

76. Nucleoside und Nucleotide

Teil 27¹⁾

Festphasensynthese eines Tridecanucleosid-dodecaphosphats, das die unnatürliche Base 4-Amino-2(1H)-pyridinon enthält, und eines Octanucleosid-heptaphosphats zur Untersuchung der DNA-Polymerase-Spezifität

von **Roland Charczuk** und **Christoph Tamm***

Institut für Organische Chemie der Universität, St. Johannis-Ring 19, CH-4056 Basel

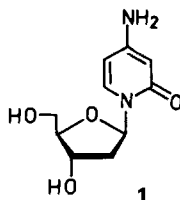
(23.I.87)

Nucleosides and Nucleotides. Solid Phase Synthesis of a Tridecanucleoside Dodecaphosphate Containing the Unnatural Base 4-Amino-2(1H)-pyridinone and of a Octanucleoside Heptaphosphate for the Determination of the DNA-Polymerase Specificity

The tridecanucleoside dodecaphosphate d(T-T-Z-C-G-T-C-A-A-A-T-C) incorporating the modified nucleoside 4-amino-1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinone (Z_d , **1**) and the octanucleoside heptaphosphate d(G-A-T-T-T-G-A) were synthesized by the solid-phase method using the triester method. The carrier material was a copolymer consisting of styrene with 1% divinylbenzene.

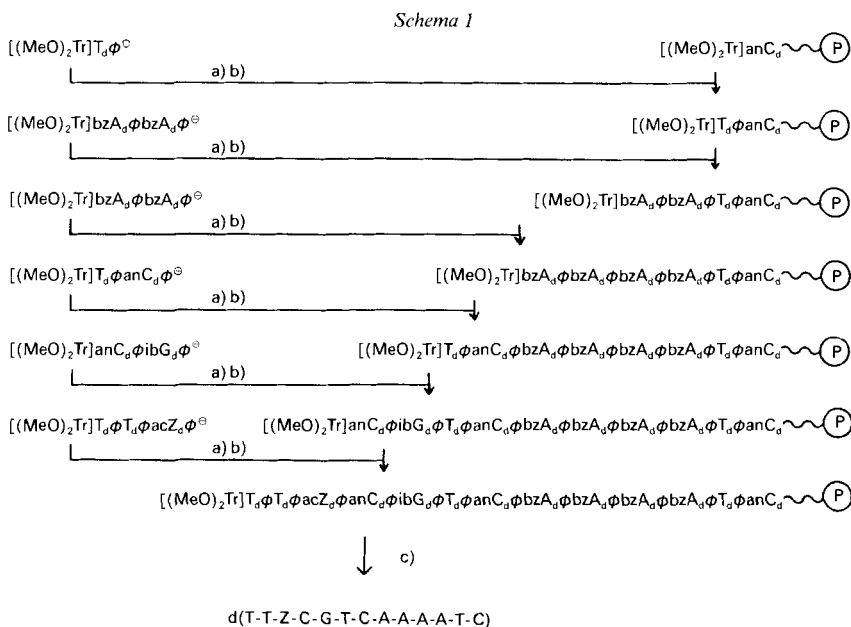
1. Einleitung. – Im Rahmen unseres Konzeptes zur Untersuchung der DNA-Polymerase-Spezifität [2a] benötigten wir das Tridecanucleosid-dodecaphosphat d(T-T-Z-C-G-T-C-A-A-A-T-C²), welches das unnatürliche Nucleosid 4-Amino-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinon (Z_d , **1**) enthält, sowie das Octanucleosid-heptaphosphat d(G-A-T-T-T-G-A). Beide Sequenzen sind basenkomplementär und bilden eine Matrize, die ein unnatürliches Nucleosid enthält, das nur beschränkt H-Brücken nach dem Prinzip von *Watson* und *Crick* ausbilden kann. Bei unseren Versuchen mit dem *Klenow*-Fragment der DNA-Polymerase I, dem Octameren als 'Primer' und dem Tridecameren als Matrize hatte sich überraschend gezeigt, dass Z_d einen signifikanten Einbau von Cytosin bewirkt. Dies bedeutet, dass C_d eine Wasserstoff-Bindung mit Z bilden kann. Eine derartige Basenpaarung zwischen Pyrimidin- und Pyridin-nucleotiden ist bisher nicht beobachtet worden [1].

Als Syntheseverfahren für die Herstellung der beiden Oligonucleotide wählten wir aufgrund von früheren positiven Erfahrungen [3] die Festphasenvariante der Triester-Methode. Der Kettenaufbau des Tridecameren wurde als Blocksynthese vorgenommen,



¹⁾ Teil 26: [1].

