

УДК 577.113.7

КОМПЛЕКСЫ ОЛИГО(ПОЛИ)НУКЛЕОТИДОВ
СО СТРУКТУРНЫМИ АНОМАЛИЯМИ*Долинная Н. Г., Грязнова О. И.*

Обобщены результаты исследования структуры и свойств ДНК-РНК гибридов и комплексов олиго(поли)нуклеотидов, содержащих неканонические пары оснований или неспаренные основания как внутри, так и на «концах» двойной спирали. Кратко охарактеризованы методы, используемые при изучении таких систем: рентгеноструктурный анализ, ЯМР- и УФ-спектроскопия, КД, сканирующая микрокалориметрия и др. Проведен сравнительный анализ влияния неканонических пар на структуру, а также энергетические и кинетические параметры образования и диссоциации олигонуклеотидных комплексов. Рассматривается вопрос об устойчивости неканонических пар в зависимости от их природы и положения в двойной спирали. Обсуждаются схемы образования водородных связей между основаниями некомплементарных пар.

Библиография — 171 ссылка.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1318
II. Методы, используемые для изучения двуспиральных нуклеиновых кислот со структурными аномалиями	1319
III. Гибридные комплексы ДНК-РНК	1320
IV. Комплексы нуклеиновых кислот с неканоническими парами оснований	1326
V. Сравнительный анализ влияния неканонических пар на структуру и энергетические параметры образования олигомерных комплексов	1338
VI. Комплексы нуклеиновых кислот, содержащие неспаренные нуклеотидные остатки	1340

I. ВВЕДЕНИЕ

Интерес к двуспиральным комплексам нуклеиновых кислот с различными структурными аномалиями возник в связи с изучением механизма передачи генетической информации. Так, было установлено, что гибридные ДНК-РНК-дууплексы образуются в качестве интермедиатов в ключевых биологических процессах — репликации, транскрипции, обратной транскрипции [1, 2]. Известно, что правильность «считывания» генетической информации обеспечивается комплементационными взаимодействиями оснований нуклеиновых кислот (НК) и контролируется соответствующими ферментными системами. Однако включение «ошибочных» нуклеотидов, образующих некомплементарные пары, все же происходит, хотя и крайне редко, приводя к мутациям замещения [3, 4]. В то же время, неканонические пары довольно часто образуются при кодон-антикодоновых взаимодействиях (в третьем положении кодонового триплета) [5], а также при формировании вторичной или третичной структур различных РНК [6—8]. Мощным стимулом к изучению пространственного расположения и энергетических параметров неканонических пар, вкрапленных в правильную двуспиральную структуру, явилось развитие сайт-специфического мутагенеза. Использование техники сайт-мутагенеза дает возможность делать точечные замены нуклеотидов, делеции и вставки в заданных положениях ДНК. Интерес к изучению такого типа структур совпал с развитием синтетической нуклеотидной химии и совершенствованием современных методов структурных исследований. Это позволило в последние годы получить и детально исследовать наборы ДНК-дууплексов с неканоническими парами и «лишними» нуклеотидными звеньями в заданном положении. Такие соединения являются удобными моделями для изучения различных кле-

точных процессов — репликации, транскрипции, трансляции, процессов мутагенеза. Кроме того, они представляют интерес в качестве инструментов исследования ферментов нуклеинового обмена, структуры и конформационных возможностей НК. Сведения о термодинамике и кинетике образования и диссоциации ДНК-дуплексов с неканоническими парами широко используются для диагностики генетических заболеваний [9].

Данные по геометрии спаривания некоторых типов некомплементарных пар и их влияние на параметры двойной спирали анализируются в обзорных статьях, опубликованных в 1987 г. [10, 11]. В настоящем обзоре рассматривается строение ДНК-РНК гибридных структур и комплексов НК, содержащих все изученные комбинации некомплементарных пар и «лишние» нуклеотидные звенья; оценивается влияние структурных аномалий на термодинамические и кинетические параметры комплексообразования, на вторичную структуру двойных спиралей. Аномалии структуры, вызванные минорными или модифицированными основаниями, в обзор не включены.

II. МЕТОДЫ, ИСПОЛЪЗУЕМЫЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ДВУСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ СО СТРУКТУРНЫМИ АНОМАЛИЯМИ

Рентгеноструктурный анализ монокристаллов (РСА) и дифракция рентгеновских лучей в ориентированных волокнах (ДРВ). С помощью РСА можно получить наиболее полную информацию о структуре олигонуклеотидных дуплексов, причем независимую от концептуальных моделей; РСА высокого разрешения ($\sim 1,5\text{--}2\text{ \AA}$) позволяет определить координаты всех неводородных атомов, экспериментально наблюдать влияние модификаций на локальную и общую структуру двойной спирали, исследовать ее гидратную оболочку [10, 12—14]. Для характеристики двойных и тройных спиралей, образованных полинуклеотидами, используется ДРВ [15] и является гораздо менее информативным, чем РСА.

ЯМР-Спектроскопия высокого разрешения в последнее время широко используется для изучения олигомерных дуплексов [16]. На основании спектров ПМР можно судить о локальном окружении каждого протона. Это позволяет наблюдать за изменением конформации отдельных нуклеотидных пар при варьировании температуры, pH и т. д. Анализируют две группы резонансных сигналов протонов.

а) Сигналы от необменивающихся протонов — Н(5) и Н(6) пиридиновых оснований, Н(2) и Н(8) пуриновых оснований, протонов СН_2 -группы тимина и углеводных колец. При термической диссоциации дуплексов происходит смещение сигналов в область слабых полей. Из кривых зависимости химических сдвигов (δ) сигналов этих протонов от температуры можно рассчитать термодинамические параметры перехода спираль — клубок, при этом можно следить за диссоциацией каждой нуклеотидной пары дуплекса.

б) Сигналы от медленно обменивающихся протонов иминогрупп Н(1)—Н гуанина и Н(3)—Н тимина (урацила), участвующих в образовании водородных связей, регистрируются в водных растворах. Наличие сигналов в области слабых полей однозначно указывает на образование Н-связанных нуклеотидных пар. С ростом температуры происходит сдвиг в сильное поле, уширение и исчезновение сигналов, связанное с увеличением относительного содержания открытых форм и быстрым обменом протонов иминогрупп в открытой форме с водой. Температура исчезновения сигналов не связана с термодинамической стабильностью дуплексов, а дает лишь сравнительную характеристику устойчивости отдельных нуклеотидных пар. Изучение кинетики обмена иминопротонов с водой позволяет оценить время жизни (τ) отдельных пар оснований в спиральном комплексе. На основании зависимости τ от температуры рассчитывают энергию активации, константы скорости диссоциации и образования отдельных нуклеотидных пар [17].

Измерение вицинальных констант спин-спинового взаимодействия протонов у С(1') и С(2') дает возможность оценить конформацию углеводных колец. Информацию о расстоянии между ядрами атомов можно получить с помощью ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) [18]; ЯЭО наблюдается для пары ядер, которые удалены друг от друга не более, чем на 4 Å.

Спектры ЯМР ^{31}P содержат данные о конформации сахарофосфатного остова олигонуклеотидов, образующих двойную спираль.

Сканирующая микрокалориметрия (СМК) используется для определения термодинамических параметров конформационных переходов [19]. Энтальпию перехода спираль — клубок (ΔH^0) можно получить непосредственно из кривой температурной зависимости теплоемкости системы, вычисляя площадь, ограниченную этой кривой. Параллельно по этим же экспериментальным данным можно рассчитать изменение энтальпии по Вант—Гоффу ($\Delta H_{\text{в-г}}^0$) [20]. Предполагается, что значение $\Delta H_{\text{в-г}}^0$ соответствует энтальпии перехода спираль — клубок при справедливости модели двух состояний. Отличие значений экспериментально полученной ΔH^0 и $\Delta H_{\text{в-г}}^0$ свидетельствует о том, что при плавлении система проходит через ряд частично связанных структур, а также дает возможность оценить длину кооперативно плавящегося участка дуплекса.

УФ-Спектроскопия. Кривые температурной зависимости УФ-поглощения системы позволяют определить температуру плавления ($T_{\text{пл}}$) двойной спирали и вычислить термодинамические параметры комплексообразования. Для получения кинетических характеристик перехода спираль — клубок широко используется метод температурного скачка [21], в основе которого лежит анализ изменения УФ-поглощения после скачкообразного повышения температуры.

Круговой дихроизм (КД) и дисперсия оптического вращения (ДОВ). Интерпретация данных КД (ДОВ), основанная главным образом на эмпирической привязке спектров к известным конформациям полимеров, позволяет делать выводы о близости геометрических параметров двуспиральных структур и о принадлежности их к определенному семейству форм НК (\bar{A} , \bar{B} , \bar{Z}).

Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) помогает оценить вторичную структуру двуспиральных олиго(поли)нуклеотидов как в растворе, так и в кристаллическом состоянии [22].

Теоретическая оценка конформации олигонуклеотидных дуплексов проводится на основе расчета энергии невалентных взаимодействий методом атом-атомных потенциальных функций (ААПФ) [23]. Минимизация энергии невалентных взаимодействий по различным переменным (параметрам, определяющим геометрию спаривания оснований и положение пар относительно оси спирали; параметрам спирали, торсионным углам и т. д.) позволяет установить наиболее вероятную конформацию неканонических пар и дуплексов, содержащих такие пары. Следует отметить, что точность такого рода расчетов зависит от числа рассматриваемых независимых переменных.

III. ГИБРИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ДНК-РНК

1. Вторичная структура ДНК-РНК гибридов

Известно, что природные ДНК и синтетические полидезоксирибонуклеотиды существуют в водном растворе и в волокнах высокой относительной влажности в формах \bar{B} -семейства; для двуспиральной РНК характерны формы \bar{A} -семейства. Хотя оба конформационных семейства относятся к правым спиральям, они резко отличаются спиральными параметрами. Существенным фактором, определяющим тип вторичной структуры, является конформация сахара: в \bar{A} -семействе — С(3')-эндо(N), в \bar{B} -семействе — С(2')-эндо(S). Единственной формой существования двуспиральной РНК является А-форма. Что касается ДНК, то ее конформационные возможности гораздо шире: в зависимо-

Структура ДНК-РНК гибридных комплексов

Комплексы	Форма спирали	Метод анализа	Ссылки
Полимерные ДНК-РНК-комплексы нерегулярной нуклеотидной последовательности	A-ДНК, A-РНК	ДРВ, ДОВ	[25—27]
poly[d(A C) · poly[r(G U)]	Ближе к A-РНК	КД	[28]
poly[r(A C) · poly[d(G T)]	Ближе к A-РНК	КД	[28]
r(C A ₅ G) · d(C T ₅ G)	A-РНК	КД, ПМР	[29, 30]
d(C A ₅ G) · 2r(C U ₅ G)	A-РНК	КД, ПМР	[29, 30]
poly(dG) · poly(rC)	A-ДНК *, A-РНК **	ДРВ	[15]
poly(rG) · poly(dC)	A-ДНК	ДРВ	[15]
poly(dA) · poly(rU)	A'-РНК*, биморфная структура**	ДРВ	[15]
	A-РНК	КД	[31]
poly(dI) *** · poly(rC)	Биморфная структура	ДРВ	[15]
poly(rI) · poly(dC)	A-ДНК *, A'-РНК **	ДРВ	[15]
poly(rA) · poly(dT) (волокна)	A'-РНК*, биморфная структура**	ДРВ, ЯМР ³¹ P	[32, 33]
poly(rA) · poly(dT) (в растворе)	B-ДНК,	ПМР	[34]
	биморфная структура	КД	[31]
poly(dA) · 2poly(rU)	A-РНК	ДРВ	[35]
poly(rA) · 2poly(dT)	биморфная структура	КД	[31]
d(T C A C A T) · r(A U G U G A)	B-ДНК	ПМР	[36]
poly(rG-dC) · poly(rG-dC)	A-РНК, Z-, B-форма	КД, ЯМР ³¹ P	[37—39]
r(GCG)d(CGC) · r(GCG)d(CGC)	A-ДНК	КР	[22]

* Относительная влажность ниже 80%.

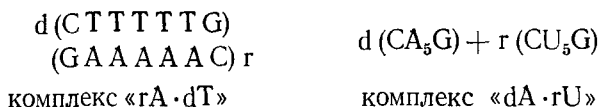
** Относительная влажность выше 80%.

*** I — инозин.

сти от условий среды и нуклеотидной последовательности ДНК-дуплексы могут существовать в формах \bar{B} -, \bar{A} -семейств, чередующейся B-форме, левой Z-форме. Показано также, что локальные параметры нуклеотидных пар варьируют в широких пределах [24].

Анализируя имеющиеся в литературе данные, можно констатировать, что для ДНК-РНК гибридов более характерна принадлежность к \bar{A} -семейству конформаций. Однако в зависимости от нуклеотидного состава и последовательности, а также условий комплексообразования гибридные комплексы могут образовывать структуры иного типа — B-, Z-, а также биморфные, содержащие элементы двух форм (табл. 1).

Рассмотрим подробнее некоторые из приведенных в табл. 1 данных. Анализ конформаций гибридных гептамерных комплексов¹:



проводили параллельно с исследованием их рибо- и дезоксирибоаналогов [29, 30]:



На основании значений констант спин-спинового взаимодействия протонов углеводных остатков установлено, что фуранозные кольца в комплексах «rA · rU» и «rA · dT» находятся в N-конформации (A-форма), а остатки дезоксирибозы в «dA · dT» — в S-конформации (B-форма). При комплексообразовании d(C A₅ G) с r(C U₅ G) преимущественно образуется тройная спираль d(C A₅ G) · 2r(C U₅ G), которая, по данным КД, относится к A-семейству.

Полимерные комплексы poly(dA) · poly(rU) и poly(dI) · poly(rC) (в виде волокон) в условиях высокой относительной влажности имеют необычные дифракционные картины, представляющие суперпозицию

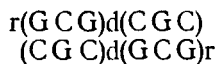
¹ Здесь и далее структура дуплексов записывается в направлении (5'—3') — верхняя цепь, (3'—5') — нижняя цепь.

рефлексов, соответствующих А- и В-формам спирали [15]. Высказывается предположение, что углеводные остатки полимерных тяжей этих комплексов имеют различную конформацию — N-типа для рибозы и S-типа для дезоксирибозы. Подобная биморфная структура ДНК-РНК гибридного комплекса может играть важную роль при функционировании ДНК- и РНК-полимераз.

Интересные данные получены при исследовании poly(rA)·poly(dT). Этот рибо-дезоксирибонуклеотидный гибрид является аналогом ДНК-дуплекса poly(dA)·poly(dT). Последний сохраняет В-форму спирали даже в условиях, при которых природная нерегулярная ДНК существует в А-форме. По-видимому, «В-любивость» сохраняется и в гибридном комплексе, несмотря на наличие в нем конформационно жесткой полирибонуклеотидной цепи. Волокна poly(rA)·poly(dT) только при относительной влажности ниже 90% образуют спираль, относящуюся к А-семейству [32]. При увеличении влажности происходит конформационный переход в структуру, по геометрическим параметрам близкую к В-форме ДНК, однако по конформации углеводных остатков являющуюся биморфной [32, 33]. В водном буферном растворе, как показано методом ПМР с использованием ЯЭО, poly(rA)·poly(dT) находится в В-форме, причем углеводные остатки в обеих цепях имеют одинаковую конформацию S-типа [34]. Однако из-за стерических препятствий, создаваемых 2'-гидроксильной группой рибозы, геометрия гибридной спирали немного отличается от классической В-формы ДНК, в частности, увеличены наклон и твист оснований, а также расстояние между основаниями и осью спирали. В-форма спирали в растворе, как оказалось, характерна и для дуплекса гетерогенного состава d(TCACA T)·r(AUGUGA) [36].

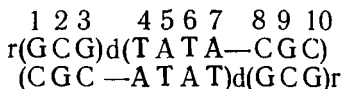
Особый интерес представляет исследование структуры двуспиральных комплексов, в состав которых входят ковалентно связанные ДНК- и РНК-фрагменты. Гибрид смешанного состава с чередующейся рибо-дезоксирибонуклеотидной последовательностью poly(rG-dC)·poly(rG-dC) является аналогом ДНК-дуплекса poly(dG-dC)·poly(dG-dC); для последнего при высокой ионной силе наблюдается переход в левую Z-форму [40]. Структура poly(rG-dC)·poly(rG-dC) при умеренной концентрации NaCl по геометрическим параметрам и конформации углеводных остатков аналогична А-РНК [37]. Переход гибридной спирали в Z-форму в отличие от ее ДНК-аналога происходит как при увеличении, так и при уменьшении ионной силы со средними точками А—Z-перехода в низкосолевой области — 25 мМ NaCl, в высокосолевой области — 1500 мМ NaCl [37, 38]. В присутствии ионов тетрабутиламмония (>30 мМ) наблюдается дополнительный конформационный переход гибридного комплекса в В-форму [39].

