



УДК 547.963.32.07:577.113.6:554

НОВЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМИНОКИСЛОТ ПО ИХ БОКОВЫМ РАДИКАЛАМ С АРИЛАЗИДАМИ

© 1998 г. Д. Г. Кнорре, Е. В. Биченкова, В. В. Коваль,
П. В. Алексеев*, В. Д. Кнорре**, Э. Нордхоф***, Т. С. Годовикова#

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Академика М.А. Лаврентьева, 8;

*Новосибирский госуниверситет, Новосибирск;

** Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва;

*** Отдел молекулярной биологии Оденского университета, Дания

Поступила в редакцию 27.01.98 г. Принята к печати 11.03.98 г.

Предложен новый подход к изучению взаимодействия остатков аминокислот по их боковым радикалам с фотоактивными арилазидами, основанный на сближении реагирующих групп путем присоединения вводимых в реакцию соединений к комплементарным олигонуклеотидам. В качестве мишеней для фотомодификации использованы соединения, представляющие собой фрагменты цистамина, гистамина и 1,6-гексаметилендиамина, моделирующие боковые радикалы цистина, гистидина и лизина, присоединенные через фосфамидную связь к 3'-концевому фосфату олигонуклеотида GGATCp. В качестве фотореагентов использованы производные олигонуклеотида pGATACAA, к 5'-концу которого фосфамидной связью присоединены фрагмент $N_3C_6H_4NH$ - и его производные, содержащие спейсер $-(CH_2)_nNH$ -, где $n = 2, 4, 6$, а также производные, несущие остатки $N_3C_6F_4CO-NH(CH_2)_3NH$ - или $2-N_3,5-NO_2-C_6H_3CO-NH(CH_2)_3NH$ -. Фотомодификация в дуплексах проводилась при облучении светом 300–350 нм. Предельные выходы фотосшивки составили от 22 до 68%. Наибольшую эффективность по отношению к мишеням проявляют реагенты с остатком *n*-азидоанилина. Предельный выход продуктов фотомодификации, моделирующих боковые цепи цистеина и лизина, зависит от длины и структуры используемых спейсеров и варьирует от 40 до 67%. В дуплексе с мишенью, несущей остаток имидазола (модель гистидина), отмечается снижение выхода до 25%. Это согласуется с данными компьютерного моделирования, указывающими на неблагоприятное взаимное расположение остатка имидазола и фотоактивной группы.

Ключевые слова: фотоаффинная модификация; производные олигонуклеотидов; компьютерное моделирование.

Фотоаффинная модификация становится одним из наиболее эффективных методов исследования структуры активных центров биополимеров и их надмолекулярных комплексов. Интерес к фотохимическим превращениям обусловлен возможностью проведения реакции в миллисекундном диапазоне, что открывает перспективу изучения динамики процессов, происходящих в нуклеопротеидных системах. Примером применения такого подхода является пионерское исследование взаимодействия ДНК с РНК-полимеразой фага T7. Облучение через разные промежутки после смещения ДНК с ферментом наглядно продемонстрировало, что первичное связывание фермента происходит с различными участками

ДНК, но затем наблюдается направленное перемещение фермента в сторону промотора [1].

Для нуклеиновых кислот разработаны эффективные методы определения участков модификации, в отдельных случаях имеются некоторые сведения о механизме фотомодификации отдельных компонентов нуклеиновых кислот (образование тиминных димеров, псораленовые производные тимина) [2]. В то же время для взаимодействия фотоактивных соединений с аминокислотными остатками в составе белковых молекул структурные данные практически отсутствуют, хотя отдельные сведения о том, какие именно остатки подвергаются фотоаффинной модификации, имеются в достаточном количестве.

Для изучения взаимодействия аминокислот по их боковым радикалам с фотоактивными группами мы предложили подход, основанный на искусственном сближении реагирующих групп путем образования комплементарного комплекса про-

Сокращения: Im – остаток имидазола, *p – [³²P]фосфат. Префикс d (дезоксид) в аббревиатуре олигодезоксинуклеотидов и их производных опущен.

Автор для переписки.

