

ANGEWANDTE CHEMIE

84. Jahrgang 1972
Heft 11
Seite 489–556

Chemische Synthese von Polynucleotiden^[\star\star]

Von K. L. Agarwal, A. Yamazaki, P. J. Cashion und H. G. Khorana^[\star]

Über den gegenwärtigen Stand der Methodik zur chemischen Synthese von kürzeren Desoxyribopolynucleotiden (Kettenlängen bis zu etwa zwanzig Nucleotideinheiten) wird in diesem Fortschrittsbericht ein Überblick gegeben.

1. Einleitung

In den vergangenen Jahren sind Methoden zur chemischen Synthese von kurzkettigen Desoxyribopolynucleotiden entwickelt worden^[1]. Die Zugänglichkeit von synthetischen Desoxyribopolynucleotiden mit vollständig definierter Nucleotidsequenz hat exakte Studien über Probleme der Proteinbiosynthese, über den genetischen Code und über die Wirkungsweise der Enzyme DNA- und RNA-Polymerase ermöglicht. Auch für weiterführende Studien über die biologische Funktion der DNA auf makromolekularer Ebene wird die Synthese bishelicaler Produkte mit definierter

Nucleotidsequenz Voraussetzung sein. Zu diesem Zweck ist eine allgemeine Methodik entwickelt worden, die mit Erfolg zur Totalsynthese des Gens für die alanin-spezifische tRNA aus Hefe eingesetzt werden konnte^[2] (Abb. 1).

Diese Methodik umfaßt die folgenden drei Schritte: 1. Chemische Synthese von Desoxyribopolynucleotid-Segmenten mit acht bis zwölf Nucleotideinheiten. Diese müssen der Gesamtheit der beiden zu synthetisierenden DNA-Stränge entsprechen; die Segmente müssen außerdem so ausgewählt sein, daß sich Überlappungen von vier bis sechs Nucleotideinheiten zwischen Fragmenten komplementärer Stränge ergeben (s. Abb. 1). 2. Enzymatische Phosphorylierung der 5'-Hydroxygruppen mit ATP, dessen γ -Phosphorylgruppe radioaktiv markiert ist, in Gegenwart von T4-Polynucleotid-Kinase. 3. Kopf-Schwanz-Verknüpfung der zur Doppelhelix arrangierten (hybridisierten) Segmente mit dem Enzym T4-Polynucleotid-Ligase.

Es ist klar, daß das durch diese Strategie umrissene Konzept auch die Grundlage für künftige Gensynthesen^[2a] sowie für die Manipulation synthetischer oder natürlicher DNA bilden wird. Da die Schritte 2 und 3 im Verhältnis zu Schritt 1 wenig Zeit erfordern, werden schnellere und wirkungsvollere DNA-Synthesen dann zu erwarten sein, wenn die chemische Synthese der Desoxyribooligonucleotide verbessert wird. Hauptziel dieses Fortschrittsberichtes soll daher sein, 1. den Stand dieser Methodik darzustellen, 2. einige neuere Verbesserungen und Verfeinerungen aus unserem Labora-

[^{\star}] Dr. K. L. Agarwal, Dr. A. Yamazaki, Dr. P. J. Cashion und Prof. Dr. H. G. Khorana
Departments of Biology and Chemistry, Massachusetts Institute of Technology
Cambridge, Massachusetts 02139 (USA)
Nach einem Vortrag auf dem 23. IUPAC-Kongreß in Boston, Juli 1971.

[^{\star\star}] An Abkürzungen werden verwendet:

Ac = Acetyl
An = Anisoyl
iBu = Isobutyryl
Bz = Benzoyl
DCC = Dicyclohexylcarbodiimid
Me = Methyl
MMTr = Monomethoxytriphenylmethyl (= Monomethoxytrityl)
MS = Mesitylensulfonylchlorid
TEAB = Triäthylammoniumhydrogencarbonat
TPS = 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid
Tr = Triphenylmethyl (= Trityl)

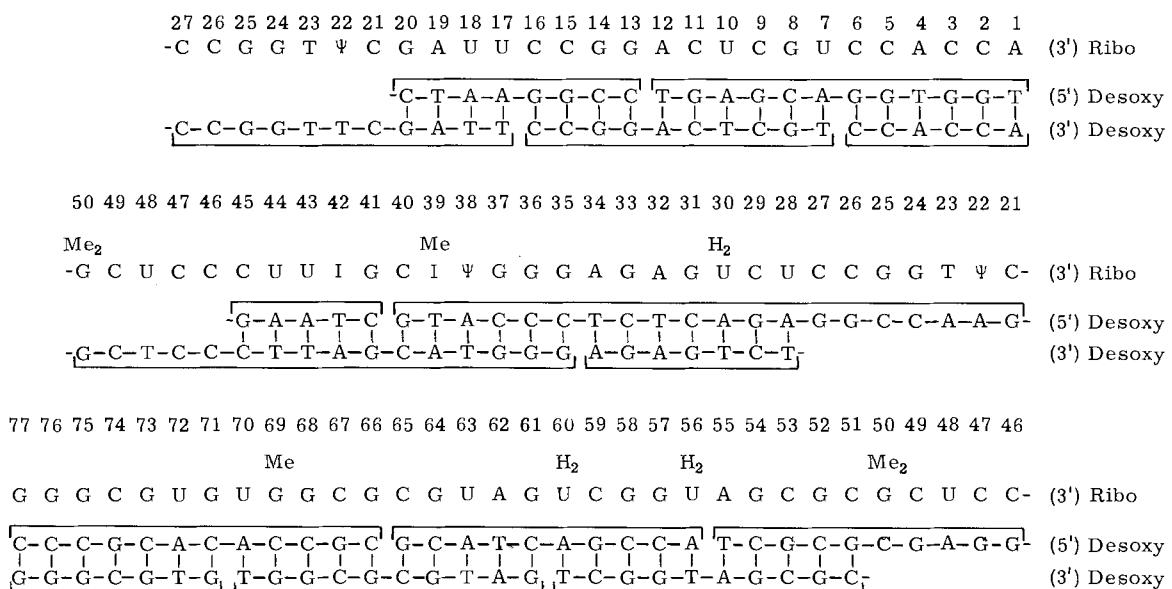


Abb. 1. Gesamtplan zur Synthese eines tRNA_{ala}-Gens. Die chemisch synthetisierten Segmente sind durch eckige Klammern gekennzeichnet. 1. Reihe: laufende Nummer; 2. Reihe: Sequenz der tRNA; 3. und 4. Reihe: Sequenz der beiden Strände des tRNA_{ala}-Gens.

torium zu diskutieren und 3. auf offenstehende Probleme, die noch nicht oder noch nicht befriedigend gelöst sind, hinzuweisen.

2. Synthese der Internucleotidbindung und Einführung von Schutzgruppen

Die Synthese des einfachsten Dinucleosidphosphats, Thymidyl-Thymidin (TpT), ist in Abbildung 2 skizziert.

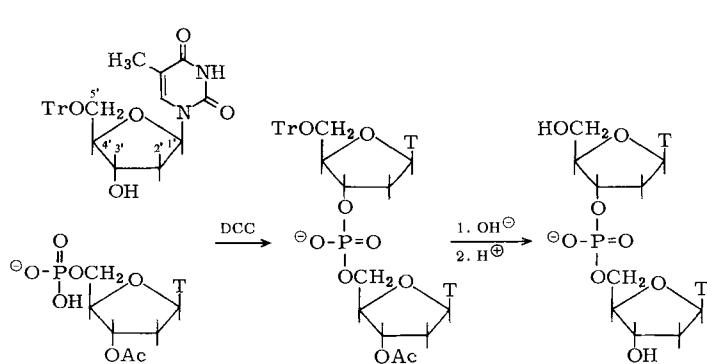


Abb. 2. Synthese von Thymidyl-(3'→5')-Thymidin (TpT).

