

Ätherphasen mit Wasser und Sole gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Der Rückstand der eingedampften Lösungen lieferte aus Äther/Hexan 23,6 g farblose Platten, Smp. 80–83°.

$\text{C}_9\text{H}_8\text{ClNO}$	Ber. C 59,5 (181,6)	H 4,4	Cl 19,5	N 7,7%
	Gef. , ,	58,9	, 4,6	, 19,2 , , 7,7%

Pikrat von IX: Aus Methanol gelbe Prismen, Smp. 194–196°.

$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_4\text{O}_8$	Ber. C 43,9 (410,7)	H 2,7	Cl 8,6	H 13,6%
	Gef. , ,	43,7	, 2,8	, 8,7 , , 13,7%

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. Ōki & H. Nakanishi, Bull. chem. Soc. Japan 43, 2558 (1970).
- [2] O. Exner, V. Jehlička & J. Firl, Coll. Czechoslov. chem. Commun. 36, 2936 (1971).
- [3] W. Klyne & V. Prelog, Experientia 16, 521 (1960).
- [4] J. E. Blackwood, C. L. Gladys, K. L. Loening, A. E. Petrarca & J. E. Rush, J. Amer. chem. Soc. 90, 509 (1968); J. E. Blackwood, C. L. Gladys, A. E. Petrarca, W. H. Powell & J. E. Rush, J. chem. Docum. 8, 30 (1968).
- [5] O. Exner, V. Jehlička & A. Reiser, Coll. Czechoslov. chem. Commun. 24, 3207 (1959).
- [6] H. Lumbroso & P. J. W. Schuijl, C.r. hebd. Séances Acad. Sci. 264C, 925 (1967).
- [7] O. Exner & V. Jehlička, Coll. Czechoslov. chem. Commun. 30, 639 (1965).
- [8] H. Lumbroso, D. M. Bertin & P. Reynaud, C.r. hebd. Séances Acad. Sci. 261, 399 (1965).
- [9] H. Lumbroso & D. M. Bertin, Bull. Soc. chim. France 1970, 1728.
- [10] M. Kandel & E. H. Cordes, J. org. Chemistry 32, 3061 (1967).
- [11] R. M. Moriarty, C. L. Yeh, K. C. Ramey & P. W. Whitehurst, J. Amer. chem. Soc. 92, 6360 (1970).
- [12] A. I. Vogel, J. chem. Soc. 1948, 1833.
- [13] O. Exner, Z. Fidlerová & V. Jehlička, Coll. Czechoslov. chem. Commun. 33, 2019 (1968).
- [14] H. Lumbroso & G. Pifferi, Bull. Soc. chim. France 1969, 3401.
- [15] H. F. van Woerden & E. Havinga, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 86, 353 (1967).
- [16] O. Exner, V. Jehlička & J. Firl, Coll. Czechoslov. chem. Commun. 37, 466 (1972).
- [17] I. F. Halverstadt & W. D. Kumler, J. Amer. chem. Soc. 64, 2988 (1942).

## 184. Nucleoside und Nucleotide. Teil 3. Über die Polykondensation von Thymidin-3'-phosphat nach der Triestermethode<sup>1)</sup>

von W. Falk und Ch. Tamm

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(13. V. 72)

*Summary.* Condensation of a mixture of 25 mole per cent of 5'-O-*p*-methoxy-trityl-thymidine 3'-( $\beta$ -cyanoethyl)phosphate] and 75 mole per cent of thymidine 3'-( $\beta$ -cyanoethyl)phosphate] in pyridine yielded a mixture of oligonucleotides, the largest being the pentanucleotide. It was demonstrated that longer chains are not obtained due to the formation of a C-pyridinium-thymidine nucleotide. For avoiding this undesired side reaction, the condensation was carried out using *sym.*-collidine as solvent. The analogous side reaction was not observed, longer chains of oligonucleotides were not obtained, however.

**1. Einleitung.** – Die chemische Synthese von Polynucleotiden kann entweder nach dem Prinzip der sog. Diester- oder nach der Triester-Methode erfolgen. Bei der

<sup>1)</sup> Teil 2: [1].

ersteren werden vorgebildete Nucleosidphosphorsäure-monoester mit Nucleosiden oder Nucleotiden zu Diestern kondensiert, wobei als Lösungsmittel meist Pyridin und als Kondensationsmittel meist Dicyclohexyl-carbodiimid (DCC) dienen. Der Aufbau der Polynucleotidkette lässt sich durch schrittweises Anfügen einer Nucleosid- resp. Mononucleotid-Einheit, durch Blockkondensation von Polynucleotiden, durch Polykondensation von Mononucleotiden oder durch Blockpolykondensation realisieren (vgl. Übersichtsartikel [2]). Nach der Hydrolyse des Kondensationsmittels und Entfernen der verwendeten Schutzgruppen muss das Reaktionsgemisch durch Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Cellulose gereinigt und in die Komponenten zerlegt werden. Diese Operation gestaltet sich in der Regel recht schwierig, da es sich um ein Gemisch von sehr ähnlichen Anionen handelt.

Um diesen Schwierigkeiten aus dem Wege zu gehen, begannen *Letsinger et al.* [3] [4] [5] vor einigen Jahren die Vor- und Nachteile der Polynucleotidsynthese nach der Phosphorsäuretriester-Methode in der 2-Desoxyribosereihe zu untersuchen. Sie arbeiteten vornehmlich an festen polymeren Trägern, aber auch in Lösung [5]. Es kam dabei die Methode der schrittweisen Kondensation zur Anwendung. In jüngerer Zeit wurden auch Blockkondensationen mit guten Ergebnissen durchgeführt [6]. In der Ribosereihe kam die Methode ebenfalls zur Anwendung [7]. Aus den publizierten Ergebnissen lassen sich folgende Vor- und Nachteile der Triestermethode gegenüber der Diestermethode herauslesen: 1. Die Produkte der Triestersynthese verhalten sich wie neutrale organische Verbindungen und können z. B. an Kieselgel chromatographiert werden. 2. Internucleotidische Bindungen können nicht mehr aktiviert werden, so dass etwa die Bildung von verzweigten Nucleotiden unterbleiben sollte. 3. Die Phosphorsäuretriester reagieren spezifisch mit der primären Hydroxygruppe eines Nucleosids. Die Reaktion mit der sekundären Hydroxygruppe macht nach enzymatischer Bestimmung nur 4% aus [5]. Je nach Fragestellung kann dieser Punkt auch als Nachteil bezeichnet werden. Weitere Nachteile sind die etwas längeren Reaktionszeiten und die Notwendigkeit der Verwendung von aggressiven Kondensationsmitteln wie Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid (TPS) [8] und Mesitylensulfonylchlorid (MS).

Es schien uns daher angezeigt, die Auswirkungen dieser Einflüsse auf die Polykondensation zu Triestern genauer zu untersuchen. Nach den bisherigen Erfahrungen war zu hoffen, dass reinere Produkte entstehen und dass das Abfallen der Ausbeuten bei steigender Kettenlänge geringer als bei früheren Polykondensationen [9–14] sein würde. Die benötigte lange Reaktionszeit könnte außerdem Aufschlüsse über die Stabilität der Triester liefern.

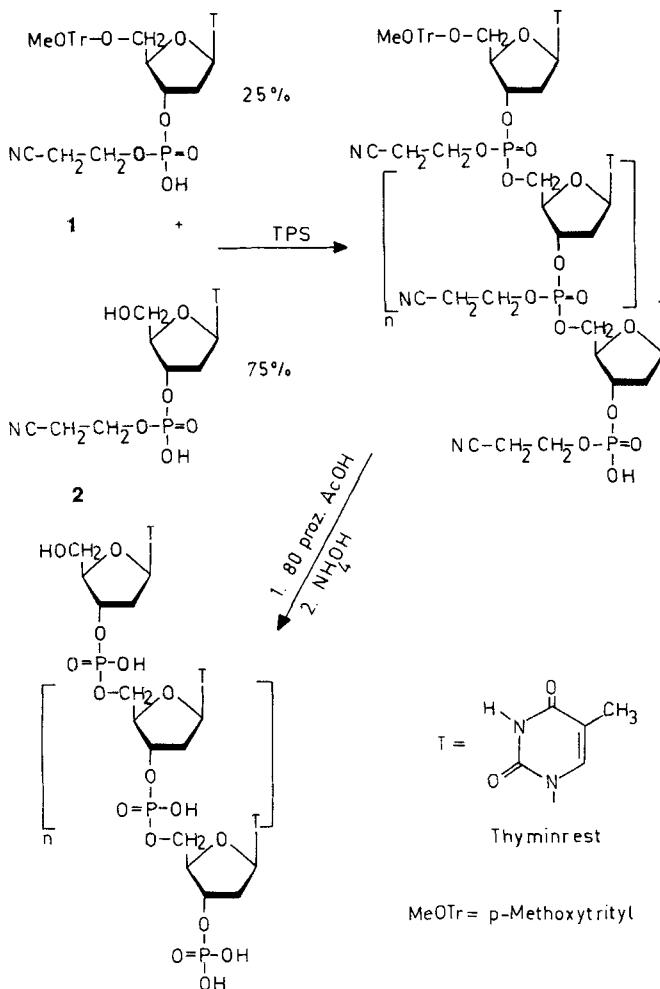
**2. Versuche zur Polykondensation.** – Zur Durchführung der Kondensation wurde ein zur Diestermethode analoges Verfahren gewählt, das nach *Khorana* [15] bisher die besten Ergebnisse zeigte. Da eine 5'-Hydroxygruppe zur Kondensation zur Verfügung stehen muss, geht die Synthese von einem 3'-Phosphorsäuretriester, aufgeteilt in 25% eines Startnucleotides und 75% eines Kettenbausteines, aus. Anschließend werden die Schutzgruppen durch Hydrolyse entfernt und das Polymerengemisch an DEAE-Cellulose aufgetrennt. Als Modelle dienten  $(\text{MeOTr})\text{T}_{\text{dP}}(\text{CNEt}^2)$  (**1**) als Starteinheit resp.  $\text{T}_{\text{dP}}(\text{CNEt}^2)$  (**2**) als Kettenbaustein. Es wird die in Schema 1 darstellte Reaktionsfolge erwartet.

<sup>2)</sup> Nomenklatur nach IUPAC-IUB-Empfehlungen. Vgl. Biochemistry 9, 4022 (1970).

Als Schutz für die primäre Hydroxygruppe wurde die Mono-*p*-methoxytritylgruppe (MeOTr) [16] gewählt, während die Phosphorsäure mit  $\beta$ -Cyanoäthanol (CNEt) [17] verestert wurde. Beide Schutzgruppen sind bequem anwendbar und die Abspaltungsbedingungen äusserst mild.

Zur Erleichterung der Identifizierung der durch die Kondensation entstehenden Oligonucleotide wurden nach den bekannten Methoden der schrittweisen Kondensation [18] und der Phosphorylierung [4] die nicht-phosphorylierten und phosphorylierten Thymidin-oligonucleotide bis zum Pentanucleotid (siehe exp. Teil) hergestellt und mittels UV.-Messungen und enzymatischer Methoden genau bestimmt. Bei diesen Synthesen wurde ebenfalls die (MeOTr)-Schutzgruppe verwendet. Dadurch wurde lediglich eine Änderung im Arbeitsverfahren notwendig. Bei der Aufarbeitung der Kondensationsgemische wurde stets eine 10–20proz. Abspaltung der (MeOTr)-Gruppe

Schema 1. Reaktionsfolge zur Polykondensation



beobachtet, die aber durch Zugabe von etwas festem Ammoniumhydrogencarbonat verhindert werden konnte.

