

Darstellung und Eigenschaften von N^3 -(3-L-Amino-3-carboxypropyl)uridin-5'-monophosphat — einem modifizierten Nucleotid aus Transfer-RNA

Frank Seela* und Friedrich Cramer

Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Chemie,
D-3400 Göttingen, Hermann-Rein-Str. 3

Eingegangen am 6. Mai 1975

N^3 -(3-L-Amino-3-carboxypropyl)uridin-5'-monophosphat (**5b**), ein durch den α -L-Aminobuttersäurerest modifiziertes Uridin-5'-monophosphat (UMP), das im Extraloop der *Escherichia coli* tRNA^{Phe} Position 47 einnimmt, wurde aus N^3 -(3-L-Amino-3-carboxypropyl)uridin (**5a**) durch Phosphorylierung mit Phosphoroxchlorid gewonnen. Die experimentellen Bedingungen für die Darstellung des Nucleosids **5a**, das durch Alkylierung von Isopropylidenuridin mit α -L-Benzamido- γ -brombuttersäure-äthylester nach Abspaltung der Schutzgruppen aus der Vorstufe **4** erhalten wurde, werden beschrieben. Der Vergleich der CD-Spektren von **5b** und UMP zeigt, daß das modifizierte Nucleotid im alkalischen eine andere Geometrie als im neutralen oder sauren Medium besitzt. Diese pH-abhängige Änderung, die bei UMP nicht beobachtet wird, beeinflußt vermutlich auch die räumliche Struktur der tRNA.

Preparation and Properties of N^3 -(3-L-Amino-3-carboxypropyl)uridine 5'-Monophosphate — a Modified Nucleotide from Transfer RNA

N^3 -(3-L-Amino-3-carboxypropyl)uridine-5'-monophosphate (**5b**), an α -L-aminobutyrate-modified uridine 5'-monophosphate (UMP), which is found at position 47 in the extra loop of *Escherichia coli* tRNA^{Phe}, was prepared from N^3 -(3-L-amino-3-carboxypropyl)uridine (**5a**) by phosphoryl chloride phosphorylation. Also described are the experimental conditions for the preparation of nucleoside **5a** which was obtained by alkylation of isopropylideneuridine with ethyl α -L-benzamido- γ -bromobutyrate and after removal of the protecting groups from the intermediate **4**. Comparison of the c. d. spectra of **5b** and UMP shows that the modified nucleotide under alkaline conditions has a geometry different from that in neutral or acidic media. This pH-dependent change, which is not observed with UMP itself, may influence the 3-dimensional structure of tRNA.

N^3 -(3-L-Amino-3-carboxypropyl)uridin-5'-monophosphat (**5b**), ein durch einen L-Amino-buttersäurerest modifiziertes Uridin-5'-monophosphat (UMP) wurde unlängst im RNAase-Hydrolysat von *Escherichia coli* tRNA^{Phe} gefunden¹⁾ und als Nucleosid durch NMR- und Massenspektrum näher charakterisiert²⁾. Das Nucleosid **5a** ist mit dem von

*¹⁾ Privatdozent an der Universität Paderborn — Gesamthochschule, Fachbereich 6 (Organische Chemie), D-4790 Paderborn, Pohlweg 55.

¹⁾ Z. Ohashi, M. Maeda, J. A. McCloskey und S. Nishimura, *Biochemistry* 13, 2620 (1974).

²⁾ S. Friedman, H. J. Li, K. Nakanishi und G. van Lear, *Biochemistry* 13, 2932 (1974).

Barrell und Sanger gefundenen Nucleosid X identisch und befindet sich in Position 47 im Extraloop dieser tRNA³⁾.

Wie durch Umsetzung von methylverarmter tRNA mit S-Adenosyl-L-methionin in Gegenwart einer aus *E. coli* isolierten Transferase gezeigt werden konnte, wird bei der Biosynthese dieses Nucleotids nicht die Methylgruppe, sondern in ungewöhnlicher Reaktion der größere Aminobuttersäurerest von S-Adenosyl-L-methionin auf die tRNA übertragen⁴⁾.

