

CHEMICAL TOOLS
IN THE MODERN
BIOLOGY (Exemplified
by Antisense Action
on the Genetic Structures)

D. G. KNORRE

Possibilities of the usage of oligonucleotides as chemical tools for the development of the methods of highly selective changes of nucleic acids through antisense approach are described.

Рассмотрены возможности избирательного связывания олигонуклеотидов с участками нуклеиновых кислот, после чего биологическое функционирование нуклеиновых кислот прекращается (антисмысловое действие олигонуклеотидов).

**ХИМИЧЕСКИЕ ИНСТРУМЕНТЫ
В СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ
(на примере антисмысловых
воздействий на генетические
структуры)**

Д. Г. КНОРРЕ

Новосибирский государственный университет

ВВЕДЕНИЕ

Биология является экспериментальной наукой и по мере проникновения в понимание устройства уникальных структур и тонких процессов, лежащих в основе жизнедеятельности, нуждается в непрерывном оттачивании методов исследования. В особенности это относится к той группе биологических наук, которые принято объединять термином “физико-химическая биология”. Задачей этой группы наук является увязывание наблюдаемых биологических явлений с законами и методами химии и физики. Наиболее сложными, уникально построенными веществами, из которых состоят живые организмы, являются белки и нуклеиновые кислоты, особенность которых заключается в том, что каждый элемент их структуры может оказаться крайне важным для живого организма в целом. Например, изменение всего лишь в одной клетке какого-либо органа гена, программирующего один из белков, существенных для регулирования деления клеток, может дать начало росту злокачественной опухоли этого органа. Одна частица вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), попав в подходящую клетку, в принципе имеет шанс встроиться в клеточную ДНК, а такая ДНК может начать производить новые вирусные частицы, что приведет к заболеванию СПИДом. Поэтому для понимания того, как выполняются определенные биологические функции, надо располагать данными не только о молекулах белков или нуклеиновых кислот в целом, но и обо всех составляющих их структурных элементах. При этом важно научиться иметь дело не только с молекулами белков и нуклеиновых кислот, но с их структурными фрагментами, остатками аминокислот или нуклеотидов. А для этого нужно располагать инструментом, который имеет размеры того же порядка величины, что и структурные фрагменты биополимеров. Такой размер имеют отдельные молекулы (реагенты), которые могут вступать в определенные химические взаимодействия с выбранными элементами биополимера, например вступать в химическую реакцию с определенным остатком аминокислоты в белке или с определенным нуклеотидным

остатком в нуклеиновой кислоте. Многие из таких высокоприцельных реагентов получают на основе нуклеиновых кислот и их фрагментов — олигонуклеотидов. Именно таким реагентам посвящена эта статья. При этом необходимо напомнить некоторые основные аспекты структуры нуклеиновых кислот. Это знание тем более существенно для создания подходов, позволяющих воздействовать на биологические функции, например подавлять рост опухоли или размножение вируса.

СТРОЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В первой статье¹ уже говорилось, что нуклеиновые кислоты и белки построены из набора мономеров, располагающихся в определенной последовательности вдоль полимерной цепи. На рис. 1 представлена общая схема строения нуклеиновой

¹ Кнорре Д.Г. Биология нуклеиновых кислот // Соросовский Образовательный Журнал // 1996. № 3. С. 11–16.

