



## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 547.963.32

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ КАК ИНСТРУМЕНТ  
ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ СТРУКТУР И ПРОЦЕССОВ

Смирнов В. Д., Метелев В. Г., Шабарова З. А.,  
Иржогофьев М. А.

*Химический факультет  
и Межфакультетская лаборатория биоорганической химии  
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

В обзоре рассматриваются современные области использования олигонуклеотидов для изучения проблем молекулярной биологии и биоорганической химии. Обзор включает в себя следующие разделы: «зондирование» олигонуклеотидами пространственной структуры различных РНК; использование олиго-полинуклеотидного взаимодействия для выделения индивидуальных РНК; изучение нуклеиново-белкового взаимодействия с использованием синтетических олигонуклеотидов; использование синтетических олигонуклеотидов в качестве затравок в реакциях полинуклеотидного синтеза; применение олигонуклеотидов для направленной модификации нуклеиновых кислот; введение синтетических олиго- и полинуклеотидов в нативные структуры.

Обзор содержит анализ перспектив использования синтетических олигонуклеотидов для изучения структуры и функций природных биополимеров.

В настоящее время все чаще публикуются работы, в которых синтетические олигонуклеотиды рассматриваются как объекты не только для решения чисто химических задач (выявление свойств отдельных функциональных групп, исследование устойчивости тех или иных связей, конформации молекул и их взаимодействия в растворе), но и для изучения механизма действия ферментов нуклеинового обмена, направленной модификации природных нуклеиновых кислот, создания новых методов их выделения. Синтетические олигонуклеотиды — удобный инструмент для исследования структурной организации нуклеиновых кислот, тонкого механизма их функционирования, в том числе взаимодействия с белками, а также для выяснения функциональной роли отдельных участков нуклеиновых кислот.

Классическим примером использования синтетических олигонуклеотидов для решения молекулярно-биологических задач служит расшифровка генетического кода [1, 2], ставшая возможной благодаря доступности синтетических тририбонуклеотидов и полирибонуклеотидов заданной структуры. Знаменательными событиями последнего времени, открывающими широкие перспективы для молекулярной биологии и генетической инженерии, были осуществленные в лаборатории Кораны синтезы структурной части гена тРНК<sup>Ala</sup> [3] и всех фрагментов (включая инициаторный и терминаторный участки) гена тРНК<sup>Tyr</sup> [4, 5], а также проведенный в Институте биоорганической химии синтез фрагментов гена тРНК<sup>Val</sup> [6, 7]. Успешно идут работы по синтезу фрагментов генов лизоцима [8—

11], рибонуклеазы [12], *N*-белка бактериофага  $\lambda$  [13], осуществлен синтез *lac*-оператора *E. coli* [14].

Цель настоящего обзора — выявление основных направлений использования синтетических олигонуклеотидов в молекулярной биологии. Отметим, что понятие «синтетические» применяется главным образом к олигонуклеотидам, полученным чисто химическим путем или с помощью полинуклеотидфосфорилазы, а в отдельных работах — к олигонуклеотидам, выделенным после расщепления природных РНК или синтетических гомополимеров различными ферментами. В последних случаях важны идеи и закономерности, которые, однако, могут быть эффективнее реализованы при применении олигонуклеотидов, полученных синтетическим путем, т. е. имеющих заданную последовательность.

## 1. «Зондирование» пространственной структуры РНК с помощью синтетических олигонуклеотидов

Работы Уленбека, Льюиса, Доти и др. [15—18] показали, что сравнительно небольшие олигонуклеотиды способны специфически взаимодействовать с комплементарными им одноцепочечными участками нативных нуклеиновых кислот. Анализ данных, полученных при изучении такого взаимодействия, позволяет сделать заключение об особенностях пространственной организации макромолекулы, т. е. решить вопрос, в одно- или двуспиральном участке РНК находится та или иная ее нуклеотидная последовательность и каким образом эта последовательность расположена относительно «поверхности» макромолекулы. Этот метод нашел широкое применение при изучении структур ряда тРНК, 5S- и 16S-РНК рибосом *E. coli* [15—24].

1. Изучение пространственной структуры тРНК. В качестве примера исследования пространственной структуры тРНК приведем работу Понгса и Грайса [20], осуществивших подробное картирование доступных участков тРНК<sup>Val</sup> (*E. coli*), изучив ее взаимодействие с 29 тринуклеотидами.

По их данным, не способны к комплексообразованию с тринуклеотидами участки (рис. 1) 1—7, 66—72 («стебель»), 10—13, 22—25 (дигидроуридиловая ветвь), 27—31, 39—43 (антикодоновая ветвь), 49—53, 61—65 (риботимидиловая ветвь). В то же время достаточно прочные комплексы образуются с участками 14—17 (дигидроуридиловая петля), 32—34 (антикодоновая петля). Последовательность 44—46 (дополнительная петля) образует комплекс с С-С-С со средней величиной константы ассоциации. Участки 19—21 (дигидроуридиловая петля), 46—48 (дополнительная петля) и 55—58 (риботимидиловая петля) пространственно недоступны для комплементарных олигонуклеотидов, т. е., скорее всего, непосредственно участвуют в образовании третичной структуры тРНК. С другой стороны, универсальная последовательность G-T- $\psi$ -C риботимидиловой петли способна связывать G-A-A.

Другой пример: при картировании тРНК<sup>Phe</sup> из дрожжей было установлено [21], что основания областей 3'-конца и антикодоновой петли (U-Gm-A-A-Y) образуют прочные комплексы с комплементарными олигонуклеотидами. Кроме того, способными к связыванию оказались последовательности A-G-m<sup>7</sup>G (дополнительная петля) и G-T- $\psi$ -C (риботимидиловая петля). Недоступны для взаимодействия с тринуклеотидами последовательности A-G-hU (дигидроуридиловая петля) и C-G-m<sup>1</sup>A (риботимидиловая петля). Эти результаты соответствуют данным Рича и сотр. [26] о третичной структуре дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup>. Следует, однако, отметить некоторую неоднозначность интерпретации результатов по взаимодействию олигонуклеотидов с РНК. Образование относительно прочного комплекса олигонуклеотида с РНК свидетельствует о том, что комплементарная олигонуклеотиду последовательность РНК входит в односпираль-

ный участок. В то же время отсутствие связывания олигонуклеотида с заведомо известным участком РНК не является строгим доказательством участия последнего в образовании вторичной структуры, а может быть объяснено также и тем, что однотяжевая последовательность нуклеотидов в этом участке РНК находится в невыгодной для комплексообразования конформации (например, малые петли тРНК).

На примере тРНК<sup>Phe</sup> из дрожжей Айзингер и Шпар показали [27], что пентануклеотид U-U-C-A-G эффективно связывается с антикодоном

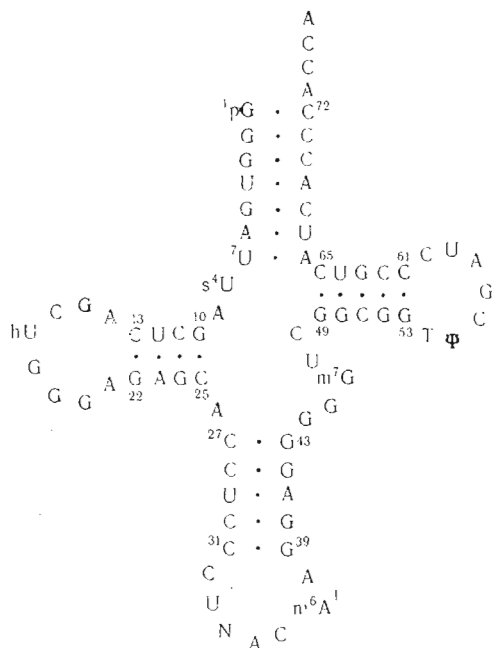


Рис. 1. тРНК<sub>3</sub><sup>Val</sup> (*E. coli*) [25] в конфигурации «клеверного листа»

и двумя предшествующими ему (с 5'-конца) пиримидиновыми нуклеотидами. Этот факт и данные Уленбека по неэффективному взаимодействию с тРНК олигонуклеотидов, комплементарных участкам антикодоновой петли за антикодоном (с 3'-конца) [16], свидетельствуют в пользу представлений [27] о *hf*-конформации антикодоновой петли.

Результаты исследований вторичной и третичной структур ряда тРНК методом комплексообразования с олигонуклеотидами, подтверждающая единую для этого семейства РНК вторичную структуру («клеверный лист»), говорят о наличии более сложной индивидуальной пространственной организации макромолекул тРНК. Степень доступности для комплексообразования дигидроуридиловой петли, например, различна в разных тРНК: в тРНК<sup>Tyr</sup> с олигонуклеотидами взаимодействует большая часть оснований одноцепочечного участка дигидроуридиловой петли [16], а в тРНК<sup>Ile</sup> (*E. coli*) и тРНК<sup>Phe</sup> (из дрожжей) дигидроуридиловая петля совсем не способна к комплексообразованию [21, 22]. Индивидуальная схема образования пространственной структуры каждой тРНК, вероятно, и обеспечивает ее строго специфическое функционирование на уровне нуклеиново-белкового взаимодействия [28].

