

# Darstellung 5'.5''-phosphatverknüpfter Dinucleoside

Preparation of 5',5''-Phosphate Linked Dinucleosides

Siegmar Bornemann und Eckhard Schlimme

Laboratorium für Biologische Chemie im Fachgebiet Organische Chemie der Universität-Gesamthochschule, Warburger Straße 100, Bauteil J, D-4790 Paderborn

Z. Naturforsch. **36 c**, 135–141 (1981); eingegangen am 9. September/23. Oktober 1980

5',5''-Phosphate Bridged Dinucleosides, Cap Analogs, <sup>31</sup>P-NMR, Hypochroism

We report on the chemical preparation of 5',5''-phosphate bridged dinucleosides (**1–16**) by applying the 1,1'-carbonyl-diimidazole activation method.

Nucleotides of this unusual type function as 5'-terminal cap structures of most eukaryotic mRNAs and on the monomer level as regulators in macromolecular biosynthesis.

## Einleitung

Die Synthese 5'.5''-verknüpfter Dinucleosidphosphate ist von besonderem Interesse, seitdem vor einigen Jahren Nucleotide dieses Typs sowohl als 5'-terminale Strukturen bestimmter Messenger RNA nachgewiesen [1 und dort zitierte Literatur] als auch in freier Form als Biomoleküle mit Signalfunktion in Mikroorganismen aufgefunden wurden [2–4 und dort zitierte Literatur].

## Methoden und Material

UV-Spektren: Diese wurden mit einem Zeiss-PMQ 3- bzw. einem Shimadzu UV-200 Spektrometer aufgenommen.

<sup>31</sup>P-NMR-Spektren: Bruker WP 60 DS (60 MHz); protonenentkoppelt in D<sub>2</sub>O bei pH 11.

Chromatographie: Die Auftrennung der Reaktionsansätze erfolgte an Diethylaminoethyl-(DEAE)-cellulose, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Form (Fa. Whatman, Maidstone, England), mit einem linearen Triethylammoniumbicarbonat (TBK)-puffer-Gradienten.

Die analytische Dünnschichtchromatographie wurde mit folgenden Trägerfolien durchgeführt:

(a) Polyethylenimin(PEI)-imprägnierten Cellulose-Platten (Fa. Macherey und Nagel, Düren);

(b) Cellulose-Platten F 1440 LS 254 (Fa. Schleicher und Schüll, Dassel).

Aufgrund ihrer UV<sub>254</sub>-Absorption ließen sich die Substanzen eindeutig identifizieren. Als Lösungsmittelsysteme (LS) für die DC wurden eingesetzt:

LS I = 0,5 M KNO<sub>3</sub> (pH 5,7); LS II = Ethanol/1 M Ammoniumacetat (7:3, v/v) (pH 6,8); LS III = 0,4 M TBK (pH 7,5, bei 4 °C).

Dünnschichtelektrophorese: Sie wurde in einer DE-Doppelkammer (Fa. Desaga, Heidelberg) mit Kieselgel-Dünnschichtplatten (Fa. Woelm, Eschwege) durchgeführt, wobei als Elektrophoresepuffer 0,1 M Natriumcitrat (pH 4,0) eingesetzt wurde.

Enzymatische Analyse: Hierzu wurden folgende Enzyme eingesetzt:

(a) Orthophosphorsäure-monoesterphosphohydrolase [Alkalische Phosphatase (APase)], E.C. 3.1.3.1;

(b) Oligonucleotid-5'-nucleotidohydrolase [Phosphodiesterase (PDEase, Schlangengift)], E.C. 3.1.4.1;

(c) Oligonucleotid-3'-nucleotidohydrolase [Phosphodiesterase (PDEase, Kalbsmilz)], E.C. 3.1.4.18;

(d) 5'-Ribonucleotidphosphohydrolase [5'-Nucleotidase], E.C. 3.1.3.5. Angaben über die jeweiligen Reaktionsansätze [5]. Enzyme wurden bezogen von:

(a) 5'-Nucleotidase, Fa. Sigma-Chemie, München; (b) sämtliche anderen Enzyme, Fa. Boehringer, Mannheim.

Phosphatbestimmung: Diese erfolgte spektralphotometrisch in Anlehnung an die Methode von Zilversmit und Davis [6].

Radioaktivitätsmessungen: Die Radioaktivitätsmessungen wurden

a) in einem Tricarb-Scintillationsspektrometer, Modell 3385 (Fa. Packard Instrument Comp., Illinois, USA),

b) die Auswertung der Dünnschichtchromatogramme mit einem TLC-Linear-Analyzer LB 2821 (Fa. Berthold, Wildbad) vorgenommen.

Die in den Synthesen verwendeten Nucleotide wurden, wenn nicht anders in Abschnitt 4 vermerkt, von Fa. Boehringer, Mannheim, bezogen.

