

Gotthard Kowollik und Peter Langen

Nucleotidanaloge Thymidinsulfate

Aus dem Institut für Biochemie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch

(Eingegangen am 17. Februar 1966)

Bei der Reaktion von Thymidin mit Chlorsulfonsäure, SO_3 -Pyridin oder SO_3 -Triäthylamin in verschiedenen Molverhältnissen werden nebeneinander die Nucleotidanalogen Thymidin-5'-sulfat, -3'-sulfat und -3',5'-disulfat erhalten und deren jeweilige Anteile in den Reaktionsprodukten bestimmt. Der Monosulfat-Anteil besteht überwiegend aus Thymidin-5'-sulfat, das wie Thymidin-3',5'-disulfat als Na-Salz isoliert wird. Die beiden Monosulfate werden außerdem aus 3'- bzw. 5'-geschützten Thymidinen dargestellt. — Die Thymidinsulfate hemmen die Abspaltung von Phosphat aus 5'-Nucleotiden durch Enzyme der Kern-, Mitochondrien- und Mikrosomen-Fraktion aus Mäuseleber. Die Reihenfolge ihrer Hemm-Wirksamkeit ist bei den Enzymen verschiedener Herkunft teilweise recht unterschiedlich. Die Phosphatabspaltung aus Desoxyribonucleotiden wird wesentlich stärker gehemmt als diejenige aus Ribonucleotiden.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über Thymin-Antimetabolite haben wir die Schwefelsäureester des Thymidins (TdR)*) hergestellt und biochemisch untersucht in der Annahme, daß sie als Antagonisten der entsprechenden Phosphate, insbesondere des als DNS-Precursor wichtigen Thymidin-5'-monophosphats, wirken könnten. Eine Hemmung der DNS-Synthese durch die Sulfate fanden wir jedoch nicht, so daß offenbar die anabolen Umsetzungen von Thymin-Nucleotiden nicht durch diese Verbindungen beeinflusst werden. Dagegen wirken die Thymidinsulfate als Nucleotid-Antagonisten auf einige Enzyme, die Phosphat aus 5'-Nucleotiden abspalten.

Die Darstellung nucleotidanaloger Nucleosidsulfate ist erst in neuerer Zeit erfolgreich versucht worden. Erste Vertreter dieser Substanzklasse wurden von *Egami* und *Takahashi*¹⁾ dargestellt, die durch Umsetzung von Adenosin mit Chlorsulfonsäure Isomerenmische von Adenosinsulfaten erhielten. *Huber* sowie *Arnold* und *Price*²⁾ konnten aus 2',3'-Isopropyliden-nucleosiden mit Chlorsulfonsäure unter nachfolgender Abspaltung der Schutzgruppe erstmals in ihrer Struktur gesicherte Nucleosidsulfate (Adenosin- bzw. Cytidin-5'-sulfat) darstellen. Als bisher einziges Desoxyribonucleosid haben *Wigler* und *Choi*³⁾ 5-Fluor-desoxyuridin (FUdR) mit SO_3 -Pyridin sulfatiert. Mittels Papierchromatographie ließen sich die entstandenen Sulfate auftrennen und durch Umsetzung von 5'- bzw. 3'-geschütztem FUdR mit SO_3 -Pyridin auch die beiden isomeren 3'- bzw. 5'-Monosulfate rein erhalten.

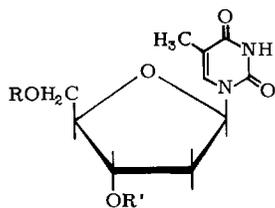
*) Abkürzungen: TdR Thymidin, FUdR 5-Fluor-desoxyuridin.

1) *F. Egami* und *N. Takahashi*, Bull. chem. Soc. Japan **28**, 666 (1955).

2) *G. Huber*, Chem. Ber. **89**, 2853 (1956); *J. Arnold* und *T. D. Price*, J. Amer. chem. Soc. **84**, 1406 (1962).

3) *P. W. Wigler* und *H. U. Choi*, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1636 (1964).

Bei der Sulfatierung von TdR sind — analog FUdR — drei Schwefelsäureester zu erwarten: TdR-5'-Sulfat (1), TdR-3'-Sulfat (2) und TdR-3',5'-Disulfat (3).



	R	R'	Name
	H	H	Thymidin (TdR)
1	SO ₃ H	H	TdR-5'-Sulfat
2	H	SO ₃ H	TdR-3'-Sulfat
3	SO ₃ H	SO ₃ H	TdR-3',5'-Disulfat
4	H	COCH ₃	3'-O-Acetyl-TdR
5	SO ₃ H	COCH ₃	3'-O-Acetyl-TdR-5'-sulfat
6	COCH ₃	SO ₃ H	5'-O-Acetyl-TdR-3'-sulfat
7	COCH ₃	COCH ₃	3',5'-O-Diacetyl-TdR

Für unsere biochemischen Versuche waren wir zunächst an einem Produkt mit möglichst hohem Gehalt an 1 bzw. an reinem 3 besonders interessiert. Mit diesem Ziel haben wir TdR in verschiedenen Molverhältnissen mit Chlorsulfonsäure behandelt. Desoxyribonucleoside waren bisher mit Chlorsulfonsäure noch nicht sulfatiert worden⁴⁾. Weiterhin haben wir TdR auch mit SO₃-Pyridin und mit dem als mild⁵⁾ und selektiv⁶⁾ bezüglich der Veresterung primärer OH-Gruppen geltenden Sulfatierungsmittel SO₃-Triäthylamin umgesetzt.

