

BBA 95745

DIE METHYLIERUNG VON INOSIN UND URIDYLYL-(3'-5')INOSIN
DURCH DIMETHYLSULFAT

KARL-HEINZ SCHEIT UND ANTONIN HOLY*

*Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin,
Abteilung Chemie, Göttingen (Deutschland)*

(Eingegangen am 16. Juni, 1967)

SUMMARY

Methylation of inosine and uridylyl-(3'-5')inosine with dimethylsulfate

Methylation of inosine with diazomethane at pH 7 yields 1-methylinosine, 7-methylinosine, 9-(β , D-ribofuranosyl)-6-methoxypurine, 5-(*N*-formyl, *N*-methyl)-amino-6-(D-ribofuranosyl)aminopyrimidine-4-on and 3-methyl-5-(*N*-formyl, *N*-methyl)amino-6-(D-ribofuranosyl)aminopyrimidine-4-on. The reaction of 2', 3'-*O*-isopropylideneinosine with dimethylsulfate at pH 7 yielded 3-methyl-5-(*N*-formyl, *N*-methyl)amino-6-(D-2', 3'-*O*-isopropylideneribofuranosyl)aminopyrimidine-4-on as the sole reaction product. The ultraviolet- and NMR spectra of these compounds are discussed. The methylation of uridylyl-(3'-5')inosine with dimethylsulfate at pH 7 occurred without fission of the phosphodiester linkage selectively at the hypoxanthine moiety with the formation of 3-methyl-5-(*N*-formyl, *N*-methyl)-6-aminopyrimidine-4-on and 5-(*N*-formyl, *N*-methyl)-6-aminopyrimidine-4-on.

EINFÜHRUNG

Die chemische Modifizierung von tRNA ist von mehreren Arbeitskreisen benutzt worden, um Informationen über die Funktion und die Struktur dieser Moleküle zu erlangen. Neben N-Oxydation¹ und Halogenierung² wurde dazu auch die Alkylierung durch Formaldehyd³, Acrylnitril⁴ oder Dimethylsulfat⁵ benutzt. Kürzlich berichteten wir über die Methylierung von Ribodinucleosidphosphaten, die Inosin oder Inosin-Derivate enthielten, durch Diazomethan bei pH 7 (Ref. 6). Nun haben wir die Reaktion von Inosin und Uridylyl-(3'-5')inosin (Up I) mit Dimethylsulfat bei pH 7 untersucht, um ein ungefähres Bild davon zu erhalten, welche Veränderungen Inosin in tRNA bei der Methylierung durch Dimethylsulfat erfahren könnte. Die Alkylierung von Inosin in organischem Lösungsmittel war bereits von MILES⁷ und JONES UND ROBINS⁸ untersucht worden. Die dabei gewonnenen Erkennt-

Abkürzung: UpI, Uridylyl-(3'-5')inosin.

* Institut für Organische Chemie und Biochemie der Tschechoslovakischen Akademie der Wissenschaften, Prag, ČSSR.

nisse lassen sich jedoch nicht ohne weiteres auf die Methylierung von Oligonucleotiden in wässriger Lösung übertragen, wie unsere Ergebnisse im Folgenden zeigen werden (vgl. auch Ref. 13).

EXPERIMENTELLER TEIL

Papierchromatographie

Papier: Schleicher und Schüll 2043b (gewaschen), Whatman 3 MM (für präparative Trennungen).

Lösungsmittel: (A) 2-Propanol–conc. NH_4OH –Wasser (7:2:2, v/v/v); (B) Äthanol–1 M Ammoniumacetat (7:3, v/v), (C) *n*-Butanol–Äthanol–Wasser (4:1:5, v/v/v, aufsteigend).

Dünnschichtchromatographie

Lösungsmittel: (D) Chloroform–Methanol (9:1, v/v), (E) Chloroform–Methanol (95:5, v/v). Für analytische Zwecke wurden Silicagel-Dünnschichtplatten F_{254} (E. Merck AG, Deutschland) verwendet. Präparative Dünnschichtchromatographie erfolgte an 2.0 mm dicken PF_{254} Silicagelschichten (E. Merck AG, Deutschland).

Elektrophorese

Elektrophorese erfolgte an den oben bezeichneten Papieren in 0.1 M Triäthylammoniumbicarbonat (pH 7.5) bei 17 V/cm.

Ultravioletspektren wurden mit den Geräten Cary 14 und Zeiss PMQ II aufgenommen. NMR-Spektren wurden mit den Geräten Perkin Elmer R 10 und Varian HA 100 gemessen. Reaktionen bei konstanten pH wurden im pH-Stat-Apparat der Fa. Radiometer (Kopenhagen) durchgeführt.

