

ANGEWANDTE CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

73. Jahrgang · Nr. 2 · Seite 49–80 · 21. Januar 1961

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT · DIE CHEMIE ·

Probleme der chemischen Polynucleotid-Synthese

Von Prof. Dr. F. CRAMER*

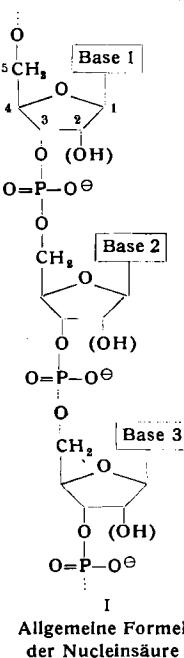
Institut für Organische Chemie der T.H. Darmstadt

Zunächst wird über bisherige Synthesen von Oligonucleotiden zusammenfassend berichtet und dann auf eigene Syntheseversuche eingegangen. Der Diäthylester des Adenosindiphosphates und die analoge Verbindung des Thymidinphosphates reagieren als „Triester“ zu Polynucleotiden. Trichloracetonitril scheint neben dem schon erprobten Carbodiimid ein geeignetes Reagens zur Polynucleotid-Synthese zu sein. Es werden weiterhin theoretisch-chemische Fragen der Aktivierung von Pyrophosphat-Bindungen behandelt. In Einschlußverbindungen kann die Pyrophosphat-Bindung aktiviert werden; diese Modellreaktion mag — obwohl noch recht unvollkommen — eine Erklärung für den Vorgang der identischen Reduplikation von Desoxyribonucleinsäure und Ribonucleinsäure geben: Die molekulare Oberfläche beider Verbindungen wirkt als stereospezifische Matrize gleichzeitig aktivierend auf das Substrat, welches an ihre Oberfläche adsorbiert ist.

1. Allgemeine Struktur der Nucleinsäure

Die Synthese von Polynucleotiden kann man auf zweierlei Weise betrachten, als biochemischen Vorgang und als Problem der präparativen organischen Chemie. Hier sollen nur der präparativ-organisch-chemische Aspekt und die damit zusammenhängenden theoretischen Fragen behandelt werden; der biochemische und biologische Aspekt, also die Biosynthese der Nucleinsäure, soll nur insoweit berücksichtigt werden, als das zum Verständnis der chemischen Synthese nötig ist.

Zunächst eine kurze Zusammenfassung darüber, was Nucleinsäure ist¹⁾ und welche synthetischen Probleme sich bei dem Versuch ihrer Synthese ergeben. Wenn man die Grundstruktur (I) betrachtet, zeigt sich, daß die Nucleinsäure ein Polyester-Molekül ist, ein Polyester-Molekül der bifunktionellen Phosphorsäure mit einem bifunktionellen Alkohol. Das Molekül ist ein Makromolekül, es sind mehrere tausend Nucleotid-Einheiten in der Nucleinsäure hintereinandergeknüpft. Das chemische Problem der Synthese kommt also darauf hinaus, Polyester herzustellen. Die Aufgabe kompliziert sich dadurch, daß wir es hier mit einem recht komplizierten Alkohol zu tun haben, mit einem Zucker, genauer mit einem Nucleosid der Ribose.



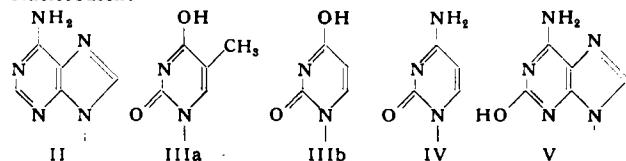
Allgemeine Formel
der Nucleinsäure

* Nach Vorträgen an der Yale-Universität 4. März 1960, an der Harvard-Universität 8. März 1960 und an der T. H. Darmstadt 2. Juli 1960.

¹⁾ Zusammenfassung: A. R. Todd, Angew. Chem. 70, 527 [1958].

Nucleotid-Einheiten zu Polynucleotiden sei gelöst, ergibt sich als nächste Aufgabe die Darstellung eines Polynucleotides mit einer bestimmten Sequenz der Basen.

Nucleobasen:



Außerdem wird das Problem noch dadurch kompliziert, daß es zwei Arten von Nucleinsäuren gibt, die Desoxyribonucleinsäure (DNS), abgeleitet von der Desoxyribose, und die Ribonucleinsäure (RNS), die in der 2'-Stellung eine OH-Gruppe trägt. Diese zur Phosphoester-Gruppe α -ständige OH-Gruppe ist eine sehr unangenehme Zugabe und bietet synthetisch außerordentlich große Schwierigkeiten. Die Synthese von Nucleinsäuren oder Nucleinsäure-Teilstücken mit einer bestimmten Reihenfolge ist insofern wichtig, als die Reihenfolge der Nucleotide in der Nucleinsäure besondere biologische Bedeutung hat.

2. Biologische Rolle der Nucleinsäure

Wir glauben heute zu wissen, daß die Erbeigenschaften in der DNS kodifiziert sind in der Weise, daß die Reihenfolge der Nucleobasen im Makromolekül die genetischen Informationen trägt²⁾. In die Reihenfolge der vier Bausteine II, III, IV und V ist ein bestimmter Code eingeschrieben, durch welchen das Gen eindeutig definiert sein muß. Mit Hilfe dieses Codesystems wird die Synthese der übrigen Zellbestandteile gesteuert, werden die Proteine und Enzyme synthetisiert. Es sei nur erinnert an das berühmte Watson-Crick-Modell^{3,4)}, welches sich mehrfach bestätigen

²⁾ Vgl. A. Kornberg, Angew. Chem. 72, 231 [1960]; Nobel-Vortrag.

³⁾ J. D. Watson u. F. H. C. Crick, Nature [London] 171, 737 [1953]; M. Feughelman, R. Langbridge, W. E. Seeds, A. R. Stokes, H. R. Wilson, C. W. Hooper, M. H. F. Wilkins, R. K. Barclay u. L. D. Hamilton, Nature [London] 175, 834 [1955].

⁴⁾ Vgl. W. D. McElroy u. B. Glass: The Chemical Basis of Heredity, Johns Hopkins Press, Baltimore 1957.

ließ^{5,6}) und die derzeit beste Erklärung für den chemischen Mechanismus der Vererbung gibt.

Die Rolle der RNS ist noch weit weniger klar. Man weiß nur, daß sie für die Synthese der Proteine verantwortlich ist, indem sie die Protein-Synthese steuert. Auch hier sind es offenbar bestimmte Nucleotid-Sequenzen, die für die Synthese bestimmter Proteine bedeutungsvoll sind. In manchen Viren ist RNS ebenfalls Träger der genetischen Information.

3. Biosynthese der Nucleinsäure

Die Biosynthese der Ribonucleinsäure ist von *Ochoa*⁷) in den letzten Jahren aufgeklärt worden. *Ochoa* findet, daß das Ausgangsmaterial für diese Biosynthese das entsprechende Nucleosiddiphosphat ist. Mit dem Enzym Polynucleotid-Phosphorylase reagiert ADP unter Freisetzen von anorganischem Phosphat zu Polynucleotiden.



