

Fritz Eckstein

Oligodesoxynucleotide mit endständiger 5'-Phosphatgruppe^{1,2)}

Aus dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Chemische Abteilung, Göttingen
(Eingegangen am 18. Januar 1967)

Die schrittweise chemische Synthese von einigen Oligodesoxynucleotiden mit endständiger 5'-Phosphatgruppe wie pTpTpTpT³⁾, pTpTpTpC und pCpTpT, ausgehend von Desoxynucleosid-5'-phosphorsäure-[β,β,β -trichlor-äthylestern], wird beschrieben.

Nach *Khorana* und Mitarbb.⁴⁾ können synthetische Oligodesoxynucleotide als Starter bzw. Matrizen sowohl für DNA-abhängige DNA-Polymerase als auch für DNA-abhängige RNA-Polymerase dienen. Solche Oligodesoxynucleotide können enzymatisch oder chemisch dargestellt werden⁵⁾.

Die in der vorangehenden Arbeit⁶⁾ beschriebenen Eigenschaften der β,β,β -Trichlor-äthylester von Desoxynucleotiden ließen vermuten, daß diese Verbindungen zur Synthese von Oligodesoxynucleotiden mit einer 5'-Phosphatgruppe geeignet sein würden. Wir synthetisierten dazu einige Oligodesoxynucleotide mit einer durch β,β,β -Trichlor-äthanol geschützten Phosphatgruppe und spalteten diese Gruppe anschließend mit Zn/Cu ab.

Die Synthese von nur aus Thymidylsäure bestehenden Oligonucleotiden gestaltet sich in Anlehnung an *Khorana*⁷⁾ recht einfach. 2'-Desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure-[β,β,β -trichlor-äthylester]⁶⁾ (**4a**) wird mit 3'-O-Acetyl-2'-desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure in Pyridin unter Verwendung von DCCD oder Triisopropylbenzolsulfonylchlorid⁸⁾ kondensiert. Das nach Abspaltung der Acetylgruppe mit Ammoniak und Trennung auf einer DEAE-Cellulosesäule in 52-proz. Ausbeute anfallende 5'-O-[β,β,β -Trichlor-äthylphosphoryl]-desoxythymidylyl-(3'→5')-desoxythymidin (**1a**) kann man auf die gleiche Art wieder mit 3'-O-Acetyl-2'-desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure kondensieren und gelangt so zum phosphatgeschützten Tri- und weiter zum

1) Vorläufige Mitteil.: F. Eckstein, *Angew. Chem.* **78**, 682 (1966); *Angew. Chem. internat. Edit.* **5**, 671 (1966).

2) 9. Mitteil. in der Reihe Synthese von Oligo- und Polynucleotiden; 8. Mitteil.: H. J. Rhaese, W. Stehr und F. Cramer, *Liebigs Ann. Chem.* **703**, 215 (1967).

3) Die verwendeten Abkürzungen für Nucleotide sind erläutert bei E. Ohtsuka, M. W. Moon und H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 2956 (1965).

4) C. Byrd, E. Ohtsuka, M. W. Moon und H. G. Khorana, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **52**, 1494 (1964).

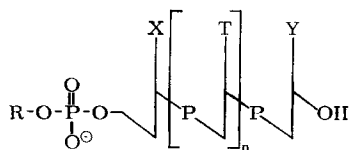
5) Für eine ausführliche Diskussion s. F. Cramer, *Angew. Chem.* **78**, 186 (1966); *Angew. Chem. internat. Edit.* **5**, 173 (1966).

6) F. Eckstein, *Chem. Ber.* **100**, 2228 (1967), vorstehend.

7) T. M. Jacob und H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 368 (1965): Darstellung von Oligothymidylsäuren mit einer durch die Tritylgruppe geschützten 5'-OH-Gruppe.

8) R. Lohrmann und H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **88**, 829 (1966).

