

УДК 547.93 : 541.49

**СПЕЦИФИЧЕСКОЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ  
В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ С УЧАСТИЕМ МОНО-  
И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ**

**Н. И. Соколова, В. К. Каграманова, Н. Г. Долинная**

Обобщены и проанализированы данные о комплексообразовании между синтетическими полинуклеотидами и комплементарными олиго-(моно)-нуклеотидами. Рассмотрены основные методы изучения комплексов и оценены границы применимости этих методов. Особое внимание уделено условиям комплексообразования (температура, ионная сила, pH растворов, концентрация и соотношение компонентов и др.). Обсуждается влияние природы гетероциклического основания, сахара и длины олигонуклеотидной цепи на стехиометрию и термическую стабильность комплексов.

Библиография — 150 наименований.

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

I. Введение . . . . .	104
II. Основные принципы образования олигомер(мономер)-полимерных и олиго- мер-олигомерных комплексов . . . . .	105
III. Комpleксы мономеров с полинуклеотидами . . . . .	112
IV. Комpleксы олигонуклеотидов с полинуклеотидами . . . . .	118
V. Взаимодействие комплементарных олигонуклеотидов . . . . .	126

**I. ВВЕДЕНИЕ**

За последние годы появилось много работ, посвященных изучению взаимодействия комплементарных моно-, олиго- и полинуклеотидов. Это вызвано расширением исследований по изучению вторичной структуры нуклеиновых кислот, а также взаимосвязи структуры нативных макромолекул и их биологических функций.

Одним из подходов к выяснению причин и закономерностей образования сложных нативных нуклеотидных комплексов является изучение более простых синтетических систем. Как показали исследования последних лет, такие системы оказались удобными моделями для изучения ряда вопросов молекулярной биологии (кодон-антикодоновых взаимодействий<sup>1</sup>, проблем биосинтеза белка<sup>2</sup>, редупликации ДНК<sup>3, 4</sup> и т. д.).

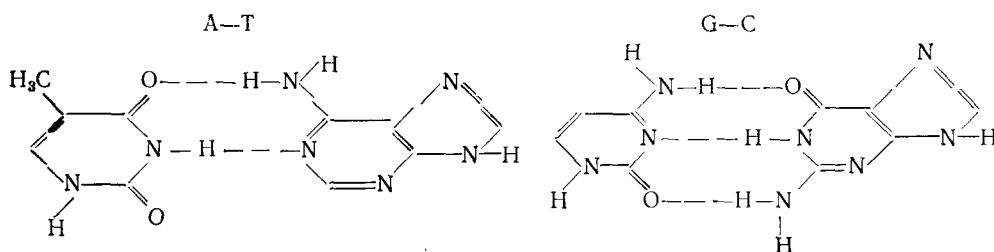
Изучение способности моно-, олиго- и полинуклеотидов образовывать в водных растворах ДНК-подобные комплексы имеет важное значение и с точки зрения биоорганической химии в связи с разработкой новых подходов к неферментативному олигонуклеотидному синтезу на матрицах<sup>5-7</sup>.

В настоящем обзоре систематизированы опубликованные до 1973 г. сведения о специфических взаимодействиях в простейших нуклеотидных системах. Рассматриваются работы, связанные с изучением мономер-полимерных, олигомер-полимерных и олигомер-олигомерных комплексов. Не обсуждаются вопросы полинуклеотид-полинуклеотидного взаимодействия, рассмотренные в ряде статей и монографий<sup>8-10</sup>, а также некоторые общие вопросы, такие, как теоретическое рассмотрение природы сил, принимающих участие в комплексообразовании<sup>11-13</sup>, и современная трактовка перехода «спираль — клубок»<sup>14-16</sup>.

## II. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ОБРАЗОВАНИЯ ОЛИГОМЕР-ПОЛИМЕРНЫХ И ОЛИГОМЕР-ОЛИГОМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Способность к образованию межмолекулярных специфических комплексов в водных солевых растворах присуща не только полинуклеотидам. Было показано, что короткие олигомеры друг с другом и с молекулами полимеров в соответствующих условиях также могут образовывать упорядоченные межмолекулярные структуры<sup>17-25</sup>. Комплексообразование олиго- и полинуклеотидов, как и нативных макромолекул нуклеиновых кислот, определяется тремя основными факторами — взаимодействием гетероциклических оснований (комплементационным и межплоскостным), влиянием растворителя и электростатическими эффектами фосфатных групп.

Комплементационные (поперечные) взаимодействия приводят к специфическому связыванию друг с другом определенных гетероциклических оснований из соседних полимерных (олигомерных) цепей, аденин взаимодействует с урацилом (тимином), гуанин с цитозином<sup>26</sup>



Теоретический аспект проблемы стабильности, связанных водородными связями пар оснований, рассматривается в монографии Кочеткова и др.<sup>10</sup>

Межплоскостные продольные «стэкинг» взаимодействия играют важную роль в создании определенной конформации участвующих в комплексообразовании моно-, олиго- и полинуклеотидных цепей и обеспечивают стабильность комплекса. Благодаря гидрофобным силам гетероциклические основания каждой цепи укладываются в стопку, стремясь уйти от контакта с молекулами воды; это обусловлено выигрышем в энергии за счет энтропийного фактора, связанного с изменением числа структурированных молекул воды вокруг растворенного вещества при ассоциации молекул этого вещества в комплекс. Кроме того, процесс сопровождается уменьшением энергии поверхностного натяжения за счет изменения размеров поверхности молекул при переходе от гидратированных оснований к их ассоциатам.

Используя метод гельхроматографии при помощи термодинамических расчетов, Брэслер и сотр.<sup>27</sup> показали, что суммарная энергия водородных связей значительно выше энергии стэкинг-взаимодействия. Ранее же считалось, что водородные связи не вносят существенного вклада в стабилизацию комплекса<sup>28</sup>.

Помимо взаимодействия оснований и влияния растворителя, важным фактором являются заряды фосфатных групп. Если связывание гетероциклических оснований друг с другом и с молекулами воды стабилизирует комплекс, то отталкивание одноименно заряженных фосфатных групп дестабилизирует его.

Отличительной чертой рассматриваемых в настоящем обзоре комплексов является их резко выраженная зависимость как от общей концентрации нуклеотидов, так и от избыточной концентрации олиго(моно)-нуклеотидной компоненты по отношению к полимерной матрице<sup>28</sup>. Качест-

венное объяснение последней зависимости было дано Тс'о и др.<sup>29</sup>, а также Уленбеком<sup>30</sup>. Эти авторы показали, что для двух полинуклеотидов сравнимой длины локальная концентрация мономерных единиц в объеме, где происходит взаимодействие, достаточно велика. В таких условиях степень комплексообразования не зависит от концентрации полимера в растворе.

Когда же одна из цепей, образующих спираль, состоит из мононуклеотидов или коротких олигонуклеотидов, степень комплексообразования находится в соответствии с законом действующих масс.

В системе олигомер — полимер общая концентрация олигонуклеотида существенно влияет на его локальную концентрацию вблизи полимерных молекул, поэтому по закону действующих масс комплексообразование зависит от общей концентрации олигонуклеотида.

В мономер-полимерных системах локальная концентрация мономерных единиц непосредственно определяется общей концентрацией мономера. Таким образом, концентрационная зависимость комплексообразования в этих системах должна быть выражена наиболее сильно.

В результате изучения различных олиго-полинуклеотидных комплексов была обнаружена линейная зависимость  $1/T$ . пл. от  $\lg c$  ( $c$  — концентрация олигомера в расчете на основание)<sup>28</sup>. Наклон экспериментальной прямой зависит от длины олигонуклеотидной цепи. Общим свойством комплементарных комплексов является зависимость устойчивости последних от ионной силы раствора.

Вклад электростатических сил в свободную энергию перехода «спираль — клубок» задается уравнением<sup>31</sup>:

$$\Delta E_{\text{эл.}} = RT (C_1 - C_2 \lg I),$$

где  $C_1$  и  $C_2$  — эмпирические константы,  $I$  — ионная сила раствора.

Для полимер-полимерных систем найдена линейная зависимость температуры плавления от  $\lg I$ <sup>31, 32</sup>. Показано, что с увеличением ионной силы происходит повышение температуры плавления комплекса. Эта же закономерность присуща системе олиго А — поли У<sup>33</sup>. Особенно сильно от концентрации солей зависит устойчивость мономер-полимерных комплексов.

Присутствие ионов  $Mg^{2+}$  заметно стабилизирует олигомер (мономер)-полимерные комплексы<sup>34</sup>. Например, увеличение в 4 раза концентрации  $Mg^{2+}$  в системе (рА)<sub>4</sub> — поли У (от  $10^{-3} M$  до  $4 \cdot 10^{-3} M$ ) приводит к повышению температуры плавления комплекса на  $6,5^\circ$ <sup>35</sup>.

Важнейшее свойство, объединяющее специфические межмолекулярные комплексы, образуемые с участием как коротких, так и длинных нуклеотидных цепей, состоит в кооперативном характере разрушения таких структур, что выражается в сравнительно узком интервале температур, отделяющих упорядоченный комплекс от разрушенной структуры. В настоящее время вопрос о кооперативности перехода «спираль — клубок» решается в рамках теорий, рассматривающих этот процесс с точки зрения статистической физики. Сущность кооперативного перехода состоит в том, что различные его стадии не происходят независимо одна от другой, а являются взаимосвязанными, и разрушение хотя бы одного участка спирали ведет к быстро прогрессирующему плавлению всей структуры. Причиной кооперативности плавления является нарушение межплоскостных взаимодействий пар оснований<sup>36</sup>. Степень кооперативности перехода может быть различна для различных систем и характеризуется фактором кооперативности  $\sigma = e^{-E/RT}$ ,  $E$  — свободная энергия стэкинг-взаимодействия двух изолированных пар оснований, связанных водородными связями.

### 1. Методы изучения комплексов

Образование нуклеотидных спиральных комплексов в растворе сопровождается существенным изменением их свойств по сравнению со свойствами свободных компонентов — возрастанием молекулярного веса и жесткости структур, увеличением оптической активности, возникновением гипер-гипохромных эффектов в области поглощения и др. Это позволяет регистрировать и изучать комплексы с помощью ряда физико-химических методов: ИК- и УФ-спектроскопии<sup>5, 37</sup>, дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма<sup>38, 39</sup>, седиментационного анализа<sup>40</sup>, вискозиметрии<sup>34</sup>, протонного магнитного резонанса (ПМР)<sup>41</sup>, калориметрии<sup>42</sup> и др. При исследовании систем олигомер—олигомер и олигомер (мономер) — полимер наиболее широкое применение нашли оптические методы, на которых следует остановиться несколько подробнее.

**УФ-спектроскопия.** В условиях комплексообразования происходит изменение интенсивности поглощения в УФ-области по сравнению с суммарной интенсивностью поглощения индивидуальных компонентов. При этом в зависимости от длины волны поглощаемого света молярный коэффициент поглощения комплекса может быть меньше (гипохромный эффект), больше (гиперхромный эффект) или равен сумме соответствующих коэффициентов поглощения компонентов. В области максимума поглощения при образовании комплекса обычно наблюдается уменьшение интенсивности поглощения (рис. 1). В некоторых случаях, когда исходные компоненты имеют собственную вторичную структуру, образование межмолекулярного комплекса сопровождается увеличением поглощения<sup>43</sup>.

Величина гипохромного эффекта характеризуется процентом гипохромии ( $\% h$ ) и отражает степень стэкинг-взаимодействия оснований в комплексе. Обычно методом УФ-спектроскопии определяют температурную зависимость поглощения растворов при определенной длине волны и строят кривые «плавления»<sup>9</sup>. Из характера зависимости термической устойчивости комплекса (Т. пл.) от длины цепи олигомеров и их концентрации можно рассчитать ряд термодинамических характеристик<sup>33</sup>.

При взаимодействии гомоолиго- и полинуклеотидов длина волны, при которой мольный коэффициент экстинкции комплекса равен сумме коэффициентов экстинкции компонентов, является характеристикой, по которой можно судить о примерной стехиометрии комплекса. Связь между изохроматической длиной волны и стехиометрией комплекса была установлена Стивенсом и Фельзенфельдом<sup>44</sup>. Позднее Блейк и сотр.<sup>45</sup> показали, что для двойных спиралей 1A·1U эта характерная длина волны соответствует 280 нм, а для трехцепочного комплекса 1A·2U — 283,5 нм.

Таким образом, метод УФ-спектроскопии обеспечивает получение всех необходимых сведений о взаимодействии в данной системе и имеет лишь тот недостаток, что неудобен для исследования растворов с высокой концентрацией нуклеотидов.

**Дисперсия оптического вращения (ДОВ) и круговой дихроизм (КД).** При комплексообразовании синтетических олиго- и полинуклеотидов на-

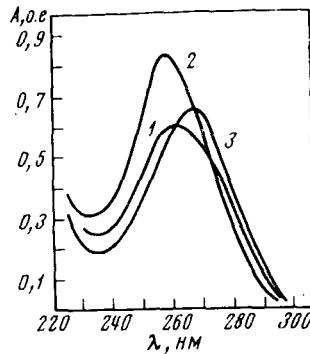


Рис. 1. УФ-спектры 1 — комплекса  $A(pA)_7 \cdot d(pT)_8$ ; его компонентов 2 —  $A(pA)_7$  и 3 —  $d(pT)_8$  ( $9,4 \cdot 10^{-6} M$  концентрация нуклеотидов, 1 M  $NaCl$ ,  $pH 7,0$ ,  $-5^\circ$ )<sup>38</sup>

блюдаются значительные изменения в спектрах ДОВ и КД: смещение точек нулевого перехода в коротковолновую область и изменение амплитуды эффекта Коттона<sup>46-48</sup>. Обычно кривую ДОВ или КД комплекса сравнивают с суммарной кривой, полученной в результате сложения кривых индивидуальных компонентов (с учетом их мольной доли в комплексе), либо с кривой ДОВ или КД смеси компонентов при температуре  $> > T$  пл. комплекса. Полезную информацию о комплексообразовании дают также кривые «плавления», отражающие зависимость молярной эллиптичности или молярного вращения, измеренных при определенной длине волны, от температуры. Следует отметить, что голубое смещение спектров ДОВ и КД, изменение оптической активности, а также гипохромные эффекты при УФ-спектроскопии могут быть вызваны не только образованием специфических комплексов, но и образованием различных гомоассоциатов. Вследствие этого для систем, где наряду со специфическим взаимодействием, имеет место и гомоассоциация компонентов, необходима дополнительная корректировка экспериментальных данных<sup>39</sup>.

