



УДК 547.963.2.04

МЕТОКСИСУЛЬФОНИЛФЕНИЛЭТИЛОВЫЕ ЭФИРЫ  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ — НОВЫЕ РЕАГЕНТЫ  
ДЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ  
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КОМПЛЕМЕНТАРНОМ КОМПЛЕКСЕ

*Гринева Н. И.*

*Новосибирский институт органической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР*

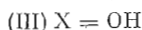
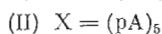
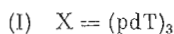
*Сайкович Е. Г.*

*Специальное конструкторско-технологическое бюро  
биологически активных веществ, Новосибирск*

Синтезированы новые производные олигонуклеотидов с метилирующей группой на 5'-конце: 2-(4-метоксисульфонилфенил)этил-5'-фосфаты дезокситритимидилата и пентааденилата. Применимость полученных эфиров для метилирования нуклеиновых кислот в комплементарном комплексе показана на примере их взаимодействия с рРНК *E. coli*.

Ферментативное метилирование нуклеиновых кислот интенсивно исследуется в связи с важной ролью этой модификации в механизмах созревания РНК [1], процессов рестрикции и клеточной дифференцировки [2]. Метилирование ДНК протекает, как предполагают, по строго определенным регуляторным участкам ДНК, структура и функция которых только начинают проявляться. Направленное метилирование избранных последовательностей в нуклеиновых кислотах, моделирующее действие специфичных метилаз и выяснение изменения функции этих последовательностей может явиться одним из подходов к исследованию механизмов регуляции. Методом специфично направленного метилирования может служить модификация нуклеиновых кислот метилирующими производными олигонуклеотидов по аналогии с работами [3, 4].

В данной работе описано получение метилирующих производных олигонуклеотидов, в основу которого положен метод, разработанный ранее для мононуклеотидов [5]. Синтезированы 5'-фосфоэфир тритимидилата (I) и пентааденилата (II), содержащие остаток 2-(4-метоксисульфонилфенил)этилового спирта (III) (таблица),

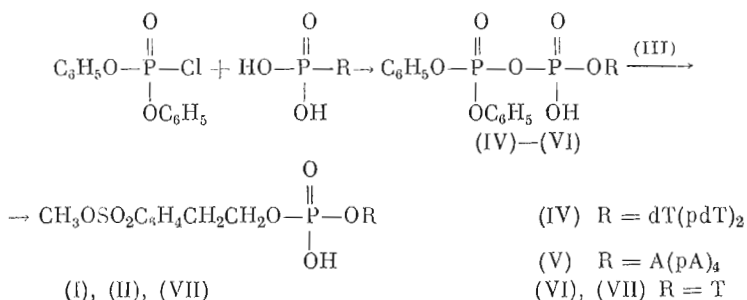


**Характеристики синтезированных производных олигонуклеотидов и исходных соединений**

Соединение	$E_f$	$R_f$ в системе			$\lambda_{\text{макс}}$ , нм (рН)	$\lambda_{\text{мин}}$ , нм (рН)
		1	2	3		
2-(4-Метоксисульфонилфенил)этил-5'-тримидилат (I)	0,72	0,50	0,15	0,32	268 (2, 6, 12)	236 (2,6); 246 (12)
2-(4-Метоксисульфонилфенил)этил-5'-пентаденилат (II)	—	1,10 *	—	—	0,76; 0,81; 0,27 **	0,42; 0,11; (6)
5'-Тримидилат	—	0,41	0,01	0,06	—	—
5'-Пентаденилат	—	0,34 *	—	—	0,82; 0,71; 0,34 **	0,29; 0,05; (6)
Метилвый эфир 4-(2-оксипентил)бензолсульфокислоты	0	0,90	0,90	0,92	224,5; 267; 274 (2, 6, 12)	250, 271 (2, 6, 12)

\* Относительно р.А. \*\* Цифры указывают соответственно  $D_{250}/D_{260}$ ,  $D_{270}/D_{260}$ ,  $D_{280}/D_{260}$ ,  $D_{290}/D_{260}$ ,  $D_{225}/D_{260}$ .

