

- [16] J. G. Moffatt, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 649–658.  
 [17] Siehe V. Wittmann, C. H. Wong, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2144–2147.  
 [18] Alle neuen Verbindungen wurden NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch charakterisiert. Hochaufgelöstes Positiv-Ionen-MS: **2**:  $m/z$  571.971, ber. für  $[C_{11}H_{15}N_5O_{12}P_3Na_3+H]^+$ : 571.970; **4**:  $m/z$  1080.898, ber. für  $[C_{21}H_{24}ClN_{10}O_{21}P_5Na_6+H]^+$ : 1080.896 ( $^{35}Cl$ ); **6**:  $m/z$  1398.985, ber. für  $[C_{31}H_{38}N_{15}O_{27}P_6Na_6+Na]^+$ : 1398.977; **8**: 1296.023, ber. für  $[C_{31}H_{37}N_{15}O_{24}P_5Na_5+H]^+$ : 1296.021. Ihre Reinheit wurde durch HPLC (BioRad-MA70-Anionenaustauschersäule, Gradientenelution mit 50 mM  $\rightarrow$  700 mM  $NH_4^+HCO_3^-$ ) zu mehr als 98 % bestimmt.  
 [19] A. Guranowski, A. Sillero in *Ap<sub>4</sub>A and Other Dinucleoside Polyphosphates* (Hrsg.: A. G. McLennan), CRC Press, Boca Raton, FL, **1992**, S. 81–133.  
 [20] N. M. H. Thorne, S. Hankin, M. C. Wilkinson, C. Nunez, R. Barraclough, A. G. McLennan, *Biochem. J.* **1995**, *311*, 717–721.  
 [21] A. Guranowski, E. Starzynska, P. Brown, G. M. Blackburn, *Biochem. J.* **1997**, *328*, 257–262.  
 [22] A. Guranowski, E. Starzynska, E. Bojarska, J. Stepinski, E. Darzynkiewicz, *Protein Expression Purif.* **1996**, *8*, 416–422.  
 [23] H. Jakubowski, A. Guranowski, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 9982–9989.

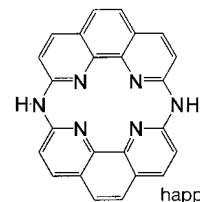
## Ein neuartiger Co<sup>II</sup>-Komplex als spezifisches Reagens für DNA-Ausbuchtungen\*\*

Chien-Chung Cheng,\* Yen-Ning Kuo, Kuo-Shen Chuang, Chi-Fong Luo und Wen Jwu Wang\*

Ausbuchtungen („bulges“) in Nucleinsäuren sind entscheidende Strukturmerkmale für deren Erkennung durch Nucleinsäure-bindende Proteine in biologischen Systemen.<sup>[1]</sup> Trotz der Bedeutung von DNA-Ausbuchtungen sind nur von wenigen detaillierte Strukturinformationen verfügbar;<sup>[2]</sup> vermutlich deswegen, weil derartige Strukturen weniger stabil sind. Die Schmelztemperatur von DNA mit einer Ausbuchtung, die von einer einzigen zusätzlichen Base verursacht wird, ist gegenüber der einer entsprechenden DNA, deren Struktur ausschließlich Watson-Crick-Basenpaare enthält, um 2.0–3.6 °C verringert.<sup>[3]</sup>

Zwar wurden zahlreiche synthetische chemische Nucleasen entwickelt, um DNA/RNA-Strukturen zu untersuchen.<sup>[4]</sup> Dennoch gibt es immer noch sehr wenige spezifische Reagentien für Ausbuchtungen in DNA. Bei zwei Arten von auf

