

КРОСС-СШИТЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ: ПОЛУЧЕНИЕ, СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

© 2010 г.

В. А. ЕФИМОВ, С. В. ФЕДЮНИН

*Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина
и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва*

I. Введение. II. Поперечно-сшивающие агенты. III. Установление структуры кросс-сшивки. Методы получения дуплексов с заранее заданным положением поперечной связи. IV. Биологические ответы клетки на появление в ДНК поперечных сшивок. V. Сшитые РНК-РНК и ДНК-РНК дуплексы и их применение в молекулярной биологии. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Для функционирования клетки необходимо в первую очередь нормальное протекание транскрипции и репликации геномной ДНК. Основным этапом при осуществлении этих процессов является расплетание двойной спирали ДНК. При ковалентной сшивке цепей ДНК между собой этот процесс становится невозможным, что вызывает блокирование процессов репликации и транскрипции и остановку цикла клеточного деления [1–3]. В то же время в клетке существует комплекс ферментов репарации, служащий для устранения различных повреждений в НК, который активируется при действии кросс-сшивающих реагентов. Способы удаления поперечно-сшитых участков ДНК различны для клеток прокариот и эукариот и базируются в основном на репарации путём гомологичной рекомбинации и синтезе на повреждённой матрице, при этом указанные процессы обычно протекают при содействии ферментов эксцизионной репарации [3–8]. Помимо репарационных систем, в клетке также работают «следающие» системы, которые в каждый момент времени оценивают функциональное состояние ДНК, наличие повреждений и возможность их своевременного устранения. При

Принятые сокращения: в обозначениях олигодезоксирибонуклеотидов (например GNC) приставка d и тип связи (5'→3') опущены, N – любой нуклеотид.

Адрес для корреспонденции: eva@mx.ibch.ru

этом репарация кросс-сшивок требует гораздо больше времени и энергозатрат по сравнению с другими повреждениями, поэтому при большом количестве сшивок их своевременное устранение оказывается невозможным, и в конечном счёте происходит гибель клетки в результате индукции апоптоза [9–13]. Установлено, что даже одна трудно поддающаяся репарации сшивка способна убить бактериальную или дрожжевую клетку, а 40 сшивок уже бывает достаточно для гибели клетки млекопитающих [3].

Сшивки между цепями нуклеиновых кислот (НК) могут возникать под действием как вносимых извне химических реагентов, так и эндогенно образующихся соединений. Несмотря на разную химическую природу, все они функционируют в основном как алкилирующие (арилирующие) реагенты. В настоящее время кросс-сшивающие реагенты находят применение как противоопухолевые препараты и как инструменты для исследования особенностей биологического поведения поперечно-сшитых дуплексов НК [14].

В данном обзоре кратко рассмотрены основные типы кросс-сшивающих реагентов, их использование для получения поперечно-сшитых дуплексов НК, а также биологические ответы клеток на появление в них сшитых НК.

II. ПОПЕРЕЧНО-СШИВАЮЩИЕ АГЕНТЫ

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ С ЭЛЕКТРОФИЛЬНЫМИ ГРУППИРОВКАМИ

История химических реагентов, способных поперечно сшивать НК началась еще в период Первой мировой войны в связи с разработкой и испытаниями химического оружия. Было обнаружено, что боевое отравляющее вещество сернистый иприт способен подавлять деление клеток, что создало предпосылки для последующего его использования в качестве противоракового препарата [см. обзор 15]. Дальнейшие интенсивные исследования в этой области привели к созданию менее токсичных аналогов сернистого иприта – азотистых ипритов. Первое использование этих веществ в клинической практике датируется 1946 г. [16], после чего было получено и исследовано большое количество соединений подобного типа [15, 17].

Наиболее хорошо изученным классом кросс-сшивающих агентов являются азотистые иприты, типичным представителем которых является эмбихин (1) (рис. 1). Было показано, что специфическим местом присоединения ипритов является последовательность GNC

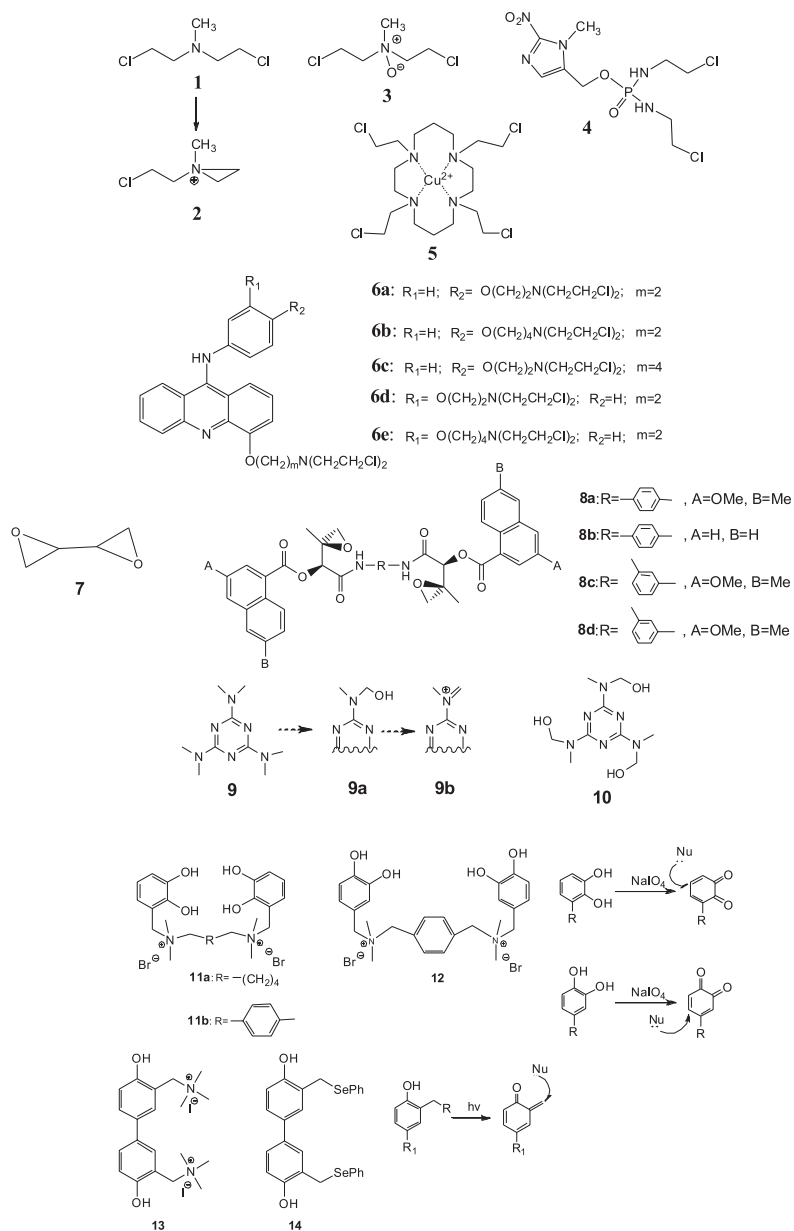


Рис. 1. Азотистые иприты (1–6), эпоксидсодержащие соединения (7, 8), производные s-триазина (9, 10) и фенольные соединения (11–14), способные образовывать кросс-сшивки в ДНК.

[18]. При этом происходит алкилирование остатков гуанина по N⁷-положению в большой бороздке ДНК в обеих цепях дуплекса. Предложенный механизм этого процесса включает промежуточное образование положительно заряженного циклического соединения типа (2).

Благодаря высокой реакционной способности по отношению к различным биологическим субстратам, азотистые иприты обладают довольно низкой селективностью. Опубликовано множество работ по улучшению эффективности и избирательности действия соединений этого класса. В первую очередь это относится к созданию гипоксиселективных производных, терапия которыми основана на том, что клетки, находящиеся в глубине большинства солидных опухолей, являются кислорододефицитными из-за плохого снабжения кровью и содержат большое количество редуктаз. Эти соединения сами по себе не токсичны, но при восстановлении они активируются, и время жизни восстановленного производного в условиях солидных опухолей значительно возрастает. К этим соединениям можно отнести иприт (3) и конъюгаты четвертичной соли эмбихина с различными нитрогетероциклическими соединениями, такие как производное (4). Азотистый иприт (3) активируется за счёт восстановления N-оксида до амина [19], во втором случае происходит высвобождение эмбихина в результате прохождения восстановительной фрагментации [20].

Паркером и сотр. был продемонстрирован принципиально новый подход к конструированию гипоксиселективных ипритных производных [21]. При восстановлении Cu²⁺ до Cu¹⁺ в соединении (5) (рис. 1), происходит образование менее стабильного комплекса с последующим высвобождением активного препарата. Этот процесс может протекать только в клетках с повышенным содержанием редуктаз, и, в отличие от соединения (2), образовавшийся 1,4,7,10-тетра-азацикладекановый иприт уже не подвергается окислению до неактивного предшественника.

Другой стратегией повышения избирательности действия ипритов служит создание их конъюгатов с различными ароматическими соединениями, способными взаимодействовать с ДНК за счёт интеркаляции. Примером такого рода агентов могут служить конъюгаты азотистых ипритов с 9-аминоакридином, имеющим высокую константу связывания с ДНК [22, 23]. Недавно были получены новые производные 9-анилиноакридина (6 а–д), несущие остатки азотистого иприта в анилиновом и акридиновом кольцах (рис. 1) [24]. Они обладают значительной цитотоксичностью против CCRF-CEM клеток лимфобластной лейкемии человека.

Подобным действием на раковые клетки обладают также производные эпоксидов, этилениминов и фосфамидов [25]. Диэпоксидбутан (DEB) (7) является самым простым из большого числа эпоксидсодержащих алкилирующих агентов (рис. 1). В работе [26] был предложен механизм образования кросс-сшивки диэпоксидбутаном аналогичный механизму действия азотистых ипритов. Было показано, что предпочтительным местом образования кросс-сшивки является фрагмент GC. При этом самым эффективным из стереоизомеров DEB является S,S-изомер [27]. С меньшей эффективностью DEB также образует кросс-сшивки и по последовательностям GGCC, TGCA, TCGA, CCGG, TATA. К эпоксидсодержащим соединениям можно отнести и более высокомолекулярные димерные аналоги природных противоопухолевых антибиотиков азиномицинов. Эти соединения обладают более высокой кросс-сшивающей и противоопухолевой активностями по сравнению со своими мономерными предшественниками. Было показано, что соединения (8 а–г) (рис. 1), имеющие жёсткие ароматические спейсеры [28], обладают повышенной токсичностью по сравнению с ранее полученными производными с аминокетильными линкерами различной длины [29].

Способностью сшивать две цепи ДНК обладают некоторые производные s-триазина. Среди них ярко выраженной противоопухолевой активностью обладают гексаметилмеламин (9) и тримеламол (10) (рис. 1) [30].

Гексаметилмеламин (9) представляет собой пример агента, активируемого с помощью окисления. Выяснилось, что в организме происходит его окисление цитохромом P-450 с образованием метилольного фрагмента (9а). Предполагается, что он способен превращаться в активный иминиевый ион (9б), ответственный за алкилирующую активность. Далее аналогичный фрагмент образуется в другой части молекулы и в конечном итоге происходит образование кросс-сшивки в ДНК [31]. Другое триазиновое производное – тримеламол (10), обладает лучшей растворимостью в воде, чем гексаметилмеламин [32]. Однако, механизм образования поперечной сшивки и предпочтительные участки связывания для этих соединений пока точно не установлены [33].

В течение последних лет был получен ряд поперечно-сшивающих реагентов, содержащих в своей структуре фрагменты фенола (11–13) [34–36]. Предполагаемый механизм алкилирования включает образование промежуточных соединений хинонового типа, являющихся хорошими акцепторами Михаэля и реагирующих с нуклеофильными группировками нуклеиновых оснований по

β -углеродному атому по отношению к кето-группе. Образование реакционноспособных интермедиатов индуцируется окислением периодатом натрия в случае производных (11) и (12) или УФ-светом в случае соединения (13) (рис 1). Преимуществом этих соединений является хорошая растворимость в воде и высокая кросс-сшивающая активность. При обработке бисфенолом (13) опухолевых клеток человека, последние подвергаются апоптозу, что в дальнейшем может быть использовано для разработки апоптоз-индуцирующих противоопухолевых препаратов [34].

СОЕДИНЕНИЯ НА ОСНОВЕ ПЕРЕХОДНЫХ МЕТАЛЛОВ

На сегодняшний день опубликовано огромное количество работ по получению и применению в химиотерапии рака соединений переходных металлов. Такими агентами являются, например, комплексы кобальта (II) (14) [37] и родия (II) (15) [38]. К той же группе формально можно отнести вышеупомянутое соединение меди (5). Одними из наиболее широко применяемых в противоопухолевой терапии препаратов являются соединения платины, такие как *цис*-диаминодихлорплатина (16), *транс*-диаминодихлорплатина (17) и димерные соединения типа (18) (рис. 2).

Среди всех продуктов взаимодействия *цис*-изомера (16) с двухцепочечной ДНК преобладают сшивки по одной цепи (65%), которые образуются по GG последовательностям, а поперечные сшивки присутствуют лишь в малом количестве на участках GC [39]. При этом сшивка сильно искажает структуру ДНК и оба остатка цитозина в последовательности GC оказываются полностью выведенными из дуплекса [40]. Данные ЯМР свидетельствуют о том, что кросс-сшивка располагается в большой бороздке дуплекса и вызывает локальные изменения правовращающей В-формы ДНК в левовращающую Z-форму. Подробное описание способов присоединения платиновых агентов к ДНК и возникающие клеточные ответы даны в обзоре Юнга и Липпарда [41].

В отличие от своего *цис*-изомера, *транс*-изомер (17) образует в основном продукты моноприсоединения к ДНК и, как следствие, обладает очень низкой противоопухолевой активностью. Однако в ходе недавних работ [42] было установлено, что его токсичность можно повысить до уровня соединения (16), если проводить обработку с одновременным облучением УФ-светом в диапазоне 320–380 нм.