Arnold und Price²⁾ sowie Wigler und Choi³⁾ hatten gefunden, daß bei der Sulfatierung die primäre Hydroxygruppe (an C-5') gegenüber einer sekundären Hydroxygruppe (an C-3' oder/und C-2') bevorzugt reagiert. Die größere Reaktionsfreudigkeit der primären Hydroxygruppe in Nucleosiden, z. B. bei Umsetzung mit Tritylchlorid, ist lange bekannt. So entstehen aus TdR bei Acetylierungen (mit Acetanhydrid⁷⁾ bzw. O-acetylierten Cyclohydroxamsäuren⁸⁾ oder bei Sulfonylierungen (mit Tosylchlorid^{9,10)} oder p-Nitro-benzol-sulfochlorid¹⁰⁾ überwiegend oder ausschließlich die entsprechenden 5'-substituierten Derivate.

Danach konnte vermutet werden, daß auch bei der Sulfatierung von TdR vorzugsweise die primäre Hydroxygruppe reagiert und der Monosulfatanteil überwiegend aus 1 besteht. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, ist das tatsächlich der Fall. Bei einem genügend großen Überschuß an SO₃-Pyridin bzw. Chlorsulfonsäure fällt 1 sogar als alleinige Monosulfatkomponente an, da das in geringer Menge gebildete 2 offenbar schnell zu

4) Nach Abschluß unserer Untersuchungen gelangte uns eine kurze Veröffentlichung von K. L. Agarwal und M. M. Dhar, *Experientia* [Basel] **21**, 432 (1965), zur Kenntnis, in der ein Versuch zur spezifischen Sulfatierung der 5'-OH-Gruppe von TdR mittels Chlorsulfonsäure in einem verhältnismäßig großen Lösungsmittelvolumen Acetonitril beschrieben wird. Obwohl die Autoren offenbar keine Bildung von 3 beobachtet haben, finden sie chromatographisch im Reaktionsprodukt neben 10% nicht umgesetztem TdR und 75% 1 aber auch 15% 2. Außer R_F-Werten werden keine physikalischen Daten für 1 und 2 angegeben.

5) E. E. Gilbert, *Chem. Reviews* **62**, 549 (1962).

6) E. Meezan, A. H. Olavesen und E. A. Davidson, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **83**, 256 (1964).

7) P. T. Gilham und H. G. Khorana, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 6212 (1958).

8) Y. Mizuno, T. Itoh und H. Tagawa, *Chem. and Ind.* **1965**, 1498.

9) E. J. Reist, A. Benitez und L. Goodman, *J. org. Chemistry* **29**, 554 (1964).

10) G. Kowollik, unveröffentlicht.

3 weiterreagiert. Bei einem noch größeren Überschuß an Sulfatierungsmitteln wird ausschließlich **3** gebildet, das leicht in reiner Form (als Na-Salz) isoliert und identifiziert werden kann. Unter den angewandten Reaktionsbedingungen ist dafür eine 4-fach molare Menge an SO₃-Pyridin oder eine 3-fach molare Menge an Chlorsulfonsäure erforderlich. Aus dem Molverhältnis $\frac{1+3}{2+3}$ ergibt sich³⁾, daß SO₃-Pyridin die primäre Hydroxygruppe von TdR selektiver als Chlorsulfonsäure sulfatiert. Die Selektivität sinkt mit steigendem Überschuß an Sulfatierungsmittel in beiden Fällen ab.

Tab. 1. Direkte Sulfatierung von Thymidin (TdR)

Versuch*) Nr.	Molverhältnis	Mol-% im Reaktionsprodukt**)				Mol-% 1 im Monosulfat-Anteil	Verhältnis $\frac{1+3}{2+3}$
		TdR	1	2	3		
TdR/SO ₃ -Pyridin							
1	1:1	70	22	6	2	79	3.0
2	1:2	21	51	8	20	86.5	2.5
3	1:2.5	4	50	4	42	93	2.0
4	1:3	—	26	—	74	100	1.35
5	1:4	—	—	—	100	—	1.0
TdR/Chlorsulfonsäure							
6	1:1	56	28	16	—	64	1.75
7	1:2	19	41	13	27	76	1.7
8	1:2.5	—	13	—	87	100	1.15
9	1:3	—	—	—	100	—	1.0

*) Reaktionsbedingungen: Versuche 1–5 48 Stdn. bei Raumtemperatur, Versuche 6–9 24 Stdn. bei 2°.

**) Berechnet unter der Annahme gleicher Extinktionskoeffizienten bei 260 nm.

In der Literatur gibt es eine Reihe von Hinweisen¹¹⁾, daß mit dem gegenüber SO₃-Pyridin schwächeren Sulfatierungsmittel SO₃-Triäthylamin⁵⁾ eine größere Selektivität bezüglich der Veresterung einer primären Hydroxygruppe erzielt werden kann. Wir konnten das aber bei Umsetzung von TdR mit SO₃-Triäthylamin in Dimethylformamid/Benzol/Pyridin nicht beobachten. Unter diesen Bedingungen enthielt das Sulfatgemisch zwar vorwiegend **1**, aber neben wenig **3** auch erhebliche Anteile an **2**.

Für die analytische Trennung der Reaktionsprodukte erwies sich die Papier- und Dünnschichtchromatographie als geeignet. Die Schwefelsäureester werden hierbei in Form ihrer Na-Salze eingesetzt, da sich die sauren Sulfate leicht zersetzen. Die isomeren Monosulfate **1** und **2** lassen sich nur schwer trennen.

Von mehreren geprüften Lösungsmittel-Gemischen eignete sich dazu bei der Papierchromatographie Isopropylalkohol/Wasser (8:2) (A) und bei der Durchlaufchromatographie auf Papier oder bei der Dünnschichtchromatographie auf Cellulose n-Butanol/Eisessig/Wasser (5:2:3) (B). Die einzelnen Substanzen wurden zunächst durch Vergleich mit den relativen Wanderungsgeschwindigkeiten der entsprechenden FUDR-Sulfate³⁾ in Laufmittel A identifiziert. Später konnte die so getroffene Zuordnung durch Vergleich mit dem auf eindeutigen Wege synthetisierten **1** und **2** bestätigt werden.