Гексануклеотидный дуплекс смешанного состава:



по данным КР в кристаллическом состоянии образует спираль в А-форме [22], причем все углеводные остатки (как рибоза, так и дезоксирибоза) имеют одинаковую N-конформацию. В водном растворе геометрия дуплекса, в основном, сохраняется, однако дезоксирибозные кольца концевых цитидиновых остатков принимают конформацию S-типа, что связано, по мнению авторов, с меньшей устойчивостью концевых пар и вследствие этого их большей конформационной подвижностью.

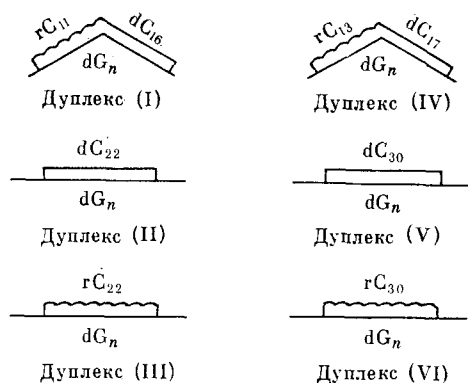
В работах [41, 42] изучена вторичная структура декамерного дуплекса:



в котором двуспиральный тетрануклеотидный ДНК-фрагмент (d·d) фланкирован с двух сторон гибридными участками. По данным РСА,

в условиях низкого содержания воды этот дуплекс образует спираль, по геометрическим параметрам близкую к А-форме ДНК, с одинаковой *N*-конформацией углеводных колец [41]. По мнению авторов, присутствие на концах дуплекса гибридных участков стимулирует переход в А-форму центрального d·d-фрагмента. В водном растворе ситуация несколько иная [42]. Согласно данным ПМР-спектроскопии, позволившим оценить соотношение конформеров для каждого нуклеотидного звена, все рибозные кольца указанного дуплекса имеют *N*-конформацию. Для остатков дезоксирибозы, расположенных как в гибридном, так и в d·d-участке дуплекса, характерно сосуществование *S*- и *N*-конформеров, причем константа равновесия зависит от локального окружения отдельного нуклеотидного звена (рис. 1). Углеводные остатки dC (положение 8), dG (положение 9) и dC (положение 10), принадлежащие гибриднему фрагменту, содержат соответственно 52, 37 и 33% конформеров *N*-типа. Такой порядок изменения процентного содержания *N*-конформеров обусловлен большей конформационной свободой концевых дезоксинуклеотидов. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в ковалентно-связанных ДНК-РНК гибридных молекулах наблюдается эффект конформационной трансмиссии (влияние РНК-фрагмента на конформацию углеводных колец соединенной с ним ДНК-последовательности), который в рассматриваемом дуплексе распространяется, главным образом, на два нуклеотидных остатка dT (положение 4) и dA (положение 5), и в меньшей степени на dT (положение 6) и dA (положение 7). Следовательно, происходит плавный переход от *N*- к преимущественно *S*-конформации. С помощью ПМР-спектроскопии доказано наличие стэкинг-взаимодействия между основаниями вдоль всей молекулы с преобладанием «стэкинга», характерного для А-формы, в r(GCG)- и «смешанного» типа в d(TATACGC)-участке.

В работах [43, 44] была исследована структура гибридных полимер-олигомерных дуплексов $dG_n \cdot rC_{11}dC_{16}$ и $dG_n \cdot rC_{13}dC_{17}$ ($n > 70$). Ниже приведены условные схемы исследованных систем.



Из анализа спектров ПМР дуплексов (I) — (III) следует, что два фрагмента дуплекса (I) образуют спирали различной конформации — гибридный участок молекулы находится в А-форме, характерной для дуплекса (III), а (d·d)-участок — в В-форме, подобно дуплексу (II)

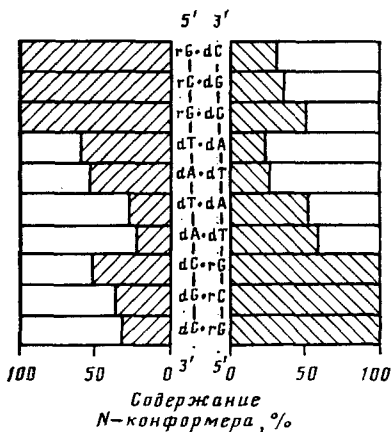


Рис. 1. Конформация углеводных колец дуплекса, образованного $r(GCG)d(TATACGC)$ в водном растворе (по данным ПМР-спектроскопии) [42]

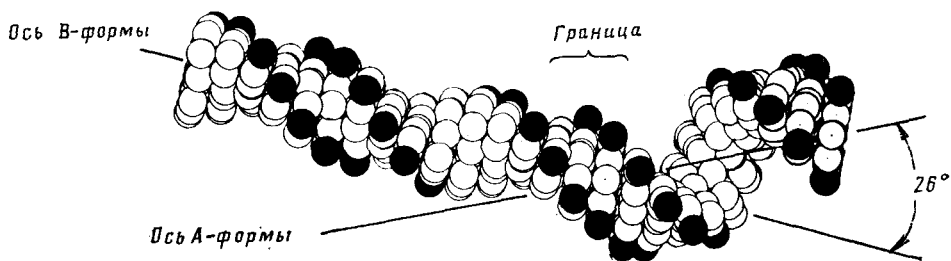


Рис. 2. Молекулярная модель комплекса $dG_n \cdot rC_{11}dC_{16}$ [44]

[43]. На основании спектров КД дуплексов (IV) — (VI) делается аналогичный вывод о сосуществовании в гибридном дуплексе (IV) А- и В-форм [44]. Анализ кривых плавления (УФ-спектроскопия) свидетельствует о том, что, несмотря на присутствие двух форм, переход спирали — клубок дуплекса (IV) является кооперативным и однофазным. По мнению авторов [44], соседство двух конформаций в ковалентно-связанных гибридных дуплексах (I) и (IV) приводит к пространственным искажениям — изгибу оси спирали на границе двух форм, причем переходный участок между А- и В-формами включает только одну нуклеотидную пару, принадлежащую ДНК-фрагменту, и соседние с ней фосфодиэфирные связи. Анализ пространственной структуры гибридного дуплекса (рис. 2), полученной методом компьютерного моделирования [44, 45] показал, что в зоне изгиба спирали комплементарционные и межплоскостные взаимодействия оснований сохраняются.

Выводы о структуре ковалентно-связанных ДНК-РНК гибридных дуплексов, сделанные в этой серии работ, отличаются от выводов работы [42] для декамерного дуплекса, что может объясняться различиями в длине $r \cdot d$ и $d \cdot d$ участков, природой нуклеотидных пар (А·Т или G·C), находящихся на «стыке» этих участков, определенными допущениями в интерпретации данных.

2. Термодинамические и кинетические аспекты образования ДНК-РНК гибридных комплексов

Сравнительный анализ термодинамики и кинетики образования гибридных двойных спиралей и их ДНК- и РНК-аналогов был проведен на модельных гептамерных комплексах « $rA \cdot dT$ », « $dA \cdot rU$ », « $dA \cdot dT$ », « $rA \cdot rU$ » (см. выше) [17, 30, 46]. На основании кривых плавления, полученных с помощью УФ- и ПМР-спектроскопии, установлен следующий порядок стабильности дуплексов: « $dA \cdot dT$ » > « $rA \cdot dT$ » > « $rA \cdot rU$ » >> « $dA \cdot rU$ », который хорошо согласуется с рядом устойчивости полимерных комплексов, образованных $poly(rA)$, $poly(dA)$, $poly(rU)$ и $poly(dT)$ в аналогичных комбинациях [47]. Сравнение равновесных констант (K_{25°) образования гептамерных двойных спиралей (табл. 2) показывает, что дуплекс « $dA \cdot dT$ » в 10 и 4 раза стабильнее « $rA \cdot rU$ » и « $rA \cdot dT$ » соответственно, а гибридный дуплекс « $dA \cdot rU$ » почти в 200 раз менее устойчив, чем « $rA \cdot dT$ ». Предполагается [30], что dA кластеры предпочитают S-конформацию и поэтому не могут образовывать устойчивых ДНК-РНК-гибридов. По мнению авторов наличие таких кластеров облегчает терминацию транскрипции.

Кинетические параметры [17, 46] подтверждают термодинамические данные о порядке стабильности дуплексов « $dA \cdot dT$ », « $rA \cdot rU$ », « $rA \cdot dT$ ». Константа скорости образования (K_p) дуплекса « $dA \cdot dT$ » немного больше, чем приблизительно равные соответствующие константы для дуплексов « $rA \cdot rU$ » и « $rA \cdot dT$ » (табл. 2). Полагают, что это объясняется более медленным формированием стэкинг-конформации в рибонуклеотидной цепи [46, 48]. В то же время приблизительно равенство энергии активации образования ($E_{a,p}$) указанных дуплексов (табл. 2) дает возможность говорить об одинаковых механизмах ассоциации рибо- и

Термодинамические и кинетические параметры образования гибридных олигомерных дуплексов и соответствующих рибо- и дезоксирибонуклеотидных аналогов

Параметры	«гА·dT»	«dA·rU»	«dA·dT»	«гА·гU»	Ссылки
$T_{пл}, ^\circ\text{C}$	22,9	<0	27,5	19,1	[30]
$K_{25^\circ}, \text{M}^{-1}$	$5,5 \cdot 10^3$	$<3 \cdot 10^1$	$1,8 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^3$	[30]
$\Delta H^\circ, \text{ккал/моль}$	-48	—	-41	-44	[30]
$K_p, 12^\circ, \text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	$6,6 \cdot 10^6$	—	$8,3 \cdot 10^{-6}$	$6,2 \cdot 10^6$	[46]
$E_{a,d}, \text{ккал/моль}$	—	—	43	39	[46]
$E_{a,p}, \text{ккал/моль}$	—	—	-0,5	0	[46]
$K_d, 12^\circ, \text{с}^{-1}$	50	—	9,6	38	[46]

Примечание: условия комплексообразования: 0,01 М фосфатный буфер, pH 7, 0,1 мМ ЭДТА, 0,2 М NaCl, c_0 $2 \cdot 10^{-4}$ М; строение дуплексов приведено на с. 1323.

дезоксирибонуклеотидных тяжей. Кинетические параметры, характеризующие процесс диссоциации двойных спиралей значительно отличаются (табл. 2). Константа скорости диссоциации (K_d) дуплекса «dA·dT» гораздо ниже соответствующих величин, определенных для дуплексов «гА·гU», «гА·dT». Эта закономерность подтверждается результатами исследования кинетики обмена иминопотонов с водой [17]: установлено, что τ неконцевых пар дуплексов «гА·гU», «гА·dT» приблизительно одинаковы и существенно ниже, чем τ «dA·dT».

По данным ПМР, для этих дуплексов наблюдается эффект «обтрепывания» концов, т. е. быстрое образование и разрушение водородных связей между основаниями на концах дуплекса в условиях термодинамической стабильности двойной спирали. Необходимо подчеркнуть, что «обтрепывание» концевых пар характерно для РНК-, ДНК- и гибридных дуплексов примерно в одинаковой степени.

В целом данные о сравнительной устойчивости гибридных, рибонуклеотидных и дезоксирибонуклеотидных комплексов неоднозначны. Для большинства изученных систем показано, что гибридные дуплексы менее стабильны, чем ДНК и РНК такого же состава. Для полимерных комплексов отличие очень мало и составляет 2—4°С [25, 26, 28, 47, 49]. В олигомерных системах эта разница выражена более четко. Так, $T_{пл}$ комплексов $гA_n \cdot pdT$, ($n=6 \div 9$) в среднем на 7°С ниже $T_{пл}$ $dA_n \cdot pdT$, с равным n [50].

С другой стороны, в ряде работ установлены другие соотношения устойчивости гибридных дуплексов. Например, стабильность полимерных комплексов, образованных различными комбинациями $\text{poly}[d(r)I]$ и $\text{poly}[d(r)C]$, изменяется в ряду: $\text{poly}(rI) \cdot \text{poly}(rC) > \text{poly}(rI) \cdot \text{poly}(dC) > \text{poly}(dI) \cdot \text{poly}(dC) > \text{poly}(dI) \cdot \text{poly}(rC)$ [51], а для ковалентно связанных ДНК-РНК-гибридов типа $dG_n \cdot rC_dC_h$ определен следующий порядок устойчивости: $dG_n \cdot dC_{3c} < dG_n \cdot rC_{13}dC_{17} < dG_n \cdot rC_{30}$ [44].

Анализ скоростей обмена иминопотонов дуплексов $\text{poly}(гA) \cdot \text{poly}(dT)$, $\text{poly}(dA) \cdot \text{poly}(rU)$, $\text{poly}(гA) \cdot \text{poly}(rU)$, $\text{poly}(dA) \cdot \text{poly}(dT)$ на дейтерий [52] позволяет определить соотношение скоростей диссоциации этих комплексов, и тем самым, их относительную стабильность — $\text{poly}(dA) \cdot \text{poly}(dT) > \text{poly}(dA) \cdot \text{poly}(rU) \geq \text{poly}(гA) \cdot \text{poly}(rU) > \text{poly}(гA) \cdot \text{poly}(dT)$. По-видимому, относительная устойчивость гибридных комплексов и их ДНК- и РНК-аналогов зависит от нуклеотидного состава.

Обобщая литературные данные по ДНК-РНК гибридным комплексам можно сделать следующие выводы.

1. Конформационно более жесткая рибонуклеотидная цепь в большинстве исследованных систем оказывает доминирующее влияние на пространственную структуру дуплекса в целом, а также на конформацию углеводных колец дезоксирибонуклеотидных остатков (комплементарных рибо-фрагменту или ковалентно соединенных с ним).

2. Для ряда гибридных дуплексов и триплексов, образованных гомополимерами, характерна биморфная структура, т. е. различная конформация рибо- и дезоксирибонуклеотидных тяжей спирали.

3. По термодинамическим и кинетическим свойствам гибридные комплексы ближе к двуспиральным РНК, чем ДНК.

IV. КОМПЛЕКСЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С НЕКАНОНИЧЕСКИМИ ПАРАМИ ОСНОВАНИЙ

При анализе литературных данных по комплексам НК, содержащим неканонические пары оснований, основное внимание уделялось следующим вопросам:

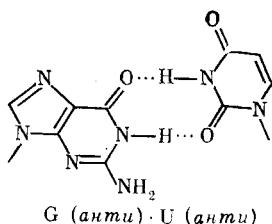
1. Схема спаривания оснований в неканонических парах.

2. Влияние модификации на межплоскостные взаимодействия оснований и конформацию сахарофосфатного остова; степень влияния некомплементарной пары на вторичную структуру двойной спирали.

3. Термодинамические и кинетические параметры образования и диссоциации модифицированных олигомерных дуплексов.

1. Пара dG·dT (G·U)

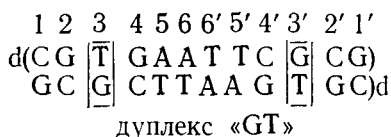
Возможность существования неканонической G·U-пары, стабилизированной водородными связями, была впервые постулирована Криком для объяснения вырожденности генетического кода [53]. Им же была предложена схема образования водородных связей между остатками гуанина и урацила.



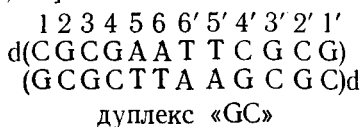
В дальнейшем исследование различных модельных систем, содержащих G·U(T)-пары, современными экспериментальными и теоретическими методами подтвердило правильность предложенной схемы.

Расчет конформаций с помощью ААПФ и построения молекулярных моделей [23, 54, 55] показал, что основания dG·dT-пары находятся в обычных таутомерных формах и в *анти*-ориентации относительно углеводных колец. Включение dG·dT-пары в двойную спираль не приводит к уменьшению межатомных контактов и вызывает лишь небольшое увеличение энергии невалентных взаимодействий и незначительное отклонение углов сахарофосфатного остова от стандартных значений, характерных для уотсон-криковской спирали.

