

(*t*BuNO₂), Reduktion (LiAlH₄, THF) und Kondensation mit Trioxan hergestellt (51 % Gesamtausbeute). **4** und **5** wurden aus den entsprechenden Hydrazinen^[1] durch Reaktion mit Trioxan synthetisiert und durch Destillation bzw. Flash-Chromatographie gereinigt.

7a,b–11a,b: Zu einer Lösung der Hydrazone **1–5** (3 mmol) in Toluol (**a**, 2 mL) oder Cyclohexan (**b**, 5 mL) wurden die Ketone **6a** (6 mmol) bzw. **6b** (12 mmol) gegeben, und die Mischung wurde gerührt, bis dünnschichtchromatographisch (DC) kein Hydrazon mehr nachweisbar war. Der Ansatz wurde eingengt und durch Flash-Chromatographie gereinigt.

7c–e und **11c–e**: Das Hydrazon **1** oder **5** wurde in einem Überschuß (ungefähr 5 Äquiv.) an Keton (**6c–e**) gelöst und die erhaltene Mischung bis zur vollständigen Umsetzung des Hydrazons gerührt (DC). Nicht-umgesetztes Keton wurde durch eine Kugelrohrdestillation zurückgewonnen (75–85 %) und der Rückstand durch Flash-Chromatographie gereinigt.

12 und **14** wurden aus **11** unter Standardbedingungen synthetisiert.

13: Ozon wurde durch eine Lösung von **12** (1 mmol) in wasserfreiem CH₂Cl₂ (5 mL) bei –78 °C bis zum dauerhaften Auftreten einer blauen Farbe (5–10 min) geleitet. Anschließend wurde Me₂S (5 mmol) zugefügt und die Mischung auf Raumtemperatur erwärmt, eingengt und der erhaltene Rückstand durch Säulenchromatographie gereinigt.

15: Die Ozonolyse wurde ausgehend von **14** wie für **13** beschrieben durchgeführt, jedoch wurde nur 1 mmol Me₂S zugegeben. Zur resultierenden Lösung wurden *t*BuOH (12 mL) und Isobuten (10 mL) gegeben. Nach dem Kühlen auf 0 °C wurde eine Lösung von NaClO₂ (10 mmol) und KH₂PO₄ (9 mmol) in H₂O (12 mL) zugetropft und die Mischung 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand mit 1 M NaOH behandelt und mit Et₂O (2 × 10 mL) extrahiert. Die wäßrige Phase wurde auf pH 1 angesäuert (HCl) und extrahiert (AcOEt, 10 × 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden eingengt und durch Flash-Chromatographie gereinigt.

Eingegangen am 19. Juni 1998 [Z12015]

Stichwörter: Asymmetrische Synthesen • Chirale Auxiliare • Fluor • Hydrazone • Nucleophile Additionen

- [1] a) J. T. Welch, S. Eswarakrishnan, *Fluorine in Bioorganic Chemistry*, Wiley, New York, **1991**; b) *Organofluorine Chemistry, Principles and Commercial Applications* (Hrsg.: R. E. Banks, B. E. Smart, J. C. Tatlow), Plenum, New York, **1994**.
- [2] a) T. Ido, K. Fukushi, T. Irie in *Biomedical Aspects of Fluorine Chemistry* (Hrsg.: R. Filler, Y. Kobayashi), Kodansha, Tokio, und Elsevier, Amsterdam, **1982**; b) *Organofluorine Compounds in Medicinal Chemistry and Biomedical Applications* (Hrsg.: R. Filler, Y. Kobayashi, L. M. Yagupolskii), Elsevier, Amsterdam, **1993**.
- [3] a) S. Arakawa, K. Nito, J. Seto, *J. Mol. Cryst. Liq.* **1991**, *204*, 15; b) R. Buchecker, S. M. Kelly, J. Fünfschilling, *Liq. Cryst.* **1990**, *8*, 217; c) T. R. Doyle, O. Vogol, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8510; d) Y. Suzuki, T. Hagiwara, I. Kawamura, N. Okamura, T. Kitazume, M. Kakimoto, Y. Imai, Y. Ouchi, H. Takezoe, A. Fukuda, *Liq. Cryst.* **1989**, *6*, 167.
- [4] J. Wiedemann, T. Heiner, G. Mloston, G. K. Surya Prakash, G. Olah, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 880–881; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 820–821, zit. Lit.
- [5] a) P. Bravo, M. Frigerio, G. Resnati, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4216–4218; b) A. Dondoni, A. Boscarato, P. Formaglio, J.-P. Bégué, F. Benayoud, *Synthesis* **1995**, 654–658.
- [6] a) J. M. Lassaletta, R. Fernández, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3691–3694; b) R. Fernández, C. Gasch, J. M. Lassaletta, J. M. Llera, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 471–472; c) D. Enders, R. Syrig, G. Raabe, R. Fernández, C. Gasch, J. M. Lassaletta, J. M. Llera, *Synthesis* **1996**, 48–52; d) J. M. Lassaletta, R. Fernández, C. Gasch, J. Vázquez, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 9143–9160.
- [7] J. M. Lassaletta, R. Fernández, E. Martín-Zamora, E. Díez, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7002–7003; b) E. Díez, F. Fernández, C. Gasch, J. M. Lassaletta, J. M. Llera, E. Martín-Zamora, J. Vázquez, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5144–5155.

