

2'(3'),5'-Diphosphate des Nucleosids X und N³-alkylierter Uridin-Derivate

Frank Seela* und Quynh Hoa Tran Thi

Universität Paderborn – Gesamthochschule, Fachbereich Naturwissenschaften II,
– Organische Chemie, Warburger Str. 100, D-4790 Paderborn

Eingegangen am 19. Mai 1979

2'(3'),5'-Diphosphates of the Nucleoside X and N³-Alkylated Uridine Derivatives

The synthesis of 2'(3'),5'-diphosphates of the rare nucleoside X (**1a**) and the N³-alkylated uridine derivatives **1b**, **c**, and **2d** has been accomplished by treatment of the nucleosides with 15 fold excess pyrophosphoryl chloride.

Polynucleotide, die das seltene Nucleosid X (**1a**)^{1,2} enthalten, sind von besonderem Interesse, da sich an der Polynucleotidkette ein kovalent gebundener Aminosäurerest³) befindet. Um den Einfluß dieses Nucleosids auf die Tertiärstruktur⁴) untersuchen zu können, beabsichtigen wir Oligonucleotidsequenzen, die das seltene Nucleosid X (**1a**) enthalten, aufzubauen. Besonders elegant erweist sich hierfür die Synthese mit Hilfe von T4-Phagen-induzierter RNA-Ligase⁵), die den schrittweisen Aufbau definierter Polynucleotidsequenzen gestattet⁶). Bei dieser Synthesemethode kann ein Nucleosid-2'(3'),5'-diphosphat an die wachsende Oligonucleotidkette angehängt werden.

Wir haben zu diesem Zweck ein Verfahren ausgearbeitet, das es gestattet, polyfunktionelle Uridin-Derivate in hoher Ausbeute in ihre 2'(3'),5'-Diphosphate umzuwandeln, und beschreiben im folgenden die Darstellung der Diphosphate des seltenen Nucleosids X (**1a**), seines Desamino-(**1c**) und Descarboxy-Derivates (**1b**) sowie von N³-Methyluridin (**2d**).

Setzt man die Nucleoside **1a**, **b**, **d** oder **2d** bei 5°C mit 15 Äquivalenten Pyrophosphorylchlorid⁷) um, so entstehen in 75–85proz. Ausbeute Diphosphate und nicht, wie bei der Umsetzung mit äquimolaren Mengen, Monophosphate. An DE-52 Cellulose-Ionenaustauscher können

Tab. 1. Phosphat/Nucleosid-Verhältnis der 2'(3'),5'-Diphosphate

Substanz	Extinktion des Molybdatkomplexes	Gesamtphosphat	Phosphat/Nucleosid
0.186 A ₂₆₂ -Einheiten (0.0229 µmol) 3a/4a	1.097 A ₈₂₀ -Einheiten	0.0457 µmol	2:1
0.0945 A ₂₆₂ -Einheiten (0.012 µmol) 3b/4b	0.599 A ₈₂₀ -Einheiten	0.0249 µmol	2:1
0.201 A ₂₆₂ -Einheiten (0.0247 µmol) 3c/4c	1.1845 A ₈₂₀ -Einheiten	0.0494 µmol	2:1
0.259 A ₂₆₂ -Einheiten (0.0287 µmol) 2e/2f	1.389 A ₈₂₀ -Einheiten	0.0579 µmol	2:1

1 µmol **3a/4a** = 8.1 A₂₆₂-Einheiten

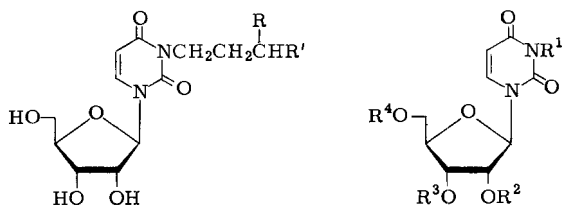
1 µmol **3c/4c** = 8.1 A₂₆₂-Einheiten

1 µmol **3b/4b** = 7.9 A₂₆₂-Einheiten

1 µmol **2e/2f** = 9.0 A₂₆₂-Einheiten

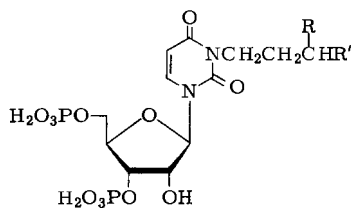
1 µmol Phosphat = 24.0 A₈₂₀-Einheiten Farbstoff.

diese durch Gradientenelution mit Triethylammoniumhydrogencarbonat/Wasser gereinigt werden. Bei der Phosphatbestimmung nach der Ammoniummolybdatmethode²⁾ erhält man 2 mol Phosphat/mol Nucleosid (Tab. 1). Durch Behandeln der Disphosphate mit NaIO_4 ²⁾ erfolgt keine Oxidation, damit kann eine *cis*-Diol-Struktur ausgeschlossen werden. Somit trägt eine der C-2'- bzw. C-3'-Hydroxylgruppen einen Phosphatrest.

