

# Die Synthese von Oligo- und Polynucleotiden

VON PROF. DR. F. CRAMER

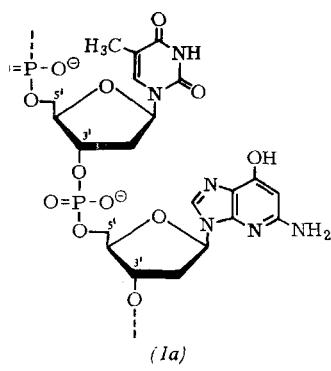
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN,  
CHEMISCHE ABTEILUNG, GÖTTINGEN

*Meinem verehrten Lehrer, Professor K. Freudenberg, einem der Pioniere der Chemie der Biopolymeren<sup>[1]</sup>, zum 80. Geburtstage gewidmet*

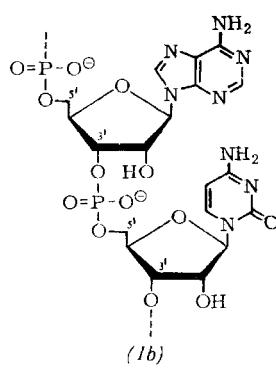
*Probleme und Ergebnisse der Synthese von Oligonucleotiden werden zusammenfassend dargestellt. Die zentrale Rolle der Nucleinsäuren im biochemischen Geschehen fordert dazu auf, Nucleinsäuren bekannter Sequenz und Kettenlänge zu synthetisieren. Durch chemische Synthese lassen sich mit geeigneten Schutzgruppen und Kondensationsmitteln definierte Oligomere mit verschiedenen Sequenzen bis zu 12 Gliedern und Homo-oligomere mit einer Maximallänge von 30 Gliedern erhalten. Die enzymatische Synthese von Ribonucleinsäuren kann so gelenkt werden, daß Polynucleotide mit definierten Sequenzen entstehen.*

## 1. Struktur, Nomenklatur

Nucleinsäuren sind gemischte Polyester; zwei Grundeinheiten geben die Formeln (1a) und (1b) wieder.



Desoxyribonucleinsäure (DNS)  
Abkürzung: d-...pTpG...



Ribonucleinsäure (RNS)  
Abkürzung: ...pApC...

Das chemische Hauptmerkmal der Nucleinsäuren ist die Phosphorsäureester-Bindung (= Internucleotidbindung). Sie bedingt die Hydrolyseempfindlichkeit der Substanzen. Die glykosidische Bindung zwischen der Ribose und den Nucleobasen ist säurelabil, insbesondere bei den Purin-Nucleosiden. Als weitere funktionelle Gruppe muß bei synthetischen Arbeiten die Aminogruppe am Cytosin und Adenin, gelegentlich auch am Guanin, berücksichtigt werden. Ribonucleinsäuren sind wegen der in 2'-Stellung der Ribose vorhandenen Hydroxylgruppe besonders alkalilabil.

Für Polynucleotide wird eine Kurzschreibweise verwendet<sup>[2]</sup>. Hierin bedeutet „p“ auf der linken Seite des Buchstabens,

[1] K. Freudenberg: Tannin, Cellulose, Lignin. Springer-Verlag Berlin 1933. — Über die blutgruppenspezifische Substanz A. Sitzungsber. Heidelberger Akad. Wiss., math.-naturw. Kl. 1940, 9. Abhandlung. — Die Stärke 15, 199 (1963). — High-molecular natural substances, J. Polymer Sci. 16, 155 (1955).

[2] Terminology and Abbreviations, Tentative Rules: J. biol. Chemistry 237, 1381 (1962).

der das Nucleosid bezeichnet, einen Phosphatrest in 5'-Stellung der Ribose, ein „p“ rechts von diesem Buchstaben einen Phosphatrest in 3'-Stellung der Ribose. Die Nucleoside werden durch folgende Abkürzungen gekennzeichnet: A = Adenosin, C = Cytidin, G = Guanosin, T = Thymidin, U = Uridin. Wenn es sich um ein Desoxynucleosid handelt, wird ein „d“ vor die Kurzbezeichnung gesetzt. — RNS bedeutet Ribonucleinsäure, DNS bedeutet Desoxyribonucleinsäure.

## 2. Aufgabenstellung

Die Rolle der DNS als Träger der genetischen Information ist bekannt. Über die Funktion der RNS konnte man noch vor fünf Jahren in einem zusammenfassenden Bericht über Polynucleotidsynthesen<sup>[3]</sup> lesen: „Die Rolle der RNS ist noch weit weniger klar. Man weiß nur, daß sie für die Synthese der Proteine verantwortlich ist, indem sie die Proteinsynthese steuert. Auch hier sind es offenbar bestimmte Nucleotidsequenzen, die für die Synthese bestimmter Proteine bedeutungsvoll sind“. Inzwischen wurden durch die Fortschritte der Molekulärbiologie<sup>[4]</sup> die funktionellen Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Arten der Nucleinsäuren und zwischen diesen und der Biosynthese der Proteine geklärt (Schema 1). Man spricht von der „Dreifaltigkeit“ der Biochemie.

Die Synthese von Oligo- und Polynucleotiden ist wichtig, weil sich die Kopier- und Übersetzungsvorgänge bei der Biosynthese der Proteine mit synthetischen Polymeren besonders gut studieren lassen sollten<sup>[5]</sup>. Auch für Studien über Basenpaarung und über die Stabilität von Doppelhelices sind definierte Oligonucleotide notwendig<sup>[6]</sup>. Zur Entzifferung des genetischen Codes müs-

[3] F. Cramer, Angew. Chem. 73, 49 (1961).

[4] Zusammenfassende Artikel in: Progress in Nucleic Acid Research and in Molecular Biology. Academic Press, New York 1963/64, Bd. I bis III.

[5] Vgl. z. B.: S. Nishimura, D. S. Jones, E. Ohtsuka, H. Hayatsu, T. M. Jacob u. H. G. Khorana, J. molecular Biol. 13, 283 (1965).

|             | Funktion   | Strukturbeispiel  | Lokalisierung                                 |  |
|-------------|--|---|---|--|
| DNS         | Speicher der genetischen Information                     | d-...pTpApGpCp...   | Zellkern, Chromosom                           |  |
|             |  | ↓ Transkription (Umkopierung)   |   |  |
| I. RNS      | Messenger für die Synthese eines Protein- oder Enzymtyps | ...pApUpCpGp...   | Während der Kopie an der DNS, dann am Ribosom |  |
|             |  | ↓ Translation (Übersetzung in ein Protein definierter Sequenz)  |   |  |
| II. Protein | Enzym oder Strukturelement der Zelle                     | $\begin{array}{ccccccc} -\text{NH}-\text{CH}- & \text{C}-\text{NH}- & \text{CH}- & \text{C}-\text{NH}- & \text{CH}-\text{C}- \\   &   &   &   &   \\ \text{R}^1 & \text{O} & \text{R}^2 & \text{O} & \text{R}^3 & \text{O} \end{array}$ |   |  |

Schema 1. Funktionen von DNS und RNS bei der Biosynthese der Proteine.

sen die als Codewörter dienenden Trinucleotide synthetisiert oder aus natürlichem Material isoliert werden [7,8]. Die Bestimmung der Leserichtung des genetischen Alphabets erfordert Polynucleotide mit definierten terminalen Triplets [7,9]. Die Wirkungsweise und die Spezifität von Enzymen, die Nucleinsäuren spalten, kann an Dinucleosidphosphaten studiert werden [10]. Zur Untersuchung chemischer Mutationen an transformierender DNS könnten Oligonucleotide als Modelle dienen. Fragen der Sekundärstruktur von Polynucleotid-Strängen muß man an einfacheren Verbindungen klären. Die Strukturermittlung und die Sequenzanalyse der Nucleinsäuren könnte durch die Synthese von Teilstücken unterstützt werden.

Eine chemische Synthese von transformierender, d.h. genetische Information enthaltender DNS mit mindestens  $10^5$  Kettengliedern übersteigt das menschliche Leistungsvermögen selbst bei weitgehender Automatisierung aller Arbeitsgänge. Auch die Synthese von messenger-RNS mit mindestens 500 Nucleotiden pro Molekül oder von transfer-RNS mit ca. 80 Kettengliedern erscheint ausgeschlossen.

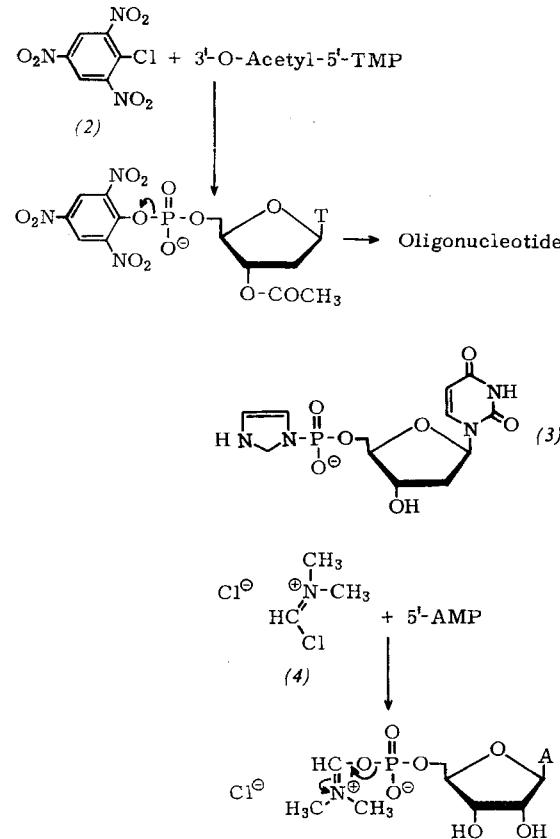
### 3. Chemische Synthesen

#### 3.1. Phosphorylierungsreaktionen

Das klassische Kondensationsmittel in der Oligonucleotidsynthese ist Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) [11,12]. Daneben sind zahlreiche weitere Reagentien für die Darstellung von Nucleotidestern oder Oligonucleotiden

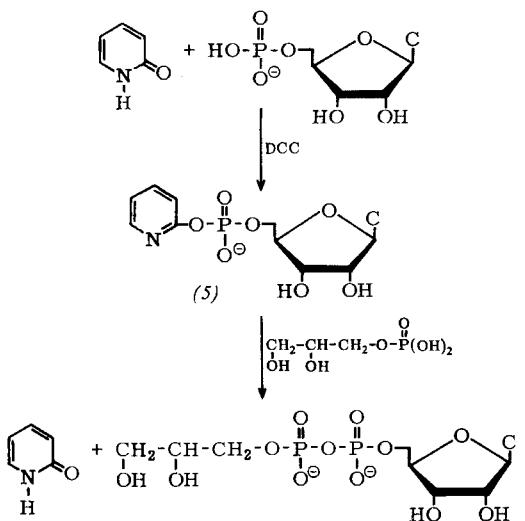
- [6] H. A. Scheraga, Vortrag, Göttingen, September 1965.
- [7] F. Cramer, H. Küntzel u. J. H. Matthaei, Angew. Chem. 76, 716, 800 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. 3, 589 (1964).
- [8] M. Nirenberg u. P. Leder, Science (Washington) 145, 1399 (1964).
- [9] S. Ochoa, 2nd FEBS-Meeting Wien 1965, Referate S. 273.
- [10] H. Witzel u. E. A. Barnard, Biochem. biophysic. Res. Commun. 7, 295 (1962).
- [11] H. G. Khorana u. A. R. Todd, J. chem. Soc. (London) 1953, 2257.
- [12] H. G. Khorana: Some recent developments in the chemistry of phosphate esters of biological interest. Wiley, New York 1961.

