

Oligonucleotidsynthese

Moritz Klammler*

Karlsruher Institut für Technologie
Seminarvortrag zum OC-F Praktikum, 4. Juli 2011

Zusammenfassung

Die Synthese von Oligonucleotiden hat sich als Forschungsgebiet mit absehbarer kommerzieller Bedeutung etabliert. Die Synthese höherer Oligomere stellt große Herausforderungen an die Ausbeuten der vielen Teilschritte. Außerdem bieten die Substrate Angriffspunkte für eine Vielzahl unerwünschter Reaktionen. Hinzu kommt, dass von der gewünschten Verbindung leicht abweichende Produkte kaum abzutrennen sind. Diesen Problemen wurde mit der Entwicklung quasi-quantitativer Syntheseschritte, vieldimensionalen Schutzgruppenkonzepten und dem periodischen Eliminieren nicht wie gewünscht reagierter Anteile begegnet. In diesem Aufsatz werden die allgemeinen Probleme der Synthese diskutiert, die unterschiedlichen Reaktionen zur Kettenverlängerung vorgestellt und die Festphasensynthese als Stand der Technik genauer beschrieben.

Einleitung

Die Bausteine der natürlichen Erbsubstanz bilden *Nucleoside*, die über Phosphatgruppen miteinander verkettet sind. Ein Nucleosid besteht aus dem Zucker Ribose (RNA) bzw. Desoxyribose (DNA) wobei die Hydroxyl Gruppe in Position 1' durch eine *Nucleobase* substituiert ist. Bezieht man den Phosphatrest in Position 5' mit ein, spricht man von einem *Nucleotid*. Als Basen kommen in der Natur *Adenin*, *Guanin*, *Cytosin* und *Thymin* (DNA) bzw. *Uracil* (RNA) vor. Bei künstlich hergestellten Nucleotiden finden anstelle der natürlichen Nucleobasen jedoch auch verschiedene andere Bausteine Anwendung, die

bis zu einem gewissen Grad von der Natur toleriert werden.^a

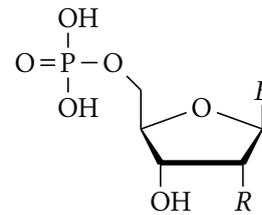


Abbildung 1: Nucleotid; DNA: $B \in \{A, C, G, T\}$, $R = H$, RNA: $B \in \{A, C, G, U\}$, $R = OH$.

Aufgrund der wichtigen Funktion der DNA / RNA in der Natur, kommt der Synthese dieser Bausteine besondere Bedeutung zu.

Nomenklatur

Für die Benennung von Oligonucleotiden hat sich folgendes Schema bewährt¹: Die Nucleoside werden entsprechend ihrer Basen mit den Großbuchstaben „A“, „G“, „C“, „T“ und „U“ abgekürzt. Die Phosphatreste werden mit einem kleinen „p“ bezeichnet. Der Name eines Oligomers ergibt sich nun aus der Aneinanderreihung der entsprechenden Buchstaben, wobei konventionsgemäß ein „p“ links eines Großbuchstabens für einen Phosphatrest in 5' und rechts in 3' Stellung steht. (Nach IUPAC² ist der Name noch einzuklammern und ein „3',5'“- voranzustellen. Ferner kann durch Voranstellen eines „d“ (manchmal auch „de“) gekennzeichnet werden, dass die Zucker *Desoxyribosen* sind.) Bei Polyphosphaten wird die Anzahl der „p“s entsprechend angepasst.

^aIm Folgenden: $\mathbb{B} := \{A, C, G, T, U, \dots\}$

* moritz.klammler@gmail.com

Synthese

Besondere Herausforderungen bei Vielstufigen Synthesen

Während ein einzelnes Nucleotid relativ einfach verfügbar ist^b, besteht die Herausforderung bei der Synthese höherer ($n \approx 10^1 \dots 10^2$) Oligomere darin, trotz der Vielzahl an Syntheseschritten eine letztendlich respektable Ausbeute der gewünschten Sequenz zu erhalten. Anders als bei der Synthese von Polymeren die lediglich aus vielen identischen Bausteinen bestehen (*Homomere*), kommt bei der Synthese von Oligomeren aus wechselnden Bestandteilen^c (*Heteromere*) erschwerend hinzu, dass ein Molekül bereits dann nicht das gewünschte Produkt darstellt, wenn nur ein einziger Kettenverlängerungsschritt nicht wie gewünscht stattgefunden hat. Im Nachhinein sind solche fehlerhaften Moleküle de facto nicht mehr vom Produkt zu trennen, können jedoch eine gänzlich andere (biologische) Funktion haben.

