

3-Desamino- und 3-Descarboxyderivate des Nucleosids „X“

Frank Seela*, Quynh Hoa Tran Thi und Doris Hasselmann

Universität Paderborn – Gesamthochschule, Fachbereich 13 (Organische Chemie),
Warburger Str. 100, D-4790 Paderborn

Ein eingegangen am 24. April 1978

Da Biosyntheseuntersuchungen gezeigt haben, daß der Aminocarboxypropylrest des Nucleosids „X“ (1a) von S-Adenosyl-L-methionin (2) stammt, 2 aber auch als Donor von Methyl-, Aminopropyl- und Carboxypropylresten fungieren kann, haben wir die beiden noch unbekannten Uridinderivate 1b und 1c über N-3-Alkylierung von 2',3'-O-Isopropylideneuridin und anschließende Abspaltung der Schutzgruppen dargestellt. 1a–c wurden durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie charakterisiert. Im Gegensatz zu den UV-Spektren zeigen die ^1H -NMR-Spektren dieser Verbindungen eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert.

3-Deamino- and 3-Decarboxy-Derivatives of the Nucleoside „X“

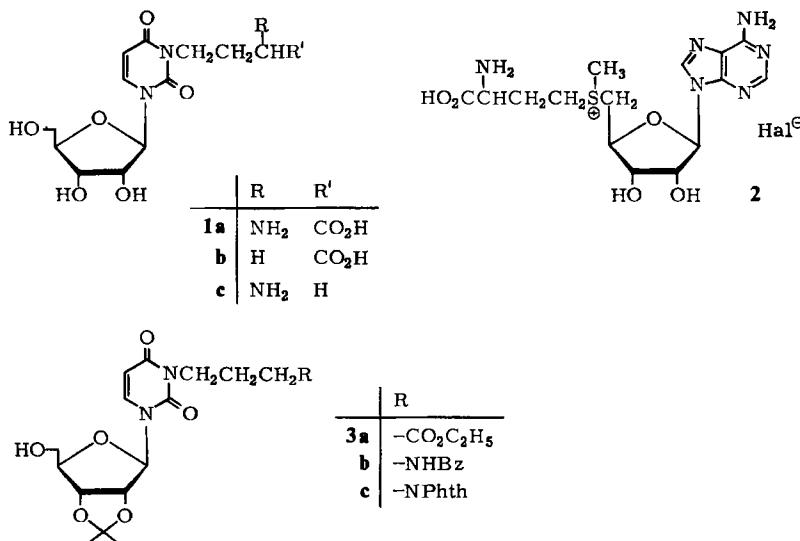
Since biosynthetic investigations have shown that the aminocarboxypropyl side chain of the nucleoside „X“ (1a) comes from S-adenosyl-L-methionine (2) and that compound 2 can also function as a donor of methyl-, aminopropyl- and carboxypropyl-groups, we have synthesized the two unknown uridine derivatives 1b and 1c. The latter compounds were obtained via N-3-alkylation of 2',3'-O-isopropylideneuridine followed by removal of the protecting groups and characterized by ^{13}C NMR spectroscopy. In contrast to the UV spectra the ^1H NMR spectra of 1a–c show a strong dependence on pH.

Seltene Ribonucleoside, die hauptsächlich in Transfer-Ribonucleinsäuren gefunden werden, entstehen fast ausschließlich durch enzymatische Modifikation am intakten Polynukleotid¹⁾. Uns interessieren speziell Nucleosid-Abkömmlinge, die Aminosäurereste enthalten und hier das Nucleosid „X“ (1a), das in Position 47 im variablen Loop von *Escherichia coli*-tRNA^{Phe} gefunden wird^{2–4)}. Dieses an N-3 durch α -Aminobuttersäure alkylierte Uridin-Derivat eignet sich aufgrund seines reaktiven Aminosäurerestes zur Einführung von photolabilen, spinmarkierenden oder antigenmarkierenden Gruppen in Nucleinsäuren^{5,6)}.

