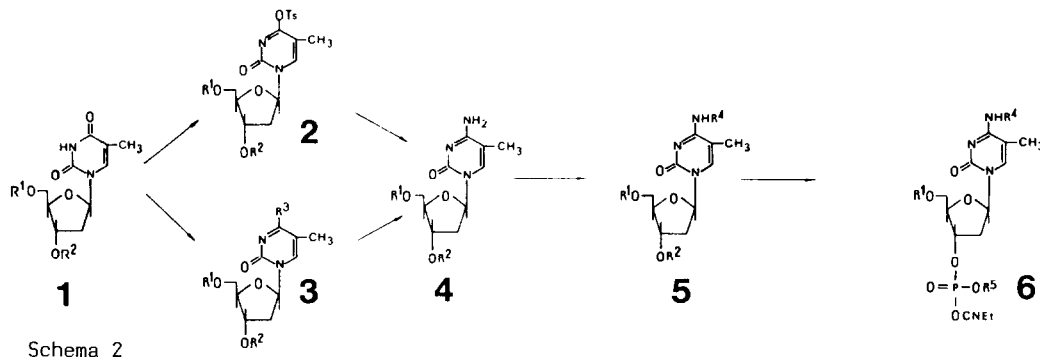


synthetisiert wurden. Die vollgeschützten Desoxyuridin- und 5-Bromdesoxyuridin-Nucleotide (MeO)TrdUp(ClPh,CNEt) bzw. (MeO)TrdBr⁵Up(ClPh,CNEt) wurden aus dU (Boehringer, Mannheim) bzw. aus dBr⁵U (Ferak, Berlin) durch Monomethoxytritylierung und Phosphorylierung nach üblichen Methoden¹⁹ erhalten und fielen als Öle an. Erst nach Abspalten der (MeO)Tr-Gruppe ließen sich Schäume isolieren. Um zum vollgeschützten 5-Methyl-2'-desoxycytidin-Nucleotid 6 ($R^1=(\text{MeO})\text{Tr}$, $R^4=\text{Bz}$, $R^5=\text{ClPh}$) zu gelangen, muß zunächst ein geeignet geschütztes Thymidin-Derivat 1 ($R^1=(\text{MeO})\text{Tr}$, $R^2=\text{Lev}$) in das 5-Methyl-2'-desoxycytidin 4 ($R^1=(\text{MeO})\text{Tr}$, $R^2=\text{Lev}$) überführt werden. Nach Schema 2 (Weg a) wird 1 mit Natriumhydrid und Tosylchlorid zur 4-O-Tosylthymidin-Verbindung 2 ($R^1=(\text{MeO})\text{Tr}$, $R^2=\text{Lev}$) umgesetzt²⁰. Dagegen kann, einer Methode von Reese et al.²¹ folgend, 1 nach Weg b auch mit Arylsulfo-3-nitro-1,2,4-triazolid bzw. nach Sung¹⁰ mit Chlorphenylphosphorsäuredichlorid im Gemisch mit Triazol oder Tetrazol zum 5-Methyl-4-azolid-2-pyrimidinon-Nucleosid 3 ($R^1=(\text{MeO})\text{Tr}$, $R^2=\text{Lev}$, $R^3=\text{Triazol}$, Tetrazol, Nitrotriazol) reagieren. Ammonolyse mit trockenem NH_3 in CHCl_3 oder Dioxan von 2 oder 3 führt zu 4, das problemlos an Kieselgel gereinigt werden kann. Nach Benzoylierung der exocyclischen Aminofunktion von 4 erhält man 5 ($R^1=(\text{MeO})\text{Tr}$, $R^2=\text{Lev}$, $R^4=\text{Bz}$), aus dem durch Abspalten der Levulinoylgruppe und nachfolgender Phosphorylierung nach¹⁹ schließlich 6 in hoher Reinheit gewonnen werden kann.