Prinzipiell sind zwei Herangehensweisen denkbar. Einerseits kann das Oligomer *sequentiell* durch Anknüpfen eines immer neuen Nucleotids an die bestehende Kette aufgebaut – andererseits durch das Verbinden jeweils zweier getrennt synthetisierter Teilstränge (*Kuppeln*) zusammengesetzt werden. Bei der Synthese eines n -Oligomers liegt die Gesamtausbeute beim sequentiellen Ansatz im Bereich $\alpha(e^{-n})$; wird das gesamte Oligomer nur durch Kupplungsreaktionen aufgebaut, im Bereich $\alpha(1/n)$. Daraus ist sofort ersichtlich, dass es eine kritische Länge gibt, ab der die sequentielle Synthese nicht mehr rentabel ist. Da die Ausbeute eines einzelnen Kettenverlängerungsschritts jedoch höher ist, als die einer Kuppelung, wird die beste Gesamtausbeute dann erhalten, wenn kurze Sequenzen sequentiell aufgebaut und dann zu langen Molekülen gekuppelt werden. Kupplungsreaktionen und -techniken ist ein eigener Vortrag⁴ im Rahmen dieses Seminars gewidmet, sodass im Folgenden nur noch die sequentielle Synthese behandelt wird.

Bei der Verlängerung der Kette wird an ein

^bTatsächlich ist nach wie vor die Gewinnung aus Hefe der Synthese überlegen.

^cUnd nur solche sind zur Codierung von Information geeignet³.

bestehendes Oligonucleotid ($n = 1$ eingeschlossen) ein weiteres Nucleotid geknüpft, wobei eine $3' \rightarrow 5'$ Bindung (oder $5' \rightarrow 3'$) gebildet wird.

Knüpfen der $3' \rightarrow 5'$ Bindung

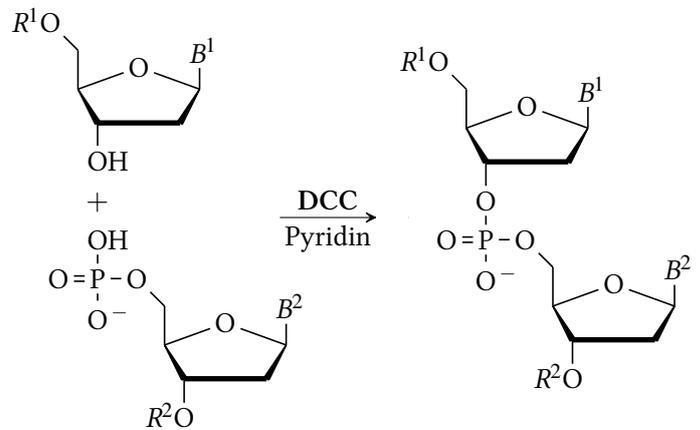


Abbildung 2: Knüpfen der $3' \rightarrow 5'$ Bindung nach der Phosphatdiester Methode⁵. $B^1, B^2 \in \mathbb{B}$. DCC N,N' -Dicyclohexylcarbodiimid $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_{11}$, $R^1 = \text{Ph}_3\text{C}$, $B^1, B^2 \in \mathbb{B}$.

Der Kettenverlängerungsschritt verläuft (zumindest formal) über eine Kondensationsreaktion zwischen einem Phosphatrest in $5'$ und der Hydroxyl Gruppe in $3'$ Position (oder umgekehrt). Da das Phosphoratom prinzipiell in der Lage ist, bis zu drei Esterbindungen auszubilden, besteht bei der naiven Synthese die Gefahr, dass die Kette nicht am Ende weiterwächst, sondern stattdessen an undefinierter Stelle verzweigt. Die Amino (und Keto) Gruppen der Nucleobasen – sowie im Fall der RNA natürlich die zusätzliche Hydroxyl Funktion in $2'$ Position – stellen weitere Angriffspunkte für unerwünschte Reaktionen dar. Außerdem müssen die Reaktion des anzuknüpfenden Nucleotids wie auch des bereits synthetisierten Oligomers mit sich selbst hintangehalten werden. Daraus ist ersichtlich, dass eine effiziente Synthese ohne ein gutes Schutzgruppenkonzept nicht möglich ist.

