



УДК 547.963.32:577.113.4

ПОПЕРЕЧНО-СШИТЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ: ОБРАЗОВАНИЕ, СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

© 2010 г. В. А. Ефимов[#], С. В. Федюнин, О. Г. Чахмахчева

Учреждение Российской академии наук

*Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 29.05.2009 г. Принята к печати 17.06.2009 г.

В обзоре приведены литературные данные об основных типах реагентов, способных давать поперечные ковалентные сшивки нуклеиновых кислот (НК). Обсуждается реакционная способность кросс-сшивающих агентов, предпочтительные участки их связывания, методы определения локализации сшивки в дуплексе. Рассмотрены биологические ответы клетки на появление в НК поперечных сшивок: блокировка репликации и транскрипции, запуск репарационных процессов и апоптотическая гибель клетки, а также применение кросс-сшивающих реагентов в качестве лекарственных средств и для решения различных задач молекулярной биологии.

Ключевые слова: нуклеиновые кислоты, поперечная сшивка, кросс-сшивающие агенты.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение
Азотистые иприты
Эпоксидсодержащие агенты
Соединения переходных металлов
Производные *s*-триазина
Псоралены
Антибиотики
Кросс-сшивающие агенты на основе соединений фенола
Эндогенные кросс-сшивающие агенты
Анализ структуры поперечно-сшитых ДНК и получение сшитых дуплексов олигонуклеотидов с заранее заданным положением поперечной связи
Биологический ответ клетки на появление в ДНК поперечных сшивок
Репарация поперечных сшивок в ДНК
Апоптотическая гибель клетки
Сшитые РНК-РНК- и ДНК-РНК-дуплексы и их применение в молекулярной биологии
Заключение

ВВЕДЕНИЕ

Транскрипция и репликация геномной ДНК — необходимые процессы для жизнедеятельности клетки. Одним из этапов этих процессов является расплетание двойной спирали ДНК. При ковалентной сшивке цепей ДНК между собой расплетание становится невозможным, что приводит к блокиро-

ванию процессов репликации и транскрипции и, как следствие, к остановке цикла клеточного деления [1–3]. В то же время в клетке активируется комплекс ферментов репарации, служащий для устранения различных повреждений в НК. Способы репарации участков молекулы ДНК, содержащих поперечную сшивку, различны для клеток прокариот и эукариот и базируются на трех основных процессах: удалении поврежденного участка, гомологичной рекомбинации и синтезе на поврежденной матрице [3–7]. Кроме репарационных систем, в клетке также работают следящие системы, которые оценивают функциональное состояние ДНК в каждый момент времени, наличие повреждений и возможность их своевременного устранения. При этом для репарации кросс-сшивок, в отличие от исправлений других повреждений ДНК, требуется гораздо больше времени и энергозатрат, поэтому при большом количестве поперечных сшивок их своевременное устранение оказывается невозможным. В этом случае в конечном счете происходит гибель клетки в результате индукции апоптоза [8–12]. Было обнаружено, что даже одна трудно поддающаяся репарации сшивка способна убить клетку бактерии или дрожжей, тогда как 40 сшивок бывает уже достаточно для гибели клеток млекопитающих с ослабленной системой репарации [3].

Сшивки между цепями НК могут возникать в организме под действием как вносимых извне химических реагентов, так и эндогенно образующихся соединений. В результате интенсивных исследований, проведенных многочисленными группами ученых, был сделан вывод, что почти все кросс-

[#] Автор для связи (тел.: 495-336-59-11; эл. почта: eva@mx.ibch.ru).

сшивающие соединения, независимо от их химической природы, в физиологических условиях функционируют как алкилирующие (арилирующие) реагенты. Кроме того, бифункциональные реагенты обычно демонстрируют на порядки более сильный биологический эффект, чем их монофункциональные аналоги.

В настоящее время кросс-сшивающие реагенты используются как противоопухолевые препараты, а также как инструменты для исследования особенностей биологического поведения поперечно-сшитых дуплексов НК [13]. Следует отметить, что хотя разработка и поиск новых кросс-сшивающих реагентов идет уже давно, детальное изучение механизма их взаимодействия с ДНК, определение предпочтительных мест связывания и других характеристик стало возможным сравнительно недавно благодаря развитию методов олигонуклеотидов, а также совершенствованию физико-химических методов анализа.

В настоящем обзоре кратко рассмотрены основные типы кросс-сшивающих реагентов, их применение для получения поперечно-сшитых дуплексов НК, а также биологический ответ клеток на появление в них сшитых НК.

АЗОТИСТЫЕ ИПРИТЫ

Исследования химических реагентов, способных поперечно сшивать НК, начались 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 использования его в качестве противоракового препарата [14]. В первой половине 30-х гг. XX века было показано, что иприт вызывает регрессию некоторых видов опухолей животных и человека. Дальнейшие интенсивные исследования в этой области привели к созданию менее токсичных аналогов сернистого иприта – азотистых ипритов [15]. Первое использование этих веществ в клинической практике датируется 1946 годом [16], после чего было синтезировано и исследовано большое количество различных соединений подобного типа [17, 18]. В то же время появились предположения о том, что противоопухолевая активность этих соединений обусловлена их способностью образовывать сшивки между двумя цепями ДНК, на что указывали некоторые данные по денатурации ДНК, обработанной такими реагентами [19]. Затем появились сообщения о сильном уменьшении молекулярной массы ДНК при алкилировании азотистыми ипритами, а также об уменьшении количества пуринов при обычном высаживании обработанных азотистыми ипритами ДНК в виде

серебряных солей [20], что указывало на участие пуриновых оснований в образовании кросс-сшивок.

Азотистые иприты представляют собой наиболее хорошо изученный класс кросс-сшивающих реагентов. Типичным представителем этого класса является эмбихин (I) (рис. 1). Вследствие высокой реакционной способности по отношению к различным биологическим субстратам, азотистые иприты обладают довольно низкой селективностью. К настоящему времени опубликовано большое количество работ по повышению эффективности и избирательности действия соединений этого класса, в частности, с помощью создания их конъюгатов с различными ароматическими производными, способными интеркалировать в молекулу ДНК. Примером такого рода агентов могут служить конъюгаты азотистых ипритов с 9-аминоакридином, имеющим высокую константу связывания с ДНК [21, 22].

Азотистый иприт типа (II) представляет собой соединение, которое в обычном состоянии нетоксично, но активируется, т.е. становится токсичным, при восстановлении *N*-оксида до амина [23]. Терапия этими производными основана на том, что клетки, находящиеся в глубине большинства солидных опухолей, являются кислорододефицитными из-за плохого снабжения кровью и при этом содержат большое количество редуктаз. Благодаря этим обстоятельствам время жизни восстановленного токсичного производного иприта в раковых клетках существенно увеличивается по сравнению с его временем жизни в обычных тканях, что позволяет добиться желаемого терапевтического эффекта.

Другой класс гипоксиселективных производных эмбихина получен в работе [24] и включает в себя конъюгаты четвертичной соли эмбихина с различными нитрогетероциклическими соединениями, наиболее перспективным из которых оказался конъюгат с 1-метил-4-нитроимидазолом (III). В присутствии кислорода эти соединения неактивны по отношению к ДНК, однако в анаэробных условиях при наличии восстановителя они высвобождают эмбихин в результате прохождения восстановительной фрагментации (рис. 1) [24].

Принципиально новый подход к конструированию ипритных производных основан на применении соединения (IV), активируемого с помощью восстановления Cu^{2+} до Cu^{1+} , при котором происходит образование менее стабильного комплекса с последующим высвобождением активного реагента [25]. Этот процесс может протекать только в клетках с повышенным содержанием редуктаз, при этом образующийся 1,4,7,10-тетраазациклотетрадекановый иприт больше не превращается в неактивный предшественник.

Ранее было высказано предположение о том, что специфическим местом присоединения ипритов к

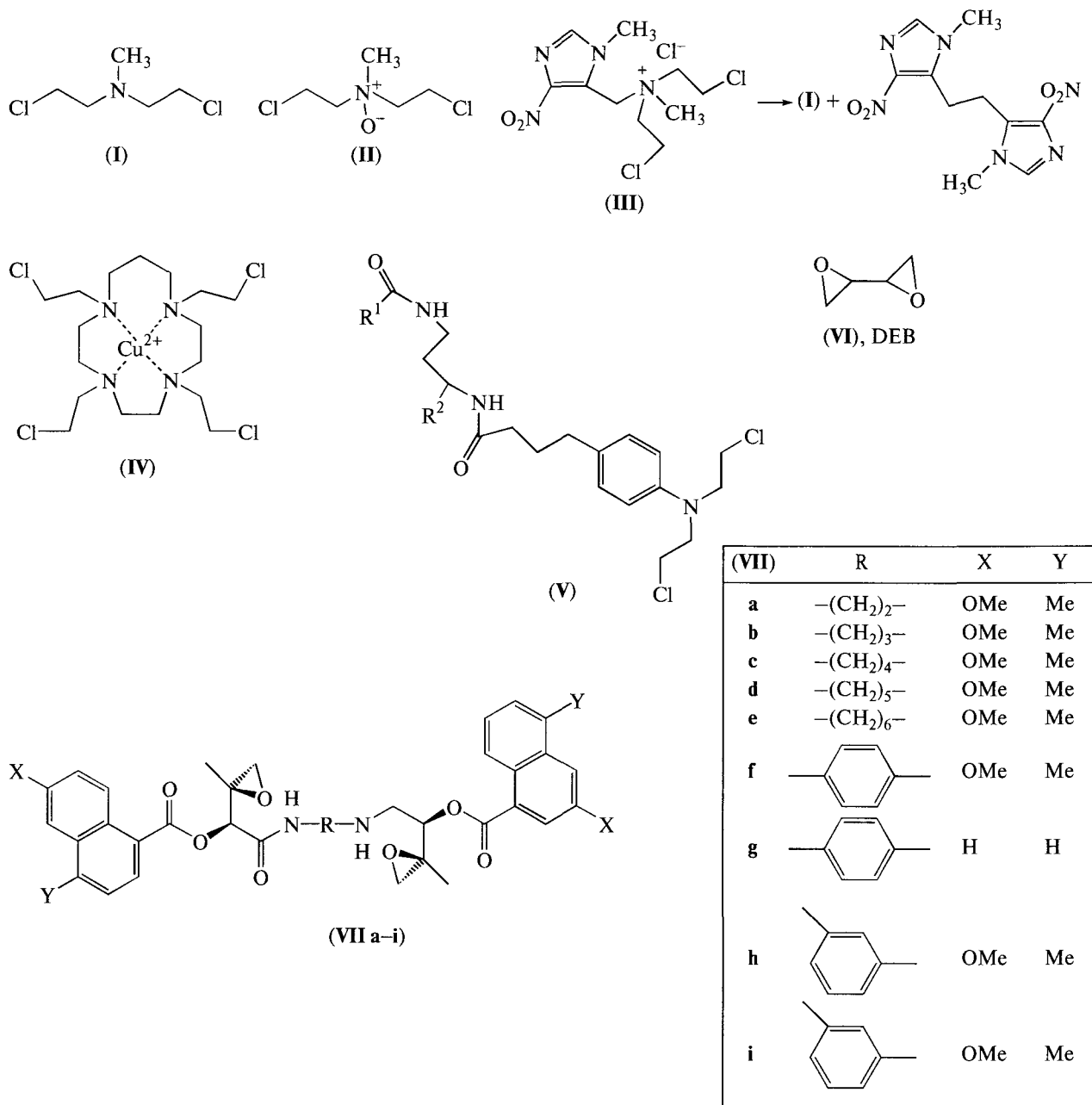


Рис. 1. Кросс-сшивающие реагенты на основе азотистых ипритов (I)–(V) и эпоксидсодержащих соединений (VI), (VII). R¹ и R² – полиамидные цепи, состоящие из остатков имидазола, пиррола и β-аланина.

молекуле ДНК, находящейся в В-форме, является последовательность GC*. Однако более поздние работы показали, что сшивка чаще происходит в местах расположения последовательности GMC (где N – любой нуклеотид) [26]. При этом происходит алкилирование остатков гуанина по N7-положению в большой бороздке ДНК в обеих цепях дуп-

лекса. Предложенный механизм этого процесса включает промежуточное образование положительно заряженного иминиевого цикла (рис. 2а).

Одним из соединений, широко используемых в химиотерапии хронического лимфолейкоза, лимфо- и ретикулосаркомы (и др. форм рака), является ароматическое производное азотистого иприта – хлорамбуцил, эффективность и специфичность действия которого может быть повышена более чем

* Здесь и далее в обозначениях дезоксиолигонуклеотидов приставка d и тип связи (5' → 3') опущены.