DNA-Ebene wirkenden Antitumor-Wirkstoffen, dem Neocarzinostatin-Chromophor (NCS-C) und Bleomycin (BLM), wurde kürzlich nachgewiesen, daß sie einen DNA-Strangbruch in der Nähe der Ausbuchtung bevorzugt erkennen.<sup>[5]</sup> Ebenso ist von DNA-Intercalatoren wie Ethidiumbromid<sup>[6]</sup> und  $[Pt(terpy)(het)]^+$  (het = „2-Hydroxyethanthiol“ = 2-Sulfanylethanol, terpy = 2,2':6',2'':-Terpyridin)<sup>[7]</sup> bekannt, daß sie spezifisch an Ausbuchtungen von Nucleinsäuren binden.<sup>[6]</sup> Diese Verbindungen binden allerdings so stark an die doppelsträngigen Domänen der DNA, daß sie eine Änderung der DNA-Konformation an der Bindungsstelle hervorrufen. Wir berichten hier über den neuartigen, oktaedrischen Co<sup>II</sup>-Komplex  $[Co^{II}(tfa)_2(happ)]$  (tfa = Trifluoressigsäure), der ein spezifisches Reagens für DNA-Ausbuchtungen ist, da er solche Strukturen gezielt oxidativ spalten kann. Dieser Komplex bietet auch den Vorteil einer nur geringen Affinität für doppelsträngige DNA. Außerdem weist er keine Spaltungsaktivität bezüglich einzelsträngiger DNA auf.



Die Herstellung des happ-Liganden erfolgte nach einer abgewandelten Vorschrift<sup>[8]</sup> zur Kondensation zweier Moleküle 2,9-Dichlor-1,10-phenanthrolin unterhalb von 200 °C im Ammoniakstrom.<sup>[9]</sup> Die Co<sup>II</sup>-Komplexe des happ-Liganden wurden durch dessen Umsetzung mit Cobalt(II)-acetat in Trifluoressigsäure (TFA)/MeOH hergestellt. Aus der Struktur des Komplexes  $[Co^{II}(tfa)_2(happ)]$  im Kristall (Abbildung 1) wird deutlich, daß der Komplex zwei verknüpfte 1,10-Phenanthrolin-Einheiten enthält. Dabei kommen alle vier Pyridin-Stickstoffatome auf derselben Koordinationsebene zu liegen, und die beiden labilen tfa-Liganden sind axial angeordnet.<sup>[10]</sup> Die durchschnittliche Co-N-Bindungslänge beträgt ca. 1.86 Å. Aus dem EPR-Spektrum des Co<sup>II</sup>-Komplexes wurde ein durchschnittlicher g-Wert von 2.005–2.331 in Methanol ermittelt, ein Hinweis auf einen oktaedrischen Co<sup>II</sup>-Komplex. Die Zugabe eines Äquivalents Pyridin führt zu einem schnellen Austausch eines der axialen TFA-Liganden unter Standard-Laborbedingungen, wie sich EPR-spektroskopisch verfolgen ließ. Die tfa-Liganden sind demzufolge labil bezüglich einer Substitution durch Nucleophile.

Vom 1,10-Phenanthrolin(phen)-Liganden des tetraedrischen Komplexes  $[Cu^{II}(phen)_2]$  ist bekannt, daß er in die DNA intercaliert. Daher kann diese Eigenschaft auch von  $[Co^{II}(tfa)_2(happ)]$  erwartet werden, der ebenfalls diesen planaren, makrocyclischen Liganden enthält. In Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und unter Bedingungen, die nicht zur Spaltung führen (siehe unten), gab es aber weder beim Topoisomerase-I-Assay<sup>[11]</sup> Anzeichen für eine Entwindung der DNA, die durch eine Intercalation in die DNA verursacht wird, noch wurden beim Mobilitätsänderungs-Assay unter nichtdenaturierenden Bedingungen Hinweise auf hochmolekulare Banden in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) gefunden, die den  $[Co^{II}(happ)]^{2+}$ -DNA-Addukten zuzuordnen wären. Ferner wies die Schmelztemperatur  $T_m$  von Kalbsthymus-DNA (60 µM bezogen auf ein einzelnes Nucleotid), die mit  $[Co^{II}(happ)]^{2+}$  (8 µM) inkubiert worden war, nur eine mäßige Änderung von 0.5–1.0 °C auf. Unter ähnlichen

[\*] Prof. C.-C. Cheng, Y.-N. Kuo  
 Institute of Chemistry  
 Academia Sinica  
 Taipei 11529 (Taiwan)  
 Fax: (+886) 2-27831237  
 E-mail: cccheng@chem.sinica.edu.tw

Prof. W. J. Wang, K.-S. Chuang, C.-F. Luo  
 Department of Chemistry  
 Tangkang University  
 Taipei (Taiwan)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Academia Sinica und vom National Science Council, Taiwan, gefördert. Wir danken den Professoren Sunney I. Chan und Daniel W. J. Kwong für hilfreiche Diskussionen.

