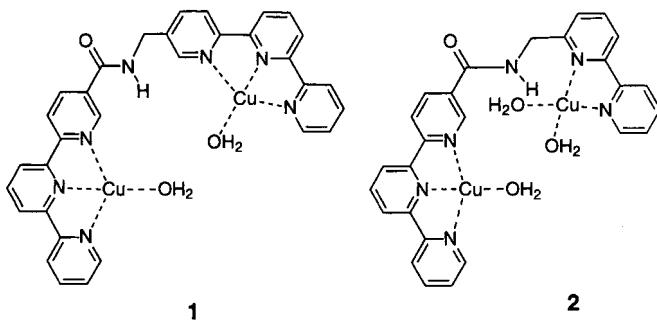


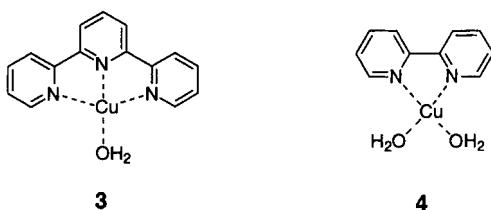
Schnelle und hochselektive Spaltung von cyclischen Ribonucleosid-2',3'-monophosphaten durch zweikernige Cu^{II}-Komplexe**

Shanghao Liu, Zhiyong Luo und Andrew D. Hamilton*

In den letzten Jahren hat das Interesse am Design neuer Katalysatoren für die Hydrolyse von Phosphodiestergruppen in DNA und RNA zugenommen.^[1,2] Diese künstlichen Nucleasen haben viele mögliche Anwendungen – als Mittel gegen Krebs oder Viren^[2*a*–*j*,^{3–5}] und als künstliche Restriktionsnucleasen.^[1,6] Da in den aktiven Zentren vieler natürlicher Nucleasen Metallionen gefunden wurden,^[6,7] überrascht es nicht, daß Metallkomplexe eine bedeutende Klasse künstlicher Katalysatoren für die Hydrolyse von Phosphodiestern bilden.^[1,2] Inspiriert durch natürliche Nucleasen, die in ihren aktiven Zentren über zwei Metallionen verfügen, haben einige Forschungsgruppen zweikernige Metallkomplexe entwickelt, die eine deutlich höhere Aktivität zeigen als einkernige Metallkomplexe.^[2*a*,*b*,*d*–*g*,^{8–11}] Wir stellten kürzlich fest, daß die Umesterung der RNA-Modellverbindung 2-Hydroxypyropyl-*para*-nitrophenylphosphat von den zweikernigen Cu^{II}-Komplexen **1** und **2** besser katalysiert wird als von den einkernigen Komplexen **3** und **4**.^[12] Hier berichten wir nun



2



3

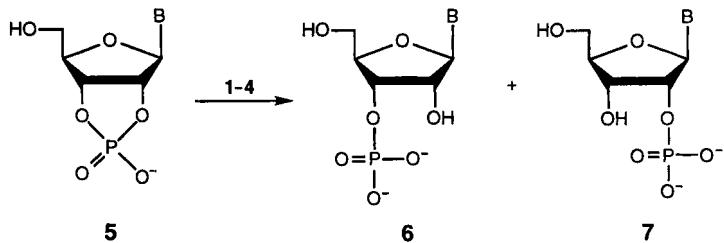
4

darüber, daß **1** und **2** bei der basen- und regioselektiven Hydrolyse von cyclischen Ribonucleosid-2',3'-monophosphaten **5**,^[13] Zwischenstufen der RNA-Hydrolyse, ebenfalls wirksamer sind als **3** und **4** (Schema 1).^[14]

Die Hydrolyse von **5a–d** in Gegenwart von **1–4** im Überschuß wurde mit HPLC verfolgt, und alle Reaktionen folgten einer Kinetik erster Ordnung. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse von **5a** in Gegenwart von **1** und **2** hängt vom pH-Wert ab (Abb. 1) und erreicht ihr Maximum bei pH 7.5. Demzufolge wurden alle anderen Reaktionen bei diesem pH-

[*] Prof. A. D. Hamilton, Dr. S. Liu, Z. Luo
Department of Chemistry, University of Pittsburgh
Pittsburgh, PA 15260 (USA)
Telefax: Int. + 412/624-1298
E-mail: ANDHAM+@pitt.edu

[**] Diese Arbeit wurde durch die National Institutes of Health (GM 53579) unterstützt.