Результаты исследований позволяют сделать ряд выводов:

1) во всех изученных тРНК пространственно доступными однотяжевыми участками являются важнейшие функциональные центры тРНК — антикодоновый участок и акцепторный 3'-конец молекулы, образующие прочные комплексы с комплементарными олигонуклеотидами;

2) отсутствие взаимодействия между олигонуклеотидами и определенными, комплементарными им, участками дигидроуридиловой, риботимицидиловой и дополнительной петли во всех тРНК говорит о возможном участии этих последовательностей в создании третичной структуры;

3) способность к комплексообразованию некоторых участков дигидроуридиловой и дополнительной петли, различающихся длиной в различных тРНК, свидетельствует о пространственной доступности этих участков и, вероятно, об их особой роли в функционировании нативных молекул.

В отдельных случаях результаты исследования способности к комплексообразованию с олигонуклеотидами дают возможность судить об изменении конформации тРНК в процессе осуществления ее функции. Так, Данчин и Грюнберг-Маного показали [29], что после аминоацилирования тРНК<sup>Phe</sup> (дрожжевая) и тРНК<sup>Val</sup> (*E. coli*) изменяется структура дигидроуридиловой петли, что сказывается на способности такой тРНК к связыванию *oligo* (dG). Авторы предполагают, что изменение конформации этого участка тРНК необходимо для осуществления ее аминоацилирования.

Перспективно, по-видимому, использование для «зондирования» тРНК эфиров олигодезоксирибонуклеотидов. Согласно Тс'о и сопр. [30], константы связывания  $d[\text{Tp}(\text{Et})\text{Gp}(\text{Et})\text{G}]$  и  $d[\text{Tp}(\text{Et})\text{Tp}(\text{Et})\text{Cp}(\text{Et})\text{A}]$  с тРНК<sup>Phe</sup> (дрожжевая) в растворах 0,1 М NaCl, 1 мМ ЭДТА и 1 М NaCl близки, тогда как для соответствующих незащищенных по межнуклеотидному фосфору дезокси- и рибонуклеотидов наблюдается заметное уменьшение констант связывания при понижении ионной силы раствора.

2. *Изучение структуры отдельных участков РНК рибосом E. coli.* В лаборатории Доти было изучено взаимодействие 5S-РНК рибосом *E. coli* с 41 тринуклеотидом и 56 тетра nukлеотидами [17]. Исходя из полученных результатов, авторы предложили модель вторичной структуры 5S-РНК, согласно которой в образование вторичной структуры вовлечено 60% оснований (в свою очередь из этих нуклеотидных пар 64% приходится на долю G·C).

Аналогичный подход использовался для изучения пространственной структуры 16S-РНК из рибосом *E. coli* [24]. Обнаруженная способность тетра нуклеотида d(pT-C-T-T) образовывать с нативной 16S-РНК комплекс с соотношением РНК — олигонуклеотид, равным 1 : 1, дает основание полагать, что комплементарный тетра нуклеотиду участок РНК с последовательностью pA-A-G-A не встроен в двуцепочечную структуру, как предполагалось ранее [31]. Кроме того, при исследовании комплексообразования того же тетра нуклеотида с 16S-РНК был отмечен эффект существенной реорганизации исходной макромолекулярной структуры рибосомной РНК при прогревании (60°) смеси последней с тетра нуклеотидом. Несмотря на то, что в использованных условиях не происходит не только дегградации РНК, но и заметного плавления ее вторичной структуры, прогревание в 3—3,5 раза улучшает комплексообразование.

3. *Исследование структуры отдельных участков РНК бактериофага R17.* Способность олигонуклеотидов заданной структуры к комплементарным взаимодействиям с нативными РНК позволила поставить более сложную задачу — изучение пространственной структуры функционально важных участков высокомолекулярных вирусных РНК (РНК фагов R17 и MS2) [32]. Было исследовано взаимодействие синтетических олигодезоксирибонуклеотидов  $d(\text{pG-G-T-A-A-T})$  и  $d(\text{pG-G-T-A-A-T-C-C})$  с РНК фага R17, имеющей последовательность, комплементарную этим олигонуклеотидам, в области между цистронами белка оболочки и РНК-полимеразы.

При температуре 4° (0,05 М трис-HCl, pH 7,0; 0,2 М NaCl, 0,01 М ацетат магния) комплекс РНК — гексануклеотид обнаруживается только при использовании значительного молярного избытка последнего. При изменении высшей структуры РНК связывание гексануклеотида увели-

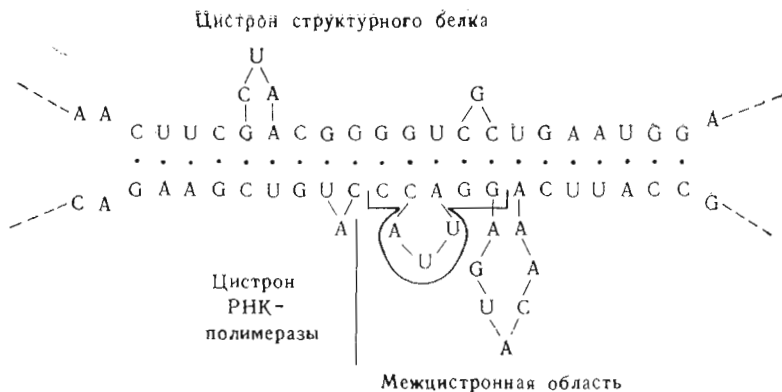


Рис. 2. Фрагмент вторичной структуры РНК фага MS2. Сплошной линией выделен исследуемый участок

чивается. Так, мягкая обработка РНК формальдегидом, изменяющая вторичную структуру в области цистрона РНК-полимеразы, приводит к более эффективному связыванию гексануклеотида. 3S-фрагменты РНК фага R17, полученные путем ограниченного гидролиза РНК панкреатической РНКазой, обладают большей склонностью к комплексообразованию, что, возможно, объясняется частичным разрушением двуспиральных участков.

Октануклеотид связывается с РНК более эффективно, чем гексамер, но абсолютная величина связывания остается низкой. Полученные результаты согласуются с предложенной Фирсом и сотр. [33] моделью вторичной структуры исследуемого участка (рис. 2)\* и свидетельствуют о конкурентном связывании олигонуклеотида с участком РНК, активно вовлеченным в образование вторичной структуры. Локальная концентрация «конкурирующего» с синтетическим олигонуклеотидом собственного участка РНК -G-G-U-C-G-C- (хотя и не полностью комплементарного изучаемой последовательности, но обближенного с ней за счет частичной комплементации) безусловно превышает реальную концентрацию вводимого олигонуклеотида. В связи с этим эффективность комплексообразования с синтетическим олигонуклеотидом принципиально не может быть близкой к 100%.

Таким образом, метод зондирования пространственной структуры РНК с помощью синтетических олигонуклеотидов хорошо дополняет метод рентгеноструктурного анализа, поскольку позволяет выяснить пространственную структуру РНК в растворах. Это особенно важно при изучении высокомолекулярных РНК, для которых рентгеноструктурный анализ пока еще невозможен.

## II. Использование олиго-полинуклеотидных взаимодействий для выделения индивидуальных РНК

Важным этапом в развитии методов выделения индивидуальных РНК можно считать применение аффинной хроматографии на олигонуклеотидсодержащих носителях, впервые предложенной для этих целей Гилхамом [34]. Принцип метода состоит в иммобилизации синтетического олигонуклеотида на носителе с последующим использованием такого носителя

\* Приводимая модель вторичной структуры предложена для РНК родственного R17 бактериофага MS2. Полная идентичность первичной структуры изучаемых областей этих РНК позволяет допустить существенные аналогии в их вторичной структуре.

для специфической сорбции нуклеиновых кислот, содержащих участки, комплементарные иммобилизованному олигомеру.

За последние годы существенно расширился набор носителей и способов иммобилизации олигонуклеотидов. Один из наиболее удобных вариантов, обеспечивающих высокую емкость сорбента, — иммобилизация олигонуклеотидов на гексаметилендиамин-сефарозе [35].

Среди большого числа примеров применения аффинной хроматографии для разделения полинуклеотидов [35—44] можно отметить выделение Эрханом и сотр. [45] тРНК<sup>Lys</sup> и тРНК<sup>Phe</sup> из препаратов суммарной тРНК *E. coli* с использованием целлюлозы, содержащей иммобилизованные олигоадениловую и олиготимидиловую кислоты. Широкое применение находят oligo(dT)- и poly(U)-содержащие целлюлозы для выделения ряда РНК с полиадениловыми участками [41, 46].