Die Methylierung von 2', 3'-O'-Isopropylideninosin durch Diazomethan

300 mg (1 mMol) 2', 3'-Isopropylideninosin wurden in 30 ml Diazo-Methanol (2:1, v/v) gelöst und unter Eiskühlung 15 mMol Diazomethan in Äther zugegeben. Nach 8 h bei 0° wurde die Reaktionslösung zur Trockne eingengt und der Rückstand der präparativen Dünnschichtchromatographie an Silicagel in Lösungsmittel E unterworfen. Das Band mit dem kleinsten R_F -Wert wurde mit Methanol, die beiden anderen Zonen mit Chloroform-Methanol (1:1, v/v) eluiert.

Ausbeute: 2', 3'-O-Isopropyliden-7-methylinosin 62.9 mg amorphe Substanz (20 % der Theorie). $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$, Mol. Gew. 322.32; ber.: C 52.17 %, H 5.63 %, N 17.38 %; gef.: C 51.50 %, H 6.0 %, N 17.28 %. Die Substanz kristallisierte beim Anreiben mit Äthanol–Äther. Sie zersetzte sich beim Erhitzen unter Braunfärbung.

2', 3'-O-Isopropyliden-1-methylinosin 154.5 mg amorphe Substanz (49 % der Theorie). $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$, Mol. Gew. 322.32; ber.: C 52.17 %, H 5.63 %, N 17.38 %; gef.: C 51.80 %, H 6.38 %, N 16.95 %. Durch 3-stündiges Kochen mit 50-proz. Essigsäure wurde N^1 -Methylinosin erhalten.

9-(β , D-2', 3'-O-Isopropylidenribofuranosyl)-6-methoxypurin 99 mg amorphe Substanz (31 % der Theorie). $C_{14}H_{18}N_4O_5$, Mol. Gew. 322.32; ber.: C 52.17 %, H 5.63 %, N 17.38 %; gef.: C 51.81 %, H 6.51 %, N 16.96 %. Durch 3-stündiges Kochen mit 50-proz. Essigsäure wurde 6-Methoxypurinribosid erhalten.

Hydrolyse von 2', 3'-O-Isopropyliden-7-methylinosin

0.6 g (1.8 mMol) wurden in 40 ml Wasser gelöst und das pH der Lösung auf 10 gebracht. Nach 12 Stunden bei Raumtemperatur wurde mit Ionenaustauscher (H^+ -Form) neutralisiert, vom Ionenaustauscher abfiltriert und das Filtrat eingengt. Das Hydrolyseprodukt wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie in Lösungsmittel D isoliert. Die Substanz wurde mit Chloroform-Methanol (1:1, v/v) vom Silicagel eluiert. Nach Einengen der Lösung wurde der Rückstand in wenig Äthanol gelöst und die Lösung unter Eiskühlung in Petroläther (Kp. 40–60) getropft. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und getrocknet. Ausbeute: 0.55 mg amorphes, weißes Pulver. $C_{14}H_{20}O_6N_4$, Mol. Gew. 340.34; ber.: C 49.40 %, H 5.92 %, N 16.46 %; gef.: C 49.20 %, H. 6.00 %, N 16.36 %.

Methylierung von Inosin durch Diazomethan bei pH 7

0.1 mMol (27 mg) wurden in 2 ml Wasser gelöst, dessen pH durch Zugabe von NH_4OH auf 7 gebracht worden war. Nach Zugabe von 3 mMol Diazomethan in Äther wurde unter Eiskühlung bis zur Entfärbung kräftig gerührt. Die Reaktionslösung wurde eingengt und das Reaktionsgemisch durch präparative Dünnschichtchromatographie in Lösungsmittel D getrennt. Nach mehrmaligem Wiederholen der Chromatographie waren 5 ultraviolett absorbierende Zonen entstanden. Die Substanzen wurden mit Methanol-Wasser (1:1, v/v) vom Kieselgel eluiert. Die Identifizierung erfolgte durch chromatographischen Vergleich mit authentischem Material und das Ultraviolett-Spektrum: 7-Methylinosin (26.5 %), Inosin (4.5 %), 5-(N-formyl, N-methyl)amino-6-(D-ribofuranosyl)aminopyrimidin-4-on (27.0 %), 7-Methylinosin (26.5 %) und 6-Methoxypurinribosid (15.5 %).

Methylierung von 2', 3'-O-Isopropylideninosin durch Dimethylsulfat bei pH 7

600 mg (2 mMol) 2', 3'-O-Isopropylideninosin wurden in 25 ml Dioxan – Wasser (2:3, v/v) gelöst und 20 mMol (2,52 g) Dimethylsulfat zugegeben. Das pH der Reaktionslösung wurde konstant auf 7 gehalten. Nach 15 Stunden bei Raumtemperatur zeigte das Dünnschichtchromatogramm der Reaktionslösung in Lösungsmittel D nur das Vorhandensein einer neuen Substanz. Die Reaktionslösung wurde eingengt, durch Kodestillation mit Äthanol getrocknet und der Rückstand erschöpfend mit Aceton extrahiert. Der Acetonextrakt wurde eingengt, die zurückbleibende Substanz in wenig Methanol gelöst und die Lösung bei 0° aufbewahrt. Die ausgeschiedenen Kristalle wurde abgesaugt. Ausbeute 350 mg chromatographisch reines Produkt vom Fp. 213–15°. $C_{15}H_{22}N_4O_6$, Mol. Gew. 354.37; ber.: C 50.84 %, H 6.26 %, N 15.81 %; gef.: C 50.67 %, H 6.49 %, N 15.64 %.

