



УДК 577.113.4:546.172.6.31

NO-ЗАВИСИМЫЕ МОДИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

© 2007 г. Н. В. Беда[#], А. А. Недоспасов

Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2

Поступила в редакцию 04.04.2006 г. Принята к печати 12.07.2006 г.

Обзор посвящен химическим превращениям нуклеиновых кислот и их компонентов под действием метаболитов оксида азота. Реакции дезаминирования оснований обсуждаются в контексте возможных конкурирующих превращений их промежуточных продуктов (нитрозоаминов, diaзоний-катионов, диазоатов, триазенов, диазоангидридов) и механизмов образования сшивок с белками и нуклеиновыми кислотами. Окисление и нитрование оснований под действием NO_2 рассмотрено с учетом возможности передачи радикала по доменам из стопок оснований в ДНК. Снижением редокс-потенциалов оснований в результате стэкинг-взаимодействий объясняется возможность их реакций в составе нуклеиновых кислот с окислителями, редокс-потенциал которых недостаточен для эффективных реакций с мононуклеотидами. Модификации нуклеиновых кислот производными пероксинитрита обсуждаются с учетом влияния первичной структуры ДНК и образующихся продуктов модификации на реакционную способность отдельных оснований. Рассмотрены возможности восстановления нитрогрупп в составе модифицированных оснований с образованием аминопроизводных и их последующее диазотирование. Результатом может быть замещение остатков нитрогуанина на оксогуанин, а при восстановительном диазотировании – на неповрежденный гуанин. Показано, что промежуточно образующиеся модифицированные основания, например, 8-аминогуанин или 8-диазоадогуанин, могут участвовать в неканоническом спаривании оснований, в том числе образовывать более устойчивые связи сразу с двумя основаниями, характерные для Z-формы ДНК. С учетом вклада микрогетерогенности среды и известных механизмов нитрозилирования и нитрования предсказана более высокая чувствительность к NO-зависимым модификациям (NODM) РНК в сравнении с ДНК. Кратко рассмотрены возможные биологические последствия NODM нуклеиновых кислот. Показано, что NODM под действием метаболитов оксида азота, генерируемых макрофагами и аналогичными клетками при воспалениях или инфекциях, в случае РНК-содержащих вирусов должны приводить к резкому повышению числа мутаций. В результате механизмы защиты от инфекции организма хозяина могут способствовать появлению новых, в том числе и более опасных вариантов инфицирующих вирусов.

Ключевые слова: дезаминирование, диазосигналинг, нитрование, нитрогуанин, оксогуанин, пероксинитрит.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение

Нитроз(ил)ирование, диазотирование и побочные процессы, формально сводимые к электрофильному нитрозированию по атомам азота.

Сокращения: Ar – арил; Arn – ароматический радикал от оснований нуклеиновых кислот; G–G-сшивки – собирательный термин для обозначения структур с двумя остатками гуанина, соединенных ковалентной связью; Hyd – гуанидиногидантоин; NODM – NO-зависимые модификации; NG – 8-нитрогуанин; OG – 8-оксо-7,8-дигидрогуанин; Ox – 2,2,4-триамино-5-(2H)-оксазолон; Sp – спироиминодигидантоин; НК – нуклеиновые кислоты. На схемах символ z использован для обозначения остатков рибозы или дезоксирибозы в нуклеозидах, нуклеотидах и НК, а также связанных с основанием заместителей, примененных авторами конкретных работ в модельных соединениях для моделирования остатков сахара; если свободное основание реагирует аналогично основанию, связанному с сахарным остатком, символ z может обозначать и атом водорода.

[#] Автор для связи (факс: (499) 196-02-21; эл. почта: beda@img.ras.ru; nedospasov@img.ras.ru).

Диазоаты и сходные структуры с несимметрично-замещенной $-\text{N}=\text{N}-$ группой.

Производные оксанина.

Реакции окисления при NO-зависимых модификациях.

Диоксид азота.

Повреждения ДНК пероксинитритом и его аддуктами.

Другие NO-зависимые модифицирующие агенты.

Биохимические последствия NO-зависимых модификаций нуклеиновых кислот.

ВВЕДЕНИЕ

Высшие оксиды азота, образующиеся из биогенного NO, и продукты их последующих превращений способны реагировать с биополимерами и низкомолекулярными метаболитами. Эти реак-

ции играют ключевую роль в регуляции важнейших биохимических процессов и часто рассматриваются как NO-зависимые модификации (NODM). Настоящий обзор посвящен химическим превращениям нуклеиновых кислот (НК) и их компонентов под действием оксидов азота и родственных им неорганических метаболитов, рассмотренных в нашем обзоре [1]. Многие из приведенных там уравнений реакций и ссылок на литературные источники принципиальны при обсуждении NO-зависимых модификаций НК, но для экономии места мы, как правило, не приводим их заново и лишь ссылаемся на работу [1]. По этой причине читателю целесообразно первоначально ознакомиться с ней и иметь ее “под рукой” при чтении настоящего обзора.

Биохимия и биоорганическая химия оксидов азота развиваются весьма бурно, и число публикаций быстро растет. Поскольку многие журналы поступают к российским читателям с опозданием или вообще недоступны, поисковая система Medline (Pubmed) оказывается наиболее эффективным источником информации о последних работах. Опция “Related Articles” позволяет найти идейно связанные работы, включая наиболее свежие и даже не вышедшие из печати (часто в Medline представлены “электронные публикации” работ, принятых в печать; так, 8 декабря 2005 г. были доступны 4480 работ 2006 г., в том числе 65 по ключевому слову “nitric oxide”, 241 – “DNA” и 4 – “nitric oxide and DNA”). По этой причине ключевые словосочетания, эффективные для поиска в Medline, мы приводим в скобках и в русскоязычной версии.

Основные результаты по NO-зависимым модификациям нуклеиновых кислот были получены на нуклеотидах и ДНК, так как именно повреждения ДНК (DNA lesions) придавалось основное значение для объяснения мутаций, канцерогенеза и многих заболеваний. Вклад NO-зависимых модификаций в биохимию РНК до сих пор остается практически неисследованным. Между тем, принимая во внимание механизм мицеллярного окислительного нитрозирования, когда местом генерации активных модифицирующих агентов являются гидрофобные фазы, в том числе ядра макромолекул, в мире НК именно крупные РНК должны быть главными мишенями этих модификаций: у ДНК отношение поверхности к объему значительно выше, чем у РНК (о регулирующем действии поверхности раздела фаз и роли катализа реакций нитроз(ил)ирования для равновесий оксидов азота и NODM см. главу “Вклад гетерогенности среды” в [1]). В механизме “восстановительного нитрозирования” (термины reductive nitrosation и reductive nitrosylation используются одинаково широко) модифицирующие агенты рождаются при участии ионов переходных металлов (см. главу “Ионы металлов в NODM” в [1], работы [2–4] и ссылки в них). Из-за более широкого разнообразия структурных мотивов при сравнимых молеку-

лярных массах вероятность появления в молекуле НК комбинации лигандов с особенно высоким сродством к какому-либо каталитически активному иону переходного металла должна быть выше для молекул РНК, чем для ДНК. При общем дефиците таких ионов и высоких концентрациях различных комплексообразователей в клетке конкуренция за эти ионы должна быть жесткой. Если вероятность появления таких сайтов в РНК выше, то эти ионы, каталитически активные для генерации NO-зависимых модифицирующих агентов, должны быть связаны преимущественно с РНК, во всяком случае, если нет специального отбора против накопления таких сайтов. Таким образом, оба механизма нитроз(ил)ирования кажутся более предпочтительными для модификации РНК. Если РНК принимают участие не только в синтезе белка, но и в различных регуляторных процессах, типа РНК-интерференции, NO-зависимые модификации РНК должны отражаться на этих процессах, первоначально ассоциировавшихся с ДНК. Ниже мы рассмотрим некоторые возможные следствия из ожидаемой частоты таких NODM РНК.

В таблице показано количество ссылок, обнаруживаемых поисковой системой Medline по комбинациям ключевых слов, одно из которых связано с NODM. В действительности “преимущество” ДНК над РНК в исследовании NODM нуклеиновых кислот сейчас значительно выше, так как существенное (примерно пропорциональное общей частоте встречаемости терминов, ДНК/РНК = = 834384/452636 \approx 1.84) количество работ попадает в выборки из-за одновременного, но независимого использования терминов в статьях. Так, из 24 статей в комбинации “nitrosation and RNA” собственно о нитроз(ил)ировании РНК речь идет в одной (!!) – в обзоре [5] лишь констатируется, что нитрозирование РНК должно быть эффективным. Интересно, что статья Нгуена и соавт. [6], в которой было определено нитрозирование РНК под действием NO в аэробных условиях, этой комбинацией терминов не обнаруживается.

Важно отметить, что традиционные физико-химические методы анализа, используемые при исследованиях NODM НК (гель-электрофорез, ВЭЖХ, МС, ЯМР), эффективны при модификациях, затрагивающих несколько процентов (в лучших случаях – сотые доли процента) оснований НК. Мы покажем, что по мере развития методов были обнаружены все более редкие и неожиданные модификации. Часто, особенно в последние годы, существование неизвестных NODM было сначала предсказано теоретически и лишь затем обнаружено экспериментально – важно знать, что искать. Ясно, что даже *единственная* модификация (замена, сшивка) единственной имеющейся в клетке молекулы ДНК, если она не будет безошибочно репарирована, может иметь серьезные долговременные и даже фатальные послед-

ствия как для клетки, так и для многоклеточного организма. Поэтому биологический интерес представляют “минорные NODM” – реакции, идущие с очень низким выходом и/или только в молекулах с уникальными последовательностями нуклеотидов. Разработка методов “химии единичных молекул” для изучения таких NODM – задача ближайшего будущего.

Свободный NO не взаимодействует с *обычными* компонентами НК. До сих пор неизвестны свободно-радикальные модификации НК, имеющие физиологическое значение и *запускаемые* NO. Мицеллярное окислительное нитрозилирование по механизмам с промежуточным образованием радикалов НК должно быть распространенной формой модификации, по крайней мере, крупных РНК, но “повреждающими” НК молекулами являются высшие оксиды азота. Известной реакцией NO, блокирующей синтез ДНК, является его взаимодействие с тирозильным радикалом в рибонуклеотидредуктазе (в этом ферменте ключевым для катализа является тирозильный радикал; считается, что он генерируется “спонтанно”, однако полный механизм неизвестен), что приводит к ингибированию фермента и синтеза ДНК [7, 8].

НИТРОЗ(ИЛ)ИРОВАНИЕ, ДИАЗОТИРОВАНИЕ И ПОБОЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ, ФОРМАЛЬНО СВОДИМЫЕ К ЭЛЕКТРОФИЛЬНОМУ НИТРОЗИРОВАНИЮ ПО АТОМАМ АЗОТА

Первичные ароматические амины (**1**) при нитроз(ил)ировании образуют сложную смесь продуктов, главные из которых показаны на схеме 1. Ожидаемые нитрозамины (**2**), вполне устойчивые в случае вторичных аминов, быстро теряют протон “аминного” атома азота (1–3-прототропная перегруппировка, что-то вроде кето-енольной таутомерии, возможно, с предварительным протонированием атома кислорода соединения (**3**)), так что двойная связь оказывается сопряженной с ароматической системой. В отсутствие кислот связь N–O может сохраняться, в равновесии находятся изомеры диазогидроксидов (“диазогидратов”), в действительности являющихся слабыми кислотами (показан *транс*-изомер относительно N=N-связи (**4**); вращение вокруг C–N-связи также затруднено из-за сопряжения), и их анионы – диазоаты (**6**). В щелочной среде (на схеме 1 – слева) превращение в фенол (**8**) протекает благодаря нуклеофильному замещению при атаке ионом OH⁻. Альтернативный вариант реализуется в кислой среде (на схеме 1 – справа); промежуточными продуктами могут быть и карбокатионы, и арильные радикалы (ниже будет рассмотрен случай радикального арилирования ДНК по остаткам пуринов).

Число работ по модификациям НК, выявленных поисковой системой Medline по комбинациям ключевых слов в декабре 2005 г.

Ключевое слово	Комбинация с ключевым словом		
	–	ДНК	РНК
–		834384	452636
Nitrosation*	1246	125	24
Nitrosylation	567	71	28
Diazotization	242	7	2
Nitric oxide	71662	4549	5634
Peroxynitrite	4025	555	193
Nitration	1728	144	61
NO ₂	4343	195	142

* О различиях значений терминов нитрозирование и нитрозилирование (в том числе в русском и английском языках) см. сноску на стр. 6 в работе [1]. Так, в англоязычной версии обзора [1] русскоязычное “нитрозирование” следовало переводить nitrosylation, и наоборот. Это было сделано с некоторыми пропусками, хотя в сноске в английской версии было указано, что используется номенклатура IUPAC. В результате опубликованная английская версия [1] содержит несколько “опечаток”, иногда полностью меняющих химический смысл. Во избежание подобной путаницы мы используем в этом обзоре общепринятую номенклатуру IUPAC и в русскоязычном тексте: нитрозилирование – радикальная реакция, нитрозирование – электрофильная. Нитроз(ил)ирование употребляется в случаях, когда механизм неизвестен или реакция может протекать параллельно по нескольким путям. Мы призываем пишущих по-русски коллег последовать нашему примеру.

Диазогидроксиды – слабые кислоты, и в избытке кислоты повторно протонируются по атомам кислорода (сравни с протонированием HNO₂ – реакция (**18**) в работе [1]) с образованием катионов (**5**) и, после отщепления воды, (**7**). Диазониевый катион (**7**) – электрофил, склонный к реакциям азосочетания с образованием соединений типа Ar–N=N–OR, Ar–N=N–NHR, Ar–N=N–SR, Ar–N=N–R (в последнем случае, хорошо известном по образованию азокрасителей Ar–N=N–Ar¹ в реакциях с нафтолами и нафтиламинами, атака может направляться и по алифатическому атому углерода, например, в 1,3-дикетонах). Стабильность диазониевых солей зависит от заместителей в кольце, растворителей (сольватации) и противоионов (гидросульфаты ((**7**)⁺HSO₄⁻) и тетрафторбораты ((**7**)⁺BF₄⁻) для некоторых Ar–NN⁺ – коммерчески доступные реактивы). Принципиально, что фенол (**8**) (ArOH) является *одним из нескольких* возможных конечных продуктов и сам способен вступать в реакции азосочетания с компонентами смеси [9].

Казалось, в случае оснований НК принципиально картина не меняется, хотя в кислой среде неустойчивы сами нуклеотиды (по этой причине

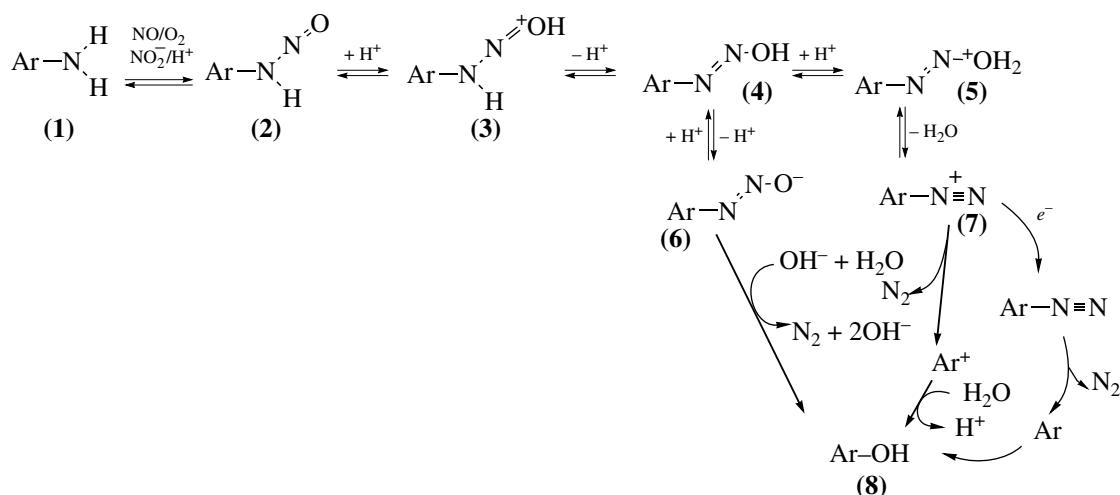


Схема 1. Образование фенолов при диазотировании первичных ариламинов – возможные конкурирующие механизмы.

при синтезе нитрозируют проводят при крайне низких концентрациях кислот, например, в натрий-ацетатном буфере pH 3.7), а диазоаты и их сопряженные кислоты (диазогидроксиды) могут дополнительно стабилизироваться образованием водородных связей с атомами азота гетероциклов. Тем не менее, в течение длительного времени выделяли и анализировали только “классические” конечные продукты диазотирования (формально – фенолы, протон с НО-группы которых перемещен на атом азота гетероцикла из-за кето-енольной таутомерии) – см. схему 2.

Дезаминирование оснований является общеизвестной модификацией, исследованной до открытия биогенного NO. Первоначально процесс был изучен применительно к кислым растворам нитрита (нитрозирующим агентом считался H_2NO_2^+ , позже N_2O_3 – см. стр. 7–8 и уравнения (17)–(19) в работе [1]) – в кислой среде желудка поступающий с пищей нитрит является нитрозантом, образование канцерогенных нитрозаминов приписывалось ему. После открытия биосинтеза NO в клетках млекопитающих роль нитрозирования, в том числе нитрозирования НК, стала оцениваться как важный регуляторный механизм, однако даже в подробном обзоре 2000 г. Маршалла и др. [10] по вкладу нитрозирования в регуляцию экспрессии генов основное внимание уделено нитрозированию белков-регуляторов, а не НК. По-видимому, такая “асимметрия” связана со сложностью объекта исследования (особенно РНК) и отсутствием экспериментальных данных.

Так как нитрозирующим агентом считался N_2O_3 [1, 5], казалось важным доказать его образование из оксида азота при физиологических значениях pH в обычных клетках: скорость окисления NO в гомогенной среде слишком мала, и игнорирование гетерогенности не позволяло объяснить участие NO в

нитрозировании даже в аэробных условиях. После осознания вклада мицеллярного катализа в окисление NO этот парадокс был снят. Предполагалось, что непосредственная атака “ N_2O_3 ” на ДНК может привести к дезаминированию через образование диазониевого иона, гидролиз которого завершается дезаминированием [11]. Конечным результатом этого процесса является замена аминогруппы на гидроксильную группу, как показано на схеме 2 [12]. Дезаминированию в реакции с “ N_2O_3 ” могут подвергаться любые основания, содержащие экзотрициклическую аминогруппу. Следовательно, аденин

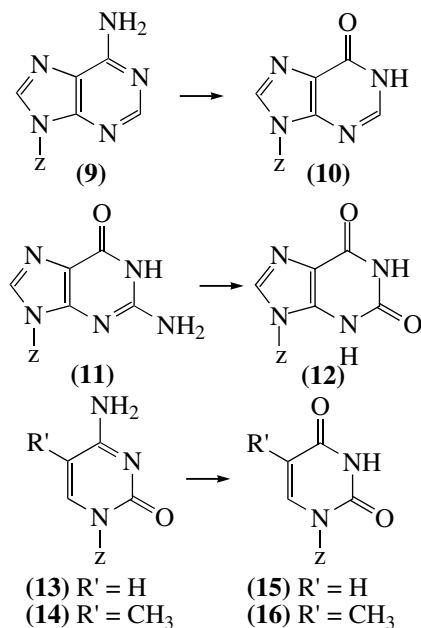


Схема 2. “Классическое” дезаминирование оснований нуклеиновых кислот.

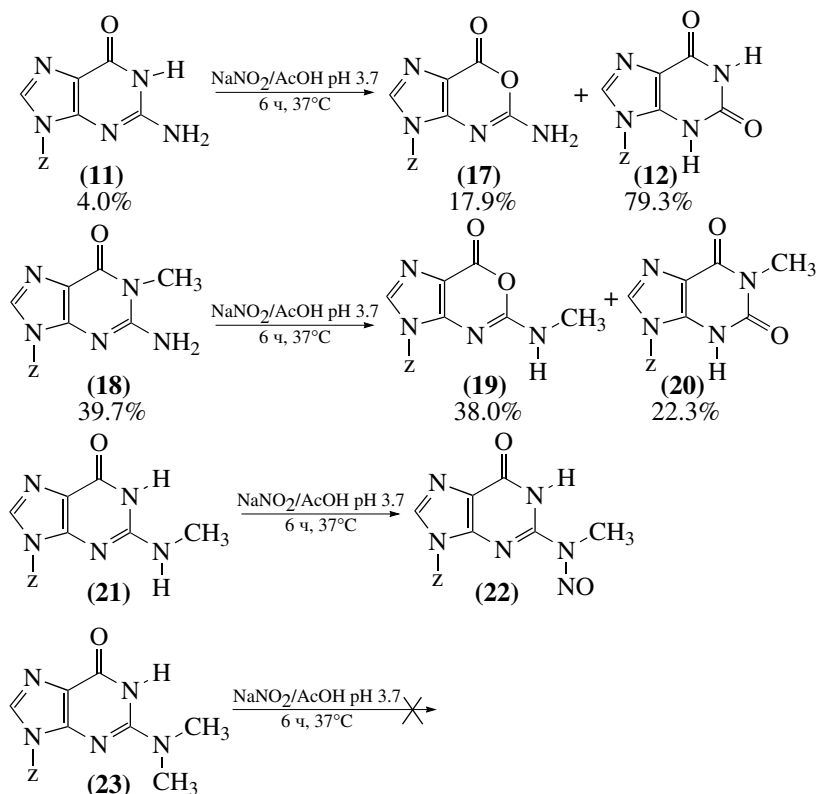


Схема 3. Нитроз(ил)ирование замещенных гуанозинов (по [22]). Указан выход в процентах в расчетах на нуклеотид. z – рибозил.

(9), гуанин (11), цитозин (13) и 5-метилцитозин (14) (и соответствующие нуклеотиды/нуклеозиды) могут быть дезаминированы с образованием гипоксантина (10), ксантина (12), урацила (15) и тимина (16), соответственно (см. схему 2). Потенциальные последствия этой реакции разнообразны при переходе от нуклеотида к нуклеотиду.

Дезаминирование аденина приводит к образованию гипоксантина, а “ошибочное” спаривание гипоксантина с цитозином в ДНК ведет к A : T → G : C-переходам.

Дезаминирование гуанина приводит к образованию ксантина. “Некомплементарный” ксантин может являться причиной перехода G : C → A : T. Из-за нестабильности ксантина ДНК может легко депуринизироваться с образованием AP-сайта и затем реплицироваться, следуя “правилу А” (введение аденина напротив AP-сайта), что ведет к G : C → A : T-трансверсиям. Наиболее вероятно, что AP-сайт будет вырезан эндонуклеазой, в результате чего получится одноцепочечный разрыв, подвергающийся репарированию.

Дезаминирование цитозина приводит к образованию урацила, что влечет G : C → A : T-замены и мутации за счет ошибочного спаривания. Из-за высоких концентраций урацилгликозилазы в клетках урацил может быть легко репарирован.

Метилирование цитозина с образованием метилцитозина и последующее дезаминирование до тимина тоже может дать переход G : C → A : T.

