

Schema 2. Synthese von Cordycepin. a) 1% OsO_4 , N -Methylmorpholinoxid (NMO), $\text{THF}/t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (67%); b) Ac_2O , Et_3N , CH_2Cl_2 (90%, 13:4:3:1-Gemisch); c) N^7 -Benzoyl- N^4,N^7 -bis(trimethylsilyl)adenin, $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$, $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, 83 °C (65%); d) NaOMe , MeOH (42%).

schen Untersuchungen von Nucleosid-Wirkstoffen sowie von Nucleotid-Polymeren wie DNA und RNA eingesetzt werden.

Eingegangen am 4. August 1994 [Z7208]

Stichworte: Asymmetrische Synthesen · Cyclisierungen · Nucleoside

Elektronenübertragung in DNA: Ruthenium-Elektronendonor- und -acceptorkomplexe als ortsspezifische Modifikationen doppelsträngiger DNA **

Thomas J. Meade* und Jon F. Karyem

Intramolekulare Elektronenübertragungen sind sowohl in Protein-Protein-Komplexen als auch in modifizierten Proteinen über größere Entfernungen mit biologisch signifikanten Geschwindigkeiten möglich^[1, 2]. Diese Elektronenübertragungen hängen nicht nur von der zu überbrückenden Distanz und der Freien Enthalpie ab, sondern auch von der Reorganisation in der Ligandenhülle und der Solvensumgebung^[3].

Zwei Faktoren, die in anorganischen und organischen Systemen die Geschwindigkeit der Elektronenübertragung beeinflussen, sind weniger gut verstanden: die Struktur des verbrückenden Mediums und die Orientierung von Donor und Acceptor. Die Entwicklung eines Systems, an dem sich diese Parameter untersuchen lassen, ist eine Voraussetzung, um die Mechanismen der Elektronenübertragung über große Entfernungen aufklären zu können.

Komplementäre DNA-Einzelstränge bilden eine strukturell genau definierte Doppelhelix, d. h. Oligonucleotide sollten sich als molekulare Matrizen eignen, um an definierten Positionen Redoxzentren anzubringen, die photochemisch aktiv und spektroskopisch erfassbar sind. Nach den Ergebnissen einer neueren theoretischen Arbeit^[4] könnte die Nucleotidsequenz derart modifizierter DNA die Kopplung zwischen Elektronendonator und -acceptor nachhaltig beeinflussen.

Um diese Annahme zu prüfen, haben wir einen neuen Zugang zu DNA-Doppelsträngen mit Ruthenium-Modifikationen entwickelt, wobei sich der Abstand zwischen Donor und Acceptor auf eine beliebige Zahl von Basenpaaren einstellen läßt. Das Ziel war die Herstellung einer Serie von Ruthenium-modifizierten DNA-Derivaten, bei denen 1. die Rutheniumkomplexe fest an einer bestimmten Position der Doppelhelix gebunden sind, 2. das Redoxpotential eines jeden Komplexes unabhängig eingestellt werden kann, 3. die Struktur der DNA-Doppelhelix von der Gegenwart der Rutheniumkomplexe unberührt bleibt und 4. sich die Redoxzustände von Donor und Acceptor spektroskopisch unterscheiden lassen. Die neue Synthesestrategie ermöglicht es, Redoxzentren unterschiedlichen Potentials an eine Reihe von Oligonucleotiden zu koppeln (Abb. 1). Diese müssen dazu an der 5'-terminalen Ribose in 2'-Position eine primäre Aminogruppe aufweisen. Anhand der an diesem System gemessenen Elektronenübertragungsgeschwindigkeiten sollte es möglich sein, genaueren Einblick in die Kopplung zwischen Elektronendonator und -acceptor zu erhalten.

Unsere Strategie zur Derivatisierung von DNA mit Übergangsmetallkomplexen unterscheidet sich von der vorausgegangenen Arbeiten über die Modifikation von Oligonucleotiden mit organischen Verbindungen und Metallkomplexen, bei denen die Fragmente an die endständigen Phosphatgruppen^[5, 6], an heterocyclische Basen^[7-11] und an Ribosen^[12, 13] gekoppelt wur-

* Dr. T. J. Meade, Dr. J. F. Karyem
Division of Biology and The Beckman Institute
California Institute of Technology
Pasadena, CA 91125 (USA)
Telefax: Int. + 818/449-5163

** Diese Arbeit wurde von den Donors of The Petroleum Research Fund (verwaltet von der American Chemical Society), der Research Corporation und dem Biological Imaging Center des Beckman Institute gefördert. Wir danken Harry Gray, Jay Winkler, I-Jy Chang und Robert Kaiser (alle California Institute of Technology) für hilfreiche Diskussionen.