Durch in vitro-Biosyntheseuntersuchungen konnte gezeigt werden, daß der Aminocarboxypropylrest in 1a vom S-Adenosyl-L-methionin (2) übertragen wird, denn ^{14}C -markierte Aminocarboxypropylreste in 2 werden nach enzymkatalysierter Reaktion als Seitenkette im Nucleosid „X“ (1a) gefunden⁷⁾. Neben dem seltenen Pyrimidinnucleosid „X“ wurde unlängst auch ein Purinderivat mit Aminocarboxypropylseitenkette (Discadenin)⁸⁾ isoliert. Das Auffinden derartiger Biosyntheseprodukte zeigt, daß neben dem Hauptweg, der Übertragung der Methylgruppe, auch der intakte α -Aminocarboxypropylrest von der Sulfoniumverbindung 2 transferiert werden kann.

Acyliert man 1a im Polynukleotidverband von *E. coli*-tRNA^{Phe}, so fällt auf, daß die Reaktion nicht stöchiometrisch erfolgt. Diese Befunde lassen eine Heterogenität der tRNA-Sequenz in Position 47 vermuten. Eine Heterogenität in dieser Position kann entweder auf das Ausbleiben der Alkylierung an N-3 des Uridinnukleotids oder die Übertragung von Methyl-, Carboxypropyl- oder Aminopropylresten von 2 zurückgeführt werden. Wie durch Biosynthese von biogenen

Aminen wie Spermidin belegt ist, kann **2** als Donor von Aminopropylresten fungieren⁹⁻¹¹, denn S-Adenosyl-L-methionyldecarboxylase kann die Aminosäureseitenkette in **2** vor der Übertragung decarboxylieren. Darüberhinaus ist auch die Übertragung von Carboxypropylresten denkbar, die nach reduktiver Desaminierung aus Methionylresten gebildet werden können. Wir haben im Hinblick auf derartige Biosyntheseprodukte und zur Darstellung von modifizierten Nucleotidsequenzen des Extraloops die Uridinderivate **1b** und **1c** synthetisiert und in ihren Eigenschaften mit dem Nucleosid **1a** verglichen.



N-3-(3-Carboxypropyl)- (1b) und N-3-(3-Aminopropyl)uridin (1c)

Wird 2',3'-*O*-Isopropylidenuridin mit 4-Brombuttersäure-ethylester in Dimethylformamid alkyliert und nach Abdampfen des Lösungsmittels im Hochvakuum der ölige Reaktionsrückstand an Kieselgel (Chloroform/Ethanol) aufgetrennt, so erhält man eine Hauptsubstanz, die nach dem Abdampfen des Lösungsmittels glasig anfällt. Nach der Elementaranalyse handelt es sich bei der chromatographisch einheitlichen Verbindung um ein Monoalkylierungsprodukt (**3a**). Es zeigt im ¹³C-NMR-Spektrum die Signale des 2',3'-*O*-Isopropylidenuridinrestes und darüber hinaus vier Signale der neu eingeführten Seitenkette. Durch Vergleich der ¹³C-NMR-Spektren von **3a** und 4-Brombuttersäure-ethylester werden die Seitenkettensignale wie folgt zugeordnet: $\delta = 14.05$ (Ester-CH₃), 22.54 (β -CH₂), 31.08 (α -CH₂) und 59.77 (Ester-CH₂). Das NCH₂-Signal konnte nicht zugeordnet werden, da es mit einem der DMSO-Signale zusammenfiel.

Hydrolyse von **3a** in Eisessig/Salzsäure spaltet den Ester und entfernt gleichzeitig den Isopropylidenrest. Durch Chromatographie des Hydrolyseproduktes an Dowex AG-Anionenaustauscher (Acetatform) werden Nebenprodukte mit Wasser eluiert, durch Gradientenelution (Essigsäure/Wasser) erhält man die Säure **1b**. Die glasige Substanz wandert auf Kieselgel wie das Nucleosid „X“ (**1a**), lässt sich aber im Gegensatz zu diesem nicht mit Ninhydrin anfärben. In der Dünnschichtelektrophorese (Kieselgel/0.1 M Natriumcitrat,

pH 6.5) wandern **1a** und **1b** mit vergleichbaren Mobilitäten, jedoch in entgegengesetzter Richtung (Tab. 1).