Für derartige Syntheseschritte gelten folgende Regeln:
 1. Die 5'-Hydroxygruppe der Nucleosidkomponente ist durch die klassische, sperrige Tritylgruppe maskiert, die nach Bedarf durch Säurebehandlung entfernt werden kann.
 2. Die 3'-Hydroxygruppe dieser Komponente ist frei.
 3. Als zweite Komponente wird ein 5'-Mononucleotid gewählt, dessen 3'-Hydroxygruppe durch Acetylierung geschützt ist. Die Acetylgruppe kann in schwach alkalischer Lösung abgespalten werden.
 4. Die als Phosphorsäuremonoester vorliegende Phosphatgruppe wird direkt zur Kondensation eingesetzt. Ein Verfahren, nach welchem Phosphor-

säurediesterderivate der Nucleotidkomponente zur Kondensation verwendet werden, schlügen Eckstein, Letsinger, Reese und deren Mitarbeiter vor^[3].

Die beiden mit Schutzgruppen versehenen Reaktionskomponenten (Abb. 2) werden durch Einwirkung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) miteinander kondensiert. Als kondensierende Agentien werden neben DCC auch aromatische Sulfonylchloride, insbesondere Mesitylensulfonylchlorid (MS)^[4] und 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TPS)^[5] eingesetzt (Abb. 3). Das dreifach substituierte

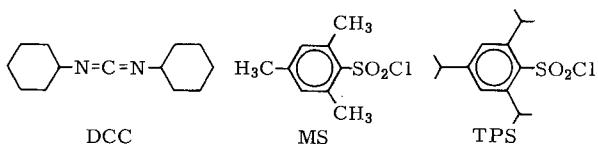


Abb. 3. Die Kondensationsmittel Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Mesitylensulfonylchlorid (MS) und 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid (TPS).

aromatische Sulfonylchlorid wird verwendet, um unerwünschte Sulfonylierungen insbesondere der 5'-Hydroxygruppen von Nucleosid- oder Oligonucleotidkomponenten zu verhindern. Die Aktivierung der Phosphatgruppe durch DCC, MS oder TPS sowie die anschließende Kondensation des aktivierten Zwischenproduktes mit der 3'-Hydroxygruppe der Nucleosidkomponente wird gewöhnlich in einem Schritt in wasserfreiem Pyridin als Lösungsmittel durchgeführt.

Durch die Kondensationsreaktion erhält man ein Gemisch, bestehend aus dem geschützten Dinucleosidphosphat – dem Hauptprodukt –, sowie aus den nicht umgesetzten Ausgangsmaterialien und dem symmetrischen Pyrophosphat, welches sich von der 3'-acetylierten Nucleotidkomponente ableitet. Das maskierte Dinucleosidphosphat mit den Schutzgruppen sowohl am 3' als auch am 5'-Ende wird durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln von den übrigen Komponenten abgetrennt. Durch Behand-

lung mit schwachem Alkali wird anschließend die Acetylgruppe am 3'-Ende entfernt. Unter diesen Bedingungen bleibt die das 5'-Ende blockierende Tritylgruppe völlig fest gebunden.

Das Produkt mit der nunmehr freien 3'-Hydroxygruppe kann anschließend durch Kondensation mit einer weiteren Nucleotidkomponente, deren 3'-Hydroxygruppe durch Acetylierung geschützt ist, verlängert werden. Durch wiederholte Kondensation und Alkalibehandlung sowie durch jeweils folgende Reinigung der Produkte wird schließlich ein Polynucleotid der gewünschten Kettenlänge aufgebaut. Zuletzt wird die am 5'-Ende stehende Tritylgruppe durch Säurebehandlung abgespalten.

Die Aktivierung des Phosphats durch DCC, MS oder TPS ist ein ziemlich komplizierter Vorgang. Im Falle von DCC konnte gezeigt werden^[6], daß die eigentliche phosphorylierende Spezies ein Trimetaphosphat ist (Abb. 4). Die 3'-Hydroxygruppe der Nucleosidkomponente reagiert nucleophil mit dem Trimetaphosphat, wobei die Internucleotidbindung aufgebaut wird. Trimetaphosphate dieses Typs

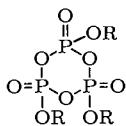


Abb. 4. Struktur des Trimetaphosphats, das sich durch DCC-Aktivierung eines geschützten Mononucleotids bildet. R = amino-geschütztes Nucleosid.

bewirken eine langsame Phosphorylierung. In Gegenwart von Arensulfonylchloriden vollziehen sich Aktivierung und Kondensation jedoch erheblich rascher, woraus geschlossen werden darf, daß Trimetaphosphate in diesem Falle wahrscheinlich nicht die phosphorylierende Spezies sind^[4].

Lägen freie Aminogruppen während der Kondensationsreaktion vor, so führten diese wenigstens in gewissem Ausmaß zu unerwünschten Nebenreaktionen mit den aktivierten Phosphaten. Ein weiterer Grund für die Einführung der Schutzgruppen besteht in der erhöhten Löslichkeit der geschützten Nucleosid- und Nucleotidderivate.

Bei der Auswahl der Schutzgruppen sind folgende Gesichtspunkte zu berücksichtigen: 1. 3'-Hydroxyschutzgruppen müssen unter Bedingungen entfernt werden, unter welchen die übrigen Amino- sowie 5'-Hydroxyschutzgruppen nicht angegriffen werden. 2. Es dürfen nur Aminoschutzgruppen gewählt werden, die sich später in einem Schritt ohne Beschädigung der Phosphordiesterbindungen, der 5'-Hydroxyschutzgruppe oder der empfindlichen Glykosylbindungen abspalten lassen. 3. Bei der Entfernung der 5'-Hydroxyschutzgruppe darf die synthetisierte Oligonucleotidkette nicht angegriffen werden.

Diese Bedingungen erfordern eine Überprüfung der Schutzgruppen, welche bereits bei der Synthese von Thymidyl-Thymidin eingeführt wurden. Während sich die Tritylgruppe bei der Synthese von Oligothymidylsäuren zum Schutz der 5'-Hydroxygruppe eignet, führt ihre Entfernung in saurer Lösung bei Purinderivaten in erheblichem Maße zu Spaltungen der N-glykosidischen Bindungen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit für 5'-Hydroxyschutzgruppen, die auch durch sehr schwache Säuren entfernt werden können^[7]. Dieses Problem konnte durch Einführung von p-Methoxy-Substituenten in die Tritylgruppe gelöst werden^[8, 9], zumal der Tritylrest bei dieser Modifikation nicht die 5'-Hydroxyspezifität verliert. Die Einführung einer p-Methoxygruppe in einen Phenylring oder mehrere Phenylringe steigert die Säurelabilität jeweils um einen Faktor von 10. So führte bei unseren früheren Studien sowohl die Anwendung der Monomethoxy- als auch der Dimethoxy-

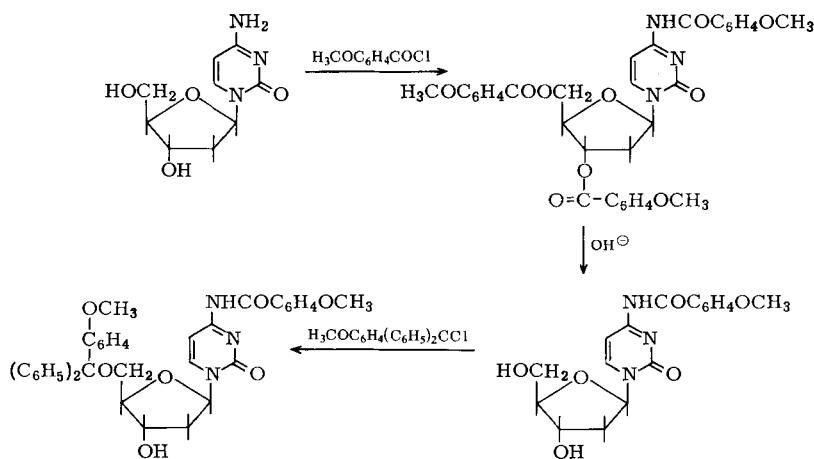


Abb. 5. Darstellung von maskierten Desoxycytidinderivaten.

