

OLIGONUCLEOTIDE III⁺)

SYNTHESE VON URIDYLYL - (3'→5')-URIDYLYL-(3'→5')-URIDIN
UND CYTIDYLYL-(3'→5')-URIDYLYL-(3'→5')-URIDIN.

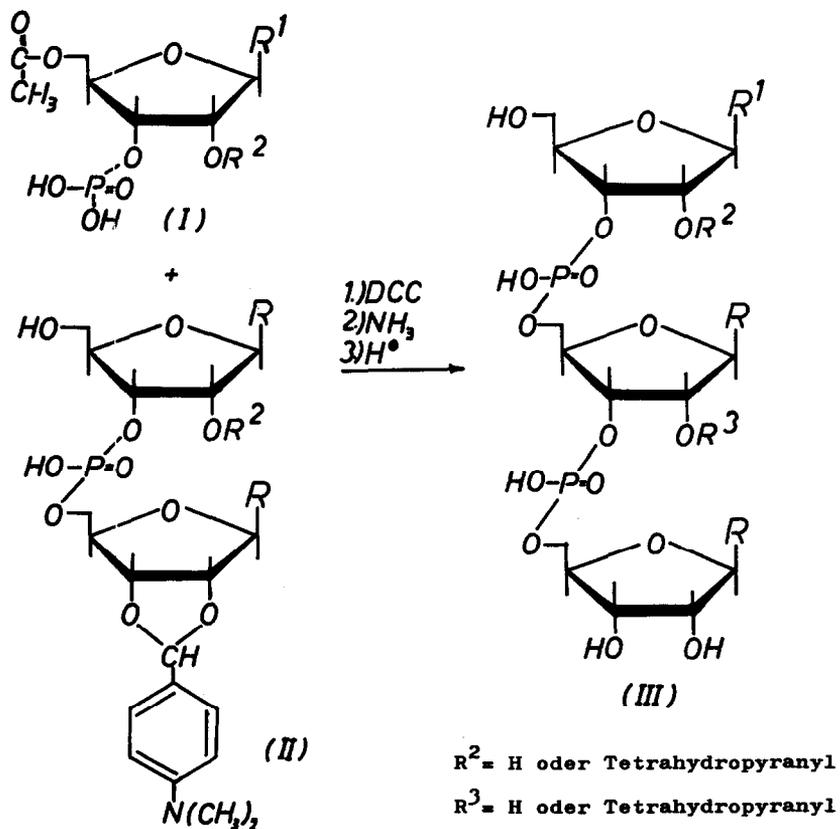
von F. Cramer und S. Rittner

Chemische Abteilung der Medizinischen Forschungsanstalt
der Max-Planck-Gesellschaft Göttingen und Institut für
Organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt

(Received 2 November 1963)

Nachdem in unserem Laboratorium die erste Synthese eines
Ribodinucleotides mit 3'-endständiger Phosphatgruppe¹⁾ und
die Darstellung eines Dinucleotides mit 5'-endständiger
Phosphatgruppe²⁾ gelungen war, teilen wir nun die Synthese
zweier Trinucleosid-diphosphate mit; nämlich des UpUpU und
CpUpU³⁾.

Bei Oligonucleotidsynthesen in der Ribosereihe muss die
2'-OH-Gruppe des Zuckers spezifisch geschützt werden: dies
kann entweder durch die Acetyl-Gruppe⁴⁾ oder durch die Tetra-
hydropyranyl-Gruppe geschehen⁵⁾⁶⁾. Beide Möglichkeiten sind
für Ribooligonucleotidsynthesen⁴⁾⁷⁾ verwendet worden. Wir
haben zum Schutz des 5'-Hydroxyls den Acetylrest, zum Schutz
des 2'-Hydroxyls den Tetrahydropyranylrest, und zum Abdecken
der 2',3'-Hydroxyle die p-Dimethyl-aminobenzalgruppe ver-
wendet.