**ИК-спектроскопия.** Частоты валентных колебаний свободных  $\text{NH}_2$ - $\text{HN}$  и  $\text{O}=\text{C}$  групп пиримидиновых и пуриновых оснований изменяются при участии этих групп в образовании водородных связей<sup>49, 50</sup>. На этом основан метод изучения комплексообразования с помощью ИК-спектроскопии, позволяющий регистрировать наличие комплементационных взаимодействий в системе.

Установление структуры комплекса проводится двумя путями: а) сравнением ИК-спектра изучаемого комплекса с ИК-спектром комплекса известной стехиометрии, обычно в качестве эталонов используют ИК-спектры полимер-полимерных комплексов соответствующего нуклеотидного состава<sup>51</sup>; б) измерением зависимости интенсивности характеристической полосы поглощения комплекса от состава смеси при постоянной суммарной концентрации обоих компонентов<sup>10</sup>.

ИК-спектроскопия позволяет количественно оценить степень комплексообразования по интенсивности полос, появляющихся при взаимодействии, а диаграмма зависимости этой интенсивности от температуры представляет собой профиль плавления комплекса<sup>52, 53</sup>.

ИК-спектроскопия имеет ряд преимуществ перед рассмотренными выше методами. Поскольку ИК-спектры индивидуальных компонентов их комплексов и самоагрегатов, как правило, отличаются друг от друга, это позволяет различать продукты взаимодействия и судить о наличии неспецифических взаимодействий в системе<sup>52</sup>. Важное преимущество метода состоит в том, что он дает возможность использовать высокие концентрации нуклеотидов и наблюдать комплексообразование в условиях, исключающих применение других оптических методов. Это особенноично при изучении мономер-полимерных систем, где концентрация компонентов играет решающую роль в комплексообразовании<sup>53</sup>. Недостатком метода является невысокая интенсивность полос поглощения, возникающих в результате образования водородных связей.

## 2. Исследование стехиометрии комплексов

Важнейшей характеристикой комплекса является его стехиометрия. Для синтетических гомоолиго- и полинуклеотидов кроме обычной двухцепочечной возможно образование тройной спирали, причем вторая полинуклеотидная (пиримидиновая) цепь встраивается в комплекс, очевидно, посредством образования водородных связей с имидазольными кольцами пуриновых оснований. Такие структуры известны для пары А—У (Т) в кристаллическом состоянии<sup>54, 55</sup>.

Исследования последних лет показали, что стехиометрия олигомер-полимерных комплексов не определяется однозначно соотношением компонентов при смешении, а зависит от ряда факторов (температура, ионная сила раствора, ионы двухвалентных металлов, длина цепи олигомера и т. д.).

Наиболее распространенным методом определения стехиометрии комплексов является построение кривых смешения (так называемый метод длительных вариаций Джоба)<sup>56</sup>. Например, измеряется УФ-поглощение смесей, содержащих различные соотношения реагентов при их постоянной суммарной концентрации, и строится график зависимости оптической плотности смеси от мольной доли (*м. д.*) одного из компонентов. Экстремум на кривой смешения указывает на стехиометрию комплекса. Для построения кривых смешения используются также ДОВ<sup>57</sup> КД<sup>58</sup> и метод ИК-спектроскопии<sup>59</sup>.

Стехиометрическое соотношение взаимодействующих в комплексе оснований может быть определено непосредственно из величины мольной доли одного из компонентов, при которой наблюдается экстремум:

$$r = \frac{(1-x)}{x}$$

где  $x$  — *м. д.* одного компонента,  $(1-x)$  — *м. д.* другого компонента.

В случае сложенного экстремума для определения стехиометрии комплекса находят точку пересечения прямых, продолжающих линейные участки кривой смешения. Однако, если кривая несимметрична (например, при образовании трехцепочечного комплекса), экстраполяция может привести к грубой ошибке<sup>58, 59</sup>. Если наряду с комплексообразованием в системе имеет место самоагрегация компонентов, в формулу Джоба вводятся дополнительные члены, учитывающие изменение поглощения и концентрации, обусловленные самоагрегацией<sup>47</sup>. Расчет стехиометрии оказывается чрезвычайно сложным. В некоторых случаях можно подобрать длину волны, при которой процесс самоагрегации существенно не влияет на УФ-поглощение системы, и тогда экстремум на кривой смешения, как и в отсутствие агрегации, совпадает с максимумом концентрации комплекса. Например, исследование стехиометрии комплексов с участием гуаниловых олигонуклеотидов проводят обычно при 275 или 290  $\text{нм}$ <sup>60</sup>.

Метод построения кривых смешения используют при изучении олигомер-олигомерных и олигомер-полимерных комплексов. При мономер-полимерном взаимодействии комплексообразование чрезвычайно сильно зависит от концентрации мономерного компонента, хотя в большинстве случаев нет корреляции между соотношением компонентов в растворе и стехиометрией комплексов<sup>39</sup>. В этом случае стехиометрия взаимодействия определяется непосредственно отношением количества связанного в комплекс мономера к общему количеству полимера в растворе (при условии полного связывания полимерных молекул). Такое соотношение может быть найдено путем построения изотермы  $Tc'$  или графика Скэтчарда<sup>61</sup>. На основании этих графиков можно рассчитать энергию взаимодействия ближайших соседей и константы связывания оснований<sup>62</sup>. Для определения стехиометрии комплексов используются также методы вискозиметрии, гельфильтрации<sup>28</sup>, а также метод равновесного длиализа<sup>63</sup>.

### 3. Устойчивость комплексов. Термодинамические параметры

Термическая устойчивость комплекса является одной из главных характеристик, получаемых непосредственно из эксперимента. На рис. 2

приведена кривая термического плавления комплекса, полученная методом УФ-спектроскопии. Если принять, что оптическая плотность при низкой температуре (нижнее плато) соответствует полностью спирализованной структуре, а в конце плавления — свободным компонентам, то доля взаимодействующих в комплексе оснований ( $\theta$ ) в любой точке перехода рассчитывается по формуле:

$$\theta(t) = \frac{A_\infty - A_t}{A_\infty - A_0}$$

где  $A_\infty$  — поглощение раствора полностью денатурированного комплекса;  $A_0$  — поглощение раствора в оптимальных условиях комплексообразования.

Термическая устойчивость комплекса характеризуется двумя параметрами — температурой плавления (т. пл.) и шириной интервала перехода ( $\Delta$  т. пл.)<sup>64</sup>. Температура плавления — это средняя точка кривой

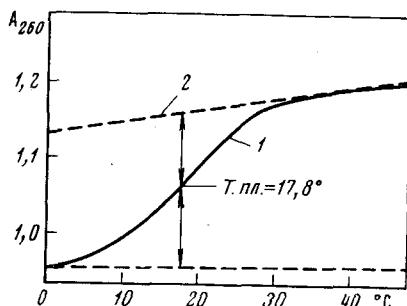


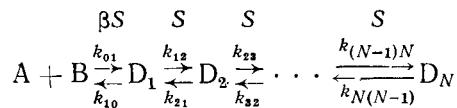
Рис. 2. Температурная зависимость оптической плотности  $A_{260}$  межмолекулярного комплекса  $(Ap)_5U(pU)_4$  (1 M NaCl, pH 7,4) 1 — экспериментальная кривая; 2 — рассчитанное поглощение раствора при отсутствии взаимодействия<sup>63</sup>

перехода, определяемая как температура, при которой доли спиральных и неспиральных участков равны, т. е.  $\theta = 1/2$ . Для данного комплекса при постоянных внешних условиях величина т. пл. постоянна. Величина интервала перехода определяется разностью температур, при которых касательная к кривой плавления в точке т. пл. на графике  $(1-\theta) - t^\circ$  пересекает линии, соответствующие  $1-\theta=0$  и  $1-\theta=1$ .  $\Delta$  Т. пл. отражает кооперативность перехода, т. е. степень одновременности разрушения всех звеньев спиральной структуры при повышении температуры. В случае синтетических гомополинуклеотидов ширина перехода связана с фактором кооперативности ( $\sigma$ ) соотношением:

$$\Delta T_{\text{пл.}} = 12,4 R \frac{T_{\text{пл.}}^2}{\Delta H} \sigma^{2/3}, \Delta H — \text{энタルпия перехода.}$$

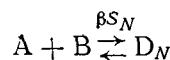
Теория кооперативного перехода «спираль — клубок», разработанная современной статистической физикой для полинуклеотидных моделей<sup>65-67</sup>, применима и для рассмотрения олигомер-олигомерных и олигомер(мономер)-полимерных взаимодействий<sup>68-72</sup>. Согласно этой теории, первая пара оснований, образующаяся при взаимодействии олигомера с полимером (олигомером), значительно менее устойчива, чем последующие. Образование каждой следующей пары оснований связано со специфической константой устойчивости, величина которой в области перехода быстро приближается к пределу. Установлено, что в большинстве случаев различия в константах устойчивости всех пар оснований, исключая первую, несущественны и кооперативный переход может быть описан моделью с двумя параметрами.

В соответствии с этим, образование двойной олигомер-олигомерной спирали представляется следующей схемой:



А и В — взаимодействующие олигомеры (олигомер и полимер),  $N$  — длина цепи олигомера,  $D_i$  — частично спирализованная структура с  $i$ -парами оснований,  $\beta S$  — константа устойчивости первой пары оснований,  $S$  — константа устойчивости любой из последующих пар.

Статистический анализ этой схемы, учитывающей возможность существования частично связанных структур  $D_i$ , показал, что величина  $\beta$  чрезвычайно мала ( $\beta \ll 1$ ), а константа  $S$  очень велика ( $S \gg 1$ )<sup>68-70</sup>. Это позволяет в случае относительно коротких олигомеров пренебречь концентрациями частично связанных структур  $[D_i]$  и рассматривать комплексообразование в реальных системах в соответствии с моделью «все или ничего»:



Такое допущение, согласно Апплеквисту<sup>68</sup> и Дамлу<sup>65, 69</sup>, не вносит существенной ошибки в расчет термодинамических параметров и обеспечивает простую количественную связь термодинамических параметров с величиной температуры плавления, наклоном кривой плавления, а также с длиной олигонуклеотида и его концентрацией в растворе.

ТАБЛИЦА 1

Термодинамические параметры перехода «спираль—клубок» для ряда олигомер (мономер)-полимерных систем<sup>68</sup>

Комплекс	Условия комплексообразования	$\Delta H_1$ , ккал/моль	$\Delta S_1$ , кал/моль·град	$\beta$ , моль <sup>-1</sup>	Ссылки на литературу
Поли U—аденозин (1A·2U)	D <sub>2</sub> O; 0,15M NaCl, $pD=7,0$	-22,0	—	—	52
Поли U—2-NH <sub>2</sub> -аденозин (1A·2U)	То же	-22,2	—	—	52
Поли U—аденин (1A·2U)	»	-24,2	—	—	52
Поли U—2,6-диамино-пурин (1A·2U)	»	-22,9	—	—	52
Поли C—5'-GMP (1G·2C)	D <sub>2</sub> O; 0,2M NaCl, $pD=7,0$	-46,2	—	—	50
Поли U—олиго A (5'-фосфат)(1A·2U)	1M NaCl; 0,001M MgCl <sub>2</sub> , pH 7,4	$-14,4 \pm 3$	$-41,1 \pm 8$	$0,1 \cdot 10^{1 \pm 1}$	35
Поли U—олиго A (3'-фосфат)(1A·2U)	То же	$-15,2 \pm 2,5$	$-43,7 \pm 7$	$0,5 \cdot 10^{1 \pm 1}$	35
Поли U—олиго A (1A·2U)	0,1M NaCl; 0,01M MgCl <sub>2</sub> , pH 7,0	$-12,4 \pm 2,5$	$-38 \pm 7$	$5 \cdot 10^{1 \pm 1}$	73
Поли U—олиго A (2'—5')(1A·2U)	То же	$-11,6 \pm 3$	$-39 \pm 10$	$1 \cdot 10^{2 \pm 1}$	73
Поли C—олиго G (1G·4C)	0,2M NaCl, pH 6,2	$-7,0 \pm 3$	$-17,3 \pm 7$	$1 \cdot 10^{1 \pm 0,5}$	74
Поли C—олиго I (1C·4I)	0,01M MgCl <sub>2</sub> ; pH 7,0	$-6,2 \pm 0,3$	-17,4		75

Для упрощения расчетов предполагают, что  $\Delta H_1$  и  $\Delta S_1$  (изменения энталпии и энтропии, сопровождающие образование одного моля пар оснований), одинаковы для всех пар и  $\beta$  не зависит от температуры. В таком случае энталпия и энтропия перехода пропорциональны длине цепи олигомера:

$$\Delta H = N\Delta H_1, \quad \Delta S = N\Delta S_1$$

Дамл<sup>70</sup> рассчитал ряд термодинамических параметров для нескольких олигомер(мономер)-полимерных систем на основании экспериментальных данных, полученных другими исследователями. Результаты этих расчетов приведены в табл. 1.

Реальной системой, наиболее соответствующей модели «все или ничего», является мономер-полимерная система, термодинамические расчеты которой могут проводиться даже при агрегации мономеров в растворе<sup>71</sup>.

