

A GUANOZIN 3',5'-DI-PIROFOSZFÁT /ppGpp/ KÉMIAI SZINTÉZISE

Egyetemi doktori disszertáció

Simoncsits András

-

Készült a

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ

Biokémiai Intézetében

1974

1950. évi közvetlen adó törvényekről



1950. évi közvetlen adó törvényekről

-

1950. évi közvetlen adó törvényekről

1950. évi közvetlen adó törvényekről

1950. évi közvetlen adó törvényekről

1950

Köszönetet mondok dr. Tomasz Jenő tudományos munkatársnak, aki munkámat irányította és támogatta, valamint Kovács Józsefné és Rádi Erzsébet laboránsoknak a kísérleti munkában nyújtott segítségükért.

Tartalomjegyzék

Bevezetés	1
Ribonukleozid 2'/3'/,5'-difoszfátok szintézisére használt mód- szerek áttekintése	4
Ribonukleozid 2'/3'/,5'-difoszfátok alkoholos hidroxilcsoport- jának savlabilis csoporttal való védésére felhasználható módszerek	10
A nukleotid-koenzimek felosztása és szintézisükre használt mód- szerek vázlatos áttekintése	15
Guanozin foszforilezése pirofoszforilkloriddal	20
Guanozin 2',5'- és 3',5'-difoszfát	21
Guanozin 5'-pirofoszfát 2'/3'/-monofoszfát	23
Guanozin 5'-trifoszfát 2'/3'/-monofoszfát	24
Guanozin 5'-monofoszfát 2'.3'-ciklofoszfát	25
A foszforilezés primer termékének szerkezete	25
A guanozin 3',5'-difoszfát 2'-OH-jának védeése	27
A 2'-O-/1"-etoxietil/guanozin 3',5'-difoszfát vizsgálata ...	28
A guanozin 3',5'-di-pirofoszfát szintézise	29
A guanozin 3',5'-di-pirofoszfát vizsgálata	31
Kísérleti rész	33
Módszerek és anyagok	33
Guanozin foszforilezése	37
Guanozin 2',5'-difoszfát	39
Guanozin 2'/3'/,5'-difoszfát	39
Guanozin 3',5'-difoszfát	39
Guanozin 5'-monofoszfát 2'.3'-ciklofoszfát	41
Guanozin 5'-pirofoszfát 2'/3'/-monofoszfát	42
Guanozin 5'-trifoszfát 2'/3'/-monofoszfát	44
Guanozin 5'-pirofoszfát 2'.3'-ciklofoszfát	44

2'-O-/1"-etoxietil/guanozin 3',5'-difoszfát	46
3'-O-/1"-etoxietil/ guanozin 2',5'-difoszfát	48
Guanozin 3',5'- és 2',5'-di-pirofoszfát	49
Uridin 2'/3'/,5'-difoszfát	51
Uridin 5'-pirofoszfát 2'.3'-ciklofoszfát és uridin 5'-piro- foszfát 2'/3'/-monofoszfát	53
2'/3'/-O-/1"-etoxietil/ uridin 3'/2'/,5'-difoszfát	53
Uridin 2'/3'/,5'-di-pirofoszfát	55
Összefoglalás	57
Irodalom	60

Bevezetés

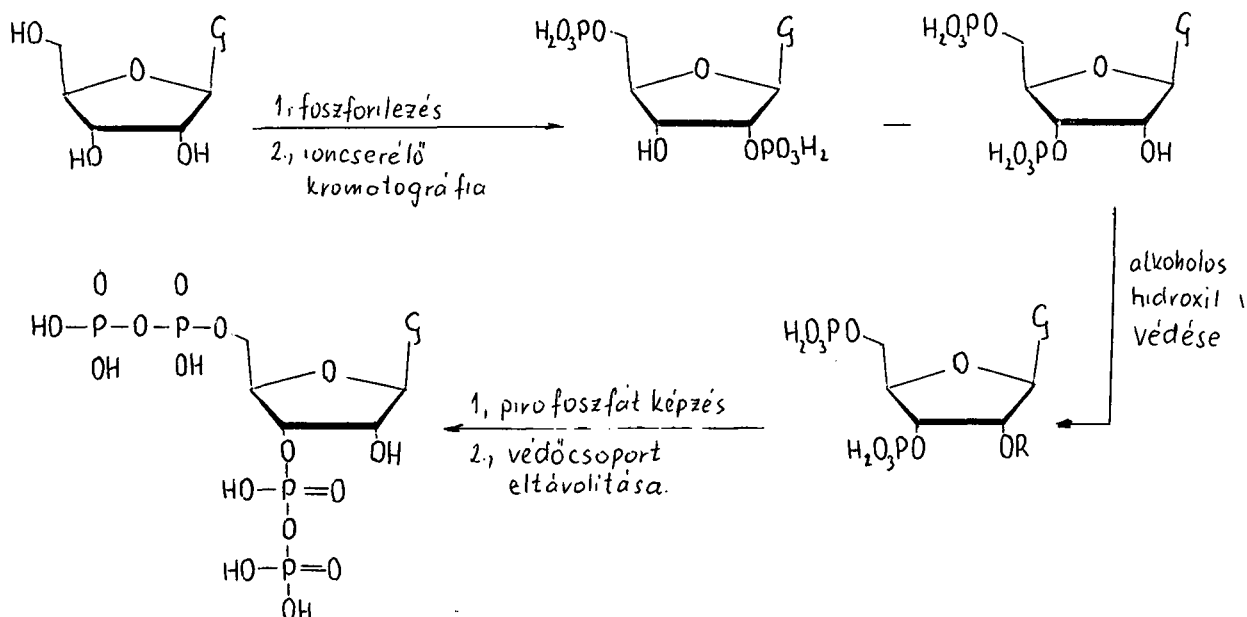
Aminosav-éheztetett stringens *Escherichia coli* törzsek savas extraktumából két, addig ismeretlen szerkezetű foszforilezett vegyületet mutattak ki vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel, melyeket MS I illetve MS II-nek neveztek el /60/. Az MS I keletkezésének és lebomlásának kinetikájából arra következtettek, hogy az RNS felhalmozódás lehetséges inhibitoraként résztvesz a stringens válaszban /61/. Elvégezték az MS I izolálását, és kémiai valamint enzimatikus hidrolizisek eredményei alapján kimutatták, hogy az a guanozin tetrafoszfátja, pontosabban a guanozin 5'-difoszfát 3'- vagy 2'-difoszfát /ppGpp/ /62/. Későbbiekben kimutatták, hogy a ppGpp guanozin 5'-difoszfátból és adenozin 5'-trifoszfátból keletkezik pirofoszfát transzfer által /63,64/, és ez lehetőséget adott a másik pirofoszfát csoport helyének pontos megállapítására. Ugyanis γ -P³²-adenozin 5'-trifoszfátot használva és a keletkező ppGpp-t cink-aktivált élesztő-pirofoszfátázzal hidrolizálva olyan radioaktív guanozindifoszfátot kaptak, amely növényi 3'-foszfomonoészteráz hatására teljesen elveszítette radioaktivitását /63/. Ebből következik, hogy a ppGpp pontos szerkezete guanozin 3'5'-di-pirofoszfát, s ezt később NMR-spektroszkópiával is alátámasztották /65/.

A guanozin 3',5'-di-pirofoszfát egyre növekvő /de nagyrészt még tisztázatlan/ biológiai jelentőségén kívül kémiailag is érdekes szokatlan szerkezete miatt, mivel a ribóz két hidroxilcsoportját is

észterezi pirofoszforsav, s így egy különleges nukleotid-anhidridnek tekinthető. A molekula két különböző stabilitású pirofoszfát csoporttal rendelkezik. A 3'-pirofoszfát kötés - a szomszédos cisz térállású hidroxilcsoport jelenléte miatt - könnyen hasad 2'.3'-ciklusos foszforsavdiészter intermediéren keresztül /32/.

Munkámban a guanozin 3'.5'-di-pirofoszfát és 2'.5'-izomerje szintézisét próbáltam megvalósítani, mivel a munka indulásakor még nem volt ismeretes, melyik izomer a biológiailag aktív vegyület. Ezért guanozinból kiindulva olyan szintézist terveztem, amely alkalmas mindkét tiszta izomer előállítására. A ribonukleozid 3'-pirofoszfátok szintézisére eddig két módszer ismert /29,51/ /mindkét módszerrel adenozin 3'-pirofoszfátot szintetizáltak/, míg számos eljárást ismerünk az 5'-pirofoszfátok előállítására /66,67/. A ribonukleozid 3',5'-di-pirofoszfátok és a megfelelő 2',5'-izomerek szintézisét azonban eddig még nem végezték el.

A tervezett szintézis vázlatát a 3'.5'-izomerre felírva a következő ábrán foglaltam össze.



A guanozin 2'/3',5'-difoszfát előállítását a guanozin pirofoszforilkloridos foszforilezésével /18/ terveztem megvalósítani. Az izomerek szétválasztására az analóg inozinszármazékok szétválasztására használt ioncserélő oszlopkromatográfiás módszert választottam /13/.

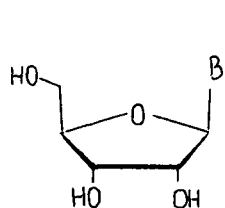
A szintézis második lépésében a guanozin 2',5'- illetve 3',5'-difoszfát alkoholos hidroxilcsoportjának védését tűztem ki célul. A védeés azért szükséges, mert ellenkező esetben a következő lépés guanozin 5'-pirofoszfát 2'.3'-ciklofoszfát képződéshez vezetne /50/. A védőcsoport kiválasztásánál a következő szempontokat kell figyelembevenni: a védési reakció közben a kiindulási anyag izomerizációja ne következzen be, a pirofoszfát szintézis körülményei között a védőcsoport stabil legyen, valamint eltávolításánál a már meglevő pirofoszfát kötések hasadása a lehető legkisebb mértékben következzen be. A fenti követelmények indokolták az -etoxietil csoport használatát, melyet az oligoribonukleotid szintéziseknél már sikerrel alkalmaztak. A védett származék elkészítése a nukleotid-komponens alkoholos hidroxilcsoportja és az etilviniléter közötti savkatalizált addíciós reakciót választottam. Amennyiben e reakció során ácilvándorlás nem következik be, ez egyben a végtermék izomermentességét is biztosítja.

A harmadik lépésben a két különböző helyzetű pirofoszfát csoport felépítését azonos módon, egyidejűleg, a Michelson-féle anioncserés módszerrel /39/ szándékoztam elvégezni. A védőcsoport enyhe savas hidrolízise után lenne nyerhető a végtermék. Ha a második

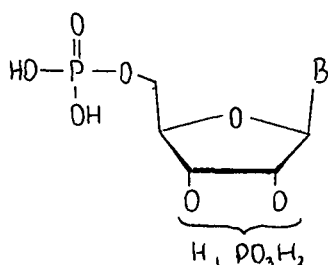
lépésben izomerizáció nem következett be, a végtermék a kiindulási difoszfát csoportjaival azonos helyzetű két pirofoszfát csoportot tartalmaz; pirofoszfát vándorlás helyett ugyanis minden esetben csak a molekula 2'.3'-ciklofoszfáton keresztüli lebomlása következhet be /32/.

Ribonukleozid 2'/3',5'-difoszfátok szintézisére használt módszerek áttekintése

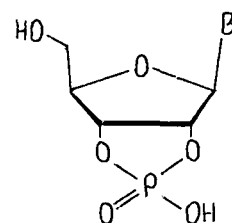
A ribonukleozid 2'/3',5'-difoszfátok /11/ olyan vegyületek, melyekben a ribonukleozid ribóz csoportjának primer és valamelyik szekunder alkoholos hidroxilcsoportját ortofoszforsav észteresíti. E vegyületek szintézise a kiindulási anyagok, de különösen az észterkötést kialakító módszerek tekintetében sokféle lehet. A kiindulási anyag sok esetben ribonukleozid /I/, de lehet ribonukleozid 2'.3'-ciklofoszfát /III/ is.



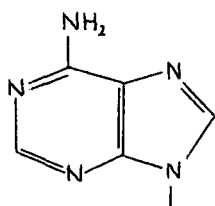
I. a, b, c, d, e



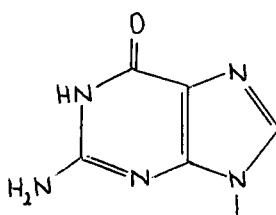
II. a, b, c, d, e



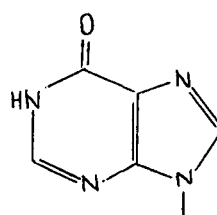
III a, b, c, d, e



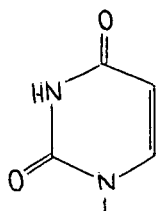
a: B=adenin-9 (A)



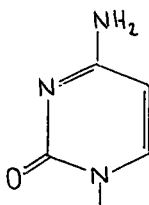
b: B=guanin-9 (G)



c: B=hipoxantin (Hx)



d: β -uracil-1 (U)



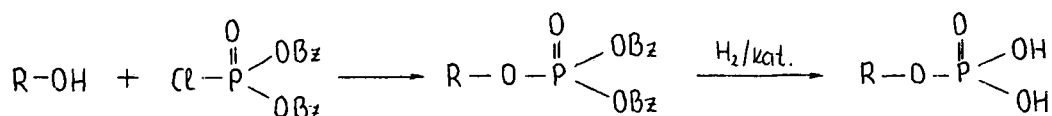
e: β -citozin-1 (C)

A foszfátészter kötést kialakító módszerek nagyon sokfélék lehetnek, a II. szintézise szempontjából való csoportosításuk elég nehézkes. A módszerekben közös, hogy a nukleozid-O-P kötés kialakítása után a primer termék egy valamilyen további feldolgozása szükséges, s ezalatt elsősorban hidrolízis vagy hidrogenolízis, foszfit típusú reagens alkalmazása esetén oxidáció értendő, ezenfelül III.-ból kiinduló szintézisek esetén a 2',3'-ciklofoszfát gyűrű sav- vagy báziskatalizált hidrolízise /1,2/ is szükséges. A termék egyből legtöbb esetben ioncserélő oszlopkromatográfiát alkalmazva nyerik ki II.-t.

Pirimidin ribonukleozid 2'/3',5'-difoszfátok szintézisére alkalmas az ún. polifoszforsavas módszer /3/ uridint /Id/ vagy citidint /Ie/ foszforsav és foszforpentoxid keverékével kezeltek.

Savas hidrolízis és ioncserélő oszlopkromatográfia után Ba-só alakban izolálták IIId.-t és IIe.-t. Ez a módszer a purin ribonukleozidokra nem alkalmazható az N-glikozidos kötésük savérzékenysége miatt.

A ribonukleozidok alkoholos hidroxilcsoportjait dibenzilfoszforkloridáttal is szokták foszforilezni. Az elsődlegesen képződő foszfor-sav triészter típusú vegyület benzil csoportjai katalitikus hidrogénezéssel eltávolíthatók:

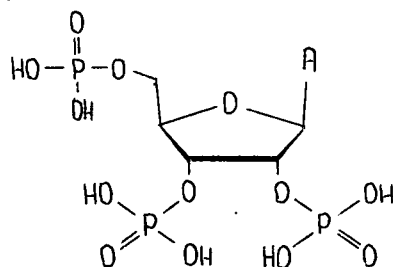


ahol R-OH: nukleozid vagy nukleozidszármazék

-Bz: $-CH_2C_6H_5$

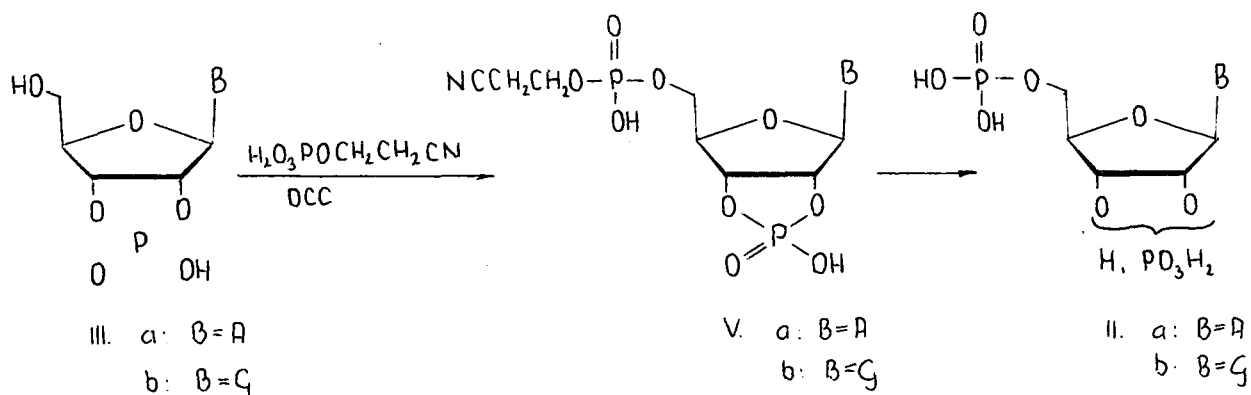
Adenozint dibenzilfoszfokloridáttal foszforileztek és a termékelegyből hidrogenolízis és ioncserélő oszlopkromatográfia után kapták IIa.-t /4,5,6/. A difoszfát izomereket anioncserélő oszlopon és papirkromatográfiás módszerrel /5/ elválasztották egymástól.

Ugyanebből a reakcióelegyből adenozin 2',3',5'-trifoszfátot /IV/ is izoláltak /5/.

