



УДК 547.963.32.057:542.95

© 1992 г. Е. А. Кубарева, Е. А. Романова, Т. С. Ореукая,
Е. С. Громова, З. А. Шабарова

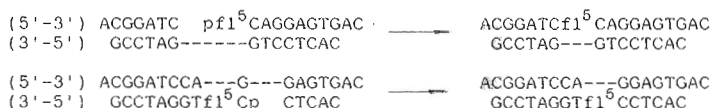
СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ
5-ФТОР-2'-ДЕЗОКСИРИБОЦИТИДИН

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет

Предметом настоящего исследования явилась разработка синтеза олигодезоксирибонуклеотидов, имеющих в своем составе 5-фтор-2'-дезоксирибоцитидин (fl^5Cyd). Такие олигонуклеотиды перспективны для изучения механизма действия цитозиновых ДНК-метилаз [1, 2].

Известна работа [3], в которой fl^5Cyd был включен в синтетический ДНК-дуплекс, содержащий участок узнавания ДНК-метилазы *Hha*I. В этом случае был осуществлен ферментативный синтез $\text{poly}(\text{fl}^5\text{CG})$. Причиной отказа от химического подхода при синтезе олигонуклеотидов с данной модификацией явилась нестабильность 5'-О-диметокситритил-N'-бензоил-5-фтор-2'-дезоксидитидина при кислотной обработке (5% дихлоруксусная кислота в хлористом метиле), используемой обычно для удаления диметокситригильной защитной группы на каждой стадии наращивания олигомерной цепи [3]. Включение сильного электроноакцепторного заместителя — атома фтора — в цитозиновое основание изменило химические свойства нуклеозида.

Нами изучена устойчивость 5'-О,N-защищенного fl^5Cyd в условиях стандартных постсинтетических обработок олигонуклеотидов. Показано, что при выдерживании 5'-О-диметокситритил-N'-бензоил-5-фтор-2'-дезоксидитидина в концентрированном аммиаке при 55°С в течение 18 ч и при последующем действии 80% водного раствора уксусной кислоты при 20°С в течение 40 мин происходит удаление защитных групп без изменения структуры фторированного нуклеозида. Вероятно, отсутствие бензоильной защиты по аминогруппе $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{fl}^5\text{Cyd}$ делает нуклеозид более устойчивым при последующей кислотной обработке. Учитывая эти результаты, мы осуществили введение fl^5Cyd на 5'-конец олигонуклеотидов в ходе их химического синтеза с сохраненной концевой диметокситригильной группой. При этом модифицированный олигонуклеотид подвергается кислотной обработке лишь после удаления щелочелabile защитных групп и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Олигонуклеотиды, содержащие fl^5Cyd внутри олигомерной цепи, получали лигированием на комплементарной матрице двух олигонуклеотидов нужной длины и состава, один из которых содержит 5'-концевой fl^5Cyd (схема).



Префикс «d» (дезокс) при обозначении дезоксирибонуклеозидов и олигодезоксирибонуклеотидов опущен; fl^5Cyd — 5-фтор-2'-дезоксирибоцитидин.

Исходным соединением для синтеза H^3Cyd явился 2'-дезоксисуридин, 3',5'-ди-О-ацетильное производное которого было обработано элементарным фтором [4]. Эта работа проводилась в лаборатории проф. Д. Цеха совместно с д-ром К.-Д. Пайном (Берлин, Гумбольдтский университет). Далее по методике [5] из 3',5'-ди-О-ацетил-5-фтордезоксисуридина получали 5-фтордезоксцитидин.

Бензоилирование экзоциклической аминогруппы H^3Cyd хлористым бензоилом с промежуточным силилированием гидроксильных групп по методике Ти [6] оказалось малоэффективным. Ацилированный нуклеозид хорошо растворим в эфире, что затрудняет его отделение от бензойной кислоты, которую обычно экстрагируют из реакционной смеси эфиром. Присутствие же бензойной кислоты в смеси вызывает деструкцию нуклеозида. Нами был изменен порядок введения защитных групп: первоначальное 5'-О-третилирование H^3Cyd по стандартной методике [6] с последующим ацилированием аминогруппы бензойным ангидридом в спирте [7]. По окончании реакции 5'-О-диметокситритил- N^3 -бензоил-5-фтордезоксцитидин экстрагировали хлороформом, при этом значительная часть бензойной кислоты в виде триэтиламмониевой соли оставалась в водной фазе.

Полученный по методике [8] 3'- N,N -диизопропиламидометилфосфит 5'-О, N -защитенного 5-фтордезоксцитидина без дополнительной очистки был введен в олигонуклеотидный синтез по стандартному регламенту получения олигодезоксирибонуклеотидов на автомате-синтезаторе Applied Biosystems 380B. В результате были синтезированы два олигонуклеотида: (5')[(MeO)₂Tr] $\text{H}^3\text{CAGGAGTGAC}$ (Ia) и (5')[(MeO)₂Tr] $\text{H}^3\text{CTGGATCCG}$ (IIa). В тех же условиях были получены все немодифицированные олигодезоксирибонуклеотиды, используемые далее для ферментативного лигирования (схема).

