

Несовершенные комплексы нуклеиновых кислот и их биохимическое проявление

М.А.Зенкова, Г.Г.Карпова

Новосибирский институт биоорганической химии

Сибирского отделения Российской академии наук

630090 Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 8, факс (383–2) 35–1665

Обзор посвящен анализу экспериментальных данных по селективности взаимодействия нуклеиновых кислот с антисмысловыми олигонуклеотидами и их производными, открывающими перспективу высокоизбирательного воздействия на многие биохимические и молекулярно-генетические процессы в живых организмах. В обзоре рассмотрены теоретические оценки уровня специфичности взаимодействия нуклеиновых кислот и термодинамические параметры образования совершенных и несовершенных комплементарных комплексов. Особое внимание уделено комплементационной точности взаимодействия ДНК и РНК с олигонуклеотидами и их производными в различных модельных системах как *in vitro*, так и *in vivo*. Проанализированы данные по специфичности ингибирования трансляции с помощью антисмысловых олигонуклеотидов в модельных системах *in vitro*. Обсуждается вопрос о влиянии пространственной структуры молекулы нуклеиновой кислоты на точность и эффективность взаимодействия с антисмысловыми олигонуклеотидами и их производными.

Библиография – 247 ссылок.

Оглавление

I. Введение	414
II. Теоретические оценки специфичности взаимодействия нуклеиновых кислот	415
III. Термодинамические параметры образования совершенных и несовершенных дуплексов и особенности их пространственной структуры	415
IV. Точность взаимодействия молекул РНК и ДНК с олигонуклеотидами и их производными	422
V. Заключение	431

I. Введение

Кардинальное значение в обеспечении ключевых процессов жизнедеятельности имеет селективное взаимодействие между нуклеиновыми кислотами. Достаточно напомнить, что специфическое взаимодействие комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот лежит в основе установленной Уотсоном и Криком двуспиральной структуры ДНК. Именно принцип комплементарности определяет селективное взаимодействие нуклеиновых кислот с антисмысловыми РНК, олигонуклеотидами и их производными. (Такие соединения называют антисмысловыми, основываясь на их способности образовывать комплементарный комплекс с выбранной последовательностью нуклеиновой кислоты – НК-мишени, которая является смысловой последовательностью.) Все это открывает перспективу сайт-направленного («адресованного») воздействия на многие ключевые биохимические и молекулярно-генетические процессы, происходящие с участием нуклеиновых кислот, как *in vitro*, так и в живой клетке *in vivo*.^{1,2} Благодаря многочисленным интересным возможностям этого подхода, включая направленное воздействие на внутриклеточные процессы, а также успехам в

области олигонуклеотидного синтеза, метод сайт-направленного воздействия, основанный на использовании антисмысловых олигонуклеотидов, привлекает в последние годы все возрастающее внимание.^{3–5}

Один из вариантов такого подхода, впервые сформулированный в конце 60-х годов, получил название комплементарно-адресованной (в современном варианте сайт-направленной) модификации.^{6–8} В его основу положены два процесса: первый – реакционноспособное производное олигонуклеотида, комплементарное определенному участку НК-мишени, образует с этим участком специфический комплементарный комплекс и таким образом направляет, адресует действие реакционноспособной части молекулы; второй – непосредственно химическая реакция (алкилирование, фотомодификация, расщепление) с каким-либо основанием нуклеиновой кислоты вблизи этого участка. В настоящее время такой подход рассматривается как наиболее универсальный метод для высокоизбирательного воздействия на нуклеиновые кислоты с целью подавления развития вирусных инфекций, опухолевого процесса, вызванного мутациями в протоонкогенах, определяющих злокачественное перерождение клетки.^{5,9}

Для широкого использования этого подхода как в исследовательских, так и терапевтических целях существенно, чтобы взаимодействие олигонуклеотида или его реакционноспособного производного с НК-мишенью происходило с высокой избирательностью. Согласно статистике¹ последовательность случайного 17-звенного олигонуклеотида повторяется в геноме человека только один раз, поэтому можно ожидать чрезвычайно селективного взаимодействия НК-мишени с олигонуклеотидом такой длины. Однако в

М.А.Зенкова. Кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории структуры и функции рибосом НИБХ СО РАН, тел. (383–2) 35–16–68.

Г.Г.Карпова. Доктор химических наук, заведующая той же лабораторией.

Дата поступления 7 декабря 1992 г.

настоящее время накоплен уже достаточно большой массив экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что специфичность взаимодействия нуклеиновых кислот (образование совершенного комплементарного комплекса) невысока. Существует большая вероятность образования несовершенного (содержащего неканонические пары оснований или петли) или частичного (только часть антисмыслового олигонуклеотида находится в комплексе) комплексов с различными участками НК-мишени. Кроме того, на эффективность комплексообразования с антисмысловым олигонуклеотидом огромное влияние оказывает пространственная структура и доступность выбранного участка связывания НК-мишени. Эта же проблема возникает и при использовании олигонуклеотидов или их производных для сайт-направленного мутагенеза или в качестве зондов для гибридизации.

В настоящем обзоре проанализированы накопленные к настоящему моменту экспериментальные данные по селективности взаимодействия нуклеиновых кислот. Рассмотрение материала проводится в порядке усложнения исследуемой модельной системы: от совершенных и несовершенных комплементарных комплексов, образованных олигонуклеотидами, до взаимодействия антисмысловых олигонуклеотидов с высокомолекулярными НК в системах *in vitro*. Для удобства восприятия материала в первом разделе обзора приведены теоретические данные оценки уровня селективности взаимодействия нуклеиновых кислот, а во втором – термодинамические параметры образования совершенных и несовершенных комплементарных комплексов. Раздел обзора, посвященный взаимодействию реакционноспособных производных олигонуклеотидов с НК-мишенями, базируется в основном на результатах исследований, выполненных в Новосибирском институте биоорганической химии СО РАН. Следует отметить, что в данном обзоре для случаев взаимодействия высокомолекулярных НК-мишеней с олигонуклеотидами проанализированы только те работы, в которых оценивался уровень точности взаимодействия нуклеиновых кислот или было достаточно экспериментальных данных для проведения такой оценки.

II. Теоретические оценки специфичности взаимодействия нуклеиновых кислот

Одним из источников ошибок при сайт-направленном воздействии на нуклеиновые кислоты является возможность образования несовершенных комплексов. Теоретические оценки уровня модификации нуклеиновых кислот в составе несовершенных комплексов сделаны в работах.^{10–12}

Влияние температуры и концентрации реагента (реакционноспособного олигонуклеотида) на специфичность взаимодействия олигонуклеотидного зонда и НК-мишени проанализирована в работе.¹⁰ Для оценки вклада несовершенных комплексов было предложено использовать параметр дискриминации (∇), характеризующий соотношение между степенями связывания реагента в правильном и несовершенном комплексах. Окончательное выражение для ∇ выглядит следующим образом:

$$\nabla = \{\alpha - \lg[X]\} \frac{n - n'}{n'},$$

где X – концентрация реагента, n и n' – длина совершенного и несовершенного дуплексов. Отсюда следует, что значение ∇ , т.е. дискриминация совершенного и несовершенного дуплексов, определяется длиной этих дуплексов и имеет логарифмическую зависимость от концентрации зонда и существенно падает с ее ростом. Согласно оценкам, сделанным для концентрации олигонуклеотида 10^{-8} и 10^{-2} М, параметр ∇ достигает наибольшего значения при температуре взаимо-

действия, равной температуре плавления (T_m) совершенного дуплекса.

В работе¹¹ с помощью статистического подхода оценено отношение r' суммы равновесных констант неспецифического связывания $\sum K_n^i = K_n$ для различных типов несовершенных комплексов (неканонические пары – «мисматч», свисающие концы, лишние или выпяченные основания – «балдж» в мишени и олигонуклеотиде) к константе образования совершенного дуплекса K_s ($r' = K_n/K_s$). Основной вклад в K_n дают комплексы со свисающими концами. Для уменьшения доли таких комплексов необходимо использовать реагенты, содержащие на концах $G-C$ -пары, потому что различие в стабильности совершенного и несовершенного дуплексов, связанное с отсутствием в несовершенном комплексе концевой $G-C$ -пары в 5–6 раз выше, чем из-за отсутствия концевой $A-T$ -пары. Доля связывания в несовершенные комплексы может быть существенно снижена, если использовать длинные олигонуклеотиды при соблюдении условия $K_s \cdot x_o \ll 1$, где x_o – концентрация олигонуклеотида. Следует отметить, что все расчеты в работе¹¹ были проведены с некоторыми допущениями. Так, авторы полагали, что концевые неканонические пары полностью расплавлены и не вносят вклада в стабильность дуплекса. Численные значения изменений свободной энергии дуплекса для образования неканонических пар, вычисленные по данным работы,¹³ носили усредненный характер и не учитывали ближайшего окружения. Степень дестабилизации дуплекса, вызванная «лишним» основанием, определялась по экспериментальным данным этой же работы для «лишнего» цитозина и считалась одинаковой для всех оснований. Однако принятые автором допущения не должны принципиально менять сделанных выводов.

В работе¹² рассмотрены кинетические аспекты специфичности взаимодействия адресованного реагента и матрицы и показано, что неспецифичность взаимодействия олигонуклеотидного реагента и матрицы может быть двух типов. Во-первых, это неспецифичность, связанная с реакцией вне комплекса, ранее рассматривавшаяся в работах.^{14–16} Во-вторых, – неспецифичность, вызванная образованием несовершенных комплексов. Данные анализа возможного уровня неспецифической модификации обоих типов для 302-членного фрагмента ДНК реагентами разной длины (6–14 звеньев) показали, что вклад неспецифической модификации второго типа увеличивается с уменьшением длины олигонуклеотидной части реагента. Следует отметить, что неспецифичность модификации обоих типов зависит от концентрации реагента: с увеличением концентрации реагента специфичность модификации НК-мишени падает.

III. Термодинамические параметры образования совершенных и несовершенных дуплексов и особенности их пространственной структуры

1. Совершенные дуплексы

Согласно современным представлениям, особенности поведения двуспиральных нуклеотидных структур в растворе определяются взаимодействиями между гетероциклическими основаниями, влиянием растворителя, ионной силой и электростатическим взаимодействием фосфатных групп. В комплементарном комплексе изменение состояния каждого нуклеотидного звена не может происходить независимо от соседних звеньев, что обуславливает кооперативный характер образования и диссоциации двуспиральных структур. Данные по термодинамике ДНК-дуплексов подробно рассмотрены в обзорах.^{17–19} Природные РНК образуют правозакрученную A -форму двойной спирали,

Таблица 1. Термодинамические параметры образования пар ближайших соседей в ДНК-дуплексах²⁴ (1 M NaCl, 25°C, pH 7.0)

Пары	$-\Delta H_0$, ккал/моль	$-\Delta S_0$, кал/К·моль	$-\Delta G_0$, ккал/моль
AA/TT	9.1	24.0	1.9
AT/TA	8.6	23.9	1.5
TA/AT	6.0	16.9	0.9
CA/GT	5.8	12.9	1.9
GT/CA	6.5	17.3	1.3
CT/GA	7.8	20.8	1.6
GA/CT	5.6	13.5	1.6
CG/GC	11.9	27.8	3.6
GC/CG	11.1	26.7	3.1

отличающуюся от *B*-формы ДНК шагом спирали в 11 оснований (на одно больше, чем в *B*-форме ДНК). Самые важные различия между ДНК и РНК затрагивают конформацию нуклеотида: в РНК остаток сахара имеет *C*(3')-эндо-конформацию, а в ДНК – *C*(2')-эндо-конформацию. Различия в конформации сахара приводят к появлению различий в расстояниях между фосфатами полинуклеотидной цепи: 5.9 Å в РНК- и 7 Å в ДНК-дуплексах.²⁰ Относительная стабильность *B*-формы ДНК-дуплексов зависит от последовательности цепей, образующих дуплекс, другими словами, стабильность данной пары оснований определяется ее ближайшими соседями.^{13, 21–24} Общая стабильность и условия плавления любого ДНК-дуплекса могут быть предсказаны на основании его первичной структуры, если известны параметры ΔG_0 , ΔH_0 и ΔS_0 для каждой пары ближайших соседей²⁴ (табл. 1). Свободная энергия образования совершенного дуплекса (ΔG_0) определяется суммой свободных энергий образования пар ближайших соседей (ΔG_x) и может быть легко оценена из данных табл. 1 по формуле

$$\Delta G_0 = -(\Delta G_{\text{ин}} + \Delta G_{\text{сим}}) + \sum_x \Delta G_x,$$

где $\Delta G_{\text{ин}}$ – изменения ΔG_0 образования дуплекса за счет инициации, $\Delta G_{\text{сим}}$ – величина, объясняющая различие в энтропиях между дуплексом, образованным самокомплементарной последовательностью, и дуплексом, образованным двумя комплементарными последовательностями; $\Delta G_{\text{ин}} = 5$ ккал/моль для комплекса, начинающегося с G-C-пары, и 6 ккал/моль для комплекса, начинающегося с A-U-пары; $\Delta G_{\text{сим}} = 0.4$ ккал/моль для дуплекса, образованного самокомплементарной последовательностью, и 0 – для дуплекса, образованного двумя комплементарными последовательностями. Определение ΔH_0 и ΔS_0 образования совершенного дуплекса производится аналогично. Термодинамические параметры образования протяженного ДНК-

Таблица 2. Термодинамические параметры образования пар ближайших соседей в РНК-дуплексах²⁸ (1 M NaCl, 25°C, pH 7.0)

Пары	$-\Delta H_0$, ккал/моль	$-\Delta S_0$, кал/К·моль	$-\Delta G_0$, ккал/моль
AA/UU	6.6	18.4	0.9
AU/UA	5.7	15.5	0.9
UA/AU	8.1	22.6	1.1
CA/GU	10.5	27.8	1.8
CU/GA	7.6	19.2	1.7
GA/CU	13.3	35.5	2.3
GU/CA	10.2	26.2	2.1
CG/GC	8.0	19.4	2.0
GC/CG	14.2	34.9	3.4
GG/CC	12.2	29.7	2.4
Инициация	0	10.8	–3.4
Симметрия дуплекса	0	1.4	–0.4

дуплекса легко определяются по трехмерным диаграммам, представленным в обзорной работе.¹⁹

В табл. 2 приведены термодинамические параметры образования G-C- или A-U-пар в РНК-дуплексах, полученные в рамках метода ближайших соседей.^{25–28} Определение термодинамических параметров образования каждого дуплекса проводится также, как и для ДНК-дуплексов.²⁴

Наиболее характерной чертой вторичной структуры РНК является образование шпильки. Петли на конце шпильки обычно состоят из 4–6 оснований и стабилизируют всю шпильку. Значение $\Delta \Delta G_0$ в значительной степени зависит от последовательности оснований в петле и от замыкающей петлю пары оснований и изменяется от –3 до 1.5 ккал/моль.^{29–33} При этом даже в коротких петлях (3–5 нуклеотидов) все основания находятся в стэкинге друг с другом и кольцом рибозы, а каждый из остатков рибозы имеет N-конформацию, позволяющую нуклеотидам растянуться на максимальное расстояние.^{20, 30} В общем случае петли, образованные дезоксирибоолигонуклеотидами, стабилизируют всю шпильку в несколько меньшей степени, однако зависимость стабилизирующего действия от последовательности оснований в петле сохраняется.^{32, 33}

Единственной формой существования двуспиральной РНК является *A*-конформация. В зависимости от условий образования и последовательности ДНК-дуплексы могут существовать в виде *A*-, *B*- или левозакрученной *Z*-конформаций. Согласно данным^{18, 19, 34–37} для РНК – ДНК-дуплекса более характерна *A*-форма спирали, хотя при определенных условиях и в зависимости от последовательности могут реализовываться и другие конформации. Сравнительный анализ термодинамики и кинетики образования гибридных дуплексов приведен в работах.^{18, 35, 37–41} На основании анализа кривых плавления и данных ЯМР-спектроскопии установлен следующий ряд стабильности РНК – ДНК-дуплексов: $dA_5 \cdot dT_5 > rA_5 \cdot dT_5 > rA_5 \cdot rU_5 > dA_5 \cdot rU_5$ (T_m равны 27.5, 22.9, 19.1 и 0°C соответственно).³⁵ Следует отметить, что данные по стабильности РНК – ДНК-дуплексов очень немногочисленны и противоречивы. Для большинства изученных дуплексов оказалось, что гибридные дуплексы менее стабильны, чем соответствующие РНК- или ДНК-дуплексы.⁴² Очевидно, что стабильность гибридных дуплексов, так же как дезокси- и рибоаналогов, определяется их первичной структурой.

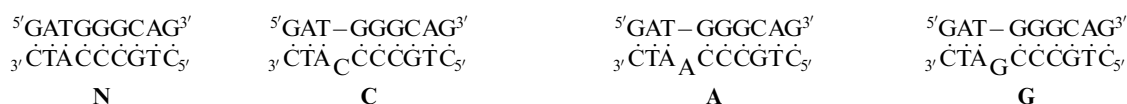
2. Несовершенные дуплексы нуклеиновых кислот

Первоначальный интерес к несовершенным дуплексам нуклеиновых кислот возник, по-видимому, в процессе изучения механизмов передачи генетической информации. При репликации, транскрипции или обратной транскрипции точность передачи генетической информации обеспечивается комплементарными взаимодействиями нуклеиновых кислот, однако при этом происходит включение и ошибочных оснований.^{43, 44} С другой стороны, комплексы такого типа образуются при кодон-антикодоновых взаимодействиях, при формировании пространственной структуры РНК (G·A- и G·U-пары). Образование несовершенных дуплексов используется в технике сайт-направленного мутагенеза.

а. Дуплексы со свисающими основаниями на концах

Концевые неспаренные основания, прилегающие к протяженной двойной спирали (кору), являются характерным элементом вторичной структуры РНК и вовлечены во многие биологические процессы. Добавление неспаренного основания на 3'- или 5'-конец РНК-дуплекса стабилизирует коровый дуплекс за счет стэкинг-взаимодействия свисающего основания с последней комплементарной парой дуплекса. При этом спаренное основание на 3'-конец РНК-дуплекса в большей степени стабилизирует дуплекс, чем 5'-«висящий» конец;

Схема 1



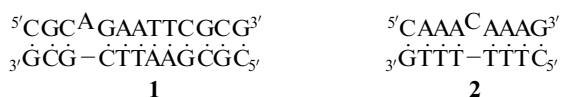
разница в температурах плавления таких дуплексов составляет 8° при концентрации олигонуклеотида 10^{-4} М. Добавление 3'-концевого неспаренного основания сравнимо с добавлением А-У-пары. Стабилизирующее действие некомплементарных оснований на концах РНК-дуплекса убывает в ряду $45, 46$ $3'-\text{A} > 3'-\text{U} > 5'-\text{A} \cong 5'-\text{U}$. Аналогичные результаты были получены при изучении влияния неспаренных оснований на концах на стабильность коровых дуплексов $28, 47$ GGCC/GGCC , CCGG/CCGG , CGCG/CGCG . Стабилизирующие действие неспаренных концевых оснований увеличивалось в ряду $3'-\text{C} < 3'-\text{U} < 3'-\text{G} \cong 3'-\text{A}$, при этом увеличение свободной энергии дуплекса за счет стабилизирующего влияния неспаренных оснований на концах составляло 10–20, 30–70 и 60–95% от увеличения ΔG_0 за счет образования соответствующей комплементарной пары. В среднем 5'- и 3'-некомплементарные основания вносят -0.2 и $-(0.4-1.8)$ ккал/моль в ΔG_0 образования РНК-дуплекса. $48, 49$

Влияние неспаренного концевого основания на стабильность корового ДНК-дуплекса противоположно влиянию свисающего основания на РНК-дуплекс: ДНК-дуплексы в большей мере стабилизируются неспаренным основанием на 5'-конце. $50, 52$ Изучение структурных и термодинамических особенностей поведения коровых дуплексов, содержащих неспаренные остатки тимидина на 5'- и 3'-концах, показало, что добавление 5'- или 3'-свисающего тимидина к коровому дуплексу приводит к увеличению T_m дуплекса. Причем 5'-концевой тимидин оказывает большее стабилизирующее действие: T_m составляет $8.3-9.3^\circ\text{C}$ для 5'- и $5.0-3.0^\circ\text{C}$ для 3'-неспаренных остатков тимидина соответственно. Анализ КД-спектров коровых дуплексов и их производных с неспаренными остатками тимидина на 3'- или 5'-концах показал, что весь дуплекс, включая свисающий конец, находится в В-конформации, а неспаренное основание – в стэкинге с коровым дуплексом. 52

6. Дуплексы с лишними основаниями

Внутренняя петля, состоящая из одного основания, или «лишнее», выпяченное (балдж) основание является часто встречающимся элементом вторичной структуры ДНК и РНК. Особый интерес к выступающим основаниям связан с тем, что в ДНК такое основание является «горячей» точкой мутаций, а в РНК лишний аденозин часто появляется в сайтах связывания белков. Основной вопрос, касающийся этого элемента вторичной структуры, состоит в том, принадлежит ли лишнее основание двойной спирали или же оно образует внутреннюю петлю и выведено из стэкинга.

