

Synthese von Oligo- und Polynucleotiden, XIV¹⁾

Darstellung von Desoxy-oligonucleotiden mit 2'.3'-[2.4-Dimethoxy-benzyliden]-uridin als Phosphat-Schutzgruppe

von Faizulla Kathawala und Friedrich Cramer

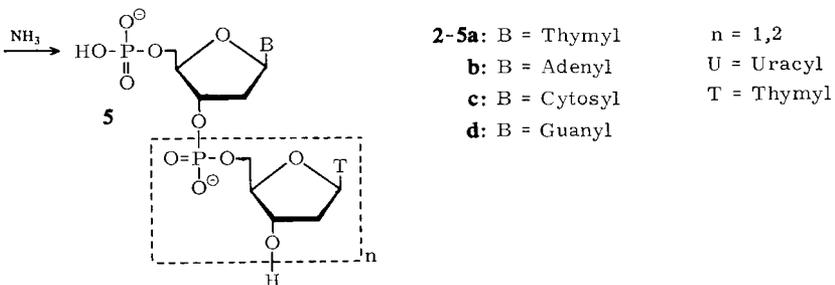
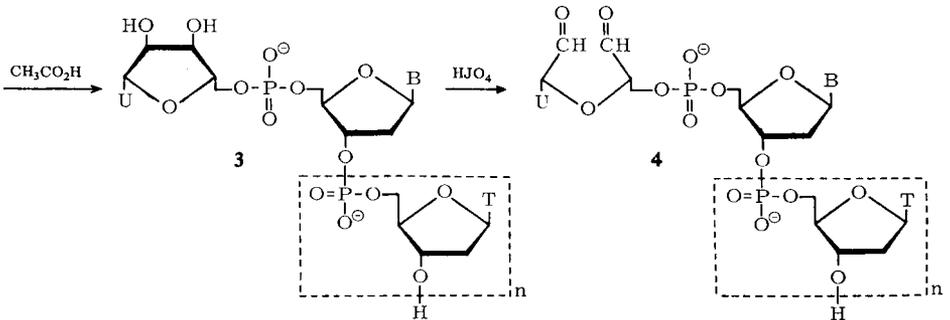
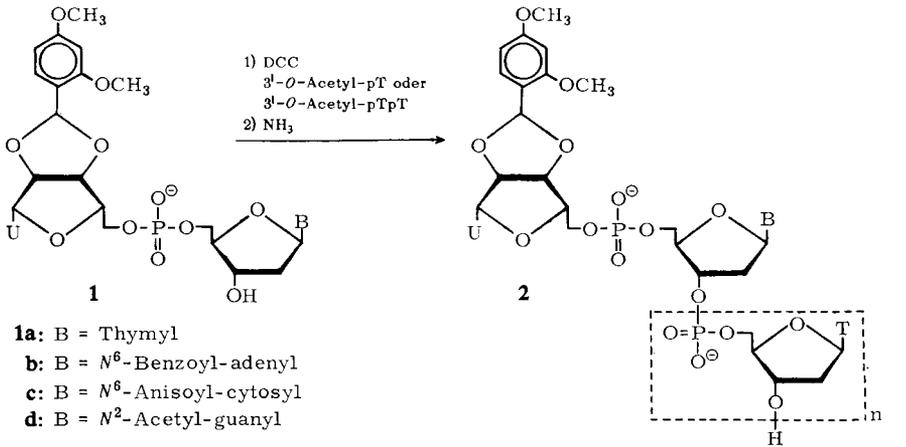
Aus dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen
Eingegangen am 4. August 1967

Anhand der Synthese von vier Desoxy-dinucleotiden (pTpT, pApT, pCpT und pGpT) sowie vier Desoxy-trinucleotiden (pTpTpT, pApTpT, pCpTpT und pGpTpT), die alle vier die in natürlicher DNS vorkommenden Basen enthalten, wird gezeigt, daß 2'.3'-[2.4-Dimethoxy-benzyliden]-uridin als Phosphat-Schutzgruppe zur Synthese beliebiger Desoxy-oligonucleotide angewendet werden kann.