Tab. 1. Chromatographische und elektrophoretische Mobilitäten von Uridin, des Nucleosids „X“ (**1a**) und der Derivate **1b** und **1c**

	Kieselgel R_F (Wasser)	Cellulose R_F (BuOH/HOAc/H ₂ O, 4:2:1)	Kieselgel R_E (0.1 M Natrium- citrat, pH 6.5)
Uridin	0.9	0.7	1.0 (-)
1a	0.9	0.4	1.0 (-)
1b	0.9	0.7	0.8 (+)
1c	0.8	0.4	2.5 (-)

Die im Neutralen anionische Seitenkette in **1b** sollte sowohl das *syn/anti*-Konformerenverhältnis der modifizierten Nucleobase relativ zur Ribose, als auch die Tertiärstruktur des Polynucleotidverbandes beeinflussen und von der Wirkung der **1a**-Seitenkette verschieden sein. Wir haben zu diesem Zweck die ¹³C-Spektren von **1a** und **1b** in neutralem D₂O aufgenommen und die Signale den C-Atomen zugeordnet (Tab. 2). Im Bereich der Ribonucleosidsignale traten zwischen **1a/b** und Uridin nur geringfügige Unterschiede auf. Die Signale der Seitenkette von **1a** und **1b**, die zwischen 20 und 40 ppm und um 178 ppm gefunden werden, liegen weit außerhalb des Verschiebungsbereiches der unmodifizierten Ribonucleoside und eignen sich damit für Untersuchungen der Tertiärstruktur von Polynucleotiden, die das Nucleosid „X“ oder Nucleosid-„X“-Derivate enthalten.

Entsprechend der Darstellung von **1a** und **1b** versuchten wir auch das Descarboxy-derivat **1c** über die Alkylierung von 2',3'-O-Isopropylidenenuridin mit *N*-(3-Brompropyl)-benzamid und anschließende saure Abspaltung der Schutzgruppen zu gewinnen. Nach Chromatographie der Reaktionsprodukte erhielten wir **3b**, dessen Konstitution durch Elementaranalyse und ¹³C-NMR gesichert wurde. Schwierig gestaltete sich jedoch die Umwandlung von **3b** in **1c**. Die hohe Stabilität der Amidbindung erforderte zur Abspaltung des Benzoylrestes hier so saure Bedingungen, daß in großem Maße Glycosidhydrolyse auftrat. Wir wählten aufgrund dessen statt der Benzoylschutzgruppe den Phthaloylrest, der unter milder alkalischer Hydrolyse abspaltbar ist.

Reaktion von *N*-(3-Brompropyl)phthalimid mit 2',3'-O-Isopropylidenenuridin unter den für **3b** bewährten Alkylierungsbedingungen führte nach Chromatographie des Reaktionsproduktes zum Phthaloylderivat **3c**. Die Abspaltung des Phthaloylrestes wurde zuerst mit 1 M ethanolischem Hydrazin versucht, um danach den Isopropylidenrest im Sauren mit Ameisensäure abzuspalten. Bei dieser Reaktionsfolge entstanden jedoch in großer Menge gelb gefärbte Reaktionsprodukte, und das im analytischen Maßstab nachweisbare Amin **1c** konnte nicht analysenrein isoliert werden. Durch 8 h Kochen mit halbkonz. Salzsäure ließ sich der Phthaloylrest jedoch entfernen, wobei gleichzeitig die Isopropylidenschutzgruppe abgespalten wurde. Das Reaktionsgemisch wurde am Kationenaustauscher adsorbiert, und Nebenprodukte wurden mit Wasser eluiert. Aus dem salzauren Eluat erhielt man das Hydrochlorid von **1c** nach Abdampfen. Es wanderte in der Dünnschicht-

Tab. 2. ^{13}C -NMR-Spektren von **1a** – **c** in D_2O ; δ in ppm, J = (Hz), Methanol als innerer Standard

	Nucleobase						Glycon			Seitenkette			
	C-2	C-4	C-5	C-6	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	α -C	β -C	γ -C	CO_2H
1a	152.89	166.24	102.64	141.16	91.31	74.80	70.33	85.22	61.72	58.46	28.43	38.21	172.80
1b	s 152.70	s 166.06	d 102.46	d 140.76	d 91.36	d 74.56	d 70.26	d 85.16	d 61.66	t 32.16	t 23.25	t 41.60	s 178.43
(5)	(10)	(178)	(183)	(171)	(152)	(151)	(149)	(143)	(127)	(132)	(145)	(5)	(5)
1c	152.83	166.04	102.71	141.05	91.18	74.73	70.46	85.29	61.85	38.08	26.03	39.11	

