

Albrecht Franke, Fritz Eckstein, Karl-Heinz Scheit und Friedrich Cramer

Synthese von Oligo- und Polynucleotiden, XVI¹⁾

Synthese von Desoxyoligonucleotiden mit der Trichloräthyl-Phosphatschutzgruppe

Aus dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen

(Eingegangen am 29. September 1967)

Die Synthese mehrerer Di- und Trinucleotide mittels der Trichloräthyl-Schutzgruppe am Phosphatrest wird beschrieben. Dabei ergibt sich, daß diese Schutzgruppe auch zur Darstellung komplizierter Oligonucleotide geeignet ist, da sie während der Syntheseschritte beständig und danach leicht und selektiv in guter Ausbeute abspaltbar ist. Die Identifizierung der Oligonucleotide erfolgte durch Chromatographie, Elektrophorese, UV-Spektroskopie und enzymatischen Abbau.

Die Synthese höherer Oligonucleotide definierter Sequenzen erscheint zur Zeit am aussichtsreichsten durch Aneinanderfügen vorgefertigter kurzer Oligonucleotide (Blöcke)^{2,3)}. Diese Methode erfordert in geeigneter Weise geschützte Oligonucleotide mit entsprechendem terminalen Phosphat. Dies muß mit einer Schutzgruppe versehen sein, die die Syntheseschritte bis zum Oligonucleotid unversehrt übersteht, dann aber wieder abgespalten werden kann, ohne daß andere Schutzgruppen oder das Oligonucleotid selbst angegriffen werden.

Eine Phosphat-Schutzgruppe, die diese Voraussetzungen erfüllt, ist die mit Zn abspaltbare β,β -Trichloräthyl-Gruppe⁴⁻⁶⁾, welche sich bereits bei der Darstellung mehrerer Oligonucleotide, z. B. d-pTpTpTpT, d-pTpTpTpC und d-pCpTpT⁵⁾, bewährt hat. Im folgenden wird über die Darstellung einiger weiterer Oligonucleotide mit dieser Schutzgruppe berichtet, deren grundsätzlichen Weg das Schema zeigt⁷⁾.

¹⁾ XV. Mitteil.: F. Eckstein und I. Rizk, *Angew. Chem.* **79**, 939 (1967).

²⁾ E. Ohtsuka und H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 2195 (1967), dort weitere Zitate.

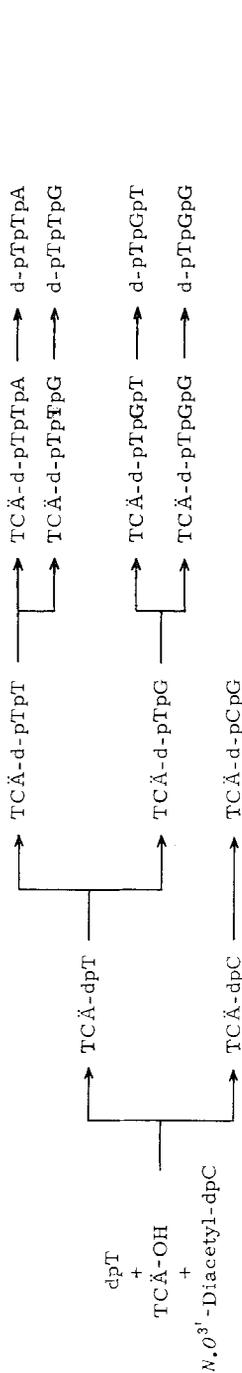
³⁾ F. Cramer, W. Frölke und H. Matzura, *Angew. Chem.* **79**, 580 (1967); *Angew. Chem. internat. Edit.* **6**, 562 (1967).

⁴⁾ F. Eckstein, *Chem. Ber.* **100**, 2228 (1967).

⁵⁾ F. Eckstein, *Chem. Ber.* **100**, 2236 (1967).

⁶⁾ F. Eckstein und K. H. Scheit, *Angew. Chem.* **79**, 317 (1967); *Angew. Chem. internat. Edit.* **6**, 362 (1967).

⁷⁾ Die verwendeten Abkürzungen sind erläutert bei: E. Ohtsuka, M. W. Moon und H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 2956 (1965).