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

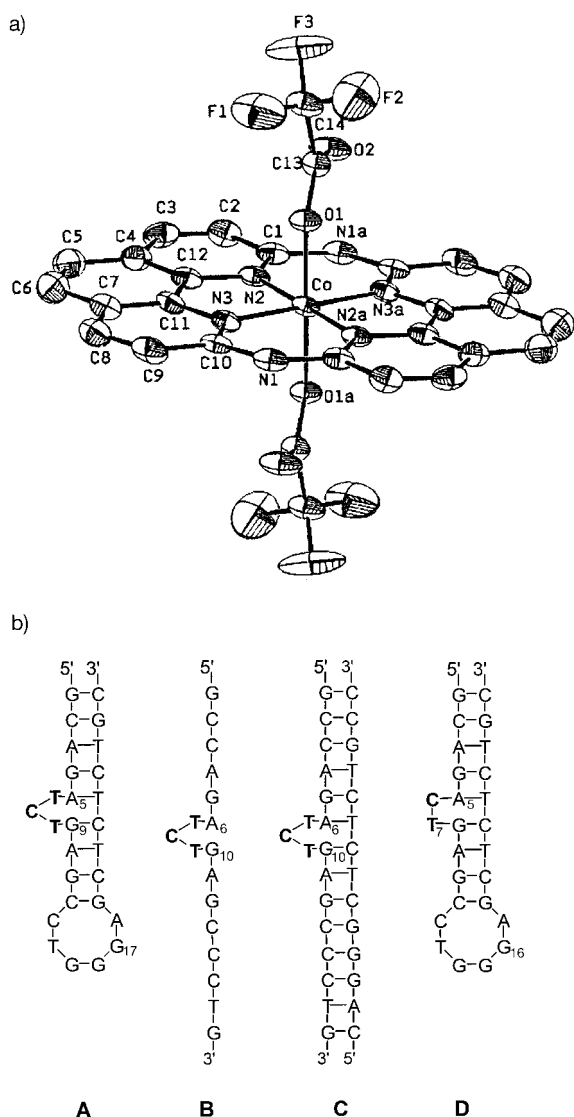


Abbildung 1. a) ORTEP-Darstellung der Struktur von  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{tfa})_2(\text{happ})]$  im Kristall mit der Numerierung der Atome. b) Die in dieser Untersuchung verwendeten DNA-Substrate.

Bedingungen führte die Inkubation mit Ethidiumbromid zu einem um 12–13 °C vom Vergleichswert abweichenden  $T_m$ -Wert. Durch photometrische Titration bei 399 nm mit Kalbsthymus-DNA wurde für  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{happ})]^{2+}$  eine DNA-Bindungskonstante von ca.  $10^4 \text{ M}^{-1}$  ermittelt (10 mM Phosphatpuffer, pH 7). Dagegen ist der entsprechende vierfach koordinierte Kupferkomplex  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{happ})]^+$  ein stärkerer DNA-Intercalator, dessen Bindungskonstante mit dem Ethidiumbromid-Verdrängungs-Assay zu  $10^5 \text{ M}^{-1}$  bestimmt wurde.<sup>[9]</sup> Offensichtlich stellen die axialen Liganden des oktaedrischen Komplexes  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{happ})(\text{X})_2]$  ( $\text{X} = \text{TFA}, \text{H}_2\text{O}$ ) eine signifikante sterische Hinderung dar und schränken das Ausmaß der Insertion des Komplexes zwischen benachbarte Basen der doppelsträngigen DNA ein.

In Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  spaltet  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{tfa})_2(\text{happ})]$  katalytisch DNA. Reaktionen von  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{happ})]^{2+}$  ( $0.6 \mu\text{M}$ ) mit verschiedenen am 5'-Ende  $^{32}\text{P}$ -markierten Oligonucleotiden<sup>[12]</sup> (4–5  $\mu\text{M}$ ) wurden in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.005–0.05 %) 5 min lang bei Raumtemperatur durchgeführt. Die