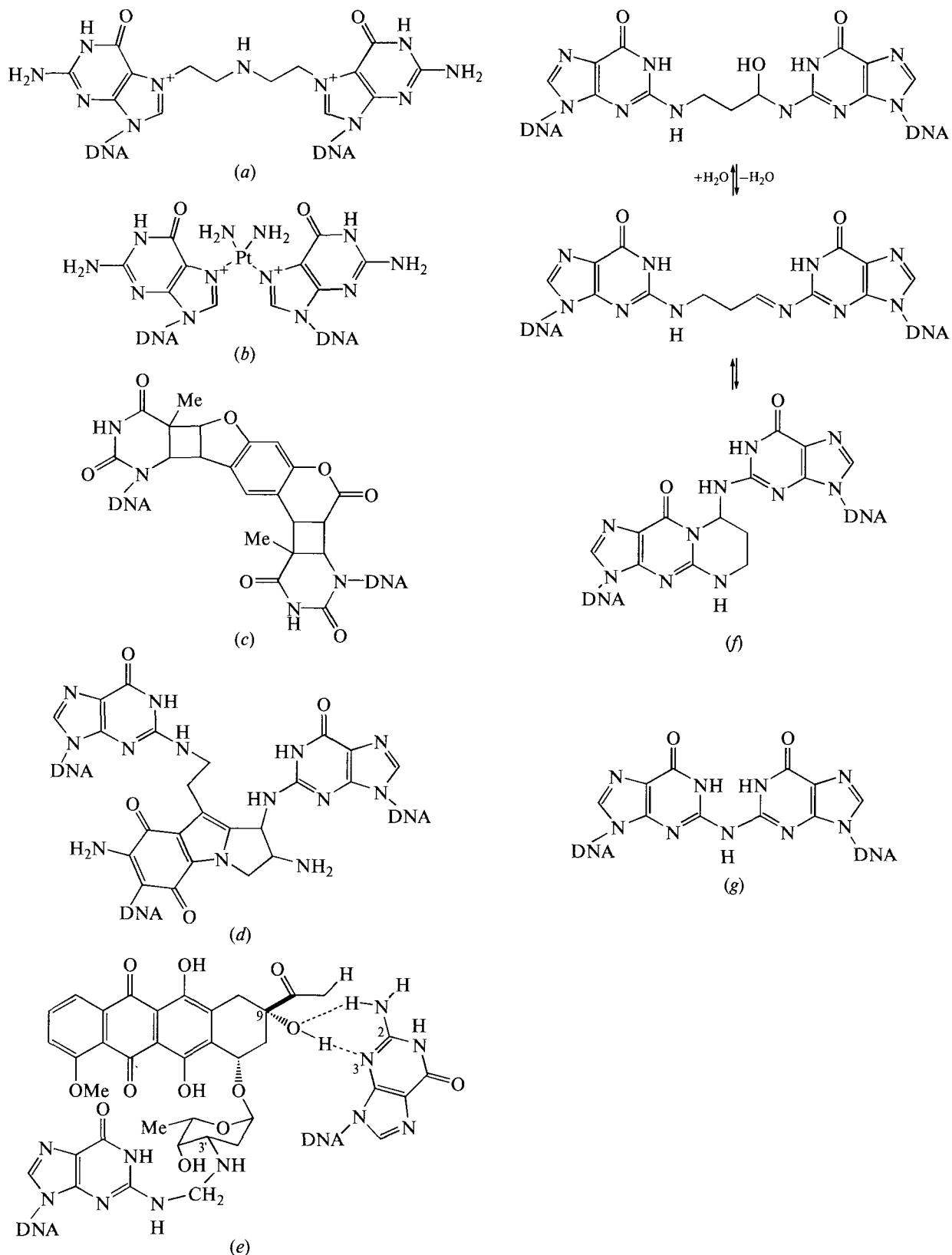


Рис. 2. Структуры поперечных сшивок, образующихся под действием кросс-сшивающих реагентов: азотистого иприта (a), *cis*-диаминодихлорплатины (b), псоралена (c), митомцина С (d), дауномицина (e) и возникающих под действием эндогенных агентов: акролеина (f) и азогистой кислоты (g).

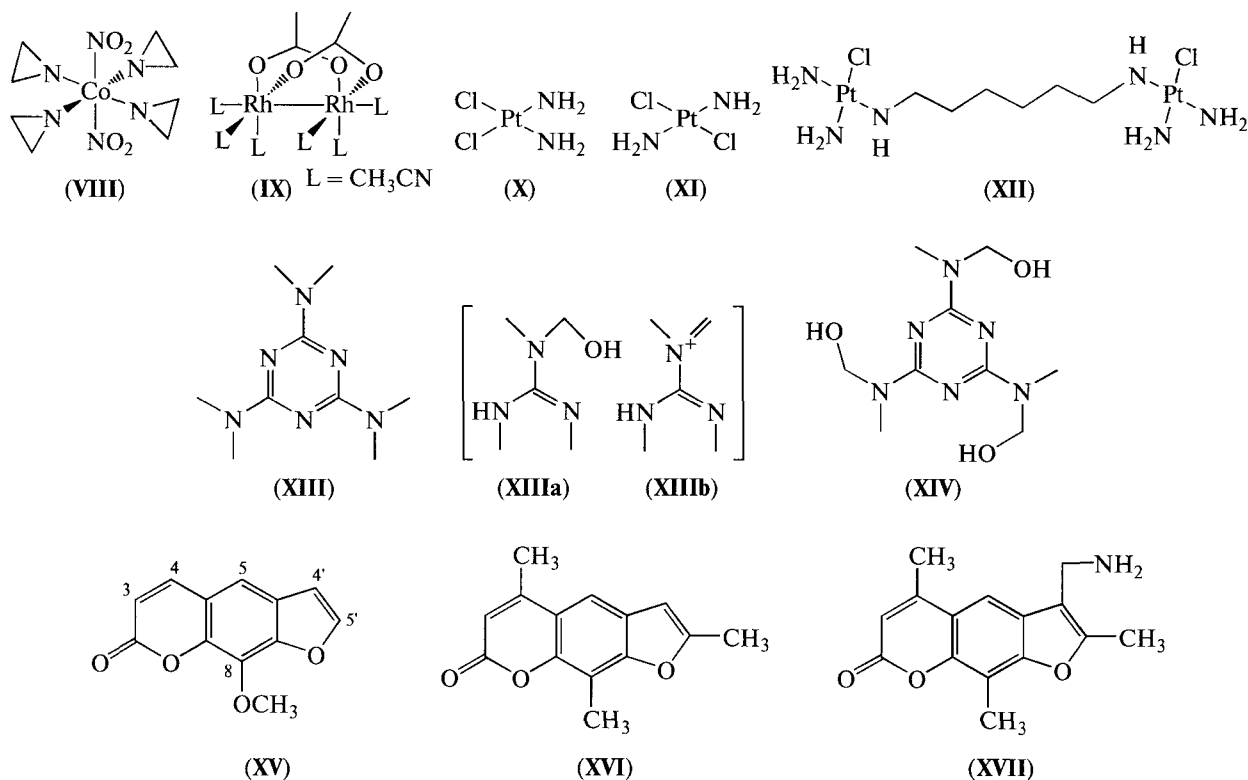


Рис. 3. Соединения переходных металлов (VI)–(X), триазиновые производные (XI)–(XIII) и псоралены (XIV), (XV), используемые в качестве поперечно-сшивающих реагентов.

в 100 раз за счет использования его конъюгатов с полиамидами (V) [27]. Так, было показано, что конъюгат хлорамбуцила с сиквенспецифичным пирролимидазолиевым полиамидом способен алкилировать N3-положение аденина и ковалентно сшивать цепи ДНК в последовательности -AGCTGCA-, являющейся полиамидсвязывающим участком; при этом сшивка происходит в малой бороздке.

ЭПОКСИДСОДЕРЖАЩИЕ АГЕНТЫ

В 1951 г., параллельно с развитием исследований азотистых ипритов, было обнаружено, что подобным действием на раковые клетки обладают производные эпоксидов, этилениминов и фосфамидов [28]. Диэпоксидбутан (DEB, (VI)) является самым простым из большого числа эпоксидсодержащих алкилирующих агентов (рис. 1). В работе [29] было предложено, что механизм образования кросс-сшивки диэпоксидбутаном аналогичен механизму действия азотистых ипритов. Этот вывод основывался на данных о наличии в продуктах реакции диола с двумя остатками дезоксигуанозина, алкилированным по 7-положению. В настоящее время установлено, что предпочтительным местом образования кросс-сшивки является фрагмент GC'. При этом самым эффективным из стереоизомеров DEB

является *S,S*-изомер [30]. С меньшей эффективностью DEB также образует кросс-сшивки в последовательностях GGCC, TGCA, TCGA, CCGG, TATA. Кроме того, были получены димерные аналоги природных противоопухолевых эпоксидсодержащих антибиотиков азиномицинов (VIIa)–(VIIe), содержащие аминоалкильные спейсеры различной длины [31]. Эти соединения обладают более высокой кросс-сшивающей и противоопухолевой активностью по сравнению со своими мономерными предшественниками. Позже были синтезированы похожие димеры (VIIf)–(VIIi), содержащие более жесткий ароматический спейсер, и было показано, что они обладают повышенной токсичностью по сравнению с производными (VIIa)–(VIIe) [32].

СОЕДИНЕНИЯ ПЕРЕХОДНЫХ МЕТАЛЛОВ

На сегодняшний день известно достаточно большое число соединений переходных металлов, способных связываться с ДНК, в том числе комплексы кобальта (II) (VIII) [33] и родия (II) (IX) (рис. 3) [34]. К той же группе формально можно отнести вышеупомянутое соединение меди (IV). Однако наиболее широкое применение в противоопухолевой терапии нашли соединения платины, такие, как *цис*-диаминодихлорплатина (X), *транс*-диаминодихлорплати-

на (XI) и димерные соединения типа (XII). Среди всех продуктов взаимодействия *цис*-изомера (X) с двухцепочечной ДНК преобладают сшивки по одной цепи, 65% из которых образуются по GG-последовательностям, а поперечные сшивки присутствуют лишь в малом количестве на GC-участках [35]. При этом сшивка сильно искажает структуру ДНК и оба остатка цитозина в последовательности -GC- оказываются полностью выведенными из дуплекса [36]. Данные ЯМР свидетельствуют о том, что кросс-сшивка располагается в большой бороздке дуплекса и вызывает локальный переход правовращающей *B*-формы ДНК в левовращающую *Z*-форму (рис. 2b).

Подробное описание способов присоединения платиновых агентов к ДНК и возникающий клеточный ответ приведены в обзоре [37]. В отличие от своего *цис*-аналога, *транс*-форма (XI) обладает очень низкой противоопухолевой активностью, так как образует в основном продукты моноприсоединения к ДНК. Однако цитотоксичность *транс*-формы может быть повышена до уровня соединения (X), если обработку проводить с одновременным облучением УФ-светом в диапазоне 320–380 нм [38]. Исследование взаимодействия соединения (XI) с гуанозин-5'-фосфатом под действием УФ-света показало, что в результате образуется три продукта: *транс*-[Pt(¹⁵NH₃)₂(GMP)(OH₂)]²⁺, *транс*-[Pt(¹⁵NH₃)₂(GMP)Cl]⁺ и *транс*-[Pt(¹⁵NH₃)₂(GMP)]₂, что указывает на возможность протекания реакции через индуцированную светом потерю соединения (XI) двух атомов хлора.

С целью повышения эффективности кросс-сшивающих агентов на основе соединений платины различными группами также были получены димерные соединения (XII), которые показали высокую эффективность и давали намного больший процент поперечных сшивок среди всех продуктов присоединения по сравнению со своими мономерными аналогами [39, 40].

ПРОИЗВОДНЫЕ *s*-ТРИАЗИНА

Среди производных *s*-триазина ярко выраженной противоопухолевой активностью обладают гексаметилмеламин (XIII) и тримеламол (XIV) (рис. 3) [41]. Гексаметилмеламин представляет собой пример агента, активируемого с помощью окисления. Было обнаружено, что в организме происходит его окисление цитохромом P-450 и образование метильного фрагмента (XIIIa). Предполагается, что соединение (XIIIa) способно превращаться в активный иминиевый ион (XIIIb), обладающий алкилирующей активностью. Далее аналогичный ион образуется в другой части молекулы (XIII), и в конечном итоге происходит образование кросс-сшивки ДНК [42]. Позднее с учетом данных о механизме действия гексаметилмеламина было синтезировано

и изучено другое триазиновое производное – тримеламол (XIV), преимуществом которого является повышенная растворимость в воде по сравнению с гексаметилмеламином [43]. Предпочтительные участки образования поперечной сшивки ДНК этими соединениями пока не установлены, равно как и структура образующегося ДНК-аддукта [44].

ПСОРАЛЕНЫ

Псорален и его производные представляют собой класс фурукумаринов и являются веществами растительного происхождения. Эти полиароматические соединения образуют с ДНК ковалентные аддукты и сшивки под действием облучения длинноволновым УФ-светом. Среди псораленов наиболее изученными являются 8-метоксипсорален (XV), 4,5',8-триметилпсорален (XVI) и 4'-аминометил-4,5',8-триметилпсорален (XVII) (рис. 3) [7, 45].

Инициирование образования поперечных сшивок псораленами в ДНК-дуплексах протекает через стадию интеркаляции планарного трициклического соединения между плоскостями двух пар оснований ТА или АТ путем поглощения кванта света и прохождения реакции фотоциклоприсоединения к 5,6-двойной связи тимидина 4',5'-двойной связи фуранового цикла, или 3,4-двойной связи кумарина. При этом, если присоединение изначально происходит с участием пиранонового цикла, кумариновое кольцо разрушается, а полученный продукт оказывается неустойчивым и кросс-сшивка не образуется. Напротив, если первым реагирует фурановый фрагмент, то в дальнейшем интактное кумариновое кольцо может поглощать второй квант света и вступать в реакцию циклоприсоединения, в результате которой образуется сшивка (рис. 2c).

Структура продукта поперечной сшивки ДНК псораленом изучалась на синтетических ДНК-дуплексах длиной 8 п.о. с помощью ЯМР-спектроскопии [46]. 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 *B*-форму уже на расстоянии 3 п.о. от места сшивки. Следует отметить, что сшивки ДНК псораленами достаточно стабильны химически и их можно легко воспроизвести на дуплексах, образованных синтетическими олигонуклеотидами. Поэтому часто исследования механизмов репарации поперечных сшивок в ДНК проводятся на примере сшивок этими соединениями.

