

Oligonucleotidsynthese

Moritz Klammler | 4. Juli 2011

SEMINAR ZUM FORTGESCHRITTENENPRAKTIKUM ORGANISCHE CHEMIE



Kolophon

Diese Präsentation wurde mit $\text{\LaTeX} 2_{\epsilon}$ und der BEAMER Klasse mit einem noch nicht veröffentlichten, selbst geschriebenen Theme (KIT2) erstellt. Die Grundschrift ist BIOLINUM / LIBERTINE. Plots wurden mit GNUMPLOT und PSTricks erstellt, separat compiliert und als PDF eingebunden. Der Setzvorgang wurde mit GNUMAKE automatisiert.

Der Quelltext ist auf Wunsch vom Autor erhältlich.

Das Titelbild ist ein Ausschnitt des Gemäldes *Hirte mit Kühen am Seeufer* von Christian Mali (1832–1906), Öl auf Leinwand, 81 × 114 cm.

© 2011 Moritz Klammler

Creative Commons Namensnennung-Weitergabe unter gleichen Bedingungen 3.0 Deutschland.

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

Überblick

1 Einleitung

- Aufbau der DNA
- Nomenklatur

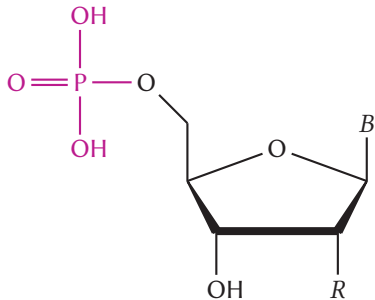
2 Synthese

- Ausbeuten vielstufiger Synthesen
- Knüpfen der 3' → 5' Bindung
- Schutzgruppen
- Moderne Festphasensynthese
- Reinigung und Charakterisierung

3 Epilog

- Ausblick und Zusammenfassung
- Literaturempfehlungen

Nucleoside / Nucleotide



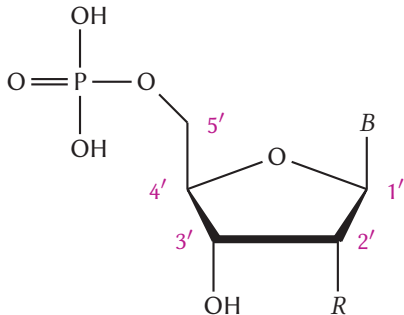
DNA:

- $B \in \{A, C, G, T\}$
- $R = H$

RNA:

- $B \in \{A, C, G, U\}$
- $R = OH$

Nomenklatur



- Nucleosid $\in: \{A, G, C, T, U\}$
- Phosphatrest $=: p$
- $p_{5'}Np_{3'}$
- Präfixe
 - $3' \rightarrow 5' / 2' \rightarrow 5'$
 - “d” bzw. “de”
- Bsp.: d(pAppTpT)

Ausbeuten vielstufiger Synthesen

- Sequentielle Kettenverlängerung

$$\eta_{\text{tot}} = \eta_{\text{sq}}^n \Rightarrow \text{exponentielles Problem}$$

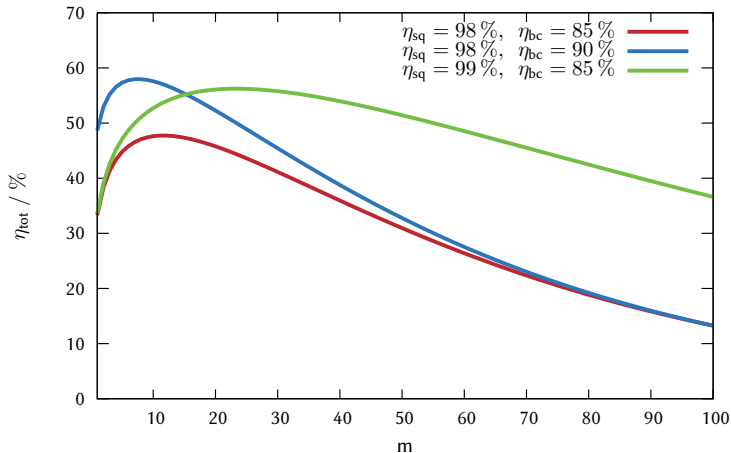
- Parallele Blockkupplung

$$\eta_{\text{tot}} = \eta_{\text{bq}}^{\log_2(n)} \Rightarrow \text{invers polynomielles Problem}$$

