

Abbildung 4. Blick entlang der Helixachse auf die zentralen AGG-CCT-Abschnitte der modellierten Struktur des Bicyclo[3.2.1]DNA-13mer-Duplex (oben), von kanonischer A-DNA (Mitte) und von kanonischer B-DNA (unten). Die Ähnlichkeit des Basenstapelungsmusters zwischen A-DNA und Bicyclo[3.2.1]DNA ist offensichtlich.

Rückgrat-Torsionswinkel α - ζ von denen der B-DNA auf Erwartungsgemäß ergeben sich jedoch Abweichungen im Abstandshalter zwischen Rückgrat und Base. In der Bicyclo[3.2.1]DNA liegt er quasi perfekt gestreckt vor und unterscheidet sich damit deutlich von der entsprechenden DNA-Struktureinheit. Dies führt zu einem Basenstapelungsmuster, welches deutlich demjenigen von A-DNA gleicht (Abbildung 4), was in Einklang mit den CD-Spektren ist.

Aus den experimentellen Resultaten lassen sich vorerst die folgenden Schlüsse über die strukturelle und energetische Rolle des Furanose-Ringsystems der DNA ziehen: 1) Die entropischen Kosten der Bildung eines Duplex mit einem DNA-Analogon auf Phosphodiesterbasis, in welchem die Basen flexibel an die Rückgrateinheit gebunden sind, lassen sich überwinden, wenn die Rückgrateinheit selbst konformativ fixiert ist. 2) Selbst ohne ein Ringsystem, welches die Nucleobase relativ zur Rückgrateinheit in eine wohldefinierte Lage bringt, kann die Strangorientierungsselektivität in der Duplexbildung beibehalten werden. Dies ist sowohl im Hinblick auf das acyclische, auf Peptidbasis aufgebaute DNA-Analogon PNA von Interesse, welches nur eine bescheidene Strangorientierungsselektivität zeigt,^[19] als auch im Zusammenhang mit gemischten α/β -DNA-Duplexen, welche im Unterschied zu β/β -DNA-Duplexen eine parallele Strangorientierung bevorzugen.^[20] 3) Eine Erhöhung der translatotrischen und rotatorischen Freiheitsgrade eines Basenpaars im Zentrum einer Doppelhelix führt nicht zu einer Verminderung der Basenpaarungsselektivität.

Was auch immer die chemischen Gründe waren, nach welchen die Natur RNA und DNA als genetisches Material auswählte – Paarungssysteme auf Phosphodiesterbasis, welche zwischen Base und Rückgrat keinen Ring als Verbindungsstück aufweisen, lassen sich nicht kollektiv von der Liste der potentiellen Kandidaten im Selektionsprozess streichen.

Eingegangen am 16. Februar 2000 [Z14713]

- [1] *The RNA World* (Hrsg.: R. F. Gesteland, T. R. Cech, J. F. Atkins), 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999.
- [2] A. Eschenmoser, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 218–259.
- [3] K. C. Schneider, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 453–455.
- [4] L. Peng, H.-J. Roth, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1494–1512.
- [5] P. Nielsen, L. H. Dreieck, J. Wengel, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 19–28.
- [6] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607–3630.

- [7] V. K. Rajwanshi, A. E. Hakansson, B. Dahl, J. Wengel, *Chem. Commun.* **1999**, 1395–1396.
- [8] C. Hendrix, H. Rosemeyer, I. Verheggen, F. Seela, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 110–120.
- [9] Y. Maurinsh, H. Rosemeyer, R. Esnouf, A. Medvedovici, J. Wang, G. Ceulemans, E. Lescrinier, C. Hendrix, R. Busson, P. Sandra, F. Seela, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2139–2150.
- [10] M. Bolli, C. Litten, R. Schütz, C. Leumann, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 197–206.
- [11] M. Bolli, H. U. Trafelet, C. Leumann, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4660–4667.
- [12] R. Steffens, C. J. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3249–3255.
- [13] M. Beier, F. Reck, T. Wagner, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Science* **1999**, *283*, 699–703.
- [14] J. Hunziker, H.-J. Roth, M. Böhringer, A. Giger, U. Diederichsen, M. Göbel, R. Krishnan, B. Jaun, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 259–352.
- [15] O. Jungmann, H. Wippo, M. Stanek, H. K. Huynh, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1527–1530.
- [16] S. Pitsch, R. Krishnamurthy, M. Bolli, S. Wendeborn, A. Holzner, M. Minton, C. Lesuer, I. Schönvogt, B. Jaun, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 1621–1635.
- [17] Ein anderes Nucleosid-Analogon, welches auf ähnlichen Entwurfskriterien beruht, ist kürzlich vorgestellt worden (M. Marangoni, A. Van Aerschot, P. Augustyns, J. Rozenski, P. Herdewijn, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3034–3041). Jedoch wurden nur Eigenschaften von Oligonucleotiden, welche eine solcherart modifizierte Einheit aufwiesen, beschrieben. Eine Extrapolation auf die Eigenschaften vollständig modifizierter Oligonucleotide ist unmöglich.
- [18] C. Epple, C. Leumann, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 209–216.
- [19] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566–568.
- [20] F. Morvan, B. Rayner, J.-L. Imbach, M. Lee, J. A. Hartley, D.-K. Chang, J. W. Lown, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 7027–7044.