erprobt und in speziellen Fällen als geeignet gefunden worden, so z.B. Säurechloride [13,14], Trichloracetonitril [15,16], Woodwards Reagens [17], Pikrylchlorid (2) [18]. Nucleotid-imidazolide (3) wurden auf ihre Eignung zur Oligonucleotidsynthese [19] geprüft. Dimethylformamid-chlorid (4) ist ein Veresterungsreagens für Nucleotide [14,20,21]

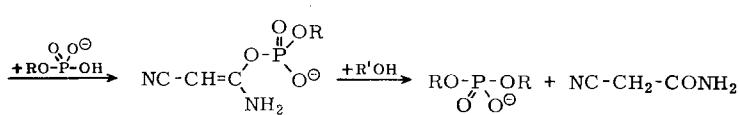
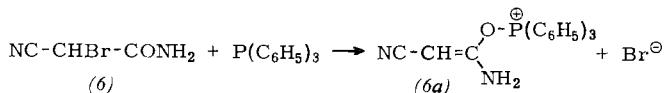


Neue Phosphorylierungsreagentien sind Phosphorsäure- $\alpha$ -hydroxypyridylester [22].  $\alpha$ -Hydroxypyridylester der Nucleotide (5) übertragen den Nucleotidrest auf andere Nucleophile, z. B. auf Phosphate, so daß Pyrophosphat-Coenzyme entstehen. Eine Oligonucleotidsynthese ist mit diesen Verbindungen bisher noch nicht durchgeführt worden. Ein energisch wirkendes Phosphorylierungsreagens ist die Mischung von  $\alpha$ -Bromcyanacetamid (6) und Triphenylphosphin [23]. Bei dieser Reak-

- [13] T. M. Jacob u. H. G. Khorana, Chem. and Ind. 1962, 932.
- [14] T. M. Jacob u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 86, 1630 (1964).
- [15] F. Cramer, W. Rittersdorf u. W. Böhm, Liebigs Ann. Chem. 654, 180 (1962).
- [16] F. Cramer, H. J. Baldauf u. H. Küntzel, Angew. Chem. 74, 77 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. 1, 54 (1962).
- [17] F. Cramer, H. Neunhoeffer, K.-H. Scheit, G. Schneider u. J. Tennigkeit, Angew. Chem. 74, 387 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. 1, 331 (1962).
- [18] F. Cramer, R. Wittmann, K. Daneck u. G. Weimann, Angew. Chem. 75, 92 (1963); Angew. Chem. internat. Edit. 2, 43 (1963).
- [19] F. Cramer u. H. Neunhoeffer, Chem. Ber. 95, 1664 (1962).
- [20] F. Cramer, S. Rittner, W. Reinhard u. P. Desai, Chem. Ber., im Druck.
- [21] M. Ikehara u. H. Uno, Chem. Pharm. Bull. 12, 742 (1964).
- [22] W. Kampe, Tetrahedron Letters 1963, 2133.
- [23] F. Cramer u. T. Hata, Liebigs Ann. Chem., im Druck.



tion, deren erster Schritt nach Art einer Perkow-Reaktion verläuft, entsteht eine Zwischenverbindung (*6a*), die dem schon früher zur Synthese von Oligonucleotiden verwendetem Enolphosphat des Malonesters<sup>[24]</sup> entspricht.



In einer vergleichenden Untersuchung<sup>[25]</sup> wurde die phosphorylierende Wirkung von Cyclohexyloxonitril, Äthoxyacetylen, Bromcyan, Dichlormalonsäuredinitril, Perfluoroctancarbonsäurenitril, Benzonitril, Benzylecyanid, Malodinitril studiert, doch erwies sich keines dieser Reagentien als den bisher benutzten deutlich überlegen. Auch die Inamine 1-Dimethylamino-2-phenylacetylen und 1-Dimethylamino-3,3-dimethyl-1-butin sowie 4-Nitrophenylcyanat, N-Äthylbenzisoxazolium-fluoroborat<sup>[25a]</sup>, N(1),N(4)-Diäthyltetrazolium-tosylat oder N(1)-Äthyl-N(4)-methoxyphnyltetrazolium-tosylat lieferten keine befriedigenden Ausbeuten an Dinucleosidphosphaten<sup>[25b]</sup>.

### 3.2. Schutzgruppen

#### 3.2.1. Schutzgruppen für Phosphorsäuren

Bei der Verknüpfung zweier Nucleotide muß der Phosphorsäurerest des einen Nucleotids geschützt werden, um die Kondensation in der richtigen Reihenfolge zu bewirken. Im allgemeinen genügt es, das Nucleotid einmal zu verestern; Phosphorsäure-diester werden durch die meisten Kondensationsmittel nicht mehr aktiviert. Phosphorsäure-benzylester<sup>[26]</sup> lassen sich nach der

[24] F. Cramer u. R. Wittmann, Angew. Chem. 72, 628 (1960).

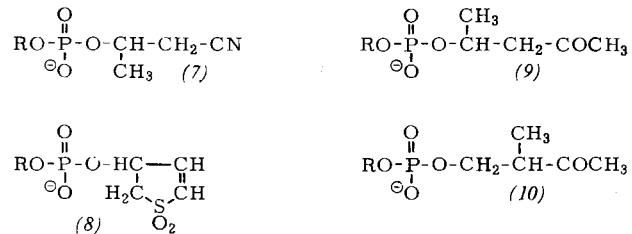
[25] K. von der Trappen, Dissertation, Universität Heidelberg 1962.

[25a] Wir danken Dr. D. S. Kemp für die Überlassung des Präparates.

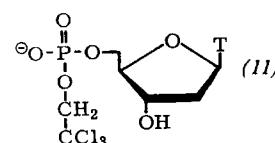
[25b] F. Eckstein u. R. Olofson, unveröffentlichte Versuche.

[26] F. R. Atherton, H. T. Openshaw u. A. R. Todd, J. chem. Soc. (London) 1945, 382.

Reaktion durch Hydrierung wieder spalten, allerdings besteht dabei die Gefahr, daß auch Pyrimidinkerne hydriert werden. Der  $\beta$ -Cyanäthylrest<sup>[27]</sup> läßt sich mit Alkali unter  $\beta$ -Eliminierung abspalten. Von den alkali-labilen Estern (*7*)–(*10*), R = Nucleosid, erwiesen sich die Ester (*9*) und (*10*) als besonders geeignete Phosphorsäure-Schutzgruppen für Oligonucleotide<sup>[28]</sup>.



Durch Umsetzen von Nucleotiden mit Diphenyldiazomethan erhält man Benzhydrylester von Nucleotiden<sup>[29]</sup>, die mit verdünnten Säuren gespalten werden können. Auch tert.-Butylester sind säurelabil<sup>[30]</sup>.  $\beta,\beta,\beta$ -Trichloräthylester von Desoxyribonucleotiden (*11*) können durch Zn/Cu in Essigsäure oder in Dimethylformamid ohne Verlust von O-Acetyl- oder O-Benzoylgruppen reduktiv gespalten werden<sup>[31]</sup>. Als oxidativ abspaltbare Gruppe wurde die Äthylthiogruppe vorgeschlagen<sup>[32]</sup>.



#### 3.2.2. Schutzgruppen für Hydroxyl- und Aminogruppen

Acetyl- und Benzoylderivate von Nucleosiden und Desoxyribonucleotiden lassen sich nach den in der Zuckerchemie üblichen Verfahren bereiten. Bei der Acylierung von 3'-Ribonucleotiden müssen die Bedingungen so gewählt werden, daß die Bildung von Cyclophosphat vermieden wird<sup>[33]</sup>. Zum spezifischen Schutz der primären OH-Gruppe in 5'-Stellung werden Tritylderivate oder die leichter abspaltbaren p-Methoxytritylderivate verwendet<sup>[36]</sup>: Die 2'-OH-Gruppe läßt sich mit Di-hydropyran<sup>[34, 36]</sup> oder mit Äthylvinyläther<sup>[35]</sup> abdecken. Durch Bildung von Benzylidenderivaten (p-Methoxybenzyliden-<sup>[36]</sup> oder p-Dimethylaminobenzy-

[27] G. M. Tener, J. Amer. chem. Soc. 83, 159 (1961).

[28] D. Söll u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 87, 360 (1965).

[29] F. Cramer u. K.-H. Scheit, Liebigs Ann. Chem. 679, 150 (1964).

[30] F. Cramer, H. P. Bär, H. J. Rhaese, W. Saenger, K.-H. Scheit u. G. Schneider, Tetrahedron Letters 1963, 1039.

[31] F. Eckstein, Angew. Chem. 77, 912 (1965); Angew. Chem. internat. Edit. 4, 876 (1965).

[32] A. Nussbaum u. R. Tiberi, J. Amer. chem. Soc. 87, 2513 (1965).

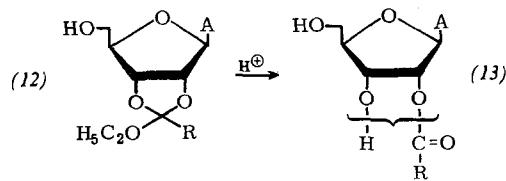
[33] D. H. Rammier, Y. Lapidot u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 85, 1989 (1963).

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

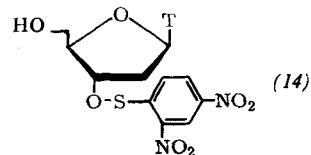
[35] S. Chladek u. J. Smrt, Chem. and Ind. 1964, 1719.

[36] M. Smith, D. H. Rammier, I. H. Goldberg u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 84, 430 (1962).

liden-Gruppierungen [37]), die sich leicht mit Säure spalten lassen, können die 2'- und 3'-Stellungen der Ribose reversibel geschützt werden. Den gleichen Zweck erfüllen 2',3'-O-Äthoxymethylenderivate (12), die durch Behandlung mit Essigsäure in die 2'- und 3'-O-Acyl-derivate (13) übergeführt werden [38–40].



Bei der Synthese eines Dinucleotids an einem polymeren Träger wurde ein Dinitrophenylsulfenyl-desoxyribonucleosid (14) verwendet. Derartige Verbindungen kön-



nen durch Thiophenol oder Raney-Nickel gespalten werden [41,42]. Formylnucleoside [30, 43, 44] sind synthetisiert, aber nicht zur Synthese von Oligonucleotiden eingesetzt worden.