Для оценки важности последовательности нуклеотидов ДНК при определении активности оснований по отношению к нитрозированию были изучены относительные скорости NO-зависимого дезаминирования 2-дезоксигуанозина и 2-дезоксцитозина в различных окружениях [13]. Константы скорости дезаминирования гуанина и цитозина как в одно-, так и в двуцепочечной ДНК меньше, чем константы скорости нитрозирования морфолина (широко распространенный стандарт в исследованиях кинетики нитрозирования) в $\sim 10^3$ – 10^4 раз. Одноцепочечные олигомеры были в ~ 5 раз более реакционноспособными в сравнении с дезоксинуклеотидами и в ~ 10 раз в сравнении с двуцепочечными олигомерами. Во всех случаях ксантина в продуктах реакции было примерно в два раза больше, чем урацила, т.е. наиболее активным в реакциях дезаминирования является гуанозин.

Более поздние исследования показали, что реакции нуклеотидов и нуклеиновых кислот с NO в аэробных условиях или с кислыми растворами нитрита являются более сложными. При обработке гуанина оксидом азота (II) в присутствии кислорода или азотистой кислотой помимо ксантина был выделен новый продукт – оксанин (17)

(на схеме 3) [14]: атом азота в гетероцикле замещался на кислород. После обработки 2-дезоксигуанозина или ДНК NO в аэрированных растворах получали производные оксанина и ксантина в мольном соотношении $\sim 1 : 3$. “Улучшенный” (2005 г.) препаративный синтез дезоксиоксанозина (dOxo) включает инкубацию dGuo (4 ммоль) с 10-кратным избытком (роль этого избытка не обсуждается; возможно, при меньших концентрациях реакция слишком медленна) 0.1 М нитрита натрия в ацетатном буфере pH 3.7 при 45°C в течение 4 ч и последующее выделение целевого продукта хроматографией с выходом 15% на взятый в реакцию дезоксигуанозин [15]. Значительная часть исходного dGuo выделяется в неизменном виде, однако увеличение времени реакции оказалось нецелесообразным, так как dOxo начинает выпадать из реакционной смеси в осадок вместе с побочными продуктами, и выделить его в чистом виде из осадка не удается. Таким образом, скорость реакции нитрозирования гуанина мала даже в этих явно нефизиологических условиях. Кроме того, оксанин образуется в реакциях перенитрозирования (ср. реакции (25) и (27) в работе [1]), например, при инкубации нуклеотидов или ДНК с *N*-нитрозоиндолами (типа изомеров *N*-нитрозотриптофана – см. формулу II в работе [1]) при “физиологических” значениях pH [16, 17]. Это иллюстрирует роль *N*-нитрозосоединений, образующихся при нитроз(ил)ировании вторичных аминов, в “прямой” (без участия ферментов и реакций алкилирования) модификации НК. Возможная роль обратимого нитроз(ил)ирования триптофана в составе белков [18–20] в защите НК от окисления будет рассмотрена ниже.

Рибонуклеозид оксанина – оксанозин был выделен как новый противораковый антибиотик в 1981 г. из бактериальной культуры [21]. 2-Дезоксиоксанозин проявлял более высокую противоопухолевую активность, чем оксанозин. В работе Судзуки и соавт. [22] приведен гипотетический механизм образования 2-дезоксиоксанозина при действии кислых растворов нитрита. Поскольку 1-метилгуанозин (18) в тех же условиях дает метилированный оксанозин (19), *N*²-метилгуанозин (21) – *N*-нитрозамин (22), а *N*²,*N*²-диметилгуанозин (23) в реакцию не вступает (см. схему 3), образование оксанозина не связано с нитрозированием гетероциклического азота, но требует нитрозирования/диазотирования незамещенной 2-аминогруппы и, очевидно, образования иона диазония или диазоата (диазоат (24) был получен с удовлетворительным выходом при нитрозировании в разбавленной H₂SO₄ при 0°C и быстром подщелачивании, сравни со схемой 1 – “неканонический” ход реакции).

После обработки ДНК азотистой кислотой обнаруживаются внутри- и межнитевые сшивки в ДНК; в случае нативных клеточных объектов –

ДНК-белковые сшивки [23–25]. Предполагалось, что эти продукты могут образовываться и в ДНК, обработанной NO в аэробных условиях, под действием “N₂O₃”. С использованием ВЭЖХ с детекцией по флуоресценции (лазерное возбуждение) и олигомера АТАТСГАТСГАТАТ с флуоресцентной меткой на 5'-конце было доказано образование межнитевых сшивок ДНК при обработке NO в аэробных условиях [26]. Частота сшивок зависела от концентрации NO (и, видимо, кислорода, но это не было исследовано) и соответствовала примерно 6% от выхода продукта дезаминирования (ксантина). Образование межнитевых сшивок после обработки ДНК азотистой кислотой было обнаружено гораздо раньше [23]. Структура продукта реакции в месте сшивки двух гуанинов (dG-to-dG (25)) (см. схему 4) установлена методами ЯМР и МС [24].

В серии работ Р. Глазера и соавт. проведено комплексное исследование дезаминирования оснований, механизмов образования производных оксанина и сопутствующих реакций методами органической химии и компьютерного моделирования. Исключительно удачен обзор [27] по диазотированию гуанина – в списке литературы более 100 ссылок; настоятельно рекомендуем познакомиться с оригиналом статьи: цветные рисунки в обзоре принципиальны и значительно облегчают восприятие весьма насыщенного текста.

Авторы рассматривают совокупность экспериментальных результатов предшествующих работ, выделяя парадоксальные или неожиданные: (а) образование в ДНК, помимо ксантина и оксанина, также и различных межцепочечных G–G-сшивок, (б) отсутствие оксанина при действии NO/O₂ на двуцепочечную ДНК при физиологических значениях pH (и ксантина, и G–G-сшивки при этом образуются!), (в) отсутствие каких-либо экспериментальных подтверждений образования диазогуанозина (26) – ожидаемого продукта *N*²-нитроз(ил)ирования (при том, что Судзуки и соавт. [22] выделили диазоат (24) и *N*-метил-*N*-нитрозопроизводное (27)), а также (г) зависимость реакционной способности гуанина в составе ДНК от окружения в последовательности нуклеотидов. Заметим, образование “классической” dG-to-dG-сшивки (25) можно объяснить нуклеофильной атакой диазоата (24), как показано на схеме 4 вверху.

Анализ предлагаемого Глазером объяснения требует рассмотрения кислотно-основных равновесий для некоторых диазосоединений (см. схему 5). Если “обычные” арилдиазониевые катионы, например фенилдиазоний (31), могут потерять свой положительный заряд (и высокую электрофильность) путем присоединения аниона к концевому атому азота (например, с образованием “диазогидроксидов” (32) при присоединении OH⁻ – их последующее депротонирование приведет к диазоатам (33)), со-

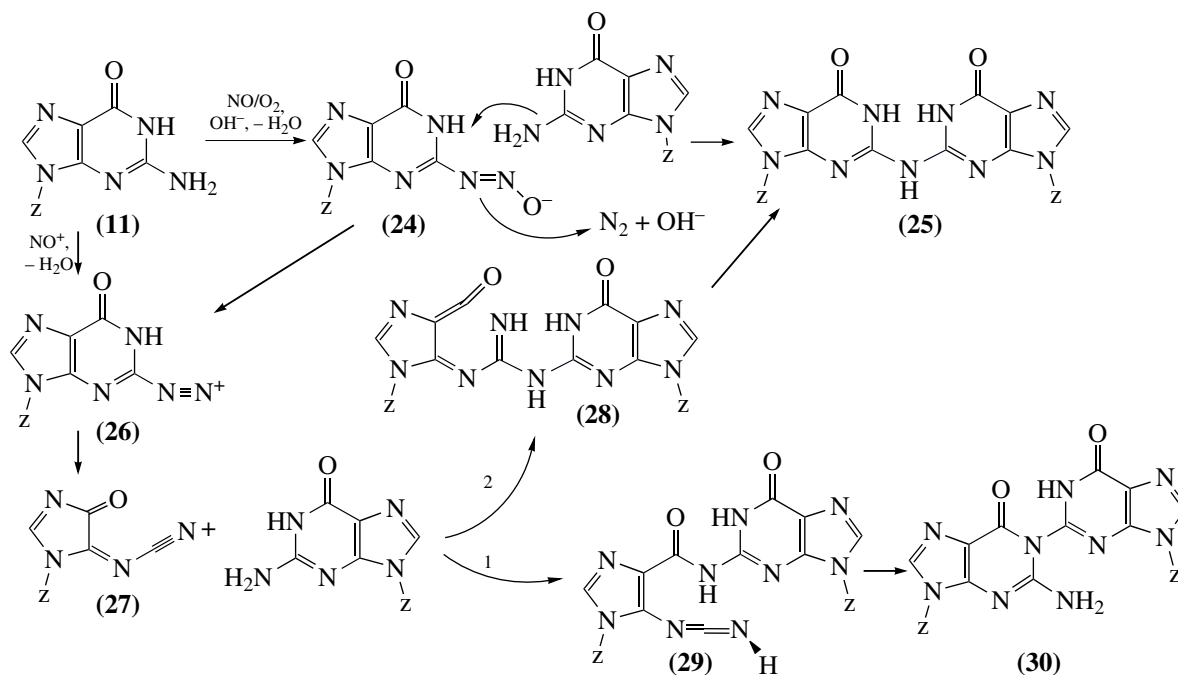


Схема 4. Образование G-G-сшивок.

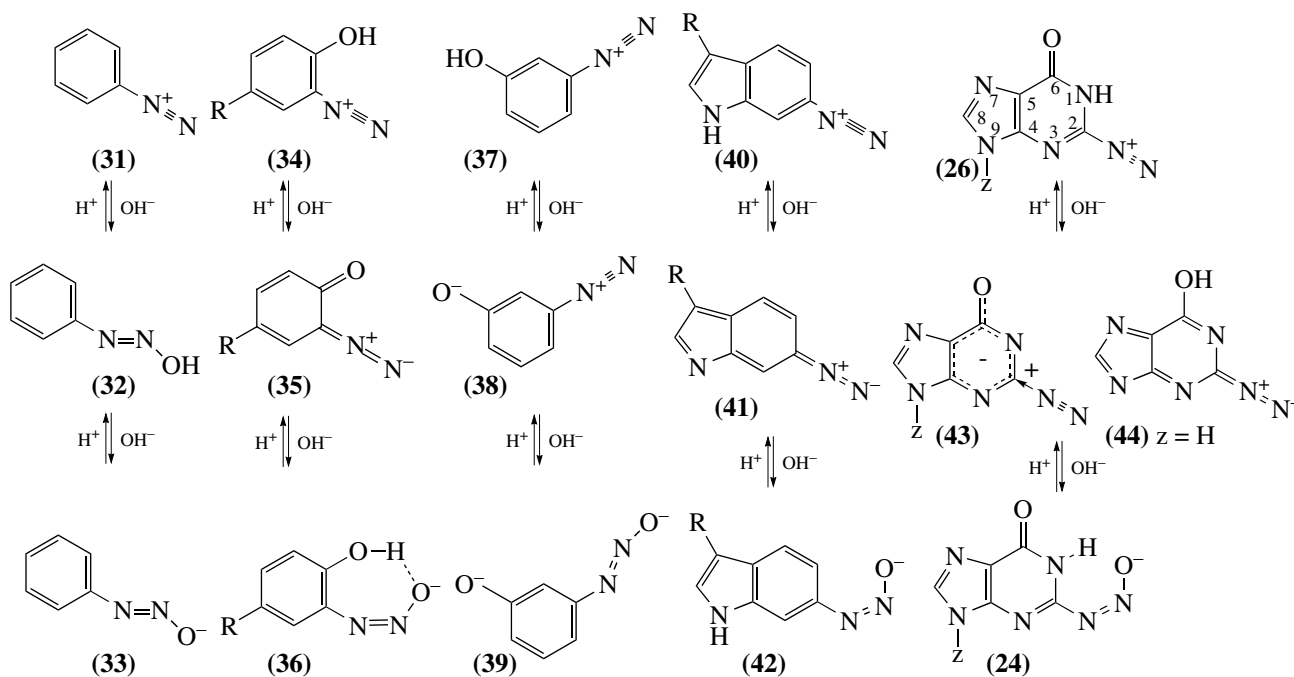


Схема 5. Кислотно-основное равновесие диазосоединений в растворах. ((34)–(36) R = CH₂-CH-(NH₂)COOH) – диазо-производные тирозина; ((40)–(42) R = CH₂-CH-(NH₂)COOH) – диазопроизводные триптофана.

единения, имеющие “подвижный” атом водорода, связанный с ароматической системой, иногда получают принципиально другую возможность стабилизации – потерять протон. Так, в случае *o*- и *p*-диазофенолов (34) (на схеме 5 рассмотрено на примере

орто-изомера) перераспределение двойных связей и уход протона с фенольного гидроксила позволяет сохранить ароматичность (замкнутую систему из 6 π -электронов). Это приводит к диазохинонам (хинон диазидам, диазооксидам) (35) – O=C- и C=N-свя-

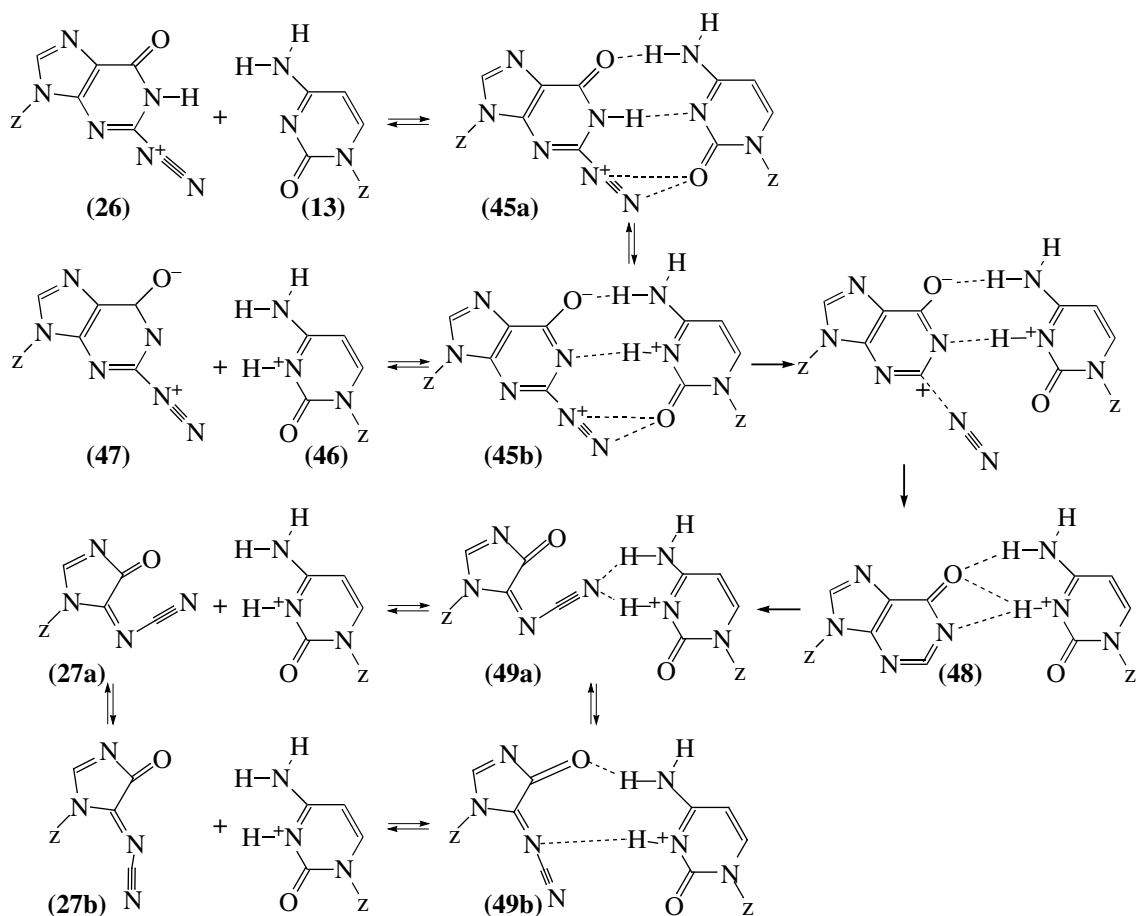


Схема 6. Раскрытие цикла при дезаминировании гуанина ($z \neq H$).

зи сопряжены (биохимически важный пример – хинондиазид тирозина – см. структурные формулы VIII в работе [1]). Вместе с протоном теряется и электрофильность диазониевой соли. Для *мета*-дiazофенолов (37) такой возможности нет: ароматических структур с сопряженными двойными связями $O=C$ и $C=N$ не существует, возможны лишь структуры с разделением зарядов, типа (38), но такие вещества оказываются нестабильными.

Роль донора протона может играть и атом азота гетероцикла, даже сопряженного с циклом, к которому присоединена диазогруппа, как показано структурой (41) для индольного фрагмента 6-дiazотриптофана (40). В случае нуклеотидов один из таких гетероциклических атомов азота оснований (потенциальных доноров протона) связан с сахарным остовом и протона уже не имеет (сравни структуры (26) и (44)). У гуанина (и только у него из канонических оснований) имеется еще один претендент – атом N^1 , однако карбонильная группа в положении 6 (двойную связь $C=O$ перенести нельзя) не позволяет образовать стабильную diaзохиноидную структуру, как и в случае *м*-diazофенола (37): отрицательный заряд

будет делокализован между атомами азота и кислорода (см. структуру (43)), но положительный делокализоваться не может¹. Эту-то особенность и использует Глазер для объяснения “неожиданного” поведения гуанозина при diaзотировании.

Нестабильность diaзогуанозина, по Глазеру, зависит от наличия цитозина (13) в комплементарной цепи ДНК (см. схему 6). Образование аналога уотсон-криковской пары – (45) в случае N^2 -diazогуанина приводит к быстрому уходу N^1 -протона ((45a) \rightarrow (45b) – цитозин действует как основание), образуется цитозониевый ион (46) (электрофил) и нестабильная структура несостоявшегося хинондиазида (47). Методами молекулярной механики было показано, что группа N_2 (см. структуру (45b)) оказывается практически

¹ Заметим, diaзоатные структуры ((36), (39), (42), (24)) возможны для всех рассмотренных примеров. Как образуется diaзоат гуанозина при diaзотировании в серной кислоте и подщелачивании реакционной среды, не вполне ясно: образующийся в кислоте diaзониевый ион должен при подщелачивании превращаться в diaзоат быстрее, чем терять протон при атоме азота основания. Глазер и соавт. в работе [27] этого превращения не обсуждают.

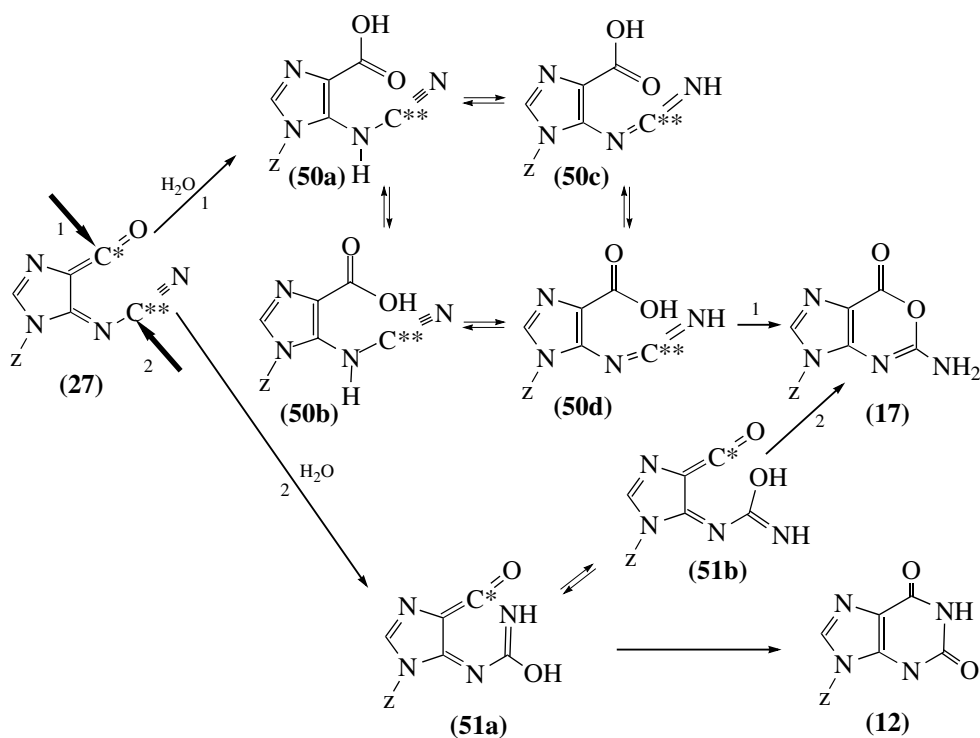


Схема 7. Конкурирующие пути в замыкании цикла при диазотировании гуанина ($z \neq \text{H}$).

несвязанной с нуклеотидной частью и сразу уходит в виде молекулы азота. Оценка времени жизни (26) в паре с цитидином – менее наносекунды!

Потеря N_2 также не позволяет образовать стабильную систему: C^2 -атом углерода в продукте (48) оказывается в sp -гибридизации (нормальный валентный угол – 180°) и не может оставаться в составе цикла: цикл должен разомкнуться – структура (27a). Это приводит к появлению *двух* sp -гибридизованных атомов (на схеме 7 отмечены звездочками) – в кетеной (верхняя – *) и иминонитрильной (нижняя – **) группах. Дальнейшие события происходят с их участием, а разнообразие продуктов полной реакции связано с их конкуренцией за мишени.

На схеме 7 жирными стрелками показаны два потенциальных места для атаки в образовавшейся структуре (27). При присоединении воды к кетену (путь 1) образуется карбоновая кислота (50a), при присоединении к нитрилу – имид (51a). И в том, и в другом случае второй sp -гибридизованный атом не затронут и ждет своей очереди. Теперь атака по любому из них может протекать внутримолекулярно, но в варианте 1, если вода атаковала кетен “сверху” и первоначально образовалась кислота (50a), $-\text{COOH}$ -группа должна предварительно повернуться на 180° (или протон перепрыгнуть на другой атом кислорода) для изомеризации в (50b). Если это произойдет, путь 1 приведет к оксанину (17). Для образования окса-

нина по пути 2 необходим поворот (или перескок протона) в имидной группе: (51a) \rightarrow (51b); иначе путь 2 приведет к ксантину (12).

Интермедиат (27) и, особенно, первичные продукты присоединения (например, (50) и (51) в случае присоединения воды) – высоко реакционно-способные, но достаточно долгоживущие продукты, и, в принципе, имеют возможность дожидаться поворотов или изомеризации (рассматриваются $\text{N}-\text{CN} \leftrightarrow \text{N}=\text{C}=\text{N}$ (например, (50a) \leftrightarrow (50c) на схеме 7) и *цис-/транс-* (27a) \leftrightarrow (27b) на схеме 6) реакции изомеризации), поэтому реально в смеси находится множество² малостабильных промежуточных продуктов превращений, которые образуют известные выделяемые продукты (оксанин, ксантин, “шивки” и др.) лишь при обработке реакционных смесей (в случае ДНК, возможно, после гидролиза).