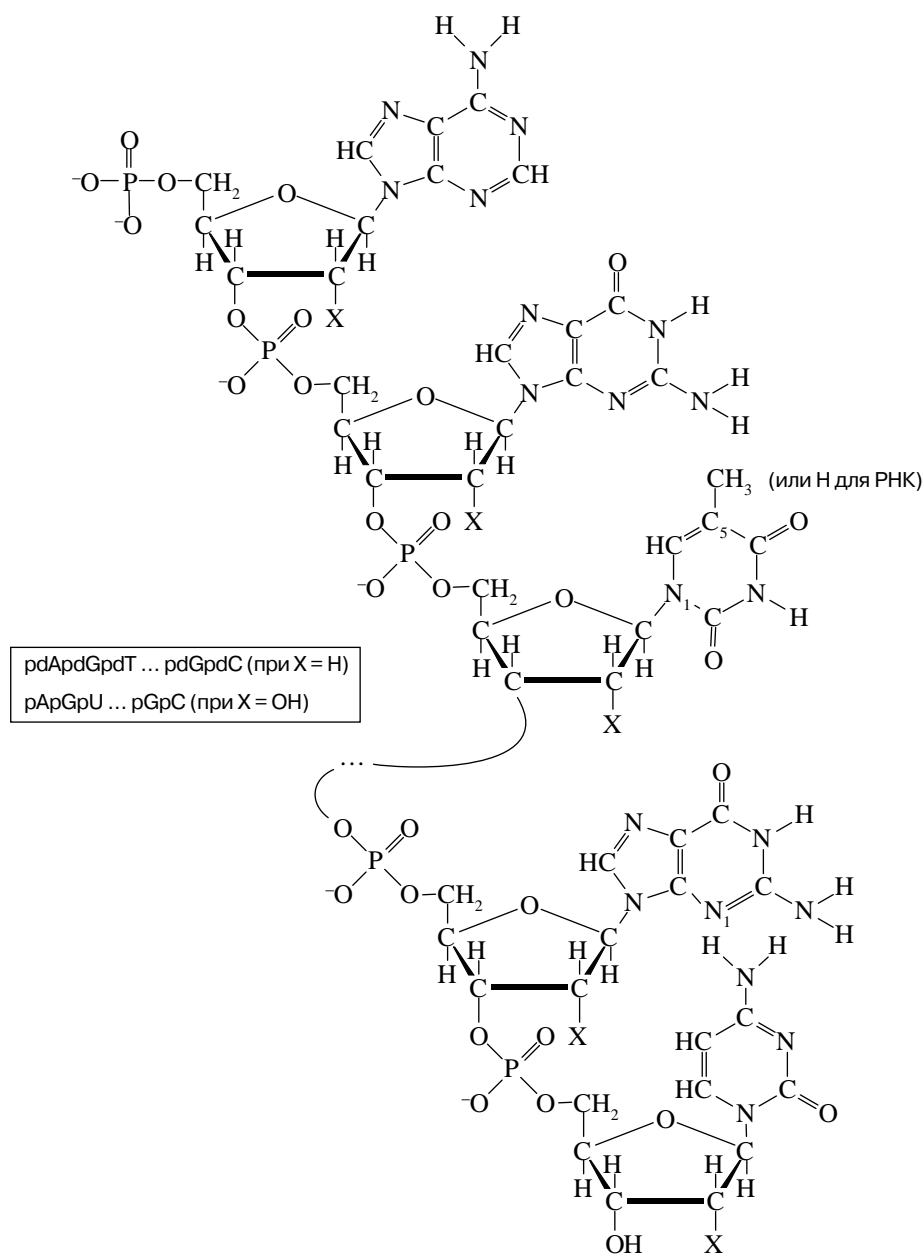


Рис. 1. Структура нуклеиновой кислоты: РНК (X=OH) и ДНК (X=H). В рамке те же структуры с использованием од-нобуквенной символики

кислоты с учетом тех небольших различий, которые имеются между РНК и ДНК.

Различный биологический смысл нуклеиновых кислот определяется именно порядком чередования или последовательностью нуклеотидов, которую иногда называют последовательностью оснований. Химическую структуру отдельных мономеров практически никогда не вырисовывают, ограничиваясь представлением каждого звена в виде одной буквы. Если нужно отразить наличие остатка фосфорной кислоты у каждого мономерного звена или на одном из концов, его изображают малой буквой р.

Цепочка, построенная из нуклеотидов, является гибкой. Но в определенных условиях благодаря взаимодействию между отдельными фрагментами внутри цепи или фрагментами, находящимися в разных цепях, оказывается зафиксированной определенная форма цепи, то есть цепь приобретает некоторую форму, как принято говорить, имеет определенную пространственную структуру. Например, комплементарные последовательности, описанные в первой статье, образуют в определенных условиях структуру в виде двойной спирали, образованной двумя нитями, навитыми вокруг общей оси.

