



УДК 577.113.541.127

## ИЗУЧЕНИЕ КООПЕРАТИВНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРОИЗВОДНЫХ ДЕЗОКСИРИБООЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ДНК МЕТОДОМ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ

© 1995 г. А. Адина-зада, О. С. Федорова\*

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

Поступила в редакцию 29.12.94 г.

Изучены количественные характеристики модификации 26-звенного олигодезоксирибонуклеотида TTGCCTGAATGGGAAGAGGGTCATT (P) 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензилфосфамидным производным олигонуклеотида рТТСССА (X) в присутствии производных олигонуклеотидов (PhnL)рТТСААГГСр(L-Phn) (E<sub>1</sub>) и (Phn-L)рТГАСССТСр(L-Phn) (E<sub>2</sub>), где Phn – остаток N-(2-гидроксиэтил)феназиния, L – этилендиаминовый спейсер. В комплексах PXE<sub>1</sub>, PXE<sub>2</sub> и PXE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> производные E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> и реагент X связываются на мишени P в тандеме, причем E<sub>1</sub> располагается со стороны 3'-конца реагента X, а E<sub>2</sub> – со стороны 5'-конца. Из зависимостей предельной по времени степени модификации мишени P, а также более коротких мишеней, содержащих участок комплементарного связывания реагента, от концентрации реагента X определены константы образования комплексов PX, PE<sub>1</sub>, PE<sub>2</sub>: соответственно  $K_X = (4.2 \pm 0.6) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_{E_1} = (1.25 \pm 0.44) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_{E_2} = (2.56 \pm 1.22) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Оценены коэффициенты кооперативности совместного связывания X, E<sub>1</sub> и E<sub>2</sub> на мишени с образованием комплексов PXE<sub>1</sub>, PXE<sub>2</sub> и PXE<sub>1</sub>E<sub>2</sub>:  $\alpha_1 = 15.7 \pm 2.1$  и  $\alpha_2 = 8.7 \pm 1.2$ ;  $\alpha_{12} = 136.5 \pm 2.6$ . Получены данные, свидетельствующие о том, что E<sub>2</sub> выступает не только в качестве эффектора процесса модификации, но и ингибитора вследствие образования комплекса PE<sub>2</sub>\* с  $K_{E_2}^* = (1.97 \pm 1.27) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , не способного присоединять реагент.

*Ключевые слова:* нуклеиновые кислоты, направленная модификация, олигонуклеотидные эффекторы, кинетика.

Специфичная к последовательности модификация одно- и двухцепочечных нуклеиновых кислот реакционноспособными производными олигонуклеотидов, способных образовывать соответствующие дуплексы или триплексы, – один из наиболее перспективных вариантов актуального подхода к регуляции экспрессии генов [1, 2]. Ранее было показано [3 - 6], что из зависимости предельной по времени степени внутрикомплексной модификации мишени от концентрации реагента могут быть получены количественные характеристики стабильности комплексов. В предыдущей работе [7] этот подход был применен нами для оценки величины кооперативных эффектов, возникающих при использовании в ходе модификации нуклеиновых кислот так называемых олигонуклеотидных эффекторов. Олигонук-

леотидные эффекторы химической модификации нуклеиновых кислот – это конъюгаты олигонуклеотидов, несущие стабилизирующие дуплексы группы и образующие тандем с реакционноспособным производным на нуклеиновой кислоте-мишени [8, 9]. С использованием реакционноспособных производных олигонуклеотидов, несущих N-(N-метил-2-хлорэтиламино)фенильную группу (RCI) в качестве реагентов и N-(2-гидроксиэтил)феназиниевый остаток (Phn) в качестве стабилизирующих дуплексы групп, в работе [10] было показано, что в условиях, когда алкилирование в присутствии одного только реагента пренебрежимо мало, эти дополнительные олигонуклеотиды увеличивали степень модификации почти до количественных значений.