с помощью пирофосфатного метода [6, 7] по следующей схеме:



Для удобства анализа продуктов использовали соединение (III), меченное  $^{14}\text{C}$  по  $\text{CH}_3$ -группе, которое было получено действием [ $^{14}\text{C}$ ]метанола на 4-(2-трифторацетоксипентил)бензолсульфохлорид и последующим удалением трифторацетильной группы метилатом натрия. Продукт взаимодействия активированного пирофосфата пентаденилата (V) с соединением (III) после очистки гель-хроматографией на сефадексе G-25 содержит около 70% фосфоэфира (II), вычисленного из молярного отношения радиоактивного вещества к нуклеотидному материалу. Содержание нуклеотидного материала определяли спектрофотометрически после установления отсутствия в препарате непрореагировавшего спирта (III). Продукт реакции очищали пересаживанием. Пентаденилат содержал большее количество конечного диэфира (II), чем полученный в тех же условиях диэфир тримидилата (I). Это связано, по-видимому, с довольно высокой растворимостью производных тимидиловой кислоты, содержащих гидрофобные заместители, в органических растворителях, пересаживание из которых приводит к экстракции соединения (I) из осадка и обогащению суммарного продукта реакции непрореагировавшим олигонуклеотидом и производным тримидилата (I) с отщепившейся  $\text{CH}_3$ -группой. Диэфир тримидилата (I) может быть отделен от исходного нуклеотида с помощью электрофореза и хроматографии на бумаге.

Диэфир тримидилата (I) получен в виде три-*н*-октиламмониевой, а пентаденилата (II) — цетавлоновой солей. Их перевод в водорастворимые соли осложнен наличием метилирующей функции, не выдерживающей условий обработки. В связи с этим важно было синтезировать метилирующие производные сразу в виде водорастворимых солей, например

из натриевых солей активированных производных. Для выяснения этой возможности промежуточный Р<sup>1</sup>-дифенил-Р<sup>2</sup>-тимидин-5'-пирофосфат, полученный обычным способом [7] в виде цетавлоновой или триоктиламмониевой соли, обработкой NaI в ацетоне переводили в натриевую соль. Об устойчивости активированного пирофосфата рdT при такой обработке свидетельствует неизменившийся характер спектра <sup>31</sup>P-ЯМР (группа сигналов с  $\delta$  12,5 и 22,5 м.д. до обработки NaI и 10,7 и 20,7 м.д. после обработки) и превращение его в соединение (VII). Натриевая соль Р<sup>1</sup>, Р<sup>2</sup>-тимидин-5'-пирофосфата сохранялась в сухом виде не менее 20 ч. Она растворима в диметилформамиде и реагирует со спиртом (III), давая эфир нуклеотида (VII) с тем же выходом, что и триоктиламмониевая соль. Этот путь, однако, ограничен растворимостью натриевых солей дифенилпирофосфатов олигонуклеотидов в диметилформамиде.

Принципиальная применимость синтезированных соединений для комплементарно адресованного метилирования исследовалась на примере их взаимодействия с рРНК *E. coli*. В работе [8] показано, что алкилирующие 3'- и 5'-производные олигонуклеотидов, содержащие остаток 2-хлорэтиламина, в том числе производные пентааденилата, образуют достаточно стабильные комплементарные комплексы с рРНК и при 5° почти количественно алкилируют РНК в таких комплексах [9]. Одна молекула рРНК (16S+23S РНК) связывает ~30 моль такого реагента. При применении [<sup>14</sup>C]метилирующего производного пентааденилата (II) с рРНК ковалентно связалось около 70% всей радиоактивной метки, т.е. метилировалась ~21 участок в РНК.