Der Zweck einer derartigen Modifizierung von tRNA mag darin gesehen werden, daß durch den geladenen Aminosäurerest die räumliche Struktur dieser tRNA beeinflusst wird. Aufgrund der zwitterionischen Struktur des L-Aminobuttersäurerestes sollte die Strukturänderung pH-abhängig sein, je nachdem ob im Alkalischen die Amino-Carboxylat-Form, im Säuren die Ammonium/Carbonsäure-Form oder beim isoelektrischen Punkt das Zwitterion der Aminosäure vorliegt. Auch könnte eine Anlagerung zweiwertiger Ionen, wie z. B. Magnesium, an 5b bevorzugt stattfinden.

Aminosäurenucleotide vom Typ 5 sind besonders geeignete Objekte zur Untersuchung der gegenseitigen Beeinflussung der räumlichen Anordnung von Aminosäure- und Nucleotid-Rest.

Um strukturelle Parameter des monomeren Nucleotids sowohl in Lösung als auch im Festzustand studieren zu können, haben wir es auf folgendem Wege dargestellt.

***N*³-(3-L-Amino-3-carboxypropyl)uridin-5'-monophosphat**

Wird L-Homoserin an der Aminogruppe durch den Benzoylrest geschützt und in saurer Lösung cyclisiert, so bildet sich, wie bereits beim Racemat gezeigt⁵⁾, optisch aktives α -L-Benzamido- γ -butyrolacton (1).

Bromwasserstoff in Äthanol öffnet den Lactonring von 1 unter Bildung von α -L-Benzamido- γ -brom-buttersäure-äthylester (2), der als L-Form deutlich höher als die entsprechende racemische Verbindung⁵⁾ schmilzt.

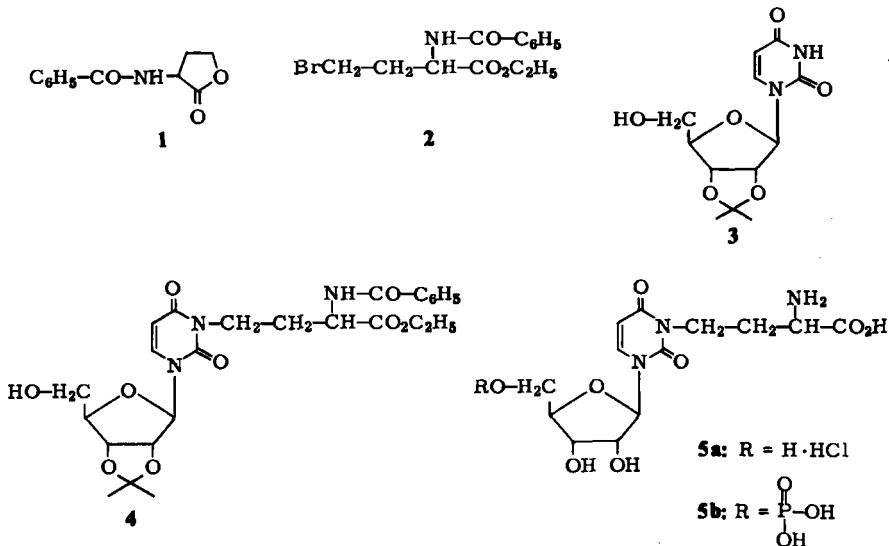
Wird Isopropylidenuridin (3) in Gegenwart von Kalium-*tert*-butylat mit 2 alkyliert, so entsteht *N*³-[3-L-Benzamido-3-(äthoxycarbonyl)propyl]-2',3'-*O*-isopropylidenuridin (4), das an einer Kieselgelsäule (LS III) von Nebenprodukten befreit und in ca. 50proz. Ausbeute gewonnen werden kann.

Verbindung 4, erstmals von Ohashi et al.¹⁾ erwähnt (jedoch ohne experimentelle Angaben zur Synthese und ohne analytische Daten), konnte durch Elementaranalyse, UV-Spektrum und optische Drehung charakterisiert werden. Durch Hydrolyse von 4 in halbkonzentrierter Salzsäure ließ sich die Benzoyl-, Äthyl- und Isopropyliden-Schutzgruppe gleichzeitig abspalten und das Reaktionsprodukt an einem Kationenaustauscher auftrennen. Die Hauptzone enthielt analysenreines *N*³-(3-L-Amino-3-carboxypropyl)-uridinhydrochlorid (5a), das in der Dünnschichtelektrophorese (Kieselgel, LS IV) mit gleicher Mobilität wie Uridin wandert, sich jedoch mit Ninhydrin blauviolett anfärben läßt. Im Dünnschichtchromatogramm (Cellulose, LS I) wandert 5a deutlich langsamer als das unmodifizierte Nucleosid.

