



УДК 547.963.32.057:542.95

ЦИКЛИЧЕСКИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ. II*. ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ОБРАЗОВАНИЯ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

© 1997 г. А. В. Максименко[#], О. А. Федорова, М. Б. Готтих,
Е. А. Кубарева, З. А. Шабарова

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
и химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119899, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 24.05.96 г.

Методами химического и ферментативного лигирования изучены закономерности циклизации линейного 38-звенного олигодезоксирибонуклеотида на циклической матрице. Показано, что структура и выход продуктов реакции зависят от метода лигирования и нуклеотидной последовательности лигируемого олигонуклеотида и матрицы. Установлено, что химическое лигирование в этой системе может приводить к образованию катенанов, структура которых подтверждена с помощью направленного гидролиза эндонуклеазой рестрикции *MvaI*. Наличие G/C-кластеров вблизи новой межнуклеотидной связи способствует образованию катенанов.

Ключевые слова: циклические олигонуклеотиды, катенаны, химическое лигирование.

Метод матрично-направленного химического лигирования широко используется в настоящее время в химии нуклеиновых кислот. Он позволяет получать различные фрагменты ДНК, в том числе и модифицированные [2]. В предыдущей работе этой серии метод химического лигирования был применен для синтеза циклических олигонуклеотидов [1]. Такие соединения представляют определенный интерес для антисенсовой биотехнологии, так как обладают повышенной устойчивостью к нуклеазному гидролизу [3]. Кроме того, для циклических олигонуклеотидов, способных к образованию триплексов, продемонстрирована высокая специфичность связывания с РНК- и ДНК-мишенями [4–7].

Показано, что в процессе репликации и рекомбинации ДНК образуются полициклические соединения–катенаны [8, 9]. Полициклические соединения были обнаружены также в митохондриях ряда внеклеточных паразитов, таких, как *Leishmania* и *Crithidia* [10, 11]. Возможность получения химическими методами полициклических олигонуклеотидных соединений (например, катенанов) до сих пор не изучалась. Вместе с тем такие соединения могут быть использованы для исследования неко-

торых биологических процессов, а также механизма действия ряда ферментов.

Целью данной работы было изучение возможности образования полициклических соединений при лигировании линейного олигонуклеотида на циклической матрице. Изучено также влияние нуклеотидной последовательности неспаренных участков линейного и циклического олигомеров на направление реакции, и проведено сравнение закономерностей лигирования линейного олигонуклеотида на циклической и линейной матрицах. Параллельно с химическим осуществлялось и ферментативное лигирование в изучаемых системах с использованием T4-ДНК-лигазы.

1. Химическое и ферментативное лигирование линейного олигонуклеотида на циклической матрице

Для изучения особенностей химического и ферментативного лигирования линейного олигонуклеотида на циклической матрице были сконструированы системы I и II (рис. 1). Первичная структура исходных соединений (линейных олигонуклеотидов (1_n) и (4_n) и матриц (3_n и 5_n)) подобрана так, что за счет комплементарных взаимодействий в этих системах может формироваться 14-звенный дуплекс с разрывом в центральном положении одной из цепей. Для сравнения параллельно в тех же условиях проводили лигирование линейного олигонуклеотида (1_n) на линейной матрице (2) (система III, рис. 1).

Сокращения: MES – морфолинэтансульфонат, ЭР – эндонуклеаза рестрикции, EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид. Префикс “d” (дезоксид) при обозначении олиго-2'-дезоксирибонуклеотидов опущен.

*Сообщение I см. [1].

[#] Автор для переписки.