Regioselektive α -Phosphorylierung von Aldosen in wässriger Lösung**

Ramanarayanan Krishnamurthy, Sreenivasulu Guntha und Albert Eschenmoser*

Im Zusammenhang mit Studien über eine potentielle präbiotische Chemie des Glycolaldehyds^[3] beschrieben wir vor kurzem eine unter milden Bedingungen in wässriger

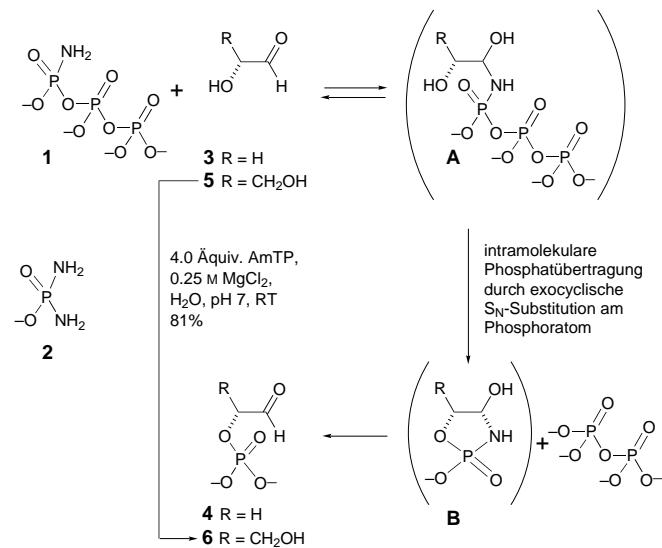
[*] Prof. Dr. A. Eschenmoser, Prof. Dr. R. Krishnamurthy, Dr. S. Guntha
Department of Chemistry and The Skaggs Institute for Chemical Biology
The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Fax: (+1) 858-784-9573
E-mail: rkrishna@scripps.edu
und

Laboratorium für Organische Chemie
Eidgenössische Technische Hochschule
Universitätstrasse 16, 8092 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 1-632-1043

[**] Chemie von α -Aminonitrilen, 29. Mitteilung. 28. Mitteilung: Lit. [1], 27. Mitteilung: Lit. [2]. Diese Arbeit wurde durch die Skaggs Foundation unterstützt. S.G. dankt dem NASA NSCORT Exobiology Programm (La Jolla) für ein Postdoktorandenstipendium.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können bei R.K. (rkrishna@scripps.edu) angefordert werden.

Lösung erfolgende Umwandlung dieses Hydroxaldehyds in sein 2-Phosphat^[1] (Schema 1). Das spezifische Phosphorylierungsreagens in diesem Prozess ist Amidotriphosphat **1** (AmTP), von dem bekannt ist,^[4] dass es sich durch Ammonolyse von Cyclotriphosphat („Metatriphosphat“) in wässriger Lösung bildet. Cyclotriphosphat selbst wirkt nicht als



Schema 1. Regioselektive intramolekulare Phosphorylierung von Glycolaldehyd (R = H) und D-Glycerinaldehyd (R = CH₂OH) durch Amidotriphosphat **1** (AmTP).

Phosphorylierungsmittel unter den Bedingungen, unter denen sein Ammonolyseprodukt AmTP Glycolaldehyd in praktisch quantitativer Ausbeute phosphoryliert.^[1] Der Grund für diesen bemerkenswerten Reaktivitätsunterschied ist die spezifische Fähigkeit des Amidotriphosphats, mit Glycolaldehyd reversibel ein Carbonyl-Additionsprodukt **A** zu bilden; dessen α -Hydroxygruppe wird durch eine intramolekulare Phosphatgruppenübertragung unter Bildung des Zwischenprodukts **B** phosphoryliert, das dann anschließend zu Glycolaldehydphosphat **4** hydrolysiert (Schema 1).

Diesem mechanistischen Konzept gemäß sollte AmTP generell das Potential zur regioselektiven Phosphorylierung von α -Hydroxygruppen in Aldozuckern haben. Hier berichten wir, dass AmTP mit Glycerinaldehyd, den beiden Tetrofuranosiden und den vier Aldopentosen unter milden Bedingungen Reaktionsprodukte liefert, die sich von einer intramolekularen Phosphatgruppenübertragung auf die Hydroxygruppe an der C2-Position des Zuckers herleiten lassen. Des Weiteren beschreiben wir eine vergleichbar regioselektive Phosphorylierung durch Diamidophosphat **2** (DAP)^[5] anstelle von AmTP als Phosphorylierungsreagens; für Aldofuranosiden erweist sich diese Variante sogar als präparativ günstiger, was die Isolierung der Produkte betrifft.

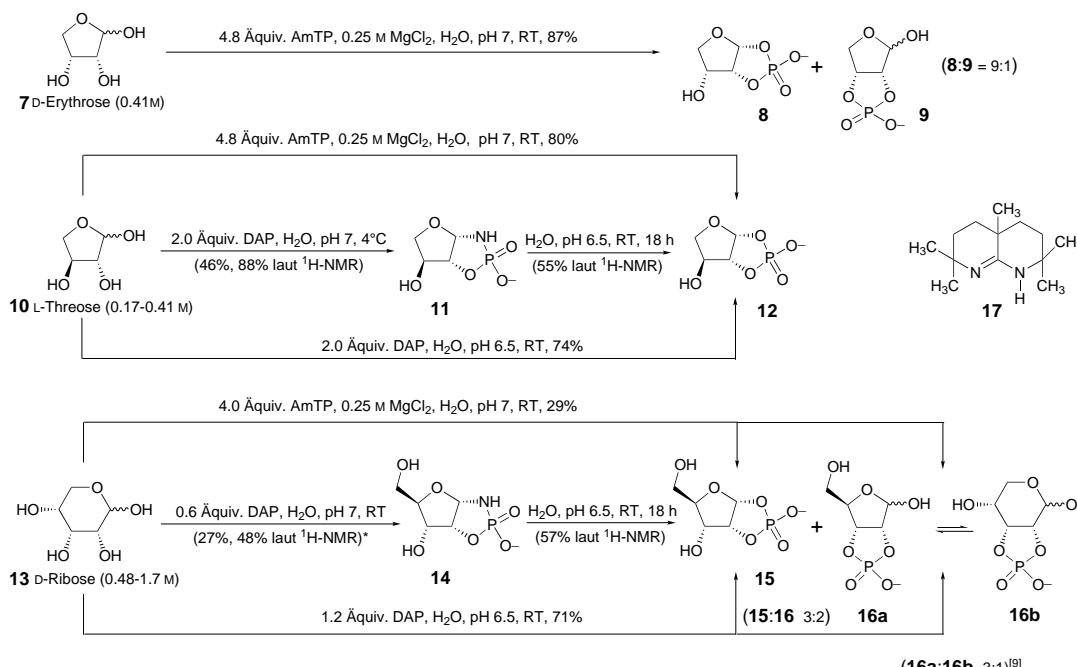
D-Glycerinaldehyd **5** reagiert unter den für Glycolaldehyd optimierten Bedingungen (0.025 M wässrige Lösung, 0.25 M MgCl₂, Raumtemperatur (RT), 5 Tage)^[1] mit dem Natriumsalz von AmTP (4 Äquiv., pH ≈ 7) langsam, aber sauber und mit hoher Regioselektivität zu D-Glycerinaldehyd-2-phosphat **6** (Schema 1; 81% Ausbeute an isoliertem Produkt nach Ionenaustauschchromatographie). ¹H- und ³¹P-NMR-Spek-