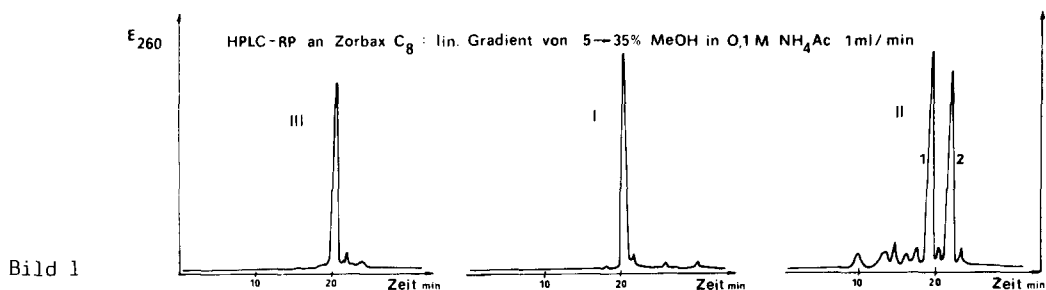
Schema 2

Die Verwendung von 6 im Triester-Verfahren zum Einbringen von dm^5C in synthetische DNA-Abschnitte hat gegenüber einem von Sung^{10a} vorgeschlagenen Verfahren, das den Einbau von vollgeschützten 5-Methyl-4-azolid-2-pyrimidinon-nucleosid-3'-phosphorsäuretriester in die wachsende DNA-Kette vorsieht, mehrere Vorteile. Erstens ist 6 durch die Synthese nach Schema 2 in hoher Reinheit erhältlich. Nach^{10a} wird dagegen erst am Ende der Synthese eines Oligonucleotides durch Ammonolyse 5-Methylcytosin erzeugt, wobei im Fall unvollständiger Umwandlung modifizierte Basen im DNA-Fragment verbleiben und zu einem nicht trennbaren Produktgemisch führen. Zweitens kann nur 6 ($R^1=\text{H}$, $R^4=\text{Bz}$, $R^5=\text{ClPh}$) problemlos in schnellen Triester-Festphasensynthesen in 5'-3' Richtung^{9,22} eingesetzt werden, da es gegenüber starken Basen wie 0,1 M Tetramethylguanidin zum wiederholten Abspalten der 3'-CNEt-Gruppe stabil ist.

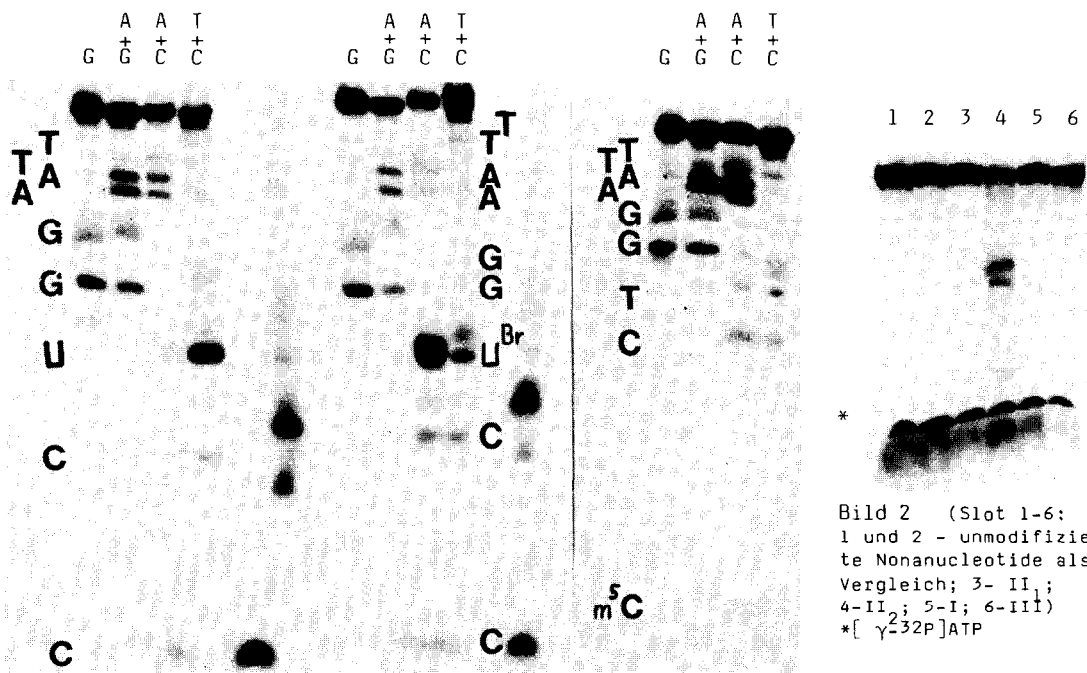
Alle zum Aufbau der Nonanucleotide I, II und III nötigen Triesterblöcke wurden unter Verwendung der (MeO)Tr-Gruppe zum Schutz der 5'-OH Funktion sowie mit Hilfe des Kondensationsmittels IPS/1-Methylimidazol²³ (1:3) in Pyridin mit Ausbeuten von 70-90% in 5-10 min synthetisiert. Im jeweilig letzten Kondensationsschritt kamen 30 μmol Trinucleotidblock (Phosphat-) und 20 μmol Hexanucleotidblock (OH-Komponente) zum Einsatz. Zur schnellen Kontrolle der Nucleotidverknüpfung haben wir die qualitative Basenzusammensetzung aller DNA-Triesterblöcke (Tri- bis Nonamere) nach Reinigung an Kieselgel mit Hilfe der Pyrolyse-Massenspektrometrie

