



УДК 577.113.4

© 1993 И. Н. Меренкова, Т. С. Орецкая,
Н. И. Соколова, Э. А. Шабарова

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ДВУСПИРАЛЬНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

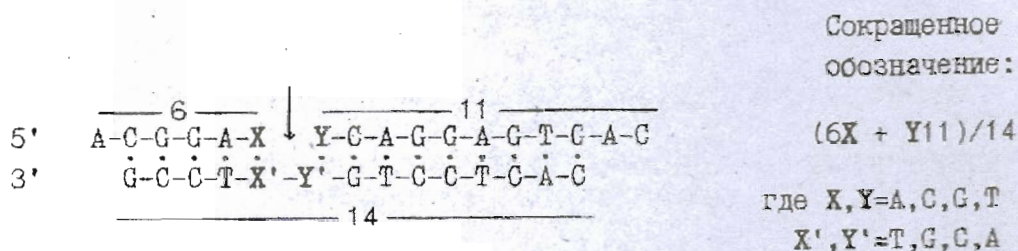
ХV. ВЛИЯНИЕ ЛОКАЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ ДНК НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ХИМИЧЕСКОГО ЛИГИРОВАНИЯ.

*Химический факультет и Институт физико-химической биологии
им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

На серии модельных ДНК-дуплексов с единичным разрывом в одной из цепей показана зависимость эффективности образования новой межнуклеотидной связи с помощью химического лигирования от локальной структуры ДНК в участке «сшивания», которая уменьшается в следующем ряду: пиримидин-пиримидин > пурин-пиримидин > пиримидин-пурин > пурин-пурин. Наиболее отчетливо эта закономерность выражена в дуплексах, где акцептором 3'-фосфата является 5'-гидроксильная группа. Показано, что для дуплексов, содержащих некомплементарные пары оснований в реакционном центре, выход продуктов лигирования также зависит от природы взаимодействующих нуклеотидов.

В процессе развития метода химического лигирования (ХЛ), который заключается в сборке двуспиральных ДНК из олигонуклеотидных блоков под действием химических реагентов [1, 2], была обнаружена зависимость эффективности реакции ХЛ от природы нуклеотидов, между которыми образуется новая межнуклеотидная связь [2, 3]. Нами было проведено исследование этой зависимости в трехкомпонентных системах, которые различались нуклеотидной последовательностью, фланкирующей участок лигирования, и длиной матрицы [3]. Оказалось, что в ряде случаев изменение длины матрицы существенно влияет на выходы целевых олигомеров. Вполне естественно, что это исследование поставило перед нами ряд вопросов, касающихся химических реакций в олигонуклеотидных комплексах. Для дальнейшего практического использования метода ХЛ при сборке генов и других протяженных ДНК-дуплексов необходимо было прежде всего на простой модельной системе выявить наиболее «удачные» нуклеотидные пары, обеспечивающие высокий выход целевого продукта. Определение таких нуклеотидных пар позволит предложить практические рекомендации по рациональному планированию разбивки протяженной последовательности ДНК на синтетические фрагменты для повышения эффективности ХЛ.

Корректное и систематическое изучение зависимости эффективности ХЛ от структуры «узла сшивания» было проведено в достаточно простой модельной системе, позволяющей детально исследовать единственный акт «сшивания» двух олигомеров на комплементарной матрице. Эта система представляла собой серию ДНК-дуплексов с единичным разрывом в одной из цепей. В состав дуплексов входили гекса- и ундекануклеотиды, различающиеся только структурой примыкающих к разрыву 3'- или 5'-концевых звеньев соответственно, и комплементарные им тетрадекануклеотиды-матрицы, изображенные на схеме:



В месте одноцепочечного разрыва варьировали: 1) нуклеотиды при неизменном положении фосфатной группы; 2) положение фосфатной группы — 3'- или 5'-концевая; 3) нуклеотиды при образовании пиродифосфатной связи (в результате реакции 5'- и 3'-концевых фосфатных групп).

В качестве конденсирующего агента использовался BrCN, так как именно он представляется наиболее перспективным для сборки протяженных ДНК [3].

Для получения достоверных результатов ХЛ в вышеприведенных системах проводилось по 6—8 раз, разброс значений выходов составлял не более 5%. В случае дуплексов, где гексануклеотид содержит 3'-концевую фосфатную группу, несколько серий опытов было проведено, когда метка включалась на 3'-конец ундекануклеотида.