Tab. 3. ^1H -NMR-Spektren von **1a** und 2-L-Aminobuttersäure in D_2O bei pH 2, 7 und 14; δ in ppm, J = (Hz)

Nucleosid X · HCl (1a)	Nucleobase						Glycon			Seitenkette		
	6-H	5-H	1'-H	2'-H	3'-H	4'-H	4'-H	5'-H	NCH ₂	CH ₂	CH	
pH 7	d 7.88	d 5.93	d 5.91	t 4.35	t 4.21	m ≈ 4.13	dd 3.90	dd 3.80	m ≈ 4.07	m 2.24	t 3.77	
	(9)	(9)	(5)	(5)	(5)	(5)	(12; 6); (34); (12; 5)	(12; 6); (34); (12; 5)			(5)	
pH 2	d 7.85	d 5.91	d 5.87	t 4.31	t 4.17	m ≈ 4.06	dd 3.90	dd 3.77	m ≈ 4.04	m 2.29	4.1 – 4.2	
	(9)	(9)	(5)	(5)	(5)	(5)	(12; 6); (34); (12; 5)	(12; 6); (34); (12; 5)				
pH 14	d 7.83	d 5.93	d 5.84	t 4.27	t 4.10	m ≈ 4.04	dd 3.91	dd 3.78	m ≈ 4.01	m 1.98	t 3.26	
	(9)	(9)	(5)	(5)	(5)	(5)	(12; 6); (34); (12; 5)	(12; 6); (34); (12; 5)		m 1.83	(5)	
$\text{H}_3\text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CO}_2\text{H}$												
pH 7									t 0.99	q 1.92	t 3.72	
									(6.5)	(6.5)	(5.5)	
pH 2									t 1.03	q 2.00	t 4.00	
pH 14									(6.5)	(6.5)	(5.5)	
									t 0.90	q 1.60	t 3.20	
									(6.5)	(6.5)	(5.5)	

chromatographie (Tab. 1), (Kieselgel, 0.25 M LiCl) ähnlich wie **1b**, ließ sich jedoch im Gegensatz zu diesem mit Ninhydrin ansärfen. Im Gegensatz zu den UV-Spektren, die sich bei **1a–c** bei pH 2, 7 und 12 nicht ändern, übt die unterschiedliche Ionisierung der Seitenkette im $^1\text{H-NMR}$ einen starken Einfluß auf die Lage der zur Carboxylgruppe α -ständigen Protonen aus (Tab. 3). Wie bei der Modellsubstanz α -L-Aminobuttersäure wandern die α -Signale bei Anionenbildung zu höherem, bei Kationenbildung zu tieferem Feld. Da die Signale der unmodifizierten Ribonucleoside keine derartig starken pH-Verschiebungen erfahren, eignet sich diese Methode zum Auffinden von **1a–c** in natürlichen Polynucleotiden.

Die Trennung der Uridinderivate **1a–c** gelang außer durch Elektrophorese (Tab. 1) auch bei zweidimensionaler Chromatographie an Cellulose (Abb. 1). Diese für seltene Nucleotide bewährte Trennmethode benutzten wir auch zur Isolierung des Nucleosid „X“-2'(3')-phosphats (Xp) aus dem RNase T₂-Hydrolysat von *E. coli*-tRNA^{Phe}. Xp, das in der Nähe des stark fluoreszierenden Guanosin-2'(3')-phosphats wandert, lässt sich mit alkalischer Phosphomonoesterase in **1a** umwandeln und besitzt in der Dünnschichtelektrophorese (Na-Citrat, pH 6.5) die gleiche Mobilität wie das synthetische Produkt. Die Zuordnung der absoluten Konfiguration der Seitenkette in **1a** sowie die Suche nach Nucleosid „X“-Derivaten, wie **1b** und **1c**, in den Hydrolysaten von Transfer-Ribonucleinsäuren wird zur Zeit vorgenommen.