Уместно вспомнить, что любая молекула состоит из атомов, связанных прочными химическими ковалентными связями. В условиях живых организмов ковалентные связи, свойственные нуклеиновым кислотам, устойчивы и сами по себе никаких изменений не претерпевают. Как образование новых ковалентных связей, так и их разрушение, в частности разрушение фосфоэфирных связей (чаще всего в реакции с водой), могут происходить только при участии специальных катализаторов – ферментов. Но помимо ковалентных связей возможны и другие, более слабые взаимодействия, которые объединяют общим термином “нековалентные взаимодействия”. Именно за счет этих взаимодействий молекулы биополимеров могут принимать определенную пространственную структуру. Например, комплементарные цепи нуклеотидов могут свертываться в двойную спираль, в первую очередь благодаря образованию водородных связей, обозначаемых для атомов X и Y как X–H···Y, где черточкой обозначена прочная ковалентная связь между атомами X и H, а тремя точками – слабая водородная связь между атомами H и Y. Поскольку связь X–H должна быть полярной (образующая ее пара электронов должна быть смещена в сторону атома X), а атом Y должен обладать неподеленной парой электронов, то в биологических системах эта связь образуется в основном, когда атомы X и Y являются атомами O или N. На рис. 2 представлены структуры пар гетероциклов аденин–тимин и гуанин–цитозин. Образование между гетероциклами водородных связей приводит к тем самым комплементарным взаимодействиям, которые описаны в первой статье для пар нуклеотидов dA•dT и dG•dC. Пары

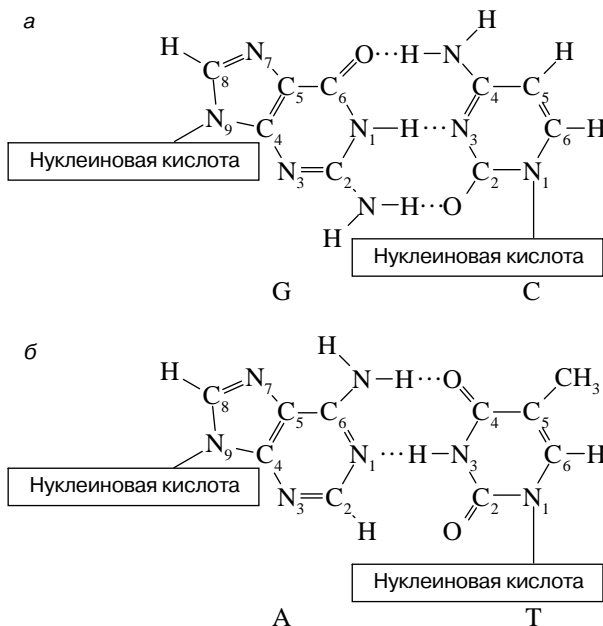


Рис. 2. Уотсон-Криковское взаимодействие между гетероциклами, входящими в состав полинуклеотидных цепей: а – гуанин-цитозин, б – аденин-тимин

оснований располагаются в плоскостях, приблизительно перпендикулярных оси спирали, образуя как бы скошенную стопку плоских структур. Между этими парами также существуют достаточно сильные нековалентные взаимодействия, которые называют стекинг-взаимодействиями (от англ. stack – стопка), так что в целом два комплементарных фрагмента нуклеиновых кислот удерживаются до определенной температуры в виде двойной спирали специфичными (то есть свойственными только определенным парам) водородными связями и менее специфичными стекинг-взаимодействиями. Двойная спираль – регулярная структура, в ней не только регулярно чередуются одинаковые химические фрагменты, но и их взаимное положение в пространстве. Такие элементы пространственной структуры называют вторичной структурой. В нуклеиновых кислотах элементы вторичной структуры могут существовать и в пределах одной цепи, если она как бы завернется сама на себя. Это возможно, если после некоторой последовательности нуклеотидов с небольшим перерывом существует комплементарная последовательность. Это, например, имеет место для каждой транспортной РНК, поскольку все они устроены так, что могут образовать несколько небольших комплементарных участков, в целом дающих вторичную структуру в форме, получившей название “клеверный лист”. С некоторыми упрощениями на рис. 3 представлена вторичная структура дрожжевой тРНК, специфичной к валину. Отдельные двуспиральные фрагменты также могут вступать в