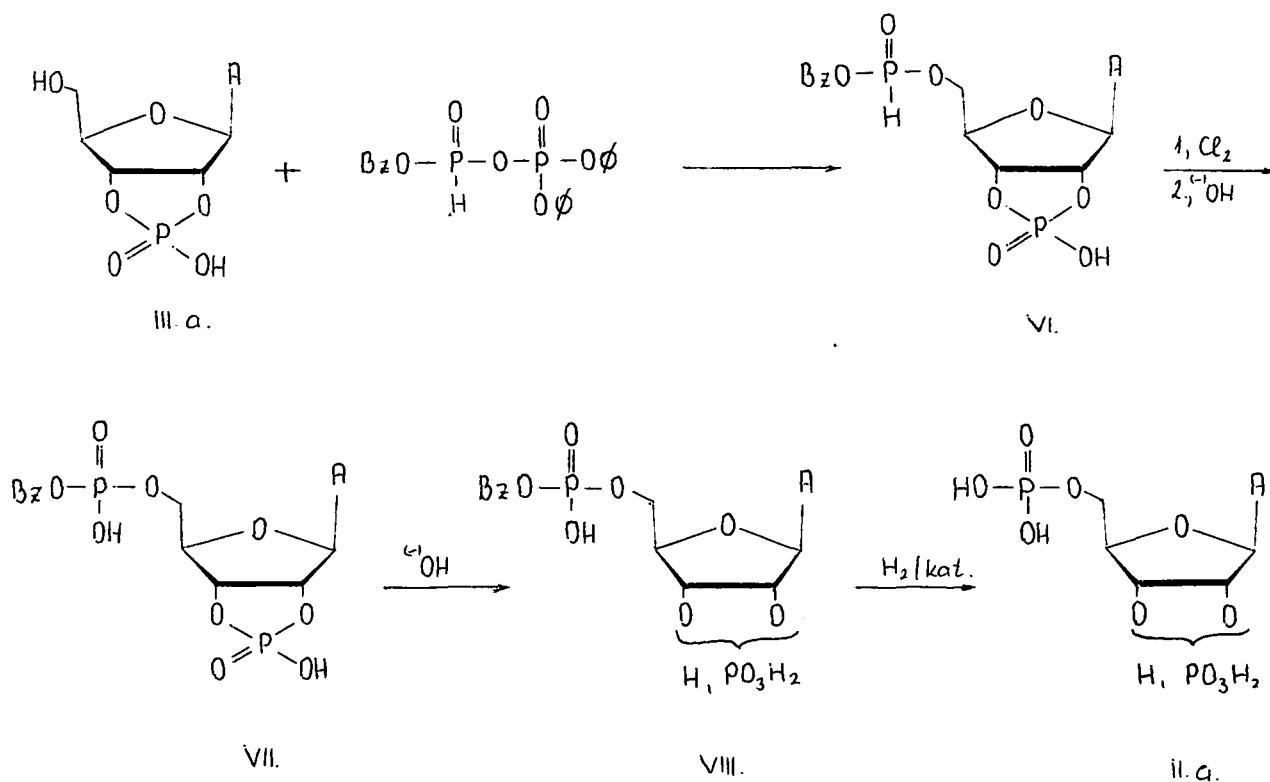


IV.

Adenozin 2',3'-ciklofoszfát /IIIa/ és dibenzilfoszfokloridát reakciójából képződő adenozin 5'-dibenzilfoszfát 2',3'-ciklofoszfát hidrogenolízise és hidrolízise után szintén IIIa.-t nyertek /7/. Diciklohexilkarbodiimid és β -cianoetilfoszfát keverékét alkalmazva foszforilezőszernek /8/, adenozin 2',3'-ciklofoszfátból kiindulva a képződő adenozin 5'-/ β -cianoetil/-foszfát 2',3'-ciklofoszfát /Va/ lugos hidrolízise után kapták IIa.-t /7/, Ugyanezzel a módszerrel IIb.-t is előállították /9/.

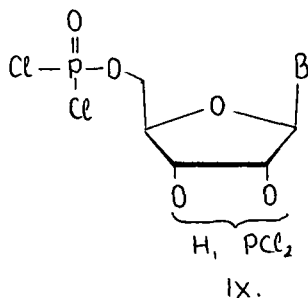


A benzilfoszforosav és difenilfoszforsav vegyes anhidridje és az adenzin 2'.3'-ciklofoszfát reakciója után kapott adenzin 5'-benzilfoszfát 2'.3'-ciklofoszfát /VI/ benzilfoszfát csoportját klórozták, majd enyhe bázikus hidrolizissel adenzin 5'-benzilfoszfát 2'.3'-ciklofoszfátot /VII/ kaptak. Lugos hidrolizissel a ciklofoszfát gyűrűt kinyitották, majd VIII-ből a benzilcsoportot hidrogenlizissel eltávolítva kaptak IIa.-t /10/:



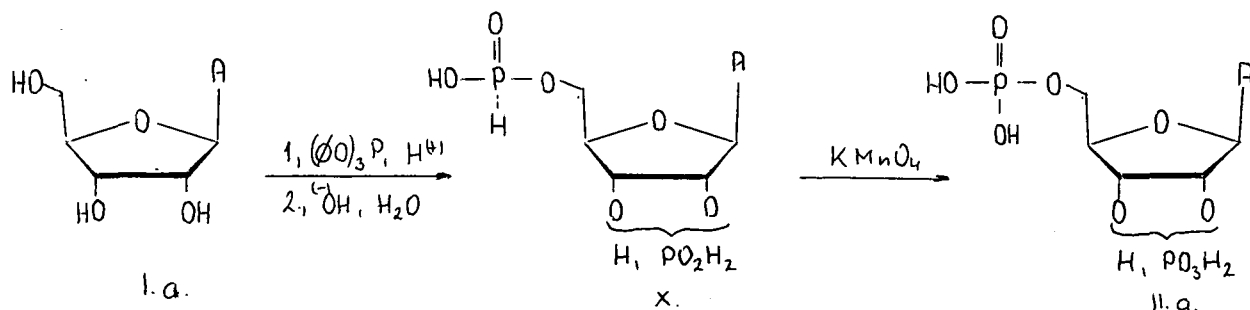
-Bz: $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$
 $-\phi$: $-\text{C}_6\text{H}_5$

Foszforoxiklorid és foszfortriklorid egymás utáni alkalmazásával valamennyi fő ribonukleozidból előállították a megfelelő difoszfátokat /11/. A nukleozidot először trimetilfoszfát jelenlétében foszforoxikloriddal reagáltatva 5'-helyzetben szelektíven foszforilezték /12/, majd a reakcióelegyhez az intermedier izolálása nélkül foszfortrikloridot adtak. A foszfortriklorid és a 2'/3'/-OH között végbemenő reakció után a reakcióelegyben levő nukleozid 5'-foszfodikloridát 2'/3'/-foszfodikloridit /IX/ kevés viz jelenlétében klórozták, majd hidrolízis és ioncserélő oszlop-kromatográfia után kaptak II.-t. Az inozin esetében ioncserélő oszlop-kromatográfiával IIc.-t izomerjeire is szétválasztották /13/.

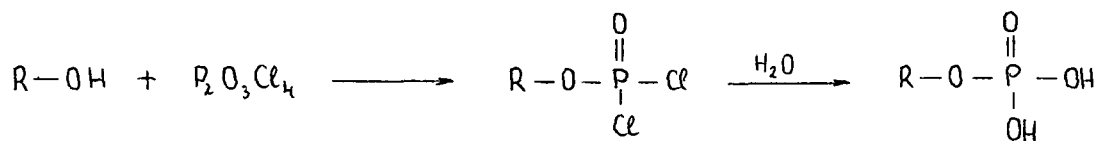


A primer és szekunder alkoholos hidroxilcsoportok PCl_3 -al szembeni különböző reaktivitása és a képződő 5'-illetve 2'/3'/-foszfodikloriditok közötti stabilitásbeli különbség miatt végezték el először az 5'-OH szelektív foszforilezését. A 2'/3'/-foszfodikloriditok ugyanis viszonylag stabilak a reakció körülményei között, azonban a kialakulásukhoz szükséges hosszú idő alatt a kevésbé stabil, elsődlegesen képződő 5'-foszfodikloridit elbomlik, s a reagensek együttes alkalmazása nem vezetett eredményre.

Trifenilfoszfit és a ribonukleozidok alkoholos hidroxilcsoportjai között végbemenő reakció is felhasználható nukleozid 2'/3'/,5'-difoszfátok szintézisére. Adenozin és trifenilfoszfit vízmentes körülmények között végbemenő savkatalizált reakciója után lugos hidrolízist alkalmazva adenozin 2'/3'/,5'-difoszfítet /X/ kaptak, amelyet semleges KMnO_4 oldattal adenozin 2'/3'/,5'-difoszfáttá oxidálták. Melléktermékként adenozin 2',3'5'-trifoszfítet is izoláltak, amelyet hasonló módon alakítottak át adenozin 2',3',5'-trifoszfáttá /IV/. Oxidáció előtt és után is ioncserélő oszlopkromatográfiát kellett alkalmazni /14/.



A nagyon reakcióképes pirofoszforilklorid jól alkalmazható a ribonukleozidok foszforilezésére. Alkoholos hidroxilcsoportot tartalmazó vegyületekkel foszforsavészterdiklorid képződése közben reagál, s ez foszforsavmonoészterre hidrolizálható /15/.

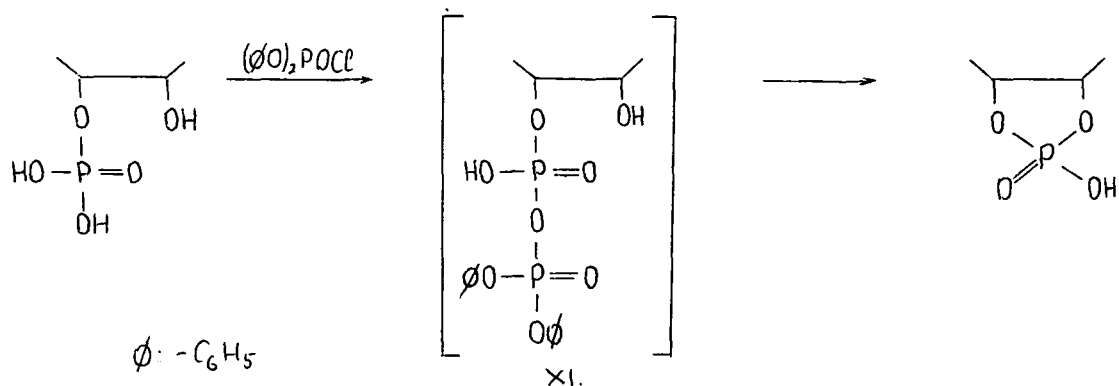


A nukleotidkémiaiában először a ribonukleozid 5'-foszfátok szintézisére használták fel megfelelően védett ribonukleozid származékból kiindulva /16/. Ribonukleozidok borátkomplexeit pirofoszforilklorid-

dal foszforilezték, s savas hidrolízis és ioncserélő oszlopkromatográfia után az előállítani kívánt ribonukleozid 5'-foszfátok mellett jelentős mennyiségben kaptak nukleozid 2'/3',5'-difoszfátokat is /17/. Guanozinból és inozinból kiindulva csaknem kvantitatíve nyerték a megfelelő 2'/3',5'-difoszfátokat /18/. A nukleozid 2'/3',5'-difoszfátok izomerekre való szétválasztását preparatív méretekben csak néhány esetben végezték el /5,13/. Tiszta izomerek előállításának másik lehetséges útja az izomerkeverék difoszfátok átalakítása nukleozid 5'-foszfát 2'.3'-ciklofoszfáttá - pl. a klórhangyasav-etilészteres módszert alkalmazva - majd a ciklofoszfát-gyűrű specifikus, enzimátikus nyitása /19/.

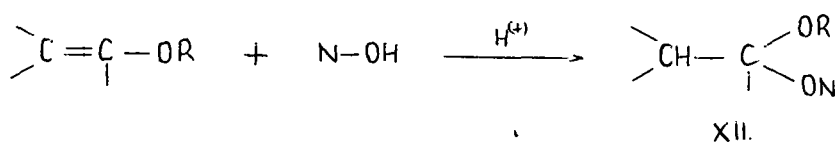
Ribonukleozid 2'/3',5'-difoszfátok alkoholos hidroxilcsoportjának savlabilis csoporttal való védésére felhasználható módszerek

A ribonukleozid 2'/3',5'-difoszfát alkoholos hidroxilcsoportját a pirofoszfát kötések felépítése előtt védeni kell. Védés nélkül az alkalmazott pirofoszfát szintetizáló módszer /leírása a későbbiekben/ nukleozid 5'-pirofoszfát 2'.3'-ciklofoszfát képződéséhez vezetne /50/, mivel az elsődlegesen képződő XI. típusu anhidrid intramolekulárisan foszforilezné a szomszédos cisz hidroxil csoportot. E reakciót fel is használják nukleozid 2'.3'-ciklofoszfátok szintézisére /31/.



Az alkoholos hidroxil védésére olyan védőcsoportot kellett választani, melynek eltávolításánál a már meglevő pirofoszfát kötés hasadása a lehető legkisebb mértékben következik be. Lugos közegben eltávolítható védőcsoport nem alkalmas, mivel az eltávolítás körülményei és a felszabaduló cisz hidroxilcsoport jelenléte következtében a pirofoszfát kötés könnyen hidrolizál öttagu ciklofoszfát gyűrű átmeneti fellelése közben /32/. Ezért az alkoholos hidroxilcsoport védésére enyhén savas körülmények között eltávolítható csoportot kell alkalmazni. Ilyen védőcsoportokat a nukleozidok területén például az oligoribonukleotidok szintézisében alkalmaznak leggyakrabban a nukleotid-komponens 2'-OH-jának védésére.

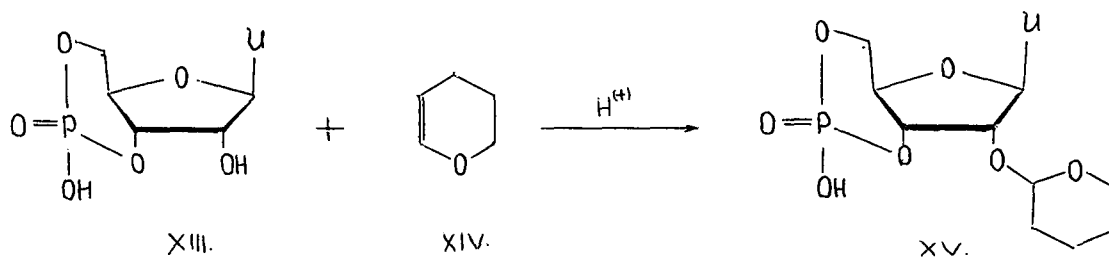
A nukleozidok alkoholos hidroxilcsoportjai viniléterekkel savkatalizált reakcióban acetál típusu vegyület /XII/ képződése közben reagálnak.



N - OH: nukleozid, vagy alkoholos hidroxilcsoporttal rendelkező nukleozidszármazék.

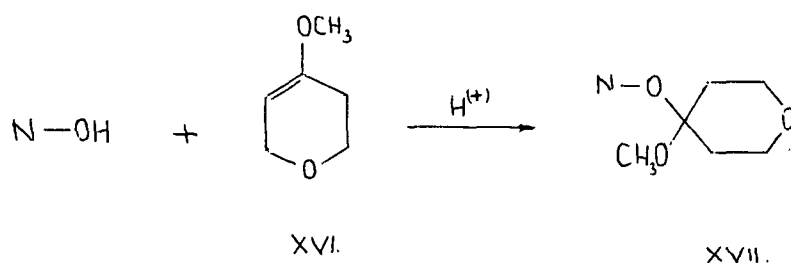
A XII. típusu vegyületek savas közegben labilisak, és a kiindulási nukleozidszármazékokra hidrolizálnak.

Először a dihidropirán /XIV/ és az uridin 3'.5'-ciklofoszfát /XIII/ közötti reakciót irták le /20,21/. A képződő 2'-O-tetrahidropiranyluridin 3'.5'-ciklofoszfátot /XV/ az első oligoribonukleotid szintézis egyik kiindulási anyagának, a nukleotidkomponens 5'-O-tritil-2'-O-tetrahidropiranyluridin 3'-foszfátnak az előállítására használták.



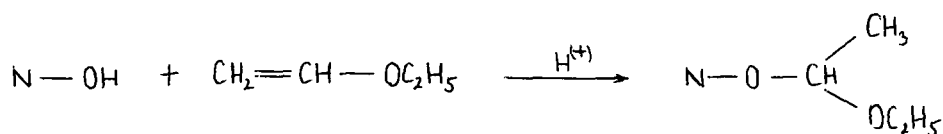
A tetrahidropiranyilezési reakciót később számos esetben felhasználták nukleozid- és nukleotidszármazékok, pl. az 5'-O-acetilnukleozid 3'-foszfátok /22/ és a 3'.5'-di-O-acetilnukleozidok /23/ 2'-OH-jának védésére. A reakciót vízmentes, alkoholos hidroxilcsoportot nem tartalmazó oldószerekben, savkatalizátor /HCl, p-toluolszulfonsav, trifluorecetsav/ jelenlétében hajtják végre. A tetrahidropiranyl csoport eltávolítása hig ecetsavval, piridinium vagy ammonium formájú szulfonsav-gyantákkal /22/ vagy 0.01 N HCl-al /23/ történhet. A tetrahidropiranyl csoport természetesen nemcsak a 2'-OH védésére használható.

A 4-metoxi 5.6.-dihidropiránt /XVI/ hasonló módon, alkalmazták nukleozid vagy nukleotidszármazékok 2' vagy 5' /vagy mindkettő/ alkoholos hidroxiljainak védésére /24,25/.



A XVII. származék 4-metoxitetrahidropiranil csoportja könnyebben eltávolítható, mint a tetrahidropiranil csoport.

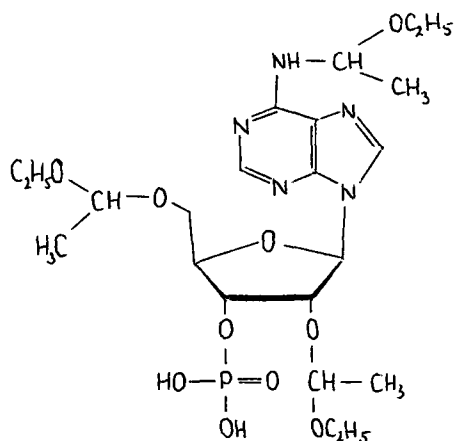
A tetrahidropiranil származékoknál labilisabb védőcsoportot kerestek az oligoribonukleotidszintézisben a 2'-OH védelmére, hogy a védőcsoport savas hidrolízisének a már kialakított internukleotid kötés izomerizációja minél kisebb mértékű legyen. A 2'-O-/1"-alkoxietil/ származékokból az 1-etoxietil csoport könnyebben távolítható el, mint a megfelelő tetrahidropiranil védőcsoport. Izoláláshoz és a további szintetikus lépésekben való alkalmazáshoz elegendő stabilitással a 2'-O-/1"-etoxietil/ származékok rendelkeznek /26/. Az 1-etoxietil védőcsoport kialakítását a megfelelően védett nukleozid 3'-foszfát 2'-OH-ja és az etilviniléter savkatalizált reakciójával végzik el /27,28/.



Az alkoholos hidroxilcsoport regenerálása híg ecetsavas közegben /5-10 %-os/, szobahőmérsékleten 1-2 óra alatt végezhető el.

Az 1-etoxietil csoportot felhasználják a nukleozid 3'-foszfátok 2'- és 5'-OH-jának egyidejű védelmére is, s a kapott származékokat oligoribonukleotid szintézisekben, valamint az adenzin 3'-pirofoszfát szintézisében alkalmazták /29/.

A heterociklusos bázisok és az etilviniléter között végbemenő reakciókkal nem sokat foglalkoztak. Adenozin 3'-foszfátból kiindulva hosszabb reakcióidő után N⁶, O^{2'}, O^{5'}-trisz /1"-etoxietil/-adenozin 3'-foszfát /XVIII/ képződését írták le /28/.



