



УДК 577.113.4:541.127

© 1992 г. О. С. Федорова, Л. М. Подуст, В. В. Горн,
Г. А. Максакова

СТРОЕНИЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК-МИШЕНИ КАК ФАКТОР, ВЛИЯЮЩИЙ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЕЕ МОДИФИКАЦИИ В КОМПЛЕКСЕ С КОМПЛЕМЕНТАРНЫМ РЕАГЕНТОМ

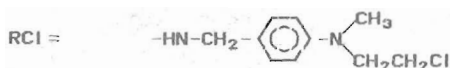
Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН

Исследована эффективность модификации трех одноцепочечных ДНК-мишеней различной длины: 41-мера (структура шпильки), 22- и 10-меров (часть петли этой шпильки) 5'-[*n*-(*N*-метил-*N*-2-хлорэтиламино)бензил]фосфамидными производными 8- и 11-звенных олигонуклеотидов, комплементарных этим мишеням. Эффективность модификации 10- и 22-меров превышает эффективность модификации 41-мера, а также ранее исследованного 303-звенного фрагмента ДНК. Это различие, вероятно, связано с участием области связывания реагентов в случае длинных мишеней в формировании вторичной и третичной структур. Из зависимостей предельной степени модификации от концентрации реагентов при 20, 25, 30 и 35°С оценены термодинамические параметры связывания реагентов с мишенями.

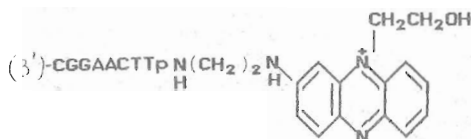
Реакционноспособные производные олигонуклеотидов, образующие комплементарные комплексы с определенными нуклеотидными последовательностями, модифицируют нуклеиновые кислоты в участках, расположенных, как правило, вблизи этих последовательностей [1]. В ряде работ было показано, что в случае олигонуклеотидных производных ароматических 2-хлорэтиламинов модификации могут подвергаться остатки нуклеозидов мишени, расположенные вдали от предполагаемого места связывания реагента по нуклеотидной цепи [2–5]. Так, при проведении модификации 303-членного одноцепочечного фрагмента ДНК [3, 5] алкилирующими производными олигонуклеотидов, комплементарных участку 261–274, модифицировался не только остаток гуанозина-258, но и гуанозин-179. Этот результат, очевидно, объясняется особенностями вторичной и третичной структуры нуклеиновой кислоты-мишени. В работе [5] нами было высказано предположение, что особенности пространственной структуры мишени влияют не только на появление точек модификации в сайтах, значительно удаленных от места связывания реагента, но и на эффективность модификации в комплементарном комплексе. Значения констант связывания алкилирующих производных олигонуклеотидов с фрагментом ДНК, оцененные из зависимостей степеней модификации от концентрации реагентов, оказались на несколько порядков ниже величин, ожидаемых на основании термодинамических параметров ДНК-дуплексов [6]. Это обусловлено тем, что количественные закономерности модификации могут осложняться формированием в районе модификации дополнительных структурированных областей. Используемый в работах [3, 5, 7] 303-звенный нуклеотидный фрагмент ДНК имеет, по-видимому, довольно сложную вторичную и третичную структуры, поэтому интересно было бы проследить, как меняются количественные закономер-

41-мер: 5' AATGGAGCGTGCCTTGAATGGGAAGAGGGTCAGGTTCCATT
 22-мер: TTTGCCTTGAATGGGAAGAGTT
 10-мер: TGGGAAGAGT

Реагент (I) 3' ACCCTTCTp-RCI
 Реагент (II) 3' CTTACCTTCTp-RCI



Эффектор:



Первичные структуры мишеней: 41- и 22-, 10-меров; реагентов (I), (II) и эффектора. Стрелкой показано модифицируемое основание

ности модификации по мере уменьшения способности нуклеотидной мишени к образованию структур типа «шпилька» и других структур в области комплексообразования с реагентом. В настоящей работе в качестве нуклеотидных мишеней были использованы отдельные элементы структуры 303-нуклеотидного фрагмента ДНК в виде 41-мера, представляющего собой участок 243–283 303-звенной нуклеотидной последовательности, образующий шпильчатую структуру [7, 8], 22- и 10-меров, нуклеотидные последовательности которых соответствуют участкам 257–278 и 261–270 (схема 1).