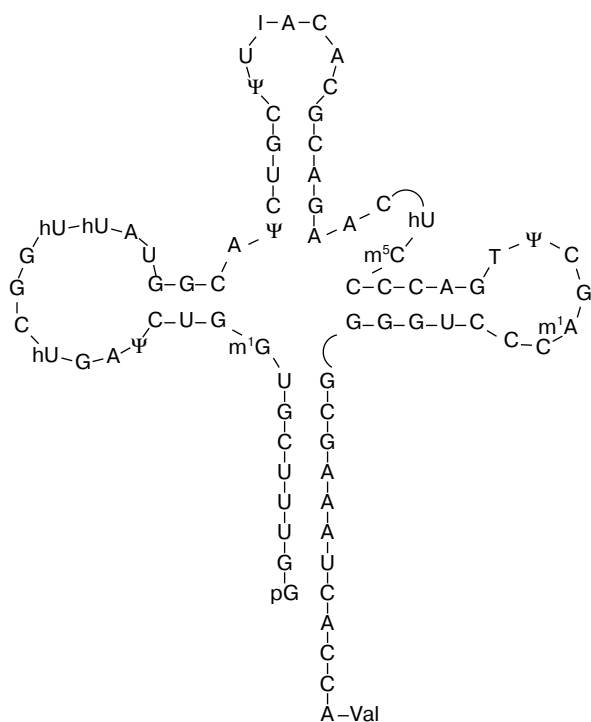


Рис. 3. Структура дрожжевой валиновой тРНК в виде клеверного листа. Помимо четырех основных нуклеотидов тРНК содержит множество так называемых минорных нуклеотидов: hU – дигидроуридинфосфат, у которого двойная связь в кольце урацила во фрагменте –CH=CH– превращена в одинарную в результате гидрирования (присоединения двух атомов H, то есть образования фрагмента –CH₂–CH₂–); m¹G, m¹A, m⁵C – производные нуклеотидов G, A, C, имеющих метильные группы (CH₃) в гетероциклах соответственно при атомах N1 и C5; Ψ – псевдоуридинфосфат, у которого гетероцикл (урацил) связан с рибозой не через атом N1, а через атом C5; I – инозинфосфат, который является аналогом G, в котором 2-NH₂-группа заменена на H

нековалентные взаимодействия между собой и складываться в более сложную конструкцию, которую в общем случае называют третичной структурой.

Нековалентные взаимодействия помимо образования водородных связей могут осуществляться в результате притяжения между разноименными зарядами. Упомянутые стекинг-взаимодействия являются примером третьего типа взаимодействий, которые в биохимии чаще всего называют гидрофобными. Они происходят между молекулами или их частями (радикалами), не имеющими электрических зарядов и не способными к образованию водородных связей с молекулами воды. В водном окружении молекулы тРНК стараются по возможности изолировать себя от контактов с водой, объединяясь в единую структуру.

СПОСОБНОСТЬ БИОПОЛИМЕРОВ К ВЫСОКОИЗБИРАТЕЛЬНОМУ УЗНАВАНИЮ ПАРТНЕРОВ. ВЗАИМНОЕ УЗНАВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Важнейшим общим свойством функционально активных нуклеиновых кислот и белков является способность к высокоизбирательному взаимодействию с определенными партнерами, к узнаванию этих партнеров. Это взаимодействие приводит к образованию комплексов, то есть довольно прочных структур, связанных между собой нековалентными связями. Например, рибосомы, составленные из нескольких молекул РНК и большого набора белков, существуют благодаря такому устройству ее компонентов, что каждый из них имеет в своей третичной структуре области для узнавания определенного набора соседей. В результате этого все компоненты в некотором диапазоне условий держатся вместе в виде единой структуры. Всякое узнавание основано на существовании у биополимера при определенной третичной структуре области, у которой сразу по нескольким точкам может произойти взаимодействие с партнером. Последний естественно также должен иметь взаимно ориентированные точки, предназначенные для узнавания. Взаимно узнают друг друга положительный и отрицательный заряды, донор и акцептор неподеленной пары электронов, способные образовать водородную связь или две неполярные области, способные к гидрофобным взаимодействиям.

