



УДК 541.145+541.127+547.963.32.07+577.113.4

КИНЕТИКА ФОТОМОДИФИКАЦИИ ДНК ПРОИЗВОДНЫМИ 1-[3-(n-АЗИДОТЕТРАФОРБЕНЗОИЛ)АМИНОПРОПИЛ]- 5'-ФОСФАМИДОВ ДЕЗОКСИРИБООЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В СОСТАВЕ МОДЕЛЬНЫХ ДУПЛЕКСОВ

© 1995 г. А. В. Казанцев, Г. А. Максакова, О. С. Федорова*

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

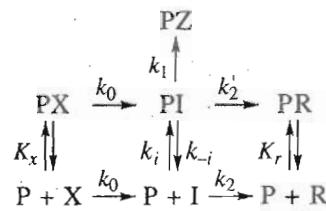
Поступила в редакцию 15.09.94 г. После доработки 10.05.95 г.

Изучена кинетика фотомодификации при 37°C 26-звенного дезоксирибонуклеотида pTGCCTTGAATGGAAAGAGGGTCATT производными комплементарных олигонуклеотидов pTCTCCCATTC, pTCTCCCA и pTCCCA, несущими на концевой фосфатной группе остаток (*n*-азидотетрафорбензоил)аминопропиламина (-ArN₃) (реагенты (I), (II), (III) соответственно). Установлено, что в ходе облучения реагенты инактивируются с потерей сродства к мишени. Предложено кинетическое уравнение, описывающее процесс модификации. Из зависимости предельной по времени степени модификации от концентрации реагентов определены константы ассоциации реагентов с мишенью (K_x), равные $(9.9 \pm 0.4) \times 10^4$, $(1.1 \pm 0.1) \times 10^5$, $(8.4 \pm 2.1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, для реагентов (I), (II) и (III) соответственно и эффективность модификации в комплексе (γ_{ef}), равная для всех реагентов ≈ 0.3 . Из зависимости степени модификации $[PZ]/p_0$ от времени для реагента (II) определена константа скорости лимитирующей стадии фотомодификации $k_0 = (7.9 \pm 0.9) \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, близкая к измеренной константе скорости фотолиза *n*-азидотетрафорбензойной кислоты, равной $k_p = (5.5 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$.

Ключевые слова: производные олигонуклеотидов, фотомодификация ДНК, кинетика.

Проведенные в последние годы исследования показали, что данные о зависимости предельного выхода внутрикомплексного алкилирования олигонуклеотида от концентрации реагента – комплементарного олигонуклеотида, несущего реакционноспособную группу, – позволяют определить сродство реагента к олигонуклеотиду-мишени, т.е. константу ассоциации образующегося дуплекса [1, 2]. Одним из существенных аспектов, который влияет на количественные характеристики процесса, является воздействие побочных реакций на состояние “адресующего” олигонуклеотида в составе реагента. При сохранении этого олигонуклеотида и тем самым его сродства к олигонуклеотиду-мишени побочные продукты превращения реагента также сохраняют сродство к мишени и при протекании процесса в квазиравновесном режиме становятся конкурентными ингибиторами внутрикомплексной модификации. Наиболее детальный анализ кинетики внутрикомплексной модификации был проведен для алкилирования реагентом, несущим *n*-[N-метил-N-(2-хлор-

этил)амино]фенильный остаток. Этот процесс может быть описан схемой [1 - 3]



где Р – ДНК-мишень; X – реагент; I – этилениминиевый катион, образующийся из реагента в лимитирующей стадии; R – продукт его гидролиза в растворе; PZ – продукт модификации мишени; PX, PI и PR – соответствующие комплексы X, I и R с мишенью; K_x , K_r – константы ассоциации X и R с мишенью; k_0 – константа скорости лимитирующей стадии, k_1 – константа скорости модификации мишени активированным реагентом внутри комплекса, k_2 – константа скорости первого порядка взаимодействия активного интермедиата I с водой и компонентами буфера, k'_2 – константа скорости инактивации реакционноспособной функциональной группы реагента в составе комплекса PI в побочных реакциях с раствором, k_i , k_{-i} – константы скорости образования и распада комплекса PI.

* Автор для переписки.

Префикс “d” в обозначениях дезоксирибонуклеотидов опущен.