АНТИБИОТИКИ

Особое место в истории разработки кросс-сшивающих препаратов занимает открытие и исследование природных противоопухолевых антибиотиков. В 1956 г. в Японии из культуральной жидкости

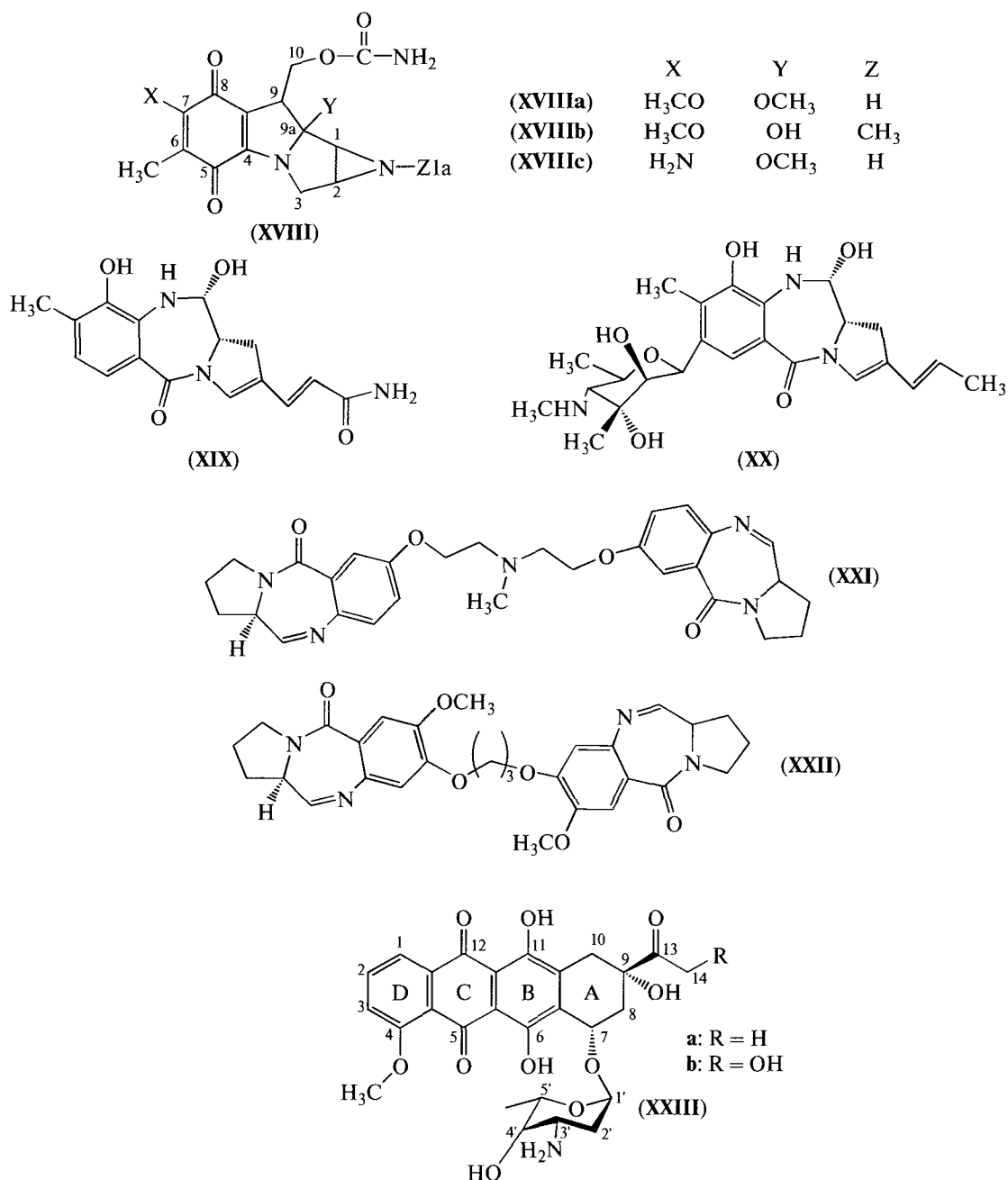


Рис. 4. Противоопухолевые антибиотики, обладающие кросс-сшивающей активностью.

Streptomyces caespitosus были выделены митомцины А и В [47], а двумя годами позже — митомцин С [48]. Эти соединения являются производными митозана (XVIII) и отличаются друг от друга природой заместителей в 1а-, 7- и 9а-положениях остова этой молекулы [49] (рис. 4). Строение этих соединений было установлено в 1962 г., и уже в следующем году был доказан молекулярный механизм их действия, включающий ковалентное связывание компонен-

тарных цепей ДНК, что и является причиной их высокой цитотоксичности и противоопухолевой активности [50]. Причем митомцины А (XVIIIa) и В (XVIIIb) не привлекли большого внимания исследователей вследствие их слишком высокой цитотоксичности, которая была выявлена уже в ходе первых экспериментов на лабораторных животных. В то же время митомцин С (XVIIIc) стал широко применяться в химиотерапии рака с 1974 г.

Многочисленные исследования показали, что активация митомицина С с последующим образованием поперечной сшивки ДНК происходит в результате многостадийного процесса (схема 1), ключевыми этапами которого являются первоначальное ферментативное или химическое восстановление хинонового фрагмента до 1,4-гидрохинона (**XVIII d**), элиминирование молекулы метанола из положения 9a соединения (**XVIII d**) с образованием митозена и раскрытие азиридинового кольца с образованием активного электрофильного центра при атоме уг-

лерода в 1-м положении (**XVIII e**), способного взаимодействовать с различными нуклеофилами, в том числе и с аминогруппами гетероциклических оснований нуклеотидов [1, 51]. Дальнейшая цепь превращений включает в себя элиминирование карбоксильной группы при атоме углерода в 10-м положении с образованием высокореакционноспособного метида (**XVIII i**), который алкилирует аминогруппу нуклеотида из комплементарной цепи ДНК, что приводит к образованию поперечной сшивки.

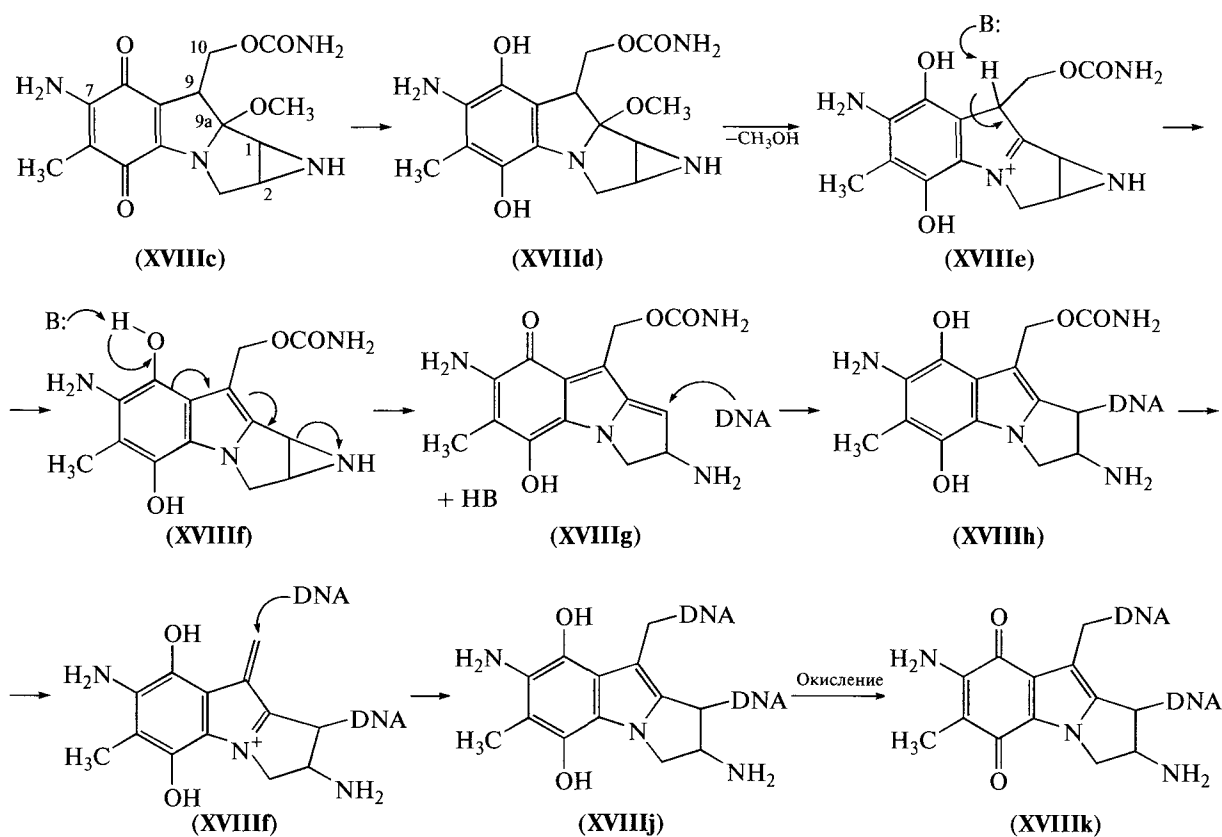


Схема 1. Механизм поперечной сшивки ДНК митомицином С.

Структура аддукта митомицина С с ДНК, приведенная на рис. 2d, была установлена в 1987 г. [52]. Было показано, что присоединение антибиотика (**XVIII e**) происходит в месте расположения фрагмента 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 B-формы ДНК, приводя лишь к незначительному уширению малой бороздки в месте сшивки [53, 54].

В последующие годы усилия ученых были направлены на поиск новых способов получения митомицинов и их аналогов, обладающих повышенной эффективностью и избирательностью действия, в результате чего к настоящему времени получено более 600 новых соединений. Наиболее

перспективными из них оказались димерные производные митомидина С, в которых два остатка митомидина связаны различными линкерами, отличающимися химической природой и местом прикрепления к молекуле антибиотика. Некоторые из таких димеров позволили значительно повысить региоселективность этих реагентов по сравнению с мономерным антибиотиком, а также повысить выход поперечных сшивок за счет полифункциональности этих кросс-сшивающих реагентов [55, 56].

Из антибиотиков, способных образовывать поперечные сшивки в ДНК, следует также отметить пирролбензодиазепиновые димеры, которые представляют собой синтетические производные природных предшественников антромицина (XIX) и сибиромидина (XX) [57], но, в отличие от природных аналогов, обладают способностью образовывать кросс-сшивки. Было показано, что димеры типа (XXI), (XXII) (рис. 4), содержащие алифатический мостик длиной в 3 или 5 атомов углерода, обладают высокой кросс-сшивающей активностью [58]. При этом отмечается, что эти димеры специфичны к тем последовательностям в ДНК, которые гораздо чаще встречаются в кодирующих участках генома, чем в некодирующих (например, AGATTCT, GGATCC).

Среди других антибиотиков, обладающих способностью образовывать ковалентные связи с ДНК, особо следует отметить противоопухолевые антибиотики антрациклинового ряда, которые были открыты в 1950 г. в культуральной жидкости *Streptomyces purpurascens* [59], а в дальнейшем были обнаружены во многих других штаммах стрептомицетов. С момента открытия и до настоящего времени было синтезировано несколько тысяч различных аналогов и производных антрациклинов, некоторые из которых вошли в практику химиотерапии рака. В первую очередь это даунорубин (дауномицин), независимо открытый в начале 60-х гг. XX века в двух фармацевтических компаниях: "Farmitalia" (Италия) и "Ron Pulek" (Франция), и доксорубин (андриамицин), открытый несколько позже в "Farmitalia" [60].

Даунорубин (XXIIIa) представляет собой гликозид, состоящий из агликона — 4-метокси-6,7,9,11-тетрагидрокси-9-ацето-7,8,9,10-тетрагидротетраценхинона и аминоксахара — 3-амино-2,3,6-тридезоксид-*L*-ликсозы (даунозатин) (рис. 4). Доксорубин (XXIIIb) отличается от даунорубина наличием дополнительной гидроксильной группы при С14-атоме каркаса молекулы. Общим для антибиотиков ряда антрациклинов является наличие сильного хромофора антрахинонового типа, обладающего характерной флуоресценцией, а также присутствие в С9-положении агликона гидроксильной группы, играющей важную роль в проявлении биологической активности этих соединений.

Механизм цитотоксичности антибиотиков антрациклинового ряда до конца не изучен и скорее всего плейотропен [61, 62]. Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что основной молекулярной мишенью этих антибиотиков является ДНК, с которой они способны образовывать прочные комплексы с константой связывания $\sim 10^8 \text{ M}^{-1}$. В основе этого взаимодействия лежит интеркаляция антибиотика в ДНК между гетероциклическими основаниями дезоксицитидина и дезоксигуанозина. Впервые это было показано в 1987 г. рентгеноструктурным анализом кристаллов комплекса двух молекул даунорубина и одной молекулы дуплекса, образованного самокомплементарным гексануклеотидом CGTACG, с разрешением 1.2 \AA [63]. Установлено, что 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 ($\sim 3.09 \text{ \AA}$) от N2-атома гуанина. Это создавало предпосылку для образования ковалентной связи между 3'-аминогруппой даунозатина и N2-атомом гетероцикла гуанина при действии небольшого бифункционального электрофильного реагента, например формальдегида, что и было показано авторами работ [64, 65], обнаружившими между двумя сближенными аминогруппами метиленовый мостик, ковалентно связывающий антибиотик с ДНК (рис. 2e).

Согласно работе [66], источником формальдегида могут служить самые различные соединения: Трис-НСI 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). На схеме 2 показано образование формальдегида из доксорубина по реакции Байера-Виллигера. В пользу этого механизма свидетельствуют также данные работ [67, 68], в которых с применением масс-спектрометрии был проведен анализ содержания формальдегида в клетках, обработанных доксорубином и даунорубином, по сравнению с необработанными клетками. В результате было выявлено, что уровень содержания формальдегида в обработанных клетках выше и является функцией от концентрации препарата. Были также выявлены две водородные связи гидроксильной группы при С9-атоме агликона с N2- и N3-атомами азота второго остатка гуанина [69] (рис. 2e).

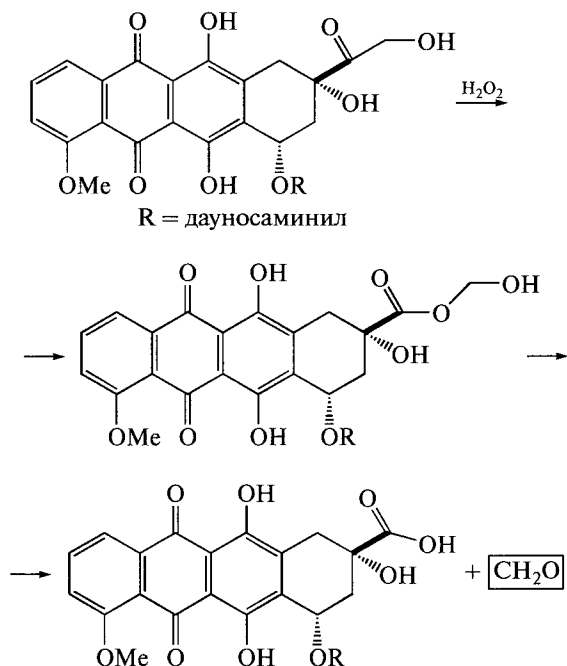
КРОСС-СШИВАЮЩИЕ АГЕНТЫ
НА ОСНОВЕ СОЕДИНЕНИЙ ФЕНОЛА

Схема 2. Окисление доксорубина перекисью водорода по Байеру-Виллигеру с выделением формальдегида.

Аналогичное строение аддукта ДНК-антибиотик было показано и для доксорубина с той лишь разницей, что была фиксирована дополнительная водородная связь между ОН-группой при атоме С14 и ближайшей фосфатной группой ДНК [69]. Таким образом, оказалось, что с формальной точки зрения антибиотики доксорубин и даунорубин образуют ковалентную связь только с одной из цепей ДНК, в то время как в другую цепь происходит интеркаляция агликона, закрепленная образованием двух водородных связей. 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 лекарственных препаратов на их основе при сохранении необходимой цитотоксичности [70, 71]. Димерные конъюгаты антрациклиновых антибиотиков с формальдегидом: доксосформ, дауноформ и эпидоксосформ оказались исключительно активными против устойчивых к исходным антибиотикам опухолевых клеток [72–74].