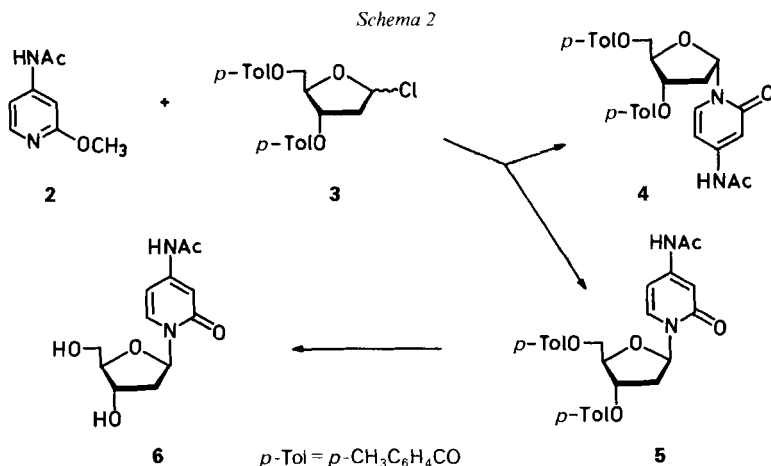
²⁾ Abkürzungen (vgl. auch [2b]): φ = (2-Chlorphenyl)-phosphat; (CNEt) = Cyanoethyl; [(MeO)₂Tr] = 5'-O-Dimethoxytrityl; bz = N⁶-Benzoyl; an = N⁴-Anisoyl; ib = N²-Isobutyl; ac = N⁴-Acetyl.



a) Abspaltung der [(MeO)₂Tr]-Gruppe der Träger-gebundenen Komponente. b) Kondensation. c) Vollständige Abspaltung aller Schutzgruppen.

um die Anzahl der Kondensationsschritte mit der unnatürlichen Base 4-Amino-2(1*H*)-pyridinon zu vermindern (Schema 1). Die Synthese des Octameren wurde als schrittweise Kondensation von Monomereinheiten durchgeführt. Nur der letzte Kondensationsschritt erfolgte mittels eines Dinucleotid-Blocks, um das Endprodukt besser aus dem Reaktionsgemisch abtrennen zu können.

2. *N*⁴-Acetyl-geschütztes Desoxyribosylpyridinon 6. – Als erstes galt es, ein *N*⁴-geschütztes Derivat von Z_d (1) herzustellen (Schema 2). Als Schutzgruppe wurde die



bewährte Ac-Gruppe eingesetzt [4]. Die Kondensation von geschütztem 2-Desoxyribosyl-chlorid **3** mit 4-Acetamido-2-methoxypyridin (**2**) erfolgte nach dem von *Wachtl* [3] modifizierten Verfahren von *Currie et al.* [5]. Das resultierende Anomerengemisch **4/5** liess sich nur durch Chromatographie an Al_2O_3 vollständig trennen. Die Gesamtausbeute an α - und β -Anomeren betrug 50% (15% reines β -Nucleosid **5**) bezogen auf eingesetztes **3**. Die selektive Abspaltung der *O*-Toluoyl-Gruppen mit NaOMe ergab das gewünschte Produkt **6** (= acZ_d).

3. Übrige Synthese-Bausteine. – Als Synthese-Bausteine dienten vollgeschützte Mono-, Di- und Trimere. Die benötigten Mononucleotide [(MeO)₂Tr]_nN₃φ(CNEt) wurden nach Modifikation der Literaturangaben [3] aus den Desoxynucleosiden hergestellt, wobei die Reihenfolge der Zugabe von *N*-Alkylimidazol und Phosphorylierungsmittel zur Lösung des Nucleosids als entscheidend für eine gute Ausbeute erkannt wurde [6]. Die Abspaltung der CNEt-Schutzgruppe erfolgte mit Et₃N/H₂O/Pyridin [7] (Reaktionsdauer 30 min) oder mit *tert*-Butylamin [8] (Reaktionsdauer 10 min). Für die Abspaltung der [(MeO)₂Tr]-Gruppe kamen Benzolsulfonsäure in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ [9] oder ZnBr_2 in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/i\text{-PrOH}$ [10] zum Einsatz. Für die Kondensationen zum Aufbau der Bausteinblöcke haben wir neben Standard-Reagenzien wie 3-Nitro-1-(2,4,6-triisopropylbenzolsulfonyl)-1*H*-1,2,4-triazol (TPSNT) [11], 3-Nitro-1-(2,4,6-trimethylbenzolsulfonyl)-1*H*-1,2,4-triazol (MSNT) [12], 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonyl-chlorid (TPSCI)/Tetrazol [13], TPSCI/1-Methylimidazol [14] und MSNT/1-Methylimidazol [15] das von uns entwickelte Kondensationsmittel MSNT/1-Butylimidazol verwendet, womit bei kürzesten Reaktionszeiten sehr hohe Ausbeuten erreicht werden konnten (s. *Tab. 1*). Diese positive Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit durch 1-Butylimidazol verglichen mit 1-Methylimidazol könnte u. a. mit dessen stärkeren nucleophilen Charakter zu tun haben. Kinetische Untersuchungen der Kondensationsreaktionen in Gegenwart von Nucleophilen, die stärker als 1-Methylimidazol sind, deuten ebenfalls darauf hin [16].

