

SYNTHESE VON DINUCLEOSIDPHOSPHATEN UNTER VERWENDUNG  
UNGESCHÜTZTER NUCLEOSIDE

Hartmut Follmann

Institut für Organische Chemie der Universität Marburg

(Received 22 March 1967)

Dinucleosidphosphate eindeutiger Verknüpfung sind auf verschiedenen Wegen dargestellt worden, deren gemeinsames Merkmal die Blockierung aller nicht an der Kondensationsreaktion beteiligten Funktionen durch verschiedenartige Schutzgruppen ist (1,2). Die Synthese von 3'-5'-Dinucleosidphosphaten kann jedoch wesentlich vereinfacht werden, wenn man acylierte 3'-Ribonucleotide (2) mit Ribonucleosiden ohne Schutzgruppen in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid oder Triisopropylbenzolsulfochlorid umsetzt. Da bei der alkalischen Aufarbeitung des Reaktionsgemisches die unnatürlichen Isomeren ohne weiteren Aufwand wieder zerstört werden und außerdem die Diesterbindung nur 5'-OH-Gruppe des Nucleosids bevorzugt geknüpft wird, kann man die Bildung eines Isomerengemisches in der Kondensationsreaktion selbst in Kauf nehmen, auf die aufwendige selektive Blockierung der 2'- und 3'-OH-Gruppe im Nucleosid verzichten und dennoch eine Ausbeute von 30 - 40 % an 3'-5'-Dinucleosidphosphaten erzielen. Ausgehend von acylierten 2'-Mononucleotiden und ungeschützten Nucleosiden sind auch reine 2'-5'-Dinucleosidphosphate erhältlich.

Auf diese Weise wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Verbindungen I - XII dargestellt. Die Struktur aller Diester ist gesichert durch ihre spektralen Daten und die vollständige Hydrolyse durch NaOH und Pankreas- oder  $T_2$ -Ribonuclease, die nur das betreffende Nucleotid und Nucleosid liefern; sie verbrauchen die einer Glykolgruppierung äquivalente Menge Perjodat.

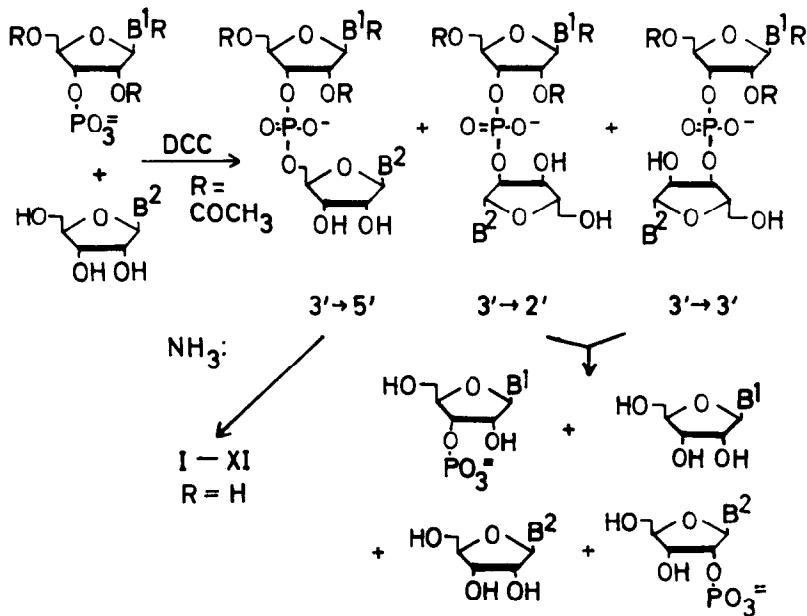
Tabelle 1 :

