



УДК 577.113.6+577.323.24

КОМПЛЕМЕНТАРНО АДРЕСОВАННАЯ МОДИФИКАЦИЯ
МОДЕЛЬНОГО ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА, ИМЕЮЩЕГО
ФОРМУ ШПИЛЬКИ*Бажина Ю. Н., Лебедев А. В., Левина А. С.,
Лохов С. Г., Федорова О. С.**Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Проведена модификация 17-звенного олигодезоксирибонуклеотида d(рТТGGCAGCAGCCAA) (I), имеющего форму шпильки, алкилирующим производным олигонуклеотида d(TTGGC)UCHRCI, комплементарного участку стебля шпильки. Из кривых плавления оценены термодинамические параметры стабильности шпильчатой структуры ($\Delta H_h = -125 \pm 17$ кДж/моль, $\Delta S_h = -380 \pm 84$ Дж/моль·К) и комплекса реагента с мишенью ($\Delta H_{px} = -155 \pm 8$ кДж/моль, $\Delta S_{px} = -427 \pm 21$ Дж/моль·К). Из зависимости степени модификации олигонуклеотида (I) от концентрации реагента получены эффективные константы связывания K_x , равные 1988 ± 83 и 1239 ± 58 M⁻¹ при 30 и 50°С соответственно. Экспериментальные величины K_x удовлетворительно согласуются со значениями $K_x = K_{px} / (1 + K_h)$, рассчитанными с использованием термодинамических параметров.

Реакционноспособные производные олигонуклеотидов могут быть использованы для специфической модификации нуклеиновых кислот, протекающей через образование комплекса между олигонуклеотидным «адресом» реагента и комплементарным участком нуклеиновой кислоты (комплементарно адресованная модификация [1]). Этот подход реализован на примере модификации различных одноцепочечных нуклеиновых кислот: транспортных и рибосомных РНК, одноцепочечных фрагментов ДНК и модельных олигодезоксирибонуклеотидов [2]. Кроме того, проводилась модификация двухцепочечных ДНК, содержащих последовательности, способные образовывать трехцепочечные комплексы [3–5]. Более универсальный механизм модификации двухцепочечных ДНК, с помощью которого можно осуществлять воздействие на любые нуклеотидные последовательности, включает в себя образование комплементарного комплекса между олигонуклеотидной частью реагента и одной из цепей ДНК с одновременным высвобождением второй цепи (механизм перераспределения цепей).

Попытка реализации этого подхода сделана в настоящей работе на примере модификации модельного 17-звенного олигодезоксирибонуклеотида, имеющего форму шпильки, алкилирующим производным олигонуклеотида, комплементарного одной из цепей двухцепочечного стебля шпильки. Исследование модификации шпильчатых структур представляет интерес еще и потому, что они являются структурными элементами транспортных и рибосомных РНК, а также образуются в регуляторных участках генов, что, вероятно, играет важную роль в процессах транскрипции, трансляции и др.

Структура 17-звенного олигонуклеотида-мишени (I) d(рТТGGCAGCAGCCAA) изображена на рис. 1. Его пять концевых нуклеотидов самокомплементарны и образуют стебель шпильки. Олигонуклеотидная часть реагента d(TTGGC)UCHRCI комплементарна шести 3'-концевым нуклеотидам мишени. Можно поэтому ожидать, что модификации будут подвергаться остатки гуанозинов G8 и G10, расположенные в петле

Сокращения: – CHRCI – 2',3'-O-4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензил.

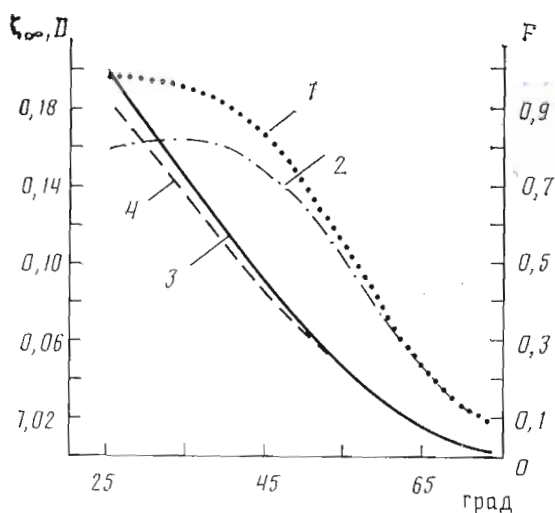


Рис. 2. Зависимость расчетных значений доли шпильчатой структуры F (1 — без реагента, 2 — с реагентом), доли комплекса с реагентом D (3) и предельной степени модификации ξ_{∞} (4) от температуры ($[\text{реагент}] = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)