Экспериментальное изучение молекулярной структуры dG·dT-пары и ее влияние на конформацию, термодинамические и кинетические параметры двойной спирали ДНК проведено Пателем и соавт. [56—60] на додекамерном дуплексе «GT»



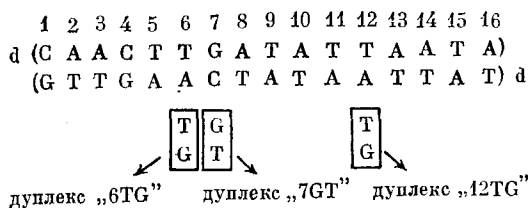
В качестве контроля использовали немодифицированный дуплекс «GC» [61], образующий и в растворе, и в кристаллическом состоянии, спираль в *B*-форме [62, 63]



Наличие в спектре ПМР дуплекса «GT» двух сигналов иминопротонов, соответствующих dG·dT-паре, которые расположены в более сильном поле по сравнению с сигналами dG·dC-пары в том же положении дуплекса «GC», однозначно указывает на существование между остатками гуанозина и тимидина двух водородных связей с карбонильными акцепторными группами. Это подтверждает структуру dG·dT(G·U)-пары, приведенную выше и исключает взаимодействия с участием редких таутомерных форм оснований. Включение dG·dT-пары приводит к нарушению межплоскостных взаимодействий оснований этой пары, в частности остатка тимина, с соседними. По данным ЯМР ^{31}P и ПМР, конформационные возмущения, вносимые dG·dT-парой, локализуются в участке модификации и затрагивают только ближайшую нуклеотидную пару с 3'-конца.

Замена двух dG·dC-пар в дуплексе «GC» на dG·dT-пары вызывает понижение $T_{пл}$ дуплекса на 20°С, однако энтальпия перехода из двуспирального состояния в односпиральное при этом не изменяется (см. ниже табл. 4). По мнению авторов это связано с незначительным нарушением стэкинг-взаимодействий в дуплексе «GT». Близость ΔH^0 и различия $T_{пл}$ дуплексов «GC» и «GT» позволяют предположить, что дестабилизирующее влияние dG·dT-пары имеет энтропийную природу. По разности значений $\Delta H^0_{в-г}$ и ΔH^0 , определенной из кривых теплопоглощения (СМК), установлено, что кооперативно плавящийся участок, как и в дуплексе «GC», так и в дуплексе «GT» составляет 9 нуклеотидных пар, т. е. захватывает участки модификации. По данным ПМР, в дуплексах «GC» и «GT» наблюдается эффект «обтрепывания» концов, затрагивающий нуклеотидные пары в 1-ом и 2-ом положениях. Наличие dG·dT-пары усиливает этот эффект, вследствие чего уширение и исчезновение сигналов иминопротонов dG·dC-пар (положения 1 и 2) в дуплексе «GT» происходит при более низких температурах, чем в дуплексе «GC». Сравнительный анализ кинетических данных обмена иминопротонов дуплексов «GT» и «GC» подтверждает вывод о том, что область распространения структурных возмущений, вносимых dG·dT-парой, ограничивается только соседней с неканонической парой (при 35°С τ dG·dT- и соседней dG·dC-пары (положение 4) дуплекса «GT» в 10 и 2 раза соответственно меньше τ пар в тех же положениях дуплекса «GC»). Методом температурного скачка [64] определена энергия активации образования дуплекса «GT», которая оказалась гораздо больше (22 ккал/моль), чем такой же параметр немодифицированной двойной спирали [65]. На основании этого авторы предположили, что образование dG·dT- и dG·dC-пары (положение 4) в дуплексе «GT» может сопровождаться конформационными подгонками, требующими дополнительной энергии.

В работе [66] исследовано влияние неканонических пар на термодинамические и кинетические параметры образования гексадекамерного дуплекса. За основу был взят гексадекануклеотид d(CAACTTGATATTAATA), который соответствует фрагменту бактериофага ΦX174 и вместе с комплементарной последовательностью образует участок связывания белка гена A. Ниже приведены структура исходного комплементарного комплекса и изученные замены канонических пар на dG·dT-пару.



Все дуплексы, содержащие dG·dT-пару, имеют $T_{пл}$ ниже $T_{пл}$ дуплекса «0» (см. дуплексы № 6—8, 12, табл. 4), причем дестабилизирующий

эффект больше при замещении dG·dC-пары на некомплементарную по сравнению с аналогичным замещением dA·dT-пары, а также когда замещаемая пара расположена ближе к центру дуплекса. Наименьшую дестабилизацию вызывает dG·dT-пара, заменяющая dA·dT-пару в 12-положении (дуплекс «12TG»). Небольшое различие свободной энергии образования (ΔG) дуплекса «0» и дуплексов «6TG», «7GT», «12TG» ($\Delta\Delta G \approx 3$ ккал/моль, табл. 4) свидетельствует о незначительном нарушении dG·dT-парой стэкинг-взаимодействия оснований. Изучение кинетики образования и диссоциации дуплексов «0» и «7GT» показывает, что возмущения, вносимые G·T-парой приводят к увеличению константы скорости диссоциации дуплекса, а константы скорости образования остаются практически одинаковыми. По-видимому, дестабилизация дуплекса «7GT» связана с увеличением скорости диссоциации.

Используя технику ЯЭО исследован также A·T-богатый дуплекс, содержащий внутреннюю dG·dT-пару [67].



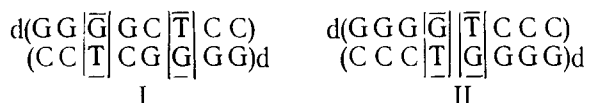
Кроме установления геометрии спаривания между dG·dT в этой работе получена информация о степени гидратации малой бороздки в окрестностях некомплементарной пары.

Недавно проведенное рентгеноструктурное исследование синтетического додекамера в B-форме с двумя dG·dT-парами:



подтвердило, что изменения в структуре, индуцируемые этими некомплементарными парами, носят локальный характер и практически не нарушают общую конформацию дуплекса [68]. Тем не менее именно эта комбинация оснований (сравнивались dG·dT-, dA·dC- и dA·dG-пары) образует наиболее асимметричную пару (характерной чертой уотсон-криковских пар является наличие псевдооси 2-го порядка, лежащей в плоскости оснований). Это может быть причиной эффективной репарации dG·dT-пары соответствующими ферментативными системами, «узнающими» отклонения от псевдосимметрии [10, 68]. Следует отметить, что dG·dT-пара хорошо дискриминируется также ферментами рестрикции. Так, замена dG·dC-пары на dG·dT или dG·dU в участке узнавания ряда эндонуклеаз рестрикции приводит к резкому понижению, а в некоторых случаях полному ингибированию расщепления модифицированных ДНК-дуплексов [69, 70].

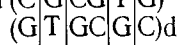
Объектом для изучения влияния локального окружения dG·dT-пар на конформацию и стабильность ДНК в A-форме служили два октамерных дуплекса одинакового состава, различающихся положением двух dG·dT-пар [12, 71—73].



Характерным свойством ДНК-дуплексов, содержащих GG- и CC-кластеры, является то, что в кристаллическом состоянии они образуют спираль в A-форме [74]. Методом РСА показано, что включение dG·dT-пар приводит лишь к незначительному искажению сахарофосфатного остова молекулы, причем возникающая деформация локализована в участке модификации и ограничена ближайшими фосфодиэфирными связями. Стэкинг-взаимодействия в районе неканонической пары нарушены в основном за счет уменьшения перекрытия оснований dG·dT-пары с основаниями соседней пары с 3'-конца, а «стэкинг» с бли-

жайшим «соседом» в 5'-положении сохраняется почти таким же, как и в немодифицированном дуплексе. Термодинамическая устойчивость кристаллических структур (I) и (II) значительно отличаются — кристаллы дуплекса (II) стабильны при комнатной температуре, а кристаллы дуплекса (I) плавятся при 6°С. По мнению авторов, одной из причин различия в устойчивости дуплексов является уменьшение вклада стэкинг-взаимодействий в стабилизацию структуры (I). В дуплексе (I) dG·dT-пары отделены двумя dG·dC-парами, при этом нарушаются стэкинг-взаимодействия в четырех из семи мест межплоскостных контактов пар оснований, а в дуплексе (II), где dG·dT-пары расположены рядом, такие нарушения происходят только в трех местах. Различная дестабилизация дуплексов (I) и (II) может быть связана также с различным состоянием их гидратной оболочки. В частности, показано, что в дуплексе (I) отсутствуют мостиковые водородные связи, стабилизирующие dG·dT-пары. На основании этих данных делается вывод, что последовательно расположенные dG·dT-пары в меньшей степени дестабилизируют двойную спираль, чем изолированные [12, 71—73].

Влияние dG·dT-пар на структуру ДНК в Z-форме исследовано методом РСА на примере гексамерного дуплекса $d(C\overline{G}CGT\overline{G})$ [75]. Не-



смотря на меньшую гибкость сахарофосфатного остова Z-ДНК по сравнению с B-ДНК, некомплемментарная пара включается в Z-спираль, практически ее не деформируя. Показано, что в дуплексе сохраняется присутствующее в Z-форме чередование конформации гликозидной связи (*син*-, *анти*-) и фуранозного цикла (*N*- и *S*-) в нуклеотидных остатках, хотя в dG·dT-паре дезоксирибоза гуанозина имеет нехарактерную C(4')-эндо-конформацию. Пара dG·dT, включенная в Z-спираль, не только не ухудшает межплоскостных взаимодействий, но даже в некоторой степени стабилизирует их, поскольку наблюдается более полное перекрывание остатков гуанина и тимина с основаниями соседних пар по сравнению с dG·dC-парой, находящейся в том же положении немодифицированного дуплекса. Установлено, что важную роль в стабилизации dG·dT-пары играет гидратная оболочка дуплекса. С участием молекул воды образуются мостиковые водородные связи между N(2), O(6) гуанина и O(2), O(4) тимина соответственно, которые частично компенсируют отсутствие одной связи в dG·dT-паре по сравнению с dG·dC-парой.

Следует отметить, что строение гидратной оболочки вблизи некомплемментарной пары практически не зависит от формы ДНК (A, B или Z) [10, 68].

Кратко отметим еще некоторые работы, в которых анализируется влияние dG·dT-пар на олигомерные дуплексы. По данным ПМР, динуклеотиды $pd(GT)$ и $pd(TG)$ не образуют комплексов в растворе, в условиях, когда самокомплемментарные динуклеотиды ассоциируются с образованием мини-дуплексов [76, 77]. В то же время, полимер $poly[d(GT)]$ может существовать в растворе в виде двойной спирали [78—80]. Это доказано методами УФ-, КД- и ПМР-спектроскопии, а также по связыванию бромид атидия.

Данные, характеризующие дестабилизирующее влияние dG·dT-пар на олигомерные дуплексы, приводятся в работах [50, 81, 82].

Ряд работ посвящен исследованию рибоолигонуклеотидных комплексов, содержащих G·U-пару. По данным РСА, концевые G·U-пары в тетрамерном дуплексе $r(\overline{G}GC\overline{U})$ практически не нарушают стэкинг-взаимодействия оснований [83].

В работах [84, 85] изучено влияние G·U-пары и ее локального окружения на устойчивость пентануклеотидных двойных спиралей. Серии исследованных дуплексов приведены ниже:

$\begin{array}{c} r(CA \overline{G} UG) \\ (GU \overline{U} AC)r \\ \text{дуплекс «5GU»} \end{array}$	$\begin{array}{c} r(AG \overline{G} CU) \\ (UC \overline{U} GA)r \\ \text{дуплекс «5*GU»} \end{array}$
$\begin{array}{c} r(CAAUG) \\ (GUUAC)r \\ \text{дуплекс «5AU»} \end{array}$	$\begin{array}{c} r(AGACU) \\ (UCUGA)r \\ \text{дуплекс «5*AU»} \end{array}$
$\begin{array}{c} r(CAGUG) \\ (GUACA)r \\ \text{дуплекс «5GC»} \end{array}$	$\begin{array}{c} r(AGGCU) \\ (UCCGA)r \\ \text{дуплекс «5*GC»} \end{array}$
серия I	серия II

В дуплексах серии I центральная пара фланкирована А·U-парами, а в серии II — G·C-парами. Показано, что все комплексы серии II более устойчивы, чем соответствующие комплексы серии I. По данным ПМР, $T_{пл}$ пары G·U в дуплексе «5 GU» на 4° C ниже $T_{пл}$ остальных пар, т. е. G·U-пара является участком локальной нестабильности дуплекса. А в дуплексе — 5*GU» пара G·U имеет ту же $T_{пл}$, что и остальные пары. Замещение центральной комплементарной пары на G·U в дуплексах серии I приводит к понижению их устойчивости, причем дестабилизация больше при замене G·C-пары ($T_{пл}$ дуплексов «5GU», «5GC», «5AU» равны соответственно 23, 38, 28° C). В дуплексах серии II дестабилизирующее влияние G·U-пары гораздо меньше и проявляется только при замещении G·C-пары; замена А·U на G·U практически не влияет на устойчивость двойной спирали ($T_{пл}$ дуплексов «5*GU», «5*GC», «5*AU» равны соответственно 44, 54, 45° C). По мнению авторов [85], различные эффекты, сопровождающие включение G·U-пары между А·U- или G·C-парами связаны с тем, что в дуплексе «5GU» в большей степени нарушены межплоскостные взаимодействия между основаниями G·U-пары и фланкирующих ее пар, чем в дуплексе «5*GU».

Сравнительный анализ термодинамических параметров образования олигомерных дуплексов, содержащих G·U-пары, и немодифицированных дуплексов, содержащих в том же положении А·U-пары (см. дуплексы № 34—49 в табл. 4), проведен в работе [86]. Установлено, что замена А·U-пары на G·U вызывает понижение прочности комплекса, зависящее от его состава, нуклеотидной последовательности, положения G·U-пары в олигомерной цепи и ее локального окружения. Дестабилизация комплексов, вызванная такой заменой, в основном имеет энтальпийную природу, хотя для дуплексов, содержащих рядом расположенные G·U-пары, уменьшение прочности связано с неблагоприятным изменением энтропии комплексобразования (см. табл. 4).

На дестабилизирующий эффект замены канонических пар на G·U-пару указывается также в работах [5, 87—89]. Однако образование G·U-пары термодинамически более выгодно, чем возникновение других неканонических пар в тех же условиях. Так, пентарибонуклеотид AGGCU при самоассоциации образует дуплекс «GU» с двумя G·U-парами, а не дуплекс «GG» с одной G·G-парой [85].

$\begin{array}{c} r(A \overline{G} GC \overline{U}) \\ (U \overline{C} G \overline{G} A)r \\ \text{дуплекс «GU»} \end{array}$	$\begin{array}{c} r(AG \overline{G} CU) \\ (UC \overline{G} GA)r \\ \text{дуплекс «GG»} \end{array}$
---	--

Аналогичный вывод о предпочтительном образовании G·U-пар перед G·G-парами делается в работе [90].

Изучение влияния концевых G·U-пар на термическую устойчивость РНК-дуплексов показало, что вклад свободной энергии G·U-пары, фланкирующей тетрамерный GC-содержащий кор, приблизительно равен вкладу концевой А·U-пары и на ~1 ккал/моль меньше вклада пары G·C

[91]. Другие концевые некомплементарные пары — А·А, А·С, А·Г и U·U менее стабильны, чем соответствующие уотсон-криковские. Более того, было показано, что концевая G·U-пара более стабильна, если она содержит 5'-G и 3'-U, а не наоборот [91].

На основании данных КД проведено сопоставление термической устойчивости и конформационных особенностей полимерных комплексов рибо- и дезоксирибозы, состоящих только из G·U- или dG·dT-пар — poly[r(G U)] и poly[d(G T)] [79]. Установлено, что образование ДНК-дуплекса происходит при более высокой ионной силе (0°С, 0,1 М NaCl), чем комплексообразование его рибо-аналога (0°С, 0,02 М NaCl). В диапазоне концентрации NaCl от 0,1 до 1 М спираль poly[d(G T)]₂ претерпевает конформационные перестройки (в пределах В-формы), следствием которых является плавное изменение спектра КД. Относительная устойчивость дуплексов зависит от ионной силы буфера: в 0,1 М NaCl более устойчив рибонуклеотидный дуплекс ($T_{пл}$ poly[r(GU)] и poly[d(GT)] равны 14 и 3°С соответственно), а в 1 М NaCl стабильнее становится дезокси-аналог ($T_{пл}$ 23 и 30°С). Однако эти дуплексы гораздо менее прочны, чем дуплексы образованных самокомплементарными полимерами — poly[r(AU)] и poly[d(AT)] ($T_{пл}$ последних в 0,1 М NaCl равны 65 и 57°С соответственно).

2. Пара А·С

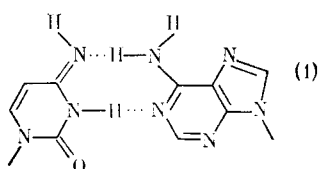
Структура dA·dC-пары и ее влияние на конформацию и устойчивость ДНК-дуплекса «АС»



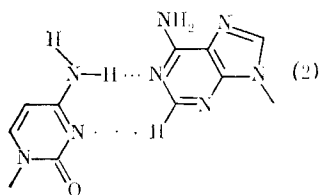
дуплекс «АС»

исследовались в работе [92].

