

ÜBER DIE REAKTION VON FORMALDEHYD MIT NUCLEOSIDEN

K.H.Scheit

Chemische Abteilung der Medizinischen Forschungsanstalt
der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen.

(Received 24 February 1965)

Formaldehyd reagiert in wässriger Lösung bei pH7 in spezifischer Weise mit Nucleotiden und Polynucleotiden (1,2,3, 5,10,11). Da die Anlagerung von Formaldehyd reversibel ist, gelang es bisher nicht, die eigentlichen Reaktionsprodukte zu isolieren oder papierchromatographisch nachzuweisen. In der Literatur fanden sich daher auch keine genauen Angaben über die Stabilität und Struktur derselben, obwohl die Formaldehyd-Reaktion bereits mehrmals zu Strukturuntersuchungen von DNS, RNS und Polynucleotiden herangezogen wurde (1,2,3,5,10). In dieser Arbeit wird die Reaktion von Isopropylidennucleosiden mit Formaldehyd beschrieben. Diese Experimente wurden durchgeführt, um genaue Angaben über Art und Stabilität der Reaktionsprodukte, die Reaktionsbedingungen und die Vollständigkeit der Reaktion zu erhalten. Die Reaktion von 2'.3'-O-Isopropylidennucleosiden mit Formaldehyd läßt sich durch Chromatographie an Silicagel-Dünnschicht mit einem Chloroform-Methanol Gemisch bei 0°C verfolgen. Bei den gewählten Reaktionsbedingungen, Formaldehyd in Puffer pH7 bei 37°C, verhält sich Isopropylidenuridin indifferent. Das durch Reaktion von Formaldehyd

am N¹-Atom zu erwartende Produkt (11) war also unter diesen Chromatographie-Bedingungen nicht stabil. Durch Einwirken von Formaldehyd auf Isopropylidencytidin und -adenosin entstand jeweils ein Reaktionsprodukt. Die Reaktion von Formaldehyd mit Isopropylidenguanosin war weniger übersichtlich und führte zu fünf Produkten (A,B,C,D,E), die chromatographisch noch nicht einwandfrei getrennt werden konnten. Nur die Isopropylidenguanosinderivate D und E, welche in geringerer Menge entstanden, hatten einen größeren R_F-Wert als die Ausgangsverbindung, während die Substanzen A,B und C kleinere R_F-Werte besaßen. Dies könnte bedeuten, daß die Reaktion des Formaldehyds mit Isopropylidenguanosin an mehreren Stellen erfolgte.

Das von uns synthetisierte Isopropyliden-5-hydroxymethyluridin (I) hatte in den Lösungsmitteln A und B einen kleineren R_F-Wert als Isopropylidenuridin, während die Formaldehyd-Addukte von Isopropylidencytidin und -adenosin weiter wanderten als die Ausgangsverbindungen. Durch das Einführen des Hydroxymethylrestes wird eine Substanz im allgemeinen hydrophiler und sollte bei der Silicagel-Dünnschichtchromatographie weniger weit wandern als die Ausgangsverbindung. Hier überwiegt ein anderer Einfluß. Die Reaktion des Formaldehyds mit den N⁶-Aminogruppen vermindert die Basizität, so daß diese Moleküle vom schwach sauren Kieselgel weniger stark absorbiert werden und deshalb größere R_F-Werte als die entsprechenden Ausgangsverbindungen besitzen. In Übereinstimmung damit hat das von

uns dargestellte Isopropyliden- N^6 -hydroxyäthylcytidin (IV) einen größeren R_F -Wert als Isopropylidencytidin.