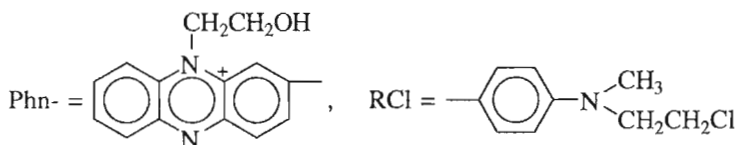
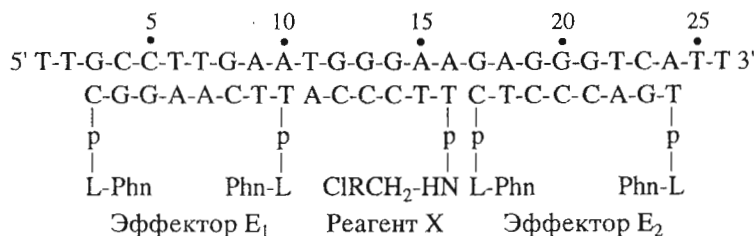
Ранее [7] мы изучали количественные характеристики направленной модификации модельного 26-звенного фрагмента ДНК производным гексадезоксинуклеотида с 5'-концевой алкилирующей группой в присутствии эффекторов E<sub>1</sub> и E<sub>2</sub>,

\* Автор для переписки.

Префикс "d" в обозначениях олигодезоксирибонуклеотидов везде опущен.

производных олигонуклеотидов, несущих на 5'- и 3'-концевых фосфатных группах присоединенные через этилендиаминовый линкер остатки

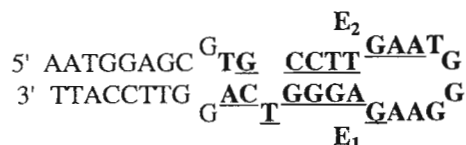
N-(2-гидроксиэтил)феназиния, связывающихся с участками ДНК-мишени со стороны 5'- и 3'-концов реагента соответственно:



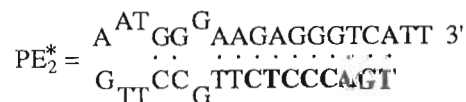
Было показано, что при концентрации реагента  $\sim 5 \times 10^{-6}$  М и в отсутствие эффекторов степень модификации ничтожно мала, тогда как в присутствии эффектора  $E_1$  с ростом концентрации последнего она достигала плато значения, равного 0.5 - 0.6. Это значение хорошо согласуется с выведенным теоретически в работе [6] при следующих основных допущениях: 1) реагент берется в начальной концентрации  $x_0$ , намного превышающей начальную концентрацию мишени  $p_0$ ; 2) реагент X, мишень P и их комплекс PX находятся в равновесии в течение всего процесса (квазиравновесное приближение); 3) идущий в растворе гидролиз C-Cl-связи в RCl-группе реагента не приводит к изменению сродства реагента к мишени P.

Вместе с тем проведение аналогичных экспериментов с эффектором  $E_2$  показало, что, несмотря на отчетливое повышение степени модификации реагентом X при добавлении эффектора  $E_2$ , предельное значение степени модификации остается низким. Это различие могло быть обусловлено как минимум двумя причинами. Во-первых, предельное значение выхода продукта модификации может зависеть от концентрации реагента и достигнутый в работе [7] небольшой выход при высоких концентрациях эффектора  $E_2$  мог быть результатом недостаточной концентрации реагента. Во-вторых, не исключено, что наряду с комплексом  $PE_2$ , способным присоединять реагент, возможно образование комплекса  $PE_2^*$ , в котором место связывания реагента заблокировано. В исследуемом случае это вполне вероятно. Действительно, участок последовательности мишени P (нуклеотиды 2 - 24) является частью шпильчатого района в исследованном ранее 302-звенном фраг-

менте ДНК, для которого в работах [11, 12] была предложена следующая вторичная структура:



(жирным шрифтом выделен участок, идентичный последовательности 2 - 22 26-мера; подчеркнуты нуклеотиды, участвующие в образовании комплексов с  $E_1$  и  $E_2$ ). Олигонуклеотидная часть реагента X комплементарна петле приведенной шпильчатой структуры, тогда как эффекторы  $E_1$  и  $E_2$  комплементарны участкам, которые могут быть заняты в формировании стебля. Существование в мишени P вторичной или третичной структуры следует из данных нашей работы [7], где было показано, что на кривой плавления мишени P имеется переход при 30 - 35°C. С другой стороны, можно предположить, что мишень P образует с эффектором  $E_2$  комплекс, не способный к связыванию реагента:

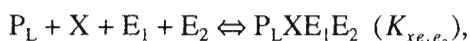
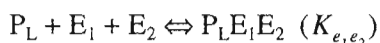
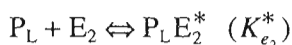
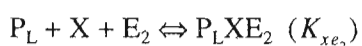
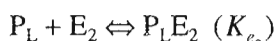
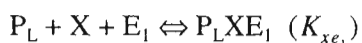
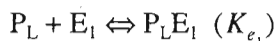
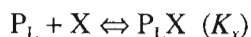


(жирным шрифтом выделена олигонуклеотидная последовательность эффектора  $E_2$ ).