- [1] a) H. Mitsuya, S. Broder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 1911; b) D. M. Huryn, M. Okabe, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1745; c) M. I. Johnston, D. F. Hoth, *Science* **1993**, *260*, 1286.
- [2] a) J. Balzarini, G.-j. Kang, M. Dalal, P. Herdewijn, E. de Clercq, S. Broder, D. G. Johns, *Mol. Pharmacol.* **1987**, *32*, 162; b) M. M. Mansuri, J. E. Starrett, I. Ghazzouli, M. J. M. Hitchcock, R. Z. Sterzycki, V. Brankovan, T.-S. Lin, E. M. August, W. H. Prusoff, J.-P. Sommadossi, J. C. Martin, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 461. c) Stavudin wurde vor kurzem von der United States Food and Drug Administration zur Behandlung von AIDS- und HIV-Infektion zugelassen: *Chem. Eng. News* **1994**, *72* (27), 22.
- [3] a) E. A. Kaczka, E. L. Dulaney, C. O. Gitterman, H. B. Woodruff, K. Folkers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1964**, *14*, 452; b) E. Walton, F. W. Holly, G. E. Boxer, R. F. Nutt, S. R. Jenkins, *J. Med. Chem.* **1965**, *8*, 659; c) S. Penman, M. Rosbach, M. Penman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *67*, 1878.
- [4] a) A. Todd, T. L. V. Ulbricht, *J. Chem. Soc.* **1960**, 3275; b) W. W. Lee, A. Benitez, C. D. Anderson, L. Goodman, B. R. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 1906; c) J. Horwitz, J. Chua, M. A. Da Rooze, M. Noel, I. L. Klundt, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 205; d) C. J. Rizzo, J. P. Dougherty, R. Breslow, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4129.
- [5] C. U. Kim, P. F. Misco, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5733.
- [6] a) Zu Synthesen von AZT ausgehend von achiralen Vorstufen siehe: M. W. Hager, D. C. Liotta, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5117; b) M. E. Jung, J. M. Gardiner, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2614.
- [7] F. E. McDonald, C. B. Connolly, M. M. Gleason, T. B. Towne, K. D. Treiber, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6952.
- [8] Y. Gao, J. M. Klunder, R. M. Hanson, H. Masamune, S. Y. Ko, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5765.
- [9] a) N. Ikeda, I. Arai, H. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 483; b) E. J. Corey, C.-M. Yu, D.-H. Lee, *ibid.* **1990**, *112*, 878.
- [10] a) H. Kawakami, T. Ebata, K. Koseki, K. Okano, K. Matsumoto, H. Matsushita, *Heterocycles* **1993**, *36*, 665; b) J. Wang, J. A. Wurster, L. J. Wilson, D. Liotta, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4881.
- [11] Allylalkohol ist zwar nach 24 h bei -20 °C noch nicht vollständig umgesetzt, aber die Epoxidierung wird an dieser Stelle abgebrochen, um einen hohen Enantiomerenüberschuß des Pivalinsäureglycidylesters **2** zu gewährleisten. Die Nebenprodukte (Pivalinsäureallylester und 2-Phenyl-2-propanol) werden chromatographisch an Kieselgel entfernt.
- [12] M. Yamaguchi, I. Hirao, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 391.
- [13] M. Bednarski, S. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7060.
- [14] F. W. Lichtenthaler, P. Voss, A. Heerd, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 2141.
- [15] a) T.-S. Lin, M.-Z. Luo, M.-C. Liu, S. B. Pai, G. E. Dutschman, Y.-C. Cheng, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 171; b) T.-S. Lin, M.-Z. Luo, M.-C. Liu, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3477.
- [16] a) P. C. Kline, A. S. Serianni, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7373; b) E. P. Nikonowicz, A. Pardi, *Nature (London)* **1992**, *355*, 184; c) R. T. Batey, M. Inada, E. Kujawinski, J. D. Puglisi, J. R. Williamson, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4515; d) M. J. Michnicka, J. W. Harper, G. C. King, *Biochemistry* **1993**, *32*, 395; e) S. Quant, R. W. Wechselberger, M. A. Wolter, K.-H. Wörner, P. Schell, J. W. Engels, C. Griesinger, H. Schwalbe, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6649.

