



УДК 577.113.4 (+.7):577.152.31*264'14

РАСЩЕПЛЕНИЕ РНК В СОСТАВЕ ГИБРИДНЫХ ДУПЛЕКСОВ РИБОНУКЛЕАЗОЙ Н *E. coli* II. СУБСТРАТНЫЕ СВОЙСТВА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ НЕНУКЛЕОТИДНЫЕ ВСТАВКИ

© 2000 г. П. Е. Воробьев[#], И. А. Пышная, Д. В. Пышный, М. Н. Репкова, А. Г. Веньямина, М. А. Зенкова, Е. М. Иванова, К. Скалфи-Хапп*, Х. Зелигер*, Ж. Бонора**, В. Ф. Зарытова

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, Новосибирск,
630090, просп. Акад. Лаврентьева, 8;

* Университет г. Ульма, Отделение полимеров, Ульм, Германия;

** Университет г. Триеста, Отделение химии, Триест, Италия

Поступила в редакцию 18.04.2000 г. Принята к печати 16.06.2000 г.

Исследованы свойства 20-звенных “мостиковых” олигодезоксирибонуклеотидов, в которых фрагменты коротких олигомеров соединены гексаметилендиоловыми и гексаэтиленгликолевыми вставками. Показано, что такие олигонуклеотиды способны образовывать с ДНК и РНК комплементарные комплексы, термостабильность которых зависит от длины и числа ненуклеотидных вставок. Гибридные комплексы “мостиковых” олигонуклеотидов являются субстратами рибонуклеазы Н *E. coli*. При введении в 20-мер от одной до трех ненуклеотидных вставок эффективность гидролиза РНК в соответствующих гибридных комплексах снижается всего в 1.2–1.4 раза. Наиболее существенное влияние ненуклеотидные вставки оказывают на состав продуктов гидролиза РНК. Выявлено, что в составе гибридных дуплексов с “мостиковыми” олигонуклеотидами РНКазы Н одновременно гидролизует РНК с 3'-конца дуплексных участков, формируемых каждым олигонуклеотидным фрагментом “мостикового” олигонуклеотида. Наличие на 3'-конце олигодезоксирибонуклеотида инвертированной 3'-3'-фосфодиэфирной связи не оказывает существенного влияния на эффективность действия РНКазы Н.

Ключевые слова: антисмысловые олигонуклеотиды; “мостиковые” олигодезоксирибонуклеотиды, ненуклеотидные вставки; рибонуклеаза Н; комплементарные комплексы, термостабильность.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных механизмов подавления экспрессии генов с помощью антисмысловых олигонуклеотидов считается расщепление мРНК в составе гибридных РНК/ДНК-дуплексов рибонуклеазами Н [2]. Это обуславливает необходимость исследования таких антисенс-олигонуклеотидов на их способность стимулировать гидролиз комплементарной РНК РНКазой Н.

“Мостиковые” олигонуклеотиды, содержащие олигометилендиоловые и олигоэтиленгликолевые [3–7], олигоаргининовые [8, 9], дидезоксирибозные [10, 11] и другие вставки [12, 13], были предложены ранее как инструменты исследования взаимодействий в коротких олигонуклеотидных дуплексах и триплексах, а также как потен-

циальные ген-направленные соединения. Однако способность гибридных комплексов, образованных с участием мостиковых олигодезоксирибонуклеотидов, активировать действие РНКазы Н систематически не изучалась, и лишь несколько работ свидетельствуют о наличии у них субстратных свойств [4, 5, 9].

В данной работе исследовано влияние гексаметилендиоловых и гексаэтиленгликолевых вставок на гибридизационные свойства “мостиковых” олигонуклеотидов и на процесс гидролиза РНК в гибридных комплексах “мостиковых” олигонуклеотидов под действием РНКазы Н.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние модификации межнуклеотидных фосфодиэфирных связей в “мостиковых” олигодезоксирибонуклеотидах на способность последних активировать рибонуклеазу Н было исследовано на примере расщепления 20-звенного олигорибонуклеотида (rM) [1] в комплексах с нативным олигодезоксирибонуклеотидом и с олигодезокси-

Сообщение I см. [1].