2'.3'-[2.4-Dimethoxy-benzyliden]-uridin ist eine Phosphat-Schutzgruppe¹⁾, die während der Oligonucleotid-Synthese stabil ist, da die Bindung zwischen dem Phosphorsäurerest und der Schutzgruppe eine 5'–5'-Internucleotid-Bindung ist und sich nach der Synthese durch aufeinanderfolgende saure Hydrolyse der Acetalgruppierung mit verdünnter Essigsäure, Perjodatspaltung der freigelegten *cis*-Glykol-Gruppierung der Ribose und β -Eliminierung in ammoniakalischem Medium in sehr guter Ausbeute schonend abspalten läßt (2–5), ohne daß eine der Zwischenstufen des Abbaus isoliert werden muß. Die Brauchbarkeit dieser Schutzgruppe wird in der vorliegenden Arbeit an der Synthese von acht Oligonucleotiden gezeigt.

Zur Darstellung der vier Dinucleotide pTpT, pApT, pCpT und pGpT¹⁾ sowie der vier Trinucleotide pTpTpT, pApTpT, pCpTpT und pGpTpT (**5a–d**) wurde jeweils das geschützte Mononucleotid **1a–d**¹⁾ mit dem in 3'-Stellung acetylierten Mononucleotid pT oder Dinucleotid pTpT mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in absolutem Pyridin bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach Entfernung der Schutzgruppen an 3'-Stellung und an der Aminogruppe der Basen durch Hydrolyse mit konz. Ammoniak wurden die nur noch am endständigen Phosphat geschützten Dinucleotide sowie Trinucleotide **2a–d** durch Chromatographie an DEAE-Cellulose-Säulen und Elution mit einem Bicarbonat-Gradienten gereinigt und in Ausbeuten von 47, 42, 33 und 47 sowie 17, 16, 20 und 12% erhalten. Die bei der Chromatographie gefundenen und identifizierten Stoffe sind aus Tab. 1 ersichtlich.

¹⁾ XIII. Mitteilung: F. Kathawala und F. Cramer, Liebigs Ann. Chem. 709, 185 (1967). — Abkürzungen gemäß IUPAC-IUB, vgl. Hoppe-Seyler's 7. physiol. Chem. 348, 245 (1967).



Die Abspaltung der Schutzgruppe (2 → 5)¹⁾ lieferte die Dinucleotide sowie Trinucleotide **5a–d** in sehr guter Ausbeute von 95, 80, 90 und 95 sowie 90, 95, 88 und 90%. Die Nucleotide **5** wurden mit Schlangengift-Phosphodiesterase abgebaut, wobei

die gute Übereinstimmung der gefundenen mit den berechneten Werten (Tab. 2) den völligen Abbau der Schutzgruppe ohne gleichzeitigen Angriff auf das Nucleotid zeigt. Die Charakterisierung aller Verbindungen erfolgte durch Papierchromatographie in zwei Lösungsmitteln (Tab. 3), Elektrophorese bei drei verschiedenen pH-Werten (Tab. 3) und UV-Spektroskopie (Tab. 4).

Tabelle 1. Chromatographische Trennung der geschützten Di- und Trinucleotide **2a–d** (gewünschte Fraktionen sind unterstrichen)

Rohprodukt (n = 1)	Fraktion Nr.	Extinktion OD-Einheiten	Identifizierter Stoff	Rohprodukt (n = 2)	Fraktion Nr.	Extinktion OD-Einheiten	Identifizierter Stoff
RpTpT (2a)	I	137 ^{a)}		RpTpTpT (2a)	I	212 ^{a)}	
	II	363	R'pT		II	190	R'pT
	III	220	1a		III	1843	1a
	IV	690	1a		IV	258	
	V	490	pT		V	717	5a (unrein)
	VI	1420	2a		VI	178	
	<u>VII</u>				VII	390	5a
			VIII		747	2a	
RpApT (2b)	I	75 ^{b)}	Benzoessäure	RpApTpT (2b)	I	608 ^{a)}	Benzoessäure
	II	70			II	303	
	III	110	pT		III	206	R'pA
	IV	1320	1b		IV	2360	1b
	V	300			V	863	5a
	VI	1540	2b		VI	488	
	<u>VII</u>	225			VII	847	2b
			VIII		387		
			IX		85		
RpCpT (2c)	I	96 ^{b)}		RpCpTpT (2c)	I	191 ^{a)}	Anissäure
	II	154			II	285	
	III	1350	1c (pT, 2c)		III	966	1c
	IV	680	2c, pT		IV	425	1c, 5a
	V	960	2c		V	696	5a
	<u>VI</u>	168			VI	450	
			VII		286	2c	
			VIII		658	2c	
			IX		361		
RpGpT (2d)	I	54 ^{b)}		RpGpTpT (2d)	I	300 ^{b)}	
	II	120	pT		II	610	
	III	520	pT		III	2590	1d
	IV	780	1d		IV	1008	5a
	V	780	1d		V	120	
	VI	620	3d		VI	640	2d
	<u>VII</u>	1000	2d		VII	486	
			VIII		76		