Tetranucleotid. Obwohl noch keine näheren Untersuchungen über die Abhängigkeit der Ausbeute vom verwendeten Überschuß an Mononucleotid vorliegen, haben wir in Anlehnung an *Khorana* mit steigender Kettengliederzahl diesen Überschuß vergrößert.



X = Thyminyl-

Y = Cytosyl-

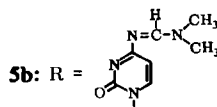
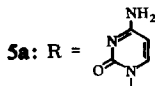
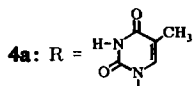
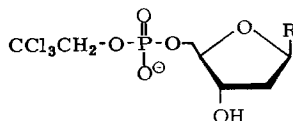
	R	n
2a	CCl ₃ CH ₂	0
2b	CCl ₃ CH ₂	1
2c	CCl ₃ CH ₂	2
2d	H	0
2e	H	1
2f	H	2

	R	n
X = Y = Thyminyl- 1a	CCl ₃ CH ₂	0
1b	CCl ₃ CH ₂	1
1c	CCl ₃ CH ₂	2
1d	H	0
1e	H	1
1f	H	2

X = Cytosyl-

Y = Thyminyl-

3a	CCl ₃ CH ₂	0
3b	CCl ₃ CH ₂	1
3c	H	0
3d	H	1



An Stelle der 3'-O-Acetyl-2'-desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure haben wir in einigen Fällen 3'-O-N⁶-Diacetyl-2'-desoxy-cytidin-5'-phosphorsäure verwendet, um zu Oligonucleotiden mit 3'-terminalem Cytidin zu gelangen. Die NH₂-Gruppe des Cytidins muß vor der Kondensation mit den Mononucleotiden geschützt werden, ebenso die NH₂-Gruppe bei allen mit Cytidin beginnenden Oligonucleotiden. Wir haben dazu 2'-Desoxy-cytidin-5'-phosphorsäure-[β,β,β-trichlor-äthylester]⁶⁾ (**5a**) bzw. das Cytidin enthaltende Dinucleotid **3a** nach *Žemlička et al.*⁹⁾ in Dimethylformamid mit Dimethylformamid-dimethylacetal umgesetzt und anschließend mit 3'-O-Acetyl-2'-desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure, wie oben beschrieben, kondensiert. Nach Behandlung mit Ammoniak wurde an einer DEAE-Cellulosesäule chromatographiert. Man erhält so **3a** bzw. **3b** in ca. 45-proz. Ausbeute.

Die Ausbeute an **3a** bei der Kondensation von **5b** (aus **5a**) mit 3'-O-Acetyl-2'-desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure unter Verwendung von Triisopropylbenzolsulfonylchlorid ist von der

⁹⁾ *J. Žemlička, S. Chládeck, A. Holý und J. Smrt*, Collect. czechoslov. chem. Commun. **31**, 3198 (1966), und dort aufgeführte Zitate.

Menge des Kondensationsmittels abhängig. Mit 2.0 Äquiv. Kondensationsmittel beträgt die Ausbeute an **3a** 25%, bei 2.75 Äquiv. 40% und bei 4.0 Äquiv. 44%. Behandelt man **5b** [λ_{\max} (Methanol) = 315 m μ] in Pyridin 6 Std. mit Triisopropylbenzolsulfonylchlorid, so verschiebt sich das UV-Maximum [λ_{\max} (Methanol) = 325 m μ , Schulter bei 335 m μ]. Wir nehmen an, daß sich das Sulfonylchlorid unter Bildung eines Amidinium-Ions an **5b** anlagert. Nach Behandlung mit konz. Ammoniak (5 Std.) erhält man das UV-Spektrum des Cytidins zurück.

In Tab. 1 sind die Ergebnisse der Kondensationsreaktionen zusammengefaßt.