Nach der Chromatographie ließen sich die Formaldehydanlagerungsprodukte durch Methanol vom Silicagel eluieren und begrenzte Zeit bei 0°C in Lösung aufbewahren. Von diesen Lösungen wurden UV-Spektren aufgenommen. Das UV-Spektrum der Isopropylidenadenosin-Formaldehydverbindung war dem UV-Spektrum des 6-Methylaminopurinribosids (9) sehr ähnlich. Die UV-Spektren des entsprechenden Isopropylidencytidinderivates und des Isopropyliden- N^6 -hydroxyäthylcytidins stimmten ebenfalls gut überein. Daraus und aus dem chromatographischen Verhalten der Substanzen schließen wir, daß Isopropylidenadenosin und -cytidin bei pH 7 durch Formaldehyd zu N^6 -Hydroxymethylnucleosiden (II+III) alkyliert werden.

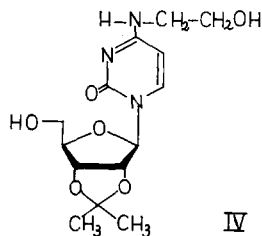
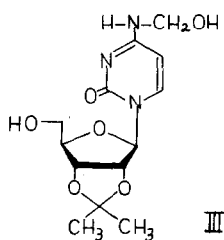
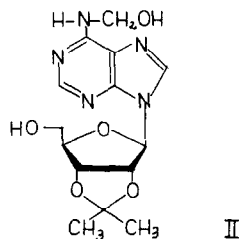
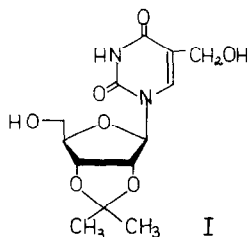


TABELLE 1

 UV-Absorption der Isopropylidennucleoside
 und ihrer Hydroxymethylverbindungen

Substanz	$\lambda_{\max.}$ [m μ]	$\lambda_{\min.}$ [m μ]	Bemerkung
Isopropylidencytidin	270	250	pH 7
Isopropyliden-N ⁶ -hydroxy- methylcytidin	271; 236	253; 228	pH 7
Isopropylidenadenosin	259	225	pH 7
Isopropyliden-N ⁶ -hydroxy- methyladenosin	267 266	230 238	Methanol * *
Isopropylidenguanosin	270*; 253	221	Methanol
Isopropylidenguanosin- derivat A	275*; 257	228	Methanol
Isopropylidenguanosin- derivat B und C	275	232	Methanol
Isopropylidenguanosin- derivat D und E	280	233	Methanol
Isopropyliden-N ⁶ -hydroxy- äthylcytidin	270; 239	248; 228	pH 7

* Wendepunkt

* * Puffer-pH 7 : Formaldehydlösung (35 Gew.-%) = 1 : 1.

Im Gegensatz zu den Isopropylidenguanosin-Derivaten B, C, D und E besaß Substanz A das typische UV-Spektrum des Guanosins. Möglicherweise handelt es sich hier um Isopropyliden-N²-hydroxymethylguanosen.

Theoretisch kann Formaldehyd nochmals mit den N⁶-Hydroxymethylverbindungen des Isopropylidencytidins und -adenosins

reagieren unter Bildung von Di-N⁶-hydroxymethylderivaten. Die Reaktion von Isopropyliden-N⁶-hydroxyäthylcytidin mit Formaldehyd führt auch mit großem Überschuß an Reagens nicht zu einer neuen, chromatographisch nachweisbaren Verbindung. Weiterhin zeigt Isopropylidenadenosin in Lösungen hoher Formaldehydkonzentrationen das gleiche UV-Spektrum wie Isopropyliden-N⁶-hydroxymethyladenosin. Diese Beobachtungen machen die Reaktion zu Di-N⁶-hydroxymethylverbindungen wenig wahrscheinlich.

