

Nucleotide, II¹⁾

Über die Verseifung von Dinucleosidmonophosphorsäurephenylester und die Isomerisierung der Internucleotid-Bindung^{1a)}

Hartmut Rokos, Arthur Myles, Wolfgang Hutzenlaub und
Wolfgang Pfeleiderer*

Fachbereich Chemie der Universität Konstanz,
D-7750 Konstanz, Postfach 7733

Eingegangen am 26. Februar 1975

Die alkalische Hydrolyse der 3' → 3'-(8), 3' → 5'-(1) und 5' → 5'-Thymidylthymidinphenylester (10) verläuft unter mehr oder weniger starker Isomerisierung der Internucleotid-Bindung. Der Gehalt an den jeweils drei möglichen 3' → 3'-(6), 3' → 5'-(5) und 5' → 5'-Thymidylthymidinen (4) wird quantitativ auf chromatographischem bzw. enzymatischem Wege bestimmt. Die größte Isomerisierungstendenz zeigt das 3' → 3'-Isomere 8. Ein Mechanismus dieser Umwandlungsreaktionen wird diskutiert.

Nucleotides, II¹⁾

Saponification of Phenyl Dinucleoside Monophosphates and Isomerisation of the Internucleotidic Bond

Alkaline hydrolysis of the 3' → 3'-(8), 3' → 5'-(1), and 5' → 5'-thymidylthymidine phenylester (10) leads to more or less isomerisation of the internucleotidic linkage. The amounts of the three possible 3' → 3'-(6), 3' → 5'-(5), and 5' → 5'-thymidylthymidines (4) have been determined quantitatively by chromatographical and enzymatical means, respectively. The 3' → 3'-isomer 8 shows the highest tendency for isomerisation. A mechanism of these rearrangement reactions is discussed.

Für den synthetischen Aufbau von Oligonucleotiden nach dem Triester-Verfahren kommt dem Phenylrest als Phosphorsäure-Schutzgruppe²⁻⁵⁾ insofern präparative Bedeutung zu, als seine relativ große Hydrolysebeständigkeit die selektive Abspaltung alkalilabiler Acylgruppen vom Zuckerteil des Moleküls ermöglicht. Allerdings können bei der Verseifung von internucleotidartig gebundenen Phosphorsäurephenyltriestern in Gegenwart benachbarter bzw. sterisch günstig lokalisierter freier OH-Funktionen Komplikationen auftreten. Bei der alkalischen Hydrolyse der drei isomeren Thymidylthymidinphenylester (3' → 3'-(8), -(3' → 5'-(1) und -(5' → 5'-(10) haben wir nämlich

¹⁾ I. Mitteil.: A. Myles, W. Hutzenlaub, G. Reitz und W. Pfeleiderer, Chem. Ber. 108, 2857 (1975), vorstehend. — ^{1a)} Vorgetragen auf dem 2. Symposium über Nucleinsäurekomponenten in Liblice/Tschechoslowakei, Sept. 1972.

²⁾ C. B. Reese und R. Saffhill, Chem. Commun. 1968, 767.

³⁾ J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, G. R. Owen, C. B. Reese und R. Saffhill, Chem. Commun. 1971, 869.

⁴⁾ N. J. Cusack und C. B. Reese, Tetrahedron Lett. 1973, 2209.

⁵⁾ J. H. van Boom, J. F. M. de Rooy und C. B. Reese, J. C. S. Perkin I 1973, 2513.