Целью настоящей работы было более полное исследование зависимости предельного выхода продукта модификации от концентрации всех трех производных олигонуклеотидов, участвующих в формировании комплексов с мишенью. Кроме того, тем же методом получены некоторые количественные характеристики комплексообразования

с укороченными мишенями, неспособными к образованию приведенных выше шпилечных структур.

Для описания процессов комплексообразования, происходящих в системе, использовались следующие уравнения:



где  $P_L$  – неструктурированная форма мишени, способная к образованию комплекса с реагентом,  $P_H$  – структурированная форма.

Модификация мишени  $P$  протекает в составе комплексов  $P_L X$ ,  $P_L X E_1$ ,  $P_L X E_2$ ,  $P_L X E_1 E_2$ . Уравнения, описывающие кинетику модификации в составе этих комплексов и зависимости предельного выхода модификации мишени от концентраций реагента и эффекторов, приведены в Приложении.

Были получены зависимости предельной по времени степени модификации  $[PZ]_{\infty}/p_0$  в присутствии одного из эффекторов  $E_1$  или  $E_2$  от концентрации эффекторов  $E_1$  и  $E_2$  для разных концентраций реагента. Эти зависимости представлены на рис. 1 и 2 в полулогарифмических координатах. При  $e_0 \geq 10^{-6}$  М в обоих случаях степень модификации выходила на плато. С ростом концентрации реагента платовые величины  $[PZ]_{\infty}/p_0$  возрастают до значения  $\approx 0.6$ , однако в присутствии эффектора  $E_1$  это значение достигается при меньшей концентрации реагента  $X$ , чем для эффектора  $E_2$ .

Зависимости предельной по времени степени модификации  $[PZ]_{\infty}/p_0$  от начальной концентрации реагента  $X$  были получены экспериментально и представлены на рис. 3. Кривая 1 соответствует зависимости  $[PZ]_{\infty}/p_0$  в отсутствие эффекторов  $E_1$  и  $E_2$ ; кривая 2 получена в присутствии эффектора  $E_1$ , кривая 3 – в присутствии эффектора  $E_2$ , кривая 4 – в присутствии эффекторов  $E_1$  и  $E_2$ .

Кривые 1–4 описываются уравнениями (6)–(9) (см. Приложение) соответственно, из которых были рассчитаны величины  $\gamma$  (эффективность ал-

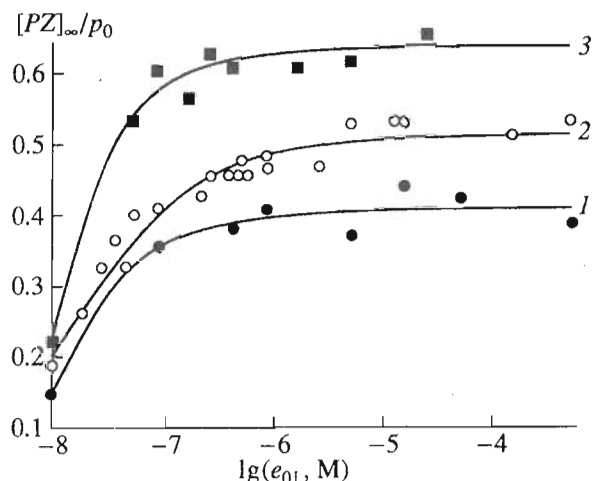


Рис. 1. Зависимости предельной по времени степени модификации мишени  $P$  ( $[PZ]_{\infty}/p_0$ ) от логарифма начальной концентрации эффектора  $E_1$  для начальных концентраций ( $x_0$ ) реагента  $X$ , равных 1 (1), 5 (2), 8.23 мкМ (3) ( $p_0 = 5$  нМ, 25°C).

