

die Claisen-Umlagerung einer derartig konfigurierten Verbindung ist. Die in Abbildung 1 gezeigte Boot-Sessel-Konformation von **5** kann bereits aus den 3J -Kopplungen im ^1H -NMR-Spektrum abgeleitet werden und wird durch die im zweidimensionalen Experiment beobachteten transanularen NO-Effekte gestützt. Die sehr scharfen Signale deuten auf eine durch die drei planaren Zentren stark eingeschränkte Flexibilität, die schon bei geringer substituierten Systemen zu bemerkenswerter Stereoselektivität bei nachfolgenden Reaktionen führte.^[8]

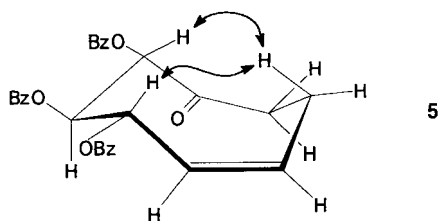


Abb. 1. Aus NMR-Daten abgeleitete Boot-Sessel-Konformation von **5**. Die Pfeile geben beobachtete NO-Effekte wieder.

Diese Tatsache sowie drei definierte chirale Zentren aus dem ursprünglichen Kohlenhydratgerüst und die hohe Dichte funktioneller Sauerstoffgruppen, die synthetisch leicht zu verändern sind, lassen Verbindungen wie **5** als vielfältig nutzbare Synthesebausteine attraktiv erscheinen, die nun in wenigen Schritten aus dem einfachen und verbreiteten Ausgangsmaterial D-Glucose zugänglich sind.

Experimentelles

5: Eine Lösung aus 52 mg (0.11 mmol) **4** in 5 mL wasserfreiem Xylol wird 12 h unter Rückfluß erhitzt. Der nach Verdampfen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand wird chromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (5/1) als Eluens gereinigt. Dabei werden 31 mg (60%) **5** als farbloser Sirup erhalten. $[\alpha]_D^{20} = -49.5$ ($c = 1$, Chloroform). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.43$ –2.50 (m, H-7_{ax}), 2.60 (ddd, H-8_{ax}, $J = 4.6, 12.7, 13.2$ Hz), 2.85–2.95 (m, H-7_{ax}), 3.13 (ddd, H-8_{ax}, $J = 4.1, 12.7$ Hz), 5.53 (d, H-2, $J = 8.6$ Hz), 5.62 (dd, H-5, $J = 7.1, 11.2$ Hz), 5.71 (dd, H-3, $J = 8.6, 10.7$ Hz), 5.92 (m, H-6), 6.22 (ddd, H-4, $J = 1.5, 7.1, 10.2$ Hz), 7.20–7.47, 7.79–7.85 (2 \times m, 9H, 6 H, Aryl). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 22.01$ (C-7), 42.08 (C-8), 68.91 (C-4), 69.51 (C-3), 76.32 (C-2), 126.88–132.63 (C-5, C-6, Aryl-C), 164.45, 164.48, 164.74 (3 \times CO_2), 203.78 (C-1).

Eingegangen am 14. Mai 1997 [Z.10438]

Stichwörter: Carbocyclen • Kohlenhydrate • Umlagerungen

- Thaisrivongs, N. Vanier, C. S. Wilcox, *ibid.* **1980**, 45, 48–61; h) R. J. Ferrier, N. Vethaviyasar, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1973**, 1791–1793.
- [5] a) M. L. Shulman, S. D. Shiyan, A. Y. Khorlin, *Carbohydr. Res.* **1974**, 33, 229–235; b) S. D. Shiyan, M. L. Shulman, A. Y. Khorlin, *Izv. Akad. Nauk SSR, Ser. Khim.* **1973**, 2386–2387.
- [6] a) K. Sato, N. Kubo, R. Takada, S. Sakuma, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, 66, 1156–1165; b) K. Sato, S. Sakuma, Y. Nakamura, J. Yoshimura, H. Hashimoto, *Chem. Lett.* **1991**, 17–20; c) K. Sato, N. Kubo, R. Takada, A. Aqeel, H. Hashimoto, J. Yoshimura, *ibid.* **1988**, 1703–1704.
- [7] a) R. E. Ireland, D. Häbich, *Chem. Ber.* **1981**, 114, 1418–1427; b) *Tetrahedron Lett.* **1980**, 1389–1392.
- [8] a) S. L. Schreiber, D. B. Smith, G. Schulte, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 5994–5996; b) S. A. Hardinger, P. L. Fuchs, *ibid.* **1987**, 52, 2739–2749; c) W. C. Still, I. Galyanker, *Tetrahedron* **1981**, 37, 3981–3996.

