



УДК 577.113.(4+7)

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ КОРОТКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

### VII\*. ВЛИЯНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРЫ ДУПЛЕКСА НА НАПРАВЛЕННОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОДИФИКАЦИИ ДНК-МИШЕНИ АЛКИЛИРУЮЩИМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

© 1998 г. Д. В. Пышный, С. Г. Лохов, Е. М. Иванова#, В. Ф. Зарытова

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,  
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8  
Поступила в редакцию 24.04.97 г. Принята к печати 11.08.97 г.

Исследована модификация ДНК-мишени алкилирующими производными олигонуклеотидов, обладающими различной комплексообразующей способностью. Для изменения комплексообразующих свойств олигонуклеотидов увеличивали их длину (тетра-, окта- и додекамеры), вводили однобуквенную замену и/или остаток N-(2-гидроксиэтил)феназиния. Обнаружено влияние конформационных изменений структуры для комплекса мишень · реагент при повышении температуры реакции на эффективность и направленность алкилирования. Показано, что в случае полного насыщения мишени реагентом увеличение гибридизационной способности последнего может приводить к понижению эффективности модификации мишени. Установлено, что модификация мишени тетра- и пентануклеотидным реагентом (в присутствии эффектора, соседствующего с 3'-конца) протекает практически по одному внутрикомплексному основанию мишени. В случае алкилирующего производного додекамера, образующего с мишенью стабильный высококооперативный комплекс, алкилированию подвергается ряд оснований мишени, причем повышение температуры приводит к изменению направленности алкилирования. При этом перераспределение сайтов модификации мишени в пользу более сильных нуклеофильных центров вызывает увеличение эффективности алкилирования вблизи температуры плавления комплекса мишень · додекануклеотидный реагент, несмотря на снижение степени ассоциации мишени.

*Ключевые слова:* олигонуклеотиды, реакционноспособные производные, модификация ДНК, термодинамическая стабильность.

Известно, что эффективность комплементарно адресованной модификации мишени производным олигонуклеотида, несущим реакционноспособную группировку, возрастает с увеличением термостабильности комплекса мишень · олигонуклеотид [2]. Одним из основных факторов, обеспечивающих эффективное комплексообразование олигонуклеотидов с нуклеиновыми кислотами, является число комплементарных пар оснований, участвующих в формировании дуплексной структуры, т.е. длина олигонуклеотидов. Кроме того, стабильность комплекса олигонук-

леотида с НК-мишенью можно повысить путем введения в олигонуклеотид полициклических ароматических группировок [3, 4] или используя вспомогательные олигонуклеотиды, способные повышать степень ассоциации соседнего олигонуклеотида в тандемном комплексе с НК-мишенью благодаря кооперативному взаимодействию между компонентами тандема [5, 6]. Повышение комплексообразующей способности олигонуклеотидов приводит к увеличению жесткости структуры образуемых ими комплексов с комплементарными участками НК [7]. В случае реакционноспособных производных олигонуклеотидов увеличение жесткости структуры комплекса мишень · реагент может сказываться на способности реакционной группировки сближаться с центром модификации и, таким образом, на эффективности и направленности модификации мишени. Повышение температуры вызывает разрыхление структуры комплексов мишень · олигонуклеотид [8].

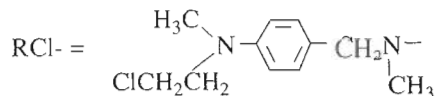
\* Сообщение VI см. [1].