XVIII.

XVIII-at is felhasználták oligonukleotid szintézisben, mivel az aminocsoport az alkoholos hidroxiloknál könnyebben regenerálható. Egyértelmű reakció céljából azonban egyéb esetekben az adenozin-, guanozin, és citidinszármazékok aminocsoportját az etoxietilezési reakció előtt szelektív szubsztitúciós módszerrel, N-dimetilaminometilén származékok elkészítésével védik /30/, majd az aminocsoportot lúgos hidrolizissal regenerálják /29/.

Nukleozid 2'/3',5'-difoszfátok alkoholos hidroxiljának viniléter típusu vegyületekkel való reakcióját nem végezték el. A fent leírt védőcsoportok közül erre a célra a hig savas közegben legkönnyebben eltávolítható 1-etoxietil csoportot alkalmaztam; s így elvégeztem a 2'-O-/1"-etoxietil/guanozin-3'.5'-difoszfát, a 3'-O-/1"-etoxietil/guanozin 2'.5'-difoszfát és a 2'/3'-O-/1-etoxietil-uridin 3'/2',5'-difoszfát szintézisét.

A nukleotid koenzimek felosztása és szintézisükre használt módszerek

vázlatos áttekintése

A guanozin 3',5'-di-pirofoszfát kémiaailag a nukleotid koenzimek különleges példajaként fogható fel.

A nukleotid koenzimek /vagy nukleotid anhidridek/ kémiai szempontból a nukleozid 5'-foszfátok vegyes anhidridjei. Csoportosításuk a nukleozid 5'-foszfátot acilező sav szerkezete alapján történhet

/33/:

/1/ A nukleozid 5'-foszfátot foszforsav vagy pirofoszforsav acilezi: nukleozid 5'-difoszfátok és nukleozid 5'-trifoszfátok

/2/ A pirofoszforsav aszimmetrikus diészterei, melyekben a nukleozid 5'-foszfátot különböző foszforsavmonoészterek acilezik.

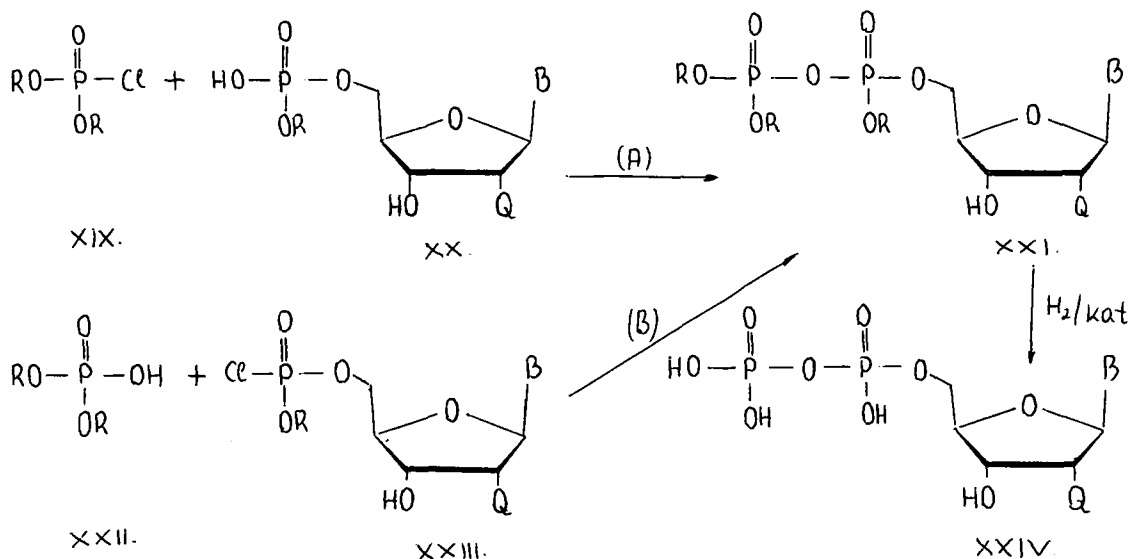
/3/ A nukleozid 5'-foszfátot karbonsavak, α -aminosavak vagy kén-sav acilezi.

A nukleotid koenzimek szintézisére sokféle módszert dolgoztak ki, s már a hatvanas évek elejére lényegében valamennyi addig ismert nukleotid koenzim többféle szintézisét is megvalósították.

A továbbiakban a legfőbb módszerek vázlatos - elsősorban a nukleozid 5'-difoszfátok példáján bemutatott összefoglalása következik.

Foszfokloridátos módszer

A savkloridból és sav sójából kiinduló vegyes-anhidrid szintézis elvileg két uton valósítható meg:



Az A módszer szerint először az adenzin 5'-difoszfát /XXIV, B=adenzin, Q=OH/ szintézisét valósították meg a benzil-adenzin 5'-monofoszfátból /XX, B=adenzin, R=benzil, Q=OH/ és dibenzilfoszfokloridátból /XIX, R=benzil/ kapott tetraszubsztituált pirofoszfát /XXI, B=adenzin, R=benzil, Q=OH/ katalitikus hidrogénezése révén /34/.

A B módszer kiindulási anyagai a benzil-nukleozid 5'-foszfokloridát /XXIII, R=benzil/ és dibenzil foszfát /XXII, R=benzil/, melyre példa a benzil-2'.3'-O-izopropilidénuridin 5'-foszfokloridátból illetve benzil-3'-O-benziltimidin 5'-foszfokloridátból és dibenzilfoszfátból kiinduló uridin 5'-difoszfát /XXIV, B=uridin, Q=OH/, illetve timidin 5'-difoszfát /XXIV, B=T, Q=H/ szintézis /35,36/.

Mindkét módszer hátránya, hogy a XXI, tetraszubsztituált pirofoszfát intermedier és a rendszerben jelenlevő anionok között végbemenő un. kicserélődéses reakciók miatt alacsony a termelés. Ezek a kicserélődéses mellékreakciók visszaszoríthatók az adott körülmények között, jóval stabilabb triszubsztituált pirofoszfát intermedierek alkalmazásával. E módosítást mindkét utra /A,B/ elvégezték. Így a B módszer monobenzilfoszfátból és XXIII. nukleotidkomponens-

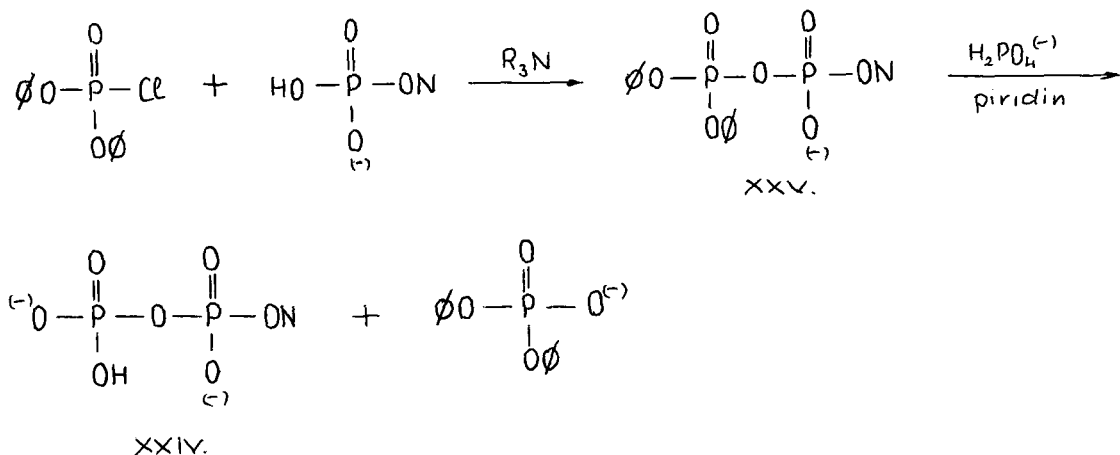
ből /36/, míg az A módszer nukleozid 5'-foszfátokból és dibenzilfoszfokloridátból indul ki /37/. Jelentős az A módszerre végrehajtott módosítás, mivel közvetlenül nukleozid 5'-foszfátból indul ki, s ioncserélő oszlopkromatográfia nélkül nagy tisztaságu termékeket szolgáltat. Egyetlen hátránya a labilis dibenzilfoszfokloridát használata.

"Anhidrid-kicserélődéses" módszer

A módszer a savanhidridek anion-kicserélődéses reakcióját /38/ használja fel. Ennek lényege, hogy egy aszimmetrikus /vagy szimmetrikus/ pirofoszfát-származék nem stabil olyan anion jelenlétében, melyből levezethető sav a pirofoszfát származék komponenseiből származtatható savak bármelyikénél vagy mindkettőnél gyengébb. A jelenlevő anion nukleofil támadása eredményeként a pirofoszfátszármazékból a legstabilabb- azaz a legerősebb savnak megfelelő - anion válik szabaddá, miközben új pirofoszfát kötés képződik. A kicserélődés feltétele, hogy a nukleofil támadással szemben a pirofoszfátszármazékot negatív töltés ne stabilizálja.

A cserereakcióban képződő új pirofoszfáton pedig védő negatív töltés létrehozása biztosítja, hogy további anionkicserélődéses reakciók ne menjenek végbe.

A módszert úgy alkalmazták pirofoszfát kötés szintézisére /39/, hogy egy foszforsavmonoészter /pl. nukleozid 5'-foszfát/ és difenilfoszfokloridát reakciójával egy pirofoszforsavtriésztert /XXV/ hoznak létre, mely erős bázis /trialkilamin/ jelenlétében, negatív töltése folytán, viszonylag stabil:



N: nukleozid

Ø: fenil

R: alkil /általában n-butyl, n-oktil/.

Gyengén bázikus közegben /piridin/ viszont XXV. disszociációjának visszaszorulása következtében ortofoszfát anionnal könnyen támadható, s difenilfoszfát anion szabadul fel nukleozid 5'-difoszfát /XXIV/képződése közben, ugyanis a difenilfoszforsav a nukleotidoknál és a foszforsavnál is erősebb sav. Ezzel a módszerrel a nukleozid 5'-difoszfátokon kívül igen sok, egyéb nukleotid koenzim szintézisét is elvégezték /40/.

A kiindulási anyagok és a módszer egyszerűségét figyelembevéve, ez látszik legjobb pirofoszfát szintetizáló módszernek.

Karbodiimides módszer

A módszer alapja, hogy adott foszforsavmonoészter karbodiimidekkel pirofoszforsavdiészterré kapcsolható össze /41/. Két különböző foszforsavmonoészterből kiindulva a reakcióban elvileg háromféle termék keletkezhet, két szimmetrikus és egy aszimmetrikus pirofoszfát. Nukleotid koenzimek szintézisére a módszer akkor használható, ha

az aszimmetrikus származék irányába halad a reakció, s ez az egyik komponens nagy feleslegével érhető el. Így elsősorban nukleozid 5'-di- és trifoszfátok szintézisére alkalmas nukleozid 5'-foszfátból és ortofoszforsavból kiindulva /42,43,44/, amikor ortofoszforsav felesleg alkalmazásával visszaszorítható a dinukleozidpirofoszfát-hoz vezető mellékreakció, viszont nagy mennyiségben keletkeznek anorganikus polifoszfátok. A módszer előnye, hogy egyszerű kiindulási anyagok szükségesek /a nukleotidkomponens hidroxiljainak és aminos csoportjának védelme szükségtelen/, hátránya viszont, a kísérleti nehézségek /heterogén reakcióelegy/, valamint a komplex termékelegyi miatti rossz termelés.

Foszforamidátos módszer

A módszer kiindulási anyagai a foszforsavmonoészterek amid típusú származékai, az ún. foszforamidátok /XXVI/. A foszforamidátos pirofoszfátszintézisek a foszforamidát és foszforsav ill. foszforsavmono- vagy diészterek protonkatalizált reakciójával hajthatók végre:



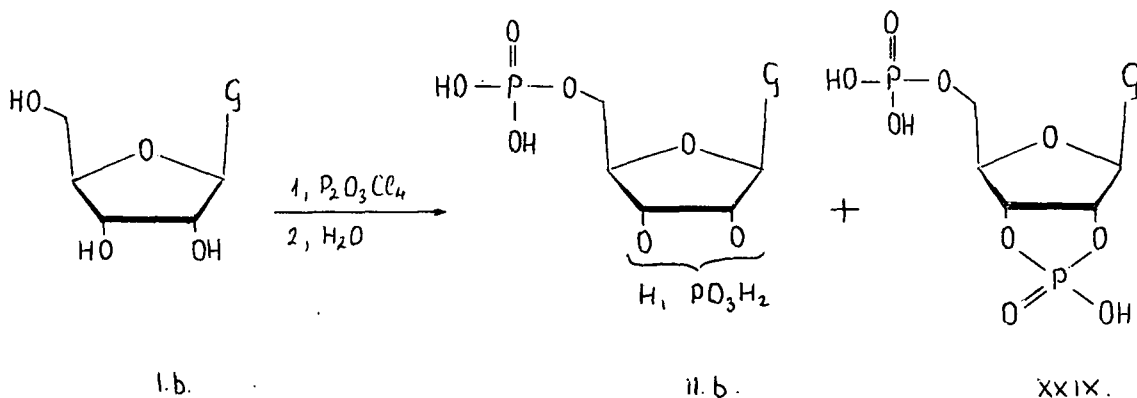
A sebességhatározó lépés a nitrogénatom protonálódása, s ezt az amidátot képező bázis erőssége szabja meg. Lehetséges mellékreakciók: foszforamidát hidrolizise, s az abból származó foszforsavészter és a foszforamidát, illetve két molekula foszforamidát szimmetrikus

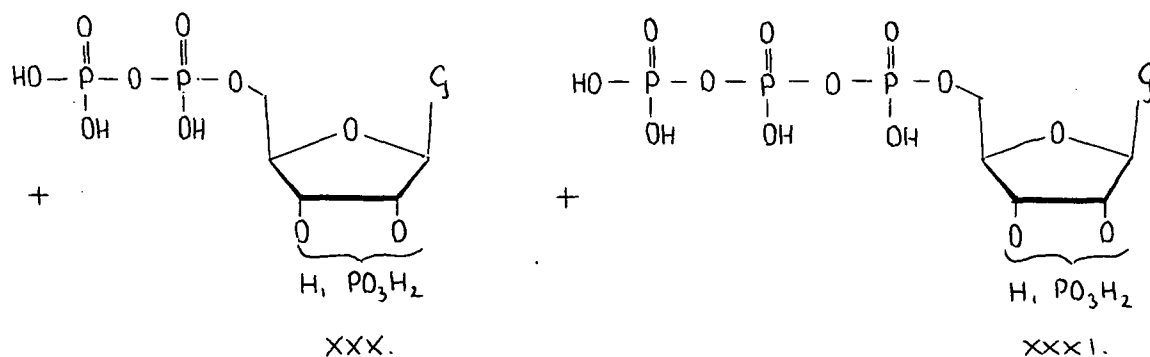
pirofoszfáttá való átalakulása.

A reakció végrehajtható nukleotid 5'-foszfátok /XXVII, $R_3=H$, $R_4=\text{nukleozid}$ / és a reakciópartnerből készített foszforamidátok /XXVI/ reakciójával /45/, de legtöbbször nukleozid 5'-foszforamidát /XXVI, $R=\text{nukleozid}$ / és foszforsav /XXVII, $R_3=R_4=H$ / vagy foszforsavmonoészterek /XXVII, $R_3=H$ / reagáltatásával. Az utóbbi módon először a ribonukleozid 5'-difoszfátokat /XXVII, $R=\text{nukleozid}$, $R_3, R_4=H$ / készítették el /45,46,47/. Az egyszerű nukleozid 5'-foszforamidátoknál /XXXVI, $R=\text{nukleozid}$, $R_1=R_2=H$ / jobban alkalmazhatók a reaktívabb nukleozid 5'-foszforomorfolidátok /48/, valamint a nukleozid 5'-foszforoimidazolidátok /49/.

Guanozin foszforilezése pirofoszforilkloriddal

Guanozin /I b/ és pirofoszforilklorid reakcióját oldószer nélkül, hidegen, tízszeres mól-feleslegű pirofoszforilkloridot használva /18/ végeztem el guanozin 2'/3',5'-difoszfát /II b/ nyerése céljából. A reakció lezajlása után a pirofoszforilklorid feleslegtől éteres kicsapással választottam el a foszforilezés primer termékét, melynek P-Cl kötéseit hidrolizáltam. A hidrolízis erősen savas körülmények között /pH1/ ment végbe 0°C-on.





A termékelegy fenti komponenseinek elválasztását Dowex 1 x 8 /Cl⁻/ gyantából készült oszlopon, pH=2,6-on NaCl-HCl oldatokkal végzett elucióval, lépcsőzetes technikát alkalmazva végeztem el. Az elució menetét $\lambda = 260$ nm-en végzett extinkcióméréssel és vékonyréteg-kromatográfiával követtem. Kevés elreagálatlan guanozin és a guanozin-monofoszfátok után először a guanozin 2'.5'-difoszfát /IIb₂/ majd a guanozin 3'.5'-difoszfát /IIb₁/ eluálódott az oszlopról. Az izomerek szétválasztása csaknem teljes mértékben sikerült. Az eluens NaCl koncentrációját növelve, az oszlopról a guanozin 5'-monofoszfát 2'.3'-ciklofoszfát /XXIX/, a guanozin 5'-pirofoszfát 2'/3'/-monofoszfát /XXX/ és a guanozin 5'-trifoszfát 2'/3'/-monofoszfát /XXXI/ eluálódott. Ezek mennyisége a foszforilezés időtartamától és - különösen a ciklusos származéké - a primer termék hidrolizisének körülményeitől függ.