Die Phosphorylierungen der Oligonucleotide mit  $\beta$ -Cyanoäthylphosphorsäure erfolgten nach der Vorschrift für Triester von Letsinger [4] mit TPS als Kondensationsmittel. Die phosphorylierten (MeOTr)-Oligonucleotide wurden nach der Abspaltung der  $\beta$ -Cyanoäthyl-Schutzgruppe an DEAE-Cellulose getrennt. Das UV.-Elutionsdiagramm zeigte jeweils zwei Hauptspitzen, von denen die bei geringerer Hydrogencarbonatkonzentration das Ausgangsmaterial repräsentierte, während in der Spalte bei höherer Konzentration das gewünschte phosphorylierte Nucleotid zu finden war. Die Ausbeuten variieren zwischen 50 und 60%. Die Produkte wurden durch Abbau mit alkalischer Phosphatase und Inkubation mit Milz-Phosphodiesterase charakterisiert (siehe exp. Teil).

$5'$ -O-(Mono- $\beta$ -methoxytrityl)-thymidin wurde nach der Vorschrift von Khorana [16] hergestellt. Bei der Aufarbeitung konnte jedoch die aufwendige Säulenchromatographie unterlassen werden, da eine sehr langsame Fällung des Rohproduktes aus Benzol durch Zusatz von Cyclohexan bereits ein kristallines, analysenreines Produkt ergab, das durch die UV.-, IR.- und NMR.-Spektren identifiziert wurde.

Die Phosphorylierung dieses Produktes erfolgte mit dem Pyridiniumsalz der  $\beta$ -Cyanoäthylphosphorsäure mit TPS als Kondensationsmittel. Die Reinigung in grossem Maßstab erwies sich als sehr problematisch, da die Reaktion nur mit einer Ausbeute von etwa 75% verläuft und sehr viele Nebenprodukte entstehen, die durch Fällung oder Flüssig-flüssig-Verteilungsmethoden nicht zu entfernen sind. Chromatographie an DEAE-Cellulose würde einen viel zu grossen Aufwand erfordern. Eine befriedigende Reinigung gelang jedoch durch eine Chromatographie an Kieselgel mit Aceton und steigenden Anteilen Methanol und 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung in Wasser. Das Präparat war zwar nicht analysenrein, konnte aber durch UV.-, IR.- und NMR.-Spektren (Fig. 1) zuverlässig charakterisiert werden. Eine weitergehende Charakterisierung ermöglichte das Nucleotid **2**, das aus **1** durch Hydrolyse mit Essigsäure entstand. **2** wurde identifiziert durch Elementaranalyse, UV.-, IR.-, NMR.-Spektren (Fig. 2) und Elektrophorese.

Die Veränderungen der chemischen Verschiebungen der Zuckerprotonen in den NMR.-Spektren im Verlauf der einzelnen Reaktionsschritte zeigen deutlich, an welchen Stellen die Reaktionen jeweils stattgefunden haben (vgl. Tab. 1).

Tabelle 1. Änderung der chemischen Verschiebung der Zuckerprotonen während der Synthese der Ausgangsmaterialien ( $\delta$ -Werte in ppm)

Substanz	H—C(1')	H—C(2')	H—C(3')	H—C(4')	H—C(5')
T <sub>d</sub>	6,12	2,08	4,22	3,72	3,59
(MeOTr)T <sub>d</sub>	6,20	2,22	4,33	3,91	3,28
(MeOTr)T <sub>dP(CNEt)</sub>	6,21	2,45	4,73	4,15	3,26
T <sub>dP(CNEt)</sub>	6,15	2,22	4,70	4,0	3,63

Die grössten Veränderungen bei Tritylierung und Entritylierung zeigten die C(5')-Protonen; bei der Phosphorylierung wurde das C(3')-Proton am meisten verschoben. Das Vorliegen eines Phosphorsäurediesters wurde durch das Verhalten bei

verschiedenen pH-Werten in der Elektrophorese bewiesen. Die Rf-Werte von  $T_{\text{Ap}}$  und  $T_{\text{Ap}}(\text{CNET})$  waren bei pH 3,5 identisch, wogegen bei pH 7,5 der Diester langsamer wanderte als  $T_{\text{Ap}}$ . Einen weiteren Hinweis lieferte das Auftreten der P=O-Schwingung im IR.-Spektrum des Diesters. Bei Phosphorsäuremonoestern (z. B.  $T_{\text{Ap}}$ ) tritt diese Schwingung nicht auf.

Nach Abspaltung der  $\beta$ -Cyanoäthyl-Schutzgruppe war das Produkt stabil gegen die 5'-Nucleotidase aus *Crotalus adamanteus* [1], wurde aber durch alkalische Phosphatase aus Kälberdarm zu Thymidin gespalten. Dadurch ist die Phosphorylierung in 3'-Stellung bewiesen.

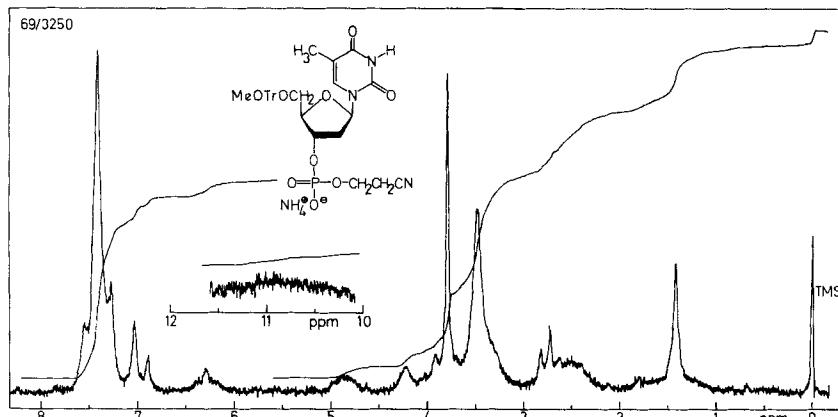


Fig. 1. 60-MHz-NMR.-Spektrum des Nucleotides 1 in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

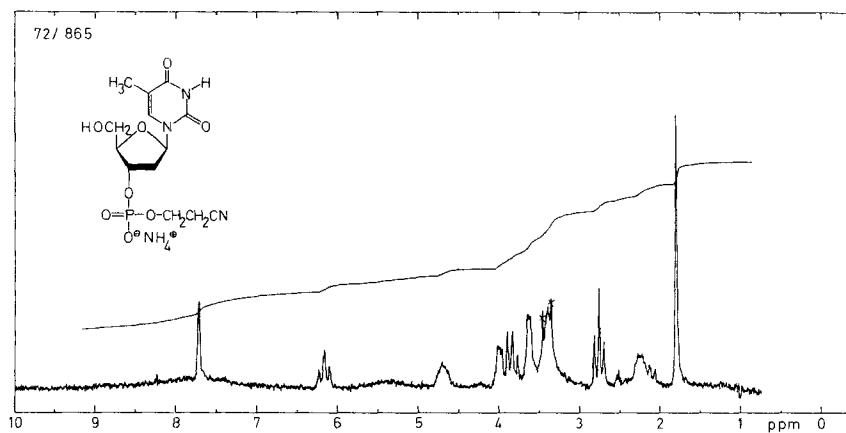


Fig. 2. 100-MHz-NMR.-Spektrum des Nucleotides 2 in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

Zur Polykondensation wurden Startnucleotid und Kettenbaustein im Verhältnis 1:3 eingesetzt, da die konformationsbedingte Tendenz zur Bildung cyclischer Oligonucleotide durch die Diesterbildung wahrscheinlich nur wenig beeinflusst wird. Die Durchführung der Reaktion erfolgte analog der Monoesterkondensation. Der Reaktionsverlauf konnte sehr gut durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel ver-

folgt werden. Alle 24 Std. wurde eine Probe hydrolysiert und chromatographiert. Während der ersten 10 Tage wurde eine ständige Abnahme der Ausgangssubstanzen und eine Entstehung von polareren Produkten beobachtet. Außerdem war erst nach 4 Tagen sämtliches TPS gelöst. Beides sprach für eine sehr langsame Reaktion. Nach 8 Tagen wurde noch etwas TPS zugegeben, nach dem 10. Tag änderte sich die Menge Ausgangsmaterial nicht mehr. Die Reaktion wurde deshalb durch Hydrolyse mit Wasser unterbrochen. Nach Abspaltung der Schutzgruppen wurde das Polymerisat mit einem Ammoniumhydrogencarbonat-Gradienten bei pH 8,5–9,0 getrennt.

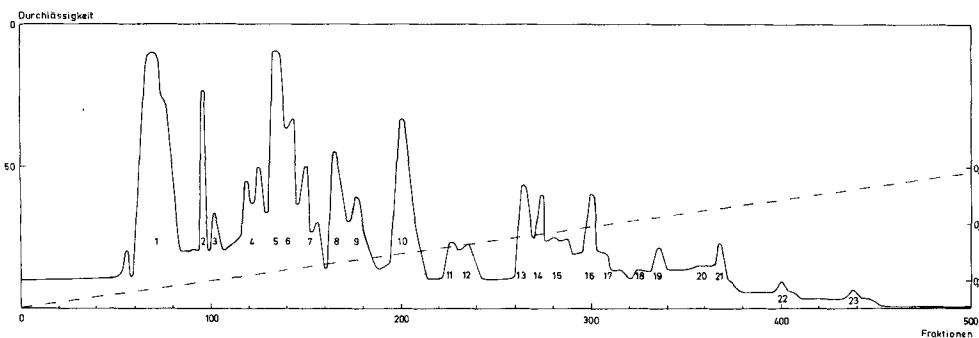


Fig. 3. Auftrennung des Polykondensationsgemisches an DEAE-Cellulose  
(- - - = Molarität  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )

Das Elutionsdiagramm (vgl. Fig. 3) zeigt ein äußerst komplexes Bild, lässt aber eine Reihe von Hauptprodukten in den Spitzen 1, 5, 10, 13, 16, 19, 21, 22, 23 erkennen, deren Absorptionen fast gleichmäßig abnehmen. Die Substanzen in den Spitzen 2, 3 und 4 zeigten ein von Thymidin verschiedenes Spektrum und wurden nicht näher untersucht. Die Triisopropyl-benzolsulfonsäure trat im Bereich der Fraktionen 110 bis 160 auf, wirkte aber nicht störend auf die nachfolgenden Untersuchungen. Die Identifizierung der Verbindungen in den Hauptspitzen wurde nach folgenden Kriterien vorgenommen:

1. Aufgrund von früheren Trennungen von Polykondensationsgemischen steht die Reihenfolge der Elution praktisch fest.

2. Die linearen Oligonucleotide bilden bei Dünnschichtchromatographie (an Kieselgel) und Papierchromatographie eine homologe Reihe [11].

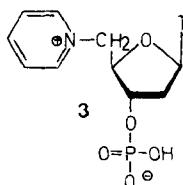
3. Die linearen Oligonucleotide müssen durch Phosphatase vollständig entphosphoryliert werden. Das ermöglicht die Unterscheidung von Pyrophosphaten gleicher Polarität [11]. Die Spaltprodukte müssen wieder eine homologe Reihe der entphosphorylierten Oligonucleotide ergeben. Die Kombination dieser Kriterien und der direkte chromatographische Vergleich mit den synthetischen Oligonucleotiden erlaubt die eindeutige Identifizierung. Auf diese Weise ergaben sich die in Tab. 2 dargestellten Zuordnungen.