Лишний аденин в дуплексе **1** находится в стэкинг-взаимодействии с соседними остатками цитидина и гуанина, а не образует внутреннюю петлю. Конформация комплементарных пар по обе стороны выступающего основания не изменена, но фосфодиэфирная связь напротив лишнего аденина несколько удлинена, что приводит к разрыхлению структуры дуплекса и небольшому изменению торсионных углов фосфодиэфирной связи. Температура плавления дуплекса с выпяченным аденином на 19°C ниже T_m совершенного дуплекса, но плавление такого дуплекса происходит кооперативно, включая выпяченный аденин. $53, 54$



Энергия активации образования дуплекса **1** ($E_{\text{акт}} - \text{A}$) значительно выше энергии активации образования совершенного комплекса. 55 Если для совершенных дуплексов стадией, лимитирующей скорость их образования, является стадия образования ядра нуклеации, 35 то в дуплексе с выступающим аденином происходит торможение комплексообразования на дефектном участке структуры, 55 что приводит к значительному увеличению энергии активации и уширению температурного интервала, в котором происходит плавление дуплекса **1**.

На основании ЯМР-спектров необмениваемых протонов и NOE-спектров иминопротонов оснований (спектров ядерного эффекта Оверхаузера), расположенных по обе стороны от лишнего цитидина в дуплексе **2**, был сделан вывод о том, что такой цитидин находится вне спирали, а конформация прилегающей к нему пары А-Т сильно изменена. Дуплекс **2** сильно дестабилизирован по сравнению с совершенным комплексом: (T_m дуплекса **2** на 15°C ниже T_m совершенного комплекса, а $\Delta\Delta G = 2.9$ ккал/моль), причем понижение стабильности дуплекса **2** имеет энтальпийную природу и является следствием нарушения стэкинг-взаимодействий в этом дуплексе. 56 При низкой температуре (около 0°C) выступающий цитидин находится вне дуплекса, а при увеличении температуры ($> 40^\circ\text{C}$) повышается доля конформаций, в которых лишний цитидин входит в спираль. 57

Лишние аденин и гуанин, прилегающие к G-C-паре (дуплексы **A** и **G**) участвуют в стэкинг-взаимодействиях с прилегающими основаниями и являются частью двойной спирали (схема 1).

Дестабилизирующее действие этих оснований строго локализовано и не распространяется на весь дуплекс. Выпяченный цитидин находится в $\text{C}_{(4)}$ -тракте дуплекса **C** и как бы дelokализован по последовательности $\text{C}_{(4)}$. Это приводит к уменьшению дестабилизирующего эффекта лишнего цитидина на двойную спираль; T_m дуплекса **C** на 5.7°C выше, чем T_m дуплексов **A** или **G**. $58, 59$ Сравнение строения рибозидеокси-дуплексов, содержащих выпяченный уридин или тимидин (дуплексы **3** и **4**), показало, что выпяченный тимидин **4** встраивается в двойную спираль, не вызывая заметных искажений В-формы ДНК, тогда как лишний уридин в дуплексе такого же состава **3** находится вне спирали. При этом регулярная структура А-формы РНК также не нарушается. $60, 61$



Экспериментальных данных по влиянию выступающего основания на структуру и стабильность РНК-дуплексов сравнительно мало. Исследование термодинамического поведения 14 синтетических рибонуклеотидов, принимающих в растворе форму шпильки с четырьмя основаниями в петле и одним выступающим основанием в стебле, показало, что введение «лишнего» основания в двуспиральную область приводит к дестабилизации дуплекса. Величина эффекта зависит от типа основания: наибольшее дестабилизирующее действие оказывают лишние аденин и гуанин ($\Delta\Delta G_{\text{A}} = 3.3$ и $\Delta\Delta G_{\text{G}} = 3.5$ ккал/моль) и наименьшее – лишний уридин ($\Delta\Delta G_{\text{U}} = 2.7$ ккал/моль). 31

в. Дуплексы с точечным разрывом

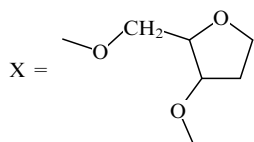
Точечные разрывы, а также апуриновые и апириимидиновые сайты часто встречаются в структуре ДНК. Однако в настоящее время накоплено сравнительно мало данных о влиянии таких повреждений ДНК на структуру и стабильность ДНК-дуплексов. Аналогичные данные по РНК-дуплексам вообще отсутствуют. С помощью ЯМР- и NOE-спектров были исследованы четыре 12-звенных дуплекса одинакового состава с точечным разрывом. Оказалось, что все они имеют *B*-форму спирали и незначительно отличаются по стабильности от совершенного дуплекса. Плавление дуплекса с точечным разрывом происходит кооперативно. По-видимому, точечный разрыв не вносит значительных изменений ни в стабильность, ни в структуру этих ДНК-дуплексов.⁶² Несколько другие результаты по влиянию точечных разрывов на стабильность ДНК-дуплекса получены в работе.⁶³ Введение точечного разрыва в кольцевую структуру приводит к уменьшению T_m такого дуплекса на 27°C (1 М NaCl).

Введение в структуру дуплекса сайта без основания приводит к понижению температуры плавления дуплекса на 10–12°C по сравнению с совершенным дуплексом. Дестабилизация дуплекса за счет «дырки» сравнима с введением в дуплекс Т-Т-пары (T_m равно 66, 53–56 и 56°C для совершенного 13-звенного дуплекса, дуплекса с апириимидиновым сайтом в положении 7 и для дуплекса с Т-Т-парой в положении 7 соответственно).⁶⁴ Наиболее подробно влияние сайта без основания и сайта без нуклеозида на структуру ДНК-дуплекса исследовано в работе⁶⁵ на примере дуплекса следующего состава:

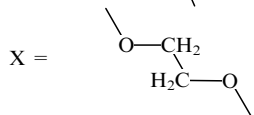


X = T

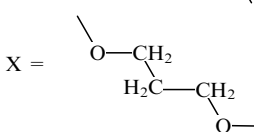
А-Т-дуплекс



А-Ф-дуплекс
(сайт без основания)



А-Е-дуплекс
(сайт без нуклеозида)



А-Р-дуплекс
(сайт без нуклеозида)

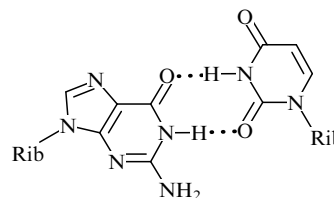
Изменение всех термодинамических параметров, вызванное повреждением дуплекса за счет образования «дырки», очень велико (ΔT_m составляет 13.9, 12.9 и 14.4°C для дуплексов А-Ф, А-Е и А-Р соответственно) и значительно превосходит значения, предсказанные для таких дуплексов на основании метода ближайших соседей. Полученные результаты свидетельствуют о том, что эти изменения стабильности дуплекса связаны с отсутствием основания, а не с отсутствием остатка сахара. Кооперативность перехода спираль — клубок практически не меняется при переходе от дуплекса А-Т к дуплексам А-Ф и А-Е. Это позволяет предположить,^{57,65} что за кооперативность перехода спираль — клубок при плавлении отвечает именно сахаро-фосфатный остов молекулы ДНК.

На основании приведенных данных можно заключить, что введение точечного разрыва хотя и снижает стабильность ДНК-дуплекса, но не сказывается на его структуре; тогда как апуриновые и апириимидиновые сайты приводят к значительным изменениям структуры дуплекса за счет нарушения стэкинг-взаимодействий в двойной спирали.

г. Дуплексы, содержащие неканонические пары оснований

Неканонические или неправильные пары оснований очень часто встречаются в молекулах как РНК, так и ДНК. Все неканонические пары могут либо образовывать внутреннюю петлю из двух оснований, либо участвовать в стэкинг-взаимодействиях двойной спирали, либо образовывать неканоническую («вобл») пару. При анализе любой неканонической пары необходимо ответить на следующие вопросы: 1) какие структурные изменения вносит данная неправильная пара в конформацию дуплекса; 2) какие термодинамические и кинетические параметры образования дуплекса изменяются под влиянием данной неканонической пары; 3) каким образом осуществляется образование водородных связей в данной неканонической паре. Все эти вопросы подробно рассмотрены в обзоре.¹⁸ В настоящем разделе будут приведены данные, касающиеся только влияния неканонических пар на стабильность РНК- и ДНК-дуплексов.

G-U- или G-T-пара. Пара G-U является одной из наиболее изученных, часто встречающихся и наиболее стабильных неправильных пар. Образование водородных связей G-U-пары, предложенное Уотсоном и Криком, показано на схеме:



G-U

С помощью рентгеноструктурного анализа 8-звенного дуплекса с двумя центральными G-T-парами, а также спектров ЯМР поли(dGT) (появление в спектрах двух сигналов в области 11 м.д. — резонанс $>N-H \cdots O=C$ водородной связи и двух сигналов в области 8 ± 0.5 м.д. — резонанс свободной NH_2 -группы) получены строгие экспериментальные доказательства того, что основания в G-T- или G-U-парах в протяженных ДНК- или РНК-дуплексах спарены и встроены в двойную спираль.^{22, 23, 54, 66–69}

Пары G-T крайне слабо влияют на общую структуру дуплекса, практически не нарушают стэкинг-взаимодействий в дуплексе. При образовании такой пары небольшим изменениям подвергается лишь торсионный угол N-гликозидной связи уридина, что и является основной причиной дестабилизации дуплексов с G-U-парами по сравнению с совершенными дуплексами.^{66, 70} При сравнении трех 8-звенных дуплексов,⁷¹ содержащих в положениях 3 и 4 две G-T-, две G-C- или две А-Т-пары, оказалось, что обе G-T-пары участвуют в формировании двойной спирали, но поворот спирали на паре G-T составляет 44.3° (вместо 31.5° для классической пары), а на следующей за G-T паре G-C — лишь 22°.

Температура плавления 8-звенного дуплекса с двумя G-T-парами в центре на 20° ниже T_m совершенного дуплекса (52 и 72°C соответственно), а $\Delta G_0 = 2-3$ ккал/моль.^{66, 71} Аналогичные результаты были получены при рентгеноструктурном анализе 8-звенного дуплекса, содержащего две I-T-пары в центре.⁷² Оказалось, что термодинамически более выгодно, если две G-T-пары следуют одна за другой, а не разделены классическими парами. Дестабилизация дуплекса (ΔG_0) в этом случае составляет 1 ккал/моль в расчете на одну G-T-пару.⁷¹

Скорость обмена протонов G-T-пар ^{22, 23} в положениях 3 и 10 при 35°C 12-звенного дуплекса превышает скорость обмена протонов (примерно на порядок) G-C-пар в этих же положениях дуплекса, что свидетельствует о более рыхлой, доступной для растворителя структуре G-T-пары по сравнению с G-C-парой. Данные, подтверждающие образование более рыхлой структуры в дуплексах с G-T-парами, получены также в работах. ^{67, 68}

При сравнении термодинамических параметров образования 16 дуплексов, содержащих внутреннюю G-U- или A-U-пару, было обнаружено, что G-U-пара стабилизирует дуплекс (по сравнению с петлей в этом месте), причем ее вклад в ΔG_0 образования дуплекса зависит от ближайшего окружения. ⁷³ Если G-U-пара находится рядом с A-U-парой, то увеличение свободной энергии дуплекса составляет $-(0.7-0.5)$ ккал/моль, а если рядом с G-C-парой, то $\Delta G_0(G-U) \approx \Delta G_0(A-U) = -(1.3-1.9)$ ккал/моль. В среднем, внутренняя G-U-пара на 0.7 ккал/моль менее стабильна, чем A-U-пара. ^{48, 70, 73} Большая стабильность пары G-U, фланкированной G-C-парой, по сравнению с парой G-U, прилегающей к A-U-паре, объясняется лучшими стэкинг-взаимодействиями пар G-U и G-C по сравнению с G-U- и A-U-парами. Сравнение рибо-дуплексов, содержащих центральную G-U-, G-C- или A-U-пару, показало, что T_m дуплекса с G-U-парой приблизительно равна T_m дуплекса, укороченного на одно звено. Сама G-U-пара является сайтом нестабильности в двойной спирали. ⁷⁴

A-G-пара. Данная «вобл-пара» представляет собой особый интерес, потому что является обычным элементом, формирующим пространственную структуру РНК. ⁷⁵ При нейтральных рН можно предложить четыре различных варианта образования водородных связей для пары G-A (рисунок). ^{75, 76} Следует отметить, что конформация *a* была предсказана и обнаружена в двойной спирали РНК, ⁷⁵ а конформация *b* нашла экспериментальное подтверждение при изучении модельных ДНК-дуплексов. ^{77, 78} До недавнего времени не было экспериментального подтверждения существования конформаций *c* и *d* для G-A-пары. В конформациях *a* и *b* характерно пропеллерное расположение оснований относительно друг друга (угол поворота составляет 24.8°), что облегчает образование водородных связей между гуанином и аденином. ^{77, 79} Пара G-A хорошо вписывается в двойную спираль B-формы, практически не нарушая стэкинг-взаимодействий в дуплексе, а изменения торсионных углов оснований лежат в пределах, характерных для канонических пар оснований. ^{77, 80, 81} Дестабилизирующее действие G-A-пары проявляется в снижении T_m дуплекса на 10°C в расчете на одну G-A-пару по сравнению с совершенным дуплексом. Возмущения, вносимые G-A-парой, носят локальный характер и не распространяются по спирали. ^{13, 77}

Сравнительное изучение 13 додекамеров, различающихся количеством G-A-пар, их положением и окружением выявило влияние ближайших соседей на стабильность несовершенного дуплекса с такими неканоническими парами. Оказалось, что наиболее стабильные последовательности, содержащие две прилегающие G-A-пары, имеют термодинамические параметры образования, приблизительно равные параметрам образования совершенного дуплекса. Однако те же последовательности с единичной G-A-парой значительно дестабилизированы по сравнению с совершенным дуплексом. ^{82, 83}

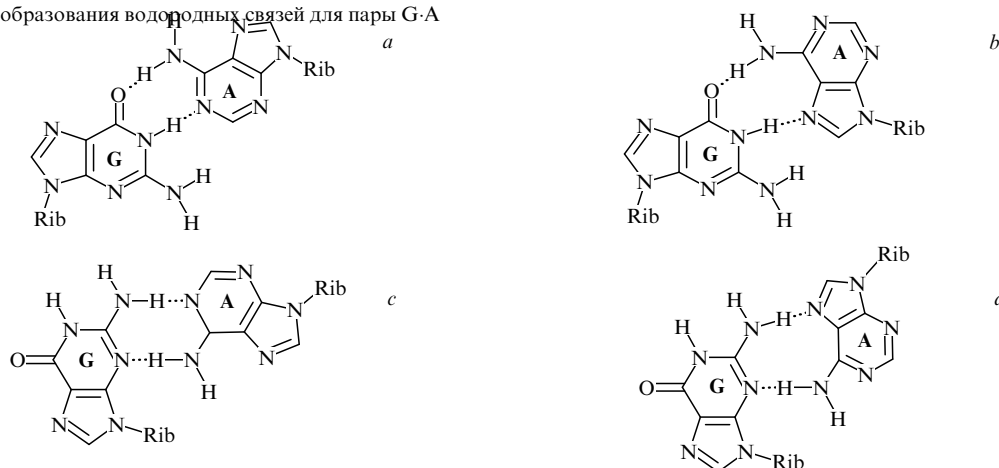
Сравнительно недавно при изучении 10-звенного дуплекса, образованного олигонуклеотидом d(ATGAGCGAATA), содержащего четыре G-A-пары и некомплементарный аденин на 3'-конце, были получены прямые доказательства существования конформации *d* для G-A-пары. Этот дуплекс образовывал B-форму двойной спирали и отличался аномально высокой стабильностью, приблизительно равной стабильности совершенного комплекса, что объяснялось очень эффективными стэкинг-взаимодействиями между основаниями противоположных цепей (G₃ с G₇ и A₄ с A₈). ⁸⁴ Изучение вклада водородных связей, образующихся внутри G-A-пары в стабильность РНК-дуплексов (не менее -1.4 ккал/моль в расчете на одну пару), позволяет объяснить эту аномально высокую стабильность несовершенного дуплекса с G-A-парами. ⁸³

A-A-пара. Пара A-A не образует стабильных водородных связей. Встраивание d(A-A)-пары в двойную спираль осуществляется за счет стэкинга аденинов с соседними основаниями и сопровождается искажением плоского строения гетероциклического основания для уменьшения перекрытия экзоциклических аминогрупп аденинов и значительными перестройками сахара-фосфатного остова дуплекса. ⁸⁵

G-G-пара. Косвенные доказательства существования этой пары получены в работах, ⁸⁶⁻⁸⁸ однако только в работе ⁸⁹ впервые доказано существование данной вобл-пары в дуплексе. Согласно данным двумерного ЯМР основания такой пары эффективно участвуют в стэкинг-взаимодействиях двойной спирали, а сама двойная спираль имеет классическую B-форму. В образовании водородной связи G-G-пары участвуют иминопротоны оснований; один из гуанинов принимает нормальную *анти*-конформацию, а другой – *син*-конформацию или близкую к ней. Такая пара имеет симметричную структуру и не вносит возмущений в регулярное строение B-формы ДНК. Данные по термодинамической стабильности дуплексов с G-G-парами отсутствуют.

Пурин-пуриновые пары вызывают сильную дестабилизацию двойной спирали. Сравнение термической устойчивости

Четыре варианта образования водородных связей для пары G-A



олигомер-полимерных дуплексов структуры $dG_n dG_{12} A_m C_x$ и $dG_n dG_{10} G_m C_x$ ($n = 100$, $m = 0-6$, $x = 5-41$) с различным количеством $d(A \cdot G)$ - и $d(G \cdot G)$ -пар показало, что дестабилизация дуплекса пропорциональна числу неканонических пар.⁸⁷ Наличие кластера неканонических пар G-A или G-G, однако, не нарушает кооперативного характера плавления дуплекса, что является дополнительным подтверждением встраивания неправильных пурин-пуриновых пар в регулярную двойную спираль. Протяженные ДНК-дуплексы, содержащие одну неканоническую пару, устойчивы к действию S1-нуклеазы. Удлинение участка с неканоническими парами от 2 до 6 оснований приводит к повышению чувствительности дуплекса к S1-нуклеазе: расщепление дуплекса S1-нуклеазой в одинаковых условиях происходит на 4 и 30% для дуплексов с одной и шестью G-G-парами соответственно.⁸⁷

Влияние ближайших соседей на дестабилизирующий эффект пурин-пуриновой неканонической пары исследовано в работах.^{70, 74, 82} Согласно данным ЯМР-спектроскопии не происходит образования 5-звенных дуплексов, если G-A- или G-G-пары фланкированы парами A-U, тогда как дуплексы, в которых G-A- или G-G-пары фланкированы парами G-C, достаточно стабильны ($T_m = 26^\circ\text{C}$). Данные, подтверждающие сильную зависимость стабильности дуплекса с пурин-пуриновыми парами от последовательности оснований в дуплексе, приведены также в работах.^{82, 84, 87, 90}

A-C-пара. Согласно данным^{77, 91} A-C-пара стабилизирована одной водородной связью между N(6)-протонами аминогруппы аденина и N(3)- или O(2)-цитидина, однако при этом не исключается возможность образования A-C-пары, стабилизированной двумя водородными связями в случае аденина в таутомерной форме. Скорость обмена иминопротонов для пар G-C и A-T, примыкающих к неканонической A-C-паре, в дуплексе с двумя A-C-парами возрастает по сравнению с совершенным дуплексом в 3 и 2 раза соответственно. Следовательно, дестабилизирующее влияние A-C-пары не локализовано и распространяется вдоль двойной спирали.⁹¹ Интеграция A-C-пары в ДНК-дуплекс сопровождается небольшими изменениями в сахаро-фосфатном остове дуплекса, обеспечивающими стэкинг-взаимодействия A-C-пары с прилегающими основаниями.⁹² Введение A-C-пары в центр 17-звенного дуплекса приводит к понижению его температуры плавления по сравнению с совершенным дуплексом на 10°C . Стабильность дуплексов, содержащих неканонические пары, убывает в ряду⁹³ $G-C > A-T > G-U > A-C$. Сравнительный анализ данных по гибридизации 11-, 14- и 17-звенных олигонуклеотидов с ДНК фага $\phi\text{X} 174$ и с ДНК мутантного фага, в которой имеется точечная замена G-A в сайте связывания олигонуклеотидов, показал, что с мутантной ДНК все три зонда связываются значительно слабее. Введение в дуплекс одной A-C-пары снижает температуру диссоциации этих зондов на 12°C , что соответствует «потере» примерно трех G-C-пар.⁹⁴

U-U-пара. Существование U-U-пары экспериментально не доказано. Пятичленный самокомплементарный олигонуклеотид AGUCU предпочтительно существует в одноцепочечной форме. Пара U-U в центре дуплекса приводит к полной его дестабилизации, тогда как дуплекс с G-C-парой в этом сайте имеет⁷⁴ температуру плавления 25°C .