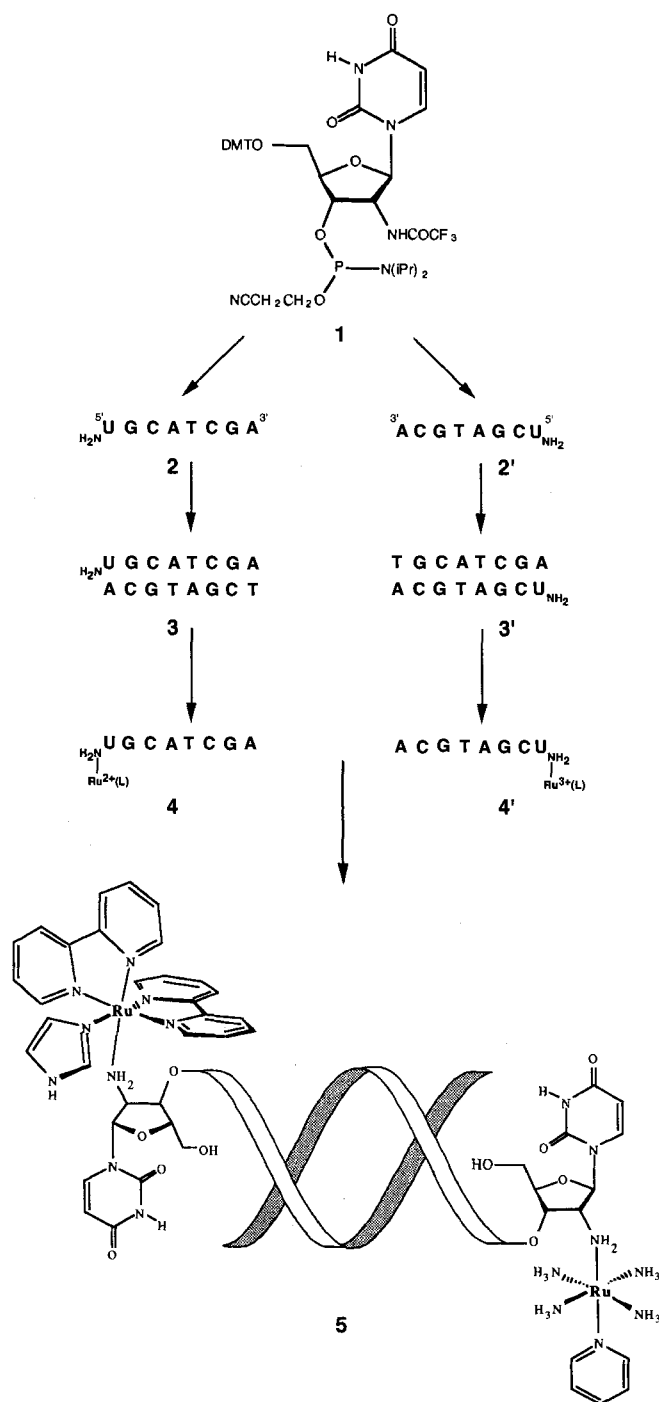


Abb. 1. Schema der Herstellung der mit Donor und Acceptor modifizierten Doppelstrang-DNA. Über automatische Synthese an fester Phase wird das mit einer DMT-2'-*N*-Trifluoracetyl-Gruppe geschützte Phosphoramidit 1 in das Oligodesoxyribonucleotid 2/2' eingebaut; dieses wird dann mit einem komplementären Strang „geschützt“ (Bildung von 3/3'). Im Anschluß an die Reaktion mit dem Rutheniumkomplex wird dieser Schutzstrang entfernt (\rightarrow 4/4'). Die modifizierten Oligonucleotide werden gereinigt und schließlich zu 5 gepaart. Abkürzungen: U_{NH₂}, 2'-Amino-2'-desoxyuridin, L, 2,2'-Bipyridin, Imidazol, Pyridin, NH₃, DMT (Dimethoxytrityl).

den. Wir haben zwei Sätze jeweils komplementärer Oligonucleotide mit endständiger Aminoribose^[14] synthetisiert; die 8–14 Basenpaare langen Oligonucleotide wurden dann mit den redoxaktiven Rutheniumkomplexen modifiziert. Anders als Fluoreszenzmarker wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC) würden diese Komplexe auch mit den Stickstoffgruppen der heterocyclischen Basen reagieren. Deshalb dient eine unmodifizierte

komplementäre Sequenz als große, über Wasserstoffbrücken gebundene Schutzgruppe, um die empfindlichen Basenpositionen für den Metallkomplex unzugänglich zu machen^[15]. Die primäre 2'-Aminogruppe der 5'-endständigen Ribose läßt sich unter diesen Bedingungen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Rutheniumkomplexe modifizieren. Zugleich wird die zufallsbedingte Modifikation der Heterocyclen in einigen Fällen vollkommen vermieden oder aber zumindest deutlich reduziert.