Важнейшим условием, предопределяющим эффективность аффинной хроматографии с использованием олигонуклеотидсодержащих сорбентов, является обеспечение специфичности и высокой эффективности (прочности образуемого комплементарного комплекса) взаимодействия иммобилизованного олигонуклеотида с избранной последовательностью нуклеиновой кислоты. Многообещающей представляется усилившаяся в последние годы тенденция к использованию сорбентов, содержащих иммобилизованные немоноклеточные синтетические олигодезоксирибонуклеотиды, так как специфичность и прочность образуемых последними комплементарных комплексов может быть существенно выше, чем при использовании гомеолигонуклеотидов. Так, комплексы гетероолигонуклеотидов с мРНК должны быть более устойчивы по сравнению с комплексами, образуемыми мРНК и олиготимидиловой кислотой, в силу большей прочности комплементарных С·G-пар. Более того, из-за наличия во всех мРНК участков poly(A) аффинный сорбент олиготимидилат-целлюлоза не может быть специфичным по отношению к какой-либо одной заданной мРНК.

В 1973 г. Доел и Смит сообщили о синтезе гептануклеотида d(pA-C-T-T-T-T-T), понануклеотида d(pA-C-T-T-T-T-T-G-T) и додекануклеотида d(pT-G-G-A-C-T-T-T-T-T-G-T), комплементарных участку гена лизоцима бактериофага T4, и гибридизации этих олигонуклеотидов с ДНК фага и мРНК лизоцима [8]. Синтезированный додекануклеотид эффективно связывается с N-цепью ДНК фага T4 и мРНК, но незначительно — с L-цепью ДНК и мутантными мРНК, а также ДНК, в которых имеется лишь малая часть гена лизоцима. Эта избирательность свидетельствует о связывании додекануклеотида с участками, имеющими комплементарную последовательность, и возможности выделения мРНК лизоцима из лизата клеток *E. coli*, зараженной фагом T4, благодаря иммобилизации додекануклеотида на носителе.

Правомерность такого подхода подтверждена в работе Ильиной и др. [47], показавших, что полинуклеотид  $U_n-(G-G-U)_4$ , содержащий додекануклеотидный участок, комплементарный d(pA-C-C)<sub>4</sub>, иммобилизованному на сефарозе, эффективно удерживается сорбентом и десорбируется только при 30° (0,004 М фосфатный буфер, рН 7,3; 0,075 М MgCl<sub>2</sub>, 0,2 М NaCl).

Новую ступень в развитии методов выделения индивидуальных РНК представляет собой работа Венетианера и Ледера [48], показавших, что транскрипция мРНК эукариот РНК-зависимой ДНК-полимеразой может быть проведена в гетерогенной системе при использовании в качестве затравки oligo(dT)-целлюлозы. Продуктом транскрипции является связанная с целлюлозой одноцепочечная ДНК, комплементарная мРНК. При использовании модифицированных таким образом целлюлоз можно легко выделить соответствующие мРНК с высокой степенью очистки из лизатов инфицированных клеток.

### III. Использование синтетических олигонуклеотидов для изучения нуклеиново-белкового взаимодействия

Проблемам нуклеиново-белкового взаимодействия посвящен обзор Богданова и Ледневой [49], где, в частности, рассмотрены системы, позволяющие изучать взаимодействие отдельных белковых и нуклеотидных фрагментов (например, комплексообразование белков с синтетическими полинуклеотидами и др.). Мы коснемся лишь отдельных исследований в этой области.

1. *Взаимодействие тРНК с аминокцил-тРНК-синтетазами.* В последние годы большое внимание уделяется изучению условий специфического связывания тРНК с соответствующими аминокцил-тРНК-синтетазами. При этом особенно важно выяснение локализации участков тРНК, ответственных за связывание с ферментом. Перспективным приемом таких исследований представляется блокирование определенных участков тРНК и выяснение таким образом их роли в процессе связывания. Общим недостатком работ, выполненных к настоящему времени, является использование для блокирования модифицирующих агентов, способных приводить к существенному изменению пространственной структуры РНК [50—52]. Результаты, полученные при этом, неоднозначны, поскольку различия в связывании белка с нативной и модифицированной молекулой тРНК могут оказаться следствием изменения пространственной структуры нуклеиновой кислоты в целом. Возможно, более удобным в исследованиях такого рода окажется метод гибридизации нуклеиновых кислот с синтетическими олигонуклеотидами.

Впервые этот метод был использован Шиммелом и др. [22] при изучении взаимодействия тРНК<sup>Ile</sup> (*E. coli*) с изолейцил-тРНК-синтетазой. Было установлено, что связывание молекулой тРНК олигонуклеотидов, комплементарных участку ее антикодоновой петли и последовательности С-С-А на 3'-конце (рис. 3), ингибировалось в присутствии изолейцил-тРНК-синтазы. Авторы полагают, что ингибирование комплексообразования вызвано блокированием синтетазой этих участков тРНК<sup>Ile</sup>. Ответить на вопрос, является ли антикодоновая петля наряду с последовательностью 3'-конца ответственной за связывание с синтетазой, пока трудно. Ранее Мирзабековым и др. [53] были получены данные в пользу того, что участки узнавания валил-тРНК-синтетазой в тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup> включают в себя два основания антикодоновой петли (36 и 37) и первые два основания 5'-конца молекулы. В соответствии с результатами Шиммела [22] находятся недавно полученные данные Тс'о [54] по ингибированию эфиром дезоксирибоолигонуклеотидов реакции аминокцилирования тРНК<sup>Phe</sup> и ряда других тРНК. В частности, было показано, что d[Tr(Et)Gp(Et)G] ингибирует на 50—80% аминокцилирование тРНК<sup>Phe</sup>, тРНК<sup>Lys</sup>, тРНК<sup>Tyr</sup>, тРНК<sup>Pro</sup>, тРНК<sup>Leu</sup>, тогда как d[Tr(Et)Tr(Et)Cp(Et)A] является более специфическим ингибитором для тРНК<sup>Phe</sup>. Видимо, образование комплексов тРНК с олигонуклеотидами, комплементарными 3'-концевой последовательности или антикодону (в случае тРНК<sup>Phe</sup>), делает невозможным связывание этих тРНК с соответствующими аминокцил-тРНК-синтетазами.

2. *Взаимодействие РНК и структурного белка бактериофага R17.* При выяснении функциональной роли отдельных областей РНК фага R17 было показано, что структурный белок этого фага присоединяется к РНК в области участка, инициирующего трансляцию цистрона РНК-полимеразы [55]. Тем не менее последовательность нуклеотидов фрагмента молекулы РНК, узнаваемого структурным белком, до сих пор не определена. Одним из путей ее выяснения является избирательное блокирование отдельных участков нетранслируемой области фаговой РНК, находящейся между цистронами белка оболочки и РНК-полимеразы, синтетическими олигодезоксирибонуклеотидами, комплементарными этим участкам [32]. Можно ожидать, что в случае присоединения олигонуклеотидов к

участку РНК, ответственному за узнавание белка, олигонуклеотид и структурный белок будут конкурировать друг с другом в связывании участка. При эффективном избирательном блокировании по результатам конкурентного связывания белка оболочки и ряда олигодезоксирибонуклеотидов с РНК можно локализовать участок связывания РНК со структурным белком. Первые данные, полученные с использованием октануклеотида d(pG-G-T-A-A-T-C-C), комплементарного участку исследуемой области РНК фага R17, говорят о том, что белок оболочки и этот октануклеотид не конкурируют друг с другом при связывании с РНК [56], однако для

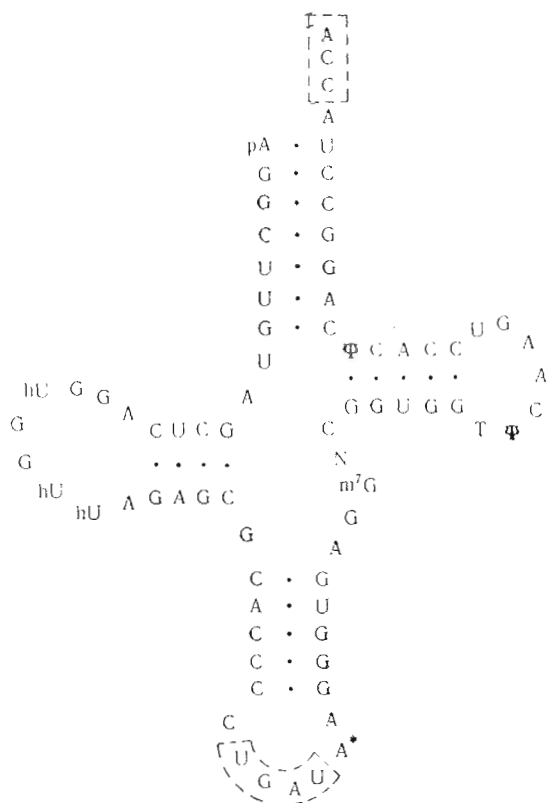


Рис. 3. тРНК<sup>Phe</sup> (*E. coli*) [52] в конфигурации «клеверного листа». Выделены участки, связывание которых с комплементарными олигонуклеотидами ингибируется в присутствии изолейцил-тРНК-синтазы (A\* — производное адениловой кислоты)

получения однозначных результатов необходимо систематическое обследование изучаемой области РНК с использованием синтетических олигонуклеотидов, перекрывающих различные участки этой области.