изводными олигонуклеотидов, один из которых на 3'-конце несет фрагмент аминокислоты, а второй на 5'-конце – фотоактивную группу. По нашему мнению, достигаемое таким образом искусственное сближение реагирующих частиц позволяет проводить процесс в водном растворе, приближаясь к реальным условиям фотоаффинной модификации биомолекул, и имеет серьезные преимущества по сравнению с изучением прямого взаимодействия фотореагента с соответствующей аминокислотой. Последний путь требует существенно более высоких концентраций, что может вызвать большое число побочных процессов. Предлагаемый нами прием ранее был применен для сравнения реакционной способности и направления реакции для трех фотоактивных групп: 4-азидотетрафторбензойной кислоты, 2-нитро-5-азидобензойной кислоты и *n*-азидоанилина. Было показано, что по отношению к фрагментам, моделирующим аминокислоты, наиболее селективен *n*-азидоанилин, который в водном растворе после облучения и образования соответствующего нитрена изомеризуется в *n*-бензохинондимин, далее выступающий в темновой реакции как сильный электрофил [3]. В этом случае вообще не происходит модификации олигонуклеотидного фрагмента, т.е. реагент может рассматриваться, как селективный для модификации белковых компонентов нуклеопротеидных комплексов [4].

ПОЛУЧЕНИЕ КОНЪЮГАТОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Для присоединения фрагментов аминокислот в работе использовали олигонуклеотид GGTATCp (I), а в качестве носителя фотоактивной группы – pGATACCAA (II). Фотохимические превращения в дуплексах проводили при 4°C, облучая реакционную смесь светом 300–350 нм. Чтобы оценить содержание дуплекса в реакционных смесях, была измерена температура плавления комплекса, которая оказалась равной 26°C. Значение ΔH , найденное для дуплекса исходя из этого значения $T_{пл}$, составляет 37.7 ккал/моль. Отсюда константа ассоциации для используемых дуплексов при 4°C, рассчитанная по уравнению Вант-Гоффа, оказывается существенно ниже 100. Следовательно, в реакционных смесях преобладающей формой является дуплекс.

В качестве мишеней для фотомодификации в работе использованы цистамин, гистамин и 1,6-диаминогексан, моделирующие боковые радикалы цистина, гистидина и лизина. Амины присоединяли к 3'-концевому фосфату олигонуклеотида GGTATCp (I) через фосфамидную связь [5]. Полученные производные метили ^{32}P по 5'-концу.

Поскольку остаток *n*-азидоанилина не модифицирует олигонуклеотиды и в то же время эф-

фективно реагирует с белками хроматина [6], в настоящей работе наиболее детально исследована фотомодификация олигонуклеотидными производными, несущими *n*-азидофениламиногруппу.

Присоединение фотоактивных групп и радикалов аминокислот осуществляли путем фосфорилирования амина активным *N,N*-диметиламинопиридиниевым производным соответствующего олигонуклеотида [7, 8], либо недавно обнаруженным нами новым активным производным, непосредственно выделяемым после активации олигонуклеотида смесью трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдисульфида в DMF [9]. При фосфорилировании цистеамина и гистамина, обладающих помимо алифатической аминогруппы дополнительными нуклеофильными центрами, нужно было убедиться, что последние не затрагиваются используемыми фосфорилирующими реагентами. Для этого методом ^{31}P -ЯМР-спектроскопии было исследовано направление фосфорилирования.

При изучении фосфорилирования гистамина активным производным тетрауклеотида pATGA в ЯМР-спектре помимо сигнала при 0.29 м. д., типичного для межнуклеотидных фосфатов, наблюдался единственный сигнал при 8.38 м. д., характерный для алифатического фосфамида [10]. Следовательно, фосфорилирование имидазольного фрагмента не происходит.

Реакция с цистеамином исследовалась на примере его взаимодействия с *N,N*-диметиламинопиридиниевым производным тимидин-5'-фосфата. При взаимодействии 0.1 М раствора триэтиламмониевой соли pT с 0.1 М DMAP в DMF в присутствии 0.3 М Ph_3P и 0.3 М $(PyS)_2$ уже через 5 мин в спектре ^{31}P -ЯМР реакционной смеси исчезает сигнал, соответствующий концевой фосфатной группе (0.2 м. д.), и регистрируются сигналы ядер атомов фосфора, соответствующие пирофосфатной (δ –9.7 м. д.) и связи P–N диметиламинопиридиниевого остатка (δ –6.7 м. д.). Через 1–2 мин после добавления к активированному таким образом мононуклеотиду 1 М раствора цистеамина в спектрах ^{31}P -ЯМР исчезает сигнал производного 4-*N,N*-диметиламинопиридиниевого производного и регистрируется сигнал с δ 6.5 м. д., свидетельствующий об образовании алифатического фосфамида. Следов сигнала, соответствующего образованию тиоэфира (в области 20 м. д.), не зарегистрировано [10].