С целью повышения эффективности кросс-сшивающих агентов на основе соединений платины различными группами исследователей были получены димерные соединения (18), которые показали

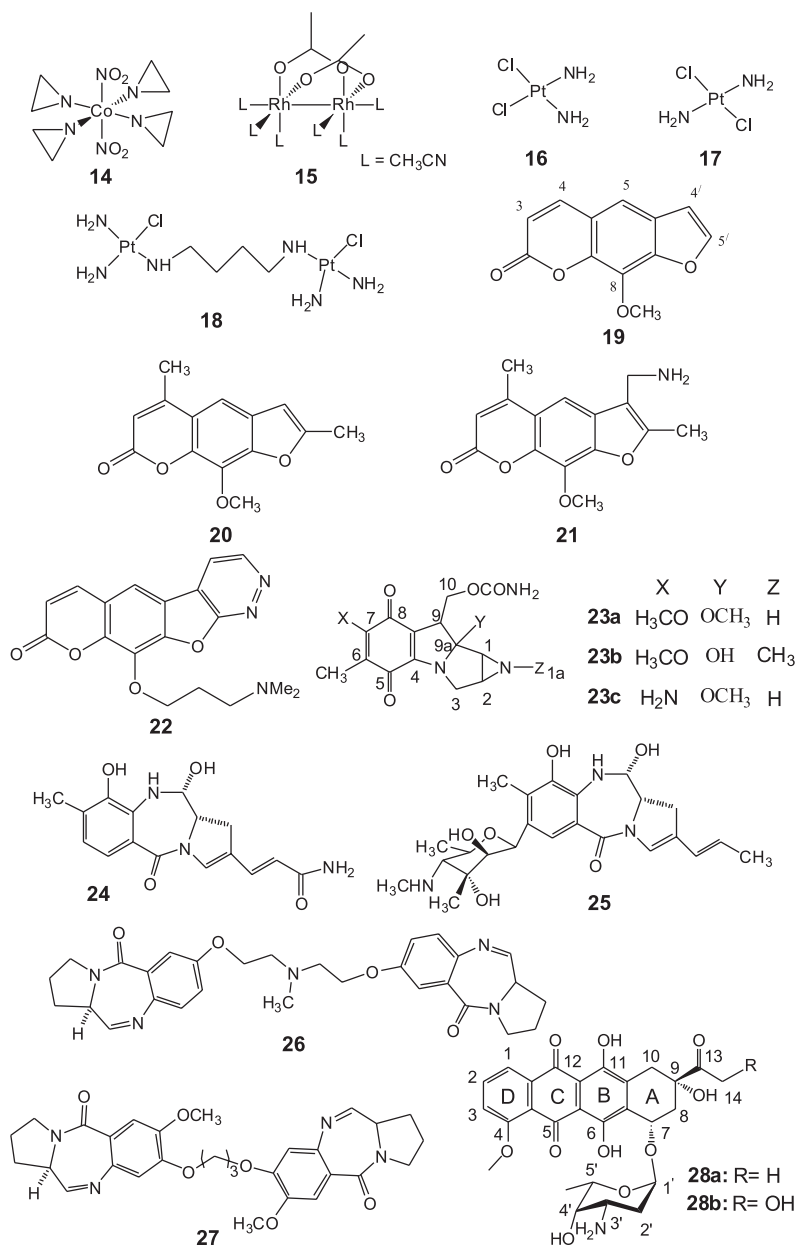


Рис. 2. Соединения на основе переходных металлов (14–18), производных псоралена (19–22) и противоопухолевые антибиотики (23–28), обладающие кросс-сшивающей активностью.

высокую эффективность, в том числе и в случае опухолей, резистентных к терапии цис-диаминодихлорплатиной [43]. При этом отмечается, что подобные соединения характеризуются большей эффективностью образования поперечных сшивок по сравнению со своим мономерными аналогами [44].

ПСОРАЛЕНА

Псоралены являются природными фурукумаринами и представляют класс фотоактивируемых поперечно-сшивающих агентов. Среди псораленов наиболее изучены 8-метоксипсорален (19), 4,5',8-триметилпсорален (20) и 4'-аминометил-4,5',8-триметилпсорален (21) (рис. 2) [8, 45]. Иницирование образования поперечных сшивок псораленами в ДНК-дуплексах протекает через стадию интеркаляции планарного трициклического соединения между плоскостями двух пар оснований ТА или АТ и поглощения кванта света с прохождением реакции фотоциклоприсоединения к 5,6-двойной связи тимидина 4',5'-двойной связи фуранового цикла, или 3,4-двойной связи кумарина. При этом поперечная сшивка образуется только тогда, когда присоединение изначально происходит с участием фуранового фрагмента. В противном случае кумариновое кольцо разрушается, а полученный продукт оказывается неустойчивым и кросс-сшивки не образуется. С помощью ЯМР спектроскопии было показано, что сшивка вызывает значительную деформацию и локальное раскручивание цепей на 25° в месте присоединения псоралена, но не оказывает существенного влияния на дуплекс в целом и он сохраняет В-форму уже на расстоянии 3 нуклеотидных пар от места сшивки [46]. Следует отметить, что сшивки ДНК псораленами достаточно стабильны химически, и их можно легко воспроизвести на дуплексах, образованных синтетическими олигонуклеотидами. Поэтому часто изучение механизмов репарирования поперечных сшивок в ДНК проводится на примере сшивок, образующихся под действием этих соединений.

В работе Виа и др. [47] сообщалось о получении нового пиридазинопсораленового производного (22), которое хотя и обладает значительной токсичностью, но имеет более высокую химиотерапевтическую активность по сравнению с 8-метоксипсораленом. По мнению авторов, полученные результаты могут способствовать в дальнейшем успешной разработке терапевтических производных псоралена с тетрациклической структурой.

АНТИБИОТИКИ

Особое место среди кросс-сшивающих препаратов занимают природные противоопухолевые антибиотики. В 1956 г. в Японии из культуральной жидкости *Streptomyces caespitosus* были выделены митомицины А и В [48], а двумя годами позже – митомицин С [49]. Эти соединения являются производными митозана (23) и отличаются друг от друга природой заместителей в 1а, 7 и 9а положениях остова этой молекулы [50] (рис. 2). Из указанных антибиотиков только митомицин С (23в) с 1974 г стал широко применяться в химиотерапии рака. Многочисленные исследования показали, что активация митомицина С с последующим образованием поперечной сшивки ДНК происходит в результате многостадийного процесса [1, 51], а структура аддукта митомицина С с ДНК была установлена в 1987 г. [52]. Оказалось, что присоединение антибиотика (23с) происходит в месте расположения димера CG в малой бороздке ДНК по N² атомам остатков гуанина с участием C¹ и C¹⁰ положений молекулы антибиотика. Данные по молекулярному моделированию, ЯМР-спектроскопии и электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле дуплексов ДНК, сшитых митомицином С, свидетельствуют о том, что этот антибиотик, в отличие от бифункциональных алкилирующих агентов типа азотистого иприта, практически не вносит серьезных деформаций в структуру В-формы ДНК, приводя лишь к незначительному уширению малой бороздки в месте сшивки [53, 54].

Активация митомицина С может происходить с участием различных редуктаз, в том числе и содержащих дитиольный активный центр [55]. В то же время эксперименты по восстановлению митомицина С тиолами не увенчались успехом [56]. Однако недавно Мануэлем и др. было показано, что восстановление тиолами возможно при рН близких к рКа соответствующего тиола [57]. Изучение механизма этой реакции в дальнейшем очевидно позволит детально понять схему активации митомицина С редуктазами, имеющими дитиольный активный центр.

Также были синтезированы более эффективные и селективные производные митомицина С, среди которых стоит отметить димерные производные, в которых два остатка митомицина связаны различными линкерами, отличающимися химической природой и местом присоединения к молекуле антибиотика. Некоторые из таких димеров позволили значительно повысить региоселективность этих препаратов и количество поперечных сшивок по сравнению с мономерным антибиотиком [58, 59].

К антибиотикам, способным образовывать поперечные сшивки в ДНК, относятся также пирролбензодиазепиновые димеры, которые представляют собой синтетические производные природных предшественников антромицина (24) и сибиромиицина (25) [60], но в отличие от них, обладают способностью образовывать кросс-сшивки. Димеры типа (26, 27) (рис. 2) содержащие алифатический мостик длиной в 3 или 5 атомов углерода, обладают высокой кросс-сшивающей активностью, причём они специфичны к тем последовательностям в ДНК которые гораздо чаще встречаются в кодирующих участках генома, чем в некодирующих (например, AGATTCT, GGATCC) [61].

Среди других антибиотиков, способных образовывать ковалентные связи с ДНК особо следует отметить противоопухолевые антибиотики антрациклинового ряда, которые были открыты в 1950 г. в культуральной жидкости *Streptomyces purpurascens* [62], а в дальнейшем были обнаружены и во многих других штаммах стрептомицетов. К настоящему времени синтезировано несколько тысяч различных аналогов и производных антрациклинов, некоторые из которых вошли в практику онкологии. В первую очередь это относится к даунорубину (дауномицину) и к доксорубину (андриамицину) [60]. Даунорубин (28а) представляет собой гликозид, состоящий из агликона – 4-метокси-6,7,9,11-тетраокси-9-ацето-7,8,9,10-тетрагидротетраценхинона и аминоксахара – 3-амино-2,3,6-тридезоксид-*L*-лихозида (даунозатин) (рис. 2). Доксорубин (28б) отличается от даунорубина наличием дополнительной гидроксильной группы при C^{14} атоме каркаса молекулы. Общим для антибиотиков ряда антрациклинов является наличие сильного хромофора антрахинонового типа, обладающего характерной флуоресценцией, а также присутствием в С9 положении агликона гидроксильной группы, играющей важную роль при проявлении биологической активности этих соединений. Механизм цитотоксичности антибиотиков антрациклинового ряда до конца не изучен [61, 62]. Установлено, что антибиотики способны интеркалировать в ДНК между основаниями цитозина и гуанина [63]. Планарный тетрациклический агликон даунорубина интеркалирован между парами оснований, «D»-кольцо агликона выступает в большую бороздку ДНК, а соединенный гликозидной связью 3'-аминосакхар располагается в малой бороздке ДНК в непосредственной близости ($\sim 3,09$ Å) от N^2 атома гуанина. Это создавало предпосылку для образования ковалентной связи между 3'-аминогруппой даунозатина и N^2 атомом гуанина при действии небольшого бифункционального электрофильного реагента, например формальдегида, что и было

показано авторами работ [64, 65], которые обнаружили между двумя сближенными аминогруппами метиленовый мостик, ковалентно связывающий антибиотик с ДНК. Согласно работе [66], источником формальдегида могут служить самые различные соединения, например Трис-HCl в составе различных буферов, спермин (обычно ассоциированный в клетках с ДНК) и, наконец, сам доксорубин (за счет взаимодействия с перекисью водорода, образующейся в организме во время протекания окислительно-восстановительных процессов по Фентону). В пользу этого механизма свидетельствуют также данные работ [67, 68], в которых с применением масс-спектрометрии был проведен анализ содержания формальдегида в клетках, обработанных и необработанных антибиотиками. Уровень формальдегида в обработанных клетках был выше и коррелировал с концентрацией препарата. Таким образом оказалось, что с формальной точки зрения антибиотик доксорубин и даунорубин образуют ковалентную связь только с одной из цепей ДНК, в то время как в другую цепь происходит интеркаляция агликона и с ней они образуют две водородные связи. Такой тип взаимодействия был назван виртуальной (или квази) кросс-сшивкой [66]. Полученные результаты создали предпосылки для рационального дизайна новых аналогов и производных антрациклиновых антибиотиков, обладающих улучшенными противоопухолевыми свойствами. В частности, была получена серия димерных производных, соединенных по 3'-аминогруппам с помощью различных линкеров. Это позволило до 10^4 раз увеличить аффинность антибиотиков к ДНК и тем самым, в перспективе, существенно сократить дозы лечебных препаратов на их основе [70, 71]. Димерные конъюгаты антрациклиновых антибиотиков с формальдегидом – доксоформ, дауноформ и эпидоксоформ, оказались исключительно активными против опухолевых клеток, резистентных к исходным антибиотикам [72–74].

ЭНДОГЕННЫЕ КРОСС-СШИВАЮЩИЕ АГЕНТЫ

Поперечные сшивки в клеточной ДНК могут возникать не только под действием внесенных извне кросс-сшивающих реагентов, но и в результате взаимодействия ДНК с эндогенными агентами. При действии α,β -ненасыщенных альдегидов (еналов), в частности акролеина, кротонового альдегида и 4-гидроксиноненала, побочных продуктов окислительной деградации ненасыщенных липидов, первоначально образуются 1,N²- γ -гидроксипирано-dG аддукты, которые при взаимодействии с аминогруппой гуанина соседней цепи в соседних C-G и G-C парах оснований последовательности 5'-CpG-3' дают поперечную сшивку [2].

Оксид азота (II), который синтезируется в организме человека и выполняет ряд важных функций, тоже может образовывать поперечные сшивки. При его взаимодействии с водой образуется азотистая кислота, которая диазотирует N²-остатки гуанина. Полученные диазосоли замещаются гуаниновыми аминогруппами комплементарной цепи, в результате чего возникает ковалентная связь в 5'-СpG-3' участках цепи [75].

III. УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ КРОСС-СШИВКИ. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ДУПЛЕКСОВ С ЗАРАНЕЕ ЗАДАННЫМ ПОЛОЖЕНИЕМ ПОПЕРЕЧНОЙ СВЯЗИ

На сегодняшний день открыто и синтезировано много соединений, способных к образованию кросс-сшивок в ДНК. Установление механизма действия и предпочтительного сайта связывания таких агентов невозможно без применения методов определения положения поперечной связи в молекуле НК.

Для обнаружения поперечной сшивки в молекуле нуклеиновой кислоты, а также приблизительной оценки количества сшитых дуплексов, проводится электрофорез в денатурирующих условиях. При этом сшитые дуплексы легко обнаруживаются по наличию полос с меньшей электрофоретической подвижностью по сравнению с соответствующими одонитчатыми фрагментами ДНК [76]. Для точного определения структуры сшитого фрагмента НК применяется способ, включающий экзонуклеазное расщепление дуплекса и выделение имеющего сшивку фрагмента НК минимально возможной длины [26]. Используется также предварительный синтез олигонуклеотида заданной последовательности, содержащей один единственный предполагаемый участок сшивки. Параллельно получают контрольный дуплекс, в котором этот участок отсутствует. Далее этот дуплекс обрабатывается кросс-сшивающим агентом и наличие или отсутствие сшивки определяется с помощью гель-электрофореза. После получения информации о положении сшивки в двухцепочечной НК и предпочтительном месте связывания определённого агента, более точную информацию о структурных особенностях сшитого участка получают с помощью таких методов, как рентгеноструктурный анализ [77], молекулярное моделирование, ЯМР [78, 79, 80] и масс-спектрометрия [81].

