

OLIGONUCLEOTIDE V<sup>+</sup>)

SYNTHESE VON GUANYLYL-(3'-5')-URIDYLYL-(3'-5')-CYTIDIN

von K.H. Scheit und F. Cramer

Chemische Abteilung der Medizinischen Forschungsanstalt  
der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen.

(Received 4 August 1964)

Kürzlich berichteten wir über die Synthese von Uridylyl-(3'-5')-uridylyl-(3'-5')-uridin<sup>1)</sup> (UpUpU)<sup>2)</sup>, andere Arbeitskreise synthetisierten UpUpU, ApUpU, UpApUpU<sup>3-5)</sup> und CpUpA<sup>6)</sup>. Wir teilen heute die Synthese eines Trinucleosiddiphosphates mit, welches am Anfang der Kette einen Guanylrest besitzt. T<sub>1</sub>-Ribonuclease hydrolysiert in RNS spezifisch die (3'-5')-Internucleotidbindung neben Guanosin-3'-Phosphaten<sup>7)</sup>. Dieses Enzym besitzt außerdem eine beachtliche synthetische Aktivität, wobei Guanosin-2'.3'-cyclophosphat als Substrat dient<sup>8)</sup>. In Gegenwart von Nucleosiden entstehen dabei die entsprechenden Dinucleosidphosphate, ohne daß außerdem Oligoguanylsäuren gebildet werden. Wir haben versucht, in dieser Reaktion ein Nucleosid durch ein Dinucleosidphosphat zu ersetzen. Zu diesem Zweck synthetisierten wir Uridylyl-(3'-5')-cytidin aus 5'.2'-O-Diacetyl-uridin-3'-phosphat und 2'.3'-O-(2.4)-Dimethoxybenzyliden-N<sup>6</sup>-benzoylcytidin mit DCC als Kondensationsmittel. Nach Abspaltung der Schutzgruppen unter milden

Bedingungen isolierten wir Uridylyl-(3'-5')-cytidin in einer Ausbeute von 41 % bezogen auf eingesetztes Uridylsäure-Derivat. Dieses Dinucleosidphosphat wurde zusammen mit Guanosin-2'.3'-cyclophosphat mit  $T_1$ -Ribonuclease inkubiert unter Bedingungen, wie sie für die Synthese von Dinucleosidphosphaten angegeben wurden<sup>8)</sup>.

Durch präparative Papierchromatographie wurde ein Oligonucleotid isoliert, das aufgrund seines chemischen, chromatographischen und enzymatischen Verhaltens die Sequenz GpUpC besitzt. Bei der enzymatischen Hydrolyse mit Pankreas-Ribonuclease entsteht ein Guanylsäure enthaltendes Oligonucleotid sowie Cytidin. Spaltung: GpUpC  $\longrightarrow$  GpUp + C. Mit  $T_1$ -Ribonuclease entsteht 3'-Guanylsäure und UpC im Verhältnis 1 : 1. Spaltung: GpUpC  $\longrightarrow$  Gp + UpC.

#### Experimenteller Teil

Guanosin-2'.3'-cyclophosphat wurde nach Angaben von H.G. Khorana et al. hergestellt<sup>3)</sup>. Die Reaktionsmischung wurde nach Abtrennung des DCC und des Dicyclohexylharnstoffes einer Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose unterworfen. Dadurch wurde die nicht umgesetzte Guanylsäure abgetrennt.

2'.5'-0-Diacetyluridin-3'-phosphat und 2'.3'-0-(2.4-Dimethoxy)-benzyliden-N<sup>6</sup>-benzoyl-cytidin: Über die Herstellung wird an anderer Stelle berichtet<sup>3)10)</sup>.

Uridylyl-(3'-5')-cytidin: Die Synthese erfolgte aus äquimolaren Mengen 2'.5'-0-Diacetyluridin-3'-phosphat und 2'.5'-0-(2.4-Dimethoxy)-benzyliden-N<sup>6</sup>-benzoylcytidin mit DCC als Kondensationsmittel. Die Reaktionsbedingungen und die Aufar-

beitung sind der Darstellung des Uridylyl-3'-5'-adenosins analog<sup>11)</sup>. Die Schutzgruppen wurden durch Behandlung mit konzentriertem Ammoniak/Dioxan = 1/1 (48 Std. bei Raumtemperatur) und mit 80%iger Essigsäure (2 Std. bei Raumtemperatur) abgespalten. Das Dinucleosidphosphat wurde durch Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose unter Verwendung eines Triäthylammoniumbicarbonatpuffers isoliert. (Ausbeute 41 %).