Massenspektrum: Molekülion 354 m/e; beständiges Zwischenprodukt 165 m/e.

Die saure Hydrolyse dieser Substanz mit 1 M HCl bei 100° führte mit 80-proz. Ausbeute zu einer Verbindung, die mit 1,7-Dimethylhypoxanthin identisch war.

Methylierung von Uridyl-(3'-5')inosin (UpI) mit Dimethylsulfat bei pH7

240 A Einheiten (250 m μ) UpI wurden in 0.5 ml Wasser gelöst und 20 μ l (0.2 mMol) Dimethylsulfat zugegeben. Die Reaktionslösung wurde, bei pH 7, 12 Stunden magnetisch gerührt. Die Elektrophorese der Reaktionsmischung nach beendeter Methylierung ergab, daß keine Spaltung der Internucleotidbindung erfolgt war. Das Gemisch der methylierten Dinucleosidphosphate wurde durch präparative Papierelektrophorese bei pH 7.5 isoliert. 100 A Einheiten (250 m μ) wurden in 0.5 ml 0.1 M Tris-Puffer (pH 7) gelöst, 100 μ g Ribonuclease (EC 2.7.7.16, Fa. Boehringer) zugegeben und 6 Stunden bei 37° inkubiert. Das Hydrolysat wurde durch präparative Papierelektrophorese bei pH 7.5 getrennt. Die entstandene Menge Uridin 3'-phosphat wurde spektrophotometrisch bestimmt. Die Nucleosidfraktion wurde eluiert und im Lösungsmittel B getrennt. Die Identifikation der Nucleoside erfolgte durch Ultraviolett-Spektren und Vergleich mit authentischem Material.

100 A Einheiten (250 m μ) wurden in 0.5 ml und 0.1 M Tris-Puffer (pH 8) gelöst (EC 3.1.4.1, Fa. Boehringer), 10 μ g Phosphodiesterase zugegeben und 6 Stunden bei 37° inkubiert. Die Hydrolyselösung wurde der präparativen Papierelektrophorese bei pH 7.5 unterworfen, wobei Auftrennung in drei Zonen erfolgte. Die Zone mit der geringsten Beweglichkeit bestand aus Uridin. Die Zweite Zone hatte die Beweglichkeit von UpI. Sie enthielt die durch Phosphodiesterase aus Schlangengift nicht spaltbaren Dinucleosidphosphate UpX. Die dritte Zone bestand aus Inosin 5'-phosphat.

Die Identität von Uridin und Inosin 5'-phosphat wurde durch Rechromatographie in den Lösungsmitteln A und B sowie durch die Ultraviolettspektren gesichert. Die durch Phosphodiesterase nicht spaltbare Dinucleosidphosphat-Fraktion wurde auf die oben angegebene Weise durch Pancreas Ribonuclease hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde in Lösungsmittel B chromatographiert.

ERGEBNISSE

Nach Untersuchungen von MILES⁷ führt die Methylierung von Inosin durch Diazomethan in organischem Lösungsmittel zu den Produkten 1-Methylinosin, 6-Methoxypurinribosid und 7-Methylinosin. In Analogie dazu erhielten wir bei der Reaktion von 2', 3'-O-Isopropylideninosin (I) mit einem geringen Überschuß an Diazomethan in Dioxan-Methanol bei 0° 2',3'-O-Isopropyliden-1-methylinosin (II), 2',3'-O-Isopropyliden-7-methylinosin (III) und 9-(β , D-2',3'-O-Isopropylidenribofuranosyl)-6-methoxypurin (IV). Das Vorhandensein des Isopropylidensubstituenten erlaubte die bequeme Auftrennung des Reaktionsgemisches durch präparative Dünnschichtchromatographie. Bei Verwendung eines größeren Überschusses an Diazomethan und längerer Reaktionsdauer stellten wir fest, daß nach erfolgter Trennung des Reaktionsgemisches, II mit einer Substanz verunreinigt war, die sich weder durch Kristallisation noch Chromatographie abtrennen ließ. Das Ultraviolett-Spektrum von II zeigte dabei eine charakteristische Abnahme des Verhältnisses $A_{250\text{ m}\mu}$ zu