Guanozin 2'.5'- és 3'.5'-difoszfát /IIb₁ és IIb₂/

Ultraibolya spektrumuk /pH=1,7 és 11 értékeken, vizes oldatokban/ jellegzetes guanozin spektrum /53/. Foszforanalízis /54/ alapján a guanin:foszfor arány = 1:2. Alakalikus foszfatázzal végzett hidrolízis után molekulánként két foszforatom mérhető vissza anorganikus foszforként, s ennek alapján megállapítható, hogy mindkét

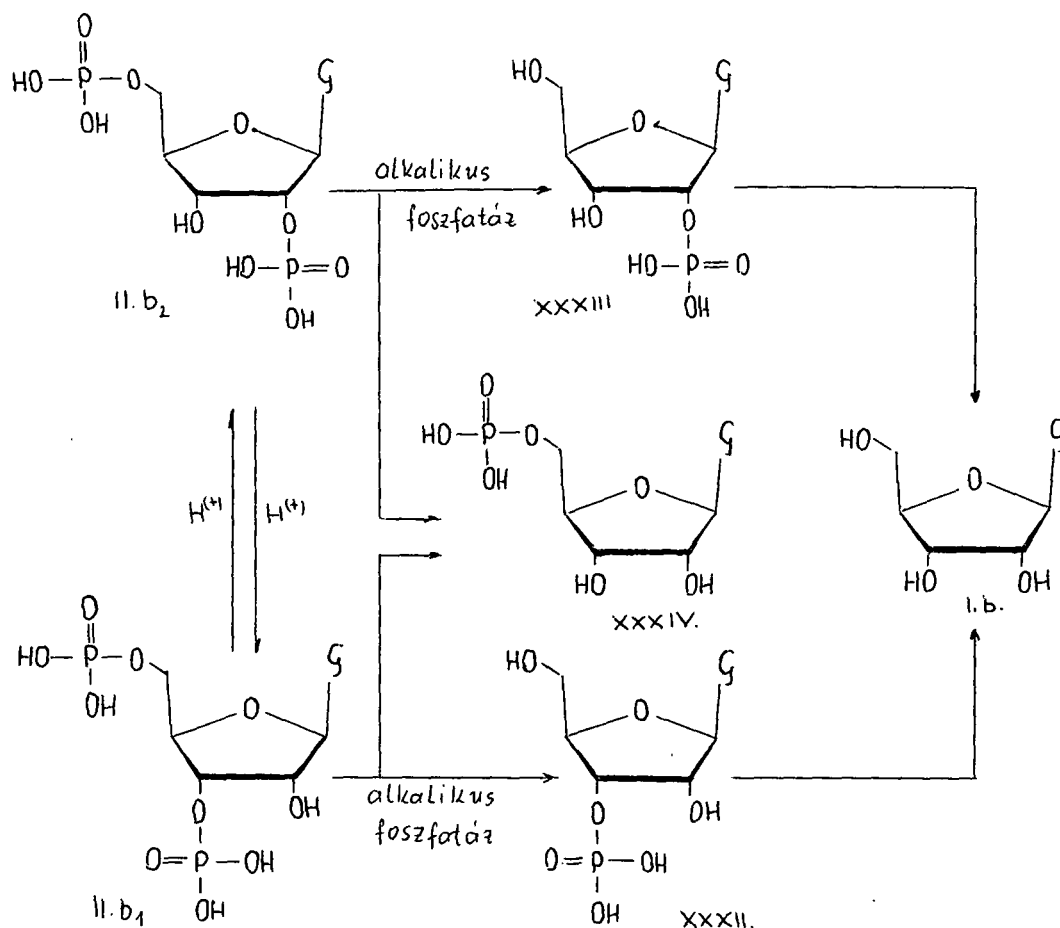
foszforatom foszforsavmonoészter szerkezet tagja. Savas közegben mindkét tiszta izomerből a helyzetizomerek egyensúlyi elegye állítható elő /55/.

Ezután a helyzetizomerek azonosítását kellett elvégezni. A szolvensben végzett vékonyréteg-kromatográfia alapján valószínű, hogy a nagyobb R_f értékű izomer a guanozin 2',5'-difoszfát /IIb₂/.

Ugyanebben a kromatográfiás rendszerben ugyanis a guanozin 2'-monofoszfát /XXXIII/ és a guanozin 3'-monofoszfát /XXXII/ közül az előbbi R_f értéke a nagyobb, s valószínű, hogy az elválasztás hasonló módon történik a 2'/3',5'-difoszfát izomereknél is /52/.

Az azonosítást megbízható módon enzimátikus módszerekkel végeztem el. Alkalikus foszfatáz hatására - mely a nukleozidok 2'-, 3'- és 5'-hidroxiljainak foszforsavmonoésztereit egyaránt hidrolizálja - a guanozin 2',5'-difoszfátnak feltételezett izomer hidrolízis intermedierei guanozin 2'-monofoszfát /XXXIII/ és guanozin 5'-monofoszfát /XXXIV/, míg a másik izomer esetében guanozin 3'-monofoszfát /XXXII/ és guanozin 5'-monofoszfát /XXXIV/ voltak.

Az izomerek azonosítását a későbbiek során bizonyított szerkezetű guanozin 5'-monofoszfát 2'.3'-ciklofoszfát /XXIX/ T_1 RNase-os hidrolízisével is elvégeztem. Az enzim a guanozin származékok 2'.3'-ciklofoszfát részletét specifikusan hidrolizálja 3'-foszfátra. A guanozin 5'-monofoszfát 2'.3'-ciklofoszfátból T_1 -RNase-os hidrolízissel kapott termék rétegekromatográfiásan azonos volt a feltételezés szerinti guanozin 3',5'-difoszfáttal.



Guanozin 5'-pirofoszfát 2'/3'-monofoszfát /XXX/

Rétegekromatográfiás viselkedés szempontjából hasonló a guanozin 2'/3',5'-difoszfáthoz, az A szolvensben kromatografálva két foltot mutatott, de az R_f értékek valamivel nagyobbak.

Az anyag a guanozinra jellemző ultraibolya spektrummal rendelkezik. A spektrumból számított molekulasúly és a foszforanalízis alapján molekulánként három foszforatomot tartalmaz.

Savas kezelés hatására az előzőekben igazolt szerkezetű guanozin 2'/3',5'-difoszfát keletkezett az 5'-helyzetű pirofoszfát kötés hasadása révén /56/. Lugos közegben a vegyület stabil.

Alkalikus foszfatazzal végzett hidrolízis végterméke guanozin. A hidrolízis intermedierjei közül rétegekromatográfiás módszerrel a guanozin 5'-difoszfátot /XXXIX/ is kimutattam.

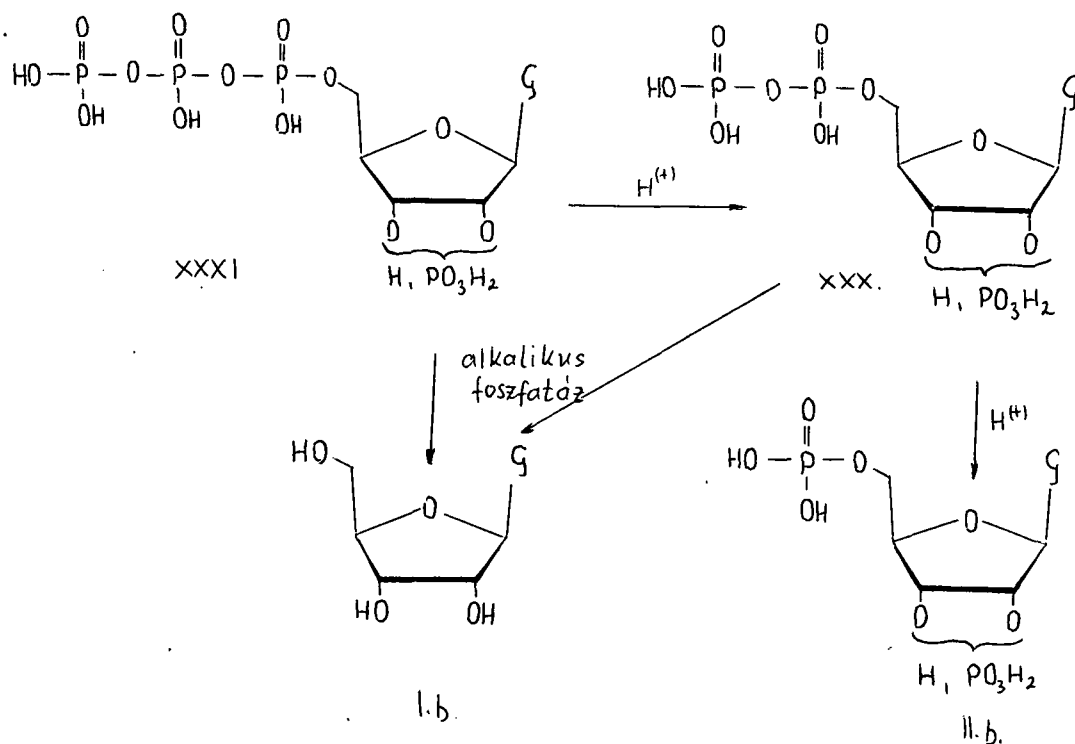
Az anyag rétegekromatográfiásan azonos volt a későbbiekben a Michel-

son-féle anioncserés módszerrel előállított /50/ guanozin 5'-pirofoszfát 2',3'-ciklofoszfát /XLVI/ lugos hidrolizisének termékével.

Az izomerekre való szétválasztást nem oldottam meg, így az izomerek azonosítását sem végeztem el. Az A szolvensben végzett rétegekromatográfia alapján valószínű, hogy a guanozin 5'-pirofoszfát 2'-monofoszfát a nagyobb R_f értékű, mivel ugyanebben a rendszerben a guanozin 2'/3'-monofoszfátok illetve a guanozin 2'/3',5'-difoszfátok közül a 2'- illetve a 2',5'-izomer rendelkezik nagyobb R_f értékkel.

Guanozin 5'-trifoszfát 2'/3'-monofoszfát /XXXI/

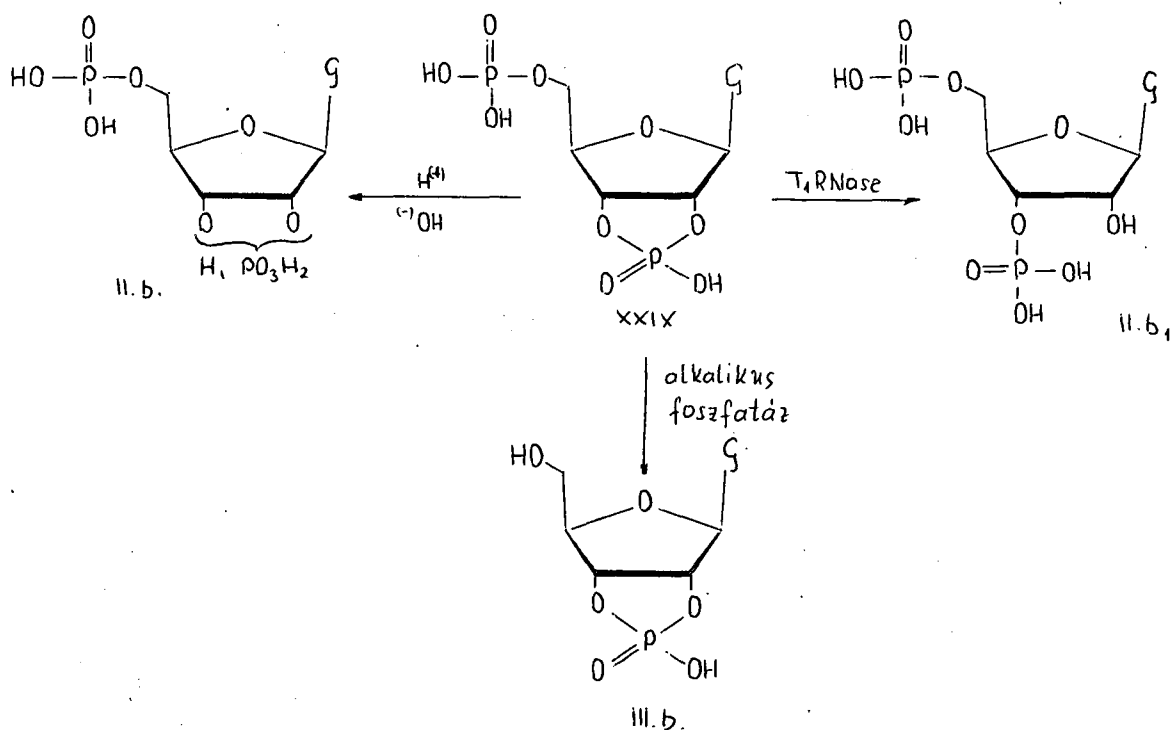
Az anyag szerkezetét lebontási termékeinek rétegekromatográfiás azonosítása révén igazoltam. Savas közegben guanozin 5'-pirofoszfát 2'/3'-monofoszfát /XXX/ keresztül guanozin 2'/3',5'-difoszfátra /IIb/ hidrolizált, lugos közegben stabil. Alkalikus foszfatáz guanozinra hidrolizálta:



Guanozin 5'-monofoszfát 2',3'-ciklofoszfát /XXIX/

Ultraibolya spektruma három pH értéken /1, 7, 11/ hasonló volt a guanozinéhoz. Foszforanalízis és a spektrumból számított molekulasúly alapján molekulánként két foszforatomot tartalmaz. Savas és lúgos hidrolízise egyaránt guanozin 2',3',5'-difoszfátot eredményezett, míg alkalikus foszfatáz guanozin 2',3'-ciklofoszfátra hidrolizálta.

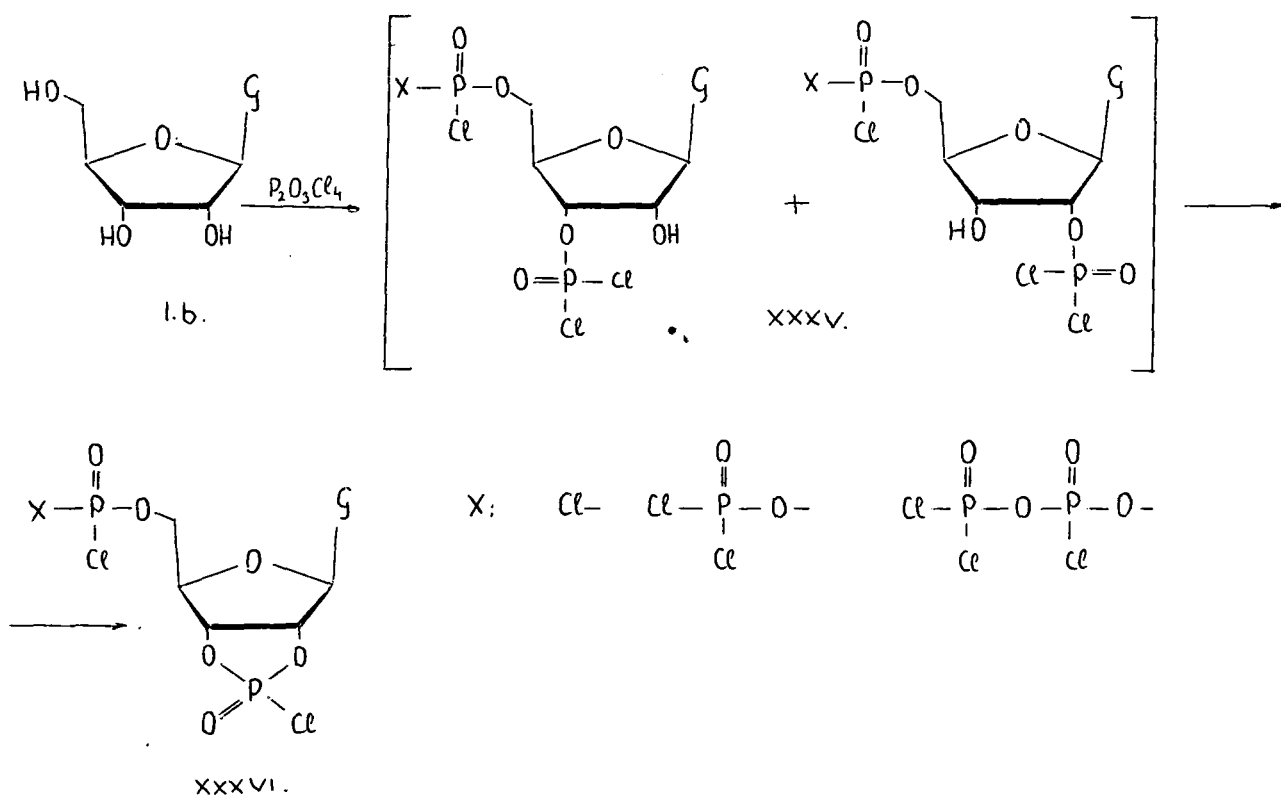
T_1 RNase hatására guanozin 3',5'-difoszfátra hidrolizált.



A foszforilezés primer termékének szerkezete

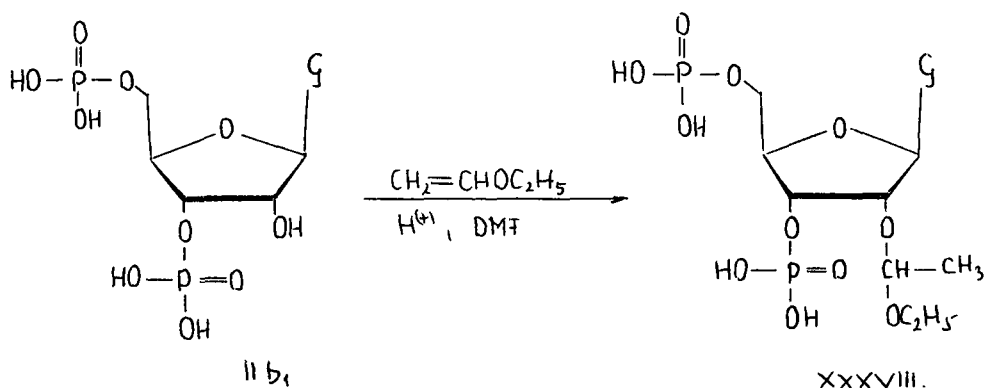
Guanozin és pirofoszforilklorid reakciója során keletkező primer termékelegyből savas hidrolízissel kapott vegyületek /IIb, XXIX, XXX, XXXI/ szerkezete alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a guanozin 5'-OH-ja mindig reagál, miközben a 2'- és 3'-OH közül csak az egyik észtereshető. A termékelegyből guanozin 2',3',5'-trifoszfátot nem

lehetett izolálni. Ugyanakkor az adenzin dibenzilfoszfokloridátos /5/ valamint trifenilfoszfitos foszforilezése /14/ után a termék-elegyből izoláltak adenzin 2',3',5'-trifoszfátot. Ilyen típusu származék valószínűleg azért nem nyerhető a pirofoszforilkloridos foszforilezéssel, mert a 2'- vagy 3'-OH-t csak átmenetileg észterezi diklórfoszforsav, s az így képződő XXXV származék 2'/3'/-foszfokloridát részlete a szomszédos hidroxilcsoporttal ciklusos klórfoszforsavdiészterré alakul. Az így keletkező XXXVI primer termék savas hidrolízise után főleg guanozin 2'/3',5'-difoszfát keletkezik. A melléktermékekben az 5'-OH-t pirofoszforsav vagy trifoszforsav észterezi, a 2'/3'/-OH-t pedig a ciklusképződés következtében csak ortofoszforsav. A fenti mechanizmust igazolja, az is, hogy a termékelegyből guanozin 5'-monofoszfát 2',3'-ciklofoszfát is izolálható, s ez valószínűleg a foszforilezés primer termékének tökéletlen hidrolíziséből származik.