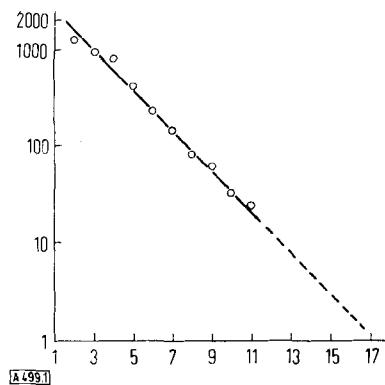


Abb. 1. Kettenlängenverteilung im Produkt der Polykondensation von Thymidylsäure mit Pikrylchlorid.  
Ordinate: Ausbeute an Oligonucleotid, ermittelt aus der Extinktion bei 267 mμ.  
Abszisse: Zahl der TMP-Einheiten in der Oligonucleotid-Kette.

dem entstehenden Gemisch von Oligomeren nimmt der Gehalt an längeren Ketten im Sinne einer Poisson-Verteilung ab (Abb. 1). Die Verbindungen werden an Säulen mit DEAE-Cellulose [45] (Abb. 2) oder auf Polymin-Cellulose-Dünnschichtplatten [48] (Abb. 3) getrennt. Das längste bisher dargestellte Oligomere ist die Poly-thymidylsäure mit 30 Kettengliedern [50], die durch Kondensation mit Pikrylchlorid gewonnen wurde.

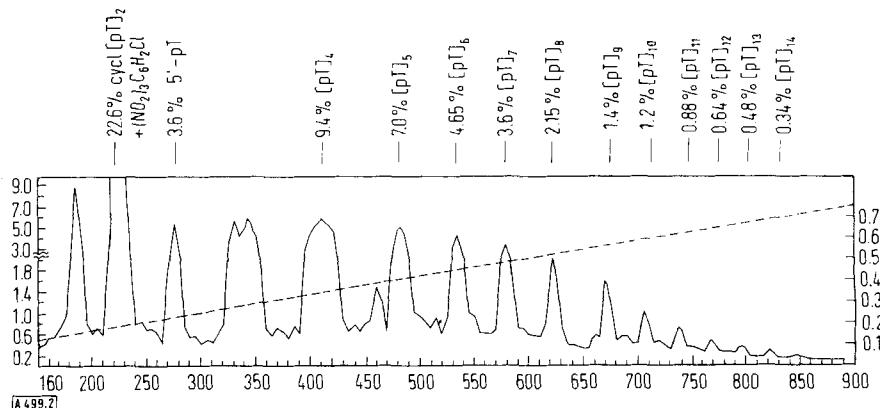


Abb. 2. Säulenchromatographische Trennung von Oligothymidylsäuren verschiedener Kettenlänge an DEAE-Cellulose. Elutionsmittel: wäßrige Lösung von Triäthylammonium-hydrogencarbonat steigender Konzentration (die von links nach rechts steigende gestrichelte Linie kennzeichnet den Konzentrationsgradienten) [47].  
Ordinaten: links: Extinktion bei 267 mμ.  
rechts: Molarität an Triäthylammonium-hydrogen-carbonat.  
Abszisse: Fraktionsnummer (je Fraktion 25 ml).

### 3.3. Synthese von Oligodesoxyribonucleotiden

#### 3.3.1. Homopolymere

Durch Kondensation von Thymidylsäure mit Dicyclohexylcarbodiimid [45], Pikrylchlorid [18] oder anderen Reagentien lassen sich Homooligomere darstellen. In

- [37] F. Cramer, W. Saenger, K.-H. Scheit u. J. Tennigkeit, Liebigs Ann. Chem. 679, 156 (1964).
- [38] J. Žemlička u. S. Chládek, Tetrahedron Letters 1965, 3057.
- [39] C. B. Reese u. J. E. Sulston, Proc. chem. Soc. (London) 1964, 214.
- [40] F. Eckstein u. F. Cramer, Chem. Ber. 98, 995 (1965).
- [41] R. L. Letsinger u. V. Mahadevan, J. Amer. chem. Soc. 87, 3526 (1965).
- [42] F. Eckstein, Tetrahedron Letters 1965, 531.
- [43] J. Žemlička, J. Beránek u. J. Smrt, Collect. czechoslov. chem. Commun. 27, 2784 (1962).
- [44] S. Chládek u. J. Smrt, Collect. czechoslov. chem. Commun. 29, 214 (1964).
- [45] G. M. Tener, H. G. Khorana, R. Markham u. E. H. Pol, J. Amer. chem. Soc. 80, 6223 (1958).

Außer Poly-T wurden nach diesem Verfahren Poly-d-A [51], Poly-d-C [52] und Poly-d-G [53] synthetisiert, z.T. mit geringerer Ausbeute. Die in den Fraktionen enthaltenen Oligo-

- [46] K. Daneck, Göttingen, unveröffentlichte Versuche.
- [47] G. Hoffarth, Göttingen, unveröffentlichte Versuche.
- [48] S. Rittner u. G. Weimann, Göttingen, unveröffentlichte Versuche.
- [49] G. Weimann, K. Daneck u. F. Cramer, Experientia 21, 417 (1965).
- [50] F. N. Hayes u. E. Hansbury, J. Amer. chem. Soc. 86, 4172 (1964).
- [51] R. K. Ralph u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 83, 2926 (1961).
- [52] H. G. Khorana, A. F. Turner u. J. P. Vizsolyi, J. Amer. chem. Soc. 83, 6886 (1961).
- [53] R. K. Ralph, W. J. Connors, H. Schaller u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 85, 1983 (1963).

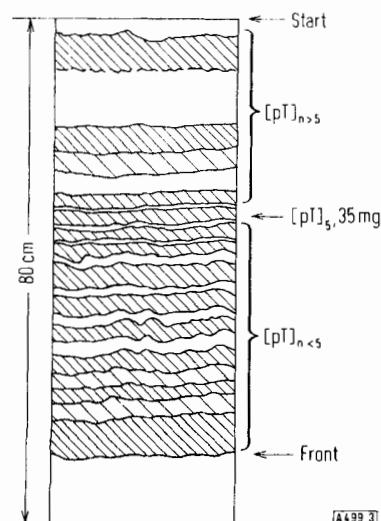
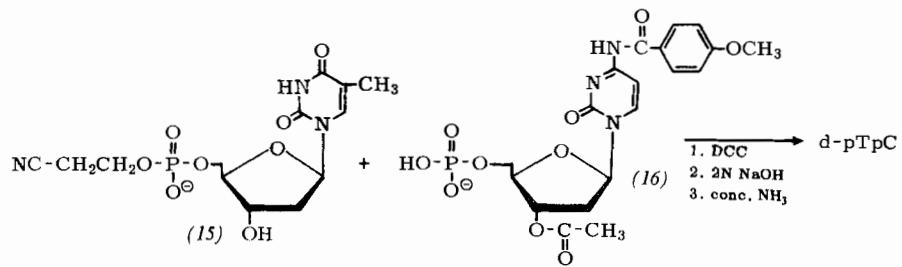
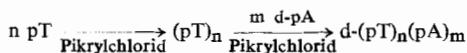


Abb. 3. Dünnschichtchromatographische Trennung von Oligothymidylsäuren verschiedener Kettenlänge an Polymin-Cellose [48]. Die einzelnen Bänder wurden eluiert und nach der  $Zn(OH)_2$ -Methode [49] aufgearbeitet.

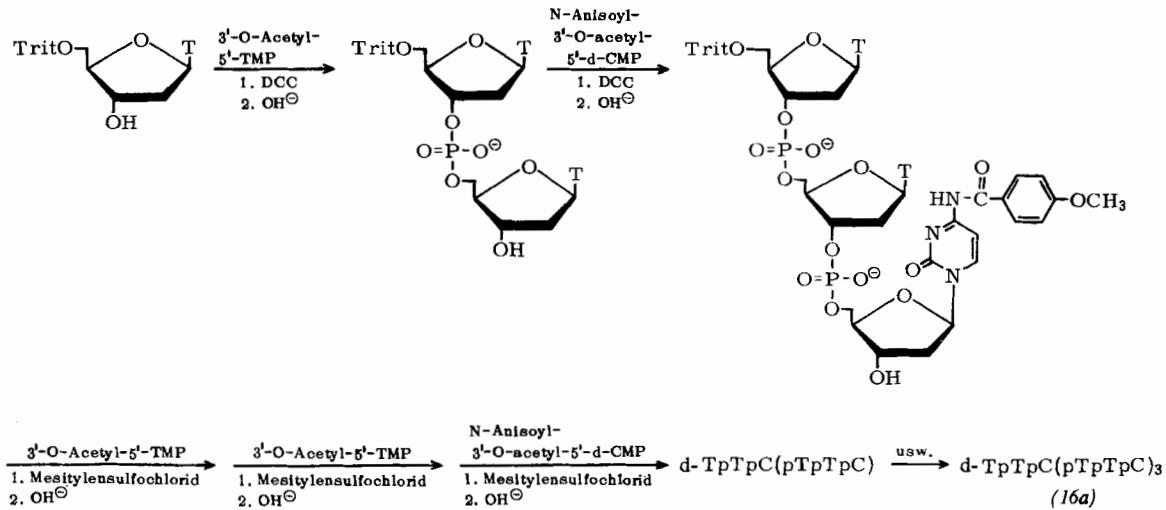
**Laufmittel:** 0,25 M NaCl (2 Std.), 0,50 M NaCl (2 Std.), 0,75 M NaCl (2 Std.), 1,00 M NaCl (2 Std.), 1,50 M NaCl (2 Std.).

nucleotide lassen sich durch Fällung mit  $Zn(OH)_2$  isolieren [49]. Nach dem folgenden Schema kann man eine Pfpfopolymerisation erreichen [46].



zum Schluß entfernt wird, beispielsweise die säure-labile Tritylgruppe. So ist man bis zum Dodecanucleotid d-TpTpC(pTpTpC)<sub>3</sub> (16a) [58] gelangt, hat die homologen Oligothymidylsäuren synthetisiert [59] und analog die Oligonucleotide d-TpTpI(pTpTpI)<sub>3</sub> [60], d-CpApApCpApA [61], d-GpApApGpApA [61] und d-TpApTpTpT [55].

Das Problem der schrittweisen Synthese von Oligonucleotiden mit terminalem 5'- oder 3'-Phosphat, also von Verbindungen des Typs  $pXpYpZ$  oder  $XpYpZp$ ,



### 3.3.2. Schrittweise Synthese von Oligodesoxyribonucleotiden

Die Kondensation des  $\beta$ -Cyanäthylesters eines 5'-Nucleotids (15) mit einem 3'-O-Acetyl-nucleotid (16) liefert ein Dinucleotid, aus dem die Schutzgruppen alkalisch abgespalten werden können. Auf diese Weise wurden dargestellt: d-pTpT, d-pGpC, d-pCpG<sup>[54]</sup>, d-pTpA<sup>[55]</sup>, d-pTpG, d-pTpC, d-pApG, d-pCpA<sup>[56]</sup>, d-

ist weniger gut gelöst. Hierzu bedarf es entweder differenziert abspaltbarer Schutzgruppen S<sup>1</sup> und S<sup>2</sup> am Dinucleotid S<sup>1</sup>-pXpY-O-S<sup>2</sup> oder das Trinucleosiddiphosphat XpYpZ muß im letzten Schritt der Synthese nachphosphoryliert werden. Eine andere Mög-

[54] H. Schaller u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 85, 3841 (1963).