Сокращения: НК – нуклеиновые кислоты, Phn – остаток N-(2-гидроксиэтил)феназиния, RCl – 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензилметиламино-; префикс "d" в аббревиатуре олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

# Автор для переписки.

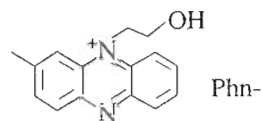
	20	↓ ↓	10 ↓		1
М	(3') C G T A G T T C G T C G A G G T C C G T p				
(X)pN <sub>4</sub>		(X)p C A G C			
(X)pN <sub>4</sub> + E1(Phn)		(X)p C A G C	p T C C A G G C Ap		
			LPhn		PhnL'
(X)pN <sub>8</sub>		(X)p C A G C T C C A			
(X)pN <sub>8</sub> p(Phn)		(X)p C A G C T C C Ap(L'Phn)			
(X)pN <sub>8</sub> *		(X)p C A G A T C C A			
(X)pN <sub>8</sub> p*(Phn)		(X)p C A G A T C C Ap(L'Phn)			
(X)pN <sub>12</sub>		(X)p C A G C T C C A G G C A			
(X)pN <sub>12</sub> *		(X)p C A G A T C C A G G C A			

X = HO- или RCl-



PhnL' = -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-Phn

PhnL- = Phn-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-



Схема

Происходящие при этом конформационные изменения могут отражаться в температурной зависимости эффективности и направленности модификации.

В данной работе рассмотрено влияние конформационных изменений структуры дуплекса мишень · олигонуклеотидный реагент на эффективность и направленность модификации мишени в зависимости от комплексообразующей способности олигонуклеотидов на примере алкилирования 20-звенного олигодезоксирибонуклеотида реакционноспособными производными олигонуклеотидов, имеющих одинаковую 5'-концевую тринуклеотидную (pCAG) последовательность с присоединенным остатком 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензилметиламина (RCl). Исследования проводили в двух направлениях: 1) сравнивали эффективность модификации мишени широким набором олигонуклеотидных производных с различными гибридизационными свойствами при одной постоянной температуре; 2) сравнивали температурные зависимости эффективности и направленности модификации мишени рядом олигонуклеотидных реагентов, резко различающихся по своей гибридизационной способности.

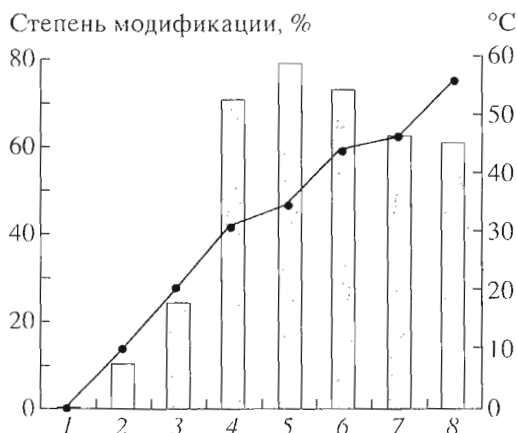
*Модификация мишени при постоянной температуре олигонуклеотидными производными с различными комплексообразующими свойствами*

Модификацию 20-звенного олигонуклеотида – мишени М – при постоянной температуре проводили с использованием алкилирующих производных олигонуклеотидов с различными комплексо-

образующими свойствами, которые моделировали несколькими способами (схема).

В качестве самого слабого олигонуклеотидного адреса был выбран тетрапуклеотид pN<sub>4</sub>, который, как было показано ранее [9], не способен образовывать комплементарный комплекс с мишенью М. Комплексообразующую способность тетрапуклеотида усиливали с помощью дифенилзидиевого эффектора E1(Phn), в присутствии которого комплекс М · pN<sub>4</sub> имеет T<sub>пл</sub> 20°C [10], или увеличивая протяженность тетрапуклеотида с 3'-конца на четыре и восемь мономерных звеньев, т.е. используя окта- и додекануклеотиды (pN<sub>8</sub> и pN<sub>12</sub>). Введение в последовательность этих олигонуклеотидов однобуквенной замены в четвертом положении от 5'-конца (pN<sub>8</sub>\* и pN<sub>12</sub>\* соответственно) приводит к некоторой дестабилизации окта- и додекануклеотидных комплексов с мишенью [11]. Кроме того, комплексообразующую способность октануклеотидов pN<sub>8</sub> и pN<sub>8</sub>\* повышали, вводя по 3'-концу остаток фосфотенидия (pL'Phn, см. схему) [12]. Температуры плавления комплексов этих олигонуклеотидов с мишенью варьируют от 10 до 55°C (рис. 1).