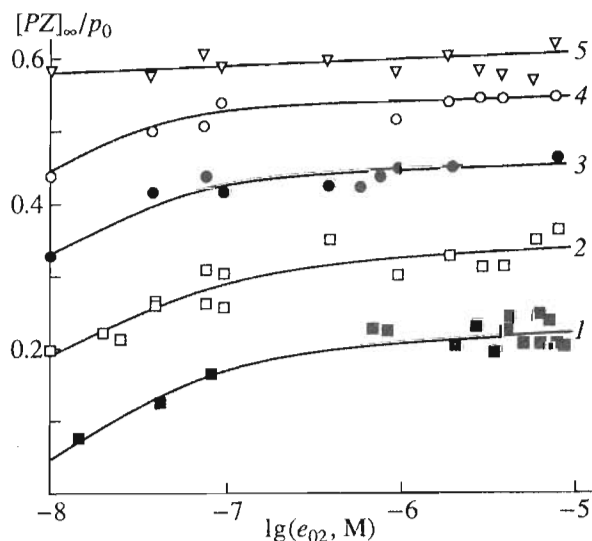


Рис. 2. Зависимости предельной по времени степени модификации мишени  $P$  от логарифма начальной концентрации эффектора  $E_2$  для начальных концентраций реагента  $x_0$ , равных 5 (1), 20 (2), 43 (3), 86 (4) и 130 мкМ (5).  $p_0 = 5$  нМ.

килирования мишени в составе комплекса) и отношения констант связывания:

$$\gamma_0 = 0.83 \pm 0.06;$$

$$K_x / (1 + K_h) = (2.16 \pm 0.38) \times 10^4 \text{ М}^{-1};$$

$$\gamma_1 = 0.97 \pm 0.05;$$

$$K_{x_{e_1}} / K_{e_1} = (6.75 \pm 0.12) \times 10^5 \text{ М}^{-1};$$

$$\gamma_2 = 0.96 \pm 0.02,$$

$$K_{x_{e_2}} / (K_{e_2} + K_{e_2}^*) = (4.15 \pm 0.29) \times 10^4 \text{ М}^{-1};$$

$$\gamma_{12} = 0.98 \pm 0.04,$$

$$K_{x_{e_1 e_2}} / K_{e_1 e_2} = (5.87 \pm 1.0) \times 10^6 \text{ М}^{-1}.$$

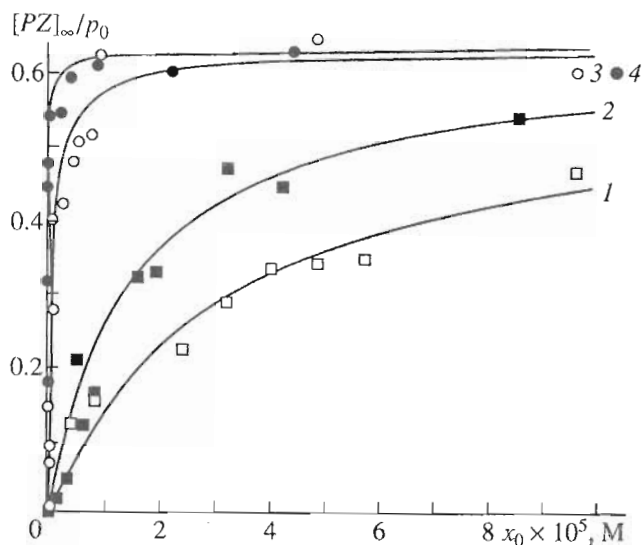


Рис. 3. Зависимости предельной по времени степени модификации мишени Р ( $[PZ]_{\infty}/p_0$ ) от концентрации реагента  $x_0$ : 1 -  $e_{01} = e_{02} = 0$ ; 2 -  $e_{02} = 13.8$  мкМ,  $e_{01} = 0$ ; 3 -  $e_{01} = 10$  мкМ,  $e_{02} = 0$ ; 4 -  $e_{01} = 10$  мкМ,  $e_{02} = 13.8$  мкМ ( $p_0 = 5$  нМ,  $25^\circ\text{C}$ ).