Sonderdruckanforderungen an Dipl.-Ing. S. Bornemann und Prof. Dr. Dr. E. Schlimme.

0341-0382/81/0100-0135 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

## Ergebnisse und Diskussion

Kürzlich berichteten wir über die Synthese der Kappenmutterverbindung  $P^1, P^3$ -(5'-Guanosyl-5''-adenosyl)triphosphat ( $Gp_3A$ ) in Anlehnung an ein Verfahren zur Darstellung von Pyrophosphaten nach Khorana und Todd [7] sowie dem Abbauverhalten von  $Gp_3A$  in subzellulären Fraktionen der Rattenleberzelle [5]. Da diese Methode für  $Gp_3A$  nur geringe Ausbeuten erbrachte, war es unser Ziel, sowohl ein günstigeres Syntheseverfahren zu finden als auch durch Anwendung einer Methode der „Experimentellen Prozeßoptimierung“ (EVOP [8, 9]\*) die Synthese zu verbessern.

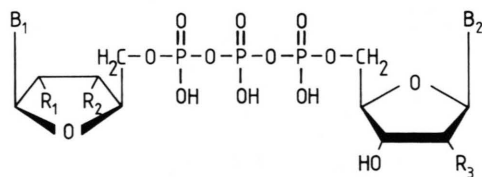
Als günstigerer Weg für die Darstellung der Dinucleosidphosphatase erwies sich die Imidazolidaktivierung [10–12] der Nucleosid-5'-monophosphate, die in einer verbesserten, dem Halbmikromaßstab angepaßten Methode [13] durchgeführt wurde. Andere Methoden zur Darstellung von Dinucleosidphosphaten wie z. B. durch Aktivierung mit Phosphorsäurediphenylesterchlorid nach Michelson [14] oder durch Kondensation mit  $N,N'$ -Dicyclohexylcarbodiimid nach Khorana und Todd [7] lieferten nur geringe Ausbeuten an Kappenanaloga [5]. Das von Hata und Mitarbeitern [15] verwendete Verfahren einer Anhydridknüpfung mittels Di-n-

butyl-phosphinothiylbromid ist die erste Mitteilung über die Darstellung kappenanaloger 1,3-disubstituierter Triphosphate und ergab recht gute Ausbeuten (30–40%) an den Dinucleosidphosphaten  $Gp_3A$ ,  $Gp_3G$ ,  $m^7Gp_3G$  und  $m^7Gp_3A$ . Aus unserer Sicht ist dieses Verfahren aber gegenüber der Imidazolidaktivierung synthetisch aufwendiger und bringt zeitlich keinen Vorteil.

Bei der Synthese wurde zunächst Adenosin-5'-O-monophosphat (5'AMP) als Tri-N-octyl-ammonium-(TNOA)-Salz in wasserfreiem Dimethylformamid (DMF) mit einem 5-fach molaren Überschuß, bezogen auf das eingesetzte 5'AMP, an 1.1'-Carbonyldiimidazol zum Adenosin-5'-phosphoimidazolid umgesetzt. Die Reaktionszeit betrug  $22 (\pm 2)$  Stunden bei Raumtemperatur. Im Anschluß an diesen Aktivierungsschritt wurde überschüssiges 1.1'-Carbonyldiimidazol mit Methanol (8-facher Überschuß bezogen auf 5'AMP) hydrolysiert und als zweite Komponente das TNOA-Salz eines Nucleosid-5'-O-diphosphates zum Ansatz gegeben.

Die Trennung der Verbindungen erfolgte säulenchromatographisch über DEAE-Cellulose direkt aus den Reaktionsansätzen mit einem Triethylammoniumbicarbonat (TBK)-Puffer, pH 7,5, (0,2–0,6 M) als Elutionsmittel. Das Elutionsprofil der Chromatographie wird am Beispiel der Darstellung von  $2'dGp_3[^{14}C]A$  gezeigt (siehe Abb. 6). Die einzelnen

\* EVOP = evolutionary operation



Dinucleosidtriphosphate		B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
1	$Gp_3A$	Guanin	Adenin	- OH	- OH	- OH
4	$Gp_3G$	Guanin	Guanin	- OH	- OH	- OH
7	$2'd Gp_3A$	Guanin	Adenin	- H	- OH	- OH
9	$Ip_3A$	Hypoxanthin	Adenin	- OH	- OH	- OH
11	$2'd Gp_3 2'd G$	Guanin	Guanin	- H	- OH	- H
14	$2',3'ddGp_3A$	Guanin	Adenin	- H	- H	- OH

Abb. 1. Formelbilder der Dinucleosidphosphate mit Triphosphatbrücke.

Tabelle 1. Analytische Befunde.

