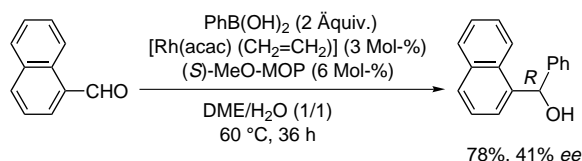
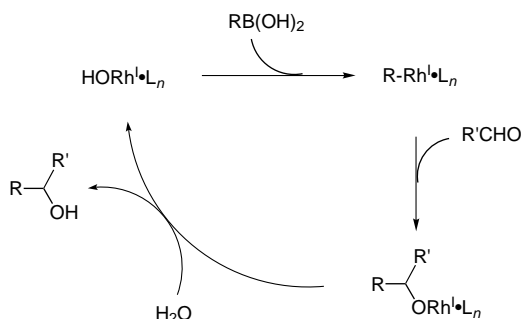


(S)-2-(Diphenylphosphanyl)-2'-methoxy-1,1'-binaphthyl ((S)-MeO-MOP)^[8] führte zu einer mäßigen asymmetrischen Induktion: (R)-(+)-(1-Naphthyl)(phenyl)methanol wurde bevorzugt gebildet ($[\alpha]_D^{20} = +9.3$ ($c = 0.01$ in EtOH), 41 % ee); dagegen führten chirale zweizählige Liganden wie diop und binap zur Bildung der racemischen Alkohole.



Schema 2. Asymmetrische Addition.

Die Reaktion verläuft möglicherweise über die Transmetallierung zwischen der Arylboronsäure und der RO-Rh-Spezies (RO = acac oder OH) zu einem Ar-Rh^I-Komplex und die Insertion des Aldehyds in die Ar-Rh-Bindung (Schema 3).^[4] Die Arylrhodium(I)-Komplexe sind instabil, so daß



Schema 3. Vorgeschlagener Katalysezyklus.

sie nicht in reiner Form isoliert werden können, aber die Annahme, daß sie bei verschiedenen Kupplungsreaktionen mit organischen Halogeniden^[9] und bei der Addition an Alkene und Alkine^[10] die entscheidenden Intermediate sind, erscheint plausibel. Jedoch tritt die Insertion von Aldehyden in die Kohlenstoff-Metall-Bindung, wenn man von Allylderivaten^[5, 11] absieht, bei Übergangsmetallen sehr selten auf.

Experimentelles

Vorschrift für die in Tabelle 1 und 2 aufgeführten Reaktionen: $[\text{Rh(acac)(CO)}_2]$ (8 mg, 0.03 mmol, 3 Mol-%), dppf (17 mg, 0.03 mmol, 3 Mol-%), PhB(OH)_2 (0.244 g, 2 mmol) und Naphthaldehyd (0.156 g, 1.0 mmol) wurden unter Stickstoff in DME (3 mL) und Wasser (3 mL) gelöst. Nach 16 h Rühren bei 80°C wurde das Produkt mit Benzol extrahiert und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet. Die anschließende chromatographische Aufarbeitung (Silicagel, Hexan/Ethylacetat, 20/1) gab (1-Naphthyl)(phenyl)methanol (0.213 g, 0.91 mmol, 91 %).

Asymmetrische Arylierung (Schema 2): $[\text{Rh(acac)(CH}_2\text{=CH}_2)_2]$ (8 mg, 0.03 mmol, 3 Mol-%), (S)-MeO-MOP (28 mg, 0.06 mmol, 6 Mol-%), PhB(OH)_2 (0.243 g, 2 mmol) und Naphthaldehyd (0.156 g, 1.0 mmol) wurden unter Stickstoff in DME (3 mL) und Wasser (3 mL) gelöst. Die Lösung wurde 36 h bei 60°C gerührt und dann aufgearbeitet. Die chromatographische Reinigung (Silicagel, Hexane/Ethylacetat, 10/1) gab den Alkohol (0.181 g, 0.77 mmol, 77 %). Die Enantiomerenreinheit (41 % ee) und die absolute Konfiguration (R) wurden durch HPLC (Daicel Chiracel OD-H, Hexan/2-Propanol, 4/1) und anhand des Drehwertes^[12] bestimmt.