dabei gebildeten DNA-Fragmente wurden mit hochauflösender PAGE untersucht. Diese Versuche wurden mit dem DNA-27mer 5'-GCAGATCTGA-GCCTGGGAGC-TCTCTGC-3' als Substrat durchgeführt, dessen Sekundärstruktur aus einer Ausbuchtung von drei Basen, einer einzelsträngigen Schleife von sechs Basen und einer doppelsträngigen Domäne besteht (**A** in Abbildung 1). Diese DNA-Sequenz wurde analog zur RNA-Haarnadel aus dem *trans*-activation response element (TAR-RNA) entworfen.<sup>[5, 13–14]</sup> Nach der Behandlung mit Piperidin trat die Strangspaltung hauptsächlich an der Stelle der DNA-Ausbuchtung auf (T6, C7, T8) und nur selten an der DNA-Haarnadelschleife (C13–A18), obwohl beide Bereiche die gleiche Sequenz 5'-CTG-3' enthalten (Abbildung 2).

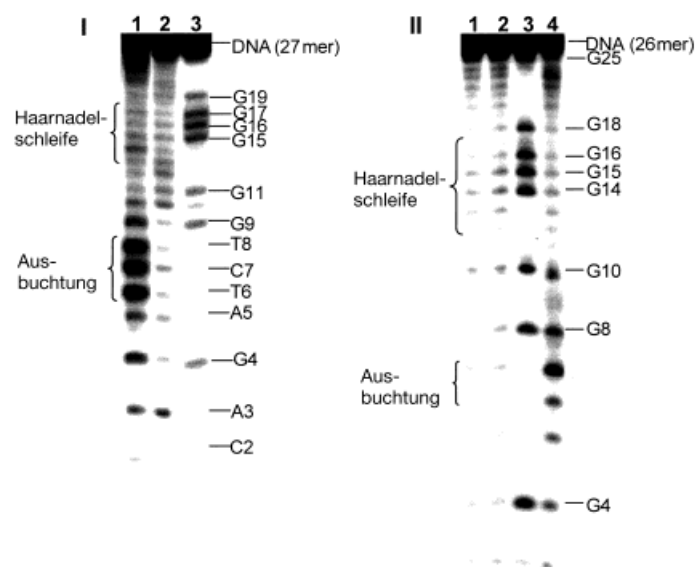


Abbildung 2. Die Autoradiogramme von denaturierenden Polyacrylamidgelen (20%; 7 M Harnstoff) zeigen das Ergebnis der Oxidation von am 5'-Ende markierten DNA-Substraten (4  $\mu\text{M}$ ) mit  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{tfa})_2(\text{happ})]$  in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.005 %) als Aktivator in 10 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6.9) bei 25 °C, Reaktionszeit 5 min. Alle Reaktionsansätze wurden dann mit 0.7 M Piperidin versetzt und 30 min auf 90 °C erhitzt. I) DNA-Substrat **A** (siehe Abbildung 1). Bahn 1: DNA mit  $\text{Co}^{\text{II}}$  ( $0.6 \mu\text{M}$ ) und  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Bahn 2: DNA mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Bahn 3: G-Reaktion der Maxam-Gilbert-Sequenzierung. II) DNA-Substrat **D** (siehe Abbildung 1). Bahn 1: nur DNA; Bahn 2: DNA mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; Bahn 3: G-Reaktion der Maxam-Gilbert-Sequenzierung; Bahn 4: DNA mit  $\text{Co}^{\text{II}}$  ( $0.6 \mu\text{M}$ ) und  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Eine Spaltung trat auch in geringerem Ausmaß an Stellen in der Nähe der flankierenden Verknüpfungen dieser Nucleobasen auf. Interessanterweise wurde keine nennenswerte oxidative Spaltung in der 5'-GGG-3'-Region der DNA-Haarnadelschleife festgestellt. Die Guaninreste dieser DNA-Schleife sind wegen ihrer Zugänglichkeit<sup>[13]</sup> und ihres niedrigen Reduktionspotentials<sup>[15]</sup> am empfindlichsten gegenüber einer oxidativen Spaltung. In Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist für die entsprechende DNA-Spaltung eine höhere Konzentration des  $\text{Co}^{\text{II}}$ -Komplexes ( $> 50 \mu\text{M}$ ) sowie eine längere Reaktionszeit ( $> 40 \text{ min}$ ) erforderlich. Darüber hinaus verringert die kompetitive Hemmung durch DNA-Intercalatoren wie  $[\text{Pt}(\text{het})(\text{terpy})]^+$ , die an der DNA-Ausbuchtung binden, deutlich das Ausmaß der Spaltung an der Ausbuchtungsstelle.