Schema der Polynucleotid-Synthese nach *Ochoa*

In diesem Aufsatz werden folgende Abkürzungen verwendet:

AMP = Adenosin-5'-monophosphat

ADP = Adenosin-5'-diphosphat

ATP = Adenosin-5'-triphosphat

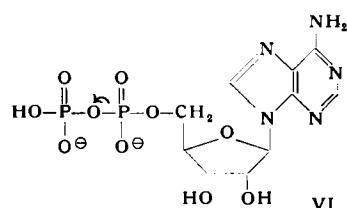
TMP = Thymidin-5'-monophosphat

TPP = Thymidin-5'-triphosphat

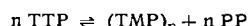
P = Orthophosphat

PP = Pyrophosphat

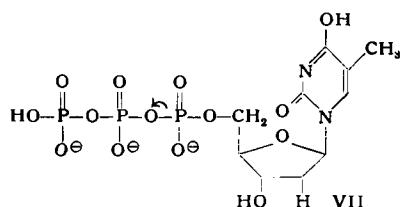
Im ADP (VI) verhält sich also die Pyrophosphat-Bindung in Gegenwart des Enzyms wie eine echte Anhydrid-Bindung. Sie überträgt den AMP-Rest auf die 3'-Stellung



des nächsten Moleküls, wobei anorganisches Phosphat abgespalten wird. Prinzipiell ähnlich verläuft die Synthese der Desoxyribonucleinsäure nach *Kornberg*⁸). Bei der DNS ist das Substrat des Enzyms allerdings nicht das Diphosphat, sondern das Triphosphat VII, hier wird also anorganisches Pyrophosphat abgespalten, im übrigen wird der Rest genauso übertragen.



Schema der DNS-Synthese nach *Kornberg*

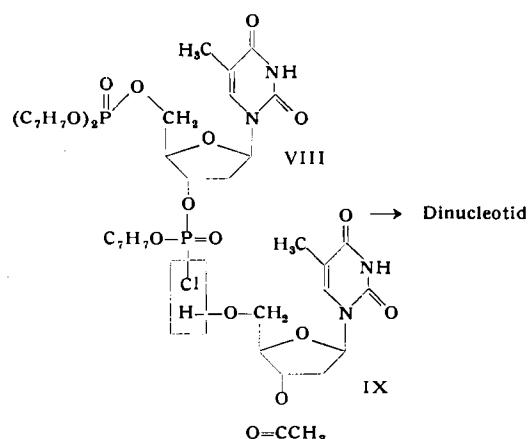


Neuere Arbeiten zeigen, daß in höheren Organismen offenbar auch das Triphosphat für die Ribonucleinsäure-Synthese benutzt wird⁹); die ursprünglichen Ergebnisse von *Ochoa* sind an Bakterien gewonnen worden.

4. Bisherige Syntheseversuche

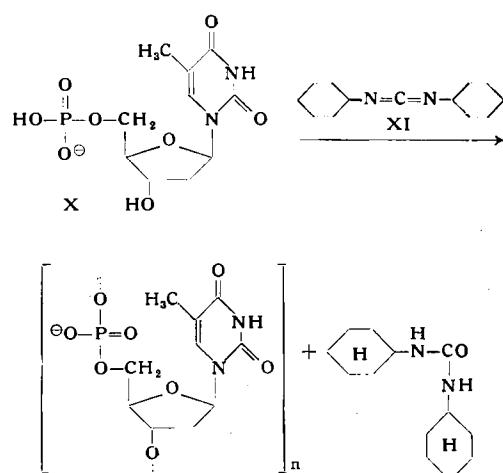
Polynucleotid-Synthesen wurden bisher von *Todd*, von *Khorana* und von *Michelson* unternommen. Wir befinden uns in diesem Gebiete aber noch ganz im Anfänge. Obwohl es seit kurzem möglich ist, einige Nucleotide zu Oligonucleotiden zu verknüpfen, ist man von einer allgemeinen Lösung des Problems der sequenzspezifischen Polynucleotid-Synthese noch recht weit entfernt.

In der ersten Dinucleotid-Synthese von *Todd*¹⁰) wird 3'-O-Acetylthymidin (IX) mit Thymidin-3'-(benzyl-phosphochloridat)-5'-(dibenzylphosphat) (VIII) kondensiert und das Dinucleotid durch anschließende Hydrogenolyse der Benzyl-Gruppen gewonnen.



Die Struktur des dargestellten Dinucleotides wurde unter anderem enzymatisch bewiesen^{2,7}); die enzymatischen Strukturbeweise sind in diesem Zweig der präparativen Chemie unentbehrlich, biologische und chemische Methoden greifen hier ineinander¹⁰).

Khorana verwendet hauptsächlich Dicyclohexyl-carbodiimid (XI) als Kondensationsmittel. Thymidylsäure (X) gibt mit XI ein Gemisch von Polynucleotiden mit maximal 11 Nucleotid-Resten¹¹). Es ist dabei sehr umständlich, die



polymer-homologe Reihe zu trennen, man verwendet papierchromatographische Methoden, Ionenaustauscherverfahren und vor allem Ecteola-Säulen. Bei der Polykondensation der Thymidyl-5'-phosphorsäure entstehen als unerwünschte Nebenprodukte auch cyclische Oligonucleotide.

⁵) M. Meselson u. F. W. Stahl, Chem. Engng. News v. 10, 2. 1958, S. 46; A. Rich, 138. Meeting Amer. chem. Soc.; Chem. Engng. News v. 26, 9. 1960, S. 49.

⁶) P. Doty u. Mitarb., Chem. Engng. News v. 9, 5. 1960, S. 38.

⁷) S. Ochoa, Angew. Chem. 72, 225 [1960]; Nobel-Vortrag.

⁸) M. Edmonds u. R. Abrams, J. biol. Chemistry 235, 1142 [1960].

⁹) A. M. Michelson u. A. R. Todd, J. chem. Soc. [London] 1955, 2632.

¹⁰) W. E. Razzell u. H. G. Khorana, J. biol. Chemistry 234, 2105 [1959].

¹¹) G. M. Tener, H. G. Khorana, R. Markham u. E. H. Pol, J. Amer. chem. Soc. 80, 6223 [1958].

	%
Monomeres .	3
pTpT	5
pTpTpT	7
pTpTpTpT . . .	6
pTpTpTpTpT . . .	3
<u>pTpT</u>	15-20
<u>pTpTpT</u>	5-6
<u>pTpTpTpT</u> . . .	3

Tabelle 1. Ausbeuten an Polynucleotiden nach¹¹⁾

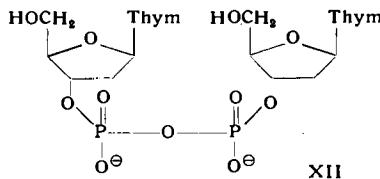
Nomenklatur der Polynucleotide: A = Adenosyl, U = Uridyl, C = Cytosyl, G = Guanyl, T = Thymidyl; dA = desoxy usw. p vor A usw. bedeutet 5'-phosphat; p hinter A usw. bedeutet 3'-phosphat; also pApA das Dinucleotid des Adenosins mit 5'-endständiger Phosphorsäure. TpTpTp das Trinucleotid des Thymidins mit 3'-endst. Phosphorsäure

Mit Thymidin-3'-phosphorsäure bilden sich analog Polynucleotide des Typs -(Tp)_n¹²⁾, die Ausbeuten sind in Tabelle 2 angegeben.