Substanz	UV-Spektren						$\epsilon$ [cm <sup>2</sup> · $\mu$ mol <sup>-1</sup> ]	Hypo- chromi- zität [%]	[ <sup>31</sup> P]-NMR-Spektren ( $\delta$ hochfeldverschoben gegenüber 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> in ppm)	$R_f$ -Werte Produkte		$R_t$ -Werte Produkte *
	$\lambda$ max			$\lambda$ min						System I <sup>e</sup>	System III <sup>f</sup> **	
	pH 2	pH 7	pH 11	pH 2	pH 7	pH 11						
<b>1, 1 a</b>	257	255	259	230	228	232	23,8 <sup>a</sup>	11,1	$\delta = -10,1$ [d, P <sup>1</sup> , P <sup>3</sup> ], - 21,6 [t, P <sup>2</sup> ]	0,05	0,31	96
<b>2, 2 a</b>	257	255	259	230	228	232	23,1	13,7	$\delta = -10,6$ [d, P <sup>1</sup> , P <sup>2</sup> ]	0,28	—	25
<b>3, 3 a</b>	258	260	260	231	230	232	24,2 <sup>b</sup>	19,2	$\delta = -10,7$ [s, P <sup>1</sup> , P <sup>2</sup> ]	0,41	—	18
<b>4</b>	256	252	262 *	228	224	232	22,1	6,5	wie <b>1, 1 a</b>	—	0,21	160
<b>5</b>	256	252	262 *	228	224	232	22,8 <sup>c</sup>	3,2	$\delta = -11$ [m, P <sup>1</sup> , P <sup>4</sup> ], - 22,5 [m, P <sup>2</sup> , P <sup>3</sup> ]	—	0,10	360
<b>6</b>	256	252	262 *	228	224	232	23,3 <sup>d</sup>	1,1	$\delta = -11$ [m, P <sup>1</sup> , P <sup>5</sup> ], - 22,5 [m, P <sup>2</sup> , P <sup>3</sup> , P <sup>4</sup> ]	—	0,04	—
<b>7, 7 a</b>	257	254	259	229	226	232	24,8	7,5	wie <b>1, 1 a</b>	0,06	0,32	108
<b>8, 8 a</b>	257	254	259	229	226	232	—	—	wie <b>2, 2 a</b>	0,38	—	31
<b>9</b>	252	251	256	228	226	228	20,4	8,8	wie <b>1, 1 a</b>	0,07	0,35	106
<b>10</b>	252	251	256	228	226	228	—	—	wie <b>2, 2 a</b>	0,44	—	30
<b>11</b>	255	252	262 *	228	225	238	21,4	9,2	wie <b>1, 1 a</b>	—	0,26	152
<b>12</b>	255	252	262 *	228	225	238	22,0	6,9	wie <b>5</b>	—	0,13	304
<b>13</b>	255	252	262 *	228	225	238	22,6	4,3	wie <b>6</b>	—	0,05	—
<b>14 a</b>	257	255	259	230	228	232	—	—	wie <b>1, 1 a</b>	0,03	0,30	117
<b>15 a</b>	257	255	259	230	228	232	—	—	wie <b>2, 2 a</b>	0,25	—	42
<b>16</b>	252	249	254	228	226	231	—	—	wie <b>2, 2 a</b>	0,27	—	74

\* ausgeprägtes breites Maximum

\*\* Vergleiche: 5'AMP, 0,46; 5'GDP, 0,24

<sup>a</sup> 22,4 nach [15]für rro(Gp<sub>3</sub>A) ermittelter Wert: 24,0 (10,6%) nach [5];<sup>b</sup> für rro(Ap<sub>2</sub>A) ermittelter Wert: 23,1 (23,0%) nach [5];<sup>c</sup> für Ap<sub>4</sub>A ermittelter Wert: 25,8 (14,0%) nach [16];<sup>d</sup> für Ap<sub>3</sub>A ermittelter Wert: 27,9 (7,0%) nach [17 a)]; 28,0 (6,7%) nach [17 b)];für rro(Ap<sub>3</sub>A) ermittelter Wert: 21,1 (29,7%) nach [18];für Ip<sub>3</sub>I<sub>(248,5 nm)</sub> ermittelter Wert: 23,4 (4,1%) nach [17 b)].(Berechnungsgrundlage:  $\epsilon_{(260 \text{ nm})}$  für A: 15,0,  $\epsilon_{(248,5 \text{ nm})}$  für I: 12,2,  $\epsilon_{(260 \text{ nm})}$  für G: 11,8).<sup>e</sup> System I: KNO<sub>3</sub> 0,5 M pH 5,5 (TLC, PEI-Cellulose) [5];<sup>f</sup> System III: TBK 0,4 M pH 7,5 bei 4 °C (TLC, PEI-Cellulose);\* System IV: Anionenaustausch-Liquidchromatographie über Nucleosil 5 SB (Fa. Macherey und Nagel, Düren); mobile Phase: 0,1 M KNO<sub>3</sub>, 0,02 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 2,6; Fließgeschwindigkeit 8 ml/h; 32 atm; 24 °C; Detektion 254 nm (vgl. auch [19]).