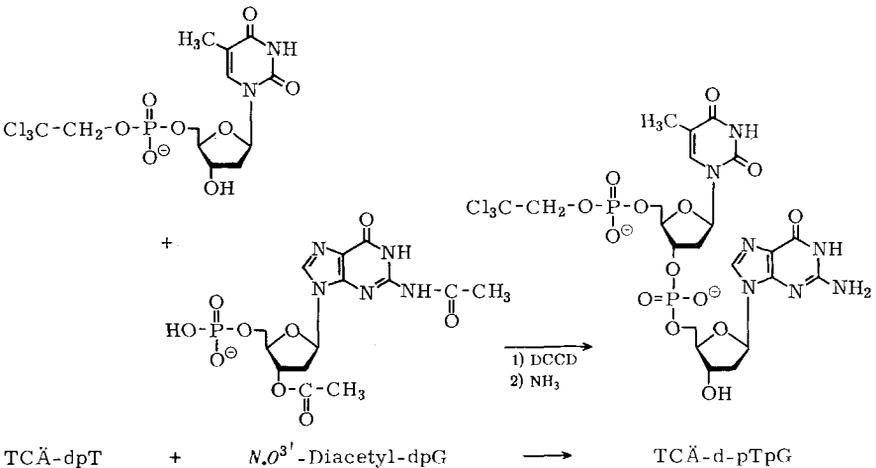
Abkürzungen

TCÄ-dpT	5'-O-[(β,β,β-Trichlor-äthylphosphoryl)-desoxythymidin
TCÄ-dpC	5'-O-[(β,β,β-Trichlor-äthylphosphoryl)-desoxycytidin
TCÄ-d-pTpT	5'-O-[(β,β,β-Trichlor-äthylphosphoryl)-desoxythymidyl-(3'→5')-desoxythymidin
TCÄ-d-pTpG	5'-O-[(β,β,β-Trichlor-äthylphosphoryl)-desoxythymidyl-(3'→5')-desoxyguanosin
TCÄ-d-pCpG	5'-O-[(β,β,β-Trichlor-äthylphosphoryl)-desoxycytidyl-(3'→5')-desoxyguanosin
TCÄ-d-pTpTpA	5'-O-[(β,β,β-Trichlor-äthylphosphoryl)-desoxythymidyl-(3'→5')-desoxythymidyl-(3'→5')-desoxyadenosin
TCÄ-d-pTpTpG	5'-O-[(β,β,β-Trichlor-äthylphosphoryl)-desoxythymidyl-(3'→5')-desoxythymidyl-(3'→5')-desoxyguanosin
TCÄ-d-pTpCpG	5'-O-[(β,β,β-Trichlor-äthylphosphoryl)-desoxythymidyl-(3'→5')-desoxyguanylyl-(3'→5')-desoxythymidin
d-pTpTpA	5'-O-[(β,β,β-Trichlor-äthylphosphoryl)-desoxythymidyl-(3'→5')-desoxyguanylyl-(3'→5')-desoxyguanosin
d-pTpTpG	5'-Phosphoryl-desoxythymidyl-(3'→5')-desoxythymidyl-(3'→5')-desoxyguanosin
d-pTpCpG	5'-Phosphoryl-desoxythymidyl-(3'→5')-desoxyguanylyl-(3'→5')-desoxythymidin
d-pTpCpG	5'-Phosphoryl-desoxythymidyl-(3'→5')-desoxyguanylyl-(3'→5')-desoxyguanosin

Darstellung der Trichloräthyl-Oligonucleotide

TCÄ-dpT⁴⁾, TCÄ-dpC⁴⁾ und TCÄ-d-pTpT⁵⁾ wurden bereits von *Eckstein* beschrieben. Die Kondensation zwischen dem Phosphatrest eines 5'-Mononucleotids und der primären Hydroxygruppe des Trichloräthanol, das im Überschuß eingesetzt wird, erfolgte mit DCCD (Dicyclohexylcarbodiimid) in absolutem Pyridin durch 24stündiges Schütteln der trockenen Reaktionspartner im Dunkeln. Trägt die Base des Mononucleotids eine Aminogruppe, so muß diese geschützt werden; dies gilt prinzipiell auch für die 3'-Hydroxygruppe, bei der aber wegen der geringen Reaktivität und Konzentration ohne nennenswerte Verluste auch darauf verzichtet werden kann. Zur Darstellung von TCÄ-dpC wurden beide funktionellen Gruppen des Mononucleotids durch Acetylreste⁸⁾ geschützt und im Anschluß an die Kondensation mit konz. Ammoniak während einiger Stdn. bei Raumtemperatur wieder abgespalten, während TCÄ-dpT aus ungeschütztem Mononucleotid gewonnen wurde. Die Reinigung beider Stoffe erfolgte durch präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten in Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser.