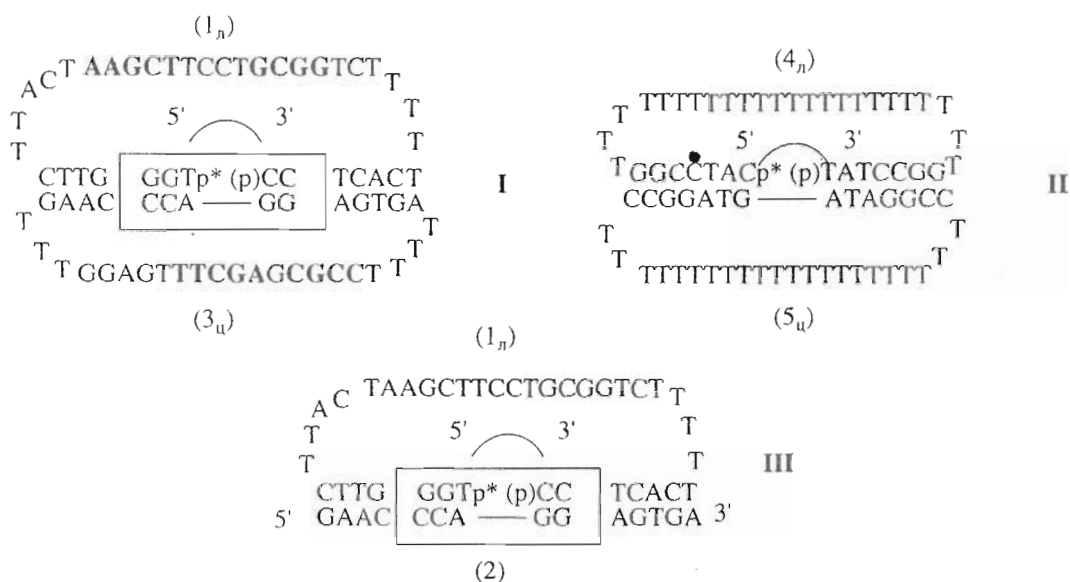


Рис. 1. Системы I–III, сконструированные для изучения химического и ферментативного лигирования. Место образования межнуклеотидной связи обозначено дугой. Участок узнавания ЭР *MvaI* взят в рамку. 4- и 5-Звенные фрагменты 38-звенного линейного олигонуклеотида (1_n) и 36-звенной циклической матрицы (3_u), способные образовывать дуплексы в дополнение к основному 14-звенному дуплексу, выделены жирным шрифтом. Линейные олигонуклеотиды, используемые для ферментативного лигирования, содержат 3'-гидроксильную группу (1_{α-n} и 4_{α-n}), а для химического лигирования – 3'-фосфатную группу (1_{β-n} и 4_{β-n}). p* – ³²P-меченая фосфатная группа.

Образование межнуклеотидной связи в исследуемых дуплексах происходило между двумя остатками пиримидиновых нуклеотидов. Такое сочетание оптимально для химического лигирования в линейных дуплексах [12]. В системе I одноцепочечные фрагменты 38-звенного линейного олигонуклеотида (1_n) и 36-звенной циклической матрицы (3_u) (не участвующие в образовании 14-звенного дуплекса) содержат последовательности, способные формировать два дуплекса из 4 и 5 п. о. (эти участки выделены жирным шрифтом на рис. 1). В системе II не может быть дополнительных комплементарных взаимодействий между неспаренными участками (рис. 1). В этих системах исследовалось влияние нуклеотидной последовательности неспаренных участков линейного и циклического олигонуклеотидов и локализации G/C-кластеров в дуплексной структуре на направление реакции. Предполагалось, что расположение G/C-участков на концах подвергающегося лигированию олигонуклеотида (1_n) будет способствовать стабилизации концевых участков дуплекса из 14 п. о. с циклической матрицей (3_u) и более эффективному образованию катенанов. В системе I G/C-кластеры расположены вблизи участка лигирования, а в системе II – на концах дуплекса. Для того чтобы облегчить идентификацию продуктов лигирования, в нуклеотидную последовательность системы I был введен участок узнавания эндонуклеазы рестрикции *MvaI* (рис. 1). Циклические олигонуклеотиды (3_u) и (5_u) были получены методом химического лигирова-

ния с помощью *BtCN* в дуплексах, аналогичных дуплексу (III) (см. [3]).

Из схемы возможных типов гибридизации линейного олигонуклеотида на циклической матрице (рис. 2) видно, что при лигировании в предполагаемых дуплексах возможно образование по крайней мере четырех продуктов: циклического олигонуклеотида (путь А), катенана (путь Б), линейного димера (путь В) и циклического димера (путь Г).