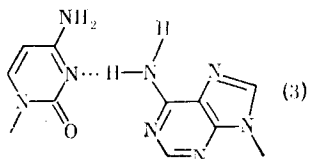
Ниже приведены теоретически возможные схемы спаривания оснований:



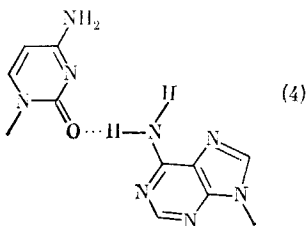
С (анти) · А (анти)



С (анти) · А (анти)



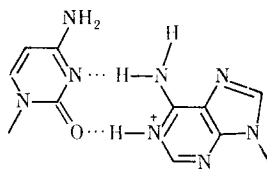
С (анти) · А (анти)



С (анти) · А (анти)

В спектре ПМР дуплекса «АС» нет сигналов от обменивающихся протонов dA·dC-пары, следовательно, схема 1, в которой предполагается участие в образовании водородной связи иминопотона цитозина, находящегося в енольной форме, не отражает реальную структуру. Отсутствие ЯЭО между Н(2) аденина dA·dC-пары и иминопотонами фланкирующих дефект dG·dC-пар исключает ориентацию оснований, изображенную на схеме 2. Авторы предполагают, что dA·dC-пара стабилизируется одной водородной связью между N(6)-аминопотонам аденина и N(3) (схема 3) или О(2) (схема 4) цитозина. Однако не исключается возмож-

ность протонирования N(1)-атома аденина, которое приводит к образованию второй Н-связи между N⁺(1)—Н аденина и О(2) цитозина (схема 5).



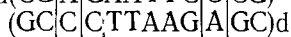
5)

C (анти) · A⁺ (анти)

Локализация сигналов Н(6) и Н(5) цитозина соседней с неканонической dG·dC-пары (положение 4) дуплекса «АС» в более слабом поле по сравнению с сигналами соответствующих протонов дуплекса «GC» (см. выше) свидетельствует о нарушении стэкинг-взаимодействий в районе неканонической пары. Предполагается, что одно или оба основания dA·dC-пары находятся вне спирали. Методом ЯМР ³¹P обнаружены существенные искажения сахарофосфатного остова дуплекса «АС» вокруг dA·dC-пары.

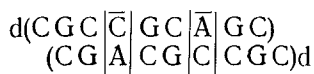
Замена двух dG·dC-пар в дуплексе «GC» на dA·dC-пары вызывает понижение *T*_{пл} дуплекса на 30°С (см. табл. 4). По данным ПМР, наличие dA·dC-пары в третьем положении дуплекса «АС» приводит к тому, что «обтрепывание» dG·dC-пар в первом и втором положениях этого дуплекса происходит при более низких температурах, чем в дуплексе «GC». При изучении кинетики обмена иминопротонов дуплекса «АС» с водой установлено, что *τ* dG·dC-пары в четвертом и dA·dT-пар в пятом и шестом положениях в 3 и 2 раза соответственно меньше, чем *τ* аналогичных пар дуплекса «GC». Следовательно, дестабилизирующее влияние dA·dC-пары не ограничивается соседней парой, а затрагивает всю молекулу дуплекса «АС».

Однако в публикации 1987 г. после углубленного изучения структуры дуплекса «АС» и его изомера d(CG|A|GAATTC|C|CG) с помощью двумер-



ного ПМР, ЯМР ³¹P-спектроскопии и оценки межатомных расстояний по данным ЯЭО авторами были сделаны иные выводы о характере влияния некомплементарной dA·dC-пары на локальную и общую структуру ДНК [93]. Так, утверждается, что остатки А и С встраиваются в двойную спираль, участвуя в стэкинг-взаимодействии с соседними основаниями и вызывают лишь локальные конформационные перестройки, не распространяющиеся на центральный ААТТ-сегмент. Полученные результаты не дают возможность сделать выбор между двумя схемами А·С-спаривания — 3 и 5 [93].

Эта интерпретация хорошо согласуется с выводами работы [94], в которой методами ЯМР-спектроскопии изучался дефектный дуплекс



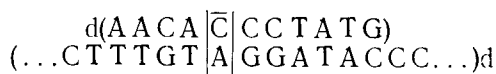
содержащий две dA·dC-пары, и работ [95, 96], посвященных рентгеноструктурному анализу дуплекса «СА», близкого по нуклеотидной последовательности к дуплексу «АС»:



Установлено, что при интеграции dA·dC-пары в ДНК стэкинг-взаимодействия с основаниями соседних пар и конформация сахарофосфатного остова нарушаются незначительно. Согласно данным РСА, более предпочтительной схемой А·С-спаривания выглядит схема 5, включающая

протонирование аденина; подчеркнута важная роль в стабилизации dA·dC-пары мостиковых Н-связей с участием молекул воды, входящих в гидратную оболочку дуплекса.

В работе [97] проведен сравнительный анализ комплексообразования 11-, 14- и 17-звенных олигонуклеотидов с ДНК ФХ174 и мутантной ДНК, в которой проведена точечная G—A-замена. Исследованные модифицированные комплексы приведены ниже.



комплекс «11AC»



комплекс «14AC»



комплекс «17AC»

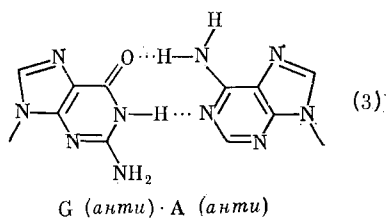
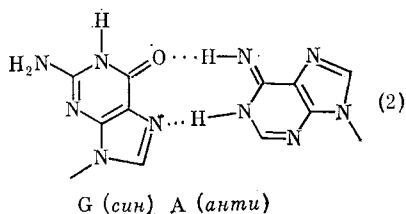
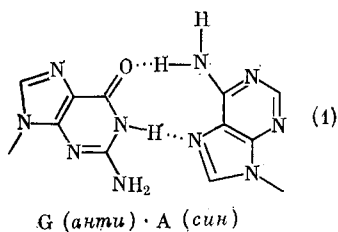
(Комплексы с немутантной ДНК, содержащие комплементарную dG·dC-пару, обозначаются соответственно «11G C», «14G C», «17G C».) Было определено, что степень связывания всех трех олигонуклеотидов с мутантной ДНК гораздо ниже, чем с природной ДНК. Кроме того, дуплексы, содержащие dA·dC-пару значительно менее устойчивы, чем их комплементарные аналоги. Замена одной dG·dC-пары на dA·dC по де-стабилизации эквивалентна удалению трех нуклеотидных пар (температуры полудиссоциации комплексов «17A C» и «14G C», а также «14A C» и «11G C» равны 43 и 41° C; 32 и 33° C соответственно).

Дестабилизирующее влияние dA·dC-пар на ДНК-дуплексы отмечается также в работах [66, 81, 98].

Замена dG·dC-пары на dA·dC в участке узнавания эндонуклеаз рестрикции SmaI, KpnI приводит к полному ингибированию этих ферментов [70].

3. Пурин-пуриновые пары

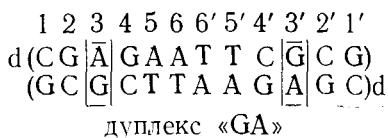
В литературе анализируются следующие схемы образования Н-связей в dG·dA-паре.



Теоретический расчет конформаций ДНК-дуплексов показал, что минимуму энергии невалентных взаимодействий соответствуют структуры 1 и 3 [54, 55].

Экспериментально взаимное расположение оснований в dG·dA-паре исследовалось на трех модельных системах. Структуру додекамерного

дуплекса «G A» изучали методом ЯМР в растворе [99].



ЯЭО между Н(2) аденина dG·dA-пары и иминопротонами соседних dG·dC-пар свидетельствует об анти-конформации аденозина (схемы 2, 3). Отсутствие ЯЭО между Н(2) и Н(8) аденина и гуанина соответственно, исключает взаимное положение оснований, изображенное на схеме 2. На основании этих данных авторы заключают, что реализуется схема 3. Аналогичный вывод о взаимной ориентации оснований в dG·dA-паре сделан в работе [100], в которой методом ПМР изучался декамерный дуплекс, содержащий две рядом расположенные dG·dA-пары.



Этот же дуплекс был исследован методом РСА [101]. Оказалось, что и в кристаллическом состоянии оба нуклеотидных остатка неканонической пары находятся в анти-конформации, а основания удерживаются двумя Н-связями (схема 3). Для dG·dA-пары в такой конформации характерно ярко выраженное пропеллерное расположение оснований (повернуты друг относительно друга на 24,8°), что облегчает спаривание. Несмотря на то, что расстояние между С(1')-атомами аденозина и гуанозина на 2 Å больше, чем в уотсон-криковской паре, блок из двух dG·dA-пар достаточно хорошо вписывается в двойную спираль. Наблюдаемые при этом малые изменения отдельных торсионных углов сахарофосфатного остова лежат в пределах, характерных для канонических пар.

Иная геометрия dG·dA-спаривания с син-конформацией аденозина (схема 1) реализуется в додекамерном дуплексе «A G», сходном по первичной структуре с дуплексом «G A» [13, 102]:

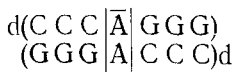


Исследование проводилось также методом РСА. Существенно, что включение в В-ДНК пары dG·dA, имеющей соответственно анти- и син-конформацию нуклеотидных остатков, сопровождается минимальными подгонками параметров сахарофосфатного остова. Предполагается, что реализация той или иной схемы спаривания (1 или 3) может зависеть от локальных условий, поскольку, согласно теоретическим расчетам, разница в энергии между этими двумя состояниями dG·dA-пары невелика [101].

Установлено, что dG·dA-пара как в состоянии 1, так и 3 встраивается в двойную спираль, практически не нарушая межплоскостных взаимодействий [13, 99—102].

Дестабилизирующее влияние dG·dA-пары проявляется в понижении $T_{пл}$ дуплекса «G A» на 17°С по сравнению с дуплексом «G C» (см. табл. 4). На основании данных обмена иминопротонов дуплекса «G A» с водой показано, что возмущения, вносимые dG·dA-парой, имеют локальный характер и затрагивают только соседнюю dG·dC-пару в четвертом положении [99].

Экспериментальные данные о молекулярной структуре dA·dA-пары получены недавно при изучении методом ЯМР-спектроскопии ДНК-дуплекса [103]:



Показано, что стабильных Н-связей между основаниями некомплементарной пары не образуется. Встраивание dA·dA-пары в двойную спираль

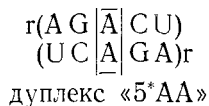
осуществляется за счет стэкинг-взаимодействия адениновых оснований с соседними, и сопровождается выведением остатков аденина из плоскости для уменьшения перекрывания противостоящих аминогрупп, а также значительным искажением сахарофосфатного остова.

Структура G·G-пары в дуплексах НК экспериментальными методами не исследовалась.

Пурин-пуриновые пары вызывают сильную дестабилизацию двойных спиралей (см. табл. 4). Сравнение термической устойчивости олигомер-полимерных комплексов $dG_n \cdot dC_{12}A_mC_x$ и $dG_n \cdot dC_{10}G_mC_x$ ($n=100$, $m=0-6$, $x=5-41$) с различным числом последовательно расположенных dG·dA- или dG·dG-пар показывает [104], что дестабилизация дуплексов пропорциональна количеству неканонических пар. Включение одной dG·dA- или dG·dG-пары вызывает понижение $T_{пл}$ комплекса, соответствующее удалению, в среднем, трех dG·dC-пар. Однако наличие dG·dA- или dG·dG-пар в центральном участке комплекса не нарушает кооперативности плавления. По-видимому, такие неканонические пары встраиваются в регулярную двойную спираль и участвуют в стэкинг-взаимодействиях как между собой, так и с соседними dG·dC-парами.

Влияние локального окружения на дестабилизирующий эффект A·A- и G·G-пар продемонстрировано в работах [84, 85]. Согласно данным ПМР-спектроскопии, не происходит образования пентарибонуклеотидных комплексов типа $r(CA \overline{X} \overline{U} G) \begin{smallmatrix} (GU) \overline{X} \overline{A} C \end{smallmatrix} r$ с центральными A·A- и G·G-парами,

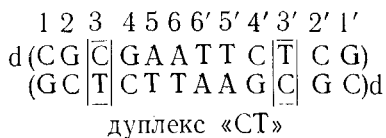
фланкированными A·U-парами. С другой стороны, образуется относительно устойчивый дуплекс «5*AA» ($T_{пл}$ 26°С), в котором A·A-пара окружена G·C-парами.



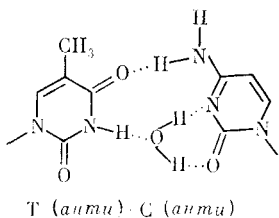
4. Пиримидин-пиримидиновые пары

Конформационный анализ ДНК-дуплексов с использованием ААПФ показал, что для каждой пиримидин-пиримидиновой пары возможно образование димера, стабилизированного Н-связями [23, 54, 55].

Экспериментальными методами молекулярная структура пиримидин-пиримидиновых пар изучалась мало. На основании результатов исследования с помощью ЯМР-спектроскопии додекамерного дуплекса «С Т» [105]:



установлено, что dC·dT-пара удерживается двумя Н-связями: полноценной — между NH₂-группой цитозина и О(4) тимина и слабой — между N(3)—Н тимина и акцепторными группами цитозина с участием молекулы воды.



T (анти) · C (анти)

Замена двух dG·dC-пар в дуплексе «G C» (см. выше) на dC·dT-пары приводит к понижению $T_{пл}$ на 30°С (см. табл. 4), причем дестабилизи-

рующее влияние dC·dT-пары затрагивает все внутренние пары оснований дуплекса «С Т». По данным скорости обмена иминопотонов дуплекса «С Т» с водой, время жизни dG·dC (положение 4)- и dA·dT (положения 5, 6)-пар соответственно в 10 и 6 раз меньше τ аналогичных пар в дуплексе «G C».

О дестабилизации олигомерных дуплексов, вызванной заменой dA·dT на dC·dT-пару, свидетельствуют также результаты работ [50, 66] (см. дуплексы № 6 и 11 в табл. 4).

Существование U·U-пар, стабилизированных водородными связями, экспериментально не доказано. На основании данных по УФ-фотогидратации и фотодимеризации полимерных комплексов poly(U)·poly(A, U) авторы работы [106] заключают, что остатки уридина в poly(A, U) находятся вне спирали и не участвуют в стабилизации вторичной структуры. На молекулярных моделях показано, что образование таких внутренних петель не вызывает значительных структурных изменений двойной спирали [107]. Увеличение содержания уридиновых остатков в сополимере poly(A, U) приводит к уменьшению устойчивости комплекса poly(U)·poly(A, U) [88, 108, 109], а полинуклеотид poly(A, U), содержащий 49 мол. % уридина, вообще не вступает в комплементарные взаимодействия с полиуридиловой кислотой [107].

Наименьшая, по сравнению с другими нуклеотидами, способность уридина к стэкинг-взаимодействиям, играющим важную роль в стабилизации двухцепочечных структур, является причиной того, что пентануклеотид r(AGUCU) не образует дуплекса в растворе в отличие от пентамеров, содержащих в третьем положении A, G или C [85].

В работе [110] обсуждается геометрия dT·dT-пары. Согласно данным ПМР-спектроскопии, эта пара не стабилизирована Н-связями [103, 111], хотя она хорошо встраивается в двойную спираль с минимальными искажениями конформации оснований и сахарофосфатного остова [103, 111, 112]. Изучение особенностей молекулярной структуры dT·dT-пары в дуплексе d(CCC $\overline{\text{T}}$ GGG) (GGG $\overline{\text{T}}$ CCC)d показало, что в интервале температур 10—20° С для

остатков тимина характерно равновесие между двумя или более конформациями [110].

Наличие dT·dT-пары в дуплексе «Т Т»:



вызывает уменьшение его $T_{пл}$ на 11° С по сравнению с додекамерным дуплексом



Кроме того, dT·dT-пара образует локальный нестабильный участок, в котором при повышении температуры инициируется процесс диссоциации двойной спирали параллельно с плавлением, начинающимся с концов. Аналогичное заключение было сделано [113] при изучении дуплекса:



Зависимость стабильности некомплементарной dT·dT-пары от природы соседних пар иллюстрируют следующие данные [103, 110]. Пара dT·dT оказывает наибольший дестабилизирующий эффект, когда она заменяет центральную dA·dT-пару в последовательности —ATA—, и наименьший — при замене dA·dT-пары в последовательности —CAG—.