Die N-Hydroxymethylnucleoside sind bei Raumtemperatur nur in Gegenwart überschüssigen Formaldehyds beständig. Entfernt man diesen aus den Reaktionslösungen durch Fällen mit Dimedon, so erhält man die Nucleoside zurück. Durch quantitative Bestimmung der nicht umgesetzten Isopropylidennucleoside verfolgten wir den Verlauf der Formaldehyd-Reaktion. Es zeigte sich, daß Isopropylidencytidin und -guanosin bereits bei niedrigeren Formaldehydkonzentrationen quantitativ hydroxymethyliert werden (vgl. Abbildung I). Die vollständige Reaktion mit Isopropylidenadenosin erfolgte erst unter recht extremen Bedingungen.

Kürzlich wurde die Einwirkung von Formaldehyd auf lösliche Ribonucleinsäure beschrieben (10). Unter den dort gewählten Bedingungen kann jedoch nach unseren Erfahrungen vollständige Reaktion nur bei nicht komplex gebundenen Guanosin- und Cytidinnucleotiden angenommen werden, da die Formaldehydkonzentration für eine quantitative Hydroxymethylierung der Adenosinnucleotide zu niedrig ist.

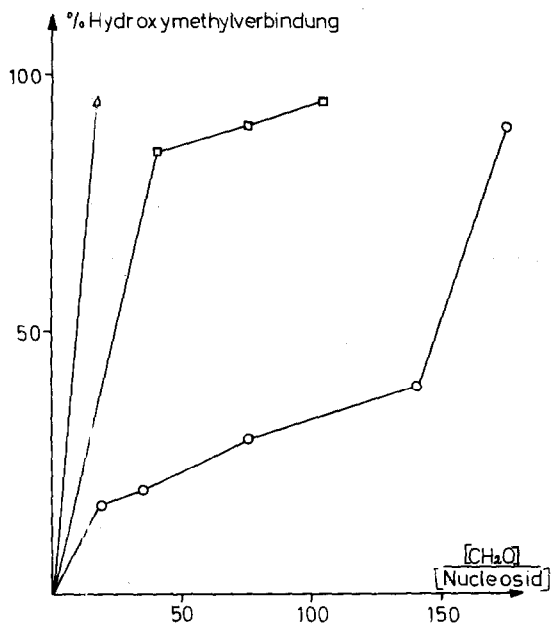


Abb. I Reaktion von Formaldehyd mit Nucleosiden

- Δ Isopropylidencytidin (0.35 mMol/10 ml) und Formaldehyd nach 5 Stdn.
- ◻ Isopropylidenguanosin (0.32 mMol/10 ml) und Formaldehyd nach 5 Stdn.
- Isopropylidenadenosin (0.33 mMol/10 ml) und Formaldehyd nach 5 Stdn.

EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeines: Isopropyliden-adenosin, -cytidin und -guanosin stammen von der Firma Waldhof, Mannheim. Isopropyli-

dencytidin wurde nach Angaben von SMRT und CHLADEK (8) dargestellt. Zur Dünnschichtchromatographie wurde Silicagel HF-254 (Merck) benutzt. Als Lösungsmittel fanden die Gemische Chloroform-Methanol 9 : 1 (A) und 8 : 2 (B) Verwendung.

Formaldehyd wurde als 35-proz. Lösung p.a. (Merck) verwendet.

Bei der Synthese von 2'.3'-O-Isopropyliden-5-hydroxymethyluridin wurde analog einer Darstellung von 5-Hydroxymethyluracil (6) verfahren. Die Isolierung der Substanz erfolgte durch präparative Schichtchromatographie an Silicagel GF-254 (Merck) mit einem Gemisch von Chloroform-Methanol 95 : 5. Ausbeute 85 %. Fp. 171-172°C (H₂O).

$\lambda_{\text{max.}}$ 263 m μ $\lambda_{\text{min.}}$ 232 m μ $\epsilon(263 \text{ m}\mu \text{ in Methanol})$ 10200

Gefunden: C 50.06 H 6.15 N 8.52 C₁₃H₁₈O₇N₂

Berechnet: 49.86 5.77 8.92 MG 314.03

2'.3'-O-Isopropyliden-N⁶-hydroxyäthylcytidin wurde aus 5'-O-Acetyl-2'.3'-O-isopropyliden-4-thiouridin und Äthanolamin in Analogie zur Darstellung von N⁶-Methylcytidin (7) bereitet.