Для предельных случаев сохранения и исчезновения сродства продукта побочного превращения к мишени в условиях квазиравновесия и при избытке реагента по отношению к мишени были получены два кинетических уравнения [2, 4]:

а) если реагент полностью сохраняет сродство к мишени, т.е. $K_x = K_r$, то

$$[PZ]/p_0 = 1 - \exp \{ -\gamma_{ef} K_x x_0 \times \\ \times [1 - \exp(-k_0 t)] / (1 + K_x x_0) \}, \quad (1)$$

где

$$\gamma_{ef} = k_1 / (k_1 + k'_2), \quad (2)$$

б) если реагент полностью теряет сродство к мишени, т.е. его олигонуклеотидный фрагмент подвергается деструкции и $K_r = 0$, то

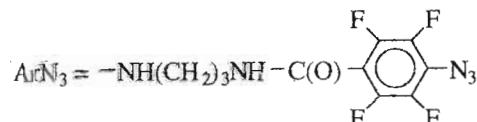
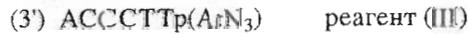
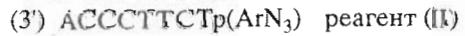
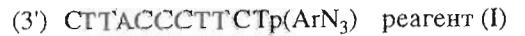
$$[PZ]/p_0 = 1 - \{ [1 + K_x x_0 \exp(-k_0 t)] / (1 + K_x x_0) \}^{\gamma_{ef}}. \quad (3)$$

Экспериментальные исследования были в основном выполнены для алкилирующих реагентов (производных, несущих *n*-[N-метил-N-(2-хлорэтил)амино]фенильный остаток [2, 4]), а также для одного из случаев окислительно-восстановительной деструкции олигонуклеотида-мишени производным Fe-порфирина [5].

Представлялось существенным выяснить, в какой мере разработанный подход может быть использован для описания внутрикомплексной фотоаффинной модификации биополимеров, которая в последнее время рассматривается как один из наиболее перспективных видов модификации при использовании реакционноспособных производных олигонуклеотидов. Цель настоя-

щей работы – исследование фотомодификации ДНК производными 1-[3-(*n*-азидотетрафторбензоил)аминопропил]-5'-фосфамидов дезоксирибоолигонуклеотидов в составе модельных дуплексов.

В качестве мишени был выбран 26-звенный дезоксирибоолигонуклеотид TTGCCTTGAATGGAGGGTCATT, являющийся фрагментом ДНК, использовавшейся ранее в качестве мишени для направленного алкилирования [2, 6]. В качестве реагентов были использованы фотоактивируемые производные дезоксирибоолигонуклеотидов pTCTTCCCATT (11-мер), pTCTTCCCA (8-мер) и pTTCCCC (6-мер) (реагенты (I), (II) и (III)), комплементарные к участкам мишени 8 - 18, 11 - 18 и 11 - 16 соответственно и несущие на 5'-концевой фосфатной группе остаток 3-(*n*-азидотетрафторбензоил)аминопропиламина (-ArN₃):



Предварительно была изучена кинетика фотолиза *n*-азидотетрафторбензойной кислоты в растворе. Изменения спектров оптического поглощения раствора, происходящие в ходе облучения, представлены на рис. 1. Исходная *n*-азидотетра-

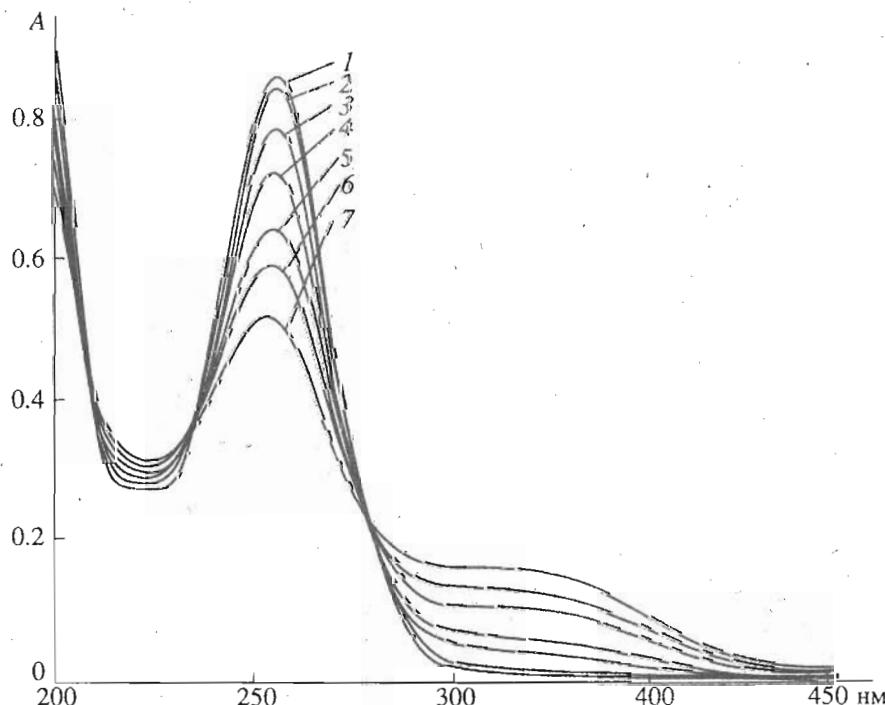


Рис. 1. Изменение оптического спектра *n*-азидотетрафторбензойной кислоты (3.7×10^{-5} М, $l = 1$ см) в зависимости от времени облучения (кривым 1 - 7 соответствуют времена облучения 0, 10, 60, 120, 300, 600, 900 с).