Сшитые двуцепочечные НК могут применяться в качестве моделей для изучения клеточных процессов, связанных с функционированием ДНК и РНК, а также для создания аффинных реагентов и «ловушек»

для белков, связывающихся с двунитиевой ДНК [82]. Например, если механизм действия фермента предполагает расплетание двойной спирали, то наличие ковалентной связи между цепями препятствует такому расплетанию. Таким образом сшитые дуплексы могут служить мощными ингибиторами белков, для функционирования которых необходимо расплетание двойной спирали [82]. Следует также отметить, что высоким сродством именно к двухцепочечной ДНК, содержащей ковалентные связи, обладают белки репарационных систем, ответственных за их устранение, поэтому поперечно-сшитые дуплексы активно используются для выделения белков подобного типа и детального изучения особенностей их функционирования [42]. Способы получения ковалентно-сшитых НК-дуплексов с применением различных реагентов подробно рассматриваются в обзорах [83, 14].

На сегодняшний день существуют три основных стратегии направленного введения сшивки в определённую последовательность дуплекса. Во-первых это постсинтетическая модификация олигонуклеотида. Уже синтезированный олигонуклеотидный дуплекс подвергают воздействию кросс-сшивающего агента с известной сайт-специфичностью. Далее проводят очистку целевого сшитого дуплекса от побочных продуктов, включающих сшивки в одной из цепей, продукты моноприсоединения агента и исходный олигонуклеотид. Этим способом получают поперечные сшивки такими агентами, как азотистые иприты. Другой метод включает гибридизацию одноцепочечного олигонуклеотида с комплементарной последовательностью, содержащей в определённом месте монопроизводное поперечно-сшивающего агента. Модификация вводится либо постсинтетически, либо в процессе наращивания олигонуклеотидной цепи. Далее после гибридизации инициируется образование поперечной сшивки. Так, в случае псоралена сшивка образуется при действии УФ-облучения, а в случае митомицина С – в результате выдерживания дуплекса в бескислородной среде и в присутствии восстановителя.

Следующий способ формально можно отнести к обоим вышеперечисленным. Он включает введение в процессе твёрдофазного синтеза комплементарных цепей модифицированного звена, содержащего активную электрофильную группу [84] или её предшественник [85]. Затем проводится гибридизация полученных цепей и обработка дуплекса бифункциональным нуклеофильным реагентом, например диаминоалканом.

Другая группа методов предполагает введение сшивки с использованием твёрдофазного метода синтеза олигонуклеотидов. В ка-

честве примера можно привести способ, включающий получение олигонуклеотида, содержащего алкильную сшивку по кислородным атомам гуаниновых остатков противоположных цепей [86] (рис. 3). Синтез был осуществлён следующим образом. На первой стадии происходило одновременное наращивание двух олигонуклеотидных цепей в направлении от 3' конца к 5' концу с использованием 3'-О-фосфитаминов нуклеозидов. Затем на определённом этапе в конденсацию вводился димер (29), представляющий собой два защищённых остатка дезоксигуанозина, соединённых между собой по О⁶-атомам гетероциклов, причём вместо стандартной изобутироильной защитной группы гетероциклического основания была использована феноксиацетильная (Рас) группа, которая позволяла проводить деблокирование в более мягких условиях. Таким образом на этой стадии осуществлялось введение сшивки по определённому сайту олигонуклеотида. Далее продолжили наращивание обеих цепей до определённой длины, после чего полученный дуплекс был деблокирован и очищен с использованием ВЖХ.

В последние годы широкое применение находит катализируемое солями меди (I) [3+2] циклоприсоединение терминальных алкинов к азидам, которое получило название «клик-реакции» [87]. Эта реакция характеризуется мягкими условиями протекания, высокими выходами, возможностью осуществления в широком диапазоне рН и инертностью по отношению к большинству функциональных групп, присутствующих в биологических субстратах. В связи с этим на сегодняшний день «клик-реакция» находит применение во множестве областей молекулярной биологии, химии и биохимии, в частности для создания конъюгатов НК с белками [88], для иммобилизации их на твёрдых носителях [89], для введения в НК различных меток [90] и т.д.

Возможность применения этой методики для получения ДНК-дуплексов содержащих поперечные сшивки различной длины между двумя модифицированными остатками урацила была продемонстрирована Зокалкой и сотр. [91]. Для этого были получены фосфитаминовые мономеры, одни из которых содержали алкильные группы (31), а другие – блокированные аминогруппы (32) (рис. 4). Введение азидных групп осуществлялось путём постсинтетической обработки аминосодержащих олигонуклеотидов N-гидроксисукцинимидными эфирами 4-азидобутановой кислоты и 6-азидогексановой кислоты. Нами был предложен другой способ введения азидных группировок в олигонуклеотиды, предусматривающий использование мономера типа (33) и фосфотриэфирного способа синтеза олигонуклеотидов [92]. В работе [91] было получено девять олигонуклеотидов с одинаковой последовательностью оснований, одни из которых содержали

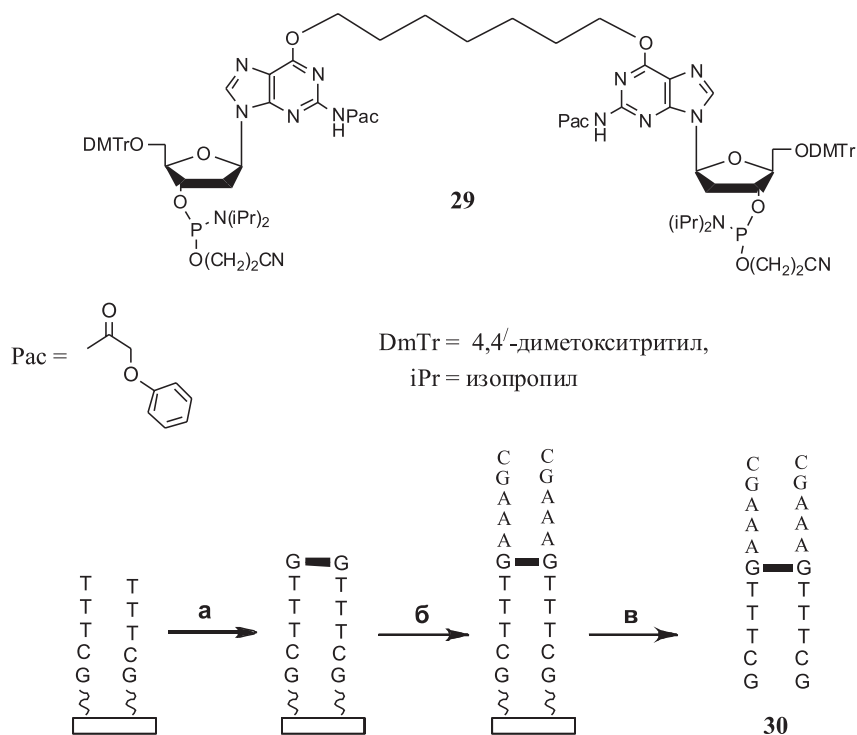
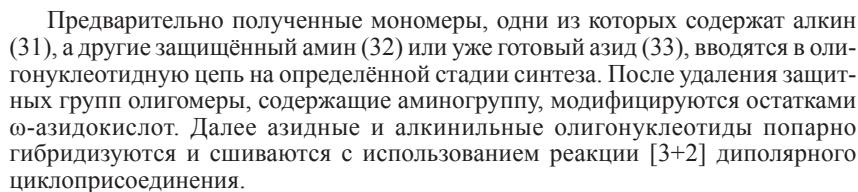


Рис. 3. Синтез на твёрдой фазе сшитых олигонуклеотидных дуплексов, включающий введение сшивки путём одновременного присоединения димерного олигонуклеотида к обеим растущим цепям: а) присоединение бис-фосфитамида (29), б) добавление 3'-О-фосфитамидов до соответствующей длины олигонуклеотида, в) снятие с носителя и деблокирование.

звено с алкинильной группой, а другие, комплементарные им, азидные группировки в разных положениях. При гибридизации азидная группа в одной цепи и алкинильная в другой оказывались в разных дуплексах на разных расстояниях. Два олигонуклеотида, не содержащие модификаций, использовались в качестве сравнения при измерении температуры плавления. Образование сшитых дуплексов было продемонстрировано с помощью денатурирующего гель-электрофореза. Скорость реакции образования сшивки зависела как от длины линкера, так и от положения октаденильной группировки в последовательности, но в среднем образование сшивок протекало достаточно быстро. При этом в отсутствие медного катализатора образования кросс-сшивки не происходило. С помощью термической денатурации было показано, что все полученные сшитые двух-



цепочечные олигонуклеотиды имеют температуру плавления в среднем на 30°C большую, чем соответствующие немодифицированные дуплексы.

IV. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОТВЕТЫ КЛЕТКИ НА ПОЯВЛЕНИЕ В ДНК ПОПЕРЕЧНЫХ СШИВОК

Для нормальной жизнедеятельности клетки необходимо сохранение нативности ДНК. Поэтому существуют специальные системы, которые осуществляют постоянный мониторинг состояния ДНК и устраняют повреждения, непрерывно возникающие под воздействием химических агентов, УФ-излучения и других факторов [93]. К подобным повреждениям относятся продукты взаимодействия ДНК с кросс-сшивающими агентами. Появление в ДНК поперечных сшивок вызывает ряд ответов клетки, которые могут различаться в зависимости от фазы клеточного цикла, количества поперечных сшивок, наличия генетических недостатков и т.п. [3].

Известно, что протекание процессов транскрипции и репликации включает расплетание молекулы ДНК. При наличии ковалентной связи между цепями расплетание становится невозможным, что приводит к остановке указанных процессов. В случае репликации возникает так называемая заблокированная репликативная вилка (stalled replication fork). Это приводит к запуску репарационных механизмов, в которых на начальных стадиях под действием сайт-специфичной эндонуклеазы происходит отщепление дочерней двойной нити ДНК, содержащей лидирующую цепь. Однако данное событие имеет место только в клетках эукариот [6]. Такие повреждения ДНК не являются классическими разрывами двойной цепи, как это имеет место при воздействии активных форм кислорода или УФ-излучения, а представляют собой «разрывы с одним концом» [94]. Недавно было показано, что в ходе первоначальной нуклеазной обработки также может происходить образование и классических разрывов двойной спирали [95].

Помимо указанных событий также происходит остановка цикла клеточного деления. Известно, что закономерная последовательность смены периодов клеточного цикла осуществляется при взаимодействии циклин-зависимых киназ и циклинов. Клетки, находящиеся в G_0 фазе могут вступать в клеточный цикл при действии на них гормонов роста, которые запускают внутриклеточный сигнальный каскад, приводящий в итоге к транскрипции генов циклинов и циклин-зависимых киназ. Циклин-зависимые киназы становятся активными лишь при взаимодействии с соответствующими циклинами.

Каждая стадия клеточного цикла, кроме G_0 , характеризуется наличием соответствующего циклина, а комплекс циклин/циклин-зависимая киназа запускает каскад реакций фосфорилирования, регулирующий смены фаз клеточного цикла. К окончанию определённой фазы соответствующий циклин быстро разрушается протеиназами. Для контроля завершения каждой фазы клеточного цикла существуют сверхочные точки. На прохождение клеткой через сверхочную точку может влиять много факторов, в том числе наличие повреждений в ДНК. Существует как минимум 3 сверхочных точки клеточного цикла, в которых проверяется наличие повреждений в ДНК: точка в G_1 (G_1/S), где проверяется интактность ДНК, перед вхождением в S-фазу; сверхочная точка в S-фазе, в которой проверяется правильность репликации ДНК, и сверхочная точка в G_2 (G_2/M), в которой проверяются повреждения, пропущенные при прохождении предыдущих сверхочных точек, либо полученные на последующих стадиях клеточного цикла. В G_2 фазе детектируется полнота репликации ДНК и клетки, в которых ДНК недореплицирована, не входят в митоз. Повреждения в ДНК, в частности блокировка репликативной вилки в результате наличия поперечной сшивки, обнаруживается белками hMOF, TIP60, MRE11, которые осуществляют передачу сигнала на трансдуцирующие PIKK (phosphatidylinositol 3-kinase-dependent kinases): ATM (ataxia-telangiectasia mutated), ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related) и DNA-PK (DNA dependent protein kinase). Предполагается, что три типа протеинкиназ взаимозаменяемы, но проявляют в тоже время разную специфичность. Так ATM в первую очередь ответственна за формирование ответа на появление в ДНК разрывов двойной спирали, тогда как ATR активируется в ответ на множество других повреждений ДНК, в том числе и блокировка репликативной вилки [96]. Активированные киназы в свою очередь фосфорилируют белок p53 (один из ключевых компонентов в запуске апоптотического каскада [97]), а также эффекторные молекулы, такие как киназы Chk1 и Chk2. Они фосфорилируют ряд белков, в том числе комплекс циклин/циклин-зависимая протеинкиназа, Cdc5, 14, 25, 45 и др., что приводит к аресту клеточного цикла. Помимо этого, киназы Chk1 и Chk2 активируют репарационный комплекс клетки. Будучи активированным, сигнальный механизм вместе с молекулярной машиной, останавливающей клеточный цикл, находятся в активированной форме до тех пор, пока повреждение не будет репарировано и система специфических фосфатаз не восстановит молекулярное спокойствие в клетке [98]. Многочисленные исследования показали, что кросс-сшивающие агенты в основном вызывают остановку клеточного цикла в фазе G_2 [99].

В том случае, если своевременное устранение повреждения в ДНК невозможно, через серию сигнальных и медиаторных белков и белковых систем запускается процесс апоптоза. Следует отметить, что, хотя до сих пор точно не установлено, каким образом и когда клетка делает выбор между запуском репарационного процесса или апоптотических систем, тем не менее, многочисленные данные позволили выявить ключевых участников обоих процессов [100].