Eingegangen am 22. Juni 1998 [Z12024]

Stichwörter: Aldehyde • Bor • Homogene Katalyse • Nucleophile Additionen • Rhodium

- [1] N. Miyaoura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457–2483.
- [2] M. Sakai, H. Hayashi, N. Miyaoura, *Organometallics*, **1997**, 16, 4229–4230; asymmetrische 1,4-Addition von Aryl- oder 1-Alkenylboronsäuren an Enone: Y. Takaya, M. Ogasawara, T. Hayashi, M. Sakai, N. Miyaoura, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5579–5580.
- [3] S. Oi, M. Moro, S. Ono, Y. Inoue, *Chem. Lett.* **1998**, 83–84.
- [4] S. Oi, M. Moro, Y. Inoue, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1997**, 1621–1622.
- [5] H. Nakamura, H. Iwama, Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6641–6647.
- [6] H. Nakamura, K. Nakamura, Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4242–4243; J. M. Nuss, R. A. Rennels, *Chem. Lett.* **1993**, 197–200.
- [7] Die Größe der P-Rh-P-Winkel nimmt in der Reihe $\text{dppe} < \text{dppp} < \text{dppb} < \text{dppf}$ zu: a) K. Angermund, W. Baumann, E. Dinjus, R. Fornika, H. Görls, M. Kessler, K. Krüger, W. Leitner, F. Lutz, *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 755–764; zur Wirkung auf die Hydroformylierung von Alkenen: b) C. P. Casey, G. T. Whiteker, M. G. Melville, L. M. Petrovich, J. A. Gavney Jr., D. R. Powell, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5535–5543; c) M. Kranenburg, Y. E. M. van der Burgt, P. C. J. Kamer, P. W. N. M. van Leeuwen, K. Goubitz, J. Fraanje, *Organometallics*, **1995**, 14, 3081–3089; zur Wirkung auf die Hydrierung von CO_2 : d) R. Fornika, H. Görls, B. Seemann, W. Leitner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1479–1481.
- [8] Y. Uozumi, T. Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9887–9888.
- [9] L. S. Hegedus, P. M. Kendall, S. M. Lo, J. R. Sheats, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 5448–5452; M. F. Semmelhack, L. Ryono, *Tetrahedron Lett.* **1973**, 2967–2970.
- [10] M. Michman, M. Balog, *J. Organomet. Chem.* **1971**, 31, 395.
- [11] T. Kondo, H. Ono, N. Satake, T. Mitsudo, Y. Watanabe, *Organometallics*, **1995**, 14, 1945.
- [12] O. Cervinka, V. Suchan, B. Masar, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1965**, 30, 1693–1699.

Konjugate eines zweikernigen Zink(II)-Komplexes mit DNA-Oligomeren als sequenzselektive künstliche Ribonucleasen**

Shigeo Matsuda, Akira Ishikubo, Akinori Kuzuya, Morio Yashiro und Makoto Komiyama*

Die sequenzselektive Spaltung von RNA ist wegen ihrer potentiellen Anwendungen, sowohl in vivo als auch in vitro, von Interesse.^[1] Man hat künstliche Ribonucleasen hergestellt, indem katalytisch aktive Metallionen (meistens Lanthanoidionen) mit DNA-Oligomeren als sequenzerkennen-

[*] Prof. Dr. M. Komiyama, S. Matsuda, A. Ishikubo, A. Kuzuya, Prof. Dr. M. Yashiro
 Department of Chemistry and Biotechnology
 Graduate School of Engineering, University of Tokyo
 Hongo, Tokyo 113-8656 (Japan)
 Fax: (+81) 3-5802-3340
 E-mail: mkomi@chembio.t.u-tokyo.ac.jp