Выбранный набор реагентов обеспечивает, с одной стороны, постоянство структурных элементов дуплекса вблизи реакционной группировки при модификации мишени, с другой – широкий диапазон термостабильности, а следовательно, и жесткости конформаций комплекса реагент · мишень при одинаковой температуре. Модификацию мишени проводили при 20°C. При этой температуре возможно, хотя и в разной степени, связывание мишени всеми исследованными реагентами.



**Рис. 1.** Степень модификации мишени М при 20°C реагентами (RCl)pN<sub>4</sub> (1), (RCl)pN<sub>8</sub>\* (2), (RCl)pN<sub>4</sub>+E1(Phn) (3), (RCl)pN<sub>8</sub>\* p(Phn) (4), (RCl)pN<sub>8</sub> (5), (RCl)pN<sub>8</sub>p(Phn) (6), (RCl)pN<sub>12</sub>\* (7), (RCl)pN<sub>12</sub> (8) и температуры плавления соответствующих комплексов М · рN<sub>n</sub>. Линией соединены температуры плавления соответствующих комплексов М · рN<sub>n</sub>.



**Рис. 2.** Зависимость степени модификации мишени М реагентами (RCl)pN<sub>4</sub>+E1(Phn) (1), (RCl)pN<sub>8</sub> (2), (RCl)pN<sub>12</sub> (3) от температуры.

Степень модификации мишени в различных системах определялась по интенсивности полос на радиоавтографе, полученном после электрофоретического разделения выдержанной 5 периодов полупревращения реакционноспособной группы [13] и обработанной пиперидином реакционной смеси, содержащей меченую <sup>32</sup>P по 5'-концевому фосфату мишень. Реакция проводилась при начальной концентрации мишени 5 × 10<sup>-7</sup> М и концентрациях реагента 10<sup>-5</sup> М.

Сравнение степени модификации мишени реагентами показало, что выходы продуктов алкилирования в ряде случаев не коррелируют с усилением прочности соответствующих комплексов мишень · олигонуклеотид (рис. 1). Эффектив-

ность модификации мишени при 20°C возрастает с повышением способности олигонуклеотида к гибридизации в ряду (RCl)pN<sub>4</sub> < (RCl)pN<sub>8</sub>\* < < (RCl)pN<sub>4</sub>+E1(Phn) < (RCl)pN<sub>8</sub>\* (Phn) < (RCl)pN<sub>8</sub>, что, очевидно, связано с увеличением степени ассоциации соответствующего комплекса реагент · мишень. Однако дальнейший рост комплексообразующей способности олигонуклеотидов, обуславливающий полное связывание мишени реагентом, приводит к некоторому уменьшению степени модификации мишени реагентами в ряду (RCl)pN<sub>8</sub> > (RCl)pN<sub>8</sub>(Phn) > (RCl)pN<sub>12</sub>\* > (RCl)pN<sub>12</sub>, несмотря на повышение степени ассоциации мишени с реагентом. Максимальная степень модификации наблюдается в случае использования реагента (RCl)pN<sub>8</sub>.

*Зависимость эффективности и направленности модификации мишени олигонуклеотидными реагентами с различающимися комплексообразующими свойствами от температуры*

Исследование температурной зависимости эффективности и направленности модификации мишени М реагентами, образующими с мишенью дуплексы различной стабильности, проводили с использованием (RCl)pN<sub>4</sub>+E1(Phn), (RCl)pN<sub>8</sub> и (RCl)pN<sub>12</sub>.

Реагент (RCl)pN<sub>4</sub>, как и было показано ранее, не образует комплекс и не модифицирует мишень при 20°C [10]. В присутствии эффектора E1(Phn) степень ассоциации тетра-нуклеотидного реагента и мишени увеличивается настолько, что степень модификации мишени при 20°C достигает 24% (рис. 2), причем модификации подвергается исключительно основание мишени G<sup>9</sup>, находящееся в составе дуплекса мишень · реагент.