T-T-пара. Согласно данным ЯМР, T-T-пара не стабилизирована водородными связями,¹³ но при этом она встраивается в двойную спираль с минимальными нарушениями структуры дуплекса и приводит к уменьшению его T_m по сравнению с совершенным 12-звенным дуплексом на 11°C . Эта пара образует локально нестабильный участок, в котором при повышении температуры инициируется процесс диссоциации дуплекса параллельно с процессом, идущим с конца дуплекса.^{51, 95} Пара T-T наиболее сильно дестабилизирует дуплекс,^{13, 85} если она находится в последовательности

АТА/ТТТ, и оказывает наименьшее действие в последовательности СТГ/ГТС.

C-C-пара. Экспериментальных доказательств образования водородных связей между основаниями C-C-пары в настоящее время в литературе нет. Отсутствие стабилизирующих C-C-пару водородных связей, а также плохое перекрытие (стэкинг) неспаренного цитозина с прилегающими основаниями дуплекса приводит к выпячиванию C-C-пары с образованием внутренней петли.^{70, 74} В работе⁹⁶ было показано, что дуплекс **5** существует не в виде шпильки с внутренней петлей из четырех цитидинов, а имеет структуру **6** с выпяченными цитидинами. Такая перестройка дуплекса сопровождается изменением сахаро-фосфатного остова только в «выплетенных» нуклеотидах, тогда как весь остальной дуплекс имеет B-форму ДНК.



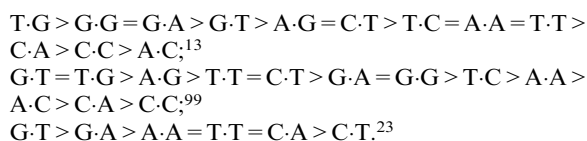
Появление C-C-пары приводит к значительному увеличению энтальпии образования дуплекса ($\Delta H_0 = -77$ ккал/моль для $[(\text{Ap})_3\text{A}(\text{pU})_4]_2$ и -43 ккал/моль для $[(\text{Ap})_4\text{C}(\text{pU})_4]_2$) и понижению его температуры плавления на $10-17^\circ\text{C}$, что соответствует потере двух A-U-пар.⁹⁷

При изучении кристаллической структуры додекамерного РНК-дуплекса, содержащего трек неканонических пар в центре, было обнаружено, что четыре некомплементарных основания не образуют внутренней петли, а формируют довольно регулярную спираль, включающую G-U- и U-C-пары.⁹⁸ Данные результаты являются первым экспериментальным доказательством существования U-C-пары в кристалле. Эта пара образует одну водородную связь и стабилизирована водородными связями с молекулами воды, образующими мостики между атомами азота гетероциклического основания и кислородными атомами у фосфора. Авторы особенно отмечают влияние водородных связей между ОН-группами рибозы, кислородными атомами у фосфора и молекулами воды на стабилизацию структуры дуплекса.⁹⁸

3. Сравнительный анализ влияния неканонических пар оснований на стабильность ДНК- и РНК-дуплексов

Вполне очевидным является тот факт, что чем меньше стабильность несовершенного комплекса, случайно образованного олигонуклеотидом и НК-мишенью, отличается от стабильности совершенного дуплекса, тем выше будет уровень их неспецифического взаимодействия. Поэтому весьма актуальным представляется сравнение дестабилизирующего влияния различных структурных аномалий (неканонических пар, выступающих оснований, свисающих концов) с целью выявления тех из них, которые дестабилизируют дуплекс в меньшей степени. В настоящее время накоплен большой массив экспериментальных данных, включающий в том числе и термодинамические параметры образования несовершенных комплексов со структурными аномалиями, однако эти данные несколько разрознены и не позволяют сделать однозначные выводы о степени дестабилизирующего влияния каждой отдельной неканонической пары оснований или какой-либо другой структурной аномалии дуплекса.^{13, 18} Следует отметить, что дестабилизирующее влияние каждой структурной аномалии зависит также и от того, в каком окружении она находится, т.е. от ближайших соседей.^{13, 84, 89} Так, в работах, где оценивалась относительная стабильность различных неканонических пар, коровая часть дуплекса обычно оставалась неизменной. Это и явилось причиной значительных расхождений в получен-

ных разными авторами оценках стабильности неканонических пар оснований.^{13, 23, 99}



Неканонические пары расположены в порядке уменьшения их стабильности.

Большие расхождения наблюдаются не только в оценках относительной стабильности различных неканонических пар оснований, но и в абсолютных величинах различий между термодинамическими параметрами для совершенных и несовершенных комплексов, включающих одну и ту же неканоническую пару. Так, исходя из данных работ^{13, 100} можно определить дестабилизирующее влияние А-С-пары при одинаковом ее окружении: $\Delta\Delta G_0(A \cdot C) = 2.7$ ккал/моль¹⁰⁰ и 3.5 ккал/моль.¹³ Однако такую разницу в дестабилизирующем влиянии данной неканонической пары оснований нельзя объяснить ни различиями в условиях проведения эксперимента, ни различной длиной исследуемых дуплексов.

Наиболее подробно дестабилизирующее действие различных неканонических оснований на стабильность коровых дуплексов исследовано в работах.^{13, 56, 99, 100} В работе¹³ экспериментально определены соответствующие параметры для дестабилизации дуплекса за счет образования неканонических пар в зависимости от ближайших соседей. Эти данные приведены в табл. 3.

Влияние всех возможных неканонических пар на термодинамику образования 17-звенного ДНК-дуплекса (мисматчи расположены в центре дуплекса) сделана в работе.⁹⁹ На основе анализа ΔH_0 и ΔS_0 неканонической пары оснований, т.е. тех параметров, которые описывают стэкинг-взаимодействия данной пары с прилегающими основаниями, авторами была проведена классификация различных мисматчей по их участию в формировании дуплекса: 1) вобл-пары или неправильные пары, стабилизированные водородными связями, характеризуются сильным стэкинг-взаимодей-

ствием с прилегающими основаниями. Такие пары не нарушают ни общего стэкинга дуплекса, ни конформации сахаро-фосфатного остова; энтропия образования вобл-пары примерно равна энтропии уотсон-криковской пары, а энтальпия образования несколько ниже. К вобл-парам относятся Т-Г-, Г-Г-, С-А-, А-А-, А-Г-пары; 2) открытые пары, т.е. пары, которые не образуют водородных связей, но находятся в стэкинг-взаимодействии с основаниями цепи. Такие пары вносят наибольшее возмущение и дестабилизируют дуплекс; 3) слабые пары – пары, которые связаны чаще всего одной водородной связью; стэкинг-взаимодействие в таком случае малоэффективно. Энтальпия образования слабой пары равна приблизительно половине энтальпии образования вобл-пары.

Следует отметить, что температуры плавления дуплексов, отличающихся только ориентацией неправильной пары, не одинаковы, хотя окружение этих пар и, следовательно, межплоскостные контакты не меняются. Недавно полученные данные свидетельствуют о крайне аномальном влиянии расположенных рядом инвертированных пар Г-А на стабильность ДНК-дуплексов.^{82, 84} Замена двух канонических пар в декамерном дуплексе на две изолированные пары Г-А снижает константу ассоциации в 10^3 – $4 \cdot 10^5$ раз. Четыре попарно расположенные инвертированные Г-А-пары дестабилизируют дуплекс только в 4.5 раза, но при наличии в этом дуплексе такого же содержания Г-С-пар, как в совершенном комплексе, образуется аномально стабильный дуплекс (константа ассоциации повышается в 5–40 раз). Аналогичные данные были получены⁹⁰ и для рибодуплексов, содержащих пару Г-А.

В работе¹⁰⁰ проведено исследование влияния местоположения неканонических пар на стабильность дуплекса 7, который соответствует фрагменту ДНК бактериофага фХ 174 и является сайтом связывания белка гена А. Дуплексы, содержащие неканонические пары, плавятся при более низкой температуре, чем совершенный дуплекс 7. Причем дестабилизация дуплекса больше в том случае, если неправильная пара замещает Г-С-пару, а не А-Т-пару; а также если неканоническая пара расположена ближе к центру дуплекса (для сравнения см. дуплексы 8-АА и 12-ТГ на схеме 2).

Схема 2

Таблица 3. Дестабилизация двойной спирали за счет образования неканонических пар оснований¹³

Пары оснований	ΔG_0 , ккал/моль	ΔH_0 , ккал/моль	ΔS_0 , кал/К·моль
A-T-A T-G-T	0	-8.1	-27
A-G-A T-G-T	0.2	-6.0	-20
A-G-A T-A-T	0.3	-5.1	-18
A-G-A T-T-T	0.7	0.8	1
A-A-A T-G-T	1.2	7.6	22
A-C-A T-T-T	1.2	-5.7	-23
A-T-A T-C-T	1.5	-2.5	-13
A-A-A T-A-T	1.5	10.6	31
A-T-A T-T-T	1.5	-7.1	29
A-C-A T-A-T	1.9	7.2	38
A-C-A T-C-T	2.0	-7.8	-33
A-A-A T-C-T	2.1	11.7	32

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
5'	C	A	A	C	T	T	G	A	T	A	T	T	A	A	T	A
	G	T	T	G	A	A	C	T	A	T	A	A	T	T	A	T
							T	G	A	T		T				
							G	T	A	C		G			7	
									A							
									C							
Дуплекс						T_m				$-\Delta G_0$					$\Delta\Delta G_0$	
7						52.0				15.8					—	
6-TG						45.1				13.2					2.6	
7-GT						42.9				12.7					3.1	
8-AA						42.1				12.6					3.2	
8-AC						40.6				12.1					3.7	
9-TC						43.0				13.1					2.7	
12-TG						46.9				14.0					1.8	

Для всех дуплексов, приведенных на схеме 2, были проанализированы три вероятных структуры: 1) образование внутренних петель. Этот процесс должен сопровождаться потерей стэкинга двух пар оснований, значительным увеличением ΔH_0 и изменением свободной энергии дуплекса ($\Delta\Delta G_0$) в диапазоне 5.5–7.0 ккал/моль; 2) образование структуры с выпяченными основаниями. Это должно сопровождаться исключением из стэкинга одной пары оснований и значениями $\Delta\Delta G_0 = 7.0$ ккал/моль; 3) образование неканонической пары оснований. Этот процесс характеризуется сохранением или незначительным изменением значений ΔH_0 и

небольшими значениями $\Delta\Delta G_0$. Согласно термодинамическим параметрам, приведенным выше, все дуплексы, изображенные на схеме, образуют неканонические пары, а не какие-либо другие структуры.

Влияние концевой неканонической пары на стабильность дуплекса исследовано лишь для олигорибонуклеотидных дуплексов.^{49, 101} Прирост свободной энергии при добавлении концевой неканонической пары к коровому дуплексу составлял в среднем $-0.5 \div -2.3$ ккал/моль в зависимости от вида неканонической пары и последнего основания корового дуплекса: значение $\Delta\Delta G_0(G \cdot U) \approx \Delta\Delta G_0(A \cdot U) \approx -1.3$ ккал/моль, добавление пары пиримидин–пиримидин или пурин–пиримидин (но не $G \cdot U$) приводило к увеличению стабильности дуплекса на -0.5 ккал/моль, а добавление пары пурин–пурин было сравнимо с добавлением свисающего конца (вклад в ΔG_0 за счет такой пары составляет -0.2 ккал/моль). В работе¹⁰² показано, что стабилизирующее влияние концевого мисматча увеличивается в ряду $A \cdot C \approx A \cdot A < A \cdot G \approx A \cdot U$ (данные получены для корового дуплекса CCGG/GGCC).

Сравнительный анализ данных, приведенных в работах,^{13, 49, 56, 99, 101} позволяет утверждать, что добавление наиболее слабой неканонической пары U·C в конец дуплекса не приводит к изменению его стабильности, тогда как появление в центральной части дуплекса изолированной пары G·U вызывает его значительную дестабилизацию.

Работа⁴² является единственной, в которой проведено сравнение стабильности несовершенных гетеродуплексов. Температуру плавления несовершенных комплексов определяли по зависимости степени связывания олигонуклеотидов с $d(pT)_9$, иммобилизованным на смоле, от температуры. Были проанализированы следующие неканонические пары: T·dC; T·rC; T·dG; T·rG; T·T и T·U. Рибоолигонуклеотиды образуют с иммобилизованным $d(pT)_9$ менее стабильные дуплексы, чем дезоксирибоолигонуклеотиды. Исключение составляют только дуплексы, содержащие T·rG-пару. Дестабилизирующее действие такой пары значительно меньше, чем пары dT·dG. Стабильность дуплекса с T·rG-парой соответствует таковой для дуплекса, укороченного на одну A·U-пару. Кроме того, в этой же работе показано влияние положения неправильной пары в дуплексе на его стабильность. Концевая неправильная пара вызывает минимальную дестабилизацию двойной спирали ($\Delta T_m = 4^\circ\text{C}$ для dT₉·dA₈ и dT₉·dA₈G) по сравнению с неправильной парой в центре дуплекса ($\Delta T_m = 15^\circ\text{C}$ для dT₉·dA₈ и dT₉·dA₅GA₃).

Рассматривая проблему репарации неканонических пар,^{88, 99} авторы приходят к выводу, что наиболее эффективно репарируются стабильные пары (G·T и T·G), вносящие минимальные возмущения в структуру ДНК. Степень репарации составляет 93% для G·T-пары и 55% для T·G-пары, тогда как другие мисматчи узнаются системой репарации клетки значительно слабее. Степень репарации составляет менее 5% для пар A·G и C·T и 42% для пары G·A.

Обсужденные в данном разделе экспериментальные данные однозначно свидетельствуют о том, что наибольший вклад в понижение комплементарной точности взаимодействия нуклеиновых кислот должны вносить несовершенные комплексы со структурными аномалиями на концах дуплекса, что хорошо согласуется с теоретическими оценками, сделанными в работе.¹¹ Однако при этом не следует забывать о возможности образования несовершенных комплексов повышенной стабильности, как, например, дуплексы с инвертированными неканоническими G·A-парами.

IV. Точность взаимодействия молекул РНК и ДНК с олигонуклеотидами и их производными

В последние годы был разработан ряд подходов для исследования структуры и функций нуклеиновых кислот, основанных на использовании антисмысловых олигонуклеотидов и их производных.¹ Антисмысловые олигонуклеотиды, комплементарные различным последовательностям в составе одноцепочечных и двуцепочечных нуклеиновых кислот, обладают способностью образовывать с этими нуклеиновыми кислотами специфические комплексы (дуплексы и триплексы), что препятствует взаимодействию нуклеиновой кислоты с рибосомами, ДНК- или РНК-полимеразами как *in vitro*, так и *in vivo*.^{2, 9}

Существует несколько основных требований, на которых базируются эти подходы. Во-первых, производные олигонуклеотидов должны проникать в клетку и быть достаточно стабильными в условиях *in vivo*. Во-вторых, олигонуклеотиды или их производные должны образовывать комплекс с выбранной последовательностью нуклеиновой кислоты. В-третьих, образование комплекса должно приводить к ингибированию функции данной нуклеиновой кислоты. В-четвертых, антисмысловые олигонуклеотиды не должны взаимодействовать с другими последовательностями в клетке, кроме выбранной.⁹ Совершенно очевидно, что последние два принципа тесно взаимосвязаны – специфическое взаимодействие с выбранной последовательностью невозможно без образования прочного, высокостабильного комплементарного комплекса.

В предыдущих разделах были рассмотрены термодинамические параметры образования совершенных ДНК- и РНК-дуплексов, а также дефекты двойной спирали, оказывающие дестабилизирующее действие на дуплекс. Все эти данные получены при изучении модельных олигомерных дуплексов. В следующем разделе будут рассмотрены работы по взаимодействию олигонуклеотидов или их производных с НК-мишенью, в которых оценивалась точность взаимодействия олигонуклеотида с выбранной нуклеиновой кислотой.

1. Модельные системы

а. Олигонуклеотиды с обычной фосфодиэфирной связью

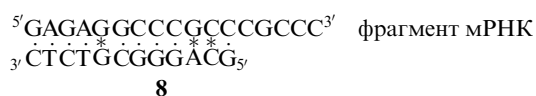
Специфичность и эффективность комплексообразования серии синтетических олигонуклеотидов длиной 8–14 звеньев (ON) с ДНК фага M13mp3 были исследованы в работе.¹⁰³ Два ON из 11 исследованных (один 12-звенный (ON-12) и второй 14-звенный (ON-14)), комплементарные участкам фаговой ДНК 3366–3377 и 2216–2230 соответственно, связывались при 4°C с ДНК-мишенью более, чем в одном сайте (концентрация ON-12 и ON-142 мкМ). Связывание этих олигонуклеотидов с ДНК-мишенью с образованием несовершенных комплексов было подтверждено элонгацией (удлинением) ON-12 и ON-14 как праймеров под действием ДНК-полимеразы при 20°C . Следует отметить, что в этих же условиях два 10-звенных олигонуклеотида, образующих с ДНК M13mp3 дуплексы длиной в 10 пар оснований с центральной G·T-парой, не достраивались ДНК-полимеразой, а 13-звенный олигонуклеотид, содержащий аналогичную неканоническую пару, достраивался ферментом до получения репликативной формы фаговой ДНК.

Влияние некомплементарных пар в составе дуплекса матрица-праймер на эффективность реакции элонгации цепи с помощью Taq ДНК-полимеразы и обратной транскриптазы AMV было исследовано в серии работ.^{104–108} Наличие единственного мисматча внутри дуплекса матрица-праймер

не оказывало значительного эффекта на выход продукта амплификации HIV-1 gag-области, тогда как наличие неканонической пары оснований на 3'-конце влияло на выход PCR-продукта. 3'-Концевые пары Т-С, Т-Г, Т-Т, Г-Г и А-С амплифицировались с такой же эффективностью как и совершенный дуплекс, тогда как пары А-Г, Г-А и С-С на 3'-конце дуплекса уменьшали общий выход PCR-продукта в 100 раз, а пара А-А – примерно в 20 раз. Влияние мисматчей Г-А и А-Г на выход продукта было одинаковым. Минимальный эффект на выход PCR-продукта оказывали мисматчи, образованные Т с Г и С с Т. Наличие двух неправильных пар вблизи 3'-конца праймер-матричного дуплекса (последние 4 основания дуплекса), когда один из мисматчей 3'-концевой (кроме неправильно спаренного тимидина), приводит к практически полному прекращению реакции элонгации.¹⁰⁴ Следует отметить, что данные по термодинамической стабильности таких несовершенных дуплексов не объясняют полученные авторами результаты. Аналогичные данные были получены¹⁰⁵ при удлинении несовершенного праймер-матричного дуплекса с помощью обратной транскриптазы AMV. Снижение суммарной концентрации dNTP от 800 до 50 мкМ (см.¹⁰⁴) или от 200 до 2 мкМ (см.¹⁰⁶) приводило к элонгации в основном только совершенного дуплекса (Г-Г- и С-Т-мисматчи соответственно). При повышении температуры отжига праймер-матричного дуплекса от 44 до 55°C происходила элонгация только совершенного дуплекса, а элонгации дуплексов с 3'-концевыми мисматчами А-А и Т-Т не наблюдалось.¹⁰⁷ Получить удлинение только совершенного дуплекса оказалось возможным также при использовании более коротких праймеров: 10 из 12 возможных неканонических пар на 3'-конце дуплекса полностью прекращали элонгацию, если использовались короткие (10-звенные) праймеры.¹⁰⁸

Анализ серии олигонуклеотидов, комплементарных последовательности Шайна-Дальгарно в 16S рРНК *E.coli* и образующих с ней совершенный (AGAGGAGGU, ON/p) и несовершенные комплексы (GGAAGGAGC, ON/i-1; GGAAGAGC, ON/i-2; AUUUCUUCUAUG, ON/i-3) показал, что эффективность ингибирования связывания Qβ РНК с 70S рибосомами *E.coli* зависит от стабильности дуплекса 16S рРНК-олигонуклеотид; ON/p: $\Delta G = -16.9$ ккал/моль, ингибирует связывание на 87.2%; ON/i-1: $\Delta G = -11.1$ ккал/моль, ингибирует связывание на 56.6%; ON/i-2: $\Delta G = -7.9$ ккал/моль, ингибирует связывание на 42.6%; ON/i-3: $\Delta G = -1.1$ ккал/моль, ингибирование не наблюдается.¹⁰⁹ Олигонуклеотидный «пробинг» молекулы 16S рРНК в составе 30S рибосомной субчастиц *E.coli* 8–15-звенными олигонуклеотидами показал, что при концентрации олигонуклеотида, равной 1 мкМ, возможно образование несовершенного комплекса с экспонированными участками РНК, содержащего 5 классических уотсон-криковских пар на 3'-конце дуплекса.¹¹⁰

Сайт-направленное расщепление мРНК протимозина- α , выделенной из цитоплазмы лимфоцитов, стимулированных стафилококковым энтеротоксином, в присутствии 12-звенного ON (GCAGGGCGTCTC) и РНКазы Н, происходит в составе как совершенного, так и несовершенного дуплексов. Несовершенный сайт связывания ON-12 был идентифицирован по размеру продуктов гидролиза и содержал три неправильных пары (см. структуру 8).¹¹¹



В этой же работе проводилось расщепление РНКазой Н мРНК γ -интерферона в присутствии 24-звенного олигонуклеотида ON-24 (концентрация 1 мкМ). Хотя ON-24, кроме последовательности 603–625 мРНК γ -интерферона, может образовывать несовершенный дуплекс длиной 7 пар основа-

ний с TGCCTGC последовательностью мРНК, продуктов расщепления РНК по данному сайту не обнаружено. Очевидно, разница в стабильности совершенного и несовершенного дуплексов ON-24·мРНК интерферона γ оказалась достаточной для дискриминации этих сайтов РНКазой Н.