	%
Tp	0,1
TpTp	0,3
TpTpTp	3,5
TpTpTpTp	3,4
TpTpTpTpTp	4,0
<u>TpT</u>	5,0
<u>TpTpT</u>	16,5
<u>TpTpTpT</u>	4,0
<u>TpTpTpTpT</u>	3,1
<u>TpTpTpTpTpT</u>	3,3

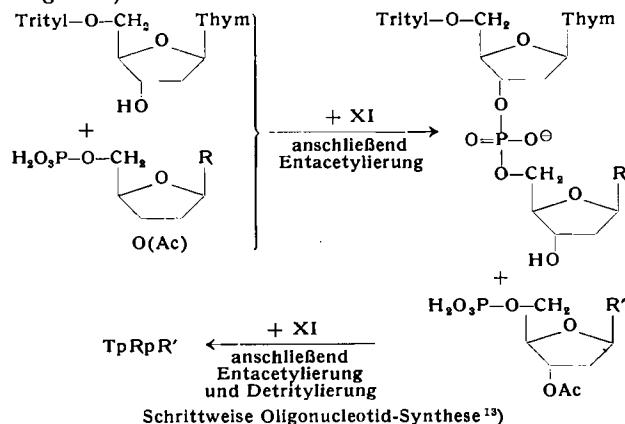
Tabelle 2
Ausbeute an
Polynucleotiden
nach¹²⁾

Interessanterweise wird hier als Ausgangsmaterial das P¹, P²-(Dithymidyl-3')-pyrophosphat (XII) verwendet,



welches sich unter dem Einfluß von Carbodiimid nach einem noch unbekannten Mechanismus (s. S. 54) zu Polynucleotiden umlagert.

Auch die schrittweise Synthese von Oligonucleotiden ist möglich¹³⁾.

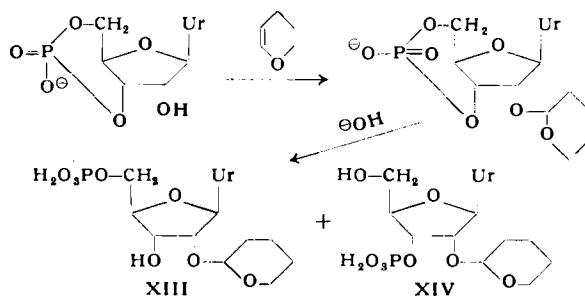


Bei dieser Synthese kann das zweite und dritte Nucleotid beliebig gewählt werden; es wurden dargestellt:

Thymidyl-(5' → 3')-thymidyl-(5' → 3')-thymidyl
(TpTpT) Ausbeute 57 %

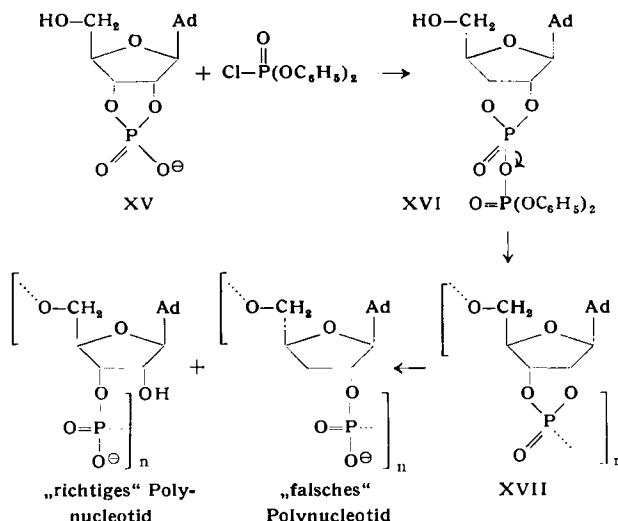
Desoxycytidyl-(5' → 3')-desoxyadenyl-(5' → 3')-thymidyl
(TpApdT) Ausbeute 31 %

Die bisher genannten Synthesen sind nur brauchbar für die Reihe der Desoxyribose. Zum selektiven Schutz der 2'-Gruppe der Ribose wurde folgender Weg beschrieben¹⁴⁾:



XIII und XIV können nun, genau wie die entsprechenden Thymidin-Derivate mit XI polykondensiert werden, wodurch die Synthese von UpU möglich wurde; auf die gleiche Weise dürften sich wohl bald Polyadenylsäuren darstellen lassen.

Eine andere Möglichkeit hat Michelson untersucht¹⁵⁾: Michelson setzt das Adenosin-2',3'-cyclophosphat (XV) und analoge Cyclophosphate mit Diphenyl-phosphorsäurechlorid um und erhält dann, offenbar über gemischte Anhydride (XVI), Polymere (XVII), die nach der Hydrolyse ein Gemisch von „richtiger“ (d. h. über die 3'-Stellung verknüpfter) und „falscher“ (d. h. über die 2'-Stellung verknüpfter) Oligonucleotide ergeben.



Auch Polyuridylsäuren, Polycytidylsäuren und Polyguanylsäuren sowie zahlreiche „Copolymerisate“ wurden dargestellt, wobei die Methode, wie erwähnt, dadurch eingeschränkt ist, daß die Bindungen statistisch über die 2'- und die 3'-Stellung verlaufen.

5. Prinzipien der biologischen Polynucleotid-Synthese

Wir haben uns die Aufgabe gestellt, ein Synthese-Schema zu entwerfen, das sich weitgehend nach der natürlichen Synthese richtet. Das natürliche Synthese-Prinzip besteht darin, daß ein Pyro- oder Triphosphat mit sich selbst bzw. mit einer alkoхolischen Gruppe des nächsten Ribosides zu einem Ester reagiert. Die biologische Polynucleotid-Synthese ist also eine Veresterung mit Hilfe eines Pyrophosphates. Ein Pyrophosphat vom Typ des ADP oder ATP

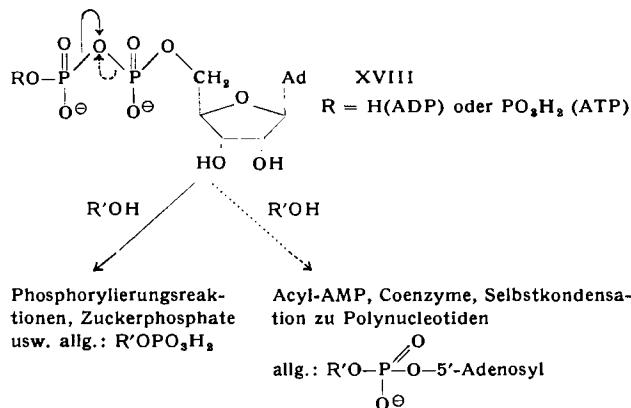
¹¹⁾ A. F. Turner u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 81, 4651 [1959].

¹²⁾ P. T. Gilham u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 81, 4647 [1959].

¹³⁾ M. Smith u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 81, 2911 [1959].

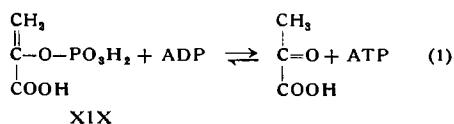
¹⁴⁾ A. M. Michelson, J. chem. Soc. [London] 1959, 1371, 3655.

(XVIII) kann mit Transphosphorylasen grundsätzlich in zweierlei Weise reagieren.

