



УДК 577.113(.4.+7): 577.152.31\*264'14

## РАСЩЕПЛЕНИЕ РНК В СОСТАВЕ ГИБРИДНЫХ ДУПЛЕКСОВ РИБОНУКЛЕАЗОЙ *H. coli*. I. СУБСТРАТНЫЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ, ОБРАЗОВАННЫХ РНК И ТАНДЕМОМ КОРОТКИХ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ

© 2000 г. П. Е. Воробьев, В. Ф. Зарытова<sup>#</sup>Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,  
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 09.03.2000 г. Принята к печати 05.05.2000 г.

Исследовано расщепление рибонуклеазой *H. coli* 5'-меченого фрагмента РНК в составе двух гибридных дуплексов с идентичными последовательностями, один из которых образован РНК и 20-звенным олигодезоксирибонуклеотидом (РНК/p20), второй – РНК и тандемом коротких олигодезоксирибонуклеотидов (октануклеотид : тетра-нуклеотид : октануклеотид) (РНК/тандем). Показано, что РНК в составе комплекса РНК/p20 гидролизует с 3'-конца, образуя последовательно 17-, 14-, 11-, 8- и 5-звенные 5'-меченые фрагменты. При гидролизе РНК в комплексе РНК/тандем регистрируются те же продукты, но скорости их накопления отличаются: 17-звенный и 8-звенный продукты накапливаются с близкими начальными скоростями. Существенно отличается накопление конечного 5-звенного продукта гидролиза РНК: в комплексе РНК/тандем он появляется в первые минуты реакции, а в комплексе РНК/p20 – лишь после значительного лаг-периода. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что в случае тандема происходит не только последовательное накопление укороченных продуктов (характерное для комплексов с участием протяженных олигодезоксинуклеотидов), но и параллельное. Это происходит вследствие гидролиза каждого дуплексного участка, образованного РНК и коротким олигонуклеотидом тандема. Несмотря на то что порядок узнавания и расщепления РНК-мишени рибонуклеазой *H* по определенным связям зависит от типа гибридного дуплекса, деструкция РНК-мишени в составе комплекса РНК/тандем и в комплексе с полноразмерным олигодезоксирибонуклеотидом протекает с близкой эффективностью.

*Ключевые слова:* антисмысловые олигонуклеотиды; рибонуклеаза *H*; танделы коротких олигонуклеотидов.

### ВВЕДЕНИЕ

Развитие подхода к регуляции экспрессии гена с использованием олигонуклеотидов и их производных продолжается более 30 лет [1–3]. Создан большой набор олигонуклеотидов, модифицированных по сахарофосфатному остову, гетероциклическим основаниям, концевым и межнуклеотидным фосфатным группам [2, 3]. Способность производных олигодезоксирибонуклеотидов образовывать с РНК гибридные дуплексы и обеспечивать гидролиз РНК рибонуклеазой *H*, как правило, определяет перспективность использования таких производных в антисенс-технологии [4]. Некоторые из полученных соединений (природные олигодезоксирибонуклеотиды, их тиоаналоги) способны обеспечивать гидролиз РНК рибонукле-

азой *H* в составе образованного ими гибридного дуплекса, другие (метилфосфонатные производные олигодезоксирибонуклеотидов, олигорибонуклеотиды и их 2'-*O*-метилпроизводные) не обладают такими свойствами [5].

В последние годы в качестве агентов, эффективно и сайт-специфично взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами, хорошо зарекомендовали себя танделы производных коротких олигонуклеотидов [6–12]. Короткие олигонуклеотиды ассоциируются на НК-мишени и образуют с ней протяженный дуплекс, содержащий одноцепочечные разрывы. Олигонуклеотиды могут нести на концевых фосфатах реакционноспособные и гидрофобные остатки, а также группы, способные стабилизировать комплементарные комплексы, образуемые такими танделами [9]. Показано, что селективность узнавания целевых последовательностей, то есть чувствительность к однонуклеотидным несоответствиям в структуре ДНК (например, точечным мутациям) в случае использования танделов коротких олигонуклеотидов выше, чем в случае протяженных олигонуклеотидов [10–11].

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

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: zarytova@niboch.nsc.ru; тел.: (3832) 39-62-24).