Die Spaltungen mit alkalischer Phosphatase zeigten, dass die Hauptspitzen 5–10% nicht spaltbares nucleotidisches Material enthalten. Es dürfte sich dabei um die Pyrophosphate handeln. Längerkettige Nucleotide enthielten vermutlich die Spitzen 21, 22 und 23. Das darin vorhandene nucleotidisches Material war auf Papier und Kieselgel polarer als das Pentanucleotid.

Tabelle 2. Nucleotidausbeuten bei der Polykondensation in Pyridin

Spitze	Substanz	Ausbeute in % OD <sub>265</sub> -Einheiten <sup>3)</sup>
5	T <sub>d</sub> P	17
10	(T <sub>d</sub> P) <sub>2</sub>	7,6
13	(T <sub>d</sub> P) <sub>3</sub>	3,0
16	(T <sub>d</sub> P) <sub>4</sub>	1,6
19	(T <sub>d</sub> P) <sub>5</sub>	0,8

Die geringen Ausbeuten an linearen Oligonucleotiden bedingten eine genauere Untersuchung der Spitze 1, in der 38% des gesamten nucleotidischen Materials enthalten war. Das Gemisch liess sich auf Papier in zwei Komponenten im Verhältnis 4:1 zerlegen. Die grössere Menge war polarer, die kleinere unpolarer als T<sub>d</sub>P. Das UV.-Spektrum der polareren Verbindung zeigte ein Maximum bei 261 nm und eine starke Schulter bei 265 nm. Das entspricht einem äquimolaren Gemisch von Thymidin und einem N-Alkylpyridinium-Kation. Bei der Elektrophorese bei pH 3,5 blieb die Verbindung am Start, bei pH 7,5 hatte sie einen ähnlichen Rf-Wert wie T<sub>d</sub>P(CNEt). Durch die Inkubation mit alkalischer Phosphatase wurde ein Nucleosid freigesetzt, das die gleichen UV.-Eigenschaften wie das Nucleotid besass, sich aber bei der Elektrophorese bei pH 3,5 und 7,5 zur Kathode bewegte. Dieses Verhalten entspricht dem 5'-(C-Pyridinium)-nucleotid 3, das Khorana bei vielen Kondensationsreaktionen in allerdings geringeren Mengen gefunden hat [9] [10] [11].



Diese Ergebnisse zeigen deutlich die Empfindlichkeit der Triester bei der Anwendung klassischer Methoden. Während Khorana bei der Polykondensation von pT<sub>d</sub> noch 41% OD<sub>267</sub>-Einheiten des nucleotidischen Materials als Polynucleotide, die grösser als das Tetranucleotid waren, isolieren konnte, erhielten wir lediglich noch sicher nachweisbar das Pentanucleotid in 0,8% OD<sub>265</sub>-Einheiten-Ausbeute. Der Grund hierfür kann nicht in der Reaktionsträigkeit der Diester liegen, da nur noch 17% des Ausgangsmaterials zurückgewonnen werden konnten und in späteren Versuchen eine 90proz. Umsetzung erreicht wurde. Ausserdem beweisen die Arbeiten von Letsinger et al., dass diese Reaktionen bemerkenswert sauber und quantitativ verlaufen können. Die schlechten Ausbeuten lassen sich durch die Bildung des Pyridinium-nucleotids erklären. Khorana fand bei einer genaueren Untersuchung der schrittweisen Synthese [15] [18], dass die Bildung der Pyridiniumderivate aus einer Reaktion des Pyridins mit dem C(5') eines Nucleosidphosphorsäure-triesters, der als Zwischenprodukt auch

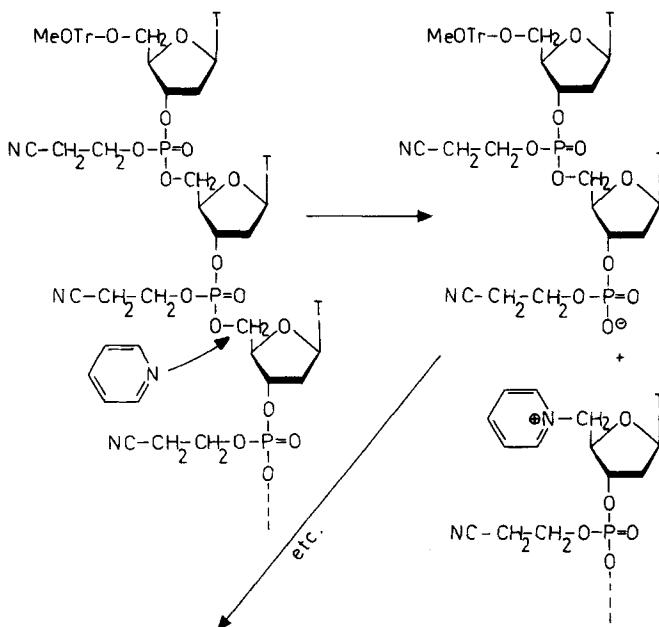
<sup>3)</sup> Die Anzahl der «Optical Density»-Einheiten (OD.) ist das Produkt aus dem totalen Volumen der Lösung in ml und ihrer optischen Dichte, gemessen in einer 1-cm-Zelle bei der angegebenen Wellenlänge.

bei Diesterreaktionen entstehen kann, resultiert. Eine analoge Reaktionsfolge lässt sich für die Produkte formulieren, die bei der Triester-Polykondensation entstehen (vgl. Schema 2).

Es ist daraus ersichtlich, dass bei der Spaltung T<sub>d</sub>p und Pyridinium-nucleotid in einem Verhältnis entstehen, das durch die Kettenlänge vorgegeben ist. Diese Erklärung wird durch die relativ grosse isolierte Menge an Mononucleotid aus dem Reaktionsgemisch gestützt.

Die Möglichkeiten, diese unerwünschte Reaktion auszuschalten, sind nicht sehr vielfältig. Die Einführung einer Phosphorsäure-Schutzgruppe mit grösserer Raumfüllung erschien nicht angeraten, da dies sicher auf eine weitere Desaktivierung des Diesters hinausliefe. Der Ersatz des Pyridins durch ein anderes Lösungsmittel versprach den grössten Erfolg. Zur Pufferung der entstehenden Sulfonsäuren müsste nur noch eine relativ geringe Menge Pyridin zugesetzt werden. Es kommen aber nur sehr wenige Lösungsmittel in Frage, da sie neutral sein müssen, keine nucleophilen Eigenschaften besitzen dürfen und alle an der Reaktion beteiligten und entstehenden Verbindungen lösen sollten. Anhand der Testreaktion: (MeOTr)T<sub>d</sub>p(CNEt) + T<sub>d</sub>(Ac) + TPS (1:2:2,5 Mol) → (MeOTr)T<sub>d</sub>p(CNEt)T<sub>d</sub>(Ac), die ein vollständig geschütztes Dinucleotid ergab, wurde zunächst Dimethylformamid (DMF) unter Zusatz von variierenden Äquivalenten Pyridin untersucht (vgl. Tab. 3), da Kondensationen zu

Schema 2. Kettenbruchreaktion durch Pyridin



Diestern in diesem System möglich sind [13]. Später wurde auch Pyridinium-Dowex 50 zugesetzt, ohne dass aber eine Reaktion beobachtet werden konnte. Es erwies sich als unmöglich, in Anwesenheit von DMF und TPS die Bildung des Dinucleotids zu erreichen. Eine weitere Möglichkeit war die Anwendung von Pyridinderivaten, bei

denen der Stickstoff durch  $\alpha$ -ständige Methylgruppen sterisch gehindert ist. Mit *sym.*-Collidin konnte ein Umsatz erzielt werden.

Tabelle 3. Ausbeuten in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	Ausbeute in %
Pyridin	76
DMF + 2 Äqu. Pyridin	0
DMF mit 30% Pyridin	0
DMF mit 50% Pyridin	0
DMF + 2 Äqu. Pyridin + Pyridinium-Dowex 50	0
DMF mit 50% Pyridin + Pyridinium-Dowex 50	0
<i>sym.</i> -Collidin	50

Die Gesamtausbeute war schlechter als in Pyridin. Dennoch wurde auch die Bildung höherer Polymere beobachtet, weshalb auf eine Veränderung der Reaktionszeiten verzichtet wurde. Das einzige Problem stellten somit die Nebenprodukte dar, die aus Reaktionen des Collidins resultieren. Auf Grund der Aktivität der Methylgruppen [19] kann es zu einer grossen Zahl von Nebenreaktionen kommen. Dies hatte bei den Polykondensationen zur Folge, dass alle Fraktionen recht stark durch nicht-nucleotidische Nebenprodukte verunreinigt waren, die wie die Nucleotide in Wasser löslich und in organischen unpolaren Lösungsmitteln unlöslich waren. Sie liessen sich auch durch wiederholte Chromatographie an DEAE-Cellulose nur sehr schlecht entfernen. Die Löslichkeit der Reaktanden war in *sym.*-Collidin etwas schlechter als in Pyridin. Um eine homogene Lösung zu erhalten, musste in etwas verdünnter Lösung gearbeitet werden (etwa 17proz. in Bezug auf des Nucleotid). Die Analyse der ein-

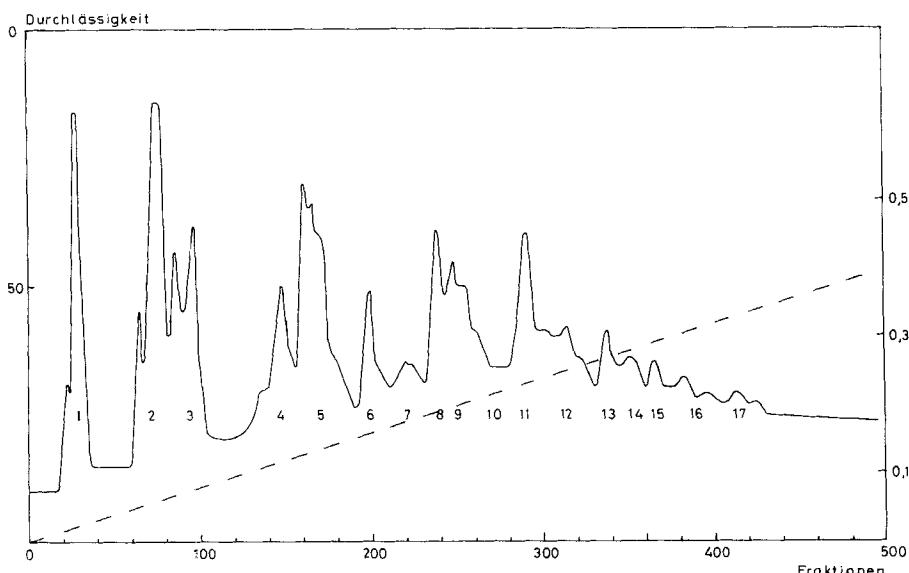


Fig. 4. Auftrennung des Polykondensationsgemisches in *sym.*-Collidin

(--- = Molarität  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )

zernen Spitzen nach der Auftrennung ergab, dass zwar grössere Mengen Di- und Tri-nucleotid entstanden waren, eine weitere Reaktion aber praktisch unterblieb. Ausserdem liess sich eine ausserordentlich hohe Anzahl von Nebenprodukten feststellen.

Versuche bei gleich hohen Konzentrationen wie in Pyridin (etwa 25proz.) lieferten bessere Ergebnisse (vgl. Fig. 4). Nucleotide bis zum Pentanucleotid liessen sich in vernünftigen Mengen nachweisen (vgl. Tab. 4).