3. *Модельные системы для изучения нуклеиново-белкового взаимодействия.* Простейшие олигонуклеотиды были использованы для создания модельных систем с целью изучения природы и характера взаимодействия между аминокислотами и основаниями нуклеиновых кислот [57—61]. Так, в работах Громовой и др. [57—59] исследована конформация аминокислотных амидов олигодезоксиадениловых кислот и свойства их комплексов с полиуридилиновой кислотой. Показано, что геометрические параметры этих комплексов совпадают с параметрами трехспиральных комплексов oligo(dA)·2 poly(U) и не зависят от природы аминокислотного компонента и длины олигонуклеотидной цепи. В то же время термическая устойчивость таких комплексов ниже устойчивости комплексов с участием незамещенных oligo(dA); наибольшим дестабилизирующим действием обладают остатки



ароматических аминокислот. На основании полученных результатов авторы высказывают предположение об отсутствии интеркалирования ароматических радикалов в спираль и о фиксации их в малой бороздке спирали за счет взаимодействия с N<sup>3</sup>-участком аденинового гетероцикла [59].

С целью выявления специфичности связывания актиномицина с ДНК проведено изучение констант диссоциации его комплексов с олигодезоксирибонуклеотидами методом спектрального титрования [60]. Было показано, что динуклеотиды, содержащие гуанин, образуют с актиномицином комплекс, в 10 раз более стабильный, чем комплекс, образуемый динуклеотидами другого состава. При этом замечена следующая зависимость прочности комплекса от состава динуклеотида: а) динуклеотиды d(pN-G) (где N — A, T, G) связывают актиномицин аналогично dGMP; б) d(pG-N) — менее прочно, чем dGMP; в) d(pC-G) образует наиболее стабильный комплекс. Актиномицин образует с тетра nukлеотидом d(pC-T-A-G) комплекс, по устойчивости близкий к комплексу с d(pN-G). Эти данные свидетельствуют о том, что актиномицин имеет предпочтение к двуспиральным структурам, образуемым самокомплементарными олигонуклеотидами d(pC-T-A-G) и d(pC-G), давая комплексы, в которых он связан с остатком гуанозина на 3'-конце цепи. С другой стороны, исследования Патела [61] по спектроскопии ЯМР комплекса актиномицина с d(pG-C) (соотношение 1 : 2) подтверждают предположение Собелл и Джейна [62] о том, что антибиотик интеркалирует между G·C- и C·G-парами оснований. Пател предполагает, что метод может быть успешно применен для локализации интеркалирования в двуспиральную ДНК.

В последнее время появилось большое количество работ по расшифровке структуры регуляторных участков ДНК [4, 5, 64—66], а также участков, узнаваемых рестриктазами [67—69]. Одним из интереснейших направлений становится изучение специфичности взаимодействия соответствующих ферментов с синтетическими олигодезоксирибонуклеотидами, моделирующими структуру этих участков, однако до настоящего времени публикации по этому вопросу отсутствуют.

#### IV. Использование синтетических олигонуклеотидов в качестве затравок в реакциях полинуклеотидного синтеза

Изучение процессов репликации и транскрипции бактериальных и фаговых ДНК показало, что действие соответствующих полимераз катализируется олигонуклеотидом-затравкой, комплементарным участку ДНК-матрицы, присутствующим в реакционной смеси. Так, согласно Гулиану [70, 71], Ертелю и Шаллеру [72, 73] эффективная инициация репликации с помощью ДНК-полимеразы I из *E. coli* возможна только при использовании олигонуклеотидов-затравок, способных образовывать устойчивый комплекс со считываемой одноцепочечной ДНК. Образование этого комплекса является процессом, лимитирующим скорость репликации, и требует предварительной инкубации. В общем случае олигомеры с длиной цепи в 10—12 нуклеотидных остатков обеспечивают достаточно высокую специфичность гибридизации и высокую эффективность инициации репликации и транскрипции.

1. *Синтетические олигонуклеотиды как затравки в реакциях репликации.* Особый интерес представляют работы, связанные с использованием в качестве затравки олигонуклеотидов заданной гетерогенной последовательности. В 1971 г. Кораной и сотр. [74] был проведен ряд опытов по использованию в реакциях репликации систем синтетическая матрица — синтетический олигонуклеотид-затравка. При изучении системы I [матрица — икозануклеотид (1), затравки — олигонуклеотиды (2) — (7)] было показано, что пентануклеотид (4) и нонануклеотид (5) эффективно иницируют репликацию, тогда как эффективность инициации тетра нуклеотидами (6) и (7), пентануклеотидами (2) и (3) очень низка. В системе 2

ГСТСССТТАГСАТГГГАСАГ	(1)	СААССГГАГАГТСТСССАТГ	(4)
ГААТС (3) ССТСТ	(2)	ТСТГАГА	(2)
ГГГААТС (4)	система 1	ТТГГСССТСТ	(3)
ГАГГГААТС (5)		ГСССТСТ	(4)
СТАС (6)		ССТСТ	(5)
СТСТ (7)		СТСТ	(6)

3' . . . ГАТТТАГАСГГСАСТАГСТТССААГСТТАГГАААГГГГТГГТ . . . 5' ЦНК фага φ 80 рsu<sup>III</sup> Р-цепь

СТАААТСТГССГТГАТСГАСТТССААГГТ	ССССАССА	сегмент (2)'
	ССССАССАССА	сегмент (2)
ТССААТССТТССССАССАССА	ТССААТССТТССССАССАССА	полинуклеотид (3)
ТССААТССТТСС	ТССААТССТТСС	сегмент (4)
ТССААТССТТССССАССА	ТССААТССТТССССАССА	полинуклеотид (5)
ТССААТССТТССССА	ТССААТССТТССССА	полинуклеотид (6)

система 3

[матрица — икозануклеотид (1), затравки — олигонуклеотиды (2) — (6)] малоэффективной затравкой является тетра-нуклеотид (6). В соответствии с этими результатами минимальный размер олигонуклеотида-затравки мог быть определен в 5—7 мононуклеотидных звеньев. В этой же работе было показано, что в качестве матриц в реакции репликации могут быть использованы синтетические олиго- и полинуклеотиды, начиная с длины цепи в 9—12 нуклеотидных остатков.

Для изучения и отработки условий образования комплекса матрица — затравка Кораной и сопр. [75] был использован ряд синтетических полидезоксирибонуклеотидов, комплементарных R-цепи ДНК фага  $\phi 80$   $\text{psu}_{III}^{\dagger\dagger}$  (система 3).

При гибридизации полинуклеотида (3) \* с R-цепью ДНК фага  $\phi 80$   $\text{psu}_{III}^{\dagger\dagger}$  соотношение ДНК — полинуклеотид близко к эквимолярному. После совместной гибридизации с R-цепью полинуклеотида (1) и (3) могут ковалентно соединяться ДНК-лигазой. Это свидетельствует о специфической «посадке» полинуклеотидов (1) и (3). В то же время полинуклеотиды (1) и сегменты (2) и (2') связываются с матрицей в количестве, в 2—3 раза превышающем эквимолярное, т. е. для каждого из них существует по крайней мере два места связывания с ДНК.

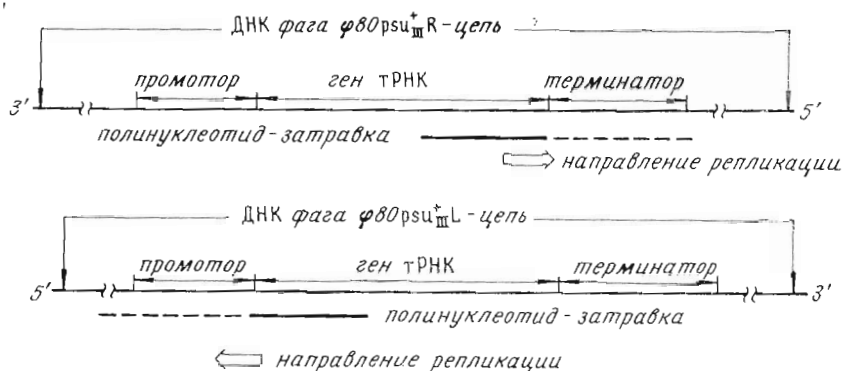
Очевидно, полинуклеотид (5) также может связываться не с одной последовательностью в составе ДНК, так как он образует с R-цепью комплекс с молярным соотношением полимер — ДНК, равным 1,8 : 1. Интересно, что при конкурентной гибридизации с R-цепью избытка  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$  и полинуклеотида (5) связывание последнего уменьшается вдвое, т. е.  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$  конкурирует с полинуклеотидом (5) в связывании только одного места.