Более поздние исследования ряда олигомер-олигомерных комплексов показали, что в реальных системах  $\beta$  является функцией температуры, а энタルпия образования первой пары оснований существенно отлична от мольной энталпии образования последующих пар<sup>36, 71, 76-78</sup>. Таким образом, хотя упрощенная теория Апплеквиста и Дамла и позволяет в первом приближении оценить термодинамические характеристики комплексообразования в системе в целом, она не совсем верно отражает термодинамику отдельных стадий этого процесса.

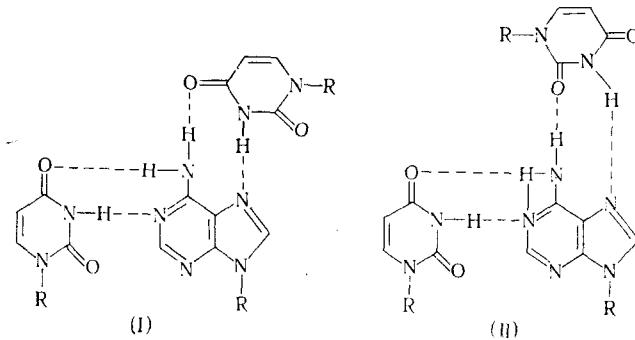
### III. КОМПЛЕКСЫ МОНОМЕРОВ С ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ

Комплексообразование мономеров с комплементарными полинуклеотидами со строгой структурной специфичностью было обнаружено лишь для одной комбинации компонентов: пуриновый мономер — пиримидиновый полимер<sup>39, 34, 41, 50, 53</sup>. Соответствующих комплексов с участием пиримидиновых мономеров в аналогичных условиях получить до сих пор не удалось<sup>50</sup>. Вероятно, это связано с тем, что меньший размер поверхности пиримидинового основания, в сравнении с пуриновым, приводит к меньшему их перекрыванию при образовании псевдополимерной структуры в комплексе и, следовательно, к меньшей стабилизации комплекса за счет стэкинг-взаимодействий ковалентно не связанных мономеров. Поэтому такие комплексы, если они вообще образуются, должны быть существенно менее устойчивы, чем комплексы пуриновых мономеров.

Характерной чертой мономер-полимерных комплексов является их резко выраженная зависимость от концентрации мономерного компонента. Концентрация полимера фактически не влияет на устойчивость комплексов, так 10-кратное увеличение количества поли U не сказалось на устойчивости системы поли U — 2-аминоаденин<sup>63</sup>.

*Стехиометрия мономер-полимерных комплексов.* Из мономер-полимерных систем наиболее широко изучены взаимодействия аденоцина или его производных с поли U<sub>2</sub><sup>34, 50, 78-80</sup>. Если олигомер-полимерные или полимер-полимерные системы приводят к образованию и двухтяжных, и трехтяжных спиральных структур<sup>28</sup>, то для мономер-полимерного взаимодействия предпочтительно образование трехцепочечных комплексов, состоящих из двух полинуклеотидных и одной псевдополимерной цепи, образованной мономерами. Стехиометрия этих комплексов (1Pu — 2Py) объясняется, по-видимому, термодинамикой комплексообразования. Образование упорядоченной вторичной структуры, как правило, связано с неблагоприятным для процесса уменьшением энтропии. В этом случае движущую силу процесса должна обеспечивать теплота реакции. Согласно данным Скруггса и Росса<sup>81</sup>, образование трехцепочечного комплекса с участием мономера сопровождается большим изменением энтропии ( $\sim -42$  кал/град·моль), по сравнению с энтропией образования трехтяжной полимер-полимерной спирали ( $\sim -32$  кал/град·моль). Очевидно, теплота реакции образования двухцепочечного комплекса оказывается недостаточной для компенсации столь высокого изменения энтропии и в случае мономер-полимерной системы необходимо присоединение еще

одной цепи, которое обеспечивает дополнительный выигрыш в энталпии. Различия в изменении энтропии, сопровождающие образование мономер-полимерного и полимер-полимерного комплексов, авторы приписывают большей степени разупорядоченности мономера в растворе по сравнению с жесткими молекулами полинуклеотидов. Фельзенфельд<sup>53</sup> предложил две возможные структуры для мономер-полимерных комплексов A·2U, различающиеся расположением цепей поли U: в первой структуре цепи поли U антипараллельны, во второй — параллельны (см. схему).



Требованиям стехиометрии отвечают обе структуры. Однако изучение ИК-спектров комплекса поли A·2 поли U показало, что цепи поли U связаны с адениновыми остатками через различные карбонильные кислороды<sup>37</sup>: одна из цепей образует пару водородных связей через  $C_4=O$  и  $N_3-H$ , а другая — через  $C_2=O$  и  $N_3-H$ . Этот факт говорит в пользу структуры (II), в которой вторая полинуклеотидная цепь связана с адениновыми основаниями в соответствии со схемой Хашемейера<sup>55</sup>.

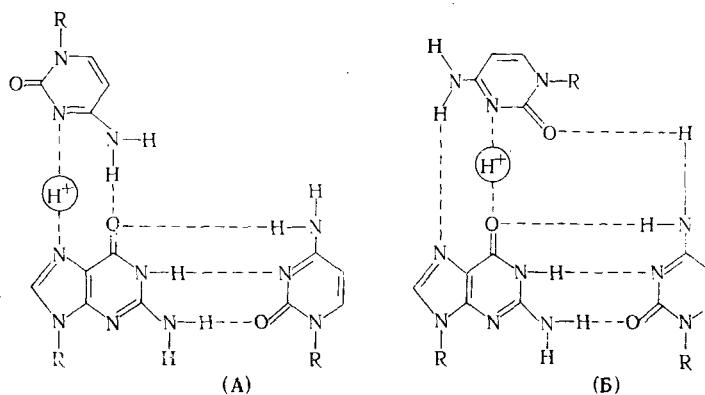
Вполне вероятной структурой мономер-полимерного комплекса может быть и структура с антипараллельным расположением цепей. В таком комплексе полинуклеотидные цепи могут принадлежать одной и той же молекуле поли U, сложенной вдвое, и связаны между собой посредством адениновых мономеров.

На основании результатов седиментационного анализа Хуанг и Тс'о<sup>34</sup> предположили образование двухцепочечного комплекса аденоцина с поли U при 20°. Однако этот вывод не подтвердился при изучении системы методами КД<sup>79</sup> и равновесного диялиза<sup>63</sup>. Дамл<sup>80</sup> считает трехцепочечные комплексы 1A·2 поли U единственной формой взаимодействия аденоцина с поли U независимо от концентрации компонентов и температуры. Следует отметить также, что ИК-спектры и полученные Ховардом и сотр.<sup>50</sup> кривые плавления говорят о полной диссоциации трехцепочечного комплекса A·U<sub>2</sub>=A+2U без промежуточного образования комплекса 1A·1U. Образование комплекса 1A·1U вместо 1A·2U должно регистрироваться изменением ИК-спектров — появлением интенсивной полосы поглощения при 1672  $cm^{-1}$ , тогда как для структуры 1A·2U характерна полоса при 1657  $cm^{-1}$ <sup>53</sup>.

Наличие заместителей в пуриновом основании в положениях, ответственных за связывание второй полинуклеотидной цепи, приводит к тому, что комплекс либо не образуется совсем (например, в случае тубрецидина), либо требуется очень высокая концентрация реагентов. Так, Хуангу и Тс'о<sup>34</sup> не удалось зарегистрировать образование комплекса N<sub>6</sub>-метиладеноцина с поли U. Ховард же, сильно увеличив концентрацию реагентов, обнаружил комплекс 9-метил-6-метиламинопурина с поли U со стехиометрией 1:1<sup>50</sup>.

Взаимодействие гуаниновых мономеров с поли С в значительной степени зависит от pH раствора. Так при pH 7,8, когда протонирование поли С невозможно, гуанозин-5'-фосфат образует с поли С комплекс 1G·1C<sup>52</sup>. В области pH ≤ 7 комплекс имеет структуру 1G·2C, хотя в этом случае образование трехцепочечной спирали требует наличия протонированной формы поли C<sup>+</sup> при довольно высоком значении pH. Однако потенциометрическое титрование показывает, что протонирование полицитидиловой кислоты облегчается в присутствии гуанозина, причем рК поли С сдвигается в нейтральную область<sup>39</sup>.

Из предложенных в настоящее время схем связывания 1G·2C<sup>74, 79</sup> большинство авторов отдает предпочтение структуре (A), см. схему.



Следует указать, что плавление трехцепочечных комплексов 1G·2C происходит различно в нейтральных и кислых растворах<sup>39</sup>. При pH 6,4 комплекс с повышением температуры разрушается до исходных компонентов, в то время как при pH 4,5 происходит «выплавление» гуаниновых мономеров и сохраняется двухцепочечная структура поли С и поли C<sup>+</sup>. Такая денатурация комплекса более вероятна для структуры (Б), в которой параллельные цепи поли С и поли C<sup>+</sup> связаны между собой. Очевидно, нельзя исключать возможность существования различных структур при различных значениях pH.

Исследование роли заместителей в гетероциклическом ядре пуринового компонента в большинстве случаев связано с попытками количественно оценить индивидуальный вклад водородных связей в стабилизацию комплекса. Однако, как правило, наряду с образованием новой водородной связи, меняются вклады в энергию взаимодействия и ряда других сил, участвующих в создании структуры. Поэтому иногда трудно указать главный источник стабилизации<sup>42, 50</sup>.

Обнаружено, что введение заместителей в положения 1,6 и 7 препятствует взаимодействию мономера с соответствующим полинуклеотидом<sup>34, 39, 82-84</sup>. Так, N<sub>1</sub>-метиладенозин, в котором введение метильной группы нарушает одновременно два ответственных за связывание участка, оказывается неспособным к взаимодействию с поли U<sup>42, 50</sup>. Сарочи и др.<sup>39</sup> отмечают также, что не наблюдается комплексообразования поли С при замене гуанозина на 7-метилгуанозин, 6-Cl-пуринрибозид, 6-тиогуанозин и 2,6-диаминопуринрибозид.

Ховард и др.<sup>50</sup> обнаружили, что комплексы 2-NH<sub>2</sub>-аденозина и 2-NH<sub>2</sub>-аденозин-5'-фосфата с поли U более устойчивы, чем соответствующие комплексы аденоцина и 5'-АМФ. Возможно, 2-NH<sub>2</sub>-группа принимает участие в образовании дополнительной водородной связи с одной из

цепей поли U, в результате чего получается система, подобная 1G·2C. Стехиометрия комплексов 2-NH<sub>2</sub>-аденозина с поли U 1A·2U<sup>63</sup>.

Заместители, не препятствующие образованию водородных связей, практически не оказывают влияния на способность мономера к комплексообразованию и на устойчивость комплекса. Например, комплексы поли U с различными 3- и 9-алкилзамещенными аденинами близки по устойчивости к комплексам с немодифицированным аденином<sup>34</sup>. Обнаружено комплексование поли U с 8-аза-2,6-диаминопурином вместо аденина<sup>50</sup>.

Сахарный остаток в молекуле мономера не принимает участия в создании сахарофосфатного остова, скрепляющего цепь, как это имеет место в полинуклеотидах. Поэтому замена пуринового основания соответствующим нуклеозидом, как правило, существенно не сказывается на устойчивости комплекса, хотя T<sub>c</sub><sup>o</sup> в ряде случаев отмечает некоторую стабилизирующую роль углеводного радикала. Природа сахарного остатка (рибоза или дезоксирибоза) и его конфигурация (D- или L-рибоза) на уровне мономер-полимерных взаимодействий, по-видимому, не имеет значения<sup>34</sup>.

Методом равновесного диализа в сочетании с УФ-спектроскопией было проведено сравнительное исследование ряда систем гомо- и сополимеров (поли AC, поли UC, поли UG) с мономерами<sup>63</sup>. Авторы установили, что сополимерные системы подчиняются тем же закономерностям, что и гомополимерные. Использование смеси мономеров позволило сравнить силу комплементарного взаимодействия отдельных мономеров. Например, при исследовании комплексования поли UC со смесью dG и dA или dG и 2-аминоаденозина обнаружено большее связывание во втором случае.

*Влияние концевой фосфатной группы.* Комплексы мононуклеотидов с полинуклеотидами являются наименее изученными среди мономер-полимерных систем, хотя и представляют большой интерес с биологической точки зрения.

Первая работа, в которой авторам удалось наблюдать и исследовать мононуклеотидные комплексы, принадлежит Ховарду и сотр.<sup>52</sup> В условиях высокой нуклеотидной концентрации (0,10—0,25 M) с помощью ИК-спектроскопии было установлено наличие двух- и трехцепочечных структур, образованных гуаниловыми мононуклеотидами (5'-GMP и 5'-dGMP) с полицитидовой кислотой. Отмечалось, что при pH 7,8 ИК-спектр комплексов аналогичен спектру комплекса GpGpGp·поли C, стехиометрия которого, по данным Липсетт<sup>74</sup>, 1G·1C. При pH $\leqslant$ 7 в спектре монополинуклеотидных комплексов появлялись новые полосы поглощения, свидетельствующие об образовании трехцепочечных спиралей, содержащих протонированную форму поли C<sup>+</sup>.