Schema 1. Spaltung cyclischer Ribonucleosid-2',3'-monophosphate **5** durch die Kupferkomplexe **1–4**. **a**, B = Adenin, **b**, B = Guanin, **c**, B = Uracil, **d**, B = Cytosin.

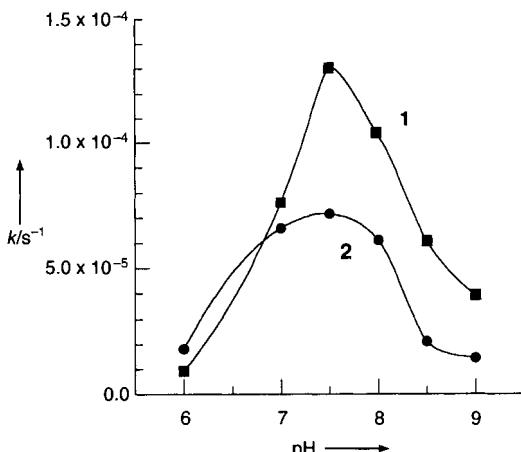


Abb. 1. Zusammenhang zwischen pH-Wert und Geschwindigkeit (ausgedrückt als Geschwindigkeitskonstante *k*) der Hydrolyse von **5a** (0.2 mM) bei 20°C in Gegenwart von **1** oder **2** (1.0 mM). Die Reaktionsmedien sind bei pH 7.0, 7.5 und 8.0 HEPES-Puffer (0.05 M), bei pH 8.5 und 9.0 AMPSO-Puffer (0.05 M) und bei pH 6.0 der MES-Puffer (0.05 M).

Wert durchgeführt. In Tabelle 1 sind die Geschwindigkeitskonstanten und Regioselektivitäten der durch **1–4** katalysierten Hydrolysen von **5a–d** zusammengefaßt. Die zweikernigen Komplexe **1** und **2** sind tatsächlich aktiver als die

Tabelle 1. Geschwindigkeitskonstanten *k* und Selektivitäten der Hydrolyse von **5** in Gegenwart von **1–4** unter Bedingungen für eine Kinetik erster Ordnung (hoher Überschuß an **1–4**) [a].

Nr.	Substrat	Katalysator	<i>k</i> × 10 ⁶ [s ⁻¹]	Selektivität [b]
1	5a	1	130 ± 17	0.48 ± 0.01
2	5a	2	71.6 ± 7.7	1.92 ± 0.02
3	5a	3	2.03 ± 0.01	0.69 ± 0.01
4	5a	4	3.41 ± 0.11	2.97 ± 0.12
5	5a	–	0.0015 [c]	1.2 [c]
6	5b	1	713 ± 92	5.9 ± 0.1
7	5b	2	2.31 ± 0.15	0.73 ± 0.01
8	5b	3	1.56 ± 0.10	1.54 ± 0.05
9	5b	4	3.11 ± 0.43	3.45 ± 0.05
10	5b	–	0.0011 [c]	1.1 [c]
11	5c	1	360 ± 25	0.056 ± 0.002 (17.7 ± 0.5 [d])
12	5c	2	6.85 ± 0.35	0.62 ± 0.03
13	5c	3	1.26 ± 0.02	1.96 ± 0.02
14	5c	4	1.10 ± 0.05	2.01 ± 0.17
15	5c	–	0.00056 [c]	1.0 [c]
16	5d	1	84 ± 2	0.093 ± 0.003 (10.7 ± 0.3 [d])
17	5d	2	11.9 ± 0.9	1.20 ± 0.01
18	5d	3	0.84 ± 0.07	1.17 ± 0.02
19	5d	4	1.04 ± 0.22	1.86 ± 0.02
20	5d	–	0.00074 [c]	0.9 [c]