a) $\lambda = 264 \text{ m}\mu$. – b) $\lambda = 260 \text{ m}\mu$.

Tabelle 2. Abbau der Di- und Trinucleotide **5a–d** mit Schlangengift-Phosphodiesterase

Substanz	Zusammensetzung	Ber.	Gef.	Substanz	Zusammensetzung	Ber.	Gef.
pTpT (5a)	2 pT		2 pT	pTpTpT (5a)	3 pT		3 pT
pApT (5b)	pA : pT	1 : 1	1 : 0.95	pApTpT (5b)	pA : pT	1 : 2	1 : 2.17
pCpT (5c)	pC : pT	1 : 1	1 : 0.89	pCpTpT (5c)	pC : pT	1 : 2	1 : 1.82
pGpT (5d)	pG : pT	1 : 1	1 : 0.91	pGpTpT (5d)	pG : pT	1 : 2	1 : 2.2

Tabelle 3. Papierchromatographie und Elektrophorese der Di- und Trinucleotide

Substanz	R_F -Werte Lösungs- mittel A ^{a)}	Beweglichkeiten ^{c)} bei			Substanz	R_F -Werte Lösungs- mittel Aa, c) B ^{b)}	Beweglichkeiten ^{c)} bei			
		pH 3.6	pH 7.0	pH 9.0			pH 3.6	pH 7.0	pH 9.0	
RpTpT (2a)	0.43	0.81	0.62	0.66	RpTpTpT (2a)	0.96 ^{c)}	0.55	1.08	0.74	0.81
R'pTpT (3a)	0.24	0.95	0.73	0.82	R'pTpTpT (3a)	0.43 ^{c)}	0.35	1.08	0.82	0.96
pTpT (5a)	0.16	1.17	1.01	1.03	pTpTpT (5a)	0.29	1.25	1.02	1.06	1.06
pT	0.25	1.00	1.00	1.00	pT	1.0	0.40	1.00	1.00	1.00
RpApT (2b)	0.34	1.48	0.63	0.69	RpApTpT (2b)	1.23 ^{c)}	0.53	1.66	0.82	0.92
R'pApT (3b)	0.15	1.75	0.80	0.95	R'pApTpT (3b)	0.45 ^{c)}	0.32	1.37	0.91	1.12
pApT (5b)	0.07		1.15	1.13	pApTpT (5b)		0.25	1.95	1.21	1.18
dpA	0.14	1.00	1.00	1.00	dpA	1.0	0.40	1.00	1.00	1.00
RpCpT (2c)	0.36	1.44	0.58	0.64	RpCpTpT (2c)	1.3 ^{c)}	0.51	1.75	0.70	0.74
R'pCpT (3c)	0.16	1.60	0.69	0.86	R'pCpTpT (3c)	0.49 ^{c)}	0.30	1.80	0.80	0.88
pCpT (5c)	0.08	1.86	0.98	0.97	pCpTpT (5c)		0.26	1.85	1.03	0.97
dpC	0.15	1.00	1.00	1.00	dpC	1.0	0.37	1.00	1.00	1.00
RpGpT (2d)	0.25	1.03	0.61	0.66	RpGpTpT (2d)	1.33 ^{c)}	0.43	1.34		0.85
R'pGpT (3d)	0.09	1.16	0.75	0.90	R'pGpTpT (3d)		0.22			
pGpT (5d)	0.04	1.22	1.13	1.01	pGpTpT (5d)		0.16	1.68		1.08
dpG	0.08	1.00	1.00	1.00	dpG	1.0	0.24	1.00		1.00

a) 1m Ammoniumacetat/Äthanol (5:2). — b) Propanol/konz. NH₃/Wasser (55:10:35). — c) Werte bezogen auf das betreffende Mononucleotid (= 1.00).