Олигонуклеотиды выделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, используя гидрофобные свойства 5'-О-диметокситригильной группы [9], и затем детретилировали. Нуклеозидный состав соединений $\text{H}^3\text{CAGGAGTGAC}$ (I) и $\text{H}^3\text{CTGGATCCG}$ (II) доказывали исчерпывающим гидролизом смесью фосфодиэстеразы змеиного яда и фосфомоноэстеразы в течение 3 ч при 37° С с последующим анализом гидролизата ВЭЖХ и сравнением с контрольной смесью нуклеозидов [10].

С помощью T_4 -полинуклеотидкиназы проведено 5'-фосфорилирование и $5'\text{-}^{32}\text{P}$ -мечение олигонуклеотидов (I) и (II) и не обнаружено изменения эффективности работы фермента.

Соединения $\text{ACGGATCCT}^3\text{CAGGAGTGAC}$ (III) и $\text{CACTCT}^3\text{CTGGATCCG}$ (IV), содержащие H^3Cyd внутри цепи, получали ферментативным лигированием с помощью T_4 -ДНК-лигазы из соответствующих олигонуклеотидов на комплементарной матрице (схема) в стандартных условиях [10].

Первичную структуру синтезируемых олигонуклеотидов (III) и (IV) и исходных соединений (I) и (II) подтверждали методом химической деградации нуклеиновых оснований [11]. Влияние сильного электроноакцепторного заместителя в H^3Cyd проявляется в реакции с перманганатом калия.

Таким образом, нами показано, что олигонуклеотиды, содержащие H^3Cyd в середине цепи, достаточно просто и эффективно получают комбинацией химического и ферментативного синтеза. Таким путем можно получать олигонуклеотиды не только с единичным включением остатка H^3Cyd , но и с несколькими остатками H^3Cyd , отстоящими друг от друга на 6–7 нуклеотидных звеньев, если проводить лигирование нескольких олигонуклеотидов с 5'-концевыми H^3Cyd .

Авторы выражают благодарность В. Н. Сергееву, В. Н. Ташлицкому и Г. Я. Шефлян за помощь при выделении и анализе олигонуклеотидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Santi D. V., Garrett C. E., Barr P. J.* // *Cell*. 1983. V. 33. № 1. P. 9-10.
2. *Santi D. V., Wataya Y., Matsuda A.* // *Enzyme-activated Irreversible Inhibitors* / Eds Seiler N., Jung M. J., Koch-Weser J. Amsterdam - New York - Oxford: Elsevier - North-Holland Biomedical Press, 1978. P. 291-303.
3. *Osterman D. G., DePillis G. D., Wu J. C., Matsuda A., Santi D. V.* // *Biochemistry*. 1988. V. 27. № 14. P. 5204-5210.
4. *Cech D., Meinert H., Etzolt G., Langen P.* // *J. Prakt. Chem.* 1973. B. 315. S. 149-153.
5. *Krug A., Schmidt S., Lekschas J., Lemke K., Cech D.* // *J. Prakt. Chem.* 1989. B. 331. S. 835-842.
6. *Jones R. A.* // *Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach* / Ed. Gait M. J. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1984. P. 23, 24.
7. *Schaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1963. V. 85. № 10. P. 3821-3827.
8. *Barone A. D., Tang I. Y., Caruthers M. H.* // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. № 10. P. 4051-4061.
9. *Шмидт С., Кузнецова Л. Г., Романова Е. А., Нимани А., Орецкая Т. С., Крынецкая Н. Ф., Метелев В. Г., Шабарова З. А.* // *Биоорг. химия*. 1991. Т. 17. № 6. С. 823-830.
10. *Кузнецова С. А., Кубарева Е. А., Орецкая Т. С., Долиная Н. Г., Крынецкая Н. Ф., Громова Е. С., Шабарова З. А., Цех Д.* // *Биополимеры и клетка*. 1987. Т. 3. № 6. С. 283-289.
11. *Rosenthal A., Schubert F., Cech D., Orezkaja T. S., Kusnezova S. A., Shabarova Z. A.* // *Biomed. and biochim. acta*. 1985. V. 44. № 10. P. 75-83.

Поступила в редакцию
20.XI.1991
После доработки
24.I.1992

E. A. KUBAREVA, E. A. ROMANOVA, T. S. ORETSKAYA,
E. S. GROMOVA, Z. A. SHABAROVA

**SYNTHESIS OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES CONTAINING
5-FLUORO-2'-DEOXYCYTIDINE**

Chemical Department, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

A synthesis of the phosphoroamidite derivative of 5-fluoro-2'-deoxycytidine which allows one to introduce the modified nucleoside residue into the 5'-position of the oligodeoxyribonucleotide by the standard solid phase phosphoroamidite method, has been carried out. Oligonucleotides with 5-fluoro-2'-deoxycytidine residues in various positions of the DNA strand are obtained by the combination of chemical and enzymatic syntheses.