[a] Bei pH 7.5 (0.05 M HEPES-Puffer), 20°C; [1/2] = 1.0 mM, [3/4] = 2.0 mM, [5] = 0.2 mM; alle Werte von *k* und der Selektivität sind Mittelwerte zweier gleichartiger Durchläufe. [b] Verhältnis 6/7. [c] Aus den Daten bei pH 11.08 in Lit.[15] berechnet. [d] Verhältnis 7/6.

einkernigen Komplexe **3** und **4**. So beschleunigt **1** die Hydrolyse von **5b** fast 500mal mehr als **3** (Tabelle 1, Nr. 6 und 8), und auch durch **2** wird die Hydrolyse von **5a** stärker beschleunigt als durch **3** und **4**, wenn auch der Unterschied nicht so deutlich ist: Sie wird ungefähr 35- bzw. 22mal schneller (Tabelle 1, Nr. 2–4). Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die beiden Cu^{II}-Ionen in **1** und **2** bei der Beschleunigung der Hydrolyse von **5a–d** eng zusammenwirken.

Noch interessanter ist der Befund, daß die zweikernigen Komplexe deutlich basen- und regioselektiver sind als die einkernigen Komplexe, wobei die Selektivitätsrichtung in einigen Fällen zudem umgekehrt ist. Zum Beispiel wird **5b** 6mal schneller hydrolysiert als **5a**, wenn **1** zugesetzt wird, aber etwas *langsamer* als **5a** mit **3** als Katalysator (Tabelle 1, Nr. 6/1 und 8/3). Der zweikernige Komplex **1** ist nicht nur der aktivste, sondern auch der regioselektivste Katalysator unter den vier Komplexen: Er spaltet beispielsweise die P-O(3')-Bindung in **5c** 17mal schneller als die P-O(2')-Bindung (Abb. 2 und Tabelle 1, Nr. 11). Im Gegensatz dazu spalten

Komplexe **1** und **2** spalten **5a–d** sowohl mit hoher Aktivität (bis zu 10⁶mal schneller als ohne Katalysator, Tabelle 1, Nr. 6 und 10), als auch mit bemerkenswerter Basen- und Regioselektivität. In dieser Hinsicht ähneln **1** und **2** den natürlichen Nucleasen stärker als die meisten anderen Nucleasemimeta. Interessanterweise führt die Selektivität von **1** bei der Spaltung von **5c** und **5d** zu mehr Nucleosid-2'-monophosphat (**7c** bzw. **7d**) als zu Nucleosid-3'-monophosphat (**6c** bzw. **6d**) und ist damit entgegengesetzt zu der natürlicher Nucleasen oder der wenigen anderen Nucleasemimeta, die Regioselektivität zeigen. Diese umgekehrte Regioselektivität könnte nützlich sein, da die Reaktivitäten der 2'- und 3'-Hydroxygruppen bei der enzymatischen Behandlung von RNA ziemlich unterschiedlich sind.