Интересные результаты были получены и при изучении гибридизации с ДНК сегментов (4), (2) и (2'). Ундекануклеотид (4) не связывается с R-цепью, тогда как ундекануклеотид (2) и октануклеотид (2') обнаруживают хорошую способность к гибридизации. Как известно, на эффективность гибридизации кроме размера и состава олигонуклеотида значительное влияние оказывает вторичная структура места «посадки». Очевидно, именно это является причиной низкого связывания сегмента (4), так как в сравнимых условиях олиго-полинуклеотидные комплексы в 6—10 пар оснований имеют достаточную устойчивость [76, 77].

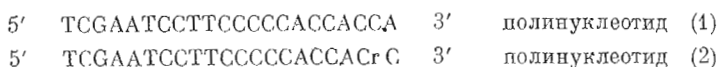
В ряде лабораторий [78—80] (подробнее см. обзор Свердлова [81]) предложено использование синтетических олигодезоксирибонуклеотидов заданной последовательности в качестве затравок для репликации при расшифровке первичной структуры определенных участков ДНК. Так, полученные Кораной [75] сведения об устойчивости комплексов ДНК — затравка с использованием в качестве последних различных олигодезоксирибонуклеотидов позволили ему осуществить одну из интереснейших и важных работ, непосредственно связанных с исследованием регуляторной роли отдельных фрагментов ДНК, — определение первичной структуры нетранскрибируемых промоторного [4] и терминаторного [5] участков гена тирозиновой  $\text{tRNA}$ . Источником ДНК, содержащей ген тирозиновой  $\text{tRNA}$ , явился бактериофаг  $\phi 80$   $\text{psu}_{III}^{\dagger\dagger}$ , полученный после введения гена-супрессора тирозиновой  $\text{tRNA}$  в ДНК фага  $\phi 80$  [82]. Подход к расшифровке промоторного и терминаторного участков можно проиллюстрировать схемой, из которой следует, что элонгация полинуклеотида-затравки, образующего комплементарный комплекс с R-цепью, позволяет определить (путем анализа последовательности полученной реплики) первичную структуру терминаторного участка гена  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$ . Первичная структура промоторного участка определяется аналогичным эксперимен-

\* В обозначении использованных для комплексообразования олигонуклеотидов сохранена терминология статьи Кораны [75]: сегментами названы олигонуклеотиды, использованные им в дальнейшем для лигазной «сборки» гена  $\text{tRNA}_{\text{su}_{III}}^{\text{Tyr}}$ ; полинуклеотидами — более крупные блоки, специально синтезированные для данной работы.

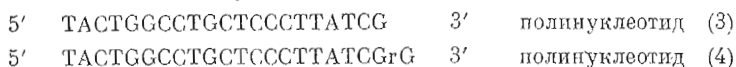
Схема



том с L-цепью. В качестве затравки для определения терминаторной последовательности использованы синтетические дезоксиполинуклеотиды (1) и (2):



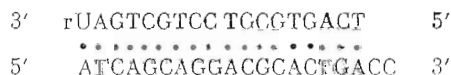
Аналогично для определения структуры промоторной области применены синтетические полинуклеотиды (3) и (4):



С помощью этого подхода в лаборатории Кораны была установлена последовательность 23 нуклеотидов терминаторного [5] и 29 нуклеотидов промоторного [4] участков гена тРНК<sup>Tyr</sup> (*E. coli*):



В этой же лаборатории проводится определение первичной структуры промоторного участка гена N-белка фага  $\lambda$ . В качестве затравки используется октадекануклеотид d (T-C-A-G-T-G-C-G-T-C-C-T-G-C-T-G-A-rU) [13]. Конечной целью этой работы является изучение механизма инициации транскрипции ДНК. Транскрипция ДНК *E. coli*, например, осуществляется одним ферментом — ДНК-зависимой РНК-полимеразой, — который, таким образом, должен узнавать промоторы всех генов, поэтому очень интересно сравнить их первичную структуру. Такое сопоставление уже позволило выявить ряд закономерностей [4, 49]. Дальнейшие исследования могут быть осуществлены с использованием синтетических промоторов, а также синтетических участков генов, кодирующих N-концы белков, продуцируемых фагом (стартовые точки транскрипции). Так, синтезированный в лаборатории Кораны [13] двуглазевой комплементарный комплекс



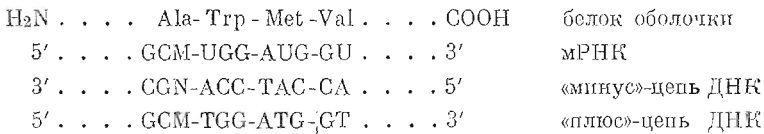
представляет собой начальный участок гена N-белка фага  $\lambda$ . Предполагается, что после расшифровки первичной структуры и синтеза промоторного участка изучаемого гена двуглазевой полинуклеотид, структура кото-





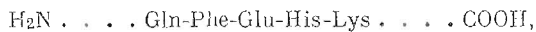
( $6000/4^8 \approx 1/10$ ) и ундекануклеотида ( $6000/4^{11} \approx 1/700$ ). Следовательно, можно ожидать, что применение этих олигонуклеотидов в качестве затравок репликации ДНК для анализа нуклеотидной последовательности обеспечит уникальную стартовую точку синтеза.

Большинство работ, связанных с комплексообразованием синтетических олигонуклеотидов и нативных нуклеиновых кислот, базируется на применении олигонуклеотидов, комплементарных заранее известной последовательности матрицы. Шотт и др. [79] подошли к целенаправленному синтезу затравок для репликации ДНК фага fd, используя известную аминокислотную последовательность белка оболочки этого фага [96]. В общем случае такой подход затруднен из-за вырожденности генетического кода [1, 2], т. е. невозможности по аминокислотной последовательности белка однозначно предсказать соответствующую нуклеотидную последовательность в мРНК. Однако для некоторых аминокислот, в частности метионина и триптофана, код не вырожден, и это позволяет утверждать, что, например, участок белка с последовательностью Ala-Trp-Met-Val (см. схему) кодируется мРНК, содержащей ундекануклеотид-GCMUGGAUGGU-, где M = A, C, G, или U (так как возможны четыре кодона для аланина; для валина все четыре возможных кодона начинаются последовательностью GU). В свою очередь такая последовательность мРНК предопределяет четыре варианта «плюс»- и «минус»-цепей соответствующей ДНК (как известно, матрицей для синтеза мРНК является «минус»-цепь [97]):

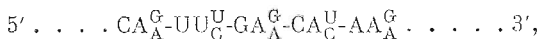


где N=A, T, G, C; M = U, A, C, G.

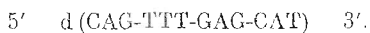
Вариант преодоления неопределенности, порождаемой вырожденностью кода, предложен недавно Ву [85] при выборе додекадезоксирибонуклеотида, частично или полностью комплементарного участку гена эндолизина, входящего в ДНК фага λ. Из известной аминокислотной последовательности



соответствующей, согласно генетическому коду, нуклеотидной последовательности РНК



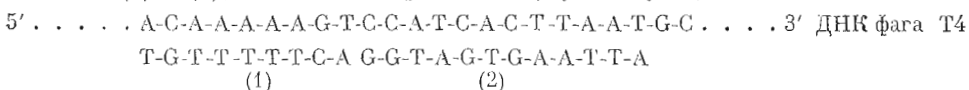
для синтеза был выбран додекануклеотид состава



Выбор обусловлен следующим: если в указанных кодонах третий нуклеотид представлен G или A, — выбирается G (U или C — выбирается U), так как при гибридизации в этом случае образуются либо совершенные пары, либо пара G·T, геометрия которой близка к «совершенной».

Надежным, хотя и трудоемким, способом обеспечения уникальности присоединения затравки к заданному участку ДНК является предложенный Нарангом метод «лигазной сборки» олигонуклеотида-затравки из двух олигомеров. В этом случае фермент соединяет блоки только при условии их полного и направленного комплексообразования с соседними участками ДНК, тем самым обеспечивается комплементарность матрицы и затравки на достаточно большом участке. Так, используя полученные генетическими методами [98, 99] сведения о первичной структуре участка гена лизоцима в ДНК фага T4, Наранг синтезировал пона- и додеканук-

леотиды (1) и (2), комплементарные этому участку [9, 10].



Олигомер, получаемый при ферментативном соединении блоков (1) и (2), будет затравкой дальнейшей репликации, надежно обеспечивающей уникальность стартовой точки.

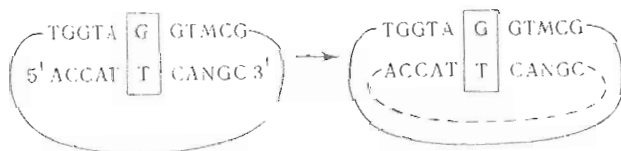
Таким образом, при использовании олигонуклеотидов в качестве затравок в реакции репликации в первую очередь необходимо доказать, что гибридизация затравки с ДНК и соответственно репликация комплементарной цепи ДНК происходит на заранее заданном участке.