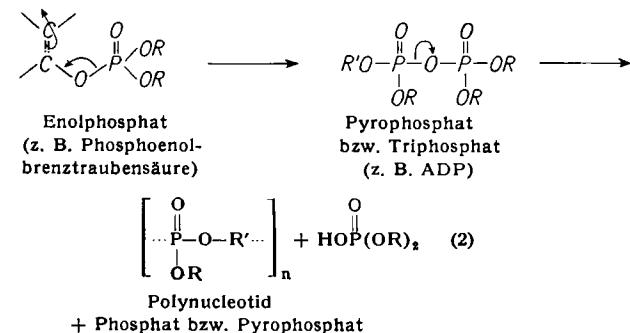


Wenn das Elektronensystem durch das katalysierende Enzym im Sinne des ausgezogenen Pfeiles polarisiert wird, so wird das endständige Phosphat zur Phosphorylierung benutzt (Hexokinase, Myokinase), AMP bzw. ADP werden frei. Im anderen Falle (punktierter Pfeil) geht der Rest des AMP die homöopolare Bindung ein und anorganisches Phosphat bzw. Pyrophosphat wird in Freiheit gesetzt. Zu letzterem Enzymtyp gehören u. a. die Polynucleotid-Phosphorylase von *Ochoa* und das *Kornberg*-Enzym.

Eine unter zahlreichen enzymatischen Nachlieferungsreaktionen für Phosphorsäure-Anhydrid-Bindung („energiereiches Phosphat“) ist die Reaktion von Phosphoenolbrenztraubensäure (XIX) mit ADP zu ATP; diese Reaktion liefert chemische Energie aus dem Kohlenhydratstoffwechsel an den Phosphatstoffwechsel.



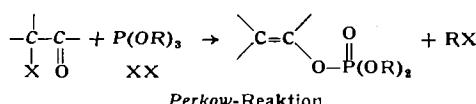
Der prinzipielle Weg zu einem Polynucleotid führt daher über folgende Stufen:



Diesen Weg wollen wir nun chemisch-präparativ nachgehen und zunächst die Enolphosphate behandeln.

6. Enolphosphate

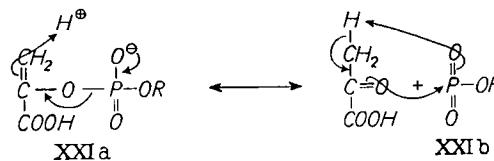
Enolphosphate kann man nach der *Perkow*-Reaktion aus α -Halogen-ketonen oder -estern und tertiären Phosphiten (XX) darstellen, wobei R in XX ein Alkylrest sein muß¹⁸). Dabei bildet sich in exothermer Reaktion meist in sehr guter Ausbeute ein Enolphosphat.



¹⁸⁾ Vgl. Zusammenfassung *F. Cramer*, Angew. Chem. 72, 236 [1960].

Mit Hilfe dieser Reaktion kann man Phosphoenolbrenztraubensäure aus Brombrenztraubensäure herstellen¹⁷⁾.

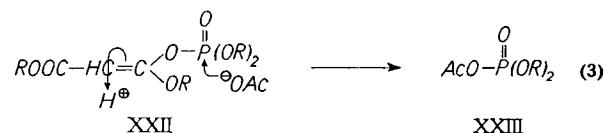
Wie kann man eine Übertragung der Phosphorsäure aus dem Enolphosphat in Gl. 1 verstehen? In einer „nonbond“-Resonanz-Struktur (XXI) ist Metaphosphat (XXIb) vor-



Non-bond-resonance von Phosphoenol-brenztraubensäure

gebildet, und Metaphosphat wirkt phosphorylierend. Diese Reaktion wird katalysiert durch ein Enzym, und wir haben untersucht, ob eine solche Phosphorylierung nicht-enzymatisch möglich wäre. In einzelnen Beispielen gelingt das zwar, manche einfachen Enolphosphate liefern mit einer zweiten Phosphorsäure geringe Mengen Pyrophosphat¹⁹⁾, im allgemeinen bedarf die Reaktion jedoch der Hilfe eines Enzyms.

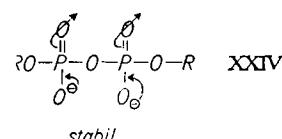
Wenn man in der *Perkow*-Reaktion statt eines α -Halogen-ketons einen α -Halogen-ester verwendet, den Brommalonester, dann bildet sich zu 85% das Enolphosphat XXII¹⁹). Dieser enolisierte Ester ist als Ketenacylal wesentlich reaktionsfähig.



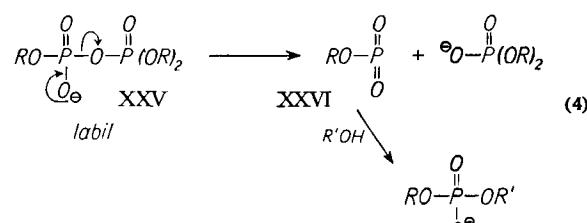
Mit einer beliebigen Säure HOAc reagiert XXII in der Weise, daß sich der Malonester zurückbildet und das Säure-Anion sich mit dem Phosphorylium-Kation zu einem Anhydrid XXIII verbindet (Gl. 3). Die Säure HOAc kann eine beliebige Säure sein, z. B. auch Phosphorsäure selbst, so daß wir damit den enzymatischen Übergang Enolphosphat \rightarrow Pyrophosphat auf nichtenzymatischem Wege nachahmen können.

7. Pyrophosphate

Anorganisches Pyrophosphat verhält sich nicht wie ein Anhydrid; das gilt auch für die sym. Diester-pyrophosphate. Man kann das damit erklären, daß die $\text{P}=\text{O}$ -Doppelbindung in Resonanz steht mit der $\text{P}-\text{O}$ -Gruppe und daß damit die positive Ladung am P weitgehend kompensiert wird (XXIV).



stabil

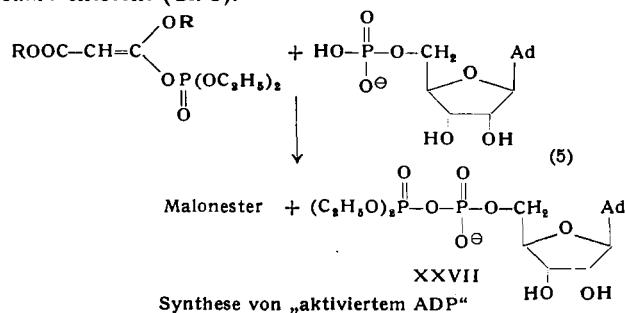


¹⁷⁾ *F. Cramer u. D. Voges*, Chem. Ber. 92, 952 [1959].