Известно, что гуаниловые мономеры склонны к самоагрегации и образованию гелей, иногда — осадков, начиная с 0,01 M концентрации нуклеотида даже в растворах с невысокой ионной силой<sup>39</sup>. Весьма вероятно, что при столь высокой нуклеотидной концентрации исследователи наблюдали взаимодействие поли C со сложными гелями гуаниловых кислот. В работе Сарочи, Куртуа и Гюшльбауэра<sup>39</sup> исследуются смеси гуаниловых кислот с поли C в слабокислых разбавленных (0,002 M суммарная концентрация нуклеотида) растворах. Отмеченное в этих условиях образование комплекса 1G·2C зависит от pH раствора: комплексообразование наблюдалось только при pH $\leqslant$ 6. По всей вероятности, этот верхний предел pH устойчивости комплексов обусловлен не только необходимостью протонирования поли C для образования трехцепочечного комплекса, но и важностью подавления диссоциации вторичных

ТАБЛИЦА 2

## Взаимодействие пуриновых оснований и нуклеозидов с полинуклеотидами

Мономер	Полинуклеотид	Концентрация, М		Условия комплексообразования	Стехиометрия комплекса	T, пл. комплекса, °C	Ссылки на литературу
		мономера	полимера				
Аденозин	Поли U	0,015	0,030	0,15M NaCl	1A·2U	18,5	50
То же	Поли U	0,030	0,015	0,6M NaCl, pH 6,9	1A·2U	—	42
»	То же	0,015	0,925·10 <sup>-2</sup>	0,1M NaCl	1A·2U (5°)	11	34
»	»	0,015	0,925·10 <sup>-2</sup>	0,4M NaCl	1A·1U (20°)	18	34
»	»	0,015	0,925·10 <sup>-2</sup>	0,02M MgCl <sub>2</sub>	—	31	34
»	»	0,5·10 <sup>-3</sup>	3,6·10 <sup>-3</sup>	1M NaCl+0,01M MgCl <sub>2</sub> +0,01M какодилат Na, pH 6,97	—	—	80
»	»	—12·10 <sup>-3</sup>	3,6·10 <sup>-3</sup>	0,1M NaCl+0,01M какодилат Na, pH 6,97	1A·2U	—	80
d-Аденозин	Поли U	0,015	0,030	0,15M NaCl	1A·2U	18,5	50
L-Аденозин	Поли U	0,015	0,925·10 <sup>-2</sup>	0,02M NaCl	1A·2U	—	34
2-NH <sub>2</sub> -аденозин	Поли U	0,015	0,030	0,15M NaCl pH 6,9	1A·2U	31	42
То же	То же	0,034	0,030	0,125M NaCl, pH 6,9	1A·2U	36	42
»	»	0,030	0,015	0,6M NaCl, pH 6,9	1A·2U	47,7	42
8-Аза-2,6-диаминопурин	Поли U	0,015	0,030	0,14M NaCl	1Pu·2U	—	50
Аденин	Поли U	0,067	0,100	0,15M NaCl	1A·2U	24	50
2,6-Диаминопурин	Поли U	0,045	0,090	0,15M NaCl	1A·2U	44	50
Гуанозин	Поли C	0,034	0,0688	0,125M какодилат Na, pH 6,9	1G·2C	36	50
То же	То же	1,38·10 <sup>-3</sup>	0,75·10 <sup>-3</sup>	0,2M какодилат Na, pH 6,7	1G·2C	—	39

фосфатных групп мононуклеотида. Особого внимания заслуживает различие в поведении комплексов 5'-GMP и 3'(2')-GMP с поли C: последний комплекс имеет более широкий интервал pH устойчивости. Известно, что гуаниловые кислоты с фосфатной группой в положениях 5'- или 3'(2') обладают различной склонностью к самоагрегации и образуют гели различной структуры<sup>85-87</sup>. Однако различия их комплексов с поли C пока не объяснены.

Особое место среди работ, посвященных взаимодействию моно-, ди- и трифосфатов нуклеозидов с полинуклеотидами, занимает работа Тс'о и Хуанга<sup>40</sup>. В растворах с антимолярной концентрацией компонентов в присутствии MgCl<sub>2</sub> авторы наблюдали, что комплексообразование пуриновых нуклеотидов с соответствующими полинуклеотидами сопровождается выпадением комплекса в осадок. Обнаружить комплексы в надосадочной фазе не удалось. На основании этих наблюдений авторы высказали предположение о том, что для комплексообразования в мононуклеотид-полинуклеотидных системах необходима дополнительная движущая сила, которой может быть фазовый переход. Комpleксы трифосфатов мономеров оказались значительно менее стабильны, чем комплексы монофосфатов. Исследования комплексообразования циклофосфатов<sup>88</sup> показали, что они дают более стабильные комплексы с полимерами, чем нуклеотиды. Это, вероятно, объясняется уменьшением

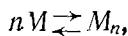
ТАБЛИЦА 3

## Взаимодействие нуклеозидфосфатов с полинуклеотидами

Монометр	Полинуклеотид	Концентрация, М		Условия комплексообразования	Стехиометрия комплекса	Т. пл. комплекса, °С	Ссылки на литературу
		мономера	полимера				
5'-AMP То же	Поли U То же	0,026 0,010	0,050 0,010	0,075M MgCl <sub>2</sub> , 0,03M MgCl <sub>2</sub> , pH 5,8	1A·2U 1A·2U комплекс в осадке	14	51
2-NH <sub>2</sub> -5'-AMP 5'-ATP 5'-dATP (или 5'-ATP)	»	0,030 0,020 0,020	0,060 0,010 0,010	0,18M NaCl 0,08M MgCl <sub>2</sub> 0,04M MgCl <sub>2</sub> , pH 7,0	1A·2U 1A·2U 1A·2U комплекс в осадке	11 11	40 50 51
5'-GMP То же »	Поли C То же »	0,054 0,115 0,010	0,109 0,115 0,010	pD 7,0 pD 7,8 0,04M MgCl <sub>2</sub> , pH 7,0	1G·2C 1G·1C 1G·1C комплекс в осадке	~23 ~15	40 52 52
»	»	0,16·10 <sup>-2</sup>	0,1·10 <sup>-2</sup>	1M NaCl, pH 5,3—5,6	1G·2C		40 39
2'(3')-GMP	»	0,2·10 <sup>-2</sup>	0,1·10 <sup>-2</sup>	1M NaCl, pH 3,0—6,0	1G·2C		39
5'-GTP	»	0,02	0,04	0,04M MgCl <sub>2</sub> , pD 6,1	1G·2C	25	51
То же	»	0,02	0,01	0,08M MgCl <sub>2</sub> , pH 7,0	1G·1C комплекс в осадке		40
»	»	0,02	0,04	0,08M MgCl <sub>2</sub> , pH 7,0	1G·2C комплекс в осадке		40

заряда фосфата, что особенно важно для мононуклеотидов. Условия комплексообразования и характеристики ряда мономер-полимерных комплексов приведены в табл. 2 и 3.

Анализ работ, связанных с изучением зависимости мономер-полимерных систем от концентрации мономера, позволяет сделать вывод, что для взаимодействия необходима определенная, минимальная концентрация мономера «нижний порог», величина которой зависит от его природы, pH раствора, ионной силы и присутствия ионов Mg<sup>2+</sup>. При дальнейшем увеличении концентрации мономера термическая устойчивость комплексов возрастает, однако, при достижении некоторой, характерной для данных условий, концентрации наступает насыщение, степень комплексообразования достигает постоянной величины и далее не изменяется. Графически процесс может быть изображен изотермой T<sub>c'</sub><sup>39</sup>. Согласно Хуангу и T<sub>c'</sub><sup>o</sup>, существование «нижнего порога», концентрации объясняется тем, что взаимодействию мономеров с полимерами предшествует процесс самоассоциации мономерных молекул в растворе:



M — молекула мономера, n — число мономерных единиц в агрегате (n = 1, 2, 3...).

Образующиеся агрегаты («пачки») взаимодействуют затем с полимером, приводя к соответствующим комплексам. Образование «пачек» ини-

цирует процесс комплексообразования и определяет минимальную величину концентрации мономера в растворе.

Существует и другая точка зрения. Фельзенфельф и Майлс<sup>53</sup> считают, что самоагрегацию мономеров следует рассматривать как процесс, конкурирующий со специфическим комплексообразованием. Взаимная ориентация пуринов в «пачках» и в упорядоченном комплексе, вероятно, различна, поскольку в первом случае она определяется в основном гидрофобными взаимодействиями ароматических ядер, а во втором — действием стереоспецифических сил. Поскольку в «пачках» не существует строгой взаимной ориентации мономеров (о чем свидетельствуют спектры ДОВ и КД мономерных растворов), взаимодействие «пачек» с полинуклеотидом должно осуществляться путем их разрушения и перестройки мономеров в соответствии со стереохимическими требованиями спирали.

В настоящее время нет достоверных сведений об участии мономер-полимерных комплексов в естественных биологических процессах. Однако, обнаруженное Максвеллом и др.<sup>2</sup> ингибирование пептидного синтеза направляемого полинуклеотидной матрицей в бесклеточной системе, в присутствии комплементарных мономеров говорит о том, что мономер-полимерные взаимодействия могут контролировать передачу генетической информации в клетке. Такой контроль может иметь место на различных уровнях передачи информации — как на стадии транскрипции, так и на стадии трансляции.

#### IV. КОМПЛЕКСЫ ОЛИГОМЕРОВ С ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ

Олигомер-полимерные комплексы характеризуются большей устойчивостью по сравнению с мономер-полимерными, что позволяет использовать их в качестве удобных моделей для изучения закономерностей комплексообразования. В комплексообразовании принимают участие олигомеры, содержащие не только пуриновые (как это имело место при мономер-полимерных взаимодействиях), но и пиримидиновые основания<sup>3, 34, 81, 89</sup>. По структуре и физическим свойствам олигомер-полимерные комплексы близки полимер-полимерным ассоциатам.

Стехиометрия A—U(T)-комплексов не определяется однозначно соотношением компонентов в растворе, а зависит от ряда факторов, одним из которых является природа олигонуклеотида. Так, по данным Кассани и Боллама<sup>28</sup>, при средней ионной силе раствора даже в присутствии  $Mg^{2+}$  олигомеры тимидиловой кислоты образуют с поли dA комплекс 1T·1A, в то время как для системы коротких олиго dA — поли dT в этих условиях характерно образование структуры 1A·2T. Причиной различной стехиометрии является, видимо, то, что в тройной спирали 1Pu·2Py, образованной с участием олиго dA, разрывы имеются лишь в одной — адениловой — цепи. В трехцепочечном комплексе олиго dT-поли — dA из олигомеров состоят две цепи спирали. При прочих равных условиях устойчивость последнего комплекса должна быть значительно ниже устойчивости первого<sup>81</sup>.

Влияние природы сахарного остатка на структуру полинуклеотидных цепей и спиралей уже в течение нескольких лет обсуждается в литературе<sup>90—95</sup>. Обнаружены сильные различия в КД спектрах комплексов поли AAU·поли AUU и их дезоксирибозных аналогов, что может быть обусловлено различием их углеводных компонентов<sup>91</sup>.

На полимер-полимерных системах однозначно показано, что стабильность комплексов дезоксирибонуклеотидов и смешанных комплексов меньше, чем соответствующих рибополинуклеотидных систем<sup>90</sup>. Та же

закономерность наблюдается и в олигомер-полимерных комплексах, причем особенно важную роль играет природа сахарного остатка полинуклеотидного компонента. Характерная для комплекса  $d(pT)_{10}$ ·поли dA двухцепочечная структура уступает место трехцепочечной при замене поли dA на поли A (рис. 3)<sup>28</sup>.

Возможно, роль 2'-ОН группы в стабилизации трехцепочечной спиралей связана с образованием дополнительных водородных связей, в которых гидроксильная группа может принимать участие в качестве акцептора<sup>92</sup> или донора<sup>93</sup> протона. Тс'о и др.<sup>94</sup> предполагают образование внутримолекулярных водородных связей между 2'-ОН и N<sub>3</sub>-пурина,

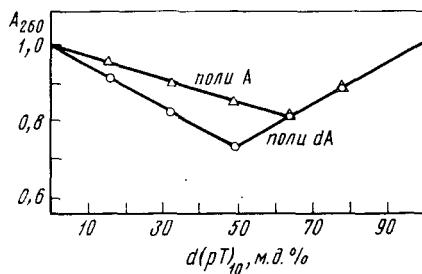


Рис. 3. Кривые смешения комплексов,  $d(pT)_{10}$  с поли A и  $d(pT)_{10}$  с поли dA (1 M NaCl, pH 6,8, 23°)<sup>28</sup>

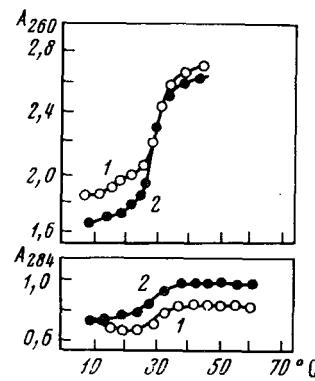


Рис. 4. Плавление структур, образуемых  $d(pA)_8$  с поли dT при различном соотношении компонентов в растворе  
1 — 1A-1T; 2 — 1A-2T (0,15 M NaCl, pH 7,0)<sup>28</sup>

$\text{O}_2$ -пиrimидина или фосфатной группой. Однако остается непонятным, каким образом это может способствовать введению в комплекс второй полинуклеотидной цепи.

Рядом других исследователей<sup>90, 92</sup> высказывается предположение, что влияние 2'-ОН группы на структуру и стабилизацию спиралей вызвано изменением конформации сахарного кольца и взаимодействием рибозного 2'-гидроксила с молекулами растворителя. Достаточно убедительных доводов в пользу той или иной точки зрения в настоящее время нет.