[55] G. Weimann, H. Schaller u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 85, 3835 (1963).

[56] E. Ohtsuka, M. W. Moon u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 87, 2956 (1965).

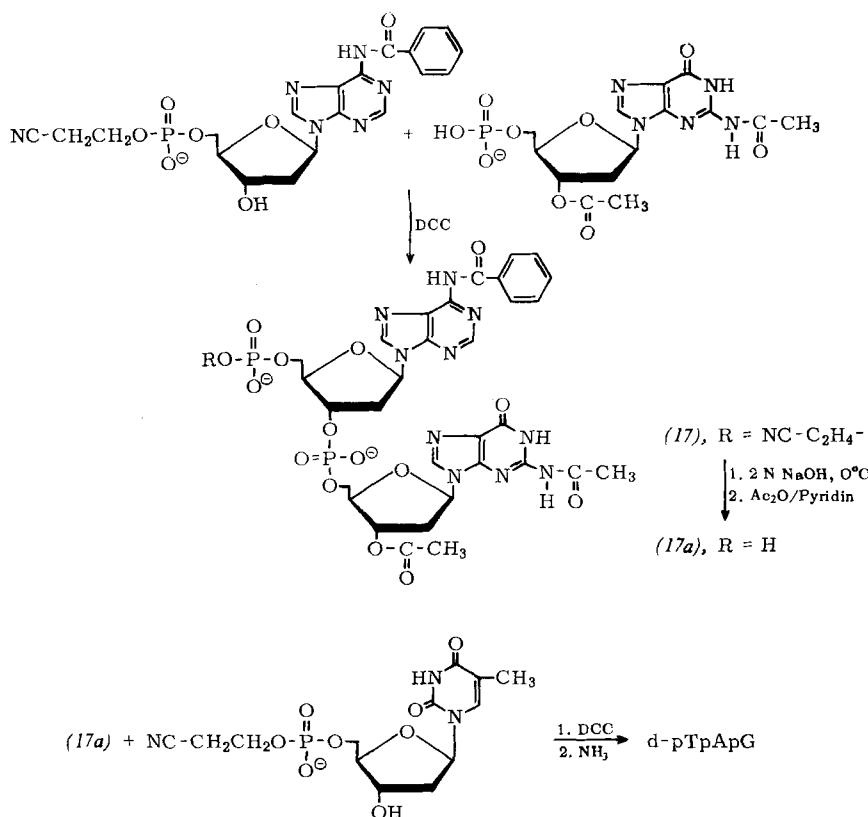
[57] H. Schaller u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 85, 3828 (1963).

[58] T. M. Jacob u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 87, 2971 (1965).

[59] T. M. Jacob u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 87, 368 (1965).

[60] S. A. Narang u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 87, 2981 (1965).

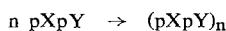
[61] S. A. Narang, T. M. Jacob u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 87, 2988 (1965).



lichkeit [62] besteht darin, auf der Stufe des Dinucleotids (17) zunächst alle Schutzgruppen mit Alkali zu entfernen, nachzuacetylieren und schließlich zum Tri-nucleotid zu kondensieren.

### 3.3.3. Blockpolymerisation

Unter Blockpolymerisation wird im folgenden die Kondensation vorgefertigter Oligonucleotide zu höheren Einheiten verstanden. Bisher sind nur Dinucleotide durch Blockpolymerisation zu höheren Einheiten verknüpft worden (Tabelle 1) [55]:



Mit den Produkten konnten wichtige biochemische Erkenntnisse gewonnen werden. So kann (d-pTpA)<sub>4</sub> [55] bereits als Matrize für das Kornberg-Enzym dienen [63].

Tabelle 1. Durch Polymerisation von Dinucleotiden gewonnene Oligonucleotide [55, 56].

| Dinucleotid | Blockpolymeres        | n   |
|-------------|-----------------------|-----|
| d-pTpA      | (d-pTpA) <sub>n</sub> | 2-7 |
| d-pTpG      | (d-pTpG) <sub>n</sub> | 2-6 |
| d-pTpC      | (d-pTpC) <sub>n</sub> | 2-8 |
| d-pApG      | (d-pApG) <sub>n</sub> | 2-6 |
| d-pCpA      | (d-pCpA) <sub>n</sub> | 2-6 |

Die Oligomeren wirken als Matrizen für DNS-Polymerase und RNS-Polymerase und werden von RNS-Polymerase praktisch fehlerfrei in die komplementäre RNS-

[62] S. Rittner, Göttingen, unveröffentlichte Versuche.

[63] A. Kornberg, L. L. Bertsch, J. F. Jackson u. H. G. Khorana, Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, 315 (1964).

Sequenz übersetzt [64]. Die erhaltene messenger-RNS katalysiert im zellfreien System die Synthese eines Polypeptides mit alternierender Aminosäuresequenz.

## 3.4. Synthese von Oligoribonucleotiden

### 3.4.1. Homopolymere

Die Synthese von Oligoribonucleotiden ist wegen der 2'-OH-Gruppe der Ribose wesentlich komplizierter als entsprechende Synthesen in der Desoxyribose-Reihe; die 2'-Hydroxylgruppe gibt Anlaß zu Isomerisierungen und macht das Endprodukt alkalilabil. Wenn auf das ausschließliche Vorhandensein von 3' → 5'-Bindungen im Polymeren verzichtet wird, ist es relativ einfach, aus 2',3'-O-Cyclophosphaten mit Phosphorsäurediphenylester-chlorid oder anderen energisch wirkenden Säurechloriden als Kondensationsmittel [65, 66] Oligomere der Art (18) zu erhalten.

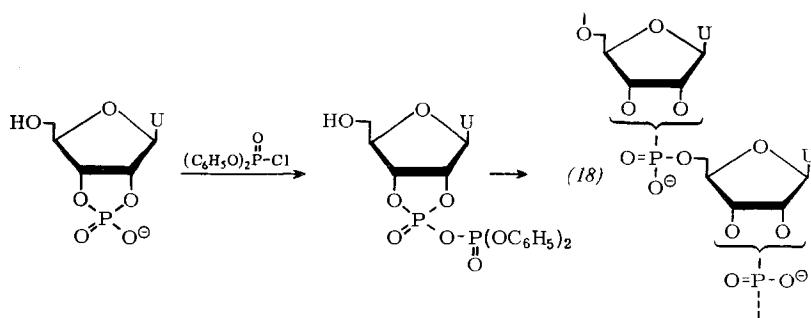
Diese Oligomeren, die für physikalisch-chemische Studien wertvoll sein können, sich den meisten Enzymen gegenüber jedoch nicht wie natürliches Material verhalten, haben Kettenlängen bis zu 20 Einheiten. Durch Zugabe von kettenabbrechenden 2',3'-O-Diacetyl-nucleosiden [66] oder 2',3'-O-Benzylidennucleosiden [67]

[64] S. Nishimura, D. S. Jones u. H. G. Khorana, J. molecular Biol. 13, 302 (1965).

[65] A. M. Michelson, J. chem. Soc. (London) 1959, 1371.

[66] A. M. Michelson: The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides. Academic Press, London - New York 1963, S. 418-441.

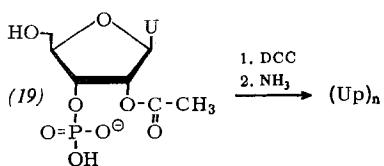
[67] K. H. Scheit u. W. Kampe, Göttingen, unveröffentlichte Versuche.



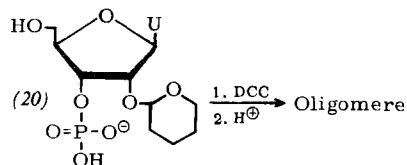
erhält man Oligomere des Typs  $XpXp \cdots XpY$  mit einigermaßen einheitlicher Kettenlänge.

Mit Polyphosphorsäureestern als Kondensationsreagens entstehen aus 3'-(oder 5')-Nucleotiden hochmolekulare Verbindungen<sup>[69]</sup>, die nicht die biologischen Eigenschaften von Polynucleotiden besitzen; sie sind offenbar vernetzt und teilweise substituiert und werden durch Ribonuclease nicht abgebaut<sup>[50, 70]</sup>.

Wenn Isomerisierungen vermieden werden sollen, muß die 2'-Stellung geschützt werden. So ließ sich 2'-O-Acetyl-3'-uridylsäure (19) – allerdings nicht mit sehr befriedigenden Ausbeuten – bis zum Decanucleotid poly-



merisieren<sup>[68]</sup>, und 2'-O-Tetrahydropyran-3'-uridylsäure (20) wurde zu Oligomeren kondensiert, aus denen aber die Tetrahydropyran-Gruppe nur schwer und



nicht ohne Isomerisierung zu entfernen ist<sup>[36]</sup>. Auch ein in 2'-Stellung geschütztes Guanosinderivat wurde bereitet<sup>[71, 72]</sup>.

### 3.4.2. Schrittweise Synthese von Oligoribonucleotiden

#### 3.4.2.1. Dinucleosidphosphate und analoge Verbindungen

Dinucleosidphosphate (XpY) wurden nach verschiedenen Methoden synthetisiert:

2',5'-O-Diacetyl-3'-nucleotide<sup>[73]</sup> (21) lassen sich mit p-Methoxybenzyliden- oder p-Dimethylaminobenzyliden-

[68] C. Coutsogeorgopoulos u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 86, 2926 (1964).

[69] G. Schramm, H. Grötsch u. W. Pollmann, Angew. Chem. 74, 53 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. 1, 1 (1962).

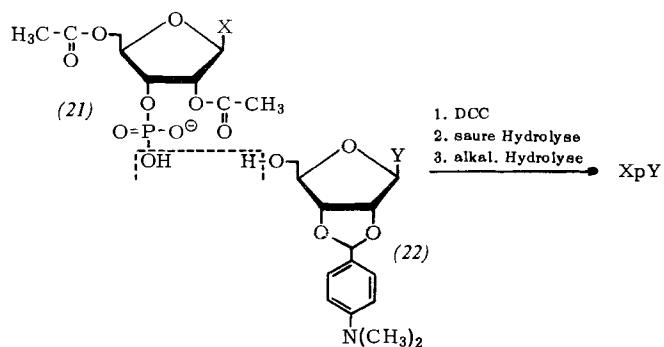
[70] N. K. Kochetkov, E. I. Budowsky, V. D. Domkin u. M. N. Khromov-Borissov, Biochim. biophysica Acta 80, 145 (1964).

[71] D. B. Straus u. J. R. Fresco, J. Amer. chem. Soc. 87, 1364 (1965).

[72] D. B. Straus, J. Amer. chem. Soc. 87, 1375 (1965).