Для химического лигирования использовались два конденсирующих агента: бромциан и водорастворимый карбодиимид. Лигирование под действием бромциана проводили в условиях, рекомендованных в работе [13]. EDC-индуцируемое лигирование осуществляли в 0.05 M MES-буфере с pH 5.0 для того, чтобы уменьшить вероятность модификации карбодиимидом гетероциклических оснований в одноцепочечных участках. Лигирование действием T4-ДНК-лигазы проводилось при 4°C (в условиях существования дуплекса). Для удобства контроля за ходом реакции линейные олигонуклеотиды (1_n) и (4_n) содержали 5'-³²P-меченую фосфатную группу, которая взаимодействовала с 3'-гидроксильной группой в случае ферментативного лигирования и с 3'-фосфатной группой в случае химического лигирования. Выбор реагирующих групп обоснован тем, что химическое лигирование с участием 5'-фосфатной и 3'-гидроксильной групп малоэффективно. Реакционные смеси анализировали методом электрофореза при

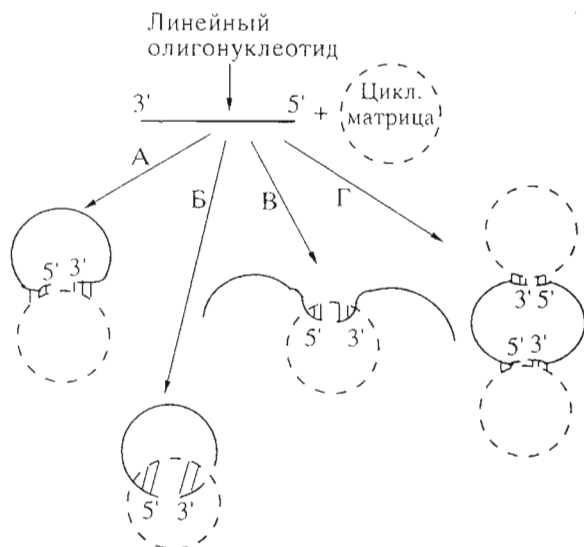


Рис. 2. Возможные пути гибридизации 38-звенного олигонуклеотида на циклической матрице. Лигирование в образующихся дуплексах приводит к образованию (в скобках указан нижний индекс соответствующего продукта): А – циклического олигонуклеотида (ц.), Б – катенана (к.), В – линейного димера (л. д.), Г – циклического димера (ц. д.).

50°C в 15% ПААГ, содержащем 7 М мочевины, фрагменты ДНК визуализировали автордиографией (рис. 3).

При химическом лигировании в дуплексе (I) было получено пять продуктов (рис. 3а). Олигонуклеотиды ($1_{ц}$), ($1_{л.д}$), ($1_{ц.д}$) по электрофоретической подвижности соответствовали продуктам лигирования на линейной матрице, полученным и охарактеризованным ранее: 38-звенному цикли-

ческому олигонуклеотиду ($1_{ц}$), линейному димеру (76-звенный линейный олигонуклеотид) и циклическому димеру (76-звенный циклический олигонуклеотид) [1]. Кроме того, при лигировании в системе I было получено два новых продукта: ($1_{к.1}$) и ($1_{к.2}$). Поскольку электрофоретическая подвижность этих соединений выше, чем у циклического димера, и ниже, чем у линейного димера, было сделано предположение, что по крайней мере один из них является катенаном. Вторичная структура 74-звенного катенана должна быть более компактной, чем у циклического димера. При лигировании в дуплексе (II) было получено три продукта: ($4_{ц}$), ($4_{л.д}$), ($4_{к.2}$) (рис. 3б). Образование соединения, подвижность которого в геле соответствует продукту лигирования ($1_{к.1}$), в системе II не наблюдалось.

Ферментативное лигирование в системе I (рис. 3а, 5) приводило в основном к образованию циклического олигонуклеотида и линейного димера, в системе II наблюдалось также образование соединения ($4_{к.2}$) (рис. 3б, 3).

Таким образом, было показано, что при химическом лигировании линейного олигонуклеотида на циклической матрице в дуплексе (I) образуются два новых продукта: ($1_{к.1}$) и ($1_{к.2}$). В дуплексе (II) все методы лигирования приводят к образованию соединения ($4_{к.2}$).