Предлагаемый механизм объясняет, почему оксанин не образуется в двуцепочечной ДНК при действии NO/O_2 при нейтральных значениях pH: молекула воды может атаковать кетен только в плоскости, перпендикулярной оси молекулы ДНК (“сбоку”), и образование сразу изомера

² Структуры (50c), (50d) из-за наличия хирального $\text{N}=\text{C}=\text{N}$ фрагмента являются в действительности смесью диастереомеров (в формуле (29) на схеме 4 показан один из них – атом водорода карбодиимида *над* плоскостью молекулы); в статье [27] потенциальные последствия этой стереоизомерии не рассматриваются.

(50b) невозможно; вращение (50a) \rightarrow (50b) также затруднено “спариванием” оснований (в структурах (48), (49) на схеме 6 показаны ожидаемые водородные связи); путь 2, требующий изомеризации (поворота) (51a) \rightarrow (51b) в ходе реакции, не может конкурировать с образованием ксантина по реакции (51a) \rightarrow (12), протекающей без каких-либо вращений. В случае нуклеотидов и одноцепочечных ДНК (и РНК?) таких ограничений нет, и оксанин может образоваться наряду с ксантином.

Помимо воды, атаковать образовавшиеся после вылета N_2 интермедиаты могут другие нуклеофильные группы. Если этой нуклеофильной группой окажется аминогруппа гуанина противоположной цепи в двуцепочечной ДНК, образуется G–G'-сшивка (см. схему 4).

Справедливость предложенного Глазером механизма превращений диазотированного гуанозина была подтверждена предсказанием существования и последующим обнаружением в модельных экспериментах нового типа G–G'-сшивок. Если интермедиат (27) действительно образуется в результате нитрозирования, в случае, если атакующей его нуклеофильной группой является аминогруппа гуанина, пути 1 и 2 на схеме 4 преимущественно должны давать *разные* продукты: известная G–G'-сшивка (dG(N²)-to-dG'(C²)) (25) будет образовываться по пути 2, когда атаке подвергается *sp*-гибридизованный атом иминонитрила (отмечен **) с образованием кетена (28) (см. схему 4). Если же первой будет атакована кетенная группа (путь 1), в качестве основного продукта следует ожидать изомер (29), далее циклизующийся в (30) (dG(N¹)-to-dG'(C²)). Как и в случае атаки водой, в двуцепочечной ДНК путь 1 затруднен, т.е. должна образовываться только “обычная” dG-to-dG'-сшивка (25).

Было установлено, что частота образования межцепочечных G–G'-сшивок зависит от нуклеотида, соседнего в комплементарной цепи с диазотируемым G. Образование G–G'-сшивок возможно, если два Gua в двунитевой структуре оказываются рядом (по крайней мере, в классической модели ДНК). Поскольку в комплементарной цепи напротив гуанина находится цитозин, сшивки могут образовываться только в структурах с мотивами 5'-GC-3' или 5'-CG-3' в каждой из цепей. Оказывается, чаще других образуются сшивки в мотиве CCGG [28]. Селективность, в целом, можно объяснить различиями в доступности аминогрупп ненитрозированных остатков гуанина в каждом из мотивов (в простейшем варианте – просто расстоянием между аминогруппами двух остатков гуанина) [29]. Действительно, чем ближе аминогруппы гуанинов противоположных цепей ДНК друг к другу, тем выше вероятность реакции продукта диазотирования одной из них со второй, а не с другими нуклеофилами (например, молекулой

воды, что приведет к образованию оксанина или ксантина, но не сшивки). Если шестичленный цикл гуанина при диазотировании временно раскрывается и рассмотренная конкуренция в атаке интермедиатов имеет место, присоединяющаяся аминогруппа для успешного образования сшивки (одной из возможных сшивок!) должна находиться не рядом с местом, где была исчезнувшая при диазотировании аминогруппа, а рядом с образующимися при вылете N_2 *sp*-гибридизованными атомами (см. схему 6). В статье [27] приведены замечательные цветные рисунки, иллюстрирующие различия двух подходов.

Ниже будет показано, что два остатка гуанина в G–G-последовательности в цепи ДНК имеют разный редокс-потенциал. Если диазотирование протекает как последовательные реакции окисления (например, действием NO_2) и нитрозилирования ($G + \cdot NO_2 \rightarrow \cdot G + NO_2^-$; $\cdot G + \cdot NO \rightarrow G-NO \rightarrow \dots$), то преимущественное образование сшивки “первым” G связано не с геометрическими факторами, а со снижением его редокс-потенциала по отношению ко “второму”. В процессе передачи радикалов (“дырок”) по стопкам оснований ДНК (см. ниже) их концентрации оказываются выше в местах с пониженным редокс-потенциалом, т.е. на “первом” G. Таким образом, имеются принципиально разные подходы к объяснению наблюдаемой селективности. Вероятно, для оценки вклада каждого из механизмов сейчас недостаточно экспериментальных данных. Показано, что в двунитевых олигонуклеотидах, содержащих межцепочечную сшивку G–G', нарушается обычное спаривание G с C [30, 31].

Аналогичные механизмы диазотирования с промежуточным раскрытием цикла были рассмотрены и для других оснований [32, 33]. В случае цитозина продукт раскрытия цикла (53) может терять связь с сахарным остатком и превращаться в 3-изоцианатоакрилонитрил (смесь изомеров $O=C=N-CH=CH-CN$, на схеме 8 показан изомер (54) – один из них), который благодаря двум реакционноспособным группам на концах молекулы мог бы участвовать в образовании сшивок оснований (например, G и A в противоположной цепи, как показано на схеме 8, стрелка 1). В статье [34] рассматриваются и другие возможные превращения продукта (53) (стрелка 2). Присоединение молекулы воды без разрыва связи с сахаром дает карбаминую кислоту (58), которая после декарбоксилирования превращается в высокоактивный аминокрилонитрил (59) (известный канцероген), связанный с модифицированной цепью. Ясно, что последующие реакции продукта (59) могут давать сшивки с основаниями как той же, так и противоположной (в случае двуцепочечной ДНК) цепи, а также с белками и с другими метаболитами.

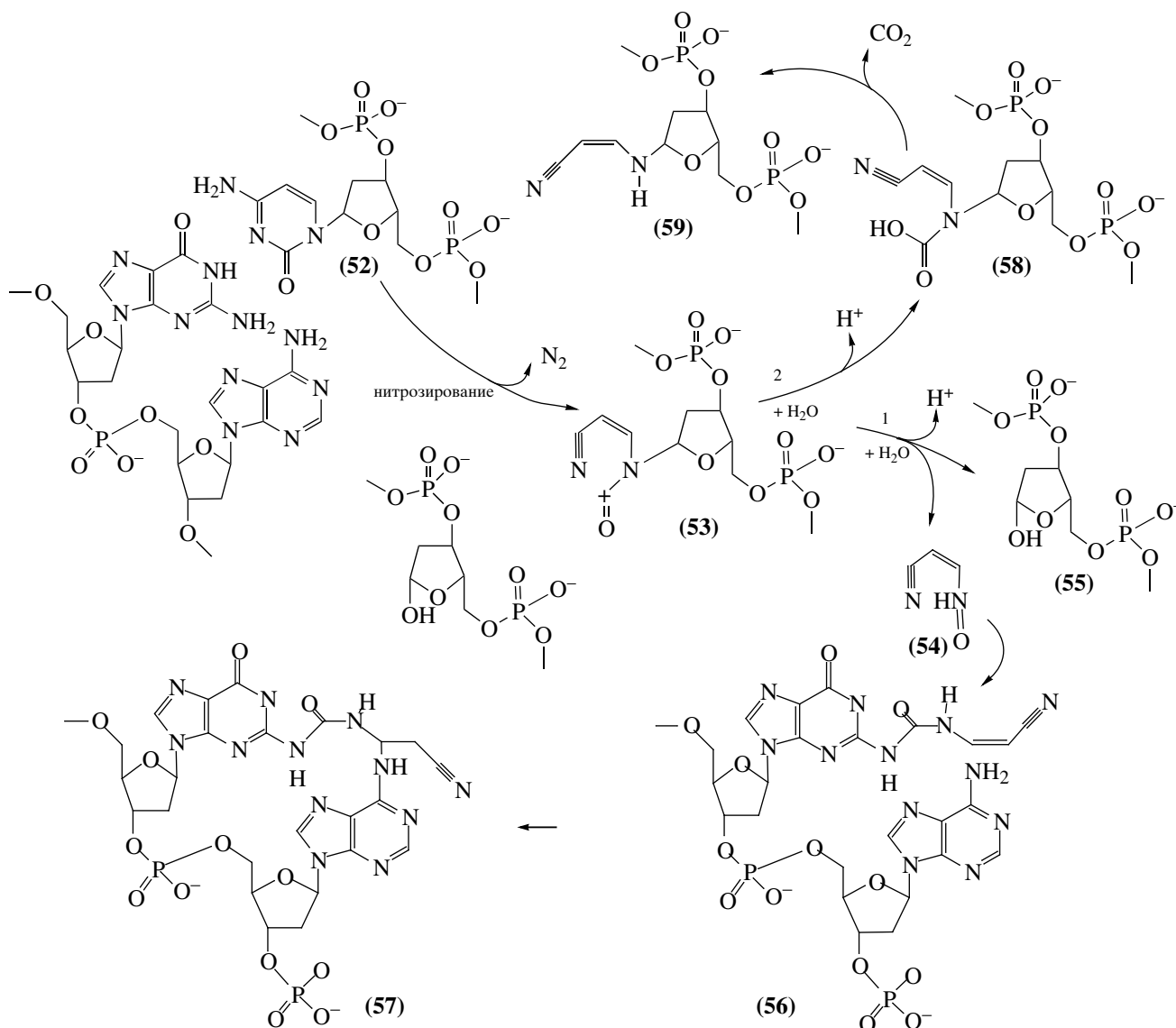


Схема 8. Возможности образования шивков при раскрытии цикла цитозина в процессе дезаминирования (по [33, 34]). Цепь, содержащая диазотируемый цитозин и продукты его распада, выделены.

ДИАЗОАТЫ И СХОДНЫЕ СТРУКТУРЫ С НЕСИММЕТРИЧНО-ЗАМЕЩЕННОЙ –N=N–ГРУППОЙ

Способность диазосоединений вступать в реакции азосочетания с сохранением группы –N=N– обеспечивает возможность образования семейства веществ нескольких классов, с несколькими изомерами в каждом, из единственного ароматического амина (схема 9). Доказательство структуры для этих соединений может оказаться трудной задачей, так как атомы азота не проявляются в рутинных спектрах ЯМР на протонах и ^{13}C , а при масс-спектропии группы N_2 часто теряются при ионизации. В результате оба метода обычно хорошо “видят” ароматический фрагмент со всеми его заместителями (например, нуклеотид), но не

диазо-часть, и все семейство может оказаться “на одно лицо” (например, изомеры диазогидроксидов/диазоатов (62), триазенов (63) и диазоангидридов (64) на схеме 9). Применительно к NODM нуклеотидов и НК это справедливо в полной мере – во многих (если не в большинстве) случаях строгого доказательства структур не проводилось или не публиковалось. Подчас выделение для анализа модифицированного нуклеотида или основания включает стадии, не гарантирующие отсутствие превращений. Эти обстоятельства следует иметь в виду, особенно, при интерпретации экспериментальных результатов, трудно совместимых с ожидаемыми свойствами продуктов NODM. Ниже приведено несколько примеров появления таких структурных задач применительно к NODM НК.

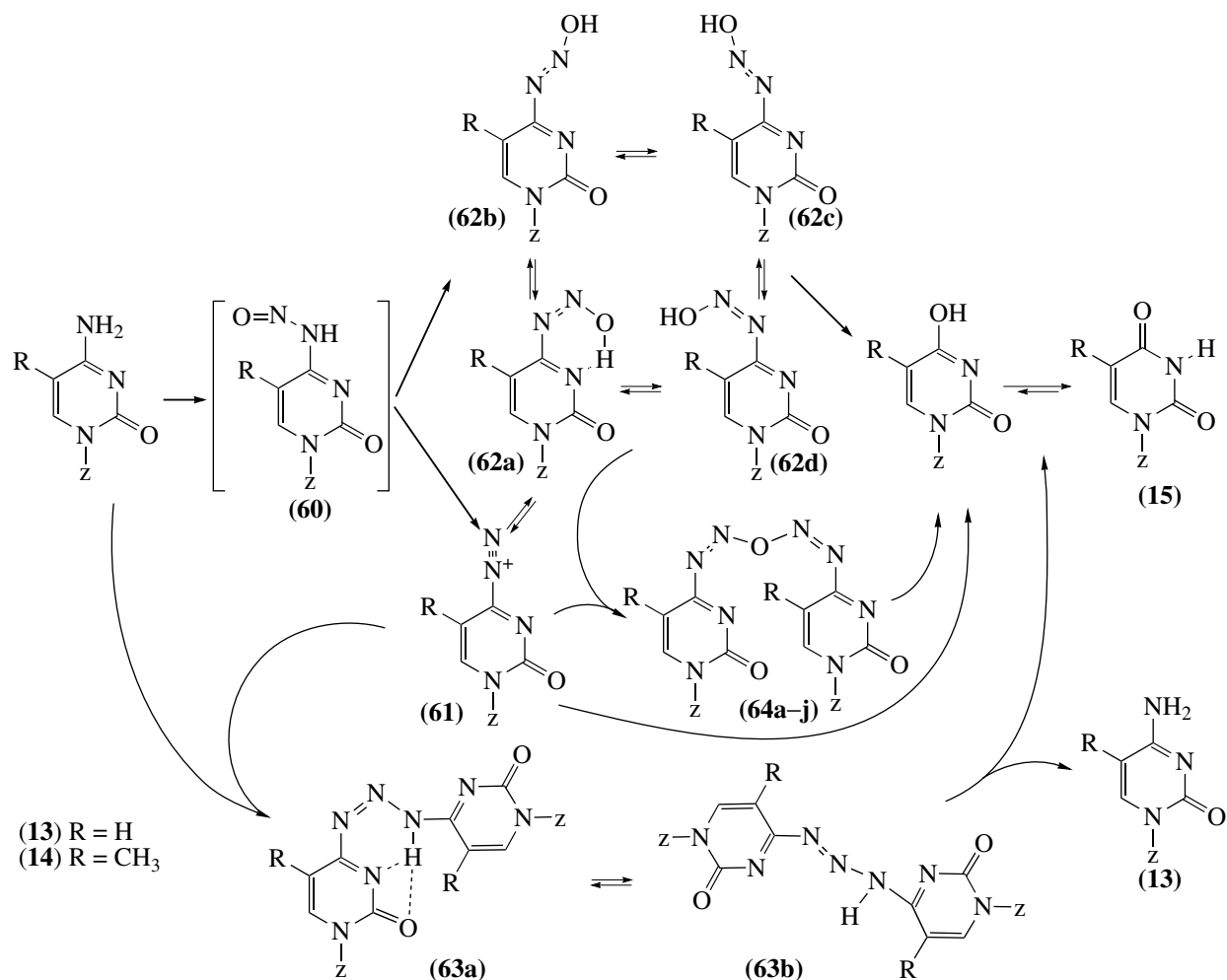


Схема 9. Возможные альтернативные пути превращений диазоатов цитозина.

Диазоаты, как промежуточные продукты диазотирования оснований нуклеиновых кислот, были описаны многократно [35–37]. Диазоат 2-дезоксцитидина получен Судзуки и соавт. [35] с небольшим выходом (<1–3%) как интермедиат при действии на dCyd нитрита натрия в ацетатном буфере pH 3.7 или NO в присутствии кислорода в фосфатном буфере pH 7.4. Продукт выходил с аналитической C₁₈-колонки узким пиком (10.6 мин) значительно позже dCyd (6.9 мин) и dUrd (8.6 мин) и был выделен в гомогенном виде с помощью препаративной ВЭЖХ. Он количественно связывался анионообменной смолой (Dowex 1x8, OH⁻), но не связывался с катионообменной (Dowex 50Wx2, H⁺), т.е. вел себя как кислота. В анионной моде масс-спектра наблюдался сигнал *m/z* 255, соответствующий диазоат-аниону. В ¹H-ЯМР-спектре (DMSO-*d*₆) присутствовали сигналы всех протонов, ожидаемых для диазоата (аниона), и продукт был описан как *один из изомеров* диазоата (как видно из схемы 9, – структура ((62), R = H), в принципе, их может быть четыре). Так как при

выделении с помощью ВЭЖХ использовали триэтиламоний-ацетатный буфер, но сигналы протонов этильных групп катиона в ПМР-спектре были слабые, а сигнал от воды – очень сильным, нам кажется разумным признать продукт сопряженной кислотой (“диазогидроксидом”) – одним из изомеров ((62), R = H). Трудно объяснить результаты ВЭЖХ – казалось бы, кислота должна быть менее гидрофобной, чем dCyd и dUrd, слабее связываться на C₁₈-колонке и элюироваться раньше их. Напротив, триазены (63) и диазоангидриды (64) (из четырех изомеров диазогидроксидов (62) можно образовать 10 – четыре симметричных и шесть несимметричных – “димеров” диазоангидридов, на схеме 9 показан один из них) должны быть более гидрофобны, чем исходный dCyd.

Аналогично, из 5-метилдезоксцитидина (14) был получен продукт, сходный по спектру ¹H-ЯМР с описанным выше диазоатом дезоксцитидина (добавился сигнал метильной группы), но не имевший сигнала, ожидаемого для молекулярно-

го иона диазоата в масс-спектре (сигнал продукта дediaзотирования ($M - 28$) присутствовал, как и в спектре дезокситимидина). При ВЭЖХ продукт выходил между исходным (14) и конечным – дезокситимидином (17).

В обоих случаях продукты (вероятно – один из изомеров диазоатов) оказались неожиданно устойчивыми (при 37°C и $\text{pH } 7.4$ $\tau_{1/2} = 330$ ч для (62), $R = \text{H}$ [35], 21 ч – для (62), $R = \text{CH}_3$ [37]), однако получить их с высоким выходом не удалось – большая часть исходных цитидина или 5-метилцитидина в ходе реакции относительно быстро превращалась в конечные продукты дезаминирования, так что их концентрации росли, но концентрации предполагаемых диазоатов быстро выходили на плато и далее практически не менялись. Принципиально, что, будучи выделенными ВЭЖХ в чистом виде, оба соединения медленно разлагались с образованием *только* ожидаемых продуктов дезаминирования (15), (16). Это возможно для диазоатов/дiazогидроксидов и для diaзоангидридов, но не для триазенов.

Авторы [35–37] считают, что выделенные ими промежуточные продукты являются в каждом случае одним из изомеров диазоатов (62) – обычных интермедиатов в реакции diaзотирования, медленно теряющих N_2 . Это объяснение трудно принять: при $\text{pH } 7.4$, когда время жизни продукта ((62), $R = \text{H}$) измеряется неделями, реакция diaзотирования не может завершиться за несколько часов – соединение ((62), $R = \text{H}$) должно было бы накапливаться и оказаться основным продуктом реакции. Второе явное противоречие состоит в практически линейном росте концентраций соединений как ((62), $R = \text{H}$), так и (15) в начальный период реакции. Действительно, если продукт ((62), $R = \text{H}$) – интермедиат, скорость образования конечного продукта (15) должна зависеть от концентрации этого интермедиата, т.е. расти с увеличением его концентрации в реакционной среде. Это наблюдалось при $\text{pH } 3.7$, но не при $\text{pH } 7.4$ (сравни рис. 4 и 5 в работе [35]: при повышении концентрации ((62), $R = \text{H}$) более чем втрое скорость накопления конечного продукта возрастала незначительно). Последнее обстоятельство можно было бы объяснить участием в diaзотировании нескольких изомеров диазоатов, образующихся и распадающихся с разными скоростями, но медленно распадающийся интермедиат должен накапливаться в любом случае, чего реально не наблюдалось: достигнув некоторого критического значения, накопление *стабильного* (?) интермедиата резко прекращалось. Это означает, что при этом критическом значении концентрации либо резко падает скорость его образования (а у остальных интермедиатов и конечного продукта скорости превращений не меняются!), либо резко возрастает скорость его распада (по нашей оценке из рисунков в статье – в десятки раз). В

первом случае выделяемый стабильный интермедиат должен быть ингибитором собственного синтеза (но не синтеза конечного продукта!), во втором – катализатором собственного распада с сильно нелинейной эффективностью действия.

На наш взгляд, объяснением парадокса могло бы быть мицеллярное окислительное нитроз(ил)ирование: накопление в реакционной среде *любого* малорастворимого продукта при нитроз(ил)ировании будет безболезненно протекать до достижения критической концентрации мицеллообразования (ККМ). С появлением новой фазы (превышение ККМ) происходит “NO-катастрофа” [38] – скорость окисления NO и последующих превращений, вызываемых продуктами окисления, возрастает. В целом по системе, скорость окисления NO описывается уравнением (53) в работе [1], т.е. при очень малых долях вновь образовавшейся гидрофобной фазы (x) практически не изменится [39]: член $(k_1/k_2) Q_{\text{NO}}^2 Q_{\text{Ox}} x$ при очень малых x мал. Однако в самой новой фазе скорости как окисления NO, так и последующих реакций непосредственно от x не зависят, а задаются коэффициентами распределения (Q) и возрастают, возможно, в сотни раз ($Q_{\text{NO}}^2 Q_{\text{Ox}} \gg 1$). Это ускорение затрагивает как малорастворимый продукт, ККМ которого оказалась превышенной, так и все другие соединения, хорошо сольбилизируемые мицеллами этого продукта (см. главу “Вклад гетерогенности среды” в работе [1] – в гидрофобной фазе не только ускоряются реакции, протекавшие в водной среде, но возрастает вклад радикальных реакций из-за увеличения стационарных концентраций NO_2). Экспериментально изломы на кривых скоростей накопления продуктов окисления NO при достижении ККМ наблюдали, например, Лио и соавт. [40]. Окунь и Архер [41] описали многократное (до 800 раз) ускорение нитроз(ил)ирования в кислых растворах нитрита при появлении гидрофобной фазы. Таким образом, и diaзогидроксиды, и diaзоангидриды, и триазены, если они имеются в реакционной среде и малорастворимы, могут быть достаточно стабильными в растворе в отсутствие нитрозантов, медленно превращаться в конечные продукты в их присутствии, но в мицеллах должны реагировать быстро. Если конечные продукты водорастворимы, стационарные концентрации промежуточных продуктов должны быть достаточны для поддержания гетерогенности среды, но не могут быть существенно выше – получается саморегулирующаяся система с обратной связью. Подчеркнем, что выделение из реакционной среды diaзогидроксида или diaзоата не исключает возможности того, что малорастворимым мицеллообразующим компонентом был триазен или diaзоангидрид.

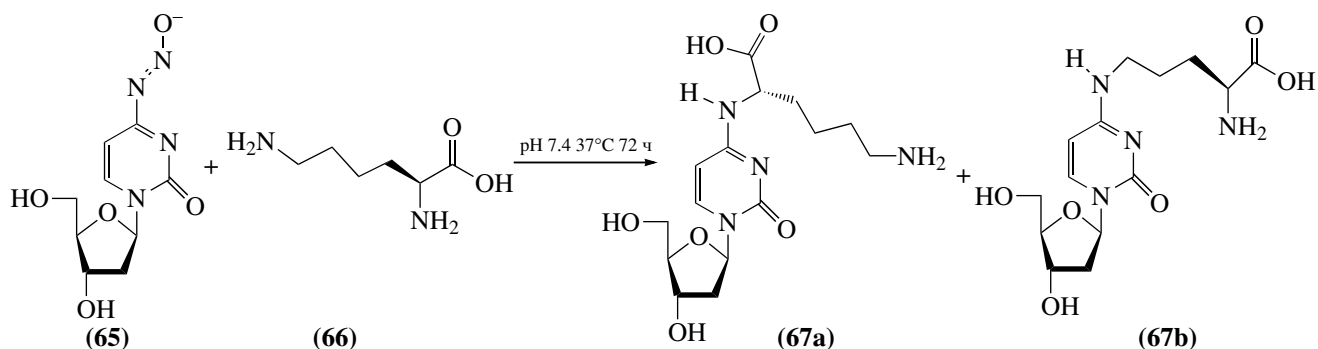


Схема 10. Взаимодействие диазоата дезоксицитидина с лизином.