Точность образования дуплекса особенно важна при проведении сайт-направленного мутагенеза. Для введения точечных мутаций в молекулу ДНК оказались наиболее удобными 8–12-звенные олигонуклеотиды, содержащие заменяемое основание в центре.¹¹² Определяющим параметром, от которого зависел выход мутантной ДНК, являлась стабильность несовершенного дуплекса, содержащего одну неканоническую пару. Выход мутанта повышался от 0.05 до 20% при понижении температуры гибридизации от 33 до 0°C для 8-звенного олигонуклеотида с Г-Т-парой в центре. Использование 10-звенного ON с аналогичной неправильной парой¹¹³ приводило к повышению выхода мутантной ДНК до 38% при 10°C. При смещении заменяемого основания от 3'-конца к центру олигонуклеотида выход мутантной ДНК повышался от 8 до 20% соответственно. Вероятно, дуплексы с неправильной парой на конце, хотя и более стабильны, но олигонуклеотиды, образующие такие дуплексы, являются плохими праймерами для ДНК-полимеразы.¹¹³

При использовании олигонуклеотидов, комплементарных сайту мутации, для коррекции последовательности ДНК с помощью ДНК-полимеразы было показано, что эффективность коррекции прямо связана со стабильностью дуплекса олигонуклеотид (праймер)-ДНК. При увеличении длины праймера от 11 до 17 оснований выход «исправленной» ДНК фага ϕ X 174 (производили коррекцию мутантного штамма am3) повышался от 0.02 до 13.9%. Кроме того, два расположенных встык один за другим (тандемно) олигонуклеотида (имитация точечного разрыва) были более эффективны в синтезе «исправленной» ДНК, чем короткие олигонуклеотиды (выход ДНК фага ϕ X 174, %: ON-11 + ON-6 – 1.2%, а ON-11 – 0.02% и ON-6 – 0%; ON-14 + ON-6 – 14.0%, а ON-14 – 1.9%; ON-17 + ON-6 – 32.5%, а ON-17 – 13.9%).¹¹⁴

В работе¹¹⁵ пентадекадезоксирибонуклеотид, полностью комплементарный сегменту РНК, синтезируемой на триптофановом опероне *E.coli*, ответственному за регуляцию аттенуации, был использован для изучения роли вторичной структуры РНК в термации транскрипции. Суть используемого в работе¹¹⁵ подхода состоит в том, что олигомер, связываясь в комплекс с выбранным участком синтезируемого транскрипта, предотвращает образование соответствующей «терминаторной» вторичной структуры в этом сегменте РНК, выступая, таким образом, в качестве антитерминатора. Показано, что в присутствии 500-кратного избытка олигомера (2 мкМ, 37°C) по отношению к матрице выход транскрипта примерно в четыре раза превышал выход продукта в контрольном эксперименте (без олигонуклеотида). С другой стороны, выход транскрипта, синтезируемого в присутствии этого же олигомера (в тех же условиях) на триптофановом опероне *Ser.marcenscens*, превышал выход продукта в контрольном эксперименте всего в 1.2 раза. В последнем случае олигомер мог образовывать с соответствующим участком транскрипта дуплекс с двумя неканоническими парами, в отличие от совершенного комплекса, образуемого этим олигомером с выбранным участком РНК, синтезируемой на триптофановом опероне *E.coli*.

В работе¹¹⁶ был предложен общий подход для создания олигонуклеотидных зондов для мРНК с неизвестной первичной структурой (предполагается, что аминокислотная последовательность соответствующего белка известна хотя бы частично). Этот подход основан на использовании в качестве праймера или зонда олигонуклеотида, комплементарного участку мРНК, кодирующему тетрапептиды, состоящие из аминокислот Phe, Tyr, His, Asn, Asp, Cys, Gln, Lys, Glu, Trp, Met. С учетом вырожденности кода такой олигонуклеотид будет образовывать с мРНК дуплекс, содержащий либо Г-С-

, либо G-U-пары. Кроме того, могут встречаться пары T-G или T-A. Созданный по такому принципу зонд для гастриновой мРНК (содержащий две G-U-пары) гибридизовался с мРНК, однако эффективность его как праймера была в 2 раза ниже, чем эффективность полностью комплементарного данному участку олигонуклеотида. Кроме того, в случае олигонуклеотидов с двумя G-U-парами и гибридизация, и элонгация праймера происходили только при денатурации мРНК.

Точный выбор условий гибридизации позволяет различить последовательности РНК или ДНК, содержащие в сайте связывания зонда хотя бы одну замену.^{117, 118} Так, наличие одной G-T-пары (вместо G-C) в центре сайта связывания 14-звенного олигонуклеотида (ON-14-B) понижало степень его гибридизации с мРНК β-глобина кролика до 8% по сравнению со степенью гибридизации олигонуклеотида, полностью комплементарного этому же участку (ON-14-A) (1 М NaCl, 37°C, [ON-14-A] = [ON-14-B] = 0.15 · 10⁻⁹ М). Температуры диссоциации комплексов¹¹⁷ мРНК-ON-14-A и мРНК-ON-14-B различались на 5°C.

Гибридизация 23-звенных олигонуклеотидов с исходной и мутантной ДНК зависела от типа неправильной пары в сайте связывания олигонуклеотида. Комплементарный ДНК аденовируса Ad-2 ON-23 гибридизовался и с ДНК мутантного штамма Cyt-15. Дуплекс ON-23 · Cyt-15 ДНК содержал Т-Т-пару. С другой стороны, ON-23М, комплементарный ДНК Cyt-15, давал очень слабый сигнал гибридизации с ДНК Ad-2. В последнем случае дуплекс содержал А-А-пару, что объясняется большим дестабилизирующим действием А-А-пар на двойную спираль, чем Т-Т-пары.¹¹⁸

Различия в стабильности совершенного дуплекса и дуплекса, содержащего одну неправильную пару, были использованы для диагностики серповидно-клеточной анемии. 19-Звенные олигонуклеотиды: ON-19-A, комплементарный мРНК нормального глобина (мРНК-A), и ON-19-S, комплементарный мутантной мРНК (мРНК-S), давали перекрестную гибридизацию при 45°C (уровень гибридизации 10–15%); комплекс мРНК-A-ON-19-S содержал одну А-А-пару, а мРНК-S-ON-19-A – одну Т-Т-пару. Повышение температуры гибридизации до 55°C приводило¹¹⁹ к строго специфическому взаимодействию данных олигонуклеотидов с соответствующей мРНК. Точность взаимодействия коротких зондов длиной 7, 9 или 12 олигонуклеотидных звеньев оказалась невысокой и приводила к сильной перекрестной гибридизации. Так, 9- и 12-звенные зонды, комплементарные гену лизоцима фага T4, гибридизовались на 15–18% с ДНК безлизоцимного фага G223 и на 10% с суммарной РНК *E. coli*.¹²⁰ При температуре гибридизации на 15–20°C ниже температуры плавления совершенного комплекса 12–15-звенные олигонуклеотиды хорошо гибридизовались с ДНК *lac* оперона (не только дикого, но и серии мутантных штаммов) с образованием дуплексов с неканоническими парами типа С-А, G-А, Т-Т и т.д. При этом степень перекрестной гибридизации зависела от вида неправильной пары: степень гибридизации для олигонуклеотидов, образующих комплекс с G-А-парой была ниже, чем с С-А-парой. Повышение температуры гибридизации от 30 до 37°C позволило избежать перекрестной гибридизации этих зондов.¹²¹

6. Неионные аналоги олигонуклеотидов

Неионные аналоги олигонуклеотидов (фосфотриэфиры, метилфосфонаты) были предложены в качестве антисмысловых олигонуклеотидов для ингибирования экспрессии генов *in vivo*. Незаряженные олигонуклеотиды легко проникают в клетку за счет пассивной диффузии. Использование неионных аналогов в качестве ингибиторов трансляции мРНК или экспрессии генов подробно рассмотрено в обзорах.^{1–3, 122}

При изучении связывания этилфосфотриэфиров олигонуклеотидов, комплементарных антикодоновой петле (dTrpTrpCpA, ON-I) и ССА-концу (dGpGpT, ON-II) тРНК^{Phe}

из дрожжей и *E. coli* было обнаружено, что константа связывания этих производных с тРНК^{Phe} выше, чем немодифицированных ON. При 0°C (1 М NaCl, 10 мМ Mg²⁺) константа связывания (K_x) составляла 3600 М⁻¹ для ON-I и 2400 М⁻¹ для диэфирного аналога.¹²³ Как и ожидалось, при 0°C ON-II в концентрации 270 мкМ ингибировал аминоацилирование всех пяти исследуемых тРНК (специфичных к Phe, Lys, Tyr, Pro, Leu) примерно в одинаковой степени (на 60–80%). В концентрации 364 мкМ ON-I ингибировал аминоацилирование тРНК^{Phe} за счет образования совершенного дуплекса с тетрауклеотидной последовательностью в антикодоновой петле тРНК^{Phe}. Наряду с этим в присутствии ON-I наблюдалось¹²⁴ ингибирование реакции аминоацилирования и других тРНК: тРНК^{Leu} на 35%, тРНК^{Lys} на 12%, тРНК^{Pro} на 0.7%. При использовании в качестве ингибиторов реакции аминоацилирования метилфосфатных (модифицированных фосфат обозначен звездочкой) производных олигонуклеотидов dApApApA (M-ON-1) и dGpGpU (M-ON-2), комплементарных последовательности в антикодоновой петле тРНК^{Lys} и ССА-концу тРНК соответственно, было обнаружено неспецифическое ингибирование реакции аминоацилирования тРНК^{Phe} на 9% и тРНК^{Leu} на 12% в присутствии M-ON-1 (0°C). В присутствии такого же производного dApApGpA (M-ON-3), образующего с антикодоновой петлей тРНК^{Lys} дуплекс с одной G-U-парой, уровень ингибирования реакции аминоацилирования тРНК^{Lys} составлял 35% (тогда как для M-ON-1 – 88%), а степени аминоацилирования тРНК^{Phe} и тРНК^{Leu} не изменялись.¹²⁵

Наиболее полно экспериментальные данные по термодинамике дуплексов, образованных фосфодиэфирным и метилфосфонатным олигонуклеотидами, представлены в работах.^{126, 127} Изменение свободной энергии дуплекса вследствие введения одной метилфосфонатной связи вместо диэфирной составляет $\Delta\Delta G_0 = -0.75$ ккал/моль (1 М NaCl, 25°C) независимо от типа основания в олигонуклеотиде. Дополнительная стабилизация таких дуплексов происходит за счет уменьшения суммарного заряда в расчете на пару ближайших соседей, содержащих метилфосфонатную связь.¹²⁶

Повышение стабильности дуплексов, образованных метилфосфонатными производными олигонуклеотидов, влияет на комплементарную точность взаимодействия таких производных с нуклеиновыми кислотами и их фрагментами. В работе¹²⁸ была изучена фотомодификация 35-членного олигонуклеотида додекамерными метилфосфонатами, несущими на 5'-конце 4'-(аминоалкил)-4,5',8-триметилпсорален. Показано, что степень фотомодификации ON-мишени сильно зависит от точности образования дуплекса с реагентом (см. табл. 4). Неканонические пары, прилегающие к реакционноспособной части производного, резко снижали степень фотомодификации мишени. Эти результаты хорошо согласуются с данными работы,¹²⁹ в которой было показано, что биологическая и биохимическая активность олигонуклеозидметилфосфонатов резко снижается при появлении в дуплексе дефектов.

Таблица 4. Влияние точности образования дуплекса на степень фотомодификации 35-звенного олигонуклеотида псораленовым производным метилфосфонатного додекамера¹²⁸

Дуплекс	Степень фотомодификации, %
Совершенный	85
Центральная Т-С-пара	53
3'-Концевая Т-С-пара	58
5 G-T-Пар через одну	33
3 Т-С-Пары через одну	19
4 Т-С-Пары через одну	0

в. Фосфотиоатные аналоги олигонуклеотидов

Фосфотиоатные аналоги олигонуклеотидов, содержащие атом серы вместо атома кислорода у фосфора, также относятся к производным ОН с модифицированной фосфодиэфирной связью. Замена атома кислорода на атом серы приводит к повышению устойчивости таких производных к действию внутриклеточных нуклеаз.¹³⁰ Термодинамические параметры образования дуплексов между обычной ДНК или РНК и фосфотиоатными производными олигонуклеотидов представлены в работах.^{1, 131–134} К сожалению, данные по точности взаимодействия фосфотиоатных производных олигонуклеотидов с модельными НК-мишенями отсутствуют.

г. Производные олигонуклеотидов, содержащие α -аномерные звенья

В течение последних нескольких лет были разработаны методы синтеза олигонуклеотидов, устойчивых к действию нуклеаз и состоящих из α -аномеров нуклеотидов (см. обзоры^{135–137}). α -Олигонуклеотиды образуют двойную спираль с комплементарной цепью, состоящей из природных (β) или α -аномеров нуклеотидов. Обе цепи α - β -дуплекса находятся в параллельной ориентации, а сам дуплекс принадлежит, согласно данным ЯМР, к *B*-конформации ДНК и на $70 \pm 10\%$ правозакручен.¹³⁸ Температура плавления дуплексов типа α - β $\{\alpha[(\text{Tr})_7\text{T}]\cdot\beta[\text{d}(\text{pA})_8]\}$ (30°C) выше T_m соответствующего β - β -дуплекса (24°C).¹³⁹ что свидетельствует о большей стабильности α - β -дуплексов по сравнению с β - β . С другой стороны, для гетероолигомерных дуплексов типа $\alpha[\text{d}(\text{TCTAAAC})]\cdot\beta[\text{d}(\text{AGATTTG})]$ температура плавления практически не отличается от соответствующего β - β -дуплекса (33 и 36°C соответственно).¹⁴¹ Детальное термодинамическое изучение следующих дуплексов $\beta[\text{d}(\text{CCTTCC})]\cdot\beta[\text{d}(\text{GGAAGG})]$, $\alpha[\text{d}(\text{CCTTCC})]\cdot\beta[\text{d}(\text{GGAAGG})]$, $\beta[\text{d}(\text{CCTTCC})]\cdot\alpha[\text{d}(\text{GGAAGG})]$ позволило сделать вывод о том, что стабильность дуплексов α - β зависит от природы оснований в α -цепи (пурин или пиримидин) по крайней мере для гомопуриновых или гомопиримидиновых последовательностей.¹⁴² Сравнение приведенных выше дуплексов β - β ($T_m = 19^\circ\text{C}$) с дуплексами α - β ($T_m = 28^\circ\text{C}$) показало, что в 1 M NaCl дуплексы α - β стабильнее, чем дуплексы β - β , если α -цепь состоит из пиримидиновых оснований.¹³⁶ Дуплексы α -олигонуклеотидов $\alpha[(\text{Tr})_7\text{T}]$ с природными РНК (поли(гА)) стабильнее аналогичного комплекса с поли(дА) ($T_m = 29$ и 17°C соответственно), тогда как дуплекс β - dT_8 -гйк-и(гА) менее стабилен, чем dT_8 -поли(дА) ($T_m = 14$ и 17°C соответственно).¹⁴³ Данные по точности взаимодействия α -олигонуклеотидов с природными ДНК- или РНК-мишенями в литературе отсутствуют.

д. Производные олигонуклеотидов, ковалентно связанные со стабилизирующими дуплекс группами

Олигонуклеотиды, ковалентно связанные через олигометиленовый мостик с молекулой красителя, образуют дуплексы повышенной прочности ($\Delta T_m = 20–30^\circ\text{C}$), за счет интеркаляции красителя в двойную спираль мРНК-антисмысловый олигонуклеотид.^{131, 144, 145} Синтез и механизм действия таких олигонуклеотидных производных подробно рассмотрены в обзорах.^{5, 146, 147} Стабильность дуплекса поли(гА)- dT_{6-8} значительно возрастает ($\Delta T_m = 20–30^\circ\text{C}$), если олиготимидилат ковалентно связан через один из концов с 9-амидакридином.^{139, 144, 148} В работах^{149, 150} для увеличения стабильности ДНК-дуплексов был использован другой краситель – N-(2-оксиэтил)феназиний. Олигонуклеотид, несущий остаток феназина на 5'-конце, инактивировал репликацию ДНК бактериофага M13mp7 на 65%, тогда как свободный олигонуклеотид не оказывал инактивирующего действия.¹⁵⁰ К сожалению, в работах, посвященных таким

производным олигонуклеотидов, не оценивалась специально точность взаимодействия с НК-мишенью. Все эти работы выполнены либо на гомополимерных матрицах, либо на коротких ДНК-фрагментах.

2. Ингибирование трансляции мРНК

В последние годы антисмысловые олигонуклеотиды и их производные интенсивно используются в качестве специфических ингибиторов экспрессии генов.^{1, 5, 151, 152} В основе подхода лежит предположение о том,^{153–161} что после образования дуплекса с антисмысловым олигонуклеотидом, мРНК либо теряет способность к транслации рибосомой,^{153–157} либо расщепляется РНКазой Н.

Для исследования ингибирующего действия олигонуклеотидов или их производных на трансляцию мРНК используют стандартные бесклеточные белок-синтезирующие системы – лизат ретикулоцитов кролика, экстракт из проростков пшеницы (WGE) и ооциты *Xenopus laevis*. Активность РНКазы Н особенно высока в экстракте из проростков пшеницы.^{159, 162, 163} В свежеприготовленном лизате ретикулоцитов кролика также тестируется небольшая активность РНКазы Н, достаточная для гидролиза экзогенной мРНК с антисмысловым нуклеотидом.¹⁶⁰ В ооцитах *Xenopus laevis* активность РНКазы Н обнаруживается и в ядре, и в цитоплазме.^{159, 164}

В качестве матрицы использовались наиболее доступные мРНК глобинов кролика^{157, 159, 165–169} или мыши.¹⁶⁰ Кроме того, часто в качестве матрицы использовались вирусные РНК: саркомы Рауса (RSV),^{170, 171} Сендай,¹⁷² энцефаломиокардита,¹⁷³ табачной мозаики.¹⁷⁴ Поскольку в некоторых работах оценивался уровень специфичности ингибирования трансляции, результаты именно этих исследований будут рассмотрены подробнее.

Как было показано в работе¹⁷⁰ трансляция 35S РНК вируса саркомы Рауса (RSV) в WGE эффективно подавлялась в присутствии 13-звенного олигонуклеотида $\text{d}(\text{AATGGTAAATGG})$, комплементарного 3'- и 5'-концевым последовательностям этой РНК. Одновременно с подавлением трансляции РНК RVS (примерно на 88%) наблюдалось ингибирование трансляции РНК AMV (вирусы миелобластома птиц), мРНК глобинов кролика и РНК BMV (вирус мозаики Брума) на 57, 25 и 30% соответственно (данные приведены для соотношения РНК:ОН-13, равного 1:20, 25°C). Степень ингибирования трансляции всех РНК увеличивалась с увеличением концентрации ОН-13, однако при низких концентрациях ОН-13 (РНК:ОН-13 равно 1:2) ингибировалась в основном трансляция РНК онковирусов: РНК RSV и РНК AMV на 27 и 10%, соответственно. Анализ последовательности показал, что ОН-13 мог образовывать с РНК AMV несовершенный комплекс длиной 13 пар оснований, содержащий три неканонические пары – две в центре и одну на 3'-конце. Степень гомологии данного олигомера с РНК BMV и глобиновой РНК не определялась.