tren des Reaktionsgemisches zeigen keine erkennbare Bildung von Glycerinaldehyd-3-phosphat.^[6]

Bei gleicher Behandlung der Aldotetrosen **7** und **10** beobachtet man eine ähnliche Regioselektivität der Phosphorylierung, allerdings mit einer Überraschung: Produkte sind die 1,2-Cyclophosphate **8** bzw. **12**, isolierbar in 87% bzw. 80% Ausbeute. Während im Falle der Erythrose (2,3-Diol in *cis*-Konfiguration) das Produktgemisch ungefähr 10% des zu **8** isomeren 2,3-Cyclophosphats **9** enthält, fällt bei der Reaktion mit Threose (2,3-Diol in *trans*-Konfiguration) das 1,2-Cyclophosphat **12** isomerenfrei an (Schema 2). D-Ribose **13** reagiert unter ähnlichen Bedingungen mit vier Äquivalenten AmTP viel langsamer und ergibt neben dem 1,2-cyclophosphat **15** das Gemisch der 2,3-Cyclophosphate **16a** und **16b**. Der Anteil der beiden letzteren ist höher als bei der vergleichbaren Reaktion in der Erythrose-Reihe (Schema 2). Auch sind die Gesamtausbeuten niedriger (29%); vermutlich werden Zwischenprodukte (z.B. das Primäraddukt) in der Pyranoseform abgefangen.^[7] Die anderen drei Pentosen verhalten sich analog zur Ribose, soweit wir dies aus ¹H- und ³¹P-NMR-spektroskopisch verfolgten Experimenten schließen können. Die Reaktion von AmTP mit Hexosen wurde an den Beispielen der Glucose und der Mannose geprüft. In beiden Fällen konnte nach 14 Tagen ¹H-NMR-spektroskopisch nur wenig Phosphorylierung (ca. 5%) beobachtet werden.

Die relative Reaktivität der Aldosen gegenüber AmTP entspricht der Reihenfolge Glycolaldehyd > Glycerinaldehyd > Erythrose > Threose > Ribose >> Glucose und Mannose. Unter Bedingungen, unter denen die Phosphorylierung der C₂-, C₃- und C₄-Zucker innerhalb von zwei bis fünf Tagen vollständig erfolgt, läuft sie im Fall der Ribose innerhalb von zwei Wochen nur zu ca. einem Drittel ab (laut ¹H-NMR). Dieser Unterschied dürfte sowohl mit den relativen Stabilitäten der offenen Aldehydformen der Aldosen in wässriger Lösung als auch mit der Lage des Furanose/Pyranose-Gleichgewichts im Zusammenhang zu stehen.^[7] Andererseits werden, wenn auch viel langsamer, die „cyclischen“ Aldosen (**7**, **10** und **13**) durch AmTP auch in Abwesenheit von MgCl₂ phosphoryliert, dies im Gegensatz zu den beiden „acyclischen“ Aldosen (Glycolaldehyd und **5**).

Die Strukturzuordnungen für die Produkte in der Ribose-Reihe fußen auf spektroskopischen Vergleichen mit authentischen Proben des Ribofuranosyl-1,2-cyclophosphats **15**^[8] und des entsprechenden 2,3-Cyclophosphats **16**^[9], während die Zuordnungen für **8** und **12** in der Tetrose-Reihe durch ¹H- und ³¹P-NMR-Spektroskopie inklusive ¹H-¹H- sowie ¹H-¹³C-NMR-Korrelationsexperimenten gestützt werden. Bei Durchführung der Reaktionen in D₂O und in Gegenwart von MgCl₂ können NMR-spektroskopisch vorübergehend Signale beobachtet werden, die den 1,2-Amidocyclophosphaten **11** ($\delta(^1\text{H}) = 5.57$, CH-anomeres Zentrum; $\delta(^{31}\text{P}) = 25.7$) bzw. **14** ($\delta(^1\text{H}) = 5.35$, $\delta(^{31}\text{P}) = 25.9$) zuzuordnen sind. Im weiteren Verlauf der Reaktion nimmt die Intensität dieser Signale wieder ab, während die Signale der 1,2-Cyclophosphate **12** ($\delta(^1\text{H}) = 5.95$, CH-anomeres Zentrum; $\delta(^{31}\text{P}) = 18.4$) und **15** ($\delta(^1\text{H}) = 5.87$, $\delta(^{31}\text{P}) = 18.8$) ansteigen. Die Konstitution des als Zwischenprodukt gebildeten 1,2-Amidocyclophosphats **11** wurde durch ¹H-, ³¹P- und ¹³C-NMR-Spektroskopie bestimmt