- Kombination (m-Oligomere parallel koppeln)

$$\eta_{\text{tot}} = \eta_{\text{bq}}^{\log_2(n/m)} \eta_{\text{sq}}^m$$

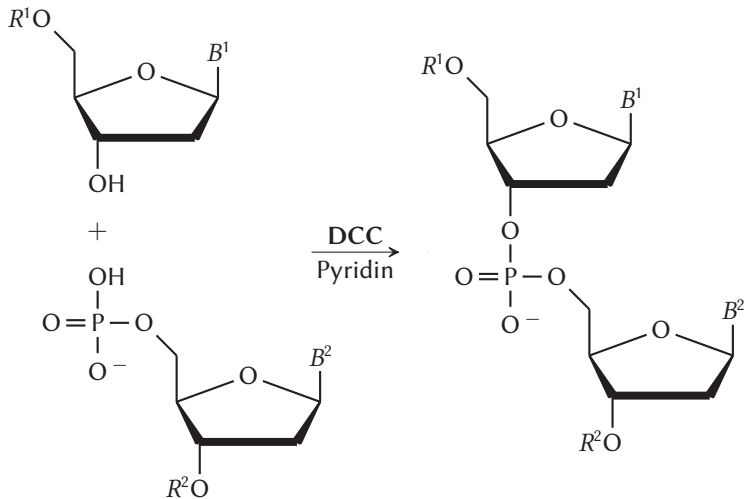
Synthese eines n-Oligomers aus sequentiell aufgebauten m-Bausteinen



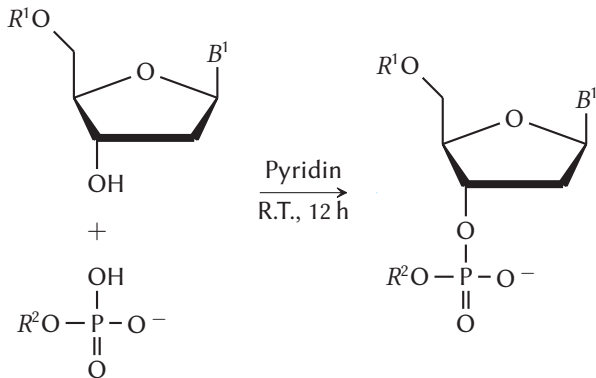
Knüpfen der 3' → 5' Bindung

- Phosphatdiester (historisch)
- Phosphatriester (historisch)
- **Phosphoramidit**
- H-Phosphonat