дит следующим образом:

$$\Delta H_{px} = 6RT_m^2 (dD/dT)_{T=T_m} \quad (6)$$

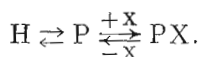
Изменение энтропии можно рассчитать с помощью уравнения

$$\Delta S_{px} = R \ln(2/c) + \Delta H_{px}/T_m \quad (7)$$

Из уравнений (5)–(7) видно, что при плавлении дуплексов T_m зависит от концентрации олигонуклеотидов.

Из кривых плавления найдено, что изменения энтальпии и энтропии при образовании комплекса между олигонуклеотидами (II) и (III) равны соответственно -155 ± 8 кДж/моль, -427 ± 21 Дж/моль·К.

С помощью значений ΔH_h , ΔS_h , ΔH_{px} и ΔS_{px} , оцененных из кривых плавления, можно рассчитать, как ведет себя доля шпильчатой структуры F от температуры в отсутствие и в присутствии реагента. Пусть в системе имеют место следующие равновесия:



Если концентрация реагента x_0 превышает концентрацию олигонуклеотида-мишени, то

$$F = [H] / ([H] + [P] + [PX]) = K_h / (1 + K_h + K_{px}x_0), \quad (8)$$

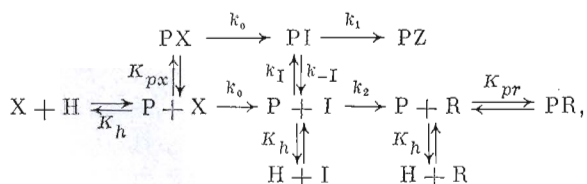
тогда как доля олигонуклеотида, находящегося в комплексе с реагентом (D), равна:

$$D = [PX] / ([H] + [P] + [PX]) = K_{px} \cdot x_0 / (1 + K_h + K_{px} \cdot x_0). \quad (9)$$

На рис. 2 изображена зависимость доли шпильчатой структуры олигонуклеотида (1) от температуры в интервале $30-70^\circ \text{C}$ в отсутствие и в присутствии реагента ($4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), рассчитанная с помощью уравнения (8). Значения K_h и K_{px} для каждой температуры найдены из измеренных величин ΔH_h , ΔH_{px} , ΔS_h и ΔS_{px} . Из рис. 2 видно, что в присутствии $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ реагента доля шпильчатой структуры F уменьшается вследствие образования реакционного комплекса, доля которого (D) составляет заметную величину. Например, при 30°C величина D равна 0,17. Результаты расчетов, представленные на рис. 2, позволяют сделать вывод о том, что можно

ожидать протекания модификации олигонуклеотида (I), имеющего шпильчатую структуру, реакционноспособным производным олигонуклеотида, комплементарного стеблю шпильки.

Кинетическая схема механизма модификации биополимеров алкилирующими производными олигонуклеотидов, предложенная в работе [7], в данном случае должна быть дополнена равновесием, характеризующимся константой K_h , и выглядит следующим образом:



где H — олигонуклеотид-мишень, имеющий шпильчатую структуру; P — олигонуклеотид-мишень, имеющий линейную структуру; X — реагент; I — промежуточный этилениммониевый катион, образующийся из реагента в лимитирующей стадии; PZ — продукт комплементарно адресованной модификации; R — продукт гидролиза катиона I в растворе; PX, PI, PR — соответствующие комплексы с мишенью; K_{px} , K_{pr} , K_h — константы равновесий, указанных на схеме; k_0 , k_1 , k_2 , k_I , k_{-I} — константы скорости реакций, указанных на схеме.