Die präparative Trennung der Reaktionsgemische in TdR, Monosulfatgemisch und **3** gelingt leicht an einem stark basischen Anionenaustauscher wie z. B. Dowex-1 in der Cl[⊖]-Form. Mit Wasser wird TdR, mit *n*/10 HCl das Gemisch von **1** und **2** und mit *n* HCl **3** eluiert.

¹¹⁾ Vgl. die in l. c.⁶⁾ angegebenen Beispiele; A. H. Olavesen und E. A. Davidson, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **101**, 245 (1965).

Die Struktur der so auf direktem Wege aus TdR erhaltenen Monosulfate haben wir durch Synthese aus spezifisch geschützten Thymidinen gesichert. Zur Darstellung von **2** wurde 5'-O-Trityl-TdR¹²⁾ in Pyridin mit Chlorsulfonsäure bei 0° oder mit SO₃-Pyridin bei Raumtemperatur umgesetzt und aus dem entstandenen 5'-O-Trityl-TdR-3'-sulfat (Pyridiniumsalz) ohne vorherige Isolierung die Schutzgruppe durch kurzzeitiges Erhitzen mit 80-proz. Essigsäure abgespalten. Nach Neutralisation mit Natronlauge wird das Na-Salz von **2** als chromatographisch einheitliches Produkt erhalten.

1 sollte durch Sulfatierung von 3'-O-Acetyl-TdR (**4**)¹³⁾ und dessen Entacetylierung zugänglich sein. Bei der Sulfatierung von **4** mit SO₃-Pyridin, SO₃-Triäthylamin oder Chlorsulfonsäure werden in Abhängigkeit von den Molverhältnissen der Reaktionspartner neben dem erwarteten 3'-O-Acetyl-TdR-5'-sulfat (**5**) und nicht umgesetztem **4** überraschenderweise bereits unterschiedliche Mengen **1** und teilweise TdR erhalten (s. Beispiele in Tab. 2).

Tab. 2. Sulfatierung von **4** mit SO₃-Pyridin

Molverhältnis 4/SO ₃ -Pyridin	TdR	Mol-% im Reaktionsprodukt		
		4	5	1
1 : 1	14	51	29	6
1 : 2	—	23	61	16
1 : 2.5	—	13	71	16
1 : 3.5	—	—	52	48
1 : 5	—	—	46	54
1 : 10	—	—	2	98

Offensichtlich tritt also schon während der Reaktion eine teilweise Entacetylierung ein. Esterspaltungen bei Sulfatierungen z. B. von Fettsäureestern mit SO₃ wurden in wenigen Fällen beobachtet⁴⁾, sind aber unseres Wissens bei Sulfatierungen mit SO₃-Amin-Komplexen oder Chlorsulfonsäure noch nicht beschrieben worden.

Die erhaltenen Substanzen wurden durch Klärung ihrer gegenseitigen Beziehungen mittels Acetylierung und Entacetylierung identifiziert. Zu Vergleichszwecken haben wir durch Acetylierung von **2** das zu **5** isomere 5'-O-Acetyl-TdR-3'-sulfat (**6**) dargestellt, das ein ähnliches chromatographisches Verhalten wie **5** zeigt (Tab. 4).

Wie aus Tab. 2 hervorgeht, nimmt bis zur 2.5-fach molaren Menge an SO₃-Pyridin der Anteil an **5** im Reaktionsprodukt zu, fällt aber bei weiter gesteigertem Überschuß schnell ab. Ursache dafür ist die zunehmende Entacetylierung von **5** zu **1**. Die Entacetylierung der Ausgangssubstanz (**4**) spielt dabei eine ganz untergeordnete Rolle, da TdR nur bei einem 1 : 1-Verhältnis in geringem Prozentsatz gebildet wird und dessen Sulfatierungsprodukt **2** nicht auftritt. Bei einem ca. 10-fachen Überschuß an SO₃-Pyridin werden neben Spuren von **5** 98% **1** erhalten, das aus dem angegebenen Grunde seine Entstehung ganz vorwiegend der Entacetylierung des intermediär gebildeten **5** verdankt. Die Ausbeute an isoliertem **1** ist aber viel geringer, da unter diesen Bedingungen noch andere Zersetzungen auftreten, die eine

¹²⁾ J. Beránek und J. Piíha, Collect. czechoslov. chem. Commun. **29**, 625 (1964).

¹³⁾ A. M. Michelson und A. R. Todd, J. chem. Soc. [London] **1953**, 951.

starke Verfärbung der Reaktionsmischung bedingen. Eine Isolierung von **1** ist unter diesen Bedingungen schwierig, weil die gefärbten Zersetzungsprodukte nur über eine verlustreiche Behandlung mit Aktivkohle entfernt werden können.

Zur Darstellung von **1** aus **4** wählt man deshalb günstiger ein mittleres Molverhältnis von $4/\text{SO}_3$ -Pyridin (etwa 1:3,5 bis 1:5), wobei das Reaktionsprodukt zwar aus **5** und **1** besteht, aber mit Natronlauge bei pH 12 leicht zu chromatographisch einheitlichem **1** entacetyliert werden kann. Das zweite Monosulfat mit dem niedrigeren R_F -Wert (Tab. 4), das bei direkter Sulfatierung von TdR erhalten wird (Versuche 1 bis 4 und 6 bis 8 in Tab. 1), erweist sich bei chromatographischem Vergleich als identisch mit dem auf dem eben beschriebenen Wege gewonnenen Na-Salz von **1**. Diese Feststellung eröffnet einen präparativ einfachen Weg zur Darstellung von **1** direkt aus TdR, denn unter bestimmten Bedingungen der direkten Sulfatierung (Versuche 4 oder 8 in Tab. 1) fällt neben **3** nur **1** an, wobei die Ausbeute an **1** allerdings relativ gering ist (15–25 Mol-%). **3** läßt sich, wie oben beschrieben, von dem gewünschten **1** leicht an einer Dowex-1-Säule abtrennen.