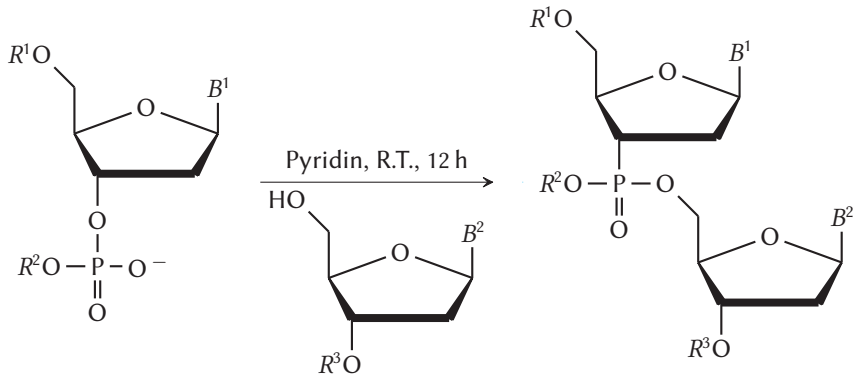
Phosphatdiester Methode



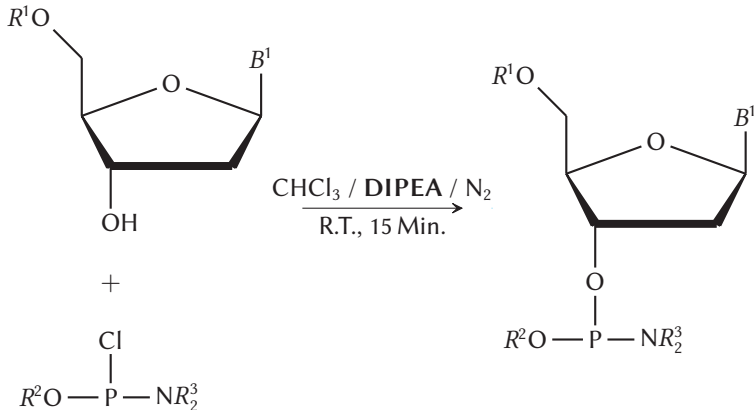
Phosphattriester Methode



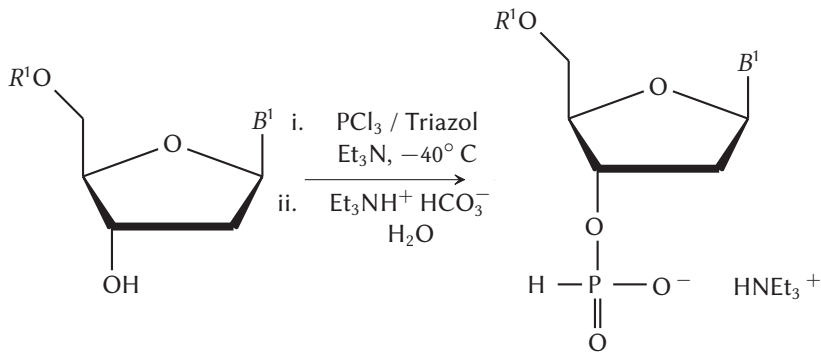
Phosphattriester Methode (Forts.)



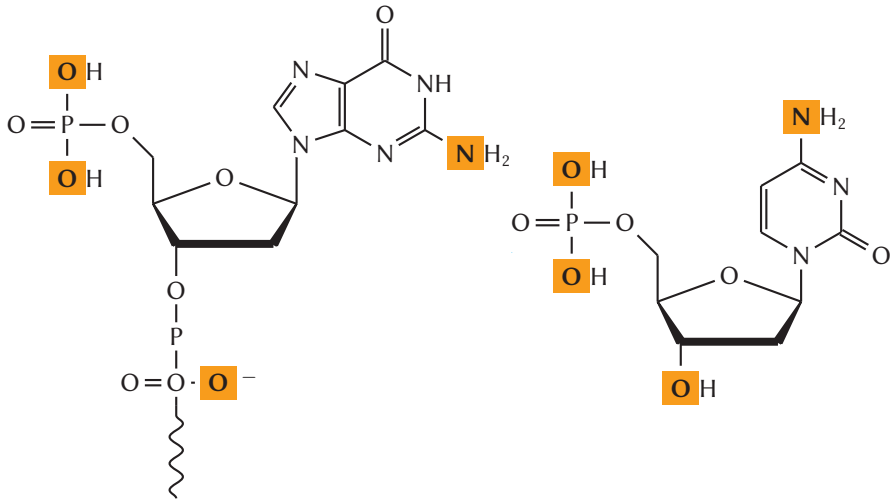
Phosphoramidit Methode



H-Phosphonat Methode



Schutzgruppen



Schutzgruppen (*Forts.*)