Реагент (RCl)pN<sub>8</sub> модифицирует мишень в более широком температурном интервале (рис. 2). Степень модификации максимальна при низких температурах, когда степень ассоциации мишени с реагентом высока. Основным сайтом модификации является основание мишени C<sup>13</sup>, не вовлеченное в образование комплекса мишень · реагент (рис. 3а). В значительно меньшей степени алкилируется основание G<sup>12</sup>, принимающее участие в формировании комплекса, и в еще меньшей – G<sup>9</sup>. Повышение температуры реакции приводит к некоторому относительному перераспределению эффективности модификации в сторону внутридуплексных оснований G<sup>12</sup> и G<sup>9</sup> (рис. 3а).

Кривая температурной зависимости степени модификации мишени М реагентом (RCl)pN<sub>12</sub>, обладающим наибольшей комплексообразующей способностью, имеет максимум, который не регистрируется в случае использования реагентов



на основе олигонуклеотидов с меньшей комплексообразующей способностью. Наибольшая эффективность модификации достигается при 50°C (рис. 2), т.е. вблизи температуры плавления комплекса (рис. 1), при которой степень ассоциации мишени с реагентом близка к 0.5.

Как и в случае использования октануклеотидного реагента, модификация мишени реагентом (RCl)pN<sub>12</sub> протекает по нескольким основаниям: в большей степени по C<sup>13</sup> и в меньшей – по G<sup>12</sup> и G<sup>9</sup> (рис. 3б). Однако в отличие от октануклеотидного реагента при использовании (RCl)pN<sub>12</sub> наблюдается выраженное изменение эффективности алкилирования этих оснований при повышении температуры реакции – уменьшение доли модификации по основанию C<sup>13</sup>, не участвующему в образовании дуплекса, и увеличение эффективности алкилирования более нуклеофильных оснований G<sup>12</sup> и G<sup>9</sup>, находящихся внутри дуплексной структуры.

Полученные данные по направленности алкилирования мишени согласуются с результатами модификации 302-звенного одноцепочечного ДНК-фрагмента реагентами на основе гекса-, пента- и тетра-нуклеотидов в присутствии дифеназиниевого производного октануклеотида, фланкирующего реагент с 3'-конца [14], и реагентами на основе окта- и додекануклеотидов [15]. Было показано, что реагент на основе протяженных олигонуклеотидов модифицирует мишень по различным основаниям как внутридуплексного, так и одноцепочечного участка, в то время как реагенты на основе более коротких олигонуклеотидов (тетра-, пента-), с меньшей комплексообразующей способностью, модифицируют мишень исключительно по основаниям мишени внутри дуплекса.

Полученные результаты показывают, что комплексообразующие свойства олигонуклеотидной части реагента влияют на направленность и характер зависимости предельной степени модификации от температуры. В случае олигонуклеотидных реагентов, образующих с мишенью прочный комплекс, зависимость степени модификации от температуры может проходить через максимум, а изменение температуры – вызывать существенное перераспределение позиционной направленности алкилирования. Перераспределение сайтов модификации в пользу более нуклеофильных оснований может обуславливать наличие максимума на температурной кривой модификации мишени вблизи температуры плавления комплекса, как это наблюдается в случае додекануклеотидного реагента. Кроме того, при модификации мишени в одинаковых условиях увеличение термостабильности дуплекса мишень реагент путем использования реагентов с большей комплексообразующей способностью в отличие от ранее описанных случаев [16, 17] может