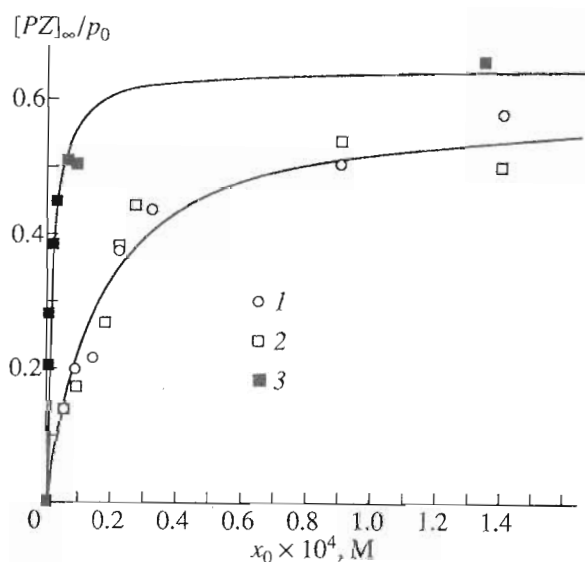


Рис. 4. Зависимости предельной по времени степени модификации ( $[PZ]_{\infty}/p_0$ ) 10-мера (1) и 22-мера (2, 3) от концентрации реагента  $x_0$  (1, 2 -  $e_{02} = 0$ ; 3 -  $e_{02} = 13.8$  мкМ;  $p_0 = 5$  нМ,  $25^\circ\text{C}$ ).

Значения  $\gamma$  равны примерно единице, что свидетельствует об отсутствии стерических затруднений при модификации мишени в составе комплексов РХЕ<sub>1</sub> и РХЕ<sub>2</sub>, хотя присоединение к мишени Р эффектора Е<sub>2</sub> изменяет позиционную селективность модификации [7, 10].

Поскольку из данных, представленных на рис. 3 (кривая 1), может быть рассчитана лишь комбинация констант  $K_x/(1 + K_h)$ , то для определения значения  $K_x$  были получены зависимости  $[PZ]_{\infty}/p_0$

от концентрации реагента более коротких мишеней рТGGGAAGAGT (10-мер) и рTGAATGGGAAGAGGGTCAGGTT (22-мер) (подчеркнуты участки связывания реагента Х). Из рис. 4 видно, что данные для 10- и 22-меров укладываются на одну кривую. Обработка этих данных методом нелинейной регрессии по уравнению (6) (см. Приложение) привела к значению  $K_x$ , равному  $(4.3 \pm 1.9) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Оно превышает величину  $K_x/(1 + K_h)$  примерно в 2 раза, что свидетельствует о некотором участии области комплементарности реагента в формировании пространственной структуры мишени. С использованием этой величины было оценено значение  $K_h$  (~1). Следовательно, в условиях эксперимента приблизительно у 50% всей мишени область связывания реагента участвует в образовании пространственной структуры.

Взаимодействие мишени Р одновременно с олигонуклеотидами Х и Е<sub>1</sub>, Х и Е<sub>2</sub>, а также Х и обоими эффекторами рассматривается как кооперативное, в связи с чем константы образования этих комплексов выражаются в виде произведений  $K_{x_e1} = \alpha_1 K_x K_{e1}$ ,  $K_{x_e2} = \alpha_2 K_x K_{e2}$ ,  $K_{x_e1e2} = \alpha_{12} K_x K_{e1} K_{e2}$ , где  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  и  $\alpha_{12}$  - коэффициенты кооперативности, ответственные за взаимодействие между концами реагента и эффекторов в составе тандемных комплексов с мишенью. Если константы образования комплексов РЕ<sub>2</sub> и РЕ<sub>2</sub><sup>\*</sup> различаются на коэффициент  $\varphi$ , т.е.  $K_{e2}^* = \varphi K_{e2}$ , то, используя значение  $K_x = (4.2 \pm 0.6) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , из приведенных выше отношений констант связывания можно рассчитать коэффициенты кооперативности:  $\alpha_1 = 15.7 \pm 2.1$ ,  $\alpha_2/(1 + \varphi) = 1.0 \pm 0.1$ ,  $\alpha_{12} = 136.5 \pm 2.6$ .