В течение последних лет был получен ряд поперечно-сшивающих реагентов, содержащих в своей структуре фрагменты фенола (XXIV)–(XXVII) (рис. 5) [75–77]. Предполагаемый механизм, по которому происходит кросс-сшивание в присутствии этих соединений, включает образование промежуточных соединений хинонового типа, которые являются хорошими акцепторами Михаэля и реагируют с нуклеофильными группировками нуклеиновых оснований по β -углеродному атому по отношению к кетогруппе. Образование реакционноспособных интермедиатов индуцируется окислением периодатом натрия [в случае производных (XXIVa), (XXIVb), (XXV), (XXVII)] или УФ-светом [в случае соединений (XXVI) и (XXVII)]. Преимуществом этих соединений является хорошая растворимость в воде и высокая кросс-сшивающая активность. В работе [75] отдельно отмечается, что при обработке бисфенолом (XXVI) опухолевых клеток человека, последние подвергаются апоптозу, что в дальнейшем может быть использовано для разработки апоптозиндуцирующих противоопухолевых препаратов.

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, такими, как формальдегид, ацетальдегид и малоновый альдегид. В ДНК человека были также обнаружены $1,N^2$ - γ -гидроксипропано-dG-аддукты, образующиеся при действии α,β -ненасыщенных альдегидов (еналей), в частности акролеина, кротонового альдегида и 4-гидроксиноналя (4-HNE), которые являются эндогенными побочными продуктами окислительной дегградации ненасыщенных липидов. Они могут также действовать как экзогенные агенты, происходящие, например, из сигаретного дыма или автомобильных выхлопов. Наличие подобных аддуктов приводит к расположенным в малой бороздке поперечным сшивкам ДНК между остатками гуанина в соседних C-G- и G-C-парах последовательностей CpG. В ходе изучения механизма образования подобных сшивок на модельных дуплексах олигонуклеотидов, в которых определенные остатки гуанина были постсинтетически модифицированы с образованием $1,N^2$ -dGuo-енальных аддуктов, было показано, что в результате раскрытия 8-гидроксипропанового кольца происходит образование реакционноспособного альдегида, который атакуется N^2 -аминогруппой остатка dGuo из противоположной цепи [2, 78]. Образование экзоциклических $1,N^2$ -пропаноаддуктов дезоксигуано-

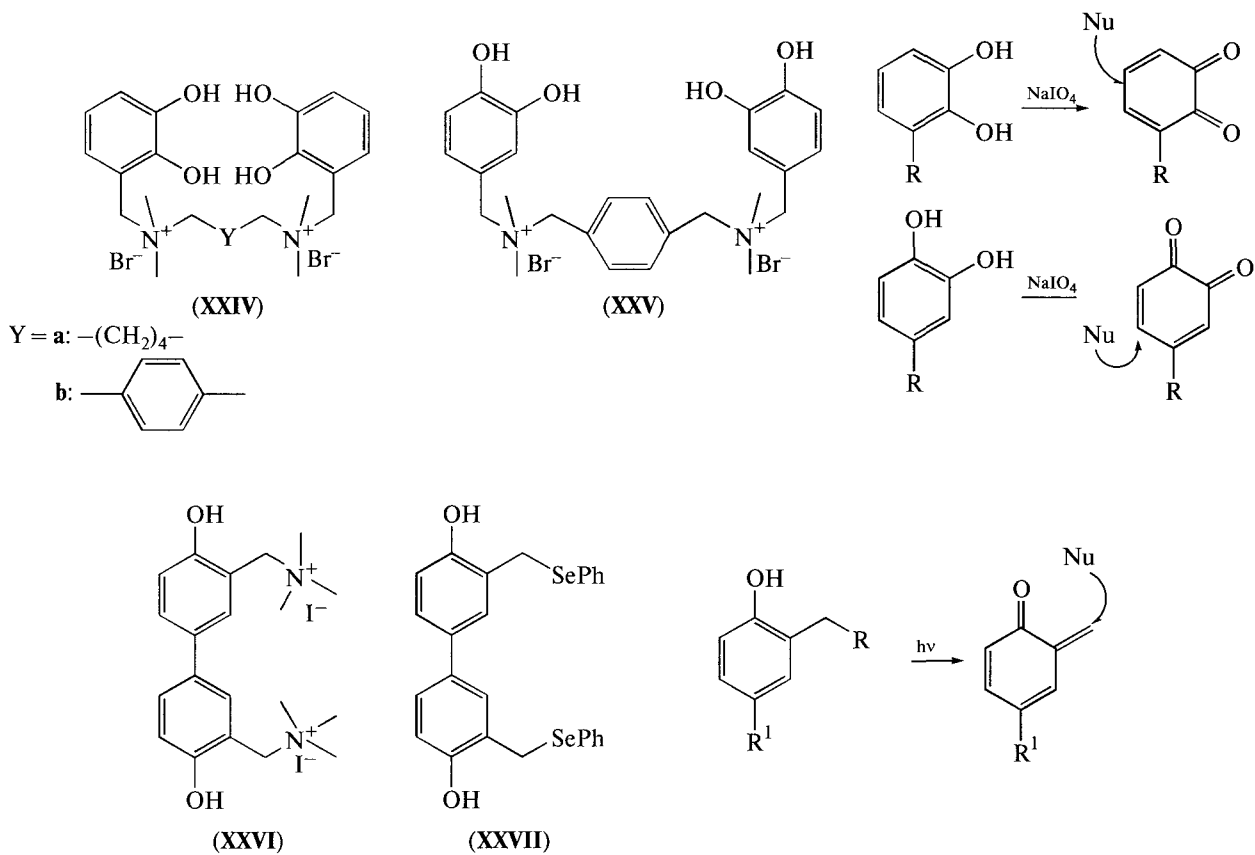


Рис. 5. Поперечно-сшивающие реагенты на основе соединений фенола и механизм их кросс-сшивающей активности.

зина и поперечных сшивок в ДНК было продемонстрировано также при действии формальдегида, ацетальдегида и малонового альдегида [79–83]. Гипотетическая структура продукта кросс-сшивки ДНК акролеином, существующая в виде равновесной смеси карбиноламина, имина и пиримидопурина, приведена на рис. 2f.

Оксид азота, который синтезируется в организме человека и выполняет ряд важных функций, тоже может образовывать поперечные сшивки. При взаимодействии с водой NO образует азотистую кислоту, которая диазотирует N^2 -остатки гуанина. Полученные диазосоли замещаются гуаниновыми аминогруппами комплементарной цепи, в результате чего возникает ковалентная связь в местах CpG-последовательностей [84–86] (рис. 2g). Два остатка гуанина в противоположных цепях соединяются через одну из экзоциклических иминогрупп. Структура сшивки была показана с помощью 2D-ЯМР-спектроскопии высокого разрешения [85, 86].

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ПОПЕРЕЧНО-СШИТЫХ ДНК И ПОЛУЧЕНИЕ СШИТЫХ ДУПЛЕКСОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ЗАРАНЕЕ ЗАДАННЫМ ПОЛОЖЕНИЕМ ПОПЕРЕЧНОЙ СВЯЗИ

Обнаружение поперечной сшивки в НК и оценка количества сшитых молекул легко осуществляется с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях. При этом сшитые дуплексы обнаруживаются в виде полос с меньшей электрофоретической подвижностью по сравнению с одноцепочечными НК [87, 88]. Для точного определения структуры сшитого фрагмента двухцепочечной НК обычно применяется ферментативное расщепление дуплекса экзонуклеазами с последующим выделением фрагмента НК, включающего ковалентную сшивку [29]. При использовании синтетического дуплекса с заданной последовательностью оснований каждой цепи в него вводится единственный предполагаемый участок сшивки. Параллельно получают контрольный дуплекс, в котором этот участок отсутствует. После обработки обоих дуплексов кросс-сшивающим реагентом наличие или отсутствие

сшивки в них можно определить с помощью гель-электрофореза. После получения информации о положении сшивки в двухцепочечной НК и предпочтительном месте связывания определенного кросс-сшивающего агента, более точную информацию о структуре и пространственном расположении сшивки, участвующих в ее образовании атомах и степени ее влияния на параметры двухцепочечной НК получают с помощью таких методов, как рентгеноструктурный анализ [89], молекулярное моделирование, ЯМР- [85, 86, 90] и масс-спектрометрия [91]. На рис. 2 приведены структуры поперечных сшивок, образуемых некоторыми кросс-сшивающими реагентами.

Накопленные знания о механизмах образования поперечных сшивок НК, эффективности и селективности действия различных реагентов позволяют создать способы направленного введения поперечных сшивок в определенные участки дуплексов с помощью химического синтеза. Сшитые двухцепочечные 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 НК [92]. Например, если механизм действия фермента предполагает расплетание двойной спирали, то наличие ковалентной связи между цепями препятствует этому процессу, и сшитые дуплексы могут служить ингибиторами таких белков. Также следует 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 для изучения особенностей их функционирования [37].

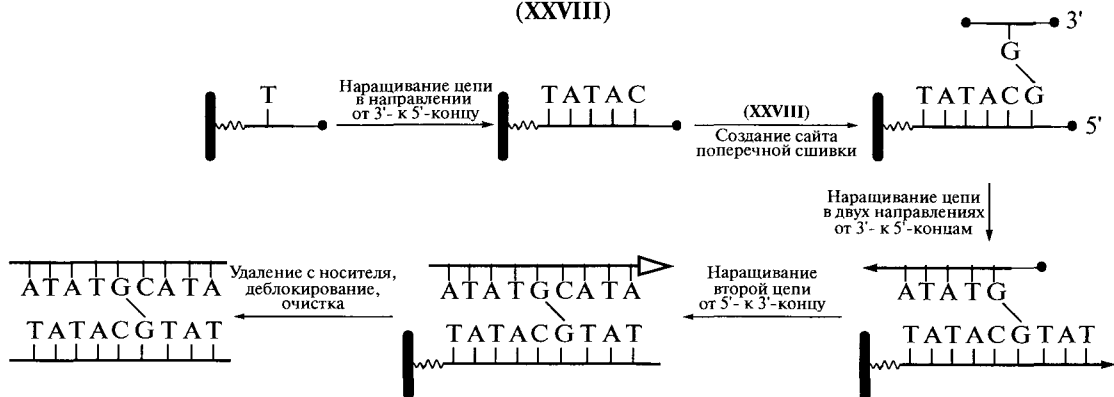
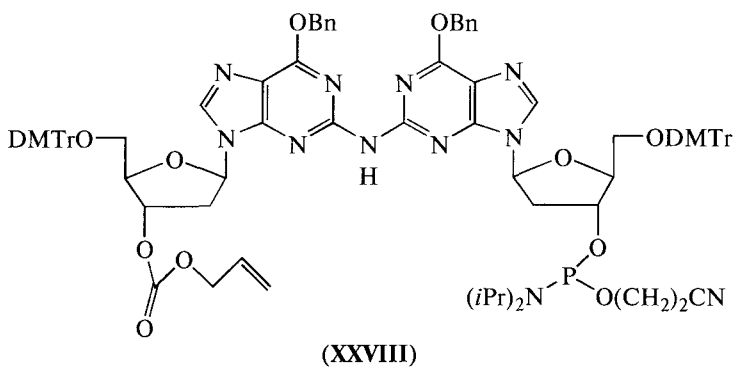
На сегодняшний день известно несколько способов направленного введения сшивки в последовательность дуплекса, образованного синтетическими олигонуклеотидами [13, 93]. Прежде всего следует отметить постсинтетическую модификацию синтетических дуплексов кросс-сшивающим агентом с последующей очисткой сшитого дуплекса от побочных продуктов, имеющих сшивки в одной из цепей, и продуктов моноприсоединения, а также от исходных олигонуклеотидов. В качестве примера можно привести работу [94], в которой предложен способ определения структуры сшивки самокомплементарных дуплексов $(CGCGCTAGCGCG)_2$ и $(ATATACGTATAT)_2$ с помощью 4,5',8'-триметилпсоралена и митомицина С, соответственно, с последующим расщеплением олигонуклеотидов нуклеазой Р1 и анализом полученных продуктов с помощью масс-спектрометрии с ионизацией в электрическом

поле и тандемной масс-спектрометрии. Основная идея метода заключается в том, что данный фермент не расщепляет фосфодиэфирную связь в 3'-положении модифицированного нуклеозида. В результате обработки дуплексов нуклеазой Р1 получают тетра-нуклеотиды с ковалентно связанными остатками тимина в нуклеотидной последовательности ТА при сшивке псораленом и гуанина в последовательности GC при сшивке митомицином С. Структуру сшивки определяют с помощью масс-спектрометрического анализа данных тетра-нуклеотидов по пикам фрагментов молекулярного иона.

Вторым способом направленного введения сшивки является гибридизация одноцепочечного олигонуклеотида с комплементарным олигонуклеотидом, содержащим в определенном месте последовательности монопроизводного 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-излучения, а в случае митомицина С — в присутствии восстановителя.

Согласно третьему способу, сшивка вводится в процессе твердофазного синтеза олигонуклеотидов. В одном из предложенных подходов сначала на твердом носителе по стандартному протоколу осуществляется наращивание олигонуклеотидной цепи до определенной длины в направлении от 3'-к 5'-концу (схема 3а). Далее полученная цепь обрабатывается активированным (например, фосфитамидным) производным динуклеозида (XXVIII), в котором два нуклеозидных остатка ковалентно связаны через основания. В результате получают олигомер с двумя 5'-концами, несущими диметокситритильные защитные группы, и одним 3'-концом, содержащим устойчивую к кислоте аллилоксикарбонильную защитную группу. После удаления двух диметокситритильных групп олигонуклеотидные цепи далее наращивают в двух направлениях, после чего удаляется 3'-защитная группа у остатка мономера с поперечной сшивкой и олигонуклеотид достраивается посредством последовательных конденсаций с 5'-фосфитамидными производными нуклеозидов. После деблокирования и удаления с носителя, полученный поперечно-сшитый дуплекс очищается с помощью ВЭЖХ или гель-электрофореза [95].