Знание общих принципов узнавания означает, что для определенного участка белка или нуклеиновой кислоты можно спроектировать такого партнера, который мог бы взаимодействовать с этим участком. Наиболее просто сегодня это можно сделать в случае нуклеиновых кислот. Это обусловлено тремя обстоятельствами. Во-первых, если речь идет об участке одонитевой нуклеиновой кислоты, которая не имеет какой-либо прочной третичной структуры, то нетрудно создать комплементарную последовательность, которая будет образовывать с ней фрагмент двойной спирали. Во-вторых, если двунитевая нуклеиновая кислота, например ДНК хромосом или шпилька в составе одонитевой РНК, имеет комплементарные последовательности, одна из которых образована только пиримидиновыми, а вторая – только пуриновыми нуклеотидами, то можно синтезировать последовательность, состоящую либо только из пиримидиновых олигонуклеотидов, либо только из пуриновых, которая в определенных условиях будет образовывать тройную спираль. Внешний олигонуклеотид образует связи с компонентами уже существующей двойной спирали не путем взаимодействия по Уотсону–Крику, а путем так называемых хугстиновских взаимодействий, представленных на рис. 4.

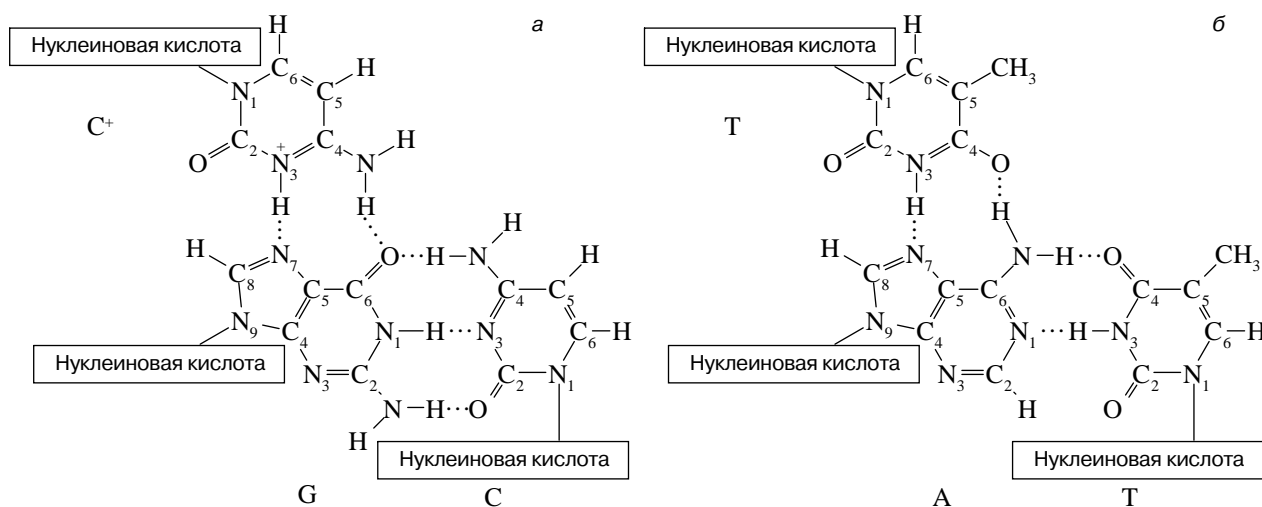


Рис. 4. Взаимное расположение гетероциклов в тройном комплексе полигуаниловой кислоты с двумя цепями полицитидиловой кислоты (а) и полиадениловой кислоты с двумя цепями политимидиловой кислоты (б). Изображенные сверху гетероциклы связаны с двумя нижними хугстиновскими связями