Выявлено, что тандемы производных коротких олигонуклеотидов являются хорошими ингибиторами репродукции вируса иммунодефицита человека в культуре клеток [12].

Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что тандемы коротких олигонуклеотидов, самособирающиеся на НК-мишени в комплементарный комплекс, способны обеспечить селективность, сайт-специфичность и эффективность взаимодействия с комплементарными участками нуклеиновых кислот и проявляют высокую и избирательную биологическую активность. Поскольку эффективность антисмысловых олигонуклеотидов и их производных может быть прямо связана со способностью образуемых ими гибридных дуплексов обеспечивать гидролиз матричных РНК рибонуклеазой Н [4], важно иметь данные о возможности тандемных систем формировать субстраты для рибонуклеазы Н.

В данной работе исследована способность тандемов коротких олигодезоксирибонуклеотидов обеспечивать гидролиз РНК-мишени рибонуклеазой Н из *E. coli* в составе гибридных дуплексов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве РНК мишени использовали <sup>32</sup>P-меченый 20-звенный олигорибонуклеотид. Гибридные дуплексы были образованы РНК с тандемом коротких (р8<sub>1</sub> + р4 + р8<sub>2</sub>) олигодезоксирибонуклеотидов (РНК/тандем) или с протяженным 20-звенным олигодезоксирибонуклеотидом (РНК/р20) той же последовательности, что и тандем коротких олигонуклеотидов (схема 1).

На рис. 1 представлены результаты гидролиза РНК в дуплексах РНК/тандем и РНК/р20 в одинаковых условиях. В обоих случаях наблюдается пять основных сайтов расщепления РНК-мишени, различающихся по интенсивности. Расщепляются в основном фосфодиэфирные связи между

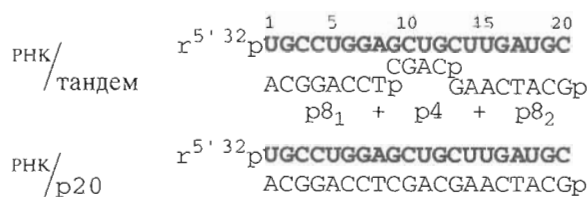


Схема 1.

нуклеотидами А<sup>17</sup>-U<sup>18</sup>, U<sup>14</sup>-U<sup>15</sup>, U<sup>11</sup>-G<sup>12</sup>, А<sup>8</sup>-G<sup>9</sup> и U<sup>5</sup>-G<sup>6</sup> с образованием 17-, 14-, 11-, 8- и 5-звенных фрагментов РНК (р17, р14, р11, р8 и р5 соответственно). Количественное соотношение 5'-меченых продуктов расщепления по различным сайтам РНК меняется в ходе реакции (рис. 1-3).

При расщеплении РНК в обоих комплексах сначала образуется продукт гидролиза р17 (рис. 1), причем начальная скорость накопления этого продукта практически не зависит от типа гибридного дуплекса (рис. 2а). Однако с течением времени наблюдаются различия в процессе гидролиза в комплексах РНК/тандем и РНК/р20. В первом случае наблюдается медленное, а во втором – быстрое расходование 17-звенного фрагмента РНК (рис. 2а). Далее деструкция РНК в составе комплекса РНК/тандем сопровождается лишь незначительным, а в составе комплекса РНК/р20 существенным накоплением 14-звенного фрагмента РНК с последующим достаточно быстрым его расходованием (рис. 2б). Через 30 мин содержание продукта р14 в реакционной смеси становится одинаковым (7%) для обоих дуплексов. На рис. 2в представлены кинетические кривые накопления 5'-меченого продукта дальнейшей деструкции РНК-мишени, р11. В случае комплекса РНК/тандем он накапливается с малой начальной скоростью и через 30 мин его содержание в реакционной смеси не превышает 7% (кривая 1).