Полагая концентрации I и PI квазистационарными, концентрации H, PX и PR — квазиравновесными, а также $K_{px} = K_{pr}$ и $k_1[P] \ll k_2$, для случая, когда P_t (полная концентрация мишени) много меньше начальной концентрации реагента x_0 , получим выражение для предельной степени модификации, которое, как и в [7], имеет вид:

$$\zeta_\infty = [\text{PZ}]_\infty / P_t = 1 - \exp[-\gamma_{эфф} K_x x_0 / (1 + K_x x_0)] = 1 - \exp(-\gamma_{эфф} D), \quad (10)$$

где

$$\gamma_{эфф} = (1 + k_1/k_2 K_x) / (1 + k_{-I}/k_1). \quad (11)$$

Однако константа K_x в данном случае имеет следующий смысл:

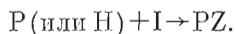
$$K_x = K_{px} / (1 + K_h). \quad (12)$$

При малых степенях модификации предельная степень модификации ζ_∞ равна:

$$\zeta_\infty \approx \gamma_{эфф} D. \quad (13)$$

Зная величину $\gamma_{эфф}$, с помощью уравнений (9)–(13) можно рассчитать ожидаемое значение степени модификации для данной температуры. На рис. 2 представлена зависимость величины ζ_∞ от температуры для случая, когда $\gamma_{эфф} = 1$. Видно, что при концентрации реагента $4 \cdot 10^{-4}$ М можно ожидать протекания специфической модификации олигонуклеотида-мишени.

Необходимо отметить, что кроме модификации, протекающей в специфическом комплексе (схема), биополимер-мишень может модифицироваться промежуточным этилениммониевым катионом неспецифически за счет «неадресованной» реакции в растворе:



В случае полинуклеотидов модификации подвергаются преимущественно остатки гуанозинов [8]. Неадресованное алкилирование характеризуется фактором конкуренции p , представляющим собой отношение константы скорости взаимодействия промежуточного этилениммониевого катиона I с биополимером к удельной скорости гидролиза этого катиона [9]. Степень модификации биополимера за счет неадресованной реакции на временах, соответствующих полной ионизации реагента ($\zeta_\infty^{\text{неадр}}$), можно оценить по формуле, выведенной в работе [9], которая при малых степенях модификации преобразуется к виду

$$\zeta_\infty^{\text{неадр}} = p x_0. \quad (14)$$

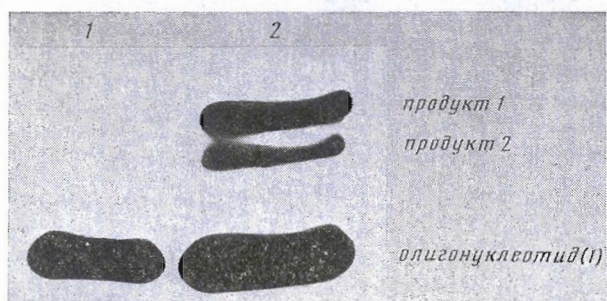


Рис. 3. Радиоавтограф гель-электрофореза реакционной смеси при модификации ^{32}P -меченого олигонуклеотида (I) реагентом d(TTGGC)UCHRCI

В расчете на один остаток гуанозина фактор конкуренции (p) равен 10 M^{-1} (см. [10] и ссылки в этой работе). При концентрации реагента $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ олигонуклеотид-мишень (I), содержащий в своей структуре пять остатков гуанозина, будет модифицироваться по неадресованной реакции на 2%, как это следует из расчета по формуле (14).

Для оценки эффективности комплементарно адресованной модификации в работе [10] было предложено использовать отношение скоростей адресованной и неадресованной реакций (f). В условиях, когда концентрация реагента существенно превышает концентрацию мишени, $x_0 \gg P_i$, эффективность модификации f может быть рассчитана с помощью выражения (15) [11]:

$$f = -\ln(1 - \xi_\infty) / px_0. \quad (15)$$

В ходе экспериментов по модификации 5'- ^{32}P -меченый олигонуклеотид (I) выдерживали при определенной температуре в присутствии реагента до полной ионизации связи C—Cl, что соответствует времени реакции, превышающему время полупревращения в 5 раз. Время полупревращения для каждой температуры рассчитывали из данных [12], где изучалась зависимость от температуры константы скорости ионизации связи C—Cl в 2',3'-O-{4-[N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]}бензилиденовых производных моно- и олигонуклеотидов. После окончания реакции продукты разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле. Из геля вырезали полосы, соответствующие исходному олигонуклеотиду (I) и продуктам модификации 1 и 2 (рис. 3), и определяли в них радиоактивность. Степень модификации $\xi_\infty = [PZ]_\infty / P_i$ рассчитывали в виде отношения радиоактивности в продуктах реакции к суммарной радиоактивности в дорожке геля, полагая при этом, что модификация идет из одного реакционного комплекса.