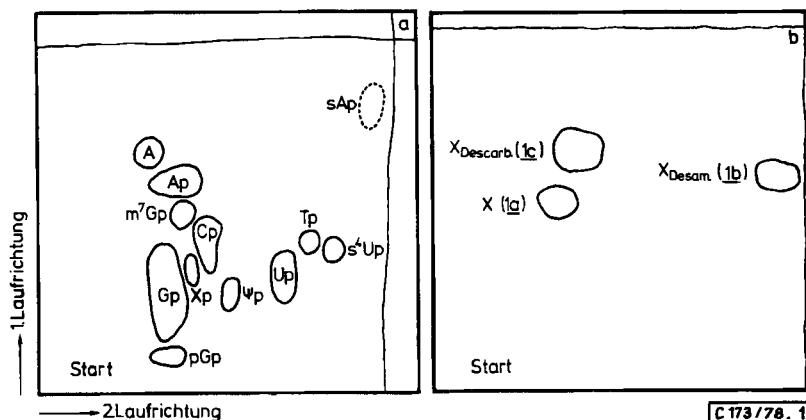


Abb. 1. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm des RNase T₂-Hydrolysats von tRNA^{Phe} aus *E. coli* (a) und von N-3-(3-L-Amino-3-carboxypropyl)uridin (1a) und dessen Derivaten 1b und 1c (b). 1. Laufrichtung: Isobuttersäure/0.5 M Ammoniak (5:3); 2. Laufrichtung: 2-Propanol/konz. Salzsäure/Wasser (70:15:15). sA = 2-Methylthio-N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adenosin; s⁴U = 4-Thiouridin; ψ = Pseudouridin; m⁷G = 7-Methylguanosin; T = Ribothymidin; X = N-3-(3-L-Amino-3-carboxypropyl)uridin

Herrn B. Seeger danken wir für die Aufnahme der NMR-Spektren. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie wird für finanzielle Förderung gedankt.

Experimenteller Teil

Die Elementaranalysen wurden vom Mikroanalytischen Labor Beller, Göttingen, ausgeführt. ^1H -NMR-Spektren: Bruker WH 270-Spektrometer, ^{13}C -NMR-Spektren: Bruker HX 60-Spektrometer (Tetramethylsilan oder Methanol als innerer Standard). UV-Spektren: Zeiss PMQ 3 bzw. Shimadzu UV-200-Spektrometer.

Chromatographie: Bei der Säulenchromatographie wurden Kieselgel 60 (0.06 – 0.2 mm, Merck), Dowex AG, 1 X 2 (200 – 400 mesh, Acetaform, Serva) und Lewatit S 1080-Ionenautauscher (0.1 – 0.25 mm, H^+ -Form, Merck) und ein LKB-Fraktionensammler mit Uvicord verwendet. Analytische Dünnschichtchromatographie wurde an Kieselgel-Dünnschichtplatten F 254 (Woelm, Eschwege) oder Cellulose-Fertigplatten (ohne Fluoreszenzindikator, Merck) ausgeführt. Als Substanznachweis diente die UV_{260} -Absorption bzw. die Ninhydrinreaktion. Als Lösungsmittelsysteme (LS) für die Dünnschichtchromatographie wurden LS I (0.25 M wäßriges Lithiumchlorid), LS II (1 M wäßriges Lithiumchlorid), LS III (Wasser), LS IV (Chloroform/Ethanol, 97:3), LS V (Chloroform/Ethanol, 9:1), LS VI (Isobuttersäure/0.5 M wäßriges Ammoniak, 5:3), LS VII (2-Propanol/konz. Salzsäure/Wasser, 70:15:15) verwendet.

Die Dünnschichtelektrophorese wurde in einer DE-Doppelkammer (Desaga, Heidelberg) auf Kieselgel-Dünnschichtplatten (Woelm, Eschwege) durchgeführt. Als Elektrophoresepuffer wurden 0.1 M Natriumcitrat pH 6.5 benutzt. Zur Hydrolyse von *E. coli*-tRNA^{Phe} (Boehringer, Mannheim) wurden Ribonuclease T₂ (E. C. 2. 7. 7. 17) der Firma Sankyo Comp., Ltd., Tokyo, Japan, zur Abspaltung des Phosphatrestes alkalische Phosphomonoesterase (E. C. 3.1.3.1) der Fa. Boehringer, Mannheim, verwendet.