фторбензойная кислота имеет максимум поглощения на длине волны $\lambda = 256$ нм. При фотолизе происходит уменьшение оптического поглощения на этой длине волны и в оптическом спектре появляется плечо в районе 320 - 330 нм, где исходный азид не поглощает. Наличие трех изобестических точек свидетельствует о превращении азида преимущественно в один продукт. Константу скорости фотолиза (k_p) находили с помощью обработки этой кинетической кривой зависимости поглощения A_{256} от времени (рис. 2) по уравнению (4) (см. "Экспер. часть").

Получено, что $k_p = (5.5 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, т.е. время полупревращения $\tau_{1/2}$ составляет ~ 120 с. Следовательно, на временах, равных $5\tau_{1/2}$ (~ 600 с), фотолиз реагента должен заканчиваться.

При исследовании фотомодификации образцы, содержащие ^{32}P -меченую мишень и реагент, облучали при 37°C , затем обрабатывали пиперидином и наносили на денатурирующий 20% ПААГ. После разделения реакционной смеси электрофорезом и радиоавтографии наблюдали появление как полосы, обладающей меньшей электрофоретической подвижностью, так и четырех полос с большей подвижностью, соответствующих расщеплению по остаткам аденоцина (A18) и гуанозина (G17, G19, G20) (рис. 3). На продукт, не подвергающийся расщеплению при обработке пиперидином, приходится примерно доля в 15 - 20% общей модификации. Среди полос с большей подвижностью в геле максимальное расщепление соответствует модификации по остатку G19 (40 - 50% общей степени модификации). При расчете суммарной степени модификации учитывались все эти полосы.

Были получены кинетические кривые модификации мишени реагентами (I) и (II), представленные на рис. 4. Видно, что они стремятся к достижению платовых значений при $t \geq 590$ с, что совпадает с временем полного фотолиза *n*-азидотетрафторбензойной кислоты в растворе.

При времени облучения ≥ 600 с были получены зависимости предельной степени модификации при 37°C от концентрации реагентов (I), (II) и (III) (рис. 5). Они имеют типерболический характер, что характерно для реакций, протекающих через образование комплексов между взаимодействующими молекулами.

Согласно существующим представлениям о механизме фотолиза ароматических азидов [7, 8], модификация протекает через промежуточное образование синглетного или триплетного нитрена или с помощью образующегося из синглетного нитрена семичленного кетенимина. Возбуждение азидной группы реагента при используемой в работе интенсивности и длине волны облучения — самая медленная стадия процесса фотолиза (ср. данные [9]), поэтому константа скорости

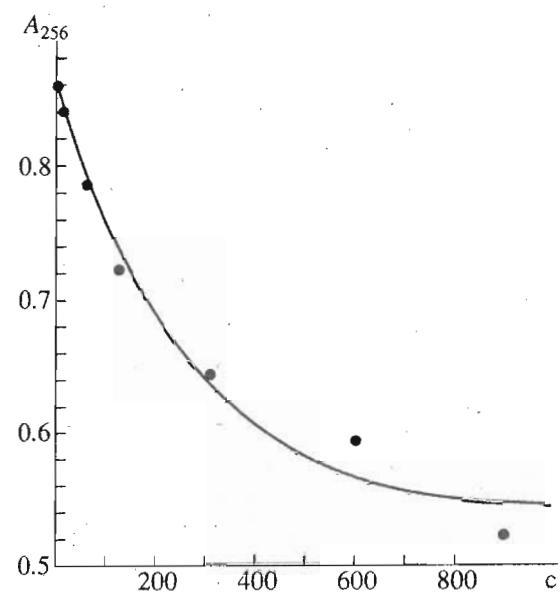


Рис. 2. Зависимость поглощений раствора *n*-азидотетрафторбензойной кислоты на длине волны 256 нм (A_{256}) от времени облучения t .