Die *Phosphatdiester Methode* (Abb. 2) ist eine historische Reaktion zur Knüpfung der $3' \rightarrow 5'$ Bindung, bei der die OH Gruppe in Position $3'$ des einen Nucleotids acyliert und dadurch unreaktiv gemacht wird. Damit wird ein Nucleosid, dessen $5'$ Hydroxy Funktion durch eine Triphenylmethylgruppe geschützt ist, umgesetzt. Wäss-

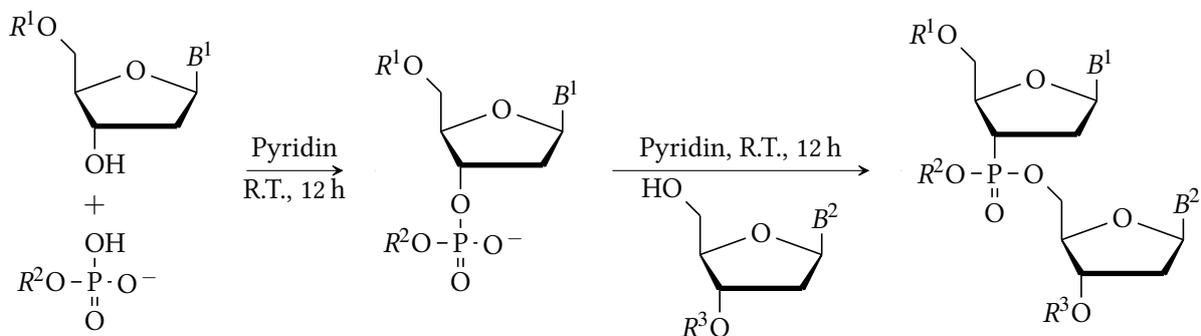


Abbildung 3: Kettenverlängerung nach der Phosphatriester Methode^{5,6}. $B^1, B^2 \in \mathbb{B}$, $R^1 = \text{CPh}_3$, $R^2 = \text{CH}_2\text{CCl}_3$, $R^3 = \text{Ac}$. Der zweite Schritt kann durch den Einsatz eines Kupplungsreagens (bewährt haben sich Triazol Derivate \rightarrow Abb. 5) erheblich beschleunigt werden⁷.

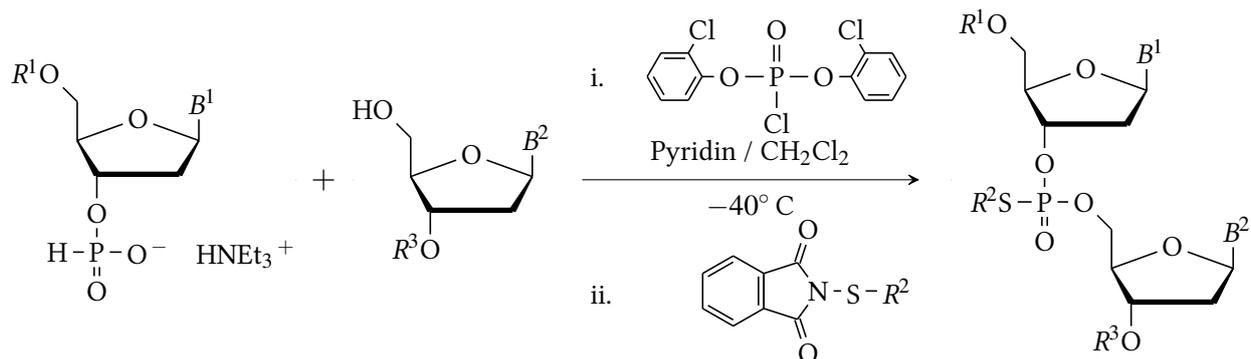
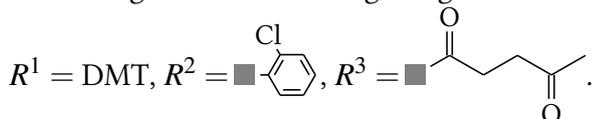


Abbildung 4: Kettenverlängerung nach der (modifizierten) H-Phosphonat Methode⁸. $B_1, B_2 \in \mathbb{B}$,



rig alkalische Aufarbeitung spaltet die Schutzgruppen ab und führt zum gewünschten Dimer.

