

Chemische Synthese des Dodecanucleotids dpT–T–T–T–T–C–A–T–C–A–T

Von R. WEISS, E. BIRCH-HIRSCHFELD und H. VENNER

Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR, Jena

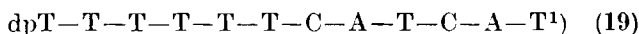
Inhaltsübersicht. Zu Enzymspezifitätsuntersuchungen wurde das Dodecanucleotid dpT–T–T–T–T–C–A–T–C–A–T benötigt. Es wird seine chemische Synthese, ausgehend von den Mononucleotiden dpT, dpC und dpA, beschrieben.

Chemical Synthesis of the Dodecanucleotide dpT–T–T–T–T–C–A–T–C–A–T

Abstract. For studies on the specificity of enzymes, the dodecanucleotide dpT–T–T–T–T–C–A–T–C–A–T was required. Its chemical synthesis is reported starting with the mononucleotides dpT, dpC and dpA.

Obwohl die Existenz von 6-Methylaminopurin und 5-Methylecytosin als seltene Basen in DNA seit langem bekannt ist, konnte erst in jüngster Zeit ihre fundamentale Rolle für das System Restriktion-Wirtsmodifikation nachgewiesen [1] und ihre Mitwirkung bei weiteren biologischen Prozessen wahrscheinlich gemacht werden [2].

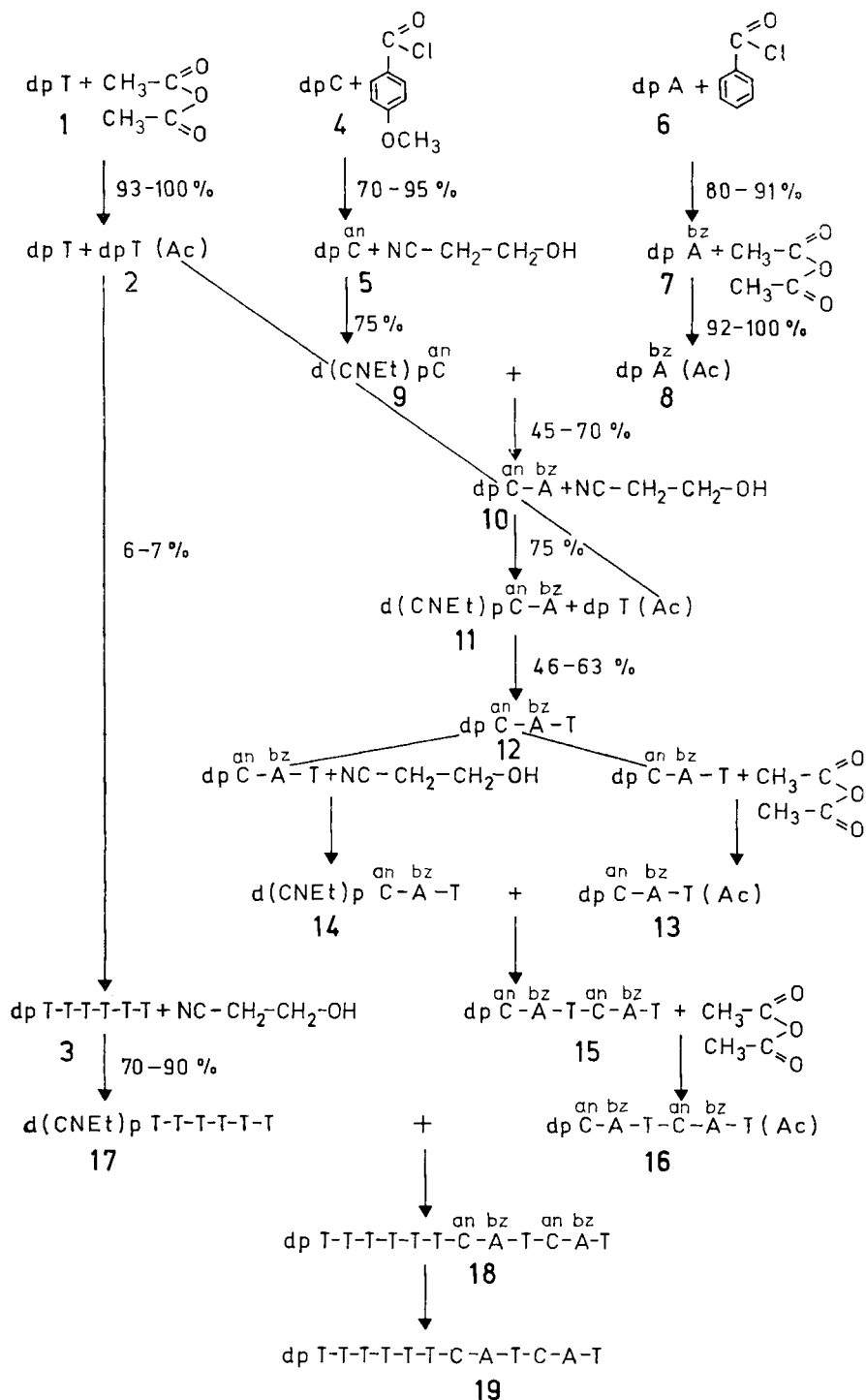
Ein besonderes Problem ergibt sich dabei aus der Tatsache, daß aus natürlichem Material gewonnene DNA bzw. deren Spaltstücke stets schon methylierte Basen enthalten. Dadurch ist es unmöglich, Untersuchungen über die Spezifität, z.B. von DNA-Methylasen, anzustellen. Da DNA unmittelbar nach der Replikation in vivo enzymatisch methyliert wird, bleibt als einziger Weg zur genaueren Ermittlung der Enzymspezifität die Darstellung solcher DNA-Regionen durch chemische Synthese. Im Hinblick auf die Überprüfung der Spezifität von Cytosin-Methylasen wurde von uns die chemische Synthese des folgenden Dodecanucleotids vorgesehen:



Dieses kann, im Vergleich zum entsprechenden Cytosin-methylierten Produkt, für die Beeinflussung weiterer enzymatischer Reaktionen herangezogen werden.