Для проверки способности соединения (I) алкилировать РНК в комплексе мы исследовали комплексообразование (pdT)<sub>3</sub> с РНК. Раствор рРНК с (pdT)<sub>3</sub> в буфере А, выдержанный при 0° несколько часов, подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-75 при 0° и первый полимерный пик хроматографировали на сефадексе G-75 в условиях диссоциации комплексов с олигонуклеотидами [10]. В результате получили полимерный пик РНК и тритимидилат, количество которого свидетельствовало о том, что при 0° образовывался комплекс рРНК с ~25 молекулами (pdT)<sub>3</sub>. Поэтому далее реакцию рРНК с соединением (I) проводили в соотношении 1:25 при 0°. В условиях разделения продуктов реакции, описанных выше, найдено, что около 50% реагента израсходовалось на метилирование рРНК. При контрольном метилировании рРНК спиртом (III), не содержащим адресующей олигонуклеотидной группировки, в тех же условиях на метилирование рРНК расходуется менее 1% реагента; при метилировании рРНК 3500-кратным избытком соединения (III) в течение 30—40 сут при 2° реакция проходит лишь на 1,5—2%. Таким образом, эффективность метилирования реагентами, содержащими олигонуклеотидную группировку, превышает по крайней мере на 2—3 порядка эффективность метилирования реагентом, не содержащим олигонуклеотидного адреса. Это указывает на то, что метилирование происходит в комплементарном комплексе.

Полученные данные свидетельствуют о том, что синтезированные метилирующие производные 5'-олигонуклеотидов способны образовывать комплементарные комплексы с рРНК, эффективно метилировать РНК в этих комплексах и, таким образом, служить реагентами для комплементарно адресованной модификации.

### Экспериментальная часть

В работе использовали (pdT)<sub>3</sub> и (pA)<sub>3</sub>, любезно предоставленные В. Ф. Куликовой и В. К. Райтом, сефадексы G-25 и G-75 (Pharmacia, Швеция).

Нисходящую хроматографию на бумаге FN-1, FN-2, FN-4 (ГДР) вели в следующих системах растворителей: 1 — изопропанол — вода (6:4), 2 —

изопропанол — вода (8 : 2), 3 — этанол — 1 М ацетат аммония, рН 7,5 (7 : 3). Электрофорез на бумаге FN-4 проводили на приборе для горизонтального электрофореза при 3—5°, напряжении 4,9 кВ в течение 1,5 ч в 0,03 М бикарбонате триэтиламония, рН 7,5. Спектры <sup>31</sup>P-ЯМР снимали на спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-NC 12 (Bruker Physic AG, ФРГ). Радиоактивность измеряли на счетчиках Mark I и Mark II (Nuclear Chicago, США).

Использовали буферные растворы: 0,2 М NaCl, 0,01 М MgSO<sub>4</sub>, 0,01 М трис-HCl, рН 7,3 (буфер А) и 0,02 М трис-HCl, рН 7,2 (буфер Б).

[<sup>14</sup>C]Метилловый эфир 4-(2-оксиэтил)бензолсульфонокислоты (III). Раствор 0,864 г (2,72 ммоль) 4-(2-трифторацетоксиэтил)бензолсульфонокислоты, полученного по методике [5], в 1,75 мл абс. эфира добавляли по каплям в течение 1,25 ч к раствору 0,1 мл (0,079 г, 2,47 ммоль) [<sup>14</sup>C]метанола в 4 мл абс. пиридина, поддерживая температуру бани от —45 до —50°. Перемешивали еще 0,5 ч при этой же температуре, добавили каплю метилоранжа и нейтрализовали реакционную смесь охлажденным разбавленным (1 : 10 по объему) раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до слабо-розового окрашивания водного слоя. Экстрагировали 25 мл эфира, эфирный слой промывали разбавленной (1 : 10) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, водой, насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> и водой до нейтральной реакции (вода и растворы NaHCO<sub>3</sub> и H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> должны быть охлаждены до 0—5°), высушили MgSO<sub>4</sub>. Эфир удаляли в вакууме. Получали 310 мг бесцветного масла, содержащего 30% соединения (III) и 70% метилового эфира с неотщепившейся трифторацетильной группой. Для удаления трифторацетильной группы к полученному продукту добавляли 0,57 мл 1,40 н. метилата натрия в абс. метаноле и выдерживали 5 мин при 0°. Нейтрализовали 3 н. HCl по метилоранжу, экстрагировали эфиром (3×10 мл). Эфирные вытяжки промывали водой, холодным насыщенным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и снова водой до нейтральной реакции по универсальному индикатору, высушивали MgSO<sub>4</sub>, эфир отгоняли в вакууме. Получали 140 мг (26,3% в расчете на исходный [<sup>14</sup>C]метанол) бесцветного масла. Спектр ПМР полностью совпадает с таковым для нерadioактивного соединения, приведенным в работе [5]. Удельная активность 333 500 имп/мин·мкмоль.