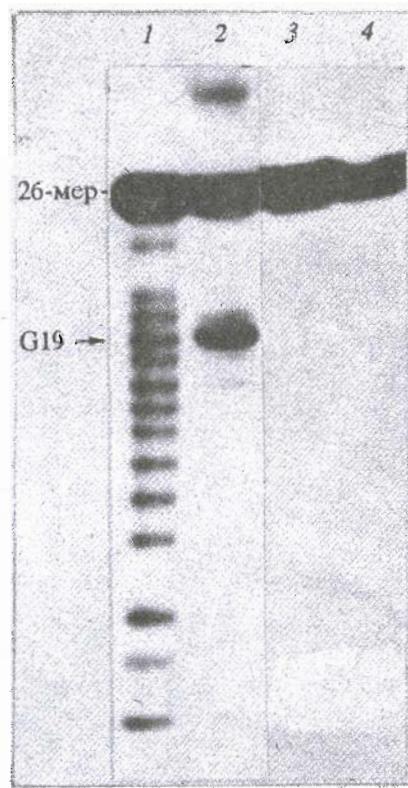


Рис. 3. Радиоавтограф, полученный при разделении продуктов фотомодификации 26-мера реагентом (II) ($x_0 = 6 \times 10^{-5} \text{ M}$): 1 — расщепление 26-мера по остаткам А + Г [21]; 2 — облучение 26-мера в присутствии реагента; 3 — облучение 26-мера в отсутствие реагента; 4 — исходный 26-мер без облучения ($p_0 \approx 1 \times 10^{-8} \text{ M}$). Образцы на дорожках 1 - 4 подвергались обработке пиперидином.

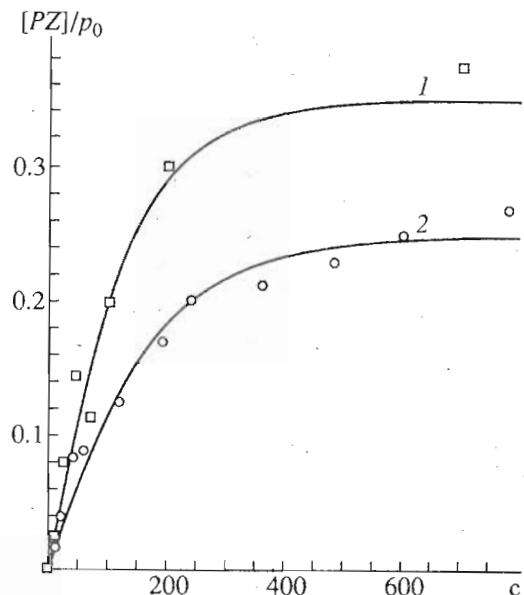


Рис. 4. Кинетические кривые ($[PZ]/p_0$) - t модификации 26-мера реагентами (I) (кривая 1, $x_0 = 8.77 \times 10^{-7}$ М) и (II) (кривая 2, $x_0 = 1.45 \times 10^{-5}$ М, $p_0 \approx 1 \times 10^{-8}$ М).

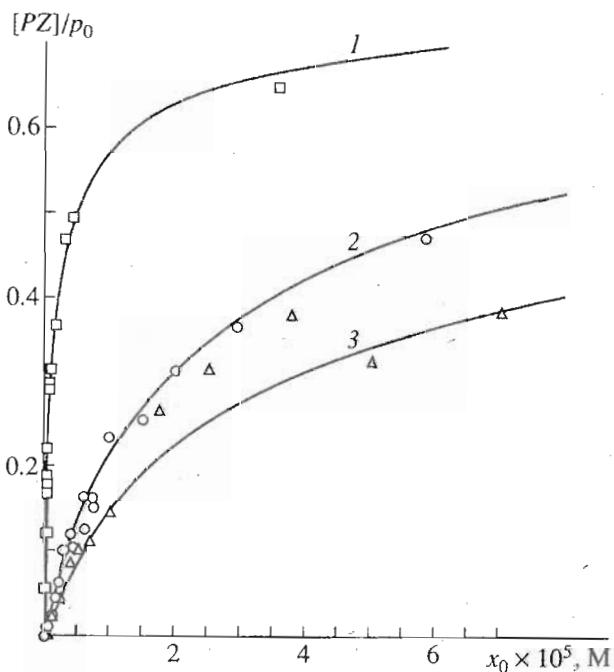


Рис. 5. Зависимости степени модификации $[PZ]/p_0$ 26-мера при времени облучения, равном 600 с, от концентрации x_0 реагентов (I), (II) и (III) (кривые 1, 2 и 3 соответственно) ($p_0 \approx 1 \times 10^{-8}$ М).

этой стадии и определяет величину k_p . Эта константа в свою очередь определяется интенсивностью облучения и коэффициентом экстинкции азидогруппы на длине волны облучения.

В работе [10] было показано, что модификация протекает в условиях квазиравновесия, если константа скорости лимитирующей стадии реакции

модификации меньше, чем константа скорости распада дуплекса между реагентом и мишенью. Последнюю можно примерно оценить на основании экспериментально полученных значений констант устойчивости дуплексов алкилирующих производных таких же олигонуклеотидов, что и в реагентах (I), (II) и (III), и равных $(2.9 \pm 1.0) \times 10^6$ (35°C) [11], $(3.6 \pm 1.0) \times 10^5$ (35°C) [11] и $(2.2 \pm 0.4) \times 10^4$ М $^{-1}$ (25°C) [6] соответственно. Поскольку константы скорости образования олигонуклеотидных дуплексов, как правило, равны $10^6 - 10^7$ М $^{-1}$ с $^{-1}$ [12], величины констант скорости распада дуплексов должны лежать в диапазоне $5 \times 10^3 - 0.3$ с $^{-1}$, т.е. быть существенно больше, чем k_p . Поэтому модификация должна протекать в квазиравновесных условиях. Следовательно, фотомодификация нуклеиновых кислот арилазидными производными олигонуклеотидов может быть описана такой же кинетической схемой, как и для алкилирующих производных олигонуклеотидов, а кинетические уравнения (1) - (3) применимы и для описания процесса фотомодификации.