Schema 2. Aus der Umsetzung von Aldosen mit dem Natriumsalz von Amidotriphosphat (AmTP) oder Diamidophosphat (DAP) in den angegebenen Ausbeuten isolierte und spektroskopisch charakterisierte Reaktionsprodukte. Das Experiment mit AmTP in der Threose-Reihe wurde mit D-Threose durchgeführt. Ausbeuteangaben beziehen sich auf eingesetzte Aldose, mit Ausnahme des durch * gekennzeichneten Werts.^[10]

(Abbildung 1). Versuche zu dessen Isolierung durch Ionenaustrauschchromatographie führten zu einem Gemisch, das neben **11** auch das Cyclophosphat **12** enthielt.

Nach Feldmann und Thilo^[4b] kann bei der Ammonolyse von Cyclotriphosphat zu AmTP die Reaktion weiter voranschreiten und das Diamidophosphat **2** (DAP) gebildet werden. Präparativ ist diese Verbindung aus POCl₃ einfach zugänglich und als kristallines Natriumsalz-Pentahydrat haltbar.^[5] Es schien uns, dass auch DAP ähnlich wie AmTP als selektives Phosphorylierungsreagens für α -Hydroxyaldehyde brauchbar sein könnte, indem eine der Aminogruppen gegenüber der Carbonylgruppe als Nucleophil wirken und die zweite (nach Protonierung) als Abgangsgruppe in der intramolekularen Phosphatübertragung agieren würde. Diese Erwartung wurde in Experimenten mit L-Threose und D-Ribose als repräsentative Aldosen bestätigt. Dabei wurden Reaktionsbedingungen gefunden, die nicht nur die Isolierung der labilen 1,2-Amidocyclophosphate **11** und **14** erlauben, sondern auch bessere Ausbeuten der Endprodukte bei den Phosphorylierungsexperimenten in der Ribosereihe ergeben.

Lässt man L-Threose mit zwei Äquivalenten DAP in wässriger Lösung (0.16 M **10**, RT, pH 9.6) reagieren, so beobachtet man innerhalb von 24 Stunden nur die Bildung eines Addukts neben sehr wenig Phosphorylierung (¹H- und ³¹P-NMR). Wenn die Umsetzung hingegen bei 4 °C und bei einem durch Ionentauscherharz IR-120 (H⁺) eingestellten pH-Wert von 7 durchgeführt wird, wird das 1,2-Amidocyclophosphat **11** und eine geringe Menge von **12**

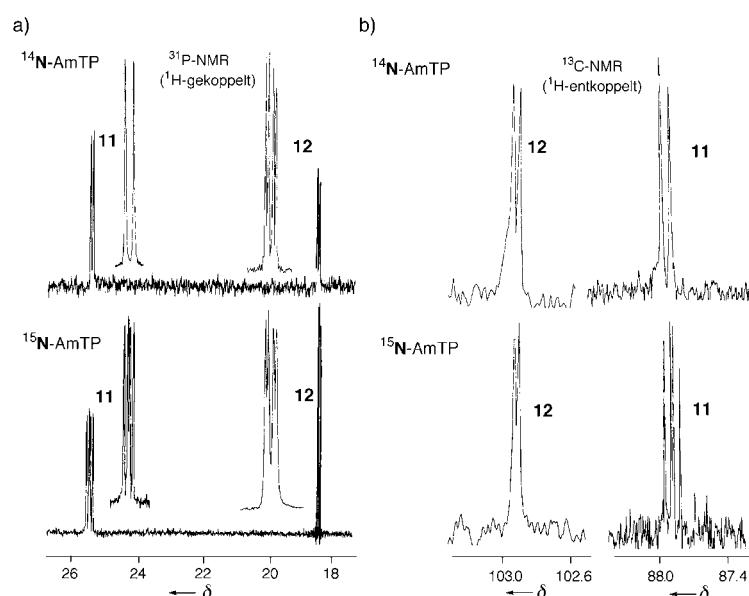


Abbildung 1. ³¹P-NMR- und ¹³C-NMR-spektroskopischer Vergleich von Reaktionsgemischen aus der Reaktion von Threose mit ¹⁴N-AmTP (oben) und ¹⁵N-AmTP (unten) (0.17 mmol **10** in 1 mL D₂O, 4 Äquiv. 98-proz. ¹⁵N-AmTP^[1], 0.25 M MgCl₂). ¹H-gekoppeltes ³¹P-NMR-Spektrum (a) und ¹H-entkoppeltes ¹³C-NMR-Spektrum (b), aufgenommen nach 3 Tagen bei RT. a) Effekt von ¹⁵N-AmTP gegenüber ¹⁴N-AmTP in den Kopplungsmustern des ³¹P(¹H)-NMR-Spektrums von **11**, in welchem das Phosphorsignal bei δ = 25.9 als Dublett eines Doublets erscheint (J_{NP} = 25.8, J_{LP} = 16.2 Hz) anstelle des einfachen Doublets (J_{LP} = 16.2 Hz) im Spektrum von ¹⁴N-AmTP. Das Signal von **12** bei δ = 18.5 bleibt, wie erwartet, unverändert in seinem Aufspaltungsmuster. Mit der Zeit verschwindet das Signal von **11**, während das von **12** größer wird und bei Ende der Reaktion unverändert bleibt. b) ¹³C-NMR-Spektren der Reaktionsgemische. Bei der Reaktion mit ¹⁴N-AmTP erscheint das Signal bei δ = 87 (durch ¹³C-¹H-COSY dem Kohlenstoffatom des anomeren Zentrums von **11** zugeordnet) als Dublett (J_{CLP} = 12.6 Hz), bei der Reaktion mit ¹⁵N-AmTP als Dublett eines Doublets (J_{CLP} = 12.5 Hz, J_{NP} = 9.5 Hz). Das Signal von **12** bei δ = 102.8 (C1 zugeordnet) ist in seinem Aufspaltungsmuster wie erwartet unverändert (d, J_{CLP} = 4.3 Hz). Diese Beobachtungen zeigen, dass das Stickstoffatom in **11** sowohl an das anomere Kohlenstoffatom als auch an das Phosphoratom gebunden ist.