Natürliche Nucleasen erzielen ihre hohe Basen- und Regioselektivität durch Erkennen und Binden der Nucleotidbasen in der zu spaltenden RNA-Region. Wir glauben aufgrund der Analyse der Daten in Tabelle 1, daß **1** und **2** nach ähnlichen Mechanismen reagieren. Erstens sind die Basen- und Regioselektivitäten von **1** und **2** wahrscheinlicher durch die aktive Teilnahme der Base an der Katalysator-Substrat-Bindung als durch sterische Effekte verursacht, da sie nicht mit der Größe oder der Gestalt der Base korrelieren. So sind Adenin und Guanin in **5a** bzw. **5b** von ähnlicher Größe, zeigen aber dennoch sehr verschiedene Reaktivitäten und Regioselektivitäten. Zweitens tritt die Base vermutlich mit den Liganden und nicht mit den Cu^{II}-Ionen in Wechselwirkung, da die beobachteten Basen- und Regioselektivitäten nicht mit den bekannten Affinitäten der Nucleotidbasen für Metallionen^[19,20] korrelieren. Zum Beispiel sind die Affinitäten von Uracil und Cytosin zu Metallionen stark unterschiedlich, aber sowohl **5c** als auch **5d** werden in Gegenwart von **1** hoch regioselektiv hydrolysiert (Tabelle 1, Nr. 11 und 16).

Die Nucleotidbasen können mit den zwei Metallionen koordinierenden Liganden von **1** und **2** über Wasserstoffbrückenbindungen zur verbrückenden Amidgruppe oder durch π-Stapelbildung mit den Ter- oder Bipyridineinheiten in Wechselwirkung treten.^[19,20] In Schema 2 sind zwei mögliche

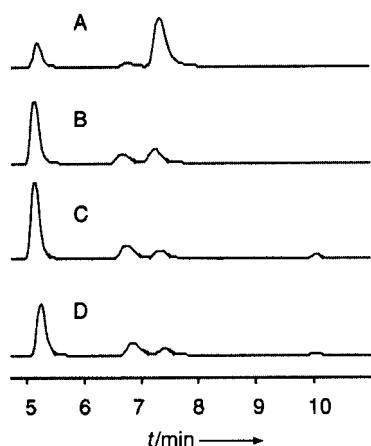
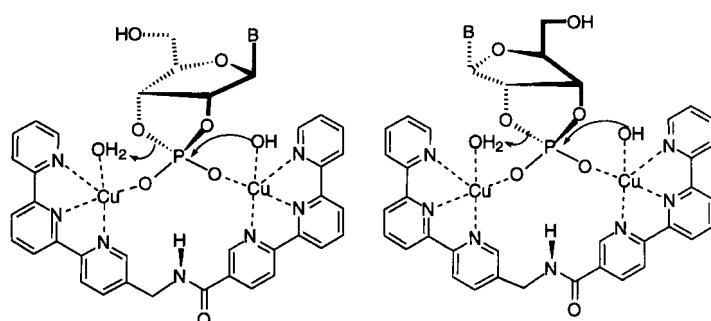


Abb. 2. HPLC-Kurven zur regioselektiven Hydrolyse von **5c** (2',3'-cUMP) in Gegenwart von **1–4** im pH 7.5-HEPES-Puffer (0.05 M) bei 25°C. [5c] = 0.2, [1/2] = 1.0, [3/4] = 2.0 mM. A: **1**, nach 1.5 h; B: **2**, nach 22.5 h; C: **3**, nach 119 h; D: **4**, nach 120 h. Die Retentionszeiten sind wie folgt: 2',3'-cUMP **5c** 5.2 min, 3'-UMP 6.8 min, 2'-UMP 7.4 min, Uracil 10.1 min.

2–4 die eine P-O-Bindung in **5c** nicht mehr als doppelt so schnell wie die andere (Abb. 2 und Tabelle 1, Nr. 12–14). Ähnlich wirkt **1** bei der Hydrolyse von **5d** viel stärker regioselektiv als **2–4** (Tabelle 1, Nr. 16–19). Der Komplex **2** ist nicht so aktiv oder regioselektiv wie **1**, dafür aber basenselektiver als dieses und die einkernigen Komplexe **3** und **4**: Er hydrolysiert **5a** schneller als die anderen drei Substrate, wobei sich die Geschwindigkeiten maximal um den Faktor 31 (zwischen **5a** und **5b**, Tabelle 1, Nr. 2 und 7) unterscheiden.