Ингибирование трансляции мРНК в WGE за счет образования несовершенного комплекса с антисмысловым олигонуклеотидом наблюдали в работе.¹⁶⁴ Все три исследованных олигонуклеотида, специфичных к β -глобиновой мРНК, имели сайты неполной комплементации на α -глобиновой мРНК. Так, ОН-17 мог образовывать с мРНК α -глобина несовершенный дуплекс из 10 пар оснований, три из которых неканонические; ОН-12 – несовершенный дуплекс из семи пар оснований с центральной А-С-парой и, наконец, ОН-8 мог образовывать дуплекс, содержащий семь пар оснований с концевой неправильной парой. Ингибирование трансляции мРНК α -глобина наблюдалось только в присутствии ОН-8 (степень ингибирования β - и α -мРНК 65 и 15% соответственно). По-видимому, в случае ОН-17 и ОН-12 разница в стабильности совершенного и несовершенного дуплексов, образуемых этими олигонуклеотидами с β - и α -глобиновой

мРНК была достаточно велика, чтобы при 25°C и 10 мкМ концентрации олигонуклеотидов либо вообще не образовывался несовершенный комплекс, либо не происходило его узувание РНКазой Н.

Образование несовершенного комплекса между мРНК α -глобина и 30-звенным олигонуклеотидом, комплементарным фрагменту 270–300 β -глобиновой мРНК, было зарегистрировано по расщеплению α -мРНК в присутствии насыщенных концентраций 30-мера в ооцитах *Xenopus laevis*.¹⁵⁹ Степень гомологии между α -глобиновой мРНК и ON-30 составляла 60%. В работе¹⁶⁰ наблюдалось неспецифическое ингибирование трансляции глобиновых мРНК олигонуклеотидами, комплементарными 5'-нетранслируемой последовательности. Этот факт объяснялся высоким уровнем гомологии между нетранслируемыми последовательностями в α - и β -глобиновых мРНК. Высокая степень гомологии (около 50%) между 5'-концевыми последовательностями всех мРНК вируса Сендай привела к тому, что 20-звенный ON, комплементарный фрагменту 1–20 мРНК белка NP, понижал выход продуктов трансляции всех мРНК этого вируса за счет образования частичного комплекса длиной 10 пар оснований с 10-звенной последовательностью, практически общей для всех мРНК вируса Сендай.¹⁷²

В работе¹⁷⁵ неспецифическое подавление трансляции РНК BMV в лизате ретикулоцитов кролика (RRL) 15-звенным ON, комплементарным РНК вируса везикулярного стоматита (VSV), авторы объясняли подавлением транслирующей способности рибосом за счет связывания этого ON-15 с 18S рРНК. Уровень неспецифического ингибирования трансляции РНК BMV зависел от концентрации ON-15 и имел ярко выраженную тенденцию к насыщению. Максимально достигнутая степень ингибирования трансляции составляла 88 и 43% при 40 мкМ ON-15, и 41 и 2% при 10 мкМ ON-15 для РНК VSV и РНК BMV соответственно.¹⁷⁵ Хотя, по утверждению авторов, отсутствует гомология между РНК BMV, 18S рРНК и данным ON-15, более вероятным является ингибирование трансляции РНК BMV за счет образования несовершенного комплекса с этим олигонуклеотидом, чем вследствие неспецифического ингибирования транслирующей активности рибосом.

В работе¹⁷³ показано, что трансляция РНК вируса энцефаломиокардита в RRL подавляется примерно на 60% с помощью 25 мкМ 13-звенного олигонуклеотида, образующего совершенный комплекс с участком 751–763. Замена центральной G-C-пары этого дуплекса на пару G-A (изменено одно основание ON-13) приводит к 4-кратному снижению уровня ингибирования трансляции (до 14%) при той же концентрации ON-13.

Интересные данные по комплементационной точности взаимодействия антисмысловых олигонуклеотидов или их метилфосфонатных аналогов с НК-мишенью получены в серии работ Миллера с соавт.^{165–167, 176, 177} по ингибированию трансляции мРНК глобинов кролика *in vitro*. Фосфодиэфирные олигонуклеотиды длиной 8–10 звеньев ингибировали трансляцию мРНК глобинов в RRL и WGE (0–200 мкМ ON, 0,3 мкг мРНК). Данные олигомеры были полностью комплементарны последовательностям, расположенным в 5'-нетранслируемой области и области AUG-кодона, либо α -, либо β -глобиновой мРНК. Все синтезированные олигонуклеотиды образовывали дуплекс с выбранными последовательностями мРНК, что было показано с помощью достройки этих олигонуклеотидов (как праймеров) обратной транскриптазой. Однако несмотря на то, что эти олигонуклеотиды были хорошими ингибиторами трансляции, комплементационная точность их взаимодействия с мРНК была низкой. Так, например, ON-12 ингибировал трансляцию мРНК α -глобина (комплементарен ее участку 28–39) на 97% в RRL и на 100% в WGE при концентрации 100 мкМ, но одновременно с этим ON-12 ингибировал трансляцию β -глобиновой мРНК на 96 и 100% в RRL и WGE

соответственно. При концентрации ON-12, равной 5 мкМ, степень ингибирования трансляции α - и β -мРНК составляла 15 и 14% в RRL и 75 и 14% в WGE соответственно. Аналогичные результаты были получены для всех семи исследованных нуклеотидов.¹⁶⁵

В работах^{166, 176} были изучены короткие 4–12-звенные олигонуклеозидметилфосфонаты (M-ON), комплементарные точно тем же участкам глобиновых мРНК, что и фосфодиэфирные олигонуклеотиды, использованные в работе.¹⁶⁵ Предгибридизация M-ON с мРНК приводила к увеличению степени ингибирования трансляции мРНК в RRL на 20–30%. Вызывает удивление тот факт, что при 37°C M-ON-4 (CpCpApT) (комплементарен участкам 37–40 в α - и 54–57 в β -мРНК) при концентрации 100 мкМ не ингибировал трансляцию мРНК, а при концентрации 200 мкМ степень ингибирования трансляции α - и β -мРНК составляла 28 и 42% соответственно. Также как и в работе,¹⁶⁷ M-ON, комплементарные мРНК α -глобина, ингибируют трансляцию обеих мРНК примерно в одинаковой степени, особенно при высоких концентрациях M-ON (200 мкМ) и при проведении стадии перегибридизации мРНК с M-ON.

Прямое сравнение ингибирующего действия ON и M-ON позволяет сделать вывод о том, что M-ON не являются более эффективными и специфичными ингибиторами трансляции, чем фосфодиэфирные олигонуклеотиды. Низкую специфичность ON и M-ON длиной 4–12 звеньев, также как и их невысокую эффективность в подавлении трансляции, можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, 5'-нетранслируемая область α - и β -глобиновых мРНК кролика обладает высокой степенью гомологии. Поэтому кроме выбранного на одной мРНК сайта связывания, каждый из олигонуклеотидов может образовывать и несовершенные комплексы с другой мРНК. Однако авторы, обсуждая возможность образования таких комплексов, отыскивают только те участки мРНК, которые могут образовывать с M-ON или ON непрерывный дуплекс длиной не менее четырех пар оснований (так называемый частичный дуплекс⁴⁷), и полностью отвергают возможность образования более протяженных дуплексов, содержащих неканонические пары, другими словами, несовершенных комплексов.^{165, 166} Во-вторых, не рассматривается влияние вторичной структуры мРНК на комплексообразование.¹⁷⁵

Низкая специфичность действия коротких M-ON (9-звенные олигонуклеотиды) была обнаружена также при ингибировании трансляции мРНК белков N, NS и GVSV в RRL при 30°C. При концентрации M-ON-9 (комплементарен мРНК белка N, участок 14–22) наряду с ингибированием синтеза белка N на 77%, происходило ингибирование синтеза белков NS и M на 38 и 43% соответственно.¹⁷⁸ Низкую специфичность ингибирования трансляции, наблюдавшуюся при высоких концентрациях (100–150 мкМ) M-ON-9, авторы объясняют образованием частичных комплексов M-ON-9 с другими мРНК VSV. Кроме того, несмотря на отсутствие экспериментальных доказательств, авторы полагают,¹⁷⁸ что большое влияние на специфичность и эффективность ингибирования трансляции оказывает вторичная структура мРНК.

Сайт-специфичное ингибирование трансляции происходит и в том случае, если M-ON образует с мРНК дуплекс, содержащий неканонические пары. Три октамера (M-ON-8_{1–3}), комплементарные области AUG-кодона мРНК белка gas p21 BALB, ингибировали трансляцию этой мРНК в соответствии со стабильностью образующихся дуплексов. Так,¹⁷⁷ M-ON-8₁ ингибировал синтез белка на 97%; M-ON-8₂, образующий с мРНК дуплекс, содержащий одну неправильную пару в центре, – на 31%; а M-ON-8₃, образующий с мРНК дуплекс с двумя неканоническими парами в центре, – на 9%.

При определенных концентрациях и температуре антисмыслового олигонуклеотида степень ингибирования трансляции мРНК зависит от длины используемого олигонуклео-

тида, т.е. от стабильности дуплекса. 12-Звенный ON, комплементарный инициаторной области мРНК трипаносом, менее эффективен в подавлении трансляции¹⁷⁹ (степень ингибирования 20–25%), чем ON-22 и ON-34 (степень ингибирования трансляции 65–70 и 95–100% соответственно) при 25°C и концентрации 15 мкМ. Определяющее значение стабильности дуплекса мРНК·ON в подавлении трансляции данной мРНК в RRL и WGE можно дополнительно проиллюстрировать данными работ.^{180, 181} Так, 12-звенный ON, комплементарный последовательности 2–13 мРНК *T.brucei*, ингибирует трансляцию этой мРНК, но не подавляет трансляцию мРНК *T.vivax* (другой вид африканских трипаносом) при 22°C. Как оказалось, ON-12 образует с мРНК *T.vivax* дуплекс (температура диссоциации дуплекса 22°C), содержащий две неправильные пары G·A и T·T.

В работах^{145, 182} было показано, что 18-звенный олигонуклеотид, несущий на 3'-конце остаток 9-аминоакридина, подавляет экспрессию рКН113 примерно на 55% (концентрация ON-18 30 мкМ). Одновременно с этим наблюдается незначительное подавление экспрессии рBR322 (на 10%), очевидно, за счет образования несовершенного комплекса длиной 11 звеньев, содержащего две неканонические пары оснований на 5'конце дуплекса (G·T и C·T), в области нуклеотидного остатка 3234 рBR322.

Во всех рассмотренных в этом разделе работах для ингибирования трансляции мРНК *in vitro* использовались короткие 4–13-звенные олигонуклеотиды при высоких концентрациях (40–200 мкМ). Низкая специфичность ингибирования трансляции, по-видимому, была связана с тем, что разница в стабильности несовершенных и совершенных комплексов при высоких концентрациях олигонуклеотидов практически исчезла и оба типа дуплексов выступали либо в качестве ингибиторов инициации трансляции (связывание с рибосомами), либо являлись субстратами для РНКазы Н.

Специфичность ингибирования трансляции мРНК *in vitro* резко возрастает при использовании длинных антисмысловых олигонуклеотидов. Так, трансляция мРНК трипаносом специфически ингибировалась (степень подавления 95–100%) 22- и 34-звенными ON при концентрации 25 мкМ в WGE. В качестве контроля использовали РНК BMV, степень трансляции которой в присутствии этих же олигонуклеотидов не изменялась.¹⁷⁹ Трансляция РНК вируса табачной мозаики (TMV) специфически подавлялась (на 90–95%) двумя 26-звенными ON (концентрация 10 мкМ) в RRL при 30°C. В этих же условиях уровень трансляции РНК BMV не изменялся.¹⁷⁴ Специфическое ингибирование трансляции β-глобиновой мРНК кролика в присутствии α-глобиновой РНК было достигнуто при использовании 20–25- и 48-звенных ON в концентрации 5.3 мкМ (2.6 мкМ для ON-48) при 37°C в RRL. Уровень ингибирования составлял¹⁶⁹ 55–88% для ON-20 (25) и 80–98% для ON-48.

Использование антисмысловых олигонуклеотидов длиной 21–49 звеньев, комплементарных либо области инициации трансляции, либо части молекулы мРНК, кодирующей фермент дегидрофолат редуктаза, приводило к ингибированию трансляции мРНК в системе RRL не более чем на 60% при концентрации 49-звенного олигонуклеотида, равной 190 мкМ. Основной причиной низкой ингибирующей способности таких протяженных олигонуклеотидов по сравнению с их длиной и используемой концентрацией является недоступность участков мРНК для образования столь протяженного дуплекса.¹⁵⁶ В настоящее время недостаточно данных для обсуждения специфичности ингибирования трансляции мРНК глобинов кролика с помощью 17-звенных фосфотиоатных производных олигонуклеотидов (S-ON) или α-олигомеров такой же длины в RRL, WGE и ооцитах *Xenopus laevis*.^{157, 168}

3. Точность взаимодействия олигонуклеотидов и их производных с НК-мишенью *in vivo*

Антисмысловые олигонуклеотиды и их производные в перспективе можно рассматривать как терапевтические противоопухолевые, противовирусные и антибактериальные средства. Именно этим объясняется огромный интерес к изучению действия антисмысловых олигонуклеотидов *in vivo*. Механизм проникновения производных олигонуклеотидов в клетку и их утилизация подробно рассмотрены в работах.^{159, 183–187}

а. Ооциты *Xenopus laevis*

Ооциты *Xenopus laevis* являются одной из наиболее простых систем *in vivo*.¹⁸⁸ Экзогенные мРНК и ДНК, введенные в ооциты *Xenopus* посредством микроинъекций, экспрессируются в данной системе; при этом ядерные цитоплазматические транскрипты в равной мере доступны для взаимодействия с 19–20-звенными олигонуклеотидами или антисмысловыми РНК.^{189, 190} Также как и в системе трансляции *in vitro*, одним из механизмов действия олигонуклеотидов *in vivo* является¹⁸⁹ олигонуклеотид-направленное расщепление экзогенной мРНК с помощью эндогенной РНКазы Н. К сожалению, в литературе отсутствуют данные по влиянию точности взаимодействия антисмысловых олигонуклеотидов на степень ингибирования трансляции или транскрипции экзогенных мРНК или ДНК в ооцитах *Xenopus laevis*. Олигонуклеотиды длиной 18–23 нуклеотидных остатков¹⁹¹ подавляют на 85–98% трансляцию мРНК интерлейкинов IL-2 и IL-3 в ооцитах *Xenopus laevis* в концентрации менее 1 мкМ; тогда как для ингибирования синтеза β-тубулина в этой же системе требуется 20 мкМ 27-звенного олигонуклеотида.¹⁹²

б. Точность антивирусного действия олигонуклеотидов

Большинство исследований, связанных с изучением функционирования антисмысловых олигонуклеотидов *in vivo*, выполнено на культивируемых линиях клеток, зараженных вирусами. Это связано, очевидно, с тем, что для многих вирусов известны последовательности вирусных РНК или ДНК и закономерности развития вирусной инфекции клетки, а также с относительной простотой определения действия антисмыслового олигонуклеотида на вирусный геном. Исследования по противовирусному действию антисмысловых олигонуклеотидов выполнялись на вирусах саркомы Рауса (RSV),¹⁹³ визикулярного стоматита (VSV),^{178, 194} герпеса (HSV),¹²⁹ иммунодефицита человека (HIV),^{195–200} гриппа.^{201–203} Однако ни в одной из перечисленных работ не был показан механизм антивирусного действия антисмысловых олигонуклеотидов. Кроме того, до настоящего времени не получено прямых доказательств образования дуплекса между олигонуклеотидом и вирусной РНК или ДНК *in vivo*. Тем не менее, накоплено большое количество экспериментальных данных, которые было бы интересно рассмотреть с точки зрения специфичности взаимодействия олигонуклеотидов или их производных с НК-мишенью.

Так,¹⁹³ практически количественное подавление размножения вируса саркомы Рауса в культуре фибробластов из эмбрионов цыпленка происходило под действием 13-звенного защищенного олигонуклеотида, комплементарного 3'- и 5'-концевым последовательностям РНК RVS, при концентрации ON-13 в среде, равной 2 мкМ. Некоторые данные по зависимости степени подавления вирусной инфекции от точности взаимодействия олигонуклеотида с НК-мишенью были получены в работе¹²⁹ при изучении подавления репликации ДНК HVS октануклеозидметилфосфонатом d(TrCpCpCpTrCpCpTrG) (M-ON-8). Данный октануклеозид-

метилфосфонат комплементарен акцепторному сайту сплайсинга мРНК 4 и 5 HSV-1. Практически количественное подавление размножения вируса (на 90–95%) происходило под действием 75 мкМ М-ОН-8, добавленного в среду одновременно с вирусом или до него. При добавлении М-ОН-8 в среду (концентрация 150 мкМ) через 1 ч после инфекции, степень ингибирования развития вируса не превышала 40%. Одновременно с ингибированием HSV происходило подавление под действием М-ОН-8 синтеза ряда низкомолекулярных белков клетки-хозяина на 10–30%. Более того,¹²⁹ М-ОН-8 мог образовывать комплекс длиной 6 пар оснований в акцепторном сайте сплайсинга IE мРНК 4 и 5 генома HSV-2 и вследствие этого подавлять размножение вируса HSV-2 (на 70% при концентрации М-ОН-8 75 мкМ) также хорошо, как и вируса HSV-1. Кроме того, М-ОН-8 мог образовывать частичный дуплекс длиной 7 пар оснований с мРНК белка L VSV и последовательностью 72–80 мРНК β -глобина кролика. В соответствии с этим, М-ОН-8 (150 мкМ) ингибировал синтез белка L VSV на 85% при размножении в клетках L мыши и трансляцию мРНК β -глобина на 75–78% в RRL *in vitro*.¹⁶⁶

Увеличение длины антисмыслового олигонуклеотида и снижение его концентрации позволяют получить строго селективное ингибирование размножения вируса. В работах^{194, 204} было показано, что 15-звенный олигонуклеотид (концентрация в среде 200–400 мМ), ковалентно связанный 3'-концом с поли-L-лизинном, специфически ингибирует (на 85–98%) размножение VSV, не подавляя при этом ни синтез хозяйских белков, ни вирус энцефаломиокардита. Функция поли-L-лизина (молекулярная масса 14000) состоит в стимулировании проникновения антисмыслового олигонуклеотида в клетку.

В отличие от модельных систем, антисмысловые олигонуклеотиды *in vivo* могут ингибировать развитие вируса на любой стадии созревания. Например, для вируса иммунодефицита человека (HIV) мишенью для действия антисмысловых олигонуклеотидов могут быть 5'-конец вирусной РНК и области всех инициаторных кодонов, участки вирусной РНК, вовлеченные в процесс сплайсинга (донорные и акцепторные сайты сплайсинга), полиА-тракт. Кроме того, с помощью олигонуклеотидов можно воздействовать на активность вирусной обратной транскриптазы, область вирусного генома, ответственную за трансактивацию (TAR-область) и многие другие этапы созревания вируса. В работах^{196, 205} было показано, что наибольшее подавление размножения вируса HIV в клетках Molt-3 наблюдается при взаимодействии ON-20 с акцепторным сайтом сплайсинга (5349–5368) tat III гена. Затем по чувствительности в отношении антисмысловых олигонуклеотидов идут повторяющиеся последовательности, 5'-нетранслируемые области мРНК вирусных белков, полиА-тракт на 3'-конце вирусной РНК. Показано, что эффективность подавления вируса зависит от длины антисмыслового олигонуклеотида. Так, ON-12, ON-15 и ON-20, комплементарные последовательности 5349–5368, ингибируют развитие синсития на 64, 64 и 73% при концентрации в среде 26.0, 19.7 и 15.4 мкМ соответственно.

Олигонуклеотиды, образующие комплексы с вирусной РНК, содержащей некомплементарные основания на 3'-конце олигонуклеотида, являются хорошими ингибиторами вирусной ревертазы. Так, ON-26 и ON-14, образующие с вирусной РНК дуплексы с тремя и двумя некомплементарными основаниями на 3'-конце олигонуклеотида, подавляют ферментативную активность ревертазы HIV на 80 и 75% соответственно. Подавление²⁰⁵ синтеза вирусных белков p15 и p24 в присутствии этих же нуклеотидов происходит лишь на 4–8%.