В цикле работ [114, 115] методами ЯМР-спектроскопии и температурно-

го скачка показано, что олигонуклеотиды $d[ATCCTA(T)_nTAGGAT]$ ($n=0\div 7$), в первичной структуре которых содержатся палиндромные элементы, могут образовывать в растворе как дефектные двойные спирали (I), так и мономолекулярные «шпильки» (II)

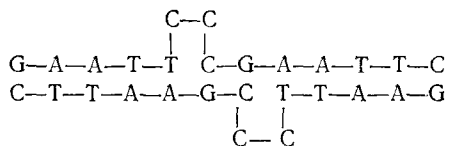


Олигомеры, содержащие больше трех некомплементарных тимидиновых звеньев, образуют исключительно «шпильки», а для олигонуклеотидов с $n \leq 3$ характерно сосуществование обеих форм. Уменьшение нуклеотидной концентрации и ионной силы раствора способствует преимущественному образованию «шпилек». По данным ПМР-спектроскопии стабилизация петель в «шпилечных» структурах, содержащих меньше трех неспаренных тимидиновых остатков, осуществляется за счет разрушения нуклеотидных пар, соседних с олиго(dT)-последовательностью. Наиболее устойчивы структуры с петлями, содержащими 4—5 нуклеотидных звеньев. Значения энтальпии диссоциации пар оснований в двухцепочечном участке молекулы свидетельствуют о том, что пары, ближайшие к петле более устойчивы, чем концевые, т. е. петля в определенной степени стабилизирует двуспиральный фрагмент. Путем измерения ЯЭО установлено, что стабилизация осуществляется за счет «стэкинга» первого (с 5'-конца) неспаренного остатка тимидина с основанием соседней нуклеотидной пары.

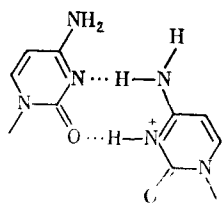
Образование «шпилечных» структур, аналогичных (II), зафиксировано также для олигонуклеотидов $d[CGCGCG(T)_nCGCGCG]$ ($n=4, 5$) [116, 117] и $d(CGCGATTTCGCG)$ [113].

Экспериментальных доказательств образования Н-связей между основаниями С·С-пары до настоящего времени не получено. По мнению многих авторов, отсутствие Н-связей в С·С-паре, а также неполноценный «стэкинг» неспаренного цитозина с основаниями соседних нуклеотидных пар приводит к «выпячиванию» обоих остатков цитидина из спирали, т. е. к образованию внутренней петли. Этими же факторами обусловлен и дестабилизирующий эффект С·С-пары [84, 85, 90, 118].

При изучении комплексообразования олигонуклеотидов ($A_8C_mU_8$) ($m=1-8$) [20, 119] установлено, что олигомеры с $m=1\div 3$ образуют бимолекулярную спираль с внутренней петлей, а при $m=4\div 8$ термодинамически более выгодной становится «шпилечная» структура. Среди «шпилек», образованных олигорибонуклеотидами, максимально устойчива та, петля которой состоит из шести нуклеотидных звеньев. На основании данных ПМР-спектроскопии и ЯЭО установлено [120], что олигонуклеотид $d(GAATTCCGGAATT)$ образует необычную бимолекулярную структуру, содержащую несовпадающие петли:



Протонирование одного из цитозиновых остатков С·С-пары способствует образованию Н-связей между основаниями. Так, по данным КД, олигомер $d(C_4A_4T_4C_4)$ образует дуплекс с концевыми $dC \cdot dC^+$ -парами [121]. Наличие центрального $d(A_4T_4)$ -участка способствует образованию $dC \cdot dC^+$ -пар между антипараллельными цепями (в более ранних работах [122, 123] предполагалось, что С·С⁺-пары могут возникать только между параллельными тяжами), причем этот процесс происходит при более высоких значениях рН, чем, например, ассоциация dC_8 с $d(C^+)_8$.



C (анти) · C⁺ (анти)

Предложена следующая структура dC·dC⁺-пары, которая, по мнению авторов [81] может включаться в двойную спираль ДНК, не приводя к существенным изменениям ее геометрических параметров. Предполагается, что образование dC·dC⁺-пар происходит также при самоассоциации poly[d(C T)] и poly[d(A C)] [124].

V. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ НЕКАНОНИЧЕСКИХ ПАР НА СТРУКТУРУ И ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ОБРАЗОВАНИЯ ОЛИГОМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

1) Пиримидин-пуриновые некомплементарные пары, а также пара dG·dA, включенные в нуклеотидные двойные спирали, удерживаются двумя Н-связями. Пара dA·dA водородными связями не стабилизирована. Нет строгих экспериментальных доказательств о молекулярной структуре пары dG·dG и пиримидин-пиримидиновых пар. Основания в некомплементарных парах находятся в обычных таутомерных формах и, как правило, в анти-конформации (исключение составляет пара dG(анти)·dA(син)).

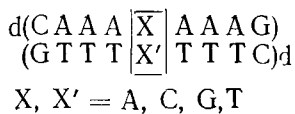
2) замена А·Т-, G·C-пар на неканонические приводит к изменению конформации сахарофосфатного остова.

3) В зависимости от природы гетероциклических оснований в неканонических парах и от их ближайшего окружения основания таких пар могут или включаться в двойную спираль, участвуя в стэкинг-взаимодействии, или выходить из спирали, образуя петлю.

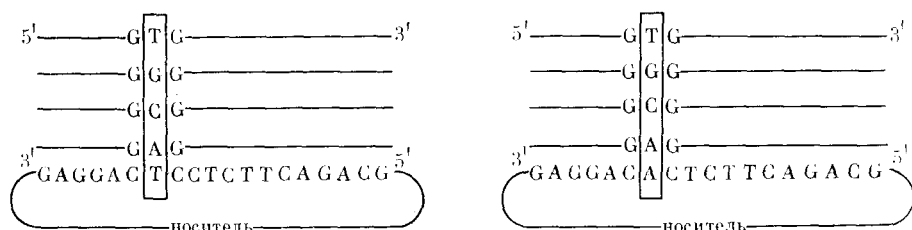
4) Наименьшие возмущения локального характера вызывают G·U-, dG·dT-, dG·dA-пары, которые сосуществуют с комплементарными парами внутри двойной спирали.

5) Наиболее обширное возмущающее влияние оказывают dA·dA- и dC·dT-пары. Основания этих пар расположены, по крайней мере частично, вне двойной спирали.

6) Замещение уотсон-криковских пар на неканонические приводит к уменьшению устойчивости дуплекса. Степень дестабилизации зависит от длины модифицированного дуплекса, природы неканонических и заменяемых (G·C или А·Т) пар, относительного количества «ошибочных» пар, их положения в дуплексе и локального окружения. Например, для серии ДНК-дуплексов [110]:



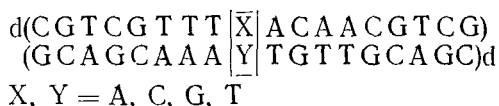
На основании изучения их профилей плавления был получен следующий ряд устойчивости (указаны X·X'-пары): dG·dT > dG·dG > dG·dA > > dC·dT > dA·dA = dT·dT > dA·dC = dC·dC. Компьютерный анализ 100t-РНК позволил оценить относительную стабильность некомплементарных пар в ДНК: G·U ≈ G·G > C·C, U·U, C·A, A·A > G·A, U·C [125]. А для серии ДНК-дуплексов: олигомер — полимер, фиксированный на сухом агарозном геле:



на основании измерения скорости диссоциации дуплексов выведен следующий ряд уменьшения термостабильности в зависимости от природы варьируемой нуклеотидной пары: $dT \cdot dA \approx dA \cdot dT > dG \cdot dT \geq dG \cdot dA > dA \cdot dA \approx dT \cdot dT \approx dC \cdot dA > dC \cdot dT$ [126]. Термодинамические параметры образования олигомерных комплексов с неканоническими парами оснований суммированы в табл. 4.

7) В общем случае дестабилизация модифицированного дуплекса по сравнению с «правильным» связана с уменьшением энтальпии комплексообразования (из-за нарушения стэкинг-взаимодействий в районе неканонической пары), перекрывающим благоприятное изменение энтропии (за счет большей конформационной подвижности «ошибочных» пар).

Сравнительная характеристика влияния всех возможных комбинаций неканонических пар на термодинамические параметры комплексообразования проведена в работе [127] на примере ДНК-дуплекса:



Анализировались только те составляющие $\Delta H^0(X \cdot Y)$ и $\Delta S^0(X \cdot Y)$ (в расчете на нуклеотидную пару), которые характеризуют стэкинг-взаимодействия неканонической пары с соседними парами (приближение «виртуального стэкинга») (табл. 3).

Основываясь на полученных данных высказано предположение о структурных особенностях некомплементарных пар. Рассматриваются три основных типа конформаций таких пар.

а) Связанные (так называемые «wobble» пары). Они характеризуются тем же значением ΔS и несколько пониженным ΔH по сравнению с

Таблица 3

Термодинамические параметры варьируемой нуклеотидной пары в составе октадекамерного ДНК-дуплекса [127]

Варируемая пара оснований (X·Y)	$T_{пл}^*$ дуплекса, °C	$\Delta H(X \cdot Y)$, кДж/моль	$\Delta S(X \cdot Y)$, кДж/моль·K	Тип структуры X·Y-пары
G·C	69,6	70,6	0,208	Уотсон-криковская
C·G	68,1	68,8	0,208	»
A·T	67,7	67,8	0,208	»
T·A	64,9	55,5	0,208	»
G·T	60,1	30,6	0,116	Слабая
T·G	60,0	60,8	0,208	Связанная
A·G	59,3	59,1	0,208	Связанная
T·T	58,7	0	0,031	Открытая
C·T	58,6	0	0,031	Открытая
G·G	56,7	57,0	0,208	Связанная
G·A	56,6	30,6	0,128	Слабая
T·C	56,0	0	0,035	Открытая
A·A	55,6	55,6	0,208	Связанная
A·C	54,4	30,6	0,133	Слабая
C·A	53,2	54,1	0,208	Связанная
C·C	51,5	0	0,045	Открытая

* $T_{пл}$ измеряли в 1 мМ какодильном буфере, pH 7,1, содержащем 0,5 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, нуклеотидная концентрация — 0,3 О·Е₂₆₀/мл.

уотсон-криковскими парами, имеют спаренные основания и встраиваются в двойную спираль.

б) Открытые пары. Для них характерны низкие значения ΔH и ΔS ; такие пары образуют петли.

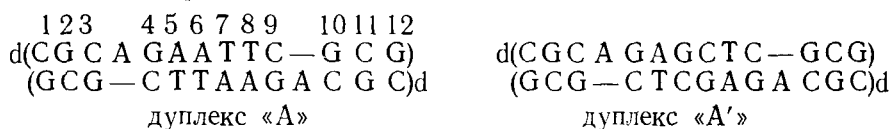
в) Слабые нуклеотидные пары. Имеют промежуточные (между экстремальными) значения термодинамических параметров, образуют разного типа промежуточные структуры. Между структурными особенностями пар и их дестабилизирующим влиянием не найдено прямого соответствия. Интересно, что T_{m-1} дуплексов с неканоническими парами $X \cdot Y$ и $Y \cdot X$, отличающимися только взаимным расположением оснований в комплементарных цепях, не одинакова, хотя окружение этих пар и, следовательно, межплоскостные контакты не изменяются. По-видимому, это связано с эффектом дальних взаимодействий неканонических пар.

Рассматривая образование и репарацию некомплементарных пар, ученые приходят к выводу, что репарационные системы элиминируют с наибольшей эффективностью более часто встречающиеся пары. Так, репарационная система *E. coli* эффективно «исправляет» $dT \cdot dG$ -, $dG \cdot dG$ -, затем $dC \cdot dA$ -пары, и в гораздо меньшей степени — $dG \cdot dA$ -, $dA \cdot dG$ -, $dT \cdot dT$ -, $dC \cdot dC$ -, $dT \cdot dC$ -, $dC \cdot dT$ -пары [128]. Предполагают, что узнавание «ошибочных» пар ферментами репарации не связано со степенью дестабилизации, а определяется ориентацией оснований относительно сахарофосфатного остова и рисунком функциональных групп в бороздках двойной спирали [10, 127].

VI. КОМПЛЕКСЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, СОДЕРЖАЩИЕ НЕСПАРЕННЫЕ НУКЛЕОТИДНЫЕ ОСТАТКИ

1. Внутренние неспаренные звенья

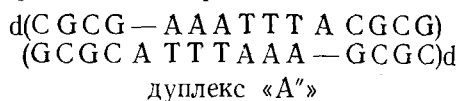
Анализ структуры ДНК-дуплексов «А» и «А'» [14, 57—59, 64, 129, 130], в состав которых входят остатки аденозина, не имеющие партнера на комплементарной цепи:



показал, что неспаренное пуриновое основание встраивается в спираль и участвует в стэкинг-взаимодействии с соседними $dG \cdot dG$ -парами. Однако включение «лишнего» звена сопровождается увеличением расстояния между парами $G \cdot C$ и, как следствие, приводит к нарушению «стэкинга» между основаниями немодифицированного тяжа дуплекса. Кроме того, в участке модификации наблюдается искажение сахарофосфатного остова, а также изменение длин и торсионных углов $P-O$ -связей фосфатного остатка напротив «лишнего» аденозина (данные ПМР-спектроскопии).

Наличие неспаренного остатка сильно дестабилизирует дуплекс (табл. 4). Близость значений ΔH^0 дуплексов «GC» (см. выше) и «А» (нарушение стэкинг-взаимодействий между основаниями $G(3)$ и $C(4)$ на немодифицированном тяже компенсируется дополнительными межплоскостными взаимодействиями «лишнего» аденозина) указывает на энтропийную природу дестабилизирующего эффекта. По разнице значений $\Delta H_{в-г}$ и ΔH^0 , определенной методом СМК для дуплекса «А», установлено, что кооперативно плавящийся участок составляет 9 ± 1 нуклеотидных пар, т. е. включает «лишнее» звено. По данным скорости обмена иминопотопов дуплекса «А» с водой дестабилизирующее влияние неспаренного аденозина затрагивает все внутренние пары дуплекса.

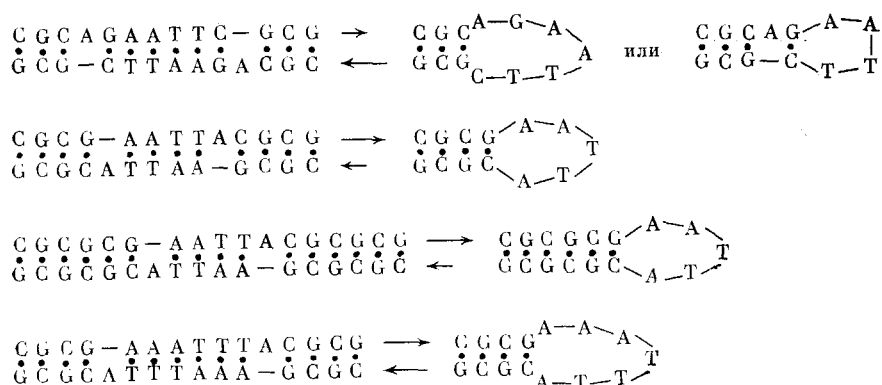
При изучении методом ЯМР-спектроскопии более протяженной последовательности, содержащей неспаренный остаток аденозина:



также было показано, что «лишнее» основание интегрируется в двойную спираль [131]. Однако следствием этого является не увеличение расстояния между основаниями на противоположной цепи, как в случае дуплекса «А», а некоторый изгиб спирали. Поскольку дефекты расположены симметрично на разных тяжах дуплекса, спираль приобретает S-образную форму. При этом основания немодифицированного тяжа напротив неспаренного остатка достаточно хорошо стыкованы.

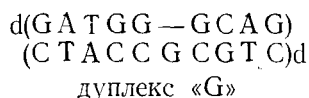
Интересно, что в кристаллическом состоянии для обоих дуплексов — «А» [132] и «А'» [133, 134] характерна конформация с внеспиральным расположением неспаренного аденозина. Несмотря на палиндромную последовательность, оба «лишних» основания ориентированы по-разному (вероятно из-за влияния кристаллической упаковки). Кроме того, локальная структура в районе дефекта отлична для «А» и «А'» дуплексов. Таким образом, в растворе неспаренный остаток аденозина встраивается в двойную спираль, а в кристаллическом состоянии — «выпячивается». Полученные данные указывают на конформационную гибкость подобным образом модифицированных ДНК-дуплексов и способность их при изменении внешних условий легко переходить из одного конформационного состояния в другое.