TABELLE I

PAPIER- UND DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE

Verbindung	Lösungsmittel	R _F werte			
		A	B	C	D
Inosin		0.28	0.59	0.28	—
Uridin		0.42	0.71	0.38	—
1-Methylinosin		0.48	0.38	—	—
7-Methylinosin		—	0	0	—
6-Methoxypurinribosid (9-(β, D-Ribofuranosyl)-6-methoxypurin)		—	—	0.64	—
2',3'-O-Isopropylideninosin		—	—	—	0.28
2',3'-O-Isopropyliden-1-methylinosin		—	—	—	0.46
6-Methoxypurin-9-(β, D-2',3'-O-isopropyliden)ribosid		—	—	—	0.95
2',3'-O-Isopropyliden-7-methylinosin		—	—	—	0
3-Methyl-5-(N-formyl, N-methyl)amino-6-(D-ribofuranosyl)aminopyrimidin-4-on		0.61	—	—	—
5-(N-Formyl, N-methyl)amino-6-(D-ribofuranosyl)aminopyrimidin-4-on		0.47	—	—	—
3-Methyl-5-(N-formyl, N-methyl)amino-6-(D-2',3'-isopropylidenribofuranosyl)aminopyrimidin-4-on		—	—	—	0.54
5-(N-Formyl, N-methyl)amino-6-(D-2',3'-O-isopropylidenribofuranosyl)aminopyrimidin-4-on		—	—	—	0.39
Uridin 3'-phosphat		0.09	—	—	—
Inosin 5'-phosphat		0.10	0.30	—	—
Uridyl-yl-(3'-5')inosin		0.20	0.39	—	—
Uridyl-yl-(3'-5')-3-methyl-5-(N-formyl, N-methyl)amino-6-(D-ribofuranosyl)aminopyrimidin-4-on		0.25	0.57	—	—
Uridyl-yl-(3'-5')-5-(N-formyl, N-methyl)amino-6-(D-ribofuranosyl)amino-pyrimidin-4-on		0.25	0.51	—	—
1,7-Dimethylhypoxanthin		—	—	0.30	—

$A_{260\text{ m}\mu}$, was auf eine Verunreinigung durch eine Substanz mit einem λ_{max} von 260–270 $\text{m}\mu$ hindeutete.

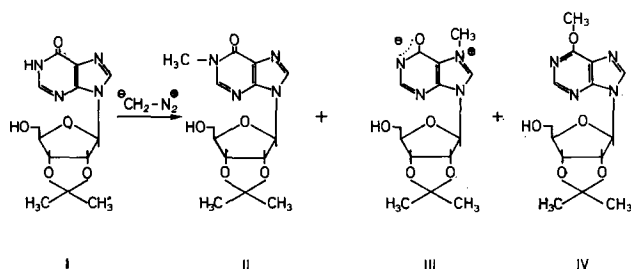


Fig. 1. Methylierung von 2',3'-O-Isopropylideninosin durch Diazomethan.

Die Stellung der Methyl-Substituenten in II, III und IV konnte sehr leicht mit Hilfe der NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden, da durch die Methylgruppe eine signifikante Verschiebung des Resonanz-Signal des benachbarten Protons nach niederen Feldstärken erfolgte. Aus Tabelle II kann man entnehmen, daß im Spektrum von II eine Verschiebung des H^2 -Signals nach niederen Feldstärken, verglichen mit I, erfolgt, während das H^8 -Signal seine Lage nicht ändert. Die 7-Methyl-

gruppe in III führt zu einer Verschiebung des H-8-Signals. O-Methylierung zu IV hat eine völlige Änderung des heterocyclischen Systems zur Folge. Das NMR-Spektrum von IV zeigt daher sowohl für H-2- und H-8-Resonanz eine Verschiebung nach niederen Feldstärken. Die Lage des N-Methylsignals in II bei 6.42 ppm ist vergleichbar mit der von 3-Methyluridin und 3-Methylthymidin. Die Methylgruppe in III sitzt an einem quartären N-Atom, was zu einer Verschiebung des entsprechenden Signals nach niederen Feldstärken zu 5.81 ppm führt. Interessanterweise liegt das Signal der O-Methylgruppe von IV ebenfalls bei 5.83 ppm. Der in der Enolform fixierte Pyrimidinring ist ein stark elektronenziehender Substituent, der eine Ver-
ringerung der magnetischen Abschirmung bewirkt und zur gleichen chemischen Verschiebung der Methylprotonen wie ein N-Atom mit positiver Ladung führen kann. Vom 7-Methylguanotin war bekannt, daß neben einer Hydrolyse der glykosidischen Bindung eine Spaltung des Imidazolrings eintreten kann, wobei ein Pyrimidinderivat entsteht⁸⁻¹¹. Wir konnten feststellen, daß diese Öffnung des Imidazolrings bei III selbst bei pH 7 in beträchtlichem Umfang statt findet und bei pH 9-10 nach 2 Stunden bei Raumtemperatur quantitativ war. Aufgrund der Ultraviolett- und NMR-Spektren, sowie der Elementaranalyse glaubten wir, dass die Hydrolyse von III nach dem in Fig. 2 wiedergegebenen Mechanismus erfolgte.