Wir kommen nun zurück zum Problem der Schutzgruppen, welches an Bedeutung gewinnt, sobald Nucleoside und Nucleotide außer Thymin und Thymidin in die zu synthetisierende Polynucleotidkette eingebaut werden müssen. Die Einführung von Desoxyadenosin, Desoxyguanosin und Desoxycytidin sowie ihrer Nucleotide erfordert nämlich die Maskierung der Aminogruppen dieser Bausteine.

tritylgruppe zum Schutz der 5'-Hydroxyenden zu befriedigenden Ergebnissen; gegenwärtig ziehen wir die Monomethoxytritylgruppe vor. Die Acetylgruppe erweist sich als befriedigend zum Schutz der 3'-Hydroxygruppen und wird weiterhin eingesetzt. Weitere 3'-Hydroxyschutzgruppen wie β -Benzoylpropionyl^[10] und Methoxyacetyl^[11] wurden kürzlich vorgeschlagen.

Gewöhnlich setzt man bei synthetischen Arbeiten als Aminoschutzgruppen Anisoyl für das Cytosin-, Benzoyl für das Adenin- und Isobutyryl oder 2-Methylbutyryl^[12] für das Guaningerüst ein. Diese Schutzgruppen lassen sich mit konzentriertem Ammoniumhydroxid in einem Schritt ohne irgendwelche Nebenreaktionen entfernen. Der Grund für die Wahl verschiedener Aminoschutzgruppen liegt in deren unterschiedlicher Stabilität. Hier sei darauf hingewiesen, daß all diese Schutzgruppen die zahlreichen chemischen Manipulationen während der häufig sehr lange dauernden Synthese eines Oligonucleotids überstehen müssen.

Die in Abbildung 5 gezeigte Reaktion ist ein Beispiel für die nun verfügbare allgemeine Methode zur Darstellung von Desoxynucleosiden mit maskierten Aminogruppen und 5'-Hydroxygruppen. Die Acylierung des freien Desoxycytidins erfolgt in Gegenwart eines Überschusses von acylierendem Agens. Das auf diese Weise vollständig acyierte Derivat wird unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen mit Alkali behandelt, wodurch das gewünschte, ausschließlich *N*-acylierte Desoxycytidin entsteht. Die selektive Hydrolyse wird durch die in stark alkalischem Milieu beobachtete Ionisierung der Amidgruppe innerhalb des aromatischen Systems ermöglicht, durch welche das Resonanzsystem erweitert und die *N*-Acylgruppe stabilisiert wird. Die Hydrolysegeschwindigkeit ist der Hydroxid-Ionen-Konzentration direkt proportional.

Auf diese Weise können alle Desoxynucleoside und Nucleotide in der an den Aminogruppen geschützten Form erhalten werden. Die Maskierung der 5'-Hydroxyfunktionen

durch die Monomethoxytritylgruppe wird nach der Standardprozedur für Tritylierungen durchgeführt. Zur Einführung der Aminoschutzgruppen bei Nucleotiden dient das Verfahren, das für Nucleoside beschrieben wurde. Die Maskierung der 3'-Hydroxygruppen erfolgt durch Behandlung der *N*-Acylnucleotide mit Acetanhydrid in Pyridin. Die mit Schutzgruppen versehenen Nucleoside und Nucleotide (außer Thymin und Thymidin) sind in Abbildung 6 aufgeführt.

3. Synthese höherer Desoxyribopolynucleotide mit spezifischer Sequenz

Ziel der chemischen Synthese ist der Aufbau von Desoxyribopolynucleotiden mit definierter und spezifischer Sequenz. Dieses Ziel kann auf zwei Wegen erreicht werden: entweder durch schrittweise Addition von Mononucleotiden an die wachsende Polynucleotidkette oder durch Verwendung vorgeformter Oligonucleotidblöcke zur Kettenverlängerung. Beide Methoden wurden systematisch untersucht und während der vergangenen Jahre bei synthetischen Arbeiten erprobt.

3.1. Schrittweise Synthese unter Verwendung geschützter Mononucleotide

Die zuerst mit größerem Erfolg angewendete Methode bestand in der schrittweisen Addition von geschützten Mono-

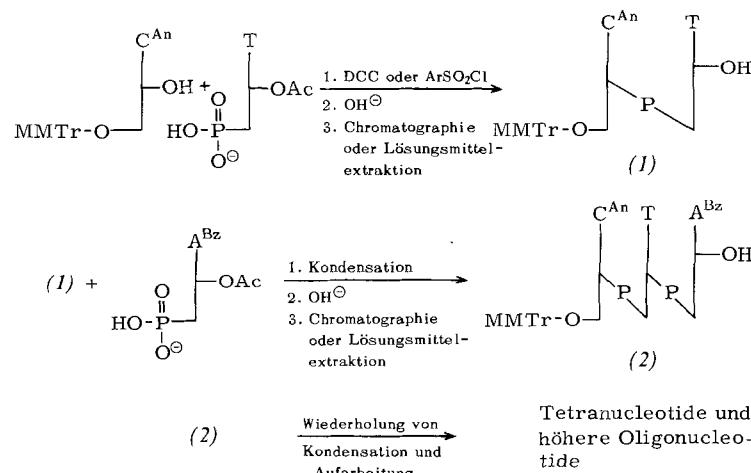


Abb. 7. Schrittweiser Aufbau eines Tetranucleotidtriphosphats und höherer Oligonucleotide.

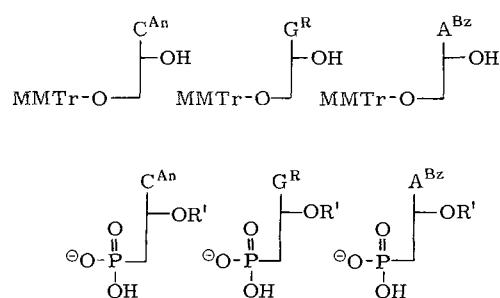


Abb. 6. Maskierte Desoxyribonucleoside und Desoxyribonucleotide, schematisch. $\text{R} =$ Isobutyryl oder 2-Methylbutyryl, $\text{R}' = \text{H}$ oder Acetyl.

nucleotideinheiten an das 3'-Hydroxyende einer wachsenden Oligonucleotidkette^[13]. Ein Beispiel ist in Abbildung 7 aufgeführt.

Obwohl diese Methode ein Maximum von Syntheseschritten zum Aufbau der jeweils gewünschten Kettenlängen erfordert, bietet sie doch häufig den Vorteil hoher Ausbeuten bei den aufeinanderfolgenden Kondensationsreaktionen. Diese Methode wurde und wird daher immer wieder entweder allein oder in Verbindung mit der unten beschriebenen Addition von Oligonucleotidblöcken bei zahlreichen synthetischen Arbeiten eingesetzt.

3.2. Schrittweise Synthese unter Verwendung vorgeformter maskierter Oligonucleotidblöcke als 5'-Phosphatkomponenten

Die Methode, die sich vorgeformter Blöcke^[14, 15] bedient, führt aufgrund der geringeren Anzahl der erforderlichen Syntheseschritte rascher zum Ziel und erleichtert darüber hinaus die chromatographische Auftrennung der Produkte. Die Ausbeuten sind jedoch bei den einzelnen Kondensationsschritten im allgemeinen niedriger. Im Großen und Ganzen ist dennoch die Block-Methode zur Polynucleotidsynthese vorzuziehen, vorausgesetzt, daß die vorgeformten maskierten Oligonucleotide, insbesondere Dinucleotide, in größeren Mengen leicht zugänglich sind.