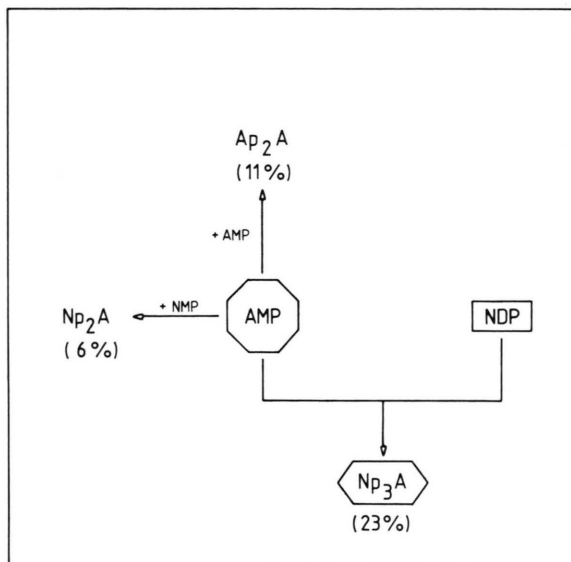


Abb. 2. Syntheseverlauf. AMP aktiviert; NDP als nicht aktivierte Komponente eingesetzt; Np<sub>3</sub>A Zielprodukt.

Reaktionsprodukte wurden entweder durch Verwendung der Hauptpeakfraktion oder durch Rechromatographie unter den oben genannten Bedingungen isoliert. Eine Charakterisierung der chromatographisch und elektrophoretisch einheitlichen Komponenten (Formelbild Abb. 1) erfolgte einerseits durch UV- und <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie und andererseits konnte durch Kombination von enzymatischen und chemischen Analysenverfahren (PDE-Spaltungsver-

halten, 5'-Nucleotidase-Spezifität und Perjodat-Spaltung) sichergestellt werden, daß die 3'- und/ bzw. 2'-Hydroxylgruppen in freier Form vorlagen. Sämtliche analytischen Befunde sind in Tab. I zusammengestellt.

Die Synthese für Np<sub>3</sub>A wurde in folgender Weise optimiert:

- Mengenverhältnis der Ausgangskomponenten,
- Aktivierungsart,
- Reaktionszeit.

Die Optimierung erbrachte zusammengefaßt folgende Befunde:

(1) Wird das überschüssige 1,1'-Carbonyldiimidazol nach der Aktivierung von 5'AMP mit Methanol hydrolysiert, so ergibt sich trotz Einsatz unterschiedlicher Mengenverhältnisse der beiden Ausgangssubstanzen ein einheitliches Produkt-Spektrum (Abb. 2).

(2) Wird 5'GDP anstatt 5'AMP aktiviert und sodann das Aktivierungsreagens mit Methanol hydrolysiert, ergibt sich ebenfalls ein einheitliches, allerdings gegenüber (1) stark erweitertes Produkt-Spektrum (Abb. 3).

(3) Wird nach Aktivierung des Nucleosid-5'-mophosphates das überschüssige Aktivierungsreagens nicht hydrolysiert, so kommt es zwar wegen der dann möglichen Aktivierung der zweiten zugeetzten Nucleotidkomponente zu einer Erweiterung der Produktplatte gegenüber den unter (1) geschild-

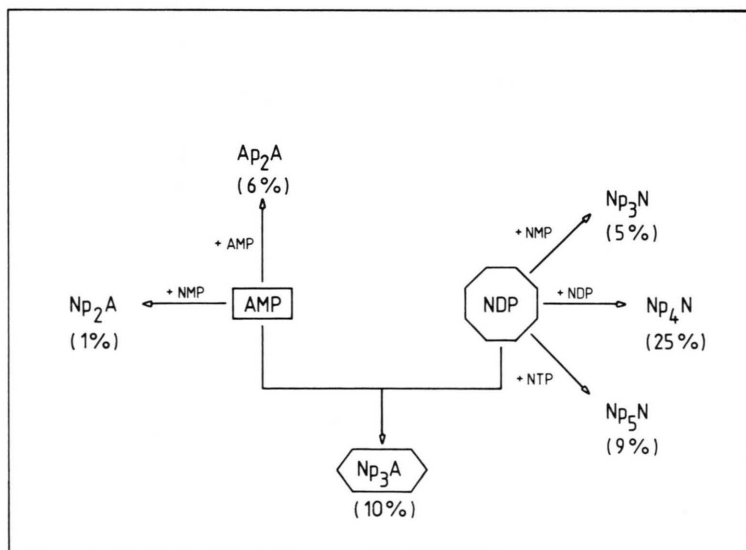


Abb. 3. Syntheseverlauf. NDP aktiviert; AMP als nicht aktivierte Komponente eingesetzt; Np<sub>3</sub>A Zielprodukt.