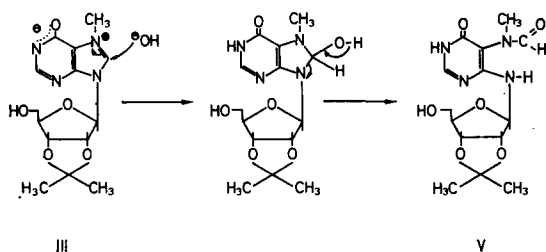


Fig. 2. Mechanismus der alkalischen Hydrolyse von 2',3'-O-Isopropyliden-7-methylinosin.

Die ähnlichen chromatographischen Eigenschaften von II und V führten dazu, daß bei erfolgter Hydrolyse von III und nach Auftrennung durch präparative Dünnschichtchromatographie die Substanz II durch V verunreinigt war. Das NMR-Spektrum von IV in Deuterodimethylsulfoxyd zeigt zwei Signale für ein N-H Proton bei 2.49 und 2.62 ppm. Dieses Signal bei niederen Feldstärken weist darauf hin, daß sich das Proton am glykosidischen N-Atom, in Konjugation zu der 4-Carbonyl-Gruppe, befindet und nicht am N-5-Atom. Die größere Basizität des N-5-Atoms würde eine größere magnetische Abschirmung und damit eine geringere chemische Verschiebung eines entsprechenden N-H-Signals zur Folge haben. Cytidin besitzt ebenfalls eine Aminogruppe in Konjugation zu einer Carbonylgruppe. Die chemische Verschiebung dieser N-H Signale in Deuterodimethylsulfoxyd beträgt 2.78 ppm, ist also von gleicher Größenordnung wie im Falle des N-H Protons der Verbindung V.

Eine Erklärung für das Auftreten zweier Signale für ein N-H Proton könnte eine gehinderte Rotation um die C-N-Bindung sein. Die sterische Hinderung läßt sich am Modell leicht nachweisen.

Kürzlich berichteten wir über die Methylierung von UpI mit Diazomethan⁶. Wir fanden nach der enzymatischen Hydrolyse des methylierten UpI 1-Methyl-

inosin, 9-(β , D-Ribofuranosyl)-6-methoxypurin und 3-Methyl-5-(*N*-formyl, *N*-methyl)-6-(D-ribofuranosyl)aminopyrimidin-4-on, welches durch Ringöffnung des 7-Methylinosins und nachfolgende Methylierung durch Diazomethan entstanden war. Ähnliches beobachteten wir bei der Methylierung von Inosin in Wasser von pH 7 bei 0° mit einem dreifachen Überschuß an Diazomethan. Folgende Produkte wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie in Lösungsmittel (D) isoliert: 7-Methylinosin (26.5 %), Inosin (4.5 %), 5-(*N*-Formyl, *N*-Methyl)-amino-6-(D-ribofuranosyl)-6-methoxypurinribosid (15.5 %). Die Chromatographie in nichtwässrigem Lösungsmittel erlaubte es, den Anteil an 7-Methylinosin, der während der Reaktion nicht hydrolysiert wurde, unzersetzt zu isolieren. Der geringe Diazomethan-Überschuß genügte offenbar nicht, um das Ringöffnungsprodukt des 7-Methylinosins zu einem Dimethyl-Pyrimidinderivat zu methylieren. Das Verhältnis der Reaktionsprodukte ist jedoch mit dem bei der Methylierung von UpI gefundenen vergleichbar.

JONES UND ROBINS⁸ erhielten bei der Methylierung von Inosin durch Methyljodid in organischen Lösungsmittel 7-Methylinosin als Hauptprodukt. Wir haben die Methylierung von 2',3'-*O*-Isopropylideninosin durch Dimethylsulfat in Dioxan-Wasser bei pH 7 untersucht. Da das sicherlich zuerst gebildete 2',3'-*O*-Isopropyliden-7-methylinosin unter Reaktionsbedingungen nicht stabil war, sollten eventuell Sekundär-Reaktionen die Folge sein. Die Methylierung von I durch einen zehnfachen Überschuß an Dimethylsulfat bei konstanten pH 7 führte nur zu einem Reaktionsprodukt, das nach Umkristallisation in 50-proz. Ausbeute isoliert wurde. Das chromatographische Verhalten der Substanz in Lösungsmittel D schloß das Vorhandensein eines quartären N-Atoms aus. Die Ultravioletspektren bei pH 7 und pH 12 waren identisch und zeigten ein Maximum bei 265 m μ . Daraus ließ sich folgern, daß es sich um ein Pyrimidin-Derivat ohne acides-N-H-Proton handeln mußte. Das Massenspektrum und die Elementaranalyse ergaben das Molekulargewicht der Substanz: 354. Das NMR-Spektrum der Substanz in Deuterodimethylsulfoxyd zeigte große Ähnlichkeit mit dem der Verbindung V: Zwei N-H-Signale bei 2.50 und 2.60 ppm mit der Intensität eines Protons; ein Formylproton bei 2.15 ppm; Signale für zwei *N*-Methylgruppen bei 7.05 und 6.57 ppm. Hier ergibt sich gute Übereinstimmung mit