³⁾ B. G. Barrell und F. Sanger, FEBS-Lett. 3, 275 (1969).

⁴⁾ S. Nishimura, Y. Taya, Y. Kuchino und Z. Ohashi, Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 702 (1974).

⁵⁾ Y. Knobler und M. Frankel, J. Chem. Soc. 1958, 1629.



Behandelt man **5a** mit Phosphoroxotrichlorid in Triäthylphosphat, eine Methode, die bei unmodifizierten Nucleosiden überwiegend zu den 5'-Monophosphaten führt^{5,6)}, so entsteht eine auf der Kieselgel-Dünnschichtelektrophorese (Kieselgel, LS IV) mit R_F 0.6 (relativ zu Uridin-5'-monophosphat) wandernde Hauptkomponente, die UV-Licht löscht und sich mit Ninhydrin zu einer blauviolettten Zone anfärben läßt. Neben der Hauptkomponente (Zone II) entstand ein Nebenprodukt (Zone III), bei dem es sich aufgrund des zu Zone II etwa doppelt so großen R_F -Wertes um ein Diphosphat handeln muß.

Präparative Auftrennung des Reaktionsgemisches an DE-52-Cellulose und Gradientenelution mit Triäthylammoniumhydrogencarbonat-Puffer führt zu chromatographisch reinem **5a**-Phosphat, das in etwa 50proz. Ausbeute als Alkylammoniumsalz anfällt.

Die quantitative Phosphatbestimmung ergibt nach Veraschen der Substanz 2 mol Phosphat pro mol **5a**. Verascht man die Probe nicht und bestimmt das Phosphat direkt, so erhält man 1 mol Phosphat pro mol **5a**. Letzteres ist also ionisch an die Aminogruppe von **5a** gebunden, was gleichzeitig zeigt, das 1 mol **5a** nur 1 mol kovalent gebundenes Phosphat besitzt.

Bei analytischer Dünnschichtelektrophorese wandert **5a**-Phosphat einheitlich als UV-aktives ninhydrinpositives Anion.

Alkalische Phosphatase spaltet das **5a**-Phosphat zurück zu **5a**; das zeigt an, daß außer der Einführung des Phosphatrestes in **5a** keine weiteren strukturellen Veränderungen eingetreten sind. Die Stellung des Phosphatrestes, der sich aufgrund der Synthesebedingungen an C-5' befinden sollte^{6,7)}, konnte durch Perjodatoxidation des **5a**-Phosphates sichergestellt werden. Oxidiert man 1 A₂₆₂-Einheit **5a**-Phosphat in 20 µl Wasser mit 10 µl $2 \cdot 10^{-2}$ M NaJO₄ bei 4°C^{8,9)}, versetzt das Reaktionsgemisch zur Zerstörung

⁵⁾ M. Yoshikawa, T. Kato und T. Takenishi, *Tetrahedron Lett.* 1967, 5065.

⁷⁾ M. Yoshikawa, T. Kato und T. Takenishi, *Bull. Chem. Soc. Japan* 42, 3505 (1969).

⁸⁾ D. M. Brown, M. Fried und A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* 1955, 2206.

⁹⁾ F. Hanßke, M. Sprinzl und F. Cramer, *Bioorg. Chem.* 3, 367 (1974).

überschüssigen Natriumperjodates mit 5 μ l 2,3-Butandiol und chromatographiert an PEI-Cellulose in 0.25 M LiCl, dann ist aus dem mit R_f 0.6 wandernden 5a-Phosphat ein Oxidationsprodukt entstanden, das am Start zurückbleibt; entsprechende Oxidationsprodukte erhält man auch von Uridin-5'-monophosphat, während man bei der Oxidation von Uridin-2'- bzw. -3'-monophosphat unverändertes Ausgangsmaterial zurückerhält⁸⁾. Diese Reaktionsfolge zeigt an, daß das 5a-Phosphat eine freie *cis*-Diol-Gruppierung besitzt, weshalb ihm die Konstitution 5b zukommen muß.