Aus den phosphat-geschützten Mononucleotiden wurden durch Ankondensieren je eines weiteren geschützten Mononucleotids geschützte Dinucleotide gewonnen, indem die trockenen Pyridiniumsalze der Verbindungen mit DCCD in absol. Pyridin 5–6 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln geschüttelt wurden. Als Reaktionspartner für TCÄ-dpT dienten 3'-O-Acetyl-desoxythymidin-monophosphat⁹⁾ (3'-O-Acetyl-dpT) und *N,O*3'-Diacetyl-desoxyguanosin-monophosphat¹⁰⁾ (*N,O*3'-Diacetyl-dpG).



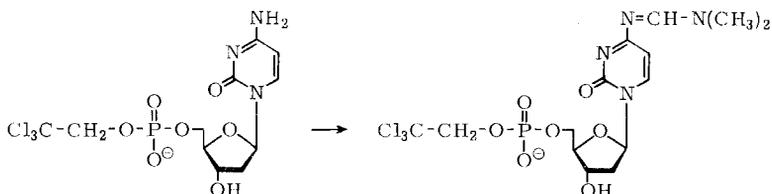
⁸⁾ H. G. Khorana und J. P. Vizsolnyi, J. Amer. chem. Soc. **83**, 675 (1961).

⁹⁾ R. T. Gilham und H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. **86**, 6212 (1958).

¹⁰⁾ P. K. Ralph, W. J. Connors, H. Schaller und H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. **85**, 1983 (1963).

N-geschütztes TCÄ-dpC wurde ebenfalls mit *N.O*^{3'}-Diacetyl-desoxyguanosin-monophosphat¹⁰⁾ umgesetzt. — Die Reaktionen wurden durch Zusatz von Wasser unterbrochen, der Dicyclohexylharnstoff durch Filtration und nichtumgesetztes Kondensationsmittel durch Extraktion mit Äther/Petroläther entfernt. Stoffe, die Purinbasen enthalten, besonders Guanin, bedürfen dabei zur Hydrolyse der *N*-Acetylgruppen mit Ammoniak Reaktionszeiten bis zu 2 Tagen. Die Substanzen TCÄ-d-pTpT und TCÄ-d-pTpG wurden schließlich durch Chromatographie über eine DEAE-Cellulose-Säule und Elution mit einem Triäthylammoniumhydrogencarbonat-Gradienten gereinigt und in 49 und 54proz. Ausbeute erhalten. TCÄ-d-pTpG ließ sich auch dünn-schichtchromatographisch reinigen.

Der Kondensation zu TCÄ-d-pCpG mußte die Einführung einer Schutzgruppe an der Aminogruppe des Cytosins vorhergehen: TCÄ-dpC wurde mit *N,N*-Dimethylformamid-dialkylacetal^{11, 12)} in Dimethylformamid in 6 Stdn. quantitativ zum geschützten Nucleotid umgesetzt.



Der Fortgang dieser Reaktion konnte UV-spektroskopisch sehr gut verfolgt werden, da das Maximum bei 271 m μ abnahm und ein neues bei 316 auftrat. Auch diese Schutzgruppe wurde bei der Behandlung mit Ammoniak wieder abgespalten. Die Substanz wurde durch Dünnschichtchromatographie in der beschriebenen Art in 27proz. Ausbeute rein erhalten und durch enzymatischen Abbau charakterisiert. Sie zeigte keine Anzeichen von Molekülaggregation, die wegen des Vorliegens der komplementären Basen G und C denkbar wäre.