4. Festphasensynthesen. – Von den zahlreichen bisher beschriebenen [17] Trägersystemen schienen uns mit Divinylbenzol quervernetzte Polystyrole für die Trägersynthese nach dem Triester-Verfahren als besonders geeignet. Für die Herstellung der beiden Oligonucleotide wählten wir deshalb ein Copolymer aus Styrol und 1% Divinylbenzol als Vernetzungsreagenz. Als Anker-Gruppe diente die Aminomethyl-Funktion [18]. Die Synthesen wurden in einer manuell betriebenen, abgeschlossenen Apparatur durchgeführt.

Beim Aufbau des Tridecameren (s. *Schema 1*) verwendeten wir TPSNT und MSNT als Kondensationsmittel. Vor jedem Kondensationsschritt wurde jeweils die 5'-*O*-[(MeO)₂Tr]-Gruppe mit 1*M* ZnBr_2 in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/i\text{-PrOH}$ 85:15 entfernt. In *Tab. 2* ist die Sequenz aller Operationen nach [19] für die Synthese des Tridecameren zusammengefasst. Die chromophore [(MeO)₂Tr]-Gruppe ermöglichte eine schnelle Kontrolle der Umsatzrate am Träger durch spektrometrische Bestimmung der abgespaltenen Schutzgruppe. Die Phosphodiester-Komponente wurde in 10fachem Überschuss bezogen auf die Menge des ersten am Träger gebundenen Nucleosids und die Kondensationsmittel TPSNT sowie MSNT in 3fachem Überschuss bzgl. der Phosphodiester-Komponente eingesetzt. Die Markierung der nicht umgesetzten 5'-OH-Gruppen erfolgte nach jeder Kondensation mit Ac₂O in Gegenwart von 4-(*N*-Dimethylamino)pyridin (4-(Me₂N)Py).

Tab. 1. Kondensationsbedingungen

| 3'-Phosphat-Komponente | Ver-hältnis | 5'-OH-Komponente | Kondensationsmittel | Isoliertes Produkt | Ausbeute [%] | Reaktionszeit [min] |
|---|-------------|--------------------------|--|--|--------------|---------------------|
| [(MeO) ₂ Tr]T ₄ φ(CNEt) | 1,3:1 | T ₄ φ(CNEt) | TPSCI (3 Äquiv.)/Tetrazol(9 Äquiv.) | [(MeO) ₂ Tr]T ₄ φT ₄ (CNEt) | 74 | 40 |
| | 1,3:1 | | MSNT (3 Äquiv.)/1-Butylimidazol (9 Äquiv.) | | 91 | 20 |
| [(MeO) ₂ Tr]T ₄ φT ₄ φ(CNEt) | 1,5:1 | acZ ₄ φ(CNEt) | MSNT (3 Äquiv.) | [(MeO) ₂ Tr]T ₄ φT ₄ φacZ ₄ (CNEt) | 59 | 30 |
| | 1,5:1 | | MSNT (3 Äquiv.)/1-Methylimidazol (9 Äquiv.) | | 55 | 25 |
| [(MeO) ₂ Tr]bzA ₄ φ(CNEt) | 1,5:1 | | MSNT (3 Äquiv.)/1-Butylimidazol (9 Äquiv.) | [(MeO) ₂ Tr]bzA ₄ φbzA ₄ φ(CNEt) | 81 | 15 |
| | 1,3:1 | bzA ₄ φ(CNEt) | TPSNT (3 Äquiv.) | | 74 | 40 |
| | | | MSNT (3 Äquiv.) | | 83 | 30 |
| | | | MSNT (3 Äquiv.)/1-Butylimidazol (9 Äquiv.) | | 83 | 20 |
| [(MeO) ₂ Tr]T ₄ φ(CNEt) | 1,3:1 | anC ₄ φ(CNEt) | TPSNT (3 Äquiv.) | [(MeO) ₂ Tr]T ₄ φanC ₄ φ(CNEt) | 79 | 40 |
| | 1,3:1 | ibG ₄ φ(CNEt) | MSNT (3 Äquiv.) | | 69 | 35 |
| [(MeO) ₂ Tr]anC ₄ φ(CNEt) | | | TPSNT (3 Äquiv.)/1-Methylimidazol (9 Äquiv.) | [(MeO) ₂ Tr]anC ₄ φibG ₄ φ(CNEt) | 71 | 25 |
| | | | MSNT (3 Äquiv.)/1-Methylimidazol (9 Äquiv.) | | 75 | 25 |
| | | | MSNT (3 Äquiv.)/1-Butylimidazol (9 Äquiv.) | | 80 | 20 |
| | | | MSNT (3 Äquiv.)/1-Methylimidazol (9 Äquiv.) | | 67 | 25 |
| [(MeO) ₂ Tr]ibG ₄ φ(CNEt) | 1,3:1 | bzA ₄ φ(CNEt) | MSNT (3 Äquiv.)/1-Butylimidazol (9 Äquiv.) | [(MeO) ₂ Tr]ibG ₄ φbzA ₄ φ(CNEt) | 86 | 20 |