### V. Использование олигонуклеотидов для модификации нуклеиновых кислот

Существует лишь одна область применения синтетических олигодезоксирибонуклеотидов, где эти структуры находятся в настоящее время «вне конкуренции», — создание строго селективно модифицированных РНК или ДНК. Располагая сведениями о структуре отдельных фрагментов или целых молекул нативных нуклеиновых кислот (или хотя бы сведениями о первичной структуре белков, кодируемых ими), исследователи получают возможность направленно изменять конформацию или функциональную активность отдельных участков этих полимеров путем введения в них синтетических фрагментов. При этом уместно отметить, что такого рода работы сопряжены со специфическими трудностями. Во-первых, как правило, для таких работ требуется не одна, а целая серия гетерогенных олигодезоксирибонуклеотидов, позволяющая выявить связь состава и структуры макромолекулы с ее биологической активностью. Во-вторых, ориентируясь на первичную структуру синтезируемого белка, представление о структуре соответствующего участка ДНК можно составить лишь с точностью до вырожденности аминокислотного кода. Пока проведены первые работы такого плана. Например, остроумным решением этой проблемы является метод, предложенный в одной из последних работ Шотта и Кесселя [100], позволяющий осуществить точечную мутацию (замену одного основания) без инактивации остального генома.

Идея заключается в осуществлении желаемой замены с помощью синтетической затравки — инициатора репликации — и ферментативном доращивании цепи ДНК. Шотт и Кессель предложили использовать в качестве затравок четыре синтетических ундекапуклеотида d(pCGNACCTACCA), где N = T, A, G, C (вырожденность кода не позволяет априорно выбрать один из них), соответствующих по последовательности (за исключением одного мононуклеотида) участку «минус»-цепи ДНК фага fd в районе цистрона белка оболочки.

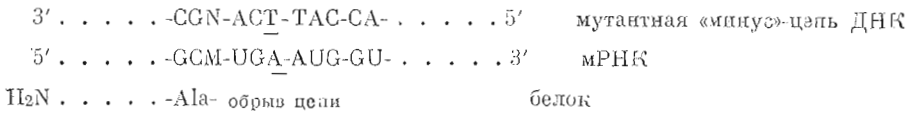
Гибридизация «плюс»-цепи ДНК фага дикого типа с синтетическим олигонуклеотидом должна приводить к образованию двуцепевого комплекса, который в дальнейшем может доращиваться в присутствии ДНК-полимеразы, полинуклеотид-киназы и полинуклеотид-лигазы до двуцепевой циклической ДНК, содержащей мутантную «минус»-цепь:



Достигаемая при этом точечная мутация в ДНК должна вызывать транскрипцию ее в мутантную мРНК, содержащую терминирующий UGA-ко-

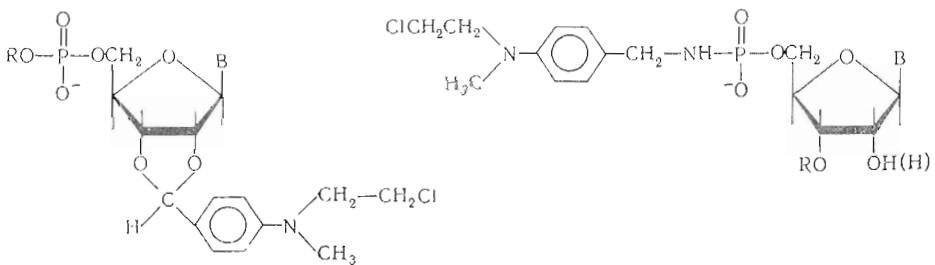


дон, что приведет при трансляции к обрыву растущей белковой цепи:



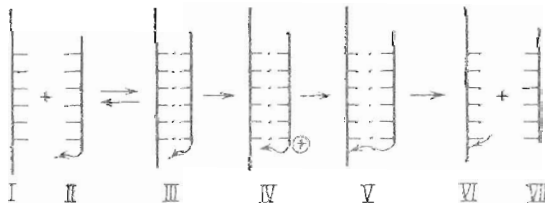
Строгая селективность, принципиально достижимая при взаимодействии гетерогенных олигонуклеотидов с нуклеиновыми кислотами, чрезвычайно привлекательна при разработке методов химической точечной модификации биополимеров. Метод направленной химической модификации отдельных мононуклеотидов различных РНК, названный методом «комплементарно адресующих агентов», предложен и развивается Кнорре и сотр. [101, 102]. Хотя до настоящего времени метод был опробован только с применением гомоолигонуклеотидов, принципиальной основой его является использование производных синтетических олигонуклеотидов с заданной нуклеотидной последовательностью, комплементарных определенному участку нативной нуклеиновой кислоты. Если такой синтетический олигонуклеотид содержит в качестве «некомплементарной добавки» соединение, способное выступать в роли модифицирующего агента, то в условиях комплексообразования «адресующего агента» с нуклеиновой кислотой достигается направленная модификация одного из гетероциклов, примыкающих к двуцепочечному участку.

Алкилирующими агентами могут быть производные 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензальдегида, соединенные с *цис*-гликольной группировкой адресующего олигонуклеотида, или 5'-фосфамидные производные этого олигонуклеотида, содержащие остаток 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензиламина:



где R — остаток олигонуклеотида, B — основание.

В обоих случаях олигонуклеотид связан с алкилирующим агентом кислотолabileй связью, легко расщепляющейся при pH 4. Поэтому общая схема алкилирования может быть представлена следующим образом:



где I — фрагмент цепи нуклеиновой кислоты, II — адресующий агент, III — комплекс нуклеиновая кислота — реагент, IV — комплекс нуклеиновая кислота — активная форма реагента, V — алкилированная нуклеиновая кислота, ковалентно и комплементарно связанная с адресующим олигонуклеотидом, VI — алкилированная нуклеиновая кислота, обработанная при pH 4, VII — адресующий олигонуклеотид.

Сближение алкилирующего агента с нуклеиновой кислотой, достигающееся в комплексе III, повышает не только избирательность, но и эффективность реакции. При алкилировании РНК из рибосом *E. coli* (адресующий агент — гексануклеозидпентафосфат  $(Ap)_5ARCl$  [102]) было показано, что алкилирование РНК вне комплекса не превышает 1%, в комплексе оно близко к количественному.

Некоторое нарушение специфичности алкилирования при использовании бензилиденовых производных, вероятно, связано с изменением конформации адресующего олигонуклеотида под влиянием арильного остатка алкилирующего компонента. Поэтому использование 5'-фосфамидных производных типа  $ClRCH_2NH(pA)_n$  [103] может быть более эффективным, поскольку для таких производных нарушения стэкинга между гетероциклическими основаниями не происходит, а арильный остаток оказывается сближенным с соседним адениновым основанием и вступает с ним в нековалентное взаимодействие, что должно приводить к некоторому увеличению компактности структуры [104]. Действительно, алкилирование РНК рибосом *E. coli* 5'-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)]-бензилфосфамидными производными олигонуклеотидов показало, что неспецифическое алкилирование составляет не более 0,3%. До определенной степени специфичность алкилирования может быть нарушена, так как использование 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-производных предусматривает стадию образования этилениммониевого катиона. При этом рядом с комплексом возникает положительный заряд, способный в принципе исказить локальную специфичность алкилирования; поэтому, возможно, более эффективно применение олигонуклеотидных производных типа  $CH_3OSO_2(CH_2)_2O(pA)_5$  [105], осуществляющих алкилирование по  $S_N2$ -механизму.

Недавно было показано, что метод адресующих агентов может быть использован с целью специфической модификации рибосомной РНК вблизи мРНК-связывающего центра. Установлено, что 2', 3'-O-[4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)]-бензилиденовые производные тетрааденилил- и гептааденилиладенозина могут выполнять роль аналогов мРНК и октануклеотидное производное эффективно алкилирует рибосомную РНК в комплексном комплексе [106, 107]. Модификация в большей степени затрагивает 30S-субъединицу рибосом, причем приобретаемая последними способность связывать лизил-тРНК без добавления  $poly(A)$  свидетельствует о присоединении олигонуклеотида к области мРНК-связывающего центра [107].

Интересным вариантом направленной модификации тРНК могут стать работы, базирующиеся на использовании РНК-лигазы. Так, в работе Кауфмана и Литтауэра [108] уже осуществлено получение тРНК<sup>Phe</sup> (дрожжи), имеющей точечную делецию в положении 37, путем последовательного расщепления тРНК, элиминирования Y-нуклеотида в этой позиции и репарации образующегося разрыва с помощью РНК-лигазы. Учитывая, что группой Отсули [109, 110] синтезирован ряд олигонуклеотидов, соответствующих 5'- и 3'-концевым последовательностям тРНК<sup>Ala</sup> (дрожжевая), можно ожидать, что в ближайшее время будут предприняты попытки направленной модификации тРНК путем лигазного включения синтетических олигонуклеотидов с заранее заданными заменами.