R = Uracyl

R¹ = Uracyl, Cytosyl oder N-Acetylcytosyl

R² = Tetrahydropyranyl

50 μMol 5'-O-Acetyl-2'-O-tetrahydropyranyluridin-3'-phosphat bzw. 5'-O-Acetyl-N-Acetyl-2'-O-tetrahydropyranylcytidin-3'-phosphat (I) wurden mit 11,2 μMol 2',3'-O-(4-dimethylaminobenzyliden)-uridylyl-(5' \rightarrow 3')-2'-O-tetrahydropyranyluridin (II) in Gegenwart von DCC kondensiert. Das geschützte Trinucleosid-diphosphat wurde zunächst mit Ammoniak zur Entfernung der Acetyl-

schutzgruppen und anschliessend mit 50%iger Essigsäure bei 100° 16 Min. lang zur Entfernung der Tetrahydropyranyl- sowie Benzalgruppe behandelt. Das in 30,5%iger Ausbeute entstandene, noch teilweise geschützte UpUpU ($R_F = 0,06$) (III, R^1 -Uracyl, R^2 und $R^3 = H$ oder Tetrahydropyranyl), sowie das in 21%iger Ausbeute gebildete CpUpU (III, R^1 -Cytosyl, R^2 und $R^3 = H$ oder Tetrahydropyranyl) ($R_F = 0,04$; $\lambda_{max} = 263$ bei pH 6,5 und 267 bei pH = 1, $\lambda_{min} 238$ bei pH 6,5 und 237 bei pH = 1) wurden papierchromatographisch⁸⁾ gereinigt.

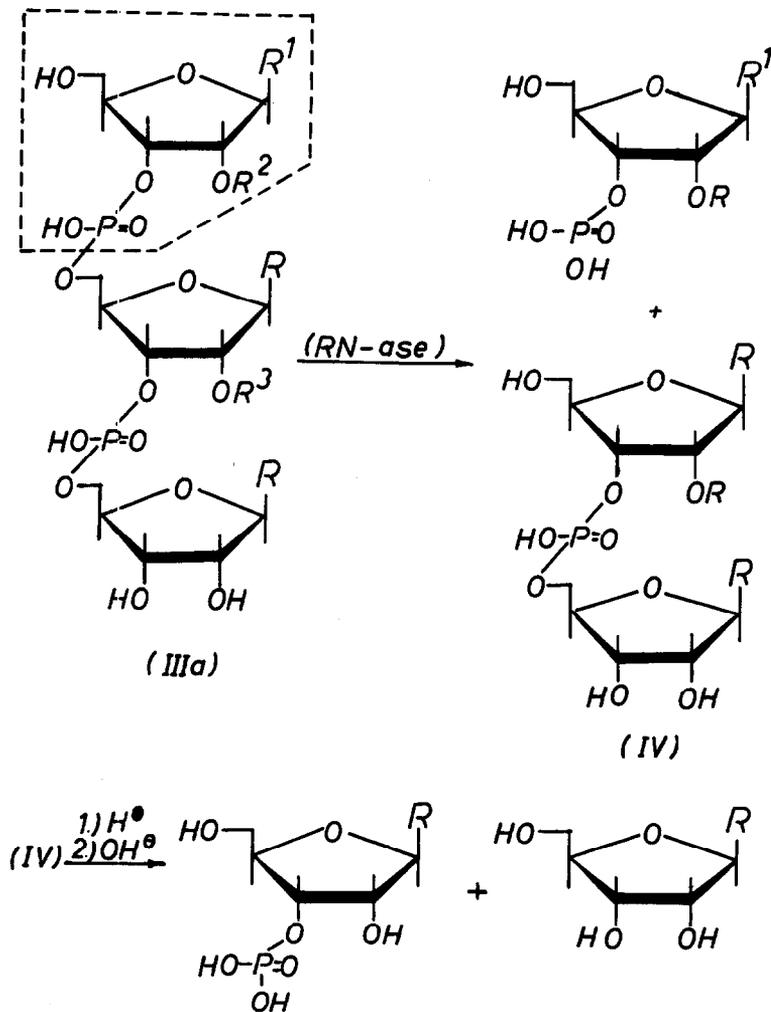
In beiden Fällen liessen sich die Tetrahydropyranylgruppen nur unvollständig entfernen; offenbar ist also die Abspaltung dieser Schutzgruppen bei Anwesenheit von mehr als einer Internucleotidbindung erschwert⁴⁾.

Durch enzymatische Abbauprobieren mit Ribonuclease und Schlangengift konnten die beiden, noch Tetrahydropyranylgruppen enthaltenden isomeren Trinucleosid-diphosphate IIIa und IIIb (IIIa, $R^1 = Uracyl$, $R^2 = H$ und $R^3 = Tetrahydropyranyl$, sowie IIIb, $R^1 = Uracyl$, $R^2 = Tetrahydropyranyl$ und $R^3 = H$) nachgewiesen werden.