Таким образом, в случае обоих бифункциональных аминов реакция проходит только по алифатической аминогруппе.

Поскольку фосфорилирование цистеамина и последующее выделение олигонуклеотидного производного проводилось в присутствии кислорода воздуха, можно было ожидать окисления HS-группы с образованием соответствующего производного дисульфида. Данные ионообменной

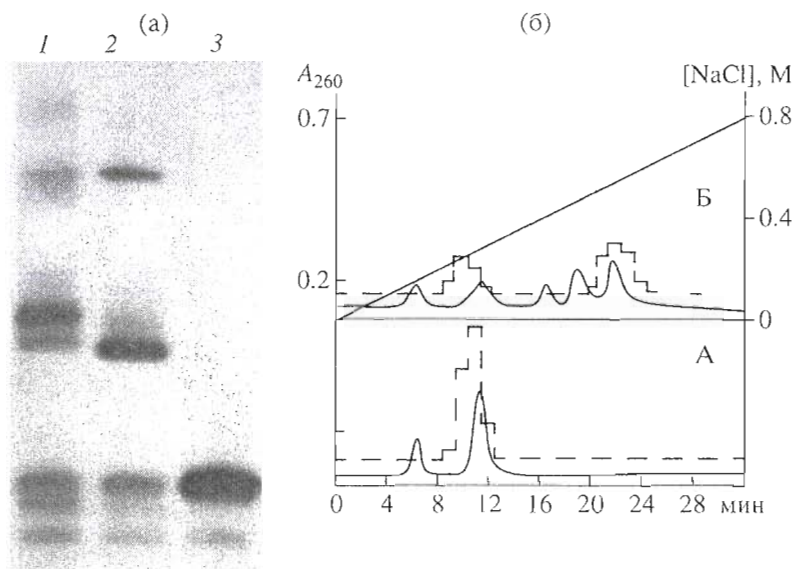


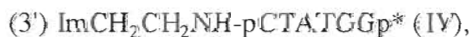
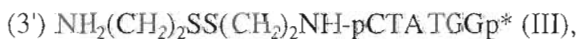
Рис. 1. Радиоавтограф электрофоретического анализа (а) и профиль хроматографического разделения на колонке с полисил-СА (б) продуктов внутрикомплексных фотореакций фотореагентов с соединениями (III), (V), моделирующими функциональные группы аминокислот: (а) – дорожки 1–3 – облученные дуплексы (III) · (X), (III) · (VIII) и мишень (III) соответственно; (б) – А – необлученный дуплекс (V) · (XI), Б – облученный дуплекс (V) · (XI), где мишень (V) – смесь немеченого и меченого ^{32}P по 5'-фосфату производного $[\text{P}^{32}]$ в соотношении 1 : 100. Штриховая линия – радиоактивный счет по Черенкову (имп/мин). Условия экспериментов см. “Экспер. часть”.

хроматографии и гель-электрофореза указывают на идентичность олигонуклеотидных конъюгатов, полученных с использованием как цистеамина, так и цистамина, что может свидетельствовать об образовании в обоих случаях цистаминового производного. Масс-спектрометрический анализ производного (III) подтвердил присутствие в олигонуклеотидном производном остатка цистамина.