[73] D. H. Rammel u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 84, 3112 (1962).

den-nucleosiden (22) kondensieren<sup>[36, 73a]</sup>. Dies dürfte zur Zeit das ergiebigste Verfahren zur Darstellung von Dinucleosidphosphaten sein. Eine Verlängerung der Kette an der durch alkalische Hydrolyse freigesetzten 5'-Hydroxylgruppe ist jedoch nicht möglich, da auch



die Acetylgruppe in 2'-Stellung des Nucleotids entfernt wird. Dieser Nachteil tritt bei den beiden folgenden Verfahren nicht auf:

Ein 5'-O-p-Methoxytrityl-2'-O-acetyl-3'-nucleotid (23) wird mit einem 2',3'-O-Dibenzoylnucleosid (24) verestert<sup>[74]</sup>. Vom Dinucleosidphosphat (25) läßt sich die Methoxytritylgruppe mit Säure entfernen, ohne daß gleichzeitig Acetyl- oder Benzoylgruppen abgespalten werden. Die weitere Kondensation mit einem 2',5'-O-Diacetyl-3'-nucleotid (26) ergibt dann das Trinucleosid-diphosphat XpYpZ. Auf diesem Weg wurden die 64 möglichen Nucleotid-Triplets synthetisiert<sup>[80]</sup> und zur vollständigen Entzifferung des genetischen Codes verwendet<sup>[81]</sup>. Nach der gleichen Methode wurde das Tetranucleosid-triphosphat UpApUpU erhalten<sup>[82]</sup>.

Eine andere Methode, bei der gleichfalls eine anschließende Kettenverlängerung möglich ist, geht vom 5'-O-

[73a] F. Cramer, H. J. Rhaese, S. Rittner u. K.-H. Scheit, Liebigs Ann. Chem. 683, 199 (1965).

[74] Y. Lapidot u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 85, 1363 (1963).

[75] R. Lohrmann u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 86, 4188 (1964).

[76] J. Smrt u. F. Sorm, Collect. czechoslov. chem. Commun. 28, 887 (1963).

[77] S. Chladek u. J. Smrt, Collect. czechoslov. chem. Commun. 29, 214 (1964).

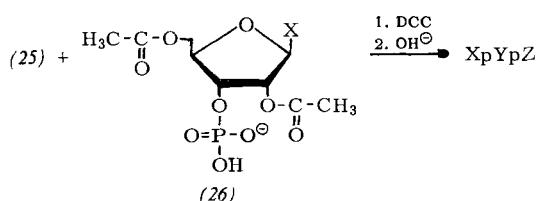
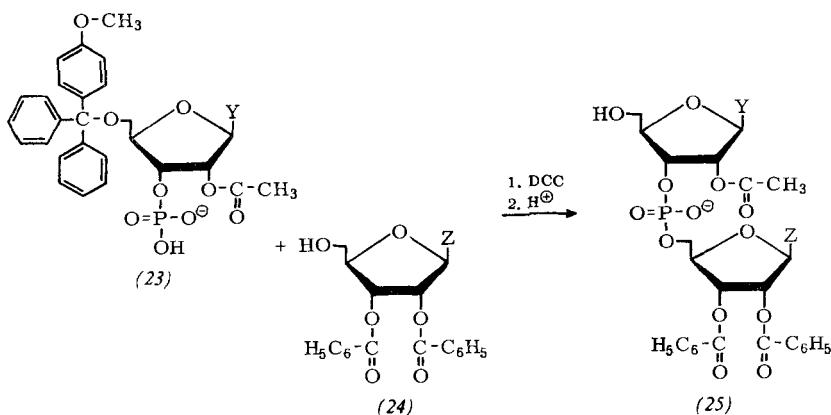
[78] G. Schneider, Dissertation, Technische Hochschule Darmstadt, 1965.

[79] K.-H. Scheit u. F. Cramer, Tetrahedron Letters 1964, 2765.

[80] H. G. Khorana, D. Söll, R. Lohrmann, E. Ohtsuka u. H. Hayatsu, persönliche Mitteilung.

[81] H. G. Khorana, Federat. Proc. 24, 1473 (1965).

[82] Y. Lapidot u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 85, 3852 (1963).



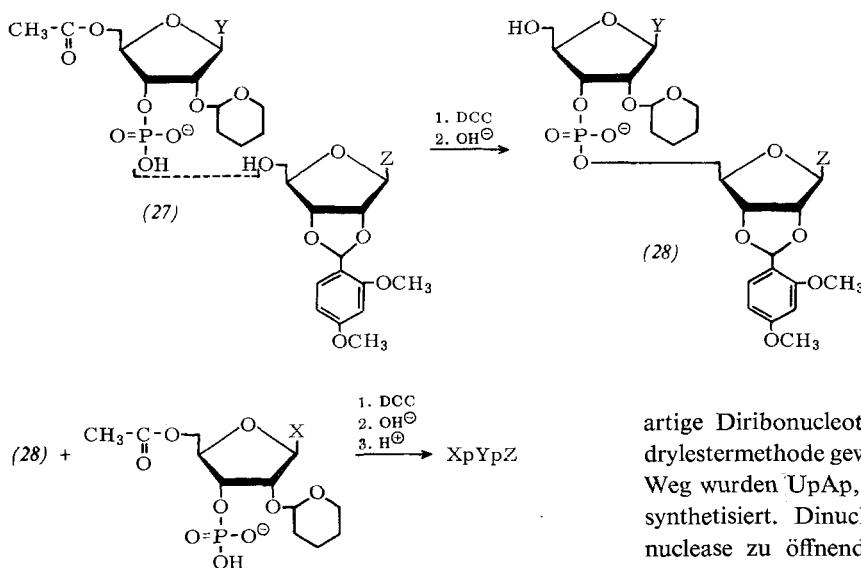
Acetyl-2'-O-tetrahydropyranyl-3'-nucleotid (27)<sup>[83]</sup> aus. Nach der ersten Kondensation lässt sich die 5'-O-Acetylgruppe durch alkalische Hydrolyse abspalten und die Kette (28) durch erneute Kondensation um ein Glied

pentaphosphat, UpUpUpUpUpU zu erhalten, wenn auch in minimaler Ausbeute<sup>[85]</sup>.

Eine Übersicht über die nach verschiedenen Verfahren dargestellten Verbindungen gibt Tabelle 2.

### 3.4.2.2. Diribonucleotide

Die enzymatische oder alkalische Hydrolyse der Ribonucleinsäuren führt in vielen Fällen zu Oligonucleotiden mit endständigem 3'-Phosphat. Zu ihrer Synthese sind verschiedene Wege beschritten worden. Das erste der-



verlängern<sup>[84]</sup>; so wurden UpUpU und CpUpU erhalten. Allerdings ist es bei höheren Oligonucleotiden schwierig, die Tetrahydropyranylgruppen vollständig zu entfernen. Immerhin gelang es, ein Hexanucleosid-

artige Diribonucleotid (29) wurde nach der Benzhydrylestermethode gewonnen<sup>[86]</sup>. Auf prinzipiell gleichem Weg wurden UpAp, ApAp<sup>[86,87]</sup>, CpAp und CpUp<sup>[78]</sup> synthetisiert. Dinucleotide, welche eine durch Ribonuclease zu öffnende 2',3'-O-Cyclophosphat-Gruppierung in der terminalen Position und eine gegen Ribonuclease stabile Internucleotid-Bindung besitzen, also

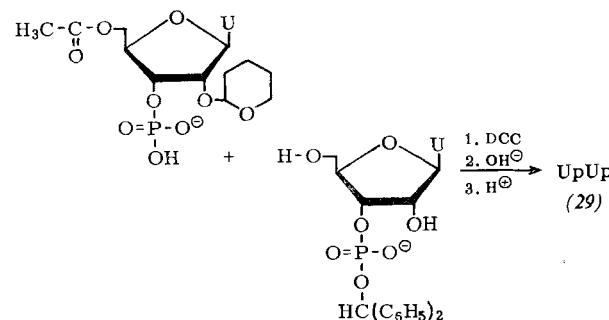


Tabelle 2. Nach verschiedenen Verfahren dargestellte Dinucleosidphosphate.

|                    |                |                    |             |
|--------------------|----------------|--------------------|-------------|
| UpU [36,73a,76,79] | UpC [73,79,83] | UpA [36,73a,77,79] | UpG [77]    |
| CpU [75,76,78,83]  | CpC [77,78]    | CpA [73,75,77]     | CpG [75,77] |
| ApU [73a,79]       | ApC [79]       | ApA [73,73a,79]    |             |
| GpU [75]           | GpC [75]       | GpA [75]           | GpG [75]    |

[83] J. Smrt u. F. Sorm, Collect. czechoslov. chem. Commun. 28, 61 (1963).

[84] F. Cramer u. S. Rittner, Tetrahedron Letters 1964, 107.

[85] J. Smrt u. F. Sorm, Collect. czechoslov. chem. Commun. 29 2971 (1964).

[86] F. Cramer u. K.-H. Scheit, Angew. Chem. 74, 717 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. I, 510 (1962).

[87] F. Cramer, K.-H. Scheit u. H. J. Rhaese, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

Dinucleotide des Typs XpPyp<sup>[†]</sup>, erhält man durch Kondensation der 2',3'-O-Cyclophosphate mit geschützten 3'-Nucleotiden<sup>[89]</sup>. Auch die β-Cyanäthylgruppe ist zum Schutz des endständigen Phosphatrestes verwendet worden<sup>[88]</sup>, doch besteht bei ihrer alkalischen Abspaltung die Gefahr der Isomerisierung. Nach diesem Verfahren wurden CpUp, ApUp und IpUp<sup>[89]</sup> sowie UpUp, UpCp und CpUp<sup>[88]</sup> dargestellt.

Die Synthese von Diribonucleotiden mit 5'-terminalem Phosphat erfordert die nachträgliche Phosphorylierung eines geschützten Dinucleosidphosphates<sup>[76]</sup>. Hier ist noch manches präparative Problem zu lösen.

#### 4. Enzymatische Synthesen

Die enzymatische Synthese von Nucleinsäuren wird hier nur soweit behandelt, als sie der Synthese von Polymeren bestimmter Sequenz dient. Es kann an dieser Stelle nicht auf alle biochemischen und molekularbiologischen Zusammenhänge eingegangen werden.

##### 4.1. DNS-Synthese

###### 4.1.1. DNS-Polymerase (Kornberg-Enzym; E.C. 2.7.7.7.)

Aus *E. coli* wurde ein Enzym isoliert, das folgende Eigenschaften besitzt<sup>[90–92]</sup>: Es katalysiert die Synthese von hochmolekularen Polydesoxyribonucleotiden, wenn alle vier 5'-Triphosphate, nämlich d-ATP, d-GTP, d-CTP und d-TTP, und eine DNS-Matrize<sup>[\*]</sup> vorhanden sind. Der native, unverletzte DNS-Doppelstrang ist ein schlechter Starter<sup>[\*\*]</sup> für die Polymerisation durch das gereinigte (von DNAsen weitgehend befreite) Enzym. Viel besser eignet sich eine durch Pankreas-DNAse leicht angedautete und anschließend durch kurzes Erhitzen auf 77 °C denaturierte DNS. Daraus und aus anderen Befunden schloß man, daß die natürliche Funktion der DNS-Polymerase die eines reparierenden Enzyms sei. In vitro repariert das Kornberg-Enzym bis 20 °C tatsächlich nur Lücken im Doppelstrang der DNS<sup>[92a]</sup>, wobei der intakte Strang als Matrize dient. Bei höheren Temperaturen beginnt aber eine über die Reparatur hinausgehende Polymerisation, wodurch Verästelungen an der DNS auftreten. Dabei kann die netto synthetisierte DNS-Menge das 20-fache der Matrizenmenge erreichen. Alle Befunde, besonders das

[†] Py = Pyrimidinucleosid.