		$\lambda_{\max}$ (nm)		Hypo- chromie (%)	eluiert bei pH	$R_F$
		pH 1	pH 7			
I	(3'-5')-Cytidylyl-adenosin (CpA)	265	261	7,5	3,05	0,35
II	" " 3-isoadenosin	275	272	10,0	3,4	0,29
III	" " N <sup>6</sup> -methyladenosin	266	267	8,0	3,1	0,42
IV	" " N <sup>6</sup> -dimethyladenosin	273	272	9,5	3,0	0,44
V	" " purin-9-ribosid	270	263	5,5	2,7	0,36
VI	" " uridin (CpU)	268	265	4,5	2,95	0,31
VII	" " N <sup>3</sup> -methyluridin	269	265	6,5	2,95	0,47
VIII	" " cytidin (CpC)	278	269	6,0	3,25	0,33
IX	(3'-5')-Uridylyl-N <sup>6</sup> -dimethyladenosin	264	267	3,5	2,6	0,50
X	(3'-5')-Adenylyl-N <sup>6</sup> -dimethyladenosin	263	262	11,0	2,75	0,50
XI	(3'-5')-Guanylyl-cytidin (GpC)	275	255 268	5,0	2,75	0,20
XII	(2'-5')-Cytidylyl-uridin (2'-5'-CpU)	268	265		2,95	0,31

$\lambda_{\max}$ : in 0,1 n HCl oder Dimethylglutarsäurepuffer pH 7,0.  $R_F$ -Werte: in Iso-  
propanol/Wasser/2 n NH<sub>3</sub> 7:2:1. Hypochromie: errechnet aus dem Extinktionsanstieg  
in  $\lambda_{\max}$  nach enzymatischer Spaltung mit weniger als 1 % des Volumens an Ribo-  
nuclease-Lösung bei pH 7,0 und der Ionenstärke 0,2.

Allgemeine Arbeitsweise: 0,2 mMol N<sup>4</sup>,0<sup>2'</sup>,0<sup>5'</sup>-Triacetyl-3'-cytidylsäure, 0<sup>2'</sup>,0<sup>5'</sup>-  
Diacetyl-3'-uridylsäure, N<sup>6</sup>,0<sup>2'</sup>,0<sup>5'</sup>-Triacetyl-3'-adenylsäure, N<sup>2</sup>,0<sup>2'</sup>,0<sup>5'</sup>-Tri-  
acetyl-3'-guanylsäure oder N<sup>4</sup>,0<sup>3'</sup>,0<sup>5'</sup>-Triacetyl-2'-cytidylsäure, als freie Säure  
oder Pyridiniumsalz, 0,3 mMol Nucleosid und 250 mg (1,2 mMol) Dicyclohexylcarbo-  
diimid wurden in möglichst wenig wasserfreiem Pyridin - evtl. unter Zusatz von  
Dimethylformamid - gelöst und verschlossen 8 - 14 Tage bei Raumtemperatur aufbe-  
wahrt. Dann wurde bis zur Trübung Wasser zugesetzt, der ausgefallene Dicyclohexyl-  
harnstoff abfiltriert, die Mischung 3 mal mit je 10 ml Petroläther extrahiert und  
zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde über Nacht mit 20 ml Ammoniak in  
Methanol (bei 0° gesättigt) behandelt, erneut zur Trockene eingedampft und dann  
in Wasser aufgenommen. Nach Filtration von evtl. Ungelöstem wurde das Produkt  
durch Ionenaustauschchromatographie an Dowex 1 x 2 (Formiatform, Elution mit ei-  
nem Gradienten von 0,001 - 0,05 n HCOOH) oder Papierchromatographie isoliert.