Изучение конформационных переходов в серии несовершенных палиндромов с вставками лишних остатков аденозина показало [135, 136], что расстояние вставки от «центра симметрии» определяет равновесие между дуплексом и одноцепочечной «шпилькой». На следующей схеме показаны теоретически возможные конформации исследованных олигодезоксирибонуклеотидов:



На основании данных УФ-, ЯМР-спектроскопии и СМК установлено, что введение дополнительных аденозиновых звеньев независимо от их положения в последовательности не вызывает изменения энthalпии комплексообразования.

Моделью двойной спирали с «лишним» остатком гуанозина служил ДНК дуплекс [137]:



На основании данных ПМР-спектроскопии и компьютерного моделирования (инкрементный подход) построена трехмерная модель дуплекса «G». Серии структур, отличающихся длиной двуспиральной последовательности, фланкирующей дефект, оказались очень близки. Дуплекс «G» представляет собой двойную спираль, принадлежащую \bar{B} — семейству; ось спирали изогнута на 18—23°. Как и следовало ожидать, неспаренный остаток встроен в двойную спираль.

В работе [138] исследована структура и устойчивость ДНК-дуплекса «С», содержащего лишней остаток цитидина.

Таблица 4

Термодинамические параметры образования олигонуклеотидных комплексов с неканоническими парами оснований и неспаренными нуклеотидными звеньями *

№	Олигомерные комплексы	Условные обозначения комплексов	Условия комплексообразования	$T_{пл}, ^\circ\text{C}$	$-\Delta H^\circ$, ккал/моль	$-\Delta S^\circ$, э. е.	$-\Delta G^\circ(t, ^\circ\text{C})$, ккал/моль	$\Delta\Delta G^{\circ****}(t, ^\circ\text{C})$, ккал/моль	Ссылки
1	d(CGCGAATTTCGCG) (GCGCTTAAGCGC)d	«GC»	0,01 М фосфат. буфер, pH 7,0, 0,1 мМ ЭДТА, 0,1 М NaCl, c_0^{***} , 0,65 мМ	71,3	102 (74)**	—	—	—	[61]
2	d(CG $\overline{\text{T}}$ GAATTTC $\overline{\text{G}}$ CG) (GC $\overline{\text{G}}$ CTTAAG $\overline{\text{T}}$ GC)d	«GT»	То же	51,3	106 (76)**	—	—	—	[56]
3	d(CG $\overline{\text{A}}$ GAATTTC $\overline{\text{G}}$ CG) (GC $\overline{\text{G}}$ CTTAAC $\overline{\text{A}}$ GC)d	«GA»	»	55,0	—	—	—	—	[99]
4	d(CG $\overline{\text{C}}$ GAATTTC $\overline{\text{A}}$ CG) (GC $\overline{\text{A}}$ CTTAAG $\overline{\text{C}}$ GC)d	«AC»	»	40,0	—	—	—	—	[92]
5	d(CGCGAGAATTC—GCG) (GCG—CTTAAGACGCG)d	«A»	»	52,0	104 (70)**	—	—	—	[129]
6	d(CAACTTGATATTAATA) (GTTGAACTATAATTAT)d	«O»	0,025 М фосфат. 1 мМ каодилят. буфер, pH 7,0, 0,1 мМ ЭДТА, 1 М Na ⁺ , c_0 17,5 мкМ	52,0	102,0	289	15,8 (25°)	—	[66]
7	d(CAACTT $\overline{\text{T}}$ GATATTAATA) (GTTGA $\overline{\text{G}}$ CTATAATTAT)d	«6TG»	То же	45,1	92,6	230	13,2 (25°)	2,6 (25°)	[66]
8	d(CAACTT $\overline{\text{G}}$ ATATTAATA) (GTTGAA $\overline{\text{T}}$ TATAATTAT)d	«7GT»	»	42,9	91,3	264	12,7 (25°)	3,1 (25°)	[66]
9	d(CAACTTG $\overline{\text{A}}$ TATTAATA) (GTTGAAC $\overline{\text{A}}$ ATAATTAT)d	«8AA»	»	42,1	92,0	269	12,6 (25°)	3,2 (25°)	[66]
10	d(CAACTTG $\overline{\text{A}}$ TATTAATA) (GTTGAAC $\overline{\text{C}}$ ATAATTAT)d	«8AC»	»	40,6	90,9	265	12,1 (25°)	3,7 (25°)	[66]
11	d(CAACTTGAT $\overline{\text{T}}$ ATTAATA) (GTTGAACT $\overline{\text{C}}$ TAATTAT)d	«9TC»	»	43,0	98,4	286	13,1 (25°)	2,7 (25°)	[66]
12	d(CAACTTGATAT $\overline{\text{T}}$ TAATA) (GTTGAACTATA $\overline{\text{G}}$ TTAAT)d	«12TG»	»	46,9	95,5	274	14,0 (25°)	1,8 (25°)	[66]

13	d(C A A A A A A G) (G T T T T T T C)d	—	0,01 М фосфат. буфер, pH 7,0, 0,1 мМ ЭДТА, 1 М NaCl, c_0 0,2 мМ	37	59	172	7,8 (25°)	—	[138]
14	d(C A A A C A A A G) (G T T T - T T T C)d	«C»	То же	22	53	161	4,9 (25°)	—	[138]
15	d(C C C A G G G) (G G G T C C C)d	—	Буфер тот же, c_0 0,4 мМ для самокомплементарных олиго- нуклеотидов, 0,1 мМ для не- самокомплементарных	48	63	177	10,0 (25°)	—	[103]
16	d(C C C G G G) (G G G C C C)d	—	То же	43	62	176	9 (25°)	—	[103]
17	d(C C C <u>T</u> G G G) (G G G <u>T</u> C C C)d	—	»	31	60	179	6,7 (25°)	—	[103]
18	d(C C C <u>A</u> G G G) (G G G <u>A</u> C C C)d	—	»	27	60	180	5,9 (25°)	—	[103]
19	d(G A T G G G C A G) (C T A C C C G T C)d	«N»	Буфер тот же, c_0 11,52 мкМ	41,53	68,04	191	—	—	[144]
20	d(G A T G G G - C A G) (C T A C C C C G T C)d	«C _N »	c_0 10,14 мкМ	29,21	60,39	174	—	—	[144]
21	d(G A T G G G - C A G) (C T A C C C A G T C)d	«A _N »	c_0 7,20 мкМ	23,15	51,07	146	—	—	[144]
22	d(C A A A C A A A G) (G T T T G T T T C)d	—	Буфер тот же, c_0 0,4 мМ	48	64,5	183	10,4 (25°)	—	[110]
23	d(C A A A G A A A G) (G T T T C T T T C)d	—	То же	50	62,8	179	9,5 (25°)	—	[110]
24	d(C A A A A A A A G) (G T T T T T T T C)d	—	»	45	68,0	196	9,6 (25°)	—	[110]
25	d(C A A A T A A A G) (G T T T A T T T C)d	—	»	41	58,6	168	8,5 (25°)	—	[110]
26	d(C A A A <u>T</u> A A A G) (G T T T <u>G</u> T T T C)d	—	»	31	55,6	165	6,5 (25°)	—	[110]
27	d(C A A A <u>A</u> A A A G) (G T T T <u>T</u> T T T C)d	—	»	27	46,7	137	5,8 (25°)	—	[110]

Таблица 4 (продолжение)

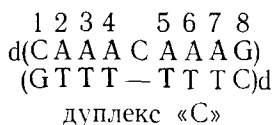
№	Олигомерные комплексы	Условные обозначения комплексов	Условия комплексообразования	$T_{пл}, ^\circ\text{C}$	$-\Delta H^\circ$, ккал/моль	$-\Delta S^\circ$, э. е.	$-\Delta G^\circ (t, ^\circ\text{C})$, ккал/моль	$\Delta\Delta G^{00000} (t, ^\circ\text{C})$, ккал/моль	Ссылки
28	d(C A A A <u>G</u> A A A G) (G T T T <u>G</u> T T T C)d	—	Буфер тот же, c_0 0,4 мМ	30	53,5	158	6,3 (25°)	—	[110]
29	d(C A A A <u>G</u> A A A G) (G T T T <u>A</u> T T T C)d	—	То же	30	52,6	156	6,2 (25°)	—	[110]
30	d(C A A A <u>A</u> A A A G) (G T T T <u>G</u> T T T C)d	—	»	24	39,9	116	5,3 (25°)	—	[110]
31	d(C A A A <u>C</u> A A A G) (G T T T <u>T</u> T T T C)d	—	»	24	53,2	161	5,3 (25°)	—	[110]
32	d(C A A A <u>T</u> A A A G) (G T T T <u>C</u> T T T C)d	—	»	22	50,0	151	5,0 (25°)	—	[110]
33	d(C A A A <u>A</u> A A A G) (G T T T <u>A</u> T T T C)d	—	»	21	36,9	107	5,0 (25°)	—	[110]
34	r(A U G C A U)p p(U A C G U A)r	—	0,01 М фосфат. буфер, pH 7,0, 0,1 мМ ЭДТА, 1 М NaCl, c_0 0,1 мМ	30,2	38,4	108,4	—	—	[86]
35	r(A <u>U</u> G C <u>G</u> U)p p(U <u>G</u> C G <u>U</u> A)r	—	То же	20,3	24,3	64,5	—	0,52 (37°)	[86]
36	r(A U G C G C A U)p p(U A C G C G U A)r	—	»	60,5	38,4	108,4	—	—	[86]
37	r(A <u>U</u> G C G C <u>G</u> U)p p(U <u>G</u> C G C G <u>U</u> A)r	—	»	58,7	54,4	145,8	—	0,88 (37°)	[86]
38	r(A U A C G U A U) (U A U G C A U A)r	—	»	42,0	55,6	158,1	—	—	[86]
39	r(A U <u>G</u> C G <u>U</u> A U)p p(U A <u>U</u> G C <u>G</u> U A)r	—	»	34,6	44,7	127,1	—	1,3 (37°)	[86]

Таблица 4 (окончание)

№	Олигомерные комплексы	Условные обозначения комплексов	Условия комплексообразования	$T_{пл}, ^\circ\text{C}$	$-\Delta H^\circ$, ккал/моль	$-\Delta S^\circ$, э. е.	$-\Delta G^\circ(t, ^\circ\text{C})$, ккал/моль	$\Delta\Delta G^{\circ****}(t, ^\circ\text{C})$, ккал/моль	Ссылки
40	r(AUGUACA U)p p(UACAUGUA)r	—	0,01 М фосфат. буфер, pH 7,0, 0,1 мМ ЭДТА, 1 М NaCl c_0 0,1 мМ	41,8	53,7	152,1	—	—	[86]
41	r(AUG $\overline{\text{U}}\overline{\text{G}}$ CAU)p p(UAC $\overline{\text{G}}\overline{\text{U}}$ GU A)r	—	То же	39,7	54,2	155,0	—	0,32 (37°)	[86]
42	r(GCUAGC) (CGAUCG)r	—	»	49,3	63,0	177,1	—	—	[86]
43	r(GC $\overline{\text{U}}\overline{\text{G}}$ GC) (CG $\overline{\text{G}}\overline{\text{U}}$ CG)r	—	»	41,7	59,1	169,5	—	1,42 (37°)	[86]
44	r(GACGUC) (CUGCA G)r	—	»	46,3	57,3	161,0	—	—	[86]
45	r(G $\overline{\text{G}}$ CG $\overline{\text{U}}$ C) (C $\overline{\text{U}}$ GCG $\overline{\text{G}}$)r	—	»	29,6	37,7	106,1	—	2,58 (37°)	[86]
46	r(CUGCA G)p p(GACGUC)r	—	»	45,4	54,5	153,0	—	—	[86]
47	r(C $\overline{\text{U}}$ GCG $\overline{\text{G}}$) (G $\overline{\text{G}}$ CG $\overline{\text{U}}$ C)r	—	»	27,1	38,7	110,5	—	2,72 (37°)	[86]
48	r(CAGCUG)p p(GUCGA C)r	—	»	43,6	50,2	140,0	—	—	[86]
49	r(C $\overline{\text{G}}$ GC $\overline{\text{U}}$ G) (G $\overline{\text{U}}$ CG $\overline{\text{G}}$ C)r	—	»	35,8	44,3	125,0	—	1,08 (37°)	[86]

* Для сравнения приведены параметры образования немодифицированных комплексов

** В скобках указаны значения $\Delta H_{B-г}^0$ *** c_0 — концентрация олигонуклеотидов.**** $\Delta\Delta G^\circ(t, ^\circ\text{C})$ равна разности $\Delta G^\circ(t, ^\circ\text{C})$ для полностью комплементарного и дефектного комплексов



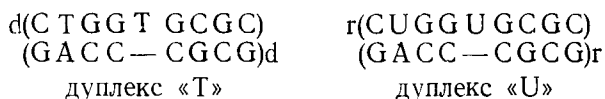
Наличие ЯЭО между иминопротонами dA·dT-пар (положения 4 и 5), а также отсутствие сдвига сигналов необменивающихся протонов неспаренного цитозина в сильное поле при понижении температуры свидетельствует о том, что «лишний» остаток цитидина «выпячен» из спирали и не участвует в стэкинг-взаимодействии с основаниями соседних пар. По-видимому цитозин «выталкивается» соседними пуриновыми основаниями, которые, как известно, обладают повышенной способностью к стэкинг-взаимодействиям. Внеспиральное положение цитидина приводит к дестабилизации дуплекса (дуплексы № 13, 14 в табл. 4 и [110]), причем дестабилизирующий эффект в этом случае имеет энтальпийную природу.

Действительно ли неспаренный цитозин всегда занимает внеспиральное положение. Оказалось, что его конформация зависит от температуры. Так, изучение методом двумерной ЯМР-спектроскопии и анализа параметров ЯЭО ДНК-дуплекса:



показало [139], что при низких температурах (0°С) «лишний» цитидин находится вне спирали, а соседние с ним основания участвуют в стэкинг-взаимодействии. С ростом температуры конформационное равновесие смещается в сторону образования структур, в которых остаток цитидина встроен в дуплекс (>40°С). Следует отметить, что нарушения в сахарофосфатном остоле распространяются на район, удаленный от места дефекта.

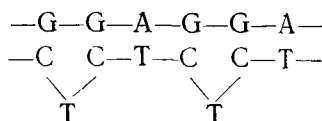
Еще более интересные результаты были получены при изучении конформационных особенностей других неспаренных пиримидиновых оснований — тимина и урацила — в дуплексах «Т» [140] и «У» [141]:



Эти дуплексы, имеющие аналогичную последовательность, различаются только принадлежностью нуклеотидных остатков к дезокси- или риборяду. Совокупность данных ЯМР-спектроскопии, параметры ЯЭО, температурная зависимость хим. сдвигов сигналов протонов и др. указывают на то, что неспаренные остатки тимидина встраиваются в дуплекс «Т». Причем, согласно результатам компьютерного моделирования, внедрение «лишнего» тимина не вызывает заметных изменений структуры В-ДНК: спаривание оснований не нарушается, нет больших искажений в значениях торсионных углов. Отметим, что в случае интеркаляции более объемистого остатка аденина возмущения структуры были гораздо более выражены.

В отличие от остатков тимидина, уридин в дуплексе «У» предпочитает находиться вне спирали. При этом регулярная структура А-РНК практически не нарушается. Авторы полагают, что разница в поведении этих оснований в ДНК- и РНК-дуплексах объясняется разной склонностью тимина и урацила к стэкинг-взаимодействиям.

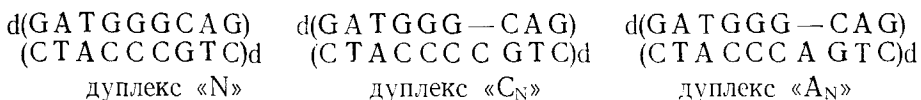
Если неспаренные остатки тимидина не единичны, а регулярно и часто встречаются в дуплексе, то для них более характерным является внеспиральное расположение. Такая конформация постулируется для полимерного дуплекса poly[d(GGA)]·poly[d(TC)] [142] на основании данных по образованию фотодимеров цитидина:



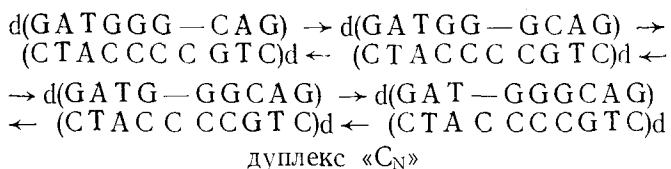
Установлено, что «лишние» остатки тимидина не нарушают кооперативности плавления, однако значительно уменьшают устойчивость дефектной спирали по сравнению с правильной poly[d(GGA)] · poly[d(TCC)].