Из рис. 1 видно, что эффективность ХЛ максимальна, когда новая фосфодиэфирная связь образуется между пиримидин-пиримидиновыми нуклеотидами, немного ниже — между пурин-пиримидиновыми нуклеотидными остатками. В то же время выход продукта ХЛ падает при взаимодействии пиримидин-пуриновых или пурин-пуриновых звеньев. Существующие к настоящему времени литературные данные позволяют объяснить обнаруженные закономерности.

Ранее было показано [4], что гликозидный угол χ для 5'-нуклеотида меньше, а его флуктуация и флуктуация угла псевдовращения фуранозного кольца больше по сравнению с 3'-нуклеотидом. Таким образом, 5'-концевой нуклеотид менее напряжен, и его конформация ближе к равновесной конформации мононуклеотида; концевая фосфатная группа при С5'-атоме углерода обладает большей свободой вращения, чем при С3'-атоме, где ее перемещение в пространстве более ограничено. В связи с этим можно было ожидать, что наиболее четко корреляция между эффективностью ХЛ и вариациями локальных структурных параметров двойной спирали, если она существует, должна проявляться на системах (6Xr + Y11)/14, в которых гексануклеотид несет концевую 3'-фосфатную группу. Сравнение результатов, полученных во всех трех сериях опытов, подтвердило это предположение (рис. 1 А—С).

Остановимся подробнее на результатах первой серии опытов (рис. 1 А). В принципе модуляции структуры можно объяснить на основе чисто механических соображений (правила Калладина, [5]). Однако более корректно, на наш взгляд, сравнение полученных данных с результатами расчетов гибкости комплементарных динуклеозидфосфатов методом Монте-Карло [4]. Зависимость локальной конформации ДНК от последовательности оснований вызвана главным образом

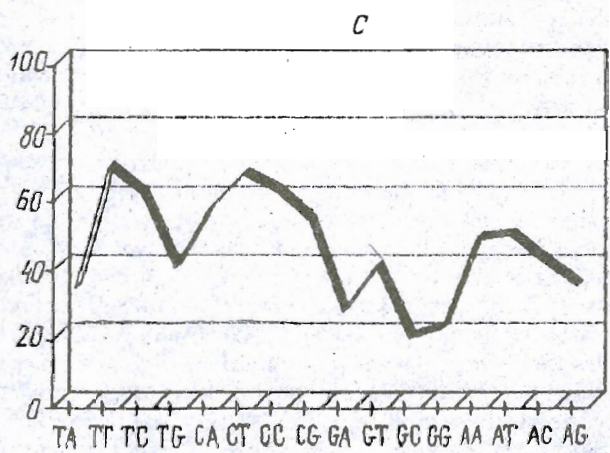
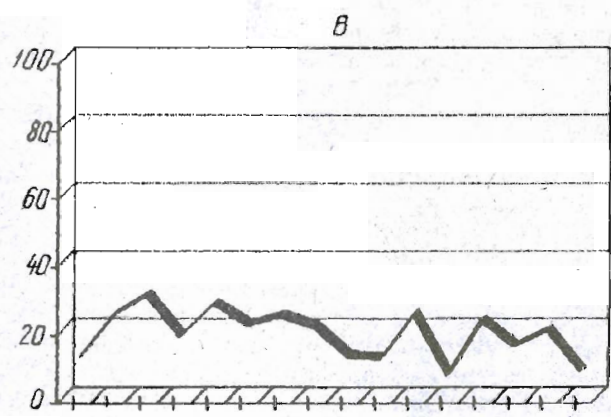
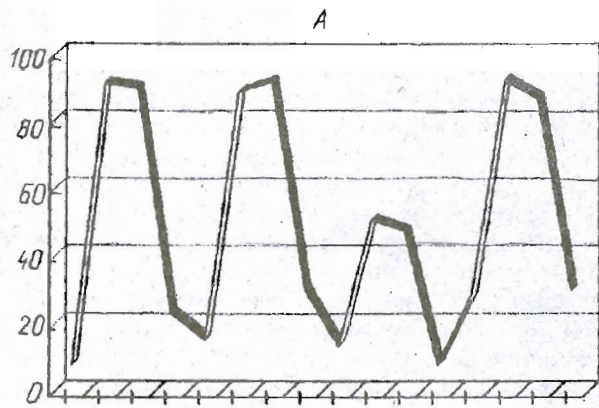