(a)



(б)

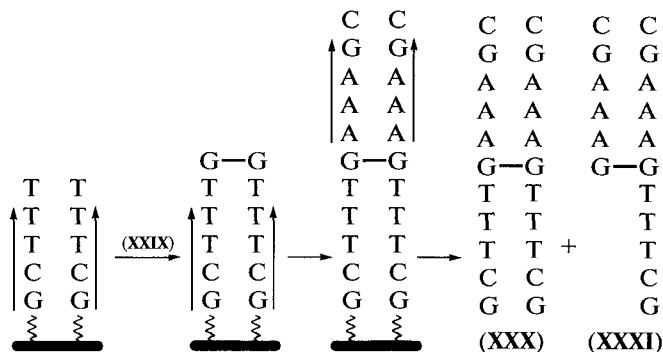
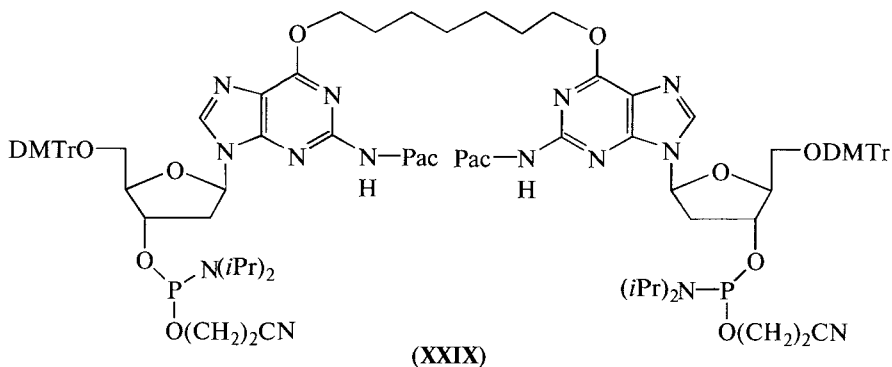


Схема 3. Получение поперечно-сшитых дуплексов твердофазным олигонуклеотидным синтезом с использованием вводимых на определенной стадии наращивания цепи димеров типа (XXVIII) (a) или (XXIX) (б). DMTr – диметокситригильная группа, Pac – феноксиацетильная группа.

Другой подход был использован для получения дуплекса, образованного самокомплементарным олигонуклеотидом и содержащего алкильную сшивку по кислородным атомам гуаниновых остатков противоположных цепей [96] (схема 3б). На первой стадии происходило одновременное наращивание двух олигонуклеотидных цепей в направлении от 3'-к 5'-концу с использованием 3'-*O*-фосфитаминов нуклеозидов. Затем на определенном этапе в конденсацию вводился димер (XXIX), представляющий собой два защищенных остатка дезоксигуанозина, соединенных между собой по O^6 -атомам гетероциклов, причем вместо стандартной изобутирильной защитной группы для аминофункции гетероциклического основания была использована феноксиацетильная группа (Pac), которая позволяла проводить деблокирование в более мягких условиях. Таким образом на этой стадии осуществлялось введение сшивки по определенному сайту олигонуклеотида. Далее продолжалось наращивание обеих цепей до определенной длины, после чего полученный дуплекс был деблокирован и очищен с использованием ВЭЖХ. Следует отметить, что наряду с целевым дуплексом (XXX) был выделен также и Y-образный олигонуклеотид (XXXI), который получился в результате присоединения димера только к одной из цепей.

Использование методов введения поперечной сшивки в процессе автоматического олигонуклеотидного синтеза было также продемонстрировано на примере синтеза дуплексов, сшитых алкильными цепями различной длины по экзоциклическим аминогруппам цитидиновых остатков [93]. Физические свойства полученных сшитых двухцепочечных фрагментов ДНК были охарактеризованы спектрами КД, кривыми термической денатурации, электрофоретическими подвижностями и ЯМР-спектроскопией высокого разрешения. Было показано, что наименьшие искажения структуры ДНК вызывала сшивка линкером в 4 метиленовых звена, длиной приблизительно 6.23 Å, что примерно соответствует расстоянию между экзоциклическими аминогруппами цитидинов GNC-последовательности *B*-формы ДНК. Эти дуплексы были в дальнейшем использованы для изучения процессов репарации поперечных сшивок в *E. coli*.

Также был разработан метод создания поперечных сшивок в синтетическом ДНК-дуплексе

с использованием реакции восстановительного аминирования [97]. Для этого при синтезе комплементарных цепей дуплекса был использован мономер (XXXII), содержащий пропандиольный фрагмент с защищенными гидроксильными группами (схема 4). После проведения наращивания цепи, на стадии деблокирования готового олигомера происходило одновременное удаление ацетильных защитных групп с гидроксильных остатков диольного фрагмента гетероцикла. После гибридизации с комплементарным олигонуклеотидом, полученный дуплекс обрабатывался периодатом натрия для получения терминальной альдегидной группы, а затем аммиаком (в виде ацетата аммония) и различными аминами, такими, как, метиламин, гидразин, этилендиамин и *N,N*-диметилендиамин, в присутствии цианборгидрида натрия для восстановительного аминирования. С помощью денатурирующего электрофореза было продемонстрировано, что в отсутствие периода натрия образование сшивки между комплементарными олигонуклеотидами не происходит, так же как и в случае использования для восстановительного аминирования ацетата аммония и метиламина. В остальных случаях на электрофореграмме наблюдались полосы, соответствующие сшитым дуплексам. Отсутствие сшивки в случае ацетата аммония и метиламина объясняется тем, что длина соответствующего линкера, который получается в результате реакции восстановительного аминирования, составляет приблизительно 7.5 Å, тогда как расстояние между положениями 7 гуаниновых остатков последовательностей GNC составляет около 8.9 Å. Обратимость реакции образования иминиевого промежуточного соединения [98] и большое расстояние в данном случае не позволяют получить желаемый результат. При этом следует отметить, что в случае применения гидразина образование сшивки протекает и в отсутствие восстановителя, что, по-видимому, связано с более высокой устойчивостью промежуточного гидразона по сравнению с иминиевыми соединениями. Полученные сшивки могут служить прекрасными моделями для изучения функционирования ДНК-дуплексов, содержащих ипритную сшивку, и при этом, благодаря замене атома азота в положении 7 на углеродный атом, исключается вероятность протекания апуринизации.

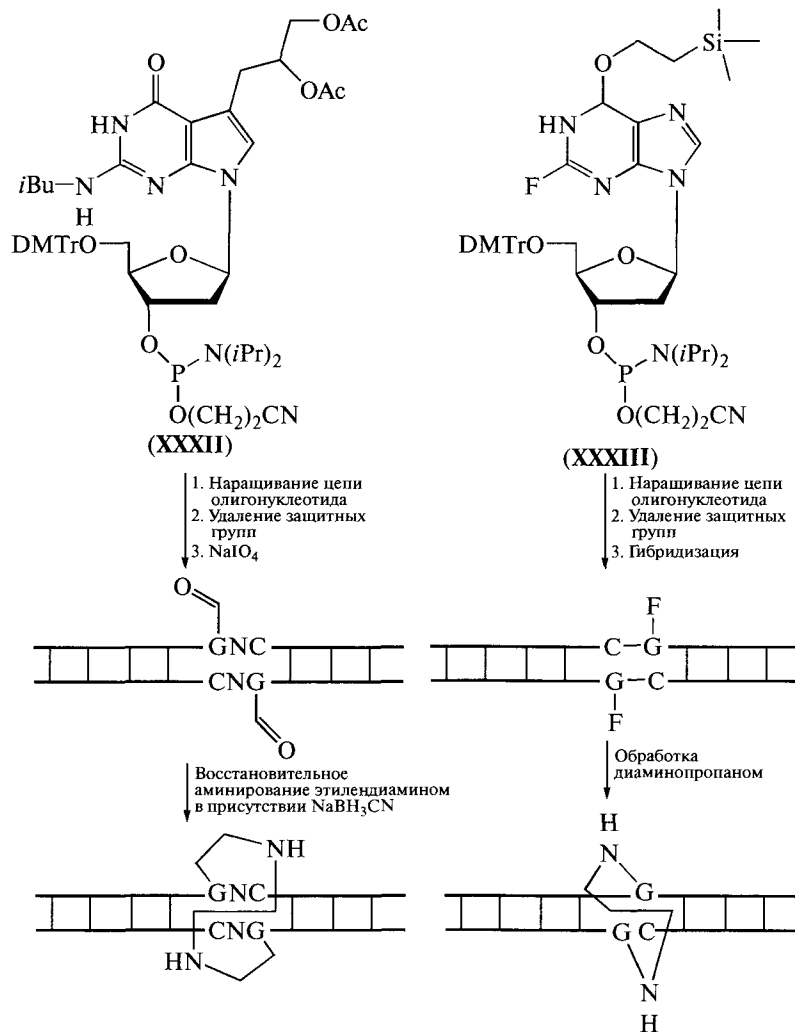


Схема 4. Получение поперечно-сшитых дуплексов с использованием постсинтетически модифицируемых олигонуклеотидов-предшественников, имеющих в определенных местах модифицированные звенья. Модифицированные олигонуклеотиды образуют дуплекс, который сшивается при действии определенных реагентов. *i*Bu – изобутироил.

Другой подход включает аналогичную процедуру, но с использованием синтона (XXXIII), который содержит во 2-положении гуанина вместо аминогруппы атом фтора. После синтеза и гибридизации олигомеров полученный дуплекс обрабатывается диаминопропаном с образованием кросс-сшивки в результате реакции замещения двух атомов фтора [98].

В последние годы широкое применение находит катализируемое солями меди (I) [3 + 2]-циклоприсоединение терминальных алкинов к азидам, имеющее название “клик-реакции” [99]. Открывая еще в 1961 г. [100], эта реакция получила новое развитие благодаря обнаружению возможности ее резкого ускорения с использованием медного катализа [101]. Она характеризуется мягкими условиями протекания, высокими выходами, возможностью ее осуществления в широком диапазоне pH 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 молеку-

лярной биологии, химии и биохимии, в частности, для создания конъюгатов НК с белками [102], для иммобилизации их на твердых носителях [103], для введения в НК различных меток [104] и т.д.

Возможность применения этой методики для получения ДНК-дуплексов, содержащих поперечные сшивки различной длины между двумя модифицированными остатками урацила, была продемонстрирована в работе [105]. Для этого были получены фосфитамидные мономеры, одни из которых содержали алкильные группы (XXXIV), а другие – блокированные аминогруппы (XXXV) (схема 5). Введение азидных групп осуществлялось путем постсинтетической обработки аминоксодержащих олигонуклеотидов *N*-оксисукцинимидным эфиром 4-азидобутановой или 6-азидогексановой кислоты. Другой недавно описанный способ введения азидных группировок в олигонуклеотиды предусматривает использование мономера типа (XXXVI) и фосфотриэфирного способа синтеза олигонуклеотидов [106].

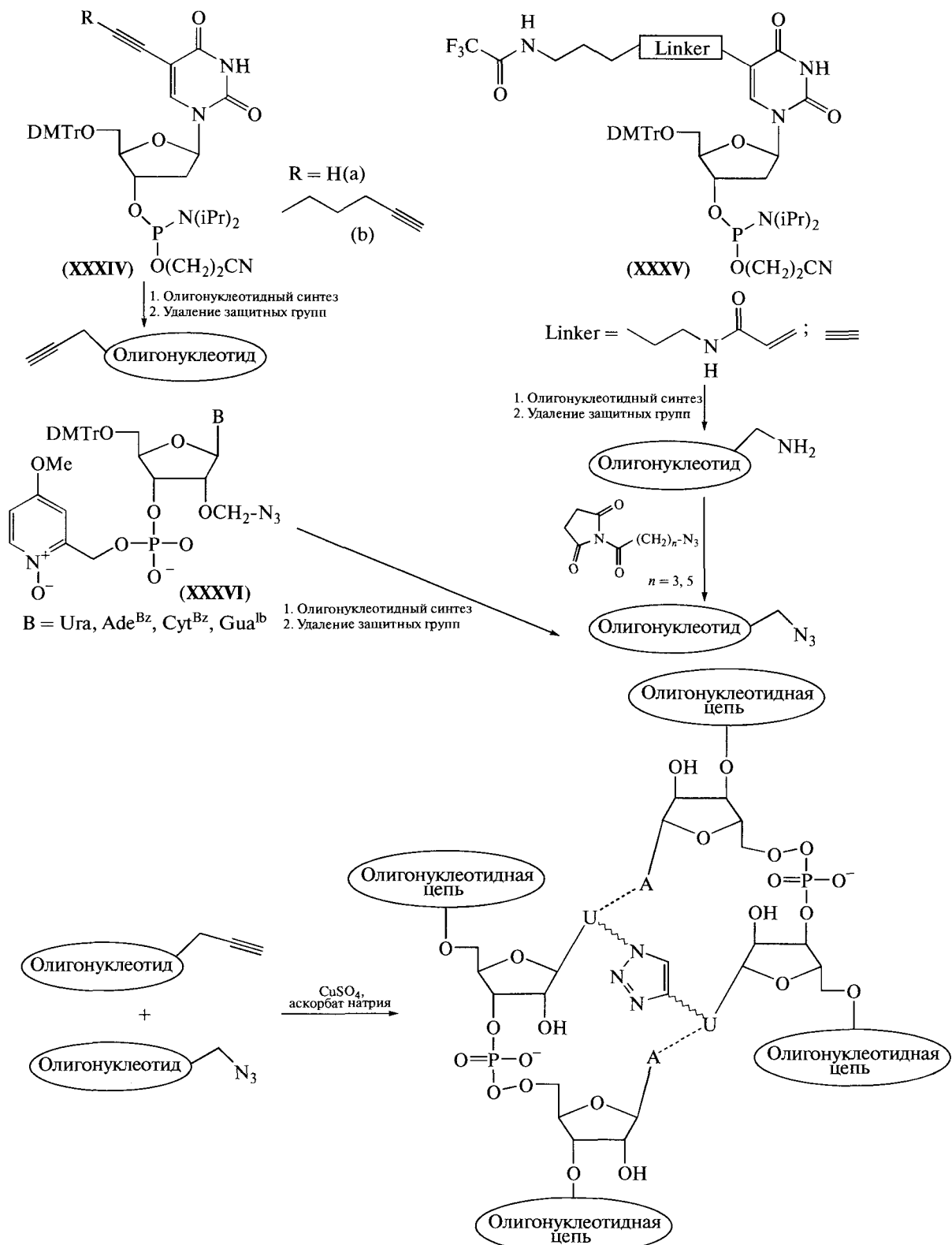


Схема 5. Получение шпиготого дуплекса с использованием клик-реакции. Предварительно полученные мономеры, одни из которых содержат алкин (**XXXIV**), а другие защищенный амин (**XXXV**) или уже готовый азид (**XXXVI**), вводятся в олигонуклеотидную цепь на определенной стадии синтеза. После удаления защитных групп олигомеры, содержащие аминогруппу, модифицируются остатками ω-азидокислот. Далее азидные и алкинильные олигонуклеотиды попарно гибридизуются и сшиваются с использованием [3 + 2] диполярного циклоприсоединения (клик-реакция).

