

# OLIGONUCLEOTID - SYNTHESE

## A. Einleitung

Auf der Suche nach immerwiederkehrenden Bausteinen der Erbsubstanz DNA (einem äußerst großen **Makromolekül**) konnten nach intensivem Bemühen drei große Einheiten identifiziert werden:

- \* ein anorganischer Phosphatrest
- \* ein Zucker (Desoxyribose)            sowie
- \* vier verschiedene Kernbasen

Diese drei Komponenten bilden - untereinander zusammengesetzt und nach einem strengen Schema verknüpft - die eigentlichen "Monomere", **aus** denen sich das "Polymer" DNA aufbaut.

Die Kombination aus einer der vier Kernbasen sowie der Zuckerkomponente wird dabei als **Nucleosid** bezeichnet; bezieht man gedanklich auch noch den Phosphatrest mit ein, greift man auf den Begriff **Nucleotid** zurück.

Durch die Existenz vier verschiedener Kernbasen (zwei vom Typus 'Purin' (**Adenin**, Guanin) sowie zwei vom Typus 'Pyrimidin' (Cytosin und Thymin)) lassen **sich** selbstverständlich auch vier unterschiedliche Nucleotide zusammensetzen.

Der Vollständigkeit halber sei noch auf die strukturellen und chemischen Ähnlichkeiten zwischen der DNA und der RNA hingewiesen:

- die Zuckerkomponente der RNA weist eine zusätzliche Hydroxylgruppe auf
- \* die Kernbase Thymin wird bei RNA - Strukturen durch **Uracil** ersetzt (dieses **stellt somit eine fünfte Kernbase dar**)

## **B. Syntheseproblematik**

Die Synthese strukturell genau definierter Oligonucleotide spielt nicht nur mehr im begrenzten Labormaßstab eine Rolle. In zunehmendem Maße tritt die großindustrielle Herstellung dieser Verbindungen in den Vordergrund

Zwangsläufig stellt sich dabei die Frage nach der effizienten Gewinnung der notwendigen Edukte (hier interessieren insbesondere die Kernbasen, da über diese die Eigenschaften des jeweiligen Nucleotids bestimmt werden):

- \* es existieren zahlreiche Totalsynthesen für die jeweiligen Kernbasen; diese sind jedoch aufgrund ihrer z.T. aufwendigen Reaktionsbedingungen sowie der durchwegs unbefriedigenden Ausbeuten industriell uninteressant
- \* trotzdem sind diese Verfahren **äußerst** wichtig, da durch leichte Modifikation der Edukte zahlreiche funktionelle Gruppen in den Grundkörper der Kernbasen **eingeführt** werden können; diese unnatürlichen Kernbasen verfügen **z.T. über** erstaunlich nützliche Eigenschaften (z.B. krankheitshemmende Wirkungen)
- \* die Hauptquelle der natürlichen Kernbasen stellt die Züchtung und Aufarbeitung von Hefezellen dar (trotz des großen Reinigungsaufwands immer noch die billigste und effizienteste Methode)

Die Kupplung zweier Nucleotide läßt sich prinzipiell sehr leicht bewerkstelligen, da diese Reaktion bereits bei Raumtemperatur unter Verwendung milder Katalysatoren (z.B. schwach saures Milieu) problemlos abläuft.

Da jedoch in einem DNA - Nucleotid drei Kupplungspunkte vorliegen (bei RNA - Nucleotiden sogar vier), von denen jeder sehr leicht an ein anderes Nucleotid gebunden werden kann, führt die bloße Vereinigung mehrerer Nucleotidkomponenten zu einer unübersichtlichen Zahl von Konstitutionsisomeren.