Spektroskopische Eigenschaften von N^3 -(3-L-Amino-3-carboxypropyl)uridin (5a) und seinem Monophosphat 5b

Abb. 1 zeigt die UV- und CD-Spektren von 5a in *Teorell-Stenhagen-Puffer*¹⁰⁾ bei pH 3.0, 7.0 und 11.0. Vergleicht man die UV-Absorption von 5a mit der von Uridin (Abb. 2), dann zeigt sich, daß diese bei der *N*-alkylierten Verbindung im Gegensatz zu der von Uridin pH-unabhängig ist. Diese spektroskopischen Befunde sind darauf zurückzuführen, daß die Anionbildung an N-3 und damit eine Verschiebung des Lactim/Lactam-Gleichgewichtes bei der alkylierten Verbindung nicht stattfinden kann.

Bei den CD-Spektren von 5a (Abb. 1) fällt auf, daß die positive Elliptizität (268 nm) bei pH 11.0 auf mehr als die Hälfte der bei pH 7.0 und 3.0 gemessenen Werte abfällt. Dieser Effekt, der beim Uridin (Abb. 2) nicht beobachtet wird, wird von einer relativ pH-unab-

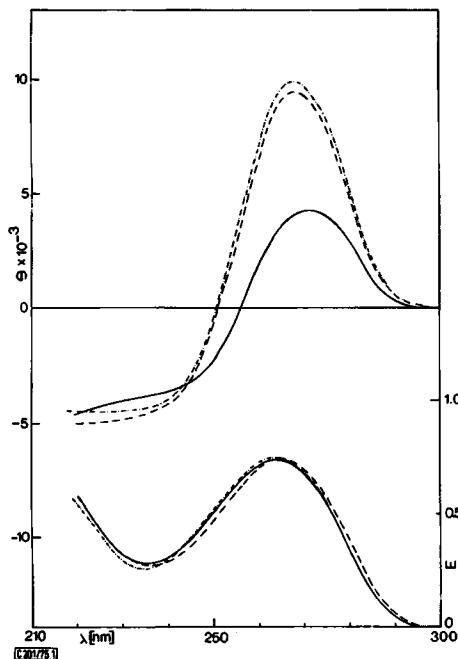


Abb. 1. CD-Spektrum (oben) und UV-Spektrum (unten) von 5a in *Teorell-Stenhagen-Puffer* bei pH 3.0 (.....), pH 7.0 (-----) und pH 11.0 (————)

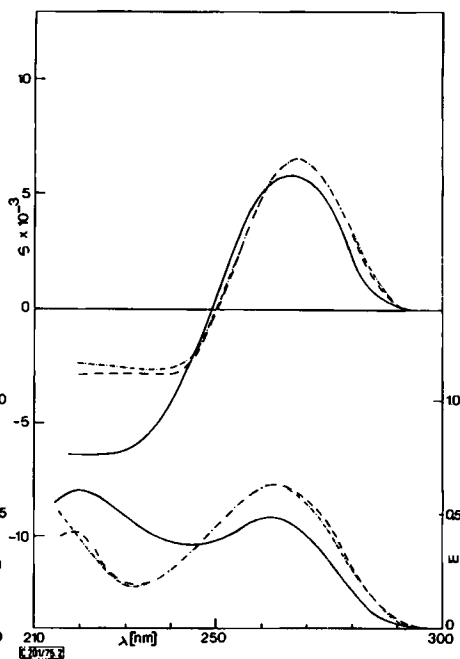


Abb. 2. CD-Spektrum (oben) und UV-Spektrum (unten) von Uridin in *Teorell-Stenhagen-Puffer* bei pH 3.0 (.....), pH 7.0 (-----) und pH 11.0 (————)

¹⁰⁾ T. Teorell und E. Stenhagen, *Biochem. Z.* **299**, 417 (1939).

hängigen negativen Elliptizität im Bereich von 210 und 250 nm begleitet; ein Bereich, wo Uridin gerade ein im Alkalischen starkes Ansteigen der negativen Elliptizität zeigt.

