



УДК 547.963.32.057

СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ,  
СОДЕРЖАЩИХ N<sup>4</sup>-МЕТИЛЦИТОЗИН*Пятраускаене Л. Ю., Климашаускас С. Й., Буткус В. В.,  
Янулайтис А. А.**Научно-производственное объединение «Фермент», Вильнюс*

Фосфотриэфирным методом в растворе синтезировано семь гомологичных додекадезоксинуклеотидов, содержащих в разных положениях участка CCCGGG, являющегося сайтом ряда эндонуклеаз рестрикции, метилированные основания 5-метилцитозин и N<sup>4</sup>-метилцитозин. Описан быстрый и простой способ получения из дезоксиуридина N<sup>4</sup>-метилдезоксипитидина и его полностью защищенного мононуклеотида, пригодного для фосфотриэфирного синтеза олигонуклеотидов.

Синтетические олигонуклеотиды, содержащие метилированные основания, широко используются как модельные субстраты для изучения структуры ДНК [1–3] и исследования механизма действия ферментов нуклеинового обмена [4–6].

Недавно в нашей лаборатории было установлено, что в ДНК микроорганизмов содержится необычное метилированное основание — N<sup>4</sup>-метилцитозин, а также выделены ферменты, с участием которых образуется это минорное основание [7, 8]. Широкое распространение такого типа метилирования цитозина в бактериальных ДНК было затем подтверждено другими исследователями [9]. Дальнейшие исследования в этой области привели к обнаружению метилаз, которые модифицируют один и тот же остаток цитозина в идентичных (или перекрывающихся) нуклеотидных последовательностях, причем в одном случае образуют 5-метилцитозин (m<sup>5</sup>C), а в другом — N<sup>4</sup>-метилцитозин (m<sup>4</sup>C). Было установлено, что соответствующие этим метилазам рестриктазы чувствительны к замене одного метилированного цитозина на другой [10]. Для более детального изучения взаимодействия ферментов рестрикции и модификации с субстратами, содержащими m<sup>4</sup>C и m<sup>5</sup>C, удобными модельными соединениями представляются синтетические олигонуклеотиды, содержащие эти модифицированные основания. В настоящей работе описан синтез самокомплементарных олигодезоксинуклеотидов, содержащих как m<sup>5</sup>C, так и m<sup>4</sup>C в разных положениях последовательности CCCGGG.

Для синтеза олигонуклеотидов модифицированным фосфотриэфирным методом [11] требуются соответствующим образом подготовленные полностью блокированные мононуклеотиды. Введение защитных групп в 5-метилдезоксипитидин в основном не отличается от блокирования дезоксицитидина, и синтез олигонуклеотидов, содержащих это метилированное основание, описан в ряде работ [12, 13]. Необходимой предпосылкой синтеза олигонуклеотидов, содержащих N<sup>4</sup>-метилцитозин, было препаративное получение соответствующего дезоксицитонозида.

Известно несколько методов синтеза метилированных производных дезоксицитидина, в основе которых лежит замещение 4-оксогруппы дезоксиуридина или тимидина на тио-, метилтио-, сульфо- или силилокси-группы [14–17] с последующей нуклеофильной атакой соответствующим амином. Общим недостатком этих методов являются жесткость условий и продолжительность реакций. В более мягких условиях можно провести

В работе использовались следующие нестандартные сокращения: TPSTe — 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилтетразол, Trt — триазолил, DMAp — 4-диметиламинопиридин, (MeO)<sub>2</sub>Tg — диметокситригил, An — анизол, VPDE — фосфодиэстераза змеиного яда. Префикс d (дезокс) для краткости всюду опущен.

Стабильность защищенных производных дезоксицитидина в присутствии реагентов фосфотриэфирного синтеза олигонуклеотидов (содержание продуктов превращения в %) \*

Соединение	<i>n</i> -Хлорфенилфос- фобис-триазолид	Et <sub>3</sub> N — Р <sub>у</sub> — Н <sub>2</sub> O, 1 : 3 : 1	5% ССl <sub>3</sub> СООН в СН <sub>2</sub> Сl <sub>2</sub>	TPSTe
А	0	0	0	90%
Б	0	0	5%	0
В	0	0	Следы	Следы
Г	0	0	0	5%

\* Данные ТСХ на силикагеле (СНCl<sub>3</sub>—МеОН, 7: 1). Время реакции 24 ч при 20° С. А — 3',5'-добензоил-N<sup>4</sup>-метилдезоксцитидин; Б — 3',5',N<sup>4</sup>-трибензоил-N<sup>4</sup>-метилдезоксцитидин; В — 3',5'-добензоил-N<sup>4</sup>-анизол-N<sup>4</sup>-метилдезоксцитидин; Г — 3',5',N<sup>4</sup>-трибензоилдезоксцитидин.