3.3. Synthese von geschützten Di- und höheren Oligonucleotiden mit 5'-Phosphatgruppen

Die Synthese der 5'-phosphathaltigen Di- oder Trinucleotidblöcke erfordert die Maskierung der Phosphormonoestergruppe von 5'-Mononucleotiden. Diese wurde bis vor kurzem durch Kondensation der an den Aminogruppen geschützten Nucleotide mit Cyanäthanol in Gegenwart von DCC oder ArSO_2Cl erreicht, wie es in Abbildung 8 skizziert ist. Das Cyanäthylderivat wird anschließend mit der zweiten Nucleotidkomponente kondensiert, welche mit Schutzgruppen an den Amino- und 3'-Hydroxyfunktionen versehen ist. Die gewöhnlich mit DCC oder ArSO_2Cl durchgeführte Kondensation ergibt zunächst vollständig maskierte Dinucleotide. Die Cyanäthyl- und die Acetylgruppe können jedoch anschließend durch schonende Alkalibehandlung entfernt werden.

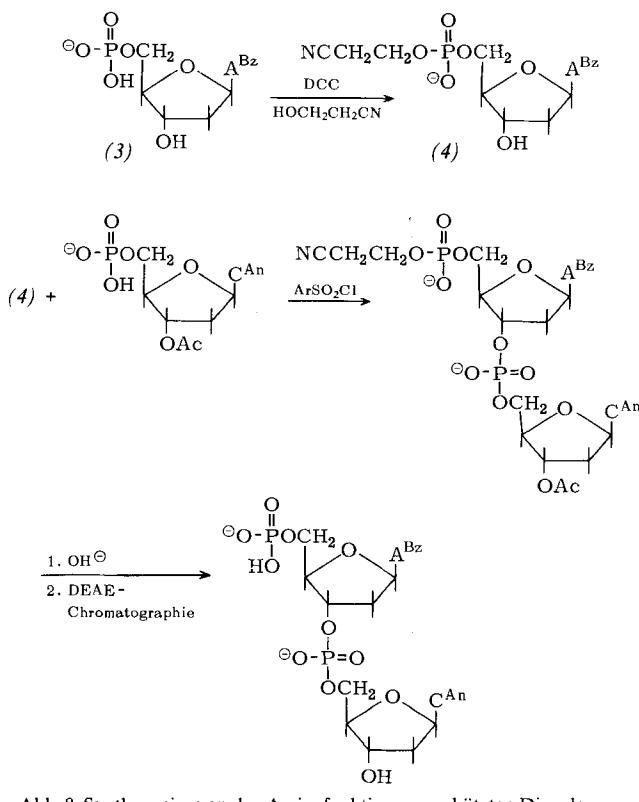


Abbildung 8. Synthese eines an den Aminofunktionen geschützten Dinucleotids mit 5'-Phosphatgruppe.

Die Reaktionsprodukte werden durch Chromatographie an DEAE-Cellulose-Säulen gereinigt, was ziemlich viel Zeit erfordert. Durch Wiederholung der Einzelschritte (Cyanäthylierung und Kondensation) werden größere Blöcke dargestellt, welche anschließend direkt zur weiteren Synthese eingesetzt werden können.

Andere, gelegentlich vorgeschlagene Phosphatschutzgruppen sind in Abbildung 9 zusammengestellt. Die von *Woodward* et al.^[16a] zur Synthese von Cephalosporin eingeführte Trichloräthylgruppe schlug *Eckstein*^[16b] als Phosphatschutzgruppe vor. Diese Gruppe lässt sich durch Behandlung mit Zink in DMF abspalten. Die Anwendung von substituierten Phosphorothioaten ist von *Nussbaum* et al.^[17] vorgeschlagen worden. Die Umwandlung der Phosphorothioate in Phosphate wurde durch Behandlung mit Jod in wäßrigem Milieu erreicht. Den dritten Typ, die *N*-(*p*-Methoxyphenyl)carbamoyläthylgruppe, führten *Narang* et al.^[18] ein; diese Schutzgruppe wird durch Alkalibehandlung abgespalten. Der vierte Typ sind einfache aromatische Phosphoroamidate. Verbindungen dieses Typs sind zuerst von *Moffatt* und *Khorana*^[19] dargestellt und zur Synthese von Nucleotid-Coenzymen eingesetzt worden. Kürzlich haben *Ohtsuka* et al.^[20] die Möglichkeit der Anwendung aromatischer Phosphoroamidate als Phosphatschutzgruppen untersucht und gezeigt, daß die Amidatgruppe unter sehr schonenden Bedingungen bei $\text{pH} = 7$ durch Einwirkung von Isoamylnitrit abgespalten werden kann.

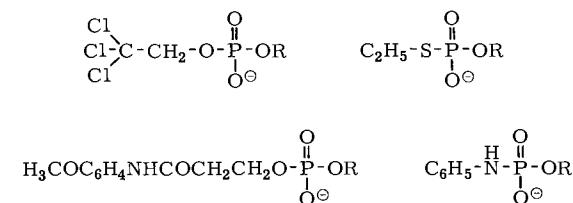


Abbildung 9. Nucleoside mit Phosphatschutzgruppen. R = Thymidin oder *N*-geschützte Nucleoside.

Den meisten Aufwand bei der Darstellung von geschützten Dinucleotidblöcken erfordert, wie schon erwähnt, die mehrtägige Reinigung der Syntheseprodukte durch Ionenaustauschchromatographie. Ein Verfahren, durch welches die Ionenaustauschchromatographie umgangen werden könnte, würde demnach die Synthese von Dinucleotidblöcken wesentlich erleichtern. Unter diesem Gesichtspunkt wurde ein Reinigungsverfahren entwickelt, welches

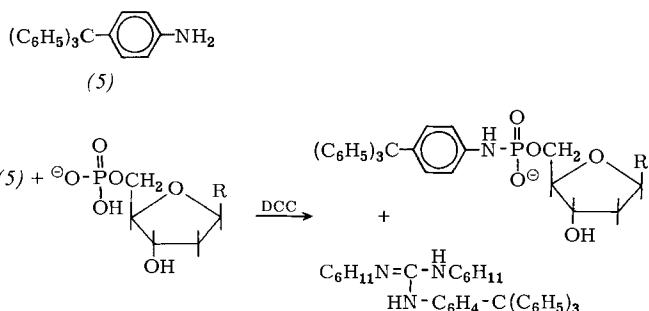


Abbildung 10. Synthese von *N*-geschützten Nucleosid-phosphoroamidaten. R = Thymin, *N*-Anisoylcytosin, *N*-Benzoyladenin oder *N*-Isobutyrylguanin.

sich des Prinzips der Lösungsmittelextraktion bedient^[21]. Ein hochlipophiles Amin, p-(Triphenylmethyl)anilin (Abb. 10), wurde zum Schutz der nucleotidischen Phosphatgruppe in Form des Phosphoroamidats eingesetzt. Der Grund für

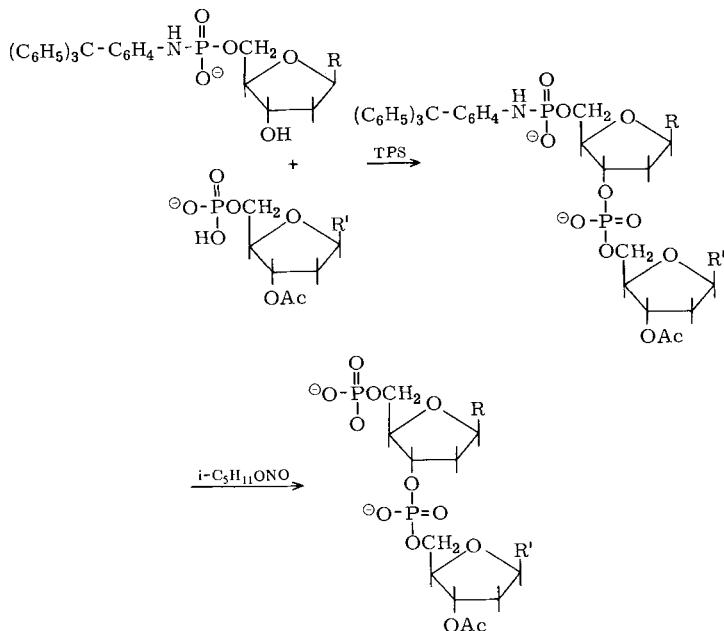


Abb. 11. Synthese von *N*-geschützten Dinucleotiden unter Verwendung der Triphenylmethylanilidgruppierung zur Maskierung des 5'-Phosphates [21]. R oder R' = Thymin, *N*-Benzoyladenin, *N*-Anisoylcytosin oder *N*-Isobutyrylguanin.

die Wahl der Phosphoroamidatgruppe lag in der Möglichkeit ihrer Abspaltung durch Isoamylnitrit unter sehr schonenden Bedingungen, unter welchen keinerlei Nebenreaktionen oder Verluste anderer Schutzgruppen zu beobachten sind. Alle vier Phosphoroamidate der geschützten Mononucleotide konnten durch Reaktion der Nucleotide mit dem Amin in Gegenwart von DCC dargestellt werden.