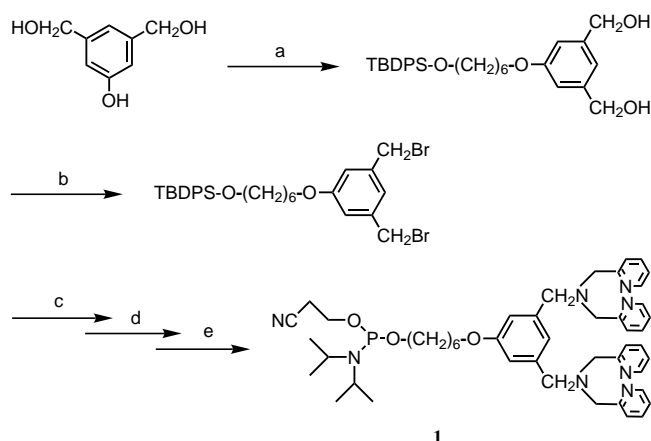
[**] Diese Arbeit wurde vom japanischen Ministerium für Erziehung, Wissenschaft und Kultur gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

den Einheiten verknüpft wurden.^[2–4] Dabei gelten aber folgende Einschränkungen: 1) Zweiwertige Metallionen wie Zn^{II} und Mg^{II} , die in vivo weit verbreitet sind,^[5] können nicht verwendet werden, und 2) kann eine selektive Spaltung nur erreicht werden, wenn in den Reaktionsgemischen keine freien Metallionen vorhanden sind (da sonst die nichtselektive Spaltung überwiegt). Weitere Fortschritte sind hier also wünschenswert.

Schon früher wurde gezeigt, daß RNA unter physiologischen Bedingungen durch zweikernige Zn^{II} -Komplexe hydrolysiert wird.^[6, 7] Obwohl das Zn^{II} -Ion selbst für die RNA-Hydrolyse nur schlecht geeignet ist, führt das Zusammenwirken von zwei Zn^{II} -Ionen zu einer merklichen Hydrolyseaktivität. Wir berichten hier, daß Konjugate aus einem zweikernigen Zn^{II} -Komplex und DNA-Oligomeren RNA selektiv an einem bestimmten Sequenzabschnitt hydrolytisch spalten, selbst in Gegenwart einer erheblichen Menge an freien Zn^{II} -Ionen.

Das Phosphoramidit-Monomer **1**, das eine *N,N,N',N'*-Tetrakis(2-pyridylmethyl)-1,3-bis(aminomethyl)benzol (TPBA)-Gruppe trägt, wurde gemäß Schema 1 hergestellt. Mit einem



Schema 1. a) K_2CO_3 , [18]Krone-6, THF, Rückfluß, 26 h; b) CBr_4 , PPh_3 , THF, 0°C , 1 min; c) *N,N*-Bis(2-pyridylmethyl)amin, *N,N*-Diisopropylethylamin, CH_3CN , RT, 20 h; d) Tetrabutylammoniumfluorid, THF, RT, 1 h; e) $(i\text{Pr}_2\text{N})_2\text{PO}(\text{CH}_2)_2\text{CN}$, 1*H*-Tetrazol, CH_3CN , RT, 90 min. TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl.

automatischen DNA-Synthesizer wurden unter Verwendung von **1** und den herkömmlichen Phosphoramidit-Monomeren TPBA-Gruppen über einen Hexamethylen-Linker an die 5'-Enden von DNA-Oligomeren geknüpft. Die Hydrolyse von RNA, die am 5'-Ende mit ^{32}P radioaktiv markiert war, durch ein Gemisch aus der modifizierten DNA (TPBA-DNA) und Zn^{II} -Ionen wurde bei pH 7.0 und 37°C durchgeführt, das Produkt wurde durch eine Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert.

Abbildung 1 zeigt das bei der Gelelektrophorese erhaltene typische Spaltungsmuster. Der DNA-Teil der TPBA-DNA ist zum Abschnitt U4–C23 des RNA-Substrats komplementär (siehe Abb. 2). Wenn das Verhältnis von Zn^{II} -Ionen zu TPBA-DNA 2:1 beträgt, erfolgt eine hochselektive Spaltung auf der 3'-Seite des Nucleotids C24 (Abb. 1, Bahn 7; der Pfeil in Abb. 2 markiert die Spaltstelle). Die Bande läuft im Gel auf der gleichen Höhe wie diejenige, die bei der alkalischen