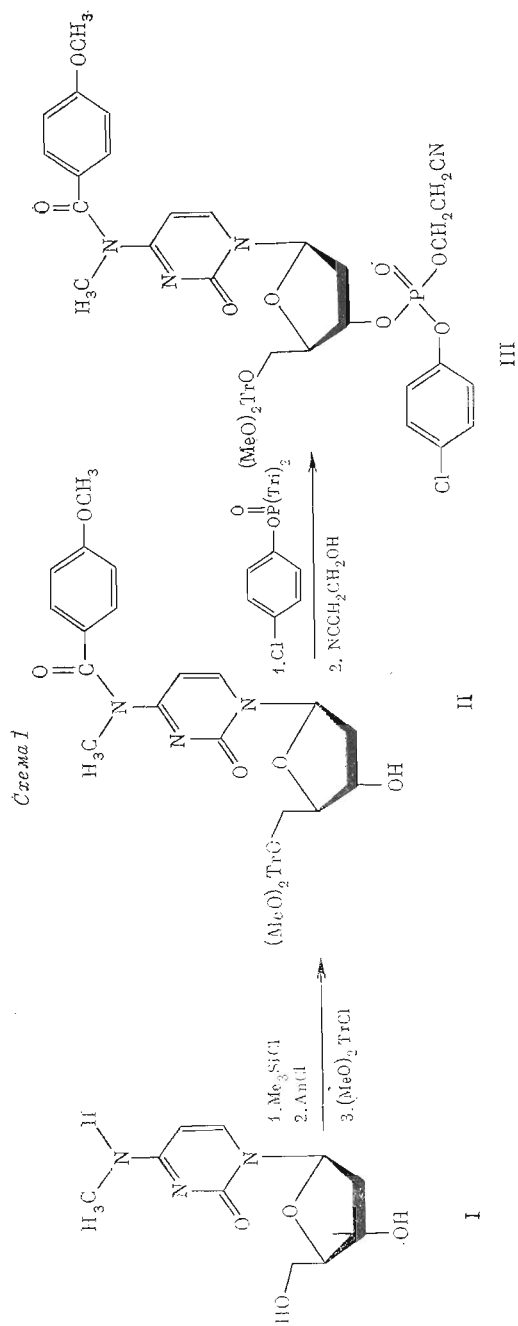
превращение карбонила в С-азолидную группировку с применением арилсульфазолидов [18] или реагентов, образующихся из триазола и *n*-хлорфенилдихлорфосфата [19] или POCl<sub>3</sub> [20, 21]. На основе такой модификации Сангом был предложен более простой метод синтеза 5-метилдезоксцитидина [22].

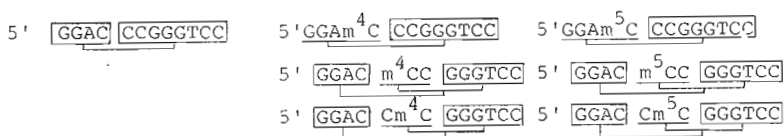
Мы предлагаем усовершенствование процедуры Санга, позволяющее в значительной степени упростить условия реакции. Для осуществления превращения мы использовали смесь POCl<sub>3</sub> и 4-диметиламинопиридина в дихлорэтано. Образовавшийся промежуточный активный интермедиат без выделения из реакционной смеси обрабатывали метиламином \*. В результате из 3',5'-добензоилдеоксиуридина в течение 3 ч получается N<sup>4</sup>-метилдезоксцитидин (I) с выходом не менее 90%.