2-(4-Метоксисульфонилфенил)этил-5'-тригимидилат (I). Раствор активированного пирофосфата, полученного из 8,76 мкмоль (рdT)<sub>3</sub> [6, 7] и 37,8 мг (175 мкмоль) соединения (III), меченного <sup>14</sup>C в 0,1 мл абс. диметилформаида, выдерживали 24 ч при 20°. Раствор выливали по каплям в эфир, осадок центрифугировали и переосадили 2 раза эфиром из абс. диметилформаида. После высушивания получали 4,4 мг желтоватого порошка, содержащего 18,4% соединения (II) (определено по соотношению мкмоль <sup>14</sup>CH<sub>3</sub>-группы/мкмоль по D<sub>260</sub>).

2-(4-Метоксисульфонилфенил)этил-5'-пентаденилат (II). К 1 мкмоль пентадениловой соли (рА)<sub>3</sub> добавляли 0,063 мл 0,035 М три-*n*-бутиламина в абс. диметилформаиде и 0,063 мл 0,030 М дифенилхлорфосфата в абс. диоксане. Через 5 ч к раствору добавляли 7 мл абс. эфира, выпавший осадок центрифугировали при 0° в герметично закрытой пробирке, эфир декантировали, осадок растворяли в 0,62 мл абс. диметилформаида и добавляли раствор 8,8 мг (40,6 мкмоль) [<sup>14</sup>C]меченого соединения (III) в 0,064 мл абс. диметилформаида. Через 17 ч раствор выливали по каплям в абс. эфир, 2 раза переосаждали абс. эфиром из абс. диметилформаида. Получали продукт, в котором на 1 мкмоль вещества по D<sub>260</sub> приходится 0,7 мкмоль <sup>14</sup>CH<sub>3</sub>-группы. Гель-хроматография продукта на сефадексе G-25 показывает наличие примеси 4-(2-оксиэтил)бензолсульфонокислоты.

Взаимодействие Na-соли P<sup>1</sup>-дифенил-P<sup>2</sup>-гимидин-5'-пирофосфата с метиловым эфиром 4-(2-оксиэтил)бензолсульфонокислоты (III) в условиях реакции анионного обмена. К 0,071 ммоль P<sup>1</sup>-дифенил-P<sup>2</sup>-гимидин-5'-пирофосфата [6, 7] приливали 2 мл 1 М NaI в абс. ацетоне, выпавший осадок

промывали 4×20 мл абс. ацетона и высушивали в вакууме. Спектр <sup>31</sup>P-ЯМР 0,31 М раствора полученного соединения в абс. диметилформамиде относительно D<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> в качестве внешнего стандарта: δ 10,7 (м), 20,7 (д) м.д.; для три-*n*-октиламмонийной соли Р<sup>1</sup>-дифенил-Р<sup>2</sup>-тимидин-5'-пирофосфата: 12,5 (м), 22,5 (д) м. д. К раствору полученной Na-соли активированного пирофосфата в 0,83 мл абс. диметилформамида добавляли 336 мг (1,556 ммоль) соединения (III). Через 17 ч раствор выливали по каплям в эфир, промывали 2×20 мл абс. эфира. Получали 81 мг порошка, содержащего 24% Na-соли 2-(4-метоксисульфонилфенил)этил-5'-тимидилата, УФ-спектр и электрофоретическая подвижность которого совпадают с соответствующими характеристиками этого соединения, полученного по [5].