[88] J. Smrt u. F. Sorm, Collect. czechoslov. chem. Commun. 28, 2415 (1963).

[89] D. Söll u. H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. 87, 350 (1965).

[90] A. Kornberg, I. R. Lehman, M. J. Bessman u. E. S. Simms, Biochim. biophysica Acta 21, 197 (1956).

[91] I. R. Lehman, M. J. Bessman, E. S. Simms u. A. Kornberg, J. biol. Chemistry 233, 163 (1958).

[92] C. C. Richardson, C. L. Schildkraut, H. V. Aposhian u. A. Kornberg, J. biol. Chemistry 239, 222 (1964).

[\*] Englisch: template.

[\*\*] Englisch: primer.

[92a] C. C. Richardson, R. B. Inman u. A. Kornberg, J. molecular Biol. 9, 46 (1964).

Molverhältnis der Basen in der DNS-Matrize und in der neu synthetisierten DNS<sup>[93]</sup>, deuten darauf hin, daß auch bei dieser Polymerisation stets basengepaarte Doppelstränge entstehen.

In Abwesenheit einer DNS-Matrize findet keine Synthese von DNS statt. Inkubiert man jedoch die Polymerase aus *E. coli* ohne DNS-Matrize lediglich mit d-ATP und d-TTP in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup>-Ionen, so beobachtet man nach Ablauf einer Latenzperiode<sup>[\*\*\*]</sup> von 2–6 Stunden (je nach Enzym- und Substratkonzentrationen) die Bildung einer hochmolekularen Verbindung. Chemische Analyse (Basenverhältnis und Bestimmung der unmittelbar benachbarten Nucleotide)<sup>[92, 94]</sup> und physikalisch-chemische Untersuchungen<sup>[95]</sup> ergaben, daß sie aus gegenläufigen Doppelsträngen alternierender d-Ap- und d-Tp-Einheiten besteht [Poly-d-(AT)]. Dagegen erhält man bei der Inkubation mit d-GTP und d-CTP nicht etwa analog einen alternierenden d-(GC)-Doppelstrang, sondern ein aus Doppelsträngen gegenläufiger homopolymerer d-G- und d-C-Stränge bestehendes Polymerat<sup>[92, 96]</sup>.

Das Enzym wurde auch verwendet, um kurzkettige synthetische Oligodesoxyribonucleotide zu kopieren und so langketige komplementäre Polynucleotide zu erhalten. Schon ein Heptanucleotid d-(pA)<sub>7</sub> wirkt in Gegenwart einer Matrize (pT)<sub>11</sub> als Starter für die enzymatische Bildung von hochmolekularem Poly-d-A.

Offenbar kann die Matrize gegen die wachsende Nucleotid-Kette verschoben werden (slipping mechanism)<sup>[63]</sup>. Es gelang so mit Hilfe von chemisch synthetisierten Oligodesoxyribonucleotiden in wenigen Fällen, Polydesoxyribonucleotide mit streng alternierender Basenfolge herzustellen (Tabelle 3)<sup>[97]</sup>.

Tabelle 3. Mit Hilfe chemisch synthetisierter Oligodesoxyribonucleotide enzymatisch gewonnene Polydesoxyribonucleotide.

| Matrize und Starter                     | Substrat       | Produkt                                       |
|---|----------------|---|
| (pT) <sub>11</sub> :d-(pA) <sub>7</sub> | d-ATP          | Poly-d-A (50–100 Nucleotide)                  |
|   | d-ATP          | d-(pA) <sub>n</sub> :d-(pT) <sub>n</sub>      |
|   | d-TTP          | Molgew. 6 × 10 <sup>6</sup>                   |
|   | d-ATP          | d-(pTpC) <sub>n</sub> :d-(pApG) <sub>n</sub>  |
|   | d-TTP          | Molgew. > 10 <sup>6</sup> ( $S_{20,w} = 16$ ) |
|   | d-CTP<br>d-GTP |   |

###### 4.1.2. „End-addition enzyme“

In gereinigten Extrakten von Kalbsthymus konnte neben einer DNS-abhängigen (matrizen-abhängigen) DNS-Polymerase ein zweites DNS-polymerisierendes Enzym, das „end-addition enzyme“, nachgewiesen und durch Chromatographie an einer Hydroxylapatit-Säule von der DNS-abhängigen DNS-Polymerase getrennt

[93] R. M. S. Smellie, Brit. med. Bull. 21, 195 (1965).

[\*\*\*] Englisch: lag phase.

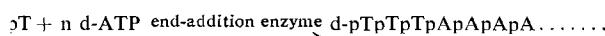
[94] H. Schachman, J. Adler, C. Radding, I. Lehman u. A. Kornberg, J. biol. Chemistry 235, 3242 (1960).

[95] D. R. Davis u. R. L. Baldwin, J. molecular Biol. 6, 251 (1963).

[96] C. Radding, J. Josse u. A. Kornberg, J. biol. Chemistry 237, 2869 (1962).

[97] C. Byrd, E. Ohtsuka, M. W. Moon u. H. G. Khorana, Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 79 (1965).

werden [98, 99]. Das „end-addition enzyme“ verlängert Oligodesoxyribonucleotide durch wiederholtes Anhängen von Desoxyribonucleotid-Einheiten um lange homologe Ketten.



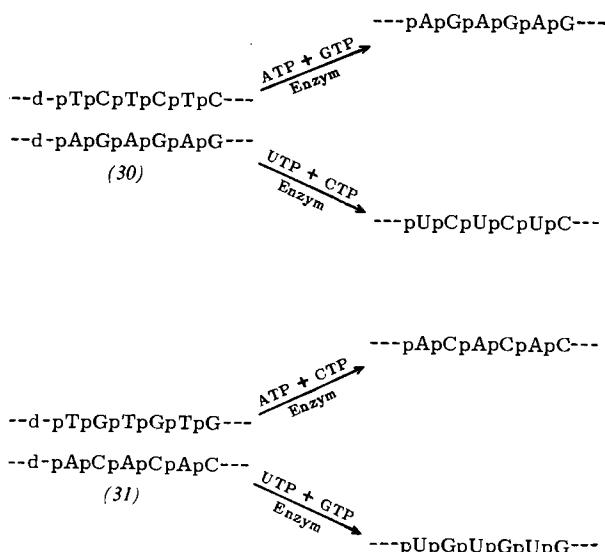
Die Geschwindigkeit dieser Polymerisation nimmt in der Reihenfolge d-ATP > d-ITP > d-CTP  $\gg$  d-TTP und d-GTP ab. d-CTP wird nur in Gegenwart von  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen eingebaut [100]. Die als Starter dienenden Oligonucleotide müssen eine Mindestlänge von drei Nucleotiden haben; bei gleicher Enzymkonzentration hängt die Länge der neugebildeten Kette vom Verhältnis Substrat/Starter ab.

## 4.2. RNS-Synthese

### 4.2.1. DNS-abhängige RNS-Polymerase (E.C. 2.7.7.6)

In Bakterien und anderen Geweben kommt eine DNS-abhängige RNS-Polymerase vor [101–105].

Sie erfordert eine DNS-Matrize und alle vier Ribonucleosid-5'-triphosphate. Die synthetisierten Polyribonucleotide sind einsträngig und von hohem Molekulargewicht, ihre Zusammensetzung wird durch die Zusammensetzung der DNS-Matrize bestimmt. Das Enzym kopiert in vitro DNS-Einzel- und Doppelstrände.



[98] F. J. Bollum, E. Groeniger u. M. Yoneda, Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, 853 (1964).

[99] M. Yoneda u. F. J. Bollum, J. biol. Chemistry 240, 3385 (1965).

[100] F. Bollum, Federat. Proc. 24, 1207 (1965).

[101] J. Hurwitz, J. August, J. Davidson u. W. E. Cohn: Progress in Nucleic Acid Research. Academic Press, New York-London 1963, Bd. I, S. 59.

[102] J. Hurwitz: Methods in Enzymology. Academic Press, New York-London 1963, Bd. VI, S. 23.

[103] M. Chamberlin u. P. Berg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 81 (1962).

[104] E. Fuchs, W. Zillig, P. H. Hofsneider u. A. Preuss, J. molecular Biol. 10, 546 (1964).

[105] M. Chamberlin u. P. Berg, J. molecular Biol. 8, 297 (1964).

Werden Einzelstränge kopiert, so ist die Basenzusammensetzung des Produktes der Basenzusammensetzung der Matrize komplementär. Verwendet man als Matrizen synthetische Polydesoxyribonucleotide, z.B. (30) oder (31), mit bekannter Basensequenz, so erhält man Polyribonucleotide mit gleichfalls definierter Basensequenz [64]. Je nach angebotenem Nucleosidtriphosphat wird der eine oder der andere Strang der DNS als Matrize benutzt. Die durch Kopieren entstehenden Ribonucleinsäuren haben zur Entzifferung des genetischen Codes beigetragen.

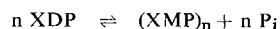
Auch aus Tridesoxyribonucleotiden bestehende Matrizen können mit RNS-Polymerase in die komplementären Polyribonucleotide „übersetzt“ werden [5, 106]. Eine Matrize von 9 Nucleotiden (3 Triplets) genügt bereits, um ein komplementäres Polyribonucleotid von mehr als 150 Nucleotiden zu synthetisieren, so daß man auch hier ein Weitergleiten der oligomeren Matrize während der Synthese postuliert hat.

Die chemische Synthese von Polydesoxyribonucleotiden ist wesentlich einfacher als die von Polyribonucleotiden. Mit Hilfe der beschriebenen Enzyme ist es möglich, die in chemisch synthetisierten Polydesoxyribonucleotiden enthaltene Information zur enzymatischen Synthese von Polyribonucleotiden auszunutzen und so die mit der Chemie der Ribopolymeren verbundenen Schwierigkeiten zu umgehen.

### 4.2.2. Polynukleotid-Phosphorylase (E.C. 2.7.7.8)

#### 4.2.2.1. Homopolynukleotide

Polynukleotid-Phosphorylase polymerisiert Nucleosid-diphosphate zu Polynukleotiden, in denen die Basen statistisch verteilt sind:



Das Enzym bedarf keiner Matrize [107]. Es wurde aus *Azotobacter vinelandii* [108, 109] und aus *Mikrococcus lysodeicticus* isoliert [110]. Das Enzym aus *Mikrococcus lysodeicticus* besitzt etwas andere Eigenschaften und fällt von vornherein in reinerer Form an. Das Enzym aus *Azotobacter vinelandii* enthält selbst nach 500-facher Anreicherung noch fest gebundene ca. 3 % eines Oligonukleotids, das möglicherweise die Funktion einer prosthetischen Gruppe hat [111]. Beide Enzyme sind spezifisch für Ribonucleosid-5'-diphosphate; als Substrate können auch chemisch modifizierte 5'-Diphosphate dienen [112]. Sind mehrere Nucleosid-5'-diphosphate gleichzeitig anwesend, so werden sie mit Ausnahme des bevorzugten GDP [113] statistisch in das polymere Produkt eingebracht [114].