Zur Herstellung der Verbindung 19 schlugen wir den im Schema 1 angegebenen Syntheseweg ein.

¹⁾ Als Abkürzungen für die Nucleinsäurebausteine und deren Schutzgruppen wurden die von der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN) empfehlenden Regeln verwendet, vgl. HOPPE-SEYLER's Z. physiol. Chem. **351**, 1055 (1970). Außerdem wurden abgekürzt: DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, MSCl = Mesitylensäure-sulfonylchlorid, MSI = Mesitylensäure-sulfonimidazol, TEAB = Triäthylammoniumbicarbonat.



Schema 1 Chemische Synthese von $\text{dpT-T-T-T-T-T-C-A-T-C-A-T}$ 19. Die Prozentzahlen neben den Pfeilen geben die Ausbeuten entsprechend den Literaturangaben an.

Tabelle 1 Zwischenprodukt zur Synthese von 15

| Verbindung | Dargestellt nach Lit. | Ausb. a) | Daten der Gelfiltration | | | | Optische Daten | | | | R _F -Werte | | | | |
|--------------------------------------------|--------------------------|-------------|-------------------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|------|------|-----------------------|-----------|--------|------|------|
| | | | V _e | K _{av} | V ₀ | K _{av} | λ _{max} | λ _{min} | 280 | 280 | 280 | A | B | C | D |
| | | | (%) | V ₀ | V ₀ | V ₀ | [nm] | 260 | 260 | 230 | 300 | | | | |
| 0,1 m TEAB 0,1 m TEAB | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 6-15 | | 6-75 | | | | | | | | | | |
| dpT(Ac) 2 | [3, 16] | 95 | | | | | 263 | 233 | 0,77 | 1,94 | | 0,52 | | | |
| d(pT) ₆ 3 | [3] | 4,2 | | | | | 266 | 235 | 0,68 | 1,94 | | 0,01 0,10 | | | |
| dpC 5 | [4, 5, 6] | 79 | 1,60 | 0,42 | | | 302 | 235 | 0,88 | 1,36 | 0,77 | 0,37 | ↑ 0,50 | 0,46 | 0,88 |
| | | | | | | | | | | | | ↑ 0,45 | | | |
| d(CNEt) ^{an} pC 9 | [7] | (87) | | | | | 302 | | | | | ↑ 0,63 | ↑ 0,71 | | |
| dpA 7 | [6] | 81 | 1,46 | 0,28 | | | 280 | 245 | 0,94 | 1,56 | 2,54 | 0,49 | ↑ 0,64 | | |
| dpA (Ac) 8 | [8, 9] | 99 | | | | | 280 | | | | | ↑ 0,65 | | | |
| | | | 6-25 | | | | | | | | | | | | |
| dpC-A 10 | [10, 11, 15] | (26) | 2,01 | | | | 285 | 240 | | 1,52 | 1,32 | 1,35 | ↑ 0,39 | | |
| d(CNEt) ^{an} pC-A 11 | [10] | (77) | | | | | | | | | | | | | |
| dpC-A-T 12 | [15, 17] | (28) | 1,63 | 0,36 | 2,7 | 0,77 | 282 | 240 | | 1,35 | 1,39 | 0,34 | | | |
| d(CNEt) ^{an} pC-A-T 14 | | (87) | | | | | | | | | | | | | |
| dpC-A-T(Ac) 13 | [8, 17] | 79 | | | | | 281 | 240 | | 1,44 | 1,32 | ↑ 0,43 | | | |
| dpC-A-T-C-A-T 15 | | (20) | 1,09 | | 1,9 | 0,4 | 281 | 237 | | 1,13 | 1,53 | | | | |
| dpC-A-T-C-A-T-T(Ac) 16 | | 90 | | | | | | | | | | | | | |
| d(CNEt) ^{an} (pT) ₆ 17 | | (79) | | | | | | | | | | | | | |
| d(pT) ₆ -C-A-T-C-A-T 18 | | | 1,6 | 0,27 | | | 276 | 238 | | 1,14 | 1,49 | 1,65 | | | |
| d(pT) ₆ -C-A-T-C-A-T 19 | | (12) | 1,7 | 0,31 | | | 266 | 233 | 0,73 | 0,67 | 1,50 | | | | |
| dpC-C-A | | | | | | | 287 | 238 | 0,91 | 1,52 | 1,09 | 0,31 | | | |

a) Die Werte in Klammern sind infolge der Uneinheitlichkeit der 5'-Phosphat-geschützten Verbindungen nicht zuverlässig. Die Ausbeuten der Cyaniäthylverbindungen dürften daher um 10–15% niedriger liegen, die der daraus hergestellten Oligonucleotide entsprechend höher.