Наконец, самый общий способ найти нуклеиновую кислоту, узнающую некоторого партнера, основан на чрезвычайно эффективном, хотя в своей основе эмпирическом приеме, получившем название селекции *in vitro* (в пробирке). Метод известен также под названием SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment). Для этой цели можно выбрать произвольный лиганд, в интересующем нас случае молекулу нуклеиновой кислоты со сложной пространственной структурой, закрепить ее на каком-нибудь нерастворимом носителе и параллельно получить химическим путем фрагмент нуклеиновой кислоты, оба конца которого имеют определенную первичную структуру, а посередине у которого существует так называемая рандомизованная структура (от англ. *random* — неупорядоченный). Такая структура легко создается в ходе химического синтеза путем введения в реакцию на определенном числе стадий не какого-то определенного мономера, а их смеси. Полученная смесь огромного числа разнообразных фрагментов пропускается через колонку с закрепленным лигандом. Если в этой смеси есть хоть какое-то число молекул, узнаваемых лигандом, они задержатся на колонке, а остальные пройдут через колонку. После этого, изменив условия, например повысив температуру, можно смыть с колонки тот материал, который на ней задержался. Его, скорее всего, будет чрезвычайно мало. Однако благодаря наличию на обоих концах определенных последовательностей нетрудно синтезировать соответствующие этим концам праймеры, провести амплификацию, то есть увеличить количество материала на несколько порядков. Обычно за два-три цикла такой селекции с амплификацией удается получить достаточное для последующих исследований количество материала. Отбран-

ные таким образом нуклеиновые кислоты получили название аптамеров.

АНТИСМЫСЛОВЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Итак, существуют несколько подходов к созданию нуклеиновых кислот, узнающих определенных нуклеиновых кислот-партнеров. Образуя комплексы с определенными участками партнеров, они, скорее всего, будут мешать проявлению их биологической активности, то есть заложенного в эти участки биологического смысла. Поэтому такие воздействия получили название антисмысловых. Следует отметить, что первоначально этот термин применялся только к воздействию на одонитивные нуклеиновые кислоты. Ведущий специалист в этой области, французский ученый Клод Элен, одним из первых применивший для той же цели образование триплексов, предложил называть воздействие в том случае антигенным, так как гены представлены дуплетными структурами. Термин не вполне удачен, так как понятие “антиген” уже широко задействовано в иммунологии для веществ, взаимодействующих с антителами. Ниже термин “антисмысловой” будет использоваться в расширительном смысле, то есть применительно к любым воздействиям на определенные нуклеиновые кислоты.

Первые обещающие эксперименты, основанные на антисмысловых воздействиях, были выполнены американскими учеными Полем Замечником и Стефенсоном в 1978 году, которые подействовали на клетки эмбриона цыпленка, зараженные вирусом саркомы Рауса, олигонуклеотидом, комплементарным одному из фрагментов нуклеиновой кислоты вируса. Было получено достоверное подавление

размножения вируса. Еще раньше, в 1967 году, принцип был сформулирован в Новосибирске Н.И. Гринева, которая предложила присоединять химические активные группы к олигонуклеотидам, чтобы направить (адресовать) эти группы на определенные, комплементарные олигонуклеотиды участки нуклеиновой кислоты, чтобы химическая реакция (модификация) происходила в определенной области нуклеиновой кислоты мишени вблизи от образовавшейся дуплексной структуры. Она назвала этот подход методом комплементарно-адресованной модификации. В 1977 году в совместной работе с лабораторией А.А. Баева на примере адресованной модификации валиновой тРНК, структура которой была установлена в его лаборатории, Н.И. Гринева продемонстрировала, что метод позволяет осуществить алкилирование реагентом, связанным с соответствующим олигонуклеотидом, по определенным точкам валиновой тРНК. В дальнейшем создание производных олигонуклеотидов, несущих химически активную группу, стало важным направлением развития антисмысловых подходов, в том числе в Новосибирском институте биоорганической химии (НИБХ) Сибирского отделения Российской академии наук.

Антисмысловые подходы, основанные на использовании олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот для подавления биологической активности нуклеиновых кислот, очевидно, сулят интересные перспективы в тех случаях, когда нужно задавить реализацию нежелательной информации в живых организмах. В первую очередь открывается перспектива создания нового поколения противовирусных и противоопухолевых препаратов. Такие препараты имеют одно неоспоримое преимущество перед другими путями создания препаратов, воздействующих на нуклеиновые кислоты. Все олигонуклеотиды независимо от мишени, на которую они нацелены, могут быть созданы по единой технологии. Варьировать нужно только последовательности нуклеотидов. В частности, в вирусологии и онкологии часто приходится сталкиваться с таким явлением, как возникновение устойчивости к препаратам. Это происходит чаще всего потому, что у отдельной вирусной частицы или отдельной раковой клетки происходит мутация, приводящая к такой устойчивости. В любом другом случае нужно начинать эмпирический поиск нового лекарственного препарата. В случае антисмысловых воздействий нужно только определить, какое изменение в структуре вирусного генома или онкогена привело к появлению устойчивости, после чего сразу становится ясным, как по той же единой технологии создавать новый препарат.