Вариация длины цепи олигонуклеотида в системе  $d(pA)_m$ -поли dT показала, что существует некоторое критическое значение  $m$  (характерное для данной ионной силы раствора), начиная с которого взаимодействие эквимолярной смеси олигомера с полимером приводит к образованию двухцепочечного комплекса<sup>28</sup>. Для всех олиго dA, длина которых меньше этого значения, свойственно образование трехцепочечной спирали, независимо от соотношения компонентов в растворе. Как отмечают авторы, вблизи критической величины  $m$  в эквимолярной смеси компонентов устанавливается равновесие двух- и трехцепочечных комплексов: кривая плавления бифазна, причем первая ступень плавления при 260 нм и уменьшение оптической плотности при 284 нм принадлежат комплексу 1A·1T, а вторая ступень плавления при 260 нм свидетельствует о разрушении комплекса 1A·2T (рис. 4). Наблюдаемое в системе равновесие, по-видимому, является истинным: соотношение двух- и трех-

ТАБЛИЦА 4

## Влияние различных факторов на стехиометрию A-U (T)-комплексов

Система	Соотношение компонентов в растворе	Условия комплексообразования	Стехиометрия компл.	Ссылки на литературу
$(pA)_m$ —поли U $m \geq 3$	1A-2U	1M NaCl, 0,001M $MgCl_2$ , 0,002M фосф. буфер, pH 7,4	1A-2U	35
	1A-1U	То же	1A-2U	35
	1A-2U	0,001M $MgCl_2$ , фосф. буфер, pH 7,2	1A-2U	35
	1A-2U	0,1M NaCl, 0,01M $MgCl_2$ , 0,05M какодилатный буфер, pH 7,0	1A-2U	99
	1A-1U	0,1M NaCl, 0,002M фосф. буфер, pH 7,4	1A-2U	35
$A(pA)_m$ —поли U $m \geq 2$	1A-2U	0,5M NaCl, 0,04M фосф. буфер, pH 7,3	1A-2U	81
	1A-1U	0,1M NaCl, 0,002M фосф. буфер, pH 7,4	1A-1U	35
	1A-1U	0,001M $MgCl_2$ , 1M NaCl, 0,002M фосф. буфер, pH 7,4	1A-2U	35
$d(pA)_m$ —поли dT $m \leq 12$	1A-2T	0,04M фосф. буфер, pH 7,0	1A-2T	28
	1A-1T	То же	1A-2T	28
	1A-1T	»	1A-1T	28
$m > 12$	1A-1T	0,008M $MgCl_2$ , 0,04M фосф. буфер, pH 7,0	1A-2T	28
	1A-1T	0,15M NaCl, 0,015M цитратный буф., pH 7,0	1A-2T	28
$m = 4-25$	1A-1T	То же	1A-1T	28
	1A-1T	0,04M фосф. буфер, pH 7,0	1A-1T	28
$d(pT)_m$ —поли dA	1A-2T	0,008M $MgCl_2$ , 0,04M фосф. буфер, pH 7,0	1A-1T	28
	1A-2T	1,0M LiCl, 0,01M какодил. буфер, pH 6,8	1A-2T	28
$d(pT)_m$ —поли A	1A-2T	0,008M $MgCl_2$ , 0,04M фосф. буфер, pH 7,0	1A-1T	28
	1A-2T	1,0M LiCl, 0,01M какодил. буфер, pH 6,8	1A-2T	28

тяжных комплексов не изменялось даже при инкубации раствора ( $5^\circ$ ) в течение трех месяцев.

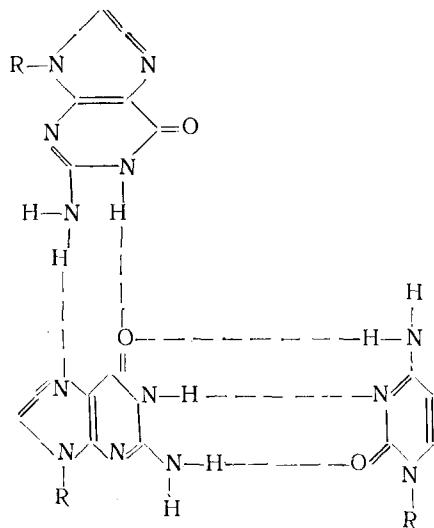
Повышение ионной силы раствора, как и при взаимодействии полинуклеотидов<sup>96-97</sup> способствует образованию трехтяжных олигомер-полимерных спиралей. Так, Рич<sup>89</sup> при увеличении концентрации  $LiCl$  в растворе наблюдал изменение стехиометрии двусpirального комплекса олиго dT-поли A и образование трехцепочечной структуры. Еще более эффективную роль в стабилизации трехцепочечных комплексов играют ионы некоторых двухвалентных металлов. Например, для получения комплекса 1A-2U в системе  $(pA)_4$ —поли U 1M раствор NaCl можно заменить  $10^{-3}$  M раствором хлористого магния<sup>35</sup>. Основная роль вводимых в раствор солей заключается в экранировании заряженных фосфатных групп олиго- и полинуклеотидов. Большая эффективность двухвалентных катионов по сравнению с одновалентными, по мнению Михельсона<sup>9</sup>, является следствием различия в константах диссоциации соответствующих металлофосфатных солей. Не исключено, что поливалентные катионы способны связывать одновременно фосфатные группы различных цепей, что также должно способствовать образованию трехцепочечных комплексов.

Влияние ионной силы раствора и ионов двухвалентных металлов на взаимодействие полианионов, какими являются олиго- и полинуклеотиды, очень велико. Часто этот факт играет решающую роль в образовании комплекса данной стехиометрии. Так, при взаимодействии олиго A с поли U в присутствии  $Mg^{2+}$  образуется трехтяжный комплекс 1A-2U независимо от соотношения компонентов в растворе<sup>98</sup>.

Некоторые сведения относительно стехиометрии олигомер-полимерных комплексов, образованных с участием олигонуклеотидов адениловой, дезоксиадениловой и тимидиловой кислот, приведены в табл. 4.

**Стехиометрия G—C-комплексов.** Изучение комплексообразования с участием G—C-пар чрезвычайно затруднено склонностью гуаниловых производных к самоассоциации. Многочисленные работы<sup>99–102</sup> свидетельствуют о том, что полигуаниловая кислота в благоприятных для комплексообразования условиях (низкая температура, высокая ионная сила) существует в виде устойчивых агрегатов. В связи с этим до сих пор не удалось получить комплексы полиг с цитидиловыми олигонуклеотидами. При уменьшении степени полимерности склонность к самоагрегации заметно падает (хотя и не исчезает), что дает возможность наблюдать G—C-взаимодействие в системах олиго G·поли C.

Первые сведения о стехиометрии таких комплексов получила Липсцетт<sup>60, 74</sup>, которая исследовала комплексообразование коротких олигомеров гуаниловой кислоты (GpG, GpGp и GpGpGp) с поли C. На основании кривых смешения автор делает вывод о способности этих олигонуклеотидов образовывать в нейтральной среде в зависимости от температуры и времени инкубации два типа комплексов: 1G·1C (см. стр. 105) и 2G·1C, в котором гуаниновые основания связаны между собой:



Подтверждением последней структуры автор считает бифазный характер плавления комплекса (рис. 5).

Однако вид кривых смешения, не имеющих четко выраженного экстремума свидетельствует о том, что комплексообразование в системе осложнено другими побочными процессами, возможно, самоагрегацией GpGpGp. Что касается профиля плавления (рис. 5), то не исключено, что первая ступень относится к плавлению самоагрегата GpGpGp, тогда как вторая отражает разрушение двутяжного комплекса 1G·1C.

В области  $pH < 6$  кривая смешения олиго G·поли C дает четкий минимум при мольной доле C=0,66, что говорит о наличии трехцепочечного комплекса 1G·2C<sup>74</sup>. Образование структуры такого типа обсуждалось ранее при рассмотрении комплексов мономеров G с поли C и связано с протонированием полицитидиловой кислоты. Возможные схемы связывания оснований в структуре 1G·2C приведены на стр. 114.

Таким образом, на основании приведенных данных относительно стехиометрии олигомер-полимерных комплексов можно сделать следующие заключения. Комплементарные олиго- и полинуклеотиды с монотонной последовательностью способны образовывать в водных растворах двух-

и трехцепочные спирали. Устойчивость комплексов неодинакова и во многом определяется структурой олигомера (природой гетероциклических оснований, длиной цепи и др.). Однако при соответствующем подборе условий (соотношение компонентов, pH, ионная сила раствора) можно получать комплексы нужной стехиометрии. При этом следует помнить, что образованию трехцепочных структур способствует пуриновая природа олигомера, наличие рибозных остатков в полинуклеотидной цепи,

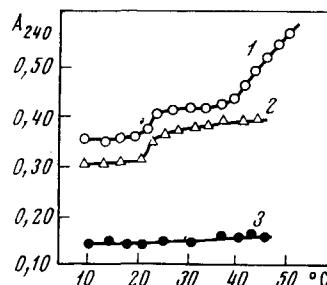


Рис. 5. Кривые плавления 1 — комплекса GpGpGp · поли C (2G · 1C), 2 — самоассоциата GpGpGp и 3 — поли C (0,2 M NaCl, pH 6,2)<sup>74</sup>

высокая ионная сила раствора, а также присутствие ионов  $Mg^{2+}$ . Образование двухцепочных комплексов, как правило, наблюдается при низкой концентрации солей в отсутствие ионов двухвалентных металлов. В случае G—C-взаимодействия важную роль в стехиометрии образующегося комплекса играет pH раствора.

*Устойчивость олиго-полинуклеотидных комплексов. Термодинамические параметры систем.* Известно, что трехцепочные полинуклеотидные комплексы, в зависимости от ионной силы раствора, могут иметь моно- или бифазный характер плавления<sup>90</sup>. Влияние концентрации солей на характер кривых плавления олигомер-полимерных комплексов специально не исследовалось. Однако для большинства изученных олиго-полинуклеотидных систем профили термического плавления однофазны, независимо от ионной силы<sup>35, 81, 98</sup>. Это означает, что трехцепочные комплексы олигомеров с полимерами, как и двухцепочные, диссоциируют непосредственно до исходных компонентов без прохождения через двухтяжный интермедиат.

Наличие пар G—C-стабилизирует нативные спирали ДНК<sup>103</sup>. Это характерно также и для олигомер-полимерных систем и отражается в возрастании температур плавления комплексов, содержащих G—C-пары (триплеты). Так, температура плавления комплекса GpG с поли C равна 26°, тогда как температура плавления комплекса ApA с поли U в аналогичных условиях составляет всего 6°<sup>35, 60</sup>.

Термическая устойчивость комплексов зависит от того, какой олигомер — пуриновый или пиримидиновый — принимает участие в комплексообразовании. Обнаружено, что комплексы олиго Ру — поли Ру более устойчивы, чем олиго Ру — поли Ри. Например, т. пл. комплекса (РА)<sub>8</sub> · поли U равна 52,8°, а комплекса (РU)<sub>8</sub> · поли A — 20°<sup>104</sup>. Причина различия в термической устойчивости таких структур, вероятно, заключается в более сильных в случае пуриновых производных межплоскостных взаимодействиях, стабилизирующих олигомер-полимерные спирали.

В работе Липсетт<sup>35</sup> показано, что в оптимальных условиях комплексообразования процент гипохромии системы олиго A — поли U для всех олигомеров, начиная с тринуклеотида, соответствует 35%, т. е. гипохромному эффекту образования трехтяжной спирали поли A · 2 поли U. Следовательно, цепь, образованную адениловыми олигомерами в комплек-

лексе, можно рассматривать как сплошную, псевдополимерную цепь, в которой отдельные звенья (олигомеры) связаны между собой вертикальными взаимодействиями.

Иначе обстоит дело с пиримидиновыми олигонуклеотидами. Наблюдаемый при комплексообразовании олиго dT с поли А гипохромный эффект ниже гипохромного эффекта соответствующего полимер-полимерного комплекса. Рич и Тиноко<sup>105</sup> полагают, что взаимодействующие с полинуклеотидом олигомеры тимидиловой кислоты не связаны между собой и образуют независимые короткие спирали.

С помощью количественной теории гипохромного эффекта, разработанной Тиноко<sup>106</sup>, были рассчитаны величины гипохромного эффекта комплексов образованных олиго dT с поли А для олигомеров различной длины.

На рис. 6 сплошными кривыми представлена расчетная величина относительного гипохромного эффекта как функция длины цепи олигомера, а точками — гипохромия, полученная на основании экспериментальных данных. Экспериментальная величина гипохромии для гептамера

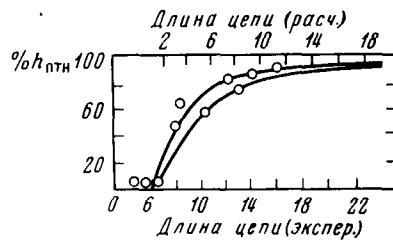


Рис. 6. Изменение гипохромного эффекта комплекса олиго dT-поли А в зависимости от длины цепи олигомера при  $\lambda=262,5$  нм ( $h\%$  отн — процентная гипохромия, рассчитанная по отношению к гипохромии комплекса поли А·поли U, рН 6,9)<sup>105</sup>

соответствует теоретической величине, рассчитанной для димера. Эта разность не изменяется с увеличением длины цепи олигомера вплоть до икозануклеотида и заставляет сделать вывод, что для любого олиго dT 4—6 оснований (вероятно, по 2—3 с каждого конца) не включены в стэкинг-взаимодействие, в результате чего, видимо, образуется структура менее совершенная и устойчивая, чем в случае комплекса олиго А·2 поли U.

С ростом длины цепи олигомера устойчивость олиго-полинуклеотидных комплексов возрастает<sup>60, 74, 88, 103</sup>. Теоретически<sup>28</sup> и экспериментально<sup>85</sup> установлена линейная зависимость т. пл. и  $\lg m$  (или  $1/m$ ), где  $m$  — длина цепи олигомера. Из характера зависимости очевидно, что т. пл. комплексов коротких олигомеров довольно сильно отличаются между собой, а для более длинных олигомеров различия в т. пл. их комплексов становятся незначительными. Обнаруженная зависимость согласуется со статистико-механической трактовкой кооперативных олигомер-полимерных взаимодействий, данной Мэйджи<sup>67</sup> и Дамлом<sup>70</sup>. Михельсон и Мони<sup>99, 104</sup> изучили зависимость термической устойчивости комплексов от длины цепи олигомера ( $m$ ) и установили, что для данной серии олигомеров графики зависимости  $1/t$  пл. от  $\lg m$  параллельны, т. е. их наклон не зависит от природы полинуклеотида, с которым они образуют комплекс. Наклон прямой определяется структурой олигомера (природой гетероциклических оснований, наличием концевых фосфатных групп, типом межнуклеотидной связи и пр.). На прямой зависимости  $1/t$  пл. —  $\lg m$  возможен перелом, что свидетельствует об изменении стехиометрии взаимодействия. Действительно, поскольку двух- и трехцепочечные комплексы имеют разную термическую устойчивость, наклон графика для этих комплексов должен быть различен.