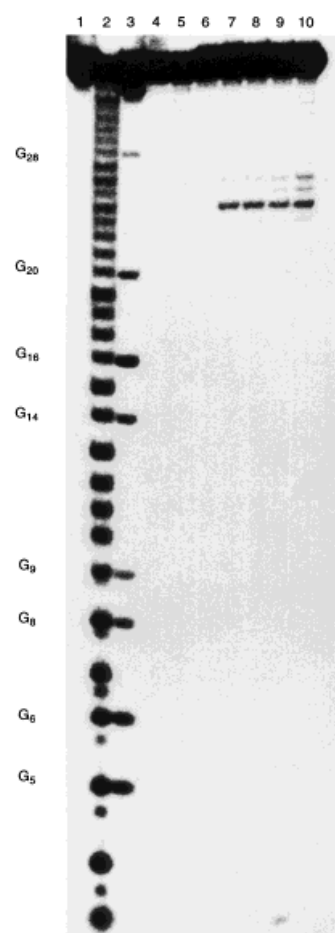


Abb. 1. Autoradiogramme für die sequenzselektive Hydrolyse von RNA (am 5'-Ende mit ^{32}P markiert) durch den Zn^{II} -Komplex von TPBA-DNA (pH 7.0, 37°C , 3 h). Bahn 1: unbehandelte RNA-Probe; Bahn 2: alkalische Hydrolyse; Bahn 3: Hydrolyse mit RNase T_1 (spezifisch für G); Bahn 4: nur Zn^{II} ($5\ \mu\text{M}$); Bahn 5: 2:1-Gemisch aus Zn^{II} und TPBA, das nicht an DNA gebunden war ($[\text{Zn}^{\text{II}}]_0 = 700\ \mu\text{M}$); Bahnen 6–10: Zn^{II} /TPBA-DNA-Gemische ($[\text{Zn}^{\text{II}}]_0/[\text{TPBA-DNA}]_0 = 1, 2, 10, 50$ bzw. 100); $[\text{RNA}]_0 = 0.2$, $[\text{TPBA-DNA}]_0 = 5\ \mu\text{M}$. Das Ausmaß der RNA-Spaltung in Bahn 7 beträgt etwa 5%.

5' AUC UGG AGG UCC UGU GUU CGA UCC ACA GAA UUC GUC 3' RNA
3' ACC TCC AGG ACA CAA GCT AGX 5' TPBA-DNA

Abb. 2. Sequenzen der TPBA-DNA und des RNA-Substrats, die für das in Abb. 1 gezeigte Experiment verwendet wurden. X ist ein Nucleotid, das eine TPBA-Gruppe trägt; der Pfeil zeigt die Stelle der selektiven Spaltung an.

Hydrolyse erhalten wird (Abb. 1, Bahn 2). Wenn der DNA-Teil von TPBA-DNA komplementär zum Bereich U2–A21 der RNA ist (anstatt zum Bereich U4–C23), findet eine selektive Spaltung auf der 3'-Seite des Nucleotids U22 statt. Mit einer DNA, die zum Bereich A1–G20 der RNA komplementär ist, wird jeweils auf der 3'-Seite von A21 und U22 selektiv hydrolysiert. Somit wurden erstmals sequenzselektive Ribonucleasen mit Zn^{II} -Ionen als katalytischen Zentren hergestellt.

Von Bedeutung ist hier, daß die Sequenzselektivität der Spaltung auch dann befriedigend ist, wenn in den Reaktions-

gemischen eine große Menge freier Zn^{II} -Ionen vorhanden ist (siehe Bahnen 8, 9 und 10 in Abb. 1; dort ist $[\text{Zn}^{\text{II}}]_0/[\text{TPBA-DNA}]_0 = 10, 50$ bzw. 100; der Index 0 bezieht sich auf die Anfangskonzentrationen). Die freien Zn^{II} -Ionen haben keine wesentliche Auswirkung auf die sequenzselektive RNA-Spaltung.^[8] Weiterhin ist bemerkenswert, daß für $[\text{Zn}^{\text{II}}]_0/[\text{TPBA-DNA}]_0 = 1$ keine meßbare Spaltung erfolgt (Bahn 6). Die selektive Spaltung wird vom 2:1- Zn^{II} /TPBA-Komplex des künstlichen Enzyms bewirkt. Diese Annahme wird dadurch untermauert, daß DNA-Konjugate mit einem *N,N*-Bis(2-pyridylmethyl)amin-Rest, der einen einkernigen Zn^{II} -Komplex bildet, bei pH 7.0 und 37 °C keine Aktivität aufweisen (siehe Hintergrundinformationen).