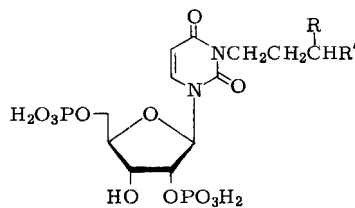


	R	R'
1a	NH ₂	CO ₂ H
b	NH ₂	H
c	H	CO ₂ H
d	H	CO ₂ C ₂ H ₅

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
2a	H	H	H	PO ₃ H ₂
b	H	PO ₃ H ₂	H	H
c	H	H	PO ₃ H ₂	H
d	CH ₃	H	H	H
e	CH ₃	PO ₃ H ₂	H	PO ₃ H ₂
f	CH ₃	H	PO ₃ H ₂	PO ₃ H ₂



3



4

	R	R'
a	NH ₂	CO ₂ H
b	NH ₂	H
c	H	CO ₂ H

Der Ort der Verknüpfung beider Phosphatreste wird mit Hilfe der ³¹P-NMR-Spektroskopie nachgewiesen. Die protonenkoppelten Spektren zeigen keine Phosphorkopplung, was eine Pyrophosphatstruktur ausschließt. Dafür treten 3 Signale relativ ähnlicher Verschiebung auf (Tab. 2). Die beiden Signale mit geringer Intensität müssen, wie der Vergleich mit Uridin-2'(3')-monophosphat zeigt, dem O-2'- bzw. O-3'-Phosphatrest zugeordnet werden. Das O-2'-Phosphatsignal ist gegenüber dem O-3'-Phosphatsignal zu höherem Feld verschoben. Die Bildung isomerer O-2'/O-3'-Phosphate erfolgt durch Nachbargruppenwirkung der *cis*-ständigen Hydroxylgruppen, deren Phosphatreste schon bei Raumtemperatur zur Isomerisierung neigen. Das Signal mit wesentlich erhöhter Intensität entsteht durch Überlagerung der Signale der 5'-Phosphatreste der 2',5'- bzw. 3',5'-Diphosphate.

Tab. 2. ³¹P-NMR-Verschiebungen der protonenentkoppelten Signale von Uridin-2'(3')-monophosphat und der 2'(3'),5'-Diphosphate in δ (ppm), relativ zu 85proz. Phosphorsäure (externe Kapillare); pH 14

Verbindung	2'-Phosphat	3'-Phosphat *)	5'-Phosphat
2a	—	—	4.086
2b	4.026	—	—
2c	—	4.296	—
3a	—	4.019	3.875
4a	3.779	—	3.905
3b	—	4.026	3.905
4b	3.785	—	3.905
3c	—	4.068	3.966
4c	3.857	—	3.966

*) Signale sind aufgrund des höheren 3'-Isomerenanteils intensiver als 2'-Signale.

Tab. 3. Elektrophoretische und chromatographische Mobilitäten der 2'(3'),5'-Diphosphate

Kieselgel, R_E (0.1 M Natriumcitrat, pH 6.5)	
3a : 1.1 (+) relativ zu 2a : 1.0 (+); 7.8 (+) relativ zu 1a : 1.0 (—)	
3b : 0.9 (+) relativ zu 2a : 1.0 (+); 0.9 (+) relativ zu 1b : 1.0 (—)	
3c : 1.9 (+) relativ zu 2a : 1.0 (+); 3.0 (+) relativ zu 1c : 1.0 (+)	
4b : 0.6 (+) relativ zu 2a : 1.0 (+); 4.5 (+) relativ zu 2b : 1.0 (—)	
PEI-Cellulose, R_F (0.75 M Kaliumdihydrogenphosphat)	
	3a : 0.7
	3b : 0.6
	3c : 0.6
	4b : 0.7

Die 2'(3'),5'-Diphosphate **3a–c** bzw. **4a–c** wandern in der Dünnschichtchromatographie sehr ähnlich (Tab. 3), unterscheiden sich jedoch in der Dünnschichtelektrophorese sehr deutlich. Eine Auftrennung der isomeren Phosphate erfolgt nicht.

Bei seltenen Nucleosiden mit freier Carboxylgruppe, wie bei **1c**, entstehen neben dem gewünschten Diphosphat eine Vielzahl von Nebenprodukten. Vermutlich bilden sich hier Acylphosphate, die in unkontrollierter Weise weiterreagieren. Diese Schwierigkeit kann durch Phosphorylierung der Ester, wie **1d**, umgangen werden. Von dessen Diphosphat läßt sich die Esterschutzgruppe leicht alkalisch abhydrolysieren, ohne daß die Phosphatreste abgespalten werden. Daß der Schutz beim Nucleosid X nicht notwendig wird, mag auf Zwitterionenbildung zurückzuführen sein. Der Schutz freier Aminogruppen ist für die Darstellung der 2'(3'),5'-Disphosphate nicht erforderlich.