Durch die potentielle Weiterreaktion an der noch freien Hydroxy Funktion des Phosphats eignet sich diese Methode kaum zur Synthese höherer Oligomere.

Bei der *Phosphatriester* Methode (Abb. 3) wird diese Sackgasse blockiert, indem die zweite Hydroxy Gruppe reversibel verestert und dadurch einer weiteren Reaktion unzugänglich gemacht wird. Es kommt kein geschütztes Nucleotid zum Einsatz – stattdessen wird ein in 5' Position verestertes Nucleosid mit dem Phosphorsäuremonoester umgesetzt, der in 3' Position bindet. Diese Verbindung (ein Diester) reagiert dann mit der entschützten 5'-Hydroxyl Gruppe des letzten Glieds der bereits aufgebauten Kette (s. Abb. 3), wobei der namensgebende Triester entsteht.

Die in den Abbildungen 2 und 3 gezeigten Reaktionen mit Phosphat wurden heute weitestgehend von einem anderen Ansatz verdrängt. Da-

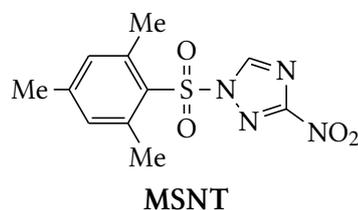


Abbildung 5: MSNT und andere Triazol Verbindungen haben sich als Kupplungsreagenzien zur Bildung des Phosphatesters bewährt⁵, greifen jedoch die Keto Funktion der Nucleobasen an⁷.

bei ist das reaktive Zentrum kein P(V) sondern der viel aktivere P(III). In einem weiteren Schritt wird dann das bereits veresterte Phosphit zum Phosphat oxidiert. Wie im Schema in Abb. 3 wird ein 5'-geschütztes Nucleosid mit einem Phosphitmonoester umgesetzt, der an das 3'-Hydroxyl bindet. Diese Verbindung reagiert mit der 5' Hydroxy Funktion der bestehenden Kette. Ein offensichtliches Problem dieser als *Phosphittriesters* bezeichneten Variante stellt die Kombinati-

on eines bereits mit einem noch nicht phosphorierten Nucleosid dar. Zwar fallen diese Nebenprodukte für die Weiterreaktion aus (keine reaktive Funktion mehr vorhanden) und gehen nur als konstanter Faktor in die Ausbeute ein, doch lassen sie sich auch vermeiden. Dazu wird (s. Abb. 6) im ersten Schritt ein Phosphoramidit ($R^2OP(Cl)NR_3^3$) im Überschuss eingesetzt. Nachdem alle 3'-Hydroxy Gruppen gebunden haben, wird das Intermediat 2 zu der bereits synthetisierten Sequenz gegeben und die Amin Schutzgruppe in situ mit einem Aminhydrochlorid in ein Chlorid verwandelt^d, das in Gegenwart einer schwachen Säure, häufig 1H-Tetrazol, quantitativ die 3' → 5' Bindung ausbildet. Anschließend wird das Phosphit mit wässriger Iodlösung zum Phosphat oxidiert⁵. Diese Variante ist als *Phosphoramidit* Methode bekannt.

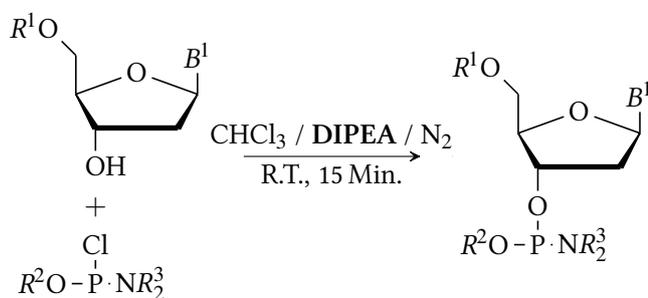


Abbildung 6: Herstellung des Phosphoramidits⁹. $R^1 = \text{DMT}$ (Dimethoxytrityl), $R^2 = R^3 = \text{Me}$ (viele Alternativen), $B^1 \in \mathbb{B}$.