Для получения полностью защищенного нуклеотида, N<sup>4</sup>-метилцитозина, необходимо защитить вторичную аминогруппу, способную реагировать с конденсирующим реагентом, TPSTe (см. таблицу). Оказалось, что как бензойная, так и анизольная группы вполне пригодны для блокирования этого гетероциклического основания. Защищенный таким образом нуклеозид практически не взаимодействует с обычными реагентами фосфотриэфирного синтеза (см. таблицу), в то время как обе защитные группы легко удаляются в ходе аммонолиза. Обе они, однако, оказались неустойчивыми в условиях щелочного гидролиза, которые часто применяются для селективного отщепления 3'- и 5'-ароильных защитных групп [23]: даже под действием очень слабых щелочей наряду с расщеплением сложноэфирных групп отщеплялась также N-защитная группа гетероциклического основания. Проблема легко решается блокированием гидроксильных дезоксирибозы триметилсилильными группами [24]. N<sup>4</sup>-Анизол-N<sup>4</sup>-метилдезоксцитидин был получен при взаимодействии 3',5'-силильного производного нуклеозида с анизолхлоридом; силильные группы удаляли действием водного пиридина. N-Защищенный нуклеозид без дополнительной очистки 5'-третиловали 4,4'-диметилхлоритрилхлоридом и третилованное производное (II) выделяли хроматографией на силикагеле. Полностью защищенный мононуклеотид (III), как и неметилированные мажорные мононуклеотиды, были синтезированы по стандартному методу фосфорилирования (II) (схема 1).

Подготовленный таким образом мононуклеотид (III) был использован в синтезе полностью защищенных динуклеотидов, которые в дальнейшем служили блоками при получении более длинных олигонуклеотидов. Синтез такого набора гомологичных олигонуклеотидов значительно упростился благодаря неоднократному использованию больших перекрывающихся

\* При образовании активного интермедиата можно наблюдать две стадии (данные ТСХ). Вероятно, вначале происходит фосфорилирование гетероциклического основания, которое далее превращается в активное диметиламинопиридиновое производное нуклеозида. Такое производное значительно активнее соответствующих азолидов нуклеозидов и хорошо реагирует с другими нуклеофильными реагентами (аминами, азолидами, метанолом, водной щелочью), образуя соответствующие производные нуклеозидов. С использованием новой методики исходя из тимидина были синтезированы 5-метилдезоксцитидин и N<sup>4</sup>, 5-диметилдезоксцитидин с общим выходом соответственно 80 и 85% (данные не приведены).





Для создания межнуклеотидных связей в качестве конденсирующего реагента использовали TPSTe. Защитные группы после завершения синтеза удаляли действием оксимата [25] и 80% уксусной кислоты. Деблокированные олигонуклеотиды очищали анионообменной хроматографией на DEAE-Toyopearl, затем обращенно-фазовой ВЭЖХ. Первичную структуру синтезированных соединений доказывали методом нуклеотидных карт [26]. Кривые хроматографического выделения и определение первичной структуры одного из олигонуклеотидов, содержащих  $m^4C$ , представлены на рис. 1. Нуклеотидный состав каждого из олигонуклеотидов определяли обращенно-фазовой ВЭЖХ после гидролиза VPDE и дефосфорилирования щелочной фосфатазой (рис. 2).

Синтезированные олигонуклеотиды будут использованы для изучения чувствительности ферментов рестрикции и модификации к метилированным субстратам.

### Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксинуклеозиды (Sigma), 4,4'-диметокситригилхлорид, (1-*H*)-1,2,4-триазол, 3-гидроксипропионитрил, 4-диметиламинопиридин (Fluka), пластинки Kieselgel 60F254 и силикагель для колоночной хроматографии (Merck), DEAE-Toyopearl 650 M (Toyo-Soda), VPDE, щелочную фосфатазу (Serva). Для обращенно-фазовой хроматографии использовали градиентный хроматограф Gilson, снабженный системой обработки хроматографических данных на базе микрокомпьютера Apple IIe, и аналитическую колонку Nucleosil C-8 (5 мкм) (Alltech). Полностью защищенные нуклеотиды, 3',5'-добензоиллированные дезоксинуклеозиды и TPSTe синтезировали по описанному методу [11].

*N*<sup>4</sup>-Метилдезоксцитидин (I). К 10 ммоль 3',5'-добензоилдезоксидеоксиуридина, высушенного упариванием с абс. пиридином и растворенного в 50 мл абс. дихлорэтана, прибавляли 30 ммоль POCl<sub>3</sub>, 90 ммоль триэтиламина, 12 ммоль DMAP и выдерживали 15 мин при 20° С до образования полярного промежуточного соединения (ТСХ на силикагеле в СНCl<sub>3</sub> — MeOH, 9:1 (A)). Реакционную смесь концентрировали, прибавляли 0,8 мл 40% метиламина в 30 мл диоксана, через 20 мин еще раз концентрировали, растворяли в 30 мл хлороформа, дважды промывали 0,01 М HCl, высушивали Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и хроматографировали на колонке с силикагелем в линейном градиенте концентрации метанола (0—6%) в хлороформе. Бензойльные группы удаляли обработкой конц. аммиаком 1 ч при 60° С. Аммиак упаривали, водный раствор промывали хлороформом (для удаления бензамида), концентрировали и остаток перекристаллизовывали из метанола. Выход 90%, т. пл. 191—192° С.