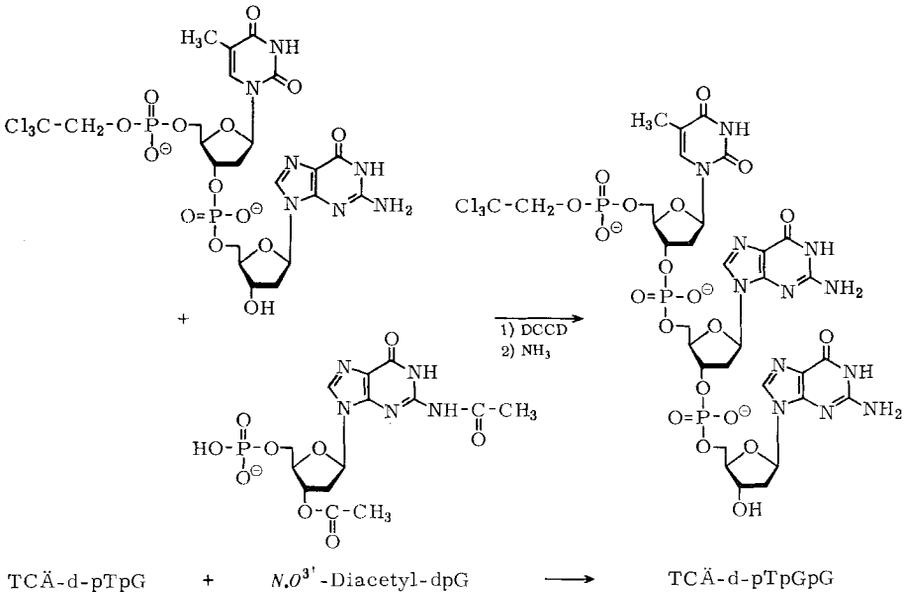
Aus dem geschützten Dinucleotid TCÄ-d-pTpT wurden in derselben Weise geschützte Trinucleotide dargestellt, nämlich mit *N.O*^{3'}-Diacetyl-desoxyadenosin-monophosphat¹³⁾ (*N.O*^{3'}-Diacetyl-dpA) TCÄ-d-pTpTpA, und mit *N.O*^{3'}-Diacetyl-dpG¹⁰⁾ TCÄ-d-pTpTpG, und durch Chromatographie an DEAE-Cellulose gereinigt, deren Verlauf Tab. 1 wiedergibt. Sie wurden zu 43 und 46% gewonnen.

Aus dem geschützten Dinucleotid TCÄ-d-pTpG ergaben sich TCÄ-d-pTpGpT und TCÄ-d-pTpGpG durch Umsetzen mit 3'-*O*-Acetyl-dpT⁹⁾ und *N.O*^{3'}-Diacetyl-dpG¹⁰⁾. Dabei blieb die Aminogruppe des Guanins des Dinucleotids ungeschützt, da sie bekanntlich nur schwer phosphoryliert wird.

¹¹⁾ J. Žemlička, Collect. czechoslov. chem. Commun. **28**, 1060 (1963).

¹²⁾ J. Žemlička, S. Chládek, A. Holý und J. Smrt, Collect. czechoslov. chem. Commun. **31**, 3198 (1966).

¹³⁾ R. K. Ralph und H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. **83**, 2926 (1961).



Tab. 1. Chromatographic trichloräthyl-geschützter Trinucleotide an DEAE-Cellulose

	Peak- Nummer	Fraktion	Gehalt O. D.-Einh. bei 260 m μ	Haupt- produkt
TCÄ-d-pTpTpA	1	51—57	500	dpA
	2	65—72	450	dpA + TCÄ-d-pTpT
	3	73—85	1750	
	4	88—95	240	TCÄ-d-pTpT + TCÄ-d-pTpTpA TCÄ-d-pTpTpA
	5	101—108	280	
	6	111—125	3360	
TCÄ-d-pTpTpG	1	58—68	490	Pyridinnucleotid
	2	74—82	530	TCÄ-d-pTpT
	3	86—98	820	dpG
	4	117—135	2450	TCÄ-d-pTpTpG

TCÄ-d-pTpGpT wurde dünn-schichtchromatographisch, TCÄ-d-pTpGpG säulen-chromatographisch gereinigt, die Ausbeuten betragen 35 und 15 %.

Zur spektralphotometrischen Ausbeutebestimmung wurde der ϵ -Wert des jeweiligen Di- oder Trinucleotids durch Addition der UV-Spektren der beteiligten Nucleotide zeichnerisch ermittelt und ohne Berücksichtigung der Hyperchromie und anderer Faktoren verwendet; es ergab sich sehr gute Übereinstimmung der berechneten und gefundenen Maxima.

Abspaltung der Trichloräthyl-Schutzgruppen

Die Abspaltung der Trichloräthyl-Schutzgruppe aus den beschriebenen Oligonucleo-tiden wurde nach den von Eckstein^{4,5)} angegebenen Bedingungen, mit Cu/Zn¹⁴⁾ in Dimethylformamid bei 50° während 1 Stde., vorgenommen. Die Verluste nach der

¹⁴⁾ E. Le Goff, J. org. Chemistry **29**, 2048 (1964).