Tabelle 2 Werte zur Charakterisierung der in Tab. 1 aufgeführten Verbindungen nach Abspaltung der Schutzgruppen [13] bzw. von 5'-Phosphat^{a)}

| Verbindung | Saure Hydrolyse C:A:T [18] | Hydrolyse mit 1. Phosphomonoesterase 2. Milzphosphodi- esterase Nucleotid:Nucleosid dC:Nucleotid | Optische Daten | | | | R _f -Werte | | D | R _{d,p} T |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------|------|-----------------------|--------|-------|--------------------|
| | | | λ _{max} | λ _{min} | 280 | 260 | 280 | A | | |
| dpC-A | 1,05:1 | 1:0,84 | 202 | 230 | 0,73 | 0,53 | 1,12 | ↑ 0,10 | 0,69 | |
| dpC-A-T | 1,12:1:1,06 | | 263 | 233 | 0,78 | 0,55 | 1,05 | 0,14 | 0,15 | 0,46 |
| dC-A-T | | | | | | | | | | 1,288 |
| dpC-C-A | 2,12:1 | 2,3:1 | 265 | 230 | 0,83 | 0,62 | 0,95 | 0,13 | 0,14 | |
| dpC-A-T-C-A-T | 0,96:0,94:1 | | 264 | 234 | 0,78 | 0,65 | 1,09 | 0,01 | 0,023 | 0,082 |
| dC-A-T-C-A-T | 1,00:1,00:1,03 ^{b)} | | | | | | | | 0,059 | 0,22 |
| d(pT) ₆ -C-A-T-C-A-T | 2,53:2:7,6 | | 266 | 233 | 0,73 | 0,67 | 1,50 | | | |

^{a)} Die Substanzen wurden absteigend im System D chromatographiert, die Flecken ausgeschnitten, mit einproz. Ammoniak eluiert, eingengt, in Wasser aufgenommen und vermessen.

^{b)} Verhältnis von dC:dA:dT, gefunden nach enzymatischem Abbau in Gegenwart von Phosphomonoesterase und Schlangengiftphosphodiesterase.

Der dazu benötigte Sechserblock d(pT)₆ **3** wurde durch Polymerisation von dpT **1** nach KHORANA [3] hergestellt. Abweichend von den Literaturangaben wurden die Oligonucleotide bis zum d(pT)₆ als Pyridiniumsalze in Äther gefällt und bei -5°C aufbewahrt.

Bei der Darstellung von dpC^{an} **5** bewährte sich das Verfahren von KHORANA [4], modifiziert nach FRÖLKE [5] und NARANG [6]. Zur Identifizierung der Produkte dienten die von uns gefundenen und in Tab.1 aufgeführten chromatographischen und optischen Daten. Dort sind auch die von uns erhaltenen Ausbeuten mitgeteilt, während die der Literatur als Vergleich im Schema 1 angegeben sind. Die Einführung der Cyan-^{bz}äthylschutzgruppe in **5** wurde nach NARANG [7] vorgenommen; dpA^{bz} **7** wurde nach NARANG [6] und dpA(Ac)^{bz} **8** durch dessen Acetylierung nach KHORANA [8,9] hergestellt.

Die Darstellung von dpC^{an bz}-A **10** ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden [6, 10-14]. Bei einem Vergleich der Arbeiten fällt auf, daß die Ausbeutengaben in den neuesten Publikationen am niedrigsten liegen. Offenbar stehen die angegebenen Ausbeuten zur Reinheit der erhaltenen Verbindungen in umgekehrtem Verhältnis.

Wir haben die Kondensation in mehreren Ansätzen durchgeführt und dabei verschiedene Verfahren miteinander verglichen (Tab.3). Bei Anwendung von DCC als Kondensationsmittel [11] wurde ein hoher Anteil an Pyrophosphaten beobachtet, während bei Kondensation mit MSCl [10] in einigen Ansätzen depurinisierte Produkte auftraten. Das betrifft vor allem unumgesetztes Ausgangsmaterial, das aus diesem Grunde nicht wieder verwendet werden konnte.

Tabelle 3 Vergleich verschiedener Kondensationsmittel zur Oligonucleotidsynthese

| (CNEt)-Ester Komponente | Menge (mMol) | 3'Ac- Komponente | Menge (mMol) | Kondensationsmittel | | | Ausb. (%) |
|---------------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|---------------------|----------------|---------------|------------------|
| | | | | DCC (mMol) | MSCl (mMol) | MSI (mMol) | |
| d(CNEt)pC ^{an} | 2,64 | dpA ^{bz} (Ac) | 4,2 | | | 11 | 26 |
| | 2,3 | | 2,7 | | 6 | | 29 |
| | 0,5 | | 0,5 | 3 | | | 24 |
| d(CNEt)pC ^{an bz} -A | 0,91 | dpT(Ac) | 3,5 | | | 10 | 28 |
| | 0,38 | | 1,8 | | 6 | | 59 |
| d(CNEt)pC ^{an bz} -A-T | 0,234 | dpC ^{an bz} -A-T(Ac) | 0,234 | | | 2,5 | 20 |
| | 0,196 | | 0,191 | | 1,35 | | 15 |
| | 0,038 | | 0,046 | | 0,4 | | 32 ^{a)} |

a) dabei wurde Pyrophosphatspaltung [7] durchgeführt.

Günstigere Resultate im Hinblick auf die Reinheit der Produkte wurden bei Anwendung von MSI analog [15] erhalten. Damit wurde bei der Reaktionsdauer von 8 Tagen eine Ausbeute von 26% erzielt. Die nicht umgesetzten Reaktionskomponenten konnten ohne weiteres wieder verwendet werden.