Сокращения: НК – нуклеиновые кислоты, НЕРЕС – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота. Префикс “d” в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

[#] Автор для переписки (e-mail: vorobuev@niboch.nsc.ru; тел.: (3832) 39-62-75).

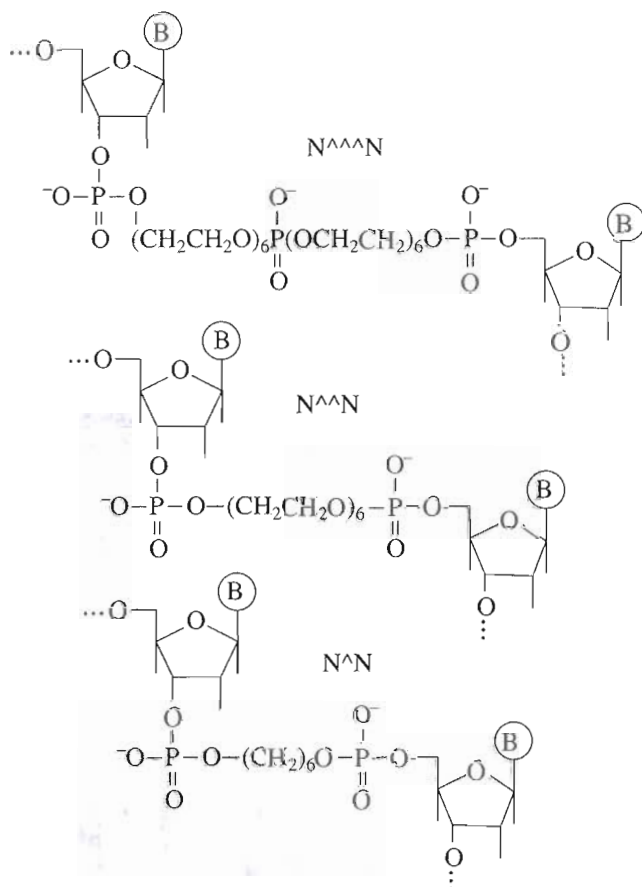
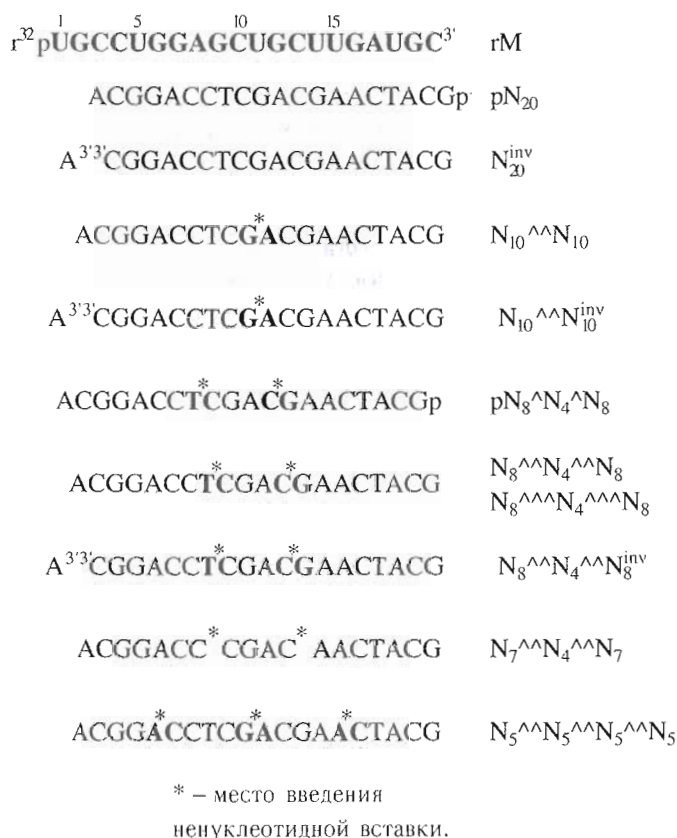


Схема. Структура всех олигонуклеотидов (кроме rM) дана в направлении от 3'-к 5'-концу. В отмеченных случаях на 3'-конце олигонуклеотида введена 3'-3'-межнуклеотидная связь.