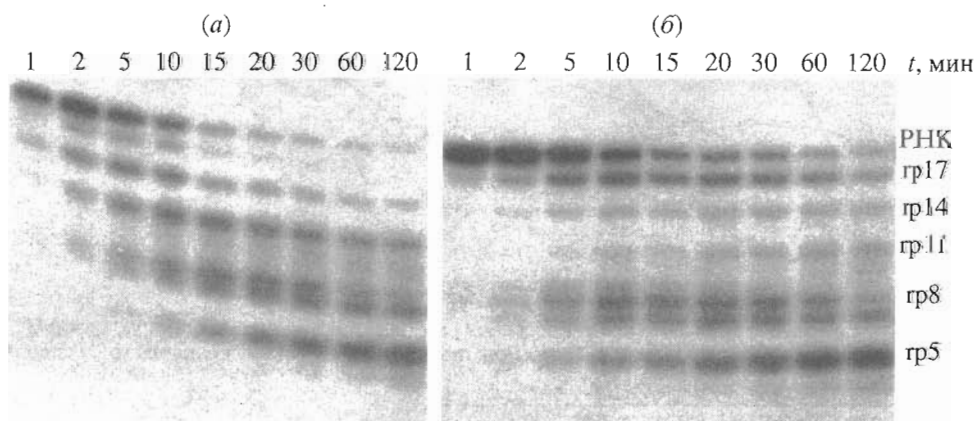
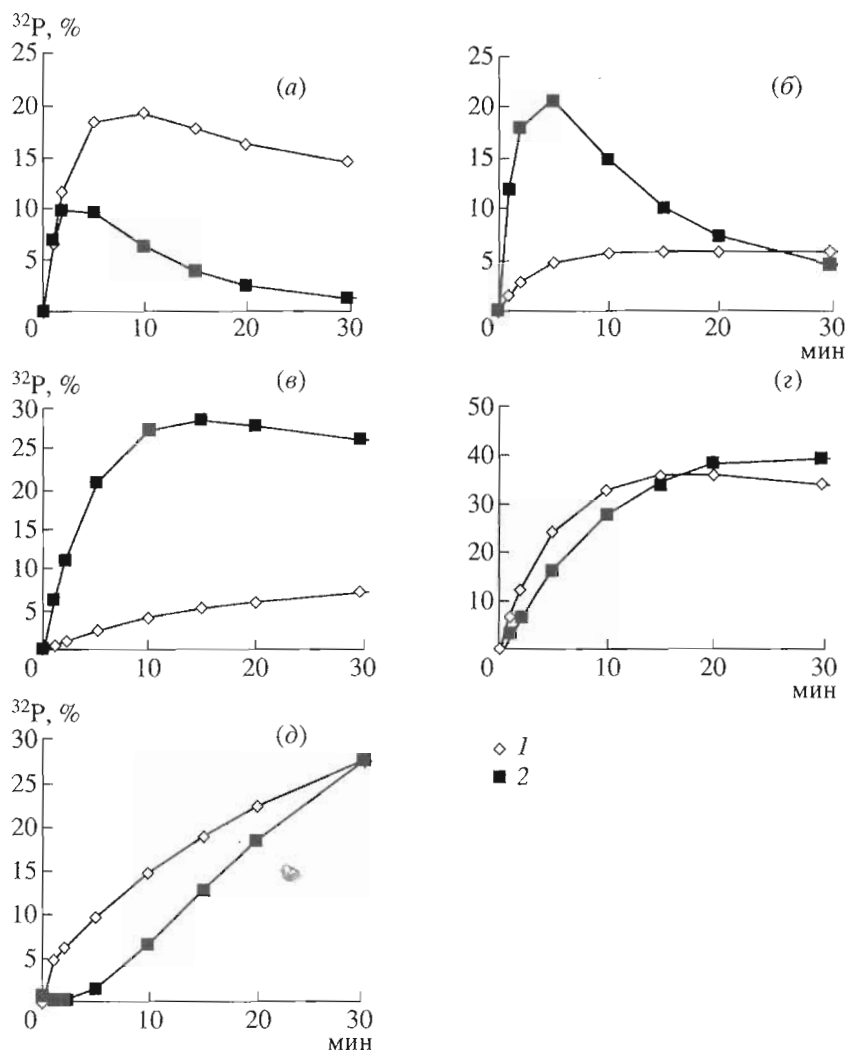
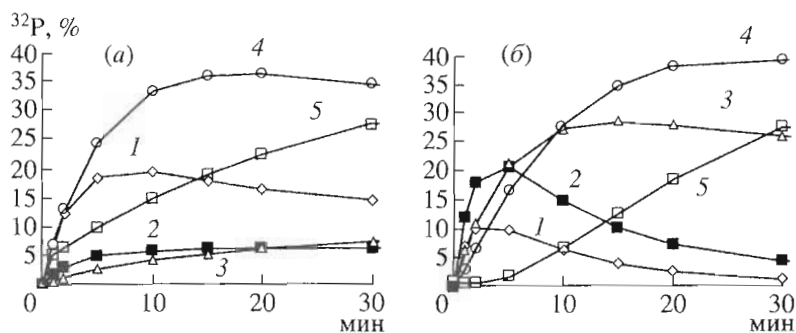


