

## КОФЕРМЕНТЫ И ЭВОЛЮЦИЯ МИРА РНК

© 2004 г. М. С. КРИЦКИЙ и Т. А. ТЕЛЕГИНА

*Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва*

I. Введение. II. Коферменты как структурные аналоги нуклеотидов. III. Фотокаталитические функции коферментов. IV. Фотосенсорные функции коферментов в белках. V. Коферменты в процессах предбиологической эволюции.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Согласно представлениям, сформировавшимся в 50–60 годы XX века, функции двух важнейших биополимеров – нуклеиновых кислот и белков – строго разграничены: за первыми закрепились роль хранителя генетической информации, а каталитическая функция была приписана исключительно белкам. Ввиду отсутствия экспериментально мотивированного ответа на вопрос о том, как сформировались в эволюции системы декодирования генетической информации нуклеиновых кислот в структурные параметры белков, проблема возникновения организмов, одновременно обладающих каталитическим и генетическим аппаратом, казалась неразрешимой. Возможность решения этой проблемы открывалась, если предположить, что на начальных этапах эволюции обе функции могли быть объединены в каком-либо одном классе биополимеров. Следует сказать, что, несмотря на экспериментальные свидетельства абиотической конденсации аминокислот в каталитически активные полимеры [35], неспособность полипептидов (в отличие от полинуклеотидов) реплицироваться с образованием комплементарных последовательностей не позволяла рассматривать белки в качестве хранителя и переносчика генетичес-

---

*Принятые сокращения:* ПНК – пептиднуклеиновая кислота; FMN – флавиномононуклеотид; NMN<sup>+</sup> – никотинамидмононуклеотид; TRP – триаминпирофосфат; NAD<sup>+</sup> – никотинамидадениндинуклеотид; NADP<sup>+</sup> – никотинамидадениндинуклеотид-3'-фосфат; FAD – флавинадениндинуклеотид; CoA – коэнзим А; NTP – никотинамидмононуклеозид-5'-трифосфат; NADPH – восстановленный никотинамидадениндинуклеотид-3'-фосфат; FADH<sub>2</sub> – дигидрофлавинадениндинуклеотид; MTHF – 5,10-метенилтетрагидрофолат.

*Адрес для корреспонденции:* mkritsky@inbi.ras.ru

Статья подготовлена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 25 «Проблема зарождения биосферы Земли и ее эволюции», а также грантов РФФИ 03-04-20006\_БНТС-а и РФФИ 04-04-49625-а.

кой информации. Значительно более плодотворной оказалась идея, высказанная К.Р. Вузом и несколько позже Л. Оргелем и окончательно сформулированная В. Гилбертом уже в 80-е годы. Согласно этой идее наличие каталитических функций у полинуклеотидов могло привести к формированию своеобразного «мира РНК» как основы эволюции первичной биосферы [24, 40, 89, 117]. Представления о существовании мира РНК исходят из предположения, что именно полинуклеотиды составляли химическую основу древнейших организмов, т.е. молекулы РНК функционировали как генетический материал и одновременно выполняли каталитические функции в отсутствие генетически упорядоченных белков.

Появление в 80-х годах прошлого столетия исследований, продемонстрировавших существование рибозимов, т.е. каталитически активных РНК, стало важным доводом в пользу этой гипотезы [69]. Оказалось, однако, что рибозимы современных организмов обладают весьма ограниченным диапазоном каталитических активностей, осуществляющих преимущественно реакции гидролиза и переноса фосфодиэфирных связей в самой РНК, а также в ДНК [97]. Представления о возможностях РНК катализа значительно расширились с развитием методов искусственного отбора и амплификации молекул из синтезированных хаотических последовательностей РНК [32, 99, 113]. Можно заметить, что методы SELEX (Selective Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), используемые для получения рибозимов с новыми каталитическими функциями, по существу воспроизводят принципы химической эволюции, естественно, с учетом того, что условия проведения современных экспериментов далеки от физико-химических условий, существовавших в эру предбиологической эволюции. Оказалось, что рибозимы, полученные в результате молекулярной селекции, катализируют образование полимерных цепей комплементарных материнским молекулам РНК [26, 31, 61, 93]. Они также способны катализировать реакции, имеющие прямое отношение к биосинтезу белка, например, перенос аминокислотных и пептидных радикалов и образование пептидной связи [56, 57, 76, 94, 108, 118, 119]. С этим хорошо согласуется тот факт, что рибосомная 23S РНК выполняет каталитическую функцию в биосинтезе белка и нельзя исключить, что именно полинуклеотидный катализатор обеспечивает пептидилтрансферазную активность современной рибосомы [88]. Эти результаты дают основание полагать, что каталитические активности, присущие полирибонуклеотидным молекулам, могли обеспечить развитие процессов репликации и трансляции в мире РНК. Исходя из широких возможностей полирибонуклеотидов как катализаторов процессов собственной

репликации, А.С. Спирин постулировал, что мир РНК мог представлять собой сообщество фазовообособленных систем – самодостаточных колоний РНК, развивающихся на твердом субстрате [107].

Реакции, катализируемые полинуклеотидами, не исчерпываются указанными выше процессами [14]. Рибозимы способны катализировать и некоторые другие химические реакции, характерные для обмена веществ. Однако попытки проанализировать возможность расширения круга каталитических процессов в ходе эволюции прото-РНК в направлении формирования метаболических систем, способных обеспечить организм энергией и веществом, сталкиваются с затруднениями. Дело в том, что целый ряд важных для метаболизма реакций, катализируемых ферментными белками, не катализируется рибозимами. Речь идет, в первую очередь, о редокс-реакциях, т.е. реакциях переноса электрона и водорода, лежащих в основе биоэнергетики всех организмов. Рибозимы же, выделенные из природных источников и полученные в результате селекции из хаотических наборов полирибонуклеотидных последовательностей, не содержат функциональных групп, обеспечивающих редокс-катализ в современных ферментах, и не способны катализировать эти реакции в отсутствие белковых катализаторов. Возникает вопрос, что же могло компенсировать этот пробел в ходе эволюции примитивных метаболических систем? Могли ли каталитические активности, жизненно необходимые для функционирования метаболизма, развиваться в рамках мира РНК до появления белков-ферментов с генетически заданной структурой? Нам кажется, что ответ на эти вопросы, можно получить, проанализировав, насколько далеко простираются в химическом отношении структурные границы мира РНК и возможно ли в рамках этого мира присутствие молекул и функциональных групп с высокой реакционной способностью, которые в комплексе со стандартными нуклеотидами смогли бы обеспечить достаточно широкий диапазон каталитических функций.

В данной статье предпринята попытка рассмотреть развивающиеся сегодня представления о том, что каталитический потенциал примитивных РНК мог быть существенно расширен за счет присоединения к их молекулам коферментных групп, особенно тех, которые обладают фотокаталитической активностью [65, 66]. Прежде всего, присоединение коферментных групп к полинуклеотидам могло обеспечить участие этих макромолекул в энергопреобразующих окислительно-восстановительных реакциях. Среди этих коферментов наибольшее внимание привлекают флавины, никотинамиды и птерины, проявляющие структурное сходство с рибонуклеотидами и, что существенно, отличающиеся высокой реакционной способ-

ностью возбужденных молекул. Недавнее открытие фотосенсорной функции флавинов и птеринов в ферментах и регуляторных белках современных организмов (см. раздел IV данной статьи) обусловило дополнительный интерес к роли фотохимических реакций коферментов в эволюции.

## II. КОФЕРМЕНТЫ КАК СТРУКТУРНЫЕ АНАЛОГИ НУКЛЕОТИДОВ

В состав всех современных РНК входят четыре нуклеотидных мономера – производных пурина или пиримидина. В них неизменно присутствует N-гликозидная связь основания с сахаром (D-рибофуранозой) и фосфодиэфирная связь между гидроксильными остатками рибозы в 5'- и 3'-положениях соседних мономеров. Вследствие инвариантности структуры рибонуклеиновых кислот и, как представляется, совершенного соответствия этой структуры их молекулярным функциям, она воспринимается сегодня как безальтернативная версия. Однако в свете эволюционных представлений логично рассматривать такую структуру современной РНК лишь как один из возможных вариантов, благополучно прошедший через сито естественного отбора, т.е. нельзя исключать, что на ранних этапах эволюции в примитивных полинуклеотидах могли присутствовать и другие мономеры и типы связей.