Поскольку должно выполняться равенство  $\alpha_{12} = \alpha_1 \alpha_2$ , можно получить  $\alpha_2 = 8.7 \pm 1.2$ . Следовательно,  $\varphi = 7.7 \pm 1.2$ , т.е. эффектор Е<sub>2</sub> преимущественно образует такой комплекс с мишенью Р, который не способен связываться с реагентом, поэтому Е<sub>2</sub> слабее влияет на эффективность присоединения реагента к мишени, чем Е<sub>1</sub>. Хотя Е<sub>2</sub> и увеличивает константу связывания реагента с мишенью в 8.7 раза, однако примерно в той же мере уменьшает долю мишени, способной образовывать комплекс с реагентом. Положительная роль эффектора Е<sub>2</sub> заключается лишь в подавлении формирования собственной структуры мишени, что выражается в исчезновении из уравнения (8) члена  $(1 + K_h)$ .

В присутствии же эффектора Е<sub>1</sub> не только исчезает собственная пространственная структура мишени, мешающая связыванию реагента, но и в 15.8 раза возрастает эффективность комплексообразования реагента. В целом эффективная константа связывания реагента с мишенью возрастает в  $\alpha_1(1 + K_h)$  раз, что составляет величину  $\approx 30$ .

Для дополнительной проверки полученных выше коэффициентов кооперативности была проведена модификация 22-мера реагентом X в присутствии эффектора E<sub>2</sub>. Из зависимости предельной по времени степени модификации 22-мера [PZ]<sub>∞</sub>/p<sub>0</sub> (рис. 4, кривая 3) от x<sub>0</sub> при e<sub>02</sub> = 1.38 × 10<sup>-5</sup> M с помощью уравнения, аналогичного уравнению (7) (см. Приложение), было рассчитано значение α<sub>2</sub> = 9.9 ± 0.3, что близко к оцененной выше величине.

Значения констант устойчивости специфических комплексов мишень-эффектор PE<sub>1</sub> и PE<sub>2</sub> (K<sub>e<sub>1</sub></sub> и K<sub>e<sub>2</sub></sub>) могут быть определены из зависимостей предельной по времени степени модификации [PZ]<sub>∞</sub>/p<sub>0</sub> от концентрации E<sub>1</sub> или E<sub>2</sub>. Для расчета K<sub>e<sub>1</sub></sub> была использована кривая 2 для x<sub>0</sub> = 0.5 × 10<sup>-5</sup> M на рис. 1, а для расчета K<sub>e<sub>2</sub></sub> – кривые 1 и 2 для x<sub>0</sub> = 0.5 × 10<sup>-5</sup> и 2.0 × 10<sup>-5</sup> M (рис. 2). Обработку данных проводили по уравнениям (10) и (11) соответственно. Путем подгонки параметров (с использованием уже найденных величин α и γ) получено, что K<sub>e<sub>1</sub></sub> = (1.25 ± 0.44) × 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>, а K<sub>e<sub>2</sub></sub> равна в среднем (2.56 ± 1.22) × 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. Следовательно, K<sub>e<sub>2</sub></sub><sup>\*</sup> = (1.97 ± 1.27) × 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>.

Результаты данной работы показывают, что метод химической модификации позволяет получать количественную информацию, достаточную для определения как сродства реагента и олигонуклеотидных эффекторов к нуклеиновым кислотам-мишеням, так и коэффициентов кооперативности и эффективности модификации мишени в составе комплексов с реагентом даже в случаях, осложненных формированием структур мишени, мешающих образованию комплексов с реагентом. Выяснению конкретного строения таких структур будет посвящено дополнительное исследование.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика эксперимента описана ранее в работе [7].

Авторы благодарят Г.А. Максакову за синтез дезоксирибоолигонуклеотидов, Д.В. Пышного за полезную дискуссию. Работа выполнена по ГНТП "Новейшие методы биоинженерии" (раздел "Геннаправленные биологически активные вещества").