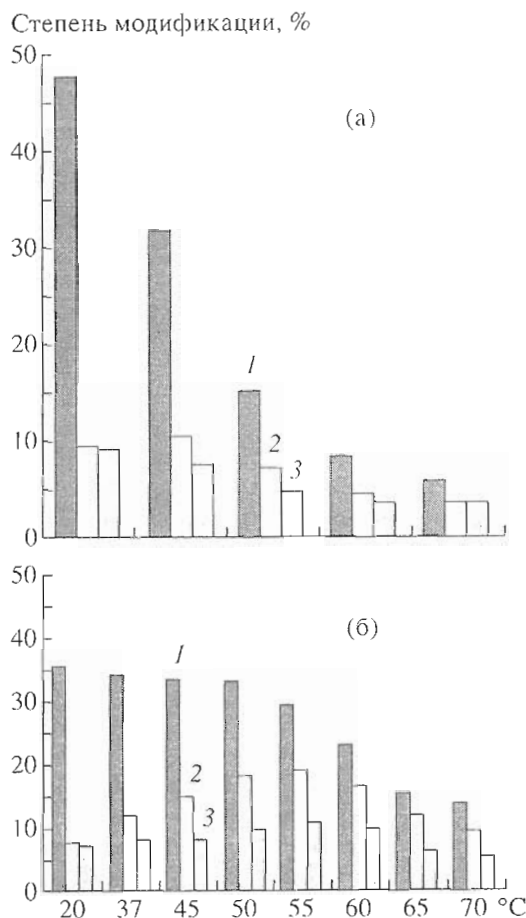


Рис. 3. Степень модификации оснований C<sup>13</sup> (1), G<sup>12</sup> (2), G<sup>9</sup> (3) мишени М реагентами (RCl)pN<sub>8</sub> (а), (RCl)pN<sub>12</sub> (б) при разных температурах.

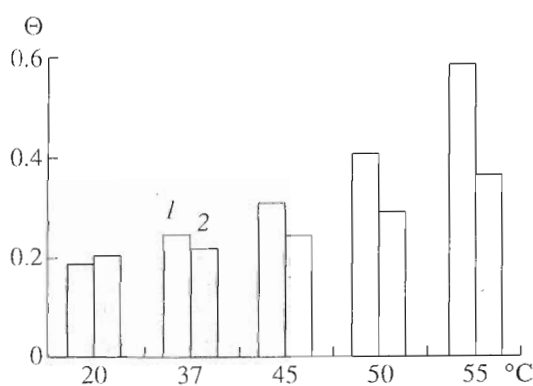


Рис. 4. Отношение степеней модификации оснований G<sup>9</sup> и C<sup>13</sup> мишени М (Θ) реагентами (RCl)pN<sub>8</sub> (1) и (RCl)pN<sub>12</sub> (2) при разных температурах.

приводить не только к повышению, но и к понижению степени модификации.

Так как во всех исследуемых комплексах дуплексный участок вблизи реакционной группировки остается неизменным, влияние комплексообразующих свойств реагентов на моди-

фикацию мишени может быть обусловлено конформационными различиями структуры дуплекса мишень · реагент. Как следует из молекулярно-механических расчетов для ряда модельных дуплексов ДНК-мишень · алкилирующий реагент [18], существуют две основные энергетически выгодные конформации-"накопители" с различной ориентацией реакционной группировки. Конформация T1 предполагает сближение реакционной группировки с первым неспаренным основанием одноцепочечного участка мишени и характеризуется низким энергетическим барьером перехода в предреакционное состояние. Находясь в конформации T2, реакционная группировка направлена в большую бороздку дуплекса и сближена с третьим или четвертым основанием мишени относительно 5'-конца реагента. Эта конформация выгоднее конформации T1, однако переход в предреакционное состояние в этом случае требует больших энергетических затрат для обеспечения существенных изменений в структуре двойной спирали комплекса: увеличения углов спирального вращения участка двойной спирали и изменения в олигонуклеотидном адресе ориентации концевой основания относительно рибозы [18]. Эти расчеты позволяют предположить, что модификация мишени по внутрикомплексному основанию из конформации T2 в большей степени будет происходить при формировании слабых комплексов мишень · реагент с низкой жесткостью структуры. Модификация одноцепочечного участка мишени при реализации конформации T1 будет более характерна для прочных комплексов мишень · реагент, имеющих жесткую структуру.