N-3-(3-Ethoxycarbonylpropyl)-2',3'-O-isopropylidenuridin (3a): 2.28 g (8 mmol) 2',3'-O-Isopropylidenuridin werden in 40 ml wasserfreies Dimethylformamid, das 2.24 g (20 mmol) Kalium-*tert*-butylat als Suspension enthält, eingetragen. Man versetzt mit 3.12 g (16 mmol, 2.1 ml) 4-Brombuttersäure-ethylester und hält 5 h auf 80 °C. Nach dem Abkühlen wird mit 120 ml 1 proz. Eisessig in Ethanol versetzt und i. Hochvak. abgedampft. Der Rückstand wird in CHCl_3 gelöst, mit Wasser gegengeschüttelt und die organische Phase durch ein Faltenfilter filtriert. Man adsorbiert an einer 5.5 × 35 cm-Kieselgel-Säule (Chloroform/Ethanol 94:6) und isoliert den Inhaltsstoff der Hauptzone. Durch mehrfaches Abdampfen mit Methanol erhält man 2.46 g (80.2%) glasige Substanz; im DC (Kieselgel, LS IV, 97:3) einheitlich mit R_F = 0.6; 2',3'-O-Isopropylidenuridin: R_F = 0.3.

UV (Methanol): λ_{max} 261 nm (ϵ = 7600). – ^1H -NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 1.18 (t, CH_3 -Ester, J = 7.5 Hz); 1.30 (s, Acetal- CH_3 , *exo*), 1.50 (s, Acetal- CH_3 , *endo*), um 1.8 (m, CH_2), 2.25 (m, CH_2CO), um 3.6 (5'-H), 3.8 (t, NCH_2 , J = 6), 4.03 (q, Ester- CH_2 , J = 7 Hz), um 4.1 (m, 4'-H), um 4.6 (2'-H und 3'-H), 5.73 (d, 6-H, J = 8 Hz), 5.83 (d, 1'-H, J = 2 Hz), 7.80 (d, 5-H, J = 8 Hz). – ^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 14.05 (Ester- CH_3), 22.54 (β -C), 25.19 (*exo*- CH_3), 27.00 (*endo*- CH_3), 31.08 (α -C), 59.77 (OCH_2), 61.26 (C-5'), 80.56 (C-2'), 83.99 (C-3'), 86.84 (C-4'), 92.34 (C-1'), 100.89 (C-5), 112.94 (Acetal-C), 140.27 (C-6), 150.56 (C-4), 162.02 (C-2), 172.25 (CO).

$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_8$ (338.4) Ber. C 54.27 H 6.58 N 7.03 Gef. C 54.16 H 6.73 N 7.15

N-3-(3-Carboxypropyl)uridin (1b): 500 mg (1.48 mmol) 3a werden in eine Mischung aus 12.5 ml Eisessig und 12.5 ml 1 N HCl eingetragen und 4 h bei 60 °C gehalten. Das Lösungsmittel wird abgedampft, der Rückstand zweimal mit Wasser nachgedampft, dann mit 30 ml Wasser aufgenommen und mit Ammoniak auf pH 9 eingestellt. Man adsorbiert an einer 12 × 2 cm-Ionenautauschersäule (Dowex AG, 1 X 2, 200 – 400 mesh, Acetaform) und wäscht solange mit Wasser, bis das Eluat kein bei 260 nm UV-aktives Material enthält. Elution (Gradient, 2000 ml 0.5 N Essigsäure/2000 ml Wasser) führt zwischen 0.1 und 0.2 N Essigsäure zur Abtrennung des Reaktionsproduktes. Nach Abdampfen des Lösungsmittels, Nachdampfen mit Wasser und Trocknen im

Exsikkator nimmt man in wenig Ethanol auf und versetzt die Lösung mit Ether, wobei die Substanz amorph ausfällt. Nach vollständigem Abdampfen des Lösungsmittels erhält man 400 mg (80%) amorphes, glasiges **1b**.

DC (Kieselgel, LS II): $R_F = 0.8$; Ausgangsmaterial $R_F = 0.3$. — UV (Wasser): λ_{\max} 262 nm ($\epsilon = 8900$). — $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): Tab. 2.