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов гидролиза 20-звенной РНК-мишени РНКазой Н *E. coli* в присутствии комплементарного 20-звенного олигодезоксирибонуклеотида р20 (а) и тандема коротких олигонуклеотидов (б). Электрофорез проводили в 20% МСАГ в денатурирующих условиях. Условия эксперимента см. "Эксперимент. часть".



**Рис. 2.** Содержание 5'-меченых фрагментов расщепления РНК-мишени рибонуклеазой Н в реакционной смеси в зависимости от времени в комплексах РНК/тандем (1) и РНК/p20 (2). Фрагменты gp17 (а), gp14 (б), gp11 (в), gp8 (г), gp5 (д). Условия реакции см. "Эксперимент. часть".



**Рис. 3.** Кинетические кривые накопления 5'-меченых продуктов гидролиза РНК-мишени рибонуклеазой Н в составе комплекса РНК/тандем (а) и РНК/p20 (б): gp17 (1); gp14 (2); gp11 (3); gp8 (4); gp5 (5). Условия реакции см. "Эксперимент. часть".

Иная картина наблюдается при гидролизе gp11 в комплексе РНК/p20. Сначала фрагмент накапливается с высокой скоростью и его содержание в реакционной смеси через 15 мин достигает 30%,

а затем начинает снижаться (кривая 2). Начальные скорости накопления двух последних продуктов гидролиза РНК-мишени, gp8 и gp5, несколько выше в случае тандемного комплекса (рис. 2г, д),

причем кривые накопления  $rp5$  в комплексах РНК/тандем и РНК/ $p20$  имеют различный характер (рис. 2д). Так, при гидролизе в комплексе РНК/ $p20$   $rp5$  появляется после определенного лаг-периода, а в комплексе РНК/тандем этот продукт регистрируется уже в первые минуты реакции. Таким образом, промежуточные продукты гидролиза РНК-мишени РНКазой Н в комплексе с протяженным олигонуклеотидом и с тандемом коротких олигонуклеотидов одни и те же, однако их появление и расходование протекает по-разному.

Соотношение конечных продуктов гидролиза также отличается для двух типов комплексов (рис. 1). Так, в случае тандема коротких олигонуклеотидов, помимо коротких фрагментов  $rp8$  и  $rp5$ , присутствует длинный фрагмент  $rp17$  (рис. 3а, кривые 1, 4, 5). В случае комплекса с протяженным олигонуклеотидом помимо продуктов  $rp8$  и  $rp5$  регистрируется фрагмент  $rp11$  (рис. 3б, кривые 3, 4, 5).

Перечисленные отличия свидетельствуют, что в данных условиях узнавание и расщепление РНК в комплексе с тандемом и протяженным олигонуклеотидом протекает неодинаково.

В случае комплекса РНК/ $p20$  регистрируется последовательное накопление и расходование 17-, 14- и 11-звенных фрагментов РНК (рис. 3б, кривые 1–3), затем накопление  $rp8$  (рис. 3б, кривая 4). Самый короткий из регистрируемых продуктов,  $rp5$ , появляется в последнюю очередь (рис. 3б, кривая 5). Эти результаты говорят о том, что в дуплексе РНК/ $p20$  рибонуклеаза Н последовательно гидролизует РНК-мишень в направлении от 3'-к 5'-концу (схема 2), что согласуется с литературными данными [13].

Ход кинетических кривых гидролиза РНК в комплексе РНК/тандем (рис. 3а), в отличие от кинетических кривых гидролиза РНК/ $p20$  (рис. 3б), свидетельствует в пользу не только последовательных превращений. Гидролиз РНК в этом случае начинается с накопления 17- и 8-звенных фрагментов РНК (рис. 1б и 3а, кривые 1 и 4), причем начальные скорости их накопления близки. Почти одновременно с  $rp17$  и  $rp8$  появляется самый короткий 5-звенный фрагмент РНК (рис. 1б и 3а, кривая 5), а продукты  $rp11$  и  $rp14$  присутствуют в незначительном количестве (рис. 1б и 3а, кривые 2, 3).