Взгляд на структуру современной РНК как на один из вариантов среди разнообразия структурных альтернатив находит подтверждение в исследованиях лаборатории А. Эшенмозера, показавших, что для построения скелета полинуклеотидной макромолекулы не обязательно наличие структуры, основу которой составляют 5',3'-фосфодиэфирные связи между рибозильными остатками мономеров. По ряду свойств синтетические полинуклеотиды с альтернативной структурой могут быть даже «лучше», чем РНК, выделенная из организмов. Так, например, синтетический полинуклеотид, содержащий рибопиранозильные, а не рибофуранозильные остатки, соединенные 4',2'-фосфодиэфирными связями, отличался более устойчивой и более селективной системой водородных связей между комплементарными основаниями, чем природные 5',3'-рибофуранозильные молекулы. Рибоза в составе нуклеотидов может быть замещена другим сахаром, например, L-треофуранозными остатками, связанными 3',2'-фосфодиэфирными связями [29, 30]. В лаборатории С. Миллера проведен синтез «нуклеиновой кислоты» (в том числе и в условиях, моделирующих предбиологические процессы), у которой вообще отсутствует сахар-фосфатный скелет. Структурная основа данной молекулы,

получившей название пептидонуклеиновой кислоты (ПНК), построена из остатков N-(2-аминоэтил) глицина (*син.* этилендиамин моноацетат), соединенных амидными связями [85, 86]. К этому скелету с помощью ацетильных линкеров присоединены стандартные основания РНК. При этом оказалось, что двуцепочечный комплекс ПНК–ДНК более устойчив к термодиссоциации, чем двойная спираль ДНК. Таким образом, каноническую структуру РНК можно рассматривать как комбинацию мономеров и химических связей, отобранных эволюцией из большого числа вариантов благодаря стереохимическим параметрам, допускающим образование водородных связей между основаниями комплементарных цепей.

Хорошо известно, что все рибонуклеотиды или их ди- или трифосфаты являются участниками метаболических реакций в качестве коферментов и переносчиков аминокислотных, фосфорильных и гликозильных остатков, а также метаболических предшественников фосфолипидов. Структура некоторых других коферментов близка к структуре нуклеотидного модуля, состоящего из положительно заряженной гетероциклической «головы» и отрицательно заряженного фосфорильного «хвоста», соединенных нейтральным линкером. Такова, например, структура FMN, молибдоптерина, пиридоксальфосфата и тиаминпирофосфата, а также метаболических предшественников коферментов – NMN<sup>+</sup> и 6,7-дигидронеоптерин-трифосфата (предшественника тетрагидробиоптерина). В никотинамидных и пиридоксальных коферментах положительно заряженная «голова» модуля представлена замещенным пиридиновым кольцом, а у тиаминдифосфатных коферментов в ее роли выступает пиримидин, конъюгированный с тиазолом. Гетероциклом FMN и других флавинов служит 1,3-дикето-7,8-диметилизоаллоксазин. Сходный гетероцикл, в котором, однако, атом азота в положении 5 замещен на углерод, присутствует в дезафлавиновых коферментах. Птериновые коферменты, например, тетрагидробиоптерин или молибдоптерин, как и коферментные производные фолиевой кислоты, содержат в качестве азотистого основания 2-амино-4-кето-птеридин [98].

Помимо рибозы, входящей в состав NMN<sup>+</sup>, роль линкера в молекулах коферментов мононуклеотидного типа выполняет рибит (в FMN), либо короткая алифатическая цепочка (в тиаминпирофосфате и в пиридоксальных коферментах). В некоторых птеринах, например, в 7,8-дигидронеоптерин-трифосфате, таким линкером является гидроксильная алифатическая структура, а в других (молибдоптерин) основание и фосфорильный «хвост» связаны тиолированными и гидроксильными остатком бутана. У наиболее сложно организованных коферментных производных птеридина – фолатов –

гетероцикл соединен с отрицательно заряженным глутамильным или олигоглутамильным «хвостом» посредством *para*-аминобензоильного линкера, причем аминогруппа ПАБ, расположенная в непосредственной близости к отрицательно заряженной «голове», может рассматриваться как ее функциональная часть. Ряд птериновых и дезазафлавиновых кофакторов имеют не нуклеотидную, а нуклеозидную структуру, т.е. у них отсутствует отрицательно заряженный фосфорильный «хвост».

Некоторые коферменты –  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{FAD}$ , а также молибдоптерин-содержащие динуклеотиды являются продуктами конденсации мономерной формы кофермента с одним из стандартных рибонуклеотидов и представляют собой квазидинуклеотиды, в которых молекулы мономера соединены не 5',3'-фосфодиэфирной связью, а 5',5'-пирофосфатным мостиком.

Неоднократно высказывалось предположение, что присоединение или связывание коферментов с полинуклеотидами могло существенно расширить каталитические возможности молекул РНК на ранних этапах эволюции [15, 23, 115] (см. также обзор Джадхава и Яруса [59]). Следует отметить, что до настоящего времени из организмов не были выделены нуклеиновые кислоты, содержащие помимо пуринов и пиримидинов какие-либо иные гетероциклические структуры, например, птеридины или изоаллоксазины. Вместе с тем, в ряде исследований показана возможность встраивания в нуклеиновые кислоты альтернативных гетероциклов посредством как химических, так и ферментативных синтезов. Исследования в этом направлении развивались не только в контексте проблем предбиологической эволюции, но и в связи с решением достаточно отдаленных задач. Так, например, в опытах, имевших целью введение флуоресцентной метки в полинуклеотидную цепь, синтетические дезоксирибонуклеозиды замещенных птеридинов (3-метил-изоксантоптерина или 4-амино-6-метилптеридина) посредством автоматического синтеза ДНК из фосфоимид-активированных нуклеозидных предшественников, включались как аналоги гуанозина и аденозина в концевые и неконцевые положения полинуклеотидной цепи. Благодаря сходству стерических параметров птеридина и пурина, замена пуринового компонента на птеридин не приводила к сколько-нибудь серьезному нарушению структуры ДНК, о чем свидетельствовали температуры плавления птеридин-содержащего и контрольного полимеров, а также анализ продуктов их ферментативного гидролиза [42-44]. Исследуется также химический синтез нуклеозидных и нуклеотидных производных изоаллоксазина и 5-дезаизоаллоксазина с целью их последующего включения в олиго- и полинуклеотиды, преимущественно в ДНК [28, 37, 38, 41, 84, 105, 106]. В ходе этих исследований

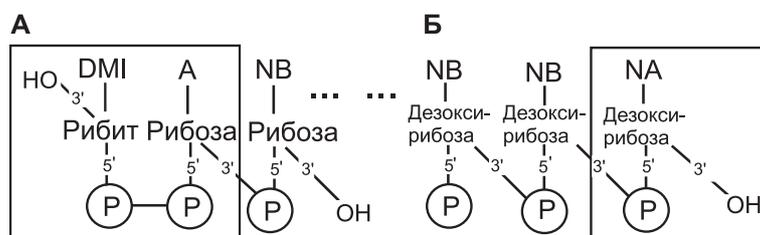


Рис. 1. Примеры ковалентного присоединения коферментов к полинуклеотидам.

**А** — FAD может заместить АТФ при 5'-концевой инициации матричного синтеза РНК, катализируемого РНК-полимеразой *Escherichia coli* (DMI — 7,8-диметил-изоаллоксазиновый остаток флавина, А — аденин, NB — нуклеиновое основание). Так же может присоединяться  $\text{NAD}^+$  [79].

**Б** — присоединение остатка  $\text{NMN}^+$  в 3'-концевое положение, катализируемое терминальной трансферазой из тимуса телят (NA — никотинамид, NB — нуклеиновое основание [75]).