Каждая последующая мишень была элементом предыдущей, что позволило проследить изменение количественных параметров модификации по мере уменьшения способности мишени к структурированию.

В качестве реагентов в настоящей работе использовали 5'-[n-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензил]фосфамидные производные олигонуклеотидов (I) и (II) длиной 8 и 11 звеньев, образующие комплементарный комплекс с мишенью (схема 1). Модификацию мишени проводили при 20, 25, 30, 35°С. Продукты реакции — спитые с мишенью алкилирующие производные олигонуклеотидов — анализировали гель-электрофорезом. За накоплением продукта реакции следили по изменению на радиоавтографе интенсивности пятна, отвечающего продукту. В случае 20, 25 и 30°С продукту реакции соответствовало пятно с наименьшей электрофоретической подвижностью. При 35°С становится заметным выщепление алкилированного основания, что приводит к уменьшению интенсивности пятна, соответствующего продукту модификации. Поэтому перед нанесением на гель смесь обрабатывали пиперидином, а за накоплением продукта следили по изменению на радиоавтографе интенсивности пятна, соответствующего фрагменту мишени, образу-

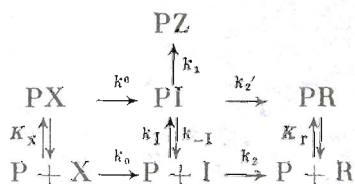
щемуся при ее расщеплении пиперидином по алкилированному основанию.

Установлено, что модификация мишени протекает по остатку гуанозина, наиболее близженному с алкилирующей функцией, но не входящему в комплементарный комплекс (на схеме 1 показан стрелкой). В контрольных экспериментах при более низких температурах было показано, что величины степеней модификации, полученные тем и другим способом, в случае коротких нуклеотидных мишеней полностью совпадают. В то же время на более длинных мишенях, таких, как 303-звенный фрагмент ДНК, при обработке пиперидином становится заметной статистическая деградация мишени, что может сильно завышать значение степени модификации. Поэтому для получения количественных характеристик модификации длинных одноцепочечных фрагментов ДНК необходим строгий контроль по расщеплению пиперидином интактной ДНК.

На рис. 1 приведены зависимости предельной степени модификации $[PZ]_{\infty}/p_0$ 22-мера ($[PZ]_{\infty}$ — концентрация продукта модификации мишени по завершении реакции, p_0 — начальная концентрация мишени) от начальной концентрации реагента x_0 для различных температур. Эти зависимости имеют вид кривых, выходящих на плато. Аналогичные концентрационные зависимости $[PZ]_{\infty}/p_0$ были получены для 10- и 41-меров в качестве мишеней. Такой характер зависимости степени модификации от концентрации реагента согласуется с механизмом процесса.

Механизм модификации нуклеиновых кислот производными олигонуклеотидов, несущими на 5'- или 3'-конце алкилирующую группу RCl, описывается схемой 2 [9]:

Схема 2



где P — нуклеиновая кислота-мишень; X — реагент; I — промежуточный реакционноспособный этилениммониевый катион, образующийся из реагента в лимитирующей стадии; R — продукт побочного превращения реагента вне комплекса (в случае ароматических 2-хлорэтиламиннов это в основном продукт гидролиза, содержащий вместо атома Cl гидроксигруппу); PZ — продукт модификации мишени; PX, PI, PR — соответствующие комплексы с мишенью; K_x и K_r — константы устойчивости комплексов PX и PR; k_0 , k_1 , k_2 , k_1 , k_{-1} , k_2' — константы скорости реакций, указанных на схеме. В работе [10] был выполнен анализ этой схемы в предположении, что P и X, а также P и R находятся в квазиравновесных концентрациях, а концентрации промежуточного катиона I и его комплекса с полимером PI могут рассматриваться как квазистационарные. Прямую реакцию $PI \rightarrow PR$ для упрощения не принимали во внимание, т. е. полагали, что $k_2' \ll k_1$, а также предполагали, что обмен между I в растворе и комплексе отсутствует, т. е. $k_2 \gg k_1[P]$. Если олигонуклеотидная часть реагента не претерпевает изменений в ходе реакции, то можно ожидать, что $K_x = K_r$. Если при этом полная концентрация мишени p_0 много меньше начальной концентрации реагента x_0 , то кинетическое уравнение для продукта модификации мише-