Экспериментальная зависимость степени модификации ξ_∞ от температуры при концентрации реагента $4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ представлена на рис. 4. (Вклад неадресованной модификации, составляющий 2%, вычтен.) Видно, что имеется очень близкое совпадение экспериментальных и рассчитанных величин (ср. с рис. 2). Параметр f , рассчитанный по формуле (15), в интервале $30\text{--}70^\circ \text{C}$ изменяется от 14,4 до 2, что свидетельствует о преимущественно адресованном характере модификации. На это указывает также ингибирование модификации добавками олигонуклеотида d(TTGGC)U и гиперболический характер зависимостей степени модификации от концентрации реагента (рис. 5). Из этих зависимостей, полученных для 30 и 50°C , с помощью уравнения (10) были рассчитаны значения K_x и $\gamma_{\text{эфф}}$:

$$30^\circ \text{C} - K_x = 1988 \pm 83 \text{ M}^{-1}, \quad \gamma_{\text{эфф}} = 0,66 \pm 0,07,$$

$$50^\circ \text{C} - K_x = 1239 \pm 58 \text{ M}^{-1}, \quad \gamma_{\text{эфф}} = 0,37 \pm 0,02.$$

Расчет по формуле (12) на основании термодинамических величин, полученных из кривых плавления, приводит к значениям K_x , равным 510 и

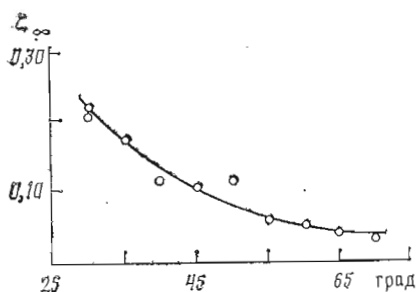


Рис. 4

Рис. 4. Экспериментальная зависимость предельной степени модификации от температуры ($x_0=4 \cdot 10^{-4}$ М, $P_t=1 \cdot 10^{-5}$ М)

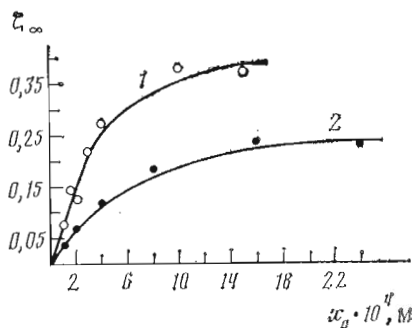


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость предельной степени модификации ξ_∞ от концентрации реагента x_0 при 30° С (1) и 50° С (2) ($P_t=1 \cdot 10^{-5}$ М)

174 М⁻¹ для 30 и 50° С соответственно. Такое расхождение рассчитанных и экспериментальных величин может быть как результатом ошибки в определении свободной энергии ΔG , которая должна составлять 3–5 кДж/моль, что укладывается в реальную экспериментальную ошибку, так и следствием каких-либо неучтенных в термодинамическом расчете взаимодействий в реакционном комплексе, приводящих к его стабилизации. О том, что последнее может иметь место, свидетельствуют данные, полученные при определении точек модификации.

При определении положений точек модификации из геля вырезали отдельные полосы, соответствующие продуктам реакции 1 и 2 (см. рис. 3), элюировали их из геля и проводили обработку 1 М пиперидином (для определения положений модифицированных пуринов) [13] или гидразингидратом в условиях, описанных в [14] (для определения положений модифицированных цитозинов). В последнем случае протекает также расщепление по положениям модифицированных пуринов, так как имеется стадия гидролиза пиперидином (рис. 6). Продукт 1 представляет собой модификацию по G3, G4 и C5 (см. дорожки 2 и 7), продукт 2 — модификацию по остаткам G8, G10, G13 (дорожки 3 и 8). Количественное соотношение между этими продуктами составляет G3 : G4 : C5 : G8 : G10 : G13 = 0,4 : 0,16 : 0,14 : 0,17 : 0,1 : 0,03. Модификация последнего из перечисленных нуклеозидов (G13) находится на уровне неадресованной реакции.