РЕПАРАЦИЯ ПОПЕРЕЧНЫХ СШИВОК В ДНК

На сегодняшний день репарация поврежденной ДНК является одной из наиболее исследуемых областей биохимии и молекулярной биологии, которой посвящён отдельный журнал (DNA Repair). Разные повреждения ДНК в зависимости от своей сложности устраняются с участием многочисленных белков и белковых комплексов. Так, O^6 -метилированные гуанины легко и быстро удаляются с участием O^6 -метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы [101], тогда как репарация разрывов двойных спиралей и поперечных сшивок требует участия множества белков и белковых комплексов, как непосредственно участвующих в устранении повреждения, так и выполняющих сигнальную и/или регуляторную функции. Поскольку один и тот же белок может выполнять одновременно несколько функций, что существенно усложняет изучение таких процессов. Необходимо также отметить, что процесс устранения сложных повреждений ДНК осуществляется последовательностью более простых методов и протекает по разному в прокариотических и эукариотических клетках [5, 8]. Подробное рассмотрение всех способов устранения различных повреждений в ДНК выходит за рамки данного обзора, поэтому ниже будут рассмотрены те процессы, которые являются основными этапами репарации поперечных сшивок.

Эксцизионная репарация нуклеотидов

Эксцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН) предназначена для распознавания и исправления больших повреждений ДНК, способных привести к блокировке репликации и транскрипции [102]. Основными белками, участвующими в ЭРН в *E. coli*, являются Uvr(A, B, C) и Pol I. UvrA и UvrB формируют комплекс $(UvrA)_2UvrB$, который распознаёт повреждённый участок, происходит присоединение UvrB к ДНК, тогда как UvrA диссоциирует и затем к комплексу ДНК-UvrB присоединяется UvrC. Далее происходит расщепление фосфодиэфирных связей вокруг повреждённого участка, после чего комплекс $(UvrB)(UvrC)$ диссоциирует, и происходит замена повреждённого участка ДНК-полимеразой Pol I.

В клетках дрожжей функцию ЭРН выполняют белки четырёх комплексов NEF1–4. Комплекс NEF2, включающий белки Rad4 и Rad23, также как и белок Rad14 комплекса NEF1, участвуют в распознавании повреждения, а эндонуклеазы Rad1–Rad10 (NEF1) и Rad2 (NEF3) создают разрезы около повреждённого участка. После этого происходит синтез ДНК с помощью ДНК-полимераз Pol2 и Pol δ и лигирование на конечной стадии ДНК-лигазой. Комплекс NEF4, состоящий из белков Rad7 и Rad16 осуществляет эксцизионную репарацию в нетранскрибируемых районах ДНК [103]. В процессе образования разрезов эндонуклеазами участвуют геликазы Rad3 и Rad25, осуществляющие локальное расплетание двуцепочечной ДНК.

В клетках человека белки RPA, XPA и XPC участвуют в распознавании повреждения, затем происходит присоединение геликазы TFIIH, которая осуществляет локальное расплетание ДНК в повреждённом сайте. Далее белки XPG и XPF/ERCC1 формируют разрезы со стороны 3'- и 5'-концов повреждённого участка соответственно. В результате удаляется 24–32 звенный олигонуклеотид и затем, как и в предыдущих случаях, происходит заполнение образовавшейся брешы белками RFC/PCNA и полимеразами Pol δ/ϵ с последующим лигированием ДНК-лигазой I [5].

Репарация на основе гомологичной рекомбинации

Основная функция этого способа репарации заключается в устранении разрывов двойных спиралей в ДНК, которые часто образуются после действия поперечно-сшивающих агентов [104]. Репарация путём гомологичной рекомбинации используется клеткой в основном в фазах клеточного цикла S и G₂, когда доступны сестринские хроматиды, тогда как в фазах G₁ и M реализуется другой способ репарации – негомологичное сращивание концов [104, 105, 106].

В клетках *E. coli* распознавание повреждённого участка осуществляется комплексом RecABC, который подготавливает субстрат для белка RecA, осуществляющего спаривание гомологичных молекул ДНК. RecABC несёт в себе функции нуклеазы и геликазы, он расплетает ДНК и проводит деградацию цепи, после чего RecA присоединяется к обработанной ДНК со стороны 3'-конца. Далее, в комплексе с белком SSB (single strand binding protein) он осуществляет поиск гомологичности в неповреждённой ДНК, после чего происходит соединение молекул и ДНК-полимераза I восстанавливает последовательность ДНК. Полученная структура превращается в две новые цепи белком RuvC вместе с RuvAB.

В клетках дрожжей первоначальная обработка цепи ДНК осуществляется неизвестной нуклеазой, вслед за которой нуклеазо-хеликазный комплекс Rad50/MRE11/XRS2 осуществляет подготовку полученного ДНК-субстрата. Далее белки Rad51 (дрожжевой гомолог бактериального белка RecA) и Rad52 вместе с белками Rad54 и Rad55,57 промотируют расплетание ДНК и гибридизацию цепей между донорной и повреждённой ДНК. Расщепление образующихся рекомбинатных промежуточных структур происходит разными способами с участием нуклеазы mus81-mms4 и/или белка, аналогичного комплексу RuvABC, называемого резольвазой А.

В клетках млекопитающих указанные функции выполняются, так же как и в клетках дрожжей, белком Rad51, а нуклеазо-хеликазный комплекс Rad50/MRE11/XRS2, вместо XRS2, включает белок NBS1. Кроме того, в процессе участвуют белки XRCC2 и XRCC3, которые выполняют функцию репарирования разрывов и поперечных сшивок, а также осуществляют взаимодействие с белком rad51. Следует подчеркнуть, что механизмы репарации посредством гомологичной рекомбинации в клетках эукариот до сих пор до конца не исследованы и продолжают интенсивно изучаться [8].

Синтез на повреждённой матрице

Основной функцией этого процесса является устранение повреждений, блокирующих репликацию. В отличие от предыдущих типов репарации повреждений ДНК, в этом типе репарации возможны существенные ошибки. В самом простом виде он включает 4 стадии: 1) ДНК-полимераза, осуществляющая репликацию, блокируется при встрече повреждения на одной из цепей, при этом фермент удаляется из репликативной вилки; 2) вместо обычной полимеразы, вводится специальная ДНК-полимераза, способная к синтезу на матрице, содержащей повреждение. Она синтезирует отрезок небольшой длины, проходящий через повреждённый участок родительской цепи; 3) далее специальная ДНК-полимераза высвобождается и синтез возобновляется обычной ДНК-полимеразой.

В клетках млекопитающих, бактерий и дрожжей функции специальной полимеразы выполняют разные белки. Так, в клетках млекопитающих белки семейства γ являются наиболее хорошо изученными полимеразми этого типа, однако, эти ферменты не участвуют в репарации поперечных сшивок. В *E. coli* функции синтеза на повреждённой матрице выполняет ДНК-полимераза II, а в дрожжах Rev3 и Rev7 формируют гетеродимер, представляющий собой полимеразу ζ , которая является членом В-семейства ДНК-полимераз [8].

Репарация кросс-сшивок в E.coli

Как показали исследования, процесс репарации поперечных сшивок является сложным и многостадийным. В основных работах по изучению механизмов репарации кросс-сшитой ДНК в клетках бактерий, дрожжей и млекопитающих, использовались дуплексы, содержащие поперечные сшивки, образованные 8-метилпсораленом, митомицином С или азотистым ипритом. Двухцепочечные ДНК, сшитые другими реагентами, используются достаточно редко.

В отличие от эукариотических клеток, процесс репарации поперечных сшивок в клетках *E. coli* изучен достаточно хорошо [5]. Он может включать комбинацию процессов эксцизионной репарации нуклеотидов и либо гомологичной рекомбинации, либо синтеза на повреждённой матрице. Показано, что в случае псораленовой сшивки эндонуклеазный комплекс $Urv(A)_2BC$ (так же обозначаемый $UrvABC$, подробно о функционировании ферментного комплекса см. [107]) сперва делает два разреза в одной из цепей ДНК с фурановой стороны поперечной сшивки, в результате чего получается короткий олигонуклеотид, ковалентно присоединённый к другой цепи ДНК через псораленовый мостик (рис. 5а). В результате 5'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы I ($Pol I$), неспособной синтезировать на этой матрице, удаляется небольшой участок около указанного олигонуклеотида, затем белок $RecA$ олигомеризуется на полученном однонитчатом участке, присоединяясь в направлении 5'–3' и образуя спиралевидную белковую нить. Участок, содержащий поперечную сшивку, помещается в эту нить. Гомологичное спаривание двух молекул ДНК приводит к образованию ДНК-гетеродуплекса с трёхцепочечным участком. Таким образом, обмен цепями, облегчаемый $RecA$, начинается со стороны одноцепочечного участка и продолжается в направлении образования олигомерной нити. Далее $Pol I$ синтезирует новую цепь на основе донорной цепи ДНК в направлении 3'–5', после чего $Urv(A)_2BC$ разрезает повреждённую цепь и поперечная сшивка удаляется в виде ковалентно-связанного олигонуклеотидного дуплекса, а ДНК-полимераза завершает процесс, достраивая образовавшийся пробел в одной из реципиентных цепей.

Биохимические и генетические эксперименты на примере репарации ипритной сшивки показали также существование альтернативного пути устранения поперечной связи, реализуемого в отсутствие доступной гомологичной ДНК или в клетках *E. coli*, дефицитных по синтезу белка $RecA$ [108]. Этот способ представлен на рис. 5б. На первой стадии белковый комплекс $Urv(A)_2BC$ осуществляет гидролиз фосфодиэфирных связей с обоих концов сайта сшивки, а полученный

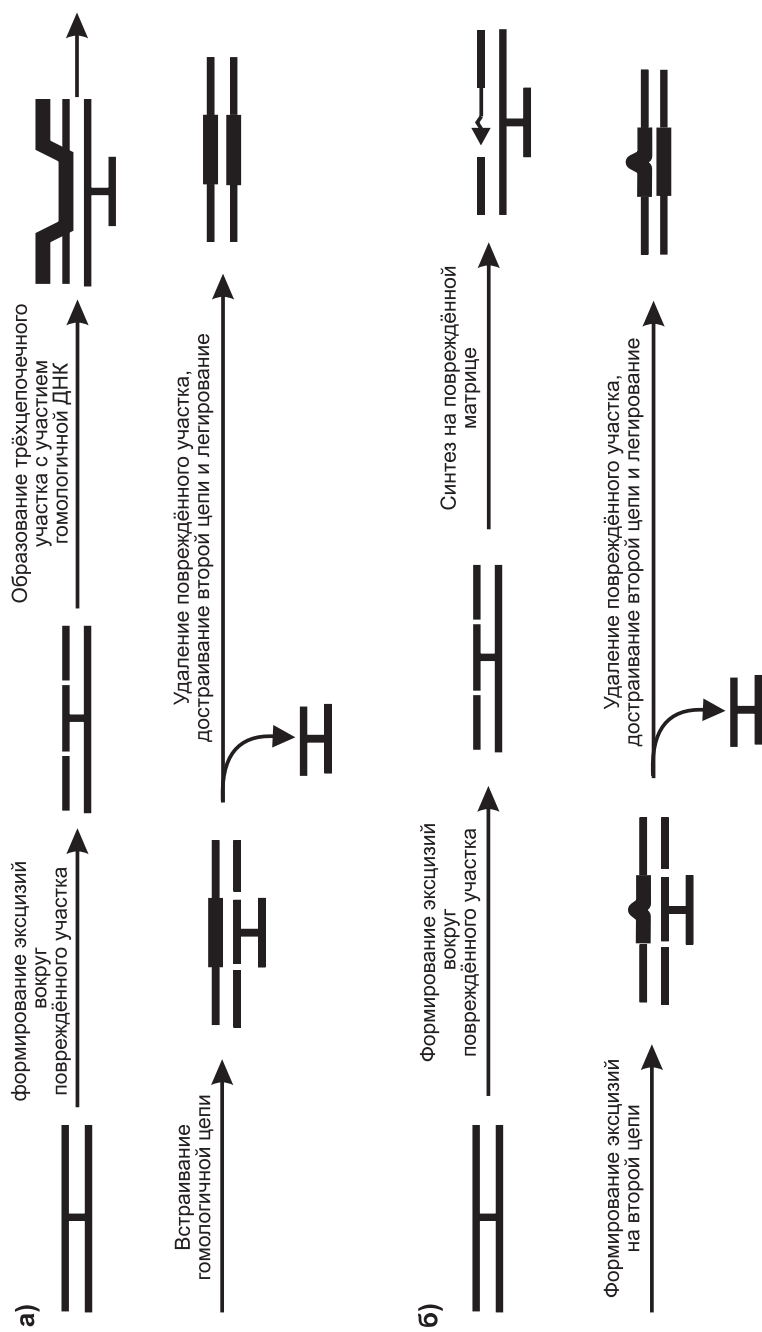


Рис. 5. Способы репарации поперечных сшивок в *E. coli*, включающие стадии гомологичной рекомбинации (а) и синтеза на повреждённой матрице (б)

пробел далее заполняется ДНК-полимеразой β . Затем $Urg(A)_2BC$ образует разрывы во второй цепи, сшитый олигонуклеотидный дуплекс удаляется и пробел заполняется ДНК-полимеразой I.

Кроме описанных выше основных белков репарационного аппарата бактериальных клеток, в устранении поперечных сшивок могут принимать участие и другие белки, такие как RecB, C, D, F, G, O, R. Так, RecFOR облегчает присоединение RecA к ДНК и ускоряет гомологичное спаривание двух молекул ДНК, а RecABC необходим тогда, когда в процессе репарации поперечно-сшитой ДНК образуются разрывы двойной спирали (что в свою очередь может являться следствием действия нуклеаз или чаще всего происходит при блокировке продвижения репликативной вилки при наличии поперечной связи). Белок RecG или RuvABC ответственны за разделение рекомбинационных промежуточных структур [5].

Репарация поперечных связей в клетках эукариот

В эукариотических клетках процесс репарации является намного более сложным, и включает множество белков. Это сильно затрудняет исследования тех механизмов, которые в нём задействованы. Дело осложняется ещё и тем, что некоторые белки, вовлечённые в эти процессы, помимо своего основного назначения выполняют несколько других функций на разных стадиях процесса. Тем не менее, хотя точные механизмы репарации поперечных связей до сих пор не установлены, за последние годы накоплен большой экспериментальный и теоретический материал об этих процессах и их участниках. В обзорах [5, 6, 8] обобщены литературные данные по исследованию процессов репарации в клетках дрожжей и млекопитающих, а также приведены все известные белки-участники и их функции.