Tabelle 4. *Nucleotidausbeuten bei der Polykondensation in sym.-Collidin*

Spitze	Substanz	Ausbeute in % OD <sub>265</sub> -Einheiten <sup>3)</sup>
3	cycl. T <sub>dP</sub>	5,2
5	T <sub>dP</sub>	9,4
6	cycl. (T <sub>dP</sub> ) <sub>2</sub>	2,3
8	(T <sub>dP</sub> ) <sub>2</sub>	4,5
11	(T <sub>dP</sub> ) <sub>3</sub>	4,6
13	(T <sub>dP</sub> ) <sub>4</sub>	2,7
15	(T <sub>dP</sub> ) <sub>5</sub>	1,7

Die Identifizierung der linearen Nucleotide wurde wie oben beschrieben vorgenommen und die cyclischen Nucleotide wie folgt charakterisiert:

1. Das 3'-5'-cycl. Mononucleotid zeigte nach Elektrophorese bei pH 3,5 den gleichen Rf-Wert wie T<sub>dP</sub> und T<sub>dP</sub>(CNEt); bei pH 7,5 lief es langsamer als T<sub>dP</sub>, aber wie T<sub>dP</sub>(CNEt). Die Verbindung war stabil gegen alkalische Phosphatase, wurde aber von Schlangengift-Phosphodiesterase langsam zersetzt zu T<sub>dP</sub> und pT<sub>d</sub>. Hydrolyse mit 0,1N HCl lieferte Thymin. Mit 1N NaOH entstand pT<sub>d</sub>.

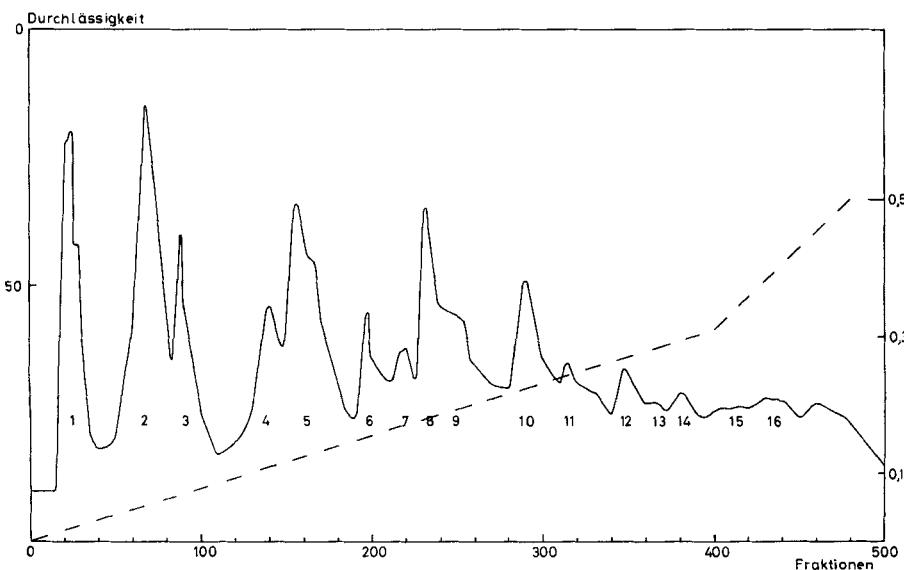


Fig. 5. *Auftrennung des Polykondensationsgemisches in sym. Collidin nach Umsatz mit Acetanhydrid in Pyridin (---- = Molarität NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)*

2. Das cycl. Dinucleotid hatte nach Elektrophorese bei pH 3,5 den gleichen Rf-Wert wie  $(T_{dP})_2$ , lief aber schneller als  $T_{dP}$ ; bei pH 7,5 zeigte es den Rf-Wert 0,77 relativ zu  $(T_{dP})_2$  und lief langsamer als  $T_{dP}$ . Die Verbindung war stabil gegen alkalische Phosphatase, wurde aber von Schlangengift-Phosphodiesterase langsam zu  $pT_d$  zersetzt. Es entstand etwas Thymidin als Folge einer schwachen Phosphatasewirkung des Enzyms. Hydrolyse mit 1N HCl lieferte in langsamer Reaktion Thymin.

Diese Eigenschaften stimmen mit den Angaben der Literatur überein [10].

Die Nachbehandlung des obigen Polykondensationsgemisches mit Essigsäure-anhydrid in Pyridin (nach Abspaltung der Schutzgruppen) zur Zerstörung eventueller Pyrophosphate [15] bewirkte eine deutliche Veränderung in der Zusammensetzung (vgl. Fig. 5). Das Ergebnis der Identifizierung ist in Tab. 5 dargestellt.

Tabelle 5. Nucleotidausbeuten der Polykondensation in sym.-Collidin nach der Pyrophosphatspaltung

Spitze	Substanz	Ausbeute in % $OD_{265}$ -Einheiten <sup>3)</sup>
3	cycl. $T_{dP}$	5,2
5	$T_{dP}$	11,5
6	cycl. $(T_{dP})_2$	2,4
8	$(T_{dP})_2$	8,2
10	$(T_{dP})_3$	5,6
12	$(T_{dP})_4$	2,9
15	$(T_{dP})_5$	1,6

In den Elutionsdiagrammen lässt sich deutlich das Verschwinden einiger Spitzen feststellen. Die Menge an Dinucleotid erhöht sich fast um das Doppelte derjenigen in Pyridinlösung, während die Nachbehandlung auf die cyclischen Nucleotide keinen Einfluss ausübte. In Collidinlösung ist die Bildung von Pyrophosphaten wesentlich stärker als in Pyridinlösung. Versuche, ein dem Pyridiniumnucleotid 3 entsprechendes Collidiniumnucleotid zu finden, verliefen erfolglos.

**3. Diskussion der Ergebnisse.** – Eine vergleichende Betrachtung der Oligonucleotid-Synthesen durch Polykondensation zeigt die deutliche Unterlegenheit der Triestermethode (vgl. Tab. 6).

Tabelle 6. Ausbeutenvergleich der verschiedenen Polykondensationen

Lösungsmittel (ml pro mMol Nucleotid)	$T_{dP}$	cycl. $(T_{dP})_2$	$(T_{dP})_2$	$(T_{dP})_3$	$(T_{dP})_4$	$(T_{dP})_5$
	Ausbeute in % $OD_{265}$ -Einheiten <sup>3)</sup>					
Pyridin (1, 2)	17,0	4,4	7,6	3,0	1,6	0,8
sym.-Collidin (2,5)	10,8	3,4	6,3	6,2	< 1	
sym.-Collidin (1,5)	9,4	2,3	4,5	4,6	2,7	1,7
sym.-Collidin (1,5), Nachbehandlung mit Essigsäureanhydrid	11,5	2,4	8,2	5,6	2,9	1,6
Diestersynthese [11]	6,5	10,2	5,8	9,2	8,9	7,8

Die Ausbeuten an längeren linearen Oligonucleotiden sind in jedem Fall wesentlich geringer. Die Triestersynthese liefert hauptsächlich Di- und Trinucleotid und eine

sehr grosse Menge von Zersetzungprodukten. Die Bildung von cyclischen Nucleotiden wird allerdings bei der Triestersynthese stark unterdrückt. Bei der Diestersynthese stellt das cyclische Dinucleotid das Hauptprodukt dar. Im *sym.*-Collidin verläuft die Reaktion zwar etwas günstiger als in Pyridin, indem die Entstehung von cycl. Nucleotiden geringer wird; die Ausbeuten an linearen Oligonucleotiden steigen. Dennoch ist die Empfindlichkeit der Triester zu gross, wie die grosse Anzahl von Neben- und Zersetzungprodukten zeigt. Die Ergebnisse unserer Studien machen deutlich, dass eine ergiebige Synthese von Oligonucleotiden durch Polykondensation eine grundsätzlich neue Versuchsanordnung erfordert.

Wir danken dem «Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung» (Projekt Nr. 2.48.68) für die finanzielle Unterstützung dieser Untersuchung.

### Experimenteller Teil

**1. Allgemeines.** – Spektren und Diagramme wurden mit folgenden Geräten aufgenommen: UV.-Elutionsdiagramme bei 254 nm mit dem «Uvicord» Typ LKB 4701 A, UV.-Spektren mit einem Beckman-UV.-Spektrophotometer, Modell DK2, IR.-Spektren mit einem Perkin-Elmer IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125, 60-MHz-NMR.-Spektren mit einem Varian-A-60-Spektrometer. Diese Spektren wurden im Spektrallaboratorium des Instituts (K. Aegerter) gemessen. Die 100-MHz-NMR.-Spektren wurden mit einem Varian-HA-100 D-Spektrometer im Institut für physikalische Chemie (E. Jutzi) gemessen.

Proben zur Elementaranalyse wurden bei Zimmertemperatur und 0,02 Torr 14 Std. getrocknet. Die Elementaranalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Labor des Instituts (E. Thommen). Die Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert.

Zur Chromatographie kamen folgende Materialien zur Anwendung: Zur Säulenchromatographie Kieselgel der Firma E. Merck AG, Darmstadt (Korngrösse 0,05–0,20 mm). Zur Cellulose-Ionen austauscherchromatographie Cellulose von Serva, Entwicklungslabor Heidelberg, Type: DEAE-SS. Bei der analytischen Papierchromatographie wurde Whatman N° 1, bei der präparativen Papierchromatographie Whatman N° 3 verwendet. Die Dünnschichtchromatographie (DC.) erfolgte auf Fertigplatten der Firma E. Merck AG, Kieselgel F<sub>254</sub>, Schichtdicke 0,25 mm.

Die Fliessmittelsysteme waren: A: Methylchlorid/Methanol 9:1, B: 2-Propanol/0,1M wässriger Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 9:1, C: Aceton mit 15% Methanol und 4% wässriger Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (0,1M), D: 2-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser 7:1:2, E: n-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser 55:10:35, F: Äthanol/1M wässrige Ammoniumacetat-Lösung 5:2.

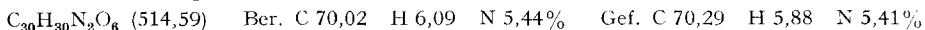
Die Papierelektrophorese wurde in einer wassergekühlten Apparatur nach Brenner-Lüscher [20] durchgeführt. Die Puffersysteme waren: für pH 3,5:0,05M Acetat-Puffer; für pH 7,5:0,05M Phosphat-Puffer. Das Spannungsgefälle betrug 18–20 V/cm. Papier: Whatman N° 1.

Das verwendete Pyridin (Fluka AG, Buchs SG) wurde über Molekularsieb 4 Å (Union Carbide) mindestens 4 Wochen aufbewahrt. Lösungen wurden im Rotationsverdampfer bei 37° und 12–15 Torr eingedampft. Die Trocknung der Substanzen zur Synthese erfolgte durch mehrfache Destillation mit abs. Pyridin und Abdampfen zur Trockne im Hochvakuum. Ammoniumhydrogencarbonat wurde durch mehrfaches Eindampfen mit wässrigem Äthanol entfernt.

Wo nicht anders erwähnt, wurden die Ammoniumsalze der Nucleotide eingesetzt.