Модификация олигонуклеотида-мишени (I) по нескольким точкам может быть обусловлена следующими причинами. Поскольку установлено, что реакция является адресованной, т. е. алкилирование оснований олигонуклеотида происходит в специфическом комплексе, в этом комплексе все перечисленные выше основания расположены в области, доступной для действия реакционной группы реагента. Это может быть в том случае, если кроме линейной структуры реакционного комплекса (рис. 1), в котором модификация могут подвергаться остатки G8 и G10, существует структура (рис. 7), включающая в себя дополнительную стабилизацию комплекса за счет образования двух G·C-пар между основаниями олигонуклеотида-мишени (I), не участвующими в комплементарном спаривании с реагентом. В этой структуре становятся доступными для модификации остатки G3, G4 и C5.

В литературе имеются данные, свидетельствующие о возможности образования в олигонуклеотидах шпильчатых структур, стебель которых состоит всего из двух G·C-пар. Так, в [10] на основании анализа положений точек модификации олигонуклеотида d(pCCCTGTTTGGC) реагентом d(pAAC)gACHRCI был сделан вывод о том, что данный олигонуклеотид-мишень находится в растворе в форме шпильки. Аналогичный вывод был сделан в работе [15] относительно олигонуклеотида CGTCAAACSTCGp и из кривых плавления оценены термодинамические параметры стабильно-

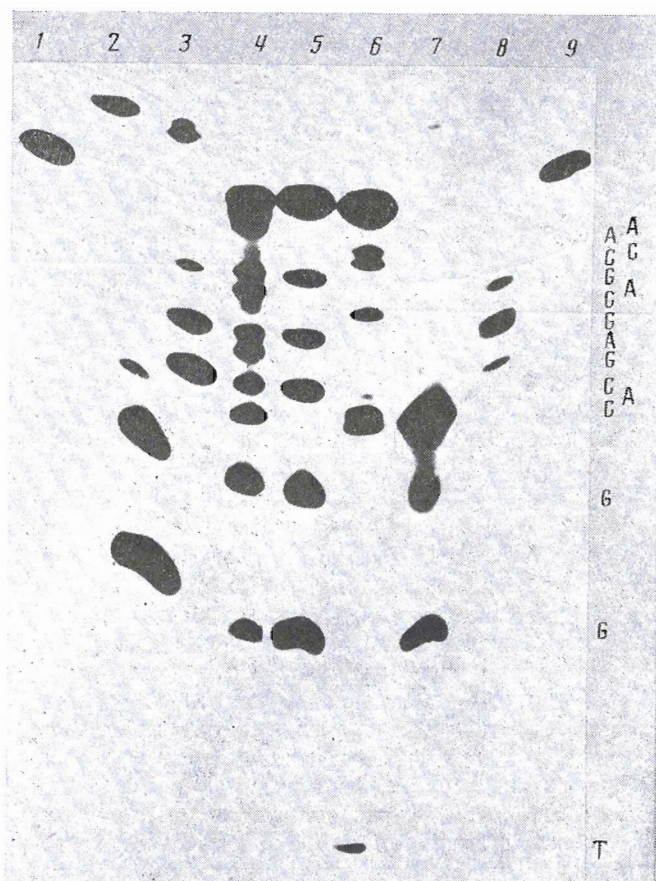


Рис. 6. Радиоавтограф гель-электрофореза продуктов расщепления олигонуклеотида (I) по остаткам модифицированных оснований. 1, 9 – немодифицированный олигонуклеотид (I), 2 – расщепление продукта 1 пиперидином, 3 – расщепление продукта 2 пиперидином, 4 – расщепление олигонуклеотида (I) по A+G, 5 – расщепление олигонуклеотида (I) по G, 6 – расщепление олигонуклеотида (I) по C+T, 7 – обработка продукта 1 гидразингидратом и расщепление пиперидином, 8 – обработка продукта 2 гидразингидратом и расщепление пиперидином