рибонуклеотидами, содержащими ненуклеотидные вставки (гексаметилендиоловые и гексаэтиленгликолевые), а также инвертированную межнуклеотидную связь на 3'-конце. Влияние числа ненуклеотидных вставок в олигонуклеотиде было рассмотрено на примере 20-звенных олигонуклеотидов, состоящих из различных олигонуклеотидных фрагментов, соединенных гексаэтиленгликолевыми мостиками (N₁₀^{^^}N₁₀, N₈^{^^}N₄^{^^}N₈, N₅^{^^}N₅^{^^}N₅^{^^}N₅), а влияние длины ненуклеотидной вставки – на примере олигомеров, состоящих из трех фрагментов (окта-, тетра- и октамеров), соединенных гексаметилендиоловыми, гексаэтиленгликолевыми мостиками, а также ди(гексаэтиленгликоль)фосфатными группами (pN₈^{^^}N₄^{^^}N₈, N₈^{^^}N₄^{^^}N₈ и N₈^{^^}N₄^{^^}N₈, соответственно) (см. схему).

Эффективность расщепления РНК под действием РНКазы Н в гибридных дуплексах зависит от ряда факторов, в том числе от термостабильности комплекса РНК-мишень · олигодезоксирибонуклеотид. Поэтому первоначально было исследовано влияние ненуклеотидных вставок на

комплексообразующую способность “мостиковых” олигонуклеотидов.

Как видно из рис. 1, первая производная кривой плавления комплекса РНК-мишени с 20-звенным немодифицированным олигомером pN₂₀ имеет два температурных максимума (кривая 1), что свидетельствует об образовании, по крайней мере, двух достаточно прочных форм комплекса с T_{max} 66 и 75°C. Введение в олигонуклеотид двух гексаметилендиоловых мостиков приводит к падению температуры плавления его комплекса до 54°C (кривая 2). Дифференциальная кривая плавления комплекса rM · pN₈^{^^}N₄^{^^}N₈ имеет четкий вид с нечетко выраженным максимумом. Следует отметить, что кривые ренатурации гибридных комплексов полностью совпадают с кривыми денатурации. Это свидетельствует о целостности молекул РНК в условиях плавления. В отличие от гибридных комплексов, сформированные олигодезоксирибонуклеотидами dM · pN₂₀ и dM · pN₈^{^^}N₄^{^^}N₈ (dM – ДНК-мишень со структурой как у rM), имеют дифференциальные кривые плавления с четко выраженным максимумом и температурой плавления ниже соответствующих

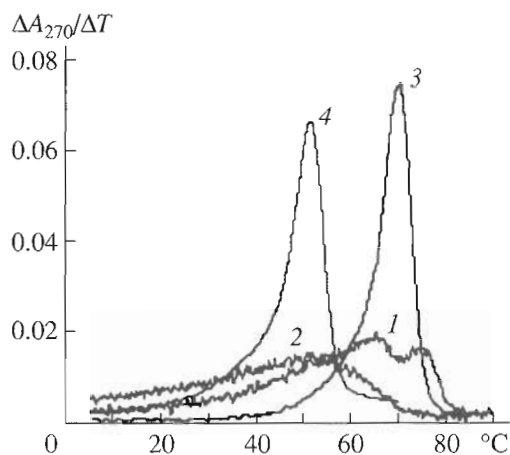


Рис. 1. Дифференциальные кривые плавления комплексов олигорибонуклеотида гМ и его ДНК-аналога dМ с нативным и “мостиковым” олигодезоксирибонуклеотидами: гМ · pN₂₀ (1), гМ · pN₈^{N₄}N₈ (2), dМ · pN₂₀ (3), dМ · pN₈^{N₄}N₈ (4). Условия плавления см. в “Эксперимент. части”.