Natürliche Ribonucleasen hydrolyseren RNA nicht nur schnell, sondern auch basenselektiv. Außerdem hydrolyseren sie **5a–d** regiospezifisch unter ausschließlicher Bildung von **6**.^[14] Von den Metallkomplexen, die RNA und **5** schnell spalten können,^[1,2] zeigen nur wenige signifikante Basen- oder Regioselektivitäten.^[2c,e,16] Es gibt jedoch auch Katalysatoren, meist mit Cyclodextrinen als Bindungsstellen, die bemerkenswert regioselektiv die Hydrolyse von **5a–d** katalysieren, doch nehmen hier die Geschwindigkeiten gewöhnlich um weniger als das 10fache der Geschwindigkeit der Hydrolyse ohne Katalysator zu.^[15,17,18] Die zweikernigen Cu^{II}-



Schema 2. Regioselektive Bindungsbildung zwischen dem unsymmetrischen, zweikernigen Metallkomplex **1** und **5a–d** und daraus resultierende Spaltungsreaktionen. Die beiden möglichen Bindungsweisen sollten sich in den Bindungsenergien unterscheiden, so daß eine – die linke – bevorzugt ist und eine regioselektive Hydrolyse resultiert.

Mechanismen gezeigt, nach denen **1** die Verbindungen **5** hydrolysiert kann. Beide Mechanismen sind mit dem hohen Grad an Kooperativität der beiden Cu^{II}-Ionen in **1** (Tabelle 1) vereinbar, der für eine Aktivierung durch zwei Lewis-saure Zentren spricht, und ebenso mit dem glockenförmigen pH-Geschwindigkeits-Profil (Abb. 1), das sowohl auf eine allgemeine Basen- als auch auf eine allgemeine Säurekatalyse

hinweist. Die beiden Mechanismen unterscheiden sich jedoch in der Orientierung des Substrats relativ zu den beiden Cu^{II}-Ionen. Man kann nun annehmen, daß die Amidgruppe nur bei einer der beiden Orientierung eine Wasserstoffbrückenbindung zur Nucleotidbase bilden kann. Eine Asymmetrie dieser Art in der Substrat-Katalysator-Wechselwirkung ist erforderlich, um einen Unterschied in der Reaktivität der P-O(2')- und P-O(3')-Bindungen zu begründen. Nach Molekülmödellen ist nur in einem der Katalysator-Substrat-Komplexe die Carbonylgruppe von Uracil oder Cytosin in **5c** bzw. **5d** für eine derartige Wasserstoffbrückenbindung günstig angeordnet, so daß darin eine mögliche Ursache für die Regioselektivitäten von **1/5c** und **1/5d** gesehen werden kann.

Anders als in **1** zeigen die beiden Cu^{II}-Ionen in **2** nur eine mäßige Kooperativität (Tabelle 1), was auf nur ein Lewis-saures Zentrum als aktive Stelle und einen allgemeinen Säure/Base-Mechanismus^[12] hindeutet und ein Grund für die niedrige Regioselektivität von **2** sein könnte. Dafür ist die Basenselektivität von **2** größer, und zwar reagiert es bevorzugt mit dem Adenin-substituierten **5a**. Sigel et al. haben berichtet, daß der Adeninrest in 5'-AMP eine stärkere Stapelwechselwirkung mit Bipyridinkupfer(II)-Komplexen eingeht als der Uracilrest in 5'-UMP.^[19] Eine solche Stapelwechselwirkung zwischen Adenin und Bipyridin mag die hohe Selektivität von **2** für **5a** gegenüber **5b-d** (Tabelle 1) erklären.