ВНУТРИДУПЛЕКСНАЯ ФОТОХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ

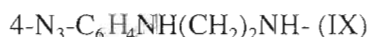
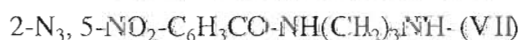
В работе были использованы в качестве компонентов дуплексов следующие производные олигонуклеотидов:

мишени



реагенты

XpGATACCAA, где



Дуплексы, образованные мишенью и фотореагентом, облучались светом с λ 300–350 нм и продукты анализировали с помощью анионообменной хроматографии и гель-электрофореза. Как видно из рис. 1, на электрофореграммах (а) и хроматограммах (б) регистрируются соединения с меньшей подвижностью по сравнению с мишенью, которые соответствуют продуктам сшивки компонентов дуплекса в соотношении 1 : 1. На примере дуплекса (III) · (X) было оценено время полупревращения для образования продукта сшивки, оказавшееся равным около 60 мин. Чтобы найти предельные выходы фотосшивки, эксперименты проводили в течение 10 периодов полупревращения (600 мин). Предельные выходы составили для дуплексов (III) · (VI) – 26%; (III) · (VII) – 22, (III) · (VIII) – 63, (III) · (IX) – 62, (III) · (X) – 68, (III) · (XI) – 40, (V) · (X) – 43, (V) · (XI) – 67%. Во всех случаях предельный выход продуктов сшивки с остатком *n*-азидоанилина в качестве фотоактивной группы существенно превышает выход с двумя другими азидопроизводными, убедительно демонстрируя преимущество *n*-азидоанилинового фрагмента для модификации некоторых функциональных групп белков.

Обращает на себя внимание тот факт, что эффективность модификации существенно зависит от структуры и размера спейсера. Так, при замене в спейсере двух CH_2 -групп (дуплекс (V) · (X)) на дисульфидный фрагмент (дуплекс (III) · (X)) предельный выход снижается с 67 до 40%. Аналогично увеличение длины спейсера, связывающего