Tab. 2. *Festphasensynthese des Tridecameren*

| Nr. | Operation | Reagenz oder Lösungsmittel | Zeit (min) | Zahl der Operationen |
|-----|--|---|---------------------------|----------------------|
| 1 | Entfernung der 5'-O-[(MeO) ₂ Tr]-Gruppe | 1M ZnBr ₂ in CH ₂ Cl ₂ /i-PrOH 85:15 | 3 | 3 |
| 2 | Neutralisation des Trägers | 0,1M Et ₃ NOAc in DMF | 1 | 3 |
| 3 | Waschen des Trägers | abs. Py | 0,5 | 3 |
| 4 | Trocknen des Trägers | HV. | 5 | 1 |
| 5 | Kondensation | 0,15M Nucleotid-Komponente in Py, Kondensationsmittel | 150 oder 35 ^{a)} | 1 |
| 6 | Herauswaschen des Überschusses an Nucleotid-Komponente und Kondensationsmittel | abs. Py | 0,5 | 1 |
| 7 | Blockierung der unumgesetzten 5'-OH-Gruppen | 10% Ac ₂ O in Py, 4-(Me ₂ N)Py | 5 | 1 |
| 8 | Waschen des Trägers | CH ₂ Cl ₂ /i-PrOH 85:15 | 0,5 | 4 |

^{a)} Die Kondensationszeit hing von den verwendeten Kondensationsmitteln ab. Sie betrug 150 min für TPSNT und 35 min für MSNT.

Die Synthese des Octameren wurde vereinfacht. Da die Methode mit ZnBr₂ eine Verlängerung der Reaktionszeit mit zunehmender Oligonucleotid-Kette erfordert [20], haben wir für die Abspaltung der [(MeO)₂Tr]-Gruppe CHCl₂COOH verwendet. Als Kondensationsmittel wurde MSNT/1-Butylimidazol 1:2 (s. Kap. 3) in 3fachem Überschuss bzgl. der Phosphodiester-Komponente eingesetzt. Wegen der hohen Kondensationsausbeuten verzichteten wir auf die Maskierung der nicht umgesetzten 5'-OH-Gruppen. Die Kondensationen wurden nach den in Tab. 3 gegebenen Operationen durchgeführt.

Tab. 3. *Festphasensynthese des Octameren*

| Nr. | Operation | Reagens oder Lösungsmittel | Zeit | Zahl der Operationen |
|-----|--|--|--------|----------------------|
| 1 | Entfernung der 5'-O-[(MeO) ₂ Tr]-Gruppe | 3% CHCl ₂ COOH in CH ₂ Cl ₂ | 25 s | 3 |
| 2 | Waschen des Trägers | CH ₂ Cl ₂ | 10 s | 3 |
| 3 | Waschen des Trägers | abs. Py | 10 s | 3 |
| 4 | Trocknen des Trägers | HV. | 5 min | 1 |
| 5 | Kondensation | 0,15M Nucleotid-Komponente in Py, Kondensationsmittel | 10 min | 1 |
| 6 | Waschen des Trägers | Py | 10 s | 2 |
| 7 | Waschen des Trägers | CH ₂ Cl ₂ | 10 s | 3 |

Wie sich im Verlaufe der Untersuchungen mit dem Kondensationsmittel MSNT/1-Butylimidazol zeigte, lässt sich die Reaktion auf 10 min verkürzen, ohne dass die Ausbeute abnimmt. Vergleicht man die Kondensationsmittel TPSNT, MSNT und MSNT/1-Butylimidazol, so stellt man fest, dass der Vorteil von MSNT/1-Butylimidazol nicht nur in der kurzen Reaktionszeit sondern auch in der besseren Ausbeute liegt (Tab. 4).