ПРОИЗВОДНЫЕ И АНАЛОГИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ КАК АНТИСМЫСЛОВЫЕ РЕАГЕНТЫ

На примере аналогов и производных олигонуклеотидов лучше, чем на каком-либо другом примере, можно продемонстрировать возможности химических инструментов исследования в физико-химической биологии и ее приложениях. Уже сами олигонуклеотиды являются такими инструментами, в частности как антисмысловые реагенты. Однако химия открывает огромные возможности их совершенствования. Так, Клод Элен предложил присоединять к олигонуклеотидам полиароматические радикалы (в его случае производные акридина, рис. 5, *а*) для того, чтобы образующиеся дуплексы были прочнее. Аналогичное действие оказывает введение остатков феназина (рис. 5, *б*). Как уже говорилось, первый вариант антисмысловых производных олигонуклеотидов состоял в присоединении к олигонуклеотиду химически активной группы. Сочетание этих двух подходов, реализованное в НИБХ В.Ф. Зарытовой, позволило получить реагенты для комплементарно адресованной модификации нуклеиновых кислот с повышенной эффективностью (то есть работающих при существенно более низких концентрациях, чем тот же реагент без остатка феназина).

Поскольку конечной задачей антисмысловых подходов является использование их в качестве медицинских препаратов, они должны попадать к своим мишеням в определенных органах и тканях, а прежде всего проникнуть в клетки. Однако олигонуклеотиды, как видно из рис. 1, несут отрицательный заряд на каждом нуклеотидном остатке, что препятствует их прохождению через гидрофобные мембраны, окружающие клетки. Работами Пола Миллера и Тсо было установлено, что отрицательно заряженные атомы О фосфодиэфирных межнуклеотидных фрагментов $P-O^-$ можно без существенного ущерба для комплементарных взаимодействий превратить в фосфотриэфиры, например производное $P-O-CH_2CH_3$ (этиловый эфир, рис. 5, *в*). Это не трудно видеть на рис. 2, из которого следует, что фосфатные группы в комплементарных взаимодействиях нуклеотидных остатков не участвуют. В дальнейшем эти же авторы вообще заменили отрицательно заряженный атом О на незаряженную CH_3 -группу, получив аналоги олигонуклеотидов, у которых соседние звенья связаны метилфосфонатным остатком (рис. 5, *д*). Оказалось, что такие производные действительно значительно лучше проникают внутрь клеток по сравнению с обычными олигонуклеотидами.

Еще более эффективным оказалось решение этой проблемы путем присоединения к одному из концов олигонуклеотида объемного гидрофобного остатка, например холестерина (рис. 5, *е*). Как и в случае производных с остатками феназина, оказалось