[106] S. Nishimura, T. M. Jacob u. H. G. Khorana, Proc. nat. Acad. Sci. USA 52, 1494 (1964).

[107] S. Ochoa, Angew. Chem. 72, 225 (1960).

[108] M. Grunberg-Manago u. S. Ochoa, Federat. Proc. 14, 221 (1955).

[109] M. Grunberg-Manago, P. J. Ortiz u. S. Ochoa, Science (Washington) 122, 907 (1955).

[110] R. F. Beers jr., Federat. Proc. 15, 13 (1956).

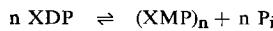
[111] S. Ochoa u. S. Mii, J. biol. Chemistry 236, 3303 (1961).

[112] S. P. Colowick u. N. O. Kaplan: Methods in Enzymology. Academic Press, London-New York 1962, Bd. VI, S. 716.

[113] H. Küntzel, Göttingen, unveröffentlichte Versuche.

[114] M. F. Singer, R. J. Hilmoe u. M. Grunberg-Manago, J. biol. Chemistry 235, 2703 (1960).

Hochgereinigte Enzympräparate erfordern einen Starter, der mindestens ein Dinucleosidphosphat sein muß; weniger gereinigte Präparate und Rohextrakte enthalten genügend Oligonucleotide als Starter<sup>[115, 116]</sup>. Eine Nettosynthese von Polynucleotiden ist mit Rohextrakten aus *Azotobacter vinelandii* ohne besondere Enzymreinigung möglich, wenn man in 1–2 M Harnstoff-Lösung arbeitet<sup>[117, 118]</sup> (die optimale Harnstoffkonzentration ist für die einzelnen Homopolynucleotide verschieden<sup>[119]</sup>). Die Ursache dafür sind im Rohextrakt enthaltene Ureasen, die durch Zerlegung des Harnstoffs die Ammoniumionenkonzentration im Ansatz so stark erhöhen, daß mit Hilfe der vorhandenen Magnesiumionen das entstehende Phosphat (Pi) weitgehend ausgefällt wird. Dadurch



wird das Gleichgewicht auf die Seite des Polymeren verschoben<sup>[121, 122]</sup>. Die optimalen Bedingungen für die Synthese von Polynucleotiden mit Rohextrakten aus *Azotobacter vinelandii* sind: Zusatz von NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ionen in Form von Ammoniumhydrogencarbonat und pH = 9,15 sowie Erhöhung der Magnesiumionenkonzentration, so daß das Phosphat quantitativ als Ammoniummagnesiumphosphat ausgefällt werden kann. Die Polynucleotid-Ausbeute ist unter diesen Bedingungen nahezu quantitativ (Abb. 4)<sup>[120]</sup>.

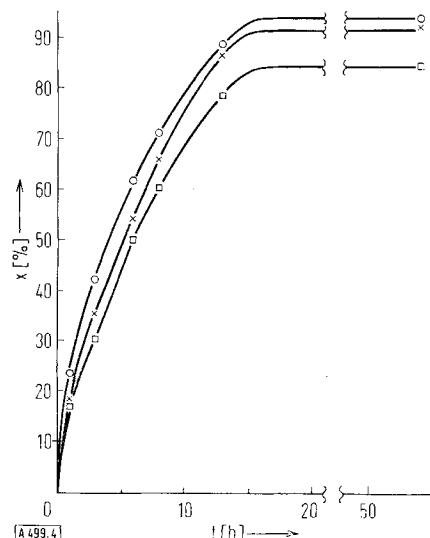


Abb. 4. Zeitlicher Verlauf der Synthese von Polynucleotiden mit Rohextrakt aus *Azotobacter vinelandii* in Gegenwart von äquimolaren Mengen Mg<sup>2+</sup> (bezogen auf eingesetztes Nucleosid-diphosphat) und 208-fachem molarem Überschuß von Ammoniumhydrogencarbonat [120].

○—○ Poly-C; ×—× Poly-A; □—□ Poly-U.

Ordinate: Ausbeute an Polymerem [%].

Abszisse: Zeit [Stunden].

[115] S. Mii u. S. Ochoa, Biochim. biophysica Acta 26, 445 (1957).

[116] M. F. Singer, L. A. Heppel u. R. J. Hilmo, Biochim. biophysica Acta 26, 447 (1957).

[117] F. Cramer u. K. Randerath, Biochim. biophysica Acta 61, 346 (1962).

[118] F. Cramer u. K. Randerath, Nature (London) 196, 1209 (1962).

[119] F. Cramer u. H. Küntzel, Biochim. biophysica Acta 80, 213 (1964).

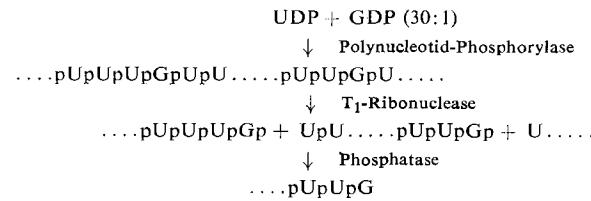
[120] H. Sternbach, Dissertation, Technische Hochschule Graz, 1965.

[121] J. Stahl u. W. Heumann, Acta Biol. med. German. 14, 108 (1965).

[122] O. W. Jones, E. E. Townsend, H. A. Sober u. L. A. Heppel, Biochemistry 3, 238 (1964).

#### 4.2.2.2. Polynucleotide mit definiertem terminalem Triplet und Oligoribonucleotide

Polynucleotid-Phosphorylase ist in bezug auf Nucleobasen nicht spezifisch. Das kann man ausnutzen, um Polymere mit definiertem Triplet am 3'-Ende zu erhalten<sup>[7]</sup>. Hierzu wird ein Nucleotid eingepolymerisiert, neben dem sich das gebildete Polymere spezifisch spalten läßt, z.B.:



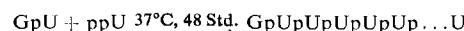
Zur Kontrolle wurde im hier gezeigten Beispiel das terminale Guanosin nach der Perjodatmethode abgespalten und bestimmt<sup>[123]</sup>. Auf diesem Wege synthetisierte Polymere zeigt Tabelle 4.

Besonders bei G-haltigen Polymeren entspricht das Basenverhältnis im Produkt nicht völlig dem Substratverhältnis (Tabelle 4). Ein Teil der Ketten hat „falsche“ Enden, was auf den Gehalt an Endonucleasen zurückzuführen ist, die das Polynucleotid im homologen Teil der Kette spalten. – Ein so dargestelltes Polymeres, nämlich ....ApApC, wurde zur Bestimmung der Leserichtung an der messenger-RNS verwendet<sup>[9]</sup>.

Tabelle 4. Polynucleotide mit definiertem Triplet am 3'-Ende [124].

| Polynucleotid | Substratverhältnis | Basenverhältnis im Polymeren | durchschnittliche Kettenlänge [Nucleotide] | Ketten mit pXpXpX-Ende [%] |
|---------------|--------------------|------------------------------|--|----------------------------|
| Up...UpUpG    | 30:1               | 20:1                         | 17   | 12                         |
| Cp...CpCpG    | 30:1               | 27:1                         | 24   | 13                         |
| Ap...ApApG    | 30:1               | 19:1                         | 14   | 33                         |
| Ap...ApApC    | 30:1               | 28:1                         | 26   | 9                          |
| Ap...ApApU    | 30:1               | 37:1                         | 31   | 17                         |
| Ip...IpIpC    | 30:1               | 26:1                         | 23   | 12                         |
| Ip...IpIpU    | 30:1               | 36:1                         | 29   | 15                         |

Gereinigte Polynucleotid-Phosphorylase<sup>[125]</sup> benötigt einen Starter<sup>[126, 127]</sup> und verlängert ein Nucleosid-diphosphat zu einem Homopolymeren mit definiertem Triplet am 5'-Ende<sup>[128]</sup>, z.B.:



Man verwendet Polynucleotid-Phosphorylase aus *M. lysodeicticus*<sup>[127]</sup> (Proteingehalt 1,45 mg/ml, ε<sub>280</sub>:ε<sub>260</sub> = 1,76). Die Ansätze (1 ml Lösung) enthalten 24 μMol Nucleosid-diphosphat, 0,5 μMol Starter (Dinucleosid-diphosphat), 150 μMol Trispuffer (pH = 8,1), 0,8 μMol EDTA, 6 μMol MgCl<sub>2</sub>, 0,11 mg Polynucleotid-Phosphorylase.

[123] P. A. Whitfield, Biochem. J. 58, 39 (1962).

[124] H. Küntzel, Göttingen, unveröffentlichte Versuche, z.T. vorgetragen beim FEBS-Meeting in Wien 1965, Referate S. 338.

[125] M. F. Singer, L. A. Heppel u. R. J. Hilmo, J. biol. Chemistry 235, 738 (1960).

[126] M. F. Singer, R. J. Hilmo u. L. A. Heppel, J. biol. Chemistry 235, 751 (1960).

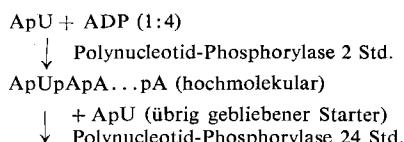
[127] M. F. Singer u. B. M. O'Brien, J. biol. Chemistry 238, 328 (1963).

[128] H. Küntzel, Göttingen, unveröffentlichte Versuche.

Unter den gleichen Bedingungen ließen sich folgende Polymere erhalten [124]:



Die Länge der Ketten beträgt, je nach der Menge an Starter und den Versuchsbedingungen, 50 bis 100 Nucleotideinheiten. Unter Einhaltung bestimmter Bedingungen gelingt es, die Polynucleotid-Phosphorylase zur Synthese von definierten kurzen Ketten zu benützen. Mit starter-abhängigem Enzym aus *M. lysodeicticus* wird ein Dinucleosidphosphat nur um wenige Einheiten verlängert, wenn man die Reaktion in 0,4 M NaCl-Lösung ablaufen lässt [129] und wartet, bis die wenigen anfänglich gebildeten langen Ketten durch Phosphorylyse in viele kurze Ketten umgewandelt worden sind [129]:



$\text{ApU}$  (wenig) +  $\text{ApUpA}$  (Hauptprodukt) +  
 $\text{ApUpApA}$  +  $\text{ApUpApApA}$  + wenig höhermolekulare  
 Polynukleotide

Bei Verwendung hochgereinigter Polynucleotid-Phosphorylase und bei einem Verhältnis von Starter zu Nucleosid-diphosphat von 1:1 oder 2:1 werden Trinucleosid-diphosphate in Ausbeuten von 5 bis 15 % erhalten [130].

Die Nucleosidphosphate  $XpYpZ$  lassen sich chromatographisch von höherpolymerem Material und nicht genutztem Starter trennen. 14 Trinucleosid-diphosphate sind auf diese Weise synthetisiert worden und haben zur Entzifferung des genetischen Codes beigetragen [131, 132]. Die Methode dürfte sich prinzipiell für die Synthese aller 64 Nucleotid-Triplets eignen.