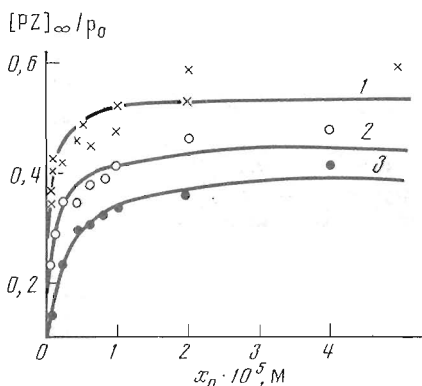


Рис. 1

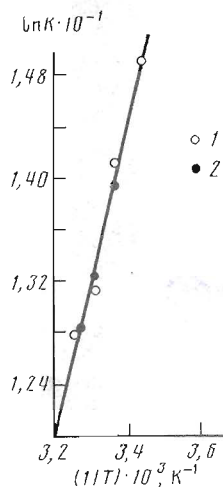


Рис. 2

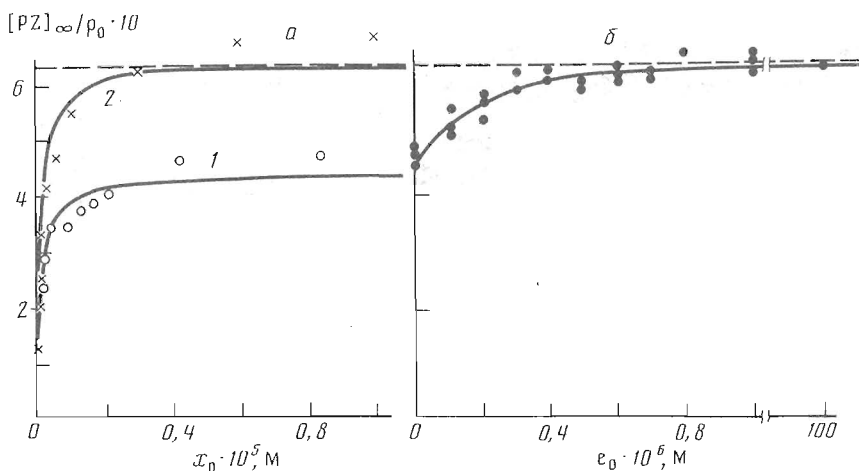


Рис. 3

Рис. 1. Зависимость предельной степени модификации $[PZ]_{\infty}/\rho_0$ 22-мера ($1 \cdot 10^{-8}$ M) от начальной концентрации x_0 реагента (I) для 20 (1), 25 (2), 35° C (3)

Рис. 2. Зависимость $\ln K_x$ от $1/T$ для 22- (1) и 10-мера (2)

Рис. 3. Зависимость предельной степени модификации $[PZ]_{\infty}/\rho_0$ 22-мера ($1 \cdot 10^{-8}$ M) реагентом (I) (1) и реагентом (II) (2) от их начальной концентрации x_0 (а) и реагентом (I) ($1 \cdot 10^{-5}$ M) от концентрации эффектора (e_0) (б)

ли PZ, по данным [10], выглядит следующим образом:

$$[PZ]/\rho_0 = 1 - \exp \{ -\gamma_{эф} K_x x_0 [1 - \exp(-k_0 t)] / (1 + K_x x_0) \}, \quad (1)$$

где

$$\gamma_{эф} = [1 + k_1 / (k_2 K_x)] / (1 + k_{-1} / k_1). \quad (2)$$

Из уравнения (1) видно, что предельная степень модификации при $t \rightarrow \infty$ не превышает величины:

$$[PZ]_{\infty}/\rho_0 = 1 - \exp [-\gamma_{эф} K_x x_0 / (1 + K_x x_0)]. \quad (3)$$