Eine vierte und letzte Variante zum Anknüpfen eines Nucleotids stellt die *H-Phosphonat* Methode dar. Dabei wird mit einem Phosphonsäureester gearbeitet, der nach Abb. 7 hergestellt wird und in Gegenwart von Wasser oder eines Thioethers und einer schwachen Base mit einem entschützten Nucleosid zum Phosphat bzw. Thio-phosphat reagiert (s. Abb. 4). Später wird der Rest $R^{2(1)}$ mit verdünnter HCl (5 Min. bei -50°C) oder einer schwachen Base (12 h bei R.T.)⁸ abgespalten.

Schutzgruppen

Wie bereits in den Schemata erwähnt, hat sich die Dimethoxytrityl (DMT) Schutzgruppe für das Hydroxid in 5' Position bewährt. Aufgrund sei-

^dDieser Schritt kann auch entfallen.

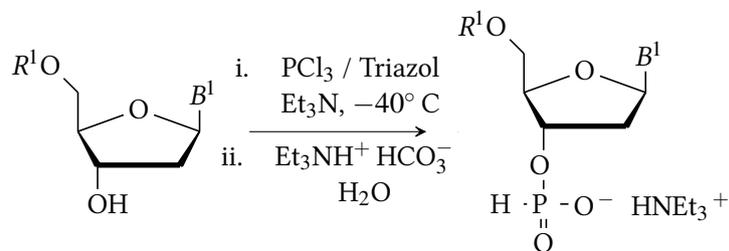


Abbildung 7: Herstellung des reaktiven Intermediats für die H-Phosphonat Methode^{5,8}. Eine Isolation ist kaum möglich. $R^1 = \text{DMT}$, $B^1 \in \mathbb{B}$.

ner Größe bindet DMT ohne weitere Maßnahmen regioselektiv an die 5'-Hydroxy Gruppe. Das Abspalten gelingt mit (halogenierter) Essigsäure^{5,11,12}.

Eine – besonders für die RNA Synthese (siehe unten) interessante – Alternative bietet 4 (Abb. 9).

Gegenstand intensiver Forschungen war der Schutz der Hydroxy Gruppe des Phosphats. Von verschiedenen erprobten Schutzgruppen haben sich für die Synthese in Lösung elektronenziehend substituierte Aromaten (z.B. 2-Chlorphenyl) als besonders geeignet erwiesen⁵. In der Festphasensynthese hat sich 2-Cyanethyl für diesen Zweck etabliert^{5,11}. Die Abspaltung der Schutzgruppe ist nicht gänzlich unproblematisch. Schließlich wird dabei ein Phosphatester hydrolysiert, ohne dass die 3' → 5' Bindungen vom gleichen Typ gespalten werden dürfen^e. Für diesen Zweck hat sich die alkalische Hydrolyse als zu unselektiv erwiesen. Dagegen haben sich die Salze aromatischer Oxime mit Amidinbasen (s. Abb. 8) als Entschützungsreagenzien bewährt¹⁰.

In er RNA Synthese kommt eine erhebliche, bislang noch nicht thematisierte, Schwierigkeit hinzu, da die 5' und die 2' Hydroxy Funktionen orthogonal und regiospezifisch geschützt werden müssen. Heute finden vor allem zwei Ansätze Verwendung¹²:

1. **DMT** für 5' (säurelabil) und **TOM** für 2' (spalten mit F^-)

^eDa ein n -Oligomer $2(n-1)$ solcher Bindungen enthält, beträgt der durch ungewollte Spaltung entstandene Verlust $\eta_{\text{tot.,cv.}} = 1 - (1 - \eta_{\text{cv.}})^{2(n-1)}$ wobei $\eta_{\text{cv.}}$ den ungewollten „Umsatz“ an Ribose-Phosphat-Esterbindungen bezeichnet.