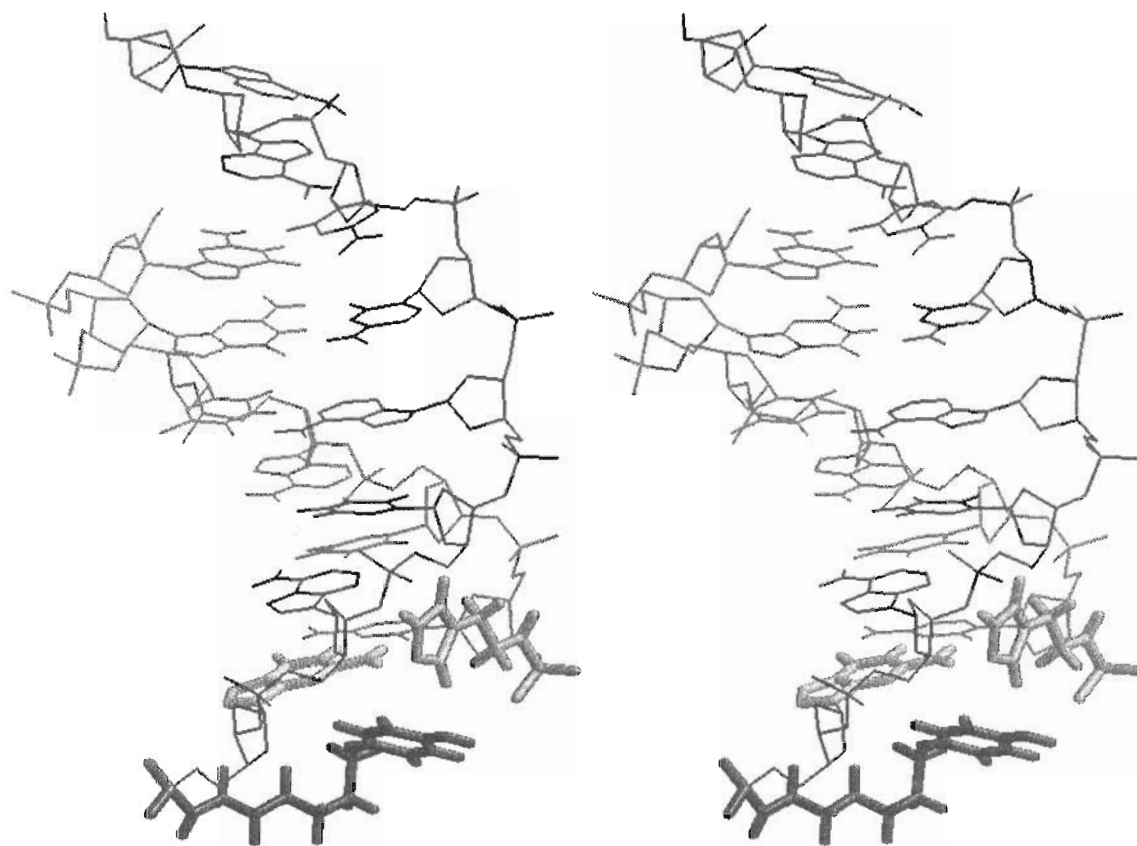


Рис. 2. Стереопара итоговой структуры облученного дуплекса (IV) · (XI). Жирными линиями выделены остатки *p*-бензохинондиимина, гистамина и остаток гуанина последней комплементарной G · C-пары, с NH₂-группой которого остаток имидазола образует дополнительную водородную связь.

фотогруппу с олигонуклеотидом, приводит к уменьшению эффективности модификации в дуплексе (43% для дуплекса (V) · (X)). Таким образом, при конструировании фотореагентов должна учитываться природа спейсеров. В некоторых случаях для выбора спейсеров может оказаться полезным предварительное компьютерное моделирование системы.

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДУПЛЕКСА (IV) · (XI)

Значение моделирования наглядно демонстрируется на примере анализа данных по внутридуплексной реакции с мишенью, несущей радикал, имитирующий фрагмент гистидина. В случае дуплекса (IV) · (XI) предельная степень модификации составила всего 25%.

Чтобы объяснить пониженную реакционную способность остатков имидазола в дуплексе (IV) · (XI), было проведено компьютерное моделирование его структуры дуплекса. Обнаружено, что в одной из конформаций, соответствующих найденному энергетическому минимуму, остаток имидазола экспонирован в сторону концевой ком-

плементарной пары G · C и может образовывать дополнительную водородную связь с NH₂-группой гуанозина (рис. 2). В пользу наличия такой водородной связи свидетельствует повышение значения $T_{пл}$ этого дуплекса на 2° по сравнению с дуплексом (I) · (II). Найденная конформация дуплекса не обеспечивает достаточного для протекания реакции сближения имидазольного кольца и образующегося в ходе фотолиза фрагмента *p*-бензохинондиимина. Однако в соответствии с представлениями, развитыми Ю.Н. Воробьевым [11], можно рассматривать эту конформацию, как “накопитель”, из которой в результате флуктуаций образуется предреакционный ван-дер-ваальсов комплекс, непосредственно предшествующий сближению реагирующих групп.

Следует отметить, что наряду с продуктами сшивки со стехиометрией 1 : 1 присутствуют продукты с меньшей электрофоретической подвижностью (рис. 1а, 1б). Число зарядов по данным анионообменной хроматографии указывает на соотношение компонентов в аддукте 1 : 2. Природа этих продуктов еще подлежит дальнейшему выяснению. В случае реагентов (VIII) и (X) показано, что уменьшение концентрации арилазидо-

производного на порядок вызывает снижение выхода ковалентных аддуктов (продуктов сшивки компонентов дуплекса) с соотношением 1 : 2. Это позволяет предположить, что в продуктах с более высокой молекулярной массой дополнительным компонентом является мишень.

Приведенные данные демонстрируют перспективность предложенного подхода для изучения взаимодействия реагирующих групп нуклеотидной природы путем сближения их с помощью комплементарных олигонуклеотидов. В то же время они показывают существенную роль конструирования реагентов, в первую очередь выбора спейсеров. На примере поведения имидазольного остатка, который образует водородную связь с гуанином видна также необходимость выявления дополнительных взаимодействий используемых мишеней с компонентами дуплекса, несущими сближаемые группы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы трифенилфосфин, 4-*N*, *N*-диметиламинопиридин, цистеамин, цистамин, гистамин (Fluka, Швейцария); 2,2'-дипиридилдисульфид (Aldrich, США); акриламид, *N*, *N*-метилбисакриламид (Serva, ФРГ); цетилтриметиламмонийбромид (Merck, ФРГ); Трис-НСl (Sigma, США).

N-Оксисукцинимидные эфиры *n*-азидотетрафторбензойной и 2-нитро-5-азидобензойной кислот получали согласно [12]; *n*-азидоанилин (производство ОХП НИОХ РАН) дополнительно перекристаллизовывали из смеси вода-этанол.