Die Sulfate von TdR zeigen in Wasser ein Extinktionsmaximum bei 266,5 nm. Die Schwefelsäureestergruppe kann im IR-Spektrum *) an mehreren charakteristischen Banden erkannt werden: 1250/cm (breit und intensiv), um 800/cm intensive und scharfe Doppelbanden, bei 1050/cm eine starke und bei 1370–1380/cm eine schwache Bande.

Biochemische Versuche ¹⁴⁾

Nach *Arnold* und *Price*¹⁵⁾ hemmen die Ribosidsulfate des Adenins und Cytosins die Aufspaltung von Adenosin- und Cytidinmonophosphat durch Kartoffelphosphatase. Wir haben die Wirkung der drei Sulfate des Thymidins auf die Phosphat-Abspaltung aus acht Substraten unter Verwendung von Zellfraktionen der Mäuseleber als Enzymquelle untersucht. Im Vergleich dazu wurde jeweils auch die Wirkung der Adenosinmonosulfate (Isomergemisch nach l. c. ¹¹⁾) mit untersucht.

In Abbild. 1a–c ist die Wirkung der Sulfate auf die Spaltung des Desoxycytidinmonophosphats **) durch die Kern-, Mitochondrien- und Mikrosomen-Fraktion wiedergegeben. Besonders bemerkenswert ist, daß die Reihenfolge der Wirksamkeiten der verschiedenen Sulfate bei den einzelnen Zellfraktionen teilweise unterschiedlich ist.

Am deutlichsten erweist sich das bei **3**, das für die Mitochondrien-Fraktion der wirksamste Stoff ist, für die Kern-Fraktion aber zusammen mit **2** die geringste Wirksamkeit zeigt. In der Mikrosomen-Fraktion liegt die Wirksamkeit von **3** zusam-

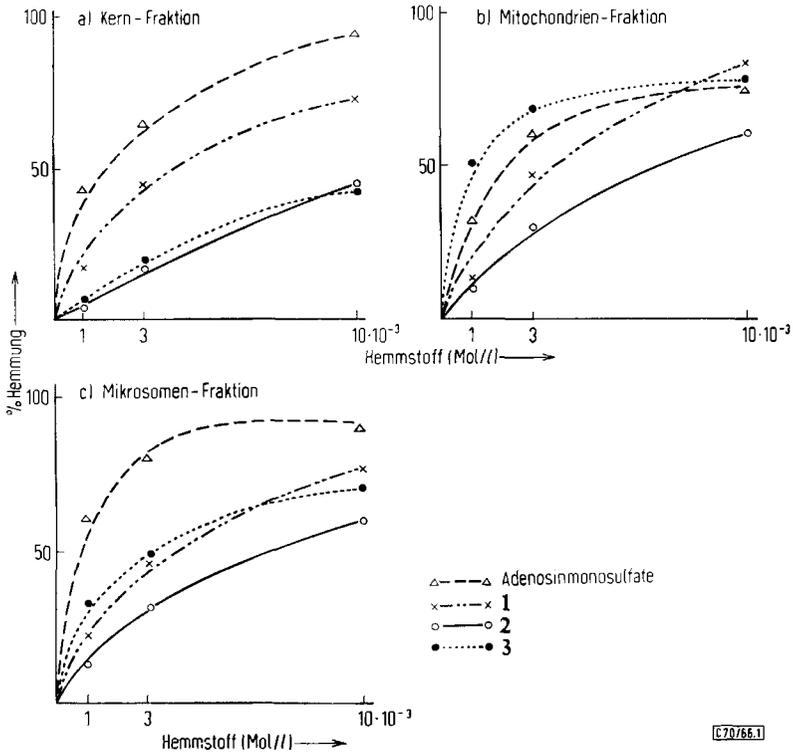
*) Aufgenommen in KBr mit einem Zeiss UR-10-Gerät; für die Aufnahme der IR-Spektren sind wir Herrn Dipl.-Phys. K. Schwarz vom Institut für Biophysik der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch, zu Dank verpflichtet.

**) Bei allen biochemischen Versuchen wurden die Nucleosid-5'-phosphate als Substrat eingesetzt.

¹⁴⁾ Über einen Teil der Versuche wurde bereits auf der Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Biochemie in der DDR in Magdeburg, Juni 1965, berichtet (Verhandlungen der Gesellschaft für experimentelle Medizin der DDR, Band 7, im Druck).

¹⁵⁾ J. Arnold und T. D. Price, *Federat. Proc.* **22**, 292 (1963).

men mit der von **1** unter der des Adenosinsulfates, aber über der von **2**. Diese Befunde weisen darauf hin, daß an der Aufspaltung der Nucleotide durch die einzelnen Zellfraktionen verschiedene Enzyme (oder Gemische davon) beteiligt sind, die sich in ihrer Hemmbarkeit unterscheiden.