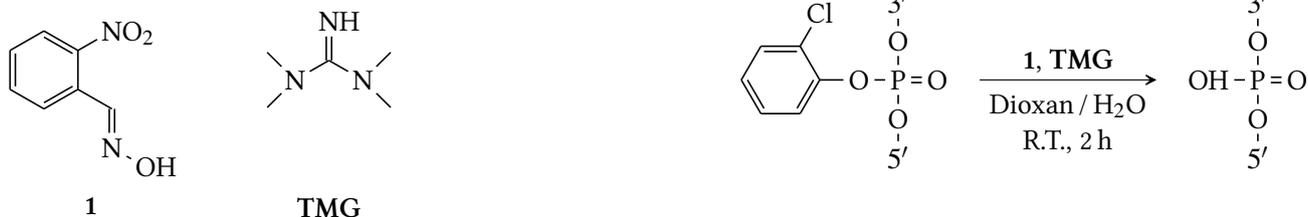


Abbildung 8: **1** *syn*-2-Nitrobenzaldoxim, **TMG** *N,N,N',N'*-Tetramethylguanidin. Entschützung des Phosphatriesters¹⁰.

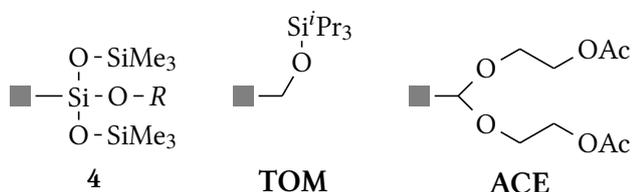


Abbildung 9: **4** Alternative Schutzgruppe für die 5' Hydroxy Funktion. Abspaltbar mit F^- -Ionen. **TOM** Triisopropylsilyloxymethyl Schutzgruppe (F^- -spaltbar) $R \in \{CHPh_2, Cyclododecanyl\}$ **ACE** Bis(2-acetoxyethoxy)methylorthoester, säurelabile Schutzgruppe für die 2' Position.

2. **4** für 5' (spalten mit F^-) und **ACE** für 2' (säurelabil)

Variante 2 hat dabei den Vorteil, dass das Produkt nur ein einziges Mal am Schluss sauren Bedingungen ausgesetzt werden muss. Die Fluoridspaltung gilt als „sanfter“.

Die Nucleobasen reagieren unterschiedlich empfindlich auf die Reaktionsbedingungen. Besonders die Aminogruppen des Guanin sind gefährdet, unerwünschte Reaktionen einzugehen⁵. Übliche Vorgehensweise ist das Schützen sämtlicher Aminogruppen mit Benzoyl (■-COPh) oder Isobutyryl (■-COⁱPr) zu schützen¹¹. Diese Schutzgruppen werden am Ende mit wässriger Ammoniaklösung entfernt. Dabei sollten allfällige 2'-OH Funktionen noch geschützt sein¹². Falls **MSNT** oder ähnliche Verbindungen während der Synthese zum Einsatz kommen, kann es auch sinnvoll sein, die Keto Funktionen zu schützen⁷.

Moderne Festphasensynthese

Heute hat sich die *Festphasensynthese* als Verfahren zur Herstellung von Oligonucleotiden in der Größenordnung von $\lesssim 10^2$ Basen etabliert. Dabei wird der erste Baustein an ein Substrat (i.d.R.

Glasschaum) gebunden, an dem die wachsende Kette bis zum Schluss haften bleibt. Alle Reagenzien werden in der entsprechenden Reihenfolge durch das Substrat gespült. Diese Methode hat den Vorteil, dass in den „Reinigungsschritten“ kaum Produkt verloren geht, was für die Synthese langer Sequenzen essentiell ist. Zur 3' → 5' Bindung ist Phosphoramidit heute die Methode der Wahl^{11,12, f}.

Das Substrat wird zunächst funktionalisiert, d.h. mit einem langkettigen Alkylamin getränkt, das ausreichend stark haftet. Dieses Molekül hat definierte Bindungspunkte, an die das erste Nucleotid, das als nächstes eingespült wird, bindet⁵ (s. Abb. 10).

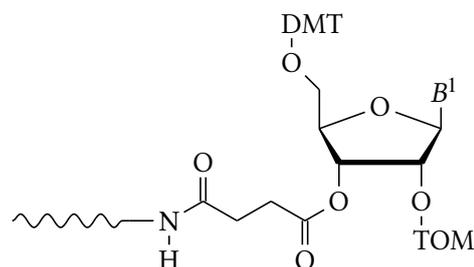


Abbildung 10: Befestigung des ersten Nucleotids am aktivierten Substratmaterial⁵.