Другой вариант объяснения “парадокса Судзуки” связан со способностью диазоангидридов (но не диазоатов или диазогидроксидов) “самопроизвольно” подвергаться несимметричному распаду с образованием двух свободных радикалов ($\text{Ar}-\text{N}=\text{N}-\text{O}-\text{N}=\text{N}-\text{Ar} \rightarrow \text{Ar}-\text{N}=\text{N}\cdot + \cdot\text{O}-\text{N}=\text{N}-\text{Ar}$), в дальнейшем теряющих азот с образованием фенолов ($\text{Ar}-\text{OH}$). Если концентрации диазоангидридов растут как квадраты концентраций промежуточных продуктов диазотирования, наблюдавшаяся нелинейность может быть связана с включением свободно-радикального пути распада накапливающихся диазоатов через диазоангидриды. При низких концентрациях диазоатов этот путь неэффективен и концентрации диазоатов растут, при высоких он становится основным путем их распада.

Диазоаты гуанозина, дезоксигуанозина и GMP (см. общую формулу (24) на схеме 4) использовали при получении соответствующих производных 2-хлоринозина (формально – нуклеофильное замещение $\text{N}=\text{N}-\text{O}^-$ на Cl^-) при инкубации соединений (24) в 2 М NaCl даже при нейтральных значениях pH [36]. Поскольку образование производных ксантина и оксанина также наблюдалось при нейтральных pH, остается неясным, что было мишенью для нуклеофильной атаки хлор-ионом: какие-то из изомеров диазоата (24), диазоний (26), находящийся с ними в равновесии (изменение pH должно влиять как на равновесную долю (26), так и на скорости изомеризации (24)), или продукты раскрытия цикла, рассмотренные Глазером. Действие диазоатов как мишеней при атаке нуклеофилами, отличными от OH^- , также может вести к образованию сшивок, например, с остатками лизина в молекулах белков [42] (см. схему 10). В модельных экспериментах показано, что образующиеся замещенные производные (67a), (67b) более стабильны к кислотному гидролизу, чем дезоксицитозин. Интересно, что в присутствии лизина или полилизина выход дезоксиуридина при распаде диазоата (62) сильно падает, то есть лизин эффективно конкурирует с гидроксидом, поставляемым водой. Как и в случае триазенов и

диазоангидридов, по ^1H - и ^{13}C -спектрам ЯМР трудно установить, нет ли между лизиновым и цитозиновым фрагментами дополнительно $\text{N}=\text{N}$ -группы. Масс-спектры продуктов в статье [42] не приведены. Мутагенное действие нитрозилования оснований было объяснено не дезаминированием по схеме 2, а неспособностью урацил-ДНК-гликозилазы репарировать диазоаты [35]. Не исключено, что репарирующие ферменты “пришиваются” к диазоатсодержащим сайтам, как это будет показано ниже для производных оксанозина.

Для нуклеотидов ($\text{H}_2\text{N}-\text{Am}$, Am – ароматическая система основания в нуклеотиде) известно взаимодействие с арилдиазониевыми солями ($\text{Ar}-\text{N}=\text{N}^+$) с образованием триазенов ($\text{Ar}-\text{N}=\text{N}-\text{NH}-\text{Am}$ – азосочетание по аминогруппе основания) [43–48]. Если допускать возможность образования диазониевых солей нуклеотидов, то следует рассматривать и возможность образования триазенов нуклеотидов, типа (63) на схеме 9. Сведений о получении “симметричных” ($\text{Ar}_2\text{N}=\text{N}=\text{NH}-\text{Am}$) триазенов типа (63) нам не известно. В гипотетической структуре *цис*-триазена (63a), стабилизированной водородными связями, остатки цитозина неэквивалентны и должны различаться спектрами ^1H -ЯМР, но симметричный *транс*-изомер (63b) (если протон при атомах азота подвижен и обменивается с водой, положение двойной связи $\text{N}=\text{N}$ в шкале времени ЯМР неопределенно) мог бы иметь спектр, подобный наблюдавшемуся у “диазоата” Судзуки. Естественно, соединения (62) и (63) различаются масс-спектрами. В работе [35] приведена только часть спектра в интервале $m/z = 200-300$, так что ион 255, в принципе, мог бы быть и продуктом фрагментации. На спектре также представлены ионы $m/z = 227$ и 226 . Первый из них соответствует dUrd, второй – его аза-аналогу (аниону “дезоксцитозония” – вероятному продукту фрагментации соединения (63)). УФ-спектр ($\lambda_{\text{max}} 285 \text{ нм}$, 310 нм) “диазоата” Судзуки трудно приписать триазеновой структуре (см. ниже).

Образование несимметричных триазенов ($\text{Ar}-\text{N}=\text{N}=\text{NH}-\text{Am}$) при действии солей диазония

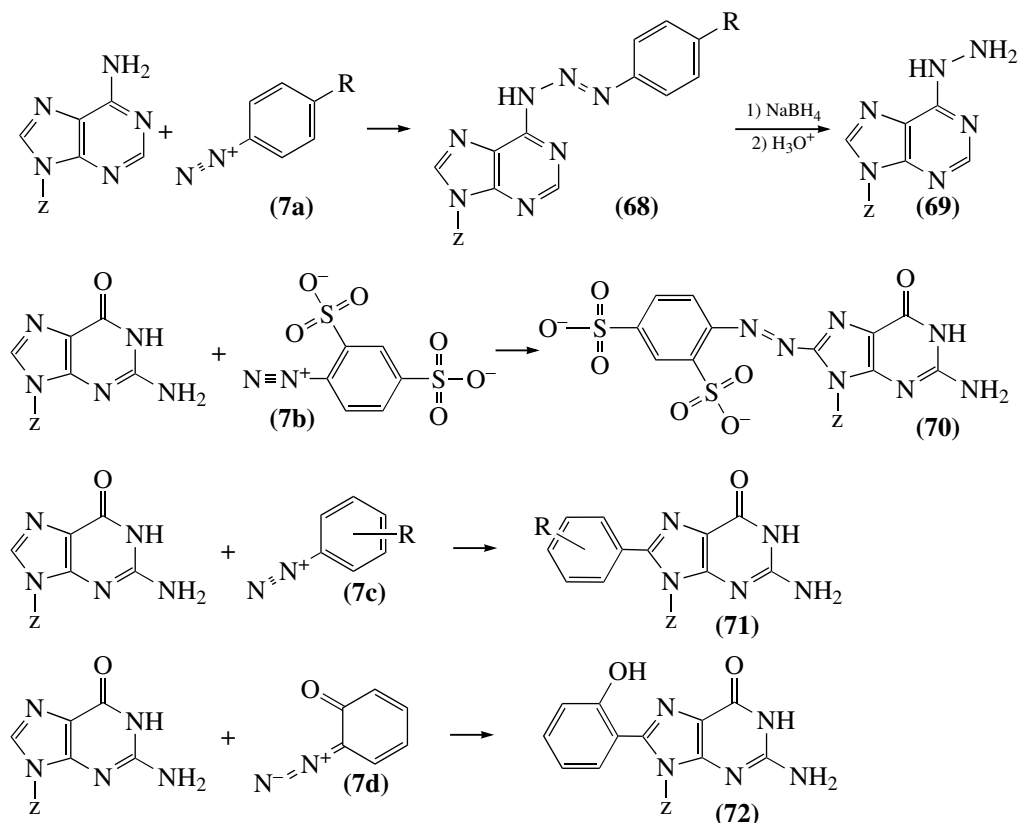


Схема 11. Взаимодействие диазосоединений с нуклеотидами и нуклеиновыми кислотами ((7a): R = CH₃, Br, SO₃H; (7c): арилдiazониевые ионы образованы при метаболизме арилгидразинов, обычно R = H, CH₃).

на производные аденина (см. формулу (63)) [43] и гуанина [44], обстоятельно изученное в группе Стока, было проверено на ДНК [45]. Авторы использовали восстановление продукта реакции под действием NaBH₄ и выделили из гидролизата ДНК аминоксантин (69) (см. схему 11). Таким образом, по крайней мере, в случае аденина, триазены в составе ДНК были достаточно стабильны.

Исследование триазенов нуклеотидов проведено Ганнеттом и соавт. при изучении мутагенного и канцерогенного действия арилгидразинов [46–48] (*in vivo* они окисляются в диазосоединения Ag–N=N⁺ типа (7)). Были выделены как продукты арилирования оснований (например, (71) в случае гуанина), так и триазены. Таким образом, в реакциях с “обычными” диазониевыми ионами свободные основания, нуклеозиды, нуклеотиды и НК ведут себя неоднозначно. Образование продуктов азосочетания по атому С⁸ гуанина известно более полувека [49]. В реакции с 4-диазо-1,3-бензолдисульфатом (7b) образуется краситель (70) – азосочетание протекает только по остаткам гуанина как в нуклеотидах, так и в гомополимерах, ДНК и РНК: N=N-связь сохраняется [50, 51]. Эту реакцию предполагалось использовать для установления структуры ДНК с помощью электронной микроскопии: введенные в остатки гуанина

сульфогруппы можно “визуализировать” связыванием с электронно-плотными катионами, содержащими кластеры атомов тяжелых металлов. Заметим, реакцию проводили при pH 9 в водном растворе карбонатного буфера – представляется сомнительным, что в этих условиях единственной атакующей частицей был диазониевый катион. В более поздних работах [43, 44] дезоксирибозин давал продукт арилирования по С⁸-положению (соединение (71b) на схеме 12) и молекулярный азот, но дезоксирибозин-3-фосфат превращался в несимметричный триазен (73) (см. схему 12). Попытки получить продукты азосочетания по С⁸ в случае нуклеозидов и нуклеозид-5-фосфатов были безуспешны, хотя гуанин быстро реагировал при pH 10 с образованием азокрасителя (70) уже при 0°C. Различия в реакционной способности объяснили вкладом протона при N⁹ в свободном основании в стабилизацию промежуточного продукта благодаря образованию водородной связи с N=N-группой.

В случае производных аденина (схема 12) во всех случаях были выделены триазены (68), но dAMP терял фосфатную группу (68b). При нагревании, особенно, при повышенных pH, триазены разлагались с образованием продуктов арилирования. Арилирование пуринов в ДНК наблюдали

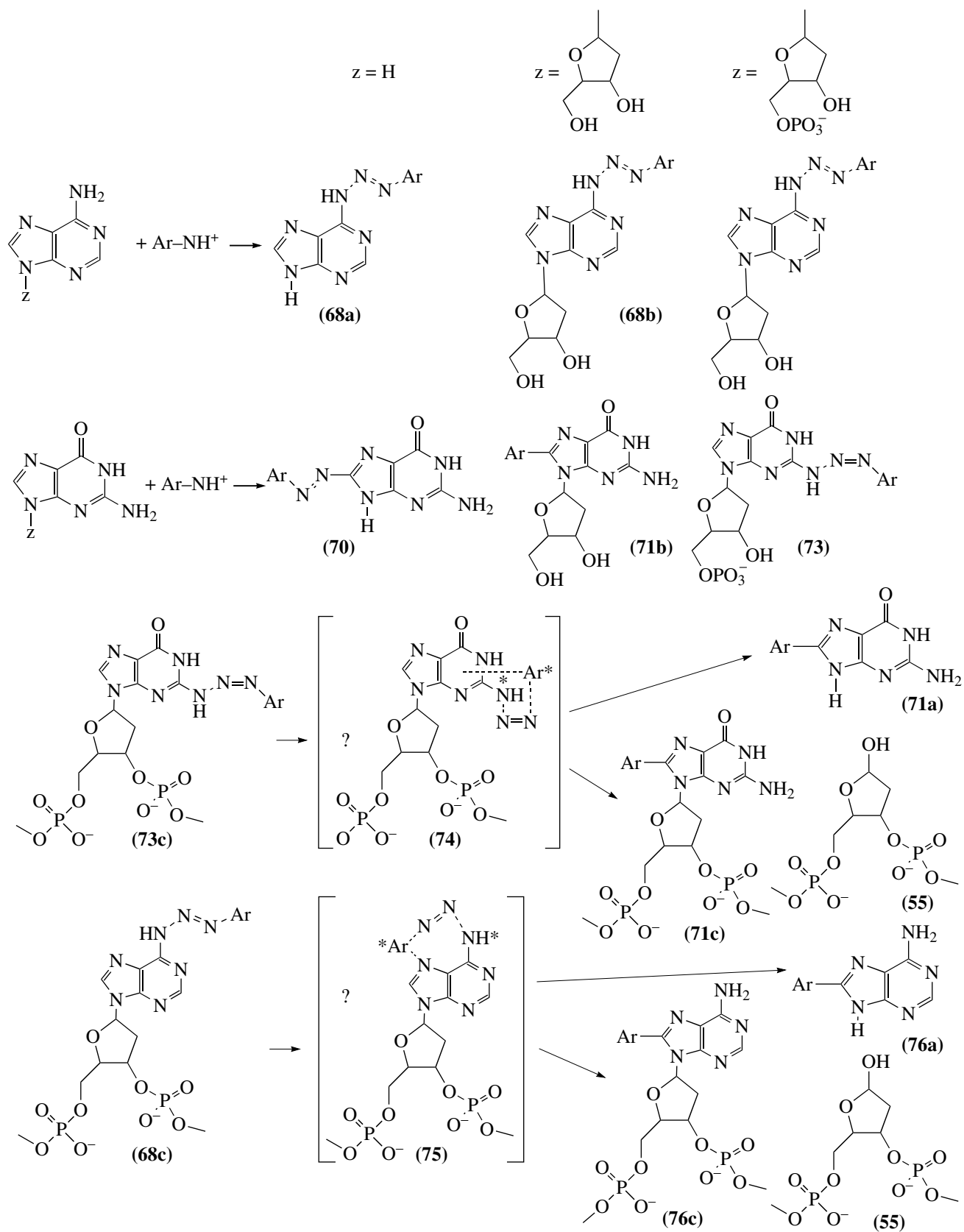


Схема 12. Триазены нуклеотидов – образование и распад.

Кикугава и соавт. под действием *o*- и *n*-диазохинонов [52] (на схеме 11 в качестве примера показан продукт реакции *o*-диазохинона (7d) с гуанином – 8-(2'-гидроксифенил)гуанин (72)).

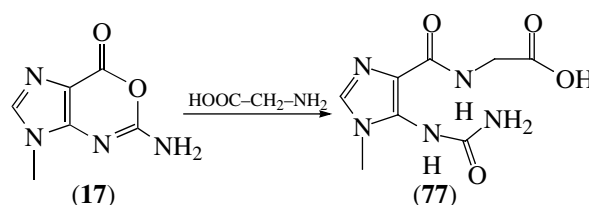
При обработке двуцепочечной ДНК серией 4-замещенных производных фенилдиазония были выделены продукты арилирования как по аденину, так и по гуанину, причем первого было существенно больше [47]. Это казалось странным, так как производные гуанина обычно более чувствительны к радикальным атакам. Парадокс был объяснен тем, что первичными продуктами были главным образом триазены, причем аминогруппа аденина была лучшей мишенью. Поскольку триазенов по остаткам аденина накапливалось больше, а последующий их распад протекал, видимо, “в пределах того же основания”, выход 8-арил-аденинов также оказывался выше. Радикальный характер реакции, медленно протекающей уже при 25°C, доказан с применением ловушки радикалов и ЭПР. Превращение (68a) → (71a) наблюдали и по изменениям ПМР-спектра. Интересно, что в случае ДНК превращение сопровождалось значительной депуринизацией: большая часть арилпуринов (71a) и (76a) (но не триазенов!) была найдена не в ДНК, а в супернатанте (вероятно, одновременно образовывался AP-сайт (55)) [47].

Ганнетт и соавт. полагают, что интермедиатами (на схеме 12 условно показаны как (74), (75)), теряющими связь с сахаром, могли бы быть арилпурильные радикалы. В обсуждаемом в работе [47] механизме триазен (68) протонируется, образуются нативный остаток аденина и арилдиазониевый катион (7), подвергающийся одноэлектронному восстановлению в диазенильный радикал ($Ar-N=N\cdot$). При его распаде образуются N_2 и арильный радикал $Ar\cdot$, который должен атаковать *тот же* остаток аденина, с которым он был связан на стадии триазена, с образованием 8-арил-аденильного радикала. После этого следует одноэлектронное восстановление с образованием конечного продукта. В целом, механизмы активации реакции и миграции радикалов при выделении N_2 , особенно, применительно к ситуации *in vivo*, остаются неясными. Если первой стадией является протонирование триазена, трудно понять, почему реакция ускоряется основаниями (в экспериментах использовали повышение pH до 10). Если в какой-то момент триазен диссоциирует на нативный остаток аденина и диазоний-катион или радикал, трудно объяснить, почему атаке после выделения N_2 подвергается *тот же* остаток аденина (а, например, не рядом расположенный остаток гуанина; ниже будут рассмотрены процессы передачи радикала по стопке оснований на “дальние дистанции”). Наконец, если в превращении участвуют свободные радикалы, как на нем отражаются присутствующие в клетке NO, NO_2 , аскорбат, тиолы и другие мишени для

свободных радикалов. Поскольку и восстановитель, и окислитель являются внешними агентами, реакция могла бы сильно промотироваться ионами переходных металлов, связанными с нуклеиновой кислотой (см. выше об ожидаемых различиях в связывании для ДНК и РНК).

Интерес к превращениям триазенов нуклеотидов возрастает в связи с открытием NODM белков, при которых диазогруппы оказываются включенными в ароматические остатки аминокислот, например, при нитровании–восстановлении–диазотировании (см., например, схему тирозин-нитротирозинового цикла в работе [1]). Взаимодействия диазобелков с НК могли бы быть важнейшими в феномене диазосигналинга.

Производные оксанина структурно близки циклическим ангидридам или активированным сложным эфирам и проявляют ацилирующие свойства. На модельной реакции было показано, что при инкубации 2-дезоксидеоксиоксианина в концентрированном водном растворе глицина образуется аддукт (77) [14, 25].



Такое ацилирование может вести к образованию сшивок с белками, например, по аминогруппам лизина (из свободных аминокислот были активны аргинин, лизин, гистидин и цистеин, из ацетилированных – только аргинин и лизин) [53]. Показано, что у нативных (но не денатурированных нагреванием) форм *некоторых* ДНК-связывающих белков имеется повышенная чувствительность к образованию таких сшивок. Так, относительные скорости образования сшивок с оксанином в составе ДНК составили у гистона H1 – 79, гистона H4 – 250, HMG-белков – 190, hOGG1-гликозилазы – 20000, Fpg-гликозилазы – 38000 (скорость реакции с N^α -ацетиллизином принята за 1). Ясно, что ковалентное связывание ДНК, поврежденной в результате NODM, с ферментом, призванным репарировать такие повреждения, является, как справедливо подчеркивают авторы, новым высокоэффективным NO-зависимым механизмом мутагенеза [53].

Действие NO на ДНК в аэробных условиях может также приводить к одноцепочечным разрывам, что наблюдали как *in vivo*, так и *in vitro*. Было показано, что NO/O_2 вызывает и дозо-, и время-зависимые одноцепочечные повреждения ДНК в ТК6-клетках [6]. Если суперскрученную плазмидную ДНК обработать NO, то разрезание ДНК не наблюдается [54]. Однако если ту же плазмиду после обработки поместить в CHO-клетки <Chi-

nese Hamster Ovary>, обнаруживаются разрывы цепи. Вероятное объяснение этих результатов состоит в образовании ксантина, который при депуризации дает AP-сайт. AP-сайты легко разрезаются эндонуклеазами с образованием одноцепочечных разрывов. Эта гипотеза отчасти подтверждается экспериментами, в которых сравнивали относительные концентрации AP-сайтов и одноцепочечных разрывов [54]. СНО-клетки были обработаны NO около 1 ч (поток NO около 85 нмоль/мл · мин моделировал физиологические условия). Непосредственно после обработки были выявлены только AP-сайты. Через 12 ч их концентрация упала до исходной, но были обнаружены в большом количестве одноцепочечные разрывы. Предполагается, что доля этих разрывов может увеличиваться благодаря вырезанию AP-сайтов. Двухцепочечные разрывы ДНК были обнаружены после 24 ч инкубации, что интерпретировалось как превращение нерепарированных одноцепочечных разрывов в двухцепочечные.

Появление AP-сайтов возможно не только при распаде триазенов с выделением N₂ (схема 12). Разрыв гликозидной связи может происходить также после диазотирования и отщепления оксанина, “сшитых” и других модифицированных оснований или в процессе диазотирования – при распаде интермедиатов. Действительно, в механизме Глазера основные события протекают после вылета N₂, например, из диазотированного гуанозина (см. схему 6), но вылет этот обусловлен нестабильностью продукта (47), т.е. невозможностью образовать хиноидную структуру после ухода протона от атома азота N¹. Если бы вместо остатка сахара к N⁹ был бы присоединен протон, такая возможность существовала бы (см. формулу (44)). Другими словами, уход остатка сахара равносителен уходу протона с N⁹, т.е. позволяет образовать хиноидную структуру, перемещая протон от N¹ на атом кислорода и сохраняя связь с N₂. С точки зрения “биологической целесообразности”, этот вариант кажется более предпочтительным по сравнению с образованием и ксантина, и оксанина, и каких-либо сшивок: образование ксантина все равно должно привести к депуризации и последующему репарированию, но существует вероятность G : C → A : T-замен до и в процессе этой репарации. В случае образования оксанина или сшивок ситуация аналогична, но и спектр возможных необратимых изменений шире, и репарация их сложнее. Действительно ли немедленное отщепление модифицированного основания во всех случаях является “наименьшим злом”, до настоящего времени неизвестно.

В целом, реакции диазотирования оснований НК могут приводить не только к замене H₂N-групп на гидроксильные (см. схему 2), но и давать множество высокоактивных продуктов, способных

далее реагировать с компонентами НК, в том числе с основаниями той же и комплементарной цепей в случае ДНК, с белками, образующими комплексы с этими НК, включая репарирующие ферменты, и с другими метаболитами. В ходе этих превращений продукты модификации оснований могут отщепляться от сахаро-фосфатного остова НК или оставаться связанными с ним.

Большинство экспериментальных результатов последних лет было интерпретировано в предположении, что нитрозирующим интермедиатом *in vivo* является N₂O₃, и возможность свободно-радикальных механизмов превращений обычно не рассматривалась. При обсуждении применимости модельных экспериментов *in vitro* к ситуации *in vivo* обычно не учитываются возможные конкурирующие процессы с участием NO, NO₂, ионов переходных металлов и других свободно-радикальных метаболитов, реакции одноэлектронного окисления/восстановления. Ясно, что снятие всех этих ограничивающих предположений приведет к открытию новых модификаций и их взаимосвязей, еще более усложнит картину и тем самым приблизит ее к реальности.

РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ПРИ NO-ЗАВИСИМЫХ МОДИФИКАЦИЯХ

Диоксид азота (NO₂) – свободный радикал, образующийся при окислении NO кислородом, при одноэлектронном окислении нитрита ионами переходных металлов и металлоферментами, как интермедиат восстановления нитратов, при гомолитическом распаде производных пероксинитрита и др. (см. стр. 9–10 и уравнение (39) в [1]). В биохимических статьях обычно NO₂ рассматривается как одноэлектронный окислитель, порождающий свободные радикалы (реакции (28), (29) в [1]), и/или как предшественник нитросоединений (рекомбинация ·NO₂ с органическим радикалом – реакция (30) в [1]). Уже на начальных этапах развития неорганической химии нуклеиновых кислот NO₂ считался очевидным предшественником появления 8-нитрогуанина (NG) (у гуанина, среди обычных канонических оснований, наиболее низкий редокс-потенциал [55, 56], т.е. он окисляется и нитруется легче остальных оснований).

Установлено, что концентрация NG возрастает при воспалениях [57], при вирусной пневмонии [58], инфекциях *Helicobacter pylori* [59] (бактерия, способная жить в желудке человека; заражение хорошо коррелирует с развитием язвенной болезни [60] и рака желудка [61]). В составе ДНК NG малоустойчив: в результате депуризации образуется свободный 8-нитрогуанин и апуриновый сайт. Данные разных авторов о скорости депуризации, особенно в олигонуклеотидах, сильно варьируют: Содум приводит для раствора при pH 7

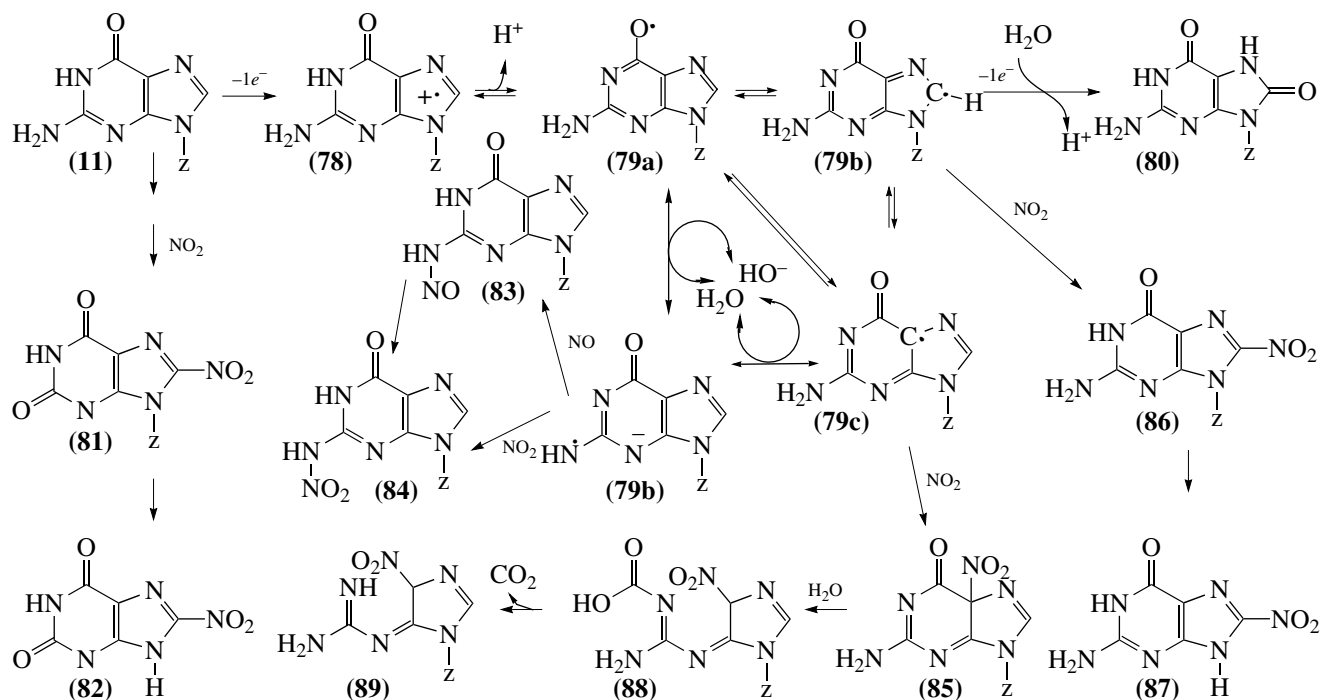


Схема 13. Продукты нитрования гуанина.

значение $\tau_{1/2}$, равное 10 мин при 20°C и <3 мин при 37°C [62], Ермилов – 4 ч при pH 7.4 и 37°C [63], Судзуки – около суток при pH 7 и 25°C [64].

Устойчивость рибонуклеотида NG выше (5% депуринизации за 6 ч), т.е. NG накапливается в РНК [65]. Сава и соавт. обнаружили значительное повышение концентрации NG в моче курильщиков (до 85 пМ) в сравнении с некурящими (не более 9 пМ) [66], но сами концентрации NG в моче на три порядка ниже, чем OG [67]. Для количественного анализа таких ничтожных концентраций NG в образцах мочи (150 мл) его концентрировали на серии колонок с антителами на NG, элюировали малыми объемами, из объединенных элюатов сорбировали на единственной колонке и элюат с нее анализировали ВЭЖХ с электрохимической детекцией на четырехэлектродном датчике: на первом электроде проводили окисление возможных примесей, второй и третий использовали для восстановления NG в 8-аминогуанин, который окислялся на четвертом – детектирующем – электроде (к вопросу о стоимости и доступности анализа).

Судзуки и соавт. [68] наблюдали образование NG при пропускании NO и кислорода в раствор dG при физиологических значениях pH и температуры, Ши – в фибробластах легочной ткани (MRC-5) при действии буферным раствором, насыщенным NO, на клетки или на выделенную из них ДНК [69]. Прямые данные о мутагенности собственно dNG получили недавно Судзуки и со-

авт. [64]. С использованием нескольких ДНК-полимераз человека показано, что как апуринный сайт, так и NG приводят в основном к G→T-заменам – в растущую цепь напротив NG чаще ошибочно вставляется аденин (в работе [64] спонтанное выщепление NG протекало медленно, характерное время – сутки). Другие замены также наблюдались. Отмечено и снижение скорости синтеза цепи при прохождении полимеразой NG, особенно, для полимеразы pol α.

При исследовании одноэлектронного окисления dGMP под действием полициклического свободного радикала, генерируемого облучением производного пирена, Шафирович и соавт. показали, что образующийся первоначально гуанильный катион-радикал (78) (схема 13) быстро (<500 нс) теряет протон с образованием нейтрального радикала $\cdot dG(-H)$ (79), эффективно окисляющего нитрит в NO_2 ($k = 2.6 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$) [70]. Сравнив редокс-потенциалы окисления гуанина ($E G/\cdot G = 1.29 V$) и нитрита ($E NO_2^-/\cdot NO_2 = 1.04 V$), авторы пришли к выводу, что окисление гуанина в НК под действием NO_2 невозможно. Согласно данным [70], поскольку редокс-потенциал других канонических оснований выше, чем у гуанина, они тем более не могут быть окислены NO_2 , т.е. NO_2 вообще не может быть окислителем ДНК. Для образования нитрогуанина под действием NO_2 дополнительно нужен более активный радикал для первой стадии; в следующих статьях [71, 72] было

показано, что таковым может быть карбонатный радикал – продукт распада аддукта пероксинитрита с CO_2 – подробнее см. ниже. Если, однако, в составе ДНК есть “неканонические” основания с более низким редокс-потенциалом, NO_2 может быть и окислителем. Это было продемонстрировано на примере 8-оксогуанина (**80**) ($E_{\text{OG}/\text{OG}} = 0.74 \text{ В}$). OG – обычный продукт 2-электронного окисления нуклеиновых кислот, известный до открытия биосинтеза NO . Поскольку OG является мутагеном, широко изучалось его образование при окислении НК гидроксильным радикалом, генерируемым рентгеновским излучением или жестким ультрафиолетом.

Статья [70], содержащая в названии вывод о невозможности реакции NO_2 с dGuo (и, стало быть, с НК), отвергает объяснение образования NG под действием NO/O_2 при участии NO_2 в качестве окислителя. Тем самым, отвергается вклад механизма мицеллярного окислительного нитрозилирования (МОН) с участием NO_2 в модификации НК (помимо NO_2 , окислителями при МОН могут быть и высшие оксиды азота с более высокими значениями редокс-потенциалов – при их участии МОН не исключается – см. уравнения (32), (33) в [1]).

В действительности вывод работы [70] сделан с использованием нескольких положений, не являющихся, при ближайшем рассмотрении, строгими.

1. Сравнение редокс-потенциалов позволяет говорить о составе равновесной смеси, но отрицательные значения ΔE не означают невозможности реакции. Действительно, для реакции $\text{dGuo} + \cdot\text{NO}_2 \longleftrightarrow \cdot\text{dGuo}(-\text{H}) + \text{NO}_2^- + \text{H}^+$ $\Delta E = (1.29 - 1.04) = 0.25 \text{ В} = RT \ln K \approx 0.059 \lg K \approx \approx [\text{dGuo}][\cdot\text{NO}_2]/[\cdot\text{dGuo}(-\text{H})][\text{NO}_2^-]$, откуда следует³:

$$\lg \left\{ \frac{[\text{dGuo}][\cdot\text{NO}_2]}{[\cdot\text{dGuo}(-\text{H})][\text{NO}_2^-]} \right\} \approx 4 \text{ и} \\ \left\{ \frac{[\text{dGuo}][\cdot\text{NO}_2]}{[\cdot\text{dGuo}(-\text{H})][\text{NO}_2^-]} \right\} \approx 10000,$$

т.е. при равных концентрациях NO_2 и нитрита в равновесной смеси при принятых значениях редокс-потенциалов на 10000 остатков гуанина должен присутствовать один гуанильный радикал, образовавшийся при окислении гуанина под действием NO_2 .

Зная скорость прямой реакции и константу равновесия, можно оценить скорость обратной реакции ($K = k_1/k_{-1}$). Если константа скорости окисления нитрита под действием гуанильного радикала равна $k = 2.6 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$, константа скорости окисления гуанина под действием NO_2 с образованием нитрита будет в ~ 10000 раз ниже, т.е.

³ Редокс-потенциалы и положение равновесия зависят от pH; в близких к нейтральным растворах с ростом pH редокс-потенциал dG падает.

$\sim 2.6 \times 10^2 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ – реакция медленная, но вполне осуществимая. Учитывая, что речь идет о модификации ДНК, когда повреждение даже одного основания на молекулу ДНК может дать эффект, пренебречь ею нельзя.

2. Редокс-потенциалы свободных дезоксигуанозина и других дезоксинуклеозидов *не равны* редокс-потенциалам (“остатков”) этих нуклеозидов в составе ДНК. Действительно, из-за перекрывания π -орбиталей ароматических систем оснований при упаковке их в молекулу ДНК остова молекулы (“stopка” оснований), в идеале, как проводник электронов представляет единое целое [73] и имеет собственные гибридные молекулярные орбитали и собственный (сниженный относительно свободных оснований) редокс-потенциал. Из-за теплового движения такое перекрывание постоянно нарушается, так что молекула ДНК представляема цепочкой непрерывно образующихся и распадающихся доменов из коротких “stopок”. Редокс-потенциалы таких доменов зависят не только от редокс-потенциалов отдельных оснований, участвующих в стэкинге, но и от структуры ДНК и физико-химических условий (pH, температуры, концентраций ионов двухвалентных металлов, ионной силы и пр.). В результате потенциал ионизации, например гуанина, снижается с 7.75 эВ в dG до 7.28 для GG , 7.24 для GC , 7.07 для GGG , и до 6.98 эВ для GGGG , соответственно (для последовательностей, содержащих несколько G , приведены потенциалы ионизации для ближайшего к 5'-концу остатка гуанина (выделены)) – из-за “спирального” сдвига оснований в стопке друг относительно друга наименьший редокс-потенциал оказывается у 5'-концевого остатка G_n -последовательностей [74]. Это означает, что в реальных молекулах ДНК окислению (допустим, под действием NO_2) будут подвергаться не равномерно все остатки гуанина, а преимущественно остатки со сниженным редокс-потенциалом, например, 5'-остатки последовательностей GGGG ⁴.

3. Эффект снижения редокс-потенциала может проявиться даже в случае высокоактивных радикалов-окислителей, например, $\cdot\text{OH}$, взаимодействующих “с первым встречным”. Первичный нуклеотидный радикал, образовавшийся при окислении ДНК таким высокоактивным окислителем, может окислить соседнее основание (передать “дырку” соседу – глубокая аналогия с полупроводником с дырочной проводимостью – здесь

⁴ Примечание в корректуре: В кратком сообщении Марголин и соавт. в июльском (2006) номере Nature Chem. Biol. [147] описано “парадоксальное” окисление под действием ONOOCO_2^- остатков гуанина с наиболее высоким значением редокс-потенциала. По мнению авторов, эффект не связан с миграцией радикала (charge migration) и вызван неизвестными причинами. В том же номере в “News and Views” дан комментарий [148].

“дырка” – радикал с неспаренным электроном в составе ДНК). Если редокс-потенциалы какой-то пары или группы оснований (“домена”) близки, дырка будет распределена между ними, находясь на каждом некоторое время. Поскольку одноэлектронное окисление меняет значение pK оснований и может сопровождаться уходом протонов, перемещениями молекул воды и изменением геометрии, процесс не является мгновенным. В конце концов – если “по дороге” ничего не случится – дырка добежит до сайта с наименьшим потенциалом ионизации (“long-distance radical cation migration”, “long-distance charge transfer”) и далее преимущественно будет находиться в нем.

Подчеркнем, при классическом рассмотрении в результате серии внутримолекулярных реакций свободный радикал может перемещаться между основаниями и оказаться на основании с наименьшим потенциалом, но не может “прыгнуть” через несколько оснований с высоким потенциалом (например, цитозин). Образование гибридных орбиталей в доменах с такими высокопотенциальными основаниями позволяет преодолевать эти барьеры и дает возможность “перепрыгнуть” в несколько прыжков через десятки нуклеотидов [75–78].

Исчезнуть дырка может при одноэлектронном восстановлении, одноэлектронном окислении и встрече с другой дыркой. Эти три возможности отчасти перекрываются: восстановление, допустим, гуанильного радикала (“дырки”) даст исходную ДНК, хотя восстановителем может быть и нечетная молекула, например, O_2 ($\rightarrow O_2$: редкий случай, когда супероксид может выступать как восстановитель – обычно он – окислитель), NO ($\rightarrow NO^+$ или NO_2^-) или другая дырка, и четная, например, остаток триптофана в белке, ассоциированным с ДНК ($\Delta E Trp/Trp = 1.01$ В [56, 79]). Триптофанильный радикал, образующийся в последнем случае, может, в свою очередь, нитрозилироваться NO , давая нитрозотриптофаносодержащий белок, способный к денитрозированию [19]. В этом случае процесс также сводится к восстановлению окисленной молекулы ДНК под действием NO , но участие остатков триптофана имеет глубокий биологический смысл: триптофан сразу принимает удар на себя, защищая ДНК, и, будучи поврежденным сам, ждет встречи с NO для исцеления. В присутствии NO белок нитрозируется, но сам же и репарируется, теряя нитрит; в отсутствие NO или других подходящих восстановителей необратимой модификации (вероятный вариант – реакция триптофанильных радикалов с кислородом) подвергается белок, но Самая Главная Молекула остается неповрежденной в обоих случаях.

Экспериментально миграция радикалов (дырок) в ДНК изучалась главным образом при фотохимическом одноэлектронном окислении олигонуклеотидов под действием ковалентно сшитых с ними красителей и последующем определении мест разрыва цепи при действии пиперидина или формамидопиримидин-гликозилазы (оба метода детектируют окисленные остатки Guo): исходный олигонуклеотид после фотоокисления расщеплялся на значительном удалении (десятки нуклеотидов) от места присоединения красителя. Некоторое время полагали, что дырки прыгают от G к G (чаще – от GG к GG) в соответствии с пониженным редокс-потенциалом Guo . Шао и соавт. [80] ввели в остаток цитозина циклопропильный заместитель (образование радикала приводит к необратимому раскрытию C_3 -цикла) и показали, что цитозин также эффективно участвует в передаче дырки по цепи. При классическом описании это должно рассматриваться как “временное” окисление цитозина под действием гуанильного радикала с много меньшим редокс-потенциалом. Интересно, что вставка на место основания индольного кольца триптофана ДНК-связывающего белка также может способствовать транспорту [81].

Таким образом, высокие значения редокс-потенциалов нуклеотидов не исключают возможности окисления *некоторых из них* в составе НК под действием окислителей с меньшими редокс-потенциалами.

Важные для NODM НК случаи окисления с образованием OG и других продуктов будут рассмотрены ниже, в разделе, посвященном пероксинитриду. Пример взаимодействия двух радикалов – реакция $\cdot dG(-H)$ в составе ДНК с $\cdot NO_2$ с образованием NG (**86**), (**87**). Таким образом, $\cdot NO_2$ может выступать и как умеренно активный окислитель НК по сайтам с пониженным редокс-потенциалом, и как нечетная молекула, взаимодействующая с радикалом (дыркой), образующимся в НК при одноэлектронном окислении. В последнем случае образуются продукты нитрования, *возможно, не того основания, которое первоначально подверглось атаке окислителя.*

При встрече гуанильного радикала с NO_2 , в принципе, возможно окисление последнего в NO_2^+ и нитрат ($\Delta E NO_2/NO_3^- = 0.77$ В) с регенерацией Guo . Вероятно, достаточно часто происходит рекомбинация с образованием продуктов нитрования. Поскольку электронная плотность в гуанильном радикале распределена по всему основанию, но концентрируется на O^6 , C^5 , N^2 и C^8 , следует ожидать введения нитрогруппы по этим позициям – см. схему 13.

N^2 -Нитродезоксигуанозин (**84**) был получен Ямада и соавт. [82] при действии смеси NO/O_2 на

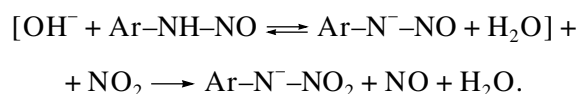
10 mM раствор дезоксигуанозина в фосфатном буфере при pH 7.4 и 37°C (по мере поглощения оксидов азота добавляли NaOH для поддержания pH) и выдерживании полученной смеси в течение 3 ч (сравни с методами получения диазоата цитозина и дезоксиоксанозина!). Продукт (выход 0.14%) выделяли хроматографией из смеси, содержащей также гуанин (0.35%), ксантин (0.86%), дезоксиоксантозин (1.6%), дезоксиоксанозин (<0.1%), NG (0.31%) и нитроксантин (1.33%), и охарактеризовали с помощью спектров ЯМР, УФ, МС и ИК (валентные колебания N–NO₂). Продукт сорбировался анионообменной смолой, т.е. являлся кислотой (титрованием по поглощению при 260 нм определены pK₁ 2.1 (нитраминная кислота), pK₂ 9.2 (гуанин)). Выход рос с увеличением pH и при pH 12.5 достигал 32% в расчете на взятый dGuo. Инкубация соединения (84) в течение недели при pH 7.4 и 37°C не давала даже следов продуктов разложения. Авторы объясняют образование продукта (84) взаимодействием гуанильных радикалов (78) или (79) с NO₂, но, отвергая возможность для NO₂ действовать в качестве окислителя дезоксигуанозина (со ссылкой на [70]), включают в число потенциальных окислителей изомеры ·NO₃ (симметричный и OONO), якобы образующиеся при окислении NO.

На наш взгляд, все экспериментальные данные, включая резкое возрастание выхода продукта (84) при высоких pH, можно объяснить действием NO₂ даже без участия N₂O₃ и N₂O₄ в качестве окислителей (см. схему 3 в [1]) – повышение pH снижает редокс-потенциал гуанина. Заметим, если при окислении NO₂ под действием гуанильного радикала образуется NO₂⁺, он мог бы стать подходящим электрофильным агентом для прямого нитрования гуанина по аминогруппе при высоких pH. Образование нитроксантина (82) можно объяснить дезаминированием и нитрованием, протекающими последовательно (видимо, в любой очередности), и дегликозилированием образующегося нитроксантозина (81).

В синтезе соединения (84) авторы использовали смесь NO с кислородом (1 : 4) вместо более удобного воздуха. Объяснений своему выбору они не приводят, но выбор кажется оправданным – стационарная концентрация NO₂ в реакционной смеси с окисляющимся NO должна быть пропорциональна концентрации кислорода (см. уравнение (19) в работе [5]).

Интересно рассмотреть возможность конкуренции NO и NO₂ в реакциях с гуанильными радикалами. Реакция NO с гуанильным радикалом по аминогруппе должна давать нитрозамин (83), превращающийся в диазоат (24) и в продукты по схемам 4, 6, 7. На схеме 1 реакция протекает через протонирование кислорода, что подразумевает кислые растворы. При щелочных pH протониро-

вание затруднено, нитрозамин накапливается и, не исключено, реагирует с молекулой NO₂ как нуклеофил, образуя нитрамин-анион и освобождая NO.



Таким образом, конкурируя при щелочных pH, NO и NO₂ образуют с (79d) продукты присоединения, из которых устойчивым оказывается только один (84); вероятно, (83) может превратиться в него в последующей реакции замещения. В близких к нейтральным и кислым растворах этот неустойчивый продукт теряет свойства нуклеофила, но получает множество других возможностей, включая образование ксантина, оксанина и шивок, без дополнительного участия NO₂.

Гуанидинонитроимидазол (89) получен Найлсом и соавт. первоначально при действии пероксинитрита на триацетилгуанозин [83], позже – той же группой обнаружен в полинуклеотидах и ДНК, обработанных пероксинитритом [84]. Было исследовано образование и свойства имидазола (89) в составе олигонуклеотидов при окислении их в водном растворе при pH 7.5 карбонатным радикалом, генерируемым фотохимически, с последующей реакцией образующихся гуанильных радикалов с NO₂ (продукт восстановления нитрита теми же радикалами) [71, 85]. Первичный продукт реакции (85) нестабилен и самопроизвольно превращается в имидазол (89) в результате последовательно протекающих присоединения воды (с образованием кислоты (88)) и декарбоксилирования. Во всех случаях имидазол (89) и NG образуются одновременно. В нуклеотидах и одноцепочечных олигонуклеотидах выход продукта (89) обычно выше, чем NG; в двуцепочечных выходы примерно равны. В отличие от NG, продукт (89) устойчив к самопроизвольной депуринизации даже при кратковременном нагревании в щелочных растворах (в олигодезоксинуклеотидах 8-нитрогуанозин (86) превращается при этом в нитрогуанин (87) и AP-сайт). Отмечено, что фосфатные связи нуклеотидов с (89) обладают повышенной устойчивостью к фосфатазам [71].

