)
129. M.Zanetti, P.Castiglioni, S.Schoenberger, M.Gerloni. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **987**, 249 (2003)
130. J.Kucharczak, M.J.Simmons, Y.J.Fan, C.Gelinas. *Oncogene*, **22**, 8961 (2003)
131. H.C.Liou. *J. Biochem. Mol. Biol.*, **35**, 537 (2002)
132. S.A.Kuznetsova, C.Clusel, E.Ugarte, I.Elias, M.Vasseur, M.Blumenfeld, Z.A.Shabarova. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4783 (1996)
133. S.Kuznetsova, A.Rykhlevskaya, M.Taranenko, O.Sidorkina, T.Oretskaya, J.Laval. *Biochimie*, **85**, 511 (2003)
134. Н.А.Нарышкин, М.Г.Ивановская, Т.С.Орепкая, Е.М.Волков, М.Дж.Гейт, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **22**, 691 (1996)
135. N.A.Naryshkin, M.A.Farrow, M.G.Ivanovskaya, T.S.Oretskaya, Z.A.Shabarova, M.J.Gait. *Biochemistry*, **36**, 3496 (1997)
136. J.Karn. *J. Mol. Biol.*, **293**, 235 (1999)
137. С.Е.Филиппова, М.Г.Ивановская, Е.А.Романова, В.Л.Тунницкая, С.Н.Кочетков. *Мол. биология*, **36**, 684 (2002)
138. J.P.Menetski. *J. Biol. Chem.*, **275**, 7619 (2000)
139. B.Berkowitz, D.-B.Huang, F.E.Chen-Park, P.B.Sigler, G.Ghosh. *J. Biol. Chem.*, **277**, 24694 (2002)
140. K.Wecker, M.C.Bonnet, E.F.Meurs, M.Delepierre. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4452 (2002)
141. C.R.Escalante, L.Y.Shen, D.Thanos, A.K.Aggarwal. *Structure*, **10**, 383 (2002)
142. G.Y.Sheflyan, E.A.Kubareva, E.S.Gromova, Z.A.Shabarova. *Bioconjugate Chem.*, **9**, 703 (1998)
143. О.А.Борисова. *Горизонты физико-химической биологии (школа-конференция)*. Пушкино, 2000. С. 28
144. С.А.Кузнецова, М.Г.Ивановская, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **17**, 1633 (1991)
145. A.V.Kachalova, D.A.Stetsenko, E.A.Romanova, V.N.Tashlitsky, M.J.Gait, T.S.Oretskaya. *Helv. Chim. Acta*, **85**, 2409 (2002)
146. А.В.Качалова, Е.М.Зубин, Т.С.Орепкая. *Успехи химии*, **71**, 1173 (2002)
147. Z.A.Shabarova, M.G.Ivanovskaya, M.B.Gottikh. In *Nucleic Acid Chemistry Improved and New Synthetic Procedures Methods and Techniques. Pt. 4* (Eds L.B.Tomnsend, R.S.Tipson). Wiley, New York, 1991. P. 386