Wenn TPBA allein (nicht DNA-gebunden) anstelle von TPBA-DNA verwendet wird, findet keine RNA-Hydrolyse statt, auch nicht für $[\text{Zn}^{\text{II}}]_0 = 700 \mu\text{M}$ (Bahn 5; $[\text{TPBA}]_0 = 350 \mu\text{M}$). Die selektive RNA-Hydrolyse erfordert also die Bildung eines Heteroduplex, in dem sich der Zn^{II} -TPBA-Komplex an der richtigen Stelle in der Nähe der zu spaltenden Phosphodiesterbindung befindet (die selektive Reaktion, deren Produkte in Bahn 7 aufgetragen wurden, fand bei $[\text{Zn}^{\text{II}}]_0 = 5 \mu\text{M}$ statt). Mit freien Zn^{II} -Ionen wird unter den verwendeten Bedingungen keine meßbare RNA-Spaltung erhalten (Bahn 4).

Einen weiteren Beweis für die äußerst wichtige Rolle des 2:1-Komplexes aus Zn^{II} und TPBA liefert die Hydrolyse von Adenylyl(3' → 5')adenosin (ApA) durch die Kombination aus Zn^{II} und TPBA (das nicht an DNA gebunden ist). Dabei wurde $[\text{Zn}^{\text{II}}]_0$ variiert, während $[\text{TPBA}]_0$ konstant bei 2.5 mM gehalten wurde. Wie erwartet nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit mit zunehmendem Wert von $[\text{Zn}^{\text{II}}]_0$ zu; die S-förmige Kurve erreicht ein Plateau für $[\text{Zn}^{\text{II}}]_0/[\text{TPBA}]_0 = 2$ (siehe Hintergrundinformationen). Weiterhin wurde die Bildung eines 2:1-Komplexes durch ^1H -NMR-Spektroskopie bestätigt.^[9] Die hier beschriebenen künstlichen Ribonucleasen mit einem zweikernigen Zn^{II} -Komplex als katalytischem Zentrum sind vielversprechende Verbindungen für eine Vielzahl von Anwendungen.

Experimentelles

Das Phosphoramidit-Monomer **1** und alle in Schema 1 dargestellten Reaktionsintermediate wurden durch ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die TPBA-DNA, die für das in Abbildung 1 gezeigte Experiment verwendet wurde, wurde durch matrixassistierte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) analysiert: ber.: 6738.64, gef.: 6738.8. Eine HPLC-Analyse des beim enzymatischen Abbau von TPBA-DNA erhaltenen Produkts war mit der Struktur im Einklang.

Die RNA-Spaltung wurde in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7.0; Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan) durchgeführt, der die RNA (0.2 μM), TPBA-DNA (5 μM), NaCl (100 mM) und die erforderliche Menge an $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ enthielt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 min auf 85 °C erhitzt und dann auf die Reaktionstemperatur (37 °C) abgekühlt. Nach beendeter Reaktion wurde das Gemisch auf ein 15proz. denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Hydrolyse von ApA durch den Zn^{II} /TPBA-Komplex (2:1) wurde durch Umkehrphasen-HPLC verfolgt. Cyclisches 2',3'-Adenosinmonophosphat (cAMP) wurde als Zwischenstufe gebildet, aber schnell zu den 2'- und 3'-Monophosphaten hydrolysiert und daher nicht in nennenswerter Menge erhalten.