удалось, в частности, получить молекулы ДНК, содержащие флавиновый остаток (нуклеозидное производное изоиллоксазина), проявляющий каталитическую и фотокаталитическую активность в реакциях переноса электрона [15, 41, 83, 105]. Кроме того, используя приемы химического синтеза, удалось получить конъюгаты фолиевой кислоты с каталитически активным полирибонуклеотидом [80]. Синтезированы также мономеры ПНА, содержащие в качестве азотистого основания изоаллоксазиновый гетероцикл, и показана их способность при включении в полимерную цепь образовывать водородные связи с комплементарным основанием в цепи ДНК [55].

Другими авторами была показана возможность ковалентного включения коферментов в концевые положения молекул РНК в реакциях, катализируемых ферментными белками и рибозимами (рис. 1 и табл. 1). Еще в 70-е годы А.Г. Малыгиным и М.Ф. Шемякиным было установлено, что  $\text{NAD}^+$  и FAD могли заменять АТФ в качестве иницирующего нуклеотида при матричном синтезе РНК, катализируемом РНК-полимеразой *Escherichia coli* [79] (см. табл. 1). Позднее в лаборатории Л. Оргеля было показано, что терминальная трансфераза из тимуса телят включала NMN из предшественника никотинамид-мононуклеозид 5'-трифосфата к 3'-концу олигодезоксирибонуклеотида, а полинуклеотидкиназа Т4 использовала в качестве субстрата  $\text{NMN}^+$  [75]. В этом же исследовании было установлено, что NADPH мог служить прекрасным субстратом для катализируемой полинуклеотидфосфорилазой *Micrococcus luteus* реакции удлинения затравочного праймера и полимеризации (см. табл. 1). Наконец, в опытах

Таблица 1  
**Ковалентное присоединение коферментов и родственных молекул к полинуклеотидам**

Присоединенный остаток	Полинуклеотид	Место включения в цепь	Тип связи	Катализатор	Ссылка
NAD <sup>+</sup>	РНК	5'-конец <sup>1</sup>	Фосфодиэфирная	ДНК-зависимая РНК-полимераза	[79]
FAD	РНК	5'-конец <sup>1</sup>	Фосфодиэфирная	<i>Escherichia coli</i>	[16]
NAD <sup>+</sup>	РНК	5'-конец	Фосфодиэфирная	Укороченная версия рибозима из <i>Tetrahymena thermophila</i>	[53]
Коэнзим А	РНК	5'-конец	Фосфоангидридная	Ca <sup>2+</sup> -зависимый рибозим (продукт селекции <i>in vitro</i> )	
NADP <sup>+</sup>	РНК	5'-конец	Фосфодиэфирная	Полинуклеотид-фосфорилаза <i>Micrococcus luteus</i>	[71]
Коэнзим А	РНК	5'-конец	Фосфодиэфирная	Терминальная трансфераза из тимуса теленка	[75]
Тиамин-пирофосфат	РНК	5'-конец	Фосфодиэфирная	Химический синтез с использованием фосфамидитных производных	[27]
Тиамин-пирофосфат	РНК	5'-конец	Фосфодиэфирная	Химический синтез с использованием фосфамидитных производных	[42]
NADP <sup>+</sup>	РНК	неконцевые положения	Фосфодиэфирная	Химический синтез с использованием фосфамидитных производных	
NMN	ДНК	3'-конец	Фосфодиэфирная	Химический синтез с использованием фосфамидитных производных	
3-метил-8-(2-дезоксидеокси-β-D-рибозил)-7(8H)-птеридон <sup>2</sup>	Дезоксирибоолигонуклеотиды	Концевые и неконцевые положения	Фосфодиэфирная	Химический синтез с использованием фосфамидитных производных	
4-амино-6-метил-8-(2'-деокси-β-D-рибофуранозил)-7(8H)-птеридон	Дезоксирибоолигонуклеотиды	Концевые и неконцевые положения	Фосфодиэфирная	Химический синтез с использованием фосфамидитных производных	
4-амино-2,6-диметил-8-(2'-деокси-β-D-рибозил) птеридон	Дезоксирибоолигонуклеотиды	Концевые и неконцевые положения	Фосфодиэфирная	Химический синтез с использованием фосфамидитных производных	

<sup>1</sup> Использовали в качестве иницирующего нуклеотида вместо АТР.

<sup>2</sup> 3-метил-изоксантоптериндезоксирибозид.

Р.Р. Брейкера и Дж.Ф. Джойса было продемонстрировано, что укороченная версия рибозима из *Tetrahymena thermophila* катализирует включение в собственную молекулу остатков  $\text{NAD}^+$  и дефосфорилированного  $\text{CoA}$  [16]. В другом исследовании каталитически активная РНК присоединяла как нуклеотиды, так и коферменты, например, FMN,  $\text{NADP}^+$ , TTP, и  $\text{CoA}$  к 5'-гидроксилам нуклеотидных остатков собственной молекулы, находящимся в терминальном положении или открывающимся при отщеплении олигонуклеотидного фрагмента [53, 58]. Реакции, лежащие в основе формирования этого своеобразного «кэпа», представлены на рис. 2.

Полинуклеотиды способны также к специфическому нековалентному связыванию коферментов и других каталитически активных лигандов. Развитие методов SELEX позволяет сегодня выделять из хаотических наборов полинуклеотидных

последовательностей аптамерные комплексы, т.е. синтетические полинуклеотиды, специфически и с высоким сродством связывающие определенный лиганд [60, 92] (табл. 2). Используя этот подход, удалось получить аптамеры, обладающие сродством к ряду коферментов и родственных молекул, например, рибофлавинолу, FMN, FAD, NMN<sup>+</sup>,  $\text{NAD}^+$  и восстановленным формам двух последних молекул [33, 70, 101]. Высокоаффинное взаимодействие лиганда и аптамера, обусловленное стерохимическим соответствием молекулы лиганда и полости в специфически уложенной полинуклеотидной цепи дополнительно поддерживается за счет водородных связей гетероциклической группы коферментной молекулы, например, 1,3-дикето-7,8-диметилизоаллоксазина, с основаниями РНК [33].

Приведенные выше примеры ковалентного и специфического нековалентного присоединения коферментов к полинуклеотидам не

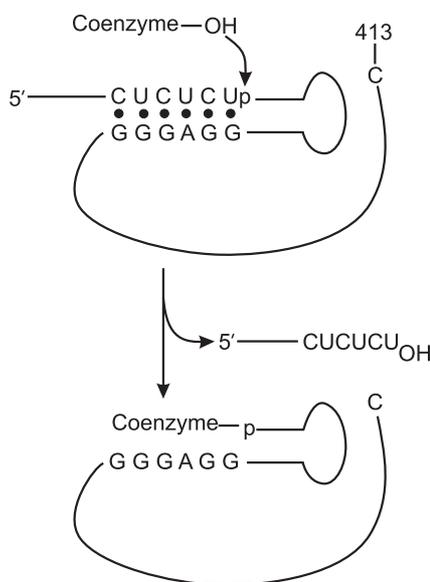


Рис. 2. Катализируемое рибозимом включение коферментных остатков в собственную полинуклеотидную цепь укороченной версии рибозима группы А.

Молекула кофермента ( $\text{NAD}^+$  или дефосфо- $\text{CoA}$ ) атакует 3'-гидроксильным остатком 5'-сайт сплайсинга с выщеплением 5'-экзона и присоединением собственной молекулы к рибозиму [58].

**Таблица 2**  
**Коферменты и родственные соединения,**  
**специфически связываемые РНК-аптамерами**

Соединение	Ссылка	Соединение	Ссылка
Рибофлавин	[70]	NMN <sup>+</sup>	[70]
5-дезазарибофлавин	[70]	NAD	[70]
FMN	[33, 54]	NADH	[70]
FAD (или FADH <sub>2</sub> )	[101]		

исчерпывают возможных путей приобретения дополнительных каталитических функций молекулами нуклеиновых кислот. Так, например, возможна химическая модификация пуриновых оснований самой РНК, приводящая к экспонированию реакционноспособных имидазольных радикалов [81]. Таким образом, можно заключить, что внедрение коферментов в мир РНК вполне реально в химическом отношении и, более того, сами коферменты могут рассматриваться как химические компоненты этого мира. Однако сам факт наличия коферментов еще не объясняет, как их присутствие могло усилить каталитическую активность связавших их полимеров в отсутствие специфических апобелков. Важно понять, при каких условиях коферменты могли реализовать свои каталитические функции вне связи со специфическим белком.