Unter Abwandlung bekannter Verfahren^[12] wurde das DMT-2'-*N*-Trifluoracetyl-geschützte Phosphoramidit 1 von 2'-Amino-2'-desoxyuridin (U_{NH₂}) hergestellt; durch automatisierte DNA-Synthese an fester Phase^[16] wurden dann die Oligodesoxyribonucleotide 2/2' zusammengesetzt. Sie wurden mit ihrer komplementären Sequenz gepaart (Bildung von 3/3'). Darauf hin wurde die U_{NH₂}-haltige Doppelhelix sukzessive mit [Ru(bpy)₂CO₃] und Imidazol unter inerter Atmosphäre umgesetzt. Der zurückgewonnene DNA-Doppelstrang wurde mit 7 M Harnstoff denaturiert und das Ruthenium-modifizierte Oligonucleotid 4^[17] über HPLC an C-18-Umkehrphase gereinigt (Abb. 2). Um den

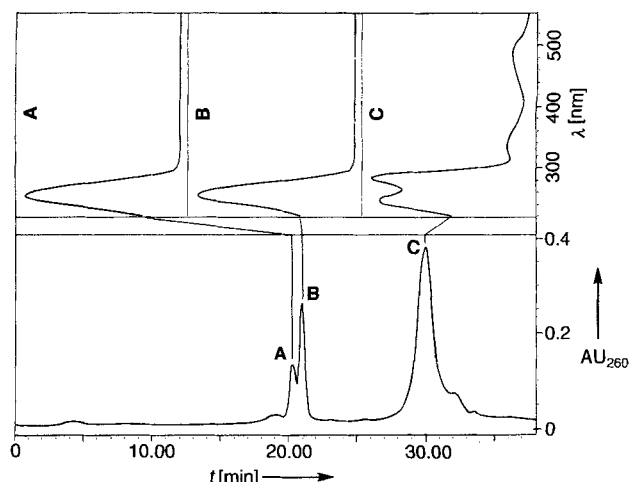


Abb. 2. HPL-Chromatogramm und UV/Vis-Spektren der doppelsträngigen DNA nach Modifizierung mit Ruthenium. Die Oligonucleotide wurden in 7 M Harnstoff bei 60 °C denaturiert und an C-18-Umkehrphase mit einem Gradienten von 2% auf 40% CH₃CN in 7 M Harnstoff und 0.1 M Triethylammoniumacetat (pH 6.5) analysiert. Bei Peak A (25.4% CH₃CN) handelt es sich um unmodifiziertes Amino-Oligonucleotid (U_{NH₂}GCATCGA), bei Peak B (27.7% CH₃CN) um den zu A komplementären Strang (ACGTAGCT); Peak C (38.3% CH₃CN) entspricht Ruthenium-modifiziertem A (U_{NH₂}Ru(bpy)₂imGCATCGA), wobei das Absorptionsspektrum mit dem Vorhandensein eines einzelnen, kovalent an das Oligonucleotid gebundenen [Ru(bpy)₂im(U_{NH₂)]-Komplexes in Einklang steht. Peak A, B und C wurden durch Coinjektion authentischer Proben sowie durch HPLC-Analyse der Nucleosidzusammensetzung im Anschluß an die enzymatische Verdauung (alkalische Phosphatase, Phosphodiesterase) identifiziert.}

komplementären Strang mit [Ru(NH₃)₄(py)]²⁺ als Acceptor zu erzeugen, wurde 3 einer analogen Prozedur unterworfen. Abschließend konnte durch Paarung der beiden Ruthenium-modifizierten Oligonucleotide 4 und 4' die gewünschte Doppelhelix 5 mit kovalent gebundenem Donor und Acceptor erhalten werden.