148. M.G.Ivanovskaya, M.B.Gottikh, Z.A.Shabarova. *Nucleosides Nucleotides*, **6**, 913 (1987)
149. Е.А.Таран, М.Г.Ивановская, М.Дж.Гейт, З.А.Шабарова. *Мол. биология*, **32**, 832 (1998)
150. N.Naryshkin, A.Revyakm, Y.Kim, V.Mekler, E.H.Ebright. *Cell*, **101**, 601 (2000)
151. N.M.Luscombe, R.A.Laskowski, J.M.Tharnton. *Nucleic Acid Res.*, **29**, 2860 (2001)
152. О.А.Борисова, А.С.Романенков, В.Г.Метелев, Е.А.Кубарева, Е.М.Зубин, М.А.Тимченко, Т.С.Орепкая. *Мол. биология*, **37**, 534 (2003)
153. M.V.Reed, D.Fraga, D.E.Schwartz, R.D.Kinrichsen. *Bioconjugate Chem.*, **6**, 101 (1995)
154. О.М.Гриценко, Е.С.Громова. *Успехи химии*, **68**, 267 (1999)
155. Б.С.Ермолинский, С.Н.Михайлов. *Биоорг. химия*, **26**, 483 (2000)
156. Е.В.Ефимцева, С.Н.Михайлов. *Биохимия*, **67**, 1374 (2002)
157. A.V.Kachalova, T.S.Zatsepin, E.A.Romanova, D.A.Stetsenko, M.J.Gait, T.S.Oretskaya. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **19**, 1693 (2000)
158. Т.С.Зацепин, А.В.Качалова, Е.А.Романова, Д.А.Степенко, М.Дж.Гейт, Т.С.Орепкая. *Биоорг. химия*, **27**, 45 (2001)
159. T.S.Zatsepin, D.A.Stetsenko, A.A.Arzumanov, E.A.Romanova, M.J.Gait, T.S.Oretskaya. *Bioconjugate Chem.*, **13**, 822 (2002)
160. Д.В.Турутин, Т.С.Зацепин, М.А.Тимченко, Е.А.Кубарева, Т.С.Орепкая. *Мол. биология*, **36**, 877 (2002)
161. O.V.Vorob'eva, O.V.Yamskova, T.S.Zatsepin. In *Proceedings IQN Spring Meeting «Nucleic Acids and Nucleo-Protein-Complexes»*. Giessen, Germany, 2003
162. M.Hashimoto, M.M.Greenberg, Y.W.Kow, J.-T.Hwang, R.P.Cunningham. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3161 (2001)
163. M.S.DeMott, E.Beyret, D.Wong, B.C.Bales, J.-T.Wang, M.M.Greenberg, B.Dempe. *J. Biol. Chem.*, **277**, 7637 (2002)
164. K.M.Kroeger, M.Hashimoto, Y.W.Kow, M.M.Greenberg. *Biochemistry*, **42**, 2449 (2003)
165. R.Singh, G.M.Whitesides. *Chemistry of Sulphur-Containing Functional Groups*. (Eds S.Patai, Z.Rappoport). Wiley, New York, 1993. P. 634
166. R.T.Raines. *Nature Struct. Biol.*, **4**, 424 (1997)