Bei der Kondensation der 2',5'-O-Acyl-3'-nucleotide mit ungeschützten Nucleosiden entsteht zunächst ein schwer trennbares Gemisch der partiell acylierten 3'-5'-, 3'-3'- und 3'-2'-Dinucleosidphosphate. Bei der Abspaltung der Acylreste durch Ammoniak werden jedoch die beiden letztgenannten Isomeren mit hydrolysiert, so daß schließlich ein chromatographisch leicht trennbares Gemisch aus 3'-5'-Dinucleosidphosphat, zwei Nucleosiden und zwei Mononucleotiden vorliegt:



( B<sup>1</sup> und B<sup>2</sup> ; vgl. Tabelle 1 )

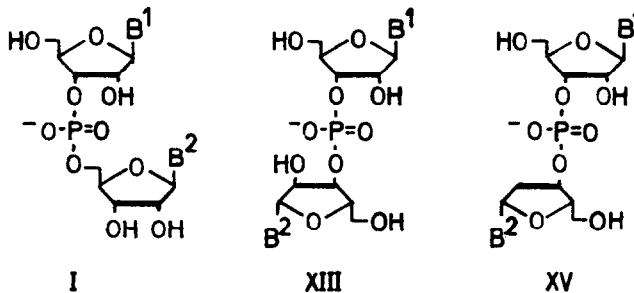
Aus dem Mengenverhältnis der Reaktionsprodukte - beispielsweise 3'-5'-CpA (I), Adenylsäure und Cytidin nach Umsetzung von Triacetyl-3'-cytidylsäure mit Adenosin (B<sup>1</sup> = Cytosin, B<sup>2</sup> = Adenin) - ist zu errechnen, daß 40 - 50 % des Umsatzes auf die Bildung des 3'-5'-Phosphodiesters entfallen, während die 2'- und 3'-OH-Gruppe des Ausgangsnucleosids nur zu je 25 - 30 % mit dem Mononucleotid reagieren.

Die vereinfachte Dinucleosidphosphatsynthese gelingt am besten mit Nucleosiden, die keine reaktiven Gruppen im Basenteil enthalten (III - VII). Ungeschützte Aminogruppen wie im Falle von Adenosin und Cytidin (I, VIII) führten unter den

Reaktionsbedingungen nicht zu Nebenreaktionen größeren Ausmaßes. Mit ungeschütztem  $N^3$ -Harnsäureribosid als Nucleosid erhielt man dagegen nur eine geringe Menge des erwarteten 3'-5'-Dinucleosidphosphates unter mehreren anderen Produkten.

Dinucleosidphosphate, in denen die Phosphatgruppe nur 2'- und 3'-OH-Gruppen beider Riboside verbindet (d.h. in 2'-2'-, 2'-3'-, 3'-2'- oder 3'-3'-Stellung), wurden im Gegensatz zu den 2'-5'-, 3'-5'- und 5'-5'-Verbindungen unseres Wissens bisher nicht synthetisiert (3,4). Ein Versuch zur Darstellung von 3'-2'(3')-CpA (XIII) bestätigte die bei der Umsetzung ungeschützter Nucleoside beobachtete große Alkaliempfindlichkeit solcher Dinucleosidphosphate. Die Kondensation von Triacetyl-3'-cytidylsäure mit 5'-O-Acetyl-adenosin ergab auch nach möglichst schonender Ammoniakbehandlung nur noch Spuren an XIII, stattdessen fanden sich im Reaktionsgemisch äquimolare Mengen an 2'(3')-Cytidylsäure, 2'(3')-Adenylsäure, Cytidin und Adenosin.

Die wesentlich höhere Hydrolysegeschwindigkeit der 2'(3')-2'(3')-Diribonucleosidphosphate wie XIII, verglichen mit den 3'-5'-Isomeren (I), kann nur auf die Anwesenheit zweier OH-Gruppen in  $\alpha$ -Stellung zur Phosphatgruppe zurückgehen:



(  $B^1$  = Cytosin ,  $B^2$  = Adenin )

