

BASISCHE SPALTUNG VON NUCLEOSIDEN IN WASSERFREIEM MEDIUM

Hartmut Follmann

Fachbereich Chemie der Universität, 355 Marburg, Germany

(Received in Germany 9 December 1972; received in UK for publication 4 January 1973)

Die säurekatalysierte Hydrolyse der N-Glycosidbindung in Nucleosiden und Nucleotiden ist seit langem bekannt und häufig untersucht.¹ Dagegen gilt diese Bindung in basischem Medium als völlig stabil, wenn man von Fällen absieht, in denen sie als Folge von Reaktionen an der Nucleobase gespalten wird.² Bei Arbeiten zur direkten Kettenverlängerung von Nucleosiden an der 5'-Zuckerposition,³ die häufig die Verwendung starker Basen wie Alkoholate und metallorganische Verbindungen in homogener wasserfreier Lösung erfordern, haben wir jedoch beobachtet, daß unter diesen Bedingungen alle Ribonucleoside und ihre O-Alkyl-, Acetal- und Ketalderivate unerwartet leicht an der Zuckerkomponente - unter Eliminierung der unversehrten Nucleobase - abgebaut werden. (Über eine ähnliche Beobachtung an 2'-Desoxyribonucleosiden wurde berichtet.⁴) Diese Arbeit beschreibt die Strukturabhängigkeit und Kinetik der mechanistisch wie präparativ bedeutsamen neuen Nucleosidreaktion.

Die Abspaltung der Purin- oder Pyrimidinbase aus Adenosin-, Cytidin- und Uridinderivaten durch Kalium-tert-butanolat in Dioxan läßt sich chromatographisch verfolgen. Bei einem Konzentrationsverhältnis von Base:Nucleosid 10 ist die Reaktion 1. Ordnung (pseudomonomolekular); die hierfür gemessenen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und die zugehörigen, im Stundenbereich liegenden Halbwertszeiten bei 25°C enthält Tabelle 1. Guanosine und Inosine werden in ähnlicher Weise zersetzt, doch sind wegen ihrer Schwerlöslichkeit in organischen Lösungsmitteln keine vergleichbaren Daten zu ermitteln. In Gegenwart eines geringeren Überschusses an Base oder bei Anwendung wässrigen Alkalis

werden die Reaktionen wesentlich langsamer, und die kinetischen Kurven tendieren zu einem Verhalten 2. Ordnung.

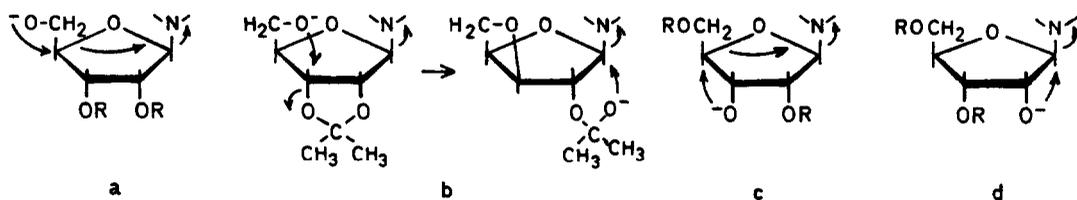
Tabelle 1 : Geschwindigkeitskonstanten k_1 (sec^{-1}) und Halbwertszeiten $t_{1/2}$ (h) der Spaltung von Nucleosiden durch Kalium-tert-butanolat bei 25°C .

Verbindung	k_1	$t_{1/2}$
(1) Adenosin	$0,6 \cdot 10^{-5}$	30 (± 4)
(2) 2',3'-O-Isopropylidenadenosin	$2,8 \cdot 10^{-5}$	7,0
(3) 2',3'-O-Anisylidenadenosin	$1,4 \cdot 10^{-5}$	14
(4) 3'-O-Methyladenosin	$5,5 \cdot 10^{-5}$	3,5
(5) 5'-O-Trityladenosin	$1,6 \cdot 10^{-5}$	12
(6) 2',3'-O-Isopropyliden-5'-O-trityladenosin	keine Spaltung	
(7) Cytidin	$1,0 \cdot 10^{-5}$	18
(8) 2',3'-O-Isopropylidencytidin	$4,3 \cdot 10^{-5}$	4,5
(9) Uridin	$3,2 \cdot 10^{-5}$	6,0
(10) 2',3'-O-Isopropylidenuridin	$7,7 \cdot 10^{-5}$	2,5
(11) 2',3'-Di-O-benzyluridin	$6,4 \cdot 10^{-5}$	3,0
(12) 2'-O-Benzyluridin	$5,5 \cdot 10^{-5}$	3,5
(13) 5'-O-Trityluridin	$4,8 \cdot 10^{-5}$	4,0
(14) 2',3'-O-Isopropyliden-5'-O-benzyluridin	keine Spaltung	
(15) 2',3'-O-Isopropyliden-5'-desoxyuridin	keine Spaltung	
(16) 2',3'-O-Isopropylidenpseudouridin	keine Spaltung	

Zur Ermittlung dieser Werte wurden Mischungen von $0,002 - 0,005 \text{ M}$ Nucleosid (c_0) und $0,1 \text{ M KOC}_4\text{H}_9$ in wasserfreiem Dioxan/tert-Butanol 80:20 unter Feuchtigkeitsausschluß im Thermostaten inkubiert und in passenden Zeitabständen aliquote Proben entnommen (2-3 Parallelbestimmungen); nach Neutralisation und Chromatographie auf Papier oder Cellulose-Dünnschichtplatten in n-Butanol/Wasser 86:14 eluierte man das ungespaltene Nucleosid und maß spektroskopisch seine Konzentration (c_t). Dieses Verfahren lieferte besser reproduzierbare Werte als die Bestimmung der entstehenden, häufig aus der Lösung ausfallenden Base. Bei graphischer Darstellung des Logarithmus von c_0/c_t gegen die Zeit ergaben

sich Geraden. Die Identität der abgespaltenen Nucleobase wurde chromatographisch und spektroskopisch sichergestellt; dagegen waren bisherige Versuche erfolglos, aus den stark basischen, sich dunkel färbenden Reaktionsgemischen ein definiertes Ribosederivat als zweite Spaltkomponente zu isolieren.