A guanozin 3',5'-difoszfát 2'-OH-jának védeése[☒]

A guanozin 3',5'-difoszfát bisz-tri-n-butylammoniumsóját vizmentes dimetilformamidban oldva ekvimoláris mennyiségű p-toluolszulfonsav katalizátor jelenlétében nagy feleslegű etilviniléterrel reagáltattam szobahőmérsékleten.



A reakcióelegyben először a kívánt 2'-O-/1"-etoxietil/-guanozin 3',5'-difoszfát /XXXVIII/ mutatható ki rétegekromatográfiával. Jelentős mennyiségű kiindulási anyag is jelen volt még, mikor a reakció továbbhaladását észleltem. Két melléktermék keletkezett, melyek spektrális /ultraibolya/ tulajdonságokból ítélve a guaninyűrű szubsztitúciós származékai, s belőlük nem volt regenerálható a kiindulási IIb₁. A reakciót úgy vezettem, hogy ezek a melléktermékek a reakció leállításakor még csak kis mennyiségben legyenek jelen, mert a termékelegy oszlopkromatográfiás feldolgozása alkalmasabb IIb₁ és XXXVIII, mint XXXVIII és a melléktermékek elválasztására.

[☒] A szintézis további lépéseiben ugyanazt a módszert alkalmaztam mindkét izomerre. Ezért a dolgozat elméleti részében az egyszerűség kedvéért, csak a guanozin 3',5'-di-pirofoszfáthoz vezető lépéseket írom le.

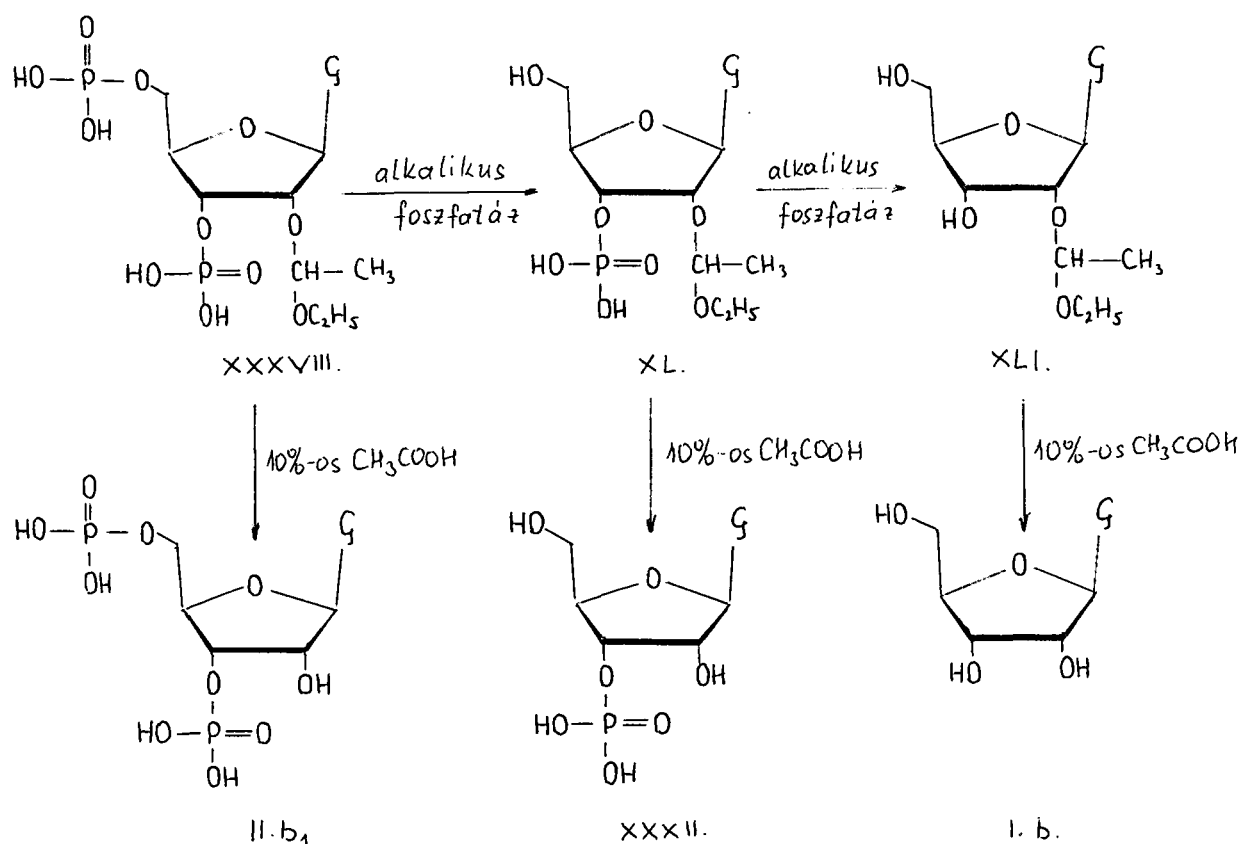
A kívánt átalakulás után a reakció leállítása a savkatalizátor semlegesítésével történt. Az etilviniléter felesleg eltávolítása után a termékelegyet vizes oldat formájában DEAE-cellulóz[‡]/HCO₃⁻/oszlopra öntöttem fel. Az anyagok eluálását - lineárgradiens elució technikát alkalmazva - trietilammoniumbikarbonát oldattal végeztem el. Először a két melléktermék eluálódott az oszlopról, majd a kívánt XXXVIII, végül a kiindulási IIb₁. A kívánt 2'-O-/1"-etoxietil/guanozin 3',5'-difoszfátot bisz-trietilammoniumsó formájában nyertem ki a megfelelő frakciók szárazra párlása, a maradék metanolos oldása, majd éteres kicsapása után.

A 2'-O-/1"-etoxietil/guanozin 3',5'-difoszfát vizsgálata

Az anyag ultraibolya spektruma jellegzetes guanozin spektrum. Lugos közegben stabil, de enyhén savas közegben /10 %-os CH₃COOH/ rövid idő alatt egy lépésben kvantitativ visszaalakítható IIb₁-é. Mivel a savas hidrolízis után IIb₂ nem keletkezett, az etoxietilezési reakció során izomerizáció nem játszódtott le.

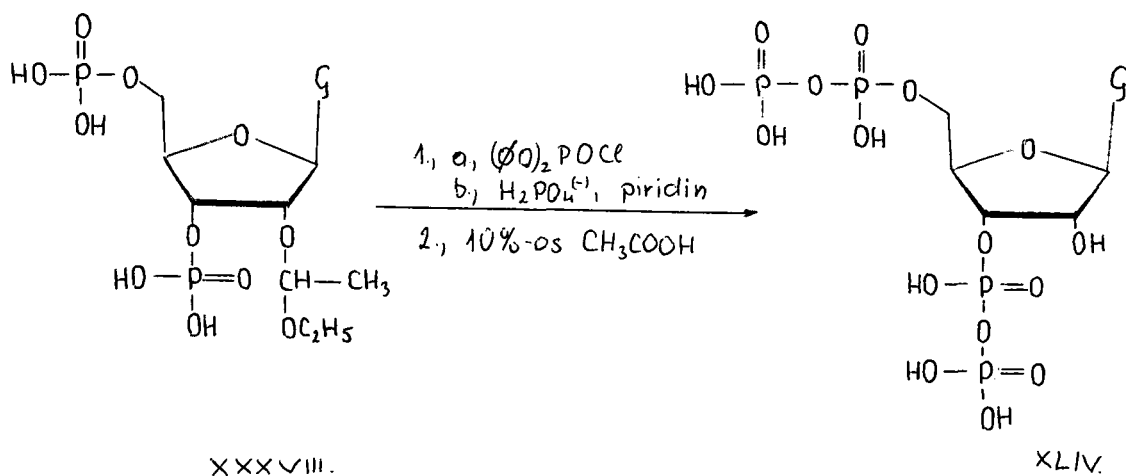
Alkalikus foszfatáz hatására két lépésben hidrolizál, s az első lépés jóval gyorsabban játszódik le, mint a második. Érdekes, hogy az első lépésben keletkező anyagból savas hidrolizissal csak guanozin 3'-monofoszfát /XXXII/ keletkezik, guanozin 5'-monofoszfát /XXXIV/ nem. Tehát alkalikus foszfatáz hatására először XXXVIII 5'-OH-ja válik szabaddá és 2'-O-/1"-etoxil/guanozin 3'-monofoszfát /XL/ keletkezik. Az alkalikus foszfatázos hidrolízis végterméke, a 2'-O-/1"-etoxietil/guanozin /XLI/ savas közegben guanozinra bomlik:

[‡] DEAE: dietilaminoetil



A guanozin 3',5'-di-pirofoszfát szintézise

A 2'-O-(2'-etoxietil)/guanozin 3',5'-difoszfátból kiindulva a Michelson-féle "anhidrid-kicserélődéses" módszert alkalmaztam arra, hogy egy molekulán belül egyidejűleg két pirofoszfát kötést építsek ki:



$\phi: -\text{C}_6\text{H}_5$

A szintézis elvégzését megnehezítette, hogy a difenilfoszforilezési reakció rétegekromatográfiás követése kontrolhiány és a reakciótermékek labilitása miatt nem lehetséges. Ezért izolálás nélkül, közvetlenül reagáltattam a termékelegyet ortofoszfáttal, majd ismét izolálás nélkül végeztem el a védőcsoport eltávolítását. Csak e három egymást követő lépés lezajlása után tudtam a szintézist rétegekromatográfiásan ellenőrizni. Az egyes lépések körülményeit külön-külön változtatva kiderült, hogy az első lépés, a difenilfoszforilezés körülményei befolyásolják döntően a szintézis sikerét. Sikerült e reakció optimális idejét megállapítani, melynél rövidebb reakció nem elég a pirofoszfát-triészter típusú csoportok kialakításához, hosszabb idő után pedig - valószínűleg a védőcsoport lassu eltávozásának következményeként - a reakció a guanozin 5'-pirofoszfát 2',3'-ciklofoszfát képződésének irányában halad. A reakció sikere függ a difenilklórfoszfát, a jelenlevő tri-n-oktilamin és XXXVIII arányától is. Az ortofoszfáttal végzett cserereakció illetve a védőcsoport eltávolításának ideje /nagy ortofoszfát felesleg ill. 10 %-os CH_3COOH alkalmazása esetén/ nem befolyásolja ilyen érzékenyen a szintézis végeredményét.

A 2'-O-/1"-etoxietil/guanozin 3',5'-difoszfátot tetra-tri -noktilammoniumsóvá alakítva és vizmentes dioxánban oldva tri-n-oktilamin jelenlétében difenilklórfoszfáttal reagáltattam szobahőmérsékleten. 1 óra reakció után a homogén oldathoz nagy feleslegű, piridinben oldott mono-tri-n-butilammoniumortofoszfátot adtam. A homogén oldatot 30 perc után bepároltam, s a maradékot 10 %-os CH_3COOH -ban oldva végeztem el a védőcsoport hidrolizisét. A hidrolizis annyi ideig tartott, míg hasonló körülmények között a hasonló XXXVIII származék 2'-OH-ja

szabaddá nem vált. A termékelegy komponenseit semlegesítés és éteres extrakció után BEAE-cellulóz HCO_3^- oszlopon, trietilammoniumbikarbonát lineár gradiens elucióval választottam el egymástól. Az elució sorrendje: egy nem azonosított anyag után a guanozin 5'-monofoszfát 2'.3'-ciklofoszfát /XXIX/, a guanozin 2'/3',5'-difoszfát /IIb/, a guanozin 5'-pirofoszfát 2'.3'-ciklofoszfát /XLIV/, a guanozin 5'-pirofoszfát 2'/3'/-monofoszfát ^{*} /XXX/, végül a guanozin 3',5'-di-pirofoszfát /XLIV/ eluálódott az oszlopról. A kívánt XLIV-et a rétegekromatográfiásan homogén frakciókból trietilammoniumsó formájában izoláltam, vagy nátriumsóvá alakítottam.

A guanozin 3',5'-di-pirofoszfát vizsgálata

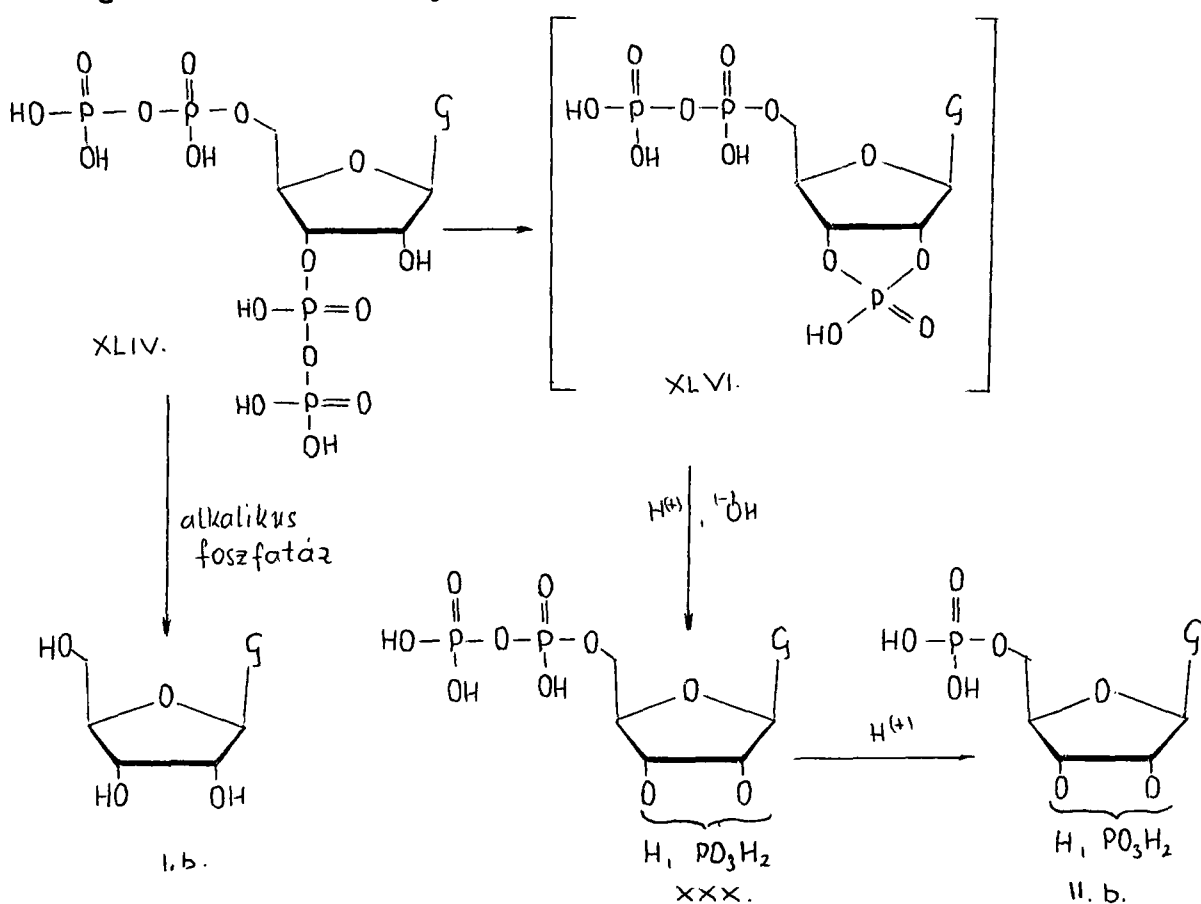
Ultraibolya spektruma jellegzetes guanozin spektrum. Foszforanalízis eredményei alapján a guanozin:foszfor arány közelítőleg 1:4 volt.

Alkalikus foszfatáz XLIV-et guanozinra /Ib/ hidrolizálta, s a hidrolízis után anorganikus foszfátként molekulánként négy foszforatom volt visszamérhető.

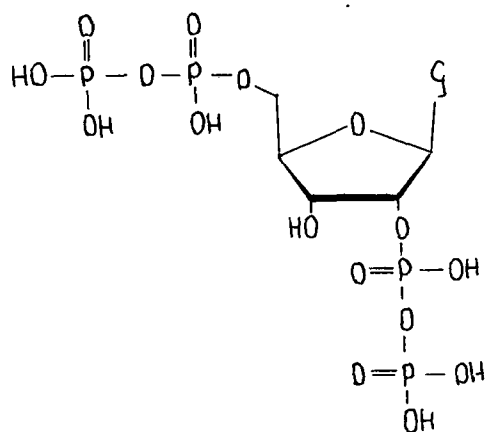
Lugos közegben XLIV guanozin 5'-pirofoszfát 2'.3'-ciklofoszfát /XLVI/ intermediéren keresztül guanozin 5'-pirofoszfát 2'/3'/-monofoszfátra /XXX/ hidrolizált, s a reakció során molekulánként egy foszforatom szabadult fel anorganikus foszfátként.

^{*}Valószínűleg XXX-al együtt guanozin 5'-monofoszfát 3'-pirofoszfát is eluálódik, mivel egy ilyen frakcióból kinyert anyag lugos kezelés után részben átalakult guanozin 2'/3',5'-difoszfáttá.

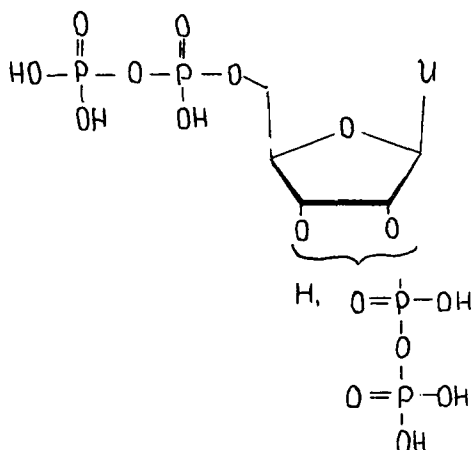
Savas közegben /0.5 N HCl/ szobahőmérsékleten guanozin 5'-pirofoszfát 2',3'-ciklofoszfáton /XLVI/ keresztül először guanozin 5'-pirofoszfát 2'/3'/-monofoszfátra /XXX/, majd guanozin 2'/3',5'-difoszfátra hidrolizált. 1 N HCl-ben 100°C-on, 8 percig végzett hidrolizis után - mikor a glikozidos - és pirofoszfát kötések hasadása következik be- /56/ - molekulánként 2,2 foszfor szabadult fel anorganikus foszfátként.



Az előzőekben leírt módszert alkalmazva, gyakorlatilag azonos módon elvégeztem a guanozin 2',5'-di-pirofoszfát /XLV/ és az uridin 2'/3',5'-di-pirofoszfát /LIII/ szintézisét is.



XLV.



LIII.