В клетках наиболее изученного штамма почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* функции эндонуклеаз, осуществляющих эксцизионную стадию процесса репарации, выполняют в основном продукты генов *RAD1-4*, *RAD10*, *RAD14*, *RAD25* при этом белки Rad1 и Rad10 вместе составляют эндонуклеазный комплекс, разрезающий цепь ДНК со стороны 5'-конца, тогда как Rad2 разрезает цепь ДНК со стороны 3'-конца. Хеликазы Rad3 и Rad25 осуществляют локальное расплетание двойной спирали в месте работы нуклеаз.

Как и в клетках бактерий, в клетках дрожжей основным этапом репарации является либо гомологичная рекомбинация, либо синтез на повреждённой матрице. В случае репарации гомологичной рекомбинацией ключевыми участниками являются продукты генов *RAD51*, *RAD52* и *RAD54* [5], а также регуляторные элементы (подробно см. [109]).

Другой процесс, синтез на повреждённой матрице, находится под контролем продуктов генов *RAD6* и *RAD18*, которые осуществляют свою регуляторную функцию посредством модификации ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) (убиквитинирования лизина в положении 164), задействованным как в процессе репликации, так и при репарации повреждений ДНК [110]. Он является вспомогательным фактором ДНК-полимеразы δ (основной ДНК-полимеразы эукариотических клеток) и, взаимодействуя с ней, существенно увеличивает её активность. При необходимости PCNA модифицируется комплексом Rad6–Rad18 и далее начинают действовать ДНК-полимераза ζ и/или η (Pol ζ и/или Pol η), способные к синтезу на повреждённой матрице [8].

Многочисленные данные свидетельствуют также о том, что, кроме вышеуказанных генов, в репарации поперечных сшивок принимают участие гены *PSO* («psoralen sensitive»). Эта группа на сегодняшний день включает 10 генов, известных как *PSO1-10*. Существование этих генов было впервые обнаружено около двух десятилетий назад, когда был получен *pso1* мутантный штамм *S. Cerevisiae*, проявляющий повышенную чувствительность к псоралену [111]. В дальнейшем было показано, что *PSO1* ген является аллельным к *REV3* (кодирует каталитическую субъединицу полимеразы ζ), и таким образом, участвует в процессах пострепликативной репарации. Продукт гена *PSO2* участвует в репарации поперечных связей посредством негомологичного сращивания концов. Этот способ репарации также используется клеткой при устранении поперечной сшивки, но в меньшей степени, чем репарация путем гомологичной рекомбинации (рис. 6а). При блокировке продвижения полимеразного комплекса в присутствии поперечной сшивки фермент топоизомераза I, основная функция которого состоит в предотвращении накопления положительных супервитков при репликации, осуществляет образование крестовидных ДНК-структур по обе стороны от участка с поперечной сшивкой, особенно в присутствии полиндромных последовательностей. Далее ферментный комплекс Mre11p–Rad50p–Xrs2p осуществляет гидролиз фосфодиэфирных связей в одноцепочечных районах крестообразных участков двух цепей, что приводит к образованию шпилек. Эти структуры затем расщепляются при участии продукта гена *PSO2*, поперечно-сшитый двухцепочечный участок удаляется и далее происходит обработка и последующее лигирование концов полученного разрыва двойной спирали с участием ДНК-лигазы IV и Xrcc4.

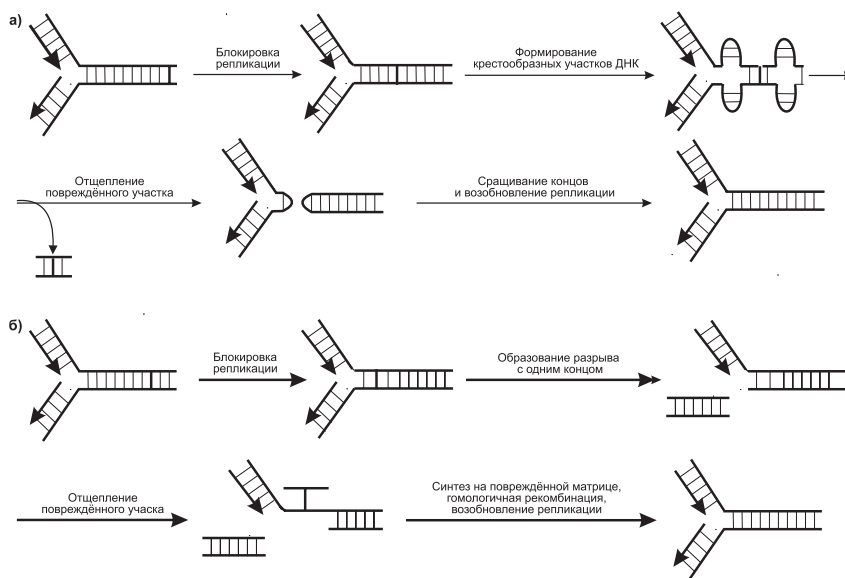


Рис. 6. Репарация кросс-сшивок в клетках млекопитающих. (а) Механизм репарации поперечно-сшитой ДНК, включающий нехомологичное сращивание концов; (б) основной путь репарации кросс-сшивков.

Следует также отметить, что непосредственно в клеточные ответы на повреждения ДНК вовлечены только восемь представителей продуктов генов группы *PSO*, тогда как *Pso6* и *Pso7* не относятся к процессам, связанным с метаболизмом нуклеиновых кислот (подробно см. [112]).

В клетках млекопитающих и человека устранение поперечной сшивки в двухцепочечной ДНК происходит по тем же принципам, но на гораздо более сложном уровне. Ряд генов, вовлечённых в процессы репарации поперечных связей в клетках млекопитающих и человека, таких как *RAD6*, *RAD18*, *RAD54*, *SNM1*, *REV3* и *REV7*, были определены по гомологичным последовательностям этих генов у клеток дрожжей. В то же время, многие белки репарационного аппарата дрожжей (*Rad6*, *Rad23*, *Rad30*, *Rad51* и *Snm1*) имеют до нескольких гомологов в клетках млекопитающих. Необходимо подчеркнуть, что из-за сложной упаковки генома млекопитающих всё большую роль играет регуляция процессов, связанных с распознаванием повреждений ДНК и формированием клеточных ответов на уровне макроструктуры хроматина (например, образование разрывов двойных спиралей вызывает фосфорилирование гистона H2AX, что

широко используется в качестве маркера указанных повреждений [113]). Наряду с этим возрастает роль факторов, выполняющих топоизомеразную и геликазную функции, некоторые из которых многофункциональны [114]. Все указанные факторы сильно усложняют изучение механизмов репарации поперечных сшивок в клетках млекопитающих и человека.

Основными эндонуклеазами, участвующими в репарации поперечных сшивок в клетках млекопитающих, являются XPG и ERCC1-XPF, которые осуществляют гидролиз фосфодиэфирных связей со стороны ближе к 3'- и 5'-концу, соответственно [5]. Ген *XPG* является гомологом дрожжевого *RAD2*, тогда как *ERCC1* и *XPF* – *RAD10* и *RAD1*, соответственно. На стадии гомологичной рекомбинации в основном задействованы белки RAD51, RAD52 и RAD54. Бергстрал и Секельский [115] предполагают, что нуклеаза ERCC1-XPF также принимает участие на стадии гомологичной рекомбинации, опосредуя вместе с другими белками разделение промежуточных рекомбинантных структур. При осуществлении синтеза на повреждённой матрице ключевыми участниками являются полимеразы ζ , η , k [116, 117], Rev и i , а также продукты уже упомянутых ранее генов *RAD6* и *RAD18* [8]. В работе [118] сообщается об участии в синтезе на повреждённой матрице в клетках человека полимеразы N, синтезная биологическая роль которой ещё не известна.

В ходе исследований клеточного ответа на поперечно сшитую ДНК было обнаружено, что клетки, мутантные по определённым генам, не относящимся к основным репарационным процессам, проявляют повышенную чувствительность к кросс-сшивающим агентам. При этом указанные мутации вызывают так называемую анемию Фанкони, которая выражается в синдроме недостаточности костного мозга. В дальнейшем, в ходе различных экспериментов на мутантных линиях было выявлено более 10 генов, продукты которых играют большую роль в узнавании блокировки репликативной вилки и формированию клеточного ответа [119]. Продукты этих генов в основном включают белки с общим названием FANC и некоторые другие, которые играют большую роль в процессе репарации поперечных сшивок. Этот процесс реализуется преимущественно в фазе S клеточного цикла и протекает следующим образом. Блокированная репликативная вилка узнаётся независимо белком FANCM и комплексом FANCD2/FANC1. Далее происходит ассоциация комплекса, состоящего из белков FANCA, B, C, E, F, G, L, M, FAAP24 и FAAP100. В выполненной недавно работе [120] было показано, что этот белковый комплекс существует на протяжении всего клеточного цикла и его ассоциация

с различными участками хроматина регулируется в зависимости от наличия повреждений в ДНК и фазы клеточного цикла [121]. Далее включается взаимодействие этого комплекса с FANCM и убиквитинирование FANCD2/FANCI при опосредовании UBE2T. Затем FANCM с участием FANCD2 создают субстрат для эндонуклеаз Mus81–Eme1 и ERCC1–XPF, последовательное действие которых вызывает отщепление одной из дочерних цепей от родительской. При этом образуется разрыв двойной спирали, а затем идёт образование разрыва в одной из нитей родительской цепи недалеко от места поперечной сшивки. Далее происходит синтез на повреждённой матрице для заделки образовавшейся брешы. FANCD2 способствует связыванию с разрывом двойной спирали белков гомологичной рекомбинации, которые и завершают процесс репарации (**рис 5д**).

Таким образом ответ клетки на поперечно-сшитую ДНК реализуется в основном при протекании процессов транскрипции и репликации из-за невозможности дальнейшего продвижения соответствующих ферментных комплексов вдоль цепи. Недавние исследования показали, что активация репарационного механизма также может происходить и вне зависимости от указанных процессов по причине локального искажения структуры ДНК в месте поперечной сшивки [122]. В этой работе были использованы модифицированные биотин-ом радиоактивно меченные олигонуклеотидные дуплексы, содержащие сшивки различной природы. Среди них алкильные сшивки N⁴C-этил-N⁴C в C·C ошибке спаривания (далее обозначена как C–C) и в последовательностях CG и GC (CG, GC). Также использовались дуплексы, содержащие N³T-этил-N³T в T·T ошибке спаривания (T–T), и сшивку, образованную 4'-амино-4,5',8-триметилпсораленом, в последовательности TA (TA). При этом самые большие отклонения от В-формы ДНК наблюдались в случае GC (нарушение спаривания оснований у двух нуклеотидов с каждой стороны от места сшивки), тогда как в CG последовательности диметиленовая сшивка практически не вызывает локального искажения двойной спирали, так же как и T–T. Сшивка C–C приводит к среднему по сравнению с CG и GC отклонению от В-формы. Указанные влияния ковалентных сшивок на структуру дуплексов находились в согласии с термодинамическими данными. Так, этильная сшивка двух цитозинов в CG последовательности и в C–C ошибке спаривания приводила к повышению температуры плавления дуплекса на 49°C и 25°C, соответственно, тогда как GC-сшивка заметно снижала устойчивость дуплекса, о чём свидетельствовали падения температуры плавления на 10°C. Таким образом, по степени уменьшения искажения двойной

спирали сшивки можно расположить в следующем порядке: *GC*, *C–C*, *TA* и оказывающие примерно одинаковое влияние – *CG* и *T–T*.

Исследования, проведённые на клетках *HeLa* и *AA8*, показали, что процесс репарации этих сшивок может сопровождаться либо образованием по одной эксцизии со стороны 5' и 3' концов от места сшивки, либо двух эксцизий со стороны 5' конца на небольшом расстоянии друг от друга. Основным продуктом в конечном счёте являлся одноцепочечный олигонуклеотид, содержащий остаток поперечной сшивки в виде ковалентно присоединённого нуклеотида. Следует отметить, что образование эксцизий с двух сторон от участка поперечной сшивки происходило без участия ферментов эксцизионной репарации, что было показано при использовании дефицитных по их синтезу линий клеток. При инкубировании сшитых дуплексов с указанными клетками выяснилось, что спустя 1 час в случае двухцепочечного олигонуклеотида с сшивкой в области *GC* последовательности 6% сшитого дуплекса превращается в вышеуказанный одноцепочечный продукт, тогда как в случае *CG* эта цифра составляет только 0,7%. Для *C–C* сшивки и для псораленовой сшивки эти значения составили 2,6% и 1,9%, соответственно. Полученные данные указывают на то, что степень искажения дуплекса на участке поперечной связи влияет на узнавание повреждения ферментами репарации.

В более поздней работе [123] те же авторы сообщают об изучении процесса синтеза на повреждённой матрице при использовании указанных выше сшитых дуплексов и клеток, не содержащих сестринских хроматид. Кроме вышеперечисленных, был использован дуплекс со сшивкой N^1I -этил- N^3T в *I–T* ошибке спаривания (*I–T*). Оказалось, что сшивки *GC*, *CG* и *C–C* эффективно репарировались, а сшивки *T–T* и *I–T* – блокировали репарацию. По мнению авторов указанное явление связано с тем, что в случае N^4C -этил- N^4C фрагмента этильный мостик находится вне зоны гетероцикла, которая отвечает за образование водородных связей, а в *T–T* и *I–T* возможность образования водородных связей блокирована. Таким образом при репарации первоначально образующегося одонитчатого олигонуклеотида, содержащего остаток сшивки, в случае N^4C -этил- N^4C фрагмента соответствующая ДНК-полимераза может осуществлять синтез на повреждённой матрице, т. к. существует возможность спаривания оснований, тогда как остатки N^3T -этил- N^3T и N^1I -этил- N^3T такой возможности не дают.

В настоящее время большое развитие получила область исследований, связанная с направленным воздействием на участников

клеточного ответа на повреждения ДНК в целях противоопухолевой терапии [см. обзоры 7, 124–126]. Исследование белков и белковых систем, вовлечённых в процессы репарации ковалентных сшивок, а также важность выполняемых ими функций, позволяет разрабатывать противоопухолевые препараты, которые направлены на их ингибирование и исключение из процесса. Таким образом можно либо полностью остановить, либо сильно затормозить репарирование ковалентных сшивок в ДНК. Применение этих препаратов в сочетании с кросс-сшивающими агентами может существенно увеличить эффективность последних и следовательно, снизить дозу для достижения аналогичного терапевтического эффекта. В качестве простого примера подобного рода стратегии можно привести применение сульфаниламидных препаратов в комплексе с триметопримом [127].