167. S.R.Paalman, D.M.Noll, N.D.Clarke. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 1795 (1997)
168. M.H.Moore, J.M.Gulbis, E.J.Dodson, B.Demple, P.C.Moody. *EMBO J.*, **13**, 1495 (1994)
169. K.Gao, S.L.Butler, F.Bushman. *EMBO J.*, **20**, 3565 (2001)
170. H.Huang, R.Chopra, G.L.Verdine, S.C.Harrison. *Science*, **282**, 1669 (1998)
171. H.Huang, S.C.Harrison, G.L.Verdine. *Chem. Biol.*, **7**, 355 (2000)
172. E.N.Peletskaya, P.L.Boyer, A.A.Kogon, P.Clark, H.Kroth, J.M.Sayer, D.M.Jerina, S.H.Hughes. *J. Virol.*, **75**, 9435 (2001)
173. S.G.Sarafianos, A.D.Clark, S.Tuske, C.J.Squire, K.Das, D.Sheng, P.Ilankumaran, A.R.Ramesha, H.Kroth, J.M.Sayer, D.M.Jerina, P.L.Boyer, S.H.Hughes, E.Arnold. *J. Biol. Chem.*, **278**, 16280 (2003)
174. C.A.He, G.L.Verdine. *Chem. Biol.*, **9**, 1297 (2002)
175. N.Dolinnaya, V.Metelev, T.Oretskaya, D.Tabatadze, Z.Shabarova. *FEBS Lett.*, **444**, 285 (1999)
176. Н.Г.Долинная, В.Г.Метелев. *Биоорг. химия*, **26**, 306 (2000)
177. V.G.Metelev, O.A.Borisova, E.M.Volkov, T.S.Oretskaya, N.G.Dolinnaya. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 4062 (2001)
178. В.Г.Метелев, Е.А.Кубарева, Е.А.Романова, Т.С.Орецкая. *Биоорг. химия*, **29**, 57 (2003)
179. V.G.Metelev, E.A.Kubareva, O.V.Vorob'eva, A.S.Romanenkov, T.S.Oretskaya. *FEBS Lett.*, **538**, 48 (2003)
180. А.С.Романенков, О.А.Борисова, Е.А.Кубарева, Т.С.Орецкая, В.Г.Метелев. *Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия*, **44**, 208 (2003)
181. Z.Shaked, R.P.Szajewski, G.M.Whitesides. *Biochemistry*, **19**, 4156 (1980)
182. V.Pingoud, C.Conzelmann, S.Kinzebach, A.Sudina, V.Metelev, E.Kubareva, J.M.Bujnicki, R.Lurz, G.Lueder, S.-Y.Xu, A.Pingoud. *J. Mol. Biol.*, **329**, 913 (2003)
183. R.H.Abeles, T.A.Alston. *J. Biol. Chem.*, **265**, 16705 (1990)
184. S.Cox, J.Harmenberg. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **25**, 17 (1992)
185. F.B.Fauman, R.M.Blumenthal, X.Cheng. In *S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structure and Functions*. (Eds X.Cheng, R.M.Blumenthal). World Scientific, Singapore; London; Hong Kong, 1999. P. 1
186. X.Gu, D.V.Santi. *Biochemistry*, **31**, 10295 (1992)
187. S.Nunes-Duby, L.Matsumoto, A.Landy. *Cell*, **59**, 197 (1989)
188. S.Nunes-Duby, M.Azaro, A.Landy. *Curr. Biol.*, **5**, 139 (1995)
189. R.S.Tirumalai, E.Healey, A.Landy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6104 (1997)
190. M.R.Redinbo, L.Stewart, P.Kuhn, J.J.Champoux, W.G.Hol. *Science*, **279**, 1504 (1998)
191. B.L.Staker, K.Hjerrild, M.D.Feese, C.A.Behnke, A.B.Burgin, L.Stewart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15387 (2002)
192. D.M.Noll, N.D.Clarke. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 4025 (2001)
193. A.D.Chheda, G.W.Teebor, R.P.Cunningham. *Methods*, **22**, 180 (2000)
194. A.Gogos, J.Cillo, N.D.Clarke, A.-L.Lu. *Biochemistry*, **35**, 16665 (1996)
195. S.D.Williams, S.D.David. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 5123 (1998)
196. D.O.Zharkov, A.P.Grollman. *Biochemistry*, **37**, 12384 (1998)
197. X.Liu, R.Roy. *Biochemistry*, **40**, 13617 (2001)
198. A.J.Kurtz, M.L.Dodson, R.S.Lloyd. *Biochemistry*, **41**, 7054 (2002)
199. J.C.Fromme, S.D.Bruner, W.Jang, M.Karplus, G.L.Verdine. *Nature Struct. Biol.*, **10**, 204 (2003)
200. O.M.Gritsenko, E.V.Koudan, S.N.Mikhailov, B.S.Ermolinsky, A.van Aerschot, P.Herdewijn, E.S.Gromova. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **21**, 753 (2002)
201. D.E.Kamashev, A.V.Balandina, V.L.Karpov. *J. Biol. Chem.*, **275**, 36056 (2000)