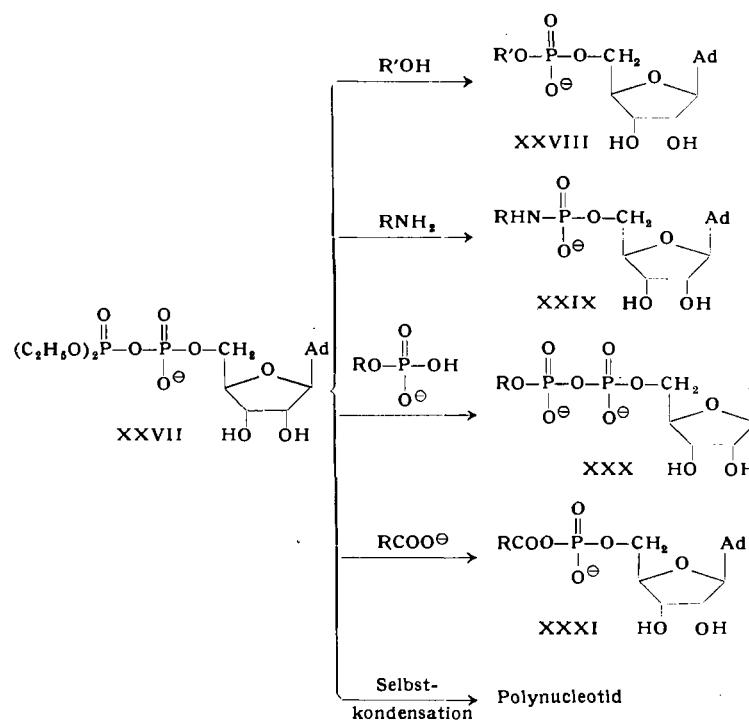
¹⁸⁾ *F. Lichtenhaller*, Dissertation Heidelberg 1958; Chem. Reviews, im Druck.

¹⁹⁾ *F. Cramer u. K. G. Gärtner*, Chem. Ber. 91, 704 [1958].

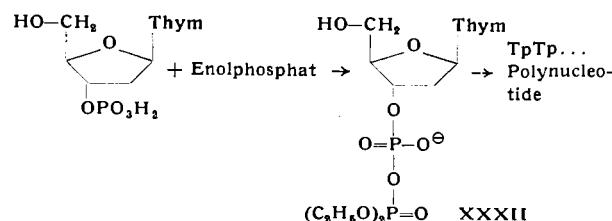
Dennoch wird in der enzymatischen Reaktion Pyrophosphat zur Polynucleotid-Synthese verwendet. Adenosindiphosphat gibt in wässriger Lösung für sich natürlich nie- mals Polynucleotid. Es muß also im Enzym irgendein Prinzip wirksam sein, das diese Polykondensation ermöglicht, und wir haben uns — von der synthetischen Seite ausgehend — überlegt, daß ein Triester (XXV) der Pyrophosphorsäure wesentlich reaktionsfähiger sein müßte, weil in ihm ein Teil der Resonanzmöglichkeiten ausgeschaltet ist. XXV sollte so reagieren, daß die rechte Seite des Moleküls Elektronen an sich zieht, dadurch ist auf der linken Seite „Metaphosphat“ (XXVI) vorgebildet, welches phosphorylierend wirkt. An vielen Beispielen konnten wir belegen, daß Triester des Typs XXV tatsächlich und ausschließlich im Sinne der Gl. 4 reagieren, d. h. sie übertragen stets den Monoesterteil des Pyrophosphates²⁰). Analog verhält sich der Ester des ADP²¹), der bei der Reaktion von Malonester-enolphosphat (XXII) mit Adenosin-monophosphorsäure entsteht (Gl. 5).



In XXVII liegt das ADP in „aktivierter Form“ vor, es reagiert mit Methanol zu einem Methylester der Adenosin-monophosphorsäure XXVIII (R' = CH₃) unter Abspaltung des Diäthylphosphorsäure-Restes, mit Aminen zu Amiden (XXIX), mit Monoesterphosphorsäuren unter Austausch der Diesterphosphorsäure gegen die Monoesterphosphorsäure zu einem Pyrophosphat (XXX). Wenn die Monoesterphosphorsäure Flavinmononucleotid ist, dann entsteht das Gelbe Ferment, das Flavin-Adenin-Dinucleotid. Mit Carbonsäuren entsteht ein Monophosphorsäure-carbon-



säureanhydrid vom Typ der aktivierte Aminosäure (XXXI, R = Aminosäure-Rest) und schließlich in der Selbstkondensation Polynucleotid. Im Falle der Selbstkondensation von XXVII entsteht freilich ein Gemisch der über die 2'- und die 3'-Stellung verbundenen Oligonucleotide (s. o.), so daß wir zunächst einmal den etwas einfacheren Fall der Thymidylsäure genauer studiert haben. Da das 5'-Hydroxyl der Ribose als ein primärer Alkohol leichter verestert werden kann, setzt man Thymidyl-3'-phosphat mit Enolphosphat um, wobei intermediär der Triester XXXII entsteht²²).



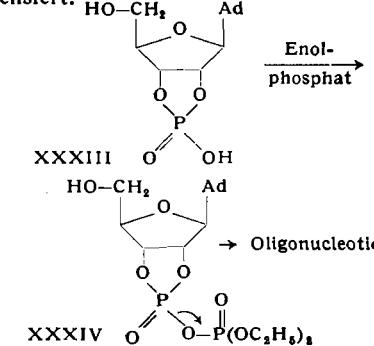
XXXII ist ein reaktionsfähiges Anhydrid, das sich polykondensiert. Die Ausbeuten an Polynucleotid sind in Tabelle 3 angegeben.

Verdg.	Ausbeute
(TP) ₅	3%
(TP) ₄	4%
(TP) ₃	13 %
(TP) ₂	7 %
Tp	6 %
[(TP) ₄]	14 %
TPpT	6 %
TP ₂	13 %
Thymin	14 %
Thymidin	17 %

Tabelle 3. Ausbeute an Polynucleotiden bei der Polykondensation von XXXII²²)

Man hat bei diesen Reaktionen ebenso wie bei der Carbodiimid-Methode damit zu kämpfen, daß sich sehr leicht Cyclonucleotide bilden, die dann natürlich keine höheren Polymerisate mehr ergeben. Thymidyl-5'-phosphat läßt sich analog kondensieren, wobei Oligonucleotide des Typs pTpT... entstehen.

Auch das Adenosin-3'-phosphat läßt sich polykondensieren²³). Mit überschüssigem Enolphosphat entsteht zunächst das 2',3'-Cyclophosphat (XXXIII), das sich dann zum Tetraester (XXXIV) umsetzt, der polykondensiert.



Diese Methode ähnelt der von Michelson¹⁵) und liefert ebenso ein Gemisch von 2'- und 3'-verknüpften Oligonucleotiden, solange man noch keine Methoden gefunden hat, um die 2'-Stellung spezifisch abzudecken.

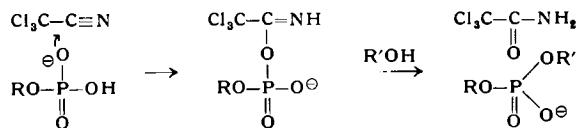
²⁰) F. Cramer u. R. Wittmann, Chem. Ber., im Druck.
²¹) F. Cramer u. R. Wittmann, Chem. Ber., im Druck.

²²) F. Cramer u. R. Wittmann, Angew. Chem. 72, 628 [1960].
²³) Unveröffentl. Versuche von R. Wittmann.