Чтобы установить, какое из уравнений, (1) или (3), можно использовать для описания кинетики фотомодификации, необходимо выяснить, подвергается ли олигонуклеотидная часть реагента фотоиндуцированной деградации. Для этого были проведены следующие эксперименты. После облучения растворов реагента (II) полученные продукты анализировали методами обращенно-фазовой и ионообменной хроматографии. При этом наблюдали падение интенсивности поглощения пика реагента (II), а при обращенно-фазовой хроматографии – появление как минимум четырех новых пиков (данные будут опубликованы отдельно). Чтобы выяснить, обладают ли продукты деградации реагента сродством к ДНК, исследовали фотомодификацию олигонуклеотида-мишени в присутствии предварительно облученного реагента (II). Данные рис. 6 свидетельствуют о том, что только 200-кратный избыток предварительно облученного реагента (II) по отношению к необлученному уменьшает степень модификации примерно в 2 раза. Следовательно, можно полагать, что в ходе облучения реагент (II) теряет сродство к мишени, т.е. кинетика фотомодификации может быть описана уравнением (3). Полагая, что член $\exp(-k_0 t)$ при $t \geq 600$ с близок к нулю, предельная по времени степень модификации будет описываться уравнением (5) (см. "Экспер. часть").

На основании данных, представленных на рис. 5, с помощью уравнения (5) были рассчитаны константы связывания (K_x) реагентов с олигонуклеотидом-мишенью, а также эффективности модификации мишени в комплексе с реагентом γ_{ef} (таблица). Для сравнения в таблице приведены величины констант связывания (K_x) алкилирующих производных олигонуклеотидов, несущих вместо группы N_3Ar - остаток

$\text{CICH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{NH-}$ (-RCI) [6, 11]. Видно, что значения K_x для фотоактивируемых и алкилирующих производных соответствующих олигонуклеотидов по порядку величины совпадают. Низкое значение γ_{ef} означает, что эффективность модификации в составе комплексов с мишенью для арилазидных производных олигонуклеотидов довольно низка.

Зависимость степени модификации $[PZ]/p_0$ олигонуклеотида-мишени реагентом $(\text{N}_3\text{Ar})\text{pTCTTCCCC}$ от времени (рис. 4) была обработана по уравнению (3) с целью оценки значений k_0 и γ_{ef} . При этом использовались значения K_x , рассчитанные из концентрационных зависимостей (см. таблицу). Получено, что $k_0 = (7.9 \pm 0.9) \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, $\gamma_{ef} = 0.31 \pm 0.01$. Видно, что константа скорости лимитирующей стадии процесса фотомодификации неплохо согласуется с константой скорости фотолиза n -азидотетрафторбензойной кислоты в растворе, а значение эффективности модификации в дуплексе (γ_{ef}) практически совпадает с величиной, рассчитанной из концентрационной зависимости степени модификации.

Результаты данной работы свидетельствуют о том, что в отличие от производных дезоксирибоолигонуклеотидов с алкилирующими ароматическими 2-хлорэтиламинаами [2, 6, 11] или катализирующими окислительную модификацию железопорфиринаами [5] фотоактивируемые арилазидные производные олигонуклеотидов параллельно расходятся в растворе, теряя сродство к мишени. Тем не менее, как и в случае первых двух типов производных, степень модификации зависит от степени связывания нуклеиновой кислоты-мишени в комплекс с реагентом (см. уравнение 5). Поэтому, исследуя зависимость предельной по времени степени модификации мишени от концентрации реагента, можно определять константы связывания фотоактивируемых производных олигонуклеотидов с комплементарными последовательностями, что особенно важно при исследовании взаимодействия с длинными нуклеиновыми кислотами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дезоксирибоолигонуклеотиды, фосфорилированные по 5'-концу (pTTCCC , pTCTTCCCC и pTCTTCCCCATTC), были получены твердофазным фосфотриэфирным методом [13]. Олигонуклео-