Wie die Werte der Tabelle 1 zeigen, hängt die Geschwindigkeit der Spaltungsreaktion in der Reihenfolge U C A von der Natur der Base ab (jedoch in weit geringerem Maße als bei der sauren Spaltung), und insbesondere vom Substitutionstyp am Zuckerrest der Moleküle. Am schnellsten reagieren mono- und di-O-substituierte Ribonucleoside wie (2), (4), (8) und (10)-(13), während die an sämtlichen vorhandenen OH-Gruppen substituierten Verbindungen (6), (14) und (15) überhaupt nicht in erkennbarem Ausmaß gespalten werden. Dies und die beobachtete Reaktionskinetik lassen auf einen Mechanismus schließen, in dem die Reaktion durch Deprotonierung mindestens einer freien Hydroxylgruppe eingeleitet und dann in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt die Nucleobase infolge Angriffs des entstandenen Alkoxidions auf benachbarte C-Atome eliminiert wird.⁵ Unter Berücksichtigung der sterischen Möglichkeiten und in Analogie zu basenkatalysierten Reaktionen an O-Glycosiden⁶ läßt sich ein Rückseitenangriff des deprotonierten O^{5'} auf C^{4'} (a) oder C^{3'} (b, unter Beteiligung des 2',3'-Substituenten), des O^{3'} auf C^{4'} oder des O^{2'} auf C^{1'} (c, d) in Betracht ziehen:



Zwischenprodukte der Reaktion, beispielsweise im Zucker modifizierte Nucleoside, sind nicht zu isolieren; gegen ihr Auftreten spricht auch, daß das zur Deprotonierung an O^{5'}, aber nicht zum Bruch der "C-Glycosidbindung" befähigte Pseudouridin (16) in Gegensatz zum Uridinderivat (10) unter den Reaktionsbedingungen unverändert bleibt. Die verlangsamte Spaltung freier und 5'-alkylierter Ribonucleoside wie (1), (5), (7) und (9) läßt sich durch Ausbildung des stabilen Monoanions im 2',3'-Diolsystem der Ribose⁷ erklären.

Die hier beschriebene Spaltreaktion unterscheidet sich somit grundlegend von den basischen Eliminierungs- und Spaltungsreaktionen an Sulfonium-, Carboxyl- und Ketofunktionen im Zucker enthaltenden Nucleosiden, für die eine C-H-Acidität verantwortlich gemacht wird.⁸ Mit geeigneten Methoden⁹ konnten wir nach partiellem Abbau von (2) unter den o.a. Bedingungen im zurückisolierten Ribosid kein Arabino-, Xylo- oder Lyxofuranosyladenin nachweisen, deren Bildung bei Deprotonierung und Racemisierung an Ribose-C-Atomen zu erwarten wäre.

Herrn Professor W.Pfleiderer und den Papierwerken Waldhof danke ich für Proben substituierter Nucleoside und Frau I.Kuntz für ihre zuverlässige Mitarbeit.

LITERATUR

- 1) H.Venner, Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 339,14 (1964); R.Shapiro,M.Danzig, Biochemistry 11,23 (1972) sowie dort zitierte frühere Literatur. S.auch 2).
- 2) Übersicht: C.A.Dekker in W.Pigman, D.Horton (Herausg.), The Carbohydrates. 2.Ed., Vol.2a, 43. Academic Press,New York 1970.
- 3) T.Walker,H.P.C.Hogenkamp, H.Follmann, Manuskript in Vorbereitung
- 4) R.v.Tigerstrom, M.Smith, Science 167, 1266 (1970).
- 5) Dies tritt offenbar nur dann ein, wenn in einem Nucleosid keinerlei andere eliminierbare Gruppe vorhanden ist, denn bei basenkatalysierten Nachbargruppenreaktionen an Anhydro- oder O-Sulfonylnucleosiden bleibt die Glycosidbindung i.a. erhalten (s. 2), 35).
- 6) Übersicht: Y.Z.Lai, Carbohydrate Res. 24,57 (1972). Unter den hier aufgeführten Möglichkeiten könnte mit Hilfe weiterer partiell alkylierter sowie C'-verzweigter Nucleoside unterschieden werden, die jedoch nicht leicht zugänglich sind.
- 7) R.M.Izatt, L.D.Hansen,J.H.Rytting,J.J.Christensen,J.Am.Chem.Soc.87,2760 (1965).
- 8) J.Baddiley, W.Frank,N.A.Hughes,J.Wieczorkowski, J.Chem.Soc.(London) 1962, 1999; J.P.Horwitz et al., J.Org.Chem. 36,3743 (1971), J.Am.Chem.Soc. 94, 3213 (1972); A.F.Cook, J.G.Moffatt, J.Am.Chem.Soc.89,2677 (1967).
- 9) Ionenaustauschchromatographie an Dowex 1x2, OH-Form, in Methanol/Wasser-Gemischen und Papierchromatographie in Isopropanol/Wasser/Äthylacetat 23:12:65; Erfassungsgrenze < 2%.