festgestellt, daß die Esterverseifung unter den erforderlichen Reaktionsbedingungen (0.1 N NaOH, Raumtemp.) von einer mehr oder weniger starken Isomerisierung¹⁾ der jeweiligen Internucleotidbindung begleitet ist. Um zu möglichst eindeutigen Aussagen über das Ausmaß der Isomerisierungen zu gelangen, haben wir die Hydrolysenexperimente quantitativ ausgewertet. Dazu wurde einmal das jeweilige Reaktionsgemisch chromatographisch im Laufmittelsystem n-Butanol/5 N Essigsäure (2/1) auf Merck-Cellulose-Dünnschichtplatten bzw. Schleicher & Schüll-Cellulosefolien in die drei isomeren Thymidylyl-thymidine **4**, **5** und **6** aufgetrennt und durch Abkratzen und Eluieren der entsprechenden Zonen der prozentuale Gehalt der einzelnen Komponenten aus der optischen Dichte bestimmt; als zweite, unabhängige Methode wurde zum anderen die Substratspezifität von Phosphodiesterasen genutzt. Milz-Phosphodiesterase führt unter Bedingungen, bei denen das natürliche Substrat 3' → 5'-TpT (**5**) vollständig in Thymidin und Thymidin-3'-phosphat gespalten wird, weder bei 3' → 3'-TpT (**6**)⁶⁾ noch bei 5' → 5'-TpT (**4**) zur Hydrolyse der Diesterbindung. Da die Milz-Phosphodiesterase eine 3'-Phosphatdiesterbindung und eine freie 5'-Hydroxygruppe erfordert⁷⁾, sollte bei **6** Spaltung erwartet werden; ihr Ausbleiben wurde jedoch auch bei 3' → 3'-dCpT festgestellt⁸⁾. Bei der Schlangengift-Phosphodiesterase dagegen fanden wir auch die etwa gleich gute Spaltbarkeit von 5' → 5'-TpT (**4**)⁹⁾ im Vergleich zu **5** und die Resistenz von 3' → 3'-TpT (**6**) bestätigt. Auch aus weiteren Untersuchungen an UpU-Derivaten kann geschlossen werden, daß die Milz-Phosphodiesterase weitaus höhere Anforderungen an die Spezifität des Substrates stellt als Schlangengift-Phosphodiesterase und zwar sowohl hinsichtlich Verknüpfungsart als auch Hydroxylsubstitution.

Die Endonuclease aus *Staph. aureus*, die in hoher Konzentration auch Dinucleosidmonophosphate hydrolysiert¹⁰⁾, verhält sich gegenüber den unnatürlich verknüpften TpT-Isomeren **4** und **6** wie Milz-Phosphodiesterase und spaltet nicht.

Zur Bestimmung der Hypochromie der beiden enzymatisch durch Schlangengift-Phosphodiesterase spaltbaren Thymidylyl-thymidine wurden diese direkt in der UV-Küvette hydrolysiert. Aus der Extinktionserhöhung wurde die prozentuale Hypochromie berechnet: Hypochromie (%) = $[1 - E_{267}(\text{TpT})/E_{267}(\text{TpT})] \times 100$. Beim 3' → 5'-TpT (**5**) ergaben sich in Übereinstimmung mit der Literatur¹¹⁾ 4.8%, während das 5' → 5'-TpT (**4**) 7.1% Hypochromie zeigte. Damit tritt auch bei den TpT-Isomeren, wie im Fall der verschieden verknüpften ApA-Isomeren¹²⁾, die größte Hypochromie bei der 5' → 5'-Internucleotidbindung auf.

Zur Bestimmung des Isomerisierungsgrades wurden aliquote Teile der Reaktionslösung mit Milz- bzw. Schlangengift-Phosphodiesterase bei 37°C für 6 h inkubiert. Die Auftrennung der Enzymsansätze erfolgte auf Papier im System n-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (55/10/35) und die Gehaltsbestimmung der einzelnen Komponenten durch Messung der optischen Dichte bei 267 nm nach Elution mit Wasser¹³⁾. Der durch

⁶⁾ R. L. Letsinger und K. K. Ogilvie, J. Amer. Chem. Soc. **89**, 4801 (1967); **91**, 3350 (1969).

⁷⁾ W. E. Razzell und H. G. Khorana, J. Biol. Chem. **236**, 1144 (1961).

⁸⁾ E. Ohtsuka, M. W. Moon und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 2956 (1965).

⁹⁾ W. E. Razzell und H. G. Khorana, J. Biol. Chem. **234**, 2105 (1959).

¹⁰⁾ A. J. Mikulski, E. Sulkowski, L. Stasiuk und M. Laskowski, J. Biol. Chem. **244**, 6559 (1969).

¹¹⁾ T. M. Jacob und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 368 (1965).

¹²⁾ N. S. Kondo, H. M. Holmes, L. M. Stempel und P. O. P. Ts'o, Biochemistry **9**, 3479 (1970).

¹³⁾ Wir danken Herrn Doz. Dr. H. Kössel, Univ. Freiburg, für die Überlassung der Methode und wertvolle experimentelle Hilfe und Hinweise.

Schlangengift-Phosphodiesterase nicht gespaltene Anteil entspricht dabei dem 3' → 3'-TpT (6), während er beim Enzym aus Milz der Summe von 3' → 3'-(6) und 5' → 5'-TpT (4) gleichzusetzen ist. Die rechnerisch ermittelten prozentualen Zusammensetzungen sind in der Tab. wiedergegeben und zeigen eine gute Übereinstimmung mit den auf chromatographischem Wege gefundenen Werten.