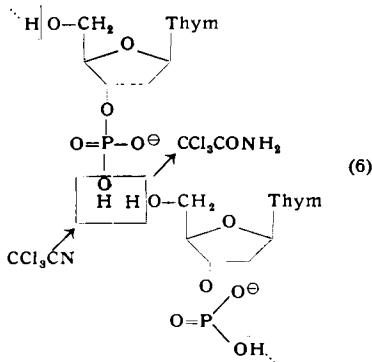
Die besprochenen Synthesen verlaufen über die Stufen Enolphosphat \rightarrow Pyrophosphat \rightarrow Polynucleotid (Gl. 2) und lehnen sich in ihrem Mechanismus eng an die enzymatischen Vorbilder an.

8. Trichlor-acetonitril-Methode

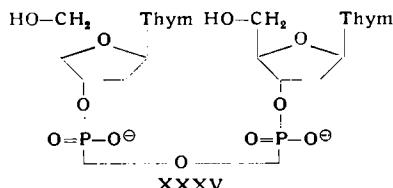
Trichlor-acetonitril kann als ein spezifisches Veresterungsreagens für Phosphorsäure benutzt werden und wirkt bei Überschuß von Alkohol in folgender Weise^{24):}



In der Bruttoreaktion hat also das Trichlor-acetonitril als Wasserabspaltungsmittel reagiert, aber in einer durchschaubaren Weise so, daß es nur solche Anionen verestert, die eine bestimmte Nucleophilie haben. So zeigt es sich, daß etwa Carbonsäuren oder Mineralsäuren durch Trichlor-acetonitril nicht verestert werden, sondern nur Phosphorsäuren in ihrer zweiten und dritten Dissoziationsstufe. Dieses spezifische und milde Veresterungsreagens kann man z. B. zur Synthese des Geranyl- und Farnesyl-pyrophosphates benützen²⁵⁾. Mit Trichlor-acetonitril kann man Polynucleotide darstellen (Gl. 6).

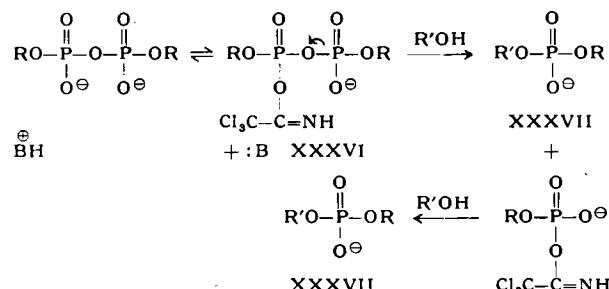


Die Reaktion ähnelt der mit Carbodiimid, hier wirkt Trichloracetonitril als Wasserabspaltungsmittel. Wenn man die Reaktion jedoch papierchromatographisch genauer verfolgt, beobachtet man, daß sie nicht so einfach verläuft, wie es die Bruttogleichung (Gl. 6) erscheinen läßt²⁶). Zunächst bildet sich nämlich ausschließlich Di(thymidyl-3')-pyrophosphat (XXXV).



XXXV sollte als symmetrischer Diester der Pyrophosphorsäure vollkommen stabil sein, es dürfte eigentlich gar nicht zum Polynucleotid weiterreagieren. Wenn man jedoch überschüssiges Trichlor-acetonitril hinzugibt, entstehen dennoch Polynucleotide; das ist ein scheinbarer Widerspruch zu allem, was wir bisher über die Stabilität von symmetrischen Diester-pyrophosphaten und die Reaktionsweise von Trichlor-acetonitril wissen, denn wir haben gesehen, daß die pK_1 -Dissoziationsstufen der Phosphorsäure, die in XXXV einzig vorhanden sind, nicht mehr mit Trichlor-acetonitril verestert werden. Bei näherer Un-

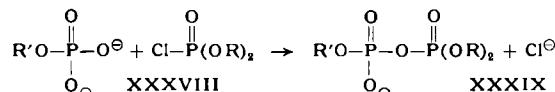
tersuchung zeigt sich nun²⁷), daß symmetrische Diester-pyrophosphate offenbar mit Trichlor-acetonitril eine reversible Additionsverbindung (XXXVI) bilden, die eine „quasi-Triesterstruktur“ besitzt.



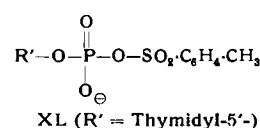
Das so reaktivierte Pyrophosphat XXXVI reagiert also wie ein echtes Säureanhydrid. Das Endprodukt der Reaktion sind 2 Mol Ester XXXVII. Das Gleichgewicht und damit die Weiterreaktion von XXXVI ist abhängig von der Basenstärke von B; mit Pyridin dürfte es weitgehend auf der rechten Seite liegen, mit Triäthylamin liegt es ganz links. XXXVI kann als „Triester“ (s. o.) die rechte Molekühlhälfte übertragen und wirkt damit als Veresterungsreagens. Ein ähnlicher Mechanismus dürfte für die Carbo-diimid-Reaktion in der Polynucleotid-Synthese gelten und es sieht demnach so aus, als seien die Triester-pyrophosphate generell die Schlüsselsubstanzen für die Polynucleotid-Synthese.

9. Weitere Reaktionen von Triester-pyrophosphaten

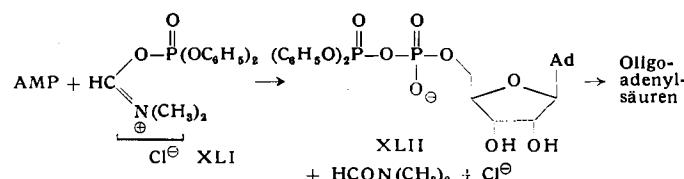
Bei der Reaktion einer Monoester-phosphorsäure mit einem Phosphorsäure-diester-chlorid (XXXVIII) entsteht intermediär ein Triesterpyrophosphat (XXXIX), welches



jedoch in Isomerisierungsreaktionen sofort zu Diesterpyrophosphat und Folgeprodukten weiterreagiert. Die Reaktion ist deshalb in dieser Form zur Darstellung von XXXIX und damit von Polynukleotiden nicht direkt brauchbar. Wenn man Tosylchlorid anstelle von XXXVIII einsetzt, gelangt man mit Thymidyl-5'-phosphat immerhin zu Oligonukleotiden¹¹), wobei die Reaktion über eine Zwischenstufe XL verlaufen muß.



Zur Darstellung von XXXIX ist jedoch der „Vilsmeyer-Komplex“ (XL) sehr geeignet^{27a}), der z. B. mit AMP zum „aktivierten ADP“ (XLII) reagiert, welches in der üblichen Weise zu Oligoadenylysäuren polykondensiert wird^{27b}). Die so erhaltenen Oligonucleotide (insges. 55% Ausb.) sind



freilich noch ein Gemisch von über die 2'- und die 3'-Stellung verknüpften Ketten (s. o.).

²⁴⁾ F. Cramer u. G. Weimann, Chem. and Ind. 1960, 46.

²⁵) F. Cramer u. W. Böhm, Angew. Chem. 71, 775 [1959].
²⁶) U. Schäffer, V. W. Schäffer, H. J. Böhm, J.

28) Unveröffentl. Versuche von H. J. Baldauf.

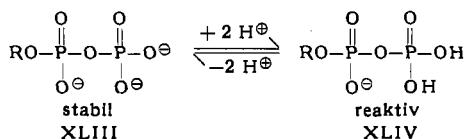
²⁷⁾ F. Cramer u. H. J. Baldauf, Angew. Chem. 72, 627 [1960].

27a) F. Cramer u. M. Winter, Chem. Ber., im Druck.