Аналогичный вывод о внеспиральном расположении неспаренных остатков тимидина делается на основании изучения дуплекса poly[d(GA)] · poly[d(TTC)] [143].

Методом ЯМР-спектроскопии были получены интересные данные о стабильности и динамике серии дуплексов с нуклеотидной последовательностью, соответствующей «горячей точке» мутаций со сдвигом рамки [144]:



Оказалось, что неспаренный аденозин оказывает главным образом локальное влияние на устойчивость нуклеотидных пар (дуплекс «A_N»), а для неспаренного цитидина характерна делокализация дестабилизирующего эффекта вдоль G·C-тракта дуплекса «C_N» за счет миграции дефекта:



Более высокую термическую устойчивость дуплекса «C_N» по сравнению с дуплексом «A_N» ($\Delta T_{пл}$ 5,7°C) авторы объясняют позиционной вырожденностью дефекта (неспаренного цитозина) и связанным с этим увеличением энтропии. Следует отметить, что результаты работы [144] по ряду пунктов, связанных с характером влияния «лишнего» аденозина на устойчивость пар дуплекса и энтальпию комплексообразования, противоречат результатам и выводам работ [57, 64, 129].

В следующей работе этой серии изучалась конформационная динамика «лишнего» остатка гуанозина, локализованного в G·C-тракте аналогичного дуплекса [145]. Наличие свободных иминопротонов неспаренного гуанозина позволило следить за миграцией дефекта. Оказалось, что «лишнее» звено занимает все возможные позиции, хотя на концах тракта — менее часто. Нельзя с определенностью сказать, что скорость миграции дефекта одинакова для олигопуриновых и олигопиримидиновых последовательностей. Что касается расположения «лишнего» основания относительно дуплекса, то экспериментальные данные свидетельствуют о том, что неспаренные пуриновые основания включаются в двойную спираль, в то время как пиримидиновые — находятся в равновесии между внутри- и внеспиральной конформацией.

В целом, можно сказать, что приемы с помощью которых ДНК нейтрализует возмущения, индуцированные неспаренными основаниями, достаточно разнообразны и зависят от локального «стэкинга» оснований, природы лишнего звена, гибкости сахарофосфатного остова и нуклеотидной последовательности.

2. Олигонуклеотидные дуплексы, фланкированные неспаренными звеньями

Влияние концевых неспаренных нуклеотидов на стабильность двойных спиралей НК исследовано, главным образом, на коротких рибонуклеотидных дуплексах [146—159]. Анализируя имеющиеся в литературе данные (табл. 5), можно сделать следующие выводы.

Фланкирование двойной спирали неспаренным концевым остатком приводит к повышению прочности дуплекса.

Термодинамические параметры образования олигонуклеотидных комплексов, фланкированных неспаренными нуклеотидными остатками *

№	Комплексы	Условия комплексообразования	$T_{пл}, ^\circ\text{C}$	$-\Delta H^{0**},$ ккал/ /моль	$-\Delta S^0,$ э. е.	$-\Delta G^0 (t ^\circ\text{C}),$ ккал/моль	Ссылки
1	r(C C G G) (G G C C)r	0,01 М какодилат. буфер, pH 7,0, 1 мМ ЭДТА, 1 М NaCl, c_0^{***} 0,1 мМ	27,1	34,7	97,1	4,41 (39°)	[152]
2	r(A C C G G)p p(G G C C A)r	То же	36,4	39,7	109,9	5,44 (39°)	[152]
3	r(C C G G U)p p(U G G C C)r	»	37,8	42,8	119,3	5,60 (39°)	[152]
4	r(C C G G A)p p(A G G C C)r	»	44,6	47,3	130,4	6,57 (39°)	[152]
5	r(G C C G G)p p(G G C C G)r	0,01 М фосф. буфер, pH 7,0, 0,5 мМ ЭДТА, 1 М NaCl, c_0 0,1 мМ	31,0	34	93	—	[158]
6	r(U C C G G)p p(G G C C U)r	То же	29,7	37	104	—	[158]
7	r(C C G G C)p p(C G G C C)r	»	34,4	40,3	113	—	[154]
8	r(C C G G G)p p(G G G C C)r	»	46,5	48,3	133	—	[154]
9	r(G G C C) (C C G G)r	»	35,0	36,0	98	—	[154]
10	r(A G G C C)p p(C C G G A)r	»	38,3	37,9	103	—	[158]
11	r(C G G C C)p p(C C G G C)r	»	39,3	35,1	94	—	[158]
12	r(U G G C C)p p(C C G G U)r	»	34,5	35,6	97	—	[158]
13	r(G G C C C)p p(C C C G G)r	»	47,5	41,7	112	—	[154]
14	r(G G C C U)p p(U C C G G)r	»	51,5	48,3	130	—	[154]
15	r(G G C C G)p p(G C C G G)r	»	57,5	52,3	140	—	[154]
16	r(G G C C A)p p(A C C G G)r	»	58,0	51,5	137	—	[154]
17	r(G C G C) (C G C G)r	0,005 М фосф. бу- фер, pH 7,0, 0,5 мМ ЭДТА, 1 М NaCl, c_0 1 мМ	27,4	32,3	89,0	—	[157]
18	r(G G C G C)p p(C G C G G)r	То же	28,8	35,3	98,7	—	[157]
19	r(U G C G C) (C G C G U)r	»	31,5	29,2	77,6	—	[157]
20	r(G C G C A)p p(A C G C G)r	»	51,9	50,0	135,7	—	[157]
21	r(G C G C C)p p(C C G C G)r	»	41,3	39,2	106,2	—	[157]
22	r(G C G C G)p p(G C G C G)r	»	50,7	47,9	129,5	—	[157]
23	r(G C G C U)p p(U C G C G)r	»	45,5	45,5	124,6	—	[157]
24	d(G A A T T C G C G) (G C G C T T A A G)d	0,01 М фосф. буфер, pH 7,0, 0,1 мМ ЭДТА, 1 М NaCl, c_0 0,7 мМ	46,3	60 (35)	—	—	[155]

Таблица 5 (окончание)

№	Комплексы	Условия комплексообразования	$T_{пл}, ^\circ\text{C}$	$-\Delta H^{0**},$ ккал/ моль	$-\Delta\Delta^0,$ э. е.	$-\Delta G^0 (t ^\circ\text{C}),$ ккал/моль	Ссылки
25	d(G G A A T T C C) (C C T T A A G G)d	0,01 М фосф. буфер, pH 7,0, 0,1 мМ ЭДТА, 1 М NaCl, c_0 0,7 мМ	52,5	59 (59)	—	—	[155]

* Для сравнения приведены данные для полностью комплементарных комплексов

** В скобках указаны значения $\Delta H_{B..T}^0$

*** c_0 — концентрация олигонуклеотидов

Стабилизация осуществляется за счет дополнительных межплоскостных взаимодействий неспаренного остатка с концевым спаренным основанием противоположной цепи; при этом происходит уменьшение эффекта «обтрепывания» концевых пар.

Повышение прочности обусловлено благоприятным изменением энтальпии комплексообразования (вклад дополнительного «стэкинга») перекрывающим неблагоприятный энтропийный эффект (уменьшение «свободы» висящего остатка) по сравнению с полностью комплементарным дуплексом.

Установлен следующий порядок стабилизации неспаренными остатками: $G \approx A > U \approx C$, т. е. пуриновые основания более эффективны, чем пиримидиновые. Аналогичная зависимость устойчивости дуплексов наблюдается и от природы основания, с которым перекрывается неспаренный остаток.

В спиралях риборяда 3'-концевое основание в большей степени повышает прочность, чем основание, расположенное на 5'-конце. В дезоксирибонуклеотидных дуплексах, наоборот, больший вклад в стабилизацию вносит 5'-концевое звено [112]. По-видимому, это связано с различиями в структуре А- и В-форм.

Наличие на концах дуплекса более, чем одного неспаренного остатка наоборот понижает прочность двойной спирали [155].

* *

*

За время подготовки рукописи к печати появился ряд публикаций по теме обзора.

В работе [160] методом КР показано, что некомплементарная G·Т-пара вызывает более сильное нарушение В-ДНК (раствор), чем Z-ДНК (кристаллическое состояние). Аргументируется предположение, что именно этот метод наиболее информативен для определения геометрии фосфодиэфирных связей вблизи некомплементарных пар.

Сравнительное изучение тонкой структуры ДНК-дуплексов в А-форме, один из которых содержит две рядом расположенные G·Т-пары, а другие являются немодифицированными аналогами, проведено методом РСА (1,7 А) [161]. Исследована также термическая устойчивость несовершенных и полностью комплементарных двойных спиралей (УФ-спектроскопия).

С помощью ЯМР-спектроскопии изучены структурные черты пиримидин-пиримидиновых некомплементарных пар — С·С и Т·Т, входящих в состав 12-звенных ДНК-дуплексов [162]:



Показано, что две имино-карбонильные водородные связи, стабилизирующие Т·Т-пару, слабее соответствующих связей в паре G·T. Что касается С·С-пары, то экспериментальные данные не дают возможности корректного выбора между несколькими схемами спаривания. Очевидно лишь, что одно из оснований пары должно быть протонировано.

В статье [163] изучается возможность образования С·С⁺-пар в 2-, 3- или 6-звенных цитозиновых трактах, локализованных внутри антипараллельного ДНК-дуплекса. Ранее было показано, что на концах антипараллельного дуплекса подобные пары образуются [121]. Согласно полученным методом КД данным, ни в одном из исследованных дуплексов спаривания цитидиновых остатков не происходит.

Проанализирована взаимосвязь между термодинамическими параметрами плавления дефектных дуплексов, образованных матричной ДНК и декануклеотидными праймерами, содержащими на 3'-конце некомплементарные основания (варианты некомплементарных пар — G·T, C·T и T·T) и точностью репликации ДНК [164]. Обсуждаются причины неоднозначной корреляции.

Обнаружено влияние нуклеотидной последовательности матричной ДНК на тип образующейся некомплементарной пары в процессе ДНК-полимеразной реакции [165]. Частоту ошибок при считывании искусственно увеличивали тем, что использовали только три из четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.

В теоретической работе [166] обсуждается дополнительная возможность образования неканонических пар. Согласно расчетам энергии межмолекулярных взаимодействий (ААПФ), в альтернативных схемах спаривания одно из оснований находится в *син*-ориентации, а в образовании водородных связей участвует молекула воды. По мнению авторов такие пары будут ближе по геометрическим параметрам к уотсон-криковским.

Влияние концевых некомплементарных пар (A·C, A·A и A·G) на термическую стабильность олигорибонуклеотидных дуплексов обсуждается в [167].

Биморфная структура poly(rA)·poly(dT) подтверждена методом комбинационного рассеяния [168].

На серии олигомерных ДНК-, РНК- и гибридных РНК·ДНК-дуплексов проведено сравнительное изучение термической стабильности и вторичной структуры (УФ-спектроскопия и КД) [169]. Показано, что наиболее устойчивым является рибонуклеотидный дуплекс, гибридные дуплексы занимают промежуточное положение. Для последних характерна А-форма двойной спирали, хотя и не полностью идентичная А-РНК.

В работе [170] изучено влияние на термодинамические и структурные характеристики двойных спиралей двух неспаренных остатков тимидина, фланкирующих с 3'- или 5'-конца гексануклеотидные дуплексы [d(GC)₃]₂ или [d(CG)₃]₂. С помощью методов УФ- и ЯМР-спектроскопии, КД и компьютерного моделирования обнаружено, что наличие тимидиновых остатков стабилизирует двойную спираль за счет стэкинг-взаимодействия неспаренных оснований, причем эффект больше в случае 5'-концевых заместителей.

Для 14-шпильчатых рибонуклеотидных структур определен индивидуальный термодинамический вклад четырехзвенной петли и неспаренного основания в двуспиральном участке [171]. Показано, что дестабилизирующий эффект неспаренного пурина больше, чем пиримидина и зависит от нуклеотидной последовательности прилегающих к дефекту участков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sugino A., Hirose S., Okazaki R. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1972. V. 69. № 7. P. 1863.
2. Уотсон Д. // Молекулярная биология гена / Пер. с англ. М.: Мир, 1978. С. 276.
3. Gerchman L. L., Ludlum D. B. // Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 308. P. 310.
4. Lasken R. S., Goodman M. F. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 18. P. 11491.
5. Uhlenbeck O. C., Baller J., Doty P. // Nature. 1970. V. 225. № 5232. P. 508.
6. Quigley G. J., Seeman N. G., Wang A. H.-J. et al. // Nucleic Acids Res. 1975. V. 2. № 12. P. 2329.
7. Mikelsaar R. // J. theor. Biol. 1981. V. 92. P. 163.

8. Traub W., Sussman J. L.//Nucleic Acids Res. 1982. V. 10. № 8. P. 2701.
9. Wallace R. B., Studencki A. B., Murasugi A.//Biochimie. 1985. V. 67. P. 755.
10. Kennard O.//Nucleic Acids and Molecular Biology/Eds F. Eckstein, D. M. J. Lilley, Berlin — Heidelberg: Springer-Verlag, 1987. V. 1. P. 25.
11. Patel D. J., Shapiro L., Hare D.//Nucleic Acids and Molecular Biology/Eds F. Eckstein, D. M. J. Lilley, Berlin — Heidelberg: Springer-Verlag, 1987. V. 1. P. 70.
12. Brown T., Kennard O., Kneale G., Rabinovich D.//Nucleosides. Nucleotides. 1985. V. 4. № 1—2. P. 255.
13. Brown T., Hunter W. N., Kneale G., Kennard O.//Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1986. V. 83. № 8. P. 2402.
14. Saper M. A., Eldur H., Mizuuchi K. et al.//J. Mol. Biol. 1986. V. 188. № 1. P. 111.
15. Arnott S., Chandrasekaran R., Millane R. P., Park H.-S.//Ibid. 1986. V. 188. № 4. P. 631.
16. Долинная Н. Г., Громоса Е. С.//Успехи. химии. 1983. Т. 52. № 1. С. 138.
17. Pardi A., Tinoco I.//Biochemistry. 1982. V. 21. № 19. P. 4686.
18. Tropp J., Redfield A. G.//Ibid. 1981. V. 20. № 8. P. 2133.
19. Матвеев С. Б., Филимонов В. В., Привалов П. Л.//Молекуляр. биология. 1982. Т. 16. Вып. 6. С. 1234.
20. Gralla J., Crothers D. M.//J. Mol. Biol. 1973. V. 73. № 4. P. 483.
21. Craig M. E., Crothers D. M., Doty P.//Ibid. 1971. V. 62. № 2. P. 383.
22. Benevides J. M., Wang A. H.-J., Rich A. et al.//Biochemistry. 1986. V. 25. № 1. P. 41.
23. Chuprina V. P., Poltev V. I.//Nucleic Acids Res. 1983. V. 11. № 15. P. 5205.
24. Флорентьев В. Л.//Висорг. химия. 1982. Т. 8. № 7. С. 885.
25. Milman G., Langridge R., Chamberlin M. I.//Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1967. V. 57. № 6. P. 1894.
26. Heguchi S., Tsuboi M., Itaka Y.//Biopolymers. 1969. V. 7. № 6. P. 909.
27. Tunis M.-J. B., Hearst J. E.//Ibid. 1968. V. 6. № 8. P. 1218.
28. Gray D. M., Ratliff R. L.//Ibid. 1975. V. 14. № 3. P. 487.
29. Pardi A., Martin F. H., Tinoco I.//Biochemistry. 1981. V. 20. № 14. P. 3986.
30. Martin F. H., Tinoco I.//Nucleic Acids Res. 1980. V. 8. № 10. P. 2295.
31. Stealy H. T., Gray D. M., Ratliff R. L.//Ibid. 1986. V. 14. № 24. P. 10071.
32. Zimmerman S. B., Pfeiffer B. H.//Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1981. V. 78. № 1. P. 78.
33. Shindo H., Matsumoto U.//J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 14. P. 8682.
34. Gupta G., Sarma M. H., Sarma R. H.//J. Mol. Biol. 1985. V. 186. № 2. P. 463.
35. Arnott S., Bond P. J., Selsing E., Smith P. J. C.//Nucleic Acids Res. 1976. V. 3. № 10. P. 2459.
36. Reid D. G., Salisbury S. A. et al.//Eur. J. Biochem. 1983. V. 135. № 2. P. 307.
37. Wu H.-Y., Behe M. J.//Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1984. V. 81. № 23. P. 7284.
38. Behe M. J.//Biopolymers. 1986. V. 25. № 3. P. 519.
39. Jayasena S. D., Behe M. J.//Nucleic Acids Res. 1987. V. 15. № 9. P. 3907.
40. Dickerson R. E., Drew H. R., Conner B. N. et al.//Science. 1982. V. 216. P. 475.
41. Wang A. H.-J., Fujii S., van Boom J. H. et al.//Nature. 1982. V. 299. № 5884. P. 601.
42. Mellema J.-R., Haasnoot C. A. G., van der Marel G. A. et al.//Nucleic Acids Res. 1983. V. 11. № 16. P. 5717.
43. Selsing E., Wells R. D., Early T. A., Kearns D. R.//Nature. 1978. V. 275. № 5677. P. 249.
44. Selsing E., Wells R. D.//J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 12. P. 5410.
45. Selsing E., Wells R. D., Alden C. I., Arnott S.//Ibid. 1979. V. 254. № 12. P. 5417.
46. Nelson J. W., Tinoco I.//Biochemistry. 1982. V. 21. № 21. P. 5289.
47. Riley M., Maling B., Chamberlin M. I.//J. Mol. Biol. 1966. V. 20. № 2. P. 359.
48. Dewey T. G., Turner D. H.//Biochemistry. 1979. V. 18. № 26. P. 5757.
49. Chamberlin M., Berg P.//J. Mol. Biol. 1964. V. 8. № 2. P. 297.
50. Gillam S., Waterman K., Smith M.//Nucleic Acids Res. 1975. V. 2. № 5. P. 625.
51. O'Brein E. J., MacEvan A. W.//J. Mol. Biol. 1970. V. 48. № 2. P. 243.
52. Takashima H., Nakanishi M., Tsuboi M.//Biochemistry. 1985. V. 24. № 18. P. 4823.
53. Crick F. H. C.//J. Mol. Biol. 1966. V. 19. № 2. P. 548.
54. Keepers J. W., Schmidt P., James T. L., Kollman P. A.//Biopolymers. 1984. V. 23. № 12. P. 2901.
55. Chuprina V. P., Poltev V. I.//Nucleic Acids Res. 1985. V. 13. № 1. P. 141.
56. Patel D. J., Kozłowski S. A., Marky L. A. et al.//Biochemistry. 1982. V. 21. № 3. P. 437.
57. Pardi A., Morden K. M., Patel D. J., Tinoco I.//Ibid. 1982. V. 21. № 25. P. 6567.
58. Patel D. J., Pardi A., Itakura K.//Science. 1982. V. 216. № 4546. P. 581.
59. Marky L. A., Kozłowski S. A., Breslauer K. J.//Biophys. J. 1981. V. 33. № 2. Pt 2. P. 318a.
60. Hare D., Shapiro L., Patel D. J.//Biochemistry. 1986. V. 25. № 23. P. 7445.
61. Patel D. J., Kozłowski S. A., Marky L. A. et al.//Biochemistry. 1982. V. 21. № 3. P. 428.
62. Dickerson R. E., Drew H. R.//J. Mol. Biol. 1981. V. 149. № 4. P. 761.
63. Hare D. R., Wemmer D. E., Chou S.-H. et al.//J. Mol. Biol. 1983. V. 171. № 3. P. 319.
64. Chu Y. G., Tinoco I.//Biopolymers. 1983. V. 22. № 4. P. 1235.
65. Porschke D., Eigen M.//J. Mol. Biol. 1971. V. 62. № 2. P. 361.