Wir haben hier gezeigt, daß die zweikernigen Komplexe **1** und **2** die hydrolytische Spaltung von cyclischen Nucleosid-2',3'-monophosphaten sehr stark beschleunigen und daß **1** die Verbindungen **5c** und **5d** hoch regioselektiv überwiegend in Nucleosid-2'-monophosphate spaltet. **2** wiederum zeigt eine bemerkenswerte Basenselektivität: **5a** wird in seiner Gegenwart viel schneller hydrolysiert als **5b-d**. Vermutlich erreicht **1** die hohe Regioselektivität durch regioselektives Binden der Baseneinheit von **5**, während **2** seine Basenselektivität durch eine bevorzugte π-Stapelwechselwirkung zwischen seiner Bipyridineinheit und der Baseneinheit erlangt. In weiteren Experimenten versuchen wir, die genaue Natur der Wechselwirkungen zu erforschen, die die hohen Reaktivitäten, Basen- und Stereoselektivitäten von **1** und **2** verursachen.

Experimentelles

Die Spaltung von **5** durch **1-4** wurde mit HPLC (Ranin) verfolgt. Typische Versuchsdurchführung: 4.5 mL einer 1.1 mM Lösung von **1** in einem Puffer wurden mit 0.5 mL einer 2.0 mM Lösung von **5** im gleichen Puffer gemischt. Je 200 μL der Reaktionsmischung wurden mit 20 mM EDTA (200 μL) quenched. Nachdem der gebildete Feststoff abfiltriert war, wurde die quenchede Lösung (20 μL) in eine C-18-Umkehrphasen-Säule eingespritzt und 10 min mit einer Mischung aus 1–10% CH₃CN und H₂O, die 0.1% CF₃COOH enthielt, eluiert (Durchflußgeschwindigkeit: 1.0 mL min⁻¹). Das Eluat wurde beim λ_{max}-Wert der Nucleobase (260 nm für Adenin und Uracil, 252 nm für Guanin und 268 nm für Cytosin) mit einem Ranin-UV-C-Detektor analysiert. Die Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung (*k*) wurden aus der Steigung der Auftragung von ln(A₀/A_t) gegen *t* erhalten, wobei A₀ und A_t die Flächen unter den HPLC-Peaks von **5** bei *t* = 0 bzw. *t* sind. Die relativen Selektivitäten für die Bildung des 3'-Monophosphats **6** und des 2'-Monophosphats **7** wurden aus dem Verhältnis der Flächen unter den HPLC-Peaks von **6** und **7** berechnet. Die Zuordnung der Peaks zu **6** und **7** wurde anhand authentischer Proben (Sigma) überprüft. Die beiden Isomere haben fast identische Extinktionskoeffizienten beim λ_{max}-Wert der jeweiligen Nucleobase. Deshalb ist das Verhältnis der HPLC-Peakflächen von **6** und **7** gleich dem Verhältnis der an **6** und **7** produzierten Mengen, d. h. gleich der Regioselektivität. In allen Fällen blieb das Verhältnis während der gesamten Dauer der Hydrolyse konstant. Bei langsamem Reaktionen (*k* < 5 × 10⁻⁶ s⁻¹) wurden merkliche Mengen an **6** und **7** zu anorganischem Phosphat und den entsprechenden Nucleosiden weiterhydrolysiert, bevor **5** vollständig hydrolysiert war. Dennoch blieb auch in diesen Fällen das Mengenverhältnis von **6** und **7** in der Reaktionsmischung unverändert. Doppelversuche ergaben

Meßfehler von weniger als ± 15 % für *k* und von weniger als ± 3 % für die Regioselektivität.