Как уже отмечалось, гидролиз РНК в обоих комплексах начинается с образования фрагмента  $rp17$  с близкими начальными скоростями (рис. 2а). Дальнейшие особенности процесса гидролиза в комплексе РНК/тандем частично могут быть обусловлены разной стабильностью гибридных комплексов, формируемых укорачивающимися фрагментами РНК с протяженным  $p20$  и тандемом коротких ( $rp8_1 + p4 + rp8_2$ ) олигодезоксирибо-

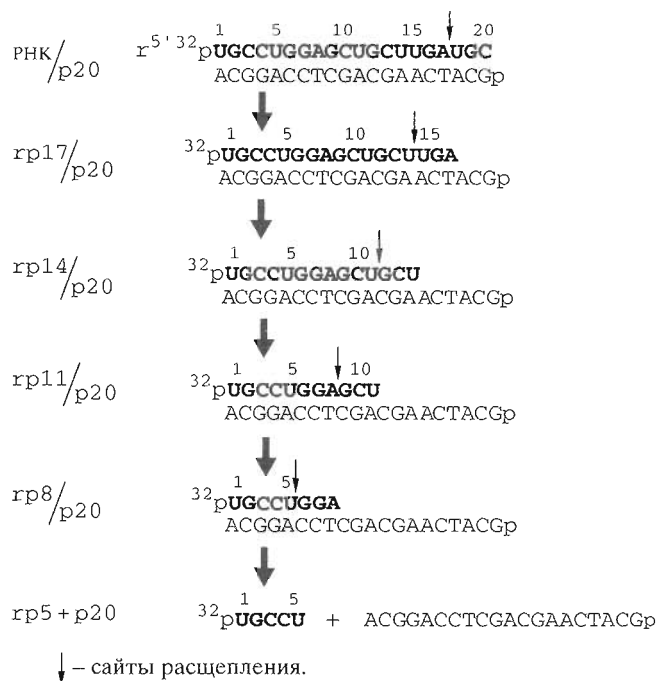


Схема 2.

нуклеотидов. Очевидно, что после первого акта гидролиза образовавшийся фрагмент  $rp17$  формирует достаточно прочный комплекс с  $p20$  (17 п. о.) и слабый комплекс с тандемом, поскольку участок комплементарного связывания  $rp17$  с октануклеотидом  $8_2$  уменьшается с 8 до 5 п. о. (схема 3). Из-за низкой стабильности и, как следствие, низкой концентрации как комплекса  $rp17$ /тандем, так и образующегося из него комплекса  $rp14/p8_1 + p4$  (схема 3, путь а) продукты  $rp14$  и  $rp11$  могут накапливаться лишь в незначительном количестве.

Основная часть  $rp17$ , по-видимому, гидролизуется по пути б (схема 3). Вызванное расщеплением падение стабильности комплекса октамера  $rp8_2$  с фрагментом  $rp17$  в свою очередь приводит к критическому снижению стабильности комплекса этого фрагмента мишени с тетрамером  $p4$  и переходу комплекса  $rp17$ /тандем в комплекс  $rp17/p8_1$ . Ранее подобный переход наблюдался при исследовании комплексообразования тандема с ДНК-аналогом использованной нами РНК-мишени. Было показано, что в присутствии двух фланкирующих октануклеотидов комплекс между ДНК-матрицей и тетрамером  $p4$  достаточно стабилен ( $T_m$  23°C). В присутствии лишь одного из октануклеотидов стабильность комплекса ДНК-тетрануклеотид резко падает ( $T_m < 7^\circ\text{C}$ ) [14].