- [8] J. M. Lassaletta, R. Fernández, E. Martín-Zamora, C. Pareja, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5787–5790.
- [9] Geeignete Kristalle wurden aus niedrigsiedendem Petrolether bei Raumtemperatur gewonnen. C₂₂H₂₅F₃N₂O₂, *M*_r = 406.44, Kristallgröße 0.1 × 0.4 × 0.4 mm, orthorhombisches Kristallsystem, Raumgruppe *P*2₁2₁2₁, *a* = 7.4267(10), *b* = 14.081(2), *c* = 20.344(3) Å, *V* = 2127.5(5) Å³, *Z* = 4, *ρ*_{ber.} = 1.269 g cm^{–3}, 1.76° < *θ* < 23.32°, MoKα-Strahlung (λ = 0.71073 Å), *T* = 296(2) K, 4500 gesammelte Reflexe, davon 2830 unabhängig [*I* > 2σ(*I*)], 362 Parameter, *R* = 0.0682 (*wR* = 0.1100). Der Kristall wurde mit Epoxidharz überzogen und auf einem CCD-Diffraktometer vermessen. Die Intensitäten wurden für Lorentz- und Polarisierungseffekte korrigiert; es wurde keine Absorptionskorrektur durchgeführt. Die Struktur wurde mit Patterson- und Fourier-Methoden gelöst und anschließend verfeinert. Die Positionen der Wasserstoffatome wurden aus einer Differenzsynthese abgeleitet, ihre Koordinaten und isotropen Temperaturfaktoren wurden verfeinert, außer für H2, dessen Temperaturfaktor konstant gehalten wurde. Die Verfeinerung gegen *F*² nutzte alle Reflexe. Die Wichtungsfaktoren (*wR*) und alle GOFs beziehen sich auf *F*², die konventionellen *R*-Faktoren auf *F*. Für die Konfiguration an C(5) wurde die im chiralen Auxiliär verwendet. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturdaten) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-102999“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [10] D. J. Bailey, D. O'Hagan, M. Tavasli, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 149–153.
- [11] D. Enders, H. Kipphardt, P. Gerdes, L. J. Breña-Valle, V. Buhshan, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1988**, *97*, 691–704.

Detektion spezifischer nichtkovalenter Zinkfingerpeptid-Oligodesoxynucleotid-Komplexe durch matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie**

Edda Lehmann und Renato Zenobi*

Das Genom aller Retroviren, einschliesslich des HIV-1, codiert für ein gag-Polypeptid, das zinkbindende Domänen des Typs CCHC enthält (CCHC = Cys-X₂-Cys-X₄-His-X₄-Cys, X = beliebige Aminosäure).^[1] Diese Domänen spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung viraler Ribonucleinsäure und bei der Replikation des Virus. Die Wechselwirkung zwischen Peptiden mit solchen Motiven und einsträngigen Nucleinsäuren wurde eingehend untersucht,^[2, 3] vor allem im Hinblick auf die Entwicklung antiviraler Agentien für die Behandlung von AIDS.^[4] Die bei diesen Untersuchungen verwendeten Methoden sind zeitaufwendig und teuer. Wir zeigen nun, dass spezifische nichtkovalente Komplexe durch

[*] Prof. Dr. R. Zenobi, E. Lehmann
Laboratorium für Organische Chemie, ETH-Zentrum
Universitätsstrasse 16, CH-8092 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 1-632-1292
E-mail: zenobi@org.chem.ethz.ch