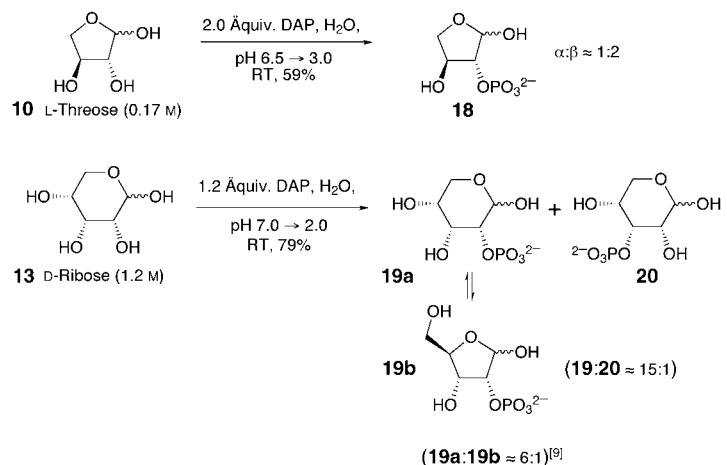
gebildet (^1H - und ^{31}P -NMR). Da die Phosphorylierung den pH-Wert des Reaktionsmediums langsam ansteigen lässt (auf ca. 8.5) und dadurch inhibiert wird, ist es notwendig, durch Zugabe von Amberlite IR-120 (H^+) in Zwölf-Stunden-Intervallen über einen Zeitraum von 4 Tagen einen pH-Wert von ca. 7 aufrecht zu erhalten, um einen vollständigen Verbrauch der L-Threose zu erreichen. Bei einem solchen Vorgehen wird **11** in hoher Ausbeute gebildet (bis zu ca. 90 % neben ca. 10 % **12** laut ^1H -NMR). Ungefähr die Hälfte davon (46 %) ließ sich durch Ionenaustauschchromatographie in praktisch reiner Form isolieren; der Verlust spiegelt die Labilität des primären Phosphorylierungsprodukts wieder, das sich in das Cyclophosphat **12** umwandelt.

Die Isolierung des 1,2-Amidocyclophosphats **14** in der Ribose-Reihe ist schwieriger, was auf seine schnelle Umwandlung in ein Gemisch der 1,2- und 2,3-Cyclophosphate unter den Bedingungen seiner (langsameren) Bildung zurückzuführen ist. In einem Experiment ausgehend von einem Überschuss an D-Ribose^[10] (1.6 M wässrige Lösung von **13** und 1M DAP, RT, pH in 4-h-Intervallen über 48 h bei ungefähr 7 gehalten) wurde das Amidocyclophosphat **14** in einer Ausbeute von 27 % isoliert (48 % laut ^1H -NMR, bezogen auf eingesetztes DAP). Die Verbindung wurde ^1H -NMR-spektroskopisch (siehe Legende von Abbildung 2) in Form ihres Salzes mit der bicyclischen Amidinbase **17** charakterisiert, das sowohl in DMSO als auch in CHCl_3 löslich ist.^[11]

Wenn die DAP-Phosphorylierungsgemische in beiden Reihen durchgängig bei einem pH-Wert von 6.5 gehalten werden, sammeln sich die Phosphorylierungsprodukte als Cyclophosphate an: in der L-Threose-Reihe selektiv als das 1,2-Cyclophosphat **12** (74 % isoliert), in der D-Ribose-Reihe als ein Gemisch der 1,2- und 2,3-Cyclophosphate **15** und **16** (71 %, Verhältnis **15**:**16** = 3:2 laut ^1H -NMR). Dass sich die 1,2-Amidocyclophosphate **11** und **14** unter solchen Reaktionsbedingungen tatsächlich in die entsprechenden Cyclophosphate umwandeln, wurde in separaten, von reinem **11** bzw. **14** ausgehenden Experimenten ^1H -NMR-spektroskopisch bestätigt (Schema 2).

Eine präparative Phosphorylierung der L-Threose und der D-Ribose direkt zu den entsprechenden 2-Phosphaten **18** und **19** wird bei der Reaktion mit DAP durch sukzessives

Herabsetzen des pH-Werts von 6.5 auf ca. 2 erreicht. Unter diesen Bedingungen werden die 1,2-Cyclophosphate innerhalb von Tagen zu den 2-Phosphaten hydrolysiert (Schema 3). Ein geringer Anteil des Hydrolyseprodukts in der Ribose-Reihe ist das 3-Phosphat **20**, das sich vermutlich aus dem im



Schema 3. Eintopfreaktion von Aldosen mit Diamidophosphat (DAP) zu den 2-Phosphaten. In separaten Experimenten wurde ^1H -NMR-spektroskopisch gezeigt, dass unter denselben Reaktionsbedingungen, aber in Abwesenheit von DAP, **11** und **12** (siehe Schema 2) zu **18** und die Zwischenprodukte **14** und **15**/**16** zu **19**/**20** reagieren (Schema 2).