### Приложение

Модификация мишени P протекает в составе комплексов P<sub>L</sub>X, P<sub>L</sub>XE<sub>1</sub>, P<sub>L</sub>XE<sub>2</sub>, P<sub>L</sub>XE<sub>1</sub>E<sub>2</sub>, доля которых

$$\chi = \frac{[P_L X] + [P_L X E_1] + [P_L X E_2] + [P_L X E_1 E_2]}{p_0} \quad (1)$$

Если начальная концентрация мишени (p<sub>0</sub>) намного меньше начальной концентрации реагента (x<sub>0</sub>) и эффекторов (e<sub>01</sub> и e<sub>02</sub>), то

$$\chi = (K_x x_0 + K_{x e_1} x_0 e_{01} + K_{x e_2} x_0 e_{02} + K_{x e_1 e_2} x_0 e_{01} e_{02}) \times (1 + K_h + K_x x_0 + K_{e_1} e_{01} + K_{x e_1} x_0 e_{01} + K_{e_2} e_{02} + K_{x e_2} x_0 e_{02} + K_{e_1 e_2} e_{01} e_{02} + K_{x e_1 e_2} x_0 e_{01} e_{02} + K_{e_2}^* e_{02})^{-1} \quad (2)$$

Ранее [6] было показано, что в условиях квазиравновесия степень модификации нуклеиновых кислот алкилирующими производными олигонуклеотидов, реагирующими через образование в лимитирующей стадии промежуточных частиц с константой скорости k<sub>0</sub>, параллельно расходующихся в растворе, может быть описана уравнением

$$\frac{[PZ]}{p_0} = 1 - \exp \{ -\gamma \chi [1 - \exp(-k_0 t)] \}, \quad (3)$$

где γ – эффективность модификации в составе комплекса с реагентом, доля которого составляет величину χ. Если в растворе образуется i различных комплексов с реагентом, в которых протекает модификация мишени, то уравнение (3) принимает вид

$$\frac{[PZ]}{p_0} = 1 - \exp \left\{ -\sum_i \gamma_i \chi_i [1 - \exp(-k_0 t)] \right\}, \quad (4)$$

т.е. суммарная степень модификации мишени описывается выражением

$$\frac{[PZ]}{p_0} = 1 - \exp \left\{ -(\gamma_0 K_x x_0 + \gamma_1 K_{x e_1} x_0 e_{01} + \gamma_2 K_{x e_2} x_0 e_{02} + \gamma_{12} K_{x e_1 e_2} x_0 e_{01} e_{02}) [1 - \exp(-k_0 t)] \right\} \times (1 + K_h + K_x x_0 + K_{e_1} e_{01} + K_{x e_1} x_0 e_{01} + K_{e_2} e_{02} + K_{x e_2} x_0 e_{02} + K_{e_1 e_2} e_{01} e_{02} + K_{x e_1 e_2} x_0 e_{01} e_{02} + K_{e_2}^* e_{02})^{-1} \quad (5)$$

Пользуясь выражением (5), можно получить уравнения для обработки экспериментальных данных в конкретных условиях, например:

1) e<sub>01</sub> = 0, e<sub>02</sub> = 0

$$\frac{[PZ]_{\infty}}{p_0} = 1 - \exp \left( -\frac{\gamma_0}{1 + (1 + K_h)/K_x x_0} \right), \quad (6)$$

2) e<sub>02</sub> = 0, e<sub>01</sub> → ∞

$$\frac{[PZ]_{\infty}}{p_0} = 1 - \exp \left( -\frac{\gamma_1}{1 + K_{e_1}/K_{x e_1} x_0} \right), \quad (7)$$

3) e<sub>01</sub> = 0, e<sub>02</sub> → ∞

$$\frac{[PZ]_{\infty}}{p_0} = 1 - \exp \left( -\frac{\gamma_2}{1 + \frac{K_{e_2} + K_{e_2}^*}{K_{x e_2} x_0}} \right), \quad (8)$$

$$4) e_{01} \rightarrow \infty, e_{02} \rightarrow \infty$$

$$\frac{[PZ]_{\infty}}{p_0} = 1 - \exp \left( - \frac{\gamma_{12}}{1 + \frac{K_{e_1 e_2}}{K_{x e_1} x_0}} \right), \quad (9)$$

$$5) e_{01} \neq 0, e_{02} = 0$$

$$\frac{[PZ]_{\infty}}{p_0} = 1 - \exp \left( - \frac{\gamma_0 K_x x_0 + \gamma_1 K_{x e_1} x_0 e_{01}}{1 + K_h + K_x x_0 + K_{e_1} e_{01} + K_{x e_1} x_0 e_{01}} \right), \quad (10)$$

$$6) e_{01} = 0, e_{02} \neq 0$$

$$\frac{[PZ]_{\infty}}{p_0} = 1 - \exp \left( - \frac{\gamma_0 K_x x_0 + \gamma_2 K_{x e_2} x_0 e_{02}}{1 + K_h + K_x x_0 + K_{e_2} e_{02} (1 + \phi) + K_{x e_2} x_0 e_{02}} \right). \quad (11)$$