При проверке антивирусной активности 15- и 20-звенных олигонуклеотидов, содержащих модифицированную связь (фосфотиоаты, фосфобутиламидаты, фосфоморфолидаты, фосфопиперазидаты) было обнаружено, что не только анти-

смысловые олигонуклеотиды, но и ON-20 со случайной последовательностью, и гомоолигомеры такой же длины проявляют анти-HIV активность.^{196, 199, 200, 206, 207} По мнению авторов, здесь возможны несколько механизмов действия таких олигонуклеотидов. Во-первых, поскольку гомоолигомеры являются лучшими субстратами для ревертазы HIV, чем гетероолигомеры, они могут выступать в качестве конкурентных ингибиторов вирусной ревертазы. Во-вторых, гомоолигонуклеотиды могут образовывать несовершенные протяженные дуплексы, достаточно стабильные для расщепления РНКазой H. В-третьих, не исключается совершенно иной механизм ингибирования. Следует отметить, что если гомоолигомеры и ON со случайной последовательностью хорошо ингибируют развитие HIV при добавлении их в среду одновременно с вирусом или же до него, то антисмысловые олигонуклеотиды хорошо подавляют HIV и в хронически инфицированных клетках.^{197, 199, 200} Такое различие объясняется, по-видимому, тем, что любой олигонуклеотид и вирус, добавленные в среду одновременно или с малым интервалом (ранняя инфекция), имеют больше возможностей для взаимодействия (олигонуклеотид может предотвращать проникновение вируса в клетку, усиливать действие РНКазы H и т.д.). В работе¹⁹⁷ показано, что на ранних стадиях инфекции вирусом HIV концентрация фосфотиоатных производных олигонуклеотидов (антисмыслового (S-ON-I), олигонуклеотида, образующего несовершенный дуплекс с восемью мисматчами (S-ON-II), и S-dA₂₀), необходимые для подавления развития синсития примерно одинаковы. При хронической инфекции для достижения такого же уровня ингибирования требуется увеличение концентрации S-ON-I в 3 раза, S-ON-II – в 8 раз и S-dA₂₀ – в 11 раз. Аналогичные результаты были получены в работах.^{196, 206} Для подавления развития вируса HIV на 50% в хронически инфицированных клетках необходима концентрация антисмыслового ON-20, равная 12 мкг/мл, ON-20 со случайной последовательностью – 46 мкг/мл и (dA)₂₀ – 60 мкг/мл. В работе²⁰⁶ был сделан компьютерный анализ двух случайных ON-20, проявлявших анти-HIV активность и служивших контролем для антисмысловых ON-20, комплементарных последовательностям РНК HIV 5349–5368 и 280–299. Оказалось, что ON-20 со случайной последовательностью к фрагменту 5349–5368, может образовывать совершенный дуплекс длиной 6 пар оснований с участком 917–928 или же дуплекс длиной 12 пар оснований, содержащий две неканонические пары, с этой же последовательностью. Случайный для последовательности 280–299 ON-20 может образовывать в области 8421–8437 либо 6-звенный дуплекс, либо дуплекс длиной 17 пар оснований с четырьмя неправильными парами. Кроме того, такие последовательности как T₄, T₅, A₄ и A₅ встречаются в геноме HIV 49, 13, 149 и 50 раз соответственно. Таким образом, антивирусная активность «случайных» олигонуклеотидов и гомоолигомеров может быть связана с их способностью образовывать несовершенные комплексы с РНК HIV протяженностью 4 пары оснований и более со стабильностью, уже достаточной для действия РНКазы H.

Олигонуклеотиды с модифицированной фосфодиэфирной связью проявляют более сильную антивирусную активность, чем олигонуклеотиды с обычной фосфодиэфирной связью, несмотря на практически одинаковые стабильности дуплексов; О-ОН-20 (*T_m* дуплекса 55°C, определена при концентрации олигонуклеотида 5 мкМ) ингибирует синситий на 68% при концентрации в среде 100 мкг/мл; М-ОН-20 (*T_m* дуплекса 51.5°C, 5 мкМ) – на 90% (25 мкг/мл); S-ОН-20 (*T_m* дуплекса 49°C, 5 мкМ) – на 90% (25 мкг/мл); фосфобутиламидат-ОН-20 (*T_m* дуплекса 45°C, 5 мкМ) – на 100% (25 мкг/мл).^{197, 199, 206, 207}

При исследовании анти-HIV действием антисмысловых олигонуклеотидов с модифицированной фосфодиэфирной связью (фосфотиоаты и нуклеозидметилфосфонаты) было

получено большое количество экспериментальных данных, указывающих на иной механизм ингибирования, исключая образование комплементарного комплекса, другими словами, на сиквенс-независимое подавление развития вируса. Так, метилфосфонатное производное 8-звенного олигонуклеотида $d(CpC\text{AATTC})$ (модифицированы подчеркнутые нуклеотиды) комплементарного акцепторному сайту сплайсинга гена tat-3 HIV-1, специфически подавляло развитие синсития и активность вирусной ревертазы при концентрации 100 мкМ. Синтез вирусной РНК ингибировался как этим 8-звенным нуклеотидом, так и комплементарным ему олигонуклеотидом (смысловая последовательность).¹⁹⁸

При исследовании антивирусного действия фосфотиоатных производных гетеро- и гомоолигомеров было обнаружено, что 14-звенные фосфотиоатные аналоги (25 мкМ) оказывают такое же ингибирующее действие (93–95%), как и аналогичные производные олигонуклеотидов, повторяющие последовательность РНК HIV (78–100%). Кроме того, было обнаружено, что определяющим фактором является длина фосфотиоатного производного.^{195, 199, 208, 209} Ингибирующее действие олигоцитидинфосфотиоатов растет в ряду $d(p_sC) < d(p_sC)_{14} < d(p_sC)_{28}$. Предполагается, что такие производные являются ингибиторами ДНК-полимеразной активности обратной транскриптазы HIV. Возможно также, что под действием фосфотиоатных аналогов олигонуклеотидов происходит стимулирование продукции интерферона.¹⁹⁵ В работе²⁰⁹ полное подавление репродукции HIV-1 в H9 клетках было получено с помощью фосфотиоатного производного 27-звенного олигонуклеотида (25 мкМ), комплементарного регулярному гену rev HIV-1. Механизм столь эффективного действия этого производного до конца не ясен. Фосфотиоатные аналоги 2'-О-метирибоолигонуклеотидов длиной 10–30 звеньев также проявляли антивирусную активность, тогда как 2'-О-метирированные олигорибонуклеотиды и их дезоксианалоги не подавляли HIV в MT-4 клетках.²¹⁰

в. Ингибирование экспрессии генов *in vivo*

Экспрессия с-туса гена представляет собой хорошую модель для изучения ингибирования экспрессии генов под действием антисмысловых олигонуклеотидов,^{211–214} так как время жизни с-туса мРНК и белков 20–30 мин. Для изучения экспрессии с-туса гена используют обычно Т-лимфоциты периферической крови человека, стимулированные фитогемагглютинином (ФТГ). Антисмысловые олигонуклеотиды добавляют в среду до концентрации 30 мкМ за 4 ч до стимуляции Т-лимфоцитов ФТГ. Как показано в работе,²¹¹ 15-звенный олигонуклеотид, комплементарный первым пяти кодонам с-туса мРНК на 80% ингибирует стимулированную митогеном пролиферацию клеток, тогда как ON со случайной или кодирующей последовательностью не оказывает ингибирующего действия на пролиферацию клеток. В работе²¹² аналогичный пентадекамер вызывал понижение уровня синтеза с-туса белка на 50–80%. Ингибирование с-туса экспрессии связано с падением роста клеток и индукцией миелоидной дифференциации. Обработка HL-клеток антисмысловыми 15-звенными олигонуклеотидами (4 мкМ, 37°C), которые образуют комплексы, содержащие от 2 до 12 неправильных пар оснований (T_m 56°C и 41°C для совершенного дуплекса и дуплекса с двумя G-T-парами соответственно), не приводила к изменению времени удвоения числа клеток. В присутствии полностью комплементарного нуклеотида время удвоения числа клеток увеличивалось более чем в 2 раза.

Строго специфичное ингибирование экспрессии с-туса гена антисмысловым 15-звенным олигонуклеотидом, комплементарным первым пяти кодонам с-туса РНК, происходит, по-видимому,²¹³ из-за того, что согласно рассчитанной

вторичной структуре с-туса мРНК, сайт связывания ON-15 находится в области петли, т.е. открыт для взаимодействия с ON-15. Специфическое подавление экспрессии с-туса гена, связанное с уменьшением и уровня с-туса белка, и с-туса мРНК, было получено с помощью 17-звенного антисмыслового нуклеотида, ковалентно связанного с поли-L-лизинном.²¹⁴ При использованных концентрациях (менее 1 мкМ) ни случайный, ни образующий несовершенный комплекс с шестью мисматчами олигонуклеотиды не оказывали значительного ингибирующего действия на экспрессию с-туса гена.

Кроме перечисленных, существует огромное количество работ, посвященных действию антисмысловых олигонуклеотидов на различные мРНК и гены, в которых уровень специфичности взаимодействия просто не определялся. За ингибирующим действием олигонуклеотида следили либо по ферментативной активности, например, хлорамфеникол:ацетил трансферазы,²¹⁵ либо по включению ³H-ТТР в Balb/c3T3 клетки после инкубации с олигонуклеотидом против мРНК PCNA.²¹⁶

4. Взаимодействие реакционноспособных производных олигонуклеотидов с НК-мишенями

Механизм ингибирующего действия антисмысловых олигонуклеотидов на различные биохимические и молекулярно-генетические процессы *in vitro* и *in vivo* включает в себя как одну из основных стадий образование комплементарного комплекса между олигонуклеотидом и НК-мишенью. Как было показано в предыдущих разделах, стабильность дуплекса ON-НК-мишень является одним из определяющих параметров для эффективного ингибирования как трансляции мРНК, так и экспрессии генов.

Для создания более эффективных ингибиторов конструируются производные олигонуклеотидов, способные образовывать дуплексы повышенной стабильности. Так, введение в олигонуклеотид таких интеркаляторов как акридин, N-(2-оксиэтил)феназиний, бромистый этидий приводит к значительной стабилизации дуплекса, однако сам процесс комплексообразования остается равновесным. Кроме того, хорошо известно, что транслирующая рибосома обладает расплетающей активностью, т.е. способностью расплавлять достаточно прочные дуплексы.^{153, 154} С другой стороны, в ряде работ показано, что для подавления трансляции мРНК, кроме комплексообразования с антисмысловым олигонуклеотидом, необходима еще РНКазы Н. Однако не все гетеродуплексы расщепляются РНКазой Н. Например, производные олигодезоксирибоолигонуклеотидов с модифицированной фосфодиэфирной связью (фосфотиоаты) очень устойчивы в клетке и образуют стабильные комплексы с РНК, которые не являются субстратами РНКазы Н.

В связи с этим более перспективными представляются такие производные антисмысловых олигонуклеотидов, которые не только образовывали бы прочный дуплекс с НК-мишенью, но и повреждали бы молекулу нуклеиновой кислоты за счет сайт-направленного взаимодействия, другими словами, содержали бы реакционноспособную группу. При этом возможны несколько типов реакционных групп, ковалентно связанных с антисмысловым олигонуклеотидом: 1) алкилирующие группы, приводящие к образованию ковалентной связи между олигонуклеотидом и НК-мишенью; 2) фотоактивируемые группы, действие которых индуцируется УФ-облучением, в результате чего также происходит образование ковалентной связи между «адресованным» реагентом и нуклеиновой кислотой; 3) расщепляющие группы, т.е. такие группы как Fe-EDTA, Cu-1, 10-фенантролин, Fe (Co, Mn)-порфирины, результатом действия которых является расщепление сахарофосфатного остова нуклеиновой кислоты.

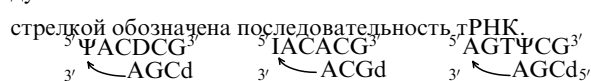
Методы получения производных олигонуклеотидов, свойства, существенные для их использования, результаты по направленному воздействию этих производных на НК-мишени подробно рассмотрены в обзорах.^{5, 9, 217–222}

Большинство исследований по сайт-направленной модификации или сайт-направленному повреждению НК-мишени выполнено на модельных матрицах: синтетических олигонуклеотидах, гомополимерах, коротких фрагментах ДНК (до 400 оснований), тРНК, 16S рРНК с использованием олигонуклеотидов разной длины. В этих исследованиях продемонстрированы преимущества используемых реакционноспособных групп, оценена эффективность реакции и подобраны условия модификации. В некоторых работах была определена позиционная направленность модификации.^{216–220} Специфичность модификации (комплементационная точность) изучалась только в нескольких работах, которые и будут рассмотрены в этом разделе.

Некоторые данные по точности взаимодействия реагента и НК-мишени могут быть найдены в серии работ (см. обзоры^{2, 5, 9, 219, 221, 229}) по сайт-направленной модификации нуклеиновых кислот производными олигонуклеотидов, которые содержат N-2-хлорэтил-N-метиламинофенильную группу, связанную либо с 3'-концом олигонуклеотида бензильдовой связью, либо с 5'-концом фосфамидной связью.

Первые эксперименты по сайт-направленной модификации природных НК (23S + 16S рРНК *E. coli*) производными тетра-, пента- и гексааденилатов, несущих 2',3'-O-[4-N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]бензильдовую группу ($>\text{CH}-\text{R}-\text{Cl}$) на 3'-конце $(\text{Ap})_{n-1}\text{A}|>\text{CH}-\text{R}-\text{Cl}$ ($n = 4 \div 6$),^{229–231} продемонстрировали высокоэффективную модификацию 16S + 23S рРНК. При концентрации реагентов, меньшей либо равной концентрации НК-мишени, от 70 до 98% реагента, присутствовавшего в реакционной среде, расходовалось на алкилирование РНК. Данный процесс не отличался химической избирательностью – модификации подвергались все основания, кроме уридина.²³⁰ Степень модификации 16S + 23S рРНК составляла²³⁰ 5 моль $(\text{Ap})_4\text{A}|>\text{CH}-\text{R}-\text{Cl}$ на 1 моль РНК при 20°C и около 30 – при 5°C. Согласно анализу последовательности, в 16S и 23S рРНК отсутствуют фрагменты U_5 и длиннее, способные обеспечить образование достаточно протяженного дуплекса с реагентом, а имеются только 3 U_4 и 24 U_3 последовательности. По-видимому, реагенты типа $(\text{Ap})_{n-1}\text{A}|>\text{CH}-\text{R}-\text{Cl}$ ($n = 4 \div 6$) образовывали либо частичные дуплексы с U_3 - и U_4 -последовательностями, либо несовершенные комплексы, включающие U_3 - и U_4 -тракты. Значения $R_{\text{х(каж)}}$ для связывания реагентов $(\text{Ap})_{n-1}\text{A}|>\text{CH}-\text{R}-\text{Cl}$ ($n = 4 \div 6$) с РНК, найденные в работе,²²⁹ оказались близки и составляли $(3-7) \cdot 10^5$, $7 \cdot 10^5$ и $(3-7) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ для реагентов с n , равным 6, 5 и 4 соответственно. Сравнение значений $K_{\text{х(каж)}}$ со значениями $K_{\text{х}}$, оцененными по методу,⁹⁷ показало, что $K_{\text{х(каж)}}$ примерно равны $K_{\text{х}}$ для дуплекса $\text{A}_4 \cdot \text{U}_4$.

Селективность сайт-направленной модификации нуклеиновых кислот была впервые оценена при определении точек модификации дрожжевой тРНК₁^{Val} реагентом $\text{d}(\text{pCrG})\text{rA}|>\text{CH}-\text{R}-\text{Cl}$.^{232, 233} Было показано, что алкилированию в тРНК₁^{Val} подвергаются три основания, одинаково расположенные относительно последовательности CrG тРНК₁^{Val}. Модификация протекала в составе следующих дуплексов:



Остаток аденина в этих дуплексах либо образует неправильную пару, либо не участвует в комплексообразовании.²³⁴

Впоследствии подобный анализ точности взаимодействия адресованного реагента и НК-мишени был проведен для $\text{Cl}-\text{R}-\text{CH}_2\text{NH}$ -реагентов. В работе²³⁵ было показано, что

реагент $\text{Cl}-\text{R}-\text{CH}_2\text{NH-p}(\text{dAACCA})$ избирательно алкилирует основание $\text{G}_{24}\text{тРНК}^{\text{Phe}} \text{E. coli}$. Судя по положению точки модификации, алкилирование G_{24} происходит в составе несовершенного комплекса следующего состава:



стрелкой обозначен $p\text{-NH}-\text{CH}_2-\text{R}-\text{Cl}$,

в то время как участок молекулы тРНК^{Phe}, к которому адресовался реагент, занят в образовании вторичной структуры.

Реагент $\text{Cl}-\text{R}-\text{CH}_2\text{NH-p}(\text{dATTTTCA})$, полностью комплементарный последовательности в антикодонной петле тРНК^{Phe}, модифицирует три остатка гуанина:²³⁶ G_{10} , G_{24} , $\text{G}_{28/29}$. Если алкилирование $\text{G}_{28/29}$ происходит, скорее всего, в составе совершенного дуплекса с выбранной последовательностью, то G_{10} и G_{24} , сближенные во вторичной и третичной структурах, подвергаются модификации, по-видимому, в составе несовершенного комплекса с соответствующей последовательностью в D-петле.



Отношение скоростей адресованной и неадресованной (вне комплекса) модификаций (f) для $\text{G}_{24} + \text{G}_{10}$ и $\text{G}_{28/29}$ составляет 58 и 460 соответственно, т.е. уровень неспецифической модификации равен 2% для G_{10} , G_{24} и менее 0.3% для $\text{G}_{28/29}$. Результаты анализа точек модификации тРНК указывают на огромное влияние пространственной структуры на селективность сайт-направленной модификации.

Интересные результаты были получены в работах^{150, 237} при исследовании сайт-направленной модификации 302-звенного фрагмента ДНК производными $-\text{NHCH}_2-\text{R}-\text{Cl}$ и $>\text{CH}-\text{R}-\text{Cl}$ 6–14-звенных олигонуклеотидов. Показано, что благодаря образованию внутренней шпильки, участок 144–149 полностью недоступен для связывания реагента $\text{Cl}-\text{R}-\text{CH}_2\text{NH-pd}(\text{TTCCC})\text{rA}$, тогда как открытый участок 261–266 подвергается модификации этим реагентом. Была обнаружена также модификация этого фрагмента в составе несовершенного дуплекса с олиго-G-последовательностью вблизи его 5'-конца. Кроме того, наблюдалось алкилирование G_{179} , по-видимому сближенного с участком связывания реагента (261–274).^{16, 149, 237–239}

Наиболее подробно проблема селективности сайт-направленной модификации исследована в серии работ^{240–244} на примере модификации 16S рРНК *E. coli*, имеющей длину 1542 нуклеотида, производными олигонуклеотидов, несущими на 3'-конце группу $>\text{CH}-\text{R}-\text{Cl}$. В столь протяженной мишени, обладающей достаточно сложной пространственной структурой, наряду с последовательностями, полностью комплементарными олигонуклеотидному адресу, могут встречаться и неполностью комплементарные фрагменты. Такие фрагменты могут быть выявлены с помощью специальной программы анализа последовательностей нуклеиновых кислот – контекстного анализа.²⁴⁵ Например, реагент, комплементарный области 771–781, по данным такого анализа, может образовывать несовершенные комплексы, содержащие не менее пяти канонических пар оснований, еще с 12 участками 16S рРНК. Оценка энергии взаимодействия показывает,²⁴⁰ что по крайней мере три из 12 несовершенных дуплексов реагента с мишенью, имеют стабильность, не сильно отличающуюся от стабильности полностью комплементарного дуплекса, а именно дуплексы с последовательностями 442–452, 663–683 и 883–893. Экспериментально показано, что этот реагент действительно модифицирует 16S рРНК по восьми участкам, причем четыре из них модифицируются примерно в одинаковой степени (771–781, 442–452, 663–673 и 883–893). Это

означает, по-видимому, что данный реагент не взаимодействует всеми основаниями с полностью комплементарным участком, так как участок комплементации занят в формировании вторичной структуры. Аналогичное влияние пространственной структуры на эффективность сайт-направленной модификации было выявлено и при алкилировании 16S рРНК другими реагентами,^{240–242} и при сайт-направленной модификации^{235, 236} тРНК^{Phe}.