N-(4-Азидофенил)-1,2-диаминоэтан, *N*-(4-азидофенил)-1,4-диаминобутан, *N*-(*n*-азидофенил)-1,6-диаминогексан получали согласно работе [13].

Олигодезоксинуклеотиды синтезированы традиционным фосфамидитным методом на автоматическом синтезаторе, как описано в работе [14].

Остаток 1,6-диаминогексана, 1,3-диаминопропана и гистамина присоединяли к концевому фосфату олигонуклеотида в соответствии с работой [5].

4-Азидотетрафторбензойную и 2-нитро-5-азидобензойную группы вводили в аминокпропановый линкер в составе олигонуклеотида так, как описано в работе [4].

5'-Фосфо-4-азидоанилид олигонуклеотида (соединение VIII) синтезировали как в работе [4]. 5'-{1-[2-(4-Азидофениламино)этил]}амидофосфат (IX), 5'-{1-[4-(4-азидофениламино)бутил]}амидофосфат (X), 5'-{1-[6-(4-азидофениламино)гексил]}амидофосфат (XI) олигонуклеотида р(ГАТАССАА), 3'-[2-(1*H*-имидазол-4-ил-этил)]-амидофосфат (IV), 3'-{1-[6-(3,4-тиагексил)ами-

но]}амидофосфат (III) олигонуклеотида GGTATCp получали по работе [5].

ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Waters 600E (США) на колонке размером 4,6 × 250 мм; скорость элюции 2 мл/мин. Для анионообменной хроматографии использовали Полисил-СА (НПО "Вектор"), градиент – 0 → 1 М NaCl в 0.01 М КН₂РO₄ (рН 8.9) в присутствии 7 М мочевины. Колоночную хроматографию на смоле с обращенной фазой LiChrosorb-RP18 (Merk, ФРГ) проводили в градиенте 0 → 20% ацетонитрила в 0.05 М LiClO₄ за 30 мин.

Спектры ³¹P-ЯМР записывали в импульсном режиме на спектрометре AC-200 (Bruker, Physic AG, ФРГ) на частоте 200 МГц при 25°C. Химические сдвиги приведены относительно Н₃РO₄ (внешний стандарт).

УФ- и ИК-спектры регистрировали с помощью спектрофотометров Specord M-40 и M-60 (Karl Zeiss, ГДР) соответственно.

Образцы облучали светом лампы ДРШ-1000 через комбинацию стеклянных фильтров УФС-1, БС-12. Интенсивность света 1.2 × 10¹⁵ квант с⁻¹см⁻². Концентрация образцов 10⁻⁶–10⁻⁵ М. Фотомодификацию проводили в 0.16 М NaCl, 0.02 М Na₂НРO₄, 0.1 мМ EDTA, рН 8.9.

Молярные коэффициенты поглощения олигонуклеотидов ε рассчитывали по методу [15] с учетом значений ε для нуклеотидов [16]. Значение ε для модифицированных олигонуклеотидов считали равным сумме значений ε₂₆₀ для немодифицированного олигонуклеотида и амида соответствующего арилазида и функциональной группы аминокислоты (при λ 260 нм).

Масс-спектрометрический анализ олигонуклеотида (I) и его производного (III) проводили методом MALDI на времяпролетном приборе (PerSeptive Biosystem). Исходный олигонуклеотид и его производное были предварительно переведены в аммониевую форму, которая в масс-спектрометре переходит в Н⁺-форму. На спектре исходного олигонуклеотида регистрировался основной пик с массой 1887.65, что соответствует структуре GGTATCp, а спектр основного пика производного олигонуклеотида соответствовал массе 2021.88, что согласуется со структурой GGTATCpNHCH₂CH₂S–SCH₂CH₂NH₂ (III).

Фотомодификация соединений (III)–(V) арил-азидными производными олигонуклеотида (VI)–(XI). Образцы (24 мкл), содержащие 5'-³²P-меченые олигонуклеотид (I) или его производные, несущие функциональные группы аминокислот (соединения (III)–(V)) в концентрации 10⁻⁵ М и соответствующее арилазидное производное олигонуклеотида (соединения (VI)–(XI)) в концентрации 10⁻⁵ М в фосфатном буфере (рН 8.9), помещали в

лунки планшета, охлаждали до 4°C и облучали светом ртутной лампы с расстояния 15 см. Время экспозиции 6 мин. В ряде экспериментов использовали немеченные олигонуклеотиды мишени в концентрации 5×10^{-5} М, при этом концентрацию арилизидных производных олигонуклеотида также увеличивали до 5×10^{-5} М.