Es folgt nun ein Viertakt-Syntheschema, das fortgeführt wird, bis die gewünschte Sequenz synthetisiert ist. Zwischen den Schritten werden überschüssige Reagenzien jeweils ausgespült. Nur das werdende Produkt bleibt haften.

1. **Entschützen** (5' *deprotection*) der 5' Position des letzten Nucleotids, z.B. mit Trichloressigsäure.

^fAllerdings ist dieses Verfahren im sub-Kilogramm Bereich limitiert. Die Entwicklung skalierbarer Verfahren in Lösung ist Gegenstand aktiver Forschung. Hierfür könnte die H-Phosphonat Methode vorteilhaft sein⁸.

2. **Kettenverlängerung** (*coupling*) durch Einspülen des nächsten Nucleotids, das zuvor als Phosphoramidit aktiviert und dessen reaktive Zentren geschützt wurden. Nucleobase.
3. **Oxidieren** des Phosphits zum Phosphat mit wässriger Iodlösung.
4. **Abfangen** (*capping*) nicht reagierter 5' Funktionen durch Acylieren (z.B. mit Acetanhydrid), die dadurch von der Weiterreaktion ausgeschlossen sind und durch den Längenunterschied (z.B. chromatographisch) abgetrennt werden können.

Am Ende wird die Esterbindung zum Substrat ammoniakalisch gespalten, das Produkt ausgewaschen, die übrigen Schutzgruppen entfernt und je nach Erfordernis per Filtration, HPLC, oder Gelelektrophorese gereinigt¹¹.

Zur Untersuchung der synthetisierten Probe bietet IR-Spektroskopie die einfachste Möglichkeit, wobei der Extinktionskoeffizient als gewichteter Mittelwert der beteiligten Nucleotide abgeschätzt werden kann¹¹. Zur Charakterisierung der Phosphatbrücken kann ³¹P-NMR verwendet werden⁹.

Zusammenfassung

Die Synthese von Oligonucleotiden spielt in der Forschung bereits heute eine wichtige Rolle. Sollten medizinische Präparate¹³ oder Werkstoffe auf Basis funktionalisierter DNA¹⁴ marktreif werden, wird sie nochmals immens an Bedeutung gewinnen⁸.

Im Forschungsmaßstab sind heute beispielsweise 10 nmol eines 30-Oligomers für weniger als fünf Euro innerhalb von Tagen verfügbar.

Für die effiziente Synthese ist entscheidend, dass die Kettenverlängerungsschritte quasi-quantitativ verlaufen. Außerdem spielt die Wahl des vieldimensionalen (vor allem bei der RNA-Synthese) Schutzgruppenkonzepts eine wichtige Rolle.

Literatur

- (1) Cramer, F. *Angew. Chem.* **1966**, 78, 186–198.
- (2) IUPAC, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 1381–1387.
- (3) Shannon, C. E. *The Bell System Technical Journal* **1948**, 27, 379–423 & 623–656.
- (4) Kimpel, T. Seminarvortrag zum OC-F Praktikum im Sommersemester 2011.
- (5) Reese, C. B. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3851–3868.
- (6) Eckstein, F.; Rizk, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1967**, 6, 695–696.
- (7) Reese, C. B.; Ubasawa, A. *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 2265–2268.
- (8) Reese, C. B.; Yan, H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 2619–2633.
- (9) Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859–1862.
- (10) Reese, C. B.; Zard, L. *Nucl. Acids Res.* **1981**, 9, 4611–4626.
- (11) Distribio[®], *Oligonucleotide Synthesis*, 2010, <http://www.distribio.com/en/service-service-and-support/oligonucleotides> [online, 2011-06-27].
- (12) Marshall, W. S.; Kaiser, R. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 222–229.
- (13) Krotz, A. H.; Carty, R. L.; Scozzari, A. N.; Cole, D. L.; Ravikumar, V. T. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, 4, 190–193.
- (14) Wanninger-Weiß, C.; Di Pasquale, F.; Ehrenschwender, T.; Marx, A.; Wagenknecht, H.-A. *Chem. Commun.* **2008**, 1443–1445.
- (15) Michelson, A. M. *The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*; Academic Press: London and New York, 1963.

© 2011 Moritz Klammler

Creative Commons Namensnennung-Weitergabe unter gleichen Bedingungen 3.0 Deutschland.

<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/>