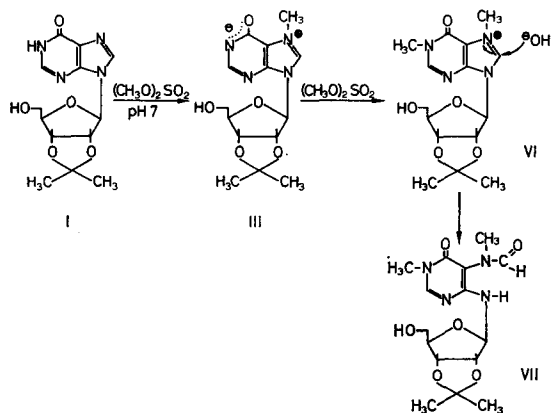


Fig. 3. Methylierung von 2',3'-*O*-Isopropylideninosin mit Dimethylsulfat bei pH 7.

TABELLE II

NMR-SPEKTREN VON INOSIN-DERIVATEN

Die chemische Verschiebung ist in ppm, feldabwärts von Tetramethylsilan $\delta\text{CH}_3 = 10$ ppm) als innerem Standard, angegeben. Die Spektren wurden bei $32 \pm 0.5^\circ$ aufgenommen. Die Zahlen in Klammer bedeuten die Kopplungskonstante, gemessen in Herz. Die chemische Verschiebung konnte mit einer Genauigkeit von ± 0.02 ppm gemessen werden. d-DMSO = Deuterodimethylsulfoxyd.

Verbindung	H-2	H-8	H-2'	H-3'	H-1'	H-5'	N-CH ₃ O-CH ₃	Formyl- H	N ⁶ -H	Bemerkung
2',3'-O-Isopropylideninosin	1.78	1.56	4.64*	5.0*	3.80** (3)	6.38** (6)				d-DMSO
2'-3'-O-Isopropyliden-1-methylinosin	1.45	1.55	4.65*	4.99*	3.82** (3)	6.40				d-DMSO
9- β , D-2',3'-Isopropylidenribofuranosyl)- 6-methoxypurin	1.28	1.30	4.53*	4.93*	3.67** (3.6)	6.40** (5)	5.81			d-DMSO
2',3'-O-Isopropyliden-7-methylinosin	1.81	0.52	4.59*	4.99*	3.78** (3)	6.32** (5)	5.83			d-DMSO
5-(N-Formyl, N-methyl)amino-6-(D-2',3'- O-isopropylidenribofuranosyl)amino- pyrimidin-4-on	2.02	—	5.30	5.30	4.15 (9)	6.52** (4)	7.17	2.22	2.49***	d-DMSO
3-Methyl-5-(N-formyl, N-methyl)amino- 6-(D-2',3'-isopropylidenribofuranosyl)- aminopyrimidin-4-on	1.81	—	5.19*	5.35*	4.01 (10)	6.42	6.57	2.15	2.50***	d-DMSO
	2.10	—	5.15*	5.38*	3.94** (10)	6.29	7.05 6.56 7.0	2.16	2.60 2.3- 2.65	CDCl ₃

* Multiplett mit dem Zentrum bei der jeweils angegebenen chemischen Verschiebung.

** Dublett mit dem Zentrum bei der jeweils angegebenen chemischen Verschiebung.

*** Beide Signale entsprechen der Intensität eines Protons.

den Signallagen der N-CH₃ Gruppen von V und II. Auf grund des 1-Methylsubstituenten zeigte das H-2-Signal eine geringe Verschiebung nach niederen Feldstärken zu 1.81 ppm. Diese Informationen berechtigen zu der Annahme, daß die Methylierung von Isopropylideninosin durch Dimethylsulfat bei pH 7 wie in Fig. 3 verlaufen war.

Bei der sauren Hydrolyse von VII durch 1 M HCl bei 100° erfolgte unter Spaltung der glykosidischen Bindung Cyclisierung zu 1,7-Dimethylhypoxanthin in 80-proz. Ausbeute.

TABELLE III

METHYLIERUNG VON UpI MIT (CH₃O)₂SO₂ BEI pH 7

Die Tabelle gibt die Zusammensetzung der bei der Reaktion entstandenen Dinucleosidphosphate XpY wieder. Die Reaktionsbedingungen und das Analysenverfahren wurden im experimentellen Teil beschrieben.