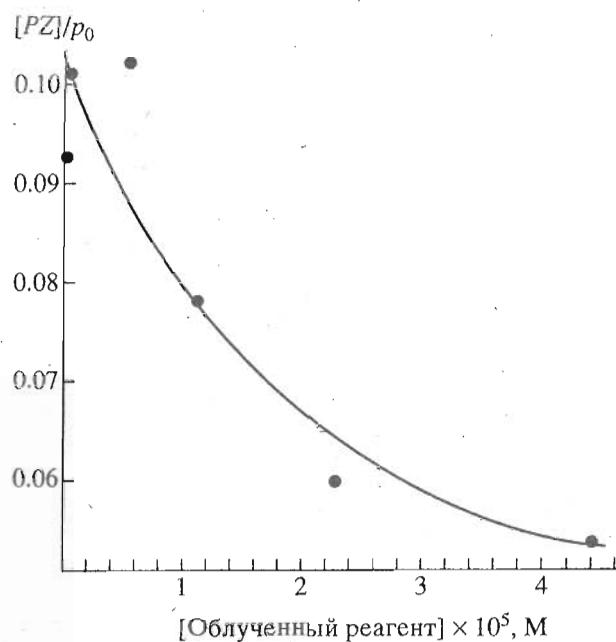


Рис. 6. Зависимость степени модификации 26-мера $[PZ]/p_0$ реагентом (II) при времени облучения, равном 600 с ($x_0 = 2.85 \times 10^{-7} \text{ M}$, $p_0 \approx 1 \times 10^{-8} \text{ M}$), от концентрации реагента (II), предварительно облученного в течение 1000 с.

тид без 5'-концевого фосфата ($\text{TTGCCTTGAA-TGGGAAGAGGGTCATT}$) был синтезирован методом [14] на синтезаторе "Виктория-бМ".

Производные олигонуклеотидов с алифатической аминогруппой – $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}]\text{pTTCCC}$, $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}]\text{pTCTTCCCC}$ и $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}]\text{pTCTTCCCCATTC}$ – синтезировали по методу [15]. Для этого активировали концевую фосфатную группу смесью трифенилfosfina и 2,2'-диiriцилдисульфида в присутствии N-метилимидазола и добавляли 5 мкл пропилендиамина на 6 - 7 ОЕ₂₆₀ цетавлоновой соли олигонуклеотида в 50 мкл DMSO. Через 30 мин реакционную смесь осаждали 15-кратным объемом эфира. Затем трижды переосаждали 1 мл ацетона из 70 мкл водного раствора 3 M LiClO_4 . Осадок дважды промывали ацетоном и высушивали под вакуумом.

Реагенты $(\text{N}_3\text{Ar})\text{pTTCCC}$, $(\text{N}_3\text{Ar})\text{pTCTTCCCC}$ и $(\text{N}_3\text{Ar})\text{pTCTTCCCCATTC}$ были синтезированы

Величины констант ассоциации K_x реагентов (I), (II) и (III) с мишенью и значения параметра γ_{ef}

Реагент	K_x, M^{-1}	γ_{ef}	K_x, M^{-1*}
$(\text{N}_3\text{Ar})\text{pTTCCC}$	$(9.9 \pm 0.4) \times 10^4$	0.27 ± 0.05	$(2.2 \pm 0.4) \times 10^4$ (25°C) [6]
$(\text{N}_3\text{Ar})\text{pTCTTCCCC}$	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^5$	0.33 ± 0.03	$(3.6 \pm 1.0) \times 10^5$ (35°C) [11]
$(\text{N}_3\text{Ar})\text{pTCTTCCCCATTC}$	$(8.4 \pm 2.1) \times 10^6$	0.20 ± 0.02	$(2.9 \pm 1.0) \times 10^6$ (35°C) [11]

* Для алкилирующих производных соответствующих олигонуклеотидов, содержащих остаток -RCI.

из N-оксисукцинимидного эфира* *n*-азидотетрафторбензойной кислоты и производных $[NH_2(CH_2)_3NH]pTCCCCA$, $[NH_2(CH_2)_3NH]pTCTCCCCA$ и $[NH_2(CH_2)_3NH]pTCTCCCATTC$ по методике, описанной в работе [16]. Реагенты выделялись методом обращенно-фазовой хроматографии на колонках с сорбентом LiChrosorb RP-18 (Merck) в градиенте концентрации метанола в буфере 0.05 М триэтиламмонийacetата (pH 8.0) на хроматографе "Милихром" (г. Орел).

Молярные коэффициенты поглощения олигонуклеотидов на длине волнны 260 нм рассчитывали по данным [17], вклад группы N_3Ar - в коэффициент экстинкции реагентов составлял $2.33 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ [18].