^{27b)} Unveröffentl. Versuche von M. Winter, Darmstadt.

10. Enzymmodelle

Wir wissen, daß eine Pyrophosphat-Bindung nur dann reaktionsfähig ist, wenn die eine Hälfte des Anhydrides voll verestert ist; dennoch benutzen die Enzyme bei der Polynucleotid-Synthese diese Polyphosphate als Substrate, und wir wollen uns nach dem Mechanismus dieser Übertragungsreaktion fragen. Man könnte als Arbeitshypothese annehmen, daß das Enzym nichts weiter tut, als die terminalen OH-Gruppen des ADP zu verestern zu einer Verbindung analog XXVII, einem „aktivierten ADP“. Es müßte für die Aktivierung des Pyrophosphates jedoch genügen, wenn das Enzym zwangsläufig auf das Molekül XLIII zwei Protonen aufdrückt würde.



Das wäre mechanistisch einer Veresterung äquivalent, XLIV müßte wie XXV, XXVII oder XXXVI reagieren.

Das Enzym (Polynucleotid-Phosphorylase oder DNS-Polymerase) ist ein Eiweißmolekül, und man kann sich durchaus vorstellen, daß das Enzym auf irgendeine Weise durch H-Brücken zwei Protonen einseitig auf das terminale Phosphat der Pyrophosphat-Bindung drückt, und daß dadurch das Molekül aktiviert wird. Da wir uns nicht nur für die Polynucleotid-Synthese, sondern auch für die Probleme der Polynucleotid-Synthese interessieren, haben wir uns überlegt, wie der Mechanismus der enzymatischen Pyrophosphat-Aktivierung aussehen könnte und ein Modell dafür aufgebaut²⁸⁾. Wir beschäftigten uns mit Einschlußverbindungen der Cyclodextrine²⁹⁾, letztere sind Polysaccharide mit cyclischer Struktur³⁰⁾ (Abb. 1).

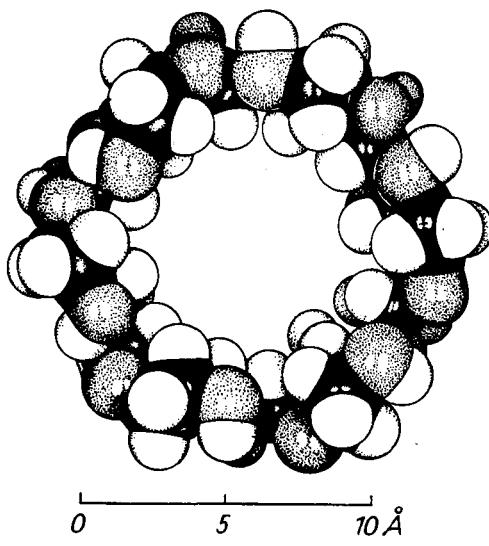


Abb. 1. Stuart-Modell von α -Cyclodextrin

Ein solches großes Ringmolekül vom Molgewicht etwa 1000 hat in der Mitte einen freien Hohlraum und kann darin andere Moleküle einschließen. Man kann nun folgendes grundlegende Experiment anstellen:

Man titriert 1. Monophenylphosphorsäure in Wasser, man findet p_K -Werte von $< 3,3$ und 6,25.

²⁸⁾ Erste Versuche in dieser Richtung wurden während eines Gastaufenthaltes an der Univ. Cambridge/England 1954 begonnen. (Vgl. A. R. Todd, Chem. and Ind. 1958, 170, Zitat 25 sowie A. R. Todd, Angew. Chem. 72, 527 [1958] i. c. S. 530 unten; s. a. A. R. Todd, Proc. Nat. Acad. Sci. [USA] 45, 1389 [1959].

²⁹⁾ F. Cramer: Einschlußverbindungen, Springer-Verlag, Göttingen-Berlin-Heidelberg, 1954.

³⁰⁾ Vgl. F. Cramer, Angew. Chem. 64, 437 [1952] u. 68, 115 [1956].

2. Monophenylphosphorsäure in wässriger Cyclodextrin-Lösung: mit wachsender Cyclodextrin-Konzentration.

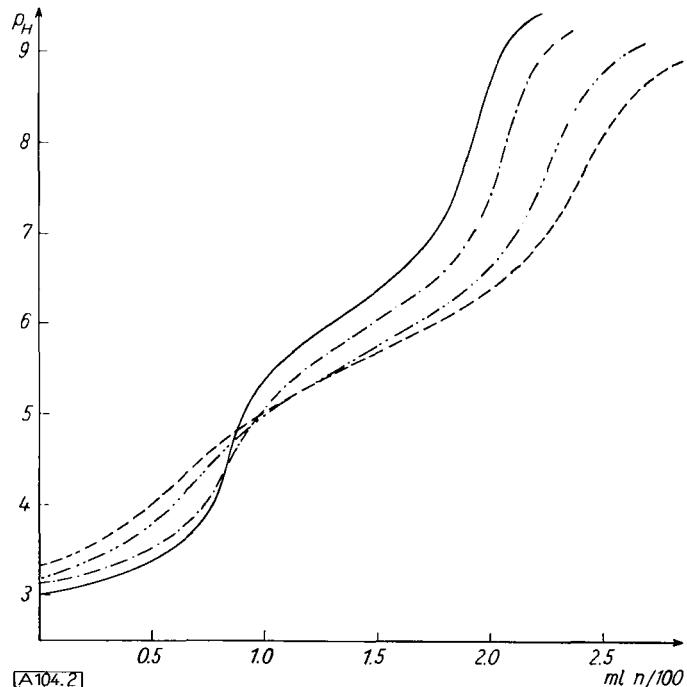


Abb. 2. Titrationskurve von Monophenylphosphorsäure³¹⁾ (10^{-3} M, 10 cm^3); — ohne Dextrin; - - - mit α -Dextrin $0,5 \times 10^{-1}$ M; - - - - mit α -Dextrin $1,0 \times 10^{-1}$ M; - - - - - mit α -Dextrin $1,5 \times 10^{-1}$ M

Dabei ergibt sich ein völlig geändertes Dissoziationsverhalten (Abb. 2), die Monophenylphosphorsäure ist überhaupt nicht mehr als zweibasige Säure titrierbar. Dieses Experiment beweist, daß allein ein physikalischer molekularer Hohlraum das Dissoziationsverhalten einer Säure völlig ändern kann, etwa nach dem Mechanismus, den Abb. 3 beschreibt.

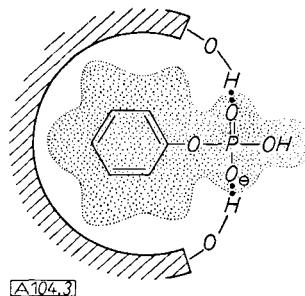


Abb. 3. Schematische Darstellung der Änderung des Dissoziationsverhaltens von Phosphorsäuren im Hohlraum eines Cyclodextrins durch Wasserstoff-Brücken. Die punktierte Fläche gibt die ungefähren van der Waals-Radien wieder.

Phosphorsäure wird also zu einer sehr schwachen Säure, die kaum mehr dissoziiert ist. Die Änderung des Dissoziationsverhaltens beobachtet man aber nur dann, wenn sich an der Phosphorsäure ein Substituent geeigneter Größe befindet, der für die Fixierung der Säure durch van der Waalsche Kräfte in einer solchen Lage sorgt, daß räumlich spezifische Wasserstoff-Brücken errichtet werden können^{32, 33)}.