Diese Befunde stützen die Annahme einer spezifischen DNA-Spaltung an Ausbuchtungen durch das Komplex-Ion  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{happ})]^{2+}$  in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Der Komplex  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{tfa})_2(\text{happ})]$  weist eine geringe Reaktivität gegenüber DNA-Einzelsträngen auf. Bei der Umsetzung des Komplex-Ions  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{happ})]^{2+}$  mit einem einzelsträngigen DNA-16mer der Sequenz 5'-GCCAGATCTG-AGCCTG-3' (**B** in Abbildung 1) wurde in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter gleichen Bedingungen keine Spaltung am Sequenzabschnitt 5'-TCT-3' festgestellt, selbst bei einem 20fachen Überschuß des  $\text{Co}^{\text{II}}$ -Komplexes. Durch Paarung dieses Einzelstrangs mit seinem komplementären DNA-Strang entstand ein DNA-Duplex mit einer Ausbuchtung von drei Basen (**C** in Abbildung 1), was durch PAGE unter nicht-denaturierenden Bedingungen verfolgt wurde. Wurde dieser Duplex unter den gleichen Bedingungen mit dem Komplex  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{happ})]^{2+}$  inkubiert, so wurde eine verstärkte DNA-Spaltung am Sequenzabschnitt 5'-TCT-3' im Bereich der Ausbuchtung verzeichnet. Diese Ergebnisse stützen zusätzlich die Folgerung, daß  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{happ})]^{2+}$  ein spezifisches Reagens für DNA-Ausbuchtungen ist, ohne eine Reaktivität gegenüber dem entsprechenden Bereich in der einzelsträngigen DNA aufzuweisen.

Wurden Magnesiummonoperoxyphthalat (MMPP) oder  $\text{KHSO}_5$  anstelle von  $\text{H}_2\text{O}_2$  verwendet, trat keine nennenswerte DNA-Spaltung mit superspiralisierter Plasmid-DNA auf. Die Zugabe von Superoxid-Dismutase und  $\text{D}_2\text{O}$  zur Reaktionslösung verringerte nicht die Konzentration der zirkulären DNA mit einem Strangbruch (Typ II), die als Spaltungsprodukt bei diesem, durch den  $\text{Co}^{\text{II}}$ -Komplex vermittelten Vorgang gebildet wird. Daher ist es unwahrscheinlich, daß Superoxidionen oder Singulett-Sauerstoff an diesem Prozeß beteiligt sind. Allerdings war die Menge an zirkulärer Typ-II-DNA nach Zugabe des Hydroxylradikalfängers Mannitol zur Reaktionslösung des DNA-Spaltungs-Assays auf die Hälfte verringert. Diesen Ergebnissen zufolge ist das Hydroxylradikal vermutlich eine der reaktiven Spezies bei der DNA-Spaltung, die durch die Reaktion von  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{happ})]^{2+}$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  gebildet werden. Im allgemeinen ist das Hydroxylradikal eine durch Diffusion frei bewegliche Spezies und weist bei der oxidativen DNA-Spaltung keine Spezifität auf. Dennoch fand die durch  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{happ})]^{2+}$  verursachte Spaltung des DNA-Strangs gezielt an der Stelle der Ausbuchtung statt. Demzufolge muß diese spezifische DNA-Spaltung auf eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem  $\text{Co}^{\text{II}}$ -Komplex, höchstwahrscheinlich über dessen Liganden, und dem Bereich der Ausbuchtung der DNA zurückzuführen sein. Kürzlich wurde die Struktur einer DNA mit einer Ausbuchtung von zwei Basen durch NMR-Spektroskopie in Lösung bestimmt. Sie hat die Form einer dreieckigen, prismenförmigen Tasche, in der Endiin-Analoga binden.<sup>[16]</sup> Wurde ein DNA-26mer mit einer Ausbuchtung von zwei Basen, der im Vergleich zum DNA-27mer mit einer Ausbuchtung von drei Basen eine Base fehlt (T6), als Substrat eingesetzt (**D** in Abbildung 1), so wurde tatsächlich eine verstärkte Aktivität und Spezifität der Spaltung am Nucleotid T7 der Ausbuchtung des DNA-26mers festgestellt (Abbildung 2). Die Form und Größe der Bindungstasche an der DNA-Ausbuchtung sind also vermutlich wichtige Faktoren für die spezifische

Erkennung durch  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{tfa})_2(\text{happ})]$ . Wie auch beim DNA-Substrat **A** wurde bei Zugabe des Intercalators  $[\text{Pt}(\text{het})(\text{terpy})]^+$  zum DNA-Substrat **D** festgestellt, daß dadurch deutlich die durch  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{happ})]^{2+}$  in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierte Spaltung an der Ausbuchtung inhibiert wird.