**2. Beschreibung der Versuche.** – 2.1. 5'-O-p-Monomethoxytrityl-thymidin [(MeOTr)T<sub>d</sub>]. – Nach dem bekannten Verfahren [16] wurden 20 mMol Rohprodukt hergestellt. Das resultierende zähe Öl wurde in einem Gemisch aus 200 ml Wasser und 200 ml Chloroform aufgenommen. Die Chloroform-Phase wurde mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und unter Zusatz von 1 ml Pyridin eingedampft. Der Rückstand musste mehrere Male mit Benzol eingeengt werden, bis der Geruch nach Pyridin verschwand. Der zähe Schaum löste sich in 150 ml Benzol nach Zugabe von 3 ml Methanol. Die Fällung erfolgte mit 170 ml Cyclohexan, das während 20 Std. aus einer feinen Kapillare unter starkem Rühren zugetropft wurde. Dabei kristallisierte das Produkt in feinen Nadeln und Nadelbüscheln vom Smp. 115–118°. Ausbeute 9,4 g (94%). Rf-Wert in Sy-

stem A: 0,33. Sichtbar im UV., Braunsfärbung mit Jod, Gelbfärbung mit 10%  $\text{HClO}_4$  in Wasser. UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 195,5 (4,96); 231 (4,138) und 266 (4,008) nm (log  $\epsilon$ ). IR.-Spektrum (Methylenchlorid): Banden bei  $3590\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{OH}$ , Zucker),  $3400\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{NH}$ ),  $1700\text{ cm}^{-1}$  (sek. Amid),  $1680\text{ cm}^{-1}$  (tert. Amid), 1600 und  $1500\text{ cm}^{-1}$  (Aromat). 60-MHz-NMR.-Spektrum in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ : s bei 1,49 ppm, 3 H an  $\text{C}(5)-\text{CH}_3$ ; t bei 2,22 ppm, 2 H an  $\text{C}(2')$ ,  $J = 5\text{ Hz}$ ; m bei 3,28 ppm, 2 H an  $\text{C}(5')$ ; s bei 3,72 ppm, 3 H an  $\text{Ar}-\text{O}-\text{CH}_3$ ; m bei 3,91 ppm, 1 H an  $\text{C}(4')$ ; m bei 4,33 ppm, 1 H an  $\text{C}(3')$ ; d bei 5,29 ppm, entfällt bei Austausch mit  $\text{D}_2\text{O}$ , OH an  $\text{C}(3')$ ; t bei 6,20 ppm, 1 H an  $\text{C}(1')$ ,  $J = 6\text{ Hz}$ ; m bei 6,75–7,60 ppm, 15 H an C(6) und Aromat; s bei 11,30 ppm, entfällt bei Austausch mit  $\text{D}_2\text{O}$ , br, 1 H an Thymidin-N.



2.2. *5'-O-p-Monomethoxytrityl-thymidin-3'-O-β-cyanoäthylphosphat* [ $(\text{MeOTr})\text{TdP}(\text{CNEt})$ ]. – 850 mg Ba-Salz der β-Cyanoäthylphosphorsäure wurden in 10 ml Wasser unter Zugabe von 6 g Dowex 50 H<sup>+</sup> gelöst und durch eine kleine Säule (ca. 2 g) Dowex 50 H<sup>+</sup> gegeben. Nach Spülen mit 10 ml Wasser wurde das Eluat mit 5 ml Pyridin eingeengt. Zum Trocknen des farblosen Öls wurde noch 3 mal mit 10 ml abs. Pyridin eingedampft und in 3 ml Pyridin gelöst aufbewahrt (+2°). 1,08 g (2,1 mMol) ( $\text{MeOTr})\text{Td}$  wurden getrocknet und der entstandene feste, farblose Schaum mit der obigen Lösung von Pyridinium-β-cyanoäthylphosphat und einer Lösung von 1,5 g (4 mMol) TPS in 3 ml Pyridin versetzt. Das Gemisch färbte sich dabei schwach gelb. Nach 14 Std. wurden 12 ml Wasser zugegeben, wobei anfangs eine milchige Trübung entstand. Nach weiteren 4 Std. wurde 3 mal mit je 20 ml Chloroform extrahiert, die Chloroform-Phase mit Wasser gewaschen und mit etwas Pyridin eingedampft. Das Rohprodukt wurde auf eine 200-g-Kieselgelsäule gegeben, die mit Aceton/Methanol/0,1M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 94,5:4:1,5 voräquilibriert war. Eluiert wurde mit steigenden Anteilen Methanol und  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung in Wasser. Die Elution erfolgte stufenweise mit folgenden Mischungsverhältnissen: 800 ml 94,5:4:1,5; 800 ml 93:5:2; 1200 ml 90:7,5:2,5; 1400 ml 87:10:3. Bei 10% Methanol erschien das Produkt. Die Fraktionen wurden vereinigt und durch Eindampfen vom  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  befreit. Der gläserne Rückstand wurde in möglichst wenig Chloroform gelöst und durch vorsichtiges Tropfen in Äther als weisses Pulver gefällt. Ausbeute: 1,52 g = 76%. Das Produkt war in den Systemen B (Rf 0,30) und C (Rf 0,26) einheitlich. Es war sichtbar im UV., färbte sich mit Jod langsam braun und ergab einen gelben Fleck mit 10proz.  $\text{HClO}_4$ .

*Charakterisierung des  $\text{NH}_4$ -Salzes.* UV.-Spektrum in Äthanol: Maxima bei 196 (4,97); 230 (4,25); 267 (4,015) nm (log  $\epsilon$ ). IR.-Spektrum (fest in KBr): Banden bei  $2260\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ),  $1680\text{ cm}^{-1}$  (Amid), 1600 und  $1500\text{ cm}^{-1}$  (Aromat),  $1250\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{P}=\text{O}$ ),  $1080\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{P}-\text{O}-\text{C}$ ). 60-MHz-NMR.-Spektrum in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  (vgl. Fig. 1): s bei 1,41 ppm, 3 H,  $\text{CH}_3$  an  $\text{C}(5)$ ; m bei 2,45 ppm, 2 H an  $\text{C}(2')$ ; t bei 2,72 ppm, 2 H an  $\text{CH}_2-\text{CN}$ ,  $J = 6\text{ Hz}$ ; m bei 3,26 ppm, 2 H an  $\text{C}(5')$ , vom Wasser verdeckt; s bei 3,78 ppm, 3 H an  $\text{CH}_3-\text{O}-\text{Ar}$ ; m bei 4,15 ppm, 1 H an  $\text{C}(4')$ ; m bei 4,73 ppm, 1 H an  $\text{C}(3')$ ; br t bei 6,21 ppm, 1 H an  $\text{C}(1')$ ; m bei 6,80 bis 7,55 ppm, 15 H an Aromat und C(6); s bei 10,9 ppm, entfällt bei Austausch mit  $\text{D}_2\text{O}$ , 1 H an Thymidin-N.

2.3. *Thymidin-3'-β-cyanoäthylphosphat* [ $\text{TdP}(\text{CNEt})$ ]. – Die Abspaltung und Isolierung wurde analog [16] durchgeführt. Das Produkt entstand in 98proz. Ausbeute als weisses Pulver. Wegen eines Startfleckes im DC. wurde eine Filtration über 10 g Kieselgel, welches 3 mal mit heißem Methanol gewaschen worden war, ausgeführt. Das Pulver wurde in Methylenchlorid/Methanol 4:1 gelöst, durch die Säule filtriert und nach Einengen aus wässrigem Äthanol mit einem Überschuss Aceton gefällt. Reines  $\text{TdP}(\text{CNEt})$ ,  $\frac{1}{2}\text{Ba, H}_2\text{O}$  konnte in einer Ausbeute von 92% erhalten werden; Smp. 224–228° (Zers.). In der Schmelze entstanden Nadeln, die bei 250° schmolzen. Dann war der Schmelzfluss klar. Dünnschichtchromatogramme in den Systemen B und D ergaben 1 Fleck, sichtbar im UV. Schwarzfärbung erfolgte nach Besprühen mit 10%  $\text{HClO}_4$  in Wasser und Erhitzen auf 150–200°. Gelb- bis Blaufärbung entstand nach Umsatz mit Chlor und o-Tolidin. Nach Abspalten der Phosphorsäure-Schutzgruppe mit konz. Ammoniak über Nacht war das Produkt widerstandsfähig gegen die 5'-Nucleotidase aus *Crotalus adamanteus* [1]. Die Inkubation von 0,5 mg mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm ergab Thymidin als einziges Produkt. Je 2 OD<sub>267</sub>-Einheiten wurden in der Papierelektrophorese eingesetzt. Die zu  $\text{TdP}$  relativen Rf-Werte waren: pH 3,5: 1; pH 7,5: 0,61. UV.-Spektrum in Wasser: Maxima bei 205 (3,99) und 266 (3,98) nm (log  $\epsilon$ ). IR.-Spektrum (fest in KBr): u. a. Banden bei  $2250\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ),  $1680\text{ cm}^{-1}$  (Amid),  $1230\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{P}=\text{O}$ ),  $1050\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{P}-\text{O}-\text{C}$ ). 100-MHz-NMR.-Spektrum in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ , als  $\text{NH}_4$ -Salz (vgl. Fig. 2): s bei

7,72 ppm, 1 H an C(6);  $t$  bei 6,15 ppm, 1 H an C(1'),  $J = 6$  Hz;  $m$  bei 4,70 ppm, 1 H an C(3');  $m$  bei 4,0 ppm, 1 H an C(4');  $d \times t$  mit Zentrum bei 3,86 ppm, 2 H an P—O—CH<sub>2</sub>—;  $m$  bei 3,63 ppm, 2 H an C(5');  $t$  bei 2,74 ppm, 2 H an —CH<sub>2</sub>—CN;  $m$  von 2,32—2,0 ppm, 2 H an C(2');  $s$  bei 1,80 ppm, 3 H an C(5)—CH<sub>3</sub>; sehr breites Signal von 9,1—6,8 ppm, 4 H von NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; breites Signal von 5,7—5,0 ppm, 1 H an C(5')—OH; beide Signale entfallen nach Zugabe von D<sub>2</sub>O.

(C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>P)<sub>1/2</sub> Ba, H<sub>2</sub>O (460,89) Ber. C 33,22 H 4,36% Gef. C 33,22 H 4,10%

*Isolierung als NH<sub>4</sub>-Salz.* Auf die übliche Weise wurde mit Hilfe von Dowex 50H<sup>+</sup> Kationenaustauscher aus dem Ba-Salz die Säure freigesetzt und unter Kühlung und Rühren das Eluat mit verd. Ammoniak vorsichtig neutralisiert. Nach dem Eindampfen bildete das Salz einen harten, farblosen Lack, der sich weder fällen noch kristallisierte ließ. Durch Lyophilisieren entstand ein trockenes weisses Pulver.

**2.4. Oligonucleotid-Derivate.** – Als Vergleichsnucleotide wurden folgende Substanzen nach der schrittweisen Methode von Khorana *et al.* [18] hergestellt: d[(MeOTr)T—T], d[(MeOTr)T—T—T], d[(MeOTr)T—T—T—T], d[(MeOTr)T—T—T—T—T]. Die  $\epsilon$ -Werte stimmten mit den Literaturwerten [18] überein. Alle Produkte waren Dünnschicht- und Papier-chromatographisch einheitlich. Zur Bestimmung der Kettenlänge und zur Verwendung als Vergleichssubstanz wurde die  $p$ -Methoxytritylgruppe von kleinen Proben abgespalten (vgl. unter 3.1). Die Kettenlängenbestimmung erfolgte mit Schlangengift-Phosphodiesterase [21] wie unter 3.2 beschrieben. Sie ergab in allen Fällen das richtige Ergebnis.

**2.5. Die Phosphorylierungen.** – **2.5.1. Stammlösung.** Nach 2.2 wurde eine Standardlösung des Pyridiniumsalzes der  $\beta$ -Cyanoäthylphosphorsäure mit der Konzentration 0,5 mMol/ml Pyridin hergestellt. Die farblose, klare Lösung wurde bei 2° aufbewahrt.