Гидролиз РНК как в комплексе  $rp17/p8_1$  (схема 3, путь б), так и в комплексе  $rp11/p8_1$  (путь а) приводит к образованию фрагмента  $rp8$  и далее  $rp5$ . Как видно из рис. 2г, д и 3а, б, оба эти продукта в

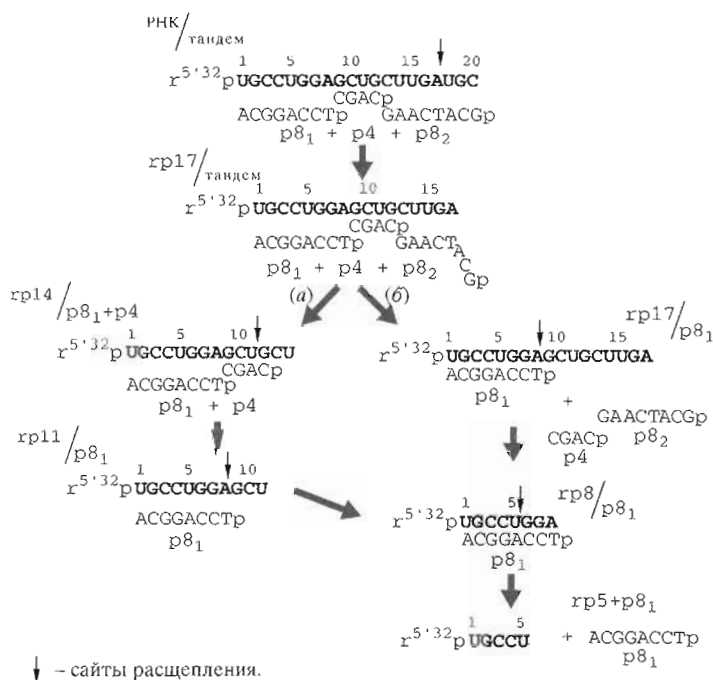


Схема 3.

системе РНК/тандем накапливаются с большей скоростью, чем в случае комплекса РНК/p20. Это может происходить за счет деструкции rp17 в составе rp17/p8<sub>1</sub>. Другим возможным объяснением наблюдаемой картины может быть параллельное узнавание РНКазой Н 5'-конца олигонуклеотида p8<sub>1</sub> в гибридном дуплексе РНК/тандем (схема 4).

Дополнительным аргументом в пользу этого предположения является близость значений на-

чальных скоростей накопления rp17 и rp8 (рис. 3а, кривые 1 и 4) и отсутствие лаг-периода при накоплении rp5 (рис. 2д, 3а) в случае тандема.

Из полученных данных следует, что процессы гидролиза РНК в комплексах РНК/p20 и РНК/тандем различаются. В первом случае гидролиз РНК начинается с 3'-конца РНК и далее протекает в 5'-направлении с последовательным образованием укороченных продуктов. Во втором – гидролиз РНК может начинаться не только с 3'-конца РНК, но и с внутренних участков РНК, участвующих в комплексообразовании с короткими олигонуклеотидами тандема, с накоплением не только последовательно укороченных фрагментов РНК, но и образующихся одновременно. Это может происходить в результате гидролиза РНК в каждом дуплексном участке, образованном РНК и коротким олигонуклеотидом тандема.

Важно отметить, что несмотря на обнаруженные отличия в процессе гидролиза РНК в комплексах РНК/p20 и РНК/тандем, деструкция РНК начинается в обоих случаях со сравнимыми начальными скоростями по сайту A<sup>17</sup>-U<sup>18</sup>. Кроме того, в случае тандема наблюдается высокая начальная скорость накопления фрагмента rp8, что обеспечивает эффективную деструкцию РНК. На рис. 4 представлены кинетические кривые гидролиза РНК-мишени в комплексе РНК/p20 и в комплексе РНК/тандем. Видно, что несмотря на имеющиеся различия в процессах гидролиза (рис. 1–3), начальная скорость и степень деструкции РНК в ком-

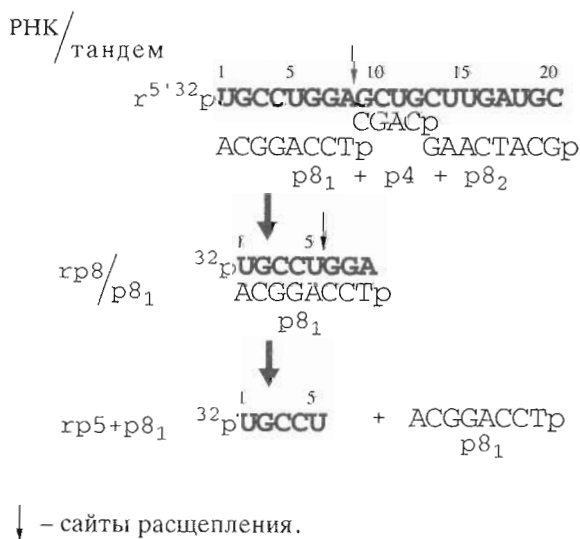


Схема 4.