В комплексах мишени с реагентами на основе окта- и додекануклеотидов при температурах существенно ниже температуры перехода из двухцепочечного в одноцепочечное состояние (20–37°C) модификация подвергается преимущественно основанию C<sup>13</sup>, что характерно для реализации менее выгодной конформации T1 и свидетельствует о жесткой структуре комплекса мишень · реагент. Повышение температуры реакции приводит к увеличению степени алкилирования оснований G<sup>12</sup> и G<sup>9</sup>, т.е. к возрастанию степени реализации конформации T2, что говорит об уменьшении жесткости структуры комплекса. В большей степени основание мишени G<sup>9</sup> алкилируется в случае использования реагента (RCl)pN<sub>8</sub> с меньшей комплексообразующей способностью по сравнению с (RCl)pN<sub>12</sub>. Как видно из рис. 4, в случае использования реагента (RCl)pN<sub>8</sub> относительная эффективность модификации основания G<sup>9</sup> увеличивается более выраженно, чем при использовании додекануклеотидного реагента. Однако даже при температурах выше температуры плавления комплекса алкилирующие производные окта- и додекамера модифицируют мишень главным образом из конформации T1 по основа-

нию C<sup>13</sup>. Преимущественное алкилирование основания мишени G<sup>9</sup>, характерное для реализации конформации T2, наблюдается только в случае самого короткого тетрануклеотидного реагента (RCl)pN<sub>4</sub> (в присутствии 3'-концевого эффектора) с низкими гибридизационными свойствами, что свидетельствует о низкой жесткости структуры комплекса M · (RCl)pN<sub>4</sub>.

Таким образом, степень реализации конформации T2 комплексов мишень · реагент снижается при увеличении гибридизационной способности реагентов. Это свидетельствует о том, что даже в одинаковых условиях подвижного равновесия комплекс  $\rightleftharpoons$  мишень + реагент (например, при температурах плавления соответствующих комплексов) реагенты с большим числом звеньев в олигонуклеотидной части образуют более жесткие дуплексные структуры. Увеличение числа взаимосвязанных элементов структуры комплекса, т.е. числа элементарных пар оснований, вызывает повышение кооперативности системы [19], что и приводит к снижению вероятности локальных перестроек концевых элементов дуплекса, необходимых для реализации алкилирования мишени из конформации H2. Таким образом, кооперативность дуплексной системы определяет степень реализации различных конформаций структуры комплекса и тем самым направленность и эффективность внутрикомплексной модификации мишени.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Хлорид N-(2-гидроксиэтил)феназиния и 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензилметиламин (H-RCl) любезно предоставлены В.Н. Сильниковым и Т.М. Ивановой (НИБЖ СО РАН).

Олигонуклеотиды и их производные выделяли ионообменной (Полисил-СА, "Теоретическая практика", Россия) и обращенно-фазовой (Li-Chroprep RP 18, Merck) хроматографиями на хроматографе Beckman-332.

Олигонуклеотиды синтезировали фосфотриэфирным методом в растворе по [20].

N-(2-Гидроксиэтил)феназиниевые производные олигонуклеотидов pCAGCTCCAp(L'Phn), pCAGATCCAp(L'Phn) и (PhnL)pTCCAGCAp(L'Phn) (E<sub>1</sub>(Phn)) получали по методу [12] и анализировали с помощью обращенно-фазовой хроматографии (колонка 4 × 250 мм, линейный градиент 0 → 20% ацетонитрила в 0.05 M LiClO<sub>4</sub> за 30 мин, скорость элюции 2 мл/мин), сравнивая времена удерживания исходных олигонуклеотидов и более гидрофобных продуктов реакции (Δt<sub>уд</sub> – время удерживания относительно исходного олигонуклеотида), а также спектрофотометрически по соотношению поглощения растворов целевых продуктов в воде при длинах волн 260 и

530 нм ( $\epsilon_{530}$  феназиниевого остатка с аминотинкером составляет  $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [12]). pCAGCTC-Cap(L'Phn):  $\Delta t_{\text{уд}} = 6$  мин,  $A_{260}/A_{530} = 5.9$ ; pCAGATC-Cap(L'Phn):  $\Delta t_{\text{уд}} = 6$  мин,  $A_{260}/A_{530} = 6.5$ ; (PhnL)pTC-CAGGCap(L'Phn):  $\Delta t_{\text{уд}} = 10$  мин,  $A_{260}/A_{530} = 3.5$ .