### III. ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ КОФЕРМЕНТОВ

Хорошо известно, что в свободном состоянии молекулы коферментов проявляют относительно низкую реакционную способность по сравнению с таковой в ферментных комплексах. Помимо связывания с апобелком существует и иной путь повышения химической активности этих соединений, а именно, фотовозбуждение их молекул, приводящее к мощному усилению реакционной способности многих коферментов. Присутствие в белке ароматических аминокислот, гасящих энергию возбуждения хромофора, может приводить к утере фотохимической активности связанного кофермента.

В настоящее время наиболее изучены фотохимические свойства флавиновых коферментов и родственных им соединений [см. обзоры 47, 96]. Другой группой соединений, привлекающей внимание фотохимиков и фотобиологов, являются коферментные производные 2-амино-4-оксиптеридина (птерина) и никотинамида, а также

некоторые структурно близкие им соединения [2, 7, 8, 10, 11, 18, 39, 71]. Интерес к исследованию флавинов и птеринов в большой мере обусловлен их функционированием в качестве физиологических фотосенсоров у ряда ферментов и регуляторных белков.

Помимо ультрафиолетовой радиации в области 250÷280 нм, поглощаемой основаниями нуклеиновых кислот, флавины, птерины и восстановленные никотинамиды поглощают в UV-A области между 300 и 400 нм. Кроме того, флавины могут возбуждаться коротковолновым видимым светом с длиной волны до 500 нм. Длинноволновый предел поглощения их дезафлавиновых аналогов несколько сдвинут в коротковолновую область по сравнению с флавинами и расположен в начале видимого диапазона спектра [87]. Главную роль в процессе возбуждения коферментов играют гетероциклические основания, однако параметры процесса, как и особенности свойств возбужденных молекул, в большой мере подвержены влиянию структуры и локализации боковых групп. Синглетно-возбужденные молекулы исследованных коферментов эффективно конвертируются в триплетные состояния [18, 67, см. также обзор 96] (рис. 3). Поскольку триплетно возбужденные молекулы могут вступать в химические взаимодействия в растворе, тогда как фотохимическое тушение возбужденных синглетных состояний осуществляется лишь в организованных системах, например, в реакционных центрах фотосинтеза, именно триплетные состояния представляют наибольший интерес для анализа процессов предбиологической эволюции. Время жизни триплетных состояний флавинов и птеринов (при измерении в низкотемпературных условиях) достигает порядка  $0,1 \div 1,0$  с и может эффективно тушиться рядом реагентов, инициируя фотохимические реакции [10, 18, обзоры 47, 96]. Стандартный окислительно-восстановительный потенциал ( $E'_0$ ) флавинов, например, рибофлавина или FMN, составляет  $-0,22$  В, т.е. восстановленные флавины являются сильными биологическими восстановителями. Переход в триплетно-возбужденное состояние сдвигает значение  $E'_0$  редокс-пары до  $+1,85$  В вследствие энергизации окисленной формы. Благодаря высокой электрофильности эта форма становится способной акцептировать электроны от различных доноров, в том числе и соединений с высоко положительным значением стандартного потенциала (рис. 3). Реакция протекает по свободно-радикальному механизму [8, 47, 71, 96] и в итоге приводит к образованию активных метаболитических восстановителей — дигидрофлавинов или дигидро- и тетрагидроптеринов [47, 68, 96].

Донорами электрона могут служить предполагаемые участники предбиологических процессов химической эволюции, например,

РЕАКЦИИ ВОЗБУЖДЕННЫХ  
ФЛАВИНОВ (FL\*) И ПТЕРИНОВ (РТ\*)

Фотофизические процессы

Возбуждение:



Генерация  ${}^1\text{O}_2$ :



Перенос энергии от возбужденного птерина на флавин  
в активном центре ДНК-фотолиазы:



Фотовосстановление и фотокатализ  
донор-акцепторного переноса электрона

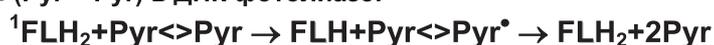
Фотовосстановление:



Перенос электрона от донора (D) к акцептору (A):



Циклический перенос электрона от FADH<sub>2</sub> на пиримидиновый  
димер (Pyr<>Pyr) в ДНК фотолиазе:



Фотоаддукция флавинов и фолатов (FOL)



Рис. 3. Схематический обзор типов реакций возбужденных флавинов и птеринов.

FL – флавины, РТ – птерины, FOL – фолиевая кислота. Используемые символы \*, <sup>1,3</sup> обозначают, соответственно, возбужденное, возбужденное синглетное и триплетное состояния молекул. D – донор электрона, A – акцептор электрона. В реакциях фотоаддукции возбужденный флавин устанавливает ковалентную связь с остатком молекулы–донора электрона. Возбужденные молекулы птеринового производного, фолиевой кислоты, переходят в восстановленные формы и присоединяют одноуглеродный (формильный) радикал (C<sub>1</sub>) молекулы–донора [2, 8, 12, 47, 67, 63, 71, 96, 104].

карбоновые кислоты, аминокислоты, спирты, а также этилендиамин-моноацетат (мономерный компонент скелетной части ПНК) и его ацетилированные производные ( $E'_0$  для этилендиаминтетраацетата высокоположителен и составляет приблизительно +0.40 В) [47]. Аналогичным образом ведут себя и птерины: их восстановленные формы, особенно тетрагидроптерины, являются сильными восстановителями ( $E'_0$  около -0,50 В), а дополнительная энергия, которую получает при возбуждении в триплетное состояние их окисленная молекула, равна 2,50 эВ [10, 18, 67]. Возможным результатом взаимодействия возбужденного флавинового или птеринового (фолатного) производного является также образование ковалентных аддуктов с соединением — донором электрона [12, 96].

При наличии акцептора электрона, например  $Fe^{3+}$ -цитохрома *b*, возбужденные флавины и птерины катализируют перенос электрона от донора на акцептор. Процесс может проходить как в анаэробных, так и аэробных условиях [9, 47, 96]. Присутствие кислорода сильно снижает продолжительность жизни восстановленных молекул этих коферментов и, кроме того, приводит к изменению механизма процесса вследствие генерации синглетного и других реакционно-активных форм кислорода. Тем не менее в аэробных, как и в анаэробных условиях, фотосенсибилизированные флавинами и птеринами реакции могут приводить к накоплению свободной энергии в продуктах [6, 9, 47, 96].

Сенсибилизированные коферментами фотореакции реализуются не только в водном растворе, но и в условиях, когда кофермент, например, липофильное производное флавина, включен в искусственную липидную мембрану и служит фотокатализатором трансмембранного переноса окислительно-восстановительных эквивалентов [104]. Также высказывалось интересное предположение о возможности функционирования в мембране светозависимого протонного переносчика, в основе деятельности которого лежит резкое (на порядки величин) различие констант диссоциации протона от флавиновой молекулы, находящейся в основном и возбужденном состоянии [104]. Однако экспериментальные подтверждения этой гипотезы пока не получены.

Рассматривая фотохимические свойства коферментов, существенные для проявления фотохимической активности этих соединений в биологических и предбиологических системах, следует также учесть возможность их участия в образовании устойчивых нековалентных комплексов. Образование стэкинг-комплексов, как с ароматическими радикалами самой коферментной молекулы, так и с циклическими структурами соседних молекул, может иметь существенное значение для проявления ее фотофизических и фотохими-

ческих свойств. Так, стэкинг-взаимодействие гетероциклов в молекуле FAD, приводящее к переносу энергии возбуждения от изоаллоксазина к адениновой части молекулы, обуславливает снижение интенсивности флуоресценции FAD по сравнению с рибофлавином или FMN [109]. Аналогичным образом интенсивность флуоресценции молекул фолиевой кислоты относительно невелика по сравнению с другими птеринами вследствие взаимного тушения возбужденных птеридиновых гетероциклов, образующих стэкинг-пары [112].