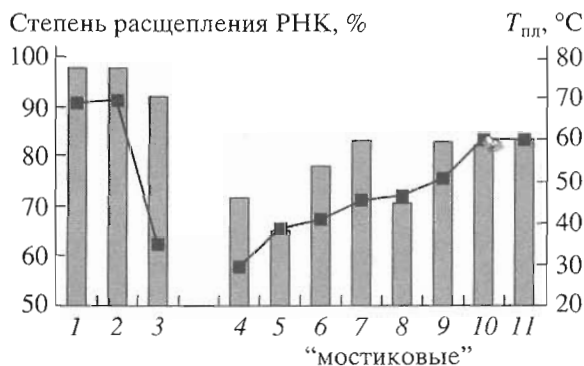


Рис. 2. Температура плавления комплексов (■) олигонуклеотидов с ДНК-матрицей dМ и степень расщепления РНК-мишени гМ (10^{-7} М) в гибридных комплексах с этими олигонуклеотидами (2×10^{-6} М) под действием РНКазы Н через 1 ч реакции (столбики): pN₂₀ (1); pN₂₀^{inv} (2); pN₈ + pN₄ + pN₈ (3); N₅^{N₅}N₅^{N₅}N₅ (4); N₇^{N₄}N₇ (5); N₈^{N₄}N₈ (6); N₈^{N₄}N₈ (7); N₈^{N₄}N₈^{inv} (8); pN₈^{N₄}N₈ (9); N₁₀^{N₁₀} (10); N₁₀^{N₁₀}^{inv} (11). Условия плавления и гидролиза см. в “Эксперимент. части”.

гибридных комплексов на 6 и 3°C (рис. 1, кривые 3, 4).

Гиперхромный эффект при плавлении РНК–ДНК- и ДНК–ДНК-дуплексов, рассчитанный из интегральных кривых плавления как величина прироста общего оптического поглощения исследуемого образца в интервале температур от 5 до 80°C, практически совпадает (33 и 29% соответственно). Резко отличается лишь высота дифференциальных кривых, что является отражением

кооперативности процесса плавления. В случае ДНК–ДНК-дуплексов плавление протекает высококооперативно, в то время как кривая денатурации РНК–ДНК-дуплекса является характерной для реализации нескольких структурных переходов. Поэтому влияние ненуклеотидных мостиков на гибридизационную способность олигонуклеотидов исследовали далее, используя в качестве мишени 20-звенный олигодезоксирибонуклеотид dМ, последовательность которого идентична последовательности РНК-мишени гМ.

Увеличение длины мостика, т.е. замена гексаметилендиолового мостика на гексаэтиленгликолевый (N₈^{N₄}N₈) или фосфодиэфир гексаэтиленгликоля (N₈^{N₄}N₈), приводит к еще большей потере стабильности комплекса (рис. 2 кривые 7, 6, ср. рис. 1, кривая 4). Еще меньшей стабильностью обладает комплекс олигонуклеотида N₇^{N₄}N₇, в котором мостики заменяют пропущенные нуклеотиды, фланкирующие центральный тетрамер, т.е. соединяют с тетра-нуклеотидом гептануклеотидные фрагменты (рис. 2, 5). Следует отметить, что стабильность комплексов “мостиковых” олигомеров, содержащих тетра- и октануклеотидные фрагменты, меньшая по сравнению с комплексом природного 20-звенного олигомера (рис. 2, 1), превышает термостабильность комплекса, образованного тандемом этих коротких олигонуклеотидных фрагментов, не соединенных мостиками (рис. 2, 3). (Дифференциальная кривая плавления комплекса dМ · N₈ + N₄ + N₈ имеет два максимума – при 35 и 24°C [14].)

Как видно из данных, приведенных на рис. 2, стабильность комплекса “мостикового” олигонуклеотида существенно зависит от длины его нуклеотидных фрагментов. Из всех рассматриваемых модифицированных 20-меров комплекс с РНК максимальной стабильности образует олигонуклеотид, содержащий два декануклеотидных фрагмента, dМ · N₁₀^{N₁₀} (рис. 2, 10), а минимальной – олигомер, составленный из четырех пентануклеотидов, dМ · N₅^{N₅}N₅^{N₅}N₅ (рис. 2, 4). Полученные данные о термической устойчивости ДНК/ДНК-комплексов “мостиковых” олигонуклеотидов позволяют предположить, что все рассматриваемые олигонуклеотиды, за исключением N₅^{N₅}N₅^{N₅}N₅, могут полностью связываться с РНК-мишенью в достаточно широком интервале концентраций при 20°C.