bestimmt und bestätigen können. Die seltenen Nucleoside wurden in Form folgender Fragmentionen nachgewiesen: dU (m/e 69, 112), dBr⁵U (m/e 147/149, 190/192), dm⁵C (m/e 152, 201, 229, 309)²⁴. Im Verlauf der Synthesen wurde die (MeO)Tr-Gruppe mit 10% CCl₃COOH in CHCl₃ bei -20°C innerhalb von 5 min und die CNet-Gruppe mit Pyridin/Et₃N/H₂O (3:1:1 v/v/v) in 30 min abgespalten.

Am Ende der Synthesen wurden alle Schutzgruppen entfernt (1. NH₂ in Pyridin bei 50°C in 15 h; 2. 80% Essigsäure bei 20°C in 10 min) und die Nonanucleotide (zwischen 80-150 OD₂₆₀) durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose 52 isoliert. Nach Entsalzung erfolgte eine Feinreinigung durch RP-HPLC an einer Zorbax C₈-Säule (Bild 1). Während die Nonanucleoti-



de I und III die erwartete Reinheit zeigten, führt die üblicherweise angewendete Prozedur der Schutzgruppenabspaltung für das dBr⁵U enthaltende Oligonucleotid II zu einem Produktgemisch mit zwei Hauptkomponenten (II₁ und II₂). Nach Markierung aller Fraktionen I, II₁, II₂ und III mit [γ -³²P]ATP und Polynucleotid-Kinase und ihrer Auftrennung durch 20% PAA-Gelelektrophore-



se (Bild 2) wurden die Nonanucleotide I, II₁ und III nach Maxam und Gilbert²⁵ sequenziert und zeigten die erwartete Struktur (Bild 3 a-c). Damit wurde u.E. erstmalig diese Methode auf Oligonucleotide mit den abgewandelten Basen m⁵C, U und Br⁵U angewendet. Unerwarteterweise reagiert dm⁵C im Oligonucleotid III zwar schwach aber merklich mit Hydrazin (Bahn T+C in Bild 3c)²⁶. dU zeigt im Vergleich zu dT eine sehr starke Reaktion mit Hydrazin (Bahn T+C in Bild 3a). dBr⁵U kann dagegen durch eine sehr intensive Bande in der A+C-Reaktion identifiziert werden, die auf Spaltung der N-glykosidischen Bindung sowie der DNA-Kette durch NaOH zurückzuführen ist (Bild 3b). Enzymatisch aus den Sequenzen I, II, III sowie d(CCAGGAGCT) synthetisierte DNA-Duplexe dienen gegenwärtig der Untersuchung des Einflusses der Basenmodifikation auf die Erkennung durch die Eco RII Restriktions- und Modifikations-(R/M)-Enzyme.