Reaktionsgemisch vorhandenen Ribofuranosyl-2,3-phosphat **16** herleitet. Die Strukturzuordnungen in der Ribose-Reihe stützen sich wiederum auf den spektroskopischen Vergleich mit bekannten Verbindungen^[8, 9], und für **18** in der Threose-Reihe ist die Konstitution durch ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie inklusive ^1H - ^1H - sowie ^1H - ^{13}C -NMR-Korrelationsexperimenten belegt.

Die Reaktionen zwischen den („cyclischen“) Aldosen mit AmTP und DAP scheinen uns mechanistisch durchsichtig zu sein, mit Ausnahme der offenen Fragen, die sich auf die Details der Rolle des Magnesiumions beziehen und auf den Reaktionsschritt, in dem sich die Umwandlung eines 1,2-Amidocyclophosphats in ein 1,2-Cyclophosphat vollzieht. Es scheint bemerkenswert, dass die Hydrolyse der aktivierte

1,2-Amidocyclophosphate den Weg über einen Zwischenprodukttyp nimmt, in welchem die Phosphatgruppe noch immer aktiviert ist (die 1,2-Cyclophosphate), bevor die Endprodukte der Hydrolyse (die 2-Phosphate) gebildet werden. Solch eine stufenweise Desaktivierung spiegelt klar eine transiente kinetische Kontrolle der Hydrolyseprozesse durch anchimere Unterstützung in den Ringbildungsschritten wider.^[12]

Die hier beschriebenen Phosphorylierungsprozesse sind Anwendungsbeispiele einer generellen Strategie, um Regioselektivität in Funktionalisierungsprozessen zu erzielen, nämlich ein aktiviertes Reagens an einen Reaktanten in unmittelbarer Nachbarschaft zum Reaktionsort reversibel zu binden und dadurch die gewünschte Strukturumwandlung durch eine irreversible intramolekulare Übertragung der funktionali-

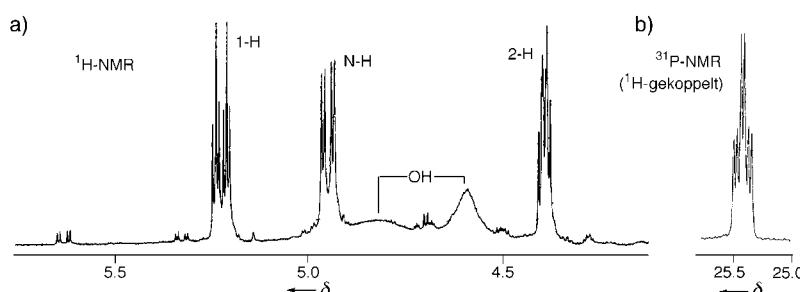


Abbildung 2. a) ^1H - und b) ^{31}P -NMR-Spektren des Ribofuranosyl-1,2-amidocyclophosphat-Salzes **14-17** in DMSO. Das Signal für das Phosphoramid-NH-Proton bei δ = 4.96 erscheint als Dublett eines Doublets ($J_{\text{NH},\text{P}} = 15.4$, $J_{\text{I},\text{NH}} = 5.0$ Hz) und das (1-H)-Signal bei δ = 5.25 als Multiplett ($J_{\text{I},\text{P}} = 16.5$ Hz, $J_{\text{I},\text{NH}} = 5.0$, $J_{\text{I},\text{2}} = 4.9$ Hz). Im ^{31}P -NMR-Spektrum erscheint das Signal bei δ = 25.5 als Dublett eines Doublets ($J_{\text{I},\text{P}} = 16.5$ Hz, $J_{\text{NH},\text{P}} = 15.4$, $J_{\text{2},\text{P}} = 7.4$ Hz). Bei Zugabe von D_2O verschwindet das NH-Signal bei δ = 4.96, zusammen mit den den OH-Gruppen zugeordneten Signalen. Damit einher geht eine Veränderung des Aufspaltungsmodells des Signals bei δ = 5.25, das nun wieder als Dublett eines Doublets erscheint. Gleichzeitig reduziert sich das ^{31}P -NMR-Signal bei δ = 25.5 auf ein Dublett eines Doublets.

sierenden Gruppe zu erreichen.^[13] Abgesehen davon, dass die beschriebenen Reaktionen in der Kohlehydratchemie von Interesse sein können,^[14] ist die Demonstration der Existenz solch robuster und regioselektiver Phosphorylierungsprozesse in wässriger Lösung auch als Beitrag zu einer potentiellen präbiotischen Chemie der Zucker gedacht.^[1, 15]

Experimentelles^[19]