Рис. 1. Выход продуктов ХЛ (%) в зависимости от природы нуклеотидных звеньев, между которыми образуется новая связь; направление цепи — 5' → 3'. На оси абсцисс показаны лишь нуклеотиды (XY), непосредственно примыкающие к месту образования связи. А — система (6Xp + Y11)/14; В — система (6X + pY11)/14; С — система (6Xp + pY11)/14

различием стэкинг-взаимодействий внутри пиримидин-пуриновых контактов. Возможность реализации стерически невыгодных контактов между взаимодействующими парами оснований, различие значений энергетически оптимальных гликозидных углов пиримидиновых и пуриновых остатков приводит к «раскрытию» плоскостей пар оснований в один из желобков. «Открытие» димеров пурин-пиримидин в узкий желоб сопровождается сближением взаимодействующих при ХЛ фосфатной и гидроксильной групп и, как следствие, увеличением эффективности ХЛ. Экспонированность плоскостей пиримидин-пуринового блока в широкий желоб приводит к уменьшению эффективности ХЛ из-за неблагоприятного взаимного расположения фосфатной и гидроксильной групп. Сравнение полученных нами экспериментальных данных (рис. 1А) с результатами расчетов в работе [4] показало, что эффективность ХЛ убывает с ростом средних значений энергии взаимодействия различных динуклеозидфосфатов. Так, например, увеличение значений энергии в ряду $GC : CG < CG : GC < GG : CC$ и $AT : TA < AA : TT < TA : AT$ приводит к уменьшению эффективности ХЛ в том же порядке. С помощью конформационного анализа [4] было показано, что наименее стабильны в В-форме ДНК пиримидин-пуриновые димеры (Pur/Pur), что проявляется в меньшем перекрывании оснований по сравнению с другими димерами (и соответственно более высокой средней энергии системы), большем среднем расстоянии между парами оснований и большей свободе при изменении конформации сахарных колец. Было также отмечено, что расстояние между парами максимально для последовательности оснований Pur/Pur и минимально — для Pur/Pur. Результаты ХЛ (рис. 1А) коррелируют с данными этих расчетов [4].

В динуклеотидах Pur/Pur пурины взаимодействуют друг с другом в дуплексе со стороны широкого желоба. Конформационные расчеты [6] показали, что здесь нет столь же заметных стерических ограничений, как для димеров Pur/Pur. Эффективность ХЛ в дуплексах, где образование новой межнуклеотидной связи происходит в пурин-пиримидиновом фрагменте, составляет 92 и 87% для АТ- и АС-контактов соответственно и гораздо ниже в случае GT- и GC-контактов — 51 и 47% соответственно. Понижение эффективности ХЛ во втором случае, возможно, связано с изменением значения угла скручивания оснований в GC-паре: увеличение пропеллер-твиста приводит к невыгодному взаимодействию аминогрупп гуанинов из противоположных цепей. Кроме того, интересно отметить, что увеличение расстояния между парами оснований в GC-содержащих фрагментах (GC-, CG- и GG-контакты) коррелирует с уменьшением эффективности ХЛ в системах, содержащих эти контакты в участке «сшивания».

В случае А/Т-блоков контакт метильной группы тимина с дезоксирибозой той же цепи, который существует во фрагменте дуплекса AA : TT — в цепи тиминов, приводит к тому, что тимины расположены ближе друг к другу, чем аденины (среднее значение параметра h для аденинов составляет 4,32 Å, для тиминов — 3,7 Å), и, как следствие этого, эффективность ХЛ при соединении тимидиновых звеньев составляет 91%, а аденозиновых — 37%. Эффективность химического лигирования контакта АТ довольно высока и составляет 92%, в то же время для ТА-контакта оказывается чрезвычайно низкой — 8%. Причиной этого может быть, во-первых, возникновение энергетически выгодных контактов метильных групп тиминов с атомами водорода при С2'-атоме дезоксирибозы в обеих цепях для АТ : ТА-фрагмента дуплекса. Кроме того, велико различие в геометрии стэкинга таких контактов: сильное перекрывание оснований в случае 5'-АТ-фрагмента и практически полное отсутствие стэкинга для 5'-ТА-фрагмента, что вызывает локальное нарушение спиральной структуры. Данные по структуре динуклеотидов d(pTrA) и d(pArT), полученные методом ЯМР [7], подтверждают такую интерпретацию.