Die starke Änderung des CD-Spektrums von **5a** bei pH 11.0 gegenüber pH 3 und pH 7, die bei Uridin nicht beobachtet wird, muß durch den L-Aminobuttersäurerest hervorgerufen werden. Wie das Kalottenmodell von **5a** zeigt, können die L-Aminogruppe und die Uridin-Carbonylgruppen eine Lage zueinander einnehmen, die über eine Wasserstoffbrücke zur Ausbildung eines achtgliedrigen Ringsystems führt. Diese wasserstoffverbrückte Struktur bringt den Uracilrest und den Aminosäurerest mit dem Asymmetriezentrum in eine relativ starre Lage zueinander, die vermutlich bei pH 11.0 vorliegt. Sobald die Aminogruppe protoniert wird, wird sich der Ring öffnen, wobei das jetzt gebildete Kation von Wassermolekülen solvatisiert und damit der gesamte Rest frei beweglich wird. Die beim Vergleich der Spektren von **5a** und Uridin beobachteten Befunde treten – wenn auch abgeschwächt – bei den entsprechenden Monophosphaten (Abb. 3 und 4) ebenfalls auf.

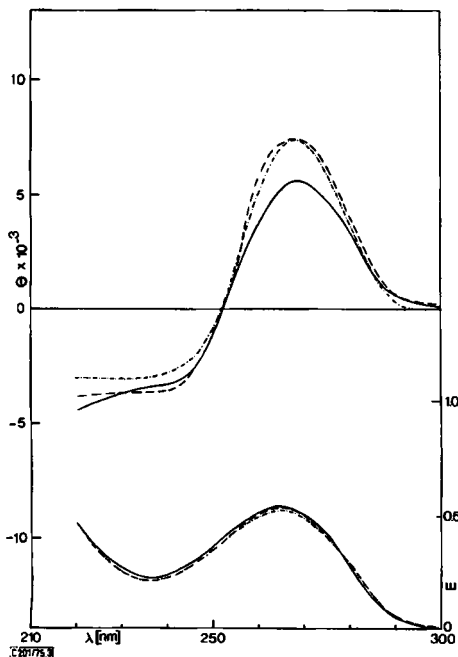


Abb. 3. CD-Spektrum (oben) und UV-Spektrum (unten) von **5b** in Teorell-Stenhagen-Puffer bei pH 3.0 (---), pH 7.0 (---) und pH 11.0 (—)

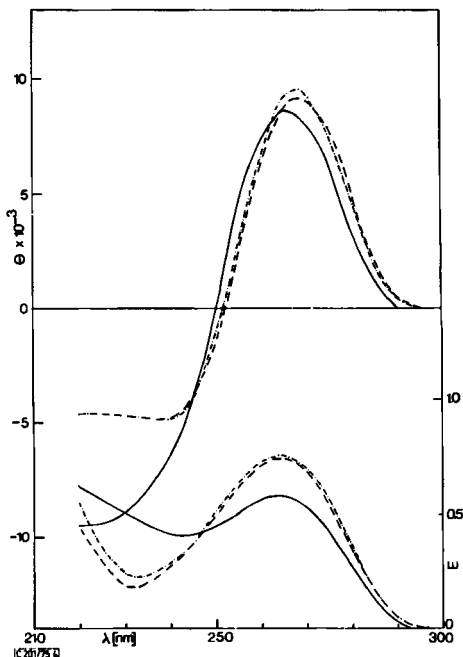


Abb. 4. CD-Spektrum (oben) und UV-Spektrum (unten) von Uridin-5'-monophosphat in Teorell-Stenhagen-Puffer bei pH 3.0 (---), pH 7.0 (---) und pH 11.0 (—)

Fräulein Sigrid Waldeck danken wir für geschickte Mitarbeit bei den Experimenten und Herrn Dr. Dieter Gauss für hilfreiche Diskussion bei der Abfassung der Arbeit. Dem Fonds der Chemischen Industrie wird für finanzielle Unterstützung gedankt.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Monoskop (Reichert, Österreich) bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Elementaranalysen wurden vom Mikroanalytischen Labor Beller, Göttingen, ausgeführt. NMR-Spektren: Bruker HX 60-Spektrometer (TMS als innerer Standard), UV-Spektren: Zeiss PMQ II- bzw. Shimadzu UV 200-Spektrometer, CD-Spektren: Cary 61-Spektrometer, optische Drehungen: Perkin-Elmer-Polarimeter 141.