Это означает, что выход модификации зависит от степени насыщения биополимера реагентом, равной $K_x x_0 / (1 + K_x x_0)$. При $x_0 \rightarrow \infty$ $[PZ]_{\infty} / p_0$ стремится к значению

$$\lim ([PZ]_{\infty} / p_0) = 1 - \exp(-\gamma_{\text{эф}}). \quad (4)$$

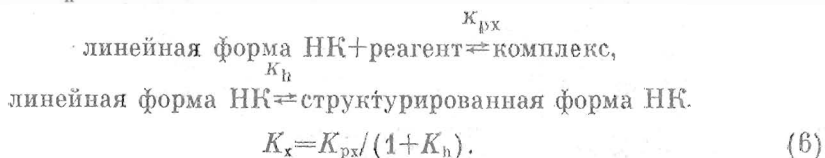
Следовательно, при высоких концентрациях реагента степень модификации стремится к значению, определяемому комбинацией констант скорости реакций промежуточного этилениммониевого катиона, входящих в выражение для $\gamma_{\text{эф}}$. На рис. 1 сплошными линиями изображены зависимости, рассчитанные по уравнению 3 на основании величин K_x и $\gamma_{\text{эф}}$, полученных при компьютерной обработке экспериментальных данных по программе нелинейной регрессии. Видно, что платовые значения $[PZ]_{\infty} / p_0$ лежат немного выше рассчитанной кривой. По-видимому, это указывает на то, что предположения, сделанные при выводе уравнения 3, слишком упрощают механизм процесса.

В отличие от предположения об отсутствии обмена между I в комплексе с P (PI) и в растворе, сделанного в сообщении [10], в работе [11] анализ схемы 2 был проведен в предположении о наличии быстрого обмена. В этом случае кинетическое выражение для степени модификации имеет вид, совпадающий с уравнением 1, однако

$$\gamma_{\text{эф}}^* = k_1 K_1 / (k_2 K_x). \quad (5)$$

Таким образом, предельная степень модификации в обоих случаях описывается уравнением 3, т. е. зависит от степени комплексобразования мишени с реагентом и имеет вид кривой с насыщением. Из этой зависимости по линейной анаморфозе или с помощью нелинейной регрессии можно оценить значения константы связывания реагента с мишенью K_x и параметра $\gamma_{\text{эф}}$.

Если в мишени область комплементарного связывания реагента занята в формировании вторичной или третичной структуры, то в уравнениях 1 и 2 величина K_x эффективна и представляет собой комбинацию константы связывания реагента с линейной формой НК-мишени K_{px} и константы равновесия между линейной и структурированной формами НК K_h :



Следовательно, если в нуклеиновой кислоте область связывания реагента участвует в формировании вторичной или третичной структуры, то это может приводить к уменьшению эффективной константы связывания реагента и соответственно к снижению степени модификации.

В таблице представлены результаты количественной обработки (уравнение 3) экспериментальных данных по модификации 41-, 22- и 10-меров реагентом (I). Здесь же для сравнения приведены данные работы [5] по модификации 303-звенного фрагмента ДНК реагентом (5')pTCTTCCCGA>CHRCI. Видно, что константы ассоциации для 22- и 10-меров с реагентом (I) имеют одинаковые значения при одной и той же температуре. Их абсолютные значения падают с увеличением температуры, причем величина K_x уменьшается приблизительно в 1,5–2,5 раза с увеличением температуры на 5°С. Одинаковые значения констант связывания реагента с этими мишенями могут свидетельствовать о том, что мишени не образуют вторичных структур, мешающих

Значения констант ассоциации K_x и параметров $\gamma_{эф}$, рассчитанные по уравнению 3 из зависимостей предельной степени модификации мишеней различной длины от концентрации реагентов (I) и (II) при разных температурах

t, °C	10-мер		22-мер		41-мер		302-мер
	$K_x \cdot 10^{-6}$, M ⁻¹	$\gamma_{эф}$	$K_x \cdot 10^{-6}$, M ⁻¹	$\gamma_{эф}$	$K_x \cdot 10^{-6}$, M ⁻¹	$\gamma_{эф}$	$K_x \cdot 10^{-4}$, M ⁻¹ [5]

Реагент (I)

20	—	—	3,02±0,81	0,74±0,04	0,16±0,04	0,60±0,05	—
25	1,15±0,31	0,67±0,04	1,37±0,36	0,58±0,03	0,14±0,04	0,55±0,06	0,002
30	0,57±0,10	0,58±0,03	0,50±0,07	0,51±0,02	0,06±0,02	0,56±0,09	—
35	0,36±0,13	0,58±0,06	0,36±0,10	0,50±0,05	—	—	0,002

Реагент (II)