Abbild. 1. Hemmwirkung der verschiedenen Schwefelsäureester auf die Phosphatabspaltung aus Desoxycytidinmonophosphat durch Enzyme der Kern-, Mitochondrien- und Mikrosomen-Fraktion aus Mäuseleber

Wir haben weiter die Wirkung der vier Sulfate auf die Aufspaltung der in Tab. 3 aufgeführten Ribo- und Desoxyribonucleotide untersucht. Das Ausmaß der Hemmwirkung ist danach bei verschiedenen Substraten stark unterschiedlich. So wird vor allem die Abspaltung von Phosphat aus den Desoxyribonucleotiden viel stärker gehemmt als diejenige aus den Ribonucleotiden. Soweit auswertbare Hemmungen vorliegen, entsprechen sie bei allen Substraten etwa den am Beispiel des Desoxycytidinmonophosphats gefundenen Regeln über die relativen Hemmeffekte der einzelnen Schwefelsäureester auf die Enzyme der verschiedenen Zellfraktionen. Die Enzyme der Kern- und Mikrosomen-Fraktion werden bei allen Substraten durch das Adenosinmonosulfat-Gemisch viel stärker als durch die verschiedenen TdR-Sulfate gehemmt. Das weist darauf hin, daß die Hemmwirkung nicht von einer strukturellen Ähnlichkeit des jeweiligen Pentoserestes in Substrat und Hemmstoff abhängt.

Da jedoch nur die Phosphatabspaltung aus Nucleotiden, nicht aber diejenige aus Fructose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat, α - und β -Glycerophosphat gehemmt wird, ist eine allgemeine strukturelle Ähnlichkeit von Substrat und Hemmstoff offenbar für die Wirkung Voraussetzung. Die TdR-Sulfate selbst werden durch die Enzyme der oben genannten Zellfraktionen nicht aufgespalten.

Tab. 3. Hemmwirkung von Schwefelsäureestern ($2 \times 10^{-3} m$) auf die Phosphatabspaltung aus verschiedenen Nucleotiden ($1 \times 10^{-3} m$) durch Enzyme der Kern-, Mitochondrien- und Mikrosomen-Fraktion aus Mäuseleber (Angaben in % Hemmung)

Substrat	Adenosin- mono- sulfate	Kern-Fraktion			Mitochondrien-Fraktion			Mikrosomen-Fraktion				
		1	2	3	Adenosin- mono- sulfate	1	2	3	Adenosin- mono- sulfate	1	2	3
Desoxycytidin- monophosphat	64	38	13	15	47	33	20	60	72	35	23	40
Cytidinmonophosphat	28	18	8	0	21	16	15	30	36	14	12	16
Desoxyadenosin- monophosphat	46	15	8	8	36	17	16	38	60	25	5	22
Adenosinmonophosphat	5	1	2	0	12	7	1	13	17	8	8	7
Thymidinmonophosphat	21	5	1	3	18	15	3	52	18	7	10	15
Uridinmonophosphat	16	6	4	3	27	15	12	24	21	7	8	0
Desoxyguanosin- monophosphat	43	15	10	9	44	26	26	68	46	25	16	22
Guanosinmonophosphat	4	0	1	0	2	10	9	7	11	0	0	0

Die Aufspaltung von Nucleotiden durch eine weitgehend gereinigte¹⁶⁾ alkalische Phosphatase oder durch die 5'-Nucleotidase aus Schlangengift wird durch die Schwefelsäureester nicht gehemmt. Nach diesen Ergebnissen scheint sich die Hemmwirkung der Sulfate auf die Phosphatabspaltung aus Nucleotiden nur auf bestimmte Enzyme zu beschränken.

Herrn Prof. Dr. K. Repke danken wir für sein förderndes Interesse an dieser Arbeit. Für die Ausführung der Elementaranalysen möchten wir Frau Dr. L. Redinger vom Institut für organische Chemie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Adlershof, für geschickte experimentelle Mitarbeit Herrn K. Gaertner sowie Herrn H. Grobe unseren Dank aussprechen.

Beschreibung der Versuche

Schmelzpunkte wurden auf dem Boëtius-Heiztisch bestimmt und sind korrigiert.

Papierchromatographie: Absteigend auf Papier Schleicher & Schüll Nr. 2043 b. Die Substanzen wurden durch ihre UV-Absorption lokalisiert. Zur quantitativen Auswertung wurde in der üblichen Weise mit Wasser eluiert und die Extinktion bei 260 nm gegen Leerwert bestimmt (s. Tab. 4).

Dünnschichtchromatographie: Mit MN Cellulose 300 (Macherey, Nagel & Co., Düren), Schichtdicke 0.25 mm (s. Tab. 4).

Sulfatierung von Thymidin (TdR)

a) Mit Chlorsulfonsäure im Molverhältnis 1 : 1 (Versuch Nr. 6, Tab. 1): Zu 0.48 g (2 mMol) TdR in 40 ccm trockenem Pyridin wird bei 0° unter Rühren langsam eine Lösung von 0.23 g

¹⁶⁾ G. Schramm und O. Armbruster, Z. Naturforsch. 9b, 114 (1954).

Tab. 4. R_F -Werte

Verbindung	Papier- chromatographie		Dünnschicht- chromatographie B*)
	A*)	B*)	
3'.5'-O-Diacetyl-TdR (7) ¹⁷⁾	—	0.85	0.90
3'-O-Acetyl-TdR (4)	0.75	0.81	0.85
Thymin (TdR)	0.65	0.68	0.70
3'-O-Acetyl-TdR-5'-sulfat (5)	0.54	0.53	0.61
5'-O-Acetyl-TdR-3'-sulfat (6)	0.50	0.50	0.60
TdR-3'-Sulfat (2)	0.47	0.41	0.50
TdR-5'-Sulfat (1)	0.43	0.40	0.47
TdR-3'.5'-Disulfat (3)	0.24	0.25	0.30

(0.13 ccm; 2 mMol) *Chlorsulfonsäure* in 3 ccm trockenem Chloroform gegeben. Das Gemisch wird 24 Stdn. bei 2° gerührt und 1 Stde. bei Raumtemperatur belassen. Danach wird i. Vak. im Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt, der Rückstand in 5 ccm Wasser aufgenommen, durch Zugabe von *n NaOH* auf pH 8 gebracht, wiederum i. Vak. eingengt und mehrmals mit absol. Äthanol nachdestilliert. Nach vollkommener Trocknung im Exsikkator wird das Reaktionsprodukt in absol. Methanol aufgenommen, die Lösung gegebenenfalls mit wenig Aktivkohle**) entfärbt und danach i. Vak. eingengt. Das so gewonnene Substanzgemisch (0.68 g) ist frei von Sulfat-Ionen. Analog wurden die anderen in Tab. 1 verzeichneten Versuche durchgeführt.