Chromatographie: Bei der Säulenchromatographie wurden Celluloseaustauscher DE 52 (Whatman, Maidstone), Kieselgel 60 oder Lewatit 1080 (Merck, Darmstadt) und ein LKB-Fraktions-sammler mit Uvicord verwendet. Analytische Dünnschichtchromatographie wurde an Kieselgel-dünnschichtplatten F 254 (Woelm, Eschwege) oder PEI-Celluloseplatten (Schleicher & Schüll, Dassel) ausgeführt; als Substanznachweis diente die UV₂₆₀-Absorption bzw. Ninhydrinreaktion. 1 M Triäthylammoniumhydrogencarbonat(TBK)-Puffer wurde durch Einleiten von Kohlendioxid in eine Mischung von 4280 ml Wasser und 720 ml Triäthylamin bis zum Erreichen von pH 7.0 hergestellt. Als Lösungsmittelsysteme für die Dünnschichtchromatographie wurden LS I (Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 2), LS II (Isopropylalkohol/Ammoniak/Wasser 7 : 1 : 2) und LS III (Chloroform/Äthanol 97 : 3) benutzt.

Die **Dünnschichtelektrophorese** wurde in einer DE-Doppelkammer (Desaga, Heidelberg) auf Kieselgel-Dünnschichtplatten (Woelm, Eschwege) oder Cellulose-Fertigplatten (Merck, Darmstadt) durchgeführt. Folgende Elektrophoresepuffer wurden benutzt: LS IV (0.1 M Sörensen/Citratpuffer, pH 6.5) und LS V (0.2 M Natriumborat, pH 10).

Phosphatasespaltung: 10 µl Enzymsuspension (Alkalische Phosphatase, EC 3.1.3.1 (Boehringer, Mannheim), Nr. 15429, 1 mg/ml) werden mit 90 µl 0.25 M Tris-HCl-Puffer pH 8.0 verdünnt. 10 µl dieser Lösung werden mit 10 µl des zu spaltenden Substrates 2 h bei 37°C aufbewahrt.

Phosphatbestimmung: Lösung a: 10proz. Ascorbinsäure; Lösung b: 0.42proz. Ammonium-molybdat · 4 H₂O in 1 N H₂SO₄; Lösung c: 1 Teil Lösung a und 6 Teile Lösung b. Zur Bestimmung werden 0.70 ml der frisch bereiteten Lösung c mit 0.30 ml der zu bestimmenden Phosphatlösung versetzt.

α-L-Benzamido-γ-butyrolacton (1): 1.19 g (10 mmol) L-Homoserin in 24 ml 0.5 N NaOH (100-ml-Rundkolben) werden auf 0°C abgekühlt und unter starkem Turbinieren alternierend mit insgesamt 1.5 g Benzoylchlorid (10.7 mmol) und 12 ml 1 N NaOH versetzt. Nach 45 min wird mit konz. Salzsäure auf pH 3.0 gebracht, wobei sich ein farbloses Öl abscheidet. Nach Zugabe von weiteren 5 ml konz. Salzsäure wird 75 min auf dem Wasserbad erhitzt, wobei die ölige Substanz in Lösung geht. Beim Abkühlen fallen farblose Kristalle aus, die abgesaugt, getrocknet und durch Waschen mit wenig Äther von Benzoesäure befreit werden (1.45 g). Nach Umkristallisation aus Wasser erhält man 1.2 g (58.5%) farblose Nadeln vom Schmp. 140–141°C. Im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, LS III) wandert die Substanz mit R_F 0.3 einheitlich.

¹H-NMR ([D₆]DMSO): m um δ 2.33 (2H), m um 4.47 (3H), m um 7.55 (3H), m um 7.86 (2H); d 8.96 ppm (NH, 1H, J = 8 Hz). – [α]_D²⁰: –29.6° (c = 1.2 in Äthanol).

C₁₁H₁₁NO₃ (205.2) Ber. C 64.38 H 5.40 N 6.83 Gef. C 64.46 H 5.33 N 6.95

α-L-Benzamido-γ-brombuttersäure-äthylester (2): 500 mg (0.41 mmol) 1 in 15 ml absol. Äthanol werden auf 45°C erwärmt und in die Lösung wird 90 min Bromwasserstoff eingeleitet. Man läßt abkühlen und bewahrt 24 h bei Raumtemp. auf. Lösungsmittel und Bromwasserstoff werden durch Vakuumdestillation vertrieben, Nachdampfen von Äthanol vertreibt letzte Reste Bromwasserstoff. Aus dem in 3 ml Äthanol gelösten Rückstand lassen sich beim Abkühlen schwach gelbe Nadeln auskristallisieren, die abgesaugt und erneut aus Äthanol umkristallisiert werden. 314 mg (41%) farblose Nadeln vom Schmp. 105°C. Im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel, LS III) wandert die Substanz einheitlich mit R_F 0.8.