Tabelle 4. UV-Spektren der Di- und Trinucleotide (Ammoniumsalze bei pH 6—6.5)

Substanz	λ_{\max} [m μ]	λ_{\min} [m μ]	$\frac{\lambda_{280}}{\lambda_{\max}}$	$\frac{\lambda_{250}}{\lambda_{\max}}$	Substanz	λ_{\max} [m μ]	λ_{\min} [m μ]	$\frac{\lambda_{280}}{\lambda_{\max}}$	$\frac{\lambda_{250}}{\lambda_{\max}}$
RpTpT (2a)	264	240	0.51	0.70	RpTpTpT (2a)	265	236	0.57	0.66
R'pTpT (3a)	264	233	0.52	0.73	R'pTpTpT (3a)	266	232	0.57	0.60
pTpT (5a)	264	236	0.53	0.70	pTpTpT (5a)	266	230	0.55	0.55
RpApT (2b)	261	238	0.40	0.79	RpApTpT (2b)	262	232	0.43	0.71
R'pApT (3b)	261	232	0.40	0.72	R'pApTpT (3b)	261	230	0.40	0.72
pApT (5b)	260	230	0.35	0.75	pApTpT (5b)	260	231	0.36	0.70
RpCpT (2c)	266	243	0.67	0.76	RpCpTpT (2c)	266	240	0.61	0.68
R'pCpT (3c)	265	232	0.61	0.74	R'pCpTpT (3c)	266	232	0.61	0.62
pCpT (5c)	268	240	0.71	0.67	pCpTpT (5c)	268	230	0.60	0.56
RpGpT (2d)	258	236	0.59	0.90	RpGpTpT (2d)	261	236	0.62	0.83
R'pGpT (3d)	257	230	0.55	0.88	R'pGpTpT (3d)	260	230	0.60	0.83
pGpT (5d)	256	230	0.61	0.93	pGpTpT (5d)	258	230	0.64	0.87

Die Kondensation zwischen dem phosphatgeschützten Mononucleotid und 3'-Acetyl-pTpT mit DCC, die etwa einer Blockkondensation zwischen zwei Dinucleotiden entspricht, ergab bisher keine sehr gute Ausbeute. Die Möglichkeit, diesen Schritt durch Verwendung anderer Kondensationsmittel zu verbessern, untersuchen wir.

Wir danken Frau H. Gladosch für fleißige und geschickte Mitarbeit.

Beschreibung der Versuche

Pyridin wurde mit Calciumhydrid getrocknet. — Die *Papierchromatographie* (Tab. 3) erfolgte auf dem Papier Schleicher & Schüll 2043 b (gewaschen) in 1 *m* Ammoniumacetat/Äthanol (5 : 2, Lösungsmittel A) oder Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (55 : 10 : 35, Lösungsmittel B). Zum Vergleich und als Bezugssubstanz wurde jeweils ein einfaches Mononucleotid mit aufgetragen. Die R_F -Werte der Trinucleotide im Lösungsmittel A wurden jeweils auf das betreffende Mononucleotid = 1.00 bezogen (Tab. 3). — Die *Elektrophorese* (nach Wieland — Pfeleiderer) wurde bei 1300–1500 V/cm auf dem Papier Whatman 3 MM in Citrat-Puffer nach Sørensen (pH 3.6), Phosphatpuffer Titrisol (pH 7.0) und dem Puffer Titrisol-Borsäure/Kaliumchlorid/Natronlauge (pH 9.0) durchgeführt und die Werte, bezogen auf die betreffenden Mononucleotide als 1.00, angegeben. — Die *spektrophotometrischen Messungen* (Tab. 4) wurden mit dem Zeiss-Spektralphotometer RPQ 20 vorgenommen. — Für den *Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase* (Tab. 2) wurden etwa 15–30 O.D.-Einheiten des Nucleotids in 0.05 ml 0.1 *m* Trispuffer (pH 8.9) gelöst und mit 0.02 ml einer Phosphodiesterase-Lösung, die 1 mg Enzym/ml Glycerin enthält (Fa. Boehringer), bei 37° 6 Stdn. inkubiert. Ein Teil wurde jeweils auf Papier aufgetragen, die Chromatogramme im Lösungsmittel A entwickelt, die Flecke ausgeschnitten, mit bidest. Wasser eluiert und die Absorption durch die 5'-Monophosphate gemessen.