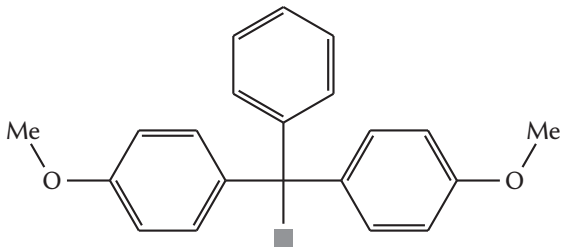
temporär

- Phosphit
- 5'-Hydroxyl

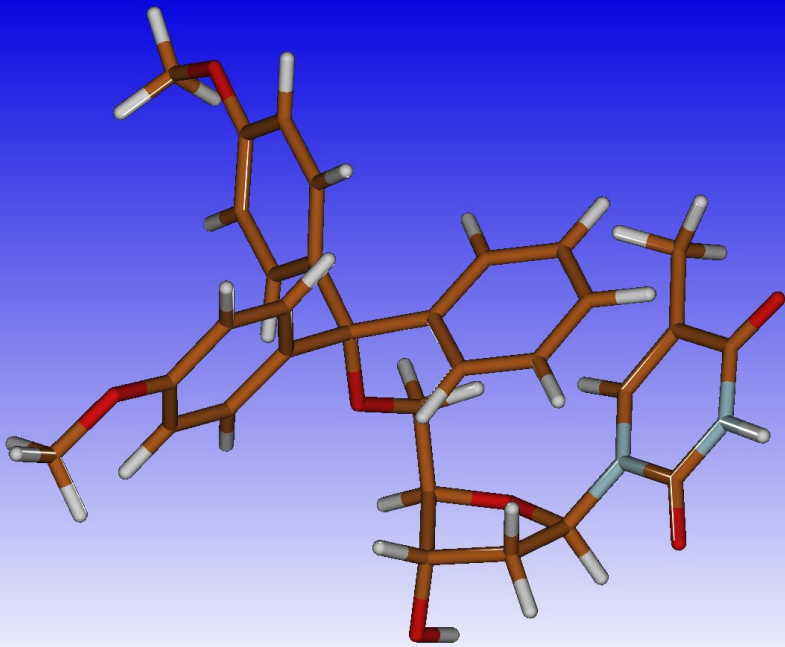
permanent

- 2'-Hydroxyl bei RNA
- Phosphat
- Amine der Basen
- ggf. Ketone der Basen

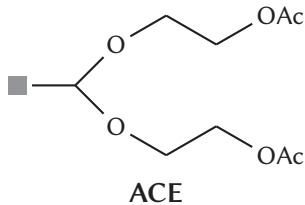
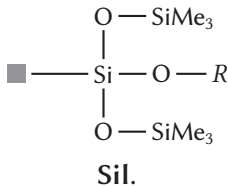
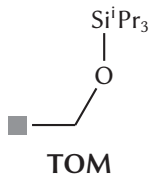
Temporäres Schützen des 5'-Hydroxyls



Dimethoxytriphenyl (DMT)
Entfernung: Halogenierte Essigsäure



Permanentes Schützen des 2'-RNA-Hydroxyls



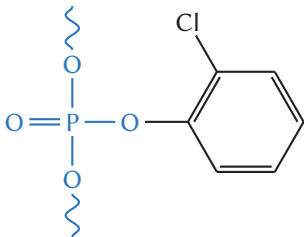
Variante 1

- 5': DMT (Säure)
- 2': TOM (F^-)

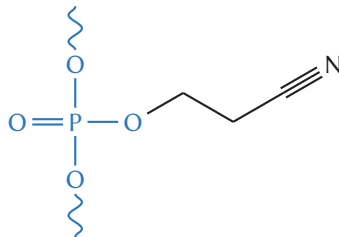
Variante 2

- 5': Sil. (F^-)
- 2': ACE (Säure)