Diese Phosphoroamidate wurden durch ein einfaches Lösungsmittlextraktionsverfahren in reiner Form isoliert;

sie fallen nach dieser Methode als Salze eines substituierten Guanidins an. Die Bildung dieses Guanidins inhibiert die phosphatkatalysierte DCC-Reaktion. Versuche mit anderen aktivierenden Agentien führen zu geringeren Ausbeuten an Phosphoroamidaten. Die Phosphoroamidate wurden anschließend mit geschützten Mononucleotiden in Gegenwart von TPS als Kondensationsmittel zu geschützten Di-nucleotiden umgesetzt (Abb. 11).

Die Ausbeuten der nach dieser Methode präparierten Di-nucleotide betragen 55–70%. Die Dinucleotidphosphoroamidate werden durch die Lösungsmittlextraktion frei von Mononucleotiden und deren symmetrischen Pyrophosphaten erhalten. Die Ausbeuten der an den Amino-funktionen maskierten Dinucleotide lagen nach Behandlung mit Isoamylnitrit bei 50–65%. Alle 16 Dinucleotide konnten auf diese Weise in verhältnismäßig kurzer Zeit dargestellt und charakterisiert werden.

3.4. Synthese eines Ikosanucleotids

Wie schon erwähnt, bietet die Methode der Kondensation vorgeformter Oligonucleotidblöcke größere Vorteile und wird ausgiebig bei unseren laufenden Arbeiten zur Poly-nucleotidsynthese angewendet. Dies sei durch das Beispiel in Abbildung 12 belegt; die Methode gestattete den Aufbau eines Ikosanucleotids, welches komplementär zu den Nucleotiden 21–40 der ala-tRNA ist (s. Abb. 1).

In der untersten Zeile ist das Endprodukt aufgeführt. Die Synthese beginnt am 5'-Ende der Kette mit Guanosin, dessen 5'-Hydroxyfunktion durch die Monomethoxytritylgruppe und dessen Aminofunktion durch die Isobutyrylgruppe maskiert ist. Dieses Guanosinderivat wurde zunächst mit dem Mononucleotid pA^{Bz}OAc kondensiert und das entstehende Dinucleosidphosphat durch Lösungsmittlextraktion isoliert. Im weiteren Verlauf der Synthese wurden jeweils die 3'-Hydroxygruppen der wachsenden Kette mit den geschützten Mononucleotiden oder Di-, Tri- und Tetranucleotidblöcken kondensiert.

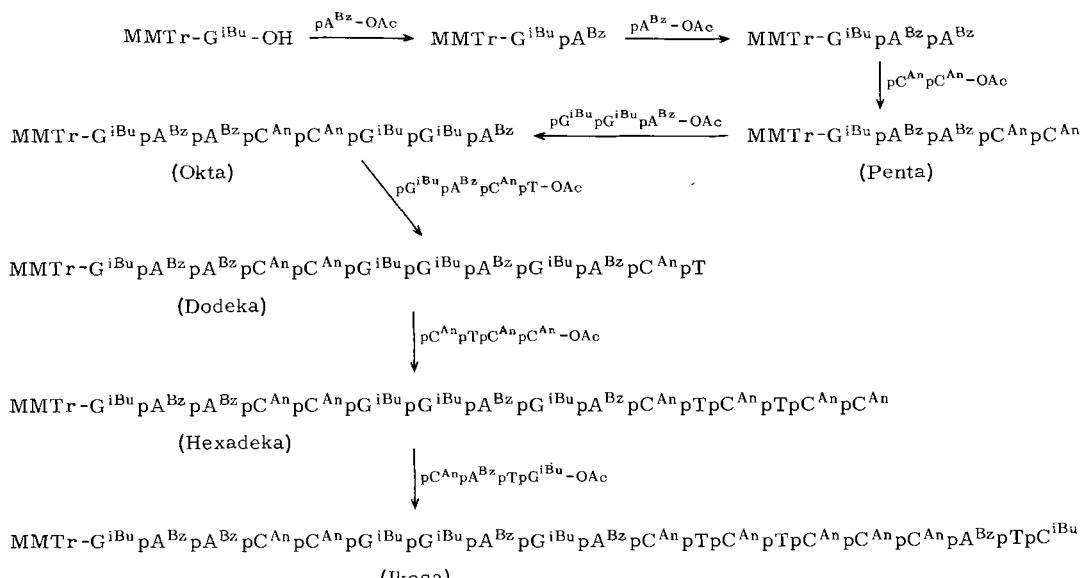


Abb. 12. Chemische Synthese eines Ikosanucleotids unter Verwendung vorgeformter Blöcke.

Nach jedem Schritt wurden die Produkte durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose gereinigt. Die Reinheit der so erhaltenen Verbindungen wurde vor Weiterverwendung wie folgt geprüft:

1. Umfassende papierchromatographische Charakterisierung der Produkte sowohl vor als auch nach Entfernung der Schutzgruppen; 2. Bestimmung der Nucleosid- und Nucleotidverhältnisse nach enzymatischer Hydrolyse der ungeschützten Produkte; 3. Chromatographie an DEAE-Cellulose-Säulen in Gegenwart von Harnstoff; diese von Tener et al.^[26] entwickelte Technik bietet den Vorteil eines sehr hohen Auflösungsvermögens.

In einer Synthesekette dieser Art fallen die Ausbeuten mit steigender Kettenlänge der Produkte ab, so daß große Überschüsse der Blöcke notwendig werden – und selbst dann ergeben sich bei den letzten Schritten nur mäßige Ausbeuten. Es ist daher wichtig, die einzusetzenden Blöcke sorgfältig auszuwählen; so sind z. B. Kondensationen zwischen zwei Purinen nach Möglichkeit zu vermeiden, da diese zu niedrigen Ausbeuten führen. Kondensationen zwischen zwei Pyrimidinen sollten hingegen aufgrund der im allgemeinen höheren Ausbeuten bevorzugt werden. In manchen Fällen spielt auch die Länge der Blöcke eine bedeutende Rolle; da nämlich die Trennung des Produktgemisches durch Ionenaustauschchromatographie weitgehend auf der verschiedenen großen negativen Ladung des Ausgangsmaterials und des Produktes basiert, verläuft die Trennung um so befriedigender, je größer diese Ladungsdifferenz ist. Ein typisches, durch Chromatographie an DEAE-Cellulose erhaltenes Trennprofil zeigt Abbildung 13; es resultiert aus einem Reaktionsgemisch, welches durch Kondensation eines Hexadekanucleotids und eines Tetra-

3.5. Verwendung von Tritylcellulose zur Reinigung von Kondensationsgemischen

Der Zweck dieses neuen Absorbens zur Säulenchromatographie kann am besten erläutert werden, wenn wir die Produkte einer typischen Kondensationsreaktion betrachten (Abb. 14):