Die Spaltung von DNA mit Bis(phenanthrolin)kupfer verläuft ohne intramolekulare Wasserstoffwanderung**

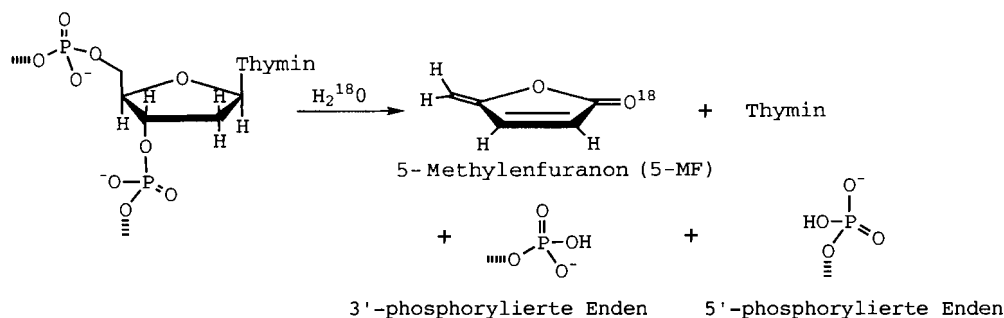
Ottile Zelenko, James Gallagher und David S. Sigman*

Die Hauptprodukte der chemischen Spaltung von DNA durch Bis(1,10-phenanthrolin)kupfer $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ und Wasserstoffperoxid sind 5'- und 3'-Phosphomonoester, freie Purine und Pyrimidine sowie 5-Methylenfuranon (5-MF) (Schema 1).^[1] Bei 5-MF handelt es sich um ein cyclisches Lacton, dessen Carbonyl-Sauerstoffatom, das nicht nachträglich mit Sauerstoffatomen des Lösungsmittels austauscht,^[2] aus dem Lösungsmittel Wasser stammt.^[3] Die Umsetzung ist unter physiologischen Bedingungen schnell, und es wird keine Base als Katalysator für die den Bruch des Phosphodiester-Rückgrats auslösenden Eliminierungsreaktionen benötigt.^[3] Die Isolierung von 5-MF,^[4] der „3'-Stagger“ in den Schnittstellen der beiden Stränge von Duplex-DNA^[4–6] und der Schutz vor Spaltung durch in der kleinen Furche bindende Liganden wie Netropsin^[7] lassen vermuten, daß die Reaktion des tetraedrischen Chelatkomplexes von einer Bindungsstelle innerhalb der kleinen Furche erfolgt.

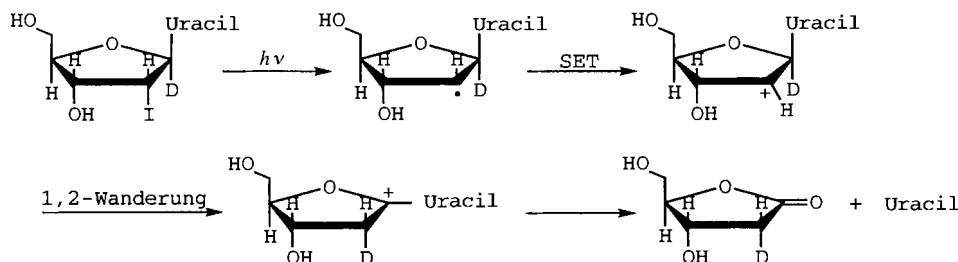
Um den genauen Mechanismus der chemischen Spaltung^[8] aufzuklären, haben eine Reihe von Versuchen unter Verwendung von DNA mit deuteriumsubstituierten Desoxyribosen begonnen. Neuere Befunde von Sugiyama, Fujimoto und Saito, die durch Photolyse von 5-Ioduridin und 2'-Desoxy-2-ioduridin C-2'-Radikale erzeugten, sprechen für die Spaltung des Phosphodiester-Rückgrats^[9] durch einen neuartigen Mechanismus, den wir bisher nicht in Erwägung gezogen hatten. Sugiyama et al. zeigten, daß die Photolyse von C-1'D-2'-Desoxy-2'-ioduridin zum entsprechenden 2-Desoxyribolacton führt, wobei mehr als 90% der Deuteriummarkierung nun in der C-2'-Position der Desoxyribose vorliegt (Schema 2). Die Ausbeute an 5-MF ist bei dieser Reaktion variabel und hängt

[*] Prof. D. S. Sigman, O. Zelenko, J. Gallagher
Department of Biological Chemistry, School of Medicine
Department of Chemistry and Biochemistry and
Molecular Biology Institute
University of California
Los Angeles, CA 90095-1570 (USA)
Telefax: Int. + 310/206-7286
E-mail: sigman@mbi.ucla.edu

[**] Diese Arbeit wurde durch den United States Public Health Service (GM 21199) unterstützt. Wir danken Ed Ruth vom Environmental Engineering Analytical Chemistry Laboratory, Department of Civil and Environmental Engineering, University of California, Los Angeles, für Hilfe bei der Massenspektrometrie.