Влияние концентрации “мостиковых” олигонуклеотидов на их способность активировать гидролиз РНК в составе гибридных комплексов под действием РНКазы Н определяли, сравнивая предельную степень расщепления ³²P-меченой РНК-мишени гМ (1×10^{-7} М) в присутствии исследуемого олигонуклеотида в концентрации от 1×10^{-7} до 2×10^{-6} М при 20°C. Поскольку в гибридном комплексе гМ · pN₂₀ расщепление РНК про-

текает с 3'-конца [1], детекцию продуктов гидролиза проводили после гель-электрофореза в денатурирующем ПААГ по распределению ^{32}P -метки, введенной на 5'-конец РНК-мишени, что позволяет регистрировать 5'-концевые продукты деградации РНК. Как видно из рис. 3а, эффективность гидролиза РНК возрастает с увеличением используемых избытков олигонуклеотида (γ) над концентрацией РНК только в случае олигомера $\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5$, обладающего минимальными гибридизационными свойствами (кривая 5). При использовании комплексов остальных исследуемых олигонуклеотидов как нативных, так и содержащих нуклеотидные вставки, в том числе и с инвертированной межнуклеотидной связью на 3'-конце, степень расщепления РНК практически не зависит от концентрации олигодезоксирибонуклеотида в интервале 10^{-7} – 2×10^{-6} М (например, рис. 3а и вставка). Это свидетельствует о том, что во всех случаях кроме олигомера $\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5$ РНК-мишень в исследуемом интервале концентраций олигодезоксирибонуклеотидов полностью ассоциирована в комплементарном комплексе. В случае $\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5$, обладающего наименьшими комплексообразующими свойствами, практически полное связывание РНК-мишени может достигаться только при максимальной концентрации олигомера – 2×10^{-6} М (при 20°C)*.

Сравнение степени расщепления РНК-мишени, достигаемой за 1 ч в комплексах с олигомерами (рис. 2), позволяет сказать, что гибридные комплексы “мостиковых” 20-звенных олигонуклеотидов оказываются достаточно эффективными субстратами РНКазы Н. Следует отметить, что в данных условиях степень расщепления РНК-мишени в комплексе с нативным 20-звенным олигонуклеотидом несколько выше по сравнению с эффективностью в комплексах, образованных “мостиковыми” олигомерами. Как видно из рис. 2, в комплексах олигомеров $\text{pN}_8^{\wedge}\text{N}_4^{\wedge}\text{N}_8$ и $\text{N}_8^{\wedge}\text{N}_4^{\wedge}\text{N}_8$, в которых короткие олигонуклеотиды соединены гексаметилендиоловыми или гексаэтиленгликолевыми мостиками, степень гидролиза РНК, достигаемая за 1 ч, падает на 9–20%. Увеличение размеров мостика до диэфира гексаэтиленгликоля в комплексе $\text{rM} \cdot \text{N}_8^{\wedge}\text{N}_4^{\wedge}\text{N}_8$ приводит к дальнейшему падению степени гидролиза РНК.

* $T_{\text{пл}}$ комплекса $\text{dM} \cdot \text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5$ при концентрации одной цепи 1.3×10^{-5} М в отсутствие MgCl_2 составляет 30°C , в условиях проведения реакции – концентрации $\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5$ 2×10^{-6} М и в буфере, содержащем 0.01 М MgCl_2 , температура плавления должна мало отличаться от этого значения, поскольку падение температуры плавления вследствие понижения концентрации олигомера на порядок компенсируется позитивным влиянием ионов Mg^{2+} [15].