Filtration, bei der mit Essigsäure nachgewaschen wird und evtl. Basen abgespalten werden können (dies wird durch sofortiges Verdünnen des Filtrats mit Pyridin vermieden), und der Ionenaustauscher-Chromatographie zur Entfernung der Zn-Ionen zeigt Tab. 2. Die Werte wurden durch Papierchromatographie und Spektralphotometrie bestimmt.

Tab. 2. Abspaltung der Trichloräthyl-Schutzgruppen

	Eingesetzt O. D.-Einheiten	Gesamtausb. %		Tri- nucleotid Anteil %	Ver- lust %
		nach der Filtration	nach der Austausch- Chromato- graphie		
TCÄ-d-pTpTpA	160	97	94	87	18
TCÄ-d-pTpTpG	90	88	80	84	33
TCÄ-d-pTpGpT	140	98	93	76	30
TCÄ-d-pTpGpG	110	95	93	79	31

Enzymatische Spaltung der Oligonucleotide

Schlangengift-Phosphodiesterase (EC 3.1.4.1.) spaltet 3'-Phosphatbindungen, so daß aus Oligonucleotiden 5'-Monophosphate entstehen; auch die Trichloräthyl-Schutzgruppe wird durch dieses Enzym abgespalten. Bei gleichzeitiger Einwirkung von Schlangengift-Phosphodiesterase und alkal. Phosphatase (EC 3.1.3.1.) wird bis zu den Nucleosiden abgespalten, was den Vorteil leichterer chromatographischer Trennbarkeit hat. Die Ergebnisse nach Abbau mit beiden Verfahren und chromatographischer Trennung zeigt Tab. 3.

Tab. 3. Enzymatischer Abbau der Oligonucleotide

	mit Schlangengift- Phosphodiesterase			mit Schlangengift-Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase				
	dpA	dpG	dpT	Verhält- nis dpX/dpT (Mol/Mol)	dA	dG	dT	Verhält- nis dX/dT (Mol/Mol)
	O.D.-Einheiten /ccm				O.D.-Einheiten/ccm			
TCÄ-d-pTpG		0.740	0.550	1.05/1				
TCÄ-d-pTpTpA	0.760		1.00	0.95/2	0.810		0.980	1.03/2
d-pTpTpA	0.985		1.21	1.01/2				
TCÄ-d-pTpTpG		0.665	0.920	1.01/2		0.710	1.06	0.94/2
d-pTpTpG		0.398	0.546	1.03/2				
TCÄ-d-pTpGpT		0.624	0.864	1.02/2		0.635	0.950	0.93/2
TCÄ-d-pTpGpG		0.680	0.247	1.93/1		0.681	0.235	2.05/1

X = A, G oder C.

Identifizierung der Nucleotide

Neben dem enzymatischen Abbau wurden die Stoffe auch chromatographisch, elektrophoretisch und durch die UV-Spektren identifiziert. Die Daten der UV-Spektroskopie bei 3 pH-Werten wurden in Tab. 4, die R_F -Werte der Chromatographie auf Papier und Dünnschichtplatten in Tab. 5 zusammengefaßt. Bei der Elektrophorese bei pH 7 legten die TCÄ-Mononucleotide die halbe Strecke, die TCÄ-Dinucleotide

Tab. 4. UV-Spektren der geschützten Oligonucleotide ($m\mu$) bei pH 7 (Phosphatpuffer), 12 und 1

	pH	λ_{\max}	λ_{\min}	Schulter	$A_{250}/260$	$A_{280}/260$	$A_{290}/260$
TCÄ-d-pTpT	7	267					
TCÄ-d-pTpG	7	257	229		0.89	0.66	0.33
TCÄ-d-pCpG	7	255	224	265 -- 275	1.02	0.78	0.45
	1	277	231	260—270			
	12	269	231				
TCÄ-d-pTpTpA	7	261	231		0.76	0.45	0.13
TCÄ-d-pTpTpG	7	260	230		0.86	0.66	0.29
	1	260	230				
	12	267	240				
TCÄ-d-pTpGpT	7	261	241		0.86	0.67	0.28
	12	267	241				
TCÄ-d-pTpGpG	7	256	227		1.01	0.62	0.29
	12	265	236				