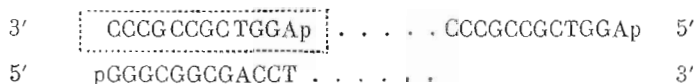
## VI. Введение синтетических олиго- и полинуклеотидов в нативные структуры

Кардинальным в настоящее время является вопрос о способе введения синтетических полинуклеотидов в нативные ДНК, в результате чего ДНК хозяина приобретет новые функциональные свойства. Вопрос этот приобретает особую остроту в связи с появлением сведений о возможности введения дополнительной генетической информации в ДНК бактериальных плазмид [111—114]. Это позволяет надеяться на разработку в бли-

жайшее время методов введения в плазмиды не только генов животных, но и синтетических полинуклеотидов, кодирующих определенные полипептиды.

Особенно перспективным может оказаться использование «комбинированных» — химических и генетических методов, с помощью которых искусственные ДНК-фрагменты будут снабжены синтетическими участками, заведомо узнаваемыми определенными рестриктазами, что обеспечит возможность введения этих фрагментов в геном клетки.

Безусловно, привлекателен подход, уже реализованный Нуссбаумом [115], осуществившим на основании сведений о первичной структуре «липких концов» фага  $\lambda$  [116] синтез додекануклеотида, комплементарного одному из них. После того как было установлено, что синтетический додекануклеотид образует достаточно прочный комплекс с участком нативной ДНК, было осуществлено лигазное встраивание этого додекануклеотида в ДНК:



Эта работа, представляющая собой первый опыт введения синтетического олигомера в природную ДНК, делает реальной перспективу направленного изменения структуры ДНК с помощью синтетических олиго- и полинуклеотидов. Действительно, синтетический фрагмент, кроме «липкого» участка, обеспечивающего комплементацию его с макромолекулой ДНК, может содержать и смысловую последовательность, изменяющую генетическую информацию этой ДНК.

В заключение отметим, что рассмотренные выше работы открывают широкие практические возможности для использования синтетических олиго- и полинуклеотидов с заданной последовательностью в первую очередь в качестве затравок в реакциях репликации, транскрипции, обратной транскрипции. Перспективным представляется получение направленных мутаций как с помощью затравок, так и с помощью производных олигонуклеотидов, несущих химически активные группы — модификаторы, поиск которых еще предстоит. Скорее всего ряд таких производных найдет применение для блокирования и выявления локализации функционально важных участков нуклеиновых кислот, а также в регуляции реакций репликации, транскрипции и обратной транскрипции. Предстоит также поиск химических подходов к введению в нативные нуклеиновые кислоты синтетических фрагментов, несущих определенную генетическую информацию.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Khorana H. G., Büchi H., Ghosh H., Gupta N., Jacob T. M., Kössel H., Morgan R., Narang S. A., Ohtsuka E., Wells R. D. (1966) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 39—49.
2. Nirenberg M., Leder P., Bernfield M., Brimacombe R., Trupin J., Rottman F., O'Neal C. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 1161—1168.
3. Khorana H. G., Agarwal K. L., Büchi H., Caruthers M. H., Gupta N. K., Kleppe K., Kumar A., Ohtsuka E., RajBhandary U. L., van de Sande J. H., Sgaramella V., Tezga T., Weber H., Yamada T. (1972) J. Mol. Biol., 72, 209—247.
4. Sekiya T., Khorana H. G. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 2978—2982.
5. Loewen P. S., Sekiya T., Khorana H. G. (1974) J. Biol. Chem., 249, 217—226.
6. Берлин Ю. А., Ефимов В. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Чахмахчева О. Г., Шлигарова Л. Н. (1975) Биоорг. химия, 1, 1121—1129.
7. Бадашсева А. Г., Берлин Ю. А., Болдырева Е. Ф., Ивановская М. Г., Киорре Д. Г., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Прокофьев М. А., Смирнов В. Д., Шабарова З. А., Шубина Т. Н. (1973) Химия природн. соедин., 394—402.
8. Doel M. T., Smith M. (1973) FEBS Lett., 34, 99—102.
9. Narang S. A., Itakura K., Bahl C. P., Wigfield Y. Y. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 49, 445—452.

10. Narang S. A., Itakura K., Bahl C. P., Katagiri N. (1974) *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 7074—7078.
11. Padmanabhan R., Jay E., Wu R. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 2510—2514.
12. Poonian M. S., Nowoswiat E. F., Tobias L., Nussbaum A. L. (1973) *Bioorganic chemistry*, **2**, 322—336.
13. Agarwal K. L., Berlin Yu. A., Kleid D. G., Smirnov V. D., Khorana H. G. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 5563—5573.
14. Itakura K., Katagiri N., Narang S. A. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4592—4600.
15. Uhlenbeck O. C., Baller J., Doty P. (1970) *Nature*, **225**, 508—510.
16. Uhlenbeck O. C. (1972) *J. Mol. Biol.*, **65**, 25—41.
17. Lewis J. B., Doty P. (1970) *Nature*, **225**, 510—512.
18. Högenauer G. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **12**, 527—532.
19. Pongs O. (1972) *FEBS Lett.*, **28**, 284—286.
20. Pongs O., Griese K. (1972) *FEBS Lett.*, **26**, 297—300.
21. Pongs O., Bald R., Reinwald E. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **32**, 117—125.
22. Schimmel P. R., Uhlenbeck O. C., Lewis J. B., Dickson L. A., Eldred E. W., Schreier A. A. (1972) *Biochemistry*, **14**, 642—646.
23. Vasilenko S. K., Ankilova V. N., Dimitrova F. F., Serbo N. A. (1972) *FEBS Lett.*, **27**, 215—218.
24. Каграманов В. Н., Друца В. Л., Чичкова Н. В., Смирнов В. Д., Шабарова З. А., Богданов А. А., Прокофьев М. А. (1974) Докл. АН СССР, **214**, 1192—1194.
25. Yaniv M., Barrell B. G. (1969) *Nature*, **222**, 278—279.
26. Kim S. H., Quigley G. J., Suddath F. L., McPherson A., Sneden D., Kim J. J., Weinzierl J., Rich A. (1973) *Science*, **179**, 285—288.
27. Eisinger J., Spahr P. F. (1973) *J. Mol. Biol.*, **73**, 131—137.
28. Helene C., Brun F., Yaniv M. (1971) *J. Mol. Biol.*, **58**, 349—365.
29. Danchin A., Grunberg-Manago M. (1970) *FEBS Lett.*, **9**, 327—330.
30. Miller P. S., Barrett J. C., Ts'o P. O. P. (1974) *Biochemistry*, **13**, 4887—4896.
31. Fellner P., Ehresmann C., Stiegler P., Ebel J. P. (1972) *Nature, New Biol.*, **239**, 1—5.
32. Метелев В. Г., Степанова О. Б., Родионова Н. П., Друца В. Л., Смирнов В. Д., Шабарова З. А., Атабеков И. Г., Прокофьев М. А. (1974) Докл. АН СССР, **218**, 976—979.
33. Min Jou W., Haegeman G., Ysebaert M., Fiers W. (1972) *Nature*, **237**, 82—88.
34. Gilham P. T. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 1311—1312.
35. Носова В. В., Вельмога И. С., Соколова Н. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1974) Докл. АН СССР, **219**, 1134—1136.
36. Gilham P. T. (1968) *Biochemistry*, **7**, 2809—2813.
37. Василенко С. К., Обухова Л. В., Ямкова В. И. (1974) Биохимия, **36**, 1288—1293.
38. Astell C. R., Smith M. (1972) *Biochemistry*, **11**, 4114—4120.
39. DeLarco J., Guroff G. (1972) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1233—1240.
40. Swan D., Aviv H., Leder P. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 1967—1971.
41. Nakazato H., Edmonds M. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 3365—3367.
42. Scheffler I. E., Richardson C. C. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 5736—5745.
43. Lamed R., Levin Y., Wilchec M. (1973) *Biochim. et biophys. acta*, **304**, 231—235.
44. Barry S., O'Carra P. (1973) *FEBS Lett.*, **37**, 134—139.
45. Erhan S., Northrup L. G., Leach F. R. (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **53**, 646—652.
46. Sheldon R., Jurale C., Kates J. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 417—421.
47. Ильина Е. В. (1975) Канд. дис. Синтез и свойства олигодезоксирибонуклеотидов с повторяющейся тринуклеотидной последовательностью, МГУ.
48. Venetianer P., Leder P. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3892—3895.
49. Богданов А. А., Леднева Р. К. (1975) в сб. Итоги науки и техники, сер. «Молекулярная биология», т. 5. Нуклеиново-белковое узнавание.
50. Zachau H. G. (1969) *Angew. Chem.*, **81**, 645—662.
51. Yarus M. (1969) in *Annual Review of Biochemistry* (Snell E. E., ed.), v. 38, pp. 841—880, Palo Alto, California, USA.
52. Yarus M., Barrell B. G. (1971) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **43**, 729—734.
53. Mirzabekov A. D., Kazarinova L. Ya., Lastity D., Baev A. A. (1969) *FEBS Lett.*, **3**, 268—270.
54. Barret J. C., Miller P. S., Ts'o P. O. P. (1974) *Biochemistry*, **13**, 4897—4905.
55. Bernardi A., Spahr P. F. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3033—3037.
56. Метелев В. Г. (1974) Канд. дис. Изучение комплексообразования синтетических олигодезоксирибонуклеотидов с РНК фара R17, МГУ.
57. Громова Е. С., Туяглов В. В., Шабарова З. А. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **240**, 1—11.
58. Тяглов В. В., Зесин С. В., Громова Е. С., Сергеев Г. Б., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1974) Молекулярн. биология, **8**, 595—602.
59. Громова Е. С., Долинная Н. Г., Смирнов В. В., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1975) Биорг. химия, **1**, 1716—1728.
60. Schara R., Müller W. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **29**, 210—216.
61. Patel D. J. (1974) *Biochemistry*, **13**, 2388—2395.