Сравнение данных, полученных в модельной системе (рис. 1А), с данными по эффективности ХЛ олигонуклеотидов, приведенных в работе [3], позволяет сделать вывод, что одной из основных причин различной эффективности ХЛ являются сиквенс-зависимые возмущения локальной структуры ДНК в участке

«сшивания». Наблюдается общая тенденция в изменении эффективности ХЛ в зависимости от природы нуклеотидов в реакционном узле. Роль фланкирующих последовательностей сказывается в меньшей степени, за исключением случаев, когда ближайшие соседи вызывают сильное искажение локальной структуры спирали (макроскопической изгиб и т. д.).

Анализ результатов, полученных во второй и третьей сериях при ХЛ олигонуклеотидов с 5'-концевой фосфатной группой или при образовании пирофосфатной межнуклеотидной связи (рис. 1В, С), показывает, что отмеченные выше закономерности в целом сохраняются, однако выражены не столь четко, что может быть связано с вышеупомянутым увеличением подвижности 5'-фосфатной группы. В целом обычно наблюдается понижение эффективности ХЛ в дуплексах, когда фосфатная группа находится на 5'-конце ундекануклеотида (рис. 1В). Это объясняется меньшей нуклеофильностью 3'-ОН-группы по сравнению с 5'-гидроксильной группой (рис. 1В и А соответственно), а также изменением подвижности реагирующих групп. Большая конформационная свобода 5'-фосфатной группы приводит к тому, что гидролиз активного промежуточного соединения происходит быстрее, чем межмолекулярная реакция образования новой связи. Интересно, что в случае системы (6X + pY11)/14, когда на 5'-конце ундекануклеотида находится аденозин-5'-фосфат, эффективность ХЛ сравнима (для GA-, AA-контактов) или даже немного выше (TA-, CA-контакты), чем для (6Xp + Y11)/14-системы. Можно предположить, что конформационно невыгодная жесткая фиксация реагирующих групп в последнем случае компенсируется увеличением свободы вращения 5'-фосфатной группы.

При образовании пирофосфатной связи (рис. 1С) в процессе реакции в месте одноцепочечного разрыва, видимо, накапливаются активные производные по обеим фосфатным группам, что блокирует нуклеофильную атаку и обуславливает некоторое понижение эффективности лигирования по сравнению с системой (6Xp + pY11)/14 (рис. 1А). Однако в связи с тем, что относительно длинные связи P—O образуют тупой угол P—O—P, равный приблизительно 130°, атомы фосфора далеко отстоят друг от друга. В результате происходит практически беспрепятственное вращение вокруг пирофосфатной связи, так что торсионные углы могут принимать такие значения, которые приводят даже к заслоненной конформации группы O—P—O—P, что, видимо, может быть объяснением более высокой эффективности ХЛ в этом случае по сравнению с системой (6X + pY11)/14 (рис. 1В).

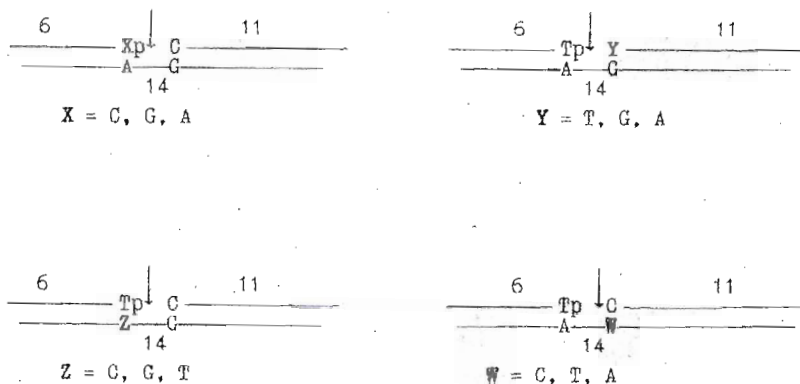
Изучение закономерностей ХЛ в системах типа (6Xp + pY11)/14 интересно с точки зрения возможности получения этим методом структур, содержащих неприродные межнуклеотидные связи.