b) Mit SO_3 -Pyridin¹⁸⁾ im Molverhältnis 1:1 (Versuch Nr. 1, Tab. 1): Zu 0.48 g (2 mMol) *TdR* in 40 ccm trockenem Pyridin werden unter Rühren 0.32 g (2 mMol) SO_3 -Pyridin gegeben. Nach Auflösen des SO_3 -Pyridins läßt man 48 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Danach wird auf 0° gekühlt und langsam mit 7 ccm Wasser versetzt. Man läßt 1 Stde. bei Raumtemperatur stehen und engt dann i. Vak. zur Trockne ein. Der Rückstand wird in 5 ccm Wasser aufgenommen und die Lösung mit *n NaOH* auf pH 8 gebracht. Weitere Aufarbeitung analog a). Ausb. 0.53 g.

c) Mit SO_3 -Triäthylamin¹⁹⁾ im Molverhältnis 1:2: Zu 0.48 g (2 mMol) *TdR* in 13 ccm Dimethylformamid/Benzol (1:1) gibt man 1 ccm Pyridin und 0.72 g (4 mMol) SO_3 -Triäthylamin und rührt 20 Stdn. bei Raumtemperatur. Danach wird i. Vak. weitgehend eingengt, mit Benzol/Wasser nachdestilliert und der Rückstand mit Äther verrieben, wobei Kristallisation eintritt. Der Äther wird verworfen. Danach wird mit Chloroform verrieben und die Chloroform-Lösung ebenfalls verworfen (Beseitigung nicht umgesetzten SO_3 -Triäthylamins). Die Lösung des Rückstands in 5 ccm Wasser wird mit *n NaOH* auf pH 8 gebracht und i. Vak. zur Trockne eingengt. Weitere Aufarbeitung analog a). Ausb. 0.48 g. Das Reaktionsprodukt enthält 53 Mol-% *TdR*, 13 Mol-% 2, 27 Mol-% 1 und 7 Mol-% 3.

TdR-3'.5'-Disulfat (3), Di-Na-Salz (Versuch Nr. 5, Tab. 1): 0.48 g (2 mMol) *TdR* werden in 40 ccm trockenem Pyridin analog b) mit 1.3 g (8 mMol) SO_3 -Pyridin umgesetzt und aufgearbeitet. Ausb. 0.91 g (99%). Das Produkt wird unter Zusatz von wenig Aktivkohle aus 90-proz. Äthanol umkristallisiert. 3 gibt mit Bariumchlorid in neutraler Lösung keinen Niederschlag. Schmp. 213–214° (Zers.).

*) Laufmittel: A = Isopropylalkohol/Wasser (8:2)³⁾; B = n-Butanol/Eisessig/Wasser (5:2:3).

**) Medizinische Kohle, E. Merck AG, Darmstadt.

¹⁷⁾ Dargestellt nach A. Michelson und A. R. Todd, J. chem. Soc. [London] 1955, 816.

¹⁸⁾ H. Sisler und L. F. Audrieth, Inorg. Syntheses 2, 173 (1946).

¹⁹⁾ R. Cherniak und E. A. Davidson, J. biol. Chemistry 239, 2986 (1964).

UV (H₂O): λ_{\max} 266.5, λ_{\min} 234 nm (ϵ_{260} = 8300).

Na₂C₁₀H₁₂N₂O₁₁S₂ (446.3) Ber. C 26.89 H 2.70 N 6.28 S 14.38
Gef. C 27.28 H 2.76 N 6.39 S 14.38*)

Das *Disulfat* bleibt bei 1 stdg. Erhitzen in *n*/100 HCl auf 80° unverändert, während in *n*/10 HCl bei 50° schon nach 2 Min. Hydrolyse (unter bevorzugter Bildung von 1) einsetzt.

TdR-3'-Sulfat (2), *Na-Salz*

a) Mit *Chlorsulfonsäure*: Zu 2.9 g (6 mMol) *5'-O-Trityl-TdR*¹²⁾ in 40 ccm trockenem Pyridin werden unter Rühren bei 0° vorsichtig 0.70 g (0.40 ccm; 6 mMol) *Chlorsulfonsäure* getropft. Die Lösung wird über Nacht bei 2° gerührt, danach in 600 ccm Eiswasser eingetropt, die wäsr. Lösung i. Vak. zur Trockne eingengt und der Rückstand 5 Min. mit 30 ccm 80-proz. *Essigsäure* unter Rückfluß erhitzt. Danach wird wiederum i. Vak. eingengt, mehrfach mit absol. Äthanol nachdestilliert, der Rückstand in 75 ccm Wasser suspendiert, daraus das Triphenylcarbinol mehrfach mit Äther extrahiert, die wäsr. Lösung mit *n NaOH* auf pH 8 gebracht, i. Vak. eingengt und der Rückstand über Silicagel i. Vak. getrocknet. Das *Schwefelsäureester-Salz* wird mit siedendem Methanol aus dem Rohprodukt extrahiert, die methanol. Lösung i. Vak. eingengt und der Rückstand mit 10 ccm 90-proz. Äthanol digeriert. Das dabei unlöslich bleibende Produkt wird isoliert und unter Zusatz von wenig Aktivkohle aus 90-proz. Äthanol umkristallisiert. Ausb. 0.91 g (44%), Schmp. 200–201° (Zers.). 2 gibt mit Bariumchlorid in neutraler Lösung keinen Niederschlag.