Eingegangen am 9. Juni 1997 [Z10523]

Stichwörter: Enzymmimetica • Hydrolyse • RNA

- [1] Übersichtsartikel: a) M. Komiya, *J. Biochem.* **1995**, *118*, 665; b) J. R. Morrow, *Adv. Inorg. Biochem.* **1994**, *9*, 41; c) M. W. Göbel, *Angew. Chem. 1994*, *106*, 1201; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1141; d) D. S. Sigman, A. Mazumder, D. M. Perrin, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2295; e) J. Chin, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 145.
- [2] Neuere Beispiele: a) P. Hurst, B. K. Takasaki, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9982; b) M. J. Young, J. Chin, *ibid.* **1995**, *117*, 10577; c) B. Linkletter, J. Chin, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 529; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 472; d) W. H. Chapman, Jr., R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5462; e) M. Yashiro, A. Ishikubo, M. Komiya, *Chem. Commun.* **1997**, *83*; f) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1793; g) *DNA and RNA Cleavers and Chemotherapy of Cancer and Viral Diseases* (Hrsg.: B. Meunier), Kluwer, Boston, **1996**; h) M. Komiya, N. Takeda, M. Irisawa, M. Yashiro in Lit. [2g], S. 321; i) J. K. Bashkin, J. Xie, A. T. Daniher, L. A. Jenkins, G. C. Yeh in Lit. [2g], S. 355; j) R. Haner, J. Hall, D. Husken, H. E. Moser in Lit. [2g], S. 307; k) D. Magda, R. A. Miller, M. Wright, J. Rao in Lit. [2g], S. 337.
- [3] C. A. Stein, J. S. Cohen, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 2659.
- [4] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543.
- [5] J. F. Milligan, M. D. Matteucci, J. C. Martin, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1923.
- [6] D. Pei, P. G. Schultz in *Nucleases* (Hrsg.: S. M. Linn, R. S. Lloyd, R. J. Roberts), 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1993**, S. 317.
- [7] N. Strater, W. N. Lipscomb, T. Klabunde, B. Krebs, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2158; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2024.
- [8] a) D. Wahnon, R. C. Hynes, J. Chin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1441; b) M. Wall, R. C. Hynes, J. Chin, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1696; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1633; c) J. Chin, M. Banaszczyk, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4103.
- [9] R. Breslow, S. Singh, *Bioorg. Chem.* **1988**, *16*, 408.
- [10] a) D. H. Vance, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12165; b) Y. S. Chung, E. A. Akkaya, T. K. Venkatachalam, A. W. Czarnik, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5413.
- [11] a) P. Hendry, A. M. Sargeson, *Prog. Inorg. Chem.* **1990**, *38*, 201; b) D. R. Jones, L. F. Lindoy, A. M. Sargeson, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7807; c) D. R. Jones, L. F. Lindoy, A. M. Sargeson, M. R. Snow, *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 4155.
- [12] S. Liu, A. D. Hamilton, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1779.
- [13] Zur Hydrolyse von **5a** durch 3 siehe: J. K. Bashkin, L. A. Jenkins, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1993**, 3631.
- [14] R. L. P. Adams, J. T. Knowler, D. P. Leader, *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 11. Aufl., Chapman and Hall, London, **1993**, S. 97.
- [15] M. Komiya, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3046.
- [16] J. R. Morrow, V. M. Shelton, *New J. Chem.* **1994**, *18*, 371.
- [17] a) M. Komiya, Y. Takeshige, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4936; b) M. Komiya, *Carbohydr. Res.* **1989**, *192*, 97; c) M. Komiya, K. Isaka, S. Shinkai, *Chem. Lett.* **1991**, 937.
- [18] Zur regioselektiven Spaltung einer Modellverbindung für cyclische Nucleosid-2',3'-monophosphate siehe: R. Breslow, J. B. Doherty, G. Guillot, C. Lipsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3227; R. Breslow, P. Bovy, C. L. Hersh, *ibid.* **1980**, *102*, 2115.
- [19] H. Sigel in *Metal-DNA Chemistry* (Hrsg.: T. D. Tullius), American Chemical Society, Washington, DC, **1989**, S. 159.
- [20] S. A. Kazakov in *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids* (Hrsg.: S. M. Hecht), Oxford University Press, New York, **1996**, S. 1244.