Ein Vergleich zeigt, daß unsere Ausbeuteangaben wesentlich unter denen der Literatur liegen. Das erklärt sich aus der Darstellung von **9** — auf das sich die Ausbeuteberechnungen beziehen — nach [7]. Dabei wird auf die sonst übliche Triäthylaminbehandlung [8, 10] zur Abspaltung einer teilweise vorhandenen weiteren Cyanoäthylgruppe verzichtet. Dadurch vereinfacht sich die Aufarbeitung von **9**, während die weitere Synthese nicht behindert wird. Allerdings ergibt sich dadurch eine Ungenauigkeit in der Ausbeuteberechnung von **9** und **10**. Die dadurch beeinträchtigten Angaben in Tab. 1 wurden deshalb in Klammern gesetzt.

Von den üblichen Trennverfahren hat sich — abgesehen von ihrer Umständlichkeit und ihrer begrenzten Kapazität — die Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose gut bewährt. Im vorliegenden Fall erwies sich DEAE-Sephadex A 25 wegen der schärferen Trennung der Produkte (vgl. Abb. 1) als vorteilhafter. Zur Identifizierung der durch Kondensation entstandenen Verbindungen dienten weiterhin die in Tab. 2 angegebenen optischen, chromatographischen und hydrolytischen Daten der Oligonucleotide nach Abspaltung der Schutzgruppen.

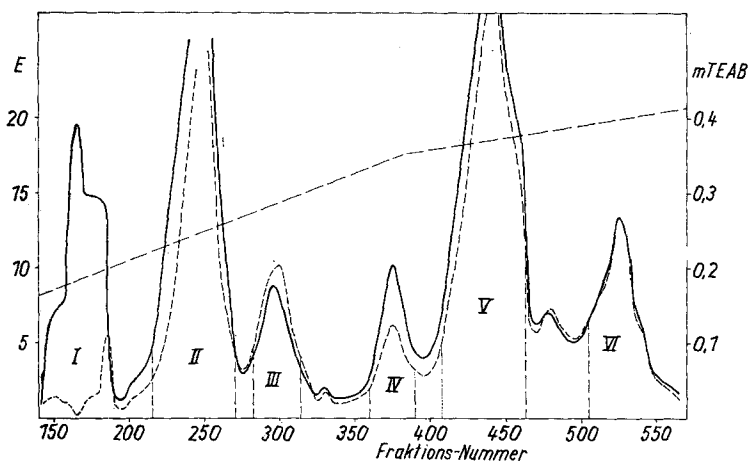


Abb. 1 Ionenaustauschchromatographie des Reaktionsgemisches zur Synthese von $\text{dpC-A}^{\text{an bz}}$ mit MSI an DEAE-Sephadex A-25. Säule: $4,5 \times 60$ cm, äquilibriert mit 0,05 m TEAB/20% Äthanol; Elutionsmittel: TEAB-Gradient (4 l 0,05 M TEAB/20proz. Äthanol — 4 l 0,35 m TEAB/20proz. Äthanol, anschließend 2,5 l 0,35 m TEAB/20proz. Äthanol — 2,5 l 0,45 m TEAB/20proz. Äthanol).

Durchfluß: 20,5 ml/9 Min.

Gipfel II: dpA^{bz} ; III: dpC^{an} ; IV: Pyrophosphat; V: $\text{dpC-A}^{\text{an bz}}$; VI: $\text{dpC-C-A}^{\text{an an bz}}$. 260 nm — — —; 280 nm ———.

Auffallend ist, daß bei der Synthese von **10** eine beträchtliche Menge an dpC-A^{an} entstanden ist. Das deutet auf Abspaltung der Cyanoäthylschutzgruppe während der Kondensation in beträchtlichem Ausmaß bzw. auf unerwünschte Phosphorsäuretriesterbildung, wie sie kürzlich von NUSSBAUM u. a. beobachtet wurde [22].

Die Einführung der Phosphatschutzgruppe in $\text{dpC-A}^{\text{an bz}}$ **10** nach KHORANA [10] sowie Acetylierung des $\text{dpT}^{\text{an bz}}$ **1** [3, 16] erfolgten kurz vor Kondensation zum $\text{dpC-A-T}^{\text{an bz}}$ **12**,

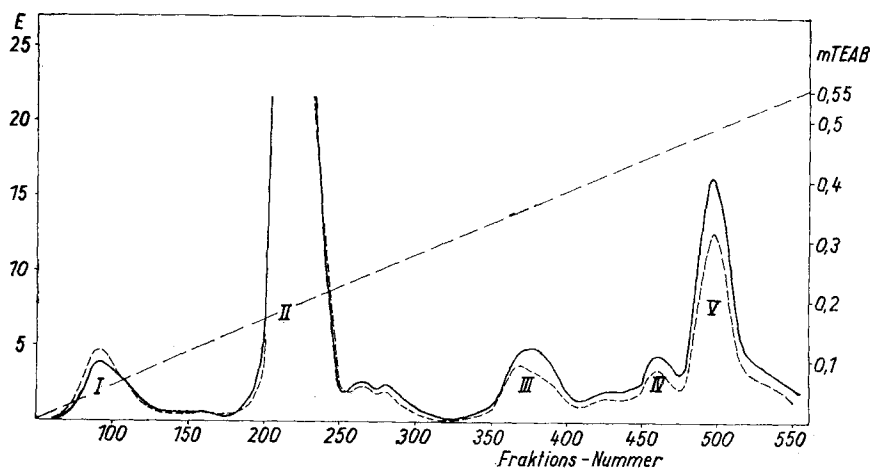


Abb. 2 Ionenaustauschchromatographie des Reaktionsgemisches zur Synthese von dpC-A-T mit MSI an DEAE-Sephadex A-25 (Bicarbonatform). Säule: $4,5 \times 60$ cm. Elutionsmittel: TEAB-Gradient (6 l 20proz. Äthanol — 6 l 0,55 m TEAB/20proz. Äthanol).