Ezek részletesebb szintézisét a kísérleti részben írtam le.

Kísérleti rész

Módszerek és anyagok

Vékonyrétegekromatográfia

Réteg: Cellulóz MN₃₀₀: Kieselgel HF₂₅₄ = 8 : 2

Szolvens: A : telített /NH₄/₂SO₄ : 0.1 M CH₃COONa : 0.05 M Na₂B₄O₇ :
izopropanol = 60:19:19:2 /5/

B : n-propanol : cc NH₄OH : H₂O = 11 : 7 : 2 /57/

Réteg: polietilénimin-cellulóz /polygram Cel 300 PEI/UV₂₅₄, Macherey-Nagel/

Szolvens: C : 1,5 M KH₂PO₄

D : 2 M NaCl

E : 0.1 M NaCl

F : 0.05 M NaCl

G : 0.5 M KH₂PO₄

Guanozin származékok R_f értékei

Vizsgált vegyület	A	B	C	D	E
guanozin /Ib/	0.26	0.63	-	-	0.65
guanozin 3',5'-difoszfát /IIb ₁ /	0.58	0.31	0.54	0.37	-
guanozin 2',5'-difoszfát /IIb ₂ /	0.66	0.31	0.54	0.37	-
guanozin 2'.3'-ciklofoszfát /IIIb/	0.28	0.62	-	-	0.28
guanozin 5'-monofoszfát 2'.3'-ciklofoszfát /XXIX/	0.45	0.39	0.57	-	-
guanozin 5'-pirofoszfát 2'/3'/-monofoszfát /XXX/	0.65 0.71	0.22	0.37	0.23	-
guanozin 5'-trifoszfát 2'/3'/-monofoszfát /XXXI/	-	-	0.24	0.14	-
guanozin 3'-monofoszfát /XXXII/	0.42	0.43	-	-	0.06
guanozin 2'-monofoszfát /XXXIII/	0.51	0.43	-	-	0.06
guanozin 5'-monofoszfát /XXXIV/	0.50	0.40	-	-	-
3'-O-/1"-etoxietil/ guanozin 2',5'-difoszfát /XXXVII/	0.27	0.45	0.69	0.45	-
2'-O-/1"-etoxietil/ guanozin 3',5'-difoszfát /XXXVIII/	0.40	0.45	0.69	0.45	-
guanozin 5'-difoszfát /XXXIX/	0.47	0.36	0.53	0.45	-
2'-O-/1"-etoxietil/guanozin 3'-monofoszfát /XL/	-	0.66	-	-	-
2'-O-/1"-etoxietil/ guanozin /XLI/	-	0.86	-	-	-
3'-O-/1"-etoxietil/ guanozin 2'-monofoszfát /XLII/	-	0.66	-	-	-
3'-O-/1"-etoxietil/ guanozin /XLIII/	-	0.86	-	-	-
guanozin 3',5'-di-pirofoszfát /XLIV/	-	-	0.22	0.14	-
guanozin 2',5'-di-pirofoszfát /XLV/	-	-	0.22	0.14	-
guanozin 5'-pirofoszfát 2'.3'-ciklofoszfát /XLVI/	0.55	0.35	0.51	0.32	-

Uridinszármazékok R_f értékei

Vizsgált vegyület	B	F	G
uridin /Id/	0.79	0.92	-
uridin 2'/3',5'/-difoszfát /IIId/	0.36	-	0.50
uridin 2'.3'-ciklofoszfát /IIId/	0.77	0.33	-
2'/3'/-O-/1"-etoxietil/ uridin /XLVII/	0.91	-	-
2'/3'/-O-/1"-etoxietil/uridin 3'/2'/-monofoszfát/XLVIII/	0.71	-	-
2'/3'/-O-/1"-etoxietil/uridin 3'/2',5'-difoszfát /XLIX/	0.48	-	-
uridin 2'/3'/-monofoszfát /L/	0.52	0.05	-
uridin 5'-pirofoszfát 2'.3'-ciklofoszfát /LI/	0.42	-	0.40
uridin 5'-pirofoszfát 2',/3'/-monofoszfát /LII/	0.28	-	0.23
uridin 2'/3',5'-di-pirofoszfát /LIII/	-	-	0.12

Ultraibolya spektrumok

Készülék: CARY-15

Az anyagok spektrumait 20-60 mg/l koncentrációju vizes oldatban vettem fel, guanozin származékok esetében pH=1,7 és 11 értékeken, míg az uridin származékoknál pH=7 és 11-en.

Összehasonlító oldat mindig a megfelelő vizes puffer volt.

Pufferek: pH=1 0.1 N HCl

pH=7 0.02 M Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4

pH=11 0.002 N NaOH

Az egyes anyagok spektrális jellemzőit előállításuk után irtam le.

A spektrumok jellemzésére használt adatok: λ_{max} , λ_{min} /nm/,

$$E_{\frac{250}{260}}, E_{\frac{280}{260}}, E_{\frac{290}{260}}$$

A spektrumokból a guanozin 5'-trifoszfát illetve az uridin 5'-monofoszfát moláris extinkciós koefficiensei alapján /53/ számítottam molekulasúlyokat.

Foszforanalízis

/H. Eibl és W.E. Lands módszere szerint /54/;

Enzimek

Alkalikus foszfátáz / calf intestine; SIGMA Chemical Company; illetve Escherichia coli, Worthington, 27 EU/mg/.

T_1 RNase /SIGMA/

Bepárlás: Rotapor készülékkel, 30-35°C-on, csökkentett nyomáson történt.

Száritás: a kiindulási guanozin és uridin száritása Fischer-pisztyolyban, toluol reflux hőmérsékletén, csökkentett nyomáson, P_2O_5

felett, a nukleotid jellegű termékek és a p-toluolszulfonsav szá-
ritása szobahőmérsékleten, csökkentett nyomáson P_2O_5 felett történt.

Guanozin /Reanal/

ultraibolya spektrumainak pH = 1 pH = 7 pH = 11
jellemzése

$\lambda_{\max}$ /nm/	256	252	258
$\lambda_{\min}$ /nm/	228	223	230
E $\frac{250}{260}$	0.97	1.18	0.91
E $\frac{280}{260}$	0.69	0.68	0.59
E $\frac{290}{260}$	0.50	0.29	0.12

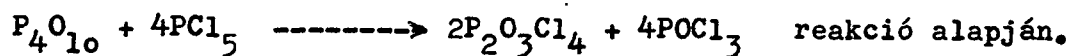
Uridin /Reanal/

ultraibolya spektruma pH = 7 pH = 11

$\lambda_{\max}$	262	261
$\lambda_{\min}$	230	242
E $\frac{250}{260}$	0.75	0.83
E $\frac{280}{260}$	0.36	0.29

Pirofoszforilklorid

Előállítás /58/ szerint az



568 g /2 mol/ P_4O_{10} , 700 g /8 mol/ PCl_3 és 800 ml CCl_4 elegyéhez Cl_2 -gázt vezettem reflux mellett. Mikor az elegy több gázt nem nyelt el, gázbevezetés nélkül 30 percig forraltam. Hidegen szűrtem, a szűrletből kb. $120^\circ C$ -ig ledesztilláltam a $POCl_3$ és CCl_4 -et, majd vákuumdesztillációval a pirofoszforilkloridot.

Főpárlatot 120-135°C között vettem. Termelés: 290 ml. A pirofoszforilkloridot légmentesen lezárt edényben, 0°C-on tároltam.

A mono-tri-n-butylammoniumpirofoszfát piridines oldatát 85 %-os H_3PO_4 és tri-n-butylamin ekvimoláris, dioxános oldatából készítettem többszöri bepárlás és piridinben való oldás után. Az etilvinilétert /Fluka/ használat előtt /59/ szerint tisztítottam. Az éter, dimetilformamid és piridin használat előtt P_2O_5 -ről, a dioxán fém Na melletti refluxolás után nátriumról desztillálva. A difenilklórfoszfát /Ega-Chemie/, tri-etilamin, tri-n-butylamin- tri-n-oktilamin /Fluka/, DEAE-cellulóz /Whatman DE11/ és a Dowex ioncserélő gyanták /Fluka/ kereskedelmi anyagok. A guanozin 2'.3'-ciklofoszfát és az uridin 2'.3'-ciklofoszfát /19/ szerint készült kromatográfiás kontroll céljából.

Guanozin foszforilezése

14 ml /100 mM/ -12°C-ra hűtött $\text{P}_2\text{O}_3\text{Cl}_4$ -hoz 2,83 g /10 mM/ frissen szárított guanozint adtam. A reakcióelegyet jeges-vizes hűtés mellett 3 óráig, majd szobahőmérsékleten 1 óráig kevertem, 8 ml abszolút éterrel felkeverve 300 ml absz. éterbe öntöttem. A kivált ragacsos anyagot porrá dörzsöltem, szűrtem, 300 ml jeges vízzel hidrolizáltam 30 percig /pH < 1/, majd 90 ml 2 N NaOH-dal semlegesítettem /pH = 7,5/. Az oldatot desztillált vízzel 1800 ml-re hígítva 3x52 cm-es Dowex 1x8 / Cl^- / 200/400 mesh gyantából készült oszlopon folyattam át;

560 ml/óra sebességgel. Ezután a gyantát 0.003 N HCl-dal mosva / ~ 12 liter/ pH=2.6-ra savanyítottam le. Az eluciót lépcsőzetesen növekvő NaCl koncentrációju NaCl-HCl pufferekkel végeztem pH=2.6-on. 75-ml-es frakciókat vettem, ezeket azonnal 1 N NaOH-dal semlegesítettem. Az eluciót $\lambda = 260$ nm-en végzett extinkcióméréssel és vékonyrétegkromatográfiával követtem. Az oszlopra 120 000 $\text{TOD}_{260}^{\text{E}}$ anyagmennyiséget vittem fel, az elució során összesen 105 000 TOD_{260} anyagmennyiség volt visszanyerhető az oszlopról az alkalmazott eluálószerekkel. Az utóbbi százalékában adtam meg táblázatosan az egyes pufferek által leszorított anyagmennyiségeket:

Eluáló puffer:	%	anyag
1/ 0.003 N HCl	2.2	Ib
2/ 0.003 N HCl + 0.1 M NaCl	1.2	XXXII, XXXIII, XXXIV
3/ 0.003 N HCl + 0.2 M NaCl	73.0	I I b ₁ , I I b ₂
4/ 0.003 N HCl + 0.5 M NaCl	23.0	XXIX, XXX, XXXI

A 3. puffer hatására eluált a kívánt guanozin 2'/3'/,5'-difoszfát. Az elució során részlegesen szétvált izomerjeire, 28 %-a kromatográfiásan homogén 2',5', míg 51 %-a 3',5'-izomer volt.

A 4. puffer hatására először XXIX és XXX, majd XXXI eluált. Mivel előzetesen nem törekedtem XXIX és XXX egymástól való elválasztására, ezeket csak néhány kromatográfiásan homogén frakcióból izoláltam.

$$\text{E}^{\text{TOD}}_{260} = E_{260} \times \text{térfogat /ml/}$$

Guanozin 2',5'-difoszfát /IIb₂/

A megfelelő frakciók összeöntése után kapott, semlegesített oldatot kétszeresére hígítva 1,4x14 cm-es Dowex 1x8 /Cl⁻/ 200/400 mesh oszlopon folytattam át, majd vizes mosás után 1 M LiCl oldattal /50 ml/ eluáltam. Az oldatot szárazra pároltam, a maradékot 100 ml 1:1 metanol:aceton eleggyel fél óráig állni hagytam. Szűrtem, kétszer 50 ml metanol-aceton eleggyel Cl⁻ mentesre mostam. Szárítás után 860 mg fehér anyagot kaptam. Termelés a kiindulási guanozinra számítva 15,5 %.

Guanozin 2'/3',5'-difoszfát /IIb₁ és IIb₂/

Hasonló módon, mint a IIb₂ esetében, 634 mg fehér anyagot kaptam, mely vékonyrétegekromatográfia alapján kb. 1:1 arányban tartalmazta a két izomert. Termelés 11,5 %.

Guanozin 3',5'-difoszfát /IIb₂/

Az előzőekhez hasonlóan 1665 mg kromatográfiásan homogén, kloridmentes anyagot kaptam. Termelés:31 %.

Spektrális tulajdonságok

Az izomerek ultraibolya spektrumai gyakorlatilag azonosak, így csak az izomer-keverék spektrumának adatait adtam meg, valamint a guanozin 5'-trifoszfát moláris extinkciós koefficiensei alapján számított molekulasúlyokat:

	pH = 1	pH = 7	pH = 11
$\lambda_{\max}$ /nm/	256	253	257
$\lambda_{\min}$ /nm/	228	253	229
E $\frac{250}{260}$	0.91	1.16	0.93
E $\frac{280}{260}$	0.68	0.67	0.61
E $\frac{290}{260}$	0.50	0.27	0.12
M _{IIB₁}	550	536	532
M _{IIB₁} és IIB ₂	545	555	548
M _{IIB₂}	554	565	545

Foszforanalízis

IIB₁-re $C_{10}H_{13}Li_4N_5O_{11}P_2 \cdot 4H_2O$ /M=539/ alapján számított
P%=11,50, talált=11.47

IIB₂-re $C_{10}H_{13}Li_4N_5O_{11}P_2 \cdot 5H_2O$ /M=557/ alapján számított
P%=11.13, talált=11.05

Savas kezelés:

IIB₁ illetve IIB₂ 1-1 mg-ját 0.1 ml HCl-ban oldottam, szobahőmérsékleten 1 napig állni hagytam. Vékonyrétegkromatográfia szerint /A szolvens/ mindkét oldat hozzávetőlegesen azonos arányban tartalmazta a két izomert.

Hidrolízis alkalikus foszfáttal:

A következő oldatokat készítettem el.

a/ IIB₁ 5.4 illetve IIB₂ 5.6 mg-ját 1 ml 0.01 M Na₂CO₃-NaHCO₃ pufferban /pH=10,4/ oldottam;

b/ 10 mg alkalikus foszfátot /calf intestine/ 1 ml ugyanilyen pufferban oldottam.

A két oldatból 0.1-0.1 ml-t összemérve az elegyet 37°C-on tartottam. 1 perc után rétegekromatográfia szerint /A szolvens/ IIb₁-ből guanozin 3'-monofoszfát, míg IIb₂-ből guanozin 2'-monofoszfát keletkezett guanozin 5'-monofoszfát és guanozin mellett. 10 perc után kromatográfiásan csak guanozin volt kimutatható. Ugyanilyen körülmények közötti, 1 órás hidrolízis után az oldatokhoz 0.2 ml 10 %-os triklórecetsavat adtam, majd az opálos oldatot 30 percig 5000/perc fordulattal centrifugáltam. A felüluszó 40 µl-jéből anorganikus foszformeghatározást végeztem. IIb₁ számított foszfortartalmának 97 %-át, míg IIb₂ 95 %-át mértem vissza anorganikus foszforként.

Guanozin 5'-monofoszfát 2',3'-ciklofoszfát /XXIX/

A difoszfátok után a 4. eluáló puffer hatására XXIX és XXX egymástól részlegesen elkülönülve eluált, s az izolálást csak három, rétegekromatográfiásan homogén frakcióból végeztem el.

A 220 ml térfogatu oldatot /OD₂₆₀ = 1500/ kétszeresére hígítva és semlegesítve 0.9x8 cm-es Dowex 1x8 /CL⁻/ 200/400 mesh gyantából készült oszlopon folyattam át, majd vizes mosás után XXIX-et 1 M LiCl oldattal /30 ml/ eluáltam. Szárazra párlás után 50 ml metanol-aceton /1:6/ eleggyel állni hagytam. 30 percig, majd a kapott csapadékot szűrtem, s metanol-aceton eleggyel kloridmentesre mostam. 52 mg fehér anyagot kaptam szárítás után.

Foszforanalízis

$C_{10}H_{12}LiN_3O_{10}P_2 \cdot 3H_2O$ -ra /M=500/ számított P%=12.40, talált=12.52.

Ultraibolya spektrum:	pH = 1	pH = 7	pH = 11
max	256	252	258
min	228	222	230
E $\frac{250}{260}$	0.91	1.17	0.90
E $\frac{280}{260}$	0.68	0.68	0.60
E $\frac{290}{260}$	0.50	0.29	0.12
M	517	505	503

Savas és lugos hidrolizis:

1 mg anyagot 0,1 ml 1 N HCl-ban oldottam. Az anyag szobahőmérsékleten, 30 perc után vékonyrétegekromatográfia szerint /A,B/ teljesen guanozin 2'/3',5'-difoszfátra hidrolizált. 0,1 N NaOH-ban ugyanilyen körülmények között 5 óra után szintén teljes átalakulás történt.

Hidrolizis T_1 RNase-al:

2 mg anyagot oldottam 0,2 ml 0,2 M Tris-HCl pufferben /pH=7,5/ s hozzáadtam 20 μ l T_1 RNase oldatot / 0,5 E U/. 37°C-on, néhány óra után rétegekromatográfiásan /A/ guanozin 3',5'-difoszfát volt kimutatható, 1 nap után az átalakulás csaknem teljes.

Hidrolizis alkalikus foszfatazzal:

1 mg anyagot és 1 mg alkalikus foszfátot /calf intestine/ 0,1 ml pH=10,4-es pufferben oldottam. 37°C-on, 1 óra után XXIX teljesen guanozin 2',3'-ciklofoszfátra hidrolizált. /IIIb/.

Guanozin 5'-pirofoszfát 2'/3'/monofoszfát /XXX/

A 4. eluáló puffer hatására XXIX után XXX eluált az oszlopról. Néhány rétegekromatográfiásan homogén frakció összeöntésével kaptam 210 ml oldatot semlegesítés után /OD₂₆₀ = 2000/ 20 ml-re pároltam be, majd 100 ml metanolt adtam hozzá. Lassu csapadék-képződés indult meg. 5 óra állás után szűrtem. 50 ml 5 : 1 metanol-

-viz eleggyel, majd 25 ml metanollal mostam. Száritás után 95 mg fehér anyagot kaptam.

Ultraibolya spektrum:	pH = 1	pH = 7	pH = 11
$\lambda_{\max}$	256	253	256
$\lambda_{\min}$	228	222	229
E 250 260	0.91	1.14	0.96
E 280 260	0.68	0.66	0.63
E 290 260	0.50	0.29	0.17
M	815	801 6	790

Foszforanalízis: $C_{10}H_{13}Na_5N_5O_{14}P_3 \cdot 9 H_2O$ -ra /M=797/ számított
P%=11.69, talált=11.60

Savas, lugos kezelés:

2 mg anyagot 0.2 ml 1 N HCl-ban 2 napig állni hagytam szobahőmérsékleten. Ezalatt kvantitativ guanozin 2'/3', 5'-difoszfáttá alakult /A,B,C szolvens/. Lugos közegben /0.1 N NaOH/ az anyag stabil volt.