Die Ru-modifizierten Oligonucleotide wurden durch Fluoreszenzmarkierung, enzymatische Verdauung und Schmelzpunktanalysen der Doppelhelices charakterisiert. Es wurden Markierungsversuche mit FITC unter Bedingungen vorgenommen, die die Reaktion mit primären Aminen begünstigen. Wie erwartet, wurden ausschließlich die 2'-Aminogruppen der 2'-Desoxyribose markiert, was das Vorhandensein primärer Amine an der DNA bestätigt. Die Schmelztemperaturen von Ru-freien und

Ru-haltigen Oligomeren gleichen sich bei thermischen De- und Renaturierungsexperimenten^[18]. Darüber hinaus wurde die Amino-modifizierte Doppelstrang-DNA durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie charakterisiert^[19]. Aus den Daten geht hervor, daß die Donoren und Acceptoren an die 2'-Amino-2'-desoxyribose gebunden sind und die DNA-Struktur durch die Rutheniumkomplexe nicht gestört wird.

Kinetische Messungen (direkte Bestrahlung und Flash-Quench-Technik)^[20] ergaben für die intramolekulare Elektronenübertragung in der mit dem Acceptor [Ru(bpy)₂(im)]³⁺ und dem Donor [Ru(NH₃)₄(py)]²⁺ modifizierten, acht Basenpaare langen DNA-Doppelhelix eine Geschwindigkeitskonstante von $1.6(4) \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ (Abstand zwischen den Metallzentren: $21 \text{ \AA}^{[21]}$). Da die Triebkraft für diesen Elektronentransfer ($-\Delta G^\circ \approx 0.7 \text{ eV}$) weit unter der berechneten Reorganisationsenergie liegt ($\lambda \approx 0.9 \text{ eV}^{[3, 20, 22]}$), ist für die aktivierungslose Elektronenübertragung zwischen den Rutheniumzentren eine Geschwindigkeitskonstante von ungefähr $2.5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ zu erwarten. Für His39-modifiziertes Cytochrom c (Fe-Ru-Abstand $20.3 \text{ \AA}^{[23]}$), hinsichtlich der Elektronenübertragung eines der effizientesten Proteinsysteme, wurde ein sehr ähnlicher k_{max} -Wert bestimmt.

Um die Abhängigkeit der Elektronenübertragung in DNA vom Abstand zwischen den Redoxzentren sowie der Basenabfolge und den π -Stapelwechselwirkungen zu ermitteln, müssen weitere Geschwindigkeitskonstanten bestimmt werden.

Eingegangen am 4. Juli,
ergänzte Fassung am 30. September 1994 [Z 7094]

Stichworte: Bioanorganische Chemie · Elektronentransfer · Oligonucleotide · Rutheniumverbindungen

- [1] B. E. Bowler, A. L. Raphael, H. B. Gray, *Prog. Inorg. Chem.* **1990**, *38*, 259–323.
- [2] *Met. Ions Biol. Syst.* **1991**, 27.
- [3] J. R. Winkler, H. B. Gray, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 369–379.
- [4] S. M. Risser, D. N. Beratan, T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2508–2510.
- [5] N. T. Thuong, C. Hélène, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 697–723; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 666–690.
- [6] J. L. Mergny, S. Boutorine, T. Garestier, F. Belloc, M. Rougée, N. V. Bulychév, A. A. Koshkin, J. Bourson, A. V. Lebedev, B. Valeur, N. T. Thuong, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 920–928.
- [7] U. Englisch, D. H. Gauss, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 629–646; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 613–629.
- [8] J. Tesler, K. A. Cruickshank, L. E. Morrison, T. L. Netzel, C. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7221–7226.
- [9] J. Goodchild, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 165–187.
- [10] A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8153–8159.
- [11] C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, J. K. Barton, *Science* **1993**, *262*, 1025–1029.
- [12] M. Imazawa, F. Eckstein, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2039–2041.
- [13] P. S. Müller, P. Bhan, L. S. Kan, *Nucleosides Nucleotides* **1993**, *12*, 785–792.
- [14] H. Aaurp, T. Tuschgi, F. Benseler, J. Ludwig, F. Eckstein, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 20–24.
- [15] Ungeschützte Oligonucleotide reagieren sehr bereitwillig mit den Ruthenium-komplexen und isolierte Reaktionsprodukte weisen Markierungen an mehreren Positionen auf.
- [16] *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (Hrsg.: F. Eckstein), Oxford Univ. Press, Oxford, **1991**.
- [17] Die Ausbeute an Ruthenium-modifizierter Aminoribose im Doppelstrang beträgt in der Regel 25% (siehe Abb. 2, Peak C).
- [18] Zur Bestimmung der Temperatur, bei der die DNA-Stränge zu 50% dissoziiert vorliegen (T_m), wurden De- und Renaturierung in 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 7.0 und 0.9 M NaCl durchgeführt. Dabei wurde ein Spektrometer mit Diodenarray-Detektor (Hewlett Packard 8452A) sowie ein Zusatzgerät zur Temperaturkontrolle (Hewlett Packard 89090A) eingesetzt. Unmodifizierte Octamere (Kontrollen) zeigten einen einfachen Helix-Knäuel-Übergang und ein T_m von 45°C. T_m der Oligomere mit Aminoribose lag mit 40°C niedriger.