Durchfluß: 20,9 ml/9 Min.

Gipfel II: dpT , Mesitylensäure; III: dpC-A ; IV: Pyrophosphat; V: dpC-A-T . 260 nm — — —; 280 nm —

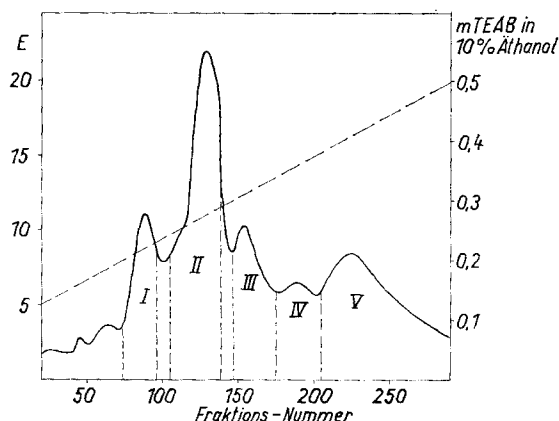


Abb. 3 Ionenaustauschchromatographie des Reaktionsgemisches zur Synthese von dpC-A-T-C-A-T an TEAE-Cellulose (Kap. 0,59 mval/g), äquilibriert mit 0,1 m TEAB in 10proz. Äthanol. Säule: $4,5 \times 60$ cm. Elutionsmittel: TEAB-Gradient (2 l 0,1 m TEAB in 10proz. Äthanol — 2 l 0,5 m TEAB in 10proz. Äthanol). Durchfluß: 14 ml/20 Min.

Gipfel I: cycl. dpC-A-T ; II: dpC-A-T ; III: Pyrophosphat; IV: Pyrophosphat und Hexanucleotid; V: dpC-A-T-C-A-T . 280 nm —.

so daß nur frisch hergestellte Produkte zum Einsatz kamen. Auch hier bewährte sich MSI als schonendes Kondensationsmittel. Bei einer Reaktionsdauer von 8 Tagen betrug die Ausbeute über 28%. Mit MSCL [17] konnten zwar wesentlich höhere Ausbeuten erzielt werden (vgl. Tab. 3); die Reinheit der erhaltenen Produkte sowie der Umstand, daß unumgesetztes Ausgangsmaterial weiterverwendet werden kann, sprechen jedoch für die Anwendung des Imidazolids.

Zur Reinigung von **12** war ebenfalls die Trennung an DEAE-Sephadex A-25 (vgl. Abb. 2) gut geeignet.

Im Verlauf des weiteren Syntheseweges wurde das Trinucleotid **12** aufgeteilt, wobei ein Teil am 5'-Phosphat, der andere an der 3'OH-Gruppe [8, 17] geschützt wurde. Die Kondensation zum $\text{dpC}-\overset{\text{an}}{\text{A}}-\overset{\text{bz}}{\text{T}}-\overset{\text{an}}{\text{C}}-\overset{\text{bz}}{\text{A}}-\text{T}$ **15** wurde sowohl mit MSCL als auch mit MSI durchgeführt (vgl. Tab. 3), wobei wir letzterem aus oben genannten Gründen den Vorzug geben. Die Trennung der Reaktionsprodukte erfolgte an TEAE-Cellulose (vgl. Abb. 3).

Die beiden Hexanucleotide **3** und **15** wurden zur Erhöhung ihrer Löslichkeit in abs. Pyridin in die entsprechenden Tri-N-hexylammoniumsalze übergeführt, d(pT)_6 **3** mit Hydracrylnitril umgesetzt und $\text{dpC}-\overset{\text{an}}{\text{A}}-\overset{\text{bz}}{\text{T}}-\overset{\text{an}}{\text{C}}-\overset{\text{bz}}{\text{A}}-\text{T}$ **15** acetyliert. Die Kondensation von **16** und **17** mit MSI ergab nach Trennung an Sephadex G-75 dp(T)_6 — $\overset{\text{an}}{\text{C}}-\overset{\text{bz}}{\text{A}}-\overset{\text{an}}{\text{T}}-\overset{\text{bz}}{\text{C}}-\overset{\text{an}}{\text{A}}-\overset{\text{bz}}{\text{T}}$ **18** (vgl. Abb. 4).