Tab. 4. Vergleich der Kondensationsbedingungen

| Sequenz | d (T-T-Z-C-G-T-C-A-A-A-T-C) | | d (G-A-T-T-T-T-G-A) |
|---|-----------------------------|------|----------------------|
| Kondensationsmittel | TPSNT | MSNT | MSNT/l-Butylimidazol |
| Dauer einer Kondensationsreaktion (min) | 150 | 35 | 10 |
| Dauer eines Kondensationszyklus (min) | 176 | 61 | 18 |
| Durchschnittliche Kondensationsausbeute pro Stufe [%] | 82,5 | 87,1 | 98 |
| Gesamtausbeute nach Abspaltung und Reinigung | 9,1 | 14,2 | 27,1 |

5. Abspaltung vom Träger und Entfernung der Schutzgruppen. – Für die Entfernung der Oligonucleotid-Ketten vom Träger und die vollständige Abspaltung der Schutzgruppen wurde das Reaktionsgut zuerst mit dem Benzaldoximat-Reagens [21] dann mit konz. NH_4OH -Lösung und schliesslich mit $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 behandelt. Für die Abspaltung

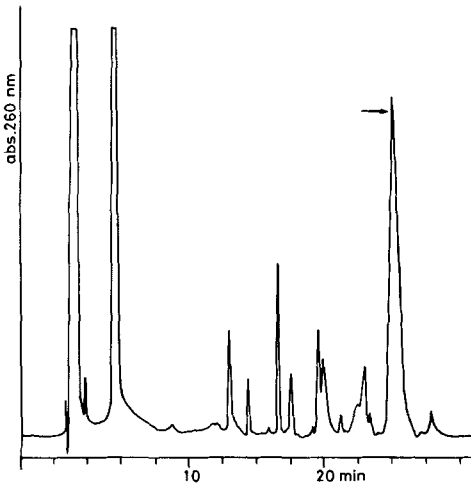


Fig. 1. HPLC-Trennung von rohem d(T-T-Z-C-G-T-C-A-A-A-T-C) (TPSNT als Kondensationsmittel; Partisil SAX)

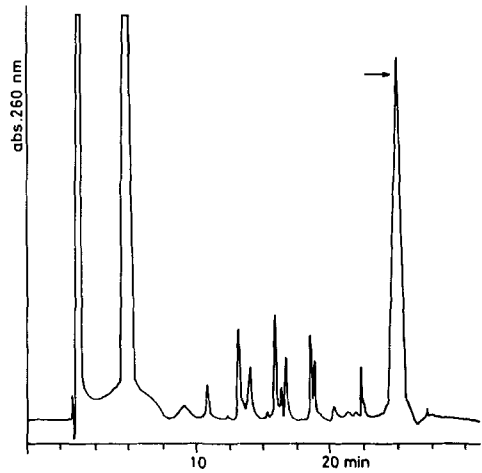


Fig. 2. HPLC-Trennung von rohem d(T-T-Z-C-G-T-C-A-A-A-T-C) (MSNT als Kondensationsmittel; Partisil SAX)

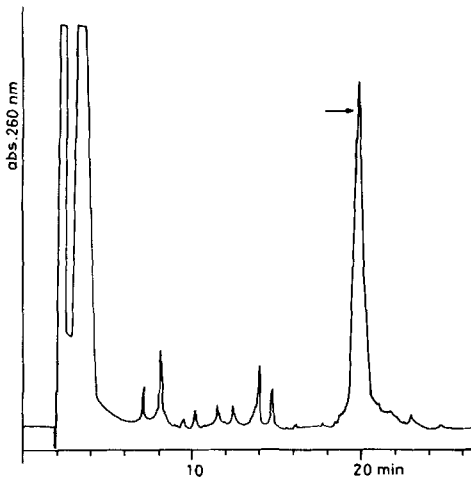


Fig. 3. HPLC-Trennung von rohem d(G-A-T-T-T-T-G-A) (Partisil SAX)

der Ac-Gruppe von der unnatürlichen Baseneinheit bewährte sich beim Tridecameren die Behandlung mit 1N NaOH [4]. Die Analyse und die Reinigung der Rohprodukte erfolgten mittels Anionenaustauscher-HPLC. Die Fig. 1–3 zeigen die HPLC-Profile der Rohprodukte. Entsalzung der entsprechenden Fraktionen wurde mittels HPLC an *RP-18* vorgenommen (s. *Exper. Teil*).