62. Sobell H. M., Jain S. C. (1972) *J. Mol. Biol.*, **68**, 21—34.
63. Zain B. S., Weissmann S. M., Dhar R., Pan J. (1974) *Nucl. Acid. Res.*, **1**, 577—594.
64. Dhar R., Weissmann S. M., Zain B. S., Pan J., Lewis A. M. (1974) *Nucl. Acid. Res.*, **1**, 595—614.
65. Maniatis T., Ptashne M., Barrell B. G., Donelson J. (1974) *Nature*, **250**, 394—397.
66. Gilbert W., Maxam A. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 3581—3584.
67. Old R., Murray K., Roizes G. (1975) *J. Mol. Biol.*, **92**, 331—339.
68. Hedgpeth J., Goodman H. M., Boyer H. W. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3448—3452.
69. Bigger C. A., Murray K., Murray N. E. (1973) *Nature New Biol.*, **244**, 40—43.
70. Goulian M. (1968) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **33**, 11—20.
71. Goulian M., Goulian S. H., Codd E. E., Blumenfield A. Z. (1973) *Biochemistry*, **12**, 2893—2901.
72. Oertel W., Schaller H. (1972) *FEBS Lett.*, **27**, 316—320.
73. Oertel W., Schaller H. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **35**, 106—113.
74. Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H. G. (1971) *J. Mol. Biol.*, **56**, 341—361.
75. Besmer P., Miller R. C., Caruthers M. H., Kumar A., Minamoto K., van de Sande J. H., Sidorova N., Khorana H. G. (1972) *J. Mol. Biol.*, **72**, 503—522.
76. Gupta N. K., Ohtsuka E., Sgaramella V., Buchi H., Kumar A., Weber H., Khorana H. G. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **60**, 1338—1344.
77. Agarwal K. L., Kumar A., Khorana H. G. (1972) *J. Mol. Biol.*, **72**, 351—373.
78. Wu R., Donelson J., Padmanabhan R., Hamilton R. (1972) *Bull. Inst. Pasteur Paris*, **70**, 203—233.
79. Shott H., Fischer D., Kössel H. (1973) *Biochemistry*, **12**, 3447—3453.
80. Loewen P. C., Khorana H. G., (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 3489—3499.
81. Свердлов Е. Д. (1975) в сб. *Итоги науки и техники, сер. «Молекулярная биология»*, т. 4.
82. Russel R. L., Abelson J. N., Landy A., Gefter M. L., Brenner S., Smith J. D. (1970) *J. Mol. Biol.*, **47**, 1—13.
83. Sanger F., Donelson J. E., Coulson A. R., Kössel H., Fischer D. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1209—1213.
84. Schott H. (1974) *Macromol. Chem.*, **175**, 1683—1693.
85. Wu R., Tu C. D., Padmanabhan R. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **55**, 1092—1099.
86. Mehrotra B. D., Khorana H. G. (1965) *J. Biol. Chem.*, **240**, 1750—1753.
87. Денисова Л. Я., Загребельный С. Н., Пустошилова Н. М. (1974) *Молекулярная биология*, **8**, 643—651.
88. Nishimura S., Jacob T. M., Khorana H. G. (1964) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **52**, 1494—1501.
89. Morgan A. R. (1970) *J. Mol. Biol.*, **52**, 441—446.
90. Terao T., Dahlberg J. E., Khorana H. G. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 6157—6156.
91. Kleppe R., Khorana H. G. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 6149—6156.
92. Green M., Gerard G. F. (1974) *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Davidson T. N., Cohn W. E. eds.), **14**, 188—325, Academic Press, N. Y.—London.
93. Киселев Л. Л. (1975) *Журн. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева*, **20**, 288—296.
94. Verma I. M., Firtel R. A., Lodish H. F., Baltimore D. (1974) *Biochemistry*, **13**, 3917—3921.
95. Метелев В. Г., Степанова О. Б., Смирнов В. Д., Шабарова Э. А., Прокофьев М. А., Фролова Л. Ю., Граевская Н. А., Киселев Л. Л. (1974) *Докл. АН СССР*, **217**, 957—960.
96. Asbeck F., Bayreuther K., Köhler H., Wettstein G., Braunitzer G. (1969) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**, 1047—1066.
97. Sugiyama M., Okamoto R., Takanami M. (1969) *J. Mol. Biol.*, **43**, 299—315.
98. Terzaghi E., Okada Y., Streisinger G., Emrich J., Inouye M., Tsugita A. (1966) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **56**, 500—507.
99. Okada Y., Streisinger G., (Emrich) Owen J., Newton J., Tsugita A., Inouye M. (1972) *Nature*, **236**, 338—341.
100. Shott H., Kössel H. (1973) *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 3778—3785.
101. Гринева Н. И., Зарыгова В. Ф., Кнорре Д. Г. (1968) *Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим.*, вып. 5, № 12, 118—124.
102. Grineva N. I., Karпова G. G. (1973) *FEBS Lett.*, **32**, 351—355.
103. Василенко С. К., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Козоровицкий А. Я., Ломаккина Т. С., Саарма М. Ю., Тиунов М. П. (1973) *Докл. АН СССР*, **212**, 1227—1230.
104. Grineva N. I., Kozorovitsky A. Ya., Lomakina T. S. (1972) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1603—1609.
105. Сайкович Е. Г. (1973) *Канд. дис. Специальные реагенты для метилирования нуклеиновых кислот*, Новосибирск.
106. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1972) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 2377—2378.

107. Будкер В. Г., Гиршович А. С., Гриньева Н. И., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Кобец Н. Д. (1973) Докл. АН СССР, **211**, 725—728.
108. Kaufmann G., Littauer U. Z. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 3741—3745.
109. Ohtsuka E., Ubasawa M., Ikehara M. (1971) J. Amer. Chem. Soc., **93**, 2296—2301.
110. Ohtsuka E., Ubasawa M., Morioka S., Ikehara M. (1973) J. Amer. Chem. Soc., **95**, 4725—4733.
111. Cohen S. N., Chang A. C. Y., Boyer H. W., Helling R. B. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **70**, 3240—3244.
112. Morrow J. F., Cohen S. N., Chang A. C. Y., Boyer H. W., Goodman H. M., Helling R. B. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 1743—1747.
113. Chang A. C. Y., Cohen S. N. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 1030—1034.
114. Berg P., Baltimore D., Boyer H. W., Cohen S. N., Davis R. W., Hogness D. S., Nathans D., Poblin R., Watson J. D., Weissmann S., Zinder N. D. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **71**, 2593—2594.
115. Harvey C. L., Wright R., Nussbaum A. L. (1973) Science, **179**, 291—293.
116. Wu R., Taylor E. (1974) J. Mol. Biol., **57**, 491—511.

Поступила в редакцию  
23.VI.1975

## SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES AS A TOOL FOR STUDYING NATURAL STRUCTURES AND PROCESSES

SMIRNOV V. D., METELEV V. G., SHABAROVA Z. A.,  
PROKOFIEV M. A.

*Laboratory of Bioorganic Chemistry, Department of Chemistry,  
M. V. Lomonosov State University, Moscow*

In the review, modern areas of utilization of oligonucleotides in the studies in molecular biology and bioorganic chemistry are described. The review comprises the following sections: oligonucleotides used for «probing» the three-dimensional structure of different RNA; oligopolynucleotide interaction as a basis for isolating individual RNA; study of nucleic acid-protein interaction with the use of synthetic oligonucleotides; synthetic oligonucleotides as primers in polynucleotide synthesis; the application of oligonucleotides for predetermined modification of nucleic acids; incorporation of synthetic oligo- and polynucleotides into the native structures. The review contains analysis of the perspectives of the use of synthetic oligonucleotides for studying the structure and function of natural biopolymers.

---