После облучения реакционную смесь выдерживали в течение ночи при 4°C в темноте и анализировали с помощью гель-электрофореза в 20% полиакриламидном геле (8 М мочевины, 0,05 М Трис-борат (рН 8,3), 1 мМ EDTA) или анионообменной хроматографией в денатурирующих условиях. Распределение вещества в дорожках геля определяли по денситометрическим профилям радиоавтографа. После хроматографического разделения реакционной смеси для количественной оценки выхода продуктов фотомодификации просчитывали по Черенкову радиоактивность соответствующих фракций. Степень модификации (%) определяли как отношение площади пиков, соответствующих продуктам модификации, к суммарной площади всех пиков (%).

Молекулярное моделирование и энергетическая минимизация. Построение стартовых структур, энергетическую минимизацию и молекулярно-динамическую симуляцию проводили для условий газовой фазы с использованием программы AMBER 4.0 [17], любезно предоставленной проф. П.А. Кольманом. Все расчеты осуществляли на рабочей станции с процессором Intel Pentium-133. Стартовые координаты дуплексной части (IV) · (XI) были получены с использованием модуля NUCGEN на основе координат правоспиральной В-ДНК Арнотта. Во всех расчетах использовались стандартные параметры силового поля AMBER 4.0. Распределение зарядов на атомах, а также структурные параметры для нестандартных фрагментов были рассчитаны с использованием полуэмпирического гамильтониана PM3, входящего в программный пакет MOPAC 7.0 [18]. Гистаминовый и N-(6-аминогексил)-*n*-бензохинондииминовый фрагменты присоединялись к олигонуклеотидным фрагментам с использованием программы SKIFF, разработанной В. Васильевым (НИБХ СО РАН). Визуализацию структур осуществляли с помощью программы RasMol 2.6 [19]. Энергетическую оптимизацию структур проводили с использованием модуля SANDER (AMBER 4.0) до достижения RMS градиента величины 4.0×10^{-3} Å. В расчетах использовалась зависимость от расстояния диэлектрическая функция.

Для поиска оптимальной ориентации гистаминового и *n*-бензохинондииминового фрагментов была проведена симуляция конформационного поведения указанных структур методом молекулярной динамики (МД) при полной постсянной энергии. При этом в расчеты были включены

только атомы дополнительных группировок, а олигонуклеотидная часть оставалась "замороженной". Для того чтобы преодолеть достаточно высокие энергетические барьеры и исследовать по возможности более обширные области конформационного пространства, МД-симуляцию проводили при повышенной температуре (600 К). В течение 100 пс периода МД-симуляции через каждый пикосекундный интервал фиксировались координаты атомов и энергии соответствующих конформаций. Далее каждая из 100 отобранных в процессе МД структур была минимизирована по всем структурным параметрам молекулы, включая олигонуклеотидную часть, и за оптимальную принималась та из них, которой соответствовала минимальная энергия.