Эффективность деструкции РНК в комплексах “мостиковых” олигонуклеотидов, содержащих один и два гексаэтиленгликолевых мостика, $\text{N}_{10}^{\wedge}\text{N}_{10}$ и $\text{N}_8^{\wedge}\text{N}_4^{\wedge}\text{N}_8$, практически одинакова, несмотря на их различные гибридизационные свойства. Однако, если обращение полярности 3'-терминальной межнуклеотидной связи в олигомерах $\text{N}_{20}^{\text{inv}}$ и $\text{N}_{10}^{\wedge}\text{N}_{10}^{\text{inv}}$ практически не оказывает влияния на степень расщепления РНК в их гибридных комплексах, то в комплексе $\text{rM} \cdot \text{N}_8^{\wedge}\text{N}_4^{\wedge}\text{N}_8^{\text{inv}}$ происходит дополнительное снижение эффективности гидролиза РНК до 71%, вероятно, вследствие уменьшения размера непрерывного дуплекса. Такая же эффективность гидролиза РНК наблюдается и в комплексе с 20-звенным олигомером, в котором три нуклеотидных мостика соединяют четыре пентамерных фрагмента. Минимальная степень деструкции РНК достигается в присутствии олигонуклеотида $\text{N}_7^{\wedge}\text{N}_4^{\wedge}\text{N}_7$ с двумя пропущенными нуклеотидными звеньями.

Уменьшение уровня расщепления РНК в комплексах “мостиковых” олигонуклеотидов не может быть обусловлено только их пониженными гибридизационными свойствами. В наименее прочном комплексе со свободными олигонуклеотидными фрагментами $\text{rM} \cdot (\text{pN}_8 + \text{pN}_4 + \text{pN}_8)$, содержащем разрывы в цепи ДНК, гидролиз РНК протекает эффективнее, чем в более стабильных комплексах, например, $\text{rM} \cdot (\text{pN}_8^{\wedge}\text{N}_4^{\wedge}\text{pN}_8)$, в которых эти фрагменты соединены нуклеотидными мостиками (рис. 2, ср. 3 и 9). Очевидно, нуклеотидные вставки, соединяющие разрывы в ДНК-цепи, снижают сродство гибридных комплексов “мостиковых” олигонуклеотидов к ферменту, что должно отражаться в замедлении ферментативного процесса.

Влияние нуклеотидных вставок на скорость гидролиза РНК под действием РНКазы Н рассматривали на примере двух “мостиковых” олигонуклеотидов, содержащих две и три гексаметилендиоловые вставки, $\text{N}_8^{\wedge}\text{N}_4^{\wedge}\text{N}_8$ и $\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5^{\wedge}\text{N}_5$, в сравнении с исходным 20-звенным олигомером N_{20} и тандемом коротких олигонуклеотидов $\text{pN}_8 + \text{pN}_4 + \text{pN}_8$, не соединенных мостиками (при $\gamma = 20$ и 20°C).

Как видно из хода кинетических кривых гидролиза РНК (рис. 3б), введение в олигомер нуклеотидных вставок приводит к заметному снижению начальной скорости реакции, причем падение скорости возрастает с увеличением числа нуклеотидных вставок в олигонуклеотиде (кривые 3, 5). Поскольку в комплексе $\text{rM} \cdot \text{pN}_8 + \text{pN}_4 + \text{pN}_8$, содержащем два разрыва в ДНК-цепи, скорость деструкции РНК (кривая 2) практически не отличается от таковой в комплексе $\text{rM} \cdot \text{pN}_{20}$ (кривая 1), можно сказать, что ухудшение субстратных свойств “мостиковых” олигонуклеотидов в большей степени обусловлено не разры-

Совокупность полученных результатов согласуется с нашим предположением о том, что в гибридном комплексе “мостикового” олигонуклеотида РНКазы Н может независимо узнавать каждый дуплексный участок.

Таким образом, “мостиковые” олигонуклеотиды образуют с РНК гибридные комплексы, в которых РНК эффективно расщепляется под действием РНКазы Н. Эффективность и направленность действия фермента в этих комплексах определяется размерами, числом и расположением нуклеотидных вставок в олигодезоксирибонуклеотидах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы полинуклеотидкиназа фага Т4 (СибЭнзим, Россия), рибонуклеаза *H. coli* (Promega, США).

Эйкозарибонуклеотид UGCCUGGAGCUGCUUGAUGC (гМ) синтезирован твердофазным *H*-фосфонатным методом как описано ранее [16], олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие нуклеотидные вставки, синтезированы по методикам [7], а содержащие “инвертированные” межнуклеотидные связи, – по аналогии с методами [17].