20	—	—	—	—	1,21±0,31	0,79±0,06	—
25	—	—	5,87±1,43	1,00±0,08	1,28±0,12	0,59±0,02	—
30	—	—	2,21±0,44	0,90±0,06	—	—	—
35	—	—	2,92±1,03	0,87±0,11	—	—	—

образованию комплекса с реагентом. По сравнению с данными для 22- и 10-меров зависимость от температуры константы ассоциации 41-мера с реагентом (I) имеет несколько иной характер. При 20°C значение константы связывания 41-мера с реагентом (I) в 20 раз ниже, чем для более коротких мишеней — 22- и 10-меров, причем при повышении температуры до 25°C значение K_x не меняется. При дальнейшем повышении температуры на 5°C величина K_x для 41-мера уменьшается так же, как в случае с 22- и 10-мерами (~в 2,5 раза), но ее абсолютное значение остается на порядок ниже, чем для 22- и 10-меров при той же температуре. Подобные эффекты в поведении констант связывания с 303-звенной ДНК-мишенью реагентов, несущих алкилирующую группу на 3'-конце, мы наблюдали ранее в работе [5].

Были получены значения констант ассоциации K_x для модификации мишеней 22- и 41-меров реагентом (II), имеющим 11-звенный олигонуклеотидный адрес (таблица). При модификации 22-мера происходит падение K_x при повышении температуры от 25 до 35°C, тогда как в случае 41-мера значения K_x для 20 и 25°C примерно одинаковы.

Такое различие в поведении констант связывания реагентов (I) и (II) с 22- и 10-мерами, с одной стороны, и 41- и 303-мерами — с другой, видимо, можно объяснить тем, что в случае модификации 41- и 303-меров идут два конкурирующих между собой процесса — бимолекулярный процесс образования комплементарного комплекса между мишенью и адресом реагента и внутримолекулярный процесс образования шпильчатой структуры самой мишени. Это приводит к уменьшению эффективной константы связывания для длинных мишеней (41- и 303-меры) в соответствии с уравнением 6 и к снижению степени модификации.

Значения K_x при разных температурах для 22- и 10-меров в качестве мишеней линейны в анамэрфозе $\ln K_x - 1/T$ (рис. 2). Из этой зависимости были рассчитаны значения ΔH_x° и ΔS_x° , которые равны $-(23,74 \pm 1,64)$ ккал/моль и $-(51,86 \pm 5,46)$ кал/моль·К соответственно. Эти величины можно сопоставить с литературными данными по стабильности ДНК-дуплексов, так как основной вклад в сродство реагента к мишени должна вносить его олигонуклеотидная часть. По данным обзора [12] величина ΔH° такого дуплекса должна быть равна примерно -68 ккал/моль, а по данным [6] она составляет -54 ккал/моль.

Ожидаемое значение ΔS° для ДНК-дуплексов примерно -150 кал/моль·К. Причина такого расхождения между рассчитанными и найденными в наших экспериментах величинами термодинамических параметров может заключаться в том, что использованные при расчете значения соответствуют переходу между полностью разупорядоченной структурой и совершенным дуплексом. В то же время в эксперименте ДНК-дуплекс образуется изотермически между реагентом и GA-богатым участком мишени, в которой остатки пуриновых оснований могут находиться в стекинге. Наличие такого эффекта недавно было отмечено в работе [13].

Платовые значения степени модификации для производного 8-мера с понижением температуры от 35 до 20°C или при увеличении длины олигонуклеотидного адреса при переходе от 8-мера к 11-меру (рис. 3а) стремятся к значению $1 - \exp(-1) = 0,63$. Это означает, что параметр $\gamma_{\text{эф}}$ растет и стремится к единице. Аналогичный эффект наблюдается при проведении модификации производным 8-мера при 25°C в присутствии другого олигонуклеотида (рис. 3б). Этот олигонуклеотид (эффектор) [14] (схема 1) с присоединенным к нему остатком N-(2-гидроксиэтил)феназина комплементарен участку мишени, непосредственно примыкающему к участку связывания реагента, и вследствие кооперативного эффекта увеличивает сродство реагента к мишени. Следовательно, факторы, увеличивающие стабильность дуплекса, т. е. затрудняющие его диссоциацию, увеличивают значение параметра $\gamma_{\text{эф}}$ за счет уменьшения членов $k_1/(k_2K_x)$ и k_{-1}/k_1 в выражении 2. Это свидетельствует в пользу того, что величина этого параметра определяется уравнением 3 и предположения относительно отсутствия обмена между активированным реагентом (I) в комплексе и растворе, высказанные в работе [10], ближе отражают реальную ситуацию.