**2.5.2. Phosphorylierung des geschützten Dinucleotids.** – 105 mg (0,11 mMol) d[(MeOTr)T—T] wurden mit 0,44 ml (0,22 mMol) Stammlösung nach dem bekannten Verfahren getrocknet. Anschliessend wurden unter strengstem Feuchtigkeitsausschluss nacheinander 240 mg (0,8 mMol) TPS und 3 ml abs. Pyridin zugegeben. Nach 20 Std. Reaktion bei 2° wurde mit 3 ml Wasser unter Eiskühlung 5 Std. hydrolysiert. Durch Zugabe von 20 ml konz. Ammoniak entstand eine klare, gelbe Lösung, die nach 18 Std. unter den üblichen Vorsichtsmassnahmen eingedampft wurde. Das gesamte Gemisch konnte nach Lösen in Wasser auf eine DEAE-Cellulosesäule aufgetragen und mit Wasser eingewaschen werden. (Die Lösungen schäumen beim Eindampfen sehr stark. Durch Zusatz von Äthanol kann dies jedoch weitgehend verhindert werden.) Elutionsgradient:

Mischgefäß:	21 0,03 M Ammoniumhydrogencarbonat in 10proz. Äthanol;
Vorratsgefäß:	21 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat in 20proz. Äthanol;
anschliessend Mischgefäß:	21 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat in 20proz. Äthanol;
Vorratsgefäß:	21 0,4 M Ammoniumhydrogencarbonat in 20proz. Äthanol.

Fliessgeschwindigkeit: 0,7 ml/Min. Im Elutionsdiagramm erschienen 2 Hauptspitzen. Die entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt und eingeengt. Die Rückstände wurden aus Wasser lyophilisiert. Nach dünnschichtchromatographischem Vergleich in System D befand sich in der vorderen Spitze das Ausgangsmaterial (20%), in der hinteren das Produkt d[(MeOTr)T—Tp] (36%). Die Phosphorylierung wurde wie folgt bewiesen: Bei Inkubation mit alkalischer Phosphatase nach Enttritylierung trat eine vollständige Spaltung zum Ausgangsmaterial ein. Bei Inkubation mit Milz-Phosphodiesterase entstand T<sub>4p</sub> als einziges Produkt. Die Vollständigkeit der Spaltung beweist die Richtigkeit der Phosphodiester-Bindungen [22].

**2.5.3. Phosphorylierung des geschützten Trinucleotids.** 40 mg (0,034 mMol) d[(MeOTr)T—T—T] und 0,2 ml (0,1 mMol) Stammlösung wurden auf die übliche Weise zusammen getrocknet und mit 105 mg (0,34 mMol) TPS in 1,2 ml abs. Pyridin versetzt. Nach 6 Std. bei 23° erfolgte die Zugabe von 1,2 ml Wasser und nach weiteren 6 Std. wurden 20 ml konz. Ammoniak zugegeben. Nach 18 Std. wurde unter den bekannten Vorsichtsmassnahmen eingeengt, in Wasser gelöst und an einer DEAE-Cellulosesäule (20 × 2,5 cm) nach dem Standardverfahren chromatographiert. Elutionsgradient:

Mischgefäß:	21 0,03 M Ammoniumhydrogencarbonat in 10proz. Äthanol;
Vorratsgefäß:	21 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat in 20proz. Äthanol;
anschliessend Mischgefäß:	21 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat in 20proz. Äthanol;
Vorratsgefäß:	21 0,4 M Ammoniumhydrogencarbonat in 20proz. Äthanol.

Durchflussgeschwindigkeit: 0,7 ml/Min; Fraktionsgrösse: 12 ml. Das Elutionsdiagramm zeigte 2 Hauptspitzen. In der hinteren befand sich d[(MeOTr)T–T–Tp] in 47% Ausbeute. Das Nucleotid war im Dünnschichtchromatogramm einheitlich in den Systemen D und E mit Rf-Werten 0,12 und 0,52. Der Beweis der Phosphorylierung gelang wie beim Dinucleotid.

**2.5.4. Phosphorylierung des geschützten Tetranucleotids.** 50 mg (0,034 mMol) d[(MeOTr)T–T–T–T] und 0,27 ml (0,13 mMol) Stammlösung wurden getrocknet und mit 154 mg (0,51 mMol) TPS in 1,3 ml abs. Pyridin versetzt. Nach 6 Std. bei 23° fand Hydrolyse mit 1,3 ml Wasser statt. Nach weiteren 12 Std. wurden 40 ml konz. Ammoniak zugegeben und die Lösung 48 Std. bei 4° stehengelassen. Die weitere Aufarbeitung und das Beladen der Säule erfolgten nach den Standardverfahren. Elutionsgradient:

Mischgefäß:	21 0,01 M Ammoniumhydrogencarbonat in 10proz. Äthanol;
Vorratsgefäß:	21 0,3 M Ammoniumhydrogencarbonat in 20proz. Äthanol;
anschliessend Mischgefäß:	11 0,3 M Ammoniumhydrogencarbonat in 20proz. Äthanol;
Vorratsgefäß:	11 0,45 M Ammoniumhydrogencarbonat in 20proz. Äthanol.

Es traten 3 Hauptspitzen auf: in der hinteren d[(MeOTr)T–T–T–Tp] in 15% Ausbeute, in der mittleren d[(MeOTr)T–T–T–T–(CNET)] in 30% Ausbeute. Dieses Produkt wurde durch Erhitzen in konz. NH<sub>3</sub> auf 60° für 30 Min. in d[(MeOTr)T–T–T–Tp] übergeführt. Isolierung und Beweis der Phosphorylierung erfolgten wie beim Dinucleotid.

**2.5.5. Phosphorylierung des Pentanucleotids.** 40 mg (0,019 mMol) d[(MeOTr)T–T–T–T–T] wurden mit 0,19 ml (0,094 mMol) Stammlösung versetzt und nach üblichem Trocknen mit 84 mg (0,28 mMol) TPS in 0,7 ml Pyridin zur Reaktion gebracht. Nach 7 Std. bei 23° wurde mit 0,7 ml Wasser unter Eiskühlung hydrolysiert und 18 Std. stehengelassen. Nach 6 Std. Reaktion mit 10 ml konz. Ammoniak wurde 10 Min. auf 60° erhitzt, wie üblich eingedampft und auf eine DEAE-Cellulosesäule (20 × 2,5 cm) aufgetragen. Elutionsgradient:

Mischgefäß:	31 0,01 M Ammoniumhydrogencarbonat in 10proz. Äthanol;
Vorratsgefäß:	31 0,3 M Ammoniumhydrogencarbonat in 20proz. Äthanol.

Durchflussgeschwindigkeit: 0,7 ml/Min. Die Isolierung und Identifizierung der Substanzen in den 2 Hauptspitzen erfolgte wie beim Dinucleotid. d[(MeOTr)T–T–T–Tp] entstand in 40proz. Ausbeute.

**2.6. Die Polykondensation von Thymidin-3'-β-cyanodithylphosphat.** 370 mg (0,5 mMol) (MeOTr)Tp(CNET) und 790 mg (1,5 mMol) Tp(CNET) wurden 4mal mit 5 ml abs. Pyridin eingedampft und im Hochvakuum getrocknet, bis ein harter, trockener Schaum entstand (je etwa 20 Min.). In einem kleinen Kochglas wurde eine Lösung von 1,3 g (4 mMol) TPS in 2,1 ml Pyridin vorbereitet. Die Zugabe dieser Lösung zum Nucleotidgemisch erfolgte mit einer Spritze, die durch den Plastikdeckel gestossen wurde. Nach 4 Tagen war sämtliches TPS gelöst, nach 8 Tagen wurden nochmals 200 mg TPS zugegeben, die sich innerhalb weiterer 3 Tage lösten. Nach insgesamt 12 Tagen (bei 23°) wurden unter Eiskühlung vorsichtig 30 ml Wasser zugesetzt. Das Gemisch war anfangs milchig trüb, wurde dann aber klar. Nach 24 Std. wurde mit 100 ml 80proz. Essigsäure 10 Min. auf 100° erhitzt und dann so lange mit Wasser eingeengt, bis kein Geruch nach Essigsäure mehr wahrnehmbar war. Der trockene Rückstand wurde in 50 ml konz. Ammoniak gelöst, über Nacht stehengelassen und dann 30 Min. auf 60° erwärmt. Es entstand eine trübe, orange-rote Lösung, die eingedampft wurde. Nachdem der Rückstand in 2 gleiche Teile geteilt worden war, wurde ein Teil nochmals mit konz. Ammoniak 30 Min. auf 60° erwärmt und anschliessend eingedampft. Zum trockenen Rückstand wurden 30 ml Wasser gegeben und soviel Äthanol, bis die gesamte Menge in Lösung gegangen war. Diese Lösung wurde auf eine DEAE-Cellulosesäule (61 × 4 cm) aufgetragen und mit 25proz. wässrigem Äthanol eingespült. Die nicht-anionischen Anteile wurden mit 1125proz. Äthanol aus der Säule ausgewaschen. Elutionsgradient:

Mischgefäß:	31 Wasser;
Vorratsgefäß:	31 0,25 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung in Wasser;
anschliessend Mischgefäß:	31 0,25 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung in Wasser;
Vorratsgefäß:	31 0,5 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung in Wasser.

Der pH-Wert der Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung blieb konstant zwischen 8,5 und 9,0. Durchflussgeschwindigkeit: 0,7 ml/Min. Alle 30 Min. wurden Fraktionen von 20–25 ml genommen. Folgende Fraktionen wurden gesammelt und auf die übliche Weise aufgearbeitet (vgl. Fig. 3.).

Faktionen	Spitzen Nr.	OD <sub>264</sub> -Einheiten	% OD <sub>264</sub> -Einheiten
59– 83	1	2900	38
95– 99	2	270	3,5
100–106	3	94	1,2
117–130	4	nicht nucleotidisch	
131–138	5	1300	17
139–146	6	550	7,2
147–159	7	355	4,6
162–172	8	340	4,4
174–185	9	194	2,5
195–214	10	560	7,6
223–231	11	94	1,2
232–243	12	104	1,3
259–270	13	230	3,0
271–276	14	120	1,5
277–289	15	134	1,7
295–303	16	125	1,6
304–317	17	83	1,1
319–328	18	43	0,56
330–340	19	64	0,8
350–364	20	42	0,56
365–371	21	24	0,31
395–406	22	18	0,18
433–446	23	10	0,10

Je 2 OD<sub>264</sub>-Einheiten sämtlicher Spitzen wurden auf Dünnschicht aufgetragen und in den Systemen D und E mit den synthetisch hergestellten Polynucleotiden T<sub>ap</sub> → (T<sub>ap</sub>)<sub>5</sub> verglichen: Nr. 1–8 in System D, Nr. 8–23 in System E. Alle Fraktionen waren zu etwa 5% verunreinigt. Die Rf-Werte der Produkte in den Spitzen mit Nummern 5, 10, 13, 16 und 19 bildeten eine homologe Reihe, die identisch war mit der synthetisch hergestellten Reihe von T<sub>ap</sub> → (T<sub>ap</sub>)<sub>5</sub>. Die Papierchromatographie der Spitzen im System F ergab das gleiche Ergebnis. Aufgetragen wurden je 5 OD<sub>264</sub>-Einheiten, die Laufzeit der höheren Polymeren betrug 2–4 Tage. Je 10 OD<sub>264</sub>-Einheiten der Spitzen 5, 10, 13, 16 und 19 wurden mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm auf die übliche Art inkubiert. In jedem Fall wurden die Nucleotide vollständig abgebaut zu einer auf Dünnschicht schneller laufenden Verbindung. Je 10 µl der Inkubationslösungen wurden auf Dünnschicht aufgetragen und direkt mit den synthetisch hergestellten Nucleotiden d(T–T), d(T–T–T), d(T–T–T–T) und d(T–T–T–T–T) in System D verglichen. Sie erwiesen sich als identisch. Spalte 5 ergab Thymidin als UV.-aktives Spaltprodukt.