66. Tibanyenda N., de Bruin S. H., Haasnoot C. A. G. et al.//Eur. J. Biochem. 1984. V. 139. № 1. P. 19.
67. Quignard E., Fazakerley G. V., van der Marel G. et al.//Nucleic Acids Res. 1987. V. 15. № 8. P. 3397.
68. Hunter W. N., Brown T., Kneale G. et al.//J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 21. P. 9962.
69. Greene P. J., Poonian M. S., Nussbaum A. L. et al.//J. Mol. Biol. 1975. V. 99. № 2. P. 237.
70. Shenoy S., Daigle K., Ehrlich K. C. et al.//Nucleic Acids Res. 1986. V. 14. № 11. P. 4407.
71. Brown T., Kennard O., Kneale G., Rabinovich D.//Nature. 1985. V. 315. № 6020. P. 604.
72. Kneale G., Brown T., Kennard O., Rabinovich D.//J. Mol. Biol. 1985. V. 186. № 4. P. 805.
73. Hunter W. N., Kneale G., Brown T. et al.//Ibid. 1986. V. 190. № 4. P. 605.
74. McCall M., Brown T., Kennard O.//Ibid. 1985. V. 183. № 3. P. 385.
75. Ho P. S., Frederick C. A., Quigley G. J. et al.//Embo J. 1985. V. 4. № 13A. P. 3617.
76. Krugh T. R., Young M. A.//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1975. V. 62. № 4. P. 1025.
77. Young M. A., Krugh T. R.//Biochemistry. 1975. V. 14. № 22. P. 4841.
78. Lezius A. G., Domin E.//Nature New Biology. 1973. V. 244. № 136. P. 169.
79. Gray D. M., Ratliff R. L.//Biopolymers. 1977. V. 16. № 6. P. 1331.
80. Early T. A., Olmsted J., Kearns D. R., Lezius A. G.//Nucleic Acids Res. 1978. V. 5. № 6. P. 1955.
81. Millican T. A., Mock G. A., Chauncey M. A. et al.//Ibid. 1984. V. 12. № 19. P. 7435.
82. Salisbury S. A., Anand N. A.//J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1985. P. 985.
83. Mizuno H., Tomita K., Nakagawa E. et al.//J. Mol. Biol. 1981. V. 148. № 1. P. 103.
84. Romaniuk P. J., Hughes D. W., Grégoire R. J. et al.//Biochemistry. 1979. V. 18. № 23. P. 5109.
85. Aikema D., Hader P. A., Bell R. A., Neilson T.//Ibid. 1982. V. 21. № 9. P. 2109.
86. Sugimoto N., Kierzek R., Freier S. M., Turner D. H.//Ibid. 1986. V. 25. № 19. P. 5755.
87. Podder S. K.//Nature New Biology. 1971. V. 232. № 30. P. 115.
88. Bautz K. F., Bautz F. A.//Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1964. V. 52. № 6. P. 1476.
89. Ackermann T., Gramlich V., Klump H. et al.//Biophys. Chem. 1979. V. 10. № 3. P. 231.
90. Uhlenbeck O. C., Martin F. H., Doty P.//J. Mol. Biol. 1971. V. 57. № 2. P. 217.
91. Freier S. M., Kierzek R., Caruthers M. H. et al.//Biochemistry. 1986. V. 25. № 11. P. 3209.
92. Patel D. J., Kozłowski S. A., Ikuta S., Itakura K.//Biochemistry. 1984. V. 23. № 14. P. 3218.
93. Gao X., Patel D. J.//J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 35. P. 16973.
94. Sarma M. H., Gupta G., Sarma R. H. et al.//Biochemistry. 1987. V. 26. № 24. P. 7707.
95. Hunter W. N., Brown T., Kennard O.//Nucleic Acids Res. 1987. V. 15. № 16. P. 6589.
96. Hunter W. N., Brown T., Anand N. N., Kennard O.//Nature. 1986. V. 320. № 6062. P. 552.
97. Wallace R. B., Shaffer I., Murphy R. F. et al.//Nucleic Acids Res. 1979. V. 6. № 11. P. 3543.
98. Evans D. H., Morgan A. R.//Ibid. 1986. V. 14. № 10. P. 4267.
99. Patel D. J., Kozłowski S. A., Ikuta S., Itakura K.//Biochemistry. 1984. V. 23. № 14. P. 3207.
100. Kan L.-S., Chandrasegaran S., Pulford S. M., Miller P. S.//Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1983. V. 80. P. 4263.
101. Privé G. G., Heinemann U., Chandrasegaran S. et al.//Science. 1987. V. 238. № 4826. P. 498.
102. Hunter W. N., Brown T., Kennard O.//J. Biomol. Struct. Dynam. 1986. V. 4. № 2. P. 173.
103. Arnold F. N., Wolk S., Cruz P., Tinoco I.//Biochemistry. 1987. V. 26. № 13. P. 4068.
104. Dodgson J. B., Wells B. D.//Ibid. 1977. V. 16. № 11. P. 2367.
105. Patel D. J., Kozłowski S. A., Ikuta S., Itakura K.//Fed. Proc. 1984. V. 43. № 11. P. 2663.
106. Lomant A. J., Fresco J. R.//J. Mol. Biol. 1973. V. 77. № 3. P. 345.
107. Fresco J. R., Alberts M. B.//Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1960. V. 46. № 3. P. 311.
108. Steiner R. F.//J. Biol. Chem. 1960. V. 235. № 10. P. 2946.
109. Lomant A. J., Fresco J. F.//Biopolymers. 1973. V. 12. № 8. P. 1889.
110. Aboul-ela F., Koh D., Tinoco I., Martin F. H.//Nucleic Acids Res. 1985. V. 13. № 13. P. 4811.
111. Cornelis A. G., Haasnoot J. H. J., den Hartog J. F. et al.//Nature (London). 1979. V. 281. № 5728. P. 235.
112. Mellema J.-R., van der Woerd R., van der Marel G. A. et al.//Nucleic Acids Res. 1984. V. 12. № 12. P. 5061.
113. Summers M. F., Byrd R. A., Gallo K. A. et al.//Nucleic Acids Res. 1985. V. 13. № 17. P. 6375.

114. Haasnoot C. A. G., den Hartog J. H. J., de Rooij J. F. M. et al. *Ibid.* 1980. V. 8. №1. P. 169.
115. Hilbers C. W., Haasnoot C. A. G., de Bruin S. H. et al. *Biochimie*. 1985. V. 67. P. 685.
116. Ikuta S., Chattopadhyaya R., Ito H. et al. *Biochemistry*. 1986. V. 26. № 17. P. 4840.
117. Xodo L. E., Manzini G., Quadrioglio F. et al. *Nucleic Acids Res.* 1986. V. 14. № 13. P. 5389.
118. Martin F. H., Uhlenbeck O. C., Doty P. *J. Mol. Biol.* 1971. V. 57. № 2. P. 201.
119. Uhlenbeck O. C., Borer P. N., Dengler B., Tinoco I. *Ibid.* 1973. V. 73. № 4. P. 483.
120. Hosur R. V., Sheth A., Chary K. V. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986. V. 139. № 3. P. 1224.
121. Gray D. M., Cui T., Ratcliff R. L. *Nucleic Acids Res.* 1984. V. 12. № 19. P. 7565.
122. Hartman K. A., Rich A. *J. Amer. Chem. Soc.* 1965. V. 87. № 9. P. 2033.
123. Inman R. B. *J. Mol. Biol.* 1964. V. 9. № 3. P. 624.
124. Gray D. M., Vaughan M., Ratcliff R. L., Hayes F. N. *Nucleic Acids Res.* 1980. V. 8. № 16. P. 3695.
125. Ninio J. *Biochimie*. 1979. V. 61. P. 1133.
126. Ikuta S., Takagi K., Wallace R. B., Itakura K. *Nucleic Acids Res.* 1987. V. 15. № 2.
127. Werniges H., Steger G., Riesner D., Fritz H.-J. *Nucleic Acids Res.* 1986. V. 14. № 9. P. 3773.
128. Kramer B., Kramer W., Fritz H.-J. *Cell*. 1984. V. 38. № 3. P. 879.
129. Patel D. J., Koslowski S. A., Marky L. A. et al. *Biochemistry*. 1982. V. 21. № 3.
130. Hare D., Shapiro L., Patel N. J. *Biochemistry*. 1986. V. 25. № 23. P. 7456.
131. Roy S., Sklenar B., Appella E., Cohen J. S. *Biopolymers*. 1987. V. 26. № 12.
132. Joshua-Tor L., Rabinovich D., Hope H. et al. *Nature*. 1988. V. 334. № 6177. P. 82.
133. Miller M., Wlodawer R., Appella E., Sussman J. L. *J. Mol. Biol.* 1987. V. 195. № 4. P. 967.
134. Miller M., Harrison R. W., Wlodawer A. et al. *Nature*. 1988. V. 334. P. 85.
135. Miller M., Kirchhoff W., Schwarz F. et al. *Nucleic Acids Res.* 1987. V. 15. № 9.
136. Roy S., Weinstein S., Borah B. et al. *Biochemistry*. 1986. V. 25. No 23. P. 7417.
137. Woodson S. A., Crothers D. M. *Ibid.* 1988. V. 27. № 9. P. 3130.
138. Morden K. M., Chu Y. G., Martin F. H., Tinoco I. *Ibid.* 1983. V. 22. № 24. P. 5557.
139. Kalnik M. W., Norman D. G., Zagorski M. G. et al. *Ibid.* 1989. V. 28. № 1. P. 294.
140. Van den Hoogen Y. T., van Beuzekom A. A., van den Elst H. et al. *Nucleic Acids Res.* 1988. V. 16. № 7. P. 2971.
141. Van den Hoogen Y. T., van Beuzekom A. A., de Vroom E. et al. *Ibid.* 1988. V. 16. № 11. P. 5013.
142. Evans D. H., Morgan A. R. *J. Mol. Biol.* 1982. V. 160. № 1. P. 117.
143. Evans D. H., Morgan A. R. *Nucleic Acids Res.* 1986. № 14. P. 4267.
144. Woodson S. A., Crothers D. M. *Biochemistry*. 1987. V. 26. № 3. P. 904.
145. Woodson S. A., Crothers D. M. *Ibid.* 1988. V. 27. № 1. P. 436.
146. England T. E., Neilson T. *Can. J. Biochem.* 1975. V. 55. P. 365.
147. Alkema D., Bell R. A., Hader P. A., Neilson T. *J. Amer. Chem. Soc.* 1981. V. 103. № 10. P. 2866.
148. D'Andrea P. L., Alkema D., Bell R. A. et al. *Ibid.* 1983. V. 105. N 3. P. 636.
149. Romaniuk P. J., Hughes D. W., Gregoire R. J. et al. *Ibid.* 1978. V. 100. № 12.
150. Alkema D., Bell R. A., Hader P. A., Neilson T. *FEBS Lett.* 1981. V. 136. № 1. P. 70.
151. Neilson T., Romaniuk P. J., Alkema D. et al. *Nucleic Acids Res.* 1980. Symp. Ser. № 7. P. 293.
152. Petersheim M., Turner D. H. *Biochemistry*. 1983. V. 22. № 2. P. 256.
153. Petersheim M., Turner D. H. *Ibid.* 1983. V. 22. № 2. P. 269.
154. Freier S. M., Burger B. J., Alkema D. et al. *Ibid.* 1983. V. 22. № 26. P. 6198.
155. Patel D. J., Kozlowski S. A., Marky L. A. et al. *Ibid.* 1982. V. 21. № 3. P. 451.
156. Nelson J. W., Martin F. H., Tinoco I. *Biopolymers*. 1981. V. 20. № 12. P. 2509.
157. Freier S. M., Sugimoto N., Sinclair A. et al. *Biochemistry*. 1986. V. 25. № 11.
158. Freier S. M., Alkema D., Sinclair A. et al. *Ibid.* 1985. V. 24. № 17. P. 4533.
159. Petersheim M., Turner D. H. *Ibid.* 1983. V. 22. № 2. P. 264.
160. Benevides J. M., Wang A. H.-J., van der Marel G. A. et al. *Ibid.* 1989. V. 28. № 1.
161. Rabinovich D., Haran T., Eisenstein M., Shaked Z. *J. Mol. Biol.* 1988. V. 200.
162. Kouchakdjian M., Li B. F. L., Swann P. F., Patel D. J. *Ibid.* 1988. V. 202. P. 139.
163. Edwards E. L., Ratliff R. L., Gray D. M. *Biochemistry*. 1988. V. 27. No 14. P. 5166.
164. Petruska J., Goodman M. F., Boosalis M. S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 6252.
165. Lai M.-D., Beattie K. L. *Biochemistry*. 1988. V. 27. No 5. P. 1722.
166. Штейнберг С. В., Поляев В. И. *Биофизика*. 1988. Т. 33. № 6. С. 922.
167. Hickey D. R., Turner D. H. *Biochemistry*. 1985. V. 24. № 15. P. 3987.
168. Benevides J. M., Thomas G. J. *Ibid.* 1988. V. 27. № 10. P. 3868.
169. Walker G. T. *Nucleic Acids Res.* 1988. V. 16. № 7. P. 3091.
170. Senior M., Jones R. A., Breslauer K. J. *Biochemistry*. 1988. V. 27. № 10. P. 3879.
171. Groebe D. R., Uhlenbeck O. C. *Ibid.* 1989. V. 28. № 2. P. 742.