Der enzymatische Abbau mit Phosphodiesterase I aus Schlangengift ergab die erwarteten Spaltprodukte. Die gefundenen Basenverhältnisse stimmten mit den berechneten Werten überein. Die monomeren Spaltungsprodukte wurden mittels HPLC an *RP-18* getrennt, durch Vergleich mit Referenzsubstanzen zugeordnet und quantitativ bestimmt. Die richtige Reihenfolge der Basen im Tridecameren wurde mit Hilfe der Sequenzanalyse³⁾ nach *Maxam* und *Gilbert* [22] bestätigt.

Wir danken dem *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* für die finanzielle Unterstützung.

Experimenteller Teil

Allgemeines. S. [3], ausser den folgenden Änderungen und Ergänzungen: Die Trägersynthesen wurden nach [19] in einer Glassäule mit einem Hahn, in welche eine Glasfritte eingesetzt war, durchgeführt (Fig. 4). Die Reagenzien und Lösungsmittel wurden direkt über *Teflon*-Schlauch-Verbindungen mit Hilfe eines Siphonsystems, in dem ein konstanter und regulierbarer N_2 -Überdruck herrschte, aus den Vorratsgefässen in das Reaktionsgefäss überführt. Die Funktionalisierung und Verknüpfung des Polystyrols mit dem ersten Nucleosid erfolgte nach den publizierten Verfahren [18] [19]. Polystyrol/Divinylbenzol-Harz (1%) (*Bio-Beads S-X1*) von *Bio-Rad Laboratories*,

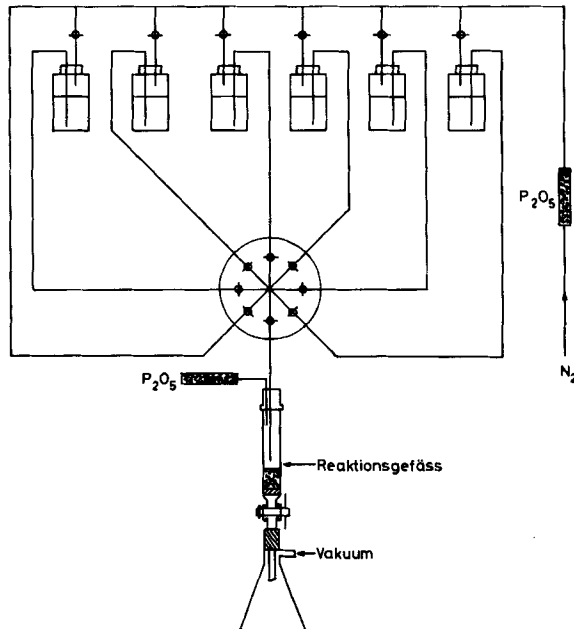


Fig. 4. Apparatur zur chemischen Oligonucleotid-Synthese an polymerem Träger

³⁾ Wir danken Herrn Prof. *Th. A. Bickle*, Abteilung Mikrobiologie des Biozentrums der Universität Basel, bestens für die Durchführung der Analyse.

Richmond, Calif., USA, 1-Butylimidazol und MSNT von *Fluka AG*, Buchs SG. Die Ausbeuten wurden, falls nicht anders erwähnt, gravimetrisch bestimmt. Säulenchromatographie: Kieselgel 60 (0,040–0,063 mm) und Aluminiumoxid 90 (0,063–0,200 mm, standardisiert, Akt. II–III nach *Brockmann*). HPLC: *Lichrosorb Si 60* (7 μ m 250 \times 4,6 mm) von *Knauer*, Berlin; *Partisil PXS 10/25 SAX* (7 μ m 250 \times 4,6 mm) von *Whatman*, New Jersey, USA, μ -*Bondapak C-18* (10 μ m 300 \times 4,6 mm) von *Waters*, Milford, USA; mobile Phase I: 45% MeOH und 0,45% H₂O in CH₂Cl₂; II: linearer Gradient von 0,001M KH₂PO₄ (pH 6,6) bis 0,4M KH₂PO₄ (pH 6,6) je in 10% wässr. Formamid-Lsg. während 30 min; III: linearer Gradient von MeCN/0,1M NH₄OAc (pH 7,0) 20:80 während 15 min; IV: 2,5% MeCN/0,1M NH₄OAc pH 7,0.

4-Acetylamino-1-[2'-desoxy-3',5'-di-O-(*p*-toluoyl)- β -D-ribofuranosyl]-2(1H)-pyridinon (**5**). Das nach [23] erhaltene Anomerengemisch **4/5** wurde an Aluminiumoxid mit CH₂Cl₂/Et₂O/MeOH 40:59:1 getrennt. Produkt **5** war nach DC und HPLC einheitlich und stimmte in den R_f sowie allen spektroskopischen Daten mit einer Referenzprobe [4] überein.