Herrn *B. Seeger* danken wir für die Aufnahme der ³¹P-NMR-Spektren und der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für finanzielle Unterstützung.

Experimenteller Teil

UV-Spektren: Zeiss PMQ 3; ^{31}P -NMR-Spektren: Bruker HX 60-Spektrometer (85proz. Phosphorsäure als externer Standard); ^1H -NMR-Spektrum: Varian EM 390-Spektrometer. Bei der Säulenchromatographie wurden Celluloseaustauscher DE 52 (Whatman, Maidstone), Dowex AG, 1×2 , (200–400 mesh, Acetatform, Serva), Triethylammoniumhydrogencarbonat (TBK)-Puffer²⁾ und ein LKB-UltraRac-Fraktionensammler mit Uvicord II verwendet. Analytische Dünnschichtchromatographie wurde an Kieselgel-Dünnschichtplatten F 254 (Woelm, Eschwege) und an PEI-Celluloseplatten (Polygram Cel 300 PEI/UV₂₅₄ Macherey-Nagel, Düren) ausgeführt. Lösungsmittelsysteme (LS): LS I (1 M wäbr. Lithiumchlorid), LS II (0.75 M wäbr. Kaliumdihydrogenphosphat, pH 4.1) und LS III (0.1 M Natriumcitratpuffer, pH 6.5). Dünnschichtelektrophorese: in einer DE-Doppelkammer (Desaga, Heidelberg) auf Kieselgel-Dünnschichtplatten.

Periodatoxidation: $2 A_{262}$ -Einheiten des Phosphorylierungsproduktes in 200 μl Wasser werden mit 20 μl 0.1 M wäbr. Kaliumhydrogenphosphat pH 7.0 und 40 μl 0.1 M wäbr. Natriumiodatlösung versetzt; zum Zerstören überschüssigen Natriumiodats werden 10 μl 2,3-Butandiol zugegeben. Die Mischung wird 1 h bei Raumtemp. aufbewahrt. Man chromatographiert das Reaktionsprodukt an einer PEI-Celluloseplatte in 0.75 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung, pH 4.1.

Phosphatbestimmung: Lösung a: 10proz. wäbr. Ascorbinsäure; Lösung b: 0.42proz. Ammoniummolybdat $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in 1 N H_2SO_4 ; Lösung c: 1 Teil Lösung a und 6 Teile Lösung b.

Das in 30–50 μl Wasser gelöste Phosphat wird im Duran-Reagenzglas (16×1.5 cm) nach Zugabe von 60 μl 10proz. ethanolischer Magnesiumnitratlösung verascht, 10 min mit 0.3 ml 1 N HCl bei 100°C hydrolysiert, nach dem Abkühlen mit 0.7 ml Phosphatreagenz (Lösung c) versetzt und nach 1stündigem Aufbewahren bei 37°C die Extinktion bei 820 nm bestimmt.

Pyrophosphorylchlorid: Eine Mischung von 85.2 g (0.3 mol) Diphosphorpentoxid und 195.6 g (0.94 mol) Phosphorpentachlorid wird in 150 ml Tetrachlorkohlenstoff 8 h bei 105–110°C aufbewahrt (Ölbad). Das Reaktionsgemisch wird abgekühlt, filtriert und der Rückstand mehrmals mit Tetrachlorkohlenstoff gewaschen. Das vereinigte Filtrat wird über eine 20-cm-Vigreux-Kolonnen destilliert. Man erhält 75 g (50%) einer farblosen Flüssigkeit vom Sdp. 101°C/10 Torr (Lit.⁷⁾ 105°C/18 Torr); $n_D^{20} = 1.4760$ (Lit.⁷⁾ $n_D^{20} = 1.4765$). – IR: 1316 ($\nu\text{P}=\text{O}$), 975 ($\nu\text{P}-\text{O}-\text{P}$), 709 cm^{-1} ($\text{P}-\text{O}-\text{P}$). ^{31}P -NMR (CDCl_3): $\delta = 9.53$.