1. Der erste Typ ist durch Monomethoxytritylgruppen an den 5'-Hydroxyfunktionen gekennzeichnet. Zu diesem Typ gehört sowohl die nicht umgesetzte MMTr-Komponente als auch das gewünschte Produkt. 2. Zum zweiten Typ gehören das nicht umgesetzte Nucleotid und dessen Pyrophosphat. Die selektive Adsorption der Produkte des ersten Typs sowie die dadurch mögliche Abtrennung von den Produkten des zweiten Typs ist kürzlich an Naphthoylcellulose- und Tritylcellulose-Säulen untersucht worden. Die adsorbierten Produkte können durch Erhöhung der Al-

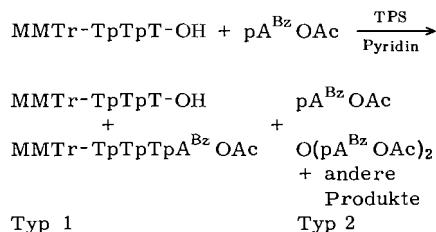


Abb. 14. Typen von Produkten einer Kondensationsreaktion.

koholkonzentration auf 90% mühe los von der Säule eluiert werden. Naphthoylcellulose erwies sich als recht instabil, da die Esterbindung in Gegenwart von Triäthylammonium-

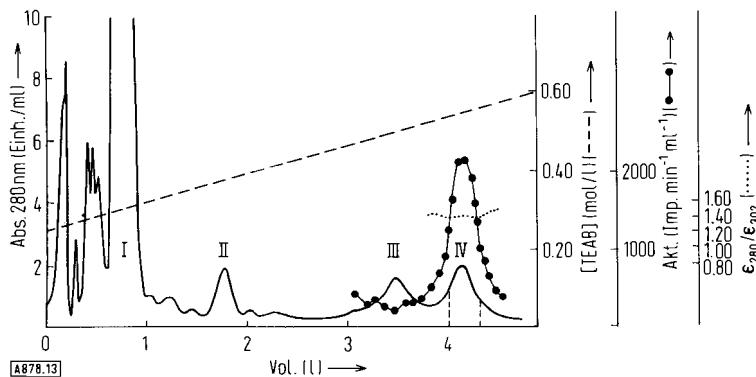


Abb. 13. Kondensation des geschützten Hexadekanucleotids mit dem geschützten Tetranucleotid (siehe dazu Abb. 12) und anschließende Auf trennung der Reaktionsprodukte an einer DEAE-Cellulose-Säule (Hydrogencarbonatform, 1.8×60 cm), äquilibriert mit 0.05 M Triäthylammoniumhydrogencarbonat (TEAB) (pH = 7.5) in 40-proz. Äthanol bei 4°C . Der zur Elution eingesetzte Hydrogencarbonatgradient ist durch die gestrichelte Linie wieder gegeben; als Lösungsmittel wurde konstant 40-proz. Äthanol verwendet.

nucleotids erhalten wurde. Der Tetranucleotidblock enthielt eine Tritiummarkierung, durch die das entstehende Ikosanucleotid leicht vom eingesetzten Hexadekanucleotid unterschieden werden konnte.

Das Signal IV wurde als Ikosanucleotid identifiziert. Das Verhältnis zwischen Radioaktivität und UV-Absorption war in diesem Bereich konstant.

hydrogencarbonat (TEAB) bei pH = 7.5–8.0 langsam hydrolysiert wird. Tritylcellulose hingegen war unter diesen Bedingungen ziemlich stabil und wird zur Zeit routinemäßig bei unseren synthetischen Arbeiten eingesetzt. Das Elutionsprofil eines Produktgemisches, welches bei der Synthese eines Hexanucleotids entsteht, an Tritylcellulose ist in Abbildung 15 gezeigt.

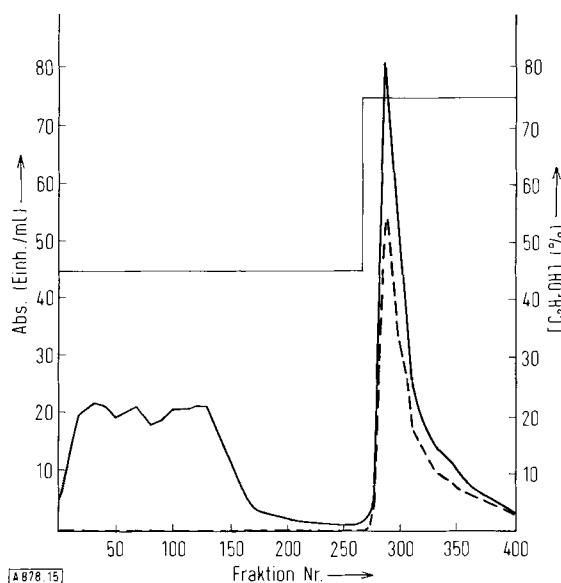


Abb. 15. Reinigung des Produktgemisches einer Kondensation zwischen MMTr-TpC^{An}G^{Bz} pABzOH und pC^{An}pC^{An}-OAc an Tritylcellulose. (—): Absorption bei 280 nm; (---): Absorption bei 472 nm (entspricht dem Gehalt an Monomethoxytritylgruppen); (—): Äthanolkonzentration.

Die durchgezogene Kurve zeigt die UV-Absorption, während die gestrichelte Kurve den Gehalt der einzelnen Fraktionen an Tritylgruppen wiedergibt. Die zuerst bei niedriger Alkoholkonzentration (45%; 0.05 mol/l TEAB) eluierten Produkte (Typ 2) erwiesen sich als frei von tritylhältigen Komponenten. Nachdem alle Produkte des zweiten Typs bei niedriger Alkoholkonzentration ausgewaschen waren, wurden die tritylhältigen Produkte durch Erhöhung der Alkohol- und TEAB-Konzentration auf 75% bzw. 0.5 mol/l eluiert. Die Prüfung dieser Produkte (Typ 1) durch umfassende papierchromatographische Analyse zeigte die Abwesenheit von Produkten des zweiten Typs. Die so erhaltenen Produkte des ersten Typs wurden anschließend durch Chromatographie an DEAE-Cellulose weiter gereinigt. Abbildung 16 zeigt ein Trennungsprofil dieser Art.

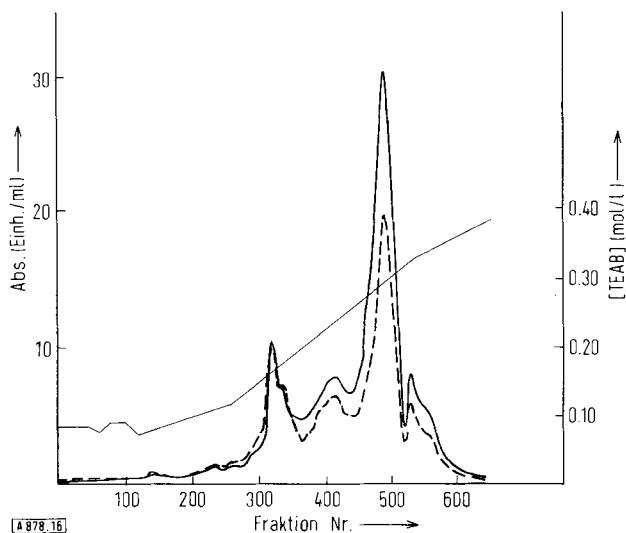


Abb. 16. Trennung von monomethoxytritylhältigem Hexa- und Tetranukleotid an DEAE-Cellulose. (—): Absorption bei 280 nm; (---): Absorption bei 472 nm (entspricht dem Gehalt an Monomethoxytritylgruppen); (—): TEAB-Konzentration.

Die eluierten Fraktionen enthielten ausschließlich tritylhältige Komponenten; das Elutionsprofil war relativ übersichtlich. Dieses Beispiel zeigt klar, daß die Reinigung der Reaktionsprodukte mit Tritylcellulose vor der Chromatographie an DEAE-Cellulose nicht nur die Wirksamkeit des Reinigungsprozesses erhöht, sondern auch den zeitlichen Aufwand verringert.