Для введения метки ^{32}P по 5'-концу олигонуклеотидов 30 мкл растворов, содержащих 30 пмоль олигонуклеотидов в буфере 0.05 М трис-HCl (pH 7.6), 0.01 М $MgCl_2$, 5 мМ дитиотрейт, 0.1 мМ спермидин, 0.1 мМ EDTA, 30 пмоль [γ - ^{32}P]ATP (уд. акт. 3.3×10^{-3} мКи/пмоль), выдерживали 30 мин с 10 - 20 ед. акт. T4-полинуклеотидкиназы при 37°C. Реакционную смесь осаждали 10-кратным объемом 2% $LiClO_4$ в ацетоне [19]. Меченные олигонуклеотиды выделяли электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ, радиоактивные полосы выявляли радиоавтографией и вырезали из геля. Меченные олигонуклеотиды элюировали из геля путем выдерживания в 300 мкл бидистиллята в течение 20 ч при 4°C (элюировалось примерно 70%). Олигонуклеотиды осаждали из раствора 5-кратным по объему избытком 2% $LiClO_4$ в ацетоне. Осадки трижды промывали 200 мкл ацетона, высушивали в вакууме и растворяли в 100 мкл бидистиллята. Концентрации полученных растворов меченых олигонуклеотидов не превышали 2.5×10^{-7} М.

Облучение образцов, объем которых составлял 40 мкл, проводили в планшете для иммунологических реакций, помещенном на поверхность воды в водяном термостате U-8 (ГДР) на расстоянии 25 см под ртутной лампой ДРШ-1000, через светофильтр ФС-6, отрезающий область спектра <300 нм. Интенсивность попадающего в ячейки планшета света была определена с помощью ферриоксалатного актинометра Хатчарда-Паркера [20] и составила 4.34×10^{15} квант/с.

Фотомодификацию исследовали в буфере состава: 50 мМ трис-HCl (pH 7.8), 50 мМ KCl, 6 мМ $MgCl_2$. Объем облучаемых образцов составлял 40 мкл. Образцы помещали в лунки планшеты и терmostатировали при 37°C в течение 3 мин, а затем проводили облучение. Уменьшение объема раствора, связанное с испарением, не превышало 10%. Облученные растворы немедленно переносили в полипропиленовые пробирки, содержащие

1 мкл 500 мМ EDTA и 1 мкл 1.4 мкг/мкл раствора суммарной тРНК. К растворам добавляли 400 мкл 2% $LiClO_4$ в ацетоне. Осадки отделяли центрифугированием, дважды промывали 80% этанолом, а затем ацетоном и высушивали в вакууме.

Для расщепления олигонуклеотидов по положениям модифицированных пуринов осадок растворяли в 50 мкл 1 М пиперицина и выдерживали 45 мин при 95°C [21], затем осаждали и промывали так, как описано выше.

Перед нанесением на денатурирующий 20% ПААГ осадки растворяли в 5 мкл раствора 7 М мочевины, содержащего 0.1% бромфенолового синего и 0.1% ксиленцианола FF. Электрофорез осуществляли при напряжении 50 В/см. Радиоавтографию геля на рентгеновскую пленку РМ-В с усиливающим экраном проводили в течение 10 - 20 ч при -10°C.

Степень модификации определяли с помощью сканирования радиоавтографов на лазерном денситометре LKB 2222 UltroScan XL. Предварительно была получена калибровочная кривая зависимости степени засвечивания рентгеновской пленки от интенсивности радиоактивного излучения. Полученные в результате сканирования величины оптического поглощения засвеченного участка рентгеновской пленки пересчитывались к истинным значениям с помощью калибровочной зависимости. Величины $[PZ]/p_0$ рассчитывали как отношение площадей пиков продуктов к сумме площадей пиков продуктов и пика исходного олигонуклеотида. Ошибка определения степени модификации, как правило, не превышала 20%.

При исследовании кинетики фотолиза *n*-азидотетрафторбензойной кислоты 80 мкл раствора помещали в лунки планшеты для иммунологических реакций и облучали в течение требуемого времени. Затем 40 мкл раствора отбирали, разбавляли до 3 мл и регистрировали спектр оптического поглощения на спектрофотометре Shimadzu UV-2100.

Планшеты во всех случаях предварительно обрабатывали 1 ч при 37°C 1% раствором желатина в буфере для подавления сорбирующих свойств поверхности. После этого планшеты многократно промывались при энергичном встряхивании.

Константу скорости фотолиза (k_p) находили с помощью обработки кинетической кривой $A_{256}(t)$ по уравнению

$$A_t = (A_0 - A_\infty) \exp(-k_p t) + A_\infty. \quad (4)$$

Константы связывания реагентов с мишенью находили из зависимостей степени модификации от концентрации реагентов при времени облучения 600 с, которые описываются уравнением, справедливым для $t \rightarrow \infty$:

$$[PZ]_{t \rightarrow \infty}/p_0 = 1 - (1 + K_x x_0)^{-\gamma_{ef}}. \quad (5)$$

Количественную обработку результатов экспериментов проводили с помощью программы

* Получен Т.А. Приходько в лаборатории органического синтеза НИБХ СО РАН.