$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_8$ (330.3) Ber. C 47.13 H 5.49 N 8.48 Gef. C 47.39 H 5.58 N 8.54

N-3-(3-Benzamidopropyl)-2',3'-O-isopropylidenuridin (**3b**): 1.71 g (6 mmol) 2',3'-O-Isopropylidenuridin werden in 40 ml wasserfreies DMF, welches 1.68 g (15 mmol) Kalium-*tert*-butylat enthält, eingetragen und mit 3.6 g (15 mmol) *N*-(3-Brompropyl)benzamid¹²⁾ versetzt. Man hält 3 h auf 80°C, versetzt mit 100 ml 1 proz. Eisessig in Ethanol und dampft i. Hochvak. ab. Der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen, mit Wasser gegengeschüttelt, die organische Phase abgetrennt und abgedampft. Nach Chromatographie an einer 35 × 5.5 cm-Kieselgelsäule (0.06–0.2 mm; Methylenechlorid/Ethanol, 96:4) isoliert man den Inhaltsstoff der Hauptzone: 1.36 g (54.2%) farbloses glasiges **3b**.

$^{13}\text{C-NMR}$ ([D_6]DMSO): 25.19 (*exo*-CH₃), 27.00 (*endo*-CH₃), 27.46 (β -C), 30.53 (α -C), 38.21 (γ -C), 61.26 (C-5'), 80.50 (C-2'), 83.99 (C-3'), 86.84 (C-4'), 92.28 (C-1'), 100.89 (C-5), 112.98 (Acetal-C), 127.12 (2 aromat. C), 128.22 (2 aromat. C), 130.94 (1 aromat. C), 134.76 (1 aromat. C), 140.33 (C-6), 150.44 (C-4), 162.03 (C-2), 166.17 (CO). — UV (Methanol): λ_{\max} 256, 218 nm ($\epsilon = 10000$, 15300).

$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_7$ (445.5) Ber. C 59.32 H 6.10 N 9.43 Gef. C 59.07 H 6.39 N 9.73

2',3'-O-Isopropyliden-N-3-(3-phthalimidopropyl)uridin (**3c**): 2.28 g (8 mmol) 2',3'-O-Isopropylidenuridin werden in 40 ml wasserfreies DMF, das 2.24 g (20 mmol) Kalium-*tert*-butylat als Suspension enthält, eingetragen. Man versetzt mit 3.54 g (20 mmol) *N*-(3-Brompropyl)phthalimid und hält 5 h auf 80°C. Nach dem Abkühlen wird mit 120 ml 1 proz. Eisessig in Ethanol versetzt und i. Hochvak. abgedampft. Der Rückstand wird in Chloroform gelöst, mit Wasser gewaschen, die organische Phase durch einen Faltenfilter filtriert und an einer 35 × 5.5 cm-Kieselgel-Säule (Chloroform/Ethanol, 94:6) aufgetrennt. Man dampft das Eluat der Hauptzone ab, schleppt Wasser mit Toluol heraus und schäumt **3c** durch mehrfaches Abdampfen mit Aceton auf: 3.2 g (80%) gelbliches amorphes **3c**. DC (Kieselgel, LS II): $R_F = 0.13$; 2',3'-O-Isopropylidenuridin: $R_F = 0.5$. DC (Kieselgel, LS V): $R_F = 0.84$; 2',3'-O-Isopropylidenuridin: $R_F = 0.54$.

UV (Methanol): λ_{\max} 261 nm ($\epsilon = 9000$). — $^{13}\text{C-NMR}$ ([D_6]DMSO): $\delta = 25.11$ (*exo*-CH₃), 26.23 (β -C), 27.00 (*endo*-CH₃), 35.42 (α -C und γ -C), 61.26 (C-5'), 80.49 (C-2'), 83.99 (C-3'), 86.77 (C-4'), 92.22 (C-1'), 100.83 (C-5), 112.87 (Acetal-C), 122.97 (2 aromat. C), 131.66 (2 aromat. C), 134.31 (2 aromat. C), 140.27 (C-6), 150.37 (C-4), 167.86 (C-2), 172.56 (2 CO).