плексе РНК/тандем и в комплексе РНК/p20 сравнимы.

Полученные результаты свидетельствуют, что тандемы коротких олигонуклеотидов помимо способности сайт-специфично и селективно взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами [10–12] удовлетворяют еще одному из основных критериев, предъявляемых к антисмысловым олигонуклеотидам. Они обеспечивают эффективный гидролиз РНК-мишени рибонуклеазой *H. coli*. Однако высокая эффективность гидролиза РНК-мишени даже в комплексе с октамером (p8<sub>1</sub>) позволяет допустить, что, как и в случае протяженных олигонуклеотидов, возможны повреждения не только в сайте полного связывания тандема, но и в других сайтах связывания октануклеотидов с РНК-мишенью. Однако этот вопрос – предмет специальных исследований.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы рибонуклеаза *H. coli* (Promega, США) и полинуклеотидкиназа фага T4 (Сибэнзим, Россия).

Эйкозарибонуклеотид UGCCUGGAGCUGC-UUGAUGC любезно предоставлен Веньяминой А.Г. и Репковой М.Н. (НИБХ СО РАН). Олигодезоксирибонуклеотиды любезно предоставлены Пышным Д.В. (НИБХ СО РАН).

Концентрации олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически с использованием УФ-детектора жидкостного хроматографа “Милихром” (Россия). Молярные коэффициенты поглощения при длине волны 260 нм были рассчитаны по методу [15].

**Введение радиоактивной метки** в РНК-мишень проводили с использованием полинуклеотидкиназы фага T4 (5 ед. акт.), 0.1 мКи [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТР в буферном растворе, содержащем 50 мМ Трис-НСl (рН 7.6), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1 мМ спермидин, 0.1 мМ EDTA, 5 мМ дитиотреит (общий объем 15 мкл). Меченую РНК-мишень выделяли с использованием электрофореза в 20% ПААГ, элюировали из геля буферным раствором, содержащим 0.25 М CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, 0.5 мМ EDTA, 0.1% додецилсульфата натрия, осаждали этанолом.

**Гидролиз рибонуклеазой *H. coli*** проводили в растворе, содержащем 20 мМ HEPES (рН 8.0), 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 мМ дитиотреит. Концентрация РНК-мишени во всех экспериментах составляла  $1 \times 10^{-7}$  М, олигодезоксирибонуклеотидов –  $2 \times 10^{-6}$  М. Реакционные смеси (10 мкл) инкубировали при 20°C в течение 15 мин, затем добавляли 0.15 ед. акт. рибонуклеазы *H. coli*. Через необходимое время добавляли 1 мкл раствора полиуридиловой кислоты (0.1 мкг/мл) и осаждали реакционные смеси 2% раствором перхлората лития в ацетоне. Осадок растворяли в 8 М мочеvine, со-

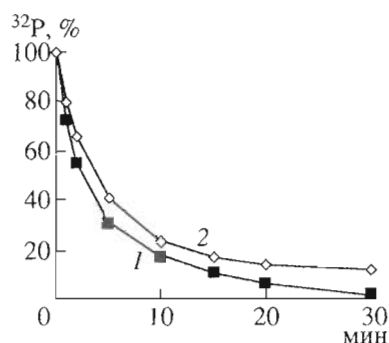


Рис. 4. Кинетические кривые гидролиза РНК-мишени РНКазой *H* в комплементарных комплексах РНК/p20 (1) и РНК/тандем (2). Условия реакции см. “Эксперимент. часть”.

держащей красителя бромфеноловый синий и ксиленцианол FF, и наносили на 20% ПААГ. Электрофорез проводили в денатурирующих условиях (0.09 М Трис-Н<sub>3</sub>ВО<sub>3</sub>, рН 8.3, 8 М мочеvine, 40°C).