*N*<sup>4</sup> - Анизоил-*N*<sup>4</sup>-метил-5'-*O* - диметокситригилдезоксцитидин (II). К 5 ммоль *N*<sup>4</sup>-метилдезоксцитидина (I), высушенного упариванием с пиридином и растворенного в 20 мл абс. пиридина, прибавляли 50 ммоль свежеперегнанного триметилхлорсилана и при периодическом встряхивании выдерживали 30—45 мин, затем прибавляли 25 ммоль анизоилхлорида и оставляли на 2 ч при 20° С. Реакционную смесь обрабатывали 20 мл водного пиридина (1:1) в течение 20 мин, после чего упаривали почти досуха и остаток высушивали упариванием с абс. пиридином. Выпавший осадок отфильтровывали, к раствору прибавляли 7,5 ммоль 4,4'-диметокситригилхлорида, 0,1 ммоль DMAP и выдерживали 1,5 ч при 20° С. По окончании реакции (ТСХ на силикагеле в (A)) реакционную смесь обрабатывали обычным способом и хроматографировали на колонке

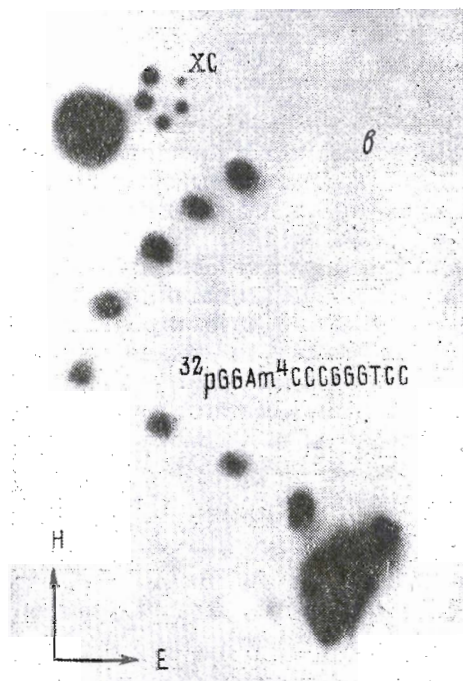
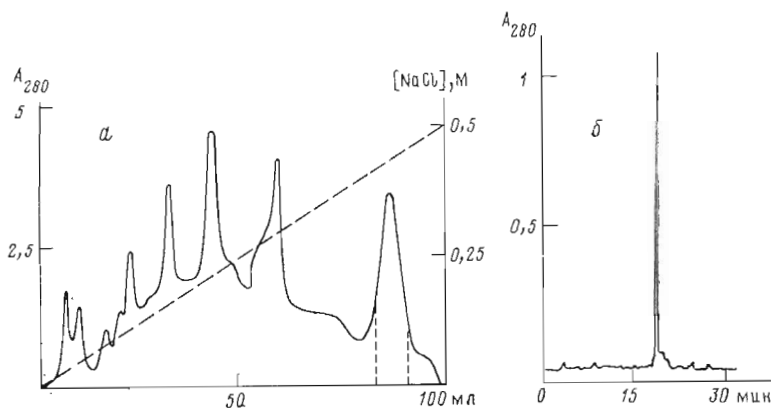


Рис. 1. Выделение, очистка и доказательство структуры додекануклеотида 5'GGAm<sup>4</sup>CCCGGGTCC. а — хроматография на колонке DEAE-Toyopearl (9×2 см) в линейном градиенте NaCl (0–0,5 М) в 7 М мочеvine, 0,01 М трис-НСl (рН 7,4), общий объем элюента 200 мл, скорость элюции 0,8 мл/мин; б — обращенно-фазовая ВЭЖХ на колонке Nucleosil C-8 (25×0,46 см) в линейном градиенте метанола (0–40%) в 25 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, рН 5,3, скорость элюции 1,2 мл/мин; в — нуклеотидная карта; направление Е — электрофорез в пиридин-ацетатном буфере (рН 3,5), направление Н — гомохроматография в гомосмеси VI [26]

с свлякателем в линейном градиенте концентрации метанола (0–4%) в хлороформе. Выход 78%. Найдено, %: С 69,20, Н 5,68. С<sub>34</sub>Н<sub>33</sub>Н<sub>3</sub>О<sub>7</sub>. Вычислено, %: С 69,12, Н 5,80.