2. Подтверждение структуры продуктов химического лигирования с помощью эндонуклеазы рестрикции *MvaI*

Строение соединений ($1_{ц}$), ($1_{л.д}$), ($1_{ц.д}$) и ($4_{ц}$), ($4_{л.д}$) было подтверждено в соответствии с методами, предложенными ранее [3]. Показано, что

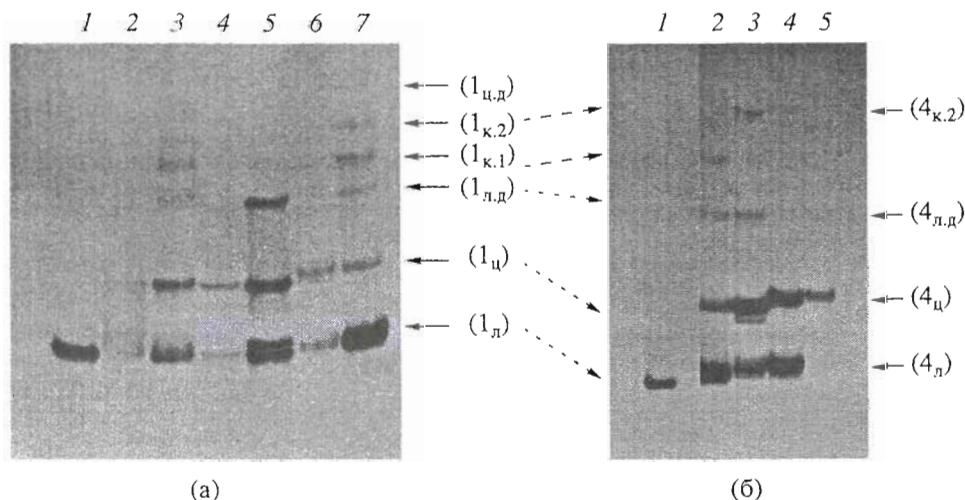


Рис. 3. Радиоавтограф электрофоретического разделения реакционных смесей, содержащих продукты лигирования: (а) – системы I (3, 5, 7) и II (2, 4, 6), лигирование с использованием EDC (3, 2), T4-ДНК-лигазы (5, 4) и BrCN (7, 6); 1 – исходный олигонуклеотид ($1_{л}$); (б) – системы I (2) и II (3–5) с помощью BrCN (2, 4), T4-ДНК-лигазы (3) и EDC (5); 1 – исходный олигонуклеотид ($1_{л}$).

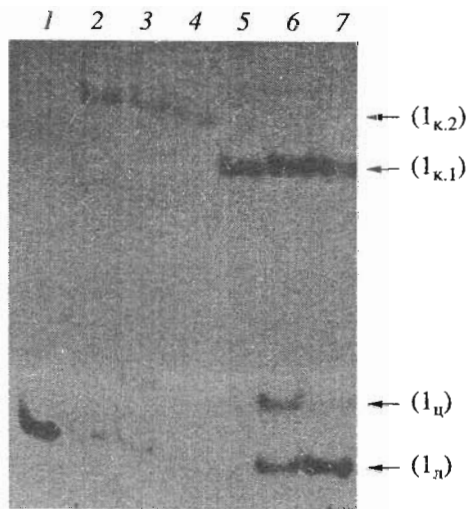


Рис. 4. Радиоавтограф электрофоретического разделения реакционных смесей, содержащих продукты гидролиза ЭР *MvaI* соединений: $(1_{к,2})$ в присутствии (дорожка 2) и в отсутствие 14-звенной матрицы (2) (дорожка 3), $(1_{к,1})$ в отсутствие (дорожка 6) и в присутствии 14-звенной матрицы (2) (дорожка 7). Контроли: 1 – 38-звенный линейный олигонуклеотид ($1_{л}$), 4 – $(1_{к,2})$, 5 – $(1_{к,1})$.