**Взаимодействие рРНК с 2-(4-метоксисульфонилфенил)этил-5'-пентаденилатом (II).** Раствор, содержащий 39,2 ОЕ<sub>260</sub> (1,2 нмоль) рРНК, 2,08 ОЕ<sub>260</sub> (35,3 нмоль) пентаденилата (II) препарата, 70%-ного по содержанию <sup>14</sup>C, в 0,98 мл буфера А, выдерживали при 2° в течение 10 сут. Затем раствор нагревали и подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-75 (0,9×42 см) в буфере Б при 45°. Долю реагента, пошедшего на метилирование рРНК, определяли как процент радиоактивности, вышедшей в высокомолекулярной фракции, от суммарной радиоактивности, элюированной с колонки. Она составила 70%.

**Взаимодействие рРНК с 2-(4-метоксисульфонилфенил)этил-5'-дезокситримидилатом (I).** Раствор, содержащий 42,6 ОЕ<sub>260</sub> (1,29 нмоль) рРНК, 0,85 ОЕ<sub>260</sub> (29,9 нмоль) тритимидилата (I) (11% <sup>14</sup>C) в 1,02 мл буфера А выдержали при 2° в течение 10 сут. Далее обрабатывали, как описано выше. Доля реагента, пошедшего на метилирование рРНК, составляла 50%.

**Взаимодействие рРНК с [<sup>14</sup>C]метиловым эфиром 4-(2-оксиэтил)бензолсульфокислоты (III).** Раствор, содержащий 80 ОЕ<sub>260</sub> (2,4 нмоль) рРНК и 72 нмоль [<sup>14</sup>C]метилового эфира (III) в 2 мл буфера А, выдерживали 12 сут при 2°, затем подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-75, как описано выше. На метилирование рРНК израсходовалось менее 1% реагента.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Венкстерн Т. В. (1976) Успехи биол. хим., XVII, 3–25.
2. Ванюшин Б. Ф. (1974) Успехи соврем. биол., 77, 68–90.
3. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1974) Молекулярн. биология, 8, 832–843.
4. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Мызина С. Д., Чемасова А. Н. (1975) Биоорганическая химия, 1, 1707–1714.
5. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Сайкович Е. Г. (1975) Ж. общ. химии, 45, 449–455.
6. Савельев Е. П., Юодка Б. А., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1967) Вестн. Моск. ун-та. Сер. хим., 5, 128–136.
7. Michelson A. M. (1964) Biochim. et biophys. acta, 91, 1–13.
8. Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Шамовский Г. Г. (1974) Мол. биол., 8, 358–371.
9. Гринева Н. И., Карпова Г. Г. (1974) Мол. биол., 8, 832–843.
10. Vasilenko S. K., Ankilova M. N., Dimitrova F. F., Serbo N. A. (1972) FEBS Letters, 27, 215–218.

Поступила в редакцию  
21.VIII.1978

#### OLIGONUCLEOTIDE METHOXYSULPHONYLPHENYLETHYL ESTERS—NEW REAGENTS FOR METHYLATION OF NUCLEIC ACIDS IN COMPLEMENTARY COMPLEX

GRINEVA N. I., SAIKOVICH E. G.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk; Special Bureau for Design and Technology of Biologically Active Compounds, Novosibirsk*

New oligonucleotide derivatives containing a methylating group at the 5'-end, via 2-(4-methoxysulphonylphenyl)ethyl-5'-phosphates of deoxytrithymidylate and pentaadenylate, have been synthesized. Applicability of the title esters for nucleic acid methylation within a complementary complex has been illustrated by their reaction with *E. coli* rRNA.