Abb. 4. Syntheseverlauf. AMP voraktiviert; NDP als zweite Komponente zugegeben, ohne vorherige Desaktivierung des 1.1'-Carbonyldiimidazols;  $\text{Np}_3\text{A}$  Zielprodukt.

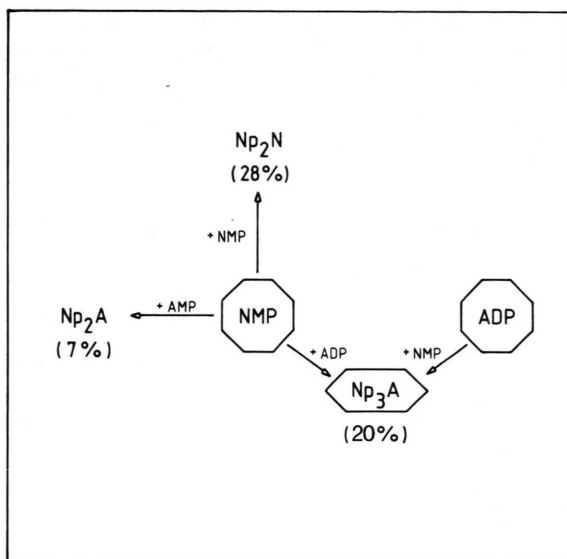
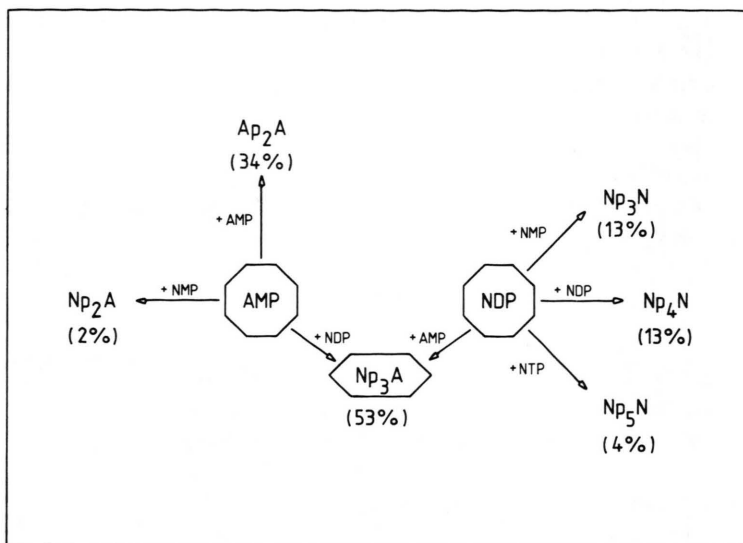


Abb. 5. Syntheseverlauf. IMP voraktiviert; ADP als zweite Komponente zugegeben, ohne vorherige Desaktivierung des 1.1'-Carbonyldiimidazols;  $\text{Np}_3\text{A}$  Zielprodukt.

derten Reaktionsbedingungen (Abb. 4), aber auch zu einer eindeutigen Ausbeuteerhöhung an  $\text{Np}_3\text{A}$ . 5'GMP eignet sich nicht zur Aktivierung, da es durch nucleophilen Angriff der 2-Aminogruppe am aktivierten Phosphat zur Bildung eines cyclischen Imidophosphates kommt. Darüberhinaus zeigte sich in den Versuchsanordnungen 5. bis 8. (Abb. 5), daß das Produkt-Spektrum bei dieser Aktivierungsart

über das molare Verhältnis der eingesetzten Nucleotide zu steuern ist, wobei ein AMP/NDP-Verhältnis von etwa 1/2 am vorteilhaftesten war.

### Experimentelles

#### 1. $P^1, P^3$ -(5'-Guanosyl-5''-adenosyl)triphosphat (1)

50,0 mg (100  $\mu\text{mol}$ ) 5'AMP  $\text{Na}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  und 116,7 mg (250  $\mu\text{mol}$ ) 5'GDP  $\text{Li}_3$  wurden über das jeweilige Pyridiniumsalz in das TNOA-Salz entsprechend [13] überführt. Das TNOA-Salz des 5'AMP wurde anschließend mit 101,3 mg (625  $\mu\text{mol}$ ) 1.1'-Carbonyldiimidazol in 12 ml DMF aktiviert, die Aktivierung nach 20 Stunden durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  (1 mmol) Methanol beendet und das TNOA-Salz des 5'GDP in 3 ml DMF gelöst zum Ansatz gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 5 Tage bei Raumtemperatur unter Vakuum in einem Exsikkator gerührt und säulenchromatographisch aufgearbeitet.