Tab. 1. Ausbeuten bei der Umsetzung von Nucleotiden bzw. Oligonucleotiden mit 3'-acetylierten Mononucleotiden

Oligonucleotid-Komponente (Menge ^{a)})	3'-Acetyliertes Mononucleotid (Menge ^{a)})	Äquiv.	Produkt	Ausb. OD ^{a)}	% ^{b)}	λ_{\max} (Methanol)
1a { (3900) (0.21 mMol) ^{d)}	dTMP { (4400) (0.46 mMol)	2.4	1b	3290	56	267
1b { (1285) (0.047 mMol) ^{d)}	dTMP { (1060) (0.11 mMol)	2.3	1c	688	40	267
4a { (4250) (0.44 mMol)	dCMP { (4000) (0.44 mMol)	1.0	2a	3450	42	269
1a { (2950) (0.16 mMol) ^{d)}	dCMP { (3000) (0.33 mMol)	2.05	2b	1752	40	268
1b { (800) (0.030 mMol) ^{d)}	dCMP { (1500) (0.16 mMol)	5.6	2c	460	43	268
5a { (4500) (0.49 mMol)	dTMP { (4900) (0.51 mMol)	1.04	3a	4150	44 ^{c)}	270
3a { (2800) (0.15 mMol) ^{b)}	dTMP { (3200) (0.33 mMol)	2.2	3b	2110	49 ^{c)}	270

^{a)} Eingesetzte Mengen in Optical Density-Einheiten (267 m μ) und mMol.

^{b)} Ohne Berücksichtigung der Hypochromie.

^{c)} Unter Verwendung von 4 Äquiv. 2.4.6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid, bez. auf dTMP.

^{d)} Unter Berücksichtigung der Hypochromie nach R. Naylor und R. T. Gilham, Biochemistry 5, 2722 (1966).

Bei allen dargestellten, am 5'-Phosphat geschützten Oligonucleotiden wurde die Trichloräthylgruppe mit Zn/Cu in DMF wie beschrieben⁶⁾ abgespalten. Die Ausbeuten nach dem Durchlaufen der Ionenaustauschersäule betragen 90–95%.

Die so erhaltenen Reaktionsgemische wurden papierchromatographisch getrennt und die Ausbeuten spektrophotometrisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Alle dargestellten Oligodesoxynucleotide wurden mit Schlangengift-Phosphodiesterase zu den 5'-Monodesoxynucleotiden gespalten. Die Verbindungen **2d**–**f**, **3c** und **3d** zeigten dabei das geforderte Verhältnis von Desoxycytidylsäure zu Desoxythymidylsäure. Die Oligodesoxythymidylsäuren **1d**–**f** wurden papierchromatographisch mit entsprechenden, durch chemische Polymerisation erhaltenen Oligodesoxythymidylsäuren verglichen¹⁰⁾. Sie wurden durch die Diesterase vollkommen zu Desoxythymidylsäure gespalten.

¹⁰⁾ G. Hoffarth, unveröffentlicht.

Tab. 2. Abspaltung der Trichloräthylgruppe mit Zn/Cu

Ausgangs- material	Menge OD ^{a)} (mMol) ^{b)}	Produkt	Ausb. %	λ_{\max} (Methanol)
1a	{ 500 (0.026 mMol)	1d	88	267
1b	{ 508 (0.017 mMol)	1e	81	267
1c	{ 101 (0.0026 mMol)	1f	91	267
2a	{ 518 (0.028 mMol)	2d	65	269
2b	{ 500 (0.018 mMol)	2e	91	268
2c	{ 457 (0.012 mMol)	2f	65	268
3a	{ 500 (0.027 mMol)	3c	70	270
3b	{ 257 (0.009 mMol)	3d	83	270

a) Optical Density-Einheiten (267 m μ).

b) Ohne Berücksichtigung der Hypochromie.

Die Ergebnisse bestätigen unsere Vermutung, daß die β,β,β -Trichloräthylgruppe mit Erfolg zur schrittweisen Synthese von Oligodesoxynucleotiden mit einer 5'-Phosphatgruppe verwendet werden kann.