Ribonucleosid(3'-3')2'-deoxyribonucleosidphosphate der Struktur XV mit nur einer OH-Gruppe neben dem Phosphatrest sind nämlich ebenso hydrolysebeständig wie die 3'-5'-Diribonucleosidphosphate (I). Die isomeren Cytidylsäure-2'-deoxyadenosinester 3'-5'-CpdA (XIV) und 3'-3'-CpdA (XV) wurden durch Kondensation von Triacetyl-3'-cytidylsäure mit 3'-O-Acetyl- bzw. 5'-O-Acetyl-2'-deoxyadenosin unab-

hängig synthetisiert und nach Entfernung der Acetylgruppen in etwa gleicher Menge gewonnen. Die Dinucleosidphosphatsynthese mit ungeschützten Nucleosiden ist daher nicht ohne weiteres auf Deoxyriboside übertragbar. Allerdings fand sich auch beim Umsatz von Triacetyl-3'-cytidylsäure mit ungeschütztem Deoxyadenosin oder Thymidin wieder das 3'-5'-Isomere (XIV, XVI) in etwa der doppelten Menge des 3'-3'-Isomeren (XV, XVII), so daß bei sorgfältiger Säulenchromatographie jeweils die bei höherem pH-Wert eluierte 3'-5'-Verbindung rein - wenn auch verlustreich - isoliert werden konnte. Die in Tabelle 2 zusammengestellten Verbindungen XIV - XVII sind zugleich neue Vertreter der wenig bekannten gemischten Ribose-Deoxyribose-Oligonucleotide (5).

Tabelle 2 :

		$\lambda_{\max}$ (nm)		Hypo- chromie (%)	eluiert bei pH	$R_F$ +)
		pH 1	pH 7			
XIV	(3'-5')-Cytidylyl-2'-deoxyadenosin	265	261	7,0	3,25	0,40
XV	(3'-3')-Cytidylyl-2'-deoxyadenosin	265	261	0	3,20	0,42
XVI	(3'-5')-Cytidylyl-thymidin	272	268	8,0	2,95	0,45
XVII	(3'-3')-Cytidylyl-thymidin (im Gemisch mit XVI)	272	268		2,90	0,45

+ ) Bedingungen wie bei Tabelle 1 beschrieben.

Die beschriebenen und weitere, leicht zugängliche Dinucleosidphosphate unnatürlicher Basenzusammensetzung und Verknüpfungsart sind als Substrate sowie zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen den Nucleobasen von mannigfachem Interesse. Über den hypochromen Effekt und die Spaltungsgeschwindigkeiten dieser Verbindungen und analoger Nucleotid-alkyladenin-ester durch Pankreas-Ribonuclease wird an anderer Stelle berichtet (6).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Förderung dieser Arbeit, der Zellstofffabrik Waldhof, Mannheim, für wertvolle Chemikalien.

## LITERATUR

- 1) A.M.Michelson, L.Szabo, A.R.Todd, J.Chem.Soc.(London) 1956, 1546.  
Übersicht: F.Cramer, Angew.Ch. 78, 186 (1966); Angew.Ch.Int.Ed. 5, 173 (1966)  
Neuere Arbeiten: J.Zemlicka, S.Chladek, A.Holy, J.Smrt, Coll.czech.chem.Comm.  
31, 3198, 3800 (1966); A.Holy, K.H.Scheit, Chem.Ber. 99, 3778 (1966).
- 2) Y.Lapidot, H.G.Khorana, J.Am.Chem.Soc. 85, 3852, 3857 (1963).  
R.Lohrmann, H.G.Khorana, J.Am.Chem.Soc. 86, 4188 (1964).
- 3) Das von M.Gulland, H.Smith, J.Chem.Soc.(London) 1948, 1532, beschriebene  
"2'-2'-UpU" muß die 5'-5'-Verbindung sein.
- 4) Zur Möglichkeit dieser Verknüpfungsart in RNS: D.M.Brown, A.R.Todd,  
J.Chem.Soc.(London) 1952, 52.
- 5) M.W.Moon, S.Nishimura, H.G.Khorana, Biochemistry 5, 937 (1966).
- 6) H.Follmann, H.J.Wieker, H.Witzel, Europ.J.Biochem. 1 (1967), im Druck.