В работе [105] было получено девять олигонуклеотидов с одинаковой последовательностью оснований, одни из которых содержали звено с алкинильной группой, а другие, комплементарные им, содержали в разных положениях азидные группы. При гибридизации азидная группа в одной цепи и алкинильная в другой оказывались в разных дуплексах на разных расстояниях. Два олигонуклеотида не содержали модификаций и использовались в качестве сравнения при измерении температуры плавления. Образование сшитых дуплексов было продемонстрировано с помощью денатурирующего гель-электрофореза. Было обнаружено, что скорость реакции образования сшивки зависела как от длины линкера, так и от положения октаиденильной 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 двухцепочечные олигонуклеотиды имеют температуру плавления в среднем на 30°C большую, чем соответствующие немодифицированные олигомеры.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ОТВЕТ КЛЕТКИ НА ПОЯВЛЕНИЕ В ДНК ПОПЕРЕЧНЫХ СШИВОК

Для нормальной жизнедеятельности клетки крайне важно сохранение нативности ДНК. Постоянный мониторинг состояния ДНК осуществляется в клетке специальными системами, которые обеспечивают устранение повреждений, возникающих под воздействием химических агентов, УФ-излучения и других факторов [107]. К подобным повреждениям также относятся поперечные сшивки ДНК, которые вызывают ряд ответов клетки, различающихся в зависимости от фазы клеточного цикла, количества сшивок, наличия генетических недостатков и т.д. [3].

Возникновение в клеточной ДНК поперечной сшивки исключает возможность расплетания двух цепей ДНК и, следовательно, блокирует в первую очередь процессы транскрипции и репликации. При осуществлении репликации поперечно-сшитой ДНК в месте ковалентной связи процесс останавливается, возникает так называемая заблокированная репликативная вилка (stalled replication fork). В результате ряда исследований было показано, что поперечно-сшивающие агенты вызывают остановку клеточного цикла в основном в фазе G2 [108]. При обнаружении поперечно-сшитой молекулы ДНК в клетке происходит ряд событий, в том числе активация репарационного белкового аппарата, значение которого состоит в устранении ковалентной сшивки. Поперечные сшивки являются одними из самых трудноустраняемых повреждений

ДНК. В клетках бактерий, дрожжей и млекопитающих репарирование поперечно-сшитых ДНК происходит по разному.

В клетках бактерий, в основном, используется два способа удаления поперечных сшивок ДНК: эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair) и гомологичная рекомбинация (homologous recombination, HR). Молекулярные механизмы, лежащие в основе этих процессов, охарактеризованы в деталях на примере *E. coli* как на клеточном, так и на биохимическом уровнях [109]. В клетках эукариот существуют пять основных способов восстановления целостности структуры ДНК: прямая репарация, гомологичная рекомбинация, негомологичная рекомбинация, эксцизионная репарация нуклеотидов и эксцизионная репарация оснований [110]. Эти пять способов репарации составляют различные комбинации, посредством которых происходит устранение поперечных сшивок в ДНК, причем выбор последовательности процессов репарации зависит не только от типа сшивки, ее локализации в геноме, но и от вида реагента, который привел к ее образованию (подробно см. также работы [5–7]).

В том случае, если своевременное устранение повреждения в ДНК невозможно, через серию сигнальных, медиаторных белков и белковых систем запускается процесс запрограммированной гибели клетки – апоптоз. Следует отметить, что 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, ответственных как за распознавание повреждения, так и за последующую передачу сигнала либо белкам репарационного аппарата, либо системам, осуществляющим деградацию содержимого клетки [111].

РЕПАРАЦИЯ ПОПЕРЕЧНЫХ СШИВОК В ДНК

Репарация поврежденной ДНК – достаточно сложный процесс, протекающий с участием большого числа белков, состав которых зависит от характера повреждения. Такие сложные повреждения, как разрывы двойной спирали и поперечные сшивки, устраняются с участием ряда белковых комплексов, причем некоторые из них могут выполнять несколько функций. Основные работы по изучению механизмов репарации поперечно-сшитой ДНК как в клетках бактерий, так и в клетках дрожжей и млекопитающих, проводились на дуплексах, содержащих поперечную сшивку, образованную 8-метилпсораленом, митомицином С или азотистым ипритом [7].

Процесс репарации поперечных сшивок в клетках *E. coli* достаточно хорошо изучен и может вклю-

чать комбинацию процессов эксцизионной репарации нуклеотидов с гомологичной рекомбинацией, либо с синтезом на поврежденной матрице [5] (схема *ба*). Показано, что в случае сшивки псораленом, эндонуклеаза $Urv(A)_2BC$ делает два разреза в одной из цепей ДНК с фурановой стороны поперечной сшивки, в результате чего получается короткий олигонуклеотид, ковалентно присоединенный к другой цепи ДНК через псораленовый мостик. Затем в результате 5'-эксонуклеазной активности ДНК-полимеразы I ($Pol I$), неспособной синтезировать на этой матрице, удаляется небольшой участок около данного олигонуклеотида, затем белок $RecA$ олигомеризуется на полученном одноцепочечном 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 трехцепочечным участком. Таким образом, обмен цепями, облегчаемый $RecA$, начинается со стороны одноцепочечного участка и продолжается в направлении образования олигомерной нити. Далее ДНК-полимераза I синтезирует новую цепь на основе донорной цепи ДНК в направлении 3'–5', после чего $Urv(A)_2BC$ разрезает поврежденную цепь и поперечная сшивка удаляется в виде ковалентно связанного олигонуклеотидного дуплекса, а ДНК-полимераза завершает процесс, достраивая образовавшийся пробел в одной из реципиентных цепей.

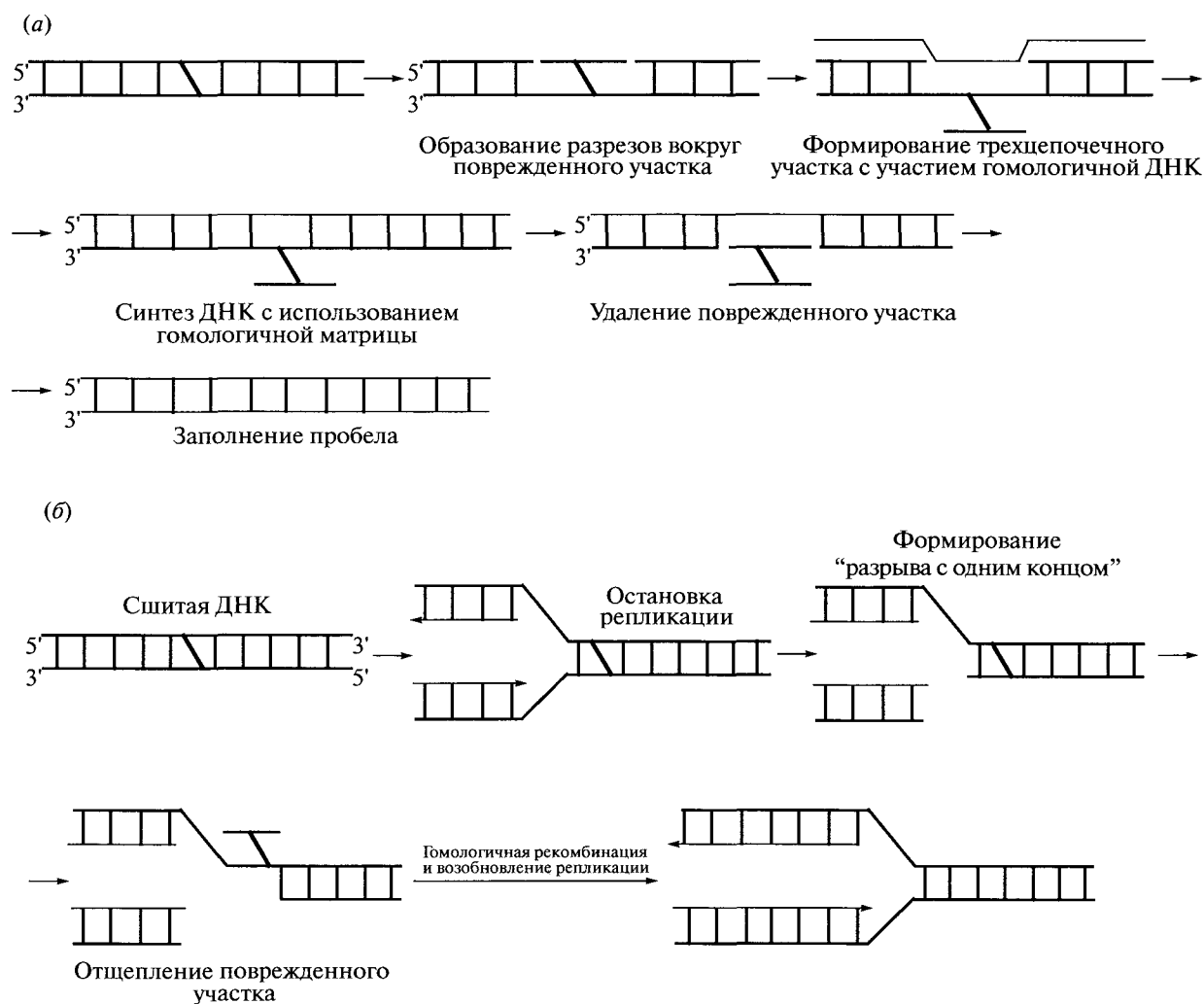


Схема 6. Обобщенная схема репарации поперечных сшивок ДНК. (а) Один из путей репарации сшивок в клетках *E. coli*; (б) основной способ репарации сшивок в клетках млекопитающих, включающий стадию гомологичной рекомбинации.

Существует также альтернативный путь устранения поперечных сшивок, реализуемый в отсутствие доступной гомологичной ДНК, который был пока-

зан на примере репарации сшивки ипритом. На первой стадии белковый комплекс $Urv(A)_2BC$ осуществляет гидролиз фосфодиэфирных связей с

обоих концов района сшивки, а полученный пробел далее достраивается с помощью ДНК-полимеразы II. Затем $Urg(A)_2BC$ образует разрывы во второй цепи, сшитый олигонуклеотидный дуплекс удаляется и пробел достраивается ДНК-полимеразой I.

В эукариотических клетках процесс репарации более сложен и включает участие многих белков, что сильно затрудняет изучение его механизма. Причем некоторые вовлеченные в этот процесс белки, помимо своего основного назначения, выполняют и другие функции. Для исследования репарационных механизмов клеток эукариот используются сшитые ДНК-дуплексы с поперечными сшивками разной природы и различные линии клеток. Для изучения роли какого-либо из известных способов репарации в устранении поперечной сшивки того или иного типа используются клетки, в которых этот способ либо вообще не может реализоваться, либо осуществляется на очень низком уровне. Такая специфика этих клеток обуславливается мутациями генов белков, которые являются ключевыми для определенных процессов репарации. Это позволяет также оценить степень участия в них самих белков. Также осуществляется тестирование различных клеток на восприимчивость к тому или иному реагенту, откуда вытекает их способность к репарации разных видов поперечных сшивок (см. обзоры 3, 5–7).

Одна из схем репарации ДНК в клетках млекопитающих представлена на схеме бб. Главный репарационный механизм включает процесс гомологичной рекомбинации и реализуется преимущественно в S-фазе клеточного цикла, когда из-за присутствия кросс-сшивки происходит блокировка репликативной вилки. Затем в результате последовательного действия эндонуклеаз Mus81-Emel и ERCC1-XPF [112] происходит отщепление одной из дочерних цепей от родительской, что приводит к образованию разрыва двойной спирали, и далее следует образование разрыва в одной из нитей родительской цепи недалеко от места поперечной сшивки. Репарация завершается белками гомологичной рекомбинации с использованием отщепленной дочерней цепи в качестве матрицы. Результаты, полученные в работе [113], свидетельствуют о том, что перед стадией гомологичной рекомбинации и после образования разреза на участке родительской цепи, содержащем поперечную сшивку, может проходить синтез на поврежденной матрице для заполнения образовавшегося пробела, после чего происходит удаление повреждения посредством эксцизионной репарации нуклеотидов и запуск процесса гомологичной рекомбинации.

Исследование белков и белковых систем, вовлеченных в процессы репарации ковалентных сшивок, а также важности выполняемых ими функций, привело к разработке противоопухолевых препара-

тов, которые направлены на ингибирование этих белков и исключение их из процесса. Таким образом можно либо полностью остановить, либо сильно затормозить репарацию ковалентных сшивок в ДНК. Применение этих препаратов в совокупности с кросс-сшивающими реагентами может существенно увеличить эффективность последних и, следовательно, снизить дозу, требуемую для достижения аналогичного терапевтического эффекта [6].

В качестве простого примера подобного рода стратегии в антимикробной терапии можно привести применение сульфаниламидных препаратов в комплексе с триметопримом [114]. Одними из белков-мишеней подобного типа в противоопухолевой химиотерапии могут служить репарационные ДНК-геликазы, которые участвуют во многих стадиях процесса репарации и в разных его типах [113]. Таким образом, репарация поперечных сшитых ДНК-дуплексов представляет значительный интерес для биохимии и молекулярной биологии. Хотя многие аспекты этого процесса, а также участвующие в нем белки уже изучены, до сих пор очень много вопросов осталось без ответа. Подробные знания о всех событиях, происходящих при активации репарационного аппарата клетки в ответ на появление в ДНК поперечных сшивок, могут способствовать созданию лекарственных препаратов повышенной эффективности и селективности, одним из назначений которых будет ингибирование процессов репарации в опухолевых клетках.

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. Он представляет собой так называемый первый тип запрограммированной клеточной гибели [9]. 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 в последствии макрофагами. Таким образом, при апоптозе клетка как бы подготавливает свое последующее фагоцитирование без развития воспалительной реакции, как это происходит в случае некроза. Характерным признаком апоптоза является фрагментация ДНК, которая происходит не хаотично, а через формирование так называемой “апоптотической лестницы”. Она представляет собой фрагменты ДНК, имеющие разную длину, но эта длина кратна примерно 200 парам нуклеотидов, так как эти фрагменты получают в результате межнуклеосомной фрагментации ге-

нома различными эндонуклеазами [8]. В настоящем обзоре рассматриваются лишь некоторые участники процесса, достаточно подробно и полно активация апоптоза и цепи передачи апоптотических сигналов рассмотрены в обзорах [9–12].

Развитие процесса апоптоза представляет собой очень сложный и до конца не изученный процесс, в котором участвует множество белков и белковых систем, выполняющих как проапоптотическую (AIF, Вах), так и антиапоптотическую функции (белки семейства Bcl-2) (схема 7). В биохимическом аспекте апоптоза выделяют четыре основных компонента: 1) Cys-Asp-протеиназы или каспазы, 2) так называемые рецепторы смерти на поверхности клетки, через которые идет активация апоптоза определенными лигандами, 3) митохондрии и входящий в них цитохром с и 4) специальные про- и антиапоптотические белки [115].