Permanentes Schützen des Phosphats

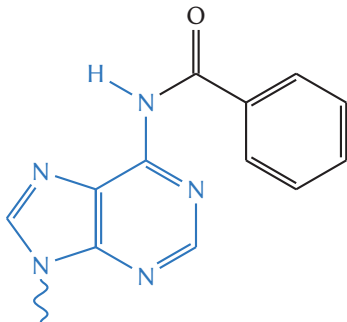


2-Chlorphenyl
in Lösung

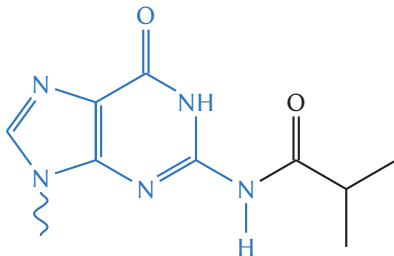


2-Cyanoethyl
bei Festphasensynthese

Permanentes Schützen der Nucleobasen



Benzoyl



Isobutyryl

Entfernung: Wäss. Ammoniak, 50...80° C, 1...8 h

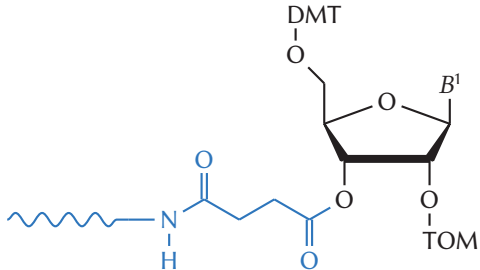
Moderne Festphasensynthese

Synthesezyklus

- 1 Entschützung (*deprotection*) der 5' Position
- 2 Kettenverlängerung (*coupling*)
- 3 Abfangen (*capping*) nicht verlängerter Ketten
- 4 Oxidation zum Phosphat

5'-Entschützung

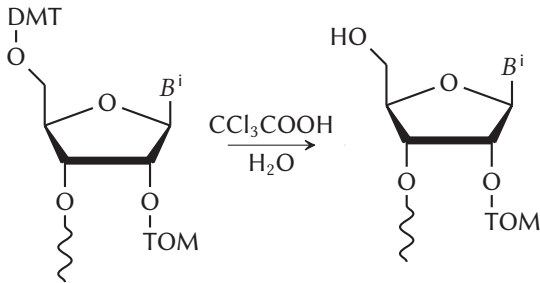
Oxidation



Kettenverlängerung

Capping

5'-Entschützung

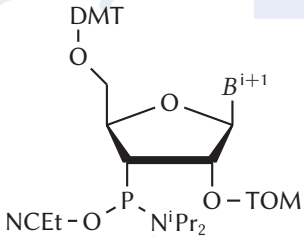


Oxidation

Kettenverlängerung

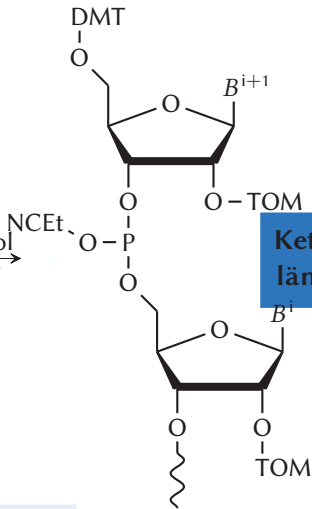
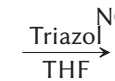
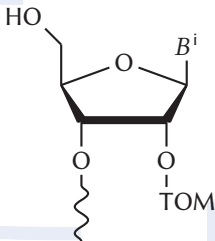
Capping

5'-Entschützung



Oxidation

+

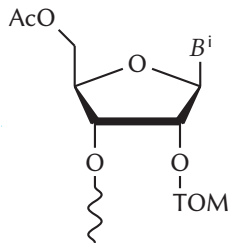
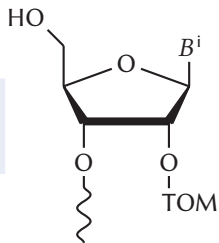