Удобной системой для изучения олигомер-полимерных взаимодействий является система олиго I-поли C<sup>107</sup>. Стехиометрия таких комплексов всегда 11·1C, оптические свойства сходны с поли I·поли C системами<sup>8, 59</sup>. Однако стабильность олиго I·поли C комплексов значительно ниже, чем олиго A·2 поли U. Так, если получение комплекса ApA·2 поли U не представляется сложным, то комплекс IрI·поли C зарегистрировать не удалось, и минимальная длина инозиновых олигомеров комплексующихся с поли C в зависимости от условий составляла 5—6 мономерных единиц<sup>104</sup>.

ТАБЛИЦА 5

Влияние концевых фосфатных групп на температуру плавления комплексов олиго A·2 поли U ( $0,18 \cdot 10^{-3} M$  нуклеотидная концентрация,  $1 M$  NaCl,  $10^{-3} M$  MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4)<sup>35</sup>

Положение концевого фосфата	Длина цепи олигомера			
	2	2	4	5
5'-фосфомоноэфирная группа	7	17	29,5	37
3'-фосфомоноэфирная группа	5	23	33,2	40,5
Без фосфомоноэфирной группы	6,2	17,4	31,3	

Установлена зависимость устойчивости олигомер-полимерных комплексов от концентрации олигомера, убывающая с ростом длины олигомерной цепи. Так, т. пл. комплекса A(pA)<sub>6</sub>·2 поли U понижается на 13° при 1000-кратном разбавлении раствора, а т. пл. комплекса A(pA)<sub>4</sub>·2 поли U, содержащего более короткий олигоаденилат, уменьшается на 14° при 100-кратном разбавлении<sup>29</sup>. Блейк<sup>33</sup> подтвердил ту же закономерность, изучая прочность комплексов (Ap)<sub>4</sub>·2 поли U в зависимости от концентрации тетрамера. Кассани и Боллам<sup>28</sup> отметили заметное влияние концентрации олигомера на ширину термического перехода — ΔT. пл.

В ряде случаев обнаружено, что устойчивость олигомер-полимерных комплексов зависит от природы сахарного кольца. По-видимому, комплексы рибосерии более термостабильны в сравнении с дезоксирибосерией, что в основном соответствует закономерности полимер-полимерного взаимодействия<sup>95, 108</sup>. В работах Кнорре и сотр.<sup>109</sup> показано, что при модификации сахара концевого нуклеозида в олигомерной компоненте сохраняется способность последнего к комплексованию. Так, 2', 3'-О-бензилиденовые производные олигоаденилатов дают комплексы, идентичные по свойствам комплексам немодифицированных олигомеров с выведением бензилиденовой группировки из спирали.

Сведения о влиянии концевой фосфатной группы на устойчивость комплекса довольно противоречивы. Уленбек и др.<sup>30</sup>, исследовавшие термическую устойчивость комплексов, образованных (Ap)<sub>m</sub> A и (Ap)<sub>m+1</sub> с поли U, отмечают дестабилизирующую роль 3'-фосфомоноэфирной группы. Так, введение в тетра- и пентамеры 3'-концевого фосфата на 8° понижает Т. пл. комплексов этих олигомеров с поли U, что объясняется, по мнению автора, возрастанием электростатического отталкивания между олигомерами и полимерными цепями, при наличии концевой фосфомоноэфирной группы. Для системы олиго G — поли C наблюдался сходный эффект, значительно убывающий с ростом длины цепи<sup>74</sup>.

Однако, по данным Липсетт<sup>35</sup>, дестабилизирующим действием обладает лишь 5'-концевая фосфатная группа, тогда как 3'-фосфомоноэфирная группа увеличивает термическую устойчивость комплекса (табл. 5). Автор не дает удовлетворительного объяснения этому факту. Можно

предполагать, что наличие фосфомоноэфирных групп, независимо от их положения в олигомерной цепи, должно дестабилизировать комплекс, при этом степень дестабилизации может быть различна для 3'- и 5'-фосфатов, поскольку известно различное влияние этих групп на вторичную структуру самих олигонуклеотидов<sup>110</sup>.

Методом УФ-спектроскопии исследовано комплексообразование полиU с амидами 5'-олигодезоксиаденилатов, отличающимися структурой амидного фрагмента и длиной олигонуклеотидной цепи<sup>111</sup>. Обнаружено, что амидный радикал не изменяет стехиометрию комплекса (1A·2U), но несколько снижает его т. пл. Дестабилизирующее влияние амидного радикала зависит от его структуры и уменьшается по мере роста олигомерной цепи.

Природа межнуклеотидных связей в молекуле олигомера оказывает определенное влияние на термическую устойчивость комплексов. Отмечено, что плавление комплексов изомерных олигонуклеотидов с 2'-5'-фосфодиэфирной связью в системах олигоA — полиU и олигоG — полиC имеет такую же ширину перехода, как и комплексы олигомеров с природной межнуклеотидной связью, но т. пл. этих комплексов несколько ниже<sup>35, 74</sup>.

Влияние дефектов в нуклеотидной последовательности комплементарного олигомера на устойчивость олиго-полинуклеотидных комплексов представляет большой интерес. Однозначно не установлено, встраиваются ли некомплементарные основания в спираль или образуют петли с нарушением стэкинга между соседними гетероциклическими основаниями. При исследовании полинуклеотидных комплексов было обнаружено, что пространственное расположение некомплементарных оснований в спирали зависит от их природы и количества<sup>30, 112-115</sup>.

При содержании некомплементарного основания выше некоторой критической величины, зависящей от вида системы, комплекс не образуется<sup>114, 115</sup>. Имеет значение не только частота и длина некомплементарных участков в цепи<sup>59</sup>, но и их положение в цепи, так как стерические требования для образования комплементарных пар на концах спирального участка менее строги, чем внутри него<sup>82</sup>.

Уленбек и др.<sup>30</sup> исследовали влияние концевых некомплементарных оснований в олигомере на комплексообразование в системах X(pA)<sub>m</sub> — полиU и (Ap)<sub>m</sub>X — полиU (X = C, U и G) и сделали выводы.

1. Присутствие некомплементарного основания на одном из концов олигонуклеотида снижает устойчивость комплекса.

2. Некомплементарное основание выводится из спирали, а полимер заполняется без пропусков, например, при взаимодействии полиU с олигомерами C(Ap)<sub>4</sub> и (Ap)<sub>4</sub>C минимум на кривой смешения должен наблюдаться при м. д. U = 0,667, если все основания олигомера взаимодействуют с урацильными остатками, а экспериментальная кривая имеет минимум при м. д. U = 0,612. Это значит, что остатки цитозина не занимают места на матрице.

3. Меньший дестабилизирующий эффект дает введение цитозинового остатка в середину олигомера. Причину этого авторы видят в большей степени сольватации некомплементарного цитозинового ядра, обладающего большим дипольным моментом по сравнению с ядрами гуанина и урацила.

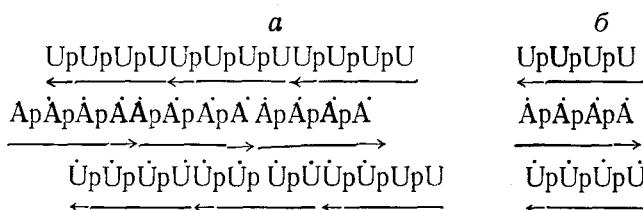
4. Некомплементарное основание, находящееся на 3'-конце олигомерной молекулы, сильнее дестабилизирует комплекс, чем наличие этого же основания на 5'-конце.

## V. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Изучение комплексов комплементарных олигонуклеотидов особенно важно, так как дает информацию об устойчивости коротких спиралей, являющихся, по-видимому, важными структурными элементами рибонуклеиновых кислот<sup>53</sup>. Однако гетерогенные олигомеры со сложной нуклеотидной последовательностью пока практически недоступны вследствие сложности их синтеза. Наиболее полно исследованы олигомерные комплексы, образованные олигонуклеотидами с монотонной последовательностью. В последние годы на таких системах изучалась кинетика процессов комплексообразования с использованием проточных и релаксационных (температурный скачок) методов<sup>36, 57, 116-118</sup>.

*Комплексы олигонуклеотидов с моногонной нуклеотидной последовательностью* не являются, по-видимому, истинно олигомерными. Это так называемые «конкатомеры», имеющие структуру, подобную структуре полимер-полимерных комплексов и отличающиеся от них лишь наличием разрывов в цепях спирали.

Например, трехцепочный комплекс 1A·2U, образованный тетрануклеотидами ArArArA и UpUpUpU, можно представить в виде следующей конкатомерной схемы (a):



Образование таких структур, а не димерных или тримерных комплексов подтверждает большой молекулярный вес комплексов, значительно превышающий утроенный молекулярный вес олигомера<sup>48, 81</sup>. Вероятно, образование конкатомерных структур, в тех случаях, когда оно возможно, термодинамически более выгодно, чем образование отдельных коротких спиралей типа б.

Стехиометрия конкаторных комплексов изучена недостаточно. При взаимодействии коротких олигомеров олиго А с олиго У методами КД, ИК- и УФ-спектроскопии<sup>53, 81</sup> показано, что стехиометрия этих комплексов 1А·2У, независимо от соотношения компонентов и ионной силы раствора. Поршке<sup>23</sup> определил критическую длину цепи олигомеров ( $n=7$ ), выше которой возможно образование двойных комплексов. Для олигомеров меньшей длины ( $n \leq 7$ ), по мнению автора, образуются и двойные, и тройные спирали.

На основании характера УФ-спектра комплекса олиго А·олиго dT Хоггет и Маас<sup>36</sup> предполагают стехиометрию 1A·1T. Комpleксы олиго G с олиго C до сих пор не исследовались.

Довольно подробно изучалась термическая устойчивость конкатомерных комплексов, образованных олигомерами адениловой кислоты с олиго  $U$  или олиго  $dT$ <sup>5, 36, 81</sup>. Устойчивость таких комплексов сильно зависит от длины олигомеров и их концентрации в растворе. Так комплекс  $A(pA)_3 \cdot 2U(pU)_3$  ( $0,12 M$  нуклеотидная концентрация;  $0,04 M$   $MgCl_2$ ,  $pH 7,0$ ) плавится при  $17^\circ$ , а  $A(pA)_5 \cdot 2U(pU)_5$  в тех же условиях имеет т. пл.  $27^\circ$ <sup>53</sup>. Чем меньше длина олигомеров, тем выше должна быть их концентрация для того, чтобы процесс комплексообразования стал заметен. Так, комплексообразование между  $A(pA)_7$  и  $d(pT)_8$  имеет место даже при  $8,5 \cdot 10^{-6} M$  нуклеотидной концентрации, тогда как тринуклео-

зиддифосфаты ApApA и UpUpU взаимодействуют лишь при концентрации  $0,12\text{ M}$ <sup>53</sup>.

В литературе долгое время обсуждался вопрос о минимальной, необходимой для комплексообразования, величине олигомеров<sup>5, 48, 103</sup>. Исследования Брамса<sup>119</sup> показали, что при суммарной нуклеотидной концентрации  $10^{-4}\text{ M}$  минимальными олигомерами являются гептамеры. Фельзенфельд<sup>53</sup>, увеличив нуклеотидную концентрацию в  $10^3$  раз, доказал существование комплексов три- и тетрамеров. Между комплементарными моно- и динуклеотидами взаимодействие в водных растворах до сих пор не обнаружено, однако в органических растворителях (хлороформ, диметилсульфоксид) оно, по-видимому, происходит<sup>120, 121</sup>.

Комплексообразование зависит от природы олигомеров. Так, образование комплекса в системе олиго dT — олиго dA при  $10^{-3}\text{ M}$  нуклеотидной концентрации фиксируется, начиная с пентамера тимидиловой кислоты и тетрамера адениловой кислоты<sup>5</sup>.

Моризо и др.<sup>122</sup> обнаружили зависимость комплексообразования от структуры сахара. Так, при сравнительном изучении методом КД смесей олигомеров dA<sub>n</sub>—dT<sub>n</sub> и rA<sub>r</sub>—rT<sub>n</sub> ( $n=3-8$ ) в  $4,7\text{ M}$  растворах KF при  $-20^\circ$  и нуклеотидной концентрации  $10^{-3}\text{ M}$  установлено, что дезоксирибоолигомеры начинают образовывать комплекс с тримеров, а их рибозные аналоги лишь с гексамеров.

Влияние ионной силы раствора на комплексообразование большинства олигомер-олигомерных систем, как правило, изучалось в условиях высокой ионной силы ( $0,5-1,0\text{ M}$  NaCl) и в присутствии  $\text{MgCl}_2$ <sup>5, 36, 48, 81</sup>. Отмечено, что при взаимодействии олиго dT с олиго A зависимость между т. пл. и  $\lg I$  ( $I$  — ионная сила раствора) несколько отклоняется от линейной<sup>36</sup>, что согласуется с поведением системы поли dT — поли A.

Образование конкатомеров<sup>108</sup>, вероятно, выгодно и в том случае, когда олигомеры имеют чередующуюся нуклеотидную последовательность. Например, олиго CA с олиго TC также образуют перекрывающиеся структуры<sup>123</sup>.

Однако, если олигомер имеет самокомплементарную чередующуюся последовательность, то межмолекулярного комплексообразования не наблюдается. Как показали исследования Шеффлера и др.<sup>124, 125</sup>, для олигонуклеотида d(TA)<sub>m</sub> более выгодной оказывается структура, образующаяся при складывании вдвое олигомерной цепи. При этом т. пл. комплекса также увеличивается с ростом длины цепи олигомера, но не зависит от его концентрации.