Экспериментальная часть

В работе были использованы олигонуклеотиды (5')d(pTCTTCCCA), (5')d(pTCTTCCCATT), (5')d(TTTCGCTTGAATGGGAAGAGTT), (5')d(AATGGAGCGTGCCTTGAATGGGAAGAGGGTCAAGTTCATT), (5')d(TGGGAAGAGT), (5')d(pTCAAGGC). Олигонуклеотиды без 5'-концевого фосфата были синтезированы методом [15] на синтезаторе «Виктория-6М». Олигонуклеотиды, фосфорилированные по 5'-концу, получены твердофазным фосфотриэфирным методом [16].

Реагенты $\text{C}_1\text{RCH}_2\text{NHpTCTTCCCA}$ (I) и $\text{C}_1\text{RCH}_2\text{NHpTCTTCCCATT}$ (II) были синтезированы по методу [17]. Их очистку от непрореагировавшего олигонуклеотида и следов нереакционноспособной формы реагента, несущей HORCH_2NH -группу, проводили с помощью микроколоночной обращенно-фазовой хроматографии на колонках с сорбентом LiChrosorb RP-18 (Merck, Германия) в градиенте концентрации метанола в буфере $0,05$ М триэтиламоний-ацетата, pH 8,0, на хроматографе «Милихром» (г. Орел).

Производное олигонуклеотида Phn-pTCAAGGC, содержащее на 5'-конце остаток феназина (Phn), было любезно предоставлено И. В. Кутявиным.

Молярные коэффициенты поглощения олигонуклеотидов рассчитывали по данным [18]. Вклад группы $\text{C}_1\text{RCH}_2\text{NH}$ - в коэффициент экстинкции реагентов (I) и (II) составляет $14,7 \cdot 10^3$ л/моль·см⁻¹ [19]. Вклад группы Phn- составляет $1 \cdot 10^4$ л/моль·см⁻¹ [20].

Для введения метки ^{32}P по 5'-концу олигонуклеотида 30 мкл раствора, содержащего 30 пмоль олигонуклеотида в буфере $0,05$ М трис-HCl (pH 7,6), $0,01$ М MgCl_2 , 5 мМ дитиотреит, $0,1$ мМ спермидин и

0,1 мМ EDTA, 30 пмоль [γ - ^{32}P]АТР (уд. акт. $3,3 \cdot 10^{-3}$ мКи/пмоль), обрабатывали 30 мин 10–20 единицами Т4-полинуклеотидкиназы при 37°С. Реакционную смесь осаждали 10-кратным объемом 2% LiClO₄ в ацетоне [21].

Модификацию олигонуклеотидов проводили в буфере состава: 0,16 М NaCl, 0,02 М Na₂HPO₄, 1 мМ EDTA, рН 7,5, при 20, 25, 30, 35°С. Реакционную смесь для каждой температуры инкубировали до полной ионизации связи С–С1 в реагенте в течение времени, в 5 раз превышающего время полуреакции [22]. Реакцию останавливали добавлением 10-кратного по объему избытка 2% LiClO₄ в ацетоне. Осадок отделяли центрифугированием и промывали спиртом.

Для расщепления олигонуклеотидов по положениям модифицированных пуринов осадок растворяли в 1 М пиперидине и инкубировали 20 мин при 100°С [23]. После обработки пиперидином олигонуклеотиды осаждали 2% LiClO₄ в ацетоне, промывали спиртом, сушили в вакууме, растворяли в 5 мкл формамида, содержащего 0,05% бромфенолового синего и 0,05% ксиленианола FF, и наносили на гель, содержащий 7 М мочевины. Электрофорез проводили при напряжении 50 В/см. Для автордиографии геля использовали рентгеновскую пленку РМ-1.

Для определения степени модификации ($[\text{PZ}]_{\infty}/p_0$) проводили денситометрирование рентгеновской пленки с помощью лазерного сканера UltroScan XL (ЛКВ, Швеция) и рассчитывали отношение площадей пиков продуктов к сумме площадей пиков продуктов и пика исходного олигонуклеотида. Оценку значений $\gamma_{\text{эф}}$ и $K_{\text{г}}$ из уравнения 3 осуществляли с помощью программы нелинейной регрессии [24].