Одними из белков-мишеней подобного типа в противоопухолевой химиотерапии могут служить репарационные ДНК-геликазы, участвующие на многих стадиях и в разных типах процесса репарации [114]. Многие из них относятся к RecQ семейству геликаз. Мутации этих ферментов могут служить причиной быстрого старения, геномной нестабильности и повышенного риска возникновения опухолей [128]. Направленное ингибирование таких геликаз может существенно повысить эффективность лечения.

Методы изучения процессов репарации

Исследование механизмов репарационных процессов в клетках различных организмов, как правило, основано на применении ДНК-дуплексов с поперечными сшивками разной природы и клеток различных линий, мутантных по тем или иным генам, продукты которых предположительно принимают участие в различных способах репарации. [см. обзоры 8, 129, 130].

Как уже упоминалось выше, даже при использовании высокоспецифичных поперечно-сшивающих агентов невозможно добиться точной локализации ковалентной сшивки, во-первых потому, что участки специфичности реагента могут находиться в любом месте генома, и во-вторых вследствие малой доли поперечных связей по сравнению с другими продуктами взаимодействия с ДНК. В связи с этим для изучения клеточного ответа на поперечно-сшитую ДНК в основном используются плазмиды [131] и олигонуклеотидные дуплексы [123], содержащие ковалентную связь между цепями в определённом месте.

Современные флуоресцентные методы анализа позволяют наблюдать процессы репарации ДНК в реальном времени. К ним относятся

метод восстановления флуоресценции после фотоотбеливания и затухания флуоресценции в обесцвеченных изображениях [132, 133]. Применение этих методов основано на использовании конъюгатов флуоресцентных белков с исследуемыми белками. При этом фотоотбеливанием называют фотоиндуцированное изменение флуорофора, которое ведёт к исчезновению флуоресценции, и затем спустя какое-то время она восстанавливается. В методе восстановления флуоресценции после фотоотбеливания определённый участок клетки интенсивно облучается светом, после чего измеряется интенсивность флуоресценции до облучения и после ее восстановления и по их соотношению судят о подвижности исследуемого фактора, «меченного» флуоресцентным белком. В то же время этот метод помогает определить скорость миграции молекул в освещённую область, что при известных диффузионных константах молекул определённого размера позволяет определить мигрируют ли они отдельно или в составе различных комплексов. Используется также метод, при котором небольшой участок клетки постоянно подвергается освещению, и постоянный контроль падения уровня флуоресценции в области около освещаемого участка позволяет судить о скорости перемещения исследуемого белка через него. К флуоресцентным методам анализа относится и флуоресцентный резонансный перенос энергии, с помощью которого по характерным спектральным изменениям определяют взаимодействия различных биомолекул между собой [134]. Флуоресцентная микроскопия высокого разрешения позволяет наблюдать различные процессы непосредственно в живых клетках, а также дает возможность обойти многие ограничения обычной флуоресцентной микроскопии [135].

Кроме вышеуказанных методов, в исследовании репарационных процессов и прочих клеточных ответов широко используется атомно-силовая микроскопия, которая позволяет наблюдать трёхмерную структуру и конформационные изменения биомолекул в нанометровом масштабе *in vitro* в условиях, близких к физиологическим [136]. В частности, этот метод был использован для изучения конформационных изменений комплекса Mre11/Rad50/Nbs1, участвующего в распознавании разрывов двойной спирали, при связывании с ДНК-субстратом [137]. Для получения информации о пространственном строении белков, также используются рентгеноструктурный анализ, ЯМР спектроскопия и электронная микроскопия [138]. Они широко применяются для изучения различных участков, ответственных за белок-белок и белок-ДНК взаимодействия.

В то время, как восстановление флуоресценции после фотоотбеливания и затухание флуоресценции в обесцвеченных изображениях могут применяться для наблюдения процессов репарации в реальном времени внутри клетки, другие методы исследований требуют выделения репарационных белков и промежуточных комплексов из клеточного лизата. Для этой цели короткий олигонуклеотид, содержащий в определённом участке монопроизводное поперечно-сшивающего агента, гибридизуют с одноцепочечной плазмидой. Далее она достраивается до двухцепочечной с помощью ДНК-полимеразы Т7 и лигируется Т4 ДНК-лигазой. После этого следует расщепление рестриктазой по сайтам, находящимся на некотором расстоянии по обе стороны от повреждённого участка. Полученный двухцепочечный фрагмент ДНК модифицируется биотином с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I и соответствующего нуклеозидтрифосфата, содержащего биотин, а затем иммобилизуется на стрептовидин-содержащем магнитном микроносителе. Эта ДНК-конструкция была использована в качестве аффинной ловушки для выделения белков репарационных систем [129].

АПОПТОТИЧЕСКАЯ ГИБЕЛЬ КЛЕТКИ

Апоптоз – явление программируемой клеточной смерти, сопровождаемой набором характерных цитологических признаков (маркеров апоптоза) и молекулярных процессов, имеющих различия у одноклеточных и многоклеточных организмов [10]. От другого вида клеточной смерти, некроза, его отличает ряд морфологических и биохимических особенностей, в частности отделение клеток от внеклеточного матрикса, конденсация ядра, сморщивание цитоплазматической мембраны и, в итоге, образование апоптозных телец – мембранных пузырьков с клеточным содержимым, поглощаемых впоследствии макрофагами. При апоптозе клетка как бы подготавливает своё последующее фагоцитирование без развития воспалительной реакции, как это происходит в случае некроза. Характерным признаком апоптоза является фрагментация ДНК, которая происходит не хаотично, а формирует так называемую «апоптотическую лестницу». Она представляет собой набор фрагментов ДНК, имеющих разную длину, но эта длина кратна примерно 200 нуклеотидам, так как эти фрагменты получаются в результате межнуклеосомной фрагментации генома различными эндонуклеазами.[9]. Развитие апоптоза представляет собой очень сложный и до конца не изученный процесс. В связи с этим в настоящем обзоре будут рассмотрены лишь некоторые участники апоптотического процесса, достаточно подробно и полно активация

апоптоза и цепи передачи апоптотических сигналов рассмотрены в обзорах [10–13]. В биохимическом аспекте в апоптозе выделяют 4 основных компонента: 1) Cys–Asp-протеиназы или каспазы, 2) так называемые рецепторы смерти на поверхности клетки, через которые идёт активация апоптоза определёнными лигандами, 3) митохондрии и входящий в них цитохром *c* и 4) специальные про- и антиапоптотические белки [139].

Активация апоптоза может происходить в результате как внешних воздействий, так и эндогенной активации апоптотического каскада. В экзогенной активации участвуют, например, определённые лиганды (такие как FasL), которые присоединяясь к специфическим рецепторам на поверхности клетки (Fas/CD95), запускают серию процессов, приводящих в конечном итоге к активации протео- и нуклеолитических ферментов. В этом случае может идти прямая активация каспазного каскада через каспазу-8, либо передача сигнала на митохондрии, в результате чего происходит дальнейшее развитие апоптотического процесса. Эндогенными индукторами апоптоза могут служить различные внутриклеточные повреждения, в частности блокированная репликативная вилка и разрывы двойной спирали в ДНК. В этом случае идёт распознавание повреждения специальными белками, которые, как и в одном из вариантов развития событий в случае экзогенной активации, далее передают сигнал на митохондрии, выполняющие центральную роль в дальнейшей цепи апоптотических событий [13]. Из митохондрий высвобождаются различные проапоптотические белки, такие как AIF (апоптоз-индуцирующий фактор), SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases). Кроме этого в цитоплазму выходит цитохром *c*, который связываясь с Araf-1 (apoptotic protease activating factor-1) и формирует так называемый апоптосомный комплекс, инициирующий активацию каспазного каскада.

Основными белками, участвующими в реализации апоптотического сигнала, являются каспазы (семейство Cys–Asp-протеиназ). У млекопитающих класс каспаз представляют 14 белков, постоянно синтезируемых в виде проферментов, активирующихся при апоптозе. Их последовательная активация представляет собой каспазный каскад, который начинается с автокаталитической активации инициаторной каспазы, которая в свою очередь активирует эффекторные каспазы [140]. Последние расщепляют актиновые филаменты, ингибируют биосинтез белков и активируют ДНКазу.

Как уже упоминалось ранее, одной из причин развития апоптотического процесса служат повреждения ДНК. Поперечно-сшитые ДНК в данном случае также не являются исключением. На примере

сшивки, образованной цис-платиной, показано, что причиной активации апоптоза является блокировка транскрипции и репликации. При этом происходит активация белка SAPK (stress-activated protein kinase), который также известен как JNK (c-Jun N-terminal kinase), и p38-киназы, которые вызывают экспрессию гена AP-1 (activator protein-1). Последний вызывает синтез белка FAS-L, лиганда рецептора FAS. Далее при их взаимодействии происходит активация каспазного каскада. Было установлено, что указанная серия процессов начинается спустя 2–4 дня после обработки цис-платиной [141].

При наличии в ДНК поперечной сшивки происходит также блокирование репликативной вилки и образование разрывов двойных спиралей (разрывов с одним концом). Эти процессы способствуют активации других сигнальных систем. В распознавании указанных повреждений, как уже упоминалось ранее, участвуют белки АТМ и АТР. При активации этих белков происходит фосфорилирование ими белка NBS1, который далее активирует киназы chk1 и chk2. Это приводит к остановке клеточного цикла. Кроме того, АТМ фосфорилирует белок p53, который является одним из главных участников запуска апоптоза, вызванного повреждениями ДНК и таким образом представляет собой один из компонентов противоопухолевого надзора организма [142]. Этот белок действует сразу по нескольким направлениям, активируя ген *p21*, продукт которого в конечном счёте приводит к остановке клеточного цикла. Он также активирует ряд проапоптотических белков, а именно Bax (BCL-2 associated X-protein), PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) и FAS-рецептор. Белок Bax связывается с порином на внешней мембране митохондрий и вместе они образуют канал, способствующий выходу цитохрома *c*. PUMA в свою очередь связывает Bcl-2, что препятствует образованию комплекса последнего с Bax и тем самым ещё больше стимулирует выход цитохрома *c*. В совокупности все указанные события приводят к активации каспазного каскада.

Следует отметить, что кроме повышения концентрации p53, также происходит активация систем репарации теми же сигнальными белками АТМ/АТР. Предполагается, что конечная судьба клетки в итоге зависит от сложного соотношения всех указанных сигнальных и регуляторных элементов, несущих либо про-, либо и анти-апоптотную функции [4].

V. СШИТЫЕ РНК–РНК И ДНК–РНК ДУПЛЕКСЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Первые работы по поперечной сшивке РНК были опубликованы еще в конце 50-х годов XX века и были посвящены действию формальдегида, глиоксаля и кетоксаля на НК вируса табачной мозаики [143, 144]. Позже сшивки цепей РНК под действием формальдегида использовались при установлении вторичной структуры тРНК Баевым и сотр. [145]. Создание в молекуле РНК поперечных связей использовалось также при определении третичной структуры рибосомных РНК. Для получения сшитых рРНК применяли в основном УФ-индуцированное образование поперечных связей за счёт наличия в определённых участках цепи остатков 4-тиоуридина. Эти остатки вводились в цепь при реконструировании рибосомной РНК с помощью лигирования фрагментов, уже содержащих 4-тиоуридиновые звенья, или при микробиологическом синтезе РНК с использованием дефицитного по синтезу пиримидинов штамма *E. coli* в среде, содержащей 4-тиоуридин. Участки поперечных сшивок в РНК определялись как с помощью обратной транскрипции (в месте поперечной сшивки процесс останавливается и далее анализируется синтезированный олигомер), так и с использованием ферментативной дегградации РНКазой H в составе РНК/ДНК дуплекса с последующим анализом полученных фрагментов с помощью денатурирующего гель-электрофореза. Исходя из локализации и числа поперечных сшивок делался вывод о пространственной структуре рибосомной РНК, изучалась внутренняя динамика ее цепей в процессе функционирования рибосомы, механизмы взаимодействия РНК с другими макромолекулами и т.д. [146, 147]. Подобная методика применима для изучения и других типов РНК.

С помощью сшивки ДНК–РНК дуплексов можно добиться повышения эффективности антисенс-терапии [148, 149]. Метод состоит в том, что специфический антисенс-олигодезоксирибонуклеотид, несущий остаток 4,5',8-триметилпсоралена на конце или в середине цепи, подвергается гибридизации с РНК-мишенью с последующим облучением УФ-светом (366 нм). Образующаяся ковалентная сшивка резко повышает термостабильность гетеродуплекса, что в свою очередь приводит к существенному увеличению эффективности антисенс-терапии. В работе [148] были получены модифицированные антисенс-олигонуклеотиды типа «шпильки», содержащие псораленовый фрагмент на 5' конце. Они состояли из двух фрагментов, имеющих специфическую последовательность оснований, которые были соединены линкером, состоящим из 4

остатков тимидина. Эти олигонуклеотиды были комплементарны гомопуриновым участкам мРНК, кодирующим белок с-Мус, который вызывает быстрый рост клеток меланомы В16–F0. Снижение уровня экспрессии этого белка приводит к резкому замедлению роста клетки. Вышеупомянутые модифицированные олигонуклеотиды способны давать триплексные структуры с РНК-мишенью посредством образования одной своей частью Уотсон-Криковского дуплекса, который далее участвует в образовании Хугстиновского комплекса со второй частью олигонуклеотида (рис. 7а). Благодаря способности к образованию подобных структур эти олигонуклеотиды обладают высокой специфичностью, эффективностью и избирательностью. Эксперименты, проведенные на клетках В16–F0 с иммунодетекцией белка с-Мус показали очень низкий уровень его экспрессии после обработки такими модифицированными антисенс-олигонуклеотидами.