В работе²⁴³ исследовано влияние температуры и концентрации реагента на селективность модификации. При 20°C с ростом концентрации реагента от $1.3 \cdot 10^{-1}$ до $2.5 \cdot 10^{-6}$ М общая предельная степень модификации 16S рРНК возрастала от 0.05 до 0.62, тогда как доля модификации в совершенном комплексе падала от 0.38 до 0.22. При повышении температуры модификации от 20 до 40°C и концентрации реагента $4 \cdot 10^{-5}$ М общая степень модификации падала от 2.57 до 0.64, однако доля модификации в совершенном комплексе при этом возрастала от 0.24 до 0.35. Таким образом, несмотря на сложность исследуемой модели, ее модификация также определяется стабильностью дуплексов, образованных реагентом и НК-мишенью. Дополнительная стабилизация дуплекса 16S рРНК-реагент с помощью вспомогательного олигонуклеотида-эффектора (комплементарного участку 16S рРНК, непосредственно примыкающему к участку связывания реагента, несущего на 5'-конце остаток N-(2-гидроксиэтил)феназина и стабилизирующего дуплекс за счет кооперативного взаимодействия с реагентом²⁴⁶) привела к более чем двухкратному увеличению доли модификации РНК в составе совершенного комплекса, не затрагивая при этом модификацию несовершенных дуплексов.²⁴⁴

К сожалению, практически отсутствуют данные по изучению селективности ингибирования каких-либо биохимических процессов, протекающих с участием нуклеиновых кислот, с помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов. В связи с этим можно упомянуть лишь две работы, в которых изучалось ингибирование трансляции мРНК с помощью реакционноспособных производных олигонуклеотидов. В работе²⁴⁷ показано, что предварительная инкубация суммарной мРНК клеток плазмоцитомы мыши МОРС 21 с $\text{Cl}-\text{R}-\text{CH}_2\text{NH}$ -производным 11-звенного олигонуклеотида, комплементарного последовательности легкой цепи иммуноглобулина G (кодирует изменяемый участок белка), приводит к количественному подавлению синтеза не только легкой, но и тяжелой цепи Ig-G в RRL.

Бликие результаты были получены в работе,²²¹ в которой псораленовые производные 12-звенных олигонуклеотидов использовали для подавления синтеза α - или β -глобинов мыши в RRL. Реагент, полностью комплементарный α - или β -мРНК, подавлял синтез обоих глобинов примерно в равной степени. Однако авторы этих работ не обсуждают полученные результаты с точки зрения специфичности взаимодействия производных антисмысловых олигонуклеотидов с мРНК.

V. Заключение

Приведенные в обзоре данные показывают, что проблема повышения комплементарной точности взаимодействия РНК и ДНК с антисмысловыми олигонуклеотидами и их производными является одной из основных при изучении сайт-направленного взаимодействия на нуклеиновые кислоты как *in vitro*, так и *in vivo*. Имеющиеся к настоящему времени экспериментальные данные по термодинамике совершенных дуплексов и дуплексов со структурными аномалиями, полученные при изучении взаимодействия модельных олигонуклеотидов, позволяют надеяться, что благодаря дестабилизирующему действию одного или нескольких mismatches, лишних оснований или петель, может быть достигнуто достаточно селективное взаимодействие между НК-

мишенью и олигонуклеотидом, комплементарным выбранному участку.

Для случая сайт-направленной модификации проблема повышения комплементарной точности, в сущности, сводится к исключению из сферы реакции несовершенных комплексов между НК-мишенью и «адресованным» реагентом. Как видно из обсуждаемого материала, в определенных случаях в системах *in vitro* высокоселективное взаимодействие может быть достигнуто либо при проведении модификации при температуре, близкой температуре плавления совершенного комплекса, либо при использовании достаточно низких концентраций «адресованного» реагента (10^{-8} – 10^{-9} М). Однако при этом необходимо учитывать, что одновременно с повышением селективности модификации будет уменьшаться степень алкилирования нуклеиновой кислоты по выбранному участку. Кроме того, в системах *in vitro* повышение селективности сайт-направленной модификации может быть достигнуто за счет использования олигонуклеотидов-эффекторов, стабилизирующих дуплекс, комплементарных последовательности НК-мишени, прилегающей к сайту связывания «адресованного» реагента и несущих остатки N-(2-оксиэтил)феназина на одном или обоих концах. Хотя в настоящее время и достигнуты впечатляющие успехи по применению этого подхода для повышения селективности и эффективности сайт-направленной модификации синтетических олигонуклеотидов и фрагментов одноцепочечной ДНК с маловыраженной вторичной структурой, пока недостаточно данных, чтобы полагать, что этот подход окажется столь же продуктивным при применении его к высокомолекулярным НК, обладающим сложной пространственной структурой.

Очевидно, что при ингибировании с помощью антисмысловых олигонуклеотидов и их производных таких процессов, как трансляция, транскрипция и другие, происходящих в системах *in vitro* и тем более *in vivo*, точность воздействия определяется не только различиями в стабильности совершенного и несовершенного комплексов, но и пространственной структурой НК-мишени, взаимодействием антисмысловых олигонуклеотидов с другими биополимерами, участвующими в изучаемом процессе, а также механизмом, по которому протекает ингибирование данного процесса с помощью антисмыслового олигонуклеотида. Например, ингибирование трансляции происходит за счет того, что мРНК после образования дуплекса с антисмысловым олигонуклеотидом либо расщепляется РНКазой Н, либо теряет способность к трансляции рибосомой. Поэтому вряд ли можно рассчитывать, что подходы, разработанные для модельных систем, где в качестве матриц используются синтетические олигонуклеотиды или фрагменты одноцепочечных ДНК могут быть эффективны для повышения специфичности ингибирования указанных выше процессов.

По мнению авторов данного обзора, методология подходов для повышения специфичности направленного воздействия на генетический аппарат нуждается в глубоких физико-химических и биохимических исследованиях в модельных системах, имеющих различные стадии процессов, которые обеспечивают хранение, умножение и реализацию наследственной информации (репликация, транскрипция, репарация, трансляция и др.) в клетках и вирусах. Возможность установления первичной структуры практически любых нуклеиновых кислот обеспечивает целенаправленное создание олиго- и полинуклеотидных адресов к самым разнообразным участкам генетического аппарата живых организмов и разработку на этой основе новых подходов к повышению селективности направленного воздействия, которые учитывают в полной мере как особенности пространственной структуры данной нуклеиновой кислоты и несовершенные прямые повторы выбранных участков комплементации, так и данные по термодинамике совершенных и несовершенных дуплексов.

Таким образом, проблема комплементационной точности взаимодействия антисмысловых олигонуклеотидов и их производных с НК является на сегодняшний день одной из самых острых проблем в области изучения сайт-направленного воздействия на нуклеиновые кислоты.

Литература

1. C.A.Stain, J.S.Cohen. *Cancer Res.*, **48**, 2659 (1988).
2. Н.И.Гринева. *Вестник АМН СССР*, **2**, 83 (1981).
3. S.Agrawal, P.S.Sarin. *Advanced Drug Delivery Rev.*, **6**, 251 (1991).
4. Y.Euguchi, T.Itoh, J. Tomizawa. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 631 (1991).
5. D.G.Knorre, V.V.Vlassov, V.F.Zarutova, A.V.Lebedev. *Sov. Sci. Rev.*, **B.**, **12**, 269 (1990).
6. A.M.Belikova, V.F.Zarytova, N.I.Grineva. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 3557 (1967).
7. Н.И.Гринева, В.Ф.Зарытова, Д.Г.Кнорре. *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук*, **12**, 118 (1968).
8. N.I.Grineva, G.G.Karpova. *FEBS Lett.*, **32**, 351 (1973).
9. J.S.Cohen. *Topics in Molecular and Structural Biology. V.12. Oligonucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression.* (Ed. J.C.Cohen) Macmillan Press, London, 1989.
10. J.E.Hearst. *Photobiochem. and Photobiophysics, Suppl.*, **23**, (1987).
11. M.P.Perelroyzen, A.V.Vologodskii. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 4693 (1988).
12. Д.Г.Кнорре, О.С.Федорова. *Хим. физика*, **10**, 869 (1991).
13. F.Aboul-ela, D.Koh, I.Tinoco, Jr., F. Martin. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 4811 (1985).
14. Н.И.Гринева, Д.Г.Кнорре, В.А.Курбатов. *Докл. АН СССР*, **201**, 609 (1971).
15. Д.Г.Кнорре, И.В.Кутявин, А.С.Левина, Н.П.Пичко, Л.М.Подуст, О.С.Федорова. *Биоорган. химия*, **12**, 230 (1986).
16. В.В.Власов, Д.Г.Кнорре, И.В.Кутявин, С.В.Мамаев, Л.М.Подуст, О.С.Федорова. *Биоорган. химия*, **13**, 1221 (1987).
17. Н.И.Соколова, В.Г.Каграмонова, Н.Г.Долинная. *Успехи химии*, **44**, 104 (1975).
18. Н.Г.Долинная, О.И.Грязнова. *Успехи химии*, **58**, 1318 (1989).
19. Н.Н.Klump. In *Biochemical Thermodynamics*. (Ed. Jones M.N.) Elsevier, Amsterdam, Oxford, New-York, Tokyo, 1988. P.100.
20. J.R.Wyatt, J.D.Puglisi, I.Tinoco, Jr. *BioEssays*, **11**, 100 (1989).
21. L.A.Marky, K.J.Breslauer. *Biopolymers*, **21**, 2185 (1982).
22. D.J.Patel, S.A.Kozlowski, L.A.Marky, J.A.Rice, C.Broka, K.Itakura, K.J.Breslauer. *Biochemistry*, **21**, 428 (1982).
23. D.J.Patel, S.A.Kozlowski, L.A.Marky, J.A.Rice, C.Broka, J.Dallas, K.Itakura, K.J.Breslauer. *Biochemistry*, **21**, 437 (1982).
24. K.J.Breslauer, R.Frank, H.Blocker, L.A.Marky. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3746 (1986).
25. R.L.Ornstein, J.R.Fresco. *Biopolymers*, **22**, 2001 (1983).
26. R.Kierzek, M.H.Caruthers, C.E.Longfellow, D.Swinton, D.H.Turner, S.M.Freier. *Biochemistry*, **25**, 7840 (1986).
27. S.M.Freier, R.Kierzek, M.H.Caruthers, T.Neilson, D.H.Turner. *Biochemistry*, **25**, 3209 (1986).
28. S.M.Freier, R.Kierzek, D.H.Jaeger, N.Sugimoto, M.H.Caruthers, T.Neilson, D.H.Turner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9373 (1986).
29. C.A.G.Haasnoot, J.H.J. den Hartog, J.F. de Rooij, J.H. van Boom, C.Altona. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 169 (1980).
30. D.R.Groebe, O.C.Uhlenbeck. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 11725 (1988).
31. D.R.Groebe, O.C.Uhlenbeck. *Biochemistry*, **28**, 742 (1989).
32. V.P.Antao, S.Y.Lai, I.Tinoco, Jr. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5901 (1991).
33. V.P.Antao, I.Tinoco, Jr. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 819 (1992).
34. B.Hartmann, R.Lavery. *J. Biomol. Struct. and Dynamics*, **7**, 363 (1989).
35. F.H.Martin, I.Tinoco. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 2295 (1980).
36. H.T.Steely, Jr., D.M.Gray, R.L.Ratliff. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 10071 (1986).
37. S.-H.Chou, P.Flynn, B.Reid. *Biochemistry*, **28**, 2435 (1989).
38. A.Pardi, I.Tinoco, Jr. *Biochemistry*, **21**, 4686 (1982).
39. J.W.Nelson, I.Tinoco, Jr. *Biochemistry*, **21**, 5289 (1982).
40. C.H.Lee, J.G.Wetmur. *Biopolymers*, **11**, 1485 (1972).
41. J.G.Hoggett, G.Maass. *Ber. Bunzen. d. Phys. Chem.*, **75**, 45 (1971).
42. S.Gillam, K.Waterman, M.Smith. *Nucleic Acids Res.*, **2**, 625 (1975).
43. L.L.Gerchman, D.B.Ludlum. *Biochem. Biophys. Acta*, **308**, 310 (1973).
44. R.S.Lasken, M.F.Goodman. *J. Biol. Chem.*, **259**, 11491 (1984).
45. M.Petersheim, D.H.Turner. *Biochemistry*, **22**, 256 (1983).
46. M.Petersheim, D.H.Turner. *Biochemistry*, **22**, 269 (1983).
47. S.M.Freier, B.J.Burger, D.Alkema, T.Neilson, D.H.Turner. *Biochemistry*, **22**, 6198 (1983).
48. M.Sugimoto, R.Kierzek, S.M.Freier, D.H.Turner. *Biochemistry*, **25**, 5755 (1986).
49. M.Sugimoto, R.Kierzek, D.H.Turner. *Biochemistry*, **26**, 4554 (1987).
50. D.J.Patel, S.A.Kozlowski, L.A.Marky, J.A.Rice, C.Broka, K.Itakura, K.J.Breslauer. *Biochemistry*, **21**, 451 (1982).
51. J.-R.Mellema, R. van der Woerd, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, C.Altona. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 5061 (1984).
52. M.Senior, R.A.Jones, K.J.Breslauer. *Biochemistry*, **27**, 3879 (1988).
53. D.J.Patel, S.A.Kozlowski, L.A.Marky, J.A.Rice, C.Broka, K.Itakura, K.J.Breslauer. *Biochemistry*, **21**, 445 (1982).
54. D.J.Patel, A.Pardi, K.Itakura. *Science*, **216**, 581 (1982).
55. J.G.Chu, I.Tinoco, Jr. *Biopolymers*, **22**, 1235 (1983).
56. K.M.Morden, J.G.Chu, F.H.Martin, I.Tinoco, Jr. *Biochemistry*, **22**, 5557 (1983).
57. M.W.Kalnik, C.-N.Chang, A.P.Crollmann, D.J.Patel. *Biochemistry*, **27**, 924 (1988).
58. S.A.Woodson, D.M.Crothers. *Biochemistry*, **26**, 904 (1987).
59. S.A.Woodson, D.M.Crothers. *Biochemistry*, **27**, 3130 (1988).
60. J.Th. van der Hoogen, C.Erkelens, E. de Vroom, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, C.Altona. *Eur. J. Biochem.*, **173**, 295 (1988).
61. J.Th. van den Hoogen, A.A. van Beuzekom, H. van den Elst, G.A. van der Marel, J.H. van Boom. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 2971 (1988).
62. J.M.L.Pieters, R.M.W.Mans, H. van den Elst, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, C.Altona. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 4551 (1989).
63. D.A.Eril, R.A.Joues, W.K.Olson, N.K.Sinha, K.J.Breslauer. *Biochemistry*, **28**, 268 (1989).
64. S.Adam, J.P.Ridous, P.Bourtayre, E.Taillandier, S.Pochet, T.Hieynh-Dinh, J.Igolen. *J. Biomol. Struct. and Dynamics*, **6**, 167 (1988).
65. G.Vesnaver, C.-N.Chang, M.Eisenberg, A.P.Grollman, K.J.Breslauer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3614 (1989).
66. G.Kneale, T.Brown, O.Kennard. *J. Mol. Biol.*, **186**, 805 (1985).
67. T.A.Early, J.Olmsted, III, D.R.Kearns, A.G.Lexius. *Nucleic Acids Res.*, **5**, 1955 (1978).
68. S.Ikuta, R.Eritja, B.E.Kaplan, K.Itakura. *Biochemistry*, **26**, 5646 (1987).
69. E.Quignard, G.Fazakerly, G. van der Marel, J.H. van Boom, W.Guschlbauer. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 3397 (1987).
70. P.J.Romaniuk, D.W.Hughes, R.J.Grigoire, R.A.Bell, Th.Neilson. *Biochemistry*, **18**, 5109 (1979).
71. D.Rabinovich, T.Haran, M.Eisenstein, Z.Shakked. *J. Mol. Biol.*, **200**, 151 (1988).
72. W.B.T.Cruse, J.Aymani, O.Kennard, T.Brown, A.G.C.Jack, C.A.Leonard. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 55 (1989).
73. L.He, R.Kierzek, J.SantaLucia, A.E.Walter, D.H.Turner. *Biochemistry*, **30**, 11124 (1991).
74. D.Alkema, P.A.Hader, R.A.Bell, T.Neilson. *Biochemistry*, **21**, 2109 (1982).
75. W.Traub, J.L.Sussmann. *Nucleic Acids Res.*, **10**, 2701 (1982).
76. V.I.Poltev, N.V.Shulygina. *J. Biomol. Struct. and Dyn.*, **3**, 739 (1986).
77. D.J.Patel, S.A.Kozlowski, K.Ikuta. *Biochemistry*, **23**, 3207 (1984).
78. X.E.Gao, D.J.Patel. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5178 (1989).
79. E.P.Nikonowicz, R.P.Meadows, P.Fagan, D.G.Gorenstein. *Biochemistry*, **30**, 1323 (1991).
80. G.G.Prive, U.Heimann, S.Chandrasegaran, L.Kan, M.L.Kopka, R.E.Dickerson. *Science*, **238**, 498 (1987).
81. W.N.Hunter, T.Brown, O.Kennard. *J. Biomol. Struct. and Dyn.*, **4**, 173 (1986).
82. Y.Li, G.Zon, W.D.Wilson. *Biochemistry*, **30**, 7566 (1991).
83. J.SantaLucia, R.Kierzek, D.H.Turner. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4313 (1991).
84. Y.Li, G.Zon, W.D.Wilson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 26 (1991).