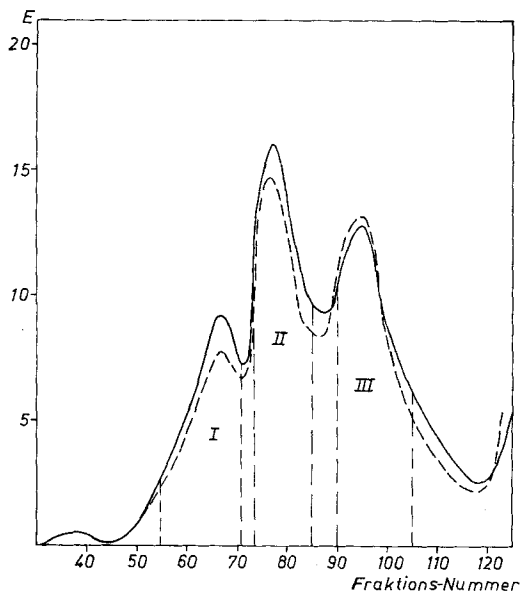


Abb. 4 Trennung der Reaktionsprodukte zur Synthese des $\text{dpT}-\overset{\text{an}}{\text{T}}-\overset{\text{bz}}{\text{T}}-\overset{\text{an}}{\text{T}}-\overset{\text{bz}}{\text{T}}-\overset{\text{an}}{\text{T}}-\overset{\text{bz}}{\text{T}}-\overset{\text{an}}{\text{C}}-\overset{\text{bz}}{\text{A}}-\overset{\text{an}}{\text{T}}-\overset{\text{bz}}{\text{C}}-\overset{\text{an}}{\text{A}}-\overset{\text{bz}}{\text{T}}$ an Sephadex G-75 (40—120 μ). Säule: K 25/100. Elutionsmittel: 0,1 m TEAB. Durchfluß: 3,2 ml/15 Min.

Gipfel I: $\text{dpT}-\overset{\text{an}}{\text{T}}-\overset{\text{bz}}{\text{T}}-\overset{\text{an}}{\text{T}}-\overset{\text{bz}}{\text{T}}-\overset{\text{an}}{\text{T}}-\overset{\text{bz}}{\text{T}}-\overset{\text{an}}{\text{C}}-\overset{\text{bz}}{\text{A}}-\overset{\text{an}}{\text{T}}-\overset{\text{bz}}{\text{C}}-\overset{\text{an}}{\text{A}}-\overset{\text{bz}}{\text{T}}$; II: $\text{dpC}-\overset{\text{an}}{\text{A}}-\overset{\text{bz}}{\text{T}}-\overset{\text{an}}{\text{C}}-\overset{\text{bz}}{\text{A}}-\text{T}$; III: d(pT)_6 ; 260 nm — — — —; 280 nm —

Nach Abspaltung der Schutzgruppen mit Ammoniak [13] wurde das Dodecanucleotid **19** noch einmal an Sephadex G-75 gereinigt, wonach die Ausbeute der Kondensationsreaktion 12% betrug.

Frau CHR. HARTMANN sind wir für fleißige technische Mitarbeit und Herrn Dr. H. REINERT für die sorgfältige Durchführung der hydrolytischen und enzymatischen Spaltungen zur Analyse zu Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche

Die Kondensationen wurden in einer Anaerobapparatur [19], die Trennungen an einem Uvi-cord II mit UltroRac-Fraktionssammler (LKB, Bromma, Schweden) bei 4 °C vorgenommen. Zur chromatographischen Trennung wurde DEAE-Cellulose SH (0,8 mval/g), TEAE-Cellulose p.A. (0,59 mval/g) der Firma Serva, Heidelberg, DEAE-Sephadex A-25 sowie Sephadex G-15, G-25 und G-75 (Pharmacia, Uppsala) verwendet. Die entsprechenden Fraktionen wurden in einem Vakuumrotationsverdampfer (VEB Medizintechnik, Leipzig) bei 20 °C eingeeengt.

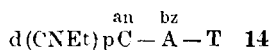
Wo im speziellen Fall nicht anders angegeben, wurden die geschützten Oligonucleotide bei -22 bis -28 °C gelagert, die ungeschützten in Ampullen lyophilisiert und bei -5 °C aufbewahrt.

Für die UV-Absorptionsmessungen diente ein Spektrophotometer Modell Uvispek (Hilger & Watts, Ltd., London). Zur papierchromatographischen Untersuchung wurde Schleicher & Schüll-Papier 2043b verwendet. Allgemein wurde absteigend chromatographiert. Die gefundenen R_F -Werte sind in Tab.1 und 2 verzeichnet. Werte, die aus dem aufsteigenden Verfahren stammen, sind durch einen stehenden Pfeil „ \uparrow “ gekennzeichnet.

Folgende Laufgemische fanden Anwendung:

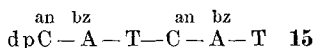
- A Äthanol:1 m Ammoniumacetat (pH 7,5) = 7:3
- B Isopropanol:0,5 m Ammoniumacetat (pH 6) = 5:2
- C Isopropanol:konz. Ammoniak:Wasser = 7:1:2
- D n-Propanol:konz. Ammoniak:Wasser = 55:10:35

Folgende Substanzen waren Handelsprodukte: dpT (Pharma, Waldhof), dpC und dpA (Serva Heidelberg), Tri-N-hexylamin und Dicyclohexylcarbodiimid (Ferrak, Berlin) und Mesitylensulfonylchlorid (EGA-Chemie, Steinheim). Letzteres wurde vor Verwendung aus Pentan umkristallisiert und über Ätzkali getrocknet. Mesitylensulfonsäureimidazolid wurde nach STAAB [20] hergestellt und vor Verwendung aus Benzol-Cyclohexan (1:3) umkristallisiert. Das zur Kondensation verwendete Pyridin (VEB Teerdest. & Chem. Fabr., Erkner) wurde mit Chlorsulfonsäure behandelt, destilliert, nochmals über Ätzkali destilliert und über Molekularsieb Zeosorb 5 IM (VEB Chemiekombinat, Bitterfeld) getrocknet. Hydracrylnitril (Schuchardt, München) wurde vor Verwendung frisch destilliert und über Molekularsieb 4 A (Merck) getrocknet. Die Tri-N-hexylammoniumsalze der geschützten Oligonucleotide wurden nach KHORANA [8, 21] hergestellt.