*N*<sup>4</sup>-Анизоил-*N*<sup>4</sup>-метил-5'-*O*-диметокситритилдезоксцитидин-3'-(*n*-хлорфенил-β-цианэтил)фосфат (III). Фосфорилирование проводили по стандартной методике [11]. Выход продукта (III) составил 83%. Найдено, %: С 62,70, Н 5,08, Cl 4,00. С<sub>42</sub>Н<sub>42</sub>Н<sub>3</sub>О<sub>11</sub>РCl. Вычислено, %: С 62,57, Н 5,03, Cl 3,85.

*Синтез олигонуклеотидов.* Тритильную группу в ходе синтеза удаляли действием 5% СCl<sub>3</sub>COOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> в течение 1 мин при 20° С, цианэтильные — действием смеси Ru—Et<sub>3</sub>N—H<sub>2</sub>O, 3:1:1, в течение 25 мин при 20° С [27]. Межнуклеотидные конденсации проводили в пиридине. Целе-

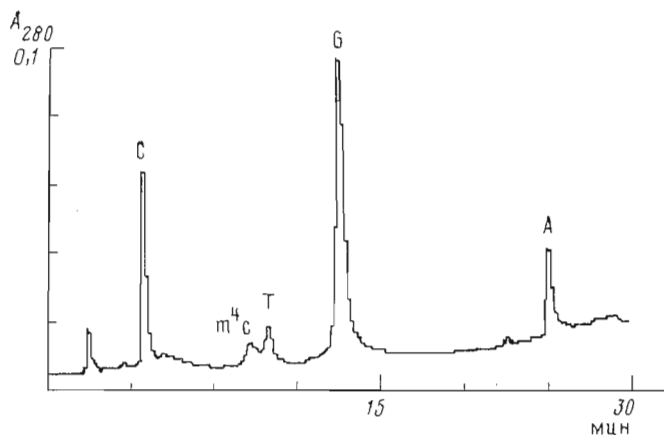


Рис. 2. Определение состава додекануклеотида 5'GGAm<sup>4</sup>CCCGGGTCC после его гидролиза до дезоксирибонуклеозидов. Обращенно-фазовая ВЭЖХ на колонке Nucleosil C-8 (25×0,46 см) в 25 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> (рН 4,4) с 0,6% ацетонитрила (10 мин), затем в градиенте ацетонитрила до 30% (20 мин). Скорость элюции 1,2 мл/мин

вые олигонуклеотиды деблокировали действием 0,3 М раствора 4-нитробензальдоксима и 1,1,3,3-тетраметилгуанидина в водном диоксане (1:1) в течение 16 ч при 20° С [25], затем выдерживали 12 ч при 50° С с 30% водн. NH<sub>3</sub> (*d* 0,88) и после упаривания детритилировали 80% уксусной кислотой (30 мин при 20° С).

**Выделение и анализ олигонуклеотидов.** Деблокированные олигонуклеотиды очищали анионообменной хроматографией на колонке с DEAE-Toyorearl (рис. 1а). Выделенные додекануклеотиды дополнительно очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Nucleosil C-8 (рис. 1б). Выход целевых олигонуклеотидов 3–4%.