Снижение редокс-потенциалов оснований в НК в сравнении с нуклеотидами и прямое экспериментальное подтверждение (раскрытием введенного в основание циклопропильного кольца) участия цитозильных и аденильных радикалов в передаче электронных дырок по цепям ДНК ставит вопрос о возможности взаимодействия биогенного NO₂ с этими основаниями. Хотя нитрование аденина пероксинитритом известно ([62], см. ниже), а нитроаденозин и нитроцитидин препаративно доступны [86, 87], нам не удалось найти работ по их идентификации в продуктах реакций НК с NO₂.

ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК ПЕРОКСИНИТРИТОМ И ЕГО АДДУКТАМИ

Способность пероксинитрита разрушать НК (вносить сшивки, одно- и двучепочечные разрывы, нитровать и окислять основания, отщеплять их без разрыва сахарофосфатной цепи и др.) надежно установлена. Повреждения НК пероксинитритом рассматриваются и как один из основных механизмов его цитотоксичности, и как причина потенциальной мутагенности NO-продуцирующих клеток. Изучение взаимодействий НК–ONOO⁻ ведется интенсивно, но белых пятен остается предостаточно.

Подобно тому, как NO в аэробных условиях вызывает в основном дезаминирование, но параллельно образуется множество минорных продуктов, повреждения, причиняемые ДНК пероксинитритом, в большинстве своем – окислительные. В модельных экспериментах обработка ДНК пероксинитритом приводит к значительно большему повреждению, чем обработка тем же количеством NO в аэробных условиях. Кроме того, и спектр повреждений также оказывается гораздо шире.

Было обнаружено как дезаминирование (например, ксантин (**12**)), так и окисление (8-оксо-7,8-дигидродезоксигуанозин, dOG (**80**) на схеме 13) оснований ДНК, выделенной из макрофагаподобных клеток RAW 264.7, активированных липополисахаридами и γ -интерфероном [88] (активация вызывает резкое увеличение биосинтеза NO и O₂⁻, при рекомбинации дающих пероксинитрит – уравнение (6) в [1]). Образование этих продуктов снижалось при ингибировании NO-синтаз. Поскольку ингибировался только биосинтез NO, но не O₂⁻, **окисление** в действительности является NO-зависимым. Появление продуктов окисления представлялось доказательством того, что эффекты синтезируемого макрофагами NO вызваны не только нитроз(ил)ированием (по мнению авторов – под действием N₂O₃), но также и образованием ONOO⁻ (или его аддуктов). Следует заметить, что в подавляющем большинстве статей к реакциям **окисления** относятся любые превращения, приводящие к появлению карбонильного кислорода (например, образованию OG), хотя путь нитрование – восстановление – диазотирование (см. ниже) дает те же продукты.

При инфекциях и хронических воспалениях (вирусная пневмония, *H. pylori* и др.) в тканях появляются NG и OG. Отмечается высокая корреляция их концентраций с активностью NO-синтаз, одновременно наблюдается накопление ядерного антигена (proliferating cell nuclear antigen) (прогностический фактор на рак) [58, 59, 89, 90].

NG и dNG образуются нейтрофилами под действием миелопероксидазы из нитрита (в качестве

возможного интермедиата рассматривали NO₂) [91]. Форболовые эфиры не увеличивают концентрацию dNG и dOG в ядерной ДНК лимфоцитов и нейтрофилов, но в присутствии нитрита эти клетки нитруют ДНК, добавляемую в среду [92]. Нитруются остатки гуанина и в РНК. Не удивительно, что 8-нитрогуанозин предлагается как маркер “активных форм оксида азота” [65] (при всей неопределенности этой субстанции).

Разрывы цепи наблюдались *in vitro* в “голой” плазмидной ДНК, обработанной ONOO⁻ с концентрацией “ниже 2–5 мкМ” [93]. При обработке той же плазмидной ДНК раствором NO не наблюдали разрывов цепи даже при миллимолярных концентрациях оксида азота. С использованием 3'-³²P-меченого конца фрагмента рестрикции, было показано, что ДНК под действием пероксинитрита подвергается случайной фрагментации [94]. Салго и др. наблюдали образование одноцепочечных разрывов в суперскрученной ДНК плазмиды pBR322 после обработки ONOO⁻ [95].

ONOO⁻-индуцируемые разрывы цепи могут происходить из-за повреждения непосредственно сахара, из-за повреждения основания и из-за участия пероксинитрита в гидролизе фосфодиэфирной связи (ONOO⁻ – достаточно сильный нуклеофил). По-видимому, задействовано несколько параллельных путей. Механизмы повреждения сахара неясны (см. обзор [96]), возможно, включают выщелчение водорода, ведущее к образованию сахарных радикалов, которые затем вступают в следующие реакции (сравни уравнения (34)–(36) в [1]). В поддержку этого механизма повреждения сахарного остова свидетельствует образование акролеина (H₂C=CH–CH=O) или его производных при обработке дезоксинуклеотидов ONOO⁻ [97]. Ермилов и др. проверили образование тимин-акролеинового аддукта после реакции тимидина (10 мМ) с пероксинитритом (1 мМ) [98]. Образование аддукта наблюдалось, хотя и с очень низким выходом (0.02%). Значительное снижение выхода аддукта в присутствии CO₂ в буфере (88% ингибирования в присутствии 10 мМ NaHCO₃) указывает на вклад пероксинитрита (см. обсуждение химии нитрозопероксикарбоната ONOOCO₂⁻ и уравнение (38) в [1]). Чувствительный метод детекции AP-сайтов и других пероксинитритзависимых повреждений, приводящих к появлению карбонильных групп в ДНК, предложен Жоу и соавт. [99]. Метод основан на образовании O-замещенных оксимов с O-[¹⁴C]метилгидроксиламином (–CH=O + H₂NOCH₃ → –CH=NCH₃). Высокая чувствительность (1 AP-сайт на 10⁶ нуклеотидов в пробе 1 мкг ДНК) достигается благодаря использованию масс-спектрометрии (!!) для детекции ¹⁴C-меченых производных – детекция по радиоактивности снижает чувствительность на два поряд-

ка (к вопросу о требованиях к аналитическому оборудованию и стоимости современных методов анализа).

В отличие от “N₂O₃”, который может реагировать с аденином, гуанином и цитозином со сравнимыми скоростями, для ONOO⁻ предпочтительной мишенью является гуанин [58, 100] – в соответствии с наименьшим редокс-потенциалом. ВЭЖХ-анализ дезоксинуклеозидов, обработанных ONOO⁻, показал, что при действии 5 мМ ONOO⁻ были разрушены 30% дезоксигуанозина и “только” 2–5% других дезоксинуклеозидов. Без информации о мутагенности и репарируемости конечных продуктов нельзя утверждать, что меньшая в сравнении с dG реакционная способность остальных дезоксинуклеозидов по отношению к ONOO⁻ не может иметь важных генетических последствий для клетки. Ким и соавт. исследовали повреждение плазмидной ДНК под действием пероксинитрита в присутствии бикарбоната и под действием SIN-1 – коммерчески доступного реагента, разлагающегося в растворе с образованием NO и O₂⁻ и широко используемого в биохимических исследованиях в качестве “донора” пероксинитрита. Частота мутаций, вызываемых повреждениями ДНК, и их спектр определялись после репликации плазмиды в хозяйских клетках *E. coli* [100]. Оказалось, что SIN-1 повреждает в основном сахар, а пероксинитрит – и сахар, и основания. В случае пероксинитрита почти все точки мутаций находились в G : C-парах, а SIN-1 также повреждал A121 и A177. C108, C168 и G129 повреждались и пероксинитритом, и SIN-1; G113, G115 и G116 – только пероксинитритом. Большинство замен составляют G : C → T : A, но частоты других замен также были измерены.

Для оценки вклада модификаций оснований в появление разрывов цепи ДНК под действием ONOO⁻ детектировали число AP-сайтов и разрывов цепи в плазмиде *pUC19* [101]. Непосредственно после обработки найдено нитрование гуанина, AP-сайты не были обнаружены, хотя разрывы цепи (повреждение сахара?) уже наблюдались. Через 12 ч после обработки число разрывов осталось неизменным, но были детектированы и AP-сайты. Зависящее от времени образование AP-сайтов после действия пероксинитрита можно объяснить появлением одного или нескольких модифицированных оснований, которые со временем теряют связь с сахаром (спонтанно или под действием гликозилаз). Удаление сахара при репарации невозможно без разрывов цепи. С использованием плазмиды *pSP189* было показано, что модифицируется гуанин. Для NG скорость спонтанной депуринизации велика (в статье приведено значение $\tau_{1/2} = 1$ ч при 37°C), но модифицированные основания не выщепляются Frg-гликозилазой; OG выщепляется Frg, но устойчив к обработке пипери-

дином. Обнаруженная модификация (–и?) была устойчива даже при 90°C, но выщеплялась как пиперидином, так и Frg, аналогично продуктам окисления олигонуклеотидов при исследовании фотоиндуцируемого транспорта дырок (long-distance transfer).

Обсуждение образования OG и его дальнейшего окисления целесообразно вести в свете изложенных выше представлений об одноэлектронном окислении ДНК. Поскольку OG – результат двухэлектронного окисления, а гуанильный радикал (дырка) является достаточно сильным окислителем, для образования OG одной дырки недостаточно – требуется встреча дырки с другим сильным окислителем (относительно редкое событие с учетом низкой концентрации дырок – вероятно встреча с неповрежденным основанием) или двух дырок. В последнем случае они могут либо вступить в реакцию диспропорционирования (одна восстановится в гуанин, другая, при наличии молекулы воды или другого источника атомов кислорода, окислится в OG), либо образовать G–G'-сшивку при рекомбинации радикалов (уравнение (31) в [1]). В отличие от рассмотренных выше случаев G–G-сшивок (25), (30), здесь образование сшивки не требует потери атома азота гуанина. Нам не удалось найти примеров экспериментального исследования этого механизма появления G–G-сшивок при NODM. Большое число “двойных повреждений” (double lesions) в ДНК рассмотрено в обзоре [102], но авторы обсуждают в основном модификации под действием очень мощных (типа ·OH) окислителей или ионизирующего излучения.

Представляется интересной возможность встречи двух дырок, находящихся в комплементарных цепях, например, в последовательности CCCCCGGG: из-за симметрии в комплементарной цепи имеется такая же последовательность, и остатки гуанина с низким редокс-потенциалом (выделены) оказываются рядом.

В процессах, требующих участия двух дырок, должны сильно проявляться нелинейные эффекты (кооперативность) – при малых концентрациях одноэлектронных окислителей (даже сильных!) в ДНК будет поддерживаться некоторая стационарная концентрация дырок, непрерывно подвергающихся восстановлению *in vivo*, но встречи двух дырок начнут вносить вклад, когда время транспорта дырки на характерное расстояние между дырками станет сравнимым со временем жизни дырки. В этой связи становится понятно, что при исследовании повреждений ДНК *in vitro* однократное введение в реакционную смесь больших количеств пероксинитрита принципиально отличается от его непрерывного поступления в низких концентрациях в течение продолжительного интервала времени.

Устойчивость к окислению (двухэлектронно-му с появлением OG) может регулироваться без участия каких-либо окислителей/восстановителей (допустим, ионами магния, влияющими на структуру ДНК и ее способность транспортировать дырки). Поскольку эффективность транспорта зависит от последовательности нуклеотидов, структуры молекулы ДНК и ее окружения, ДНК из разных источников могла бы значительно различаться по устойчивости к окислению даже при идентичных GC-составах.

Активация 5'-G в олиго-G-последовательностях означает, что именно в них будут накапливаться сначала дырки, а при достижении достаточной их концентрации – и остатки, поврежденные в результате окисления ДНК (это многократно наблюдали при изучении long-distance transfer в модельных экспериментах), в том числе и при NODM. Соответственно, OG будет чаще встречаться перед другим G [103].

Показано, что OG реагирует с пероксинитритом и его аддуктом с CO₂ много активнее, чем немодифицированный гуанин [104]. Редокс-потенциал OG ниже, чем у G, поэтому, появившись в составе ДНК, OG-сайты должны облегчать транспорт, сами становиться местом концентрации дырок и объектом последующих атак окислителей (замечательный пример “добывания слабого” на молекулярном уровне – наличие одного слабого спасает от повреждений множество нормальных – все шишки (т.е. дырки) достаются слабому). Однако, если OG появился “не там, где следует”, он оказывается относительно устойчивым – искусственное введение оксогуанина на 3'-конец GGGG-последовательности [GGG(OG)] не приводит к повышению его чувствительности к дальнейшему окислению – 5'-концевой G (выделен) по-прежнему имеет сниженный редокс-потенциал и будет атакован даже чаще, чем OG [105].

Снижение редокс-потенциалов нуклеотидов в нуклеиновых кислотах и long-distance transfer делают невозможным распространение на ДНК выводов из экспериментов на нуклеотидах, и необходимость исследований NODM ДНК (и РНК!) не вызывает сомнений. При этом следует иметь в виду, что обобщения типа “остаток гуанина в составе ДНК” также неправомерны: в ДНК есть принципиально разные остатки гуанина, различающиеся редокс-потенциалом, окружением и диктуемой этим химией – превращения, невозможные для большинства, оказываются доступными некоторым избранным. Действительно, при добавлении к образцу ДНК некоторого, даже “очень небольшого” – по отношению ко *всем* имеющимся в образце основаниям, количества модифицирующего агента (например, пероксинитрита), отношение концентраций реагента и этих “избранных” оснований много больше единицы (реагент нахо-

дится в большом избытке по отношению к “избранным”). Следовательно, он сможет прореагировать не только с самими “избранными” основаниями, но и с первичными продуктами их превращений. Повторное добавление столь же малой порции реагента не является повторением (принципиальное отличие от привычных экспериментов в органической химии) – реагент будет добавлен к *другой* ДНК. Сайтов, атакованных в первом случае, уже нет, появились новые (часто – более активные), и эти новые непредсказуемым образом изменили структуру ДНК, эффективность long-distance transfer и реакционную способность уже имевшихся остатков. В результате даже остатки в изначально идентичных, рядом расположенных повторяющихся последовательностях могут принципиально не иметь возможности прореагировать одинаково – реакция по первой (не исключено, любой из двух) меняет *относительную* активность второй.

Основными продуктами, которые были определены при реакции дезоксигуанозина с ONOO⁻ (схема 14), являются NG (86), OG (80), а также 4,5-дигидро-5-гидрокси-4-(нитрозоокси)-2'-дезоксигуанозин (90) – продукт присоединения ONOON по двойной связи между циклами [106], гуанидиногидантоин (Hyd) (91), два стереоизомера спироиминодигидантоинов (Sp) (93) и (94), 2,5-диамино-4*H*-имидазол-4-он (101), 2,2,4-триамино-5-(2*H*)-оксазолон (Ox) (102) (результат деградации “верхних частей” обоих циклов) и 4-гидрокси-2,5-диоксоимидазолидин-4-карбоновая кислота (104). Образование оксазолон было обнаружено при обработке ДНК тимуса телят пероксинитритом еще в 1996 г. [107]. Дальнейшие превращения этих (и других, минорных) продуктов приводят к исключительно сложной смеси соединений, главнейшие из которых представлены на схеме 14. Сложность смеси увеличивается благодаря присутствию стереоизомеров у большинства продуктов из-за появления асимметрических sp³-атомов углерода (отмечены*). Поскольку асимметрические атомы есть и в сахарной части, продукты являются диастереоизомерами и на ВЭЖХ выходят отдельными пиками. Биохимические свойства их также отличаются. Для химического моделирования превращений NG под действием пероксинитрита использовали 9-этил-8-нитроксантин [108].

Поскольку связь с сахаром в большинстве модификаций сохраняется, вся эта пестрая смесь оказывается в составе ДНК (и РНК?). Потеря поврежденным основанием ароматичности и резкие нарушения структуры ДНК (например, в случае спиранов (93) и (94) плоскости циклов взаимно перпендикулярны – см. обсуждение стереохимии и последствий в работе [110]) препятствуют транспорту дырок по стопкам оснований и делают молекулу ДНК более уязвимой к последующему окислению.

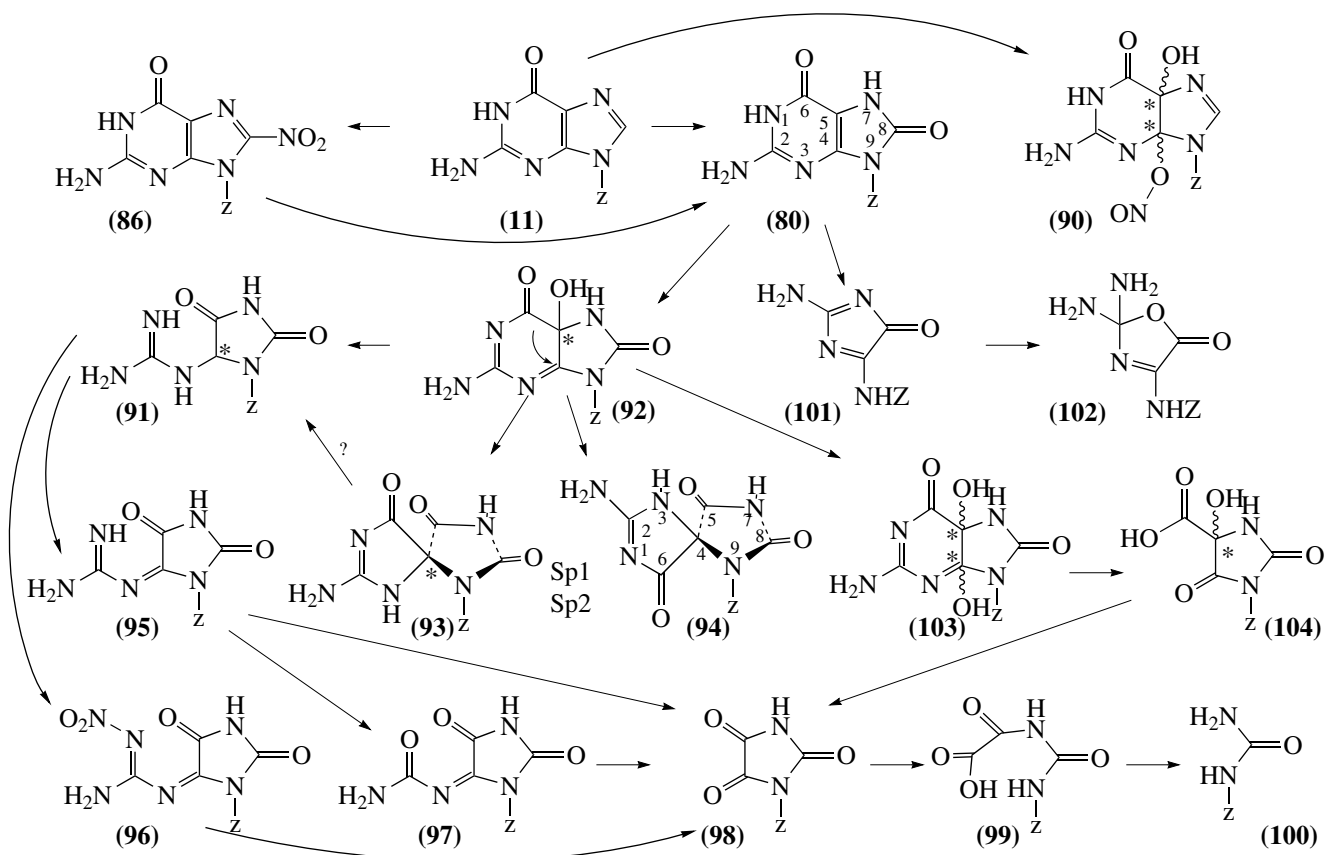


Схема 14. Основные продукты взаимодействия остатков гуанина с пероксинитритом (по [109]).

Образование OG и других продуктов под действием пероксинитрита в присутствии CO_2 (реагент – ONO:OCO_2^-) можно рассматривать как двукратное последовательное одноэлектронное окисление гуанина карбонатным анион-радикалом (см. раздел “Пероксинитрит и родственные соединения” в работе [1]). Креан и соавт. исследовали эту реакцию в H_2^{18}O [111] (см. схему 15). Как и следовало ожидать, атом кислорода в OG включается не из воды, а из карбоната (продукты анализировали MC). Действительно, первое окисление (1 на схеме) приводит лишь к образованию гуанильного радикала (**79**), второе является рекомбинацией этого радикала с новым карбонатным радикалом и дает сложный эфир (**105**). При гидролизе эфира (**105**) вода (нуклеофил; поскольку использовали фосфат-карбонатный буфер pH 7.5, реальными атакующими частицами могли быть имевшиеся в растворе анионы) присоединяется по углеродному атому карбоната, в OG (**80**) остается атом кислорода, введенный карбонатом (выделен). Дальнейшее окисление OG происходит аналогично: третий радикал карбонат-аниона образует оксогуанильный радикал (**106**), четвертый рекомбинирует с ним с образованием смеси стереоизомеров сложных эфиров (**107**). При гидро-

лизе вода атакует карбонатный атом углерода, и второй атом кислорода из карбоната включается в продукт. Перегруппировка спирта (**92**) в смесь спиранов (**93**) + (**94**) атом кислорода сохраняет. Таким образом, оба введенных атома кислорода спиранов пришли из карбоната, но не из воды. Авторы изящно продемонстрировали предлагаемый механизм и дизайн эксперимента добавлением в реакционную смесь карбоксиангидразы. Фермент быстро установил равновесие между атомами кислорода воды и карбоната, что отразилось на масс-спектрах получаемых продуктов. Принципиально, что выход смеси (**93**) + (**94**) при окислении фотохимически генерируемым карбонильным радикалом составляет 40–60% на взятый в реакцию триацетилгуанозин [72, 111].

dOG считался подходящим биомаркером для прогнозирования повреждений ДНК под действием различных окислителей [112, 113]. Быструю реакцию между dOG и производными пероксинитрита *in vivo* следует учитывать при использовании OG в качестве маркера “оксидативного стресса” при радиационных, УФ-, фото- и химических процессах, приводящих к повреждению ДНК с участием свободных радикалов, но без оксидов азота.