UV (H₂O): λ_{\max} 266.5, λ_{\min} 234 nm (ϵ_{260} = 8400).

NaC₁₀H₁₃N₂O₈S (344.3) Ber. C 34.88 H 3.81 N 8.14 S 9.32
Gef. C 35.16 H 4.00 N 7.95 S 9.04

b) Mit *SO₃-Pyridin*: 2.9 g (6 mMol) *5'-O-Trityl-TdR*¹²⁾ in 40 ccm trockenem Pyridin werden mit 4.8 g (30 mMol) *SO₃-Pyridin* versetzt und 48 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird in 600 ccm Eiswasser gegossen und wie unter a) aufgearbeitet. Ausb. 0.52 g (25%), identisch mit dem nach a) erhaltenen Produkt.

Acetat (6), *Na-Salz*: Schmp. ab 161° (unscharf).

NaC₁₂H₁₅N₂O₈S (386.3) Ber. N 7.25 Gef. N 6.81

Sulfatierung von 3'-O-Acetyl-TdR (4)

a) Mit *Chlorsulfonsäure im Molverhältnis 1:1*: Zu 0.57 g (2 mMol) 4 in 40 ccm trockenem Pyridin wird bei 0° unter Rühren langsam eine Lösung von 0.23 g (0.13 ccm; 2 mMol) *Chlorsulfonsäure* in 3 ccm Chloroform getropft. Das Gemisch wird 24 Stdn. bei 2° gerührt. Nach Zugabe von 4 ccm *n NaOH* wird i. Vak. im Rotationsverdampfer eingengt, mehrfach mit absol. Äthanol nachdestilliert, der Rückstand mit absol. Methanol bei Raumtemperatur extrahiert, der Auszug mit wenig Aktivkohle behandelt und i. Vak. eingengt. Ausb. 0.52 g. Das hygroskopische Reaktionsprodukt enthält 57 Mol-% 4, 16 Mol-% *TdR*, 22 Mol-% 5 und 5 Mol-% 1**). Analog entstehen mit der 5-fach molaren Menge *Chlorsulfonsäure* 78 Mol-% 5 und 22 Mol-% 1 und mit der 10-fach molaren Menge 99 Mol-% 1. Bezüglich der Aufarbeitung zu 1 s. unten.

b) Mit *SO₃-Pyridin im Molverhältnis 1:3.5*: 0.57 g (2 mMol) 4 in 40 ccm trockenem Pyridin und 1.11 g (7 mMol) *SO₃-Pyridin* werden 48 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zusatz von 15 ccm *n NaOH* wird 1 Stde. stengelassen. Nach Abtrennung von ausgeschiedenem Na₂SO₄ wird i. Vak. im Rotationsverdampfer eingengt, der Rückstand mit

*) Bestimmt nach 2stdg. Hydrolyse mit 2*n* HCl in der Siedehitze; ebenso wurde bei 1 und 2 verfahren.

**) Ebenso wie die folgenden Angaben unter der Annahme gleicher molarer Extinktionen bei 260 nm berechnet.

Methanol behandelt und die methanol. Lösung mit möglichst wenig Aktivkohle weitgehend entfärbt. Ausb. 0.54 g. Analog wurden die anderen in Tab. 2 verzeichneten Versuche durchgeführt.

Entacetylierung: 250 mg des Sulfatierungsproduktes aus **4** und *SO*₃-Pyridin im Molverhältnis 1 : 1 werden in 15 ccm Wasser gelöst, mit *n NaOH* auf pH 12 gebracht und 30 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Danach wird mit verd. Schwefelsäure neutralisiert, i. Vak. zur Trockne eingeeengt und das Reaktionsprodukt durch Aufnehmen in absol. Methanol von Na₂SO₄ befreit. Je 300 µg Ausgangsprodukt und Entacetylierungsprodukt werden papierchromatographisch mit Laufmittel B aufgetrennt. Nach Elution werden für die einzelnen Substanzen bei 260 nm (Vol. = 2 ccm, d = 1 cm) folgende Extinktionen gefunden: im Ausgangsprodukt für **4** 0.640, für TdR 0.288, für **5** 0.324 und für **1** 0.084; im Entacetylierungsprodukt für TdR 0.835 und für **1** 0.415. Danach sind übergegangen **4** in TdR und **5** in **1**. Die Reaktionsprodukte von **4**, die man bei anderen molaren Verhältnissen mit *SO*₃-Pyridin erhält (Tab. 2), können analog entacetyliert werden.

Acetylierungen: Je 250 mg der Reaktionsprodukte aus **4** und *SO*₃-Pyridin im Molverhältnis 1 : 1 oder 1 : 5 (Tab. 2) werden in je 8 ccm trockenem Pyridin gelöst und mit 1 ccm *Acetanhydrid* versetzt. Nach 20stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur wird i. Vak. weitgehend eingeeengt, der Rückstand mit Äther verrieben, die äther. Lösung verworfen, der verbleibende Rückstand getrocknet und papierchromatographisch untersucht. Erwartungsgemäß gehen TdR und **4** in **7** und **1** in **5** über, während **5** unverändert bleibt.