Nach Hybridisierung mit den unmodifizierten Komplementärsträngen zeigten die Ruthenium-haltigen Oligomere einen breiten Helix-Knäuel-Übergang zwischen 36 und 42 °C. Alle kinetischen Messungen wurden in Gegenwart von 1 M Na⁺ durchgeführt um sicher zu stellen, daß die modifizierten Oligonucleotide bei Raumtemperatur (22 °C) gepaart vorliegen.

[19] J. F. Karryem, Y. Hi, S. L. Mayo, T. J. Meade, unveröffentlicht.

[20] I.-J. Chang, H. B. Gray, J. R. Winkler, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7056–7057.

[21] Der Abstand zwischen den Metallzentren wurde durch Molecular-Modeling ermittelt.

[22] G. M. Brown, N. Sutin, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 883–892.

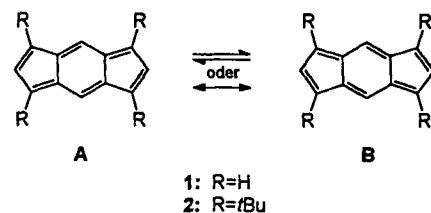
[23] D. R. Casimiro, J. H. Richards, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 13073–13077.

1,3,5,7-Tetra-*tert*-butyl-4-aza- und 1,3,5,7-Tetra-*tert*-butyl-4-phospha-s-indacen**

Teodor Silviu Balaban, Stefan Schardt, Volker Sturm
und Klaus Hafner*

Professor Wolfgang Lüttke zum 75. Geburtstag gewidmet

s-Indacen **1**^[1], ein tricyclisches, nichtalternierendes [4n]π-System, war wiederholt Gegenstand theoretischer und experimenteller Untersuchungen. Formal läßt sich **1** als durch zwei σ-Bindungen gestörtes [12]Annulen und somit als antiaromatische Verbindung auffassen. Dementsprechend legten bisherige Rechnungen^[2–4] für **1** einen Grundzustand mit lokalisierten Doppelbindungen und den C_{2h}-symmetrischen π-Bindungsisomeren **1A** und **1B** nahe.



Im Gegensatz zu dem nicht isolierbaren **1** erwies sich das kinetisch stabilisierte 1,3,5,7-Tetra-*tert*-butyl-*s*-indacen **2** als beständige Verbindung. Die aus Röntgenstrukturanalysen^[5, 6] ermittelte D_{2h} -Struktur von **2** mit Bindungslängenausgleich wurde auf einen ungewöhnlich starken elektronischen Einfluß der *tert*-Butylgruppen zurückgeführt^[7]. Nach jüngsten quantenchemischen Berechnungen von Koch et al.^[8] liegt dagegen auch **1** im Grundzustand als delokalisiertes π -System mit D_{2h} -Struktur vor. Die geringe Beständigkeit von **1** wird dem beträchtlichen Singulett-Diradikalcharakter des *s*-Indacensystems zugeschrieben.

Nur wenige Untersuchungen von Hetero-*s*-indacenen wurden bisher bekannt. Das von Gompper et al. hergestellte, donorsubstituierte 1,3,5,7-Tetrakis(diethylamino)-2,6-diaza-*s*-indacen^[9]

[**] Prof. Dr. K. Hafner, Dipl.-Ing. S. Schardt
Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule
Petersenstraße 22, D-64287 Darmstadt
Telefax: Int. + 6151/16-3574
Dr. T. S. Balaban
C. D. Nenitzescu Institute of Organic Chemistry, Bukarest (Rumänien)
Dr. V. Sturm
Freudenberg, Weinheim

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie und von der Dr.-Otto-Röhm-Gedächtnisstiftung, Darmstadt, gefördert. T. S. B. dankt der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für ein Forschungsstipendium.