Um den selektiven Aufbau einer Nucleotidkette zu gewährleisten, kann daher auf den Einsatz von Schutzgruppen nicht verzichtet werden

Im Laufe der Zeit haben sich für die einzelnen reaktiven Punkte eines **Nucleotids** bevorzugte Schutzgruppen herauskristallisiert:

- \* die freie Aminogruppe der Kernbase wird mit Benzoesäure unter Ausbildung einer Peptid-Bindung blockiert
- \* die Hydroxygruppe des Zuckergrundkörpers wird mittels der Dimethoxytriethylether-Schutzgruppe (**'DMT'**) geschützt
- \* die freien Hydroxygruppen des Phosphatrestes werden mittels  $\beta$ -Cyano-Ethyl geschützt; im modernsten Syntheseverfahren wird dieser Schritt jedoch durch Gehen eines kleinen Umweges **überflüssig**

### C. Der Phosphor-Amidit-Zyklus

Dieses Verfahren stellt die zur Zeit modernste Methode zur Herstellung von Oligonucleotiden dar; es findet in fester Phase auf Silicatoberflächen statt.

#### ***Vorbereitung & Verankerung***

Zu Beginn muß das Nucleotid gewählt werden, das am Anfang der **vollständigen** Nucleotid-Sequenz stehen soll, da dieses noch einer speziellen Vorbereitung bedarf:

anstelle eines Phosphatrestes wird an diesem Nucleotid eine Diesterkette am Zuckergrundkörper angebracht.

Das so präparierte Nucleotid wird nun auf die **Silicatoberfläche** aufgebracht, die zuvor mit Triethoxy-propylamin-silan gespült wurde. Dadurch wird das erste Nucleotid mit deutlichem Abstand von der Oberfläche der Trägersubstanz fest auf dieser verankert. Dieser 'Abstandshalter' (= **'Spacer'**) hat keinerlei chemische Relevanz; er erhöht lediglich die Sterische Zugänglichkeit des ersten Nucleotids und somit die Ausbeute im ersten Schritt.

## ***Entschützung & Kupplung***

An dieses so vorbereitete Nucleotid kann nun ein zweites angehängt werden.

Zu diesem Zweck wird zunächst durch Zugabe von **Dichloressigsäure** die DMT-Schutzgruppe des ersten Nucleotids abgespalten, wodurch ein kupplungswilliger Punkt desselben wieder **für** Reaktionen zur Verfügung steht.

An dieser Stelle koppelt nun ein durch Phosphoramidit aktiviertes zweites Nucleotid an. Dieser Schritt (eine nucleophile Substitution) wird durch Zugabe des schwach sauren **Tetrazols** ermöglicht.

## ***Oxidation & Capping***

In einem weiteren Schritt wird nun der die beiden Nucleotide **verknüpfende** Phosphitanteil mittels Iod zum **fünfwertigen** Phosphat oxidiert (dies ist aufgrund der wesentlich höheren Bindungsstabilität sowie der insbesondere bei größeren Nucleotidsequenzen beobachtbaren Sterischen Effekte von großer Bedeutung)

Trotz der hohen Reaktivität der **entschützten** Nucleotide reagiert ein Teil von ihnen (ca. 1%) nicht mit dem zweiten Nucleotid. Um nun in den nächsten Schritten den Aufbau unerwünschter Nucleotidsequenzen zu unterbinden, werden diese nicht abreagierten Hydroxylgruppen durch eine Mischung aus **Essigsäureanhydrid** und Methylimidazol dauerhaft geschützt und somit den Folgereaktionen entzogen

## ***Aufbau & Abspaltung***

Nach diesem Verfahren können nun beliebige Nucleotidsequenzen aufgebaut werden.

Das fertige Oligonucleotid wird schließlich durch Zusatz von Ammoniaklösung von der festen Phase getrennt, wobei durch geschickte Wahl der Reaktionsbedingungen gleichzeitig selektiv noch vorhandene Schutzgruppen entfernt werden können.

Die An- bzw. Abwesenheit bestimmter Schutzgruppen bestimmt maßgeblich die anzuratenden Trenn- und Reinigungsverfahren im Anschluß an den Abspaltungsprozeß