Hidrolízis alkalikus foszfatázzal:

1 mg anyagot feloldottam 0.1 ml Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ /pH=10.4/ pufferben, majd 0.1 mg 0.1 ml ilyen pufferban oldott alkalikus foszfatázt /calf intestine/ adtam hozzá. 37°C-on, 1 óra után egyéb termékek mellett guanozin 5'-difoszfát is észlelhető volt kromatográfiásan /A,B szolvens/, 4 óra után pedig kvantitativ guanozinra hidrolizált.

Guanozin 5'-trifoszfát 2',3'-monofoszfát /XXXI/

XXIX és XXX után XXXI elkülönülve eluált az oszlopról. A 300 ml térfogatu /OD₂₆₀ = 1200/ oldatot semlegesítés után kétszeresére higitva 1x10 cm-es Dowex 1x8 /Cl⁻/ 200/400 mesh oszlopon folytattam át, és vizes mosás után 1 M LiCl oldattal /40 ml/ eluáltam. Az oldatot szárazra pároltam, s 50 ml metanol-aceton eleggyel /1:1/ felszuszpendálva szűrtem. 50 ml metanol-aceton eleggyel kloridmentesre mostam. Szárítás után 66 mg anyagot kaptam.

Ennél az anyagnál csak kromatográfiás és lebontási kísérleteket végeztem. Vékonyrétegekromatográfia szerint /C,D/ az anyag homogén. 1 mg anyagot 0.1 ml 1 N HCl-ban oldva, 4 óra után főleg XXX volt kromatográfiásan kimutatható kevés kiindulási XXXI és IIb mellett /C szolvens/. 1 nap után gyakorlatilag teljesen IIb-vé alakult. 10 mg/ml koncentrációju lugos oldatban /0.1 N NaOH/ 1 nap után az anyag változatlan maradt. Alkalikus foszfataz /calf intestine/ hatására - 1 mg anyag + 1 mg enzim 0.1 ml 0.01 M Na₂CO₃ - NaHCO₃ pufferben oldva /pH=10,4/, 37°C-on tartva - 3 óra alatt kvantitativ guanozinná alakult át /E szolvens/.

Guanozin 5'-pirofoszfát 2',3'-ciklofoszfát /XLVI/

55 mg /0.1 mM/ guanozin 2',3',5'-difoszfát Li-sót 2 ml vízben oldva 1x5 cm-es Dowex 50x8 /H⁺/ 50/100 mesh oszlopon folytattam át, majd a vizes mosás után kapott oldatot szárazra pároltam. A kapott szabad savat 5 ml metanolban szuszpendáltam, hozzáadtam 0.17 ml tri-n-oktilamint /0.4 mM/, s néhány perc melegítés után tiszta oldatot kaptam. Szárazra párlás, alkoholban

oldás, bepárlás után az olajos maradékhoz 0.6 ml abszolút di-oxánt, 80 μ l difenilklórfoszfátot /0.4 mM/, 90 μ l tri-n-oktil-amint /0.2 mM/ adtam. Az opálos oldat 0.2 ml dimetilformamid hozzáadására kitisztult. 3 óra rázás után bepároltam az ele-
gyet, a maradékhoz 0.8 ml 0.5 mólos, piridinben oldott mono-
-tri-n-butylammoniumortofoszfátot adtam. A sárgás oldatot 1
óra állás után bepároltam, 10 ml vízben szuszpendálva és
 ccNH_4OH -dal semlegesítve heterogén elegyet kaptam, amelyből a
szabad aminokat 2x5 ml éterrel való extrahálással távolítottam
el. A homogén, vizes oldatot 1.4x30 cm-es DEAE-cellulóz / HCO_3^- /
oszlopra öntöttem fel. Az elució 250 ml víz- 250 ml 0.5 M
 $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{H}_2\text{CO}_3$ lineár gradienssel történt. 20 percenként 10 ml-es
frakciókat vettem, a 30-38. frakciót összeöntöttem, szárazra
párlás, 1 ml metanolban oldás és 20 ml éterrel való kicsapás,
szűrés és szárítás után 62 mg anyagot kaptam trietilammonium-
só formájában.

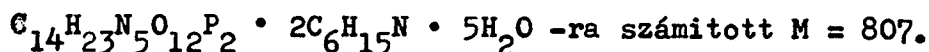
1 mg anyag 0.1 ml 0.1 M HCl-ban oldva szobahőmérsékleten
1 óra után teljesen XXX-á alakult, 1 nap után kb. fele arányban
tartalmazott XXX-at és IIb-t az oldat.

1 mg anyag 0.1 ml 0.1 N NaOH-ban oldva szobahőmérsékleten
1 óra alatt kb. 20 %-ban alakult át XXX-á. 1 nap után az át-
alakulás teljes volt.

1 mg XLVI-ot és 0.5 mg alkalikus foszfátot /calf intestine/
0.1 ml pH=10.4-es pufferben /0.01 M Na_2CO_3 - NaHCO_3 / oldottam.
37°C-on, 3 óra állás után teljesen guanozin 2'.3'-ciklofoszfát-
ra bomlott.

2'-O-(1"-etoxietil)/ guanozin 3',5'-difoszfát /XXXVIII/

508 mg /0.94 mM/ guanozin 3',5'-difoszfát Li-sót 10 ml 20 %-os piridinben oldottam, majd 1.5x1.5 cm-es Dowex 50x8 /piridinium/ oszlopra öntöttem, az oszlopot 150 ml 20 %-os piridinnel mostam. Hozzáadva 0.475 ml /2 mM/ tri-n-butylamiont és 150 ml alkoholt, a homogén oldatot bepároltam, majd alkohollal és dioxánnal egyszer-egyszer bepároltam. A kapott olajos anyagot 15 ml vizmentes dimetilformamidban oldva 6 ml /63 mM/ etilvinilétert és 190 mg p-toluolszulfonsavat adtam. Szobahőmérsékleten, 14 órai állás után 0.5 ml tri-n-butylaminnal állítottam le a reakciót. A homogén, halványsárga elegyből az etilviniléter felesleget eltávolítottam, majd az elegyet vízzel 50 ml-re hígítottam. Az oldatot 2,4x70 cm-es DEAE-cellulóz/ HCO_3^- / oszlopra öntöttem s az oszlopot vízzel mostam. Az eluciót 2000 ml víz 2000 ml 0.4 M $\text{Et}_3\text{N} \cdot \text{H}_3\text{CO}_3$ lineár gradienssel végeztem, 20 ml-es frakciókat vettem 15 percenként. A XXXVIII-at tartalmazó 127-142 frakciókat $/E_{260} > 8/$ egyesítve szárazra pároltam, a maradékot 2 ml alkoholban oldottam, s XXXVIII-at 30 ml-éterrel csaptam ki. Szűrés, szárítás után 221 mg fehér, higroszkópos anyagot kaptam bisz-triethylammoniumsó formájában. Termelés 29 %, az anyag rétegekromatográfiásan /A, B/ homogén.



Ultraibolya spektrumok	pH = 1	pH = 7	pH = 11
$\lambda_{\max}$ /nm/	258	254	258
$\lambda_{\min}$ /nm/	229	225	230
E $\frac{250}{260}$	0.89	1.10	0.91
E $\frac{280}{260}$	0.66	0.66	0.61
E $\frac{290}{260}$	0.50	0.32	0.19
	12 400	13 700	11 900
M	811	826	787

Savas hidrolizis

1 mg XXXVIII-at 0.1 ml 10 %-os CH_3COOH -ban oldottam, s ebből 20 μl -es mintákat időnként NH_4OH -dal semlegesítettem és ezeket kromatografáltam. 5 perc után kb. fele arányban alakult át Ib_1 -é. 30 perc után a hidrolizis teljes, 1 óra után is csak Ib_1 volt kimutatható, míg az izomer Ib_2 nem.

Lugos kezelés

1 mg XXXVIII-at 0.1 ml 0.1 N NaOH -ban oldottam. Szobahőmérsékleten, 20 óra után az anyag változatlan maradt.

Hidrolizis alkalikus foszfátazzal:

1 mg XXXVIII-et 50 μl 0.01 M Na_2CO_3 - NaHCO_3 pufferben /pH=10.4/ oldottam, s hozzáadtam 1 mg, 50 μl ugyanilyen pufferben oldott alkalikus foszfátzt /calf intestine/. A hidrolizist rétegekromatográfiásan követve /B szolvens/ megállapítható, hogy 1 óra után XXXVIII teljesen elbomlott, s főleg XI-é, s ez kismértékben XLI-é alakult. 24 óra után csak XLI volt jelen. 1 óra után 20 μl -es mintához 0.1 ml 10 %-os CH_3COOH -t adtam, s 30 perc után

kromatografálva XL $\rightarrow$ XXXII teljes átalakulást észleltem /A szolvens/, míg a 24 órás mintából ugyanilyen körülmények között csak Ib volt kimutatható /A,B szolvens/.

3'-O-(1"-etoxietil) guanozin 2',5'-difoszfát /XXXVII/

382 mg /0.69 mM/ guanozin 2',5'-difoszfát Li-sót 7 ml 20 %-os piridinben oldva 22 cm-es Dowex 50x8 /piridinium/ oszlopra öntöttem, majd az oszlopot 100 ml 20 %-os piridinnel mostam. Az oldathoz 0.35 ml /1.5 mM/ tri-n-butilamint és 100 ml alkoholt adva bepároltam, majd alkohollal és dioxánnal bepároltam. A maradékot 11 ml dimetilformamidban oldva 4.5 ml /47 mM/etilviniléterrel reagáltattam 137 mg p-toluolszulfonsav jelenlétében, szobahőmérsékleten. 14 óra múlva a homogén, halványvörös oldathoz 0.4 ml tri-n-butilamint adtam és az etilviniléter felesleget bepároltam. Vizzel 50 ml-re hígítva 2.4x55 cm-es DEAE-cellulóz /HCO₃⁻/ oszlopra öntöttem. Vizes mosás után az eluciót 1500 ml víz- 1500 ml 0.4 M Et₃N·H₂CO₃ lineár gradienssel végeztem, 16 ml-es frakciókat szedtem 15 percenként.

A XXXVII-et kromatográfiásan homogénen tartalmazó 120-142. frakciókat /E₂₆₀ > 7/ összeöntve szárazra pároltam. A maradékot 2 ml alkoholban oldottam és 40 ml éterrel fehér csapadékot választottam le. Szűrés, szárítás után 265 mg XXXVII-et kaptam bisz-trietil-ammoniumsó formában. Termelés: 47.4 %.

Ultraibolya spektruma gyakorlatilag azonos a XXXVIII-ével. A spektrumból számított molekulaszúlyok átlaga 815.

XXXVII savas és ezimatus hidrolízisét ugyanolyan körülmények között végeztem el, mint a XXXVIII-ét, s a két anyag

hidrolitikus tulajdonságai megegyeznek.

Guanozin 3',5'-di-pirofoszfát /XLIV és XLV/

15 mg /TOD₂₆₀=270, 20 µM/ XXXVII illetve XXXVIII-at trisz-trietilammoniumsó formában 5 ml metanolban oldottam, és 30 µl /70 µM/ tri-n-oktilamint hozzáadva bepároltam, majd vízmentes dioxánt, 15 µl difenilklórfoszfátot /72 µM/ és 20 µl tri-n-oktilamint /47 µM/ adtam, a kapott homogén oldatot 1 óráig szobahőmérsékleten, zárt edényben állni hagytam. 1 óra után hozzáadtam 0.4 ml 0.5 M mono-tri-n-butilammoniumortofoszfát piridines oldatát. 30 perc után az elegyet bepároltam, a maradékhoz 0.8 ml 10 %-os CH₃COOH-t adtam. 30 perc rázogatós után NH₄OH-dal semlegesítettem, s 10 ml vizes oldatból a tri-n-oktilamint 2x5 ml éterrel extraháltam. A vizes oldatot 1.1x17 cm-es DEAE-cellulóz /HCO₃⁻/ oszlopra öntöttem. Vizes mosás után az eluciót 150 ml - viz - 150 ml 0.5 M trietilammoniumbikarbonát lineár gradienssel végeztem 21 ml/óra átfolyási sebességgel, 20 percenként frakciót váltva.

Guanozin 3',5'-di-pirofoszfát /XLIV/:

A megfelelő frakciók egyesítése után az oldat TOD₂₆₀=47 /17.4 %-os termelés/ XLIV-et tartalmazott. Szárazra párlás után a maradékot 1 ml metanolban oldottam és 10 ml abszolút éterrel fehér csapadékot választottam le. Centrifugálás és szárítás után 2.4 mg fehér, higroszkópos anyagot kaptam. Termelés: 11.1 %.

Guanozin 2',5'-di-pirofoszfát /XLV/:

A rétegekromatográfiásan homogén frakciók egyesítése után kapott oldat TOD₂₆₀=128 /48 %-os termelés/ XLV-öt tartalmazott. A fentiek-



hez hasonlóan 8,6 mg fehér, higroszkópos anyagot kaptam. Termelés 39,5 %. Az anyag egy részletét /3 mg/ 1 ml vízben oldottam, és 0,1 N NaOH-dal a pH-t 8-ra állítottam. Az oldathoz 20 ml metanolban oldott 10 mg NaJ-ot adtam. Centrifugálás, metanolos mosás és szárítás után 2,5 mg, nem higroszkópos Na-sót kaptam. A nátrium sóvá való alakítás során az anyag rétegekromatográfián nem változott.

Spektrális tulajdonságok	pH = 1	pH = 7	pH = 11
$\lambda_{\max}$ /nm/	257	252	256
$\lambda_{\min}$ /nm/	228	222	229
E $\frac{250}{260}$	0.91	1.13	0.97
E $\frac{280}{260}$	0.68	0.65	0.61
E $\frac{290}{260}$	0.51	0.28	0.16
	12 400	13 700	11 900
M_{XLIV}	1081	1074	1070
M_{XLV}	1098	1090	1086

Foszforanalízis

XLIV-re $C_{10}H_{17}N_5O_{17}P_4 \cdot 4C_6H_{15}N \cdot 4H_2O$ alapján számolt $M=1079$,
 $P\%=11,50$ Talált $P\%=11,0$. Guanin: $P=1:3,83$

XLV-re $C_{10}H_{17}N_5O_{17}P_4 \cdot 4C_6H_{15}N \cdot 5H_2O$ alapján számolt $M=1097$,
 $P\%=11,30$. Talált $P\%=11,10$, Guanin: $P=1:3,93$

Hidrolitikus tulajdonságok vizsgálata:

a/ sav-labilitás

XLIV illetve XLV. 0,5 N HCl-ben szobahőmérsékleten csaknem tel-

jesenXXX-ra hidrolizált, s kevés IIb is kimutatható az elegyben /rétegekromatográfia C,D rendszerben/. 24 óra után a XXX -----> IIb átalakulás it teljes.

1 N HCl-ben, 100°C-on, 8 percig tartó hidrolizis után XLIV-ből anorganikus foszforként 6.32 % foszfortartalom volt visszamérhető /2,2 foszforatom molekulánként/.

b/ luglabilitás

0.25 N NaOH-ban 25°C-on, 15 óra után rétegekromatográfia /C,B/ alapján kvantitativé XXX-ra hidrolizált. A hidrolizis után anorganikus foszforként 2.8 %-ot mértem vissza /1 foszforatom molekulánként/.

c/ hidrolizis alkalikus foszfatázzal

1 µM XLIV-hez 0.1 Ml 0.2 M trisz-HCl- /pH=8.9/ pufferben oldott 1 EU alkalikus foszfatázt /Escherichia coli/ adtam. 37°C-on, 4 óra után XLIV kvantitativé Ib-re hidrolizált. /Rétegekromatográfia E rendszerben/. A hidrolizis után az oldathoz 0.2 ml 10 %-os triklór-ecetsavat adtam és 30 percig 5000/perc fordulatszámmal centrifugáltam. A tiszta felüluszból mért foszfortartalom 12.07 % volt /4,2 foszforatom molekulánként/.

Uridin 2'/3'/,5'-difoszfát /IIId/

14 ml /100 mM/ $P_2O_3Cl_4$ -hez - 10°C-on 2.44 g /10 mM/ szárított uridint adtam, majd +2°C-on 8 óráig kevertem a reakcióelegyet. A homogén elegyet ezután 400 ml abszolút éterbe öntöttem, a kivált anyagot porrádörzsöltem. Szűrés, éteres mosás és étermen-tesítés után a fehér port 250 ml jeges vízzel hidrolizáltam.

30 percig /pH < 1/, majd 2N LiOH-dal pH > 12-re lugosítottam az oldatot. Egy éjjel állni hagytam, a kivált Li_3PO_4 -et szűrtem, a szűrletet Dowex 50x8 / H^+ / gyantával semlegesítettem. Az oldatot / $\text{TOD}_{260}=81\ 000$ / 2.6 x 21 cm-es Dowex 1x8 / HCOO^- / 200/400 mesh gyantából készült oszlopra öntöttem fel. Vizes mosás után az eluciót pH=4.3-on végeztem:

Eluáló oldat	TOD_{260}
vizes mosás	1360
1/ 0.01 N HCOOH + 0.05 M HCOONH_4	16900
2/ 0.01 N HCOOH + 0.1 M HCOONH_4	600
3/ 0.01 N HCOOH + 0.4 M HCOONH_4	51000

Az elució során 100 ml-es frakciókat szedtem. A 3. eluáló pufferre lejtött frakciókból / $E_{260} > 10$ / összegyűjtött 1500 ml oldatot / $\text{TOD}_{260}=43\ 000$ / NH_4OH -dal pH=8-ra lugosítottam, majd 100 ml-re bepároltam, 1 liter etanolt adtam hozzá. A kivált fehér csapadékot szűrtem, viz-etanol eleggyel /1:10/ majd etanollal mostam. Szárítás után 1.82 g kromatográfiásan homogén /B,G szolvens/ uridin 2'/3',5'-difoszfátot kaptam ammoniumsó formájában. Termelés: 36 %.

$\text{C}_9\text{H}_{26}\text{N}_6\text{P}_2\text{O}_{12} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -ra számított $M=526$ és $P\%=11.78$,
talált $P\%=11.65$

Ultraibolya spektrum	pH = 7	pH = 11
$\lambda_{\max}$ /nm/	262	262
$\lambda_{\min}$ /nm/	230	237
$E_{\frac{250}{260}}$	0.74	0.78
$E_{\frac{280}{260}}$	0.35	0.30
E_{UTP}	10 000	8100
M	542	510

Uridin 5'-pirofoszfát 2',3'-ciklofoszfát /LI/ és uridin 5'-piro-
foszfát 2',/3'/-monofoszfát /LII/

LI előállítása a guanozin 5'-pirofoszfát 2',3'-ciklofoszfátához hasonló módon történt. LI egy részéből lugos hidrolizissel állítottam elő LII-t. Ezeket az anyagokat az uridin 2'/3',5'-di-pirofoszfát /LII/ hidrolitikus tulajdonságainak vizsgálatánál kromatográfiás kontrollvegyületekként használtam.