нелинейной регрессии [22]. Кривые, представленные на рисунках, теоретически рассчитаны по соответствующим уравнениям с помощью параметров, полученных при количественной обработке.

Работа выполнена по гранту № 93-04-2259 Российского фонда фундаментальных исследований и гранту программы "Новейшие методы биоинженерии", раздел "Ген направляемые биологически активные вещества".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Knorre D.G., Vlassov V.V. Affinity Modification of Biopolymers. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1989.
- Knorre D.G., Vlassov V.V., Lebedev A.V., Zarytova V.F., Fedorova O.S. Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1993.
- Кнорре Д.Г., Чимитова Т.В. // Молекулярная биология. 1978. Т. 12. С. 814 - 821.
- Кнорре Д.Г., Зарытова В.Ф., Бадашкеева А.Г., Федорова О.С. // Итоги науки и техники. Биотехнология. М.: ВИНИТИ, 1991. Т. 37.
- Frolova E.I., Fedorova O.S., Knorre D.G. // Biochimie. 1993. V. 75. P. 5 - 12.
- Федорова О.С., Одинаев А.Д., Горн В.В., Максакова Г.А., Перебоева О.С., Кнорре Д.Г. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 932 - 943.
- Schnapp K.A., Poe R., Leyva E., Soundararajan N., Platz M.S. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 172 - 177.
- Schnapp K.A., Platz M.S. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 178 - 183.
- Грицан Н.П., Притчина Е.А. // Успехи химии. 1992. Т. 61. С. 910 - 939.
- Кнорре Д.Г., Федорова О.С. // Докл. АН СССР. 1990. Т. 313. С. 222 - 224.
- Федорова О.С., Подуст Л.М., Горн В.В., Максакова Г.А. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 1496 - 1504.
- Кантор Ч.Р., Шиммел П.Р. Биофизическая химия. Т. 3. М.: Мир, 1985.
- Горн В.В., Зарытова В.Ф., Потемкин Г.А., Средин Ю.Г., Полищук А.С. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. С. 1054 - 1062.
- Грязнов С.М., Горн В.В., Зарытова В.Ф., Кумарев В.П., Левина А.С., Полищук А.С., Потапов В.К., Потемкин Г.А., Средин Ю.Г., Шабарова З.А. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1987. Вып. 1. С. 119 - 123.
- Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Халимская Л.М. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. С. 475 - 481.
- Добриков М.И., Зарытова В.Ф., Комарова Н.И., Левина А.С., Лохов С.Г., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 540 - 549.
- Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 3rd Ed. / Ed. Fastman G.D. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1975.
- Levina A.S., Tabatadze D.R., Khalimskaya L.M., Prichodko T.A., Shishkin G.V., Alexandrova L.A., Zarytova V.P. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 319 - 325.
- Барам Г.И., Грачев С.А. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. С. 1420 - 1421.
- Калверт Дж., Питтс Дж. Фотохимия. М.: Мир, 1968. С. 635.
- Maxam A.M., Gilbert M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499 - 560.
- Эберт К., Эдерер Х. Компьютеры в химии. М.: Мир, 1988. С. 284.

Kinetics of DNA Photomodification with Derivatives of 1-[3-(*p*-Azidotetrafluorobenzoyl)aminopropyl]-5'-phosphamides of Deoxyribonucleotides in Model Duplexes

A. V. Kazantsev, G. A. Maksakova, and O. S. Fedorova¹

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

Abstract — Kinetics of photomodification of 26-meric deoxyribonucleotide pTTGCCTTGAATGGGAA-GAGGGTCATT with derivatives of the complementary oligonucleotides pTCTTCCCATTTC, pTCTTCCCA, and pTTCCCA bearing a residue of (*p*-azidotetrafluorobenzoyl)aminopropylamine ($-\text{ArN}_3$) attached to the terminal phosphate (reagents I, II, and III, respectively) was studied at 37°C. It was established that during irradiation the reagents are inactivated, losing their affinity to the target. A kinetic equation describing the modification was suggested. From the dependence of the time-limited modification level on the reagent concentration, the association constants of the reagents with the target were determined: [$K_x = (9.9 \pm 0.4) \times 10^4$, $(1.1 \pm 0.1) \times 10^5$, and $(8.4 \pm 2.1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ for reagents I, II, and III, respectively] and the efficiency of the modification in the complex γ_{ef} (ca. 0.3 for all the reagents) were determined. From the dependence of the modification level $[PZ]/p_0$ on time for reagent II, the rate constant was determined for the rate-determining step of the photomodification $k_0 = (7.9 \pm 0.9) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, which is close to the rate constant for the photolysis of *p*-azidotetrafluorobenzoic acid $k_p = (5.5 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

Key words: oligonucleotide derivatives, DNA photomodification, kinetics.

¹ To whom correspondence should be addressed.