Schema 1.



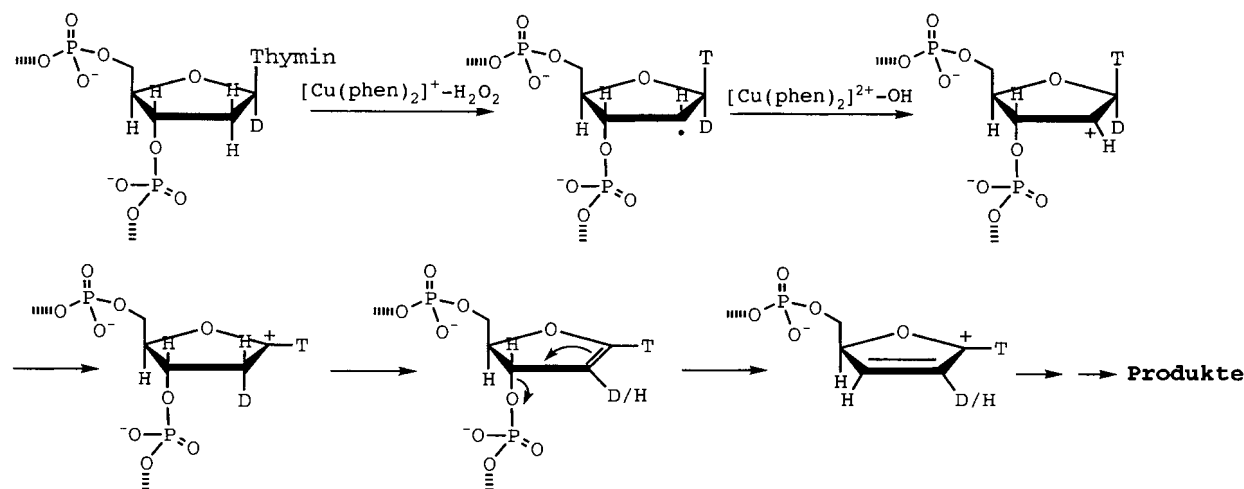
Schema 2. SET = Einelektronentransfer.

von der Polarität des Lösungsmittels ab.^[9] Die Autoren vermuten, daß die Gegenwart eines 3'-Phosphatrests die heterolytische Spaltung der Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung erleichtern würde.^[9]

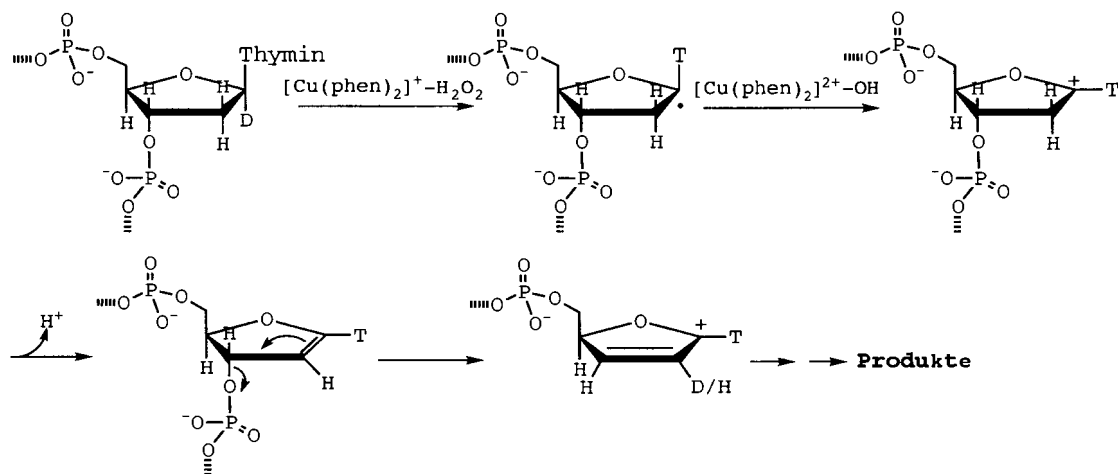
Nach diesen Befunden wäre ein möglicher Reaktionsweg für die DNA-Spaltung, daß durch die Oxidation von $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ mit Wasserstoffperoxid ein Zwischenprodukt entsteht (dessen genaue Struktur noch untersucht wird), das ein Wasserstoffatom vom C-2'H in der kleinen Furche abstrahiert (Schema 3). Im Anschluß an die Wasserstoff-Abstraktion würde das C-2'-Radikal durch das DNA-gebundene $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}\text{-OH}$ in einer Einelektronen-Oxidation zum C-2'-Carbokation oxidiert werden. Durch 1,2-Hydridverschiebung würde dann ein C-1'-Carbokation erzeugt, und danach könnte eine Reihe nicht stereospezifischer Eliminierungsreaktionen ablaufen, die zu den erwarteten Produkten führen.