Комплексы олигонуклеотидов с немонотонной нуклеотидной последовательностью начали изучать лишь в последние годы, когда были достигнуты значительные успехи в химических методах синтеза олигомеров с заданной последовательностью<sup>126</sup>. Установлено, что взаимодействие немонотонных олигонуклеотидов, если оно не осложняется самоагрегацией, происходит путем связывания двух (или трех) молекул комплементарных олигомеров с образованием коротких олигомер-олигомерных спиралей<sup>48, 63, 127, 128</sup>. Общие закономерности здесь примерно те же, что и в случае образования конкатомерных структур.

Термическая устойчивость ряда комплексов, достаточно разнообразных по составу олигонуклеотидов, была изучена Кораной и сотр.<sup>127, 128</sup>. Авторы установили, что в присутствии  $\text{Mg}^{2+}$  возможно комплексообразование с участием относительно коротких олигонуклеотидных блоков. Так, при низкой температуре ( $0-5^\circ$ ) были получены комплексы тетрануклеотидов с дека- и икозануклеотидами<sup>123</sup>. Отмечалось, что увеличение содержания пар G—C стабилизирует олигомер-олигомерные спирали. Аналогичная закономерность найдена также в работе Мартина и др.<sup>129</sup>.

Попытка получить более короткие олигомер-олигомерные спирали закончилась неудачей. Джаскунас и др.<sup>47</sup>, исследовав методом ДОВ большое число систем, состоящих из комплементарных тринуклеозидифосфатов, обнаружили комплексы лишь для пары GpGpG—GpCpC (при  $10^{-2} M$  нуклеотидной концентрации, в присутствии  $10^{-3} M$   $MgCl_2$ , рН 7, 1°). Однако комплексообразование настолько осложняется самоагрегацией тримеров GpGpC, что судить о стехиометрии взаимодействия невозможно.

ТАБЛИЦА 6

Некоторые характеристики комплексов, образуемых олигонуклеотидами  $(Ap)_m U (pU)_{n-1}$  ( $10^{-4} M$  нуклеотидная концентрация,  $1 M$   $NaCl$ , рН 7,0)<sup>129</sup>

Олигонуклеотиды	$N=(m+n)$	$-\Delta H_1$ , ккал/моль	$-\Delta H_2$ , ккал/моль	Т. пл., °С
$(Ap)_3 U (pU)_2$	6	—	—	-13
$(Ap)_4 U (pU)_3$	8	51	6,4	12
$(Ap)_5 U (pU)_4$	10	72	7,2	23
$(Ap)_6 U (pU)_5$	12	85	7,1	32
$(Ap)_8 G (pU)_4 \cdot (Ap)_4 C (pU)_5$	14	107	7,6	40
	10	—	—	29*
				33**
$(Ap)_4 CpG (pU)_4$	10	76	—	42,6

\* Т. пл. комплекса рассчитана при  $0,5 \cdot 10^{-4} M$  нуклеотидной концентрации.

\*\* То же при  $2 \cdot 10^{-4} M$ .

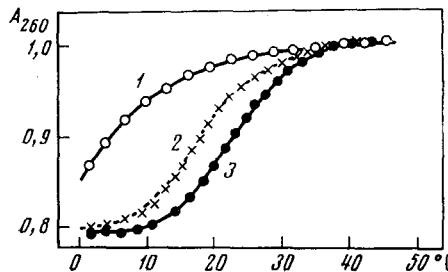
Если длина олигомеров равна 8—10 нуклеотидам, то можно получить достаточно устойчивые комплексы и в случае олигомеров, не содержащих гуаниловую и цитидиловую кислоты<sup>116</sup>. Мартин, Уленбек и Доти<sup>129</sup> изучали способность к комплексообразованию самокомплементарных олигонуклеотидов  $(Ap)_m U (pU)_{n-1}$ , в которых  $m$  и  $n$  варьировались от 3 до 7. Сильная концентрационная зависимость комплексования таких олигомеров говорит об образовании межмолекулярных комплексов и исключает внутримолекулярные взаимодействия. Установлено, что структура образующегося комплекса определяется отношением A/U в олигомерной цепи. При  $m \geq n$  образуется двухцепочечная спираль, если же  $m < n$ , то данные седиментационного анализа и характер УФ-спектров указывают на образование более крупных агрегатов, содержащих, по-видимому, трехцепочные участки. При одинаковой длине блоков A и U в олигомере ( $m=n$ ) т. пл. комплекса заметно возрастает с длиной цепи  $N=m+n$  (табл. 6).

Приведенные в табл. 6 значения энталпии  $\Delta H_1$  относятся к образованию одного моля пар A—U и рассчитаны из наклона графика концентрационной зависимости т. пл. комплекса. Абсолютная величина  $\Delta H_1$  увеличивается с ростом длины цепи. Это отклонение от идеальной модели Апплеквиста<sup>68</sup>, для которой  $\Delta H_1$  не зависит от длины олигомера, а суммарный тепловой эффект реакции определяется выражением  $\Delta H_N = N \cdot \Delta H_1$ , не удивительно, поскольку ясно, что вклад в стабилизацию спирали далеко не одинаков для всех пар. В работе Хогета и Мааса<sup>36</sup> показано, что при взаимодействии олиго Т с олиго А энталпия образования первой пары оснований  $\Delta H\beta S$  имеет положительное значение, хотя и невелико. Энталпии образования пар концевых оснований также могут существенно отличаться от энталпии образования пар оснований, находящихся внутри цепи олигомера.

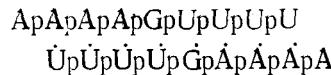
Устойчивость олигомер-олигомерных комплексов, имеющих одинаковую длину и нуклеотидный состав, но разную нуклеотидную последовательность, очевидно, не одинакова. Действительно, олигонуклеотиды  $(Ap)_6C$  и  $G(pU)_6$  образуют более устойчивый комплекс (т. пл.  $25^\circ$ ), чем  $C(pA)_6$  и  $(Up)_6G$  (т. пл.  $19^\circ$ )<sup>48</sup>, что может быть связано с различием в стэкинг-взаимодействии между основаниями в изомерных структурах<sup>130</sup>. Обнаружены различия и в устойчивости серий комплексов  $\bar{A}_nCG \cdot CGU_n$  ( $n=6,8$ ),  $A_nG_2 \cdot C_2U_n$  ( $n=4,5$ ),  $A_nG_3 \cdot C_3U_n$  ( $n=4,5$ ), отличающихся положением G—C-пар, что авторы приписывают различиям в изменениях энтропии<sup>131</sup>.

Введение в молекулу олигомера некомплементарного нуклеотида затрудняет образование комплекса и приводит к снижению его устойчивости. Так, была изучена способность к взаимодействию двух олигомеров  $(Ap)_mC(pU)_n$  и  $(Ap)_mG(pU)_n$ , но не в смеси, как в предыдущей работе, а в индивидуальных растворах<sup>132</sup>. Мономеры C и G нарушают самоком-

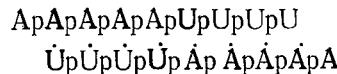
Рис. 7. Кривые плавления межмолекулярных комплексов олигомеров  
1 —  $(Ap)_5C(pU)_5$ , 2 —  $(Ap)_5G(pU)_5$ ,  
3 —  $(Ap)_4ApU(pU)_4$  ( $2,5 \cdot 10^5$ ,  
М нуклеотидная концентрация, 1 М  
NaCl)<sup>132</sup>



плементарность этих олигомеров, причем вызываемая ими дестабилизация комплексов не одинакова. Олигомер, содержащий цитидиловую кислоту, образует менее устойчивый межмолекулярный комплекс, чем олигомер с гуаниловой кислотой (см. рис. 7). Для сравнения на этом же рисунке приведен профиль плавления комплекса, образуемого  $(Ap)_5U(pU)_4$  в аналогичных условиях. Анализ температур плавления этих комплексов при различных значениях  $m$  и  $n$  показал, что введение остатка цитозина в молекулу олигомера приводит к такому же снижению устойчивости, как удаление двух пар A—U. Вероятно, цитидиловый нуклеотид образует в структуре петлю и выводит из спирали, как минимум, пару соседствующих с ним в цепи нуклеотидов. Большую устойчивость комплекса, образуемого олигомером  $(Ap)_mG(pU)_n$ , по сравнению с комплексом олигомера  $(Ap)_mC(pU)_n$  можно объяснить, если допустить, что гуаниловый остаток не выдается из спирали, как остаток C, а встроен в нее, образуя пару G—U. При этом должно происходить смещение олигомерных молекул относительно друг друга:

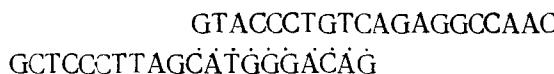


Такая структура подтверждается тем, что ее устойчивость близка устойчивости комплекса



Если же между гомогенными блоками встраивать в олигомер 4—6 цитидиловых остатков, то происходит складывание молекулы пополам с образованием однотяжной цитидиловой петли и образуется структура,

имитирующая фрагменты тРНК<sup>123</sup>. Были также изучены комплексы олигомеров, в которых спариваются не все основания, в частности комплексы, образованные дека- и нонануклеотидами или дека- и гентануклеотидами<sup>127</sup>. Отмечено, что термическая устойчивость этих комплексов уменьшается с увеличением некомплементарного плеча. Например, комплекс двух икозануклеотидов, образующих спираль из десяти нуклеотидных пар



вообще не имеет кооперативного профиля плавления<sup>128</sup>, тогда как комплекс дека- и нонануклеотида (GAACCGGAGA и TCTCCGGTT) плавится в довольно узком интервале температур (т. пл. 40°)<sup>227</sup>. Дестабилизация икозануклеотидного комплекса обусловлена отсутствием упорядоченной пространственной структуры в одноцепочечном участке спирали. Включение одноцепочечного участка в комплекс с другим олигомером приводит к резкому увеличению устойчивости структуры<sup>127, 128</sup>.

Анализ основных закономерностей, установленных при исследовании комплементационных свойств моно- и олигонуклеотидов, несомненно, поможет в общих чертах предсказать поведение еще не изученных систем, оценить возможности комплексообразования, стехиометрию взаимодействия и т. д. Однако эти закономерности, свойственные сравнительно несложным синтетическим системам, не могут быть механически перенесены на олигомер-олигомерные взаимодействия в нативных макромолекулах, обладающих сложной пространственной структурой. Более полезными моделями будут, вероятно, в этом случае комплексы синтетических олигонуклеотидов с нативными полимерными молекулами или их фрагментами, исследования которых начаты в последнее время<sup>134-139</sup>.

За последнее время появился ряд новых публикаций. Продолжается исследование мономер-полимерных<sup>140-143</sup> и олигомер-полимерных комплексов<sup>144-146</sup>. Интенсивно изучаются олигомер-олигомерные системы как с монотонной<sup>147</sup>, так и с немонотонной последовательностью оснований<sup>148-150</sup>.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. O. C. Uhlenbeck, J. Boller, P. Doty, *Nature*, 225, 508 (1970).
2. E. S. Maxwell, L. M. Baranett, F. B. Howard, H. T. Miles, *J. Mol. Biol.*, 16, 440 (1966).
3. F. J. Bollum, E. Groenüger, M. Yoneda, *Progr. Nat. Acad. Sci. USA*, 51, 853 (1964).
4. F. J. Bollum, *Science*, 144, 560 (1964).
5. R. Naylor, P. T. Gilham, *Biochemistry*, 5, 2722 (1966).
6. В. К. Небай, Н. И. Соколова, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, *ДАН*, 205, 1114 (1972).
7. А. Г. Бадакшева, Г. Н. Кабашева, Д. Г. Кнорре, Г. Г. Шамовский, Т. Н. Шубина, *Там же*, 206, 870 (1972).
8. A. M. Michelson, J. Massoulie, W. Guschlbauer, *Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, 6, 83 (1967).
9. А. Михельсон, Химия нуклеозидов и нуклеотидов, «Мир», М., 1966, гл. 8.
10. Сб. Органическая химия нуклеиновых кислот под ред. Н. К. Кочеткова и Э. И. Буровского, «Химия», М., 1970, гл. 4.
11. H. Voe, I. Tinoco, *J. Mol. Biol.*, 4, 500 (1962).
12. H. A. Nash, D. F. Bradley, *Biopolymers*, 3, 261 (1965).
13. H. A. Nash, D. F. Bradley, *J. Chem. Phys.*, 45, 1380 (1966).
14. D. M. Crothers, B. H. Zimm, *J. Mol. Biol.*, 9, 1 (1967).
15. А. А. Веденов, А. М. Дыхне, А. Д. Франк-Каменецкий, М. Д. Франк-Каменецкий, *Мол. биол.*, 1, 313 (1967).
16. М. Д. Франк-Каменецкий, А. Д. Франк-Каменецкий, *Там же*, 3, 375 (1969).
17. J. Brahms, J. C. Maurizot, A. M. Michelson, *J. Mol. Biol.*, 25, 465, 481 (1967).
18. R. C. Davis, I. Tinoco, *Biopolymers*, 6, 223 (1968).