Влияние некомплементарных пар оснований на эффективность химического лигирования

Изучение дуплексов, содержащих некомплементарные пары оснований в участке «сшивания», может быть интересно с нескольких точек зрения. Представляется важным, насколько сильно отражается появление некомплементарных пар на структуре ДНК, так как известно, что мисматчи, распространённый элемент хромосомных теломер, довольно часто встречаются в ДНК и могут приводить к мутациям в процессах репликации и транскрипции [8—11]. С другой стороны, это может дать ответ на вопрос: можно ли с помощью ХЛ получать, например, несколько гомологичных генов, несущих единичные замены, или, в случае резкого изменения эффективности лигирования по сравнению с совершенными дуплексами, применять этот метод при диагностике?

Используя олигонуклеотиды, входящие в состав описанных выше модельных систем, мы сконструировали набор дуплексов с некомплементарными парами

оснований в участке «сшивания». Схематически эти дуплексы можно представить следующим образом:



Как видно из схемы, некомплементарные пары были расположены с разных сторон (3'- или 5'-) от разрыва. Фосфатная группа во всех системах находилась на 3'-конце гексануклеотида. Зависимость эффективности ХЛ от вышеназванных модификаций показана на рис. 2.

Из приведенных данных следует, что введение различных некомплементарных пар по-разному сказывается на эффективности ХЛ. Образование продукта лигирования во всех представленных дуплексах свидетельствует о том, что некомплементарные пары оснований в той или иной степени встраиваются в двойную спираль ДНК. Низкая эффективность ХЛ в этих системах, видимо, обусловлена влиянием некомплементарных пар на конформацию углеводофосфатного остова двойной спирали. В этих дуплексах реагирующие группы получают больше степеней свободы, чем в совершенных дуплексах, что способствует атаке активированного фосфата молекулами воды. Введение некомплементарной пары слева от разрыва приводит к более сильному снижению эффективности ХЛ по сравнению с совершенными дуплексами, чем подобные замены справа.

Наименьшие возмущения локального характера вызывают G/T- и G/A-пары. Исследование различных модельных систем, содержащих G/T-пары, с помощью рентгеноструктурного анализа, ЯМР-спектроскопии, а также расчет конформаций с помощью атом-атомных потенциальных функций и построение молекулярных моделей показало, что основания G/T-пары находятся в обычных таутомерных формах и в *анти*-ориентации относительно углеводных колец [8—10, 12]. Включение G/T-пары в двойную спираль не приводит к уменьшению межатомных контактов, а вызывает лишь небольшое увеличение энергии невалентных взаимодействий и незначительные отклонения углов углеводофосфатного остова от стандартных значений, характерных для уотсон-крикковской спирали. По данным ³¹P- и ¹H-ЯМР-спектроскопии [10], конформационные возмущения, вносимые G/T-парой, локализуются в участке модификации: стэкинг-взаимодействия в районе некомплементарной пары нарушены главным образом из-за уменьшения перекрытия оснований G/T-пары с основаниями соседней пары с 3'-конца, а стэкинг с ближайшим «соседом» в 5'-положении сохраняется почти таким же, как и в совершенном дуплексе. Эти данные согласуются с результатами ХЛ: эффективность ХЛ в дуплексе, в котором некомплементарная пара находится слева от разрыва, уменьшается в 4,5 раза по сравнению с совершенным дуплексом. В дуплексе, где эта же некомплементарная пара расположена справа от разрыва, эффективность ХЛ уменьшается лишь в 2,5 раза (рис. 2 и 1А соответственно).

Пиримидин-пуриновые некомплементарные пары, а также пара G/A, включенные в нуклеотидную последовательность ДНК, удерживаются двумя водородными связями. В литературе анализируется несколько схем образования водород-