¹H-NMR ($[D_6]$ DMSO): δ 1.21 (t, 3H, $J = 7$ Hz), 2.38 (q, 2H, $J = 7$ Hz), 3.65 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 4.15 (q, 2H, $J = 7$ Hz), 4.63 (q, 1H, $J = 7.5$ Hz), m um 7.57 (3H), m um 7.90 (2H); 8.80 ppm (d, NH, 1H, $J = 7.5$ Hz). – $[\alpha]_D^{20}$: -47.9° ($c = 1.0$ in Äthanol).

$C_{13}H_{16}BrNO_3$ (314.2) Ber. C 49.70 H 5.13 Br 25.43 N 4.46
Gef. C 49.71 H 5.17 Br 25.48 N 4.49

*N*³-[3-*L*-Benzamido-3-(äthoxycarbonyl)propyl]-2',3'-*O*-isopropylidenuridin (4): 201 mg (0.64 mmol) **2** in 1.5 ml wasserfreiem Dimethylformamid (DMF) werden mit einer Lösung von 91 mg (0.32 mmol) Isopropylidenuridin (**3**) in 1.5 ml wasserfreiem DMF, das 400 mg Kalium-*tert*-butylat enthält, versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 3 h bei 80°C aufbewahrt, mit 3 ml äthanolischem, 1 proz. Eisessig versetzt und i. Hochvak. abgedampft. Bei analytischer Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, LS III) läßt sich neben wenig unumgesetztem **2** (nahe Front) und **3** (nahe Start) eine neue, UV-Licht löschende Substanz vom R_F 0.25 nachweisen. Präparative Auftrennung des Gemisches an einer Kieselgelsäule 20 × 5 cm (Kieselgel 60, 0.063–0.200 mm) trennt **4** als Inhaltsstoff der Hauptzone von einer schneller wandernden Nebenzone ab. Der farblose, ölige Abdampfrückstand der Hauptzone wird in LS III aufgenommen, durch ein hartes Filter gegeben und abgedampft. Nach Versetzen mit Äther kann die Substanz nach dem Abdampfen aufgeschäumt werden. 160 mg (48.3%) farbloses amorphes **4**.

UV (Äthanol): λ_{max} 260, 222 nm ($\epsilon = 10\,100, 16\,200$). – ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.24 (t, 3H, $J = 7$ Hz), 1.36 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), um 2.3 (m, 2H), um 3.8 (m, 2H), 4.10 (q, 2H, $J = 7$ Hz), um 4.2 (m, 3H), um 4.9 (m, 3H), 5.70 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 5.70 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz), 7.55 (d, 1H, $J = 8$ Hz), um 7.5 (m, 3H), 7.7 (d, 1H, breit), um 7.95 (m, 2H).

$C_{23}H_{31}N_3O_9$ (517.6) Ber. C 58.02 H 6.04 N 8.12 Gef. C 57.81 H 6.08 N 8.13

*N*³-(3-*L*-Amino-3-carboxypropyl)uridin-hydrochlorid (**5a**): 160 mg (0.31 mmol) **4** werden in 4 ml halbkonz. Salzsäure 10 h bei 80°C aufbewahrt, die Lösung eingedampft, Salzsäure durch Nachdampfen mit Wasser (Ölpumpe) vertrieben und der Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen. Adsorption an einer Ionenaustauscher-Säule (Lewatit S 1080, 7 × 1.5 cm, H⁺-Form) und Elution mit Wasser trennt eine Vorzone ab. Gradientenelution (500 ml Wasser/500 ml 0.2 M HCl) bringt **5a** als Inhaltsstoff der Hauptzone ins Eluat. Nach Lösen in 2 ml Äthanol und langsamer Zugabe von Äther erhält man 40 mg (34%) amorphes **5a**. Auf der Dünnschichtplatte (Cellulose) wandert **5a** in LS I mit R_F 0.26 (Uridin 0.46), in LS II mit R_F 0.43 (Uridin 0.48). In der Dünnschichtelektrophorese (Kieselgel, LS IV) wandert **5a** mit gleicher Mobilität wie Uridin zur Kathode, läßt sich jedoch mit Ninhydrin blauviolett anfärben; auf Cellulose in LS V wandert es mit $R_F + 0.75$ (bez. auf Uridin). UV (10 mmol Natriumkakyolat/Liter, pH 7.0): λ_{max} 263 nm ($\epsilon = 8\,100$).