Wir haben die Möglichkeit einer C-2'-Wasserstoff-Abstraktion mit anschließender 1,2-Wasserstoff-Verschiebung bei der DNA-Spaltung durch $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ überprüft, indem wir C-1'D-Thymidin enthaltende DNA untersucht haben. Spezifisch markierte DNA, die den Sequenzpositionen -40 bis +40 des *E.-coli*-lac-UV5-Fragments entspricht, wurde in beiden Strängen mit C-1'-deutertem Thymidin synthetisiert. Nach der Spaltung mit $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ wurde das entstandene 5-MF isoliert und mit denselben massenspektroskopischen Methoden untersucht, mit denen der Ursprung des Sauerstoffs im 5-MF identifiziert wurde.^[3] 5-MF aus unmarkierter DNA zeigte – in Übereinstimmung mit der Analyse von Grundmann und Kober^[10] – ein dem natürlichen Vorkommen von Deuterium und ^{13}C entsprechendes Isotopenverhältnis m/z 97:96 von $4.5 \pm 0.4\%$ (erwarteter Wert: 5.6%). Das 5-MF aus der Spaltung von DNA, die mit C-1'-Deuterium markiertem Thymidin hergestellt wurde, zeigte ein Isotopenverhältnis m/z 97:96 von 5.3%. Demnach ist das 5-MF unter diesen Bedingungen nicht mit Deuterium angereichert.

Diese Ergebnisse schließen aus, daß die DNA-Spaltung mit einer C-2'H-Abstraktion beginnt (1. Schritt in Schema 3), sind aber in Einklang mit dem von uns postulierten Reaktionsmechanismus, bei dem eine C-1'H-Abstraktion die Reaktionssequenz einleitet (Schema 4). Die Tatsache, daß das DNA-Rückgrat spontan ohne Erhitzen oder Zugabe von Base gespalten wird, führte zu der Annahme, daß das C-1'-Carbokation nicht zu einem Desoxyribonolacton reagiert. Statt dessen wird ein C-2'-Proton abgespalten (Schema 4), ein Reaktionsschritt, der möglicherweise durch die benachbarte 3'-Phosphatgruppe elektrostatisch begünstigt ist. Als nächstes erfolgt die Eliminierung des 3'-Phosphats unter Bildung des



Schema 3. T an den Positionen C-1' steht für Thymin.



Schema 4. T an den Positionen C-1' steht für Thymin.

resonanzstabilisierten Carbokations, welches dann nucleophil mit Wasser reagiert, wodurch das Carbonylsauerstoffatom in 5-MF eingebaut wird. Nach Sugiyama et al.^[9] verläuft die intramolekulare 1,2-Hydridwanderung stereospezifisch, während der Verlust von C-2'H keine ausgeprägte stereochemische Präferenz zeigen sollte. Da etwa 30% der in der DNA gespaltenen Nucleotide Thymidinreste waren und die Spaltungsreaktion effektiv „Nucleotid-neutral“ verläuft – mit einer geringfügigen Präferenz für Gs, einer herabgesetzten Präferenz für Cs und keiner für A und T^[5,6] –, sollte das Isotopenverhältnis m/z 97:96 im Falle eines Mechanismus mit 1,2-Hydridwanderung gut feststellbare 19% betragen.