Авторы приносят благодарность Ю.Я. Маркушину за определение температуры плавления дуплексов, Т.М. Ивановой за наработку *N*-оксисукцинимидных эфиров 4-азидотетрафторбензойной и 2-нитро-5-азидобензойной кислот, а также Г.А. Максаковой за синтез олигонуклеотидов. Настоящая работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 96-04-48615.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Park C.S., Wu F.Y.-H., Wu C.-W. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 6950–6956.
2. Shabarova Z., Bogdanov A. // Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids/ VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokio, 1994.
3. Badashkeyeva A.G., Gall T.S., Efimova E.V., Knorre D.G., Lebedev A.V., Mysina S.D. // FEBS Lett. 1983. V. 155. P. 263–266.
4. Годовикова Т.С., Березовский М.В., Кнорре Д.Г. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 858–867.
5. Knorre D.G., Alekseyev P.V., Gerassimova Yu.V., Silnikov V.N., Maksakova G.A., Godovikova T.S. // Nucleosides & Nucleotides. 1998. V. 17. № 1–3. P. 397–410.
6. Кобец Н.Д., Горожанкин А.В., Годовикова Т.С., Сильников В.Н., Кнорре Д.Г. // Докл. РАН. 1996. Т. 349. С. 822–825.
7. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Халимская Л.М. // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. С. 475–481.
8. Годовикова Т.С., Зарытова В.Ф., Мальцева Т.В., Халимская Л.М. // Биоорганическая химия. 1989. Т. 15. С. 1246–1252.
9. Годовикова Т.С., Алексеев П.В., Кнорре Д.Г. // Докл. РАН. 1997. Т. 357. С. 259–262.
10. Лебедев А.В., Резвухин А.И. // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. С. 149–185.
11. Воробьев Ю.Н. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. С. 69–82.
12. Добриков М.И., Приходько Т.А., Сафронов И.В., Шишкин Г.В. // Сиб. хим. журн. 1992. Вып. 2. С. 18–23.

13. Godovikova T.S., Knorre V.D., Maksakova G.A., Silnikov V.N. // *Bioconjugate Chem.* 1996. V. 7. P. 343–348.
14. Грязнов С.М., Горн В.В., Зарытова В.Ф., Кумарев В.П., Левина А.С., Полещук А.С., Потанов В.К., Потемкин Г.А., Средин Ю.Г., Шабарова З.А. // *Изв. СО АН.* 1987. Вып. 2. С. 119–123.
15. Cantor C.R., Tinoko I. // *J. Mol. Biol.* 1965. V. 13. P. 65–77.
16. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids* / Ed. by T.E. Fasman. Cleveland: CRC Press, 1975. P. 589.
17. Pearlman D.A., Case D.A., Caldwell J.C., Seibel G.L., Singh U.S., Weiner P., Kollman P.A. AMBER 4.0. University of California, San Francisco, 1991.
18. Stewart J.P. // *J. Computer-Aided Molecular Design.* 1990. V. 4. P. 1–105.
19. Sayle R., Milner-White E.J. // *Trends in Biochemical Sciences (TIBS).* 1995. V. 20. P. 374.

A New Approach to the Study of the Interaction between Side Chains of Amino Acids and Aryl Azides

D. G. Knorre*, E. V. Bichenkova*, V. V. Koval'*, P. V. Alekseev,
V. D. Knorre***, E. Nordhoff****, and T. S. Godovikova*#**

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

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

***Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

****Odense University, Department of Molecular Biology, Denmark

A new approach to the study of the interaction of amino acid side chains with photoreactive aryl azides was proposed. This approach was based on the drawing together of the reacting groups by the attachment of the reacting compounds to complementary oligonucleotides. Cystamine, histamine, and 1,6-hexamethylenediamine mimicking the cystine, histidine, and lysine residues, respectively, were attached to the 3'-terminal phosphate of the oligonucleotide GGTATCp through a phosphamide bond and used as the targets for photomodification. Derivatives of the oligonucleotide pGATACCAA with the fragment $N_3C_6H_4NH-$ attached directly to its 5'-end by a phosphamide bond or through the spacer $-(CH_2)_nNH-$ (where n is 2, 4, and 6) were used as photoreagents. Their derivatives containing the same spacer and the $N_3C_6F_4CO-NH(CH_2)_3NH-$ or $2-N_3,5-NO_2-C_6H_3CO-NH(CH_2)_3NH-$ residues were also used. The duplexes were photomodified by irradiation with 300–350 nm wavelength light. The maximal yields of the photo-cross-linking were from 22 to 68%. The reagents containing *p*-azidoaniline residue were found to be the most effective toward the targets. The maximum yields of the photomodification products modeling the side chains of cysteine and lysine were found to vary from 40 to 67% and to depend on the length and the structure of the spacers used. The duplex with the target bearing the imidazole residue (the histidine model) manifested a yield decreased to 25%. This fact was in a good agreement with the data of computer modeling that indicated an unfavorable mutual displacement of the imidazole residue and the photoreactive group.

Key words: photoaffinity modification, oligonucleotide derivatives, computer-aided modeling

To whom correspondence should be addressed.