Enzymatische Synthese von GpUpC: 6,5 µMol Guanosin-2'.3'-cyclophosphat (Triäthylammoniumsalz), 20 µMol Uridylyl-(3'-5')-cytidin wurden in 0,1 ml Tris-Puffer-pH 7 [0,05 m] gelöst. Die Lösung wurde 24 Std. bei 2° mit 1 µg T<sub>1</sub>-Ribonuclease inkubiert, anschließend wurde das Enzym durch Schütteln der Lösung mit 0,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol = 1/1 inaktiviert. Die wäßrige Phase wurde auf Papier aufgetragen (Schleicher und Schüll 2043 b gew.) und das Chromatogramm mit dem Laufmittel n-Propanol/konz.Ammoniak/Wasser = 55/10/35 entwickelt. Neben G-3'p (Rf 0,34); UpC (Rf 0,50), G-2'.3'-cyclophosphat (Rf 0,64) zeigte sich im UV eine neue Substanz (Rf 0,20). Der entsprechende Streifen wurde ausgeschnitten und mit wenig Wasser eluiert. Ausbeute: 15 OD-Einheiten bei 257 mµ.

Charakterisierung der Substanz mit dem Rf-Wert 0,20 durch enzymatische Hydrolyse

a) Mit Pankreas-Ribonuclease:

6 OD-Einheiten Substanz und 100 µg RNase in 0,15 ml Tris-Puffer-pH 7 [0,05 m] wurden 24 Std. bei 37° inkubiert. Das Chromatogramm der Hydrolyselösung in dem angegebenen Laufmittel zeigte zwei neue Substanzen mit den Rf-Werten 0,11 und 0,58 neben sehr wenig Ausgangsmaterial.

b) Mit  $T_1$ -Ribonuclease:

6 OD-Einheiten der Substanz und 0,5  $\mu$ g  $T_1$ -RNase wurden in 0,1 ml Tris-Puffer-pH 7 [0,05 m] gelöst und 24 Std. bei 37° inkubiert. Das Chromatogramm der Hydrolyselösung zeigte nur zwei neue Substanzen mit den Rf-Werten 0,24 und 0,38 im Verhältnis 1 : 1.

Tabelle der Rf-Werte

Laufmittel: n-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH/NH<sub>3</sub> konz./H<sub>2</sub>O = 55/35/10

|                              |      |
|------------------------------|------|
| Uridin-3'-phosphat           | 0,36 |
| Guanosin-3'-phosphat         | 0,29 |
| Cytidin                      | 0,56 |
| Uridylyl-(3'-5')-cytidin     | 0,42 |
| Guanosin-2'.3'-cyclophosphat | 0,49 |

- 1) F.Cramer, S.Rittner, Tetrahedron Letters [London] (1964)  
107
- 2) Bezeichnung nach J.Biol.Chem.
- 3) D.H.Rammler, Y.Lapidot, H.G.Khorana, J.Amer.Chem.Soc.  
85, 1989 (1963)
- 4) Y.Lapidot, H.G.Khorana, J.Amer.Chem.Soc. 85, 3852 (1963)
- 5) Y.Lapidot, H.G.Khorana, J.Amer.Chem.Soc. 85, 3857 (1963)
- 6) S.Chladek, J.Smrt, Collect.czechoslov.chem.Commun.  
29, 214 (1964)
- 7) K.Sato, F.Egami, J.Biochemistry (Tokyo) 44, 753 (1957)
- 8) K.Sato, F.Egami, Biochim.biophysica Acta [Amsterdam]  
29, 655 (1958)
- 9) M.Smith, J.G.Moffat, H.G.Khorana, J.Amer.Chem.Soc.  
80, 6204 (1958)
- 10) F.Cramer, W.Saenger, K.H.Scheit, J.Tennigkeit  
Liebigs Ann.Chem. im Druck
- 11) 4. Mitteilung: F.Cramer, H.J.Rhaese, S.Rittner, K.H.Scheit  
Liebigs Ann.Chem. im Druck

†) Siehe vorstehendes Zitat