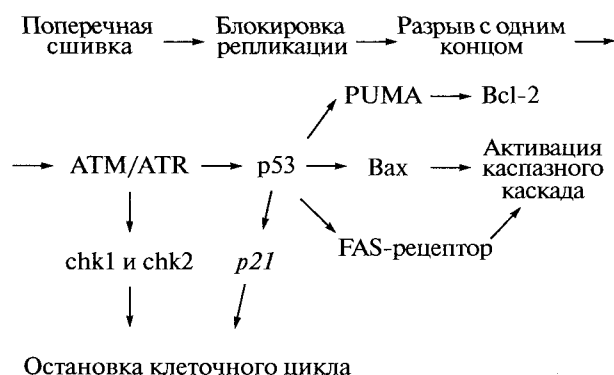


Схема 7. Обобщенная схема индукции апоптоза. ATM – протеинкиназа Ataxia-Telangiectasia Mutated; ATR – протеинкиназа Ataxia telangiectasia and Rad3 related; FAS – апоптостимулирующий фрагмент (apoptosis stimulating fragment); Вах – Bcl-2-ассоциированный X-белок; PUMA – p53-активируемый модулятор апоптоза (p53 upregulated Modulator of apoptosis); chk – киназа сверочной точки (Checkpoint kinase).

Активация апоптоза может происходить в результате как внешних воздействий, так и эндогенной активации апоптотического каскада. В экзогенной активации участвуют, например, определенные 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, двуспиральные разрывы в ДНК, нарушения целостности цитоскелета и т.д. В этом случае идет распознавание повреждения специальными белками, которые, как и в одном из вариантов развития событий в случае экзо-

генной активации, далее передают сигнал на митохондрии, выполняющие центральную роль в дальнейшей цепи апоптотических событий [12]. Из митохондрий высвобождаются различные проапоптотические белки, такие, как AIF (апоптотический индуктор), SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases). Кроме этого в цитоплазму выходит цитохром с, 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 сигнала апоптоза, являются каспазы (семейство Cys-Asp-протеиназ). У млекопитающих класс каспаз представляет 14 белков, постоянно синтезируемых в виде проферментов, активирующихся при апоптозе. Последовательная активация каспаз позволила создать концепцию об уже упомянутом каспазном каскаде [116]. Этот каскад начинается с автокаталитической активации инициаторной каспазы, которая в свою очередь активирует эффекторные каспазы [117]. Эти последние ингибируют биосинтез белков и активируют ДНКазу.

Как уже упоминалось ранее, одной из причин развития процесса апоптоза служат повреждения ДНК, такие, как модификации гетероциклических оснований, разрывы двойных спиралей и т.д. Поперечно-сшитые ДНК в данном случае также не являются исключением. На примере сшивки, образованной *цис*-диаминдихлорплатиной, 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 (с-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 через 2–4 дня после обработки *цис*-диаминдихлорплатиной [118].

При наличии в ДНК поперечной сшивки происходит блокирование репликативной вилки и образование разрывов двойных спиралей (разрывов с одним концом). Эти процессы способствуют активации других сигнальных систем (схема 7). В распознавании указанных повреждений, как уже упоминалось ранее, участвуют белок ataxia telangiectasia mutated (ATM) и гомологичные ATR-белки. При активации этих белков происходит фосфорилирование ими белка NBS1, который далее активирует киназы chk1 и chk2. Это приводит к остановке клеточного цикла. Кроме того, ATM фосфорилирует белок p53, который является одним из главных участников запуска апоптоза, вызванного повреждениями ДНК, и таким образом представляет со-

бой один из компонентов противоопухолевого надзора организма [119]. Этот белок действует сразу по нескольким направлениям, активируя ген *p21*, продукт которого в конечном счете приводит к остановке клеточного цикла. Он также активирует ряд проапоптозных 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 еще больше стимулирует выход цитохрома *c*. В совокупности все указанные события приводят к активации каспазного каскада (схема 7).

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

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 гг. прошлого века и были посвящены действию формальдегида, глиоксаля и кетоксаля на НК вируса табачной мозаики [120, 121]. Позже сшивки цепей РНК под действием формальдегида использовались при установлении вторичной структуры тРНК [122]. 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 счет наличия в определенных 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 богатой 4-метилуридином среде. 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 деградации РНКазой H в составе РНК/ДНК-дуплекса с последующим анализом полученных фрагментов с помощью денатурирующего гель-электрофореза. Основываясь на местоположении поперечных сшивок и их числе, делался вывод о пространственной структуре рибосомной РНК, изучалась внутренняя

динамика ее цепей в процессе функционирования рибосомы, способы взаимодействия РНК с другими макромолекулами и т.д. [123, 124]. Подобная методика применима и для изучения других типов РНК.

С помощью сшивки ДНК-РНК-дуплексов можно добиться повышения эффективности антисенс-терапии [125, 126]. 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 устойчивость гетеродуплекса, что в свою очередь приводит к существенному увеличению эффективности антисенс-терапии. В работе [125] 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 четырех остатков тимидина. Эти олигонуклеотиды были комплементарны гомопуриновым участкам мРНК, кодирующим белок *c-Myc*, 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 Хутстиновского комплекса со второй частью олигонуклеотида (рис. 6а). Благодаря способности к образованию подобных структур, эти олигонуклеотиды обладают высокой специфичностью, эффективностью и избирательностью. Эксперименты, проведенные на клетках В16-F0 с иммунодетекцией белка *c-Myc*, 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. 6б). 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% [126].

Помимо описанных выше модифицированных олигонуклеотидов, для ингибирования экспрессии белков также используются олигонуклеозиды, мо-

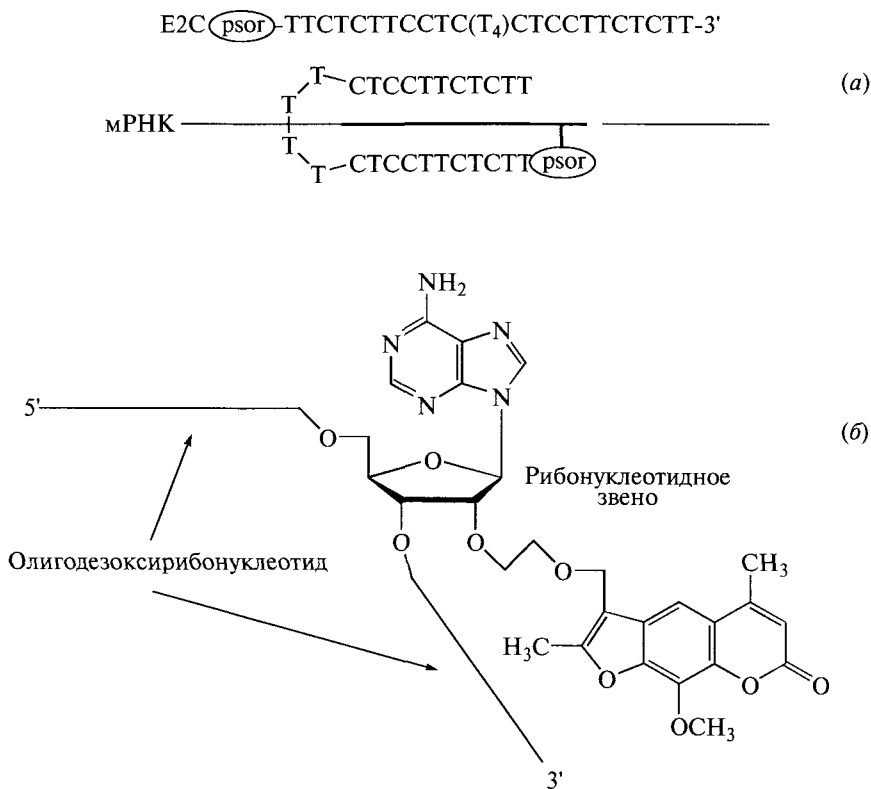


Рис. 6. Олигонуклеотиды, содержащие модификации, способные образовывать ковалентные сшивки с РНК. (а) Самокомплементарный олигонуклеотид, содержащий в середине цепи oligo(T)-линкер и остаток псоралена на 5'-конце, и схема его взаимодействия с целевой мРНК; (б) — олигонуклеотид, содержащий в середине цепи остаток аденозина, модифицированный по 2'-гидроксилу псораленом.

номеры которых соединены метилфосфонатными остатками. Было показано, что 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 олигонуклеотид с метилфосфонатными звеньями, содержащий остаток псоралена, и продемонстрирована его способность ингибировать трансляцию мРНК, кодирующих α - и β -глобины кролика, *in vitro* [127]. Позднее был получен 12-звенный олигомер, несущий остаток псоралена на одном конце и родамина на другом [128]. На опытах с клетками мышей L₉₄₉ продемонстрирована потенциальная возможность использования этого олигонуклеотида для оценки эффективности анти-сенс-взаимодействий в живых клетках с помощью флуоресцентной микроскопии.

Как показано в работе [129], кросс-сшивающие реагенты могут использоваться в том числе и для исследования механизма действия рибозимов. Самый короткий их представитель, пентарибонуклеотид GAAACp, в присутствии ионов Mn²⁺ и poly(U) подвергается гидролизу фосфодиэфирной связи

между остатками гуанозина и аденозина с образованием гуанозин-2',3'-циклофосфата и тетра-нуклеотида AAACp [130]. Ковалентное связывание атомов N⁷ 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 N⁷-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(NH₃)₃²⁺ сильно уменьшало скорость реакции расщепления, что свидетельствовало о необходимости комплексообразования 2-го остатка аденозина и 2'-ОН-звена гуанозина с ионом Mn²⁺ 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 сравнительно немного.

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 противоопухолевых лекарственных препаратов. Поиск новых соединений, обладающих кросс-сшивающей способностью, непрерывно продолжается.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rajski S.R., Williams R.M.* // Chem. Rev. 1998. V. 98. P. 2723–2796.
2. *Stone M., Cho Y.J., Huang H., Kin H.-Y., Kozekov I.D., Kozekova A., Wang H., Minro I.G., Lloyd R.S., Harris T.M., Rizzo C.J.* // Accounts Chem. Res. 2008. V. 41. P. 793–804.
3. *Scharer O.D.* // ChemBioChem. 2005. V. 6. P. 27–32.
4. *Su T.T.* // Annu Rev. Genet. 2006. V. 40. P. 187–208.
5. *Lehoczyk P., McHugh P.J., Chovanec M.* // FEMS Microbiol. Rev. 2007. V. 31. P. 109–133.
6. *Lieberman H.B.* // Current Med. Chem. 2008. V. 15. P. 360–367.
7. *Noll D.M., McGregor Mason T., Miller P.S.* // Chem. Rev. 2006. V. 106. P. 277–301.
8. *Лушиков Е.Ф., Абросимов А.Ю.* Гибель клетки (апоптоз). М.: Медицина, 2001. С. 81–109.
9. *Blank M., Shiloh Y.* // Cell Cycle. 2007. V. 6. P. 686–695.
10. *Strasser A., O'Connor L., Dixit V.M.* // Ann. Rev. Biochem. 2000. V. 69. P. 217–245.
11. *Roos W.P., Kaina B.* // Trends in Mol. Med. 2006. V. 12. P. 440–450.
12. *Гордеева А.В., Лабас Ю.А., Звягильская Р.А.* // Биохимия. 2004. Т. 69. С. 1301–1313.
13. *Анципович С.И., Орецкая Т.С.* // Успехи химии. 1998. Т. 67. С. 274–293.
14. *Brookers P.* // Mutation Res. 1990. V. 233. P. 3–14.
15. *Ward K.* // J. Am. Chem. Soc. 1935. V. 57. P. 914–916.
16. *Gilman A., Phillips F.S.* // Science. 1946. V. 103. P. 409–415.
17. *Burchenal J.H., Lester R.A., Riley J.B., Roades C.P.* // Cancer. 1948. V. 1. P. 399–412.
18. *Burchenal J.H., Burchenal J.R., Johnson S.F.* // Cancer. 1951. V. 4. P. 353–356.
19. *Press E.M., Butler J.A.V.* // J. Chem. Soc. 1950. P. 3411–3416.
20. *Press E.M., Butler J.A.V.* // J. Chem. Soc. 1950. P. 626–631.
21. *Kapuriya N., Kapuriya K., Dong H., Zhang X., Chou T.-C., Chen Y.-T., Lee T.-C., Lee W.-C., Tsai T.-H., Naliapara Y., Su T.-L.* // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2009. V. 17. P. 1264–1275.
22. *Baguley B. C.* // Anti-Cancer Drug Design. 1991. V. 6. P. 1–35.
23. *White I.N.H., Suzanger M., Mattocks A.R., Bailey E., Farmer P.B., Connors T.A.* // Carcinogenesis. 1989. V. 10. P. 2113–2118.
24. *Tercel M., Lee A.E., Hogg A., Anderson R., Lee H.H., Siim B.G., Denny W., Wilson W.R.* // J. Med. Chem. 2001. V. 44. P. 3511–3522.
25. *Parker L.L., Lacy S.M., Farrugia L.J., Evans C., Robins D.J., O'Hare C.C., Hartley J.A., Jaffar M., Stratford I.J.* // J. Med. Chem. 2004. V. 47. P. 5683–5689.
26. *Rink S.M., Solomon M.S., Taylor M.J., Rajur S.B., McLaughlin L.W., Hopkins P.B.* // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 2551–2557.
27. *Wang Y.-D., Dziegielewska J., Wurtz N., Dziegielewska B., Dervan P., Beerman T.* // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. 1208–1215.
28. *Hendry J.A., Rose F.L., Homer R.F., Roades A.L.* // Br. J. Pharmacol. 1948. V. 6. P. 235–255.
29. *Millard J.T., White M.M.* // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 2120–2124.
30. *Millard J.T., Hanly T.C., Murphy K., Tretyakova N.* // Chem. Res. Toxicol. 2006. V. 19. P. 16–19.
31. *LePla R.C., Landreau C.A., Shipman M., Hartley J.A., Jones G.D.D.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005. V. 15. P. 2861–2864.
32. *Finerty M.J., Bingham J.P., Hartley J.A., Shipman M.* // Tetrahedron Lett. 2009. V. 50. P. 3648–3650.
33. *Ware D.C., Wilson W.R., Denny W.A., Rickard C.E.F.* // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1991. P. 1171–1173.
34. *Dunham S.U., Chifotides H.T., Mikulski S., Burr A.E., Dunbar K.R.* // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 996–1003.
35. *Malinge J. M., Pérez C., Leng M.* // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. P. 3834–3839.
36. *Huang H., Zhu L., Reid B.R., Drobny G.P., Hopkins P.B.* // Science. 1995. V. 270. P. 1842–1845.
37. *Jung Y., Lippard S.J.* // Chem. Rev. 2007. V. 107. P. 1387–1407.
38. *Heringova P., Woods J., Mackay F.S., Kasparkova J., Sadler P.J., Brabec V.* // J. Med. Chem. 2006. V. 49. P. 7792–7798.
39. *Chopard C., Lenoir C., Rizzato S., Vidal M., Arpalahiti J., Gabison L., Albinati A., Garbay C., Kozelka J.* // Inorg. Chem. 2008. V. 47. P. 9701–9705.
40. *Qu Y., Scarsdale N. J., Tran M.-C., Farrell N.* // J. Inorg. Biochem. 2004. V. 98. P. 1585–1590.
41. *Coley H.V.* // Gen. Pharmac. 1997. V. 28. P. 177–182.
42. *Jackson C., Crabb T.A., Gibson M., Godfrey R., Saunders R., Thurston D.E.* // J. Pharm. Sci. 1991. V. 80. P. 245–251.
43. *Jackson C., Hartley J.A., Jenkins T.C., Godfrey R., Saunders R., Thurston D.E.* // Biochem. Pharmacol. 1991. V. 42. P. 2091–2097.
44. *Coley H.M., Brooks N., Phillips D.H., Hewer A., Jenkins T.C., Jarman M., Judson I.R.* // Biochem. Pharmac. 1995. V. 49. P. 1203–1212.