TdR-5'-Sulfat (1), Na-Salz

a) Aus **4**: Wie vorstehend beschrieben, wird **4** mit der 3.5-fach molaren Menge *SO*₃-Pyridin umgesetzt. Das im Reaktionsprodukt neben **1** enthaltene **5** (Tab. 2) wird mit *Natronlauge* bei pH 12 entacetyliert. Man erhält ein gelbbraunes Rohprodukt, in dem chromatographisch nur das *Na-Salz von 1* nachweisbar ist. Das Produkt wird mit etwas Methanol verrührt und die Lösung vom zähen braunen Rückstand abgossen. Nach Einengen i. Vak. wird die Lösung des Rückstands in wenig Methanol in der Siedehitze mit Isopropylalkohol bis zur eben eintretenden Fällung versetzt. Man behandelt mit Aktivkohle und engt wieder restlos ein. Diese verlustreichen Operationen müssen mehrfach wiederholt werden, bis das in der Kälte aus der Methanol/Isopropylalkohol-Lösung amorph ausfallende Produkt nur noch ganz schwach gelb gefärbt ist. Das so erhaltene Na-Salz von **1** ist nach spektroskopischem und analytischem Befund zu 90–95% rein.

b) Aus TdR: 3.0 g (12.4 mMol) TdR in 250 ccm trockenem Pyridin versetzt man unter Rühren mit 6.0 g (37.7 mMol) *SO*₃-Pyridin und rührt 48 Std. bei Raumtemperatur. Danach werden unter Eiskühlung 120 ccm Wasser zugesetzt. Die wäbr. Lösung wird 1 Stde. bei Raumtemperatur belassen und i. Vak. vollkommen eingeeengt. Die weitere Aufarbeitung geschieht analog der oben beschriebenen Umsetzung von TdR mit Chlorsulfonsäure. Ausb. 4.9 g Gemisch von **1** und **3** (Tab. 1). Das Produkt wird in 100 ccm Wasser an einer Dowex-1-Säule (Cl[⊖]-Form, 50–100 mesh, Säulendurchmesser 25 mm, Füllhöhe 560 mm) mit *n/10 HCl* chromatographiert. Die Fraktionen 15–40 von je 100 ccm werden vereinigt, mit *Natronlauge* neutralisiert und i. Vak. im Rotationsverdampfer eingeeengt. Der im Exsikkator getrocknete Rückstand wird mit 100 ccm absol. Methanol geschüttelt, die methanol. Lösung zur Trockne eingeeengt und der Rückstand mit 30 ccm absol. Methanol behandelt. Diese Prozedur wird so lange mit kleineren Mengen Methanol wiederholt, bis die Substanz chloridfrei ist. Ausb. 0.81 g (12%). Schmp. ab 195° (unscharf), Zers.-P. 230–231°. **1** gibt mit Bariumchlorid in neutraler Lösung keinen Niederschlag.

UV (H₂O): λ_{max} 266.5, λ_{min} 234.5 nm (ε₂₆₀ = 7900).

NaC₁₀H₁₃N₂O₈S (344.3) Ber. N 8.14 S 9.32 Gef. N 7.64 S 9.26

Durch weitere Elution mit n HCl wird in den Fraktionen 52–80 **3** erhalten, das analog von Cl[⊖] befreit werden kann. Gemäß dem Extinktionsverhältnis der **1** oder **3** enthaltenden Fraktionen errechnet sich ein Gehalt von 29 Mol-% **1** und 71 Mol-% **3** im Ausgangsmaterial (chromatographisch werden bestimmt: 26 Mol-% **1** und 74 Mol-% **3**).

Biochemische Versuche

Mäuseleber wurde mit der 5-fachen Menge 0.25 m Saccharose-Lösung in einem Potter-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde zur Entfernung von Bindegewebsbestandteilen durch ein Sieb gerührt und dann fraktioniert zentrifugiert (Kern-Fraktion: Sediment bei $650 \times g$ für 15 Min., Mitochondrien-Fraktion: Sediment bei $8000 \times g$ für 15 Min., Mikrosomen-Fraktion: Sediment bei $100\,000 \times g$ für 90 Min.). Die Kern- und Mitochondrien-Fraktion wurden je einmal mit der zum Homogenisieren benutzten Menge Saccharose-Lösung gewaschen. Der partikelfreie Überstand von $100\,000 \times g$ enthielt kaum noch Nucleotid-spaltende Aktivität.

Zur Verwendung als Enzymquellen wurde jeweils die 1 g Leber äquivalente Menge der 3 Fraktionen in 3.5 ccm (Kern-Fraktion) bzw. in 1 ccm Saccharose-Lösung (Mitochondrien- und Mikrosomen-Fraktion) suspendiert. Die einzelnen Inkubations-Ansätze enthielten: 0.1 ccm $5 \times 10^{-3} m$ Substrat-Lösung, 0.1 ccm $5 \times 10^{-3} m$ MgCl₂-Lösung, 0.1 ccm 0.5 m Trispuffer pH 7.4, 0.1 ccm Hemmstoff-Lösung oder Wasser und 0.1 ccm Enzymsuspension. Die Inkubation erfolgte bei 37°. Es wurde jeweils ein Ansatz ohne Substrat mitgeführt, um die endogene Phosphat-Freisetzung zu messen. Die Ergebnisse sind um diesen Leerwert korrigiert, der bei ungehemmter Aufspaltung etwa 50% des Meßwertes betrug. Nach 15 und 30 Min. Inkubation wurde die Umsetzung durch Zugabe von 1 ccm 0.33 m Trichloressigsäure unterbrochen und nach Abzentrifugieren der Fällung in 1 ccm des Überstandes das freigesetzte Phosphat bestimmt (colorimetrische Phosphat-Bestimmung nach *Bosse*²⁰ mit der Abweichung, daß die Farbentwicklung in einem Vol. von 5 ccm ausgeführt wurde). Da die prozentuale Hemmung nach 15 und 30 Min. Inkubation etwa gleich groß war, wurde sie aus dem Mittel der beiden Werte errechnet. Die Abweichung der beiden Einzelwerte von diesem Mittel betrug im allgemeinen weniger als 5%. Es wurde innerhalb der gewählten Inkubationszeiten eine etwa 20–50-proz. Aufspaltung der Substrate erreicht.

²⁰ Beschrieben in *K. Lohmann* und *P. Langen*, *Biochem. Z.* **328**, 1 (1956).

[70/66]