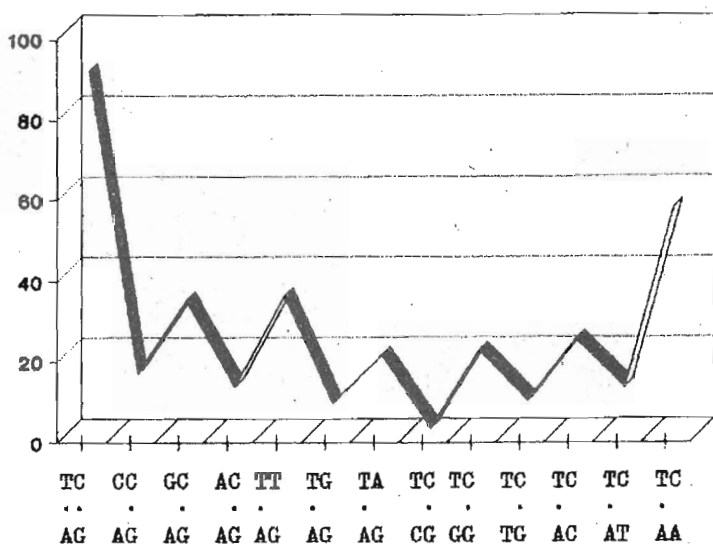


Рис. 2. Выход продуктов ХЛ (%) в зависимости от природы нуклеотидных звеньев, между которыми образуется новая связь; направление цепи — 5' → 3'. На оси абсцисс показаны лишь пары нуклеотидов, непосредственно примыкающие слева или справа к разрыву

ных связей в G/A-паре [13—17]. Отмечается большая конформационная вариабельность G/A-пары в зависимости от pH и ближайших «соседей». В частности, было показано, что при нейтральных значениях pH оба нуклеотидных остатка неканонической пары находятся в *анти*-конформации. Для G/A-пары в такой конформации характерно ярко выраженное пропеллерное расположение оснований (повернуты друг относительно друга на 24,8°). Несмотря на то что расстояние между C1'-атомами аденозина и гуанозина на 2 Å больше, чем в уотсон-криковской паре, G/A-пара достаточно хорошо вписывается в двойную спираль, практически не нарушая межплоскостных взаимодействий. Наблюдаемые при этом небольшие изменения отдельных торсионных углов углеводофосфатного остова лежат в пределах, характерных для канонических пар. На основании данных обмена иминопротонов дуплекса, содержащего G/A-пару, с водой показано [13], что возмущения, вносимые этой парой, имеют локальный характер и затрагивают только соседнюю G/C-пару с 3'-конца. Интересно, что эффективность ХЛ в дуплексе, в котором некомплементарная пара находится слева от разрыва (справа — G/C-пара), понижается в 1,4 раза по сравнению с совершенным дуплексом. В дуплексе, где эта пара расположена справа от разрыва, вообще наблюдается увеличение эффективности лигирования почти в 2,5 раза (рис. 2 и 1А соответственно). Вероятно, это связано с чрезвычайно благоприятным расположением реагирующих групп в нике. Однако детальное выяснение причин этого явления требует дальнейших исследований.

Пара A/A водородными связями не стабилизирована. Встраивание A/A-пары в двойную спираль осуществляется за счет стэкинг-взаимодействий адениновых оснований с соседними и сопровождается выведением остатков аденина из плоскости для уменьшения перекрывания противостоящих аминогрупп, а также значительными искажениями углеводофосфатного остова [18]. Выход продукта ХЛ в системе, содержащей A/A-пару, падает в 7 раз по сравнению с совершенным дуплексом.

К сожалению, нет строгих экспериментальных доказательств молекулярной структуры пары G/G. Недавно появились работы [13, 19], в которых методом ЯМР-спектроскопии исследовалась структура дуплексов, содержащих G/G-пару.

Отмечается, что включение одной G/G-пары в центральный участок комплекса в целом не нарушает геометрии двойной спирали В-ДНК, несмотря на большой объем этой пары. Было показано, что один из гуаниновых остатков находится в нормальной *анти*-конформации, тогда как другой принимает *син*- или близкую к ней конформацию. Введение этой пары вызывает лишь небольшое смещение оси спирали в сторону, что, вероятно, может объяснить уменьшение эффективности ХЛ в 3 раза по сравнению с совершенным дуплексом.

Исследование структуры С/А-пары [11, 13, 15, 18] свидетельствует о нарушении стэкинг-взаимодействий в районе неканонической пары. Несмотря на имеющиеся в литературе противоречивые сведения относительно влияния этой пары на структуру двойной спирали, принимается все же, что остатки А и С встраиваются в двойную спираль, участвуя в стэкинг-взаимодействиях с соседними основаниями, и вызывают лишь локальные конформационные перестройки. Также отмечается [15], что фланкирование С/А-пары с 3'-конца G/С-парой приводит к существенной дестабилизации спирали в районе некомплементарной пары. Вероятно, этим может объясняться различная эффективность ХЛ в системах, содержащих С/А-пару. В дуплексе, где эта пара расположена слева от разрыва, а справа — G/С-пара, эффективность ХЛ падает в 6 раз по сравнению с совершенным дуплексом. В то же время, когда С/А-пара находится справа от разрыва, эффективность ХЛ уменьшается лишь в 1,5 раза.