Tab. 5. R_f -Werte der Nucleotide bei der absteigenden Papierchromatographie und der Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Lösungsmitteln

	Papierchromatographie			Dünnschichtchromatographie		
	A	D	C	A	B	E
dpT	0.21	0.34	0.53	0.24	0.30	
dpC	0.12					
dpA	0.16	0.27				
dpG	0.10	0.17			0.23	
dT	0.70					
dC	0.64					
dG	0.53					
3'-O-Acetyl-dpT		0.55				
N,O ^{3'} -Diacetyl-dpA		0.61				
N,O ^{3'} -Diacetyl-dpG		0.50				
TCÄ-dpT	0.81	0.82			0.87	0.41
TCÄ-dpC	0.72				0.89	0.35
TCÄ-d-pTpT	0.67	0.63				0.13
TCÄ-d-pTpG	0.53				0.75	0.08
TCÄ-d-pCpG	0.47			0.64	0.74	
TCÄ-d-pTpTpA	0.49			0.57	0.71	
TCÄ-d-pTpTpG	0.45			0.41	0.62	
TCÄ-d-pTpGpT	0.43			0.42	0.62	
TCÄ-d-pTpGpG	0.39			0.36	0.59	
d-pTpTpA	0.05		0.28			
d-pTpTpG	0.05		0.24			
d-pTpGpT			0.26			
d-pTpGpG			0.23			

Lösungsmittel: Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser 7: 1: 2 (A)
 Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser 6: 3: 1 (B)
 Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser 55: 10: 35 (C)
 96proz. Äthanol/1 m Ammoniumacetatlösung 7: 3 (D)
 n-Butanol, gesättigt mit Wasser (E)

Papier: Schleicher & Schüll 2043 b gewaschen
 Schleicher & Schüll 2040
 Whatman 3 MM

Silicagel-Platten F₂₅₄ (Merck) mit Fluoreszenzindikator.

das 0.7fache und die TCÄ-Trinucleotide etwa das 0.75fache der Strecke der betr. ungeschützten Nucleotide zurück, was mit den theoretischen Erwartungen bei Ersatz einer sauren Funktion durch die Estergruppe in guter Übereinstimmung steht.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die Gewährung einer Sachbeihilfe.

Beschreibung der Versuche

Die Lösungsmittel Pyridin und Dimethylformamid wurden über Calciumhydrid getrocknet und aufbewahrt. Zum Einengen der Lösungen bei 30° diente ein Rotationsverdampfer der Firma Büchi. Gehalts- und Ausbeutebestimmungen wurden mit einem Zeiss-Spektralphotometer ausgeführt; bei pyridinhaltigen Lösungen wurde das Pyridin durch mehrmaliges Eindampfen mit konz. Ammoniak entfernt. Zur Messung der UV-Spektren diente ein Cary 14 Spektrophotometer. Elektrophorese wurde mit einer Apparatur nach Markham und Smith durchgeführt (Phosphatpuffer pH 7, Papier: Whatman 3 MM). Für die Säulenchromatographie wurde ein LKB-Fraktionssammler mit einem Uvicord UV-Analysator verwendet.