Prozentuale Isomerisierung der Internucleotidbindung bei der alkalischen Hydrolyse von Thymidylyl-thymidin-phenylester in 0.125 N NaOH/Dioxan (4/1) bei 20°C, 7 h

Eingesetzter Triester	3' → 3'-(6)	TpT-Diester 3' → 5'-(5)	5' → 5'-(4)	Bestimmungsmethode ^{a)}
8 (3' → 3')	55	38	7	a
	55	37	8	b
1 (3' → 5')	13	74	13	a
	13	75	12	b
10 (5' → 5')	6	15	71 ^{b)}	a
	5	18	70 ^{b)}	b

^{a)} a = chromatographische Trennung; b = enzymatische Spaltung.

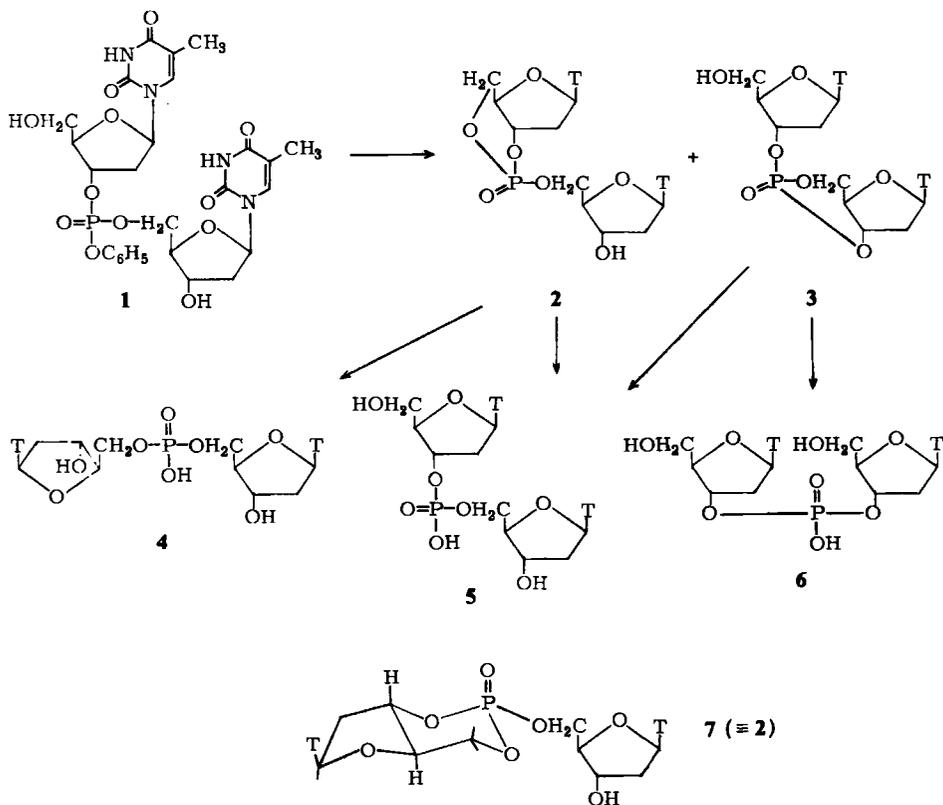
^{b)} Die restlichen 8 bzw. 7 % konnten noch nicht identifiziert werden.

Die Resultate zeigen, daß unter den angewandten Reaktionsbedingungen in teilweise beträchtlichem Ausmaße eine Isomerisierung der Internucleotid-Bindung stattfindet. Die Reaktionen müssen dabei auf der Triester-Stufe erfolgen, da sich die TpT-Diester 4, 5 und 6 unter der entsprechenden Einwirkung von Alkali als stabil erwiesen. Ein sinnvoller Mechanismus für die beobachtete Isomerisierung erfordert primär eine intramolekulare nucleophile Substitution des Phenoxyrestes, wobei die 3'- bzw. 5'-Hydroxygruppe zunächst unter Ausbildung eines cyclischen Phosphorsäuretriesters reagiert, der sich unter Öffnung des Cyclophosphatringes stabilisiert. Im Falle des Thymidylyl-(3' → 5')-thymidin-phenylesters (1) findet demzufolge neben der direkten Verseifung zum Thymidylyl-(3' → 5')-thymidin (5) Bildung der Cyclophosphate 2 und 3 statt, die bei der Hydrolyse sämtliche drei isomeren TpT 4, 5 und 6 liefern.