Другой подход состоит в использовании олигонуклеотидов, несущих псораленовый фрагмент, присоединенный к 2'-гидроксилу рибоаденозинового звена через метиленовый или метоксиметиленовый мостик (рис. 7б). Было обнаружено, что в случае олигонуклеотида, у которого 4,5',8-триметилпсорален присоединен через метиленовый мостик, эффективность образования ковалентной связи составляет порядка 35%, тогда как при использовании олигонуклеотида, имеющего связь с псораленом через метоксиметиленовый линкер, она достигает 75% [149].

Помимо описанных выше модифицированных олигонуклеотидов, для ингибирования экспрессии белков также используются олигонуклеозиды, мономеры которых соединены метилфосфонатными остатками. Эти соединения, при связывании с мРНК, способны блокировать присоединение рибосомы при инициации белкового синтеза или уже на стадии элонгации. Преимуществом этих олигомеров над обычными олигонуклеотидами является устойчивость к действию внутриклеточных нуклеаз. Также был получен олигонуклеозид с метилфосфонатными звеньями, содержащий остаток псоралена и продемонстрирована его способность ингибировать трансляцию мРНК, кодирующих α - и β -глобины кролика, *in vitro* [150]. Позднее, с помощью 12-звенного олигомера, несущего остаток псоралена на одном конце и родамина на другом, в опытах с клетками мышей L₉₄₉ была продемонстрирована потенциальная возможность использования этого олигонуклеотида для оценки эффективности антисенс-взаимодействий в живых клетках с помощью флуоресцентной микроскопии [151].

К упомянутым выше подходам для антисенс-терапии относится также использование пептидо-нуклеиновых кислот (ПНК). Благодаря нейтральности (они не несут отрицательного заряда при умеренных

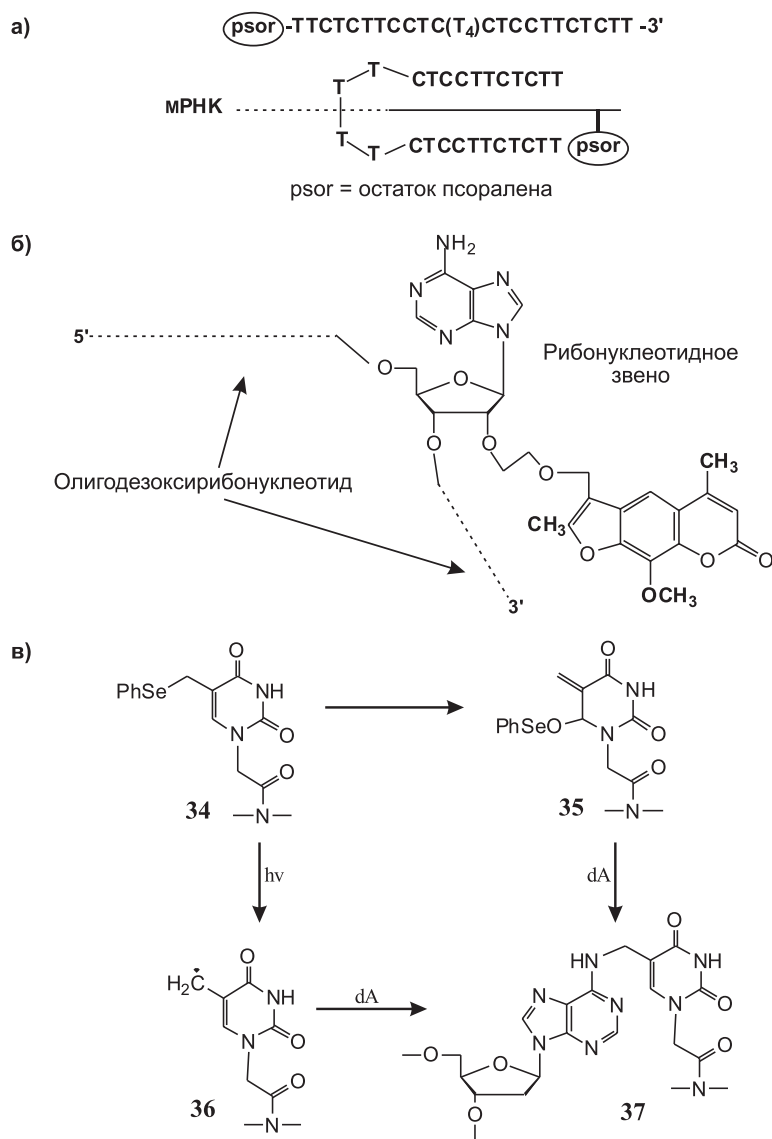


Рис. 7. Олигонуклеотиды, содержащие модификации, способные образовывать ковалентные сшивки с РНК. (а) Самокомплементарный олигонуклеотид, содержащий в середине цепи олиго-Т- линкер и остаток псоралена на 5'-конце, и схема его взаимодействия с целевой мРНК. (б) Олигонуклеотид, содержащий в середине цепи остаток аденозина, модифицированный по 2'-гидроксилу псораленом. (в) Образование поперечной связи в результате реакций тиминового звена в составе ПНК, содержащего фенилселенильную группу.

и высоких рН, т.к. не являются кислотами) константы связывания ПНК-лигандов с комплементарными цепями НК как правило выше констант связывания природных дуплексов НК. К их преимуществам следует также отнести невосприимчивость к внутриклеточным нуклеазам.

Недавние исследования показали, что для увеличения эффективности связывания с последовательностью-мишенью может быть использован подход, включающий создание поперечных связей в целевом гетеродуплексе, что достигается посредством введения различных модификаций в ПНК-олигомеры [152, 153]. Так, в работе [152] образование поперечной связи достигается введением тиминового остатка (34), содержащего фенилселенильную группу, с последующим окислением или облучением светом. В случае окисления происходит перегруппировка Димрота с образованием активного акцептора Михаэля (35), который алкилирует экзоциклическую аминогруппу аденина. Облучение светом приводит к образованию радикала (36), последующая реакция которого с остатком аденина даёт ковалентную сшивку (37). (рис. 7в).

В работе [154] показано, что кросс-сшивающие реагенты могут использоваться и для исследования механизма действия рибозимов. Самый короткий их представитель, пентарибонуклеотид ГАААСр, в присутствии ионов Mn^{2+} и поли-У подвергается гидролизу фосфодиэфирной связи между остатками гуанозина и аденозина с образованием гуанозин-2',3'-циклофосфата и тетрануклеотида АААСр [155]. Ковалентное связывание атомов N^7 пентануклеотида *транс*-диаминодихлорплатиной полностью ингибировало реакцию расщепления, тогда как моноаддукты по тем же атомам не влияли на скорость реакции. В результате был сделан вывод, что координация ионом марганца N^7 -атомов гуанозинового и аденозинового звеньев не является необходимым условием протекания реакции расщепления. В то же время блокирование остатков аденозина во втором или третьем положении цепи $Pt(NH_3)_3^{2+}$ сильно уменьшало скорость реакции расщепления, что свидетельствовало о необходимости комплексообразования 2-го остатка аденозина и 2'-ОН звена гуанозина с ионом Mn^{2+} при образовании активированного комплекса.

В общем следует отметить, что к настоящему времени по сравнению с большим количеством литературы, посвященной поперечно-сшитым ДНК, работ по исследованию и применению сшитых РНК–РНК и РНК–ДНК дуплексов сравнительно немного.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на сегодняшний день существует большое количество реагентов разной природы и специфичности, способных вызывать поперечные сшивки НК. Разработаны эффективные методы получения поперечно-сшитых дуплексов, которые используются в различных молекулярно-биологических исследованиях, в частности для изучения механизмов репарационных процессов в клетке, апоптоза, а также других происходящих в клетках процессов. Знания, полученные при исследовании репарационных механизмов и участвующих в них белковых систем используются в медицине и фармакологии, в частности они являются основой для разработки новых лекарственных форм противоопухолевых препаратов. Поиск соединений, обладающих кросс-сшивающей способностью, непрерывно продолжается.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rajski, S., Williams, R.* (1998) *Chem. Rev.*, **98**, 2723–2796.
2. *Stone, M., Cho, Y., Huang, H., Kin, H., Kozekov, I., Kozekova, A., Wang, H., Minro, I., Lloyd, R., Harris, T., Rizzo, C.* (2008) *Accounts Chem. Res.*, **41**, 793–804.
3. *Schärer, O.* (2005) *ChemBioChem.*, **6**, 27–32.
4. *Su, T.* (2006) *Annu Rev. Genet.*, **40**, 187–208.
5. *Dronkert, M., Kanaar, R.* (2001) *Mutation Research.*, **486**, 217–247.
6. *Lehoczy, P., McHugh, J., Chovanec, M.* (2007) *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**, 109–133.
7. *Lieberman, B.* (2008) *Current Med. Chem.*, **15**, 360–367.
8. *Noll, D., Mason, T., Miller, P.* (2006) *Chem. Rev.*, **106**, 277–301.
9. Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю.: Гибель клетки (апоптоз). 2001 М.: Медицина, 81–109.
10. *Blank, M., Shiloh, Y.* (2007) *Cell Cycle.*, **6**, 686–695.
11. *Strasser, A., OrConnor, L., Dixit, V.* (2000) *Ann. Rev. Biochem.*, **69**, 217–245.
12. *Roos, W., Kaina, B.* (2006) *Trends in Mol. Med.*, **12**, 440–450.
13. Гордеева А.В., Лабас Ю.А., Звягильская Р.А. (2004) *Биохимия*, **69**, 1301–1313.
14. Анципович С.И., Орецкая Т.С. (1998) *Успехи химии*, **67**, 274–393.
15. *Brookers, P.* (1990) *Mutation Res.*, **233**, 3–14.
16. *Ward K.* (1935) *J. Am. Chem. Soc.*, **57**, 914–916.
17. *Gilman A., Phillips F.S.* (1946) *Science*, **103**, 409–415.
18. *Rink, S., Solomon, M., Taylor, M., Rajur, S., McLaughlin, L., Hopkins, P.* (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 2551–2557.
19. *White, I., Suzanger, M., Mattocks, A., Bailey, E., Farmer, P., Connors, T.* (1989) *Carcinogenesis*, **10**, 2113–2118.
20. *Duan, J., Jiao, H., Kaizerman, J., Stanton, T., Evans, J., Lan, L., Lorente, G., Banica, M., Jung, D., Wang, J., Ma, H., Li, X., Yang, Z., Hoffman, R., Ammons, W., Hart, C., Matteucci, M.* (2008) *J. Med. Chem.*, **51**, 2412–2420.

21. Parker, L., Lacy, S., Farrugia, L., Evans, C., Robins, D., O'Hare, C., Hartley, J., Jaffar, M., Stratford, I. (2004) *J. Med. Chem.*, **47**, 5683–5689.
22. Kapuriya, N., Kapuriya, K., Dong, H., Zhang, X., Chou, T., Chen, Y., Lee, T., Lee, W., Tsai, T., Naliapara, Y., Su, T. (2009) *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**, 1264–1275.
23. Baguley, B. (1991) *Anti-Cancer Drug Design*, **6**, 1–35.
24. Chen, C., Lin, Y., Zhang, X., Chou, T., Tsai, T., Kapuriya, N., Kakadiya, R., Su, T. (2009) *European Journal of Medicinal Chemistry*, **44**, 3056–3059.
25. Hendry, J., Rose, F., Homer, R., Roades, A. (1948) *Br. J. Pharmacol.*, **6**, 235–255.
26. Millard, J., White, M. (1993) *Biochemistry*, **32**, 2120–2124.
27. Millard, J., Hanly, T., Murphy, K., Tretyakova, N. (2006) *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 16–19.
28. LePla, R., Landreau, C., Shipman, M., Hartley, J., Jones, G. (2005) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 2861–2864.
29. Finerty, M., Bingham, J., Hartley, J., Shipman, M. (2009) *Tetrahedron Lett.*, **50**, 3648–3650.
30. Coley, H. (1997) *Gen. Pharmac.*, **28**, 177–182.
31. Jackson, C., Crabb, T., Gibson, M., Godfrey, R., Saunders, R., Thurston, D. (1991) *J. Pharm. Sci.*, **80**, 245–251.
32. Jackson, C., Hartley, J., Jenkins, T., Godfrey, R., Saunders, R., Thurston, D. (1991) *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 2091–2097.
33. Coley, H., Brooks, N., Phillips, D., Hewer, A., Jenkins, T., Jarman, M., Judson, I., (1995) *Biochem. Pharmac.*, **49**, 1203–1212.
34. Song, Y., Wang, P., Wu, J., Zhou, X., Zhang, X., Weng, L., Cao, X., Liang, F. (2006) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 1660–1664.
35. Weng, X., Ren, L., Weng, L., Huang, J., Zhu, S., Zhou, X., Weng, L. (2007) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 8020–8023.
36. Song, Z., Weng, X., Weng, L., Huang, J., Wang, X., Bai, M., Zhou, Y., Yang, G., Zhou, X. (2008) *Chemistry*, **14**, 5751–5754.
37. Ware, D., Wilson, W., Denny, W., Rickard, C. (1991) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1171–1173.
38. Dunham, S., Chifotides, H., Mikulski, S., Burr, A., Dunbar, K. (2005) *Biochemistry*, **44**, 996–1003.
39. Malinge, J., Pérez, C., Leng, M. (1994) *Nucleic Acids Res.*, **22**, 3834–3839.
40. Huang, H., Zhu, L., Reid, B., Drobny, G., Hopkins, P. (1995) *Science*, **270**, 1842–1845.
41. Jung, Y., Lippard, S. (2007) *Chem. Rev.*, **107**, 1387–1407.
42. Heringova, P., Woods, J., Mackay, F., Kasparkova, J., Sadler, P., Brabec, V., (2006) *J. Med. Chem.*, **49**, 7792–7798.
43. Chopard, C., Lenoir, C., Rizzato, S., Vidal, M., Arpalahti, J., Gabison, L., Albinati, A., Garbay, C., Kozelka, J. (2008) *Inorg. Chem.*, **47**, 9701–9705.
44. Qu, Y., Scarsdale, N., Tran, M., Farrell, N., (2004) *Journal of Inorganic Biochemistry*, **98**, 1585–1590.
45. Ciniino, G., Gamper, H., Isaacs, S., Hearst, J. (1985) *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 1151–1193.
46. Hwang, G., Kim, J., Choi, B. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **219**, 191–197.
47. Via, L., González-Gómez, J., Pérez-Montoto, L., Santana, L., Uriarte, E., Marciani, S., Gia, M., Gia, O. (2009) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **19**, 2874–2876.
48. Hata, T., Sano, Y., Sugawara, R., Matsumae, A., Kanamori, K., Shima, T., Hoshi, T. (1956) *J. Antibiot. Ser. A.*, **9**, 141–146.