Trichloräthyl-Oligonucleotide

TCÄ-Mononucleotide wurden, soweit sie als Na-Salze vorlagen, über eine Ionenaustauscher-Säule in die *Pyridiniumform* übergeführt, das Eluat eingengt und am Ölpumpenvak. mehrmals mit absol. Pyridin abgezogen. Das *TCÄ-Mono-* oder *TCÄ-Dinucleotid (Pyridiniumsalze)* wurde zusammen mit dem anzukondensierenden geschützten *Mononucleotid (Pyridiniumsalz)* durch mehrmaliges Abziehen einiger ccm von absol. Pyridin wasserfrei gemacht, wieder in absol. Pyridin gelöst, *DCCD* und gut getrockneter Ionenaustauscher (Merck I, Pyridiniumform) zugefügt und im Dunkeln 5–6 Tage geschüttelt. Durch Zugabe von Wasser wurde die Reaktion unterbrochen, der Ansatz dann mit konz. Ammoniak behandelt, abfiltriert, mit 20proz. wäßrigem Pyridin gründlich nachgewaschen, das Filtrat eingengt, in Wasser gelöst und mit Äther/Petroläther (1 : 1) mehrfach extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser ausgeschüttelt, die wäßrigen Phasen vereinigt, zur Trockne eingengt und in Methanol wieder aufgenommen. Die Reinigung erfolgte entweder durch Chromatographie über eine DEAE-Cellulose-Säule mit linear steigendem Salzgradienten an Triäthylammoniumhydrogencarbonat (je 3 l der Salzlösung und Wasser), wobei 25-ccm-Fractionen aufgefangen, dann die gewünschten Fractionen eingengt und am Ölpumpenvak. mehrmals mit Wasser abgezogen wurden, um das Triäthylammoniumhydrogencarbonat zu entfernen; oder auf präparativen Dünnschichtplatten (Kieselgel PF₂₅₄, Schichtdicke 1–2 mm, Format 30×90 cm) in Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser (6 : 3 : 1). Die Zone des Produkts wurde abgekratzt, mit Methanol/Chloroform (1 : 1) eluiert, eingengt und mit der berechneten Menge NaClO₄ in wenig Aceton versetzt. Das Na-Salz wurde mit Aceton/Äther (1 : 1) als amorpher farbloser Niederschlag gefällt, abzentrifugiert, zuerst mit Äther/Aceton und dann mit Äther nachgewaschen und i. Vak. über P₂O₅ getrocknet.

Die *Dinucleotide* wurden als Pyridiniumsalze in absol. Pyridin aufbewahrt, die *Trinucleotide* in Na-Salze übergeführt. Als Reinheitskriterien dienten die Ergebnisse der enzymatischen Spaltungen und der Papier- bzw. Dünnschichtchromatographie.

TCÄ-d-pTpG

Ansatz: 0.625 mMol (6000 O.D.-Einheiten) *TCÄ-dpT (Na-Salz)*, 0.365 mMol (6100 O.D.-Einheiten) *N.O³-Diacetyl-dpG*, 5 ccm absol. Pyridin, 600 mg *DCCD* und 1 g Ionenaustauscher; 5 Tage. Aufarbeitung: 5 ccm Wasser, 5 ccm konz. Ammoniak während 2 Tagen.

Säulenchromatographie, Gradient 0–0.25 *m*: Fraktion 148–166. Dünnschichtchromatographie: R_F -Wert 0.65–0.75. Ausb. 0.197 mMol (4100 O.D.-Einheiten bei λ_{\max}), 54% (Dinucleotid $\epsilon_{257} = 20800$).

TCÄ-d-pCpG

Ansatz: 0.55 mMol (5000 O.D.-Einheiten) *TCÄ-dpC* (Na-Salz)*, 0.383 mMol (6400 O.D.-Einheiten) *N.O^{3'}-Diacetyl-dpG*, 5 ccm absol. Pyridin und 1 g *DCCD* (kein Ionenaustauscher); 5 Tage. Aufarbeitung: 5 ccm Wasser, 5 ccm konz. Ammoniak während 2 Tagen. Dünnschichtchromatographie: R_F -Wert 0.67–0.75. Ausb. 0.104 mMol (2060 O.D.-Einheiten bei λ_{\max}), 27.1% (Dinucleotid $\epsilon_{255} = 19900$).

TCÄ-d-pTpT

Ansatz: 0.234 mMol (4500 O.D.-Einheiten) *TCÄ-d-pTpT*, 0.374 mMol (5000 O.D.-Einheiten) *N.O^{3'}-Diacetyl-dpA*, 5 ccm absol. Pyridin, 600 mg *DCCD* und 1 g Ionenaustauscher; 6 Tage. Aufarbeitung: 10 ccm Wasser, 5 ccm konz. Ammoniak während 24 Stdn. Säulenchromatographie, Gradient 0–0.5 *m*: Fraktion 111–125. Ausb. 0.102 mMol (3360 O.D.-Einheiten bei λ_{\max}), 43.5% (Trinucleotid $\epsilon_{261} = 33000$).

TCÄ-d-pTpTpG

Ansatz: 0.21 mMol (4000 O.D.-Einheiten) *TCÄ-d-pTpT*, 0.18 mMol (3000 O.D.-Einheiten) *N.O^{3'}-Diacetyl-dpG*, 5 ccm absol. Pyridin, 600 mg *DCCD* und 1 g Ionenaustauscher; 6 Tage. Aufarbeitung: 5 ccm Wasser, 10 ccm konz. Ammoniak während 2 Tagen. Säulenchromatographie, Gradient 0–0.5 *m*: Fraktionen 117–135. Ausb. 0.083 mMol (2450 O.D.-Einheiten bei λ_{\max}), 46.1% (Trinucleotid $\epsilon_{260} = 29400$).