Herrn Prof. Dr. F. Cramer danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit, Herrn G. Sievers für geschickte Mitarbeit.

Beschreibung der Versuche

Pyridin wurde über Calciumhydrid unter Rückfluß gekocht, destilliert und aufbewahrt.

Alle Papierchromatogramme (Papier Schleicher & Schüll 2043 b, gewaschen) wurden absteigend entwickelt.

System A: Äthanol/1 *m* Ammoniumacetat (7 : 3, v/v);

System B: Propanol-(2)/konz. Ammoniak/Wasser (7 : 1 : 2, v/v);

System C: n-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (55 : 10 : 35, v/v).

Elektrophoresen wurden auf dem gleichen Papier in 0.05 *m* Ammoniumformiat (pH 3.5) durchgeführt.

Zur quantitativen Auswertung der Papierchromatogramme wurden die UV-aktiven Flecken ausgeschnitten und mit 5 ccm Wasser/Methanol (1 : 1) ca. 6 Stdn. in einem verschlossenen Erlenmeyer-Kolben eluiert, dann die optische Dichte bestimmt.

Säulenchromatographien an DEAE-Cellulose wurden mit einem linearen Gradienten an Triäthylammoniumhydrogencarbonat (3 l 0.30 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat im Vorratsgefäß, 3 l Wasser im Mischgefäß) ausgeführt (25-ccm-Fractionen).

Zum Abbau der Oligonucleotide verwendeten wir Schlangengift-Phosphodiesterase von C. F. Boehringer, Mannheim. 20 Optical Density-Einheiten (267 m μ) Substrat wurden in 0.1 ccm Trispuffer (pH 8.0) gelöst und mit 100 Enzym-Einheiten bei 37° 12 Stdn. incubiert.

Vor der Bestimmung der optischen Dichte wurden Pyridiniumsalze durch Abdampfen mit konz. Ammoniak in die Ammoniumsalze übergeführt. Bei Ausbeutangaben in Optical Density-Einheiten ist die Hypochromie nicht berücksichtigt.

Beim Eindampfen von Lösungen wurde 30° Badtemperatur nicht überschritten.

Beispiel für eine Kondensation ohne Verwendung der Dimethylformamid-dimethylacetal-Schutzgruppe:

5'-O-[β,β,β -Trichlor-äthylphosphoryl]-2'-desoxy-thymidylyl-(3'→5')-2'-desoxy-thymidin (**1a**): 40000 Optical Density-Einheiten (267 m μ) 2'-Desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure-[β,β,β -trichlor-äthylester]⁶⁾ (4.15 m Mol) (**4a**) (Pyridiniumsalz) und 40000 Optical Density-Einheiten (267 m μ) 3'-O-Acetyl-2'-desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure (4.15 mMol) (Pyridiniumsalz) wurden durch mehrmaliges Eindampfen mit absol. Pyridin getrocknet, in 20 ccm absol. Pyridin gelöst und 5.8 g DCCD (5 Äquivv.) sowie 2.5 g trockner Merck I-Ionenaustauscher (Pyridiniumform) zugegeben. Dann wurde 3 Tage im Dunkeln geschüttelt, nach Zugabe von 50 ccm 20-proz. wäbr. Pyridin mit Petroläther extrahiert, der Petroläther rückextrahiert, die vereinigten Pyridinlösungen mehrere Stdn. stehengelassen, dann zur Trockne eingedampft und die Acetylgruppe durch Behandlung mit 200 ccm konz. Ammoniak (2 Stdn.) abgespalten. Nach Eindampfen chromatographierten wir an einer DEAE-Cellulosesäule. Die Fraktionen 72–96 wurden eingengt und mit Methanol zur Trockne eingedampft. Ausb. 42000 Optical Density-Einheiten (267 m μ) (52%). Das Produkt ist papierchromatographisch in den Systemen A, B und C sowie elektrophoretisch homogen.