Die Ausbeuten auf 5'AMP bezogen betrugen: 23%  $\text{Gp}_3\text{A}$  (1), 6%  $\text{Gp}_2\text{A}$  (2) und 11%  $\text{Ap}_2\text{A}$  (3).

#### 2. $P^1, P^3$ -(5'-Guanosyl-5''-adenosyl)triphosphat (1)

25,0 mg (50  $\mu\text{mol}$ ) 5'AMP  $\text{Na}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  und 116,7 mg (250  $\mu\text{mol}$ ) 5'GDP  $\text{Li}_3$  wurden als TNOA-Salze eingesetzt. Das TNOA-Salz des 5'GDP wurde mit 202,7 mg (1250  $\mu\text{mol}$ ) 1.1'-Carbonyldiimidazol in 13 ml DMF aktiviert. Durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  (2 mmol) Methanol wurde der Aktivierungsschritt

nach 23 Stunden beendet. Anschließend wurde das TNOA-Salz des 5'AMP in 6 ml DMF zu dem Reaktionsansatz gegeben. Der Ansatz wurde 6 Tage bei Raumtemperatur unter Vakuum gerührt. Auf 5'AMP bezogen, betrugen die Ausbeuten nach der Aufarbeitung: 10% Gp<sub>3</sub>A (1), 1% Gp<sub>2</sub>A (2) und 6% Ap<sub>2</sub>A (3); bezogen auf 5'GDP: 5% Gp<sub>3</sub>G (4), 25% Gp<sub>4</sub>G (5) und 9% Gp<sub>5</sub>G (6).

### 3. P<sup>1</sup>,P<sup>3</sup>-(2'-Desoxy-5'-guanosyl-5''-adenosyl)triphosphat (7)

12,5 mg (25 µmol) 5'AMP Na<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O und 47,3 mg (100 µmol) 2'dGDP Na<sub>2</sub> wurden als TNOA-Salze eingesetzt. Das TNOA-Salz des 5'AMP wurde in 10 ml DMF gelöst und mit 20,3 mg (125 µmol) 1.1'-Carbonyldiimidazol versetzt. Durch Zugabe von 10 µl (200 µmol) Methanol wurde der Aktivierungsschritt nach 24 Stunden abgebrochen. Das TNOA-Salz des 2'dGDP wurde anschließend zugegeben und der Reaktionsansatz (17 ml DMF) 4 Tage bei Raumtemperatur unter Vakuum gerührt. Nach der Aufarbeitung betrugen die Ausbeuten: 21% 2'dGp<sub>3</sub>A (7), 1% 2'dGp<sub>2</sub>A (8) und 17% Ap<sub>2</sub>A (3).

### 4. P<sup>1</sup>,P<sup>3</sup>-(5'-Inosyl-5''-adenosyl)triphosphat (9)

10,0 mg (20 µmol) 5'AMP Na<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O und 49,4 mg (100 µmol) 5'IDP Na<sub>3</sub> wurden als TNOA-Salze ein-

gesetzt. Das TNOA-Salz des 5'AMP wurde mit 16,2 mg (100 µmol) 1.1'-Carbonyldiimidazol aktiviert. Nach der Hydrolyse des überschüssigen Aktivierungsreagens mit 8 µl (160 µmol) Methanol wurde das TNOA-Salz des 5'IDP zugegeben und der Reaktionsansatz (19 ml DMF) 4 Tage bei Raumtemperatur unter Vakuum gerührt. Die Ausbeuten auf 5'AMP bezogen betrugen: 21% Ip<sub>3</sub>A (9), 5% Ip<sub>2</sub>A (10) und 28% Ap<sub>2</sub>A (3).

### 5. P<sup>1</sup>,P<sup>3</sup>-(5'-Guanosyl-5''-[<sup>14</sup>C]adenosyl)triphosphat (1a)

12,5 mg (25 µmol) 5'AMP Na<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O und 42,0 nmol [<sup>14</sup>C]5'AMP (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (1,0 ml der [<sup>14</sup>C]5'AMP (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-Stammlösung: 0,02 mCi/ml; 479 mCi/mmol; Fa. New England Nuclear, Boston, USA) wurden gemeinsam als TNOA-Salz mit 20,3 mg (125 µmol) 1.1'-Carbonyldiimidazol aktiviert. Nach diesem Aktivierungsschritt wurde das TNOA-Salz von 23,3 mg (50 µmol) 5'GDP Li<sub>3</sub> ohne vorherige Hydrolyse des überschüssigen 1.1'-Carbonyldiimidazols zugegeben und der Reaktionsansatz (17 ml) 4 Tage bei Raumtemperatur im Vakuum gerührt. Nach der säulenchromatographischen Aufarbeitung ergaben sich folgende Produktausbeuten: 31% Gp<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]A (1a), 3% Gp<sub>2</sub>[<sup>14</sup>C]A (2a) und 15% [<sup>14</sup>C]Ap<sub>2</sub>[<sup>14</sup>C]A (3a) (alle Angaben bezogen auf 5'AMP).