Концентрации олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически с использованием УФ-детектора жидкостного хроматографа “Милихром” (Россия). Молярные коэффициенты поглощения при длине волны 260 нм были рассчитаны по методу [18].

Термическую денатурацию олигонуклеотидных дуплексов исследовали в буферных растворах, содержащих 0.1 М NaCl, 0.01 М какодилат натрия (рН 7.4), 1 мМ EDTA (для ДНК/ДНК-дуплексов) и 0.05 М KCl, 0.01 М какодилат натрия (рН 7.4), 0.01 М MgCl₂ (для РНК/ДНК-дуплексов), при концентрации каждого олигонуклеотидного компонента 1.3×10^{-5} М. Перед плавлением буферные растворы, содержащие комплементарные олигонуклеотиды в эквимольных соотношениях, прогревали до 80–90°C и медленно охлаждали до 4–5°C. Оптические кривые плавления регистрировали на специальной установке, созданной на базе спектрофотометрического УФ-детектора жидкостного хроматографа “Милихром” (Россия), как описано ранее [19], при длинах волн 260, 270 и 280 нм. Скорость нагрева образцов не превышала 0.7–1 град/мин. Для всех исследуемых комплексов кривые нагрева совпадали с кривыми охлаждения. В случае РНК–ДНК-гибридизации это является доказательством отсутствия деградации РНК в процессе денатурации.

Введение радиоактивной метки в РНК-мишень гМ проводили с использованием полинуклеотидкиназы фага Т4 (5 ед. акт.), 0.1 мКи

[γ -³²P]АТФ в буферном растворе, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН 7.6), 10 мМ MgCl₂, 0.1 мМ спермидин, 0.1 мМ EDTA, 5 мМ дитиотреит (общий объем 15 мкл). Меченую РНК-мишень выделяли после электрофореза в 20% ПААГ, элюируя из геля буферным раствором, содержащим 0.25 М NH₄COOH, 0.5 мМ EDTA, 0.1% додецилсульфата натрия.

Гидролиз РНК рибонуклеазой *H. coli* проводили в буферном растворе, содержащем 20 мМ HEPES (рН 8.0), 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂ и 1 мМ дитиотреит. Концентрация РНК-мишени гМ во всех экспериментах составляла 1×10^{-7} М, олигодезоксирибонуклеотидов и “мостиковых” олигонуклеотидов – от 1×10^{-7} до 2×10^{-6} М. Реакционные смеси (10 мкл) инкубировали при 20°C в течение 15 мин, затем добавляли 0.15 ед. акт. рибонуклеазы Н. Через необходимое время добавляли 1 мкл раствора полиуридилевой кислоты (0.1 мг/мл) и осаждали реакционные смеси 2% раствором перхлората лития в ацетоне. Осадок растворяли в 8 М мочеvine, содержащей красители бромфеноловый синий и ксиленцианол FF, и наносили на 20% ПААГ для электрофоретического анализа.

За степень гидролиза РНК-мишени принимали процентное отношение суммарной радиоактивности в пятнах, соответствующих продуктам расщепления мишени, к суммарной радиоактивности в дорожке геля.

Работа выполнена при частичной поддержке грантами INTAS-93-828-ext, Государственной научно-технической программы “Новейшие методы биоинженерии” (подпрограммы “Тен-направленные и биологически активные вещества” и “Геном человека”), межвузовской научно-технической программы “Биотехнология” и при индивидуальной поддержке Пышного Д.В. грантом Программы научных проектов молодых ученых СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьев П.Е., Зарытова В.Ф. // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26. С. 728–734.
2. Cook P.D. // Antisense Research and Applications / Eds S.T. Crooke, B. Lebleu. Boca Raton; Ann Arbor; London; Tokyo: CRC Press, 1993. P. 169–176.
3. Durand M., Peloille S., Thuong N.T., Maurizot J.C. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 9197–9204.
4. Cload S.T., Schepartz A.J. // J. Am. Chem. Soc. 1991. V. 113. P. 6324–6326.
5. Kandimalla E.R., Agrawal S. // Gene. 1994. V. 149. P. 115–121.
6. Ma M.Y.-X., Reid L.S., Climie S.C., Lin W.C., Kuperman R., Sumner-Smith M., Barnett R.W. // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 1751–1758.

7. Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V., Ivanova E.M., Zarytova V.F., Bonora G.M., Scalfi Happ C., Seliger H. // *Nucleosides Nucleotides*. 1998. V. 17. P. 1289–1297.
8. Wei Z., Tung C.-H., Zhu T., Stein S. // *Bioconjugate Chem.* 1994. V. 5. P. 468–474.
9. Wei Z., Tung C.-H., Zhu T., Dickerhof W.A., Breslauer K.J., Georgopoulos D.E., Leibowitz M.J., Stein S. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 655–661.
10. Horne D.A., Dervan P.B. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1990. V. 112. P. 2435–2437.
11. Федорова О.А., Готтих М.Б., Романова Е.А., Орецкая Т.С., Долинная М.Г., Шабарова З.А. // *Молекуляр. биология*. 1995. Т. 29. С. 1161–1167.
12. Salunkhe M., Wu T., Letsinger R.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1992. V. 114. P. 8768–8772.
13. Lewis F.D., Wu T., Burch E.L., Bassani D.N., Yang J.-S., Schneider S., Jager W., Letsinger R.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 8785–8792.
14. Pyshnyi D.V., Pyshnaya I.A., Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Ivanova E.M., Zarytova V.F. // *Pure Appl. Chem.* 1996. V. 68. P. 1321–1328.
15. Williams A.P., Longfellow C.E., Freier S.M., Kierzek R., Turner D.H. // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 4283–4291.
16. Веньяминова А.Г., Горн В.В., Зенкова М.А., Комарова Н.И., Репкова М.Н. // *Биоорган. химия*. 1990. Т. 16. С. 941–950.
17. Flavio J., Ortigao R., Rösch H., Selter H., Fröhlich A., Lorenz A., Montenarh M., Seliger H. // *Antisense Res. Dev.* 1992. V. 2. P. 129–146.
18. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids* / Ed. G.D. Fasman. Cleveland: CRC Press, 1975. V. 1. P. 589.
19. Пышный Д.В., Лохов С.Г., Сильников В.Н., Шишкин Г.В., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // *Биоорган. химия*. 1999. Т. 25. С. 40–56.

Cleavage of RNA in Hybrid Duplexes by the *E. coli* Ribonuclease H: II. Substrate Properties of Oligonucleotides Containing Nonnucleotide Linkers

**P. E. Vorobjev[#], I. A. Pyshnaya*, D. V. Pyshnyi*, M. N. Repkova*,
A. G. Venyaminova*, M. A. Zenkova*, E. M. Ivanova*, C. Scalfi-Happ**,
H. Seliger**, G. Bonora***, and V. F. Zarytova***

**Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

***Section of Polymers, University of Ulm, D-89069 Ulm, Germany*

****Department of Chemical Sciences, University of Trieste, I-42127 Trieste, Italy*

The 20-mer bridged oligodeoxynucleotides containing short oligomers joined by the hexamethylenediol and hexaethylene glycol linkers were shown to form complementary DNA/DNA and RNA/DNA complexes whose thermostability depends on the length and number of the nonnucleotide linkers. Hybrid complexes of the bridged oligonucleotides proved to be substrates for the *E. coli* ribonuclease H. The presence of one–three nonnucleotide linkers in a 20-mer decreased the hydrolysis efficacy only 1.2–1.4-fold. It is the composition of the RNA cleavage products that was influenced the most significantly by the nonnucleotide linkers. RNase H simultaneously hydrolyzed the RNA 3'-ends of each hybrid duplex involving a bridged oligonucleotide. The presence of an inverted 3'-3'-phosphodiester bond at the 3'-end of the oligodeoxyribonucleotide only slightly affected the RNase H activity.

Key words: antisense oligonucleotides, bridged oligonucleotides, nonnucleotide insert, ribonuclease H, phosphodiester bond inversion, thermostability of complementary complexes

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (3832) 39-6275; e-mail: vorobyev@niboch.nsc.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 11. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.