Наиболее обширное возмущающее влияние оказывают пиримидин-пириминовые (С/Т, Т/Т, С/С) пары. Экспериментальными методами молекулярная структура пиримидин-пириминовых пар изучалась мало. Конформационный анализ ДНК-дуплексов, содержащих эти пары, показал, что для каждой из них возможно образование димера, стабилизированного водородными связями [12]. Основания этих пар расположены, по крайней мере частично, вне двойной спирали. Результаты ХЛ согласуются с литературными данными. Так, в дуплексах, содержащих Т/С-пару, эффективность ХЛ уменьшается в 8 или 45 раз по сравнению с совершенным дуплексом в зависимости от природы соседних звеньев. Эффективность ХЛ в дуплексах, содержащих С/С- и Т/Т-пары, уменьшается в 4 и 11 раз соответственно.

В целом можно сказать, что в зависимости от природы гетероциклических оснований в некомплементарных парах, расположенных в месте разрыва и от их ближайшего окружения, основания таких пар могут или включаться в двойную спираль ДНК, участвуя в стэкинг-взаимодействиях, и тогда эффективность ХЛ меняется незначительно, или выходит из спирали. В последнем случае наблюдается резкое уменьшение эффективности ХЛ. Из анализа экспериментальных данных следует, что наименьшие возмущения локального характера оказывают G/Т- и G/А-пары вне зависимости от их положения относительно разрыва, наибольшие — А/А- и пиримидин-пириминовые пары. Эти данные согласуются с литературными [10—19].

Экспериментальная часть

В работе использовали морфолиноэтансульфонат (MES), BrCN (Merck, ФРГ); акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилендиамин, 1,4-дифенилпиротриет, бромфеноловый синий, ксиленицианол, формамид, спермидин (Serva, ФРГ); [α - 32 P]УТР, [γ - 32 P]АТР (ВО «Изотоп», Россия); Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), терминальную трансферазу (КФ 2.7.7.31) (НПО «Ферментас», Литва).

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов проводили амидофосфитным методом на синтезаторе «Applied Biosystems 380В» (Applied Biosystems, США) по стандартному регламенту. Синтез олигодезоксирибонуклеотидов с 3'-концевыми фосфатными группами проводили с использованием полимерного носителя СРG-500 Å

(Fluka), содержащего β -сульфонилэтильную якорную группу [20]. Синтезированные олигонуклеотиды были проанализированы и выделены с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ [21]. 3'-Фосфорилирование олигомеров проводили с помощью [α - 32 P]УТР и терминальной трансферазы по методике [22].

Использованы следующие буферные растворы: 0,25 М MES, доведенный Et_3N до pH 7,5, 0,02 М MgCl_2 (буфер А); 1 М ацетат калия (pH 8,0); для Т4-полинуклеотидкиназы — 0,05 М трис-НСl (pH 7,6), 0,01 М MgCl_2 , 5 мМ 1,4-дителиотреит, 1 мМ спермидин; для терминальной трансферазы — 200 мМ К-какодилат (pH 7,5), 1 мМ CoCl_2 , 0,5 мМ 1,4-дителиотреит.

Электрофорез олигонуклеотидов проводили в 20% ПААГ, содержащем 8 М мочевины. После автордиографии радиоактивность вырезанных из геля зон определяли по Черенкову на счетчике Delta-300 (Tracor, Нидерланды). Ошибка счета не превышала 2%. Выход продуктов реакции ХЛ определяли по отношению радиоактивности продукта к суммарной радиоактивности исходного олигонуклеотида и продукта.

Химическое лигирование под действием бромциана. 0,1 мМ раствор олигонуклеотидов смешивали в следующем соотношении: 5' (или 3')- 32 P-меченый олигомер — олигомер-донор фосфата — матрица = 1 : 1,2 : 1,5. Реакцию проводили в 10 мкл буфера А в течение 1 мин при 0° С. ВгСN (1 мкл) добавляли в виде 10 М раствора в абс. ацетонитриле. Нуклеотидный материал осаждали этанолом и анализировали электрофорезом в 20% ПААГ.