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Knorre D.G., Vlassov V.V. // *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 1985. V. 32. P. 292 - 320.
2. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Lebedev A.V., Fedorova O.S. *Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives*. CRC Press: Boca Raton, 1993.
3. Кнорре Д.Г., Попов С.Г., Чимитова Т.А. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 230. С. 1369 - 1373.
4. Гринева Н.И., Карпова Г.Г., Пичко Н.П. // Молекуляр. биология. 1978. Т. 12. С. 135 - 147.
5. Гринева Н.И., Карпова Г.Г., Кнорре Д.Г., Пичко Н.П., Чимитова Т.А. // Молекуляр. биология. 1980. Т. 14. С. 1301 - 1307.
6. Knorre D.G., Chimitova T.A. // *FEBS Lett.* 1981. V. 131. P. 249 - 252.
7. Федорова О.С., Одинаев А.Д., Горн В.В., Максимова Г.А., Перебоева О.С., Кнорре Д.Г. // *Биоорган. химия.* 1994. Т. 20. С. 932 - 945.
8. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Левина А.С., Мамаев С.В. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. С. 102 - 104.
9. 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.
10. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // *Биоорган. химия.* 1990. Т. 16. С. 1653 - 1660.
11. Власов В.В., Кнорре Д.Г., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подуст Л.М., Федорова О.С. // *Биоорган. химия.* 1987. Т. 13. С. 1221 - 1229.
12. Fedorova O.S., Podust L.M. // *J. Inorg. Biochem.* 1988. V. 34. P. 149 - 155.

## A Study of the Cooperative Interactions of Deoxyribooligonucleotide Derivatives under Binding with DNA by Chemical Modification

A. Adina-zada and O. S. Fedorova\*

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

**Abstract**— Quantitative characteristics of the modification of deoxyribooligonucleotide TTGCCTTGAATGG-GAAGAGGGTCAATT (P) with 4-(N-2-chloroethyl)-N-methylamino)benzyl phosphamide derivative of oligonucleotide pTTCCCA (X) were studied. The modification was performed in the presence of derivatives of the oligonucleotides (Phn-L)pTTCAAAGGCP(L-Phn) (E<sub>1</sub>) and (Phn-L)pTGACCCGCP(L-Phn) (E<sub>2</sub>), where Phn is the residue of N-(2-hydroxyethyl)phenazinium, and L is ethylene diamine spacer. In PXE<sub>1</sub>, PXE<sub>2</sub>, and PXE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> complexes, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, and reagent X are bound with target P in tandem, with E<sub>1</sub> near the 3'-end and E<sub>2</sub> near the 5'-end of the reagent X. From the dependences of the maximum in time modification degree of target P and the shorter targets containing the complementary binding site for the reagent X on its concentration, the association constants of the complexes PX, PE<sub>1</sub>, and PE<sub>2</sub> were determined as  $K_X = (4.2 \pm 0.6) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_{e_1} = (1.25 \pm 0.44) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , and  $K_{e_2} = (2.56 \pm 1.22) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ , respectively. The cooperativity coefficients of joint binding the X, E<sub>1</sub>, and E<sub>2</sub> with the target giving rise to the complexes PXE<sub>1</sub>, PXE<sub>2</sub>, and PXE<sub>1</sub>E<sub>2</sub> were estimated as  $\alpha_1 = 15.7 \pm 2.1$ ,  $\alpha_2 = 8.7 \pm 1.2$ , and  $\alpha_{12} = 136.5 \pm 2.6$ , respectively. The data obtained suggest that E<sub>2</sub> is not only the effector of modification but it is also an inhibitor due to the formation of the complex PE<sub>2</sub>\* with  $K_{e_2}^* = (1.97 \pm 1.27) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  not capable of adding the reagent X.

*Key words:* nucleic acids, site-directed modification, oligonucleotide effectors, kinetics.

\* To whom correspondence should be addressed.