$\text{P}_2\text{Cl}_4\text{O}_3$ (251.8) Ber. Cl 56.33 P 24.33 Gef. Cl 56.27 P 24.59

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der 2'(3'),5'-Diphosphate: 0.1 mmol Nucleosid wird mit 1.5 mmol Pyrophosphorylchlorid versetzt und bei 5°C unter Feuchtigkeitsausschluß über Nacht aufbewahrt. Zur Hydrolyse wird auf 0°C abgekühlt, mit einem Stückchen Eis hydrolysiert und mit 50 ml Wasser verdünnt. Die Lösung wird mit 1 N NaOH auf pH 5 gebracht, die Substanz an einer DE 52-Cellulose-Austauschersäule (30×3.5 cm) adsorbiert. Elution mit 600 ml 0.5 M TBK-Puffer/600 ml Wasser trennt das Reaktionsprodukt auf. Aus der Hauptzone erhält man nach Eindampfen des Eluats die farblosen Diphosphate.

Nucleosid	Pyrophosphorylchlorid	Produkt	% Ausb.
1a ²⁾ : 0.1 mmol	1.5 mmol	3a/4a	84
1b ³⁾ : 0.1 mmol	1.5 mmol	3b/4b	75
2d : 0.1 mmol	1.5 mmol	2e/2f	82

N^3 -(3-Ethoxycarbonylpropyl)uridin (**1d**): 720 mg (2.1 mmol) N^3 -(3-Ethoxycarbonylpropyl)-2',3'-O-isopropylidenuridin³⁾ werden mit 30 ml 1 N Essigsäure 24 h bei 50°C aufbewahrt. Die Mischung wird eingengt, der Rückstand mehrmals mit Wasser nachgedampft, an einer

20 × 2-cm-Ionenaustauschersäule (Dowex AG, 1 × 2, 200–400 mesh, Acetatform) adsorbiert und die Substanz mit Wasser eluiert. Nach mehrfachem Abdampfen mit Methanol erhält man 560 mg (73%) öliges, farbloses **1d**. DC (Kieselgel, LS I): $R_F = 0.5$; Ausgangsmaterial: $R_F = 0.1$. – UV (Methanol): $\lambda_{\max} = 262$ nm ($\epsilon = 10700$). – ¹H-NMR ($[D_6]DMSO$): $\delta = 1.18$ (t, CH₃-Ester, $J = 7$ Hz); 1.8 (m, CH₂), 2.3 (m, CH₂CO), um 3.63 (m, 5'-H), 3.85 (t, NCH₂, $J = 6$ Hz), 4.03 (q, CH₂-Ester, $J = 7$ Hz), um 4.1 (m, 4'-H), um 4.6 (2'-H und 3'-H), 5.76 (d, 5-H, $J = 8$ Hz), 5.83 (d, 1'-H, $J = 3$ Hz), 8.00 (d, 6-H, $J = 8$ Hz).

C₁₅H₂₂N₂O₈ (358.4) Ber. C 50.27 H 6.19 N 7.82 Gef. C 50.43 H 6.17 N 7.83

N³-(3-Carboxypropyl)uridin-2'(3'),5'-diphosphat (**3c/4c**): 35 mg (0.1 mmol) **1d** werden mit 380 mg (1.5 mmol) Pyrophosphorylchlorid versetzt und bei 5 °C über Nacht aufbewahrt. Zur Hydrolyse wird bis 0 °C abgekühlt, dazu ein Stückchen Eis gegeben und mit 20 ml Wasser verdünnt. Die Lösung wird mit 30 ml 0.5 N NaOH versetzt und 4 h bei Raumtemp. gerührt. Man neutralisiert mit 0.5 N HCl und adsorbiert an einer DE-52-Cellulose-Austauschersäule (30 × 3.5 cm). Elution mit 600 ml 0.5 M TBK-Puffer/600 ml Wasser trennt das Reaktionsprodukt auf. Aus der Hauptzone erhält man nach Abdampfen des Eluats 690 A₂₆₀-Einheiten (85%) farbloses **3c/4c**.

Literatur

- ¹⁾ Z. Ohashi, M. Maeda, J. A. McCloskey und S. Nishimura, *Biochemistry* **13**, 2620 (1974).
- ²⁾ F. Seela und F. Cramer, *Chem. Ber.* **109**, 82 (1976).
- ³⁾ F. Seela, Q. Hoa Tran Thi und D. Hasselmann, *Chem. Ber.* **112**, 700 (1979).
- ⁴⁾ F. Hansske, K. Watanabe, F. Cramer und F. Seela, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 1659 (1978).
- ⁵⁾ O. C. Uhlenbeck und V. Cameron, *Nucl. Acids Res.* **4**, 85 (1977); J. R. Barrio, M. C. G. Barrio, N. J. Leonard, T. E. England und O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **17**, 2077 (1978).
- ⁶⁾ E. Ohtsuka, S. Nishikawa, A. F. Markham, S. Tanaka, T. Miyake, T. Wakabayashi, M. Ikehara und M. Sugiura, *Biochemistry* **17**, 4894 (1978).
- ⁷⁾ P. C. Crofts, I. M. Downie und R. B. Heslop, *J. Chem. Soc.* **1960**, 3673.

[175/79]