$\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_8$ (471.5) Ber. C 58.59 H 5.35 N 8.91 Gef. C 58.70 H 5.33 N 8.72

N-3-(3-Aminopropyl)uridin-hydrochlorid (**1c**): 800 mg (1.7 mmol) **3c** werden in 21 ml halbkonz. Salzsäure 8 h bei 80°C hydrolysiert. Die Lösung wird eingedampft, durch Nachdampfen mit Wasser Salzsäure vertrieben und der ölige Rückstand in 50 ml Wasser aufgenommen. Nach Filtrieren adsorbiert man an einer 25 × 1.5 cm-Kationenaustauschersäule (Lewatit S 1080, H⁺-Form). Elution mit Wasser trennt eine Vorzone ab, 0.5 N HCl eluiert das Amin **1c**. Nach Vertreiben des Lösungsmittels erhält man ein farbloses glasiges Produkt, das nach Lösen in Methanol und nach Versetzen mit Ether beim Abdampfen als farbloser Schaum erstarrt. 5350 A₂₆₀-Einheiten (39.8%). DC (Kieselgel, LS I): $R_F = 0.87$; ninhydrinpositiv. DE (Kieselgel, 0.1 M wäßriges Natriumcitrat, pH 6.5): $R_E = 2.5$ (–), relativ zu Uridin. — UV (Methanol): λ_{\max} 264 nm ($\epsilon = 7900$). — $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): Tab. 2.

[$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_6$]Cl (337.8) Ber. C 42.67 H 5.97 N 12.44 Gef. C 42.06 H 6.12 N 12.22

Isolierung von N-3-(3-L-Amino-3-carboxypropyl)uridin aus *E. coli*-tRNA^{Phe} und Vergleich mit synthetischem **1a**: 10 A₂₆₀-Einheiten *E. coli*-tRNA^{Phe} werden mit 15 µl RNase T₂ (1.5 enzym.

Einheiten) und 1 µl 1 M wäßrigem Natriumacetat (pH 4.7) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Hydrolysat wird i. Vak. auf ca. 20 µl eingeengt und an einer 20 × 20 cm-Cellulose-Platte (Merck, ohne Fluoreszenzindikator) zweidimensional chromatographiert;

1. Dimension: Isobuttersäure/0.5 M wäßr. Ammoniak (5:3);
2. Dimension: 2-Propanol/konz. Salzsäure/Wasser (70:15:15).

Das Nucleotid, das zwischen Guanosin- und Cytidin-3'-phosphat wandert, wird herausgekratzt, die Substanz von der Cellulose mehrfach mit Wasser extrahiert und die Lösung auf ein kleines Volumen eingeengt. Man versetzt mit 20 µl alkalischer Phosphatase in 0.01 M wäßrigem Triethylammoniumhydrogencarbonat (TBK) (0.5 mg/ml), 2 µl 2 M TBK und ca. 60 µl Wasser. Die Mischung wird bei 37°C über Nacht inkubiert, danach eingeengt und mit synthetischem 1a cochromatographiert, DC (Kieselgel, LS II): R_F = 0.84 und DE (Kieselgel, 0.1 M wäßr. Natriumcitrat, pH 6.5): R_E = 1.0 (–), wobei die gleichen Mobilitäten für das synthetische und das natürliche Produkt gefunden werden.

Literatur

- ¹⁾ J. A. Mc Closkey und S. Nishimura, *Acc. Chem. Res.* **10**, 403 (1977).
- ²⁾ Z. Ohashi, M. Maeda, J. A. Mc Closkey und S. Nishimura, *Biochemistry* **13**, 2620 (1974).
- ³⁾ S. Friedman, H. J. Li, K. Nakanishi und G. van Lear, *Biochemistry* **13**, 2932 (1974).
- ⁴⁾ F. Seela und F. Cramer, *Chem. Ber.* **109**, 82 (1976).
- ⁵⁾ F. Seela, F. Hansske, K. Watanabe und F. Cramer, *Nucleic Acids Res.* **4**, 711 (1977).
- ⁶⁾ F. Hansske, K. Watanabe, F. Cramer und F. Seela, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 1659 (1978).
- ⁷⁾ S. Nishimura, Y. Taya, Y. Kuchino und Z. Ohashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **57**, 702 (1974).
- ⁸⁾ H. Abe, M. Uchiyama, Y. Tanaka und H. Saito, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 3807.
- ⁹⁾ R. C. Greene, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3929 (1957).
- ¹⁰⁾ H. Tabor, S. M. Rosenthal und C. B. Tabor, *J. Biol. Chem.* **233**, 907 (1958).
- ¹¹⁾ A. E. Pegg, *J. Biol. Chem.* **253**, 539 (1978).
- ¹²⁾ S. Gabriel und P. Elfeldt, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **24**, 3213 (1891).

[173/78]