Eingegangen am 3. Juli 1998 [Z 12090]

Stichwörter: Hydrolysen • Kooperative Effekte • Phosphatasen • RNA • Zink

- [1] a) T. R. Cech, *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, 59, 543–568; b) A. D. Mesmaeker, R. Häner, P. Martin, H. E. Moser, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 366–374; c) M. Komiyama, *J. Biochem.* **1995**, 118, 665–670, zit. Lit.
- [2] a) K. Matsumura, M. Endo, M. Komiyama, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2019–2020; b) J. K. Bashkin, E. I. Frolova, U. Sampath, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 5981–5982; c) D. Magda, R. A. Miller, J. L. Sessler, B. L. Iverson, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7439–7440; d) J. Hall, D. Hüskens, R. Häner, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 3522–3526; e) J. K. Bashkin, J. Xie, A. T. Daniher, U. Sampath, J. L. Kao, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2314–2321; f) V. Duarte, S. Sixou, G. Favre, G. Prati, B. Meunier, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, 4113–4118; g) D. Magda, S. Crofts, A. Lin, D. Miles, M. Wright, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2293–2294; h) D. Magda, M. Wright, S. Crofts, A. Lin, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 6947–6948.
- [3] Sequenzselektive künstliche Ribonucleasen mit organischen „Scheren“ wurden ebenfalls hergestellt: a) M. Komiyama, T. Inokawa, K. Yoshinari, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 77–78; b) J. Hovinen, A. Guzaev, E. Azhayeva, A. Azhayev, H. Lönnberg, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2205–2209; c) M. A. Reynolds, T. A. Beck, P. B. Say, D. A. Schwartz, B. P. Dwyer, W. J. Daily, M. M. Vaghefi, M. D. Metzler, R. E. Klem, L. J. Arnold, Jr., *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 760–765; d) M. Endo, Y. Azuma, Y. Saga, A. Kuzuya, G. Kawai, M. Komiyama, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 846–852.
- [4] Ein Konjugat aus einem natürlichen Enzym und DNA-Oligomeren führte zu einer sequenzselektiven Spaltung: R. N. Zuckermann, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 1766–1770.
- [5] S. J. Lippard, J. M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, **1994**.
- [6] M. Yashiro, A. Ishikubo, M. Komiyama, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1793–1794.
- [7] Für die Hydrolyse von Phosphoestern durch zweikernige Metallkomplexe siehe: a) D. R. Jones, L. F. Lindoy, A. M. Sargeson, M. R. Snow, *Inorg. Chem.* **1982**, 21, 4155–4160; b) D. H. Vance, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 12165–12166; c) D. Wahnon, A. M. Lebus, J. Chin, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2594–2597; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2412–2414; d) W. H. Chapman, Jr., R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5462–5469; e) A. Tsubouchi, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7399–7411; f) B. K. Takasaki, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8582–8585; g) T. Koike, M. Inoue, E. Kimura, M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3091–3099; h) K. G. Ragnathan, H.-J. Schneider, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1314–1316; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1219–1221; i) C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, V. Fusi, C. Giorgi, P. Paoletti, B. Valtancoli, D. Zanchi, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 2784–2790; j) P. Molenveld, S. Kapsabelis, F. J. Engbersen, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2948–2949.
- [8] Die schwachen Banden in Bahn 10, die aus einer Spaltung auf der 3'-Seite der Hauptspaltstelle resultieren, sind möglicherweise einer Katalyse durch Zink(II)-hydroxid-Cluster zuzuschreiben, die bei hoher Zn^{II} -Konzentration gebildet werden ($[\text{Zn}^{\text{II}}]_0 = 0.5 \text{ mM}$).
- [9] Bei $[\text{Zn}^{\text{II}}]_0 = [\text{TPBA}]_0 = 2.5 \text{ mM}$ (in D_2O) wurde für TPBA eine Gruppe von Signalen im ^1H -NMR-Spektrum erhalten, die von denen des freien Liganden verschieden waren. Bei einer Erhöhung des $[\text{Zn}^{\text{II}}]_0/[\text{TPBA}]_0$ -Verhältnisses trat allmählich eine andere Gruppe von Signalen auf, die der Bildung des 2:1-Komplexes entsprachen. Bei einem Verhältnis von 2:1 wurden nur Signale für den 2:1-Komplex erhalten.