X (%)	Y (%)	
Uridin 100	Inosin	21.6
	3-Methyl-5-(N-methyl, N-formyl)- 6-(D-ribofuranosyl)aminopyrimidin-4-on	58.4
	5-(N-Methyl, N-formyl)-6-(D-ribofuranosyl)- aminopyrimidin-4-on	20

TABELLE IV

ULTRAVIOLETTSPEKTREN VON INOSIN-DERIVATEN

Substanz	λ_{max} (m μ)	$\frac{A_{250\text{ m}\mu}}{A_{260\text{ m}\mu}}$	$\frac{A_{289\text{ m}\mu}}{A_{260\text{ m}\mu}}$	$\epsilon (\times 10^3)$ bei λ_{max}	Bemerkung
2',3'-O-Isopropylideninosin	249, 243 270*	1.84	0.447	11.45 (279)	Methanol
	249, 270*	1.54	0.325	11.9 (249)	pH 7
	253	1.095	0.256	13.05	pH 12
6-Methoxypurin-6-(9, β -D-2',3'- O-isopropyliden)ribosid	248 248	1.605 1.54	— —	10.8 (248) 10.95 (248)	Methanol pH 7 und pH 12
2',3'-O-Isopropyliden-1- methylinosin	250, 270* 245, 251 270*	1.570 1.650	0.428 0.440	12.23 (250) 11.9 (251)	pH 7 und pH 12 Methanol
2',3'-O-Isopropyliden-7- methylinosin	268 268	0.705 0.70	0.80 0.850	10.1 (268) 9.6	Methanol pH 7
3-Methyl-5-(N-formyl, N-methyl)- amino-6-(D-2',3'-O-isopropyliden ribofuranosyl)aminopyrimidin- 4-on	265	0.80	0.80	6.95 (265)	pH 7 und pH 12
5-(N-Formyl, N-methyl)amino-6- (D-2',3'-O-isopropylidenribo- furanosyl)aminopyrimidin-4-on	262 256	0.77 0.965	0.705 0.164	8.0 (262) 5.8 (256)	pH 7 pH 12
1,7-Dimethylhypoxanthin	270	0.552	1.260		pH 7 und pH 12

* Wendepunkt.

Die Methylierung von UpI durch Dimethylsulfat wurde ebenfalls bei konstanten pH 7 durchgeführt. Nach beendeter Reaktion zeigte die Papierelektrophorese, daß weder Nucleoside noch Nucleosidphosphate in der Reaktionslösung anwesend waren. Eine Spaltung der Internucleotid-Bindung während der Methylierung war nicht eingetreten. Chromatographie des Reaktionsgemisches in Lösungsmittel B zeigte, daß neben nicht umgesetzten UpI zwei weitere Dinucleosidphosphate vorhanden waren. Das Gemisch der Dinucleosidphosphate wurde quantitativ von Pancreas Ribonuclease hydrolysiert. Als Hydrolyseprodukte wurden Uridin 3'-phosphat und ein Gemisch von Nucleosiden beobachtet. Die Nucleoside wurden durch Elektrophorese abgetrennt und in den Lösungsmitteln A und B chromatographiert. Dabei erfolgte Trennung in Inosin, 5-(*N*-Formyl, *N*-methyl)amino-6-(*D*-ribofuranosyl)-aminopyrimidin-4-on und 3-Methyl-5-(*N*-formyl, *N*-methyl)amino-6-(*D*-ribofuranosyl)aminopyrimidin-4-on. Die Identifizierung gelang durch Ultraviolettpektren und Vergleich mit authentischem Material. Das Verhältnis der Nucleoside gibt Tabelle III wieder. Unter den Bedingungen der Methylierung von UpI scheint ein Teil des gebildeten Up-7-MeI zu hydrolysieren, bevor es durch Dimethylsulfat ein zweites Mal methyliert werden kann. Es ist interessant festzustellen, daß die beiden methylierten Dinucleosidphosphate von Schlangengiftphosphodiesterase nicht gespalten wurden.

DISKUSSION

Bei der Methylierung von RNA, Polynucleotiden und Diribonucleosiden durch Diazomethan wurde neben einer unspezifischen Alkylierung der heterocyclischen Basen eine Spaltung der Internucleotidbindung beobachtet. Nach den Untersuchungen von HAINES, REESE UND LORD TODD¹² sowie MICHELSON UND POCHON¹³ war zu erwarten daß bei der Methylierung von Ribopolynucleotiden durch Dimethylsulfat bei pH 7 die Internucleotidbindung nicht gespalten wird. Die Phosphodiesterbindung in UpI war unter unseren Reaktionsbedingungen bei der Reaktion mit Dimethylsulfat tatsächlich völlig stabil.

Die Methylierung von Inosin durch Diazomethan in organischen Lösungsmitteln führt zu 1-Methylinosin, 7-Methylinosin und 9-(β , *D*-ribofuranosyl)-6-methoxypurin. In Wasser von pH 7 entstehen zunächst die gleichen Produkte. 7-Methylinosin jedoch, das unter diesen Bedingungen nicht stabil ist, hydrolysiert zu 5-(*N*-Formyl, *N*-methyl)amino-6-(*D*-ribofuranosyl)aminopyrimidin-4-on, das durch Diazomethan in das entsprechende 3-Methylderivat überführt werden kann. Während die Methylierung von Inosin durch Methyljodid in organischen Lösungsmitteln ausschließlich zu 7-Methylinosin führt, erhält man durch Methylierung von 2', 3'-Isopropylideninosin mit Dimethylsulfat bei pH 7 ausschließlich 3-Methyl-5-(*N*-formyl, *N*-methyl)amino-6-(*D*-2', 3'-*O*-isopropylidenribofuranosyl)-aminopyrimidin-4-on.