3.6. Polynukleotidsynthese an polymeren Trägern

Die Synthese von Biopolymeren an polymeren Trägern findet seit einigen Jahren zunehmendes Interesse. Dieses Konzept wurde von *Merrifield* mit großem Erfolg zur Synthese von Peptiden und Enzymen^[22] und von *Katchalsky*^[23] zur Synthese von unlöslichen Enzymen eingesetzt. So stellt sich natürlich die Frage, ob ähnliche Konzeptionen auf dem Polynukleotidgebiet entwickelt werden können. Es wäre zu hoffen, daß sich so der zur Synthese von Polynukleotiden erforderliche Zeitaufwand verringern lassen würde, besonders da dann die Auf trennung der Produkte nach jedem Kondensationsschritt entfallen könnte. Mehrere Arbeitsgruppen haben verschiedene Methoden untersucht. Wir selbst haben sowohl unlösliche als auch in organischen Lösungsmitteln lösliche Polymere^[27] unter diesem Gesichtspunkt geprüft, nachdem dieses Konzept zuerst von *Shemyakin* et al.^[24] vorgeschlagen worden war. Es erscheint besonders attraktiv, da die Kondensationsreaktion selbst in homogenem Medium durchgeführt werden könnte. In unseren Versuchen wurde käufliches Polystyrol nach der in Abb. 17 gezeigten Reaktionsfolge in ein Polymeres umgewandelt, welches einige Prozent Methoxytritylchloridgruppen aufweist.

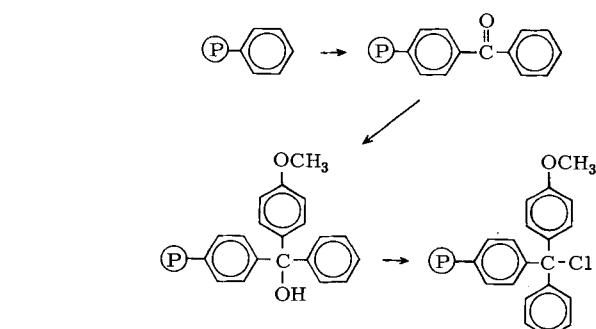


Abb. 17. Präparation von p-Methoxytritylchloridgruppen enthaltendem Polystyrol. (P) = Polystyrolgerüst.

Mit dem so abgewandelten Polystyrol wurden geschützte Desoxynukleoside zu den vier 5'-O-geschützten, an das

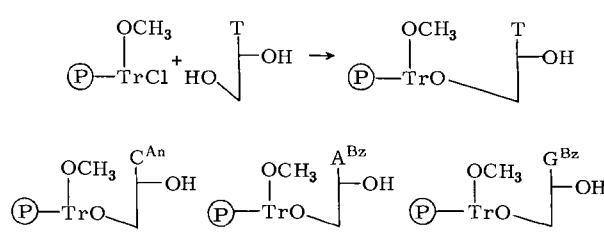


Abb. 18. Darstellung von an Polystyrol gekoppelten 5'-methoxytrityl-N-geschützten Desoxyribonukleosiden. (P) = Polystyrolgerüst.

Polystyrolgerüst gekoppelten Desoxynucleoside umgesetzt (Abb. 18). Die anschließende Kettenverlängerung durch schrittweise Addition von geschützten Mononucleotiden führte zu Dinucleosidphosphaten (s. Abb. 19) und zu Trinucleosiddiphosphaten.

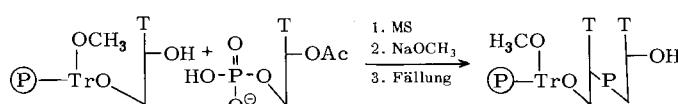


Abb. 19. Synthese eines Dinucleosidphosphats am Polystyrolträger.
Ⓐ = Polystyrolgerüst.

Nach den Syntheseschritten wurden die Produkte durch Säurebehandlung vom polymeren Träger abgespalten. Obwohl bei den einzelnen Kondensationsschritten recht hohe Ausbeuten erzielt werden konnten, waren diese doch nicht quantitativ. Eine ähnliche Methode wurde unabhängig von Cramer et al.^[25] entwickelt. Diese Methode erscheint recht vielversprechend, wenngleich noch einige Probleme gelöst werden müssen.

3.7. Selektive Maskierung von 3'-Hydroxyendgruppen bei geschützten Desoxyriboligonucleotiden

Ein Hauptproblem bei der Synthese von Desoxyribopoly-nucleotiden besteht darin, daß die Ausbeuten der einzelnen Kondensationsschritte nicht quantitativ sind. Dies ist auch einer der Hauptgründe, weshalb Synthesen an polymeren Trägern bisher nur zu begrenzten Erfolgen geführt haben, da Sequenzisomere als Produkte resultieren würden. Die Synthese in Lösung erfordert dagegen die zeitlich aufwendige Trennung von Ausgangsmaterial und verlängerten Ketten. Es wäre daher von Vorteil, wenn die 3'-Hydroxyendgruppe der nicht umgesetzten Ausgangsstoffe spezifisch und quantitativ für jegliche Weiterreaktion blockiert werden könnten. Eine solche Methode wurde von uns wie folgt entwickelt.

aromatischen Isocyanaten sowohl an der 3'-Hydroxy- als auch an der Phosphomonoestergruppe und führen so zu Dicarbamoylderivaten (6) (Abb. 20). Phosphodiester (Internucleotidbindungen) zeigen sich resistent gegenüber aromatischen Isocyanaten, so daß z. B. das Dinucleosidphosphat MMTr-TpG^{iBu}-OH lediglich an der 3'-Hydroxygruppe zu MMTr-TpG^{iBu}OCONHAr reagiert. Höhere Oligodesoxynucleotide bis zur Größe eines Pentanucleotids reagieren ebenfalls quantitativ mit aromatischen Isocyanaten an den 3'-Hydroxygruppen, sofern sie an der 5'-Hydroxygruppe und an den Aminofunktionen geschützt sind.

Die praktische Anwendbarkeit des Prinzips der 3'-Hydroxymaskierung nach jedem Kondensationsschritt wurde bei der Synthese eines Pentanucleotids erprobt. Die Syntheseschritte sind in Abbildung 21 zusammengefaßt. Nach jeder Kondensation wurden die Produkte zunächst an Tritylcellulose vorgereinigt und dann mit Naphthylisocyanat

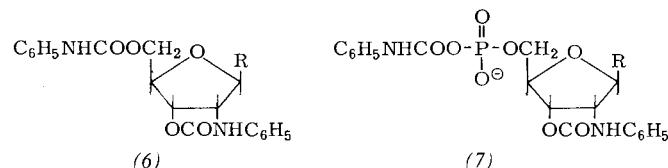


Abb. 20. Dicarbamoylderivate *N*-geschützter Nucleoside (links) und Mononucleotide (rechts). R = Thymin, *N*-Benzoyladenin, *N*-Anisoylcytosin oder *N*-Isobutyrylguanin.

umgesetzt; durch die Naphthylisocyanatbehandlung werden die nicht umgesetzten 3'-Hydroxygruppen der jeweiligen Ausgangsstoffe spezifisch maskiert, während die 3'-Hydroxygruppen der Reaktionsprodukte noch durch Acetylierung geschützt sind. Ausgehend von einem Trinucleotid wird der Zyklus: Addition eines Mononucleotids, Reinigung an Tritylcellulose und Reaktion mit Naphthylisocyanat bis zur Stufe eines Pentanucleotids zweimal durchlaufen.