сти шпильчатой структуры: $\Delta H = -80,3$ кДж/моль, $\Delta S = -256,2$ Дж/моль · К, откуда для 30°C имеем $\Delta G = -2,6$ кДж/моль. Из этих данных следует, что учет дополнительного спаривания в реакционном комплексе, дающего дополнительный вклад в стабилизацию в размере ~ 3 кДж/моль, должен привести к более близкому согласованию расчетных и экспериментальных

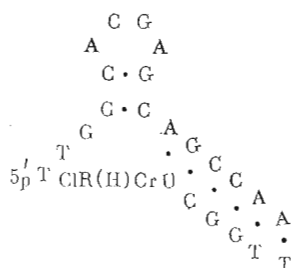


Рис. 7. Гипотетическая структура реакционного комплекса, полученная из анализа точек модификации

значений K_x . Экспериментальные значения K_x оказались больше величин, которые были использованы для вычисления ожидаемых степеней модификации, однако экспериментальные значения параметра $\gamma_{эфф}$ меньше принимаемой в расчете $\gamma_{эфф} = 1$ (см. данные на рис. 2). Это привело к доста-

точно близкому совпадению расчетных и экспериментальных величин ξ_{∞} . Предварительная оценка величины параметра $\gamma_{эфф}$ в настоящее время невозможна из-за недостатка данных относительно значений констант скорости реакций, входящих в кинетическую схему. Тем не менее проведенный в работе анализ показывает, что на основании термодинамических параметров, полученных из кривых плавления, характеризующих стабильность шпильчатой структуры и олигонуклеотидного адреса реагента с комплементарной последовательностью мишени, можно достаточно точно предсказывать ожидаемые значения степеней модификации. Показано, что существует принципиальная возможность проведения специфической модификации шпильчатой структуры реакционноспособными производными олигонуклеотидов, комплементарных к двухцепочечному участку мишени, по механизму перераспределения цепей. Этот подход может оказаться перспективным для воздействия на регуляторные области генов, содержащих шпильчатые структуры, а также для модификации двухцепочечных участков в составе РНК.

Экспериментальная часть

Олигонуклеотиды d(pTTGGCACGAGCAGCCAA) (I) и d(pACGAGCA·GCCAA) (II) синтезировали фосфотриэфирным методом в растворе в соответствии с работой [16]; олигонуклеотид d(TTGCC)U (III) получали амидофосфитным методом на синтезаторе «Виктория-4М» [17]. Метку ^{32}P на 5'-конец олигонуклеотида (I) вводили с помощью T4-полинуклеотидкиназы (1000 ед./мл) и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (>1000 Ки/ммоль).

Реагент d(TTGGC)UCHRCl синтезировали по методике [18], очищали на микроколоночном хроматографе «Милихром» с помощью обращенно-фазовой хроматографии на смоле Lichrosorb RP-18 (Merck, ФРГ) в градиенте концентрации ацетонитрила от 0 до 50% в 0,05 М тетраэтиламмонийацетате, pH 8,0.

Плавление олигонуклеотида (I) и дуплекса между олигонуклеотидами (II) и d(TTCCC)U проводили на установке, описанной в [19], на базе микроспектрофотометра «Обь-4», данные обрабатывали на ЭВМ «Искра-226».

Реакцию модификации и плавление олигонуклеотидов осуществляли в буфере состава 0,2 М NaCl, 0,01 М MgCl_2 , 0,01 М трис-HCl, pH 7,5. После проведения реакции ($V=10$ мкл) к раствору добавляли 100 мкл 2% LiClO_4 в ацетоне [20]. Осадок отделяли центрифугированием, промывали спиртом, растворяли в 5 мкл 80% формамида, содержащего 0,05% бромфенолового синего и 0,05% ксиленианола, и разделяли продукты электрофорезом на пластинах ($30 \times 20 \times 0,04$ см) с 20% полиакриламидным гелем в 7 М мочеvine при напряжении 50 В/см. Гель радиоавтографировали на рентгеновскую пленку РТ-1.

Для определения положений модифицированных оснований осуществляли частичное расщепление олигонуклеотида (I) по гуанинам [13], пуринам [21] и пиримидинам [13].