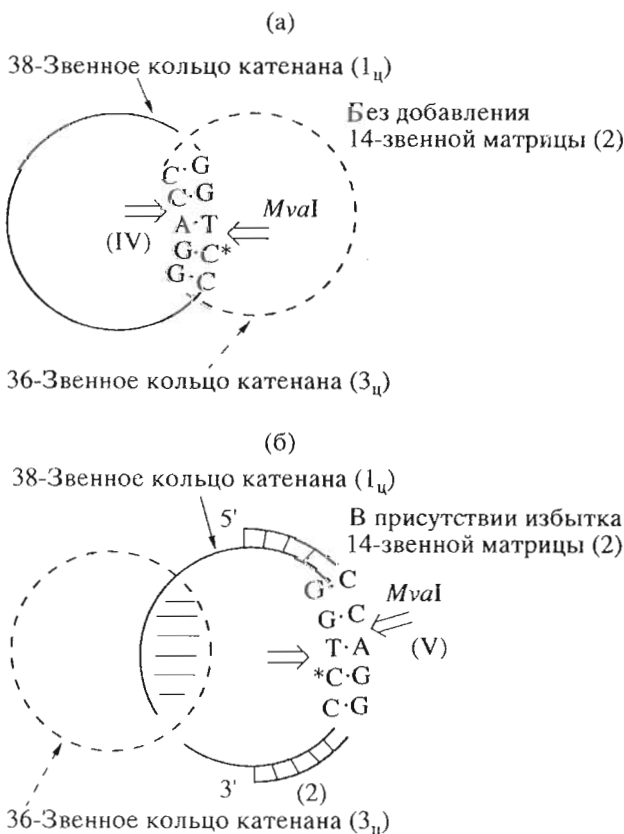


Рис. 5. Схема расщепления катенана ЭР *MvaI* в отсутствие (а) и в присутствии (б) комплементарного олигонуклеотида ($1_{л}$) олигонуклеотида (2).

циклические олигонуклеотиды ($1_{ц}$), ($1_{ц,д}$) и ($4_{ц}$) не гидролизуются смесью фосфодиэстеразы змеиного яда и щелочной фосфатазы, а также не подвергаются 5'-фосфорилированию полинуклеотидкиназой фага Т4 (экспериментальные данные не приведены).

Для подтверждения структуры новых соединений был использован их направленный гидролиз ЭР *MvaI*. Этот фермент "узнает" в двуцепочковой ДНК последовательность 5'...CC¹(Т/А)GG...3' и расщепляет ее в месте, указанном стрелкой. На рис. 4 приведен радиоавтограф анализа реакционных смесей, полученных в результате ферментативного расщепления ($1_{к,1}$) и ($1_{к,2}$). Необходимо отметить, что для ферментативного гидролиза использовались соединения, содержащие только природные фосфодиэфирные связи, которые были получены при взаимодействии ^{32}P -меченого 5'-фосфата с 3'-концевой гидроксильной группой олигонуклеотидов ($1_{\alpha-л}$) и ($4_{\alpha-л}$).

Оба новых соединения, ($1_{к,1}$) и ($1_{к,2}$), расщепляются ЭР *MvaI* в отсутствие комплементарного олигонуклеотида (2) (рис. 4). Это свидетельствует о том, что они уже содержат двухцепочечный участок, являющийся субстратом ЭР *MvaI* (дуплекс IV, рис. 5). Следовательно, оба эти соединения – катенаны. Продукты их гидролиза ЭР *MvaI*, по данным электрофоретического анализа, представляют собой смесь 38-звенных циклического и линейного олигонуклеотидов в соотношении 1 : 1. Такой состав и соотношение продуктов можно объяснить тем, что ЭР *MvaI* расщепляет двуцепочковую ДНК по двустадийному механизму, т.е. сначала происходит расщепление только одной из цепей субстрата, как описано в работе [14]. Получающийся при таком гидролизе дуплекс с разрывом в одной из цепей в условиях проведения ферментативной реакции (37°C) непрочен и диссоциирует с высвобождением циклического и линейного олигонуклеотидов. Если сначала расщепляется А-содержащая цепь участка узнавания (А-цепь), т.е. 36-звенное кольцо катенана, то продуктами гидролиза являются 36-звенный линейный и 38-звенный циклический олигонуклеотиды. Так как ^{32}P -метка содержится в 38-звенном кольце катенана, на радиоавтографе наблюдается образование 38-звенного цикла. Если расщепление межузвучившей цепи участка узнавания (Т-цепь), т.е. в 38-звенном кольце катенана, то продуктами гидролиза являются 36-звенный циклический олигонуклеотид и 38-звенный линейный олигонуклеотид. В этом случае на радиоавтографе обнаруживается 38-звенный линейный олигонуклеотид. Поскольку гидролиз каждой из цепей ЭР *MvaI* происходит с одинаковой вероятностью, 38-звенные линейный и циклический продукты образуются в одинаковых количествах.