4-Acetylamino-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinon (**6**). Eine Lsg. von 2,55 g (5 mmol) **5** in 100 ml 0,1M NaOMe/MeOH wurde 20 min bei RT. stehen gelassen. Danach wurde mit 20 ml *Dowex 50 W* (H⁺-Form) neutralisiert, der Ionenaustauscher abfiltriert, mit MeOH gewaschen und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig MeOH gelöst und über eine mit 150 g Kieselgel gepackte Säule mit CH₂Cl₂ und steigendem Anteil an MeOH chromatographiert. Bei einem MeOH-Gehalt von 20% wurde **6** (1,28 g, 81%) erhalten. Die chromatographischen und spektroskopischen Daten stimmten mit denjenigen einer Referenzprobe [4] überein.

Mono-, Di- und Trinucleotide. Nach [3] [6]. Detaillierte Angaben zu den einzelnen Kondensationen in Lsg. in *Tab. 1*.

Synthesezyklus bei der Herstellung des Tridecameren. Nach [19]. Spezielle Angaben in *Tab. 2*. Es wurden 50 mg mit Nucleosid beladener Träger (Nucleosid-Gehalt 0,14 mmol je g Träger) eingesetzt.

Synthesezyklus bei der Herstellung des Octameren. S. *Tab. 3*. Zunächst wurden 50 mg Träger, der mit 7,5 mmol [(MeO)₂Tr] bzA_d beladen war, 3mal 25 s mit je 2 ml 3% CHCl₂COOH in CH₂Cl₂ versetzt. Dann wurde das Harz 3mal 10 s mit je 2 ml CH₂Cl₂, 3mal 10 s mit je 2 ml Pyridin gespült und dann i. HV. 5 min getrocknet. Dann gab man das Kupplungsgemisch zu und liess 10 min ohne zu schütteln reagieren. Das Kupplungsgemisch wurde auf folgende Weise hergestellt: 0,08 mmol des Synthese-Bausteins wurde in 2 ml *t*-BuNH₂/Pyridin 1:3 gelöst und nach 10 min unter mehrmaliger Pyridin-Zugabe i. HV. eingedampft. Den Rückstand nahm man in 0,7 ml Pyridin auf. Dabei entstand eine klare Lsg., zu der man 71 mg (0,24 mmol) MSNT und 60 mg (0,48 mmol) 1-Butylimidazol gab. Nach der Kondensation spülte man das Harz 2mal 10 s mit je 2 ml Pyridin und dann 3mal 10 s mit je 2 ml CH₂Cl₂.

d (T-T-Z-C-G-T-C-A-A-A-T-C). Bei 23° wurden 100 μ l 0,5M (*E*)-2-Nitrobenzaloxim und 1,1,3,3-Tetramethylguanidin in Dioxan/H₂O 1:1 zu 10 mg des am Träger gebundenen vollgeschützten Tridecameren bei 23° gegeben. Nach 14 h wurde das Harz abfiltriert und 3mal mit je 200 μ l H₂O/Pyridin 1:1 gewaschen. Das Filtrat wurde unter mehrmaliger Pyridin-Zugabe eingeeengt. Dann gab man 400 μ l konz. NH₄OH-Lsg. zu, hielt das Gemisch verschlossen 12 h bei 50° und dampfte dann i. HV. ein. Der Rückstand wurde in 0,5 ml H₂O aufgenommen und mit 0,5 ml 2M NaOH versetzt. Nach 30 min wurde die alkalische Lsg. mit 1 ml Pyridinium-*Dowex 50* neutralisiert, der Ionenaustauscher abfiltriert und mit 10 ml H₂O/Pyridin 4:1 gewaschen. Das Eluat wurde eingedampft, der Rückstand mit 400 μ l CH₃COOH/H₂O 1:1 versetzt, 30 min bei RT. stehen gelassen und eingedampft. Der Rückstand wurde zwischen H₂O und CHCl₃ verteilt, die wässr. Phase abgetrennt, 5mal mit CHCl₃ gewaschen und dann lyophilisiert. Das Lyophilisat nahm man in 0,5 ml H₂O auf und analysierte es mittels Ionenaustauscher-HPLC (*Partisil*, System II). Das gesamte Material wurde im gleichen Chromatographie-System vorgereinigt und dann auf einer 'reversed-phase'-Säule (μ -*Bondapak C-18*, System III) entsalzt und gereinigt: 1 Pik, Retentionszeit 14,8 min; 12 OD₂₆₀-Einheiten des entschützten Tridecameren.

d (G-A-T-T-T-T-G-A). Die Entfernung der Oligonucleotid-Kette vom Träger und vollständige Abspaltung der Schutzgruppen (ohne Reaktion mit 1M NaOH) sowie Analyse und Auftrennung des Rohprodukts wurden wie oben beschrieben vorgenommen. HPLC (μ -*Bondapak C-18*, System III): 1 Pik, Retentionszeit 15,1 min. Ausbeute: 27,1%.