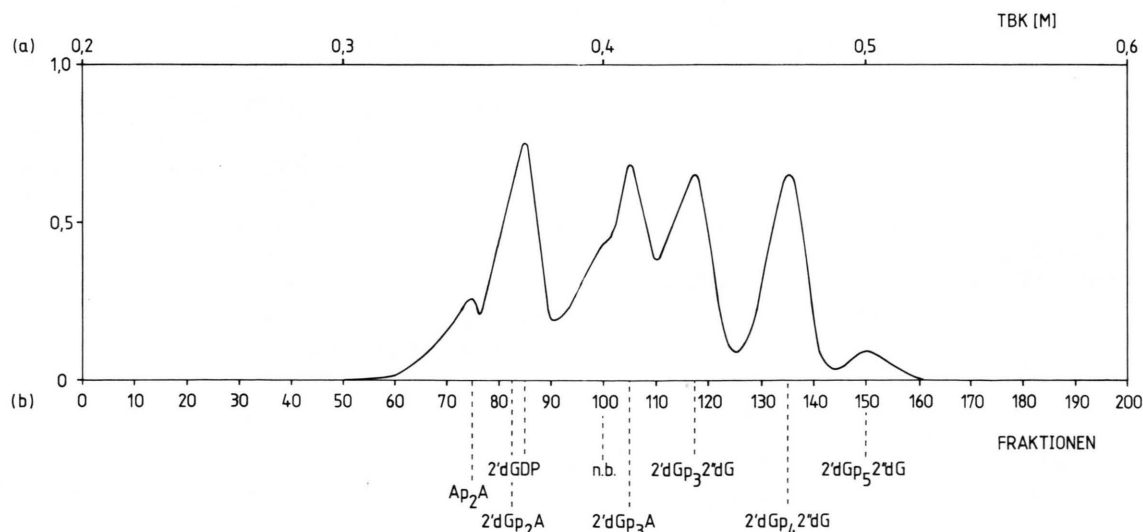


Abb. 6. Elutionsdiagramm der säulenchromatographischen Trennung des Reaktionsansatzes 4.6. Ordinate: Absorption bei 254 nm. Abszisse: (a) Triethylammoniumbicarbonatgradient [M]. Folgende Substanzen wurden identifiziert: Ap<sub>2</sub>A (0,35 M), 2'dGp<sub>2</sub>A (0,365 M), 2'dGDP (0,37 M), 2'dGp<sub>3</sub>A (0,41 M), 2'dGp<sub>3</sub>,2'dG (0,435 M), 2'dGp<sub>4</sub>,2'dG (0,47 M) und 2'dGp<sub>5</sub>,2'dG (0,50 M). (b) Fraktionen zu je 18 ml.



6.  $P^1, P^3$ -(2' Desoxy-5'-guanosyl-5''-[ $^{14}C$ ]adenosyl)triphosphat (7a)

12,5 mg (25  $\mu$ mol) 5'AMP Na<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O und 42,0 nmol [ $^{14}C$ ]5'AMP (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (1,0 ml der [ $^{14}C$ ]5'AMP (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-Stammlösung: 0,02 mCi/ml; 479 mCi/mmol; Fa. New England Nuclear, Boston, USA) wurden zusammen als TNOA-Salz mit 20,3 mg (125  $\mu$ mol) 1.1'-Carbonyldiimidazol aktiviert. Nach diesem Aktivierungsschritt wurde das TNOA-Salz des 2'dGDP [47,3 mg (100  $\mu$ mol) 2'dGDP Na<sub>2</sub>] zum Reaktionsansatz gegeben, ohne vorher überschüssiges Aktivierungsreagens mit Methanol zu hydrolysieren. Nach einer Reaktionszeit von 4 Tagen bei Raumtemperatur unter Vakuum wurde der Ansatz aufgearbeitet.

Die Ausbeuten betrugen bezogen auf 5'AMP: 53% 2'dGp<sub>3</sub>[ $^{14}C$ ]A (7a), 2% 2'dGp<sub>2</sub>[ $^{14}C$ ]A (8a) und 34% [ $^{14}C$ ]Ap<sub>2</sub>[ $^{14}C$ ]A (3a) bezogen auf 2'dGDP: 13% 2'dGp<sub>3</sub>2''dG (11), 13% 2'dGp<sub>4</sub>2''dG (12), 4% 2'dGp<sub>5</sub>2''dG (13) und ein nicht identifiziertes Produkt.