Фотохимические свойства восстановленных коферментных молекул птеридиновой и изоаллоксазиновой природы исследованы несколько хуже по сравнению с окисленными формами. Можно отметить, однако, что в биологической системе, а именно в составе фермент-субстратного комплекса ДНК-фотолиазы и циклобутановых пиримидиновых димеров ДНК, синглетно возбужденный восстановленный дигидрофлаavin-анион (FADH<sup>-</sup>) функционирует в качестве донора электрона [103]. В то же время дигидроформа птеринов (промежуточная стадия двуэлектронного восстановления этих соединений) может под влиянием света превращаться в полностью восстановленную тетрагидроформу [67]. Что касается никотинамидных коферментов NAD<sup>+</sup> и NADP<sup>+</sup>, то для них характерно проявление фотохимической активности именно в восстановленной (дигидро-) форме. В отсутствие кислорода NADH и NADPH проявляют свойство сильного восстановителя, способного восстанавливать такие низкопотенциальные акцепторы, как ферредоксин и метилвиологен. Значение E<sub>o</sub>' для основного состояния никотинамидов равно -0,32 В, в то время как для ферредоксинов оно составляет -0,43 В, а для дигидропиридинового продукта восстановления метилвиологена эта величина равна -0,79 В. Тем самым восстановленные никотинамидные коферменты, подобно флавинам и птеринам, сенсбилизируют перенос электрона против термодинамического градиента [11].

#### IV. ФОТОСЕНСОРНЫЕ ФУНКЦИИ КОФЕРМЕНТОВ В БЕЛКАХ

Фотохимическая активность коферментов широко реализуется в современных организмах. Исследования, выполненные, в основном, в последнее десятилетие, привели к открытию фотосенсорной функции флавинов и птеринов в белках. У нескольких групп ферментных и регуляторных белков эти коферменты опосредуют физиологический ответ организма на ультрафиолетовую (UV-A и UV-B) радиацию и коротковолновый видимый свет, например, индукцию клеточной дифференцировки или изменение параметров циркадных

ритмов. Хотя специфическая фотосенсорная функция установлена пока только для флавинов и некоторых птеринов, есть основания полагать, что возбуждение светом и некоторых других коферментов служит фактором регуляции скорости биокаталитических реакций. Так, возбужденные молекулы восстановленных никотинамидных коферментов модулируют каталитическую активность некоторых ферментов, например, гидрогеназы [3]. Показано также, что возбуждение ультрафиолетом пиридоксальфосфата, функционирующего в качестве кофермента при ферментативном декарбоксилировании окситриптофана в серотонин, стимулирует эту реакцию [36].

Известные сегодня белки, в которых реализуется фотосенсорная функция флавиновых и птериновых коферментов, в структурном плане распределяются по нескольким семействам. Первую группу составляют ДНК-фотолиазы, т.е. ферменты, катализирующие реактивацию поврежденных ультрафиолетом ДНК посредством каталитического расщепления димеров, образовавшихся в результате ковалентного взаимодействия соседних пиримидиновых оснований [46, 48, 103]. ДНК-фотолиазам гомологичны криптохромы – пигменты, воспринимающие свет в процессах фоторегуляции роста и развития растений и животных [13, 17, 51, 72]. Каждая белковая молекула фотолиаз и криптохромов несет по два хромофора. В фотолиазах хромофором I является восстановленный флавин,  $FADH_2$  (точнее говоря, его анионная форма  $FADH^-$ ), расположенный в активном центре фермента, а хромофором II (светосборщиком) служит птерин, МТНФ, или, в некоторых организмах, другое соединение коферментного ряда, 7,8-дидеметил-10-окси-5-дезазарибофлаavin [78]. Функционально далекие от фотолиаз, но структурно гомологичные им криптохромы связывают в качестве фотосенсоров FAD и МТНФ [17].

Ко второй структурной группе можно отнести белки, содержащие так называемые домены PAS. Эти домены, выявлены в многочисленных рецепторных и регуляторных белках у представителей всех крупных таксонов, и их конформационные изменения вовлечены в процесс передачи регуляторного сигнала. Термин PAS является акронимом названий генных белковых продуктов, в которых впервые были идентифицированы эти домены: PER (period clock), ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator) и SIM (single minded) [110]. Разновидность этих доменов, способная связывать флавиновый кофактор (FMN или FAD в зависимости от типа белка) и ответственная за процесс восприятия белком-рецептором таких воздействий, как световой сигнал, концентрация кислорода и уровень электрического потенциала, получила название LOV-доменов (Light, Oxxygen, Voltage) [21]. К группе PAS (LOV) домен-содержащих белков относится семейство

фототропинов и родственных им растительных белков, в основном ответственных за рецепцию светового сигнала в процессах фототропизма [20, 21], а также выделенный из гриба *Neurospora crassa* фоторецепторный белок WC1 (продукт гена white collar 1), контролирующий процессы развития этого организма [19, 45, 73, 74]. Эти полипептиды, в которых флавиновый кофермент, связанный с LOV-доменом, способен к фотохимическим реакциям, влияющим на конформацию домена, и, как следствие, на функцию самого белка, рассматриваются как потомки редокс-чувствительных белков [110]. В третьей группе, нитратредуктазах эукариотических организмов (сосудистых растений, зеленых водорослей, высших грибов), редокс-состояние белка также контролируется фотохимической активностью флавинового (FAD) хромофора [25, 82, 114]. В последние годы были открыты еще два типа белков, функциональная активность которых находится под контролем фотосенсорных хромофоров флавиновой природы: активируемая светом FMN-связывающая аденилилциклаза из *Euglena gracilis* [58] и фоторегулятор экспрессии генов фотосинтетического аппарата AppA [63].

В функциональном плане перечисленные выше белки можно разделить на две группы. Некоторые из них представляют собой фоторегулируемые ферменты. Так, каталитическая активность ДНК-фотолиазы реализуется исключительно при возбуждении коферментных хромофоров, а в темноте фермент совершенно не активен [46, 47, 103]. Для нитратредуктазы возбуждение светом флавинового хромофора служит фактором перевода молекулы из каталитически неактивного состояния в активное. Аналогичным образом свет действует и на фототропины, являющиеся светочувствительными протеинкиназами серин-треонинового типа, а также на светозависимую аденилилциклазу [20, 21]. Другие известные белки с коферментным фотосенсором, в том числе, по-видимому, и криптохромы, являются регуляторами транскрипции. Белок WC1 в комплексе с гомологичным ему, но нечувствительным к свету белком WC2 выступает в качестве фактора транскрипции, взаимодействующего своим «цинковым пальцем» с GATA-последовательностями в промоторе [73, 74]. Белок pAap является антирепрессором, инактивирующим репрессор транскрипции, т.е. в конечном счете также выполняет роль регулятора транскрипции [63].

Анализ фотохимических процессов, развивающихся вследствие возбуждения хромофора коферментной природы в светочувствительных ферментных и регуляторных белках, приводит к заключению, что в известных сегодня фоторецепторах возбужденные коферменты вступают в реакции переноса электрона. Так, в FMN-связывающем

LOV-домене фототропина (а, возможно, и в LOV-доменах других светочувствительных белков) фотоиндуцированный редокс-процесс сопровождается образованием ковалентного фотоаддукта C4a атома FMN-хромофора с одним из цистеинильных остатков в составе домена, что приводит к конформационным изменениям в белковой молекуле и, как следствие – активации киназного домена [102].

Основные группы светочувствительных белков с фотосенсорами коферментной природы существенно различаются по своей первичной структуре, и едва ли можно предположить их происхождение от общего эволюционного предшественника. Более вероятно, что сходство функций кофермент-связывающих рецепторов света обусловлено конвергентной эволюцией. Что касается фотокаталитических реакций коферментов в безбелковых системах, то еще в 50-е годы А.А. Красновским было отмечено, что они могли играть роль в преобразовании световой энергии Солнца на ранних этапах эволюции [5, 64]. Позднее взгляд на фотокаталитические реакции коферментов в организмах, как на своеобразный метаболический реликт, получил развитие в исследованиях других авторов, в том числе и в нашей лаборатории [65, 66]. Предполагаемая функция сенсibilизированных коферментами фотопроцессов в преобразовании солнечной энергии в биологических системах оказалась, по-видимому, полностью отвергнутой эволюцией в пользу более эффективных процессов хлорофилльного фотосинтеза. Однако эти фотореакции смогли сохраниться в организмах как одна из частей систем клеточной регуляции.