Spalte 1 wurde auf Dünnschicht und Papier in 2 UV.-absorbierende Flecke geteilt. Relativ zu T<sub>ap</sub> lief ein Produkt schneller und eines langsamer. Etwa 160 OD<sub>265</sub>-Einheiten des Gemisches wurden als Band auf Papier Whatman N° 3 aufgetragen und in System F entwickelt. Es entstanden 2 scharf voneinander getrennte, UV.-absorbierende Zonen mit den Rf-Werten 0,08–0,30 und 0,32–0,55. Die Zonen wurden ausgeschnitten, zerkleinert und 24 Std. mit Wasser eluiert. Die Messung der optischen Dichten zeigte folgendes Verhältnis: obere Zone 28 OD<sub>265</sub>-Einheiten, untere Zone 114 OD<sub>265</sub>-Einheiten. – Charakterisierung der unteren Zone: UV.-Spektrum in Wasser: Hauptmaximum bei 261 nm; sehr starke Schulter bei 265 nm. Inkubation von 10 OD<sub>265</sub>-Einheiten mit alkalischer Phosphatase bewirkte eine vollständige Spaltung in ein Nucleosid, das wesentlich polarer war als Thymidin. UV.-Spektrum des Nucleosids in Wasser: Hauptmaximum bei 261 nm; sehr starke Schulter bei 265 nm. – Charakterisierung der oberen Zone: UV.-Spektrum in Wasser: Hauptmaximum bei 263 nm. Bei Inkubation von 10 OD<sub>265</sub>-Einheiten mit alkalischer Phosphatase trat keine Spaltung ein. Die Hydrolyse mit 0,1N HCl bei 100° bewirkte nach 15 Min. keine Veränderung. Nach 15 Min. Reaktion mit 1N NaOH bei 100° war im Dünnschichtchromatogramm kein UV.-absorbierendes Material mehr festzustellen. Nach Reaktion mit 1N HCl bei 23° trat nach

48 Std. ein UV.-aktives Produkt auf, das unpolarer als das Ausgangsmaterial war, aber polarer als Thymidin und Thymin.

**2.7. Lösungsmitteltestreaktionen.** - 72 mg (0,1 mMol) ( $\text{MeOTr}$ ) $T_d$ p(CNET) und 57 mg (0,2 mMol)  $T_d$ (Ac) wurden nach Letsinger et al. [4] mit TPS umgesetzt. Die Trennung des Reaktionsgemisches erfolgte an einer 10-g-Kieselgelsäule mit Essigsäure-äthylester, der 0-10% Methanol enthielt: Elution mit 100 ml Essigsäure-äthylester, dann mit 50 ml Essigester mit 8% Methanol und schliesslich mit 70 ml Essigester mit 10% Methanol. Mit 10% Methanol erschien das Dinucleotid. Die Lösung wurde eingeengt und das Rohprodukt an einer 20-cm-Dickschichtplatte ( $\text{SiO}_2$ ) getrennt. Fließmittel: Essigsäure-äthylester/Methanol 9:1. Die Ablösung gelang mit dem Fließmittel. Die Lösung wurde filtriert und eingedampft.

Bei Verwendung von 0,5 ml Pyridin als Lösungsmittel resultierten 59 mg ( $\text{MeOTr}$ ) $T_d$ p(CNET)  $T_d$ (Ac) als farbloser Lack (63%). Die gleiche Reaktion wurde auch in je 0,5 ml folgender Lösungsmittelsysteme durchgeführt, wobei allerdings das gewünschte Produkt nicht gebildet wurde: Dimethylformamid (DMF), DMF mit 2 Äquiv. (rel. zu TPS) Pyridin, DMF mit 30% Pyridin, DMF mit 50% Pyridin, DMF mit 2 Äquiv. Pyridin und 400 mg Pyridinium-Dowex 50, DMF mit 50% Pyridin und 400 mg Pyridinium-Dowex 50.

Analoge Reaktion in sym.-Collidin: Collidin wurde über Tosylchlorid im Vakuum destilliert und über Molekularsieb 4 Å aufbewahrt. Die Reaktion wurde wie oben durchgeführt. Aufarbeitung: Nach Hydrolyse mit 0,5 ml Wasser wurde Collidin durch 3maliges Ausröhren mit Äther entfernt. Beim Ausschütteln der wässrigen Lösung mit Methylenchlorid ging der Triester in die organische Phase und wurde wie oben durch Säulen- und Dickschichtchromatographie gereinigt. Ausbeute: 42 mg = 50%.

**2.8. Die Polykondensation in sym.-Collidin.** - 360 mg (0,5 mMol) ( $\text{MeOTr}$ ) $T_d$ p(CNET)-Pyridiniumsalz und 15 000 OD<sub>264</sub>-Einheiten (1,5 mMol) $T_d$ p(CNET)-Pyridiniumsalz wurden 5mal mit je 5 ml Pyridin im Hochvakuum zur Trockne eingedampft. Zum resultierenden trockenen Schaum wurden 1,2 g (4 mMol) TPS und 3 ml Collidin gegeben. Nach 24 Std. Schütteln entstand eine trübe, leicht gelbe Suspension, die weiter gut gerührt wurde. Nach einigen Tagen war die Suspension dunkelbraun gefärbt. Nach 14 Tagen wurde unter Eiskühlung mit 3 ml Wasser hydrolysiert und nach 6 Std. durch 3maliges Ausröhren mit Äther das Collidin entfernt. Anschliessend wurde die Lösung eingedampft und mit 100 ml 80proz. Essigsäure 10 Min. auf 70-80° erhitzt. Die Essigsäure wurde durch 3maliges Abdampfen mit Wasser entfernt, der Rückstand in konz.  $\text{NH}_3$  aufgenommen, über Nacht bei 23° stehengelassen, dann vom schwarzen Rückstand abfiltriert und unter Zusatz von etwas Äthanol (Schäumen!) vorsichtig eingedampft. Der trockene Rückstand wurde nacheinander mit Äther und Benzol extrahiert, dann in wenig Wasser und Äthanol gelöst und mit einem grossen Überschuss Aceton versetzt. Dabei fiel eine braune Substanz aus, von der nach 1 Std. Stehen bei 0° das Aceton abdekantiert werden konnte. Die Acetonlösung enthielt hauptsächlich Trisopropylbenzolsulfonsäure. In keinem Extrakt befand sich nucleotidisches Material. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und in 2 gleiche Teile geteilt. Ein Teil wurde direkt auf die DEAE-Cellulosesäule (4 × 65 cm, entspricht etwa 300 g trockener Cellulose) aufgetragen und mit einem Ammoniumhydrogencarbonat-Gradienten bei pH 7,5 (konstant gehalten durch Einleiten von  $\text{CO}_2$  in das Mischgefäß) getrennt (vgl. Fig. 4). Gradient:

Mischgefäß: 31 Wasser,

Vorratsgefäß: 310,187 M Ammoniumhydrogencarbonat;

anschliessend Mischgefäß: 310,187 M Ammoniumhydrogencarbonat;

Vorratsgefäß: 310,375 M Ammoniumhydrogencarbonat.

Durchflussgeschwindigkeit: 102 ml/Std. Die Fraktionen wurden alle 15 Min. gewechselt. Folgende Fraktionen wurden gesammelt und auf die übliche Weise aufgearbeitet:

Fraktionen	Spitzen Nr.	OD <sub>264</sub> -Einheiten	% OD <sub>264</sub> -Einheiten
18- 35	1	370	3,8
63- 81	2	1700	17,5
82-110	3	760	7,8
140-154	4	370	3,8
155-188	5	910	9,4

Fraktionen	Spitzen Nr.	OD <sub>264</sub> -Einheiten	% OD <sub>264</sub> -Einheiten
194–204	6	220	2,3
205–232	7	370	3,8
233–242	8	320	3,3
243–260	9	540	5,6
261–281	10	310	3,2
282–295	11	380	3,9
296–330	12	620	6,4
331–343	13	190	1,9
344–358	14	180	1,8
359–370	15	130	1,3
371–403	16	190	1,9
404–433	17	165	1,7

Die Identifizierung der Spitzen erfolgte wie bei 2.6 beschrieben durch vergleichende Chromatographie an Kieselgel in System D. Die Zuordnungen wurden durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase und Milz-Phosphodiesterase bestätigt (vgl. Tab. 4). Die Ausbeutangaben in dieser Tabelle stimmen nicht notwendigerweise mit den oben angegebenen überein: einzelne Nucleotide sind über mehrere Spitzen verteilt. Die Ausbeuten in Tab. 4 geben die Gesamtmenge an isoliertem Nucleotid an).

2.9. *Identifizierung von cycl. T<sub>d</sub>P.* – Untersucht wurde die Substanz in Spalte 3 von Fig. 4. Sie erscheint bei der Rechromatographic an DEAE-Cellulose bei einer Hydrogencarbonatkonzentration von 0,09 M. UV.-Spektrum:  $\lambda_{\text{max}} = 263 \text{ nm}$ . Zur Papierelektrophorese wurden je 2 OD<sub>263</sub>-Einheiten als 3–4 mm langes Band aufgetragen und bei pH 3,5 und 7,5 mit T<sub>d</sub>P und T<sub>d</sub>P(CNET) verglichen. 5 OD<sub>263</sub>-Einheiten wurden mit Schlangengift-Phosphodiesterase 17 Std. bei 37° inkubiert und die Spaltprodukte durch Chromatographie an Kieselgel in System D charakterisiert. Die Spaltung erfolgte zu ca. 70%. Durch Erhitzen von 5 OD<sub>263</sub>-Einheiten in 0,1N HCl 5 Min. bei 100° entstand nach dünnenschichtchromatographischer Untersuchung in System D Thymidin. 5 OD<sub>263</sub>-Einheiten wurden mit 1N NaOH 2 Std. auf 100° erhitzt und die Zersetzungssprodukte (vorwiegend pTd) durch Dünnenschichtchromatographie an Kieselgel (System D) identifiziert. Zersetzt wurden etwa 80% des Materials.

2.10. *Identifizierung von cycl. (T<sub>d</sub>P)<sub>2</sub>.* – Untersucht wurde die Substanz in Spalte 6 von Fig. 4. Die Verbindung erschien bei der Rechromatographic an DEAE-Cellulose bei einer Hydrogencarbonatkonzentration von 0,19 M. UV.-Spektrum wie Thymidin. Zur Papierelektrophorese wurden je 2 OD<sub>265</sub>-Einheiten als 3 mm langes Band aufgetragen und bei pH 3,5 und 7,5 mit T<sub>d</sub>P, T<sub>d</sub>P(CNET) und (T<sub>d</sub>P)<sub>2</sub> verglichen. 5 OD<sub>265</sub>-Einheiten wurden durch Schlangengiftphosphodiesterase nach 17 Std. bei 37° zu etwa 80% zu pTd gespalten. Gleichzeitig entstand Thymidin. Im Parallelversuch inkubiertes pTd lieferte ebenfalls etwas Thymidin. 5 OD<sub>265</sub>-Einheiten wurden 3 Std. in 1N HCl auf 100° erhitzt. Alle Hydrolysenprodukte wurden durch Dünnenschichtchromatographie an Kieselgel in System D mit den entsprechenden Vergleichssubstanzen identifiziert. Thymidin färbt im Gegensatz zu Thymidin nach Besprühen mit 10proz. HClO<sub>4</sub> in Wasser und Erhitzen auf 160–200° nicht schwarz an.