45. *Ciniino G.D., Gamper H.B., Isaacs S.T., Hearst J.E.* // *Ann. Rev. Biochem.* 1985. V. 54. P. 1151–1193.
46. *Hwang G.S., Kim J.K., Choi B.S.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 219. P. 191–197.
47. *Hata T., Sano Y., Sugawara R., Matsumae A., Kanamori K., Shima T., Hoshi T.* // *J. Antibiot. Ser. A.* 1956. V. 9. P. 141–146.
48. *Wakagi S., Marumo H., Tomoka K., Shimizu G., Kata E., Kamada H., Kudo S., Fugimoto Y.* // *Antibiot. Chemother.* 1958. V. 8. P. 228–238.
49. *Webb J.S., Cosulich D.B., Mowat J.H., Patrick J.B., Broscha R.W., Meyer W.E., Williams R.P., Wolf C.F., Fulmor W., Pidsacks C.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1962. V. 84. P. 3185–3187.
50. *Iver V.N., Szybalski W.* // *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 1963. V. 50. P. 355–365.
51. *Danishefsky S.J., Schkeryantz J.M.* // *Synlett.* 1995. P. 475–490.
52. *Tomasz M., Lifman R., Chowdary D., Pawlak J., Verdine G.L., Nakanishi K.* // *Science.* 1987. V. 235. P. 1204–1208.
53. *Rink S.M., Lipman R., Alley S.C., Hopkins P.B., Tomasz M.* // *Chem. Res. Toxicol.* 1996. V. 9. P. 382–389.
54. *Norman D., Live D., Sastry M., Lipman R., Hingerty B.E., Tomasz M., Broyde S., Patel D.J.* // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 2861–2875.
55. *Paz M.M., Kumar G.S., Glover M., Waring M.J., Tomasz M.* // *J. Med. Chem.* 2004. V. 47. P. 3308–3319.
56. *Na Y., Li V.-S., Nakanishi Y., Bastow K.F., Kohn H.* // *J. Med. Chem.* 2001. V. 44. P. 3453–3462.
57. *Boger D.L., Paianki S.S.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1992. V. 114. P. 9318–9327.
58. *Hadjivassileva T., Stapleton P.D., Thurston D.E., Taylor P.W.* // *Int. J. Antimic. Agents.* 2007. V. 29. P. 672–678.
59. *Brockmann H., Bauer K.* // *Naturwissen Schaftefen.* 1950. V. 37. P. 492–497.
60. *Lown J.W.* // *Chem. Soc. Rev.* 1993. V. 22. P. 165–176.
61. *Gruber B.M., Anuszevska E.L., Bubko I., Gozdzik A., Pribe W., Fokt I.* // *Anticancer Res.* 2005. V. 25. P. 2193–2198.
62. *Ashikawa K., Shishidia S., Fokt I., Pribe W., Aggarwal B.B.* // *Biochem. Pharmacol.* 2004. V. 67. P. 353–364.
63. *Wang A., Ughetto G., Quigley G.J., Rich A.* // *Biochemistry.* 1987. V. 26. P. 1152–1163.
64. *Gao Y.G., Liaw Y.C., Li Y.-K., van der Marel G.A., van Boom J.H., Wang A.H.-J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 4845–4849.
65. *Leng F., Savkur R., Fokt I., Przewloka T., Priebe W., Chaires J.B.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. V. 118. P. 4731–4738.
66. *Taatjes D.J., Gaudiano G., Resing K., Koch T.H.* // *J. Med. Chem.* 1997. V. 40. P. 1276–1286.
67. *Kato S., Burke P.J., Fenick D.J., Taatjes D.J., Bierbaum V.M., Koch T.H.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2000. V. 13. P. 509–516.
68. *Taatjes D.J., Gaudiano G., Koch T.H.* // *Chem. Res. Toxicol.* 1997. V. 10. P. 953–961.
69. *Zhang H., Gao Y.-G., van der Marel G.A., van Boom J.H., Wang A.H.-J.* // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 10095–10101.
70. *Fox K.R., Webster R., Phelps R.J., Fokt I., Priebe W.* // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. P. 3556–3566.
71. *Portugal J., Cashman D.J., Trent J.O., Ferrer-Miralies N., Przewloka T., Fokt I., Priebe W., Chaires J.B.* // *J. Med. Chem.* 2005. V. 48. P. 8209–8219.
72. *Fenick D.J., Taatjes D.J., Koch T.H.* // *J. Med. Chem.* 1997. V. 40. P. 2452–2461.
73. *Taatjes D.J., Fenick D.J., Koch T.H.* // *J. Med. Chem.* 1998. V. 41. P. 1306–1314.
74. *Koch T.H., Barthel B.L., Kalet B.T., Rudnicki D.L., Post G.C., Burkhardt D.J.* // *Topics in Current Chemistry.* 2008. V. 283. P. 141–170.
75. *Song Y., Wang P., Wu J., Zhou X., Zhang X.-L., Weng L., Cao X., Liang F.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006. V. 16. P. 1660–1664.
76. *Weng X., Ren L., Weng L., Huang J., Zhu S., Zhou X., Weng L.* // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. V. 46. P. 8020–8023.
77. *Song Z., Weng X., Weng L., Huang J., Wang X., Bai M., Zhou Y., Yang G., Zhou X.* // *Chemistry.* 2008. V. 14. P. 5751–5754.
78. *Kim H.-Y.H., Voehler M., Harris T.M., Stone M.P.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. P. 9324–9325.
79. *Huang H., Hopkins P.B.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. V. 115. P. 9402–9408.
80. *Cheng G., Shi Y., Sturla S.J., Jalas J.R., McIntee E.J., Villalta P.W., Wang M., Hecht S.S.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2003. V. 16. P. 145–152.
81. *Sako M., Yaekura I., Deyashiki Y.* // *Tetrahedron Lett.* 2002. V. 43. P. 6701–6703.
82. *Wang M., McIntee E.J., Cheng G., Shi Y., Villalta P.W., Hecht S.S.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2000. V. 13. P. 1149–1157.
83. *Dooley P.A., Zhang M., Korbel G.A., Nechev L.V., Harris C.M., Stone M.P., Harris T.M.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 62–67.
84. *Caulfield J.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2003. V. 16. P. 571–574.
85. *Edfeldt N.B.F., Harwood E.A., Sigurdsson S.T., Hopkins P.B., Reid B.R.* // *Nuc. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 2785–2794.
86. *Edfeldt N.B.F., Harwood E.A., Sigurdsson S.T., Hopkins P.B., Reid B.R.* // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 2795–2801.
87. *Jackson C., Hartley J.A., Jenkins T.C., Godfrey R., Saunders R., Thurston D.E.* // *Biochem. Pharm.* 1991. V. 42. P. 2091–2097.
88. *Luce R.A., Hopkins P.B.* // *Methods in Enzymology.* 2001. V. 340. P. 396–412.
89. *Swenson M.C., Paranawithana S.R., Miller P.S., Kielkopf C.L.* // *Biochemistry.* 2007. V. 46. P. 4545–4553.
90. *Norman D., Live D., Sastry M., Lipman R., Hingerty B.E., Tomasz M., Broyde S., Patel D.J.* // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 2861–2875.
91. *Cao H., Hearst J.E., Corash L., Wang Y.* // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 2932–2938.

92. Kasparkova J., Vojtiskova M., Natile G., Brabec V. // Chem. Eur. J. 2008. V. 14. P. 1330–1340.
93. Noll D.M., Noronha A.M., Wilds C.J., Miller P.S. // Frontiers in Bioscience. 2004. V. 6. P. 421–437.
94. Wang Y., Wang Y. // Anal. Chem. 2003. V. 75. P. 6306–6313.
95. Harwood E.A., Sigurdsson S.T., Edfeldt N.B.F., Reid B.R., Hopkins P.B. // J. Am. Chem. Soc. 1999. V. 121. P. 5081–5082.
96. Wilds C.J., Booth J.D., Noronha A.N. // Tetrahedron Lett. 2006. V. 47. P. 9125–9128.
97. Angelov T., Guainazzi A., Scharer O.D. // Organic Lett. 2009. V. 11. P. 661–664.
98. Dooley P.A., Tsarouhtsis D., Korbel G.A., Nechev L.V., Shearer J., Zegar I.S., Harris C.M., Stone M.P., Harris T.M. // J. Am. Chem. Soc. 2001. V. 123. P. 1730–1739.
99. Colb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B. // Angew. Chem. 2001. V. 113. P. 2056–2075.
100. Huisgen R. // Proc. Chem. Soc. (London). 1961. P. 357.
101. Tornoe C.W., Chirstensen C., Meldal M. // J. Org. Chem. 2002. V. 67. P. 3057–3064.
102. Humenik M., Huang Y.W., Wang Y.R., Sprinzl M. // ChemBioChem. 2007. V. 8. P. 1103–1106.
103. Rozkiewicz D.I., Gierlich J., Burley G.A., Gutschmidt K., Garell T., Ravoo B.J., Reinhoudt D.N. // ChemBioChem. 2007. V. 8. P. 1997–2002.
104. Seela F., Sirivolu V.R. // Helv. Chim. Acta. 2007. V. 90. P. 535–552.
105. Zočalka P., El-Sagheer A.H., Brown T. // ChemBioChem. 2008. V. 9. P. 1280–1285.
106. Efimov V.A., Aralov A.V., Fedunin S.V., Klykov V.N., Chakhmakhcheva O.G. // Russ. J. Bioorganic Chemistry. 2009. V. 35. P. 250–253 (Ефимов В.А., Аралов А.В., Федюнин С.В., Клыков В.Н., Чахмакхева О.Г. // Биоорганическая химия. 2009. Т. 35. С. 270–273).
107. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky S.L. // Molecular Biology of the Cell./Ed. Darnell J. New York: WH Freeman, 2004. P. 963.
108. Konora J. // Biochem. Pharm. 1988. V. 37. P. 2303–2309.
109. Dronkert M.L.G., Kanaar R. // Mut. Res. DNA Repair. 2001. V. 486. P. 217–247.
110. Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Unsal-Kasmaz K., Linn S. // Ann. Rev. Biochem. 2004. V. 73. P. 39–85.
111. Bernstein C., Bernstein H., Payne C.M., Gareval H. // Mutat. Res. 2002. V. 511. P. 145–178.
112. Burma S., Chen B.P., Chen D.J. // DNA Repair. 2006. V. 5. P. 1042–1048.
113. Gupta R., Brosh R.M. // Current Medicinal Chemistry. 2007. V. 14. P. 503–517.
114. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Ч. 2. М.: Медицина, 1998. С. 288–290.
115. Oleinick N.D., Morris R.D., Belichenko I. // Photochem. Photobiol. Sci. 2002. V. 1. P. 1–21.
116. Grossmann J., Mohr S., Lapentina E.G., Fiocchi C., Levine A.D. // Am. J. Physiol. 1998. V. 274. P. 1117–1124.
117. Salvesen G.S., Dixit V.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 10964–10967.
118. Brozovic A., Fritz G., Christmann M., Zisowsky J., Jaehde U., Osmak M., Kaina B. // Int. J. Cancer. 2004. V. 112. P. 974–985.
119. Lane D.P. // Nature. 1992. V. 358. P. 15–16.
120. Staehelin M. // Biochim. Biophys. Acta. 1958. V. 29. P. 410–417.
121. Staehelin M. // Biochim. Biophys. Acta. 1959. V. 31. P. 448–454.
122. Axelrod V.D., Feldman Y., Chuguev I.I., Bayev A.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1969. V. 186. P. 33–45.
123. Juzumiene D., Shapkina T., Kirillov S., Wollenzien P. // Methods. 2001. V. 25. P. 333–343.
124. Nanda K., Wollenzien P. // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 8923–8934.
125. Stewart D.A., Thomas S.D., Mayfield C.A., Miller D.M. // Nucleic Acids Res. 2001. V. 29. P. 4052–4061.
126. Higuchi M., Sakamoto T., Kobori A., Murakami A. // Nucleic Acids Symp. Ser. 2006. V. 50. P. 301–302.
127. Kean J. M., Murakami A., Blake K.R., Cushman C.D., Miller P.S. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 9113–9121.
128. Thaden J., Miller P.S. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 386–394.
129. Bombard S., Kozelka J., Favre A., Chottard J.-C. // Eur. J. Biochem. 1998. V. 252. P. 25–35.
130. Kazakov S., Altman S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 7939–7943.

Cross-Linked Nucleic Acids: Formation, Structure, and Biological Function

V. A. Efimov[#], S. V. Fedyunin, and O. G. Chakhmakhcheva

[#] Tel. 495-336-59-11, e-mail eva@mx.ibch.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Published data on the main types of reagents capable of introducing covalent interstrand cross links into nucleic acids (NA) are summarized in the present review. The reactivity of cross-linking agents, their preferred binding sites, and methods of determining the cross-link localization in a duplex are discussed. Cell response to DNA cross linking, namely, the blocking of replication and transcription, the initiation of repair processes, and apoptotic death of the cell, are analyzed, as well as the use of cross-linking reagents in therapy and molecular biology.

Keywords: nucleic acids, cross-linking, cross-linking agents