Следует отметить, что катенан также способен к комплементарным взаимодействиям с олигонуклеотидом (2) с образованием участка узнавания ЭР *MvaI* (дуплекс (V), рис. 5). При гидролизе соединений ($1_{к,1}$) и ($1_{к,2}$) в присутствии олигонуклеотида (2), взятого в избытке, наблюдалось предпочтительное образование 38-звенного линейного олигонуклеотида (рис. 4, дорожки 7 и 2 соответственно). Это можно объяснить тем, что при наличии избытка олигонуклеотида (2) преимущественно образуется не внутримолекулярный (IV), а межмолекулярный дуплекс (V) (рис. 5). Поскольку расщепление сначала происходит только в одной цепи, получающийся при гидролизе дуплекс с разрывом в одной из цепей в условиях проведения ферментативной реакции (37°C) непрочен и диссоциирует либо с высвобождением 36-звенного циклического, 38- и 14-звенных линейных олигонуклеотидов, либо с высвобождением катенана и продуктов гидролиза 14-звенного линейного олигонуклеотида. Если сначала расщепляется А-цепь, т.е. 14-звенный линейный олигонуклеотид, то продуктами гидролиза являются катенан и два 7-звенных линейных олигонуклеотида. Так как ^{32}P -метка содержится в 38-звенном кольце катенана, продукты такого гидролиза на радиоавтографе не наблюдаются. Если расщепление межнуклеотидной связи сначала происходит в Т-цепи, т.е. в 38-звенном кольце катенана, продуктами гидролиза являются 36-звенный циклический олигонуклеотид, 38- и 14-звенные линейные олигонуклеотиды. Поскольку ^{32}P -меченым является только 38-звенный фрагмент катенана, на радиоавтографе наблюдается образование только 38-звенного линейного олигонуклеотида.

Таким образом, полученные данные подтвердили факт, что оба продукта химического лигирования линейного олигонуклеотида (1_n) на циклической матрице в системе I, ($1_{к,1}$) и ($1_{к,2}$), являются катенанами. Следует отметить, что при лигировании в дуплексе (II) образуется только один новый продукт — ($4_{к,2}$), который по подвижности в геле соответствует катенану ($1_{к,2}$), образующемуся в системе I (рис. 4). Поскольку одноцепочечные фрагменты 38-звенного линейного олигонуклеотида (1_n) и циклической матрицы ($3_{ц}$) (не участвующие в образовании 14-звенного дуплекса) содержат последовательности, способные формировать два дуплекса из 4 и 5 п. о. (рис. 1), было сделано следующее предположение. Если при гибридизации линейного олигонуклеотида с матрицей сначала образуются дуплексы из 4 и 5 п. о., а уже затем 14-звенный дуплекс, то в результате лигирования образуется катенан, состоящий из переплетенных в нескольких местах друг с другом колец ($1_{к,1}$). Если же сначала образуется 14-звенный дуплекс, то продуктом реакции будет классический катенан с одним переплетением между кольцами ($1_{к,2}$). Обладая менее компактным строени-

ем, это соединение должно иметь меньшую подвижность в геле по сравнению с катенаном, состоящим из переплетенных в нескольких местах друг с другом фрагментов циклических олигонуклеотидов. Так как в системе II в отличие от системы I не может быть дополнительных комплементарных взаимодействий между неспаренными участками, образующийся при лигировании в дуплексе (II) продукт ($4_{к,2}$) может иметь структуру классического катенана типа ($1_{к,2}$). Образование продукта, подвижность которого в геле соответствует продукту ($1_{к,1}$), в этом случае невозможно. Таким образом, было показано, что первичная структура неспаренных участков линейного и циклического олигонуклеотидов оказывает влияние на пространственную структуру катенанов: образование классических катенанов с одним переплетением между кольцами возможно только в системах, где не реализуются дополнительные комплементарные взаимодействия между одноцепочечными участками олигонуклеотидов.

3. Закономерности циклизации линейного олигонуклеотида на циклической матрице

При использовании карбодимида и ДНК-лигазы основным продуктом лигирования линейного олигонуклеотида на циклической матрице как в системе I, так и в системе II являются 38-звенные циклические олигонуклеотиды (таблица). В случае BrCN-индуцируемого лигирования в системе I образование всех продуктов происходит приблизительно в равных количествах, а при лигировании в дуплексе (II) основным продуктом является циклический олигонуклеотид ($4_{ц}$).

Такое различие объясняется тем, что лигирование под действием бромциана протекает очень быстро. Реакция заканчивается за 3–5 мин [13]. Поэтому соотношение продуктов реакции отражает первоначальное соотношение между дуплексами, образующимися в результате гибридизации линейного олигонуклеотида и матрицы. Химическое лигирование под действием карбодимида протекает достаточно медленно — за 40–48 ч. Поэтому продукты лигирования образуются в наиболее термодинамически стабильном дуплексе. Предпочтительное образование циклического олигонуклеотида свидетельствует о том, что дуплекс, образующийся в результате гибридизации линейного олигонуклеотида (1_n) на циклической матрице ($3_{ц}$) по пути А (рис. 2), очевидно, наиболее термодинамически стабилен.