49. Wakagi, S., Marumo, H., Tomoka, K., Shimizu, G., Kata, E., Kamada, H., Kudo, S., Fugimoto, Y. (1958) *Antibiot. Chemother.*, **8**, 228–238.
50. Webb, J., Cosulich, D., Mowat, J., Patrick, J., Broscha, R., Meyer, W., Williams, R., Wolf, C., Fulmor, W., Pidacks, C. (1962) *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3185–3187.
51. Danishefsky, S., Schkeryantz, J. (1995) *Synlett.*, 475–490.
52. Tomasz, M., Lifman, R., Chowdary, D., Pawlak, J., Verdine, G., Nakanishi, K. (1987) *Science*, **235**, 1204–1208.
53. Rink, S., Lipman, R., Alley, S., Hopkins, P., Tomasz, M. (1996) *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 382–389.
54. Norman, D., Live, D., Sastry, M., Lipman, R., Hingerty, B., Tomasz, M., Broyde, S., Patel, D. (1990) *Biochemistry*, **29**, 2861–2875.
55. Adikesavan, A., Jaiswal, A. (2007) *Mol. Cancer Ther.*, **6**, 2719–2727.
56. He, Q., Maruenda, H., Tomasz, M. (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 9349–9350.
57. Manuel, M. (2009) *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 1663–1668.
58. Paz, M., Kumar, S., Glover, M., Waring, M., Tomasz, M. (2004) *J. Med. Chem.*, **47**, 3308–3319.
59. Na, Y., Li, V., Nakanishi, Y., Bastow, K., Kohn, H. (2001) *J. Med. Chem.*, **44**, 3453–3462.
60. Boger, D., Paianki, S. (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9318–9327.
61. Hadjivassileva, T., Stapleton, P., Thurston, D., Taylor, P. (2007) *Int. J. Antimic. Agents*, **29**, 672–678.
62. Brockmann, H., Bauer, K. (1950) *Naturwissenschaften*, **37**, 492–497.
63. Wang, A., Ughetto, G., Quigley, G., Rich, A. (1987) *Biochemistry*, **26**, 1152–1163.
64. Gao, Y., Liaw, Y., Li, Y., van der Marel, G., van Boom, J., Wang, A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4845–4849.
65. Leng, F., Savkur, R., Fokt, I., Przewloka, T., Priebe, W., Chaires, J. (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 4731–4738.
66. Taatjes, D., Gaudiano, G., Resing, K., Koch, T. (1997) *J. Med. Chem.*, **40**, 1276–1286.
67. Kato, S., Burke, P., Fenick, D., Taatjes, D., Bierbaum, V., Koch, T. (2000) *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 509–516.
68. Taatjea, D., Gaudiano, G., Koch, T. (1997) *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 953–961.
69. Zhang, H., Gao, Y., van der Marel, G., van Boom, J., Wang, A. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 10095–10101.
70. Fox, K., Webster, R., Phelps, R., Fokt, I., Priebe, W. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 3556–3566.
71. Portugal, J., Cashman, D., Trent, J., Ferrer-Miralies, N., Przewloka, T., Fokt, I., Priebe, W., Chaires, J. (2005) *J. Med. Chem.*, **48**, 8209–8219.
72. Fenick, D., Taatjes, D., Koch, T. (1997) *J. Med. Chem.*, **40**, 2452–2461.
73. Taatjes, D., Fenick, D., Koch, T. (1998) *J. Med. Chem.*, **41**, 1306–1314.
74. Koch, T., Barthel, B., Kalet, B., Rudnicki, D., Post, G., Burkhart, D. (2008) *Topics in Current Chemistry*, **283**, 141–170.
75. Caulfield, J., Wishnok, J., Tannenbaum, S. (2003) *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 571–574.
76. Jackson, C., Hartley, J., Jenkins, T., Godfrey, R., Saunders, R., Thurston, D. (1991) *Biochemical Pharmacology*, **42**, 2091–2097.
77. Edfeldt, N., Harwood, E., Sigurdson, S., Hopkins, P., Reid, B. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2785–2794.
78. Edfeldt, N., Harwood, E., Sigurdson, S., Hopkins, P., Reid, B. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2795–2801.

79. Swenson, M., Paranawithana, S., Miller, P., Kielkopf, C. (2007) *Biochemistry*, **46**, 4545–4553.
80. Diakos, C., Messerle, B., del Socorro Murdoch, P., Parkinson, J., Sadler, P., Fenton, R., Hambley, T. (2009) *Inorg. Chem.*, **48**, 3047–3056.
81. Candy Chen, H., Chen, Y. (2009) *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 1334–1341.
82. Козлов И. А., Ивановская М. Г., Кубарева Е. А., Волков Е. М. (1996) *Молекулярная биология*, **30**, 503.
83. Noll, D., Noronha, A., Wilds, C. Miller, P. (2004) *Frontiers in Bioscience*, **6**, 421–437.
84. Angelov, T., Guainazzi, A., Scharer, O. (2009) *Organic Lett.*, **11**, 661–664.
85. Dooley, P., Tsarouhtsis, D., Korbel, G., Nechev, L., Shearer, J., Zegar, I., Harris, C., Stone, M., Harris, T. (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1730–1739.
86. Wilds, J., Booth, J., Noronha, A. (2006) *Tetrahedron Lett.*, **47**, 9125–9128.
87. Colb, H., Finn, M., Sharpless, K. (2001) *Angew. Chem.*, **113**, 2056–2075.
88. Humenik M., Huang Y.W., Wang Y.R., Sprinzl M. (2007) *ChemBioChem.*, **8**, PP. 1103–1106.
89. Rozkiewicz, D., Gierlich, J., Burley, G., Gutmiedl, K., Garell, T., Ravoo, B., Reinhoudt, D. (2007) *ChemBioChem.* **8**, 1997 – 2002.
90. Seela, F., Sirivolu, V. (2007) *Helv. Chim. Acta*, **90**, 535–552.
91. Zoćalka, P., El-Sagheer, A., Brown, T. (2008) *ChemBioChem.*, **9**, 1280–1285.
92. Ефимов В.А., Аралов А.В., Федюнин С.В., Клыков В.Н., Чахмахчева О.Г. (2009) *Биоорган. химия*, **35**, 270–273.
93. Gates, K. (2009) *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 1747–1760.
94. Shrivastav, M., De Haro, L., Nickoloff, J. (2008) *Cell Research.*, **18**, 134–147.
95. Peng, X., Ghosh, A., Van Houten, B., Greenberg, M. (2010) *Biochemistry*, **49**, 11–19.
96. Skladanowski, A., Bozko, P. Sabisz, M. (2009) *Chem. Rev.*, **109**, 2951–2973.
97. Millau, J., Bastien, N., Drouin, R. (2009) *Mutation Research*, **681**, 118–133.
98. Лихачева А.С., Розачев В.А., Николлин В.П., Попова Н.А., Шилов А.Г., Себелева Т.Е., Стрункин Д.Н., Черных Е.Р., Гельфгат Е.Л., Богачев С.С., Шурдов М.А. (2008) *Вестник ВОГиС*, **12**, 426–473.
99. Konora, J. (1988) *Biochemical Pharmacology*, **37**, 2303–2309.
100. Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C., Gareval, H. (2002) *Mutat. Res.*, **511**, 145–178.
101. Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., Roos, W. (2007) *DNA Repair*, **6**, 1079–1099.
102. Reardon, J., Sancar, A. (2005) *Progress in Nucleic acid Research and Molecular Biology*, **79**, 183–235.
103. Verhage, R., Zeeman, A., Degroot, N., Gleig, F., Bang, D., vande Putte, P., Brouwer, J. (1994) *Mol Cell Biol.*, **14**, 6135–6142.
104. Shrivastav, M., De Haro, L., Nickoloff, J. (2008) *Cell Research*, **18**, 134–147.
105. Ohnishi, T., Mori, E., Takahashi, A. (2009) *Mutation Research*, **669**, 8–12.
106. Burma, S., Chen, B., Chen, D. (2006) *DNA Repair*, **5**, 1042–1048.
107. Truglio, J., Croteau, D., Van Houten, B., Kisker, C. (2006) *Chem. Rev.*, **106**, 233–252.
108. Berardini, M., Foster, P., Loecherer, E. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 2878–2882.
109. Kroghand, B., Symington, L. (2004) *Annu. Rev. Genet.*, **38**, 233–71.

110. Essers, J., Theil, A., Baldeyron, C., van Cappellen, W., Houtsmuller, A., Kanaar, Vermeulen, R. (2005) *Molecular and Cellular Biology*, 9350–9359.
111. Henriques J., Moustacchi, E. (1980) *Genetics*, **95**, 273–288.
112. Brendel, M., Bonatto, D., Strauss, M., Revers, L., Pungartnik, C., Saffi, J., Henriques, J. (2003) *Mutation Research*, **544**, 179–193.
113. Clingen, P., Wu, J., Miller, J., Mistry, N., Chin, F., Wynne, P., Prise, K., Hartley, J. (2008) *Biochemical Pharmacology*, **76**, 19–27.
114. Rigu, G., Robert, B. (2007) *Current Medicinal Chemistry*, **14**, 503–517.
115. Bergstralh, D., Sekelsky, J. (2008) *Trends in Genetics*, **24**, 70–76.
116. Minko, I., Harbut, M., Kozekov, I., Kozekova, A., Jakobs, P., Olson, S., Moses, R., Harris, T., Rizzo, C., Lloyd, R. (2008). *J. Biol. Chem.*, **283**, 17075–17082.
117. Woodgate, R. (1999). *Genes Dev.*, **13**, 2191–2195.
118. Zietlow, L., Smith, L., Bessho, M., Bessho, T. (2009) *Biochemistry*, **48**, 11817–11824.
119. de Winter, J., Joenje, H. (2009) *Mutation Research*, **668**, 11–19.
120. Alpi, A., Langevin, F., Mosedale, G., Machida, Y., Dutta, A. Patel, K. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 8421–8430.
121. Kim, J., Kee, Y., Gurtan, A., Andrea, A. (2008) *Blood*, **111**, 5215–5222.
122. Smeaton, M., Hlavin, E., Mason, T., Noronha, A., Wilds, C., Miller, P. (2008) *Biochemistry*, **47**, 9920–9930.
123. Smeaton, M., Hlavin, E., Noronha, A., Murphy, S. (2009) *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 1285–1297.
124. Ljungman, M. (2009) *Chem. Rev.*, **109**, 2929–2950.
125. Powell, S., Bindra, R. (2009) *DNA Repair*, **8**, 1153–1165.
126. Zhu, Y., Hu, J., Hu, Y., Liu, W. (2009) *Cancer Treatment Reviews*, **35**, 590–596.
127. Машковский М.Д. Лекарственные средства (пособие для врачей), часть 2. 1998 М: Медицина, 288–290.
128. Brosh, R. Bohr, V. (2007) *Nucleic Acids Research*, **35**, 7527–7544.
129. Feuerhahn, S., Eghy, J. (2008) *Trends in Genetics*, **24**, 467–474.
130. Nagy, Z., Soutoglou, E. (2009) *Trends in Cell Biology*, **19**, 617–629.
131. Ben-Yehoyada, M., Wang, L., Kozekov, I., Rizzo, C. Gottesman, M., Gautier, J. (2009) *Molecular Cell*, **35**, 704–715.
132. Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E., Kenworthy, A. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 444–456.
133. Shav-Tal, Y., Singer, R., Darzacq, X., (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 855–861.
134. Piston, D., Kremers, G., (2007) *Trends Biochem. Sci.*, **32**, 407–414.
135. Huang, B., Bates, M., Zhuang, X. (2009) *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 993–1016.
136. Silva, L. (2005) *Curr Protein Pept. Sci.*, **6**, 387–395.
137. Moreno-Herrero, F., de Jager, M., Dekker, N., Kanaar, R., Wyman, C., Dekker, C. (2005) *Nature*, **437**, 440–443.
138. Recuero-Checa, M., Doré, A., Arias-Palomo, E., Rivera-Calzada, A., Scheres, S., Maman, J., Pearl, L., Llorca, O. (2009) *DNA Repair*, **8**, 1380–1389.
139. Oleinick, N., Morris, R., Belichenko, I. (2002) *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1**, 1–21.
140. Salvesen, G., Dixit, V. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10964–10967.
141. Brozovic, A., Fritz, G., Christmann, M., Zisowsky, J., Jaehde, U., Osmak,

- M., Kaina, B.* (2004) International Journal of Cancer, **112**, 974–985.
142. *Lane D.* (1992) Nature, **358**, 15–16.
143. *Staehelin, M.* (1958) Biochim. Biophys. Acta, **29**, 410–417.
144. *Staehelin, M.* (1959) Biochim. Biophys. Acta, **31**, 448–454.
145. *Axelrod, V., Feldman, Y., Chuguev, I., Bayev, A.* (1969) Biochim. Biophys. Acta, **186**, 33–45.
146. *Juzumiene, D., Shapkina, T., Kirillov, S., Wollenzien, P.* (2001) Methods, **25**, 333–343.
147. *Nanda, K., Wollenzien, P.* (2004) Biochemistry, **43**, 8923–8934.
148. *Stewart, D., Thomas, S., Mayfield, C., Miller, D.* (2001) Nucleic Acids Res., **29**, 4052–4061.
149. *Higuchi, M., Sakamoto, T., Kobori, A., Murakami, A.* (2006) Nucleic Acids Symp. Ser., **50**, 301–302.
150. *Kean, J., Murakami, A., Blake, K., Cushman, C., Miller, P.* (1988) Biochemistry, **27**, 9113–9121.
151. *Thaden, J., Miller, P.* (1993) Bioconjugate Chem., **4**, 386–394.
152. *Kim, Y., Hong, I.* (2008) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **18**, 5054–5057.
153. *Gantchev, T., Girouard, S., Dodd, D., Wojciechowski, F., Hudson, R., Hunting, D.* (2009) Biochemistry, **48**, 7032–7044.
154. *Bombard, S., Kozelka, J., Favre, A., Chottard, J.* (1998) Eur. J. Biochem., **252**, 25–35.
155. *Kazakov, S., Altman, S.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 7939–7943.