Для определения положения оснований, подвергшихся модификации, проводили частичное расщепление олигонуклеотидов по остаткам гуанина [23]. Полученные таким образом продукты расщепления наносили на гель в качестве контрольных дорожек.

В работе использовали акриламид, N,N-метиленабисакриламид, трис-гидрат (Serva, ФРГ). Остальные реактивы были квалификации х. ч. и ос. ч.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vlassov V. V., Gaidamakov S. A., Gorn V. V., Grachev S. A. // FEBS Lett. 1985. V. 182. № 2. P. 415–418.
2. Грачев М. А., Ошевский С. И. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 272. № 5. С. 1259–1262.
3. Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Плетнев А. Г., Подымигоин М. А. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 240–247.
4. Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Левина А. С., Пичко Н. П., Подуст Л. М., Федорова О. С. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 230–239.
5. Власов В. В., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Подуст Л. М., Федорова О. С. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1221–1229.
6. Breslauer K. J., Frank R., Blöcker H., Marky L. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 11. P. 3746–3750.
7. Бросалина Е. Б., Грачев С. А. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 248–256.
8. Podust L. M., Fedorova O. S. // J. Inorg. Biochem. 1988. V. 34. № 3. P. 149–155.
9. Knorre D. G., Vlassov V. V. // Affinity Modification of Biopolymers: CRC Press. Boca Raton, 1989.
10. Knorre D. G., Chimitova T. A. // FEBS Lett. 1981. V. 131. № 2. P. 249–252.
11. Knorre D. G., Fedorova O. S. // J. Chem. Biochem. Kin. 1991. V. 1. № 1. P. 31–38.
12. Klump H. H. // Biochemical Thermodynamics. 2nd Ed./Ed. Jones M. N. Elsevier, 1988. P. 100–144.
13. Vesnaver G., Breslauer K. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 11. P. 3569–3573.
14. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Левина А. С., Мамаев С. В. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. № 1. С. 102–104.
15. Грзлов С. М., Гorn В. В., Зарытова В. Ф., Кукарев В. И., Левина А. С., Полищук А. С., Поганов В. К., Потемкин Г. А., Средин Ю. Г., Шабарова З. А. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1987. Вып. 1. С. 119–123.

16. Горн В. В., Зарытова В. Ф., Потемкин Г. А., Средин Ю. Г., Полищук А. С. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 8. С. 1054–1062.
17. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. // Биоорган. хим. 1986. Т. 12. № 4. С. 475–481.
18. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 3rd Ed./Ed. Fastman G. D. CRC Press, 1975. P. 589.
19. Богачев В. С., Веньяминова А. Г., Гринева Н. И., Ломакина Т. С. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1970. Вып. 6. С. 110–116.
20. Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911–920.
21. Бараж Г. И., Грачев С. А. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1420–1421.
22. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Тигесова Н. Г., Чижикова Т. А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 210–214.
23. Махат А. М., Gilbert M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
24. Эберт К., Эддерер Х. Компьютеры в химии. М.: Мир, 1988. С. 284.

Поступила в редакцию
23.III.1992

O. S. FEDOROVA, L. M. PODUST, V. V. GORN, G. A. МАКСАКОВА

**TARGET STRUCTURE AS A FACTOR EFFECTING THE EFFICIENCY
OF MODIFICATION OF SINGLE STRANDED DNA IN A COMPLEMENTARY
COMPLEX WITH A REAGENT**

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division of Russian Academy
of Sciences, Novosibirsk*

Site directed alkylation of three oligonucleotide targets: 41-mer (hairpin structure), 22-mer (loop part of this hairpin) and 10-mer (part of the loop) with 5'-*p*-(*N*-2-chloroethyl-*N*-methylamino)benzylamides of oligonucleotides complementary to the loop region was studied. Thermodynamic parameters of the interaction were estimated using the dependence of the limit modification extent on the reagent concentration at different temperatures. The stability of the complex increases much in the set: 302-mer carrying the above hairpin, 41-mer, 22-mer; data on 22-mer and 10-mer being almost identical. This indicates significant influence of the loop supporting structure on the interaction with antisense reagents.