Diese Untersuchung ist der erste Versuch, einen neuartigen  $\text{Co}^{\text{II}}$ -Komplex für die spezifische Bindung und Spaltung einer DNA-Ausbuchtung einzusetzen. Gegenüber dem entsprechenden Sequenzabschnitt in einem DNA-Einzelstrang wurde keine nennenswerte Reaktivität festgestellt. Daraus folgern wir, daß die Intercalation von 1,10-Phenanthrolin, eines Liganden von  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{tfa})_2(\text{happ})]$ , in den DNA-Doppelstrang vermutlich durch die beiden axial stehenden Liganden dieses oktaedrischen Komplexes verhindert wird. Auf der anderen Seite ist es möglich, daß  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{tfa})_2(\text{happ})]$  eine Bindungstasche von bestimmter Form und Größe im Bereich der Ausbuchtung erkennt. Diese Erkennung könnte die Ursache für die gefundene spezifische DNA-Spaltung an der Ausbuchtungsstelle durch das frei bewegliche Hydroxylradikal sein, das bei der Reaktion von  $\text{Co}^{\text{II}}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  gebildet wird.

Eingegangen am 3. November 1998 [Z 12610]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1255–1257

**Stichwörter:** Cobalt • DNA-Spaltung • DNA-Strukturen • Makrocyclen • N-Liganden

- [1] D. H. Tumer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, 2, 234; E. C. Theil, *Biochem. J.* **1994**, 304, 1–11; J. L. Battiste, R. Y. Tan, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Biochemistry* **1994**, 33, 2741–2747; D. M. J. Lilley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 7140.
- [2] L. Joshua-Tor, F. Frolow, E. Appella, H. Hope, D. Rabinovich, J. L. Sussman, *J. Mol. Biol.* **1992**, 225, 397–431.
- [3] S.-H. Ke, R. M. Wartell, *Biochemistry* **1995**, 34, 4593–4600.
- [4] B. Armitage, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1171–1200; R. M. Burger, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1153–1169; C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109–1151; C. J. Burrows, S. E. Rokita, *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 295–301; J. G. Muller, P. Zheng, S. E. Rokita, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2320–2325; W. K. Pogozelski, T. D. Tullius, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1089–1107; G. Pratviel, J. Bernadou, B. Meunier, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 819–845; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 746–769; G. Pratviel, J. Bernadou, B. Meunier, *Adv. Inorg. Chem.* **1998**, 45, 251–312; J. Stubbe, J. W. Kozarich, W. Wu, D. E. Vanderwall, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 322–330.
- [5] L. S. Kappen, I. H. Goldberg, *Biochemistry* **1995**, 34, 5997–6002; L. S. Kappen, I. H. Goldberg, *Biochemistry* **1997**, 36, 14861–14867; L. D. Williams, I. H. Goldberg, *Biochemistry* **1988**, 27, 3004–3011.
- [6] W. D. Wilson, L. Ratmeyer, M. T. Cegla, J. Sychala, D. Boykin, M. Demeunynck, J. Lhomme, G. Krishnan, D. Kennedy, R. Vinayak, G. Zon, *New J. Chem.* **1994**, 18, 419–423.
- [7] M. Howe-Grant, S. J. Lippard, *Inorg. Synth.* **1980**, 20, 101–105; S. J. Lippard, J. M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA, **1994**.
- [8] S. Ogawa, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1977**, 214–216; M. Hirai, K. Shinozuka, H. Sawai, S. Ogawa, *Chem. Lett.* **1992**, 2023–2036.
- [9] T. H. Chang, C. W. Ong, Y. M. Chou, K.-S. Chuang, W. J. Wang, *J. Chin. Chem. Soc.* **1996**, 43, 73–75.
- [10] Kristallstrukturanalyse von  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{tfa})_2(\text{happ})] \cdot 4\text{tfa}$ :  $\text{C}_{36}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{F}_{18}$ ·Co, Kristallabmessungen  $0.05 \times 0.25 \times 0.25 \text{ mm}^3$ , triklin, Raumgruppe  $P\bar{1}$ ,  $a = 8.5242(2)$ ,  $b = 8.850(3)$ ,  $c = 14.293(5) \text{ Å}$ ,  $\alpha = 79.57(3)$ ,  $\beta = 79.00(3)$ ,  $\gamma = 88.81(3)^\circ$ ,  $V = 1040.9(6) \text{ Å}^3$ ,  $Z = 1$ ,  $F(000) = 558$ ,  $\rho_{\text{ber.}} = 1.792 \text{ g cm}^{-3}$ ,  $\mu = 8.432 \text{ cm}^{-1}$ ,  $R_{\text{f}} = 0.072$ ,  $R_{\text{w}} = 0.072$ ,  $\text{GOF} = 1.21$ ,  $2\theta_{\text{max}} = 45^\circ$ ,  $T = 295 \text{ K}$ ,  $\text{MoK}\alpha$  ( $\lambda = 0.71073 \text{ Å}$ ), 2944 gemessene Reflexe, davon 1654 mit  $I_0 > 2\sigma(I_0)$ , Nonius-Diffraktometer, NRCVAX-Programm (E. J. Gabe, Y. Le Page, F. L. Lee in *Crystallographic*