$[C_{13}H_{20}N_3O_8]Cl$ (381.8) Ber. C 40.90 H 5.28 N 11.01 Gef. C 40.49 H 5.46 N 10.88

*N*³-(3-*L*-Amino-3-carboxypropyl)uridin-5'-phosphat (**5b**): 19 mg (0.05 mmol) **5a** werden in 125 μ l Triäthylphosphat eingetragen und in der Wärme teilweise gelöst. Die auf 4°C abgekühlte Lösung versetzt man mit 30 μ l (0.2 mmol) Phosphoroxotrichlorid, wobei nach ca. 5 min die noch suspendierte Substanz in Lösung gegangen ist. Nach 4stündigem Aufbewahren bei 4°C wird zur Hydrolyse ein kleines Stückchen Eis zugegeben, nach Lösen des Eises mit 150 μ l Triäthylamin versetzt und i. Hochvak. eingedampft. Der in 50 ml Wasser gelöste Rückstand wird an einer DE-52-Cellulose-Austauschersäule (20 × 3.5 cm) adsorbiert. Wasser eluiert eine Vorzone, der Salzgradient (500 ml 0.5 M (TBK)-Puffer/500 ml Wasser) trennt das Reaktionsprodukt in eine schwache Vorzone (Zone I), deren Inhaltsstoff mit **5a** identisch ist, eine Hauptzone (Zone II), die **5b** enthält, und eine Nebenzone (Zone III), die in der DC-Elektrophorese doppelt so schnell wie **5b** wandert, auf. Nach Eindampfen des Eluats der Hauptzone und Lyophilisation des Rückstandes erhält man 200 A₂₆₃-Einheiten (49.4%) amorphes glasiges **5b**.

Elektrophoretische Mobilität von **5b** (= Zone II) und Vergleich mit **5a**,
U, UMP und den Inhaltsstoffen der Zonen I und III

	LS V (Cellulose)	LS IV (Kieselgel)
5b (Zone II)	0.85 (+)	0.6 (+) ^{*)}
5a	—	0.1 (—) ^{*)}
Uridin	—	0.1 (—)
Zone I	—	0.1 (—) ^{*)}
Zone III	—	1.0 (+)
UMP	1.00 (+)	1.00 (+)

^{*)} Läßt sich mit Ninhydrin anfärben. Alkalische Phosphatase spaltet **5b** zu **5a**.

Quantitative Phosphatbestimmung von 5b: 0.487 A_{263} -Einheiten (0.060 μmol) **5b** in 20 μl Wasser werden im Duran-Reagenzglas (12 \times 75 mm) nach Zugabe von 60 μl 10proz. äthanolischer $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung verascht, 15 min mit 0.3 ml 1 N HCl auf dem siedenden Wasserbad hydrolysiert, nach dem Abkühlen mit 0.7 ml Phosphatreagens (Lösung c) versetzt und nach 1 stündigem Aufbewahren bei 37°C die Extinktion bei 820 nm bestimmt. Zur Bestimmung des nicht kovalent gebundenen Phosphats wird die Bestimmung ohne zu veraschen vorgenommen.

Eingesetzte Substanzmenge (0.487 A_{263} -Einheiten) = 0.060 μmol ^{*)}

Gesamtphosphat (2.93 A_{820} -Einheiten) = 0.122 μmol ^{**)}

Anorgan. Phosphat (1.41 A_{820} -Einheiten) = 0.060 μmol

5'-Phosphat somit = 0.062 μmol

^{*)} 1 μmol **5b** = 8.1 A_{263} -Einheiten.

^{**)} 1 μmol Phosphat = 24.0 A_{820} -Einheiten Farbstoff.

[201/75]