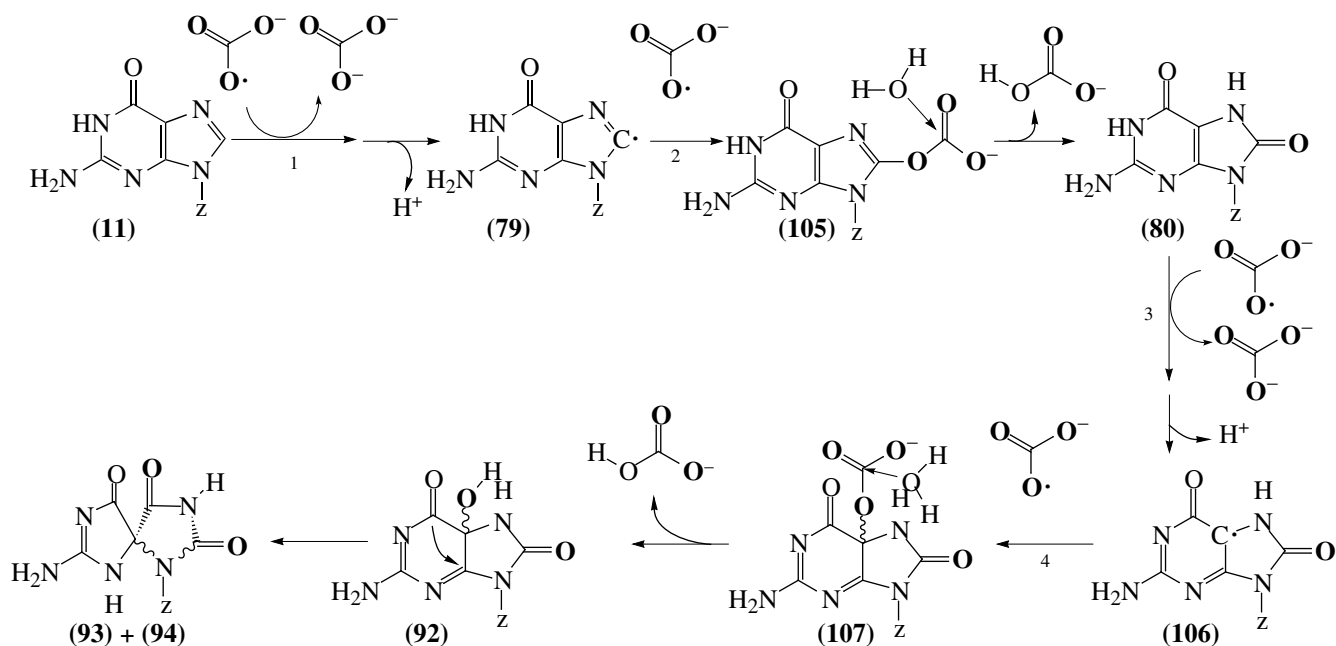


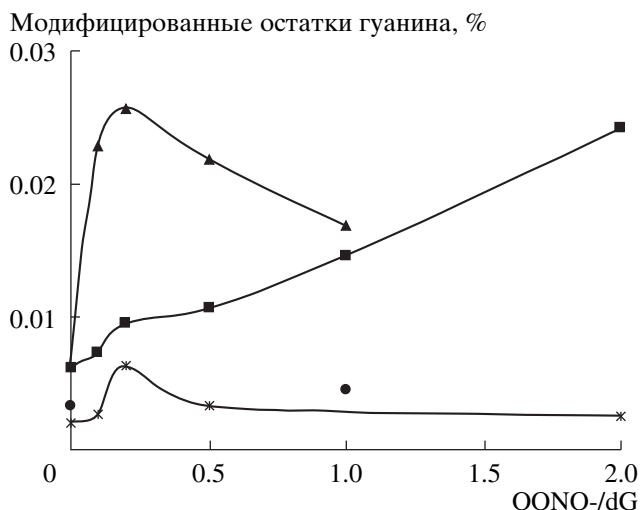
Схема 15. Последовательное окисление остатков гуанина карбонатным анион-радикалом (по [111], z – триацетилрибозил). Атомы кислорода карбоната выделены **O**.

Для dOG исследовано мутагенное действие, более выраженное в клетках млекопитающих, чем в *E. coli* [114, 115]. Концентрация dOG в моче резко возрастает при воспалениях (колебания от 1 до 100 нМ [116]; напомним, уровень NG на два-три порядка ниже). Вместе с тем, хотя пероксинитрит окисляет гуанин, в том числе с образованием OG [62, 106, 107], по данным нескольких независимых групп он **не увеличивает** содержания dOG в ДНК [63, 106]. Измеренная в 2001 г. концентрация dOG в *коммерческих* препаратах ДНК (30–80 остатков dOG на 10^6 п.о. [116, 117]) была недавно (2005 г.) определена повторно с использованием прецизионных методов МС с изотопно-мечеными стандартами [118]. Авторам удалось учесть дополнительное окисление оснований в ходе анализа (но не в процессе выделения ДНК на производстве). Влияние метода выделения ДНК на концентрацию OG в получаемом препарате исследовали Хельбок и соавт. [119].

Согласно данным работы [118], в коммерческой (Sigma) тимусной ДНК при однократном добавлении к раствору в $\text{HCO}_3^-/\text{HPO}_4^{2-}$ -буфере рН 7.2 увеличивающихся количеств пероксинитрита (серия идентичных образцов ДНК с концентрацией остатков гуанина ~275 мкМ; переменные концентрации пероксинитрита) содержание dOG плавно **растет** с 12 (нет пероксинитрита) до 50 (500 мкМ пероксинитрита) остатков OG на 10^6 п. о., при дальнейшем увеличении количества пероксинитрита **снижается** до ~30 на 10^6 п. о. и далее снова возрастает. Оксазолон (102) в исходной ДНК

не обнаружен, при 275 мкМ пероксинитрита (1 : 1 к остаткам гуанина) обнаружено 7 остатков оксазолона на 10^6 п. о., при дальнейшем увеличении количеств пероксинитрита рост очень слабый. Спираны ((93) + (94)) присутствовали в исходной ДНК в количестве ~12 на 10^6 п. о., при добавлении 27.5 мкМ пероксинитрита (1 : 10 к остаткам гуанина) концентрация возросла в четыре раза, достигла максимума при 55 мкМ и далее снижалась. Гуанидиногидантоин (Hud) (91) также присутствовал в исходной ДНК (4.5 на 10^6 п. о.). При добавлении 27.5 мкМ пероксинитрита (1 : 10 к остаткам гуанина) концентрация Hud практически не увеличивалась, но резко (до 13 на 10^6 оснований) возрастала при 55 мкМ (максимум, как и в случае спиранов) и столь же резко снижалась при дальнейшем увеличении количества пероксинитрита.

Пересчет данных работы [118] на долю модифицированных остатков гуанина представлен на графике рисунка (мы считали, что в тимусной ДНК доля гуанина составляет 21% от всех оснований, так как ее GC-состав – 42%). Как видно из графика, при наименьших количествах добавленного пероксинитрита концентрация спироиминодигидантоина (Sp) в ДНК растет много быстрее, чем OG, а концентрация гидантоина практически не увеличивается в сравнении с имевшейся в исходном препарате. Поскольку доля OG в исходном препарате мала, это означает, что окисляющийся dG сразу превращается в Sp (этого и следовало ожидать, так как редокс-потенциал OG ниже, чем у dG). Увеличение количества пероксинитрита



Изменение количества модифицированных остатков гуанина при обработке ДНК пероксинитритом в присутствии бикарбоната (расчет по данным [118]). Квадраты – OG, звездочки – Hud (91), треугольники – Sp (93) + (94), кружки – Ox (102).

двое (следующая серия точек) приводило к практически одинаковому возрастанию долей OG, Sp и Hud, но суммарное увеличение количеств трех продуктов оказывалось меньше, чем в первом случае. Следовало ожидать увеличения концентрации гидантоина (одного из продуктов дальнейшего окисления Sp, см. схему 14), так как концентрация Sp возросла в сравнении с исходной ДНК. Дальнейшее увеличение количества пероксинитрита пошло в основном на окисление уже окисленных остатков – концентрация Sp **снижается** и даже быстрее, чем растет концентрация OG. Наконец, при добавлении 1 моль пероксинитрита на моль dG в составе ДНК обнаружено ~0.017% Sp, 0.015% OG, 0.0033% Ox и 0.0025% Hud – суммарно менее 0.1% от всех имевшихся в ДНК остатков гуанина – сравни с выходом OG и Sp при окислении триацетилгуанозина карбонатным радикалом! Напомним, пероксинитрит при близких к нейтральным значениям pH быстро изомеризуется в нитрат, CO₂ ускоряет этот процесс (см. обсуждение в [1, 120]). Таким образом, в окислении ДНК участвовала лишь малая доля введенного в реакцию пероксинитрита.

Эксперимент показывает, что в ДНК имеется “очень небольшая” (<1%) фракция легкоокисляемых под действием пероксинитрита остатков гуанина, являющихся источником детектируемых продуктов. Низкий – на грани предела разрешения наиболее чувствительных современных методов анализа – выход даже основных продуктов наиболее подверженного модификации основания позволяет предполагать, что имеется множество других, не найденных до настоящего времени соединений, образующихся при действии на НК производных

пероксинитрита в условиях *in vivo*. Обзоры [102, 121, 122] дают представление о некоторых типах соединений, обнаруживаемых при действии на НК сильных окислителей. С учетом рассмотренной выше высокой реакционной способности уникальных сайтов есть много шансов найти их и при действии производных пероксинитрита.

Нитрование НК с образованием NG под действием пероксинитрита исследовано многократно [65, 92, 123–125]. Показано, что, как и в случае OG, первичные продукты реакции атакуются избытком пероксинитрита легче, чем dGuo [125]. Из-за быстрого образования ONOCO₂⁻ наличие CO₂ увеличивает выход NG под действием пероксинитрита [124]. В обзоре Сава и Охшима “Нитративные повреждения ДНК при воспалениях и их возможная роль в канцерогенезе” [126] приведено более ста ссылок, в том числе на ранние работы. Из аналогов пероксинитрита сходное действие найдено у пероксиацетилнитрата (CH₃COONO₂) [127].

Поскольку пероксинитрит не является единственным источником dOG, а NG может образоваться без его участия (например, при действии NO₂), причины корреляции появления производных OG, NG и пероксинитрита *in vivo* не очевидны. Одно из возможных объяснений – превращение NG в OG при нуклеофильном замещении нитрогруппы под действием пероксинитрита [108] ((86) → (80) на схеме 16). Естественно, возникает вопрос: а нужен ли вообще пероксинитрит для превращения NG в OG? NO₂-Зависимое нитрование–восстановление–дезаминирование ((86) → (111) → (112) → (80) на схеме 16) позволяет дать отрицательный ответ. (По-видимому, первым продуктом NO-зависимой модификации может быть даже не нитро-, а нитрозо-производное. Для остатков тирозина в белках такая возможность была доказана экспериментально [1].)

Известно восстановление производных NG до аминов ((86) → (111) на схеме 16), протекающее *in vitro* как ферментативно, так и неферментативно [58, 63, 128]. Аминогуанозин обнаруживается в тканях при вирусной пневмонии [58]. Сава и соавт. показали, что NADPH-зависимые редуктазы, включая все формы NO-синтаз и цитохром-P450-редуктазу, проводят одноэлектронное восстановление нитрогуанозина и его 5'-моно- и трифосфатов с образованием достаточно стабильных нитрогуанозильных анион-радикалов (108), которые восстанавливают кислород, при его наличии, в O₂⁻ с регенерацией исходных производных NG [129]. Процесс не ингибируется обычными аналогами аргинина и не связан с гемом – редуктазный домен NO-синтаз действует самостоятельно, превращаясь, при участии NG, в супероксидсинтазу. Заметим, что **побочным** результатом этого процесса будет увеличение образования пероксинит-

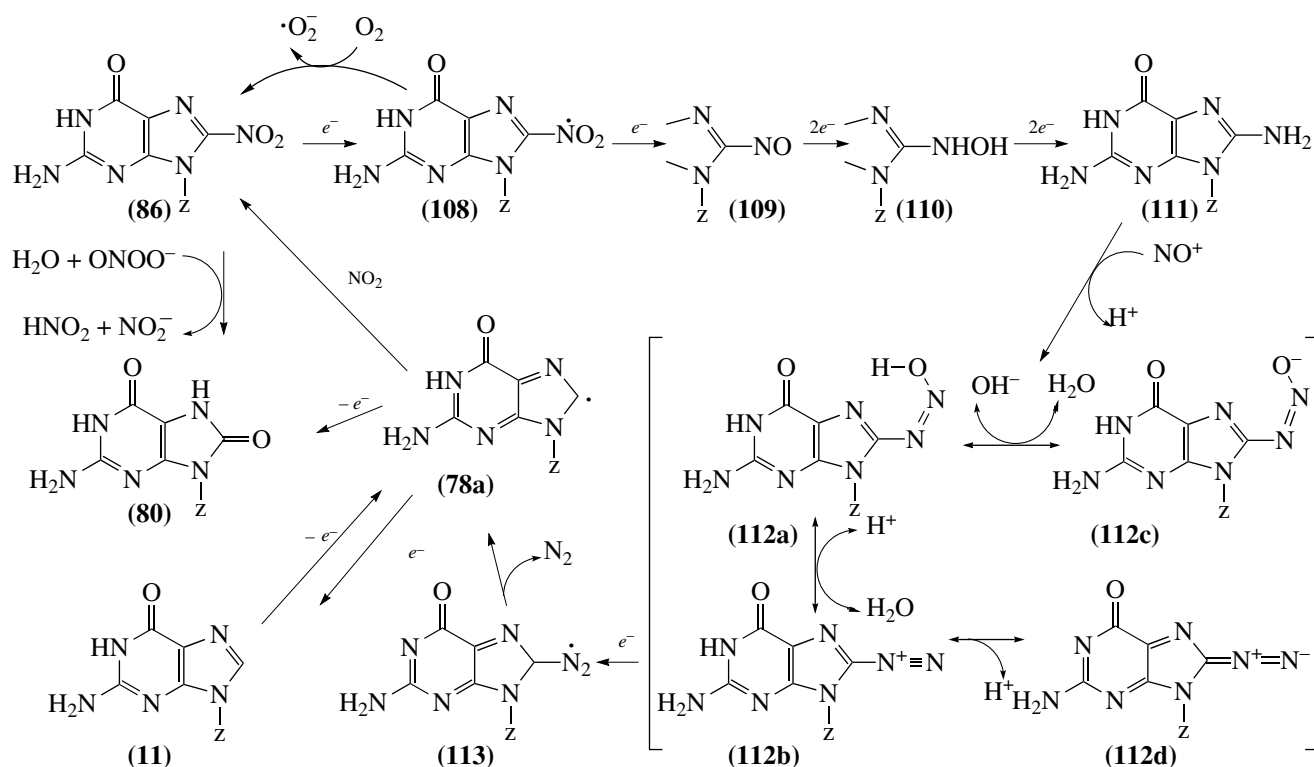


Схема 16. Возможные пути превращения нитрогуанина в оксогуанин.

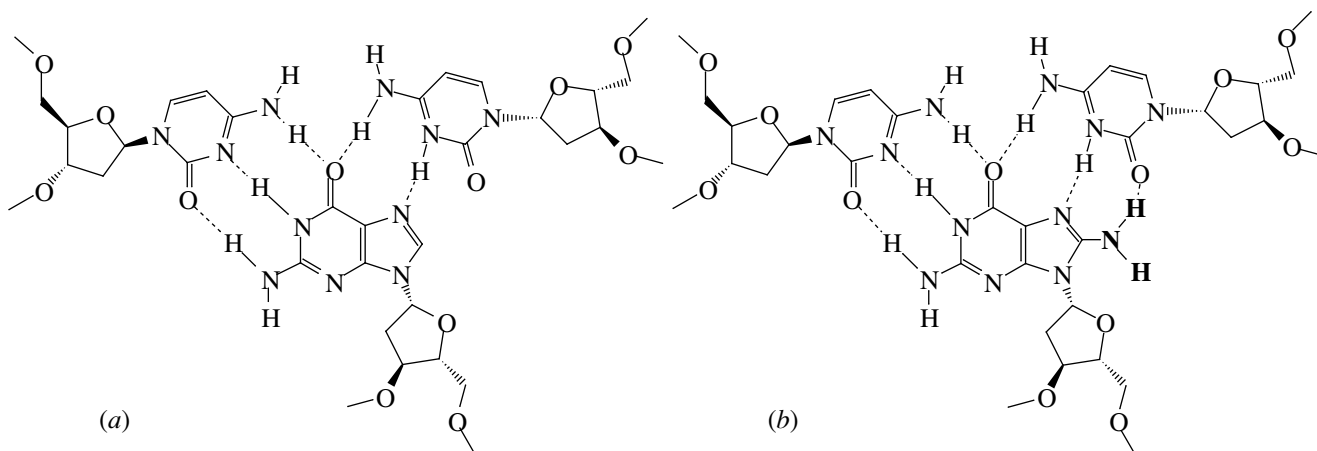


Схема 17. Неканоническое спаривание оснований при участии гуанина (H-форма ДНК – тройная спираль) (a) и 8-аминогуанина (b).

рита: $\text{NO} + \text{O}_2^- \longrightarrow \text{ONO}_2^-$. В анаэробных условиях анион-радикал (108) восстанавливается в аминогуанин, вероятно, через нитрозо- (109) и гидросиламино- (110) производные.

8-Аминогуанин известен высокой токсичностью [58] и способностью стабилизировать образование тройных спиралей (Z-форма) в ДНК [130] (см. схему 17). Ключевой стадией в предла-

гаемом цикле является диазотирование появившейся аминогруппы с образованием производных 8-диазогуанина (112). В отличие от продуктов диазотирования аминогрупп канонических оснований, этот может стабилизироваться образованием хиноидной структуры (112d). Одноэлектронное восстановление диазогуанина даст диазогуанильный радикал (113), который после потери азота вернет процесс “на круги своя” – образует неза-

мещенный гуанильный радикал (78a) – первый продукт окисления гуанина. Его возможности рассмотрены выше: одноэлектронное окисление в ОГ при наличии сильных окислителей, нитрование в присутствии NO₂ и восстановление в неповрежденный гуанин под действием широкого круга восстановителей. В целом, предлагаемый цикл является аналогом тирозин-нитротирозинового цикла [1] для НК и, вероятно, первым примером, когда основание, модифицированное в результате NODM, может быть восстановлено в исходную форму (репарировано) без его удаления из НК. Процесс не требует непосредственного участия ферментов.

В пользу эффективности предлагаемого пути свидетельствует предпочтительность дезаминирования “неспаренных” аминокетильных групп (действительно, аминокетильные группы немодифицированных оснований защищены спариванием, а аминокетильная группа, возникающая в положении 8 в обычной В-форме ДНК, – не защищена) и повышенная чувствительность к нитрованию/окислению РНК [58]. Последний факт легко объяснить, рассматривая гидрофобное ядро молекулы РНК как гидрофобную фазу, катализирующую окисление NO и образование высших оксидов, являющихся и нитрующими, и дезаминирующими агентами [5, 38, 131]. Последующие реакции определяются сольватацией высших оксидов азота “внутри” макромолекулы (о комплексообразовании NO⁺ см. [132]). У ДНК отношение объем/поверхность меньше, и эффект должен быть много слабее. В случае участия гидрофильного пероксинитрита соотношение будет иным: в гидрофобные внутренние компартменты РНК иону проникнуть трудно. Возможность прямой экспериментальной проверки предлагаемого пути могут быть основаны на выделении промежуточно образующихся диазо-производных (112), аналогично известным диазоатам для канонических оснований [25], или продуктам их превращений. Последующие реакции 8-диазогуанина с мишенями в клетке можно рассматривать как новый молекулярный механизм NO-зависимых патологий, ассоциирующихся с пероксинитритом и нитрованием.

В целом, *in vivo* появление как 8-оксо-, так и 8-нитрогуанина не является доказательством присутствия пероксинитрита и может быть результатом серии последовательных NO-зависимых реакций.

ДРУГИЕ NO-ЗАВИСИМЫЕ МОДИФИЦИРУЮЩИЕ АГЕНТЫ

Чазотте и др. [112] исследовали модификацию ДНК под действием нитроксида, в том числе в присутствии перекисей и других соединений, способных к одноэлектронному восстановлению (в качестве источника нитроксида использовали соль Анжели Na₂N₂O₃). Был обнаружен малоно-

вый диальдегид (продукт окисления дезоксирибозы) и ОГ; показано, что модификации подвергаются все основания, но с существенно различными скоростями. Модификации сайт-специфичны – одни и те же основания в разных позициях атакуются с сильно различающейся эффективностью.

При анализе NODM митохондриальной ДНК под действием раствора синтетического NO-донора в качестве источника NO и ее последующей репарации Гришко и соавт. [133] обнаружили модификацию не только гуанина, но и (в относительно малой степени) аденина. Структура продуктов модификации в работе не определена – авторы ссылаются на ранние работы и считают все наблюдаемые модификации дезаминированием. Модификация аденина была сайт-специфичной, но причины этой “избирательности” остались неизученными. Замечено, что митохондриальная ДНК модифицируется сильнее, чем ядерная.

Модификацию дезоксигуанина и ДНК под действием нитрилхлорида (NO₂Cl) исследовали Чен и соавт. [134]. Основным продуктом оказался нитроксантин (→(81) → (82)), а не NG. Авторы обсуждают возможный механизм реакции. Для доказательства структуры нитрогруппа была восстановлена в аминокетильную, аналогично процессу на схеме 16. Представляется, что время спонтанной депуринизации нитроксантина (при 37°C и pH 7.4 τ_{1/2} = 2 ч) достаточно, чтобы этот процесс мог эффективно протекать *in vivo*. Хотя вклад нитрилхлорида в NODM в последнее время обычно считается небольшим (подробнее см. [1]), а нитроксантин образуется и при действии производных пероксинитрита, важность этой работы возрастает в связи с возможными дальнейшими реакциями аминоксантина.

В целом, расширение числа изученных NO-зависимых активных агентов в реакциях с нуклеиновыми кислотами ведет к увеличению числа открываемых продуктов модификации.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ

Модифицированные основания в составе ДНК не могут быть безошибочно “считаны” полимерами (иногда фермент вообще останавливается или сшивается с модифицированным основанием) и узнаны ДНК-специфичными регуляторными белками. Естественно, возникли сложные системы исправления ошибок (репарация) и защиты от них – область исследований исключительной важности и сложности. В большинстве случаев известные механизмы первоначально были изучены на бактериях.

Основную роль в удалении NO-индуцируемых повреждений ДНК в *E. coli* играет BER (base excision reparation) [135]. ДНК-гликозилазы инициируют BER, разрезая N-гликозидную связь между основанием и дезоксирибозой с образованием

AP-сайта и модифицированного свободного основания. Далее AP-эндонуклеаза надрезает цепь ДНК с 5'-стороны от AP-сайта, образуя 3'-ОН-конец и остаток фосфата 5'-дезоксирибозы. Этот остаток удаляется дезоксирибозофосфодиэстеразой, затем 3'-ОН-конец достраивается ДНК-полимеразой. Репарацию завершает ДНК-лигаза.

Действие репарирующих ДНК-гликозилаз специфично к повреждениям разных типов [135–139]. OG репарируется формамидопиримидин-ДНК-гликозилазой (Fpg или MutM) в *E. coli* [140] и 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой (Ogg1) у млекопитающих [141]. Недавно показано, что “оксидативные” и “нитрозативные” повреждения в ДНК репарируются разными наборами ферментов [142]. Для репарации оксанина, сшивающегося с гликозилазами, и его пространственно-затрудненных аддуктов (например, оксанин-спермин) используется NER (nucleotide excision reparation) [143] – процесс, связанный с вырезанием всего поврежденного нуклеотида, обычно – с несколькими окружающими нуклеотидами. Процессы гомологичной рекомбинационной репарации, инициирующиеся двуцепочечными разрывами или одноцепочечными участками ДНК, обсуждаются в работах [144, 145].

Помимо исправления уже сделанных ошибок (удаление поврежденных оснований, AP-сайтов, разрывов и т.д.) в ДНК, имеются другие защитные механизмы. В обзоре Камия [146] обсуждаются стратегии использования нескольких ДНК-полимераз и специфических фосфатаз, расщепляющих нуклеотидтрифосфаты неканонических (NODM – поврежденных) оснований. Удивительно, но практически ничего не известно о стратегиях борьбы с NO-зависимыми повреждениями РНК и о регуляторных механизмах, использующих эти превращения. Поскольку РНК должна атаковаться чаще, чем ДНК, эти процессы не могут не влиять на структуру, функции и время жизни РНК. В частности, NODM под действием метаболитов оксида азота, генерируемых макрофагами и аналогичными клетками при воспалениях или инфекциях, в случае РНК-содержащих вирусов должны приводить к резкому повышению числа мутаций. В результате механизмы защиты от инфекции организма хозяина могут способствовать появлению новых и более опасных вариантов инфицирующих вирусов. В отсутствие механизмов репарации NODM для РНК этот важнейший класс биополимеров не может существовать в клетках NO-продуцирующих организмов в неизменном виде продолжительное время. Вероятно, NODM являются важной формой их процессинга. Конкретные воплощения механизмов, регулирующих метаболизм оксидов азота для мира РНК, еще предстоит исследовать.