Die Analyse des Isotopen-„Scramblings“ in DNA, die mit Nucleotiden hergestellt wurde, die im Desoxyribose-Teil spezifisch deuteriert sind, ergibt Hinweise auf Zwischenprodukte, die nicht in einem kinetisch langsamen Schritt gebildet werden. Die Bildung von 5-MF bei der chemischen Spaltung von DNA durch $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ und H_2O_2 erfordert die Abspaltung eines C-2'-Wasserstoffatoms. Wäre eine Wanderung von C-1'D in die C-2-Position erfolgt, wie nach den mechanistischen Untersuchungen der Photolyse von C-1'D-2'-Desoxy-2'-ioduridin zu erwarten war, hätte sich das Isotopenverhältnis m/z 97:96 vergrößern müssen. Die Tatsache, daß wir keine Wanderung des C-1'-Deuteriumatoms beobachten konnten, spricht eindeutig gegen einen oxidativen Angriff auf das C-2'-pro-R-Wasserstoffatom durch die an DNA gebundene oxidierende Spezies, die bei der Reaktion von Wasserstoffperoxid mit dem Kupferion entsteht. Unsere Ergebnisse sind hingegen in Übereinstimmung mit der Vorstellung, daß im ersten Reaktionsschritt das C-1'-Wasserstoffatom durch die in der kleinen Furche reagierende chemische Nuclease abstrahiert wird.

Experimentelles

Alle Chemikalien für Synthesen wurden von Aldrich bezogen, nur die für die Oligonucleotidsynthese benötigten Phosphoramidit-Bausteine von Glen Research. Das am C-1' der Desoxyribose deuterierte Thymidinphosphoramidit wurde nach Literaturvorschriften synthetisiert [11, 12]. Die Strukturaufklärung der Verbindung erfolgte durch ^1H -NMR- und ^{31}P -NMR-Spektroskopie (Bruker 400 MHz). Der Deuteriumgehalt wurde durch ^1H -NMR zu $\geq 95\%$ ermittelt. Die Synthese der Einzelstränge des lac-UV5-Fragments (– 40 bis + 40) wurde mit der Standard-Phosphoramiditchemie an einem Pharmacia LKB Gene Assembler durchgeführt. Die Reinigung der Oligonucleotide erfolgte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE, 15%) unter denaturierenden Bedingungen.

Bei einem typischen Spaltungsexperiment wurde doppelsträngiges lac-UV5-Fragment (250 μg , 15 μM) in 50 mM Tris/HCl (pH 8.0) und 5 mM Ascorbinsäure

mit $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ (10:1 phen:CuSO₄) bis zu einer Endkonzentration von 10 μM Cu²⁺ versetzt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur 40 min durchgeführt. Nach Erhitzen (90 °C, 40 min) wurde 5-MF durch Extraktion in Ether isoliert. Das konzentrierte Etherextrakt wurde wie beschrieben [3] durch GC/MS analysiert. Unter den Bedingungen erfolgte – wie anhand der Analyse von Umsetzungen mit ^{32}P -markierter DNA gezeigt werden konnte – eine vollständige Spaltung der DNA. Bei der Anwendung von 20% PAGE blieb keine Ausgangsbänder zurück, und es wurde nur eine Hauptbande erhalten, die einem Fragment mit ≤ 2 Basen entsprach.

Eingegangen am 21. Februar,
veränderte Fassung am 18. August 1997 [Z10147]

Stichwörter: Bioanorganische Chemie · DNA-Spaltung · Kupfer · Reaktionsmechanismen

- [1] D. S. Sigman, A. Mazumder, D. M. Perrin, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2295–2316.
- [2] M. Pitie, J. Bernadou, B. Meunier, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2935–2936.
- [3] M. Meijler, O. Zelenko, D. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1135–1136.
- [4] T. E. Goynes, D. S. Sigman, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2846–2848.
- [5] C. Yoon, M. D. Kuwabara, R. Law, R. Wall, D. S. Sigman, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 8458–8463.
- [6] C. Yoon, M. D. Kuwabara, A. Spassky, D. S. Sigman, *Biochemistry* **1990**, 29, 2116–2121.
- [7] M. Kuwabara, C. Yoon, T. E. Goynes, T. Thederahn, D. S. Sigman, *Biochemistry* **1986**, 25, 7401–7408.
- [8] a) L. Worth, Jr., B. L. Frank, D. F. Christner, M. J. Absalon, J. Stubbe, J. W. Kozarich, *Biochemistry* **1993**, 32, 2601–2609; b) W. K. Pogozelski, T. J. McNeese, T. D. Tullius, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6428–6433; c) G. Pratiel, J. Bernadou, B. Meunier, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 746–769.
- [9] H. Sugiyama, K. Fujimoto, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2945–2946.
- [10] C. Grundmann, E. Kober, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 2332–2333.
- [11] P. Kohn, R. H. Samaritano, L. M. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 5475–5480.
- [12] M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 3185–3191.