## **V. КОФЕРМЕНТЫ В ПРОЦЕССАХ ПРЕДБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭВОЛЮЦИИ**

Обязательное присутствие коферментов в современных организмах и важная роль этих соединений в самых фундаментальных сегментах метаболизма позволяет рассматривать их как вероятных участников ранней эволюции, т.е. они как бы являются реликтами древнего метаболизма [116]. Согласно результатам химического моделирования предбиологических процессов, основные структурные компоненты молекул многих коферментов и, вероятно, сами коферменты могли присутствовать среди продуктов химической эволюции. Так, изоаллоксазиновые, птеридиновые и никотинамидные структуры как и основания нуклеиновых кислот могли возникнуть абиогенным путем [1, 34, 49, 50, 91, 95]. В контексте нашей статьи существенно, что абиогенные флавиновые пигменты, образовавшиеся при термоллизе смесей аминокислот, проявляли фотоактивность как сенсibilизаторы окислительно-восстановительных реакций и фосфори-

лирования ADP в АТФ [4, 62]. Есть указания на возможность образования в абиотических условиях рибофлавина, АТФ, пиридиновых нуклеотидов и нуклеозиддифосфат-содержащих коферментов (UDP-глюкозы, CDP-этаноламина и CDP-холина) [22, 90]. Образование этих соединений могло происходить не только в чисто химических реакциях конденсации, но и в условиях катализа полирибонуклеотидами [53]. О вероятной древности по меньшей мере одной группы коферментов, флавинов, свидетельствуют результаты сравнительного анализа вторичной структуры белков [100]. Согласно оценке, проведенной в этой работе, возраст одной из двух древнейших групп белков, флавин-связывающих флаводоксиров, как и другой древнейшей группы (содержащих FeS кластеры ферредоксинов), составляет 3,2÷4,5 миллиарда лет, т.е. сопоставим с возрастом биосферы Земли. Совокупность представленных данных позволяет рассматривать коферменты флавиновой, птеринового и никотинамидной природы, а также химически родственные им соединения как участников процессов наиболее ранних процессов биологической эволюции.

Есть основание полагать, что рибонуклеотидные мономеры, как и гетероциклические азотистые основания современных РНК, являются продуктом естественного отбора, в ходе которого был подвергнут испытанию (и в значительной мере отсеялся) широкий набор гетероциклических оснований, мономеров и типов связей и сформировался современный структурный план нуклеиновых кислот. Вероятными участниками этого процесса селекции могли быть производные птеридина, изоаллоксазина и никотинамида, структурно близкие рибонуклеотидам. Присоединение, в том числе и ковалентное, таких молекул к прототипам современных полирибонуклеотидов могло расширить диапазон каталитической активности обитателей мира РНК без заметного ущерба для генетической функции этих полимеров. В случае ковалентного присоединения присутствие подобных нетипичных оснований, исходя из стереохимических соображений, выглядит более вероятным, хотя не исключается и их локализация в неконцевых положениях полимера.

Очевидно, что необходимой предпосылкой для формирования устойчивой двуцепочечной структуры примитивного РНК-полимера служит способность оснований к образованию водородных связей с основаниями комплементарной цепи. На первый взгляд, пространственные параметры гетероциклических оснований коферментных молекул гораздо хуже соответствуют стерическим требованиям, обеспечивающим такое взаимодействие, чем стандартные нуклеиновые основания. При более детальном анализе оказалось, однако, что птеридиновые аналоги гуанина и аденина, включенные в полинуклео-

тидную цепь вместо обычных оснований и в пространственном отношении близкие к пуринам, формируют водородные связи с пиримидиновым партнером в комплементарной цепи [44] (рис. 4). Сообщалось также, что кетонные группы изоаллоксазиновых циклов флавинов и амидогруппы никотинамидных коферментов могут участвовать в образовании водородных связей с нуклеиновыми основаниями [33, 38, 44, 75]. Дополнительной проработки требует вопрос о том, в каких пределах может варьировать структура «хвостовой» и «линкерной» частей молекулы для того, чтобы мономеры с основаниями коферментной природы могли вписаться в двуцепочечную структуру полинуклеотида.

Фотосенсибилизирующая активность коферментных молекул, в частности их способность катализировать редокс-реакции и реакции присоединения групп, может рассматриваться как положительный селективный признак, повышающий способность системы к выживанию благодаря получению энергии извне, и, тем самым, поддер-

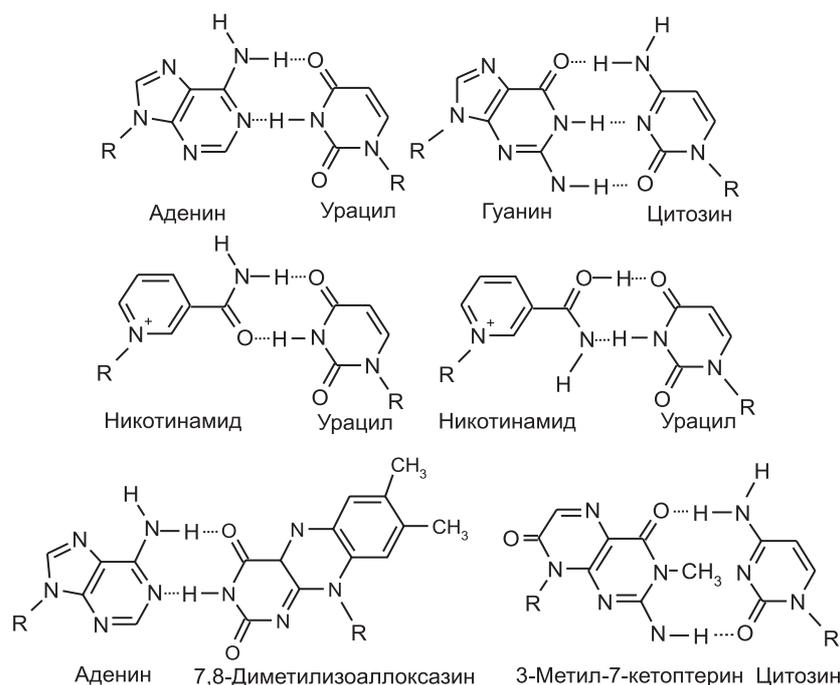


Рис. 4. Формирование водородных связей между нуклеиновыми основаниями и гетероциклами коферментов и родственными им соединениями (по результатам статей [33, 38, 44, 75]).

живающий ее метаболическую стабильность. При этом, однако, нельзя не учитывать и то обстоятельство, что стэкинг-взаимодействие возбужденного коферментного гетероцикла с соседним основанием могло в ряде случаев приводить к потере части энергии возбуждения и, как следствие, более слабой фотохимической активности коферментной группы в составе полимера, чем в изолированном состоянии. Поскольку величина такой потери зависит от комбинации гетероциклов, участвующих в стэкинге [27, 42, 43, 47, 83, 96], можно заключить, что первичная структура протоРНК могла влиять на проявление фотохимической активности присоединенной коферментной группы.