[**] Wir danken Stefan Vetter für zahlreiche Diskussionen und seine Unterstützung, Dr. Christophe Masselon für die Aufnahme der FTICR-Massenspektren sowie der Kommission für Technologie und Innovation (KTI, Projekt 3165.1) für finanzielle Unterstützung. E. L. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Kekulé-Stipendium.

matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisations(MALDI)-Massenspektrometrie nachgewiesen werden können. Ausserdem scheint diese Methode für das rasche Screening antiviraler Agentien geeignet zu sein. Die MALDI-Massenspektrometrie wird heute bei der Analyse grosser Biomoleküle intensiv genutzt.^[5] Der Nachweis spezifischer nichtkovalenter Komplexe steckt jedoch noch in den Anfängen,^[6] vielleicht auch deshalb, weil Komplexe, die unter physiologischen Bedingungen in Lösung stabil sind, die Laserdesorptions- und -ionisationsprozesse möglicherweise nicht überleben. Dank sorgfältig geplanter Kontrollexperimente konnten wir nun eine Korrelation zwischen dem Auftreten eines spezifischen nichtkovalenten Dreifachkomplexes in Lösung und in den MALDI-Massenspektren zeigen.

Für die Studie wurde ein Peptid des Typs CCHC mit 18 Aminosäuren und der Sequenz acVKCFNCGKEGHIARN-CRA-OH ausgewählt. Diese Sequenz entspricht der ersten Zinkfingerdomäne des gag-Proteins p55 des HIV-1, genannt p55F1. Das Peptid hat in Abwesenheit von Metallionen keine definierte Sekundärstruktur. Erst die Komplexbildung von Metallionen führt zu der Faltung, die für die Wechselwirkung mit Nucleinsäuren notwendig ist.^[2, 7] Peptide des Typs CCHC binden Zn^{2+} sehr stark, andere Übergangsmetallionen dagegen viel schwächer.^[8] Im Zn-p55F1-Komplex ist Zn^{2+} tetraedrisch durch drei Cystein- und einen Histidinrest koordiniert.^[9] Bei einer ersten MALDI-Studie zur Komplexbildung von Metallionen durch p55F1 fanden wir,^[10] dass der detektierte Zn-p55F1-Komplex spezifisch ist und dass die Komplexbildung qualitativ mit jener in Lösung korreliert (siehe auch Lit. [11]).

Nun untersuchten wir den Dreifachkomplex Zn-p55F1-d(TTGTT) massenspektrometrisch, da eine Bindung von d(TTGTT) an Zn-p55F1 in Lösung nachgewiesen worden ist.^[3] Das Oligodesoxynucleotid bindet an eine hydrophobe Tasche an der Peptidoberfläche. Aus Stabilitätsgründen werden üblicherweise einsträngige Oligodesoxynucleotide als Bindungspartner für ribonucleinsäurebindende CCHC-Zinkfinger verwendet.^[3]

Alle hier vorgestellten Massenspektren wurden in positiver Polarität mit einem linearen Flugzeitspektrometer aufgenommen, das bereits detailliert beschrieben ist.^[11] Abbildung 1A zeigt das Massenspektrum einer Mischung aus d(TTGTT) und p55F1. Die Signale der protonierten Moleküle von p55F1 ($[P+H]^+$) und d(TTGTT) ($[O+H]^+$) sind neben schwachen Signalen eines Oligodesoxynucleotid-Fragments (m/z 1399) und eines nichtspezifischen Addukts beider Komponenten zu sehen. Dieses Addukt wird wahrscheinlich durch elektrostatische Wechselwirkungen zusammengehalten. Nach der Zugabe von Zn^{2+} tritt ein Signal für den spezifischen Dreifachkomplex aus p55F1, Zn^{2+} und d(TTGTT) auf (Abb. 1B, m/z 3598); daneben werden schwächere Signale von p55F1-d(TTGTT)-Addukten ohne Zn^{2+} und mit zwei Zn^{2+} -Ionen beobachtet. Alle Signale entsprechen einfach geladenen Spezies. Die Überschussladung von Zn^{2+} wird durch Deprotonierung des Peptids oder Oligodesoxynucleotids kompensiert, was mit hochauflösender Fourier-Transformations-Ionencyclotronresonanz (FTICR) - Massenspektrometrie bestätigt wurde. Adduktssignale bei höheren Massen waren von vernachlässigbarer Intensität.