Geschützte Di- und Trinucleotide 2a–d. — Je 0.2 mMol der geschützten *Nucleotide 1a–d* und 0.1 mMol 3'-*O*-Acetyl-thymidin-5'-monophosphat oder 3'-*O*-Acetyl-thymidylyl-(3'-5')-thymidin-5'-monophosphat wurden durch 3maliges Versetzen mit absol. Pyridin und Eindampfen zur Trockne wasserfrei gemacht, in 2 ml absol. Pyridin gelöst, mit 500 mg trockenem Merck-I-Ionenaustauscher (Pyridinium-Form) und 2 mMol *DCC* versetzt und bei Raumtemperatur 60 Stdn. gerührt. Nach Zugabe von 2 ml Wasser wurde 4 Stdn. stehengelassen. Der ausgefallene Harnstoff wurde abfiltriert, gut mit 50-proz. Pyridin nachgewaschen und die Pyridinlösung i. Vak. eingedampft. Nach Lösen des Rückstandes in 5 ml Pyridin erfolgte die *Hydrolyse* der 3'-*O*-Acetyl-Gruppe und der Schutzgruppe an der Aminogruppe der Base mit 5 ml konz. Ammoniak bei Raumtemperatur während 15–24 Stdn. Danach wurde eingedampft, in wenig Pyridin/Wasser aufgenommen und auf eine Diäthylaminoäthylcellulose-Säule (DEAE, Carbonat-Form, 2.5 × 65 cm) aufgetragen und mit einem Gradienten von 3 *l* dest. Wasser und 3 *l* 0.3 *m* Triäthylammoniumbicarbonat eluiert. Fraktionen von 25 ml/15 Min. wurden aufgefangen und die einzelnen Peaks nach Eindampfen identifiziert (vgl. Tab. 1).

Thymidylyl-(3'-5')-thymidin-5'-phosphat. — Durch Kondensation von 4 mMol β -Cyano-äthyl-thymidin-5'-phosphat und 2 mMol 3'-*O*-Acetyl-thymidin-5'-phosphat mit 10 mMol *DCC* während 60 Stdn. bei Raumtemperatur und anschließendes Abhydrolysieren der Schutzgruppen mit 1 *n* NaOH während 20 Min. bei Raumtemperatur. Nach Chromatographie auf einer DEAE-Säule Ausbeute 50%.

3'-*O*-Acetyl-thymidylyl-(3'-5')-thymidin-5'-phosphat. — 12000 OD-Einheiten ($\lambda = 267 \text{ m}\mu$) Thymidylyl-(3'-5')-thymidin-5'-phosphat wurden mit 2 ml Acetanhydrid in 5 ml absol. Pyridin während 6 Stdn. bei Raumtemperatur acetyliert. Aufarbeitung und Fällung mit Äther ergab eine quantitative Ausbeute. R_F -Wert = 0.28 (pTpT: $R_F = 0.20$) im Lösungsmittel A. — UV-Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 267 \text{ m}\mu$.

Abspaltung der 2'.3'-[2.4-Dimethoxy-benzyliden]-uridin-Schutzgruppe: Je 0.01 mMol der geschützten *Di- und Trinucleotide 2a—d* blieben mit 2 ml 50-proz. *Essigsäure* bei Raumtemperatur 12 Stdn. stehen; dann wurde i. Vak. eingedampft. Zur Oxydation wurde in 1 ml 0.05 *m Natriumacetat* gelöst, 1 ml 0.02 *m Natriumperjodat* zugegeben und 2 Stdn. stengelassen, dann das überschüssige Perjodat durch Zugabe von 1 ml 0.05 *m Glucose* zersetzt und schließlich das Gemisch nach Zugabe von 3 ml *konz. Ammoniak* 15 Stdn. stengelassen. Danach wurde eingeengt, auf eine DEAE-Säule (Carbonat-Form, 2 × 20 cm) aufgetragen, mit 500 ml Wasser nachgewaschen, die *Di- und Trinucleotide 5a—d* mit 0.5 *m Triäthylammoniumbicarbonat* eluiert und nach Eindampfen in Pyridin aufgenommen.

[170/67]