TCÄ-d-pTpGpT

Ansatz: 0.12 mMol (2500 O.D.-Einheiten) *TCÄ-d-pTpG*, 0.208 mMol (2000 O.D.-Einheiten) *3'-O-Acetyl-dpT*, 5 ccm absol. Pyridin und 500 mg *DCCD* (kein Ionenaustauscher); 5 Tage. Aufarbeitung: 5 ccm Wasser, 5 ccm konz. Ammoniak während 2 Tagen. Dünnschichtchromatographie (7 : 1 : 2): R_F -Wert 0.60–0.65. Ausb. 0.043 mMol (1260 O.D.-Einheiten bei λ_{\max}), 35.3% (Trinucleotid $\epsilon_{261} = 29400$).

TCÄ-d-pTpGpG

Ansatz: 0.168 mMol (3500 O.D.-Einheiten) *TCÄ-d-pTpG*, 0.195 mMol (3300 O.D.-Einheiten) *N.O^{3'}-Diacetyl-dpG*, 3 ccm absol. Pyridin, 600 mg *DCCD* und 1 g Ionenaustauscher; 5 Tage. Aufarbeitung: 5 ccm Wasser, 5 ccm konz. Ammoniak während 2 Tagen. Säulenchromatographie, Gradient 0–0.5 *m*: Fraktion 180–200 (bei 20-ccm-Fractionen). Ausb. 0.025 mMol (860 O.D.-Einheiten bei λ_{\max}), 15% (Trinucleotid $\epsilon_{256} = 34200$).

Abspaltung der Trichloräthyl-Schutzgruppe

100–150 O.D.-Einheiten des *Trinucleotids* wurden in 5 ccm Dimethylformamid mit ca. 1 g aktiviertem *Cu/Zn* bei 50° 1 Stde. gerührt. Anschließend wurde filtriert und mit 80proz. Essigsäure sorgfältig nachgewaschen. Das Filtrat wurde eingeeengt, über eine Ionenaustauschersäule (Merck I, Pyridiniumform) geschickt, wieder eingeeengt und nach Entfernen des Pyridins mit Ammoniak der Gehalt bestimmt. Die Ausbeutebestimmung erfolgte durch Papierchromatographie und nachfolgende Spektralphotometrie.

*) Nach der Überführung von *TCÄ-dpC* vom Na- ins Pyridiniumsalz und Abziehen mit Pyridin wurde in 5 ccm Dimethylformamid gelöst, 1 ccm (ca. 10 mMol) Dimethylformamid-dimethylacetal zugefügt, über Nacht stehengelassen und dann das Lösungsmittel und unverbrauchte Reagens wieder abdestilliert.

Enzymatische Spaltung der Oligonucleotide

Mit Schlangengift-Phosphodiesterase (EC 3.1.4.1.): Etwa 10 O.D.-Einheiten *Trinucleotid* (Ammoniumsalz) wurden in 0.2 ccm Trispuffer (0.1 *m*, pH 8) gelöst und mit 10 λ Enzym (1 mg/ccm Glycerin, Fa. Boehringer) 12 Stdn. bei 37° inkubiert. Dann folgte Papierchromatographie, Elution der einzelnen Flecken und spektralphotometrische Gehaltsbestimmung.

Mit Schlangengift-Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase (EC 3.1.3.1.) gleichzeitig: Dem obigen Ansatz wurden noch 10 λ alkalische Phosphatase (0.5 mg/ccm, Fa. Worthington) zugesetzt.

Bestimmung der Hyperchromie: 0.4–0.5 O.D.-Einheiten des Trinucleotids (Ammoniumsalz) wurden in einer verschließbaren Quarzküvette in 2 ccm Trispuffer (0.1 *m*, pH 8) gelöst, 2 Stdn. bei 37° gehalten und die UV-Absorption gemessen. Dann wurden in die Meß- und Vergleichsküvette je 10 λ Schlangengift-Phosphodiesterase gegeben und nach einer halben Stde. wieder die UV-Absorption bestimmt; nach spätestens einer Stde. war keine Zunahme mehr festzustellen.

[430/67]