10 → 12 (Beispiel einer Phosphorylierung mit AmTP): Zu D-Threose **10** (250 mg, 2.1 mmol; Sigma-Aldrich) wurde eine wässrige Lösung des Natriumsalzes von AmTP^[1] (5 mL, 10.0 mmol) und wasserfreies MgCl₂ gegeben (119 mg, 1.25 mmol). Das Reaktionsgemisch (pH 8.5) wurde bei RT geschüttelt, bis man eine klare Lösung erhielt. Nach fünf Tagen (pH 7.1) wurde die trübe Lösung mit 500 mL Wasser verdünnt und anschließend durch Ionenaustrauschchromatographie gereinigt (DEAE-A25-Sephadex, 40–120 mesh, HCO₃⁻-Form, 5 × 20 cm, gewaschen mit 300 mL Wasser, anschließende Elution mit 0 → 0.5 M Et₃NH·HCO₃ in 0.01-M-Inkrementen von jeweils 50 mL). Die Produktfraktionen wurden (nach Einengen auf jeweils ca. 10 mL, Detektion durch DC: nBuOH/AcOH/H₂O 5:3:2, Anfärbung mit Anisaldehyd) vereinigt und im Vakuum eingedampft (10 Torr), viermal mit Wasser codestilliert, um den überschüssigen Puffer zu entfernen, und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (H.V., RT, ca. 24 h). Man erhielt 512 mg eines schwach gelben Pulvers, das 477 mg des Triethylammonium-Salzes von **12** enthielt (80% Ausbeute, basierend auf Pentaerythrit als interner ¹H-NMR-Standard; Reinheit > 95% gemäß ¹H-NMR). **12** · Et₃NH⁺: *R*_f = 0.60; ¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ = 1.16 (t, *J* = 7.4 Hz, 9H, CH₃), 3.07 (q, *J* = 7.4 Hz, 6H, CH₂), 3.86 (dd, *J*_{gem} = 10.6, *J*_{3,4} = 1.1 Hz, 1H, 4-H), 4.06 (dd, *J*_{gem} = 10.6, *J*_{3,4} = 2.6 Hz, 1H, 4-H), 4.28 (br.m, 1H, 3-H), 4.70 (m, teilweise Überlagert durch HDO-Signal, 1H, 2-H), 5.95 (ddd, *J*_{1,P} = 15.7, *J*_{1,2} = 4.0, *J*_{1,3} = 1.7 Hz, 1H, 1-H); ¹³C-NMR (151 MHz, D₂O): δ = 8.58 (CH₃), 46.98 (CH₂), 73.19 (C4), 74.54 (*J*_{C3,P} = 6.9 Hz, C3), 84.27 (C2), 102.78 (*J*_{C1,P} = 4.3 Hz, C1); ³¹P-NMR (243 MHz, D₂O): 18.7 (dd, *J*_{H1,P} = 15.7, *J*_{H2,P} = 5.5 Hz); MS (pos., FAB): *m/z* (%): 306 (10, [M+Na]⁺), 102 (100, [Et₃NH]⁺); HR-MS: gef.: 306.1084 [M+Na]⁺, ber.: 306.1082.

13 → 15 + 16 (Beispiel einer Phosphorylierung mit DAP): D-Ribose **13** (600 mg, 4.0 mmol) wurde in 3.4 mL Wasser gelöst; bei RT wurde NaPO₂(NH₂)₂ · 5H₂O (500 mg, 2.4 mmol) zugegeben. Der pH-Wert der Lösung (9.4) wurde über 24 h bei 7 gehalten, indem man Ionenaustauschharz Amberlite IR-120 (H⁺) in Abständen von 4 h zugab. Weiteres NaPO₂(NH₂)₂ · 5H₂O (500 mg, 2.4 mmol) wurde zugegeben und der pH-Wert, wie zuvor beschrieben, über 24 h auf 7 eingestellt. Anschließend wurde der pH-Wert mit Amberlite IR-120 (H⁺) auf 6.5 abgesenkt und, wie zuvor beschrieben, über 24 h gehalten. Das Reaktionsgemisch wurde mit 0.05 M wässr. Et₃NH·HCO₃ auf 10 mL verdünnt, filtriert und das Harz dreimal mit 10 mL einer 0.05 M wässr. Et₃NH·HCO₃ gewaschen. Die Waschfraktionen wurden mit dem Filtrat vereinigt und durch Ionenaustrauschchromatographie gereinigt (Dowex 1X8, HCO₃⁻-Form; 7.5 × 10 cm, Elution mit 0.05 → 0.2 M Et₃NH·HCO₃ in 0.01-M-Inkrementen von jeweils 50 mL). Die Produktfraktionen wurden (nach jeweiligem Einengen im Vakuum und Analyse durch ³¹P-NMR-Spektroskopie in D₂O) vereinigt und wie für **12** beschrieben aufgearbeitet. Man erhielt 960 mg eines farblosen Pulvers, das 883 mg eines Triethylammoniumsalzes von **15 + 16** enthielt. (71% Ausbeute basierend auf Natriumbenzoat als interner Standard für ¹H-NMR; **15:16** = 3:2 laut ¹H-NMR). **15** (Na⁺): *R*_f = 0.31; ¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ = 3.64 (dd, *J*_{gem} = 12.5 Hz, *J*_{4,5} = 4.5 Hz, 1H, 5-H), 3.88 (d, *J*_{gem} = 12.5 Hz, 1H, 5-H), 4.04 (br.m, 2H, 3-H, 4-H), 4.82 (m, 1H, 2-H), 5.86 (dd, *J*_{1,P} = 17.0 Hz, *J*_{1,2} = 4.1 Hz, 1H, 1-H); ¹³C-NMR (151 MHz, D₂O): δ = 59.68 (C5), 69.74 (*J*_{C3,P} = 6.1 Hz, C3), 78.76 (C2), 80.37 (C4), 101.34 (*J*_{1,P} = 4.1 Hz, C1). ³¹P-NMR (243 MHz, D₂O): δ = 19.89 (dd, *J*_{H1,P} = 16.9 Hz, *J*_{H2,P} = 4.9 Hz). MS (pos., FAB): *m/z* (%): 257 (100, [M+Na]⁺); MS (neg., ESI): *m/z* (%): 211 (100, [M]⁻). Charakteristische Signale für **16** (als Gemisch von α/β -Pyranose- und Furanose-Anomeren): ¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ = 4.88 (d, *J*_{1,2} = 6.9 Hz, 0.25H, 1-H, β -Pyranose), 5.43 (br.s, 0.55H, 1-H, β -Furanose), 5.49 (dd, *J*_{1,2} = 5.1, *J*_{2,P} = 0.9 Hz, 0.20H, 1-H, α -Furanose). ³¹P-NMR (243 MHz, D₂O): 17.73 (d, *J* = 18.1 Hz, β -Pyranose), 21.49 (dd, *J* = 8.9 Hz, *J* = 8.7 Hz, β -Furanose), 22.89 (t, *J* = 7.6 Hz, α -Furanose).