85. F.H.Arnold, S.Wolk, Ph.Creez, I.Tinoco, Jr. *Biochemistry*, **26**, 4068 (1987).
86. J.B.Dodgson, R.D.Wells. *Biochemistry*, **16**, 2367 (1977).
87. J.B.Dodgson, R.D.Wells. *Biochemistry*, **16**, 2374 (1977).
88. G.V.Fazakerley, E.Quignard, A.Woisad, W.Guschlbauer, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, M.Joues, M.Radman. *EMBO J.*, **5**, 3697 (1985).
89. J.A.H.Cognet, J.Gabarro-Arpa, M.Le Bret, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, G.V.Fazakerly. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6771 (1991).
90. J.SantaLucia, R.Kierzek, D.H.Turner. *Biochemistry*, **29**, 8813 (1990).
91. X.Gao, D.J.Patel. *J. Biol. Chem.*, **262**, 16973 (1987).
92. M.H.Sarma, G.Gupta, R.H.Sarma. *Biochemistry*, **26**, 7707 (1987).
93. N.N.Anand, D.M.Brown, S.A.Salisbury. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 8167 (1987).
94. R.B.Wallace, J.Shaffer, R.F.Murphy, J.Bonner, T.Hirose, K.Itakura. *Nucleic Acids Res.*, **6**, 3543 (1979).
95. A.G.Cornelis, J.H.J.Haasnoot, J.F. den Hargot, M. de Rooij, J.H. van Boom, C.Altona. *Nature*, **281**, 235 (1979).
96. R.V.Hosur, A.Sheth, K.V.R.Chary, M.Ravikumar, G.Govil, T.Zu-Kan, T.Miles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**, 1224 (1986).
97. O.C.Uhlenbeck, F.H.Martin, P.Doty. *J. Mol. Biol.*, **57**, 217 (1971).
98. S.R.Holbrook, C. Cheong, I.Tinoco, Jr., S.-H. Kim. *Nature*, **353**, 579 (1991).
99. H.Werntges, G.Stiger, D.Riesner, H.-J.Fritz. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 3773 (1986).
100. N.Tibanyenda, S.H.De Bruin, C.A.G.Haasnoot, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, C.W.Hilberts. *Eur. J. Biochem.*, **139**, 19 (1984).
101. N.Sugimoto, R.Kierzek, D.H.Turner. *Biochemistry*, **26**, 4559 (1987).
102. D.R.Hickey, D.H.Turner. *Biochemistry*, **24**, 3987 (1985).
103. Г.Р.Тигеева, Р.В.Виноградов, Ю.А.Берлин. *Биоорганическая химия*, **12**, 1484 (1986).
104. S.Kwok, D.E.Kellog, N.McKinney, D.Spasic, L.Goda, C.Levenson, J.J.Sninsky. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 999 (1990).
105. C.R.Newton, A.Graham, L.E.Heptinstall, S.J.Powell, C.Summers, N.Kalsheker, J.C.Smith, A.F.Markham. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 2503 (1989).
106. T.Ehlen, L.Debeau. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**, 441 (1989).
107. D.J.Wu, L.Ugazzoli, B.K.Pol, R.B.Wallace. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2759 (1989).
108. H.Okayama, D.T.Curei, M.L.Brantly, M.D.Halmes, R.G.Crystal. *J. Lab. Clin. Med.*, **114**, 105 (1989).
109. T.Taniguchi, C.Weissmann. *Nature*, **275**, 770 (1978).
110. L.S.Lasater, H.M.Olson, P.A.Cann, D.G.Glitz. *Biochemistry*, **27**, 4687 (1988).
111. S.L.Berger. *Analytical Biochem.*, **161**, 272 (1987).
112. M.J.Zoller, M.Smith. *Meth Enzymol.*, **100(B)**, 468 (1983).
113. M.Smith. *Nucleic Acids Res., Symposium Series*, **7**, 387 (1980).
114. A.Razin, T.Hirose, K.Itakura, A.D.Riggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 4268 (1978).
115. M.E.Winkler, K.Mullis, J.Barnett, I.Stroynowski, Ch.Yanofsky. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2181 (1982).
116. K.L.Agrawal, J.Brunstedt, B.E.Noyes. *J. Biol. Chem.*, **259**, 1023 (1981).
117. R.B.Wallace, M.J.Johnson, T.Hirose, T.Miyake, E.H.Kawashima, K.Itakura. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 879 (1981).
118. A.Murasugi, N.Takemori, S.Hashimoto. *J. Biochem.*, **102**, 627 (1987).
119. B.J.Conner, A.A.Reyes, C.Morin, K.Itakura, R.L.Teplitz, R.B.Walla. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 278 (1983).
120. M.T.Doel, M.Smith. *FEBS Lett.*, **34**, 99 (1973).
121. J.W.Szostak, J.I.Stiles, B.-K.Tyl, P.Chui, F.Sherman, R.Wu. *Methods Enzymol.*, **68**, 419 (1979).
122. P.S.Miller. In *Oligonucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression*. (Ed. J.S.Cohen) Macmillan Press, London, 1989. P.79.
123. P.S.Miller, J.C.Barrett, P.O.P.Ts'o. *Biochemistry*, **13**, 4887 (1974).
124. J.C.Barrett, P.S.Miller, P.O.P.Ts'o. *Biochemistry*, **13**, 4897 (1974).
125. P.S.Miller, K.B.McParland, K.Jayaraman, P.O.P.Ts'o. *Biochemistry*, **20**, 1874 (1981).
126. R.S.Quartin, J.G.Wetmur. *Biochemistry*, **28**, 1040 (1989).
127. P.S.Miller, N.Dreon, S.M.Pulford, K.B.McParland. *J. Biol. Chem.*, **255**, 9659 (1980).
128. B.K.Lee, A.Murakami, K.R.Blake, S.-B.Lin, P.S.Miller. *Biochemistry*, **27**, 3197 (1988).
129. C.C.Smith, L.Aurelian, M.P.Reddy, P.S.Miller, P.O.P.Ts'o. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2787 (1986).
130. F.Eckstein. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 367 (1985).
131. C.A.Stein, C.Subasinghe, K.Shinozuka, J.S.Cohen. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 3209 (1988).
132. C.A.Stein, K.Mori, S.L.Loke, C.Subasinghe, K.Shinozuka, J.C.Cohen, J.M.Neckers. *Gene*, **72**, 333 (1988).
133. A.Andrus, T.Geiser, G.Zon. *Nucleosides and Nucleotides*, **8**, 967 (1989).
134. L.Kibler-Herzog, G.Zon, B.Uznaushi, G.Whittier. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 2979 (1991).
135. C.Helene, N.T.Thuong. *Antisense RNA and DNA: Conf. Cold Spring Harbor*. Cold Spring Harbor, New-York, 1988. P. 47.
136. J.-L.Imbach, B.Rayner, F.Morvan. *Nucleosids and Nucleotides*, **8**, 627 (1989).
137. B.Rayner, C.Malvy, J.Paoletti, B.Lebieu, C.Paoletti, J.-L.Imbach. In *Topics in Molecular and Structural Biology. V. 12. Oligonucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression*. (Ed. J.S.Cohen) Macmillan Press, London, 1989. P.119.
138. F.Morvan, B.Rayner, J.-L.Imbach, S.Thenet, J.R.Bertrand, J.Paoletti, C.Malvy, C.Paoletti. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 3421 (1987).
139. M.Durand, J.C.Maurizot, U.Asseline, C.Barbier, N.T.Thuong, C.Helene. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 1823 (1989).
140. C.Gagnor, J.R.Bertrand, S.Thenet, M.Lemaitre, F.Morvan, B.Rayner, C.Malvy, B.Lebieu, J.-L.Imbach, C.Paoletti. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 10419 (1987).
141. G.Lancelot, U.Asseline, N.T.Thuong, C.Helene. *Biochemistry*, **24**, 2521 (1985).
142. J.Paoletti, D.Bazile, F.Morvan, J.-L.Imbach, C.Paoletti. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 2693 (1989).
143. M.Durand, N.T.Thuong, J.C.Marizot. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 505 (1989).
144. U.Asseline, N.T.Thuong, F.Toulme, M.Delarue, T.Montenay-Garestier, C.Helene. *EMBO J.*, **3**, 795 (1984).
145. J.J.Toulme, H.M.Krisch, N.Loreau, N.T.Thuong, C.Helene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1227 (1986).
146. N.T.Thuong, U.Asseline, T.Montenay-Garestier. In *Topics in Molecular and Structural Biology. V.12. Oligonucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression*. (Ed. J.S.Cohen) Macmillan Press, London, 1989. P.25.
147. C.J.Marcus-Sekura. *Analytical Biochem.*, **172**, 289 (1988).
148. J.Sun, U.Asseline, D.Rouzand, T.Montenay-Garestier, N.T.Thuong, C.Helene. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 6149 (1987).
149. В.Ф.Зарытова, И.В.Кутявин, М.А.Подыминогин, В.Н.Сильников, Г.В.Шишкин. *Биоорганическая химия*, **13**, 1212 (1987).
150. V.V.Vlassov, V.F.Zarytova, I.V.Kutiavin, S.V.Mamaev. *FEBS Lett.*, **231**, 352 (1988).
151. *Antisense DNA and RNA. Cold Spring Harbor*. (Ed. D.A.Melton). 1988.
152. J.J.Toulme, C.Helene. *Gene*, **72**, 51 (1988).
153. S.A.Liebhaver, F.E.Cash, S.H.Shakin. *J. Biol. Chem.*, **259**, 15597 (1984).
154. S.H.Shakin, S.A.Liebhaver. *J. Biol. Chem.*, **261**, 16018 (1986).
155. T.G.Lawson, B.K.Ray, J.T.Dodds, J.A.Grifo, R.D.Abramson, W.C.Marrick, D.F.Betsch, H.L.Weith, R.E.Thach. *J. Biol. Chem.*, **260**, 13979 (1986).
156. C.Sartorius, R.M.Franklin. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1613 (1991).
157. C.Boiziau, R.Kurfurst, C.Cazenave, V.Roig, N.T.Thuong, J.-J.Toulme. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1113 (1991).
158. M.-T.Haeuptle, R.Frank, B.Dobberstein. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 1427 (1986).
159. P.Dash, I.Lotan, M.Knapp, E.R.Kandel, P.Goelet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7896 (1987).
160. R.Y.Walder, J.A.Walder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5011 (1988).
161. C.Cazenave, N.Loreau, N.T.Thuong, J.-J.Toulme, C.Helene. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 4717 (1987).
162. J.Minshull, T.Hunt. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 6433 (1986).
163. J.-R.Bertrand, J.-L.Imbach, C.Paoletti, C.Malvy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 311 (1989).

164. C.Cazenave, N.Loreau, J.-J.Toulme, C.Helene. *Biochimie*, **68**, 1063 (1986).
165. K.R.Blake, A.Murakami, P.S.Miller. *Biochemistry*, **24**, 6132 (1985).
166. K.R.Blake, A.Murakami, S.A.Spitz, S.A.Glave, M.Paramiswara, M.P.Reddy, P.O.P.Ts'o. *Biochemistry*, **24**, 6139 (1985).
167. A.Murakami, K.R.Blake, P.S.Miller. *Biochemistry*, **24**, 4041 (1985).
168. C.Cazenave, C.A.Stein, N.Loreau, N.T.Thuong, L.M.Neckers, C.Subasinghe, C.Helene, J.Cohen, J.-J.Toulme. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 4255 (1989).
169. J.Goodchild, E.Carroll, III, J.R.Greenberg. *Arch. Biochem. Biophys.*, **263**, 401 (1988).
170. M.L.Stephenson, P.C.Zamecnik. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 285 (1978).
171. E.Wickstrom. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **13**, 97 (1986).
172. K.C.Gupta. *J. Biol. Chem.*, **262**, 7492 (1987).
173. S.Sankar, K.-C.Cheah, A.G.Porter. *Eur. J. Biochem.*, **184**, 39 (1989).
174. C.Crum, J.D.Johnson, A.Nelson, D.Roth. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 4569 (1988).
175. E.Wickstrom, W.S.Simonet, K.Medlock, I.Ruis-Robles. *Biophys. J.*, **49**, 15 (1986).
176. P.S.Miller, C.H.Agris, L.Aurelian, K.R.Blake, A.Murakami, M.P.Reddy, S.A.Spitz, P.O.P.Ts'o. *Biochimie*, **67**, 769 (1985).
177. P.S.Miller, L.Aurelian, K.R.Blake, E.Chang, J.M.Kean, B.L.Lee, S.-B.Lin, A.Murakami, P.O.P.Ts'o. In *Antisense RNA and DNA: Conf. Cold Spring Harbor*. Cold Spring Harbor, New-York, 1988. P.41.
178. C.H.Agris, K.R.Blake, P.S.Miller, M.P.Reddy, P.O.P.Ts'o. *Biochemistry*, **25**, 6268 (1986).
179. A.W.C.A.Cornelissen, M.P.Verspieren, J.-J.Toulme, B.W.Swinkels, P.Borst. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 5605 (1986).
180. P.Verspieren, A.W.C.A.Cornelissen, N.T.Thuong, C.Helene, J.-J.Toulme. *Gene*, **61**, 307 (1987).
181. P.Verspieren, N.T.Thuong, C.Helene, J.-J.Toulme. *Antisense RNA and DNA. Conf. Cold Spring Harbor*. Cold Spring Harbor, New-York, 1988. P. 53.
182. C.Helene, T.Montenay-Garestier, T.Saison, M.Takasugi, J.-J.Toulme, U.Asseline, G.Lancelot, J.C.Meanrizot, F.Toulme, N.T.Thuong. *Biochimie*, **67**, 777 (1985).
183. M.Ceruzzi, K.Draper. *Nucleosides and Nucleotides*, **8**, 815 (1989).
184. J.W.Jaroszewski, J.S.Cohen. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **6**, 235 (1991).
185. J.-P.Leonetti, N.Mechti, G.Degols, C.Gagnor, B.Lebleu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2702 (1991).
186. Y.Shoji, S.Akhtar, A.Periasamy, B.Herman, R.L.Juliano. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5543 (1991).
187. L.A.Yakubov, E.A.Deeva, V.F.Zarytova, A.S.Ryte, L.V.Yurchenko, V.V.Vlassov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6454 (1989).
188. В кн. *Транскрипция и трансляция*. (Под ред. Б.Хеймса и С.Хиггинса) Мир, Москва, 1987. С.102.
189. J.Shuttleworth, A.Colman. *EMBO J.*, **7**, 427 (1988).
190. W.M.Wormington. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8639 (1986).
191. E.S.Kawasaki. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 4991 (1985).
192. C.Jesus, C.Cazenave, R.Ozon, C.Helene. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 2225 (1988).
193. P.C.Zamecnik, M.L.Stephenson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 280 (1978).
194. M.Lemaitre, B.Bayard, B.Lebleu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 648 (1987).
195. M.Matsukura, K.Shinozuka, G.Zon, H.Mitsuya, M.Reitz, J.S.Cohen, S.Broder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7706 (1987).
196. S.Agrawal, J.Goodchild, M.P.Civeira, A.H.Thornton, P.A.Sarin, P.C.Zamecnik. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7079 (1988).
197. S.Agrawal, P.S.Sarin. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **6**, 251 (1991).
198. J.A.Zaia, J.J.Rossi, G.J.Murakawa, P.A.Spallone, D.A.Stephens, B.E.Kaplan, R.Eritza, P.B.Wallace, E.M.Cantin. *J.Virology*, **62**, 3914 (1988).
199. C.A.Stein, R.Pal, A.L.DeVico, G.Hoke, S.Mumbauer, O.Kinstler, M.G.Saragadham, R.L.Letsinger. *Biochemistry*, **30**, 2439 (1991).
200. T.Vickers, B.F.Baker, P.D.Cook, M.Zounes, R.W.Buckheit, Jr., J.Germany, D.E.Ecker. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 3559 (1991).
201. A.Zerial, N.T.Thuong, C.Helene. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 9909 (1987).
202. V.V.Vlassov, V.V.Gorn, N.J.Nomokonova, T.N.Fokina, L.V.Yurchenko. *Nucleosides and Nucleotides*, **10**, 649 (1991).
203. V.V.Vlassov, E.I.Frolova, T.S.Godovikova, E.M.Ivanova. *Nucleosides and Nucleotides*, **10**, 645 (1991).
204. J.-P.Leonetti, G.Degols, P.Milhaud, C.Gagnor, M.Lemaitre, B.Lebleu. *Nucleosides and Nucleotides*, **8**, 821 (1989).
205. P.C.Zamecnik, J.Goodchild, J.Taguchi, P.S.Sarin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4143 (1986).
206. S.Agrawal, T.Ikeuchi, D.Sun, P.S.Sarin, A.Konopka, J.Maizel, P.C.Zamecnik. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7790 (1989).
207. S.Agrawal, J.Goodchild, M.Civeira, P.S.Sarin, P.C.Zamecnik. *Nucleosides and Nucleotides*, **8**, 819 (1989).
208. M.Matsukura, G.Zon, K.Shinozuka, G.A.Stein, H.Mitsuya, J.C.Cohen, S.Broder. *Gene*, **72**, 343 (1988).
209. M.Matsukura, G.Zon, H.Shinozuka, M.Robert-Guroff, T.Shimada, G.A.Stein, H.Mitsura, F.Wong-Staal, J.C.Cohen, S.Broder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4244 (1989).
210. S.Shibahara, S.Mukai, H.Morisawa, H.Nakashima, S.Kobayashi, I.Yamamoto. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 239 (1989).
211. R.Heikkila, G.Schwab, E.Wickstrom, S.L.Loke, D.H.Pluznik, R.Watt, L.M.Neckers. *Nature*, **328**, 445 (1987).
212. G.Degols, J.-P.Leonetti, N.Mechti, B.Lebleu. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 945 (1991).
213. J.T.Holt, R.L.Redner, A.W.Nienhuis. *Mol. and Cell. Biol.*, **8**, 963 (1988).
214. E.L.Wickstrom, T.A.Bacon, A.Gonzalez, D.L.Freeman, G.H.Lyman, E.Wickstrom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1028 (1988).
215. C.J.Marcus-Sekura, A.M.Wolner, K.Shinozuka, G.Zon, G.V.Quinnan, Jr. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 5749 (1987).
216. D.Jaskulski, J.Kim de Riel, W.E.Mercer, B.Calabretta, R.Baserga. *Science*, **240**, 1544 (1988).
217. C.Helene, J.-J.Toulme. In *Oligonucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression*. (Ed. J.C.Cohen) Macmillan Press, London, 1989. P.137.
218. P.B.Dervan. In *Oligonucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression*. (Ed. J.C.Cohen) Macmillan Press, London, 1989. P.197.
219. D.G.Knorre, V.V.Vlassov. *Progr. in Nucleic Acids Res. and Mol. Biol.*, **32**, 291 (1985).
220. D.G.Knorre, V.V.Vlassov, V.F.Zarytova, G.G.Karpova. In *Advances in Enzyme Regulation. V.24*. Pergamon Press, Oxford, 1986. P.277.
221. J.M.Kean, A.Murakami, K.R.Blake, C.D.Cishman, P.S.Miller. *Biochemistry*, **27**, 9113 (1988).
222. U.Pieles, U.Engelisch. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 285 (1989).
223. R.B.Meyer Jr., J.C.Tabone, G.D.Hurst, T.M.Smith, H.Gamper. *J. Amer. Chem. Soc.*, **111**, 8517 (1989).
224. G.B.Dreyer, P.B.Dervan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 968 (1985).
225. J.C.Francois, T.Saison-Behmoaras, M.Chassignol, N.T.Thuong, J.C.Sun, C.Helene. *Biochemistry*, **27**, 2272 (1988).
226. T.Le Doan, L.Perronault, D.Praseuth, N.Habhout, J.-P.Decout, N.T.Thuong, J.Lhomme, C.Helene. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 7749 (1987).
227. C.H.B.Chen, D.S.Sigman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7147 (1986).
228. Н.И.Гринева, Г.Г.Карпова, Г.Г.Шамовский. *Молекуляр. биология*, **8**, 358 (1974).
229. Г.Г.Карпова. *Изв. Сиб. Отд. АН СССР. Сер. хим. наук*, **4**, 82 (1987).
230. Н.И.Гринева, Г.Г.Карпова. *Молекуляр. биология*, **8**, 832 (1974).
231. Н.И.Гринева, Г.Г.Карпова. *Биооргани. химия*, **1**, 588 (1975).
232. Н.И.Гринева, Г.Г.Карпова, Л.М.Кузнецова, Т.А.Чимитова, Т.В.Векстерн, Л.П.Шершнева, А.А.Баев. *Молекуляр. биология*, **10**, 1260 (1976).
233. Н.И.Гринева, Г.Г.Карпова, Л.М.Кузнецова, Т.В.Векстерн, А.А.Баев. *Nucleic Acids Res.*, **4**, 1609 (1977).
234. А.М.Беликова, Н.И.Гринева, Г.Н.Кабасева. *Tetrahedron*, **29**, 2277 (1973).
235. О.И.Гимаутдинова, И.И.Горшкова, Г.Г.Карпова, И.В.Кутиявин, Д.М.Грайфер. *Молекуляр. биология*, **18**, 1419 (1984).

236. О.И.Гимаутдинова, В.В.Горн, И.И.Горшкова, Д.М.Грайфер, Г.Г.Карпова, Д.А.Мундус, Н.М.Теплова. *Биоорган. химия*, **12**, 490 (1986).
237. V.V.Vlassov, S.A.Gaidamakov, V.F.Zarytova, D.G.Knorre, A.S.Levina, A.A.Nikonova, L.M.Podust, O.S.Fedorova. *Gene*, **72**, 313 (1988).
238. Е.Б.Бросалина, В.В.Власов, И.В.Кутявин, С.В.Мамаев, А.Г.Плетнев, М.А.Подыминогин. *Докл. АН СССР*, **285**, 1475 (1985).
239. Е.Б.Бросалина, В.В.Власов, И.В.Кутявин, С.В.Мамаев, А.Г.Плетнев, М.А.Подыминогин. *Биоорган. химия*, **12**, 240 (1986).
240. И.И.Горшкова, М.А.Зенкова, Г.Г.Карпова, А.С.Левина, В.В.Соловьев. *Молекуляр. биология*, **20**, 1084 (1986).
241. М.А.Зенкова, Г.Г.Карпова, А.С.Левина. *Молекуляр. биология*, **23**, 1056 (1989).
242. М.А.Зенкова, Г.Г.Карпова, А.С.Левина, С.В.Мамаев, В.В.Соловьев. *Биоорган. химия*, **16**, 788 (1990).
243. М.А.Зенкова, О.С.Федорова, А.С.Левина, С.В.Мамаев, Г.Г.Карпова. *FEBS Lett.*, **269**, 26 (1990).
244. М.А.Зенкова, Г.Г.Карпова, А.С.Левина, С.В.Мамаев, Ю.Н.Назарова, О.С.Федорова. *Биоорган. химия*, **17**, 470 (1991).
245. Н.А.Колчанов, В.В.Соловьев, А.А.Жарких. *Докл. АН СССР*, **273**, 741 (1983).
246. I.V.Kytiavin, M.A.Podyminogin, J.N.Bashina, O.S.Fedorova, D.G.Knorre, A.S.Levina, S.V.Mamaev. *FEBS Lett.*, **238**, 35 (1988).
247. В.В.Власов, А.А.Годовиков, В.Ф.Зарытова, Е.М.Иванова, Н.Ю.Номоконова. *Молекуляр. биология*, **24**, 173 (1990).

IMPERFECT DUPLEXES OF NUCLEIC ACIDS AND ITS BIOCHEMICAL APPEARANCE

M.A.Zenkova, G.G.Karpova

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
Prospekt Lavrent'eva, 8, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(383-2)35-1665*

This review analyzes experimental data on selectivity of nucleic acid interaction with antisense oligonucleotides and antisense oligonucleotide derivatives, allowing the possibility of highly-specific actions on biochemical and molecular-genetical processes in living organisms. Theoretical evaluations of the specificity of nucleic acids interactions and thermodynamic parameters of perfect and imperfect nucleic acid duplex formation are discussed in the review. Of special interest is the specificity of RNA and DNA interactions with antisense oligonucleotides and antisense oligonucleotide derivatives in the different model systems both *in vitro* and *in vivo*. Data on the antisense oligonucleotide directed inhibition of the translation *in vitro* are analyzed. The influence of the secondary and high-order structure of nucleic acids on the specificity and effectiveness of interactions with antisense oligonucleotides and its derivatives is discussed.

Bibliography – 247 references.

Received December 7, 1992