В целом, NO-зависимые модификации не могут не играть ключевых ролей во всех биохимических и генетических процессах с участием нуклеиновых кислот.

Авторы благодарны коллегам, оперативно приславшим отписки своих статей до поступления их в российские библиотеки, Институту молекулярной генетики РАН и РФФИ (гранты № 02-04-49530, 04-04-99317, 05-04-49325) за поддержку работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beda N.V., Nedospasov A.A. // Russian J. of Bioorganic Chemistry. 2006. V. 32. P. 1–22. (Беда Н.В., Недоспасов А.А. // Биоорганич. химия. 2006. Т. 32. С. 3–26.)
2. Ford P.C., Fernandez B.O., Lim M.D. // Chem. Rev. 2005. V. 105. P. 2439–2455.
3. Kawanishi S., Hiraku Y., Murata M., Oikawa S. // Free Radic. Biol. Med. 2002. V. 32. P. 822–832.
4. Moreno R.G., Alipazaga M.V., Medeiros M.H., Coichev N. // Dalton Trans. 2005. V. 21. P. 1101–1107.
5. Nedospasov A.A. // J. Biochem. Molecular. Toxicol. 2002. V. 16. P. 109–120.
6. Nguyen T., Brunson D., Crespi C.L., Penman B.W., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 3030–3034.
7. Kwon N.S., Stuehr D.J., Nathan C.F. // J. Exp. Med. 1991. V. 174. P. 761–767.
8. Roy B., Lepoivre M., Henry Y., Fontecave M. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 5411–5418.
9. Лундсей Р. Дж. Общая органическая химия. Пер. с англ. М.: Изд-во Химия, 1982. Т. 3. С. 168–228.
10. Marshall H.E., Merchant K., Stamler J.S. // FASEB J. 2000. V. 14. P. 1889–1900.
11. Burney S., Caulfield J.L., Niles J.C., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. // Mutat Res. 1999. V. 424. P. 37–49.
12. Wink D.A., Kasprzak K.S., Maragos C.M., Elespuru R.K., Misra M., Dunams T.M., Cebula T.A., Koch W.H., Andrews A.W., Allen J.S., et al. // Science. 1991. V. 254. P. 1001–1003.
13. Caulfield J.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 12689–12695.
14. Suzuki T., Yamaoka R., Nishi M., Ide H., Makino K. // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 2515–2516.
15. Pack S.P., Nonogawa M., Kodaki T., Makino K. // Nucleic Acid Res. 2005. V. 33. P. 5771–5780.
16. Lucas L.T., Gatehouse D., Shuker D.E. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 18319–18326.
17. Lucas L.T., Gatehouse D., Jones G.D., Shuker D.E. // Chem. Res. Toxicol. 2001. V. 14. P. 158–164.
18. Беда Н.В., Недоспасов А.А. // Мол. генет. микробиол. вирусол. 2001. Т. 4. С. 31–41.
19. Suntsova T.P., Beda N.V., Nedospasov A.A. // IUBMB Life. 2002. V. 54. C. 281–292.
20. Kirsch M., de Groot H. // J. Pineal. Res. 2005. V. 38. P. 247–253.
21. Yagisawa N., Shimada N., Naganawa H., Takita T., Hamada M., Takeuchi T., Umezawa H., Nakamura H., Iitaka Y. // Nucleic Acids Symp. Ser. 1981. V. 10. P. 55–58.
22. Suzuki T., Ide H., Yamada M., Endo N., Kanaori K., Tajima K., Morii T., Makino K. // Nucleic Acid Res. 2000. V. 28. P. 544–551.
23. Geidushek E.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1961. V. 47. P. 950–955.

24. Shapiro R., Dubelman S., Feinberg A.M., Crain P.F., McCloskey J.A. // J. Am. Chem. Soc. 1977. V. 99. P. 302–303.
25. Suzuki T., Yamada M., Ide H., Kanaori K., Tajima K., Morii T., Makino K. // Chem. Res. Toxicol. 2000. V. 13. P. 227–230.
26. Caulfield J.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. // Chem. Res. Toxicol. 2003. V. 16. P. 571–574.
27. Glaser R., Wu H., Lewis M. // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 7346–7358.
28. Kirchner J.J., Hopkins P.B. // J. Am. Chem. Soc. 1991. V. 113. P. 4681–4682.
29. Kirchner J.J., Sigurdsson S.T., Hopkins P.B. // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. P. 4021–4027.
30. Edfeldt N.B., Harwood E.A., Sigurdsson S.T., Hopkins P.B., Reid B.R. // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. P. 2795–2801.
31. Edfeldt N.B., Harwood E.A., Sigurdsson S.T., Hopkins P.B., Reid B.R. // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. P. 2785–2794.
32. Hodgen B., Rayat S., Glaser R. // Org. Lett. 2003. V. 5. P. 4077–4080.
33. Rayat S., Qian M., Glaser R. // Chem. Res. Toxicol. 2005. V. 18. P. 1211–1218.
34. Glaser R., Wu H., von Saint Paul F. // J. Mol. Model. 2006. V. 13. P. 1–7.
35. Suzuki T., Nakamura T., Yamada M., Ide H., Kanaori K., Tajima K., Morii T., Makino K. // Biochemistry. 1999. V. 38. P. 7151–7158.
36. Suzuki T., Ide H., Yamada M., Morii T., Makino K. // Bioorg. Med. Chem. 2001. V. 11. P. 2937–2941.
37. Suzuki T., Yamada M., Nakamura T., Ide H., Kanaori K., Tajima K., Morii T., Makino K. // Bioorg. Med. Chem. 2002. V. 10. P. 1063–1067.
38. Gordin V.A., Nedospasov A.A. // FEBS Lett. 1998. V. 424. P. 239–242.
39. Beda N.V., Suntsova T.P. // FEBS Lett. 1999. V. 453. P. 229–235.
40. Liu X., Miller M.J.S., Joshi M.S., Thomas D.D., Lancaster J.R., Jr. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 2175–2179.
41. Okun J.D., Archer M.C. // J. Natl. Cancer. Inst. 1977. V. 58. P. 409–411.
42. Suzuki T., Yamada M., Nakamura T., Ide H., Kanaori K., Tajima K., Morii T., Makino K. // Chem. Res. Toxicol. 2000. V. 13. P. 1223–1227.
43. Chin A., Hung M.-H., Stock L.M. // J. Org. Chem. 1981. V. 46. P. 2203–2207.
44. Hung M.-H., Stock L.M. // J. Org. Chem. 1982. V. 47. P. 448–453.
45. Koepke S.R., Kroeger-Koepke M.B., Michejda C.J. // Chem. Res. Toxicol. 1990. V. 3. P. 17–20.
46. Gannett P.M., Lawson T., Miller M., Thakkar D.D., Lord J.W., Yau W.M., Toth B. // Chem. Biol. Interact. 1996. V. 101. P. 149–164.
47. Gannett P.M., Powell J.H., Rao R., Shi X., Lawson T., Kolar C., Toth B. // Chem. Res. Toxicol. 1999. V. 12. P. 297–304.
48. Powell J.H., Gannett P.M. // J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 2002. V. 21. P. 1–32.
49. Cavalieri L.B., Bendich A. // J. Am. Chem. Soc. 1950. V. 72. P. 2587–2594.
50. Moudrianakis E.N., Beer M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1965. V. 53. P. 564–571.
51. Moudrianakis E.N., Beer M. // Biochim. Biophys. Acta. 1965. V. 95. P. 23–39.
52. Kikugawa K., Kato T., Kojima K. // Mutat. Res. 1992. V. 268. P. 65–75.
53. Nakano T., Terato H., Asagoshi K., Masaoka A., Mukuta M., Ohyama Y., Suzuki T., Makino K., Ide H. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 25264–25272.
54. Tamir S., Burney S., Tannenbaum S.R. // Chem. Res. Toxicol. 1996. V. 9. P. 821–827.
55. Orlov V.M., Smirnov A.N., Varshavsky Y.M. // Tetrahedron Lett. 1976. V. 48. P. 4377–4438.
56. Steenken S., Jovanovic S.V. // JACS. 1997. V. 119. P. 617–618.
57. Ding X., Hiraku Y., Ma N., Kato T., Saito K., Nagahama M., Semba R., Kuribayashi K., Kawanishi S. // Cancer Sci. 2005. V. 96. P. 157–163.
58. Akaike T., Okamoto S., Sawa T., Yoshitake J., Tamura F., Ichimori K., Miyazaki K., Sasamoto K., Maeda H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 685–690.
59. Ma N., Adachi Y., Hiraku Y., Horiki N., Horiike S., Imoto I., Pinlaor S., Murata M., Semba R., Kawanishi S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 319. P. 506–510.
60. van Amsterdam K., van Vliet A.H., Kusters J.G., van der Ende A. // FEMS Microbiol. Rev. 2006. V. 30. P. 131–156.
61. Crew K.D., Neugut A.I. // World J. Gastroenterol. 2006. V. 12. P. 354–362.
62. Sodom R.S., Fiala E.S. // Chem. Res. Toxicol. 2001. V. 14. P. 438–450.
63. Yermilov V., Rubio J., Ohshima H. // FEBS Lett. 1995. V. 376. P. 207–210.
64. Suzuki N., Yasui M., Geacintov N.E., Shafirovich V., Shibutani S. // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 9238–9245.
65. Masuda M., Nishino H., Ohshima H. // Chem. Biol. Interact. 2002. V. 139. P. 187–197.
66. Sawa T., Tatemichi M., Akaike T., Barbin A., Ohshima H. // Free Radic. Biol. Med. 2006. V. 40. P. 711–720.
67. Lin H.S., Jenner A.M., Ong C.N., Huang S.H., Whiteman M., Halliwell B. // Biochem. J. 2004. V. 380. P. 541–548.
68. Suzuki T., Yamada M., Kanaori K., Tajima K., Morii T., Makino K. // Nucleic Acids Symp. Ser. 1999. V. 42. P. 155–156.
69. Hsieh Y.S., Wang H.C., Tseng T.H., Chang W.C., Wang C.J. // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2001. V. 172. P. 210–216.
70. Shafirovich V., Cadet J., Gasparutto D., Dourandin A., Geacintov N.E. // Chem. Res. Toxicol. 2001. V. 14. P. 233–241.
71. Joffe A., Mock S., Yun B.H., Kolbanovskiy A., Geacintov N.E., Shafirovich V. // Chem. Res. Toxicol. 2003. V. 16. P. 966–973.
72. Joffe A., Geacintov N.E., Shafirovich V. // Chem. Res. Toxicol. 2003. V. 16. P. 1528–1538.
73. Taubes G. // Science. 1997. V. 275. P. 1420–1421.
74. Sugiyama H., Saito I. // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 7063–7068.
75. Henderson P.T., Jones D., Hampikian G., Kan Y., Schuster G.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 8353–8358.

76. *Santhosh U., Schuster G.B.* // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 5692–5699.
77. *Schlientz N.W., Schuster G.B.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. P. 15732–15733.
78. *Das P., Schuster G.B.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 14227–14231.
79. *Ly A., Tran N.Q., Ward J.F., Milligan J.R.* // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 9098–9104.
80. *Shao F., O'Neill M.A., Barton J.K.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 17914–17919.
81. *Wagenknecht H.A., Rajski S.R., Pascaly M., Stemp E.D., Barton J.K.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. P. 4400–4407.
82. *Yamada M., Suzuki T., Kanaori K., Tajima K., Sakamoto S., Kodaki T., Makino K.* // *Org. Lett.* 2003. V. 5. P. 3173–3176.
83. *Niles J.C., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. P. 12147–12151.
84. *Gu F., Stillwell W.G., Wishnok J.S., Shallop A.J., Jones R.A., Tannenbaum S.R.* // *Biochemistry.* 2002. V. 41. P. 7508–7518.
85. *Shafirovich V., Mock S., Kolbanovskiy A., Geacintov N.E.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2002. V. 15. P. 591–597.
86. *Kaiya T., Tanaka H., Kohda K.* // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2002. V. 21. P. 427–433.
87. *Colacino E., Sindona G., Gosselin G., Mathe C.* // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2003. V. 22. P. 2013–2026.
88. *de Rojas-Walker T., Tamir S., Ji H., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R.* // *Chem. Res. Toxicol.* 1995. V. 8. P. 473–477.
89. *Pinlaor S., Ma N., Hiraku Y., Yongvanit P., Semba R., Oikawa S., Murata M., Sripa B., Sithithaworn P., Kawanishi S.* // *Carcinogenesis.* 2004. V. 25. P. 1535–1542.
90. *Pinlaor S., Yongvanit P., Hiraku Y., Ma N., Semba R., Oikawa S., Murata M., Sripa B., Sithithaworn P., Kawanishi S.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 309. P. 567–571.
91. *Byun J., Henderson J.P., Mueller D.M., Heinicke J.W.* // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 2590–2600.
92. *Tuo J., Liu L., Poulsen H.E., Weimann A., Svendsen O., Loft S.* // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. V. 29. P. 147–155.
93. *Gal A., Tamir S., Tannenbaum S.R., Wogan G.N.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 11499–11503.
94. *King P.A., Anderson V.E., Edwards J.O., Gustafson G., Plumb R.C., Suggs J.W.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1992. V. 114. P. 5430–5432.
95. *Salgo M.G., Stone K., Squadrito G.L., Battista J.R., Pryor W.A.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 210. P. 1025–1030.
96. *Szabo C., Ohshima H.* // *Nitric Oxide: Biol. Chem.* 1997. V. 1. P. 373–385.
97. *Rubio J., Yermilov V., Ohshima H.* *The Biology of Nitric Oxide* // Eds. Moncada S., Stamler J., Gross S., Higgs E.A. London: Portland Press Proceedings, 1996.
98. *Yermilov V., Yoshie Y., Rubio J., Ohshima H.* // *FEBS Lett.* 1996. V. 399. P. 67–70.
99. *Zhou X., Liberman R.G., Skipper P.L., Margolin Y., Tannenbaum S.R., Dedon P.C.* // *Anal. Biochem.* 2005. V. 343. P. 84–92.
100. *Kim M.Y., Dong M., Dedon P.C., Wogan G.N.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2005. V. 18. P. 76–86.
101. *Tretyakova N.Y., Burney S., Pamir B., Wishnok J.S., Dedon P.C., Wogan G.N., Tannenbaum S.R.* // *Mutat. Res.* 2000. V. 447. P. 287–303.
102. *Box H.C., Dawidzik J.B., Budzinski E.E.* // *Free Radic. Biol. Med.* 2001. V. 31. P. 856–868.
103. *Prat F., Houk K.N.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. V. 120. P. 845–846.
104. *Tretyakova N.Y., Niles J.C., Burney S., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R.* // *Chem. Res. Toxicol.* 1999. V. 12. P. 459–466.
105. *Cullis P.M., Malone M.E., Merson-Davies L.A.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. V. 118. P. 2775–2781.
106. *Douki T., Cadet J., Ames B.N.* // *Chem. Res. Toxicol.* 1996. V. 9. P. 3–7.
107. *Douki T., Cadet J.* // *Free Rad. Res.* 1996. V. 24. P. 369–380.
108. *Lee J.M., Niles J.C., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2002. V. 15. P. 7–14.
109. *Niles J.C., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R.* // *Nitric Oxide.* 2006. V. 14. P. 109–121.
110. *Jia L., Shafirovich V., Shapiro R., Geacintov N.E., Broyde S.* // *Biochemistry.* 2005. V. 44. P. 6043–6051.
111. *Crean C., Geacintov N.E., Shafirovich V.* // *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 2005. V. 44. P. 5057–5060.
112. *Chazotte-Aubert L., Oikawa S., Gilbert I., Bianchini F., Kawanishi S., Ohshima H.* // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 20909–20915.
113. *Belvedere A., Bosca F., Catalfo A., Cuquerella M.C., de Guidi G., Miranda M.A.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2002. V. 15. P. 1142–1149.
114. *Moriya M., Ou C., Bodepudi V., Johnson F., Takeshita M., Grollman A.P.* // *Mutat. Res.* 1991. V. 254. P. 281–288.
115. *Tan X., Grollman A.P., Shibutani S.* // *Carcinogenesis.* 1999. V. 20. P. 2287–2292.
116. *Weimann A., Belling D., Poulsen H.E.* // *Free Radic. Biol. Med.* 2001. V. 30. P. 757–764.
117. *Podmore I.D., Cooper D., Evans M.D., Wood M., Lunec J.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 277. P. 764–770.
118. *Yu H., Venkatarangan L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2005. V. 12. P. 1849–1857.
119. *Helbock H.J., Beckman K.B., Shigenaga M.K., Walter P.B., Woodall A.A., Yeo H.C., Ames B.N.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 288–293.
120. *Aust A.E., Eveleigh J.F.* // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1999. V. 222. P. 246–252.
121. *Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.P., Ravanat J.L., Sauvaigo S.* // *Mutat. Res.* 1999. V. 424. P. 9–21.
122. *Marnett L.J., Riggins J.N., West J.D.* // *J. Clin. Invest.* 2003. V. 111. P. 583–593.
123. *Yermilov V., Rubio J., Becchi M., Friesen M.D., Pignatelli B., Ohshima H.* // *Carcinogenesis.* 1995. V. 16. P. 2045–2050.
124. *Ермилов В., Йошио Ю., Рубио Д., Ошима Х.* // *Вопросы онкологии.* 1998. Т. 44. С. 103–107.
125. *Burney S., Niles J.C., Dedon P.C., Tannenbaum S.R.* // *Chem. Res. Toxicol.* 1999. V. 12. P. 513–520.
126. *Sawa T., Ohshima H.* // *Nitric Oxide.* 2006. V. 14. P. 91–100.

127. Lin J.K., Chen K.J., Liu G.Y., Chu Y.R., Lin-Shiau S.Y. // *Chem. Biol. Interact.* 2000. V. 127. P. 219–236.
128. Chen H.J., Chang C.M., Chen Y.M. // *Free Radic. Biol. Med.* 2003. V. 34. P. 254–268.
129. Sawa T., Akaike T., Ichimori K., Akuta T., Kaneko K., Nakayama H., Stuehr D.J., Maeda H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 311. P. 300–306.
130. Soliva R., Guimil Garcia R., Blas J.R., Eritja R., Asensio J.L., Gonzalez C., Luque F.J., Orozco M. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 4531–4539.
131. Nedospasov A., Rafikov R., Beda N., Nudler E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 13543–13548.
132. Cacace F., de Petris G., Pepi F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 3507–3512.
133. Grishko V., Druzhyina N., LeDoux S.P., Wilson G.L. // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 4510–4516.
134. Chen H.J., Chen Y.M., Wang T.F., Wang K.S., Shiea J. // *Chem. Res. Toxicol.* 2001. V. 14. P. 536–546.
135. Spek E.J., Vuong L.N., Matsuguchi T., Marinus M.G., Engelward B.P. // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 3501–3507.
136. Kow Y.W. // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 33. P. 886–893.
137. Nilsen H., Haushalter K.A., Robins P., Barnes D.E., Verdine G.L., Lindahl T. // *EMBO J.* 2001. V. 20. P. 4278–4286.
138. Wuenschell G.E., O'Connor T.R., Termini J. // *Biochemistry.* 2003. V. 42. P. 3608–3616.
139. Moe A., Ringvoll J., Nordstrand L.M., Eide L., Bjoras M., Seeberg E., Rognes T., Klungland A. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 3893–3900.
140. Tchou J., Bodepudi V., Shibutani I., Antoshechkin I., Miller J., Grollman A.P., Johnson F. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 15318–15324.
141. Morland I., Rolseth V., Luna L., Rognes T., Bjoras M., Seeberg E. // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. P. 4926–4936.
142. Dong M., Vongchampa V., Gingipalli L., Cloutier J.F., Kow Y.W., O'Connor T., Dedon P.C. // *Mutat. Res.* 2006. V. 594. P. 120–134.
143. Nakano T., Katafuchi A., Shimizu R., Terato H., Suzuki T., Tauchi H., Makino K., Skorvaga M., van Houten B., Ide H. // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. P. 2181–2191.
144. Spek E.J., Wright T.L., Stitt M.S., Taghizaden N.R., Tannenbaum S.R., Marinus M.G., Engelward B.P. // *J. Bacteriol.* 2001. V. 183. P. 131–138.
145. Kowalczykowski S.C. // *Trends Biochem. Sci.* 2000. V. 25. P. 156–165.
146. Kamiya H. // *Nucleic Acids Res.* 2003. V. 31. P. 517–531.
147. Margolin Y., Cloutier J.-F., Shafirovich V., Geacintov N.E., Dedon P.C. // *Nature. Chem. Biol.* 2006. V. 2. P. 365–366.
148. Cadet J., Douki T., Ravanat J.-L. // *Nature Chem. Biol.* 2006. V. 2. P. 348–349.

NO-Dependent Modifications of Nucleic Acids

N. V. Beda[#] and A. A. Nedospasov

[#] Fax: +7 (499) 196-0221; e-mail: beda@img.ras.ru or nedospasov@img.ras.ru.

Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

This review is devoted to chemical transformations of nucleic acids and their components under the action of nitrogen oxide metabolites. The deamination reaction of bases is discussed in the context of possible competing transformations of its intermediates (nitrosamines, diazonium cations, diazotates, triazenes, and diazoanhydrides) and mechanisms of crosslink formation with proteins and nucleic acids. The oxidation and nitration of bases by NO₂ is considered together with the possibility of radical transfer to domains from the base stacks in DNA. Reduction of redox potentials of bases as a result of stacking interactions explains the possibility of their reactions within nucleic acids with the oxidants whose redox potential is insufficient for the effective reactions with mononucleotides. Modifications of nucleic acids with peroxynitrite derivatives are discussed in the context of the effect of the DNA primary structure and the modification products formed on the reactivity of single bases. The possibility of reduction of nitro groups within modified bases to amino derivatives and their subsequent diazotation is considered. The substitution of oxoguanine for nitroguanine residues may result; the reductive diazotation can lead to undamaged guanine. The intermediate modified bases, e.g., 8-aminoguanine and 8-diazoguanine, were shown to participate in noncanonical base pairing, including the formation of more stable bonds with two bases, which is characteristic of the DNA Z-form. A higher sensitivity of RNA in comparison with DNA to NO-dependent modifications (NODMs) is predicted on the basis of the contribution of medium microheterogeneity and the known mechanisms of nitrosylation and nitration. The possible biological consequences of nucleic acids NODMs are briefly considered. It is shown that the NODMs under the action of nitrogen oxide metabolites generated by macrophages and similar cells in inflammations or infections should lead to a sharp increase in the number of mutations in the case of RNA-containing viruses. As a result, the defense mechanisms of the host organism may contribute to the appearance of new, including more dangerous, variants of infecting viruses. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2007, vol. 33, no. 2; see also <http://www.maik.ru>

Key words: deamination, diazosignaling, nitration, nitroguanine, oxoguanine, peroxynitrite