Присутствие в полинуклеотиде фотоактивной коферментной группировки могло иметь и отрицательные последствия для системы, заключающиеся в повышенном риске фотодеградациии близлежащих мономеров и нарушении пространственной организации двойной спирали [54, 77]. Следует учесть, что как стандартные нуклеиновые основания, так и коферментные гетероциклы практически с равным риском подвергались разрушению при прямом воздействии ультрафиолетовой радиации Солнца с длиной волны ниже 300 нм. Развитие в ходе эволюции атмосферы Земли озонового экрана сильно ослабило проникновение на поверхность планеты коротковолновой составляющей этой радиации, что минимизировало риск прямой фотодеградациии стандартных оснований РНК. В то же время озоновый экран не в состоянии защитить молекулы нуклеиновых кислот от разрушения, сенсibilизированного соединениями, поглощающими свет в более длинноволновой области, например птеринами и, особенно, флавинами. Можно напомнить, что возбужденные флавины и птерины являются активными генераторами  $^1\text{O}_2$  [2, 10, 112], а также способны инициировать свободнорадикальные процессы. По этой причине птеридиновые или изоаллоксазиновые гетероциклы могли оказаться достаточно опасными партнерами в полинуклеотидной цепи, что могло быть одной из причин отторжения их из состава полинуклеотидов в ходе эволюции. Можно думать, что после вытеснения коферментных групп из состава полинуклеотидных носителей они смогли удержаться в биологических системах, сменив связывающий их полимер. Появление в ходе эволюции генетически упорядоченных полипептидов, способных к аффинному связыванию коферментов, обусловило формирование каталитически активных белков. Это, по-видимому, оказалось важным селективным признаком, обеспечившим выживание тех примитивных организмов, чьи генотипы могли обеспечить функционирование полноценного каталитического аппарата.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гладиллин К.Л., Андреева Н.А., Цыганков А.Ю., Гаджиева А.К., Кирпотин Д.Б. (1978) Докл. АН СССР, **240**, 1461–1463.
2. Егоров С.Ю., Красновский А.А., мл., Баитанов М.Е., Миронов Е.А., Людникова Т.А., Крицкий М.С. (1999) Биохимия, **64**, 1325–1330.
3. Жукова Л.В., Никандров В.В., Красновский А.А. (1987) Биохимия, **52**, 655–659.
4. Колесников М.П., Крицкий М.С. (2001) Журн. эвол. биох. физиол., **37**, 385–390.
5. Красновский А.А. (1959) в кн. «Возникновение жизни на Земле». Труды международного симпозиума 19–24 августа 1957 г. Изд-во АН СССР, М., 604–615.
6. Красновский А.А., мл., Чернышева Е.К., Крицкий М.С. (1987) Биохимия, **52**, 1273–1282.
7. Крицкий М.С., Людникова, Т.А. Миронов, Е.А. (1996) Докл. РАН, **351**, 222–224.
8. Крицкий М.С., Телегина Т.А., Людникова, Умрихина, А.В., Земскова, Ю.Л. (2001) Докл. РАН, **380**, 408–410.
9. Людникова Т.А., Телегина Т.А., Крицкий М.С. (2001) Материалы III съезда фотобиологов России. Воронеж, 2001 г., 126–127.
10. Неверов К.В., Миронов Е.А., Людникова Т.А., Красновский А.А., мл., Крицкий М.С. (1996) Биохимия, **61**, 1149–1155.
11. Никандров В.В., Брин Г.П., Красновский А.А. (1978) Биохимия, **43**, 636–645.
12. Телегина Т.А., Людникова Т.А., Земскова Ю.Л., Крицкий М.С. Материалы III съезд фотобиологов России. Воронеж, 2001 г., 217–218.
13. Ahmad, M., Cashmore, A.R. (1993) Nature, **366**, 162–166.
14. Bartel, D.P. Unrau, P.J. (1999) Trends Biochem. Sci., **241**, 9–13.
15. Behrens, C., Ober, M., Carell, T. (2002) Eur. J. Org. Chem., № 19, 3281–3289.
16. Breaker, R.R., Joyce, G.F. (1995) J. Mol. Evol., **42**, 551–558.
17. Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.-J., Liu, D. (1999) Science, 284, 760–765.
18. Chahidi, C., Aubaily, M., Momzikoff, A., Bazin, M., Santus, R. (1981) Photochem. Photobiol., **33**, 641–649.
19. Cheng, P., He, Q.Y., Yang Y.H., Wang L.X., Liu Y. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 5938–5943.
20. Christie, J.M., Briggs, W.R. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 11457–11460.
21. Christie, J.M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M., Briggs, W.R. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 8779–8783.
22. Cleaves, H.J., Miller, S.L. (2001) J. Mol. Evol., **52**, 73–77.
23. Connel, G.J., Christian, E.L. (1993) Orig. Life Evol. Biosph., **23**, 291–297.
24. Crick, F.T. (1968) J. Mol. Biol., **38**, 367–379.
25. De la Rosa, M.A., Roncel, M., Navarro, J.A. (1989) Bioelectrochem. Bioenerg., **27**, 355–364.
26. Doudna, J.A., Szostak, J.W. (1989) Nature, **339**, 618.
27. Driscoll, S.L., Hawkins, M., Balis, F.M., Pfeleiderer, W., and Laws, W.R. (1997) Biophys. J., 73, 3277–3286.
28. Duyemes, C., Decout, J.L., Peltie, P., Fontecave, M (2002) Ang. Chemie – Intern. Edition., **41**, 486–489.
29. Echenmoser, A. (1994) Orig. Life Evol. Biosph., 24, 389–423.
30. Echenmoser, A. (1999) Science, 284, 21180–2124.
31. Eklund, E.H., Bartel, D.P. (1996) Nature, 382, 373–376.
32. Ellington, A.D, Szostak, J. (1990) Nature, 346, 818–822.
33. Fan, P., Suri, A.K., Fiala, R., Live, D., Patel, J.D. (1996) J. Mol. Biol., 258, 480–500.

34. Ferris, J.F., Kuder, J.E., Catalano, A.W. (1969) *Science*, **166**, 765–767.
35. Fox, S.W., Dose, K. (1972) *Molecular Evolution and the Origin of Life*, S.A. Freeman Co, San Francisco.
36. Fraikin, G.A., Strakhovskaya, M.G., Ivanova, E.V., Rubin, A.B. (1989) *Photochem. Photobiol.*, **49**, 425–477.
37. Frier, C., Decout H., Fontecave M. (1997) *J. Org. Chem.*, **62**, 3520–3528.
38. Frier, C., Mouscadet, J.F., Auclair C., Fontecave M. (1998) *Chem. Commun.*, **22**, 2457–2458.
39. Galland, H., Senger, H. (1988) *Photochem. Photobiol.*, **48**, 811–820.
40. Gilbert, W. (1986) *Nature*, **319**, 618.
41. Girault I, Ravanat JL, Frier C, Fontecave, M., Cadet, J., Decout. J.L. (1999) *Nucleos. Nucleot.*, **18**, 1345–1347.
42. Hawkins, M.E. (2001) *Cell. Biochem. Biophys.*, **34**, 257–281.
43. Hawkins, M., Pfeleiderer, W., Mazumder, A., Pommier, Y.G., and Balis, F.M. (1995) *Nucl. Acid. Res.*, **11**, 2872–2880.
44. Hawkins, M., Pfeleiderer, W., Jungmann O., Balis, F.M. (2001) *Analyt. Biochem.*, **298**, 231–240.
45. He Q., Cheng, P., Yang Y., Wang L., Gardner K.H., Liu, Y. (2002) *Science*, **297**, 840–843.
46. Hearst, J.E. (1995) *Science*, **268**, 1858–1872.
47. Heelis, P.F. (1982) *Chem. Soc. Rev.*, **11**, 15–39.
48. Heelis, P.F., Kim, S.T., Okamura, T., Sancar, A. (1993) *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, **17**, 219–228.
49. Heinz, B., Ried, W. (1981) *BioSystems*, **14**, 33–40.
50. Heinz, B., Ried, W., Dose, K. (1979) *Angew. Chem.*, **91**, 510–511.
51. Hsu, D.S., Zhao, X., Kazantsev, A., Wang, R.-P., Todo, T., Wei, Y.-F., Sancar, A. (1996) *Biochemistry*, **35**, 13871–13877.
52. Huang, F.Q., Yarus, M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8965–8969.
53. Huang, F., Bugg, C.W., Yarus, M. (2000) *Biochemistry*, **50**, 15548–15555.
54. Hubler, C., Burgstaller, P., and Famulok, M. (1997) *Nucleos. Nucleot.*, **16**, 717–720.
55. Ikeda, H., Yoshida, K., Ozeki, M., Saito, I. (2001) **42**, 2529–2531.
56. Illangasekare, M., Sanchez, D., Nickles, T., Yarus, M. (1995) *Science*, **267**, 643–647.
57. Illangasekare, M., Yarus, M. (1999) *RNA*, **5**, 1482–1489.
58. Iseki, M., Matsunaga, S., Murakami, A., Ohno, K., Shiga, K., Yoshida, K., Sugai, M., Takahashi, T., Hori, T., Watanabe, M. (2002) *Nature*, **415**, 1047–1051.
59. Jadhav, V.R., Yarus M. (2002) *Biochimie*, **84**, 877–888.
60. Jaysena, S.D. (1999) *Clin. Chem.*, **45**, 1628–1650.
61. Johnston, W.K. Unrau, P.J., Lawrence, M.S., Bartel, D.P. (2002) *Science*, **292**, 1319–1325.
62. Kolesnikov, M.P. (1991) *Orig. Life Evol. Biosph.*, **21**, 31–37.
63. Kraft B.J., Masuda S., Kikuchi, J., Tollin, G., Zaleski J.M., Bauer C.E. (2003) *Biochemistry*, **42**, 6726–6734.
64. Krasnovsky, A.A. (1981) *BioSystems*, **14**, 81–87.
65. Kritsky, M.S., Kolesnikov, M.P., Lyudnikova, T.A., Telegina, T.A., Otroshchenko, V.A., Malygin, A.G. (2001) in: *First Steps in the Origin of Life in the Universe.* / J. Chela-Flores, et al., eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 237–240.
66. Kritsky, M.S., Lyudnikova, T.A., Mironov, E.A., Neverov, K.V. (1998) in, *Exobiology: Matter, Energy and Information in the Origin and Evolution of Life in the Universe* / J. Chela-Flores and F. Raulin, eds. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, 187–190.
67. Kritsky, M.S., Lyudnikova, T.A., Mironov, E.A., Moskaleva, I.V. (1997) *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, **48**, 43–48.