Выделение продуктов модификации олигонуклеотида (I) из геля проводили путем электроэлюции на фильтр (DE-81, Whatman) при напряжении 150 В. Время элюции 15 мин. Олигонуклеотиды смывали с фильтра 1 М LiClO_4 в воде и осаждали в виде литиевой соли из водно-ацетонового раствора.

Определение величин K_x и $\gamma_{эфф}$ из экспериментальных данных проводили путем линеаризации уравнения (10) в координатах $x_0/\ln(1-\xi_{\infty}) \div x_0$ и оптимизации параметров методом наименьших квадратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I. // Tetrahedron Lett. 1967. V. 8. № 37. P. 3557-3562.
2. Knorre D. G., Vlassov V. V. // Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol. 1985. V. 32. P. 292-320.
3. Fedorova O. S., Knorre D. G., Podust L. M., Zarytova V. F. // FEBS Lett. 1988. V. 222. № 2. P. 273-276.

4. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Подуст Л. М., Федорова О. С. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 300. № 4. С. 1006–1009.
5. Moser H. E., Dervan P. B. // Science. 1987. V. 238. № 4827. P. 645–650.
6. Биохимическая термодинамика. / Под ред. Джоунса М. М.: Мир, 1982. С. 140–191.
7. Кнорре Д. Г., Чимитова Т. А. // Молекулярн. биология. 1978. Т. 12. № 4. С. 814–821.
8. Беликова А. М., Гринева Н. И., Карнова Г. Г. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1972. Вып. 4. С. 110–116.
9. Беликова А. М., Вахрушева Т. Е., Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А. // Молекулярн. биология. 1969. Т. 3. № 2. С. 210–219.
10. Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Левина А. С., Пичко Н. П., Подуст Л. М., Федорова О. С. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 230–239.
11. Власов В. В., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Мамаев С. В., Подуст Л. М., Федорова О. С. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1221–1229.
12. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Тигеева Н. Г., Чимитова Т. А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 210–214.
13. Maxam A. M., Gilbert M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499–560.
14. Kirkegaard K., Vuc H., Spassky A., Wang J. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 9. P. 2544–2548.
15. Nadeau J. G., Gilham P. T. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 22. P. 8259–8274.
16. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 518–521.
17. Грязнов С. М., Горн В. В., Зарытова В. Ф., Кумарев В. П., Левина А. С., Полуцук А. С., Потанов В. К., Потемкин Г. А., Средин Ю. Г., Шабарова З. А. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1987. Вып. 1. С. 119–123.
18. Райт В. К., Карнова Г. Г., Гринева Н. И. // Биоорган. химия. 1977. Т. 2. № 1. С. 31–37.
19. Grachev M. A., Perelroyzen M. P. // Nucl. Acids Res. 1978. V. 5. № 7. P. 2557–2564.
20. Барам Г. И., Грачев С. А. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1420–1422.
21. Коробко В. Г., Грачев С. А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 10. С. 1420–1422.

Поступила в редакцию
5.VIII.1988.

COMPLEMENTARY ADRESSED MODIFICATION OF A MODEL HAIRPIN-SHAPED OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDE

BAZHINA J. N., LEBEDEV A. V., LEVINA A. S., LOKHOV S. G., FEDOROVA O. S.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry,
Siberian Division of the Academy of Sciences of the USSR*

A hairpin-shaped oligodeoxyribonucleotide d(PTGGCACGAGCAGCCAA) (I) was alkylated with the reagent d(TTGGG) >UCHRCl ($\text{RCl} = -\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{Cl}$) complementary to the hairpin's stem. Thermodynamic parameters for the hairpin structure estimated from melting curves were: $\Delta H_h = -125 \pm 17$ kJ/mol, $\Delta S_h = -380 \pm 84$ J/mol·K; and for the reagent-target complex $\Delta H_{px} = -155 \pm 8$ kJ/mol, $\Delta S_{px} = -427 \pm 21$ J/mol·K. Effective constants of association K_x of the oligonucleotide with the reagent were determined at 30 and 50° from the concentration dependence of the reaction yield and were 1988 ± 83 and 1239 ± 58 M $^{-1}$, respectively. Experimental values of K_x agreed with the values of $K_x = K_{px}/(1 + K_h)$, calculated with the use of the thermodynamic parameters.