*Computing 3: Data Collection, Structure Determination, Proteins and Database* (Hrsg.: G. M. Sheldrick, C. Krueger, R. Goddard), Clarendon, Oxford, **1985**, S. 167–174) zur Verfeinerung. – Die kristallographischen Daten (ohne Strukturaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-108608“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

- [11] J. K. Barton, A. T. Danishefsky, J. M. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2172–2176; A. M. Pyle, J. P. Rehmann, R. Meshoyrer, C. V. Kumar, N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3051–3058.  
 [12] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1989**.  
 [13] P. J. Carter, C.-C. Cheng, H. H. Thorp, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 632–642.  
 [14] H. R. Neenhold, T. M. Rana, *Biochemistry* **1995**, *34*, 6303–6309.  
 [15] I. Saito, M. Takayama, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5590–5591.  
 [16] A. Stassinopoulos, J. Ji, X. Gao, I. H. Goldberg, *Science* **1996**, *272*, 1943–1947.

## Hochregio- und hochstereoselektive Synthese von mannosehaltigen Oligosacchariden mit Acetylbromzuckern als Donoren und teilweise geschützten Mannosederivaten als Acceptoren über Zuckerorthoester-Zwischenstufen\*\*

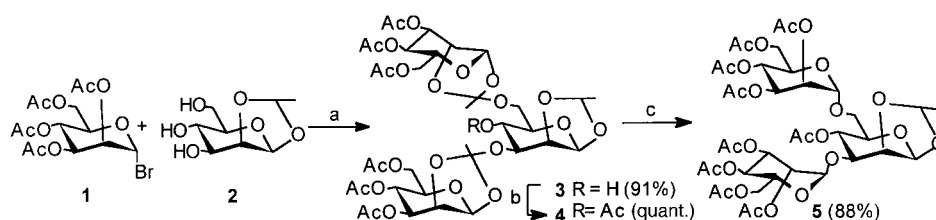
Wei Wang und Fanzuo Kong\*

Viele biologisch bedeutende Naturstoffe wie Glycoproteine,<sup>[1]</sup> die ubiquitären Bestandteile von Zellmembranen, enthalten einen Oligomannopyranose-Kern, wohingegen die Zellwand von Hefe verzweigte Mannane enthält.<sup>[2]</sup> Mannosehaltige Oligosaccharide werden nach bekannten Verfahren<sup>[3]</sup> unter mehrfachem selektivem Schützen und Entschützen hergestellt. Der Einsatz von ungeschützter oder teilweise geschützter Mannose oder Acetylbromzuckern als Ausgangsstoffe für Glycosidierungen ist für den Organiker besonders reizvoll, da die Synthesewege beträchtlich vereinfacht werden können. In einer früheren Arbeit<sup>[4a]</sup> haben wir eine neue Methode für die regio- und stereoselektive Synthese von Oligosacchariden über eine Orthoesterbildung<sup>[4d-m]</sup>/Umlagerung mit un-