Das wasserfreie Gemisch von 0,23 mMol $\text{dpC}^{\text{an}} \text{pC}^{\text{bz}} - \text{A} - \text{T}$ und 0,83 ml Hydracrylnitril wird in 1 ml abs. Pyridin gelöst und unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit mit 2,3 mMol DCC versetzt. Der verschlossene Kolben wird mit Paraffin versiegelt und die klare Lösung im Dunkeln bei Zimmer-

temperatur 2–3 Tage lang geschüttelt. Danach wird die Umsetzung papierchromatographisch im Gemisch B überprüft. Wenn kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden ist, wird die Reaktion durch Zugabe von 4 ml Wasser beendet. Man läßt das Reaktionsgemisch über Nacht bei 5 °C stehen. Anschließend wird der abgeschiedene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und mit 50proz. Pyridin gewaschen. Filtrat und Waschflüssigkeit werden dreimal mit je 20 ml Äther ausgeschüttelt und anschließend die wäßrige Phase nach Zugabe von Pyridin eingeeengt. Danach wird durch dreimaliges Abdestillieren von 2–5 ml abs. Pyridin getrocknet, der Rückstand in wenig abs. Pyridin gelöst und in die 25–50fache Menge abs. Äther eingetropft. Der ausgefallene Niederschlag wird abzentrifugiert, viermal mit abs. Äther gewaschen und vorsichtig i. Vak. getrocknet. Ausb. 87% d.Th.

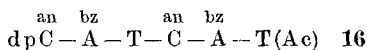


Das Gemisch der Tri-N-hexylammoniumsalze von 0,234 mM $\overset{\text{an}}{\text{dpC}}-\overset{\text{bz}}{\text{A}}-\overset{\text{an}}{\text{T}}(\text{Ac}) \mathbf{13}$ und 0,234 mM $\overset{\text{an}}{\text{d(CNEt)}}\overset{\text{bz}}{\text{pC}}-\overset{\text{an}}{\text{A}}-\overset{\text{bz}}{\text{T}} \mathbf{14}$ wird durch wiederholtes Abdestillieren von abs. Pyridin getrocknet. Beim Belüften des Rotationsverdampfers läßt man getrocknete Luft zu. Der Kolben mit dem gummiartigen Rückstand wird an die Anaerobapparatur angeschlossen [19] und über P_4O_{10} im Ölpumpenvakuum getrocknet. Anschließend gibt man nochmals etwa 2 ml abs. Pyridin zum Kolben und destilliert dieses unter vorsichtiger Schüttelbewegung i. Vak. ab. Nun werden 2,5 mMol in 2,5 ml abs. Pyridin gelöstes MSI zugegeben. Man schüttelt, bis eine homogene Lösung entstanden ist. Anschließend läßt man das Reaktionsgemisch 4 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen. Dann entfernt man den Kolben von der Apparatur, gibt 2,5 ml Wasser und 5 ml 2n NaOH zu und verseift 10 Min. bei Raumtemperatur. Um eine klare Lösung zu erhalten, muß man evtl. etwas Äthanol zugeben. Durch Zugabe von gekühltem Dowex 50 W X 8 Pyridinium-Ionenaustauscher wird anschließend neutralisiert. Dann filtriert man über eine Säule mit dem gleichen Austauscher und wäscht das Harz gründlich mit 10proz. Pyridin.

Filtrat und Waschflüssigkeit werden anschließend auf eine Säule mit TEAE-Cellulose aufgetragen. Man wäscht mit 1 l 0,1 m TEAB in 10% Äthanol und eluiert wie in Abb. 3 angegeben. Die entsprechenden Fraktionen werden vereinigt und unter wiederholter Zugabe von Pyridin eingeeengt.

Die papierchromatographische Untersuchung wurde im Gemisch A und nach Abspaltung der Schutzgruppen in einer Probe durch 48stündige Behandlung mit konz. NH_4OH in D vorgenommen.

Zur weiteren Reinigung von **15** verwendet man gegebenenfalls die Gelfiltration an Sephadex G-75 (40–120 μ) in einer 2,5 \times 100 cm-Säule bei einem Durchfluß von 3,4 ml/15 Min. Die Elution wird mit 0,1 m TEAB durchgeführt. Die Isolierung der Substanz erfolgt wie üblich nach wiederholtem Einengen mit Pyridin durch Ätherfällung. Ausb. 20%.



0,029 mM des Tri-N-hexylammoniumsalzes vom $\overset{\text{an}}{\text{dpC}}-\overset{\text{bz}}{\text{A}}-\overset{\text{an}}{\text{T}}-\overset{\text{bz}}{\text{C}}-\overset{\text{an}}{\text{A}}-\overset{\text{bz}}{\text{T}}$ werden durch wiederholtes Abdestillieren mit abs. Pyridin entwässert, anschließend über P_4O_{10} und KOH im Ölpumpenvakuum getrocknet und dann in 1 ml abs. Pyridin gelöst. Dazu gibt man 0,3 ml frisch destilliertes Essigsäureanhydrid und versiegelt den verschlossenen Kolben mit Paraffin. Man läßt 4 Std. bei Raumtemperatur im Dunkeln reagieren, kühlt dann auf 0 °C ab, versetzt das Reaktionsgemisch mit 2 ml 50proz. Pyridin und läßt über Nacht bei 5 °C stehen. Nach dem Einengen entwässert man den Rückstand durch wiederholtes Abdestillieren von abs. Pyridin, löst in 2–4 ml abs. Pyridin und tropft die Lösung in einen 30–50fachen Überschuß an abs. Äther. Der ausgefallene Niederschlag wird abzentrifugiert, dreimal mit abs. Äther gewaschen und vorsichtig i. Vak. getrocknet. Ausb. 90%.