Авторы выражают благодарность сотрудникам химического факультета МГУ Е. А. Романовой, В. Н. Ташлицкому за помощь при синтезе и анализе олигонуклеотидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sokolova N. I., Ashirbekova D. T., Dolinnaya N. G., Shabarova Z. A. // FEBS Lett. 1988. V. 232. № 1. P. 153—155.
2. Dolinnaya N. G., Sokolova N. I., Gryaznova O. I., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 9. P. 3721—3738.
3. Меренкова И. Н., Долинная Н. Г., Орецкая Т. С., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. № 1. С. 85—91.
4. Журкин В. Б. // Конформационная механика ДНК. Дисс. ... д-ра физ.-мат. наук. М.: Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта, 1986.
5. Calladine C. R. // J. Mol. Biol. 1982. V. 161. P. 343—352.
6. Zhurkin V. B., Gorin A. A., Charakhchyan A. A., Ulyanov N. B. // Theoretical Biochemistry and Molecular Biophysics/Eds D. L. Beveridge, R. Lavery. N. Y.: Adenine Press, 1990. P. 411—431.
7. Hosur R. V., Govil G., Hosur M. V., Viswamitra M. A. // J. Mol. Struct. 1981. V. 72. P. 261—267.
8. Kennard O. // Nucleic Acids and Molecular Biology/Eds F. Eckstein, D. M. Lilley. Berlin: Springer-Verlag, 1987. V. 1. P. 25—52.
9. Patel D. J., Shapiro L., Hare D. // Nucleic Acids and Molecular Biology/Eds F. Eckstein, D. M. Lilley. Berlin: Springer-Verlag, 1987. V. 1. P. 70—82.
10. Patel D. J., Shapiro L., Hare D. // Unusual DNA Structures/Eds R. D. Wells, S. C. Harvey. N. Y.: Springer-Verlag, 1988. P. 115—161.
11. Bhattacharyya A., Lilley D. M. J. // J. Mol. Biol. 1989. V. 209. P. 583—597.
12. Churpina V. P., Poltev V. I. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 1. P. 141—154.
13. Roongta V. A., Jones C. R., Gorenstein D. G. // Biochemistry. 1990. V. 29. № 22. P. 5245—5258.
14. Leonard G. A., Booth E. D., Brown T. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 19. P. 5617—5623.
15. Brown T., Leonard G. A., Booth E. D., Kneale G. // J. Mol. Biol. 1990. V. 212. P. 437—440.
16. Li Y., Zon G., Wilson W. D. // Biochemistry. 1991. V. 30. № 30. P. 7566—7572.
17. Li Y., Zon G., Wilson W. D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 26—30.
18. Долинная Н. Г., Грязнова О. И. // Успехи химии. 1989. Т. LVIII. Вып. 8. С. 1318—1353.
19. Cognet J. A. H., Gabarro-Arpa J., Le Bret M., van der Marel G. A., van Boom J. H., Fazakerley G. V. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 24. P. 6771—6779.
20. Волков Е. М., Романова Е. А., Круг А., Орецкая Т. С., Потапов В. К., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 1034—1039.

21. Шмидт С., Кузнецова Л. Г., Романова Е. А., Ниманн А., Орецкая Т. С., Крынецкая Н. Ф., Метелев В. Г., Шабарова З. А. // *Биоорган. химия*. 1991. Т. 17. № 6. С. 823—830.
22. Krynetskaya N. F., Zayakina G. V., Oretskaya T. S., Volkov E. M., Shabarova Z. A. // *Nucleosides and Nucleotides*. 1986. V. 5. № 1. P. 33—43.

Поступила в редакцию
5.V.1993

*I. N. Merenkova, T. S. Oretskaya, N. I. Sokolova,
Z. A. Shabarova*

**CHEMICAL REACTIONS IN DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS.
XV. THE INFLUENCE OF DNA LOCAL STRUCTURE ON THE
CHEMICAL LIGATION EFFICIENCY**

*Department of Chemistry and A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical
Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

A series of model DNA-duplexes with a single break in one of the chains were studied. The efficiency of the new internucleotide bond formation by means of chemical ligation was shown to depend on the DNA structure in the nick site, decreasing in the following order: pyrimidine-pyrimidine > purine-pyrimidine > pyrimidine-purine > > purine-purine. This relationship is the most pronounced in duplexes with 5'-hydroxyl group as 3'-phosphate acceptor. For duplexes, containing non-complementary base pairs in the reaction centre, the yield of ligation products also depends on the nature of the interacting nucleotides.