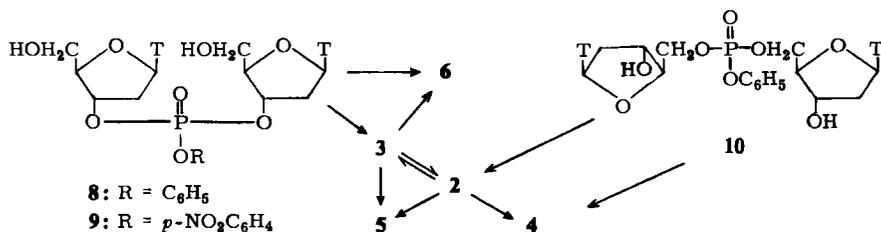
Es fällt bei dieser Reaktion ferner auf, daß sich unter den Reaktionsprodukten kein Thymidin und Thymidin-3',5'-cyclophosphat befinden, wie durch Hochspannungselektrophorese in Boratpuffer im Vergleich zu authentischen Materialien eindeutig nachgewiesen werden konnte. Dieser Befund ist nach unserer Ansicht Ausdruck der speziellen Stereochemie der cyclischen Triester, die ein sehr stark kondensiertes System (7) mit N-Typ-Konformation¹⁴⁾ im Furanose- und Sessel-Anordnung im Cyclophosphat-Ring darstellen. Man muß ferner annehmen, daß der zweite Nucleosidbaustein über eine äquatoriale Bindung mit dem Phosphoratom verknüpft ist, während der Sauerstoff die axiale Orientierung einnimmt.

Die Hydrolyse des cyclischen Triesters verläuft wohl deshalb ausschließlich unter Ringöffnung, weil nur auf diese Weise die interne Spannung, die im Übergangszustand aufgrund der partiellen Planarisierung von drei P—O-Bindungen noch verstärkt wird, drastisch vermindert werden kann.

¹⁴⁾ C. Altona und M. Sundaralingam, J. Amer. Chem. Soc. 94, 8205 (1972); 95, 2333 (1973).



Betrachtet man unter denselben Gesichtspunkten die symmetrisch verknüpften 3' → 3'- (**8**) und 5' → 5'-TpT-Triester (**10**), so sollte der Mechanismus nur Isomerisierung zum 3' → 5'-TpT (**5**) ergeben. **5** ist ohne Frage in beiden Fällen das Hauptisomerisierungsprodukt, doch darf nicht übersehen werden, daß aus **8** auch noch 7–8% **4** und aus **10** 5–6% **6** gebildet werden. Diese weitergehende Isomerisierung erfordert, soweit es sich tatsächlich um eine intramolekulare Reaktion handelt, eine zusätzliche Umesterung, bei der die jeweils noch freie Hydroxylgruppe den cyclischen Triester (**3**, **2**) unter Bildung des isomeren Typs **2** bzw. **3** angreift.



Die bei der $5' \rightarrow 5'$ -TpT-Triester-Verseifung (10) nach den beiden Bestimmungsmethoden fehlenden 7–8% entsprechen einem Produkt, dessen Struktur bis jetzt noch nicht geklärt werden konnte. Nach den chromatographischen und elektrophoretischen Untersuchungen handelt es sich aber keinesfalls um Thymidin-3',5'-cyclophosphat oder Thymidin.

Da für synthetische Zwecke die Erhaltung der Internucleotid-Verknüpfung wesentlich ist, untersuchten wir in ersten orientierenden Versuchen noch die Einwirkung von Ammoniak auf Phosphorschutzgruppen. Es zeigte sich dabei, daß die *p*-Nitrophenylgruppe als bessere Abgangsgruppe in **9** mit 4–7 N Ammoniak in wäßrigem Dioxan schon nach 1 h vollständig zu **6** abgespalten ist, während beim Phenyl-triester die Reaktionsdauer 1–2 Wochen betragen muß. In beiden Fällen findet keine Isomerisierung statt, so daß dies oftmals eine einfachere Variante gegenüber dem vorübergehenden Schutz der Hydroxylgruppen mit säurelabilen Schutzgruppen während der Hydrolyse der Phosphorschutzgruppe mit Natronlauge darstellen kann.

Weitere Untersuchungen mit entsprechender Zielsetzung sind im Gange.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir finanzielle Hilfe und der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für ein Stipendium.

Experimenteller Teil

Hydrolyse

3.1 mg (5 μ mol) des betreffenden Thymidylyl-thymidin-phenylesters (**1**, **8** oder **10**) werden in 0.2 ml Dioxan gelöst, im Thermostat bei 20°C mit 0.8 ml 0.125 N NaOH (20fach) versetzt und 7 h bei dieser Temperatur gehalten. Danach wird mit Wasser auf ca. 3 ml verdünnt und mit Dowex 50 (H^{\oplus} -Form) neutralisiert; nach Abfiltrieren des Austauscherharzes wird dieses noch mit ca. 5 ml Wasser nachgewaschen. Das Filtrat wird i. Vak. zur Trockene eingeengt und der Rückstand in 1 ml Wasser gelöst. Diese 5 mm Hydrolysenlösungen werden für die folgenden Bestimmungen verwendet.