Для радиоавтографии использовали пленку CP-BU NIF 100 (Бельгия), после радиоавтографии участки, содержащие радиоактивный материал вырезали и определяли их радиоактивность в воде по Черенкову на жидкостном сцинтилляционном счетчике Rackbeta (Wallac LKB, Швеция). За степень расщепления принимали процентное отношение радиоактивности в пятне, соответствующем продукту расщепления, к суммарной радиоактивности в дорожке геля.

Работа выполнена при частичной поддержке грантами INTAS-93-828-ext, Государственной научно-технической программы “Новейшие методы биоинженерии” (подпрограммы “Ген-направленные и биологически активные вещества” и “Геном человека”), межвузовской научно-технической программы “Биотехнология” и РФФИ № 99-04-49731.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antisense Therapeutics / Ed. S. Agrawal. Totowa: Humana Press, 1996.
2. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives. Boca Raton: CRC Press. Inc., 1994.
3. Oligonucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression / Ed. J.S. Cohen. Houndmills; London: Macmillan Press, 1989.
4. Walder R.W., Walder J.A. // Antisense RNA and DNA / Ed. D.A. Melton. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. P. 35–40.
5. 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.

6. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Левина А.С., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. С. 102–104.
7. Kutyavin I.V., Podyminogin M.A., Bazhina Yu.N., Fedorova O.S., Knorre D.G., Levina A.S., Mamaev S.V., Zarytova V.F. // FEBS Lett. 1988. V. 238. P. 35–38.
8. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Биоорганич. химия. 1992. Т. 18. С. 895–900.
9. Zarytova V.F., Ivanova E., Venyaminova A. // Nucleosides Nucleotides. 1998. V. 17. P. 649–662.
10. Пышный Д.В., Подыминогин М.А., Пышная И.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. С. 561–568.
11. Пышный Д.В., Подыминогин М.А., Пышная И.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. С. 895–902.
12. Плясунова О.А., Мамаева О.А., Пышный Д.В., Пышная И.А., Иванова Е.М., Воробьев П.Е., Зарытова В.Ф., Покровский А.Г. // Молекуляр. биология. 1998. Т. 32. С. 1085–1090.
13. Shatz O., Mous J., Le Grice S.F.J. // EMBO J. 1990. V. 9. P. 1171–1176.
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. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids / Ed. G.D. Fasman. Cleveland: CRC Press, 1975. V. 1. P. 589.

## Cleavage of RNA in Hybrid Duplexes by Ribonuclease H of *E. coli*. I. Substrate Properties of Complexes Formed by RNA and a Tandem of Short Oligodeoxyribonucleotides

P. E. Vorobiev and V. F. Zarytova<sup>#</sup>

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

We studied the *E. coli* RNase H cleavage of a 5'-labeled RNA fragment within two hybrid duplexes with identical sequences, one of which is formed by RNA and a 20-mer oligodeoxyribonucleotide (RNA/p20), whereas the second, by RNA and a tandem of short oligodeoxyribonucleotides (octanucleotide : (RNA/tandem)). It was shown that RNA in the RNA/p20 complex is hydrolyzed from the 3'-end to yield consecutively the 17-, 14-, 11-, 8-, and 5-mer 5'-labeled fragments. On hydrolysis of RNA in complex RNA/tandem, the same products were registered, but their accumulation rates in this case differed. Thus, the initial rates of accumulation of the 17- and 8-mer were close. Moreover, the accumulation of the final 5-mer differed considerably: in the RNA/tandem complex it appeared within first minutes of the reaction, but only after a considerable lag period in complex RNA/p20. These data testify that the tandem is involved not only in the consecutive accumulation of the shortened products (which is characteristic of complexes including extended oligonucleotides) but also in the parallel accumulation. This results from hydrolysis of each duplex segment formed by RNA and the short oligonucleotide of the tandem. Although the order of recognition and cleavage of RNA target by ribonuclease H depends on the type of the hybrid duplex, the destruction of RNA target within complex RNA/tandem and in complex with the full-size oligonucleotide occurs with a close effectiveness.

*Key words: antisense oligonucleotides, ribonuclease H, short oligonucleotide tandems*

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (3832) 39-6224; e-mail: zarytova@niboch.nsc.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 10. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.