³¹⁾ F. M. Henglein, Dissertation Heidelberg 1957.

³²⁾ Zur Stereospezifität von Einschlußverbindungen vgl. F. Cramer u. F. M. Henglein, Chem. Ber. 90, 2561 [1957]; F. Cramer u. W. Dietsche, ebenda 92, 378 [1959].

³³⁾ Vielleicht muß der „Verbrauch von Protonen“ bei der Bildung der Desoxycholat-Helix in wässriger Lösung (D. M. Blow u. A. Rich, J. Amer. chem. Soc. 82, 3566 [1960]) ähnlich verstanden werden.

Wir sind nun in der Lage, den Kreis unserer Überlegungen zu schließen; Untersuchungen über die Stabilität von substituierten Pyrophosphaten in Gegenwart von Cyclodextrinen zeigen folgendes: Cyclodextrin katalysiert die Spaltung von Diester-pyrophosphaten in Abhängigkeit von der Größe des Substituenten in der Phosphorsäureester-Bindung³⁴⁾.

Substituent R am Pyrophosphat	ohne	mit α -Dextrin Hohlraum $\varnothing 6 \text{ \AA}$	mit β -Dextrin Hohlraum $\varnothing 8 \text{ \AA}$	mit γ -Dextrin Hohlraum $\varnothing 10 \text{ \AA}$
<chem>c1ccccc1</chem>	7,4	11,5	32,9	18,0
<chem>Cc1ccccc1</chem>	4,8	5,5	44,4	28,7
<chem>Clc1ccccc1</chem>	< 1,0	15,1	100,0	30,8

Tabelle 4. Katalyse der Pyrophosphat-Spaltung $\text{RO}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{P}}}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{P}}}-\text{OR}$
durch Cyclodextrine; Tabelle der Reaktionsgeschwindigkeiten.
Molares Verhältnis Substrat: Cyclodextrin: $\text{Ca}^{2+} = 1:1:1$; 40°C
 $\text{p}_\text{H} 12$, $\text{K}^{1/10}$ -Werte $\cdot 10^3$

Ohne Cyclodextrin wird in Gegenwart einer bestimmten Menge Ca^{2+} das Diphenylpyrophosphat mit der Geschwindigkeit 7 gespalten, mit α -Cyclodextrin steigt die Geschwindigkeit auf 11 und mit β -Cyclodextrin auf 33. α -Methylglucosid als nichtcyclisches Kohlenhydrat zeigt keinerlei katalytische Wirkung, es hemmt sogar die Reaktion durch Bindung von Ca^{2+} . Die Katalyse der Spaltung ist sehr substrat-spezifisch und abhängig von kleinen Änderungen der Größe des Substituenten. Die Di-p-tolyl-pyrophosphorsäure hat einen für α -Cyclodextrin (Durchmesser des Hohlraumes 6 Å) zu großen Substituenten, die Katalyse mit α -Dextrin ist = 0, dagegen paßt der Tolyrest ideal in β -Dextrin (Durchmesser des Hohlraumes 8 Å) hinein; die Spaltung verläuft mit der 9-fachen Geschwindigkeit. Für die Di-p-chlorphenyl-pyrophosphorsäure beträgt der Beschleunigungsfaktor mit β -Dextrin sogar mindestens 100³⁵⁾.

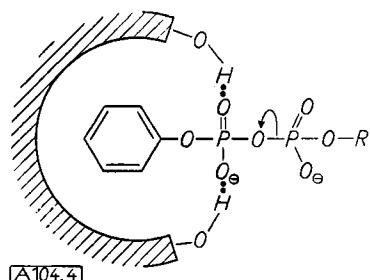


Abb. 4. Spaltung der Pyrophosphat-Bindung durch das Cyclodextrin-Modell

³⁴⁾ Unveröffentl. Versuch von N. Hennrich, Darmstadt. Vgl. auch Dissert. W. Dietsche, Heidelberg 1958.

³⁵⁾ F. Cramer u. N. Hennrich, Chem. Ber., in Vorbereitung.

Prinzipiell müßte es also möglich sein, einen spezifischen Hohlraum für ein bestimmtes Pyrophosphat zu konstruieren, der ein und nur ein Pyrophosphat spezifisch spaltet.

Die Aufarbeitung der Reaktionsprodukte brachte uns ein höchst überraschendes Ergebnis: In Gegenwart von Cyclodextrin wird das Pyrophosphat nicht hydrolysiert, sondern das Cyclodextrin wird phosphoryliert. Die Reaktion verläuft also in Gegenwart des Katalysators auch qualitativ anders, trotz des gewaltigen Überschusses an H_2O – die Lösungen sind etwa 10^{-3} molar – und eines beträchtlichen Überschusses an OH^- -Ionen ($\text{p}_\text{H} 12$) phosphoryliert die katalysierende Matrize sich selbst.

Da nach Kornberg die Synthese der DNS von einer Matrize gesteuert wird und auch die RNS-Synthese höchst spezifisch verläuft, muß man annehmen, daß das Enzym aus dem Vorrat der 4 Nucleotide jeweils das geeignete auswählt und einbaut. Unsere Cyclodextrin-Reaktion stellt ein Modell für diesen spezifischen Auswahlprozeß an einer Matrize mit gleichzeitiger Aktivierung dar.

11. Schlußbetrachtung

Das Gebiet der Polynucleotid-Synthese ist noch in den ersten Anfängen. Wenn wir abschließend unser Problem mit der in vieler Beziehung ähnlichen Aufgabe der Polykondensation der Aminosäuren zu Polypeptiden vergleichen, so zeigt sich, daß die relativ ältere, jetzt etwa fünfzigjährige Peptidchemie schon wesentlich weiter ist, man kann heute ca. 20 Aminosäuren in bestimmter Sequenz aneinanderknüpfen. Sicherlich ist die Polynucleotid-Synthese noch etwas komplizierter als die Peptidsynthese. Andererseits ist die Aufgabe ebenso verlockend, ja vielleicht auch noch wichtiger. Ist doch in der biochemischen Rangordnung die Nucleinsäure den Proteinen übergeordnet; die Reihenfolge der Bausteine der Nucleinsäure determiniert die Sequenz der Aminosäuren im Peptid – nicht umgekehrt. Hier setzt also das Bemühen des Forschers im Zentrum an und man darf sagen, daß die enormen Schwierigkeiten dennoch in einer vernünftigen Relation zur Bedeutung des Problems stehen.

Meinen Mitarbeitern, von denen vor allem Dr. Baldauf, Dr. Hennrich, Dr. Winter und Dr. Wittmann genannt seien, möchte ich an dieser Stelle besonders danken.

Unsere Arbeiten der letzten Jahre waren möglich dank der Unterstützung der folgenden Gremien: Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg; Rockefeller-Stiftung, New York; Bundesministerium für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft, Bad Godesberg; Fonds der Chemischen Industrie, Düsseldorf; Bad. Anilin- u. Soda-fabrik, Ludwigshafen; Research Corporation, New York; Gesellschaft der Freunde der T.H. Darmstadt.

Eingegangen am 14. Juli 1960 [A 104]