Beispiel für eine Kondensation unter Verwendung der Dimethylformamid-dimethylacetal-Schutzgruppe:

5'-O-[β,β,β -Trichlor-äthylphosphoryl]-2'-desoxy-cytidylyl-(3'→5')-2'-desoxy-thymidin (**3a**): Zu 4500 Optical Density-Einheiten (267 m μ) 2'-Desoxy-cytidin-5'-phosphorsäure-[β,β,β -trichlor-äthylester] (0.49 mMol) (**5a**) (Pyridiniumsalz) in 3 ccm absol. DMF wurden 0.5 ccm Dimethylformamid-dimethylacetal gegeben. Nach ca. 12 Stdn. dampfte man zur Trockne ein. Die Bildung von **5b** wurde durch das Auftreten eines neuen UV-Maximums angezeigt [λ_{\max} (Methanol) = 315 m μ]. Es wurde in wenig absol. Pyridin gelöst, 4900 Optical Density-Einheiten (267 m μ) 3'-O-Acetyl-2'-desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure (0.51 mMol) (Pyridiniumsalz) in wenig absol. Pyridin wurden zugegeben, durch mehrfaches Eindampfen mit absol. Pyridin wasserfrei gemacht und nach Aufnehmen in 3 ccm absol. Pyridin 616 mg 2,4,6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid (4 Äquivv.) zugegeben. Nach 7 Stdn. gab man unter Eiskühlung ca. 5 ccm Wasser zu, ließ über Nacht stehen, dampfte dann zur Trockne ein, spaltete durch Behandeln mit 30 ccm konz. Ammoniak (5 Stdn.) die Schutzgruppen ab und chromatographierte nach Eindampfen an einer DEAE-Cellulosesäule. Die Fraktionen 75–92 wurden eingedampft und noch mehrere Male mit Methanol zur Trockne gebracht. Ausb. 4150 Optical Density-Einheiten (267 m μ) (44%). Das Produkt war papierchromatographisch in System A und B sowie elektrophoretisch homogen.

Beispiel für die Abspaltung der Trichloräthylgruppe:

5'-O-Phosphoryl-2'-desoxy-thymidylyl-(3'→5')-2'-desoxy-thymidin (**1d**): 500 Optical Density-Einheiten (267 m μ) **1a** (Pyridiniumsalz) (0.026 mMol) in 5 ccm DMF und ca. 0.5 g aktiviertes Zn/Cu wurden 1 Stde. bei 50° geschüttelt. Dann wurde abfiltriert, mit 20-proz. Essigsäure gewaschen, das Filtrat eingedampft und auf eine Merck I-Ionenaustauschersäule (H⁺-Form) gegeben. Nach Elution mit Wasser Ausb. 480 Optical Density-Einheiten (267 m μ) (0.025 mMol)

(96%). Ein aliquoter Teil des Eluats wurde papierchromatographisch in System B getrennt und die Ausb. an **1d** spektrophotometrisch bestimmt (92%). Der Rest bestand hauptsächlich aus Ausgangsmaterial.

Das Produkt war papierchromatographisch in den Systemen A, B und C und elektrophoretisch homogen und mit authent. Vergleichsmaterial¹⁰⁾ identisch. Durch Schlangengift-Phosphodiesterase wurde es vollkommen gespalten.

Tab. 3. R_F -Werte bei der Papierchromatographie

Substanz	A	System B	C
1a	0.57	0.61	
1b	0.39	0.57	
1c	0.20	0.42	
1d			0.35
1e			0.25
1f			0.19
2a	0.53	0.66	
2b	0.31	0.55	
2c	0.18	0.45	
2d			0.33
2e			0.27
2f			0.23
3a	0.53		
3b	0.37		
3c			0.32
3d			0.26
4a	0.78		
5a	0.73		

[32/67]