Eingegangen am 24. Januar 2000 [Z14583]

- [1] R. Krishnamurthy, G. Arrhenius, A. Eschenmoser, *Orig. Life Evol. Biosphere* **1999**, 29, 333–354.
- [2] F. Reck, H. Wippo, R. Kudick, M. Bolli, G. Ceulemans, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Org. Lett.* **1999**, 1, 1531–1534.
- [3] D. Müller, S. Pitsch, A. Kittaka, E. Wagner, C. Wintner, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1990**, 73, 1410–1468; S. Pitsch, A. Eschenmoser, B. Gedulin, S. Hui, G. Arrhenius, *Orig. Life Evol. Biosphere* **1995**, 25, 294–334; R. Krishnamurthy, S. Pitsch, G. Arrhenius, *Orig. Life Evol. Biosphere* **1999**, 29, 139–152.
- [4] a) O. T. Quimby, T. J. Flautt, Z. Anorg. Allg. Chem. **1958**, 296, 220–228; b) V. W. Feldmann, E. Z. Thilo, Z. Anorg. Allg. Chem. **1964**, 328, 113–126.
- [5] a) R. Klement, G. Biberacher, V. Hille, Z. Anorg. Allg. Chem. **1957**, 289, 80–89; b) M. Watanabe, S. Sato, J. Mater. Sci. **1986**, 21, 2623–2627.
- [6] Signale von Glycerinaldehyd-3-phosphat wären bei δ = 3.95–4.05 (für 2-H und 3-H) im ¹H-NMR- und bei δ = 3.5 im ³¹P-NMR-Spektrum zu erwarten (Daten einer authentischen Probe entnommen, Sigma-Aldrich). In diesem Zusammenhang von Interesse ist der Befund, dass unter Bedingungen, unter denen D-Ribose mit AmTP phosphoryliert wird, mit D-2-Deoxyribose keine Phosphorylierung stattfindet.
- [7] Von der β -Pyranosylform das primären Additionsprodukts aus dürfte eine intramolekulare Phosphatübertragung an die α -ständige Hydroxygruppe nur langsam erfolgen, und es könnte sein, dass Pyranosyl- und Furanosylformen des Primäraddukts unter den Reaktionsbedingungen ebenfalls nur langsam ineinander übergehen. Die Adduktbildung von **13** mit AmTP konnte durch ³¹P-NMR-Spektroskopie (im Unterschied zu Experimenten mit DAP) infolge Signalüberlappung nicht verfolgt werden. Die bei der Reaktion mit DAP viel höhere Ausbeute an **15/16** (siehe unten) dürfte durch säurekatalysierte Äquilibrierung der primären Adduktformen bedingt sein.
- [8] R. Fathi, F. Jordan, J. Org. Chem. **1986**, 51, 4143–4146.
- [9] S. Pitsch, C. Spinner, K. Atsumi, P. Ermert, *Chimia* **1999**, 53, 291–294.
- [10] In diesem Experiment wurde ein Überschuss an Ribose eingesetzt, um die Produktabtrennung vom Reagens am Ionentauscher zu erleichtern.
- [11] F. Heinzer, M. Soukup, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1978**, 61, 2851–2874.
- [12] Dies kann entweder eine nucleophile Unterstützung durch eine benachbarte Hydroxygruppe in einer protonenkatalysierten Substitution einer NH₂-Gruppe in einem nichtcyclischen 2-Amidophosphat sein (Bildung eines 2,3- und 1,2-Cyclophosphats in der Ribo- und Erythro-Reihe) und/oder ein N → O-Austausch am anomeren Zentrum durch protonenkatalysierte C,N-Dissociation → C,O-Rekombination mit anschließendem NH₃-Verlust durch Hydrolyse.
- [13] Die Zahl solcher Beispiele, bei denen man sich diese Strategie zu Nutze macht, muss immens sein. Für frühe Beispiele siehe Lit. [16] (Regioselektivität bei der Bildung des Porphyringerüsts in Woodward's Synthese von Chlorophyll) und Lit. [17] (Regioselektivität einer Michael-Addition im Verlauf der Synthese von Colchicin).
- [14] Es sei angemerkt, dass die hier beschriebenen Arbeitsvorschriften Trennungs- und Isolierungsschritte mit Ionenaustauschchromatographie erfordern, die große Volumina benötigen. Ein Upscaling dürfte daher seine Grenzen haben.
- [15] Relativ hohe Konzentrationen an Substrat und Reagens sind für Reaktionszeiten in der Größenordnung von Tagen erforderlich (anstelle von Wochen, bei niedrigeren Konzentrationen). Für die Ribose gehört die Reaktion **13 → 15** und **16a** zu jenen Funktionalisierungen, durch welche die Furanoseform aus dem Pyranose/Furanose-Gleichgewicht ausselektiviert wird (siehe auch Fußnote 61 in Lit. [18]).
- [16] a) R. B. Woodward, *Angew. Chem.* **1960**, 72, 651–662; b) R. B. Woodward, *Pure Appl. Chem.* **1961**, 2, 383–404.
- [17] a) J. Schreiber, W. Leimgruber, M. Pesaro, P. Schudel, A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1959**, 71, 637–640; b) J. Schreiber, W. Leimgruber, M. Pesaro, P. Schudel, T. Threlfall, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1961**, 44, 540–597.
- [18] A. Eschenmoser, *Science* **1999**, 284, 2118–2124.
- [19] Weitere experimentelle Details zur Synthese und zu den spektroskopischen Daten von **6**, **8 + 9**, **11**, **14**, **18** und **19 + 20** sind in den Hintergrundinformationen zu finden.