Сравнивая продукты как химического, так и ферментативного лигирования в системах I и II, можно сделать вывод, что при перемещении G/C-участков к флангам дуплекса направление реакции независимо от выбранного метода лигирования смещается в сторону образования 38-звенного

Сравнение эффективности лигирования в системах I–III под действием химических реагентов и T4-ДНК-лигазы*

Продукты лигирования	Выход продуктов лигирования, %								
	T4-ДНК-лигаза			BrCN			EDC		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Циклический димер	0–1	0	0	1–3	0	0	0–1	0	0
Катенан 2'	1–2	5–7	0	4–6	1–3	0	4–6	1–2	0
Катенан I	0–1	0	0	6–8	0	0	8–10	0	0
Линейный димер	12–14	7–9	10–15	3–5	0	0	6–8	0	0
Циклический олигонуклеотид	32–34	76–78	60–65	7–9	30–32	50–55	26–28	86–88	75–80

* Образование связи под действием T4-ДНК-лигазы происходило между 5'-фосфатной и 3'-гидроксильной группами, в остальных случаях – между 5'- и 3'-фосфатными группами.

циклического олигонуклеотида (таблица). Следовательно, образование катенанов кинетически и термодинамически более выгодно в том случае, когда G/C-кластеры расположены рядом с местом разрыва в линейном олигонуклеотиде на циклической матрице.

Таким образом, в настоящей работе показано, что химические методы лигирования могут быть использованы для получения полициклических олигонуклеотидов, а также для выяснения того, какие дуплексы образуются в системах с несколькими возможными направлениями гибридизации. Поскольку BrCN-индуцируемое лигирование протекает очень быстро, использование этого метода позволяет определить первоначальное соотношение между образующимися дуплексами и зафиксировать все возможные способы гибридизации, которые реализуются в данной системе. В случае EDC-индуцируемого лигирования реакция протекает очень медленно. Поэтому использование этого метода позволяет определить, какие из возможных структур наиболее термодинамически стабильны, но не позволяет зафиксировать все возможные направления гибридизации. Также было установлено, что направление реакции лигирования зависит от первичной структуры как линейного олигонуклеотида, так и циклической матрицы. Смещение G/C-богатых участков к месту образования межнуклеотидной связи от концов дуплекса, сформированного циклической матрицей и линейным олигонуклеотидом, повышает вероятность образования катенана в случае химического метода лигирования. Наличие в одноцепочечных фрагментах последовательностей, способных к дополнительным комплементарным взаимодействиям, способствует образованию катенанов с несколькими переплетениями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались 5'-O-диметокситригил-3'-(N,N-диизопропиламидо)-(2-цианоэтил)фосфи-

ты 2-дезоксирибонуклеотидов (Applied Biosystems, США), EDC, бромциан (5 M раствор в абсолютном ацетонитриле) (Aldrich, США), эндонуклеаза рестрикции *MvaI* и T4-ДНК-лигаза (НПО "Фермент", Литва) и высокоочищенная T4-полинуклеотидкиназа без 3'-нуклеазной активности (Boehringer-Mannheim, Германия).

Синтез олигонуклеотидов выполняли на автоматическом синтезаторе Applied Biosystems 380 В (США). В качестве полимерного носителя использовали Small Scale dN CPG (Applied Biosystems, США) с загрузкой первым олигонуклеотидным звеном 20–24 мкмоль/г.

Для проведения химического лигирования с использованием BrCN и EDC олигонуклеотид-предшественник и матрицу смешивали в соотношении 1 : 2, упаривали и растворяли в 20 мкл буфера. Концентрация ДНК-дуплекса составляла 10^{-4} M в расчете на мономерное звено.

Буферный раствор для BrCN-лигирования: 1 M N-метилморфолин, 0.02 M $MgCl_2$, pH 7.5. В реакционную смесь добавляли 2 мкл 5 M раствора бромциана в ацетонитриле. Реакцию проводили в течение 5 мин при 4°C.

Буферный раствор для EDC-лигирования: 0.05 M MES, 0.02 M $MgCl_2$, pH 5.0. К смеси олигонуклеотидов добавляли карбодиимид до концентрации 0.2 M. Реакционную смесь инкубировали в темноте при 4°C в течение 48 ч.