#### 4.2.3. Reversible Wirkung von Ribonucleasen

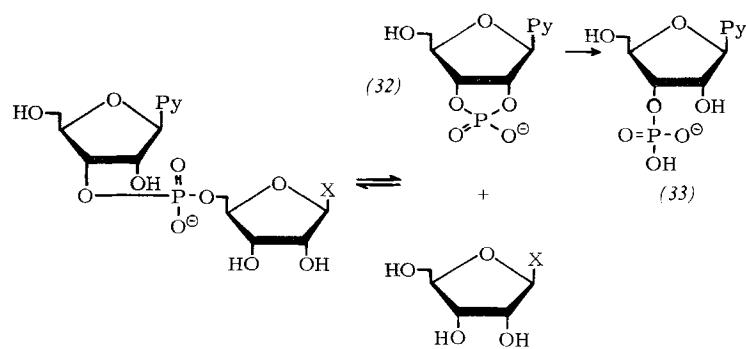
Pankreas-Ribonuclease (E.C.2.7.7.16) spaltet die Inter-nucleotidbindungen von Ribonucleinsäuren neben den Pyrimidinbasen. Die dabei intermediär entstehenden 2',3'-O-Cyclophosphate (32) werden vom Enzym zu den entsprechenden Pyrimidin-nucleosid-3'-phosphaten (33) hydrolysiert.

[129] R. E. Thach u. P. Doty, Science (Washington) 148, 632 (1965).

[130] P. Leder, M. F. Singer u. R. L. C. Brimacombe, Biochemistry 4, 1561 (1965).

[131] P. Leder u. M. W. Nirenberg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 52, 420, 1521 (1964).

[132] M. R. Bernfield u. M. W. Nirenberg, Science (Washington) 147, 479 (1965).



Der erste Schritt der Hydrolysereaktion ist reversibel [133], wenn die Konzentration des Cyclophosphates größer als 0,1 M ist. Aus 2',3'-O-Cyclophosphat entsteht dann mit Methanol der Nucleosid-3'-phosphorsäremethylester, und mit Nucleosiden entstehen Dinucleosidphosphate. Bei der Umsetzung des 2',3'-O-Cyclophosphates der Cytidylsäure mit Cytidin wurden folgende Produkte gefunden [133]:

|   | Cp  | CpC | CpC > p [*] | CpCpC |
|---|-----|-----|-------------|-------|
| % | 3,5 | 4,5 | 9           | 1     |

[\*] Cytidyl-3'→5'-cytidyl-2',3'-O-cyclophosphat.

Ähnlich lässt sich Uridin-2',3'-cyclophosphat umsetzen [134] (Tabelle 5).

Tabelle 5. Synthese von UpU aus Uridin-2',3'-O-cyclophosphat [134]: Die Lösung von 65 mg Cyclophosphat, 300 mg Uridin und 1,4 mg Ribonuclease in 20 ml Wasser wurde bei pH = 7,0 und 4 °C gehalten. Angaben in % des eingesetzten Cyclophosphates.

| Zeit [Std.] | Up [%] | UpU [%] | U > p [%] [a] |
|-------------|--------|---------|---------------|
| 1,75        | 36     | 26      | 38            |
| 2,5         | 45     | 29      | 26            |
| 3,5         | 48     | 28      | 24            |
| 6,0         | 54     | 26      | 20            |
| 25          | 78     | 10      | 12            |
| 54          | 83     | 7       | —             |

[a] Uridin-2',3'-O-cyclophosphat.

Auch gemischte Oligomere wie CpU oder CpCpU (0,8 % Ausbeute) kann man so darstellen [134].

Noch ausgeprägter ist die reversible Wirkung der T<sub>1</sub>-Ribonuclease [135]. Guanosin-2',3'-O-cyclophosphat wird in konzentrierterer Lösung teilweise zu Oligoguanylsäuren polymerisiert. In Gegenwart eines Überschusses an Nucleosid mit freier 5'-Hydroxylgruppe entstehen Dinucleosidphosphate vom Typ GpX, mit vorgegebenen Dinucleosidphosphaten Trinucleosid-diphosphate vom Typ GpXpY [179]. Daneben werden geringe Mengen höherer Oligonukleotide ...GpGpXpY gebildet. Das weitere Wachsen der Kette lässt sich verhindern, wenn man die 5'-Stellung des Guanosin-2',3'-O-cyclophosphates durch Acetylierung blockiert [136]. So wur-

[133] L. A. Heppel, P. R. Whitfield u. R. Markham, Biochem. J. 60, 8 (1955).

[134] F. Fittler, Göttingen, unveröffentlichte Versuche.

[135] F. Egami u. K. Sato-Asano, Biochim. biophysica Acta 29, 655 (1958).

[136] K.-H. Scheit, Göttingen, unveröffentlichte Versuche.

den GpU und GpC mit 16 % bzw. 15 % Ausbeute erhalten.

Die in diesem Bericht zitierten eigenen Arbeiten sind das Resultat einer glücklichen Zusammenarbeit mit meinen tüchtigen Mitarbeitern; ihnen sei vor allem gedankt. Herrn Dr. Reinhard danke ich für seinen wesentlichen Anteil bei der Abfassung dieses Manuskriptes; Herr Dr.

Eckstein hat die chemisch-präparativen, Herr Dr. Lezius die biochemischen Abschnitte überarbeitet. Finanzielle Impulse erhielten die Arbeiten durch eine Starthilfe der Rockefeller-Stiftung (1958), durch mehrere Sachbeihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft, des Bundesministeriums für Wissenschaftliche Forschung und des Fonds der Chemischen Industrie.

Eingegangen am 18. November 1965 [A 499]

## Die Biosynthese der Cyclite

VON H. KINDL, R. SCHOLDA UND O. HOFFMANN-OSTENHOF  
ORGANISCH-CHEMISCHES INSTITUT DER UNIVERSITÄT WIEN (ÖSTERREICH)

Herrn Professor K. Freudenberg zum 80. Geburtstag gewidmet

In letzter Zeit ist es – vor allem mit Hilfe radioaktiv markierter Verbindungen – gelungen, Einblick in die Biosynthese verschiedener Cyclite zu erhalten. Es konnte gezeigt werden, daß für meso-Inosit, den am weitesten verbreiteten Cyclit, ein wahrscheinlich für alle Organismen gültiger Biosyntheseweg existiert, bei dem durch Ringschluß über die beiden endständigen Kohlenstoffatome von D-Glucose der Cyclohexanring entsteht. Aus verschiedenen biologischen Materialien können zellfreie Extrakte oder Enzymsysteme hergestellt werden, welche die Überführung von D-Glucose in meso-Inosit katalysieren. – Die Biosynthese der anderen Hexahydroxycyclohexane (Inosite) verläuft über meso-Inosit als Zwischenprodukt; einzelne Teilschritte der Überführung von meso-Inosit in andere Inosite wurden untersucht.

### A. Einleitung

Der von Micheel<sup>[1]</sup> geprägte Sammelbegriff „Cyclite“ bezeichnet isocyclische Polyalkohole, deren Hydroxylgruppen an die Ringkohlenstoffatome gebunden sind. Alle bisher bekannten natürlichen Cyclite sind Abkömmlinge des Cyclohexans; innerhalb dieser Verbindungsclasse sind es die Hexahydroxycyclohexane oder Inosite, denen die größte Bedeutung zukommt.

Schon 1850 isolierte Scherer<sup>[2]</sup> aus Muskelextrakten eine Substanz, die er für einen Zucker hielt und als Muskelzucker oder Inosit bezeichnete. Es ist vor allem den Arbeiten von Maquenne<sup>[3]</sup> zu verdanken, daß diese Verbindung als Hexahydroxycyclohexan erkannt wurde. Man nannte die Substanz meso-Inosit<sup>[4]</sup>; ihre Konfiguration wurde 1942 fast gleichzeitig von zwei Arbeitsgruppen aufgeklärt<sup>[7, 8]</sup>.

Unter den Inositen ist der zuerst entdeckte meso-Inosit (I)<sup>[9]</sup> in der Natur am meisten verbreitet; er dürfte in

[1] F. Micheel, Liebigs Ann. Chem. 406, 77 (1932).

[2] J. Scherer, Liebigs Ann. Chem. 73, 322 (1850); J. prakt. Chem. 50, 32 (1850).

[3] Vgl. dazu L. Maquenne: Les sucres et leurs principaux dérivés. Gauthier-Villars, Paris 1900.

[4] Unter den neun stereoisomeren Hexahydroxycyclohexanen sind sieben optisch inaktiv und könnten deshalb mit gleichem Recht das Präfix meso- tragen. Obgleich von vielen Bearbeitern des Gebietes der Vorschlag, die bisher als meso-Inosit bekannte Substanz myo-Inosit zu nennen [5], begrüßt wurde, fand dieser Name und die von den Autoren vorgeschlagene Systematik der Cyclite doch nicht allgemeine Verbreitung. Die Nomenklatur der Cyclite wird zurzeit von einer Untergruppe der internationalen Nomenklaturkommission für biochemische Verbindungen einer

freier oder gebundener Form in allen Organismen vorkommen. Bereits Eastcott<sup>[10]</sup> konnte zeigen, daß meso-Inosit ein essentieller Bestandteil des als „Bios“ bezeichneten Wuchsstoffgemisches für Hefe ist. Für Mäuse und andere Säugetiere wurde eine Vitaminfunktion des meso-Inosits postuliert<sup>[11]</sup>, und auch verschiedene Stämme von Zellkulturen menschlichen Ursprungs benötigen ihn in ihrem Nährmedium<sup>[12]</sup>. Die Hauptfunktion des meso-Inosits besteht vermutlich darin, daß er ein Baustein der Phosphoinositide ist, die eine heute noch nicht völlig klare Rolle im Stoffwechsel spielen. Kürzlich konnte eine Mitwirkung dieser Phospholipide bei der adenosintriphosphat-abhängigen Kontraktion

Revision unterzogen. Im vorliegenden Referat bedienen wir uns der Nomenklatur, die in der ausgezeichneten Monographie von Posternak [6] verwendet wird.

[5] H. G. Fletcher, L. Anderson u. H. Lardy, J. org. Chemistry 16, 1238 (1951).

[6] T. Posternak: Les cyclitols. Hermann, Paris 1962.

[7] T. Posternak, Helv. chim. Acta 25, 746 (1942).

[8] G. Dangschat u. H. O. L. Fischer, Naturwissenschaften 30, 146 (1942).

[9] Obwohl die Cyclite in der Sesselform darzustellen wären, werden sie der Übersichtlichkeit halber hier in der hexagonalen Form geschrieben.

[10] E. V. Eastcott, J. physic. Chem. 32, 1094 (1928).

[11] Vgl. z. B. D. W. Woolley, J. biol. Chemistry 136, 113 (1940); 139, 29 (1941); J. exp. Med. 75, 277 (1942).

[12] H. Eagle, B. Agranoff u. E. E. Snell, Science (Washington) 123, 845 (1956); H. Eagle, V. Oyama, M. Levy u. A. E. Freeman, J. biol. Chemistry 226, 191 (1957); R. P. Geyer u. R. S. Chang, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 95, 315 (1957).