2'/3'/-O-/1"-etoxietil/ uridin 3'/2',5'-difoszfát /XLIX/

178 mg uridin 2'/3',5'-difoszfát ammoniumsót /0.34 mM/ 2 ml vízben oldottam, és 1x6 cm-es Dowex 50x8 /H⁺/ oszlopon folyattam át. A vizes mosás után kapott 40 ml oldatot szárazra pároltam. A maradékhoz 5 ml alkoholt és 160 μ l /0.68 mM/ tri-n-butilamint adva melegítésre homogén oldatot kaptam. Az oldatot szárazra pároltam, majd az olajos maradékot 3 ml /31 mM/ etilviniléterrel 73 mg p-toluolszulfonsav jelenlétében reagáltattam. 3 napos reakció után /szobahőmérsékleten/ a halványvörös oldat rétegekromatográfia szerint /B szolvens/ kiindulási anyagot nem tartalmazott,

csak a kívánt XLIX-t és két nem azonosított mellékterméket. Az elegyhez 0.1 ml tri-n-butilamint adtam és az etilviniléter felesleget eltávolítva vízzel 30 ml-re töltöttem. Az oldatot $\text{TOD}_{260} = 4200 / 1.5 \times 50$ cm-es DEAE-cellulóz HCO_3^- oszlopra öntöttem. Vizes mosás után az eluciót 500 ml víz- 500 ml 0.5 M trietilammoniumbikarbonát lineár gradienssel végeztem. 16 ml-es frakciókat vettem 20 percenként. A kromatográfiásan homogén 37-45. frakciókat $E_{260} > 10$ egyesítettem, a kapott oldatot $\text{TOD}_{260} = 2100$, 50% / szárazra pároltam. A maradékot 1 ml alkoholban oldva XLIX-et 15 ml abszolút éterrel csaptam ki. Szűrés, éteres mosás és szárítás után 94 mg anyagot kaptam bisz-tri-etilammoniumsó formában. Termelés: 38.2 %.

Ultraibolya spektrum	Ph = 7	pH = 11
λ_{max} /nm/	262	261
λ_{min} /nm/	231	240
E_{250}^{260}	0.74	0.82
E_{280}^{260}	0.35	0.30
ϵ_{UMP}	10 000	7 800
M	722	724

$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_{13}\text{P}_2 \cdot 2\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -ra számított $M=730$

Hidrolitikus tulajdonságok:

1 mg XLIX. 0.1 ml 10 %-os CH_3COOH -ban oldva 5 perc alatt kb. fele arányban elbomlott uridin 2'/3', 5'-difoszfátra. 30 perc után az átalakulás teljes /B szőlvens/. Lugos közegben /0.1 N

NaOH, szobahőmérséklet, 1 nap/ XLIX. stabil.

1 mg XLIX. 0.1 ml oldatban /0.01 M Na_2CO_3 - NaHCO_3 , pH=10.4/
1 mg alkalikus foszfatáz /calf intestine/ hatására 37°C-on 1
óra alatt kvantitativ elbomlott 2'/3'/-O-/1"-etoxietil/ uridin
3'/2'/-monofoszfátra /XLVIII/, az elegyben ekkor kevés 2'/3'/-O-
-/1"-etoxietil/ uridin /XLVII/ is jelen volt. 24 órás hidrolízis
után a XLVIII---> XLVII átalakulás teljes. Az 1 órás mintát
10 %-os CH_3COOH -al 30 percig kezelve rétegekromatográfiásan ke-
vés uridin /Id/ mellett főleg uridin 2'/3'/-monofoszfát /L/
mutatható ki /B szolvens/. A 24 órás minta hasonló kezelése után
az elegyben csak Id volt jelen.

Uridin 2'/3'/.5'-di-pirofoszfát /LIII/

15 mg 2'/3'/-O-/1"-etoxietil/ uridin 3'/2'/.5'-difoszfát
bisz-trietilammoniumsót /20 μM / 5 ml metanolban oldottam / $\text{TOD}_{260} =$
205/. Hozzáadva 20 μl tri-n-butilamint /84 μM / bepároltam, majd
alkohollal és dioxánnal bepároltam. A maradékhoz 0.4 ml dioxánt,
15 μl difenilklórfoszfátot /72 μM / és 20 μl tri-n-butilamint
/84 μM / adtam. A homogén oldatot szobahőmérsékleten 1 óráig
zárt edényben állni hagytam. 1 óra után az elegyet bepároltam,
a maradék olajat 2x10 ml éterrel kezelve dekantáltam. $\text{TOD}_{260} =$
=67 veszett el a dekantálásnál/. A kapott csapadékról a maradék
étert eltávolítva olajos anyagot kaptam, melyhez 0.2 ml 0.5 mólos,
piridinben oldott mono-tri-n-butil-ammoniumortofoszfátot adtam.
A kapott oldatot 20 perc állás után bepároltam, a maradékot 0.4
ml 10 %-os CH_3COOH -al kezeltem, és 30 perc után NH_4OH -dal semle-

gesítettem. Az oldatot 5 ml-re hígítva 1.1x16 cm-es DEAE-celulóz /HCO₃⁻/ oszlopra öntöttem fel. Vizes mosás után 150 ml viz- 150 ml 0.5 M trietilammoniumbikarbonát lineár gradienssel végeztem az eluciót. 7 ml-es frakciókat vettem 20 percenként. A 31-37. frakciót egyesítve /TOD₂₆₀=33, 16.1 %/ szárazra pároltam, a maradékot 1 ml metanolban oldottam, s 8 ml abszolút étterrel fehér csapadékot választottam le. Centrifugálás és szárítás után 3 mg anyagot kaptam. Termelés: 14.4 %.

Ultraibolya spektrum:	pH = 7	pH = 11
$\lambda_{\max}$ /nm/	262	261
$\lambda_{\min}$ /nm/	230	236
E $\frac{250}{260}$	0.75	0.80
E $\frac{280}{260}$	0.34	0.30
ϵ_{UTP}	10 000	8 100
M	1 040	1 028

C₉H₁₆N₂O₁₈P₄ • 4C₆H₁₅N • 4H₂O alapján számított M = 1040 és P%=11.92.

LIII. hidrolitikus tulajdonságainak vizsgálatát XLIV és XLV.-éhez teljesen hasonló módon végeztem el, így itt csak a foszforanalízis és a különböző hidrolizisek után felszabadult anorganikus foszfortartalmaz adtam meg százalékosan, illetve uraciltartalomra vonatkoztatva:

	P %	uracil : foszfor
Összes foszfortartalom	11.56	1 : 3,88
Savlabil foszfortartalom	5.84	1 : 1.96
Luglabil foszfortartalom	3.22	1 : 1.08
Enzimlabil foszfortartalom	12.00	1 : 4.03

Összefoglalás

A dolgozatban leírtam a guanozin 2',5'- és 3',5'-di-pirofoszfát, valamint az uridin 2'/3',5'-di-pirofoszfát szintézisét. A szintézist guanozinból illetve uridinből kiindulva a bevezetésben vázolt szintézisterv alapján valósítottam meg.

A szintézis első lépésében a guanozin és uridint a pirofoszforilkloridos módszerrel foszforileztem. A termékelegyből ioncserélő oszlopkromatográfiát alkalmazva nyertem ki a főterméként keletkező guanozin - illetve uridin 2'/3',5'-difoszfátot. Az izomerkeverék guanozin 2'/3',5'-difoszfátot ioncserélő oszlopkromatográfiával sikerült kompenenseire szétválasztani. A tiszta izomerek szerkezetét alkalikus foszfatázzal végzett hidrolízisük intermedierjeinek vékonyrétegkromatográfiás azonosításával igazoltam. A guanozin foszforilezésénél melléktermékeként izoláltam a guanozin 5'-monofoszfát 2'.3'-ciklofoszfátot, a guanozin 5'-pirofoszfát 2'/3'/-monofoszfátot és a guanozin 5'-trifoszfát 2'/3'/-monofoszfátot. A melléktermékek szerkezete alapján fel kellett tételeznem, hogy a foszforilezés elsődleges terméke a guanozin 5'-diklórfoszfát 2'.3'-klórciklofoszfát.

A második lépésben a guanozin 2',5'- illetve 3',5'-difoszfát, valamint az uridin 2'/3',5'-difoszfát etilviniléteres reakciójánál komplex termékelegyekhez jutottam. Ezekből a kívánt, az alkoholos hidroxilcsoporton α -etoxietil csoporttal védett származékokat, a 2'-O-/1"-etoxietil/ guanozin 3',5'-difoszfátot, a 3'-O-/1"-etoxietil/ guanozin 2',5'-difoszfátot és a 2'/3'-O-/1"-etoxietil/ guanozin 3'/2',5'-difoszfátot DEAE-cellulóz oszlopkromatográfiás frakcionálással különítettem el. A termékek szerkezetére - a 2'-O-/1"etoxietil/- guanozin 3',5'-difoszfát példáján bemutatva - a következők alapján következtettem:

- /a/ ultraibolya spektruma tipikus guanozin spektrum;
- /b/ enyhén savas közegben egy lépésben, gyorsan a kiindulási guanozin 3',5'-difoszfátra hidrolizált;
- /c/ lugos közegben stabil.
- /d/ alkalikus foszfatáz hatására két lépésben hidrolizált, mindkét lépésben egy foszfát csoport válik szabaddá. A két lépés sebessége különböző, az első lépés kb. egy nagyságrenddel gyorsabb. Az első lépésben keletkező anyag savas közegben gyorsan guanozin 3'-monofoszfátra, míg a végtermék guanozinra hidrolizált.

A fenti reakciók igazolják azt is, hogy az etoxietilezési reakció során a foszfátcsoport izomerizációja nem következett be.

A szintézis harmadik lépésében a két különböző helyzetű pi-

rofoszfátcsoporthoz felépítését azonos módon, egyidejűleg, a Michelson-féle anioncserés módszerrel végeztem el. A védett difoszfát-származékot tercier bázis jeleléteiben difenilklórfoszfáttal, majd mono-tri-n-butilammoniumortofoszfát piridines oldatával reagáltattam. Végül az α -etoxietil védőcsoport enyhe savas körülmények közötti hidrolízise és DEAE-cellulóz oszlopkromatográfia után nyertem a guanozin 2',5'- illetve 3',5'-di-pirofoszfátot, valamint az uridin 3'/3',5'-di-pirofoszfátot. A végtermékek szerkezetét - a guanozin 3',5'-di-pirofoszfát példáján bemutattva - a következők igazolják:

- /a/ ultraibolya spektruma jellegzetes guanozin spektrum;
- /b/ molekulánként négy foszforatomot tartalmaz;
- /c/ alkalikus foszfatáz guanozinra hidrolizálja, s négy molekula anorganikus foszfát szabadul fel molekulánként;
- /d/ lugos közegben guanozin 5'-pirofoszfát 2'.3'-ciklofoszfáton keresztül guanozin 5'-pirofoszfát 2'/3'/-monofoszfátra hidrolizál, a hidrolízis után anorganikus foszfátként molekulánként egy foszforatom volt visszamérhető;
- /e/ savas közegben guanozin 5'-pirofoszfát 2'.3'-ciklofoszfáton és guanozin 5'-pirofoszfát 2'/3'/-monofoszfáton keresztül guanozin 2'/3',5'-difoszfátra hidrolizál;
- /f/ a foszformérések eredményei összegezve:

Guanin : $P_{összes}$: $P_{savlabil}$: $P_{enzimlabil}$: $P_{luglabil} =$
 $= 1.00 : 3.83 : 2.20 : 4.21 : 1.00$

Irodalomjegyzék

1. D.M. Brown, A.R. Todd, J. Chem. Soc., 52 /1952/
2. D.M. Brown, C.A. Dekker, A.R. Todd, J. Chem. Soc., 2715 /1952/
3. R.H. Hall, H.G. Khorana, J. Ann. Chem. Soc., 77, 1871 /1955/
4. J.G. Moffat, H.G. Khorana, J. Ann. Chem. Soc., 83,
5. J. Baddiley, J.G. Buchanan, R. Letter, J. Chem. Soc., 1000 /1958/
6. F. Cramer, G.W. Kenner, N.A. Hughes, A.R. Todd, J. Chem. Soc.,
3297 /1957/
7. A.M. Michelson, The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides,
Academic Press, London and New York, 1963, pp. 123
8. G.M. Tener, J. Am. Chem. Soc., 83, 159 /1961/
9. A.M. Michelson, The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides,
Academic Press, London and New York, 1963, pp. 124
10. A.M. Michelson, J. Chem. Soc., 2055 /1958/
11. M. Yoshikawa, M. Sakurata, K. Kusashio, Bull. Chem. Soc., Japan,
43, 456 /1970/
12. M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, Bull. Chem. Soc. Japan,
42, 2505 /1969/
13. K. Mitsugi, E. Nakazawa, S. Okumura, M. Takahashi, H. Yamada,
Agr. Biol. Chem. /Tokyo/ 29, 1051 /1965/
14. A. Holy, F. Sorm, Coll. Czech. Chem. Commun., 31, 1544 /1966/
15. H. Grunze, Angew. Chem., 71, 70 /1959/
16. W. Koransky, H. Grunze, G. Münch, Z. Naturforsch., 176, 291 /1962/
17. K. Imai, T. Hirata, M. Honjo, Ann. Rept. Takeda Res. Lab.,
23, 1 /1964/
18. M. Honjo, K. Imai, Y. Furukawa, H. Moriyama, K. Yasumatsu, A.
Imada, Ann. Rept. Takeda Res. Lab., 22, 47 /1963/

19. A.M. Michelson, J. Chem. Soc., 36554 /1959/
20. M. Smith, D.H. Rammner, I.H. Goldberg, H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 84, 430 /1962/
21. M. Smith, H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 81, 2911 /1959/
22. J. Smrt, F. Sorm, Coll. Czech. Chem. Commun., 27, 73 /1962/
23. B.E. Griffin, M. Jarmov, C.B. Reese, Tetrahedron, 24, 639 /1968/
24. C.B. Reese, R. Saffhill, J.E. Sulston, J. Am. Chem. Soc., 89, 3366 /1967/
25. B.E. Griffin, C.B. Reese, Tetrahedron, 25, 4057 /1969/
26. S. Chládek, J. Zemlicka, F. Sorm, Coll. Czech. Chem. Commun., 31, 1785 /1966/
27. J. Smrt, S. Chladek, Coll. Czech. Chem. Commun., 33, 2978 /1968/
28. R. Brimacombe, W. Kemper, T. Jaouni, J. Smrt, Coll. Czech. Chem. Commun., 33, 2074 /1968/
29. A. Holy, S. Chladek, J. Zemlicka, Coll. Czech. Chem. Commun., 34, 253 /1969/
30. J. Zemlicka, A. Holy, Coll. Czech. Chem. Commun., 32, 3159 /1967/
31. A.M. Michelson, Chem. and Ind. /London/ 70 /1958/
32. H.G. Khorana: Some recent developments in the chemistry of phosphate esters of biological interest, 1961, John Wiley and Sons, Inc., pp. 60
33. H.G. Khorana: Some recent developments in the chemistry of phosphate esters of biological interest, 1961, John Wiley and Sons, Inc., pp. 70
34. J. Baddiley, A.R. Todd, J. Chem. Soc., 648 /1947/
35. G.W. Kenner, A.R. Todd, F.J. Weymouth, J. Chem. Soc., 3675 /1952/
36. D.E. Griffin, A.R. Todd, J. Chem. Soc., 1389 /1958/
37. A.M. Michelson, J. Chem. Soc., 1957 /1958/

38. N.R. Khorby, G.W. Kenner, A.R. Todd, J. Chem. Soc., 1234 /1952/
39. A.M. Michelson, Chem and Ind., 1267 /1960/
40. A.M. Michelson, Biochim. Biophys. Acta, 91, 1 /1964/
41. H.G. Khorana, A.R. Todd, J. Chem. Soc., 2257 /1953/
42. H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 76, 3517 /1954/
43. R.H. Hall, H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 76, 5056 /1954/
44. R.W. Chambers, H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 79, 3752 /1957/
45. R.W. Chambers, H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 80, 3749 /1958/
46. R.W. Chambers, P. Saphiro, R. Kurkov, J. Am. Chem. Soc., 82,
970 /1960/
47. R.W. Chambers, J. Am. Chem. Soc., 81, 3032 /1959/
48. J.G. Moffatt, H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 83, 649 /1961/
49. H. Schaffer, H. A-. Staab, F. Cramer, Chem. Ber., 94, 1621 /1961/
50. A.M. Michelson, Biochim. Biophys. Acta, 50, 605 /1961/
51. R.E.I. Mitchel, D.C. Ward, G.M. Tener, Can. J. Biochem., 45,
89 /1967/
52. B.G. Lane, F.W. Allen, Biochim. Biophys. Acta, 47, 36 /1961/
53. Ultraviolet Absorption Spectra of 5'-Ribonucleotides, Pabst
Laboratories, Circular OR-10
54. H. Eibl, W.E.M. Lands, Anal. Biochem., 30, 51 /1969/
55. H.G. Khorana; Some recent developments in the chemistry of phos-
phate esters of biological interest, 1961, John Wiley
and Sons, Inc., pp. 63
56. L.F. Leloir, C.E. Cardini, Methods Enzymol., 3, 840 /1957/
57. R. Markham, J.D. Smith, Biochem. J., 49, 401 /1951/
58. P.C. Crafts, I.M. Donnie, R.B. Heslop, J. Chem. Soc., 3673 /1960/

59. A.W. Burgstahler, I.C. Nordin, J. Am. Chem. Soc., 83, 198 /1961/
60. M. Cashel, J. Gallant, Nature, 221, 838 /1969/
61. M. Cashel, J. Biol. Chem. 244, 3133 /1969/
62. M. Cashel, B. Kalbacher, J. Biol. Chem., 245, 2309 /1970/
63. J. Sy, F. Lipmann, Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 306 /1973/
64. W.A. Haseltine, R. Block, W. Gilbert, K. Weber, Nature, 238,
381 /1972/
65. L. Que, G.R. Willie, M. Cashel, J.W. Badley, G.R. Gray, Proc.
Nat. Acad. Sci., 70, 2563 /1973/
66. A.M. Michelson, The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides,
Academic Press, London and New York, 1963, pp.194
67. H.G. Khorana: Some recent developments in the chemistry of phos-
phate esters of biological interest, 1961, John Wiley
and Sons., Inc., pp.74.