**Алкилирующие производные олигонуклеотидов (RCI)pN<sub>n</sub>** получали по методу [21] и выделяли обращенно-фазовой хроматографией (условия см. выше, сравнительно времени удерживания исходных олигонуклеотидов и более гидрофобных продуктов реакции. Содержание активного хлора в олигонуклеотидных реагентах, определенное по реакции алкилирования тиосульфата [22], превышало 90% по данным обращенно-фазовой хроматографии.

**Концентрацию олигонуклеотидов и их производных** определяли спектрофотометрически, используя суммарные величины  $\epsilon_{260}$  ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) моно- и динуклеотидов [23], алкилирующей группировки ( $1.47 \times 10^4$  [13]) и N-(2-гидроксиэтил)феназиниевого остатка ( $1.0 \times 10^4$  [12]).

**Термическую денатурацию** олигонуклеотидных дуплексов исследовали в буфере 0.1 М NaCl, 0.01 М какодилат натрия (pH 7.4), 1 мМ EDTA (концентрация каждого олигонуклеотидного компонента  $1.3 \times 10^{-5}$  М) на установке с терморегулируемой оптической кюветой на базе УФ-детектора жидкостного хроматографа "Милюхром" (Россия) при длине волны 260 нм. Скорость нагрева образцов не превышала 0.7–1°C/мин.

**5'-<sup>32</sup>P-Меченый олигодезоксирибонуклеотид** М получали путем обмена 5'-фосфата на [<sup>32</sup>P]фосфат [24].

**Модификацию ДНК-мишени** алкилирующими производными олигонуклеотидов проводили при температурах 20 (48 ч), 37 (8 ч), 45 (2 ч), 50 (1 ч), 55 (35 мин), 60 (20 мин), 65 (12 мин) и 70°C (7 мин) (более пяти периодов полуионизации связи C–Cl [13]).

**Алкилирование мишени** регистрировали электрофорезом в денатурирующем ПААГ по появлению продуктов деструкции полинуклеотидной цепи по модифицированным основаниям после обработки препаратов мишени 10% водным пиперидином в течение 30–50 мин при 95°C [25]. Аддукт ковалентного присоединения реагента по основанию мишени C<sup>13</sup>, устойчивый к обработке пиперидином, предварительно обрабатывали гидразингидратом для расщепления модифицированной мишени по алкилированному основанию C<sup>13</sup> [25] (данные не приведены).

За степень модификации ДНК-мишени принимали процентное отношение радиоактивности в пятне, соответствующем продукту расщепления мишени по заданному основанию, к суммарной радиоактивности в дорожке геля. Статистическое расщепление олигонуклеотида-мишени по

остаткам пуринов (A + G) получали обработкой препарата ДНК 2% раствором дифениламина в 66% муравьиной кислоте (25°C, 35 мин) [26].

Авторы выражают благодарность академику Д.Г. Кнорре за проявленный к работе интерес и полезную дискуссию.