7.  $P^1, P^3$ -(2',3'-Didesoxy-5'-guanosyl-5''-[ $^{14}C$ ]adenosyl)triphosphat (14a)

2,4 mg (4,8  $\mu$ mol) 5'AMP Na<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O und 42 nmol [ $^{14}C$ ]5'AMP(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (1,0 ml der [ $^{14}C$ ]5'AMP(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-Stammlösung: 0,02 mCi/ml; 4,79 mCi/mmol; Fa. New England Nuclear, Boston, USA) wurden als TNOA-Salz mit 3,9 mg (24  $\mu$ mol) 1.1'-Carbonyldiimidazol aktiviert und nach 24 Stunden 3,8 mg (8

$\mu$ mol) 2'.3'ddGDP Na<sub>3</sub> als TNOA-Salz zugegeben, ohne das Aktivierungsreagens vorher zu hydrolysieren. Nach einer Reaktionszeit von 4 Tagen bei Raumtemperatur unter Vakuum wurde der Ansatz (8 ml DMF) aufgearbeitet.

Die Ausbeuten betrugen bezogen auf 5'AMP: 10% 2'.3'ddGp<sub>3</sub>[ $^{14}C$ ]A (14a), 2% 2'.3'ddGp<sub>2</sub>[ $^{14}C$ ]A (15a) und 42% [ $^{14}C$ ]Ap<sub>2</sub>[ $^{14}C$ ]A (3a). 2'.3'ddGDP wurde von PL-Biochemicals, Milwaukee, USA, bezogen.

8.  $P^1, P^3$ -(5'-Inosyl-5''-adenosyl)triphosphat (9)

10,0 mg (20  $\mu$ mol) 5'IMP Na<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O und 18,8 mg (40  $\mu$ mol) 5'ADP Na<sub>3</sub> wurden als TNOA-Salze eingesetzt. Das TNOA-Salz des 5'IMP wurde mit 16,2 mg (100  $\mu$ mol) 1.1'-Carbonyldiimidazol aktiviert. Ohne das Aktivierungsreagens vorher zu hydrolysieren wurde nach 22,5 Stunden das TNOA-Salz des 5'ADP zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 4 Tagen bei Raumtemperatur unter Vakuum wurde der Ansatz (17 ml DMF) aufgearbeitet.

Die Ausbeuten betrugen bezogen auf 5'IMP: 20% Ip<sub>3</sub>A (9), 7% Ip<sub>2</sub>A (10) und 28% Ip<sub>2</sub>I (16).

Danksagungen

Professor H. Marsmann danken wir für die Aufnahme der <sup>31</sup>P-NMR-Spektren, Dr. K. S. Boos für wertvolle Diskussionen sowie dem Land Nordrhein-Westfalen und dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

- [1] A. J. Shatkin, Cell **9**, 645 (1976).
- [2] A. Travers, Nature **283**, 16 (1980).
- [3] C. D. Lobaton, C. G. Vallejo, A. Sillero u. M. A. G. Sillero, Eur. J. Biochem. **50**, 495 (1975).
- [4] C. G. Vallejo, C. D. Lobaton, M. Quintanilla, A. Sillero u. M. A. G. Sillero, Biochim. Biophys. Acta **438**, 304 (1976).
- [5] S. Bornemann u. E. Schlimme, Z. Naturforsch. **35 c**, 57 (1980).
- [6] D. B. Zilversmit u. A. K. Davis, J. Lab. Clin. Med. **35**, 155 (1950).
- [7] H. G. Khorana u. A. R. Todd, J. Chem. Soc. **1953**, 2257.
- [8] G. E. P. Box, Appl. Stat. **Vol. VI**, Nr. 2, 3 (1957).
- [9] G. E. P. Box u. N. R. Draper, Evolutionary Operation J. Wiley, New York 1969.
- [10] H. A. Staab, Liebigs Ann. Chem. **609**, 75 (1957).
- [11] F. Cramer, H. Schaller u. H. A. Staab, Chem. Ber. **94**, 1612, ibid. 1621 (1961).
- [12] D. E. Hoard u. D. G. Ott, J. Am. Chem. Soc. **87**, 1785 (1965).
- [13] a) K. S. Boos, Dissertation TU Hannover (1977); b) K. S. Boos u. E. Schlimme, Biochemistry **18**, 5304 (1979).
- [14] A. Michelson, Biochim. Biophys. Acta **91**, 1 (1964).
- [15] T. Hata, I. Nakagawa, K. Shimotohno u. K. Miura, Chem. Letters, **1976**, 987.
- [16] C. D. Lobaton, M. Sillero u. A. Sillero, Biochem. Biophys. Res. Commun. **67**, 279 (1975).
- [17] a) J. Köhrle, K. S. Boos u. E. Schlimme, Liebigs Ann. Chem., **1977**, 1160; b) H. Kröhnert, Staatsexamensarbeit, GH Paderborn (1978).
- [18] S. Lindner, Staatsexamensarbeit, GH Paderborn (1979).
- [19] K. W. Stahl, E. Schlimme u. D. Bojanovski, J. Chromatogr. **83**, 395 (1973).