Определение нуклеотидного состава каждого из олигонуклеотидов проводили следующим образом: к 100 мкл раствора, содержащего 30 мМ трис-НСl (рН 8,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0,1 ОЕ<sub>260</sub> исследуемого олигонуклеотида, добавляли 1 мкг ДНКазы I, 3 мкг VPDE и 2 мкг бактериальной щелочной фосфатазы и выдерживали 3 ч при 37° С. Гидролизат анализировали обращенно-фазовой ВЭЖХ, элюируя 25 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> (рН 4,4) с добавкой 0,6% ацетонитрила в течение 10 мин, затем еще 20 мин градиентной элюцией, увеличивая концентрацию ацетонитрила до 30%.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. van Lier J. J. C., Smits M. T., Buck H. M. Eur. J. Biochem., 1983, v. 132, № 1, p. 55–62.
2. Tran-Dinh S., Taboury J., Neumann J. H., Huynh-Dinh T., Genissel B., Gouyette C., Igoien J. FEBS Lett., 1983, v. 154, № 2, p. 407–410.
3. Wang A. H.-J., Hakoshima T., van der Marel G., van Boom J. A., Rich A. Cell, 1984, v. 37, № 1, p. 321–331.
4. Ono A., Sato H., Ohtani Y., Ueda T. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 23, p. 8939–8949.
5. Ohtsuka K., Morisawa H., Ikehara M. Chem. Pharm. Bull., 1982, v. 30, № 3, p. 874–880.
6. Rosenthal A., Cech D., Veiko V. P., Orezkaja T. S., Romanova E. A., Elov A. A., Metelev V. G., Gromova E. S., Shabarova Z. A. Tetrahedron Lett., 1984, v. 25, № 39, p. 4353–4356.
7. Janulaitis A., Klimašauskas S., Petrušytė M., Butkus V. FEBS Lett., 1983, v. 161, № 1, p. 131–134.
8. Янулайтис А., Стакенас П., Пятрушице М., Биргинайре Ю., Климашаускас С., Буткус В. Молекуляр. биология, 1984, т. 18, № 1, с. 115–129.
9. Ehrlich M., Cama-Sosa M. A., Carreira L., Jungdahl L. H., Kuo K. C., Gehrke W. Nucl. Acids Res., 1985, v. 13, № 4, p. 1399–1413.
10. Butkus V., Klimašauskas S., Keršulytė D., Vaitkevičius D., Lebionka A., Janulaitis A. Nucl. Acids Res., 1985, v. 13, № 16, p. 5727–5746.
11. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353–371.
12. van der Marel G. A., Wille G., Westerink H., Wang A. H.-J., Rich A., Mellema J. R., Altona A., van Boom J. H. J. Royol Netherland Chem. Soc., 1982, v. 101, № 3, p. 77–78.

13. *Behe M., Felsenfeld G.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 3, p. 1619–1623.
14. *Fox J. J., van Praag D., Wempen I., Doerr I. L., Cheong L., Knoll J. E., Fidinoff M. L., Bendich A., Brown G. B.* J. Amer. Chem. Soc., 1959, v. 81, № 1, p. 178–187.
15. *Watanabe K., Miura K., Saneyoshi M., Ueda T.* J. Carbohydr., Nucleosides, Nucleotides, 1979, v. 6, № 3, p. 278–294.
16. *Wempen I., Miller N., Falco E. A., Fox J. J.* J. Amer. Chem. Soc., 1967, v. 143, № 1, p. 144–148.
17. *Vorbungen H., Niedhalla U.* Angew. Chem., 1971, v. 83, № 17/18, p. 729–731.
18. *Reese C. B., Ubasawa A.* Tetrahedron Lett., 1980, v. 21, № 23, p. 2265–2268.
19. *Sung W. L.* Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 22, p. 6139–6151.
20. *Divakar K. J., Reese C. B.* J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1982, v. 1, p. 1171–1178.
21. *Reese C. B., Skone P. A.* J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1984, v. 4, p. 1263–1271.
22. *Sung W. L.* J. Chem. Soc. Chem. Commun, 1981, № 20, p. 1089–1090.
23. *Schaller H., Khorana H. G., Weinmann G., Lerch B.* J. Amer. Chem. Soc., 1963, v. 85, № 23, p. 3821–3827.
24. *Ti S. G., Gaffney B. L., Jones R. A.* J. Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 5, p. 1316–1319.
25. *Reese C. B., Titmas R. C., Yau L.* Tetrahedron Lett., 1980, v. 8, № 30, p. 2727–2730.
26. *Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R.* Nucl. Acids Res., 1974, v. 1, № 3, p. 331–353.
27. *Crea R., Kraszewski A., Hirose T., Itakura K.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 12, p. 5765–5769.

Поступила в редакцию  
25.III.1986

## SYNTHESIS OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDES CONTAINING N<sup>4</sup>-METHYLCYTOSINE

PETRAUSKIENĖ L. J., KLIMAŠAUSKAS S. J., BUTKUS V. V.,  
JANULAITIS A. A.

*ESP «Fermentas», Vilnius*

With deoxyuridine as starting material, N<sup>4</sup>-methyldeoxycytidine and its fully protected mononucleotide, suitable for oligonucleotide synthesis, have been prepared. By means of the phosphotriester approach, the fully protected mononucleotide was used for the synthesis of seven dodecadeoxynucleotides containing either m<sup>4</sup>C or m<sup>5</sup>C in various positions of the CCCGGG sequence, the recognition site of some restriction endonucleases.