2.11. *Pyrophosphatspaltung mit Essigsäureanhydrid.* – Die zweite Hälfte des Ansatzes aus Versuch 2.8 wurde mehrmals mit Pyridin im Hochvakuum eingeengt und dann mit einer Mischung von 12 ml Pyridin und 0,6 ml Tri-n-butylamin versetzt. Nach 24 Std. Röhren bei 23° unter Lichtausschluss wurde eine klare braune Lösung erhalten, zu der 7 ml Essigsäureanhydrid gegeben wurden. Nach 4 Tagen erfolgte unter Eiskühlung die Hydrolyse mit 15 ml Wasser. Essigsäure und Pyridiniumacetat konnten durch oftmaliges Eindampfen mit Wasser entfernt werden. Der Rückstand wurde 18 Std. mit konz. NH<sub>3</sub> hydrolysiert, eingeengt, in Wasser aufgenommen und an der DEAE-Cellulosesäule getrennt (vgl. Fig. 5). Gradient:

Mischgefäß: 51 Wasser;  
Vorratsgefäß: 51 0,31M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung;  
anschliessend Mischgefäß: 110,31M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung;  
Vorratsgefäß: 110,5M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung.

Fliessgeschwindigkeit: 100 ml/Std.; Fraktionengrösse: 25 ml. Folgende Fraktionen wurden gesammelt und auf die übliche Weise aufgearbeitet:

Fraktionen	Spitzen Nr.	OD <sub>264</sub> -Einheiten	% OD <sub>264</sub> -Einheiten
16– 44	1	540	5,7
50– 82	2	1900	20,0
83–105	3	515	5,4
131–147	4	370	3,9
148–185	5	1200	12,6
192–201	6	190	2,0
202–225	7	410	4,3
226–240	8	580	6,1
241–260	9	500	5,2
282–300	10	470	4,9
301–325	11	370	3,9
340–357	12	210	2,2
358–373	13	140	1,5
374–390	14	155	1,6
391–415	15	200	2,1
416–440	16	225	2,4

Alle weiteren Untersuchungen waren identisch mit denen der ersten Hälfte des Ansatzes. Zum Ergebnis vgl. Tab. 5.

**3. Enzymatische Versuche.** – 3.1. Spaltungen mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm. – Das Enzympräparat wurde von Fluka AG, Buchs SG, bezogen. Stammlösungen: 1M Glycin-Puffer pH 10; 0,01M MgCl<sub>2</sub>-Lösung in bidest. Wasser. Enzymlösung: 5 mg Enzym wurden in 1 ml bidest. Wasser suspendiert.

Substratlösungen: je 3 mg der Nucleotide d[(MeOTr)T–T] bis d[(MeOTr)T–T–T–T–T] und d[(MeOTr)T–Tp] bis d[(MeOTr)T–T–T–T–Tp] wurden in Kochgläser eingewogen, mit je 1 ml 80proz. Essigsäure versetzt und 10 Min. auf 100° erwärmt. Im Wasserstrahlvakuum wurde je 2mal mit je 1 ml Wasser bei 50° zur Trockne eingedampft. Die Rückstände wurden je 2mal mit je 2 ml Äther extrahiert, dann in 2 Portionen zu 1 ml Wasser gelöst, durch Watte filtriert und eingeengt. Die lackartigen Präparate wurden in je 0,3 ml Wasser gelöst und bei 2° aufbewahrt. Sämtliche Produkte waren papierchromatographisch einheitlich (Whatman N° 3; System E). Die Zusammensetzung der Inkubationslösung ergab sich zu: Nucleotid 0,4 μMol; Puffer 0,1 ml, MgCl<sub>2</sub>-Lösung 0,1 ml, Enzimlösung 0,05 ml, mit bidest. Wasser auf 1 ml verdünnen. Die Inkubationszeit betrug in der Regel 10 Min. bei 37°. Etwa 40 μl wurden auf Dünnschicht mit den entsprechenden Referenzen in System D verglichen.

3.2. Spaltungen mit alkalischer Phosphatase aus *E. coli* (EC 3.1.3.1.). – Pufferlösung: 4 ml 0,05 M MgCl<sub>2</sub>+8 ml 0,5 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 9,2+88 ml H<sub>2</sub>O. Enzimlösung: alkalische Phosphatase aus *E. coli* (Worthington Biochemical Corp., Freehold, N. J.) wurde gegen den angegebenen Puffer dialysiert und nachher mit diesem auf eine Konzentration von 0,5 mg Enzym/ml verdünnt (Aktivität von 11 EU/ml). Aufbewahrung bei –20°. Inkubation [23]: 0,5 μMol Substrat + 0,05 ml Puffer + 0,05 ml Enzimlösung, dann mit bidest. Wasser auf 0,2 ml auffüllen. Inkubationszeit: 30 Min. bei 37°. 20–30 μl der Inkubationslösungen wurden auf Dünnschicht in System D mit den entsprechenden Referenzsubstanzen verglichen.

3.3. Spaltungen mit Schlangengift-Phosphodiesterase (Russel's Viper, EC 3.1.4.1.). – Stammlösung des Enzyms [4]: 150 EU des Enzyms (B Grade von Calbiochem.) wurden in 0,75 ml 0,33 M Tris-Puffer pH 9,1 gelöst und bei 0° aufbewahrt. Zur Spaltung wurden je 0,05 ml der Lösungen der Nucleotide d(T–T) bis d(T–T–T–T–T) und 0,5 mg pT<sub>d</sub> eingedampft und mit je 0,1 ml der Enzimlösung bei 37° versetzt. Die Inkubationszeiten waren: pT<sub>d</sub> 7 Std., d(T–T) 3 Std., d(T–T–T) 4 Std., d(T–T–T–T) 4,5 Std., d(T–T–T–T–T) 5 Std. Etwa 10 μl wurden auf Dünnschicht aufgetragen.

und in System D mit den entsprechenden Referenzsubstanzen entwickelt.  $pT_d$  wurde geringfügig gespalten.

Zur Bestimmung der Kettenlänge wurden die Inkubationslösungen dieser Oligonucleotide als 3 cm breites Band auf Papier *Whatman N° 3* aufgetragen und in System E entwickelt (14 Std.). Die im UV. stark absorbierenden Zonen mit  $Rf\ 0,45$  ( $pT_d$ ) und  $Rf\ 0,76$  ( $T_d$ ) wurden ausgeschnitten, zerkleinert und 14 Std. mit 5 ml 0,1N HCl eluiert. Es wurde direkt über Watte in 10-ml-Messkölbchen filtriert und das Papier 2mal mit 2 ml und 1mal mit 1 ml 0,1N HCl nachgewaschen. Blindproben, d.h. Papierstücke, die in gleicher Grösse auf gleicher Höhe vom selben Papier geschnitten wurden, erfuhren die gleiche Behandlung. Die Nucleotidlösungen wurden im UV.-Spektrophotometer gegen die Blindproben gemessen. Das Verhältnis der optischen Dichten der Nucleotid- und Nucleosid-Lösungen ergibt das molare Verhältnis  $pT_d : T_d$ .

3.4. Spaltungen mit Milz-Phosphodiesterase (EC 3.1.4.1.). – Stammlösung: 2,5 mg des Enzyms (Spleen Bovine von *Nutritional Biochemicals Corporation*) wurden in 0,5 ml eines 0,2M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffers pH 5,7 gelöst [24]. Zur Spaltung wurden je 0,02 ml der Lösungen der Nucleotide  $d(T-T)$  bis  $d(T-T-T-T-T)$  und  $(T_{dp})_2$  bis  $(T_{dp})_5$  eingedampft und mit je 0,04 ml Enzymbelösung bei  $37^\circ\text{C}$  5 Std. inkubiert. Proben der Inkubationslösungen wurden auf Dünnsschicht aufgetragen und in System E entwickelt. Die phosphorylierten Nucleotide wurden vollständig zu  $T_{dp}$  gespalten. Die nicht phosphorylierten Nucleotide wurden vollständig in  $T_{dp}$  und  $T_d$  zerlegt.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Teil 2: *U. Séquin & Ch. Tamm*, Helv. 55, 1196 (1972).
- [2] *F. Cramer*, Angew. Chem. 78, 186 (1966).
- [3] *R. L. Letsinger & U. Mahadevan*, J. Amer. chem. Soc. 87, 3526 (1965); *ibid.* 88, 5319 (1966); *T. Shimidzu & R. L. Letsinger*, J. org. Chemistry 33, 708 (1968).
- [4] *R. L. Letsinger & K. K. Ogilvie*, J. Amer. chem. Soc. 91, 3350 (1969).
- [5] *R. L. Letsinger & K. K. Ogilvie*, J. Amer. chem. Soc. 89, 4801 (1967).
- [6] *R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie & P. S. Muller*, J. Amer. chem. Soc. 91, 3360 (1969).
- [7] *K. K. Ogilvie & D. Iwacha*, Canad. J. Chemistry 48, 862 (1970); *G. W. Grams & R. L. Letsinger*, J. org. Chemistry 35, 868 (1970); *T. Neilson*, Chem. Commun. 19, 1139 (1969).
- [8] *R. Lohrmann & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc. 88, 829 (1966).
- [9] *A. F. Turner & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc. 81, 4651 (1959).
- [10] *G. M. Tener, H. G. Khorana, R. Markham & E. H. Pol*, J. Amer. chem. Soc. 80, 6223 (1958).
- [11] *H. G. Khorana & J. P. Vizsolyi*, J. Amer. chem. Soc. 83, 675 (1961).
- [12] *F. Cramer*, Angew. Chem. 73, 49 (1961); *H. G. Khorana, A. F. Turner & J. P. Vizsolyi*, J. Amer. chem. Soc. 83, 686 (1961); *R. K. Ralph & H. G. Khorana*, *ibid.* 83, 2926 (1961).
- [13] *R. K. Ralph, W. J. Connors, H. Schaller & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc. 85, 1983 (1963).
- [14] *F. N. Hayes & E. Hansbury*, J. Amer. chem. Soc. 86, 4172 (1964); *G. Weimann, H. Schaller & H. G. Khorana*, *ibid.* 85, 3835 (1963); *S. A. Narang, T. M. Jacob & H. G. Khorana*, *ibid.* 89, 2167 (1967); *F. Cramer, W. Frölke & H. Matzura*, Angew. Chem. 79, 580 (1967).
- [15] *H. G. Khorana, J. P. Vizsolyi & R. K. Ralph*, J. Amer. chem. Soc. 84, 414 (1962).
- [16] *H. Schaller & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc. 85, 3821 (1963).
- [17] *H. Schaller & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc. 85, 3828 (1963).
- [18] *T. M. Jacob & H. G. Khorana*, J. Amer. chem. Soc. 87, 368 (1965).
- [19] *E. Klinsberg* (Ed.), «The Chemistry of Heterocyclic Compounds», Pyridine and Derivatives, Part II–IV, Interscience, New York 1961.
- [20] *H. Kaufmann, P. Mühlradt & T. Reichstein*, Helv. 50, 2287 (1967).
- [21] *W. E. Razzell & H. G. Khorana*, J. biol. Chemistry 234, 2105, 2114 (1959).
- [22] *N. O. Kaplan* (Ed.), «Methods in Enzymology», Vol. II, S. 565, Academic Press, Inc., New York 1956.
- [23] *H. Rogg & M. Staehelin*, Eur. J. Biochem. 21, 235 (1971).
- [24] *L. R. Melby & D. R. Stroblach*, J. org. Chemistry 34, 421 (1969).