19. P. O. P. Ts'o, N. S. Kondo, M. P. Schweizer, D. P. Hollis, *Biochemistry*, **8**, 997 (1969).
20. N. S. Kondo, H. M. Holmes, L. M. Stempel, P. O. P. Ts'o, *Там же*, **9**, 3479 (1970).
21. I. Tazawa, S. Tazawa, L. M. Stempel, P. O. P. Ts'o, *Там же*, **9**, 3499 (1970).
22. D. Poland, J. N. Vournakis, H. A. Scherada, *Biopolymers*, **4**, 223 (1966).
23. D. Pörschke, *Там же*, **10**, 1989 (1971).
24. A. Adler, L. Grossman, G. D. Fasman, *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.*, **57**, 423 (1967).
25. H. Simpkins, E. G. Richards, *J. Mol. Biol.*, **29**, 349 (1967).
26. J. D. Watson, H. C. Crick, *Nature*, **171**, 156, 740 (1953).
27. S. E. Bresler, V. M. Chernajenko, E. M. Saminski, *Biopolymers*, **11**, 1541 (1972).
28. G. R. Cassani, F. J. Bollum, *Biochemistry*, **8**, 3928 (1969).
29. P. M. Pitha, P. O. P. Ts'o, *Там же*, **8**, 5206 (1969).
30. O. Uhlenbeck, R. Harrison, P. Doty, в книге *Molecular Association in Biology*, ed. B. Pullmann, N.-Y., Acad. Press, 1968, стр. 107.
31. J. Massoulie, *Eur. J. Biochem.*, **3**, 428 (1968).
32. L. Kotin, *J. Mol. Biol.*, **7**, 309 (1963).
33. R. D. Blake, *Biopolymers*, **11**, 913 (1972).
34. W. M. Huang, P. O. P. Ts'o, *J. Mol. Biol.*, **16**, 523 (1966).
35. M. N. Lipsett, L. A. Heppel, D. F. Bradley, *J. Biol. Chem.*, **236**, 857 (1961).
36. J. G. Hoggett, G. Maass, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **75**, 45 (1971).
37. H. T. Miles, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51**, 1104 (1964).
38. P. O. P. Ts'o, в книге *Molecular Association in Biology*, ed. B. Pullmann, N.-Y., Acad. Press, 1968, стр. 55.
39. M. T. Sarocchi, Y. Courtot, W. Guschlauer, *Eur. J. Biochem.*, **14**, 411 (1970).
40. P. O. P. Ts'o, W. M. Huang, *Biochemistry*, **7**, 2954 (1968).
41. B. W. Bangerter, S. J. Chan, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **60**, 1144 (1968).
42. R. L. Scruggs, P. D. Ross, *J. Mol. Biol.*, **47**, 29 (1970).
43. F. Pochon, A. M. Michelson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**, 1425 (1965).
44. C. L. Stevens, G. Felsenfeld, *Biopolymers*, **2**, 293 (1964).
45. R. D. Blake, J. Massoulie, J. R. Fresco, *J. Mol. Biol.*, **30**, 291 (1967).
46. J. T. Yang, T. Samejima, *Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, **9**, 223 (1969).
47. S. R. Jaskunas, C. R. Cantor, J. Tinoco, *Biochemistry*, **7**, 3164 (1968).
48. R. B. Gennis, C. R. Cantor, *Там же*, **9**, 4714 (1970).
49. H. T. Miles, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51**, 1104 (1964).
50. F. B. Howard, J. Frazier, M. F. Singer, H. T. Miles, *J. Mol. Biol.*, **16**, 415 (1966).
51. H. T. Miles, F. B. Howard, J. Frazier, *Fed. Proc.*, **25**, 519 (1966).
52. F. B. Howard, J. Frazier, M. N. Lipsett, H. T. Miles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 93 (1964).
53. G. Felsenfeld, H. T. Miles, *Ann. Rev. Biochem.*, **36**, 407 (1967).
54. K. Hoogsteen, *Acta Cryst.*, **12**, 822 (1959); **16**, 907 (1963).
55. A. Haschemeyer, H. M. Sobel, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **50**, 872 (1963).
56. P. Job, *Ann. Chim.*, **9**, 113 (1928).
57. S. K. Pudder, *Eur. J. Biochem.*, **22**, 467 (1971).
58. W. Gillbert, *J. Phys. Chem.*, **63**, 1788 (1959).
59. A. C. Wang, N. R. Kallenbach, *J. Mol. Biol.*, **62**, 591, 608 (1971).
60. M. N. Lipsett, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **11**, 224 (1963).
61. G. Scatchard, *Ann. N.-Y. Acad.*, **51**, 660 (1949).
62. K. G. Wagner, *Eur. J. Biochem.*, **10**, 261 (1969).
63. R. J. Davies, N. Davidson, *Biopolymers*, **10**, 1455 (1971).
64. Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот, под ред. Ю. С. Лазуркина, «Наука», 1967, стр. 130.
65. B. H. Zimm, P. Doty, P. O. P. Ts'o, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **45**, 1601 (1959).
66. W. S. Magee, J. H. Gibbs, B. H. Zimm, *Biopolymers*, **1**, 133 (1963).
67. W. S. Magee, J. H. Gibbs, G. F. Newell, *J. Chem. Phys.*, **43**, 2115 (1965).
68. J. Applequist, V. N. Damle, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1450 (1965).
69. J. Applequist, V. N. Damle, *Там же*, **88**, 3895 (1966).
70. V. N. Damle, *Biopolymers*, **9**, 353 (1970).
71. V. N. Damle, *Там же*, **9**, 1437 (1970).
72. M. Eigen, D. Pörschke, *J. Mol. Biol.*, **53**, 123 (1970).
73. A. M. Witcheson, C. Monny, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **56**, 1528 (1966).
74. M. N. Lipsett, *J. Biol. Chem.*, **239**, 1256 (1964).
75. J. Tazawa, S. Tazawa, P. O. P. Ts'o, *J. Mol. Biol.*, **66**, 115 (1972).
76. M. E. Craig, *Fed. Proc.*, **28**, 531 (1969).
77. R. Römer, D. Riesner, G. Maas, W. Wintermeyer, R. Thiebl, H. G. Zachau, *FEBS Letters*, **5**, 15 (1969).
78. S. M. Coutts, *Biochim. Biophys. Acta*, **232**, 94 (1971).
79. C. R. Cantor, W. W. Chin, *Biopolymers*, **6**, 1745 (1968).
80. V. N. Damle, *Там же*, **11**, 1789 (1972).
81. P. D. Ross, R. L. Scruggs, *Там же*, **3**, 491 (1965).

82. *F. N. Hayes, E. Hansbury, W. E. Mitchell, T. G. Scallen*, J. Am. Chem. Soc., **93**, 4898 (1971).
83. *F. N. Hayes, E. Hansbury, V. E. Mitchell, R. L. Ratliff, D. L. Williams*, Eur. J. Biochem., **6**, 485 (1968).
84. *K. Ikeda, J. Frazier, T. Miles*, J. Mol. Biol., **54**, 59 (1970).
85. *M. Gellert, M. N. Lipsett, D. R. Davies*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **48**, 2013 (1968).
86. *D. R. Davies*, J. Chim. Phys., **65**, 57 (1968).
87. *D. R. Davies*, Ann. Rev. Biochem., **36**, 321 (1967).
88. *M. Renz, R. Lohrmann, L. E. Orgel*, Biochem. Biophys. Acta, **240**, 463 (1971).
89. *A. Rich*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **46**, 1044 (1960).
90. *B. Zmudzka, F. J. Bollum, D. Shugar*, J. Mol. Biol., **46**, 169 (1969).
91. *D. M. Gray, R. L. Ratliff, D. L. Williams*, Biopolymers, **12**, 1233 (1973).
92. *B. Zmudzka, D. Shugar*, FEBS Letters, **8**, 52 (1970).
93. *A. M. Bobst, F. Rottman, P. A. Cerutti*, J. Mol. Biol., **46**, 221 (1969).
94. *P. O. P. Ts'o, S. A. Rapaport, F. J. Bollum*, Biochemistry, **5**, 4153 (1966).
95. *E. Clerco, B. Zmudzka, D. Shugar*, FEBS Letters, **24**, 137 (1972).
96. *A. Rich, D. R. Davies*, J. Am. Chem. Soc., **78**, 3548 (1956).
97. *G. Felsenfeld*, Biochim. Biophys. Acta, **29**, 133 (1958).
98. *P. M. Pitha, P. O. P. Ts'o*, Biochemistry, **8**, 5206 (1969).
99. *A. M. Michelson*, см. <sup>90</sup>, стр. 93.
100. *R. K. Ralph, W. J. Connors, H. G. Khorana*, J. Am. Chem. Soc., **84**, 2265 (1962).
101. *J. Fresco, J. Massoulie*, J. Am. Chem. Soc., **85**, 1352 (1963).
102. *C. M. Radding, J. Josse, A. Kornberg*, J. Biol. Chem., **237**, 2869 (1962).
103. *J. Marmor, P. Doty*, J. Mol. Biol., **5**, 109 (1969).
104. *A. M. Michelson, C. Monny*, Biochem. Biophys. Acta, **149**, 107 (1967).
105. *A. Rich, J. Tinoco*, J. Am. Chem. Soc., **82**, 6409 (1960).
106. *A. Rich, J. Tinoco*, Там же, **82**, 1609 (1960).
107. *J. Tazawa, S. Tazawa, P. O. P. Ts'o*, J. Mol. Biol., **66**, 115 (1972).
108. *M. Riley, B. Malling, M. J. Chamberlin*, Там же, **20**, 359 (1966).
109. *Г. И. Баран, В. Г. Будкер, Н. И. Гринева, Д. Г. Кнорре, А. Я. Козоровицкий, Г. Г. Шамовский*, ДАН, **201**, 95 (1971).
110. *J. Brahm, J. C. Maurizot, J. Pillet*, Biochim. Biophys. Acta, **186**, 110 (1969).
111. *Л. Г. Гатинская, В. В. Смирнов, Н. И. Соколова, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев*, ДАН, **212**, 363 (1973).
112. *J. B. Fresco, B. M. Alberts*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **46**, 311 (1960).
113. *F. H. Crick, J. Mol. Biol.*, **19**, 548 (1966).
114. *R. F. Steiner*, Ann. N.-Y. Acad. Sci., **81**, 742 (1959).
115. *M. Tsuboi, K. Matsuo, M. Nakanishi*, Biopolymers, **6**, 123 (1968).
116. *M. E. Craig, D. M. Crothers, P. Doty*, J. Mol. Biol., **62**, 383 (1971).
117. *D. Pörschke, M. Eigen*, J. Mol. Biol., **62**, 361 (1971).
118. *D. Pörschke, O. C. Uhlenbeck, F. H. Martin*, Biopolymers, **12**, 1313 (1973).
119. *J. Brams, J. C. Maurizot, A. M. Michelson*, J. Mol. Biol., **25**, 465 (1967).
120. *L. Katz, S. Penman*, J. Mol. Biol., **15**, 220 (1966).
121. *R. A. Newmark, C. R. Cantor*, J. Am. Chem. Soc., **90**, 5010 (1968).
122. *J. C. Maurizot, J. Blicharski, J. Brahm*, Biopolymers, **10**, 1429 (1971).
123. *F. N. Hayes, F. H. Lilly, R. L. Ratliff, D. A. Smith, D. L. Williams*, Там же, **9**, 1105 (1970).
124. *J. E. Scheffler, E. L. Elson, R. L. Baldwin*, J. Mol. Biol., **48**, 145 (1970).
125. *E. L. Elson, J. E. Scheffler, R. L. Baldwin*, Там же, **54**, 401 (1970).
126. *H. G. Khorana*, Pure Appl. Chem., **17**, 349 (1968).
127. *N. K. Gupta, E. Ohtsuka, H. Weber, S. H. Chang, H. G. Khorana*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **60**, 285 (1968).
128. *N. K. Gupta, E. Ohtsuka, V. Sgaramella, H. Büshi, A. Kumar, H. Weber, H. G. Khorana*, Там же, **60**, 1341 (1968).
129. *F. H. Martin, O. C. Uhlenbeck, P. Doty*, J. Mol. Biol., **57**, 201 (1971).
130. *B. M. Bangerter, S. L. Chan*, J. Am. Chem. Soc., **91**, 3910 (1969).
131. *D. Pörschke, O. C. Uhlenbeck, F. H. Martin*, Biopolymers, **12**, 1313 (1973).
132. *O. C. Uhlenbeck, F. H. Martin, P. Doty*, J. Mol. Biol., **57**, 217 (1971).
133. *O. C. Uhlenbeck, P. N. Borer, B. Dengler, I. Tinoco*, Там же, **73**, 483 (1973).
134. *S. K. Vasilenko, V. N. Ankilova, F. F. Dimitrova, N. A. Serbo*, FEBS Letters, **27**, 215 (1972).
135. *O. Pongs*, Там же, **28**, 284 (1972).
136. *R. A. Schroer, K. Moldave*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **48**, 1572 (1972).
137. *P. R. Schimmel, O. C. Uhlenbeck, J. B. Lewis, L. A. Dickson, E. W. Eldred, A. A. Schreier*, Biochemistry, **11**, 642 (1972).
138. *G. Högenauer, F. Turnowsky, F. M. Unger*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **46**, 2100 (1972).
139. *O. Pongs, R. Bald, E. Reinwald*, Eur. J. Biochem., **32**, 117 (1973).
140. *G. W. Hoffman, D. Pörschke*, Biopolymers, **12**, 1611 (1973).

141. *G. W. Hoffman, D. Pörschke*, Там же, 12, 1625 (1973).
142. *R. J. H. Davies*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 52, 1115 (1973).
143. *J. G. Burr, T. L. McDowell, S. H. Christian*, Там же, 56, 21 (1974).
144. *M. W. Springgate, D. Poland*, Biopolymers, 12, 2241 (1973).
145. *B. M. Чернаенко, С. Е. Бреслер*, Мол. биол., 8, 585 (1974).
146. *G. De Boer, P. O. P. Ts'o*, Biochemistry, 13, 2638 (1974).
147. *D. W. Appleby, N. R. Kallenbach*, Biopolymers, 12, 2093 (1973).
148. *J. Gralla, D. M. Crothers*, J. Mol. Biol., 73, 497 (1973).
149. *J. Gralla, D. M. Crothers*, Там же, 78, 301 (1973).
150. *P. N. Borer, O. C. Uhlenbeck, B. Dengler, J. Tinoco*, J. Mol. Biol., 80, 759 (1973).

МГУ, им. М. В. Ломоносова, Межфакультетская лаборатория  
биоорганической химии