geschützten Glucopyranosiden als Glycosylacceptoren und Acetylbromzuckern als Donoren beschrieben, die 1→6-verknüpfte Oligosaccharide in zufriedenstellenden Ausbeuten lieferte. Außerdem wurde mit teilweise geschützten Glucose-acceptoren, bei denen die 2- und 3- oder 3- und 4-Hydroxygruppen ungeschützt waren, eine selektive Glycosylierung in 3-Position durchgeführt. Es stellte sich aber heraus, daß die Glycosylierung mit ungeschützten Glycosiden als Acceptor recht langsam ablief und wegen der schlechten Löslichkeit der Acceptoren im Reaktionsmedium schwierig zu verfolgen war. Wir berichten hier über eine neue Strategie für die hochregio- und hochstereoselektive Synthese von mannosehaltigen Di- und Oligosacchariden über Orthoester-Zwischenstufen durch Kupplung von Acetylbromzuckern mit teilweise geschützten Mannosederivaten, insbesondere ungeschützter 1,2-*O*-Ethylidenmannose, als Acceptoren.

Es ist bekannt, daß das 3,6-verzweigte Manno-trisaccharid Manp $\alpha$ 1→6(Manp $\alpha$ 1→3)Man Bestandteil aller Asparagin-verknüpften Oligosaccharide sowie das bedeutendste Epitop für die Concanavalin-A-Bindung bei Kohlenhydraten vom Oligomannose-Typ ist.<sup>[5]</sup> Die Synthesen des Trisaccharids erfordern den Einsatz verschiedener Schutzgruppen und führen über langwierige Reaktionswege mit niedrigen Ausbeuten zum Produkt.<sup>[6]</sup> Mit der neu entwickelten Orthoesterbildungs/Umlagerungs-Strategie wurde das Trisaccharid einfach durch Kuppeln von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosylbromid **1** (2.4 Äquiv.) mit 1,2-*O*-Ethyliden- $\beta$ -D-mannopyranose **2** (1 Äquiv.) in Gegenwart von Silbertrifluormethansulfonat (AgOTf, 2.2 Äquiv.) und 2,4-Lutidin (2.4 Äquiv.), gefolgt von einer Umlagerung, hergestellt (Schema 1).<sup>[7]</sup>

Die Bildung des Trisacchariddiorthoesters **3** erfolgt hochregioselektiv; es wurde keine Substitution in Position 4 beobachtet, und **3** und **4** fielen als farblose Kristalle an. Die Struktur von **3** wurde über das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum eindeutig identifiziert,<sup>[8]</sup> das zwei charakteristische Signale bei  $\delta$  = 5.54 und 5.50 für H1' bzw. H1'' enthält, sowie über das <sup>1</sup>H-NMR-



Schema 1. Synthese von **5**. a) AgOTf/2,4-Lutidin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Molekularsieb (4 Å), 3 h; b) Ac<sub>2</sub>O/wasserfreies Pyridin; c) TMSOTf/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Molekularsieb (4 Å), –30°C, 30 min.

[\*] Prof. Dr. F. Kong, Dr. W. Wang  
 Research Center for Eco-Environmental Sciences  
 Academia Sinica  
 P.O. Box 2871, Beijing 100085 (China)  
 Fax: (+86) 10-62923563  
 E-mail: fzkong@mail.rcees.ac.cn

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Chinesischen Akademie der Wissenschaften (Projekt KJ952J,510) und der National Natural Science Foundation of China (Projekt 29802009) gefördert.

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

Spektrum des Acetylierungsprodukts **4**, das ein neues Triplett bei  $\delta$  = 5.12 aufweist – ein klarer Hinweis<sup>[8]</sup> auf das Vorliegen einer Glycosylierung in 3- und in 6-Position. Die Umlagerung<sup>[4a-c, 9]</sup> von **4** in Gegenwart von Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) lieferte das 3,6-verzweigte Manno-trisaccharid **5** in hoher Ausbeute. Sein 2D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum enthielt ebenfalls einen klaren Hinweis<sup>[8]</sup> auf die 3,6-Diglycosylierung.

Der Orthoester **3** ist eine sehr wichtige Zwischenstufe. Er kann am reduzierenden Ende modifiziert werden, um mit