Работа финансировалась грантом Государственной программы "Новейшие методы биоинженерии" и грантом РФФИ (№ 96-04-50-191).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пышный Д.В., Кривенко А.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Дымышиц Г.М., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. № 1.
2. Knorre D.G., Vlassov V.V., Zarytova V.F., Fedorova O.S., Lebedev A.V. Design and Targeted Reactions of Oligonucleotide Derivatives. N. Y.: CRC, 1993. P. 153–191.
3. Asseline V., Delarue M., Lancelot G., Toulme F., Thuong N.T., Montenay-Garestier T., Helene C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 11. P. 3297–3301.
4. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Подыминогин М.А., Сильников В.Н., Шишкин Г.В. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. С. 1212–1220.
5. Pieters J.M.L., Mans R.M.V., van den Elst H., van der Marel G.A., van Boom J.H., Altona C. // Nucleic Acids Res. 1989. V. 17. P. 4551–4556.
6. Лохов С.Г., Кошкин А.А., Кутявин И.В., Митякин М.П., Подыминогин М.А., Лебедев А.В. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 197–205.
7. Maltseva T.V., Agback P., Chattopadhyaya J. // Nucleic Acids Res. 1993. V. 21. P. 4246–4252.
8. Lefevre J.-F., Lane A.N., Jardetzky O. // J. Mol. Biol. 1985. V. 185. P. 689–699.
9. Пышный Д.В., Пышная И.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 709–716.
10. 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.
11. Пышный Д.В., Подыминогин М.А., Пышная И.А., Лохов С.Г., Иванова Е.М., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 561–568.
12. Lokhov S.G., Podyminogin M.A., Sergeev D.S., Silnikov V.N., Kutayvin I.V., Shishkin G.V., Zarytova V.F. // Bioconj. Chem. 1992. V. 3. P. 414–419.
13. Барам Г.И., Бунева В.Н., Добрикова Е.Ю., Петров В.Н. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. С. 613–620.
14. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Мамаев С.В., Подыминогин М.А. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 1653–1660.
15. Vlassov V.V., Zarytova V.F., Kutayvin I.V., Mamaev S.V., Podyminogin M.A. // Nucleic Acids Res. 1986. V. 14. P. 4065–4076.
16. Зарытова В.Ф., Кутявин И.В., Подыминогин М.А., Сильников В.Н., Шишкин Г.В. // Биоорган. химия. 1987. Т. 3. С. 1212–1220.



17. Амирханов Н.В., Зарытова В.Ф. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 370–377.
18. Воробьев Ю.Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. С. 69–82.
19. Рубин А.Б. Биофизика. М.: Высш. шк., 1987. С. 144–184.
20. Зарытова В.Ф., Иванова Е.М., Романенко В.П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. С. 516–521.
21. Zarytova V.F., Godovikova T.S., Kutuyavin I.V., Khalimskaya L.M. // Biophosphates and their Analogues, Synthesis, Structure, Metabolism and Activity / Esd K.S. Bruzik, W.S. Stec. Amsterdam: Elsevier, 1987. P. 149–164.
22. Гринева Н.И., Ломакина Т.С., Тузеева Н.Г., Чимитова А.Т. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 210–214.
23. Cantor C.R., Tinoco I. // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. P. 65–72.
24. Berkner K.L., Folk W.R. // J. Biol. Chem. 1977. V. 252. P. 3176–3184.
25. Maxam A.M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
26. Коробко В.Г., Грачев С.А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. С. 1420–1422.

## Interaction of Derivatives of Short Oligonucleotides with Nucleic Acids. VII. Effect of Conformational Changes in the Duplex Structure on Site-Specificity and Efficiency of Modification of Target DNA by Alkylating Oligonucleotide Derivatives

D. V. Pyshnyi, S. G. Lokhov, E. M. Ivanova, and V. F. Zarytova

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

The modification of a target DNA by alkylating oligonucleotide derivatives possessing various capacities for complex formation was studied. The binding properties of oligonucleotides were changed either by increasing their length (tetra-, octa-, and dodecamers) or by introducing a point substitution and/or an *N*-(2-hydroxyethylphenazinium) residue. It was found that conformational changes occurring in the structure of the target · reagent complex upon elevating the reaction temperature affect the efficiency and site-specificity of the alkylation. In the case of complete saturation of the target with the reagent, an increase in the hybridization ability of the reagent reduced the efficiency of the target modification. It was found that the modification by the tetranucleotide reagent (in the presence of an effector adjacent to the 3' end) occurs exclusively at an intracomplex target base. In the case of the dodecamer, which forms a stable, highly cooperative complex with the target, several bases of the target undergo alkylation, and an increase in temperature changes the site-specificity of alkylation. In this process, the redistribution of the target modification sites toward stronger nucleophilic centers enhances alkylation at temperatures near the melting temperature of the target · dodecanucleotide complex despite a decrease in the extent of target association.

*Key words: oligonucleotides, reactive derivatives; DNA, modification, thermodynamic stability*