Reaktion der Nucleoside mit Formaldehyd

Die berechnete Menge Formaldehydlösung wurde mit Phosphatpuffer (0.066 molar) pH 7 auf ein Volumen von zehn Milliliter verdünnt und darin das Isopropylidennucleosid gelöst. Um eine ausreichende Löslichkeit des Isopropyliden-

guanosins zu erzielen, wurden den Reaktionslösungen 20 Vol.-% Dioxan zugesetzt. In bestimmten Intervallen wurden 10 λ der Reaktionslösung entnommen, auf Silicagel-Dünnschicht aufgetragen und sofort, ohne vorheriges Trocknen, bei 0 - 3° C chromatographiert. Die Dünnschicht-Chromatogramme wurden im Kühlraum (0 - 3°C) ausgewertet. Die UV-aktiven Zonen wurden markiert und die entsprechenden Substanzen mit kaltem Methanol eluiert. Die Menge an nicht umgesetztem Isopropylidennucleosid wurde durch Messen der optischen Dichte des Eluats im Spektralphotometer ermittelt. Bei Ansätzen mit Isopropylidenguanosin wurden schärfere chromatographische Trennungen erreicht, wenn der Formaldehyd vorher mit Dimedon gefällt worden war.

Jeder Punkt der Abb.I wurde einer Kurve entnommen, in der bei gegebenen Verhältnis von Formaldehyd zu Nucleosid die Gleichgewichtseinstellung in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt wurde. Die Genauigkeit dieser Meßwerte von $\pm 5\%$ gilt daher auch für die Werte der Abb.I.

TABELLE 2

R_F - Werte der Verbindungen

	Lösungsmittel	
	A	B
Isopropylidenadenosin	0.71	
Isopropyliden-N ⁶ -hydroxymethyladenosin	0.91	
Isopropylidencytidin	0.17	0.47
Isopropyliden-N ⁶ -hydroxymethylcytidin	0.26	0.71
Isopropyliden-N ⁶ -hydroxyäthylcytidin		0.57

Fortsetzung Tab.2	Lösungsmittel	
	A	B
Isopropylidenuridin	0.42	0.73
Isopropyliden-5-hydroxymethyluridin	0.32	0.67
Isopropylidenguanosin	0.38	0.60
Isopropylidenguanosinderivat A	0.28	
Isopropylidenguanosinderivat B und C	0.14	
Isopropylidenguanosinderivat D und E	0.50-0.60	0.77

Ich danke Herrn Professor Dr. F. Cramer für die wohlwollende Förderung der Arbeit.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) H.Fraenkel-Conrat, Biochim.biophysica Acta [Amsterdam]
15, 307 (1954)
- 2) M.Staehlin, Biochim.biophysica Acta [Amsterdam]
29, 410 (1958)
- 3) R.Haselkorn u. P.Doty, J.biol.Chemistry, 236, 2738
(1961)
- 4) D.E.Hoard, Biochim.biophysica Acta [Amsterdam]
40, 62 (1960)
- 5) S.Zamenhof et al. J.exp.Medicine 98, 373 (1953)
- 6) R.E.Cline et al. J.Amer.chem.Soc. 81, 2524 (1959)
- 7) J.J.Fox et al. J.Amer.chem.Soc. 81, 178 (1959)
- 8) S.Chladek u. J.Smrt, Collect.Czechoslov.Chem.Commun.
28, 1301 (1963)
- 9) P.Brookes, P.D.Lawley, J.chem.Soc. [London] 1960, 539
- 10) G.Zubay, Biochem.biophys.Res.Commun. 14, 272 (1964)
- 11) S.Lewin, J.chem.Soc. [London] 1964, 792.