202. U.K.Laemmli. *Nature (London)*, **227**, 680 (1970)
203. L.J.Deterding, R.Prasad, G.P.Mullen, S.H.Wilson, K.B.Tomer. *J. Biol. Chem.*, **275**, 10463 (2000)
204. R.A.Rieger, M.M.McTigue, J.H.Kycia, S.E.Gerchman, A.P.Grollman, C.R.Iden. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **11**, 505 (2000)
205. H.Urlaub, K.Hartmuth, S.Kostka, G.Grelle, R.Luhrmann. *J. Biol. Chem.*, **275**, 41458 (2000)
206. S.Raveh, J.Vinh, J.Rossier, F.Agou, M.Veron. *Biochemistry*, **40**, 5882 (2001)
207. S.Sastry, B.M.Ross. *Biochemistry*, **38**, 4972 (1999)
208. P.Edman. *Arch. Biochem. Biophys.*, **22**, 475 (1949)
209. M.Karas, K.F.Hillenkamp. *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988)
210. J.B.Fenn, M.Mann, C.K.Meng, S.F.Wong, C.M.Whitehouse. *Science*, **246**, 64 (1989)
211. P.F.Crain, J.A.McCloskey. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **9**, 25 (1998)
212. D.R.Owens, B.Bothner, Q.Phung, K.Harris, G.Siuzdak. *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 1547 (1998)
213. M.L.Nielsen, K.L.Bennet, B.Larsen, M.Moniatt, M.Mann. *J. Proteome Res.*, **1**, 63 (2002)
214. J.E.Redman, K.M.Wilcoxen, M.R.Ghadiri. *J. Comb. Chem.*, **5**, 33 (2003)
215. A.E.Ashcroft. *Nat. Prod. Rep.*, **20**, 202 (2003)
216. O.N.Jensen, D.F.Barofsky, M.C.Young, P.H.von Hippel, S.Swenson, S.E.Seifried. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **7**, 496 (1993)
217. S.F.Bennet, O.N.Jensen, D.F.Barofsky, D.W.Mosbaugh. *J. Biol. Chem.*, **269**, 21870 (1994)
218. O.N.Jensen, S.Kulkarni, J.V.Aldrich, D.Barofsky. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3866 (1996)
219. H.Urlaub, B.Thiede, E.C.Muller, B.Wittmann-Liebold. *J. Protein Chem.*, **16**, 375 (1997)
220. N.Tretyakova, B.Matter, A.Ogdie, J.S.Wishnok, S.R.Tannenbaum. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 1058 (2001)
221. J.Qin, B.T.Chait. *Anal. Chem.*, **69**, 4002 (1997)
222. H.Urlaub, B.Thiede, E.C.Muller, R.Brimacombe, B.Wittmann-Liebold. *J. Biol. Chem.*, **272**, 14547 (1997)
223. D.Craft, A.Doucette, L.Li. *J. Proteome Res.*, **1**, 537 (2002)
224. J.L.Beck, M.L.Colgrave, S.F.Ralph, M.M.Sheil. *Mass Spectrom. Rev.*, **20**, 61 (2001)
225. S.A.Hofstadler, R.H.Griffey. *Chem. Rev.*, **101**, 377 (2001)
226. H.Steen, O.N.Jensen. *Mass Spectrom. Rev.*, **21**, 163 (2002)

COVALENT BINDING OF MODIFIED NUCLEIC ACIDS WITH PROTEINS AS A METHOD OF INVESTIGATION OF SPECIFIC PROTEIN–NUCLEIC ACID INTERACTIONS

T.S.Zatsepin, N.G.Dolinnaya, E.A.Kubareva, M.G.Ivanovskaya, V.G.Metelev, T.S.Oretskaya

Department of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University

A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology

Leninskie gory, 119992 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)939–3181

Methods of specific covalent binding of modified nucleic acids with proteins and enzymes retaining the native structure are discussed. The use of synthetic nucleic acids containing photoactivated or reactive (nucleophilic and electrophilic) groups to test protein–nucleic acid contacts and to study the functioning of proteins is considered. The structures of protein–nucleic acid conjugates formed during enzymatic reactions are described. The methods for isolation and analysis of covalently bound protein–nucleic acid complexes are generalised. Primary attention is given to methods for identification of the protein site attached to the nucleic acid.

Bibliography — 226 references.

Received 9th March 2003