Die Methylierung von UpI durch Dimethylsulfat bei pH 7 erfolgte spezifisch am Hypoxanthin-Rest, wobei schließlich Ringöffnung unter Bildung von 3-Methyl-5-(*N*-formyl, *N*-methyl)-6-aminopyrimidin-4-on bzw. 5-(*N*-Formyl, *N*-methyl)-6-aminopyridin-4-on eintrat. Diese Ringöffnung ist unseres Erachtens bei diesen Reaktionsbedingungen und der Art der Isolierung der Reaktionsprodukte (Papierchromatographie, Säulenchromatographie oder Elektrophorese in wässrigen Systemen) unver-

meidbar. Es ist wahrscheinlich, daß MICHELSON UND POCHON bei dem Versuch 1,7-Dimethylinosin und Poly 1,7-dimethylinosylsäure aus Inosin bzw. Polyinosylsäure durch Methylierung mit Dimethylsulfat darzustellen, Verbindungen erhielten, die ebenfalls die heterocyclische Base 3-Methyl-5 (*N*-formyl, *N*-methyl)amino-6-amino-pyrimidin-4-on enthielten. Wir möchten darauf hinweisen, daß bei der totalen sauren Hydrolyse durch 1 M HCl bei 100°, die zur Freisetzung der heterocyclischen Basen führt, eine Cyclisierung der bei der Methylierung entstandenen Pyrimidine-ivate erfolgt. Im Falle des methylierten UpI findet man nach der sauren Hydrolyse Uracil, 7-Methylhypoxanthin und 1,7-Dimethylhypoxanthin.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Methylierung von Inosin durch Diazomethan bei pH 7 führte zu 1-Methyl-inosin, 7-Methylinosin, 9-(β , D-Ribofuranosyl)-6-methoxypurin, 5-(*N*-Formyl, *N*-methyl)amino-6-(D-ribofuranosyl)aminopyrimidin-4-on und 3-Methyl-5-(*N*-formyl, *N*-methyl)amino-6-(D-ribofuranosyl)aminopyrimidin-4-on. Die Reaktion von 2',3'-*O*-Isopropylideninosin und Dimethylsulfat bei pH 7 ergab als einziges Reaktionsprodukt 3-Methyl-5-(*N*-formyl, *N*-methyl)amino-6-(D-2',3'-*O*-isopropylidenribofuranosyl)aminopyrimidin-4-on. Die Ultraviolett- und NMR-Spektren dieser Verbindungen werden diskutiert. Die Methylierung von Uridyl-(3'-5')-inosin durch Dimethylsulfat bei pH 7 erfolgte ohne Spaltung der Phosphodiesterbindung selektiv am Hypoxanthin-Rest. Dabei wurde Ringspaltung zu 3-Methyl-5-(*N*-formyl, *N*-methyl)-6-amino-pyrimidin-4-on und 5-(*N*-Formyl, *N*-methyl)-6-aminopyrimidin-4-on beobachtet.

LITERATUR

- 1 H. DOEPNER, H. SEIDEL UND F. CRAMER, *Angew. Chem.*, 78 (1966) 682.
- 2 J. P. EBEL, N. BEFORT, J. DUVAL, H. YOSHIDA, J. HEINRICH UND J. H. WEIL, *Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Biologische Chemie, Tübingen, 1967*, Ges. Biol. Chem., Frankfurt a. M., 1967, p. 7.
- 3 G. ZUBAY, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 14 (1964) 272.
- 4 J. A. NELSON UND R. W. HOLLEY, *Federation Proc.*, 26 (1967) 733.
- 5 C. BOLLACK, G. KEITH UND J. P. EBEL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 765.
- 6 A. HOLY UND K. H. SCHEIT, *Biochim. Biophys. Acta*, 238 (1967) 230.
- 7 H. T. MILES, *J. Org. Chem.*, 26 (1961) 4761.
- 8 J. W. JONES UND R. K. ROBINS, *J. Am. Chem. Soc.*, 85 (1963) 193.
- 9 P. BROOKES UND P. D. LAWLRY, *J. Chem. Soc.*, (1961) 3923.
- 10 J. A. HAINES, C. B. REESE UND LORD TODD, *J. Chem. Soc.*, (1962) 5281.
- 11 E. KRIECK UND B. EMMELOT, *J. Biochem.*, 2 (1963) 733.
- 12 J. A. HAINES, C. B. REESE UND LORD TODD, *J. Chem. Soc.* (1964) 1406.
- 13 A. M. MICHELSON UND F. POCHON, *Biochim. Biophys. Acta*, 114 (1966) 469.

Biochim. Biophys. Acta, 149 (1967) 344-354