Chromatographische Trennungen

20 μ l obiger Hydrolysenlösung werden als ca. 5 cm langer, schmaler Streifen auf eine Merck-Cellulose-Dünnschichtplatte F (20 \times 20 cm) bzw. eine DC-Fertigfolie (Schleicher & Schüll F 1440 LS 254) aufgetragen und in einem frisch hergestellten Gemisch *n*-Butanol/5 N Essigsäure (2 : 1) entwickelt. Es tritt Auftrennung in drei scharfe Banden ein, wobei das $3' \rightarrow 3'$ -TpT (**6**) den größten und das $5' \rightarrow 5'$ -Isomere **4** den kleinsten R_F -Wert aufweisen. Die Zonen werden abgekratzt, im Zentrifugenglas mit je 1 ml Wasser behandelt und bei 3500 UpM zentrifugiert. Durch Bestimmung der optischen Dichte bei 267 nm im Überstand wird (unter Verwendung des Blankwerts aus der jeweils entsprechenden, analog behandelten Celluloseschicht) der prozentuale Gehalt der betreffenden Thymidylyl-thymidine **4–6** ermittelt.

Enzymatische Spaltungen

1. Inkubationsansätze¹³⁾

a) Schlangengift-Phosphodiesterase (EC 3.1.4.1): 2–5 OD₂₆₇ (entsprechend etwa 0.1–0.3 μ mol) Diester bzw. Diestergemisch werden in 125 μ l Pufferlösung (0.004 M Tris/HCl, pH 8.9; 0.004 M MgCl₂) gelöst und nach Zugabe von 2–5 μ g Enzym (Fa. Boehringer, Mannheim) 6 h bei 37°C gehalten.

b) *Milz-Phosphodiesterase (EC 3.1.4.18)*: Es wird einer Pufferlösung, bestehend aus 30 μl 1 M Kaliumphosphat pH 6,2, 25 μl 0,1 M EDTA-Natriumsalz pH 7,0, 30 μl 1 proz. Tween 80 und 115 μl Wasser, hergestellt. 2–5 OD_{267} -Substrat werden in 20 μl dieser Pufferlösung + 115 μl Wasser gelöst, mit 2–5 μg Enzym (Fa. Worthington) versetzt und anschließend 6 h bei 37°C inkubiert.

c) *Nuclease (Staph. aureus) (EC 3.1.4.7)*: 3–5 OD_{267} (entsprechend 0,2–0,3 μmol) Diester werden in 200 μl Pufferlösung (0,025 M Tris/HCl, pH 9, 0,01 M CaCl_2) mit 100 μg Enzym (Fa. Boehringer, Mannheim) versetzt und der Ansatz 6 h bei 37°C gehalten.

2. Aufbereitung der Enzymreaktionen

a) Die Auftrennung des Inkubationsansatzes erfolgt durch absteigende Papierchromatographie im System n-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (55/10/35) auf Whatman 3 MM Papier oder durch Hochspannungselektrophorese (40–60 V/cm) in 0,1 M Boratpuffer pH 9 bzw. 0,1 M Triäthylammoniumhydrogencarbonatpuffer pH 7,5 mit einer „Esso-Varsol“ gekühlten Hochspannungselektrophorese-Apparatur.

Die unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm absorbierenden Zonen sowie ein gleich großer Streifen zur Blankwertbestimmung werden ausgeschnitten und an einer Schmalseite zur Spitze verjüngt. Die Substanz wird durch aufsteigende Chromatographie in Wasser bzw. verd. Ammoniak in der Spitze des Papierstreifens konzentriert und anschließend das Nucleosid- bzw. Nucleotid-Material durch vorsichtiges Zentrifugieren bis 2000 UpM aus dem Papier eluiert. Der als Blankwert verwendete Streifen wird vollkommen gleich behandelt. Für die Bestimmung der optischen Dichte der Substanz werden entweder das gesamte UV-Spektrum oder verschiedene substanzspezifische Wellenlängen herangezogen, wobei gegen den Blankwert in der Referenzküvette gemessen wird.

b) Zur Aufnahme der UV-Spektren diente ein Cary-Recording-Spektrophotometer, Modell 15 der Fa. Applied Phys. Corp.; die optische Dichte bei einzelnen Wellenlängen wurde mit einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II mit Monochromator M 4 Q III gemessen.

[74/75]