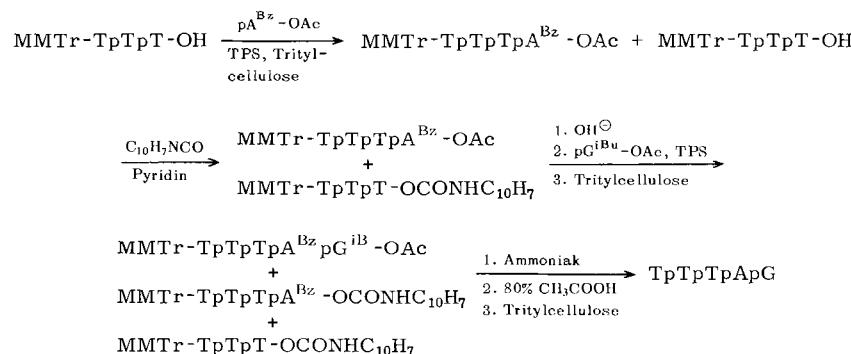


Abb. 21. Synthese eines Pentanucleotids.

Sie geht von der Beobachtung aus, daß am Stickstoff maskierte Nucleoside mit aromatischen Isocyanaten quantitativ zu Dicarbamoylderivaten (6) (Abb. 20) reagieren. Vollständig geschützte Nucleoside (3',5'-Hydroxy- und Aminofunktionen blockiert) setzen sich nicht mit aromatischen Isocyanaten um. Mononucleotide hingegen, die nur an den Aminofunktionen maskiert sind, reagieren mit

Zuletzt werden die Schutzgruppen nach Standardverfahren entfernt, und das Produktgemisch wird durch Filtration über Tritylcellulose gereinigt. Die Oligonucleotide mit den verbleibenden 3'-Naphthylcarbamoylgruppen werden selektiv an Tritylcellulose absorbiert, während das freie Pentanucleotid im Eluat erscheint. Dieses Produkt erwies sich als ca. 90% rein. Die Anwendbarkeit dieser Methode

für ausgedehntere Oligonucleotid-Synthesen sowohl in Lösung als auch an festen Trägern wird gegenwärtig studiert. Die hier besprochenen eigenen Arbeiten wurden großzügig unterstützt durch das National Cancer Institute der National Institutes of Health (Grants Nr. 72576, CA05178), die National Science Foundation Washington (Grants Nr. 73078, GB-7484X) und den Life Insurance Medical Research Fund.

Eingegangen am 25. November 1971 [A 878]
Übersetzt von Doz. Dr. H. Kössel, Freiburg

- [1] H. G. Khorana, Pure Appl. Chem. 17, 349 (1968).
- [2] K. L. Agarwal, H. Büchi, M. H. Caruthers, N. Gupta, H. G. Khorana, K. Kleppe, A. Kumar, E. Ohtsuka, U. L. RajBhandary, J. H. van de Sande, V. Sgaramella, H. Weber u. T. Yamada, Nature 227, 27 (1970).
- [2a] P. Besner, K. L. Agarwal, M. H. Caruthers, P. J. Cashion, M. Fridkin, E. Jay, A. Kumar, P. C. Loewen, K. Minamoto, E. Ohtsuka, J. H. van de Sande, N. Siderova u. U. L. RajBhandary, Fed. Proc. 30, 1413 (1971).
- [3] a) F. Eckstein u. I. Rizk, Angew. Chem. 79, 684 (1967); Angew. Chem. internat. Edit. 6, 695 (1967); b) R. L. Letsinger u. V. Mahadevan, J. Amer. Chem. Soc. 87, 3526 (1965); c) C. B. Reese u. R. Saffhill, Chem. Commun. 1968, 767.
- [4] T. M. Jacob u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 86, 1630 (1964).
- [5] R. Lohrmann u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 88, 829 (1966).
- [6] G. Weimann u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 84, 4329 (1962).
- [7] P. T. Gilham u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 81, 4647 (1959).
- [8] M. Smith, D. H. Rammler, I. H. Goldberg u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 85, 3821 (1963).

- [9] H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 85, 3821 (1963).
- [10] R. L. Letsinger u. P. S. Miller, J. Amer. Chem. Soc. 91, 3356 (1969).
- [11] C. B. Reese u. J. C. M. Stewart, Tetrahedron Lett. 1968, 4273.
- [12] E. Jay, unveröffentlicht.
- [13] T. M. Jacob u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 87, 2971 (1965).
- [14] H. Kössel, M. W. Moon u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 89, 2148 (1967).
- [15] J. Hachmann u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 91, 2749 (1969).
- [16] a) R. B. Woodward, K. Heusler, J. Gosteli, P. Naegeli, W. Oppolzer, R. Ramage, S. Ranganathan u. H. Vorbrüggen, J. Amer. Chem. Soc. 88, 852 (1966); b) F. Eckstein, Angew. Chem. 78, 682 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 671 (1966).
- [17] A. F. Cook, M. J. Holman u. A. L. Nussbaum, J. Amer. Chem. Soc. 91, 6479 (1969).
- [18] S. A. Narang, O. S. Bhanot, J. Goodchild, J. Michniewicz, R. H. Wightman u. S. K. Dheer, Chem. Commun. 1970, 516.
- [19] J. G. Moffat u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 83, 649 (1961).
- [20] E. Ohtsuka, K. Murao, M. Ubasawa u. M. Ikebara, J. Amer. Chem. Soc. 92, 3441 (1970).
- [21] K. L. Agarwal, A. Yamazaki u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 93, 2754 (1971).
- [22] R. B. Merrifield, Advan. Enzymol. 32, 221 (1969).
- [23] I. Silman u. E. Katchalski, Annu. Rev. Biochem. 35, 873 (1966).
- [24] M. M. Shemyakin, Y. A. Ovchinnikov, A. A. Kinyushkin u. I. V. Kozhevnikova, Tetrahedron Lett. 1965, 2323.
- [25] F. Cramer, R. Helbig, H. Hettler, H. K. Scheit u. H. Seliger, Angew. Chem. 78, 640 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 601 (1966).
- [26] R. V. Tomlinson u. G. M. Tener, J. Amer. Chem. Soc. 84, 2644 (1962).
- [27] H. Hayatsu u. H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 89, 3880 (1967).

Kernmagnetische Resonanz in der Festkörperchemie^[**]

Von Alarich Weiss^[*]

Mannigfache Probleme der Festkörperchemie lassen sich durch spektroskopische Untersuchung der Kernmagnetischen Resonanz (NMR- und NQR-Methode) aufklären. Dieser Fortschrittsbericht gibt einen Überblick über die Art der solchen Messungen zugrundeliegenden Wechselwirkungen im Kristall, die Beobachtungen im Spektrum sowie die daraus zu erhaltenen Informationen. Der Anwendungsbereich der Methoden umfaßt sowohl statische als auch dynamische Eigenschaften von Feststoffen.

1. Einleitung

In der Molekulchemie hat die Kernmagnetische Resonanz als physikalische Untersuchungsmethode, angewandt auf die flüssige Phase, im Laufe der letzten zwanzig Jahre einen dominierenden Platz eingenommen. In der Festkörperchemie kann man sie gleichberechtigt neben ande-

ren Methoden der Festkörperspektroskopie – wie IR-, Mößbauer-Spektroskopie etc. – einsetzen.

Die Physik stellt heute eine gut entwickelte und in den Grundlagen weitgehend geschlossene Theorie der Kernmagnetischen Resonanz zur Verfügung^[1–6]. Dennoch sind erst in den letzten Jahren, bedingt durch experimentelle Fortschritte, neue Anwendungsbereiche der Methode in der Untersuchung von Feststoffen erschlossen worden.

Von der experimentellen Methodik her ist es üblich, zwei Zweige der Kernresonanzspektroskopie zu unterscheiden:

1. Magnetische Kernresonanz (NMR),
2. reine Kernquadrupolresonanz (NQR oder auch PQR).

[*] Prof. Dr. A. Weiss
Institut für Physikalische Chemie der Universität
44 Münster, Schloßplatz 4
Neue Adresse (seit 5. 3. 1972):
Eduard-Zintl-Institut für Anorganische und Physikalische Chemie
der Technischen Hochschule
61 Darmstadt, Hochschulstraße 4

[**] Nach einem Vortrag vor der GDCh-Fachgruppe „Festkörperchemie“ am 1. Oktober 1970 in Bonn.