Abbau mit Ribonuclease und Alkali

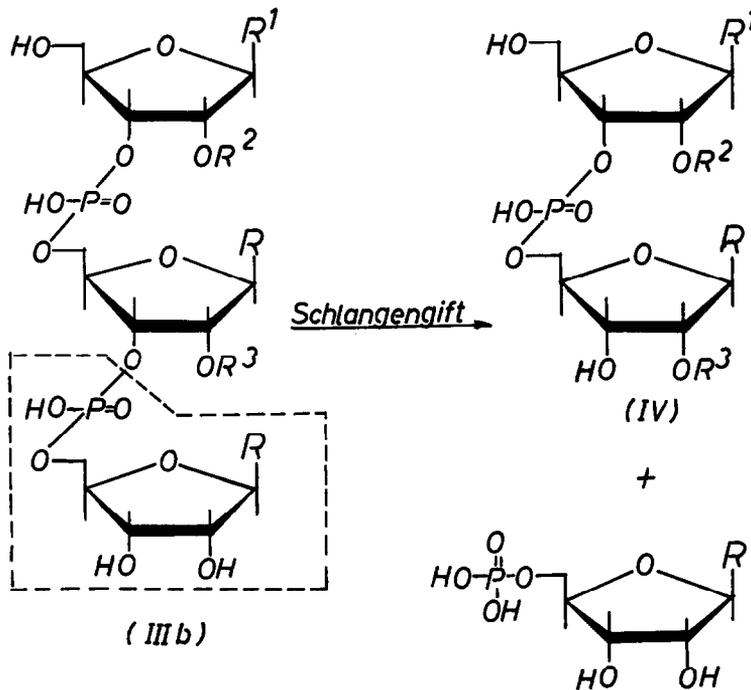
10 optische Dichteeinheiten (OD) von (III, $R^1 = Uracyl$) ($E = 260 m\mu$) wurden lyophilisiert, in 50 λ H₂O gelöst, mit 25 λ Trispuffer (pH = 8) versetzt und 10 λ Ribonucleaselösung (50 μ g) zugegeben. Diese Lösung wurde parallel mit einem Blindversuch 20 h bei 37° inkubiert. Anschliessend im 7:1:2-Gemisch⁸⁾ chromatographiert. Durch nochmalige Behandlung des Fleckens vom R_F -Wert 0,32 (Uridyl-(5'→3')-2'-O-tetrahydropyranyluridin, IV, $R^3 = Tetrahydropyranyl$) mit 50%iger Essigsäure 12 Min. bei

100° und alkalische Hydrolyse (0.3 m. KOH, 37° 24 h) konnten 3'-Uridylsäure und Uridin in einem Verhältnis von 1,1:1 nachgewiesen werden:



Abbau mit Schlangengift

10. (OD) von (III, $R^1 = \text{Uracyl}$) wurden lyophilisiert, in wenig H_2O gelöst und mit 25λ Trispuffer (pH = 8,9) und 50λ Schlangengift ($5\ \mu\text{g}$ Protein/20 ml) versetzt. Anschliessend wurde 6 h bei 37° inkubiert und im 7:1:2-Gemisch chromatographiert. Mono-



nucleotid zu geschütztem Dinucleotid IV ($R^2 = \text{Tetrahydro-pyranyl}$, $R^3 = \text{H}$) ($R_F = 0,32$) berechneten sich als Verhältnis 1,15 : 1.

Wir danken Herrn Dr. G. Weimann für wertvolle Hinweise und Anregungen.

LITERATUR

- 1) F. Cramer, K.H. Scheit, Angew. Chem. 74, 717 (1962)
- 2) F. Cramer, H. Küntzel, S. Rittner, Angew. Chem. im Druck
- 3) Bezeichnung nach J.Biol.Chem.
- 4) D.H. Rammler, Y.Lapidot, H.G.Khorana, J.Am.Chem.Soc. 85, 1991 (1963)
- 5) M. Smith, H.G. Khorana, J.Am.Chem.Soc. 81, 2911 (1959)
- 6) J. Smrt, F. Sorm, Coll.czech.chem.Comm. 27, 173 (1962)
- 7) Y. Lapidot, H.G. Khorana, J.Am.Chem.Soc. 85, 1363 (1963)
- 8) Wir verwendeten das 7:1:2(i-Prop.Konz. $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) Gemisch
- +) I. Mitteilung: F. Cramer, Angew.Chem. 73, 49 (1961)
II. Mitteilung: F. Cramer, K.H.Scheit, Angew.Chem. 74, 717
(1962)