Enzymatischer Abbau und quantitative Bestimmung der Basen des Tridecameren. Enzymatischer Abbau des Tridecameren nach [6]. Darnach trennte man das Inkubationsgemisch direkt mittels HPLC auf einer 'reversed-phase'-Säule (μ -*Bondapak C-18*, System IV) auf. Lsg. mit bekanntem Gehalt an den entsprechenden Nucleosidmonophosphaten und dem Nucleosid T_d wurden als externe Standards zur Eichung der Pikflächeneinheiten verwendet. Somit wurden die Basenverhältnisse durch Flächenvergleich wie folgt ermittelt: pC_d/pZ_d/pT_d/pG_d/pA_d/T_d 2,9:1,1:2,9:1,0:4,2:1,1.

Enzymatischer Abbau und quantitative Bestimmung der Basen des Octameren. Es wurde wie beim Tridecameren vorgegangen. Basenverhältnisse: pT_d/pG_d/pA_d/G_d 4,2:0,9:1,8:1,1.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. Charczuk, Ch. Tamm, B. Suri, Th. A. Bickle, *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 9530.
- [2] a) N. Cerletti, Dissertation, Universität Basel, 1976; b) IUPAC/IUB, *Pure Appl. Chem.* **1974**, *40*, 279.
- [3] S. De Bernardini, G. Graf, C. A. Leach, P. Bühlmeier, F. Waldmeier, Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1983**, *66*, 639.
- [4] M. Wachtl, Dissertation, Universität Basel, 1980.
- [5] a) B. L. Currie, R. K. Robins, M. J. Robins, *J. Heterocycl. Chem.* **1970**, *7*, 23; b) *ibid.* **1977**, *14*, 475.
- [6] R. Altermatt, Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 475.
- [7] R. Wetzel, H. L. Heyneker, D. V. Goeddert, P. Jhurani, J. Shapiro, R. Crea, T. L. K. Low, J. E. McClure, G. B. Thurman, A. L. Goldstein, *Biochemistry* **1980**, *19*, 6096.
- [8] H. M. Hsiung, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 5119.
- [9] J. Stawinski, T. Hozumi, S. A. Narang, *Can. J. Chem.* **1976**, *54*, 670.
- [10] F. Waldmeier, S. De Bernardini, C. A. Leach, Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 2472.
- [11] J. F. M. de Roij, G. Wille-Hazeleger, P. H. von Deursen, J. Serdjiin, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1981**, *100*, 320.
- [12] C. B. Reese, R. C. Titmas, L. Yan, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *30*, 2729.
- [13] A. K. Seth, E. Jay, *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 5445.
- [14] V. A. Efimov, S. V. Reverdatto, O. G. Chakhmakhcheva, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 961.
- [15] B. S. Sproat, W. Bannwarth, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5771.
- [16] V. A. Efimov, O. G. Chakhmakhcheva, V. A. Ovchinnikov, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 3651.
- [17] M. J. Gait, R. C. Sheppard, *Nucleic Acids Res.* **1977**, *4*, 1135; M. J. Gait, H. W. D. Matthes, M. Singh, B. S. Sproat, R. Titma, *ibid.* **1982**, *10*, 6243; M. H. Caruthers, S. L. Beaucage, J. W. Efcavitch, E. F. Fischer, M. D. Matteucci, Y. Stobinsky, *ibid.* **1980**, *7*, 215; H. Köster, J. Biermat, J. McManus, A. Walter, A. Stumpe, Ch. K. Narang, N. D. Sintha, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 103; J. Ott, F. Eckstein, *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 9137.
- [18] A. R. Mitchell, S. B. H. Kent, B. W. Erickson, R. B. Merrifield, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *42*, 3795.
- [19] H. Ito, Y. Ike, S. Ikuta, K. Itakura, *Nucleic Acids Res.* **1982**, *10*, 1755.
- [20] B. S. Sproat, W. Bannwarth, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5771.
- [21] C. B. Reese, L. Zard, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 4611.
- [22] A. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 560.
- [23] W. C. Shill, M. Kahn, A. Mitro, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923.