$\text{d(CNEt)pT-T-T-T-T-T}$ 17

0,0208 mMol d(pT)_6 -tri-N-hexylammoniumsalz **3** werden wie bei **14** beschrieben mit 1,04 mMol Hydracrylnitril und 0,208 mMol DCC in 2 ml abs. Pyridin behandelt. Ausb. 79%.

 $\text{dpT-T-T-T-T-T-C-A-T-C-A-T}$ 18

0,018 mMol des Tri-N-hexylammoniumsalzes von d(CNEt)(pT)_6 **17** und 0,025 mM dpC-A-T-C-A-T(Ac) **16** (Tri-N-hexylammoniumsalz) werden wie bei **15** zur Kondensation vorbereitet und mit 23,4 mg MSI in 1 ml abs. Pyridin zur Reaktion gebracht. Bei Lösungsschwierigkeiten hilft Zugabe von etwas Diisopropyläthylamin. Man läßt 6 Tage im Dunkeln reagieren, versetzt mit 1 ml Wasser und verseift 10 Min. lang mit 2 ml 2n NaOH. Dabei gibt man soviel Äthanol zu, bis eine klare Lösung entsteht. Nach Neutralisation mit vorgekühltem Dowex-50 W X 8 filtriert man über eine Säule mit dem gleichen Austauscher und wäscht das Harz gründlich mit 10proz. Pyridin. Filtrat und Waschflüssigkeit werden unter wiederholter Zugabe von Pyridin eingengt, der Rückstand in 2,5 ml 25proz. Pyridin gelöst und an Sephadex G-75 getrennt (vgl. Abb. 4). Man vereinigt die entsprechenden Fraktionen und engt sie unter wiederholter Zugabe von Pyridin ein. Nach Abspaltung der Schutzgruppen mit konz. NH_4OH wird eine weitere Reinigung durch Gelfiltration an Sephadex G-75 angeschlossen. Die **19** enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert. Ausb. 12% d.Th.

Literaturverzeichnis

- [1] W. ARBER u. U. KÜHNLEIN, 8. Internat. Congr. of Biochemistry, Montreux (Schweiz) 1970, Abstract, S. 180.
- [2] H. VENNER u. H. REINERT, Z. allg. Mikrobiol. **13**, 613 (1973);
H. VENNER, H. REINERT u. CH. ZIMMER, FEBS Letters **46**, 357 (1974).
- [3] H. G. KHORANA u. W. I. CONNORS, Biochem. Prep. **11**, 113 (1966).
- [4] H. G. KHORANA, A. F. TURNER u. J. P. VIZSOLYI, J. Amer. chem. Soc. **83**, 686 (1961).
- [5] W. FRÖLKE, Dissertation, Braunschweig 1967.
- [6] S. A. NARANG u. S. K. DHEER, Biochemistry **8**, 3443 (1969).
- [7] S. A. NARANG, J. J. MICHNIEWICZ u. S. K. DHEER, J. Amer. chem. Soc. **91**, 936 (1969).
- [8] S. A. NARANG, T. M. JACOB u. H. G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. **89**, 2158 (1967).
- [9] G. WEIMANN, H. SCHALLER u. H. G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. **85**, 3835 (1963).
- [10] A. KUMAR u. H. G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. **91**, 2743 (1969).
- [11] E. OHTSUKA, M. W. MOON u. G. H. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. **87**, 2956 (1965).
- [12] K. L. AGARWAL, A. YAMAZAKI u. H. G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. **93**, 2754 (1971).
- [13] H. WEBER u. H. G. KHORANA, J. molecular Biol. **72**, 219 (1972).
- [14] M. H. CARUTHERS u. H. G. KHORANA, J. molecular Biol. **72**, 407 (1972).
- [15] Y. A. BERLIN, O. G. CHAKHMAKHCHEVA, V. A. EFIMOV, M. N. KOLOSOV u. V. G. KOROBKO, Tetrahedron Letters **16**, 1353 (1973).
- [16] T. M. JACOB u. H. G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. **87**, 2971 (1965).
- [17] A. F. COOK, E. P. HEIMER, M. J. HOLMAN, D. T. MAICHUK u. A. L. NUSSBAUM, J. Amer. chem. Soc. **94**, 1334 (1972).
- [18] E. CHARGAFF u. E. VISHER, J. biol. Chem. **176**, 703 (1948).
- [19] R. WEISS u. E. BIRCH-HIRSCHFELD, J. prakt. Chem. **317**, 525 (1975).
- [20] U. H. STAAB u. K. WANDEL, Chem. Ber. **93**, 2902 (1960).

- [21] S. A. NARANG, T. M. JACOB u. H. G. KHORANA, J. Amer. chem. Soc. **89**, 2167 (1967).
[22] M. S. POONIAN, E. F. NOWOSWIAT, L. TOBIAS u. A. L. NUSSEBAUM, Bioorg. Chem. **2**, 322 (1973).

Bei der Redaktion eingegangen am 14. Januar 1975.

Anschr. d. Verf.: Dr. R. WEISS, Chem.-Ing. E. BIRCH-HIRSCHFELD, Prof. Dr. H. VENNER, Zentralinstitut f. Mikrobiologie u. exp. Therapie der AdW der DDR, DDR-69 Jena, Beuthenbergstr. 11