68. *Kritsky, M.S., Telegina, T.A.* (2004) In: *Origins: Genesis, Evolution and Diversity of Life* / J. Seckbach, ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 215–231.
69. *Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E., Cech, T.R.* (1982) *Cell*, **31**, 147–157.
70. *Lauhon, C.T., Szostak, J.W.* (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 1246–1257.
71. *Ledbetter, J.W., Pfeleiderer, W., Freisheim, J.H.* (1995) *Photochem. Photobiol.*, **27**, 355–364.
72. *Lin, C., Robertson, D.E., Ahmad, M., Raibekas, A.A., Shuman Jorns, M., Dutton, P.L., Cashmore, A.R.* (1995) *Science*, **269**, 968–970.
73. *Linden H.* (2002) *Science*, **297**, 777–778.
74. *Linden, H., Ballario, P. and Macino, G.* (1997) *Fungal Genet. Biol.*, **22**, 141–150.
75. *Liu, R., Orgel, L.E.* (2000) *Nucl. Acid. Res.*, **23**, 3742–3749.
76. *Lohse, P.A., Szostak, J.W.* (1996) *Nature*, **381**, 442–444.
77. *Lorente, C., Thomas, A.H., Villata, L.S., Hozbor, D., Lagares, A., Capparelli A.L.* (2000) *Pteridines*, **11**, 100–105.
78. *Malhotra, K., Kim, S.-T., Walsh, C., Sancar, A.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 15405–15411.
79. *Malygin, A.G., Shemyakin, M.F.* (1979) *FEBS Letts.*, **102**, 51–54.
80. *Matulic-Adamic, J., Sanseverino, M., and Beigelman, L.* (2002) *Tetrahedron Letts.*, **43**, 4439–4441.
81. *Maurel, M.C. and Decout, J.L.* (1997) *Tetrahedron*, **55**, 3141–3182.
82. *Maurico S.G., Vargas M.A., Aparicio, P.J., Maldonado, J.M.* (1983) *Physiol. Plant.*, **57**, 411–416.
83. *Mees, A., Behrens, C., Schwegler, A., Ober, M., Carell, T.* (2003) *Eur. J. Org. Chem.*, № 14, 2670–2677.
84. *Nakamura, Y., Akiyama T., Bessho, K., Yoneda F.* (1993) *Chem. & Pharm. Chem.*, **41**, 1385–1317.
85. *Nelson, K.E., Levy, M., Miller, S.L.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3868–3871.
86. *Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H., and Buchardt, O.* (1991) *Science*, **254**, 1497–1500.
87. *Nikandrov, V.V., Pantskhava, E.S., Krasnovsky, A.A.* (1986) *Photobiophys.*, **13**, 105–114.
88. *Noller, H.F., Hoffrath, V., Zimniak, L.* (1992) *Science*, **256**, 1416–1419.
89. *Orgel, L.T.* (1968) *J. Mol. Biol.*, **38**, 381–393.
90. *Ory, J.* (1994) *J. Biol. Phys.*, **20**, 135–147.
91. *Ory, J.* (2001) In: *First Steps in the Origin of Life in the Universe* / J. Chela-Flores, et al., eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 113–120.
92. *Patel, D.T. and Suri, A.K.* (2000) *J. Biotechnol.*, **74**, 39–60.
93. *Paul, N. and Joyce, G.F.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 12733–12740.
94. *Picirilli, J.A., Mc Connel, T.S., Zaug, A.J., Noller, H.L., Cech, T.R.* (1992) *Science*, **256**, 1420–1424.
95. *Ponnamperuma, C., Chang, S.* (1971) In: *Chemical Evolution and Origin of Life* / R. Buvet and C. Ponnamperuma, eds., North Holland Publishing Company, NY, pp 216–223.
96. *Presti, D.E.* (1983) *The Biology of Photoreception*, *Soc. Exp. Biol.*, 133–180.
97. *Pyle, A.M.* (1993) *Science*, **261**, 709–714.
98. *Rajagopalan, K.V. Johnson, J.I.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 10199–10202.
99. *Robertson, D.L., Joyce, G.F.* (1990) *Nature* **344**, 467–468.
100. *Rossmann, M.G., Moras, D., Olsen, K.W.* (1974) *Nature*, **250**, 194–199.
101. *Roychowdhury-Saha, M., Lato, S.M., Shank, E.D., Burke, D.H.* (2002) *Biochemistry*, **41**, 2492–2499.
102. *Salomon, M., Christie, J.M., Knieb, E., Lempert, U., and Briggs, W.R.* (2000) *Biochemistry*, **39**, 9401–9410.

103. *Sancar, A.* (1994) *Biochemistry*, **33**, 2–9.
104. *Schmidt, W.* (1984) In: *Blue Light Effects in Biological Systems*, / H. Senger, ed. Springer Verlag, Berlin, etc., 81–94.
105. *Schwogler A., Carelli, T.* (2000) *Organ. Letts.*, **2**, 1415–1418
106. *Schwogler A., Gramlich, V., Carelli, T.* (2000) *Helvet. Chem. Acta*, **83**, 2452–2463.
107. *Spirin, A.S.* (2002) *FEBS Letts.*, **530**, 4–8.
108. *Sun, L., Cui, Z., Gottlieb R.L., and Zhang, B.* (2002) *Chem. Biol.*, **9**, 619–628.
109. *Sun, M., Moore, T., Song, P.-S.* (1972) *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1730–1740.
110. *Taylor, B.L and Zhulin, I.B.* (1999) PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential and light, *Microbiol. Mol, Biol, Rev.*, **63**, 479–506.
111. *Thomas, A.H., Lorente, C., Capparelli, A.L, Martinez, C.G., Braun, A.M., Oliveros, E.* (2003) *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2**, 245–250.
112. *Thomas, A.H., Lorente, C., Capparelli, A.L, Pochrell, M.R., Braun, A.M., Oliveros, E.* (2002) *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1**, 421–426.
113. *Turek, C., Gold, L.* (1990) *Science*, **249**, 505–510.
114. *Vargas M.A., Maurico, S.G., Maldonado, J.M., Aparicio, P.J.* (1982) *Photochem/ Photobiol.*, **36**, 223–228.
115. *Visser, C.M.* (1984) *Origins of Life*, **14**, 301–305.
116. *White, H.B., III* (1976) *J. Mol. Evol.*, **7**, 101–104.
117. *Woese, C.R.* (1967) *Genetic Code, the Molecular Basis for Genetic Expression*, Harper & Row, NY
118. *Zhang, B.L., Cech, T.R.* (1996) *Nature*, **390**, 96–100.
119. *Zhang, B.L. and Cech, T.R.* (1998) *Chem. Biol.*, **5**, 539–553.