Literatur

1. R. Charubala und W. Pfeleiderer (1978) Nucl. Acids Res. Sympos. Series Nr. 4, s97; R. Charubala und W. Pfeleiderer (1979) Helv. Chim. Acta 62, 1179.
2. N. Cerletti und C. Tamm (1977) Helv. Chim. Acta 60, 1181; F. Waldmeier und C. Tamm (1978) *ibid.* 61, 1648; S. De Bernardini, G. Graf, C.A. Leach, P. Bühlmyer, F. Waldmeier und C. Tamm (1983) *ibid.* 66, 639.
3. H.-D. Schneider und C. Tamm (1983) *ibid.* 66, 350.
4. S. Kuzmich, L.A. Marky und R.A. Jones (1983) Nucl. Acids Res. 11, 3393.
5. R. Charubala und W. Pfeleiderer (1982) Tetrahedron Letters 4789.
6. P. Dwyer-Hallquist, F.J. Kézdy und K.L. Agarwal (1982) Biochemistry 21, 4693.
7. A.V. Fratini, M.L. Kopka, H.R. Drew und R.E. Dickerson (1982) J. Biol. Chem. 257, 14686.
8. P.J. Greene, M.S. Poonian, A.L. Nussbaum, L. Tobias, D.E. Garfin, H.W. Boyer und H.M. Goodman (1975) J. Mol. Biol. 99, 237.
9. A. Rosenthal, D. Cech, V.V. Gorn und V.F. Zarytova (1984) Z. Chem. 24, 65.
10. W.L. Sung (1981) Nucl. Acids Res. 9, 6139; W.L. Sung (1981) J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1089.
11. G.A. van der Marel, G. Wille, H. Westerink, A.H.-J. Wang, A. Rich, J.R. Mellema, C. Altona und J.H. van Boom (1982) Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 101, 77.
12. M. Behe und G. Felsenfeld (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1619.
13. S. Fujii, A.H.-J. Wang, G.A. van der Marel, J.H. van Boom und A. Rich (1982) Nucl. Acids Res. 10, 7879; B. Hartmann, N.T. Thuong, J. Pouyet, M. Ptak und M. Leng (1983) *ibid.* 11, 4453.
14. M. Goppelt, A. Pingould, G. Maass, H. Mayer, H. Köster und R. Frank (1980) Eur. J. Biochem. 104, 101.
15. V.V. Zinoviev, J.A. Gorbunov, M.M. Baclanov, S.G. Popov und E.G. Malygin (1983) FEBS Lett. 154, 282.
16. A.A. Yolov, E.S. Gromova, E.A. Romanova, T.S. Oretskaya, A.A. Oganov, Ya.I. Buryanov und Z.A. Shabarova (1984) FEBS Lett. 167, 147.
17. K.L. Berkner und W.R. Folk (1977) J. Biol. Chem. 252, 3185; P. Modrich und R.A. Rubin *ibid.*, 7273; B. Hofer und H. Köster (1980) Nucl. Acids Res. 8, 6143; L.-H. Huang, C.M. Farnet, K.C. Ehrlich und M. Ehrlich (1982) *ibid.*, 10, 1579.
18. J. Petruska und D. Horn (1983) *ibid.*, 11, 2495.
19. S.A. Narang, R. Brousseau, H.M. Hsiung und J.J. Michniewicz (1980) Methods in Enzymol. 65, 610.
20. D. Bärwolff Dtsch. Wirtsch. Pat. (DDR) 140254 (4.12.1978).
21. C.B. Reese und A. Ubasawa (1980) Nucl. Acids Res. Sympos. Series Nr. 7, 5; S.S. Jones, C.B. Reese, S. Sibanda und A. Ubasawa (1981) Tetrahedron Letters 4755.
22. A. Rosenthal, D. Cech, V.P. Veiko, T.S. Orezkaja, E.A. Kuprijanova und Z.A. Shabarova (1983) Tetrahedron Letters 1691; A. Rosenthal, D. Cech, V.P. Veiko und Z.A. Shabarova (1983) Z. Chem. 23, 178.
23. V.A. Efimov, S.V. Reverdatto und O.G. Chakhmakhcheva (1982) Tetrahedron Letters 961; A. Rosenthal, D. Cech, V.P. Veiko, Z.A. Shabarova und T.S. Orezkaja (1983) J. Prakt. Chem. 325, 764.
24. L. Alder, A. Rosenthal und D. Cech (1983) Nucl. Acids Res. 11, 8431; A. Rosenthal, D. Cech und L. Alder (1984) Nucl. Acids Res. Sympos. Series, im Druck.
25. A.M. Maxam und W. Gilbert (1980) Methods in Enzymol. 65, 499.
26. H. Ohmori, J. Tomizawa und A.M. Maxam (1978) Nucl. Acids Res. 8, 1479.

(Received in Germany 8 May 1984)