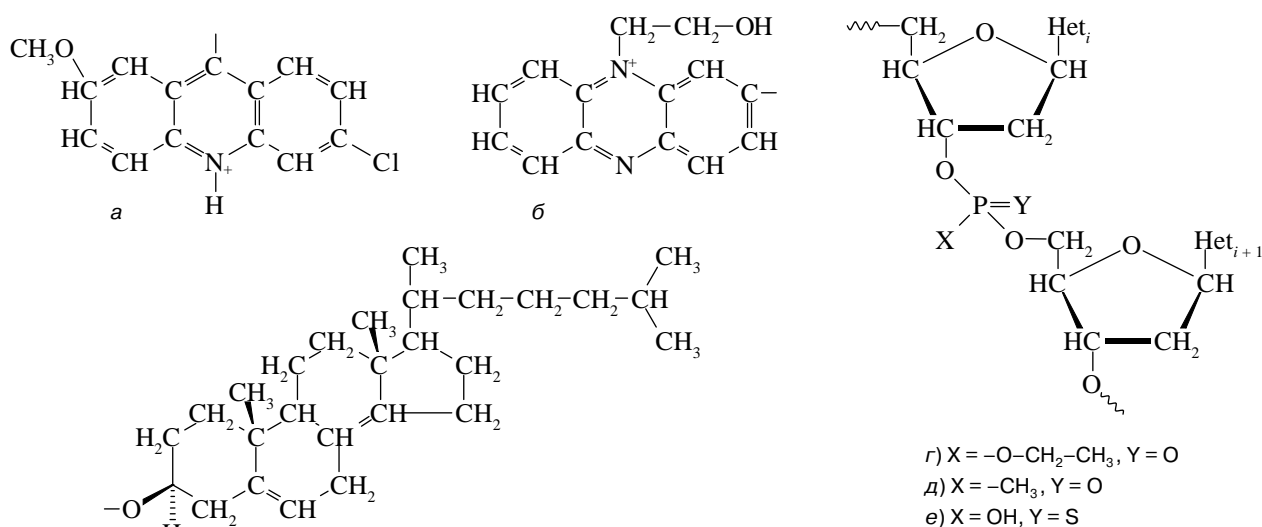


Рис. 5. Структура остатков акридина (а), феназина (б), холестерина (в), фосфотриэфирного (г), метилфосфонатного (д) и фосфориоатного (е) межнуклеотидных узлов

возможным сочетать подходы, направленные на улучшение прохождения антисмысловых олигонуклеотидов через клеточные мембраны, с присоединением реакционноспособных групп. Именно этим способом в работах НИБХ в 1981 году впервые удалось показать, что внутри клеток можно преимущественно поразить определенную мишень среди множества других нуклеиновых кислот. Для этой цели в качестве мишени были выбраны мРНК, которые у эукариот, как правило, содержат на конце несколько десятков остатков (иногда даже сотен) нуклеотида А, так называемые поли(А)-тракты. Естественно, что комплементарным является олигонуклеотид, состоящий либо из U, либо из dT. Был синтезирован олигонуклеотид (T₉U), в котором все межнуклеотидные фосфодиэфирные группы были превращены в фосфотриэфирные, и к такому олигонуклеотиду был присоединен остаток, способный модифицировать нуклеиновые кислоты. При обработке таким производным раковых клеток (асцитной карциномы Кребса) было показано, что модификации резко преимущественно подвергаются именно поли(А)-тракты.

Серьезной проблемой на пути использования олигонуклеотидов и их производных на первых порах оказалась неустойчивость олигонуклеотидов в биологических средах в результате присутствия в них ферментов, катализирующих гидролиз фосфодиэфирных групп (нуклеаз). Правда, выяснилось, что введение радикалов (реакционноспособных групп, остатков, стабилизирующих дуплексы или повышающих их гидрофобность, в частности остатка холестерина) на концевой фрагмент олигонукле-

отида частично защищает последний от действия нуклеаз. Однако особенное внимание исследователей привлекли так называемые фосфориоатные аналоги олигонуклеотидов, в которых один из атомов O, связанный с атомом P, в каждом межнуклеотидном звене заменен на атом серы (S) (рис. 5, е). Фосфориоатные фрагменты оказались существенно более устойчивыми к действию нуклеаз, чем фосфодиэфирные.

Уже приведенные, далеко не исчерпывающие примеры ясно демонстрируют, какие возможности к совершенствованию методов направленного воздействия на нуклеиновые кислоты, а тем самым на информационные процессы в живых организмах открывают химические инструменты.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Кнорре Д.Г., Зарытова В.Ф., Бадашкеева А.Г., Федорова О.С. Реакционноспособные производные олигонуклеотидов как ген-направленные биологически активные вещества // Итоги науки и техники. Биотехнология. 1991. Т. 37.

* * *

Дмитрий Георгиевич Кнорре, доктор химических наук, профессор, действительный член РАН, главный научный сотрудник Новосибирского института биоорганической химии Сибирского отделения РАН, лауреат Ленинской премии. Область научных интересов – молекулярная биология, биоорганическая химия (химия и биохимия нуклеиновых кислот). Автор более 250 публикаций, двух монографий и трех учебников.