Ферментативное лигирование с помощью T4-ДНК-лигазы проводили 16 ч при 4°C в буфере, содержащем 0.05 M трис-HCl, 0.01 M $MgCl_2$, 0.05 M дитиотреит, 1 mM спермидин, с pH 7.6. Общая концентрация нуклеотидного материала 10^{-4} M. В реакцию добавляли 30 ед. акт. фермента. Объем реакционной смеси 20 мкл.

Нуклеотидный материал после лигирования осаждали 5–10-кратным избытком ацетона из 2 M раствора $LiClO_4$ и анализировали методом электрофореза при 50°C в 15% ПААГ, содержащем 7 M мочевины. Выход продукта лигирования

определяли по отношению его радиоактивности к суммарной радиоактивности исходного меченого соединения и продукта. Радиоактивность ^{32}P -меченых препаратов измеряли методом счета по Черенкову на счетчике Delta-300 (США).

Расщепление ДНК-дуплексов (концентрация 10^{-12} М в расчете на мономерное звено) ЭР *MvaI* проводили в 10 мкл 0.01 М трис-НСI-буфера (рН 8.5), содержащего 0.015 М MgCl_2 , 0.15 М NaCl , 1 мМ дитиотреит, 100 мкг/мл альбумина. В реакционную смесь добавляли 25 ед. акт. фермента и полученную смесь инкубировали 1 ч при 37°C . Продукты реакции анализировали методом электрофореза при 50°C в 15% ПААГ, содержащем 7 М мочевины, фрагменты ДНК визуализировали автордиографией.

Авторы выражают благодарность Т.С. Орецкой, Е.А. Романовой и В.Н. Ташлицкому (МГУ) за синтез и выделение олигонуклеотидов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 94-04-12649 а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федорова О.А., Готтих М.Б., Романова Е.А., Орецкая Т.С., Долинная Н.Г., Шабарова З.А. // Молекуляр. биология. 1995. Т. 29. С. 1153–1159.
2. Shabarova Z.A. // Biochimie. 1988. V. 70. P. 1323–1334.
3. Dolinnaya N.G., Blumenfeld M., Merenkova I.N., Oretskaya T.S., Krynetskaya N.F., Ivanovskaya M.G., Vasseur M., Shabarova Z.A. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 5403–5407.
4. Prakash G., Kool E.T. // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1991. P. 1161–1162.
5. Prakash G., Kool E.T. // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. P. 3523–3527.
6. Perkins T.A., Goodman J.L., Kool E.T. // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1993. P. 215–217.
7. Vo T., Wang S., Kool E.T. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 2937–2944.
8. Sundin O., Varshavsky A. // Cell. 1981. V. 25. P. 659–669.
9. Bliska J.B., Cozzarelli N.R. // J. Mol. Biol. 1987. V. 194. P. 205–218.
10. Simpson L. // Ann. Rev. Microbiol. 1987. V. 41. P. 363–382.
11. Ryan K.A., Shapiro T.A., Rauch C.A., Englund P.T. // Ann. Rev. Microbiol. 1988. V. 42. P. 339–358.
12. Меренкова И.Н., Долинная Н.Г., Орецкая Т.С., Соколова Н.И., Шабарова З.А. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 85–91.
13. Федорова О.А., Готтих М.Б., Максименко А.В., Орецкая Т.С., Шабарова З.А. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 1153–1159.
14. Kubareva E.A., Gromova E.S., Pein C.-D., Krug A., Oretskaya T.S., Cech D., Shavarova Z.A. // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1088. P. 395–400.

Cyclic Oligonucleotides.

II. Regularities in the Formation of Polycyclic Structures

A. V. Maksimenko, O. A. Fedorova, M. B. Gottikh,
E. A. Kubareva, and Z. A. Shabarova

Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia
Chemical Faculty, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

Abstract—Cyclization of a 38-mer oligodeoxyribonucleotide on a cyclic template was studied by the chemical and enzymic ligation methods. Both structures and yields of the reaction products depended on the ligation method and the nucleotide and template sequences. The chemical ligation resulted in the formation of catenanes, whose structures were confirmed by hydrolysis with the *MvaI* restriction endonuclease. Presence of G/C-rich clusters near the formed internucleotide bond favored the catenane formation.

Key words: cyclic oligonucleotides, catenanes, chemical ligation.