Kettenverlängerung

Capping

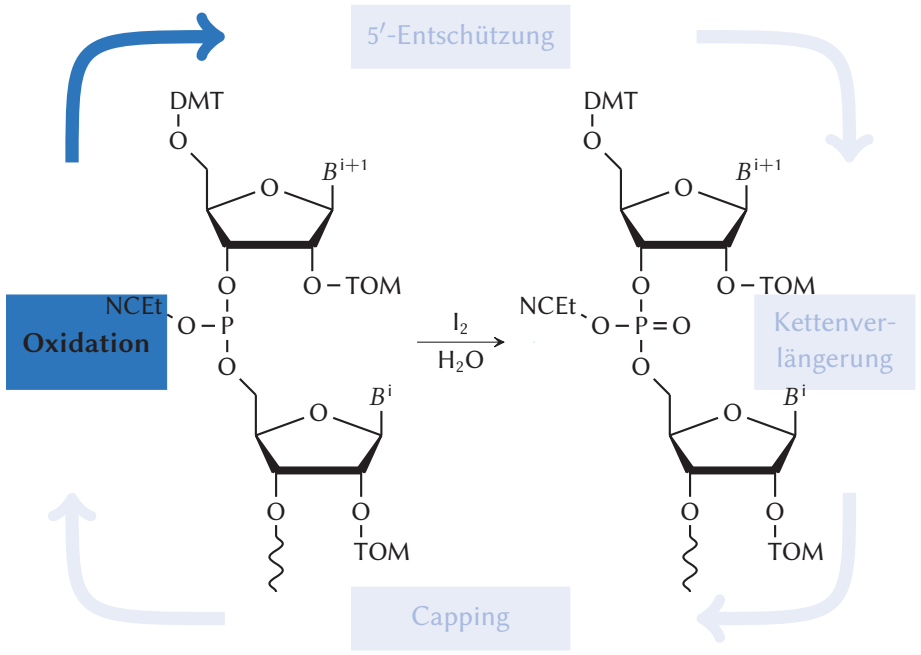
5'-Entschützung

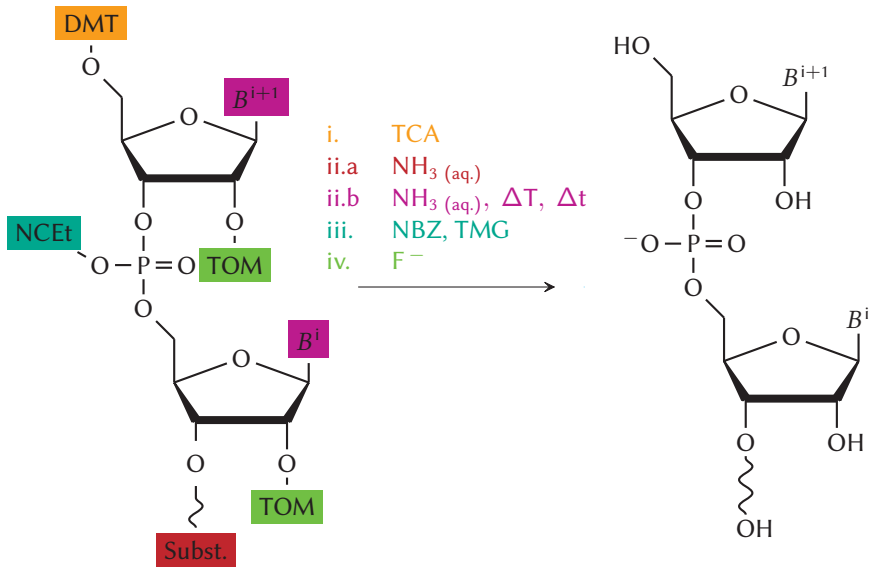
Oxidation



Kettenverlängerung

Capping





Reinigung und Charakterisierung

Reinigung

- Reverse-phase cartridge purification, RP1 ($\approx 80\%$)
- HPLC ($\approx 90\%$)
- Gelelektrophorese, PAGE ($\leq 99\%$)

Ausbeute: IR-Absorbanz

$$\log(I_0/I) = \epsilon d c$$

$$\epsilon \approx \sum_i \epsilon(B_i)$$

Verfolgung: ^{31}P -NMR




- Reaktionsfortschritt
- $3' \rightarrow 5'$ oder $2' \rightarrow 5'$?

Ausblick und Zusammenfassung

- Etabliertes Forschungsgebiet mit absehbarer kommerzieller Bedeutung
- 10 nmol eines 30-Oligomers für ≤ 5 € innerhalb weniger Tage erhältlich¹
- Quasi-quantitative Ausbeute bei Teilschritten essentiell
- Hochdimensionale Schutzgruppenkonzepte, insb. bei RNA-Synthese
- Festphasensynthese Stand der Technik
- Potentielle Anwendungen in Medizin und Technik

¹Anfrage bei Distribio am 14. Juni 2011, <http://www.distribio.com>.

Literaturempfehlungen

-  Michelson, A. M. *The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*; Academic Press: London and New York, 1963.
-  Cramer, F. *Angew. Chem.* **1966**, 78, 186–198.
-  Reese, C. B. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3851–3868.

Referenzen siehe Handout.
<http://ocf.klammler.eu>