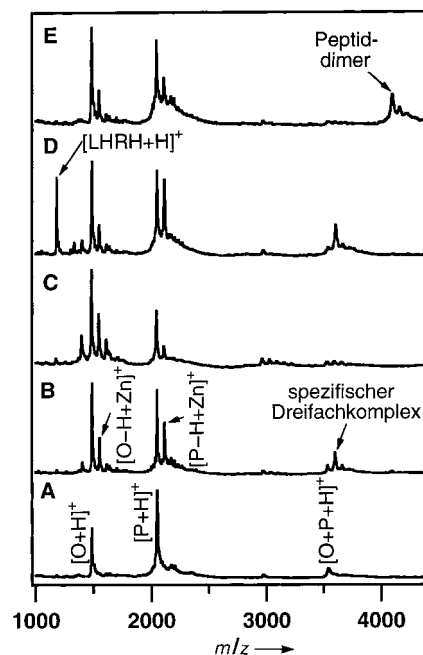


Abb. 1. MALDI-Massenspektren (AMNP-Matrix) von p55F1 und d(TTGTT) im Molverhältnis 33:1 A) ohne Zugabe von Zn^{2+} bei pH 6.5–7, B) nach Zugabe von Zn^{2+} (Molverhältnis Zn^{2+} :p55F1 = 5:1) bei pH 6.5–7, C) gleich wie (B), aber bei pH 5–5.5, D) gleich wie (B), aber mit Zugabe von LHRH bei pH 7, E) gleich wie (B), aber mit Zugabe von Cu^{2+} in gleicher molarer Quantität wie Zn^{2+} . Die Metallionenaddukte an p55F1 (m/z 2113) und sein Dimer (m/z 4262) stammen aus einer nichtspezifischen Gasphasenreaktion.

Die Signale des Dreifachkomplexes und des Zn-p55F1-Komplexes sind schwächer als jene der Einzelkomponenten. Im Falle von Zn-p55F1 wurden die Gründe schon diskutiert.^[10] Ähnliche Argumente können für den Dreifachkomplex herangezogen werden: Unterschiedliche Desorptions-, Ionisations- und Detektionseffizienzen des Dreifachkomplexes, des Zn-p55F1-Komplexes, des Peptids (im Überschuss vorhanden) und von d(TTGTT) sowie eine teilweise Oxidation des Peptids und eine teilweise Dissoziation der Komplexe während der Kristallisation oder des MALDI-Vorgangs tragen dazu bei, dass das Signal des Dreifachkomplexes schwächer ist als diejenigen der Komponenten. Damit wird klar, dass die relativen Konzentrationen der Spezies (Komplex und seine Komponenten) in Lösung nicht direkt mit ihren relativen Signalintensitäten in den MALDI-Massenspektren verglichen werden können.^[10] Schlussfolgerungen bezüglich der Spezifität des Komplexes können auch nicht allein anhand von Signalintensitäten gezogen werden; vielmehr müssen sorgfältig geplante Kontrollexperimente, z.B. die Variation des pH-Wertes oder Konkurrenzexperimente, durchgeführt werden. Die Spezifität von Zn-p55F1 wurde schon in solchen Experimenten nachgewiesen.^[10] Ähnliche Versuche für Zn-p55F1-d(TTGTT) sind im folgenden beschrieben.

Die Untersuchung von Zn-p55F1 in Lösung mit Circular dichroismus hatte ergeben, dass dieser Komplex nur bei pH > 6 stabil ist.^[10] Dies erwarteten wir auch für den Dreifachkomplex, da das Oligodesoxynucleotid nur an das zinkkomplexbildende p55F1 bindet. Reflektieren MALDI-Massenspektren das Verhalten in Lösung, dann sollte die Absenkung des pH

auf einen Wert unter 6 zu einer signifikanten Schwächung des Signals des spezifischen Dreifachkomplexes führen. Genau dies wurde experimentell beobachtet (Abb. 1 C): Das Signal von Zn-p55F1 relativ zu demjenigen von p55F1 war viel schwächer und das des Dreifachkomplexes verschwunden. Statt dessen zeigten sich schwache Signale einer Verteilung von nichtspezifischen Zn^{2+} -p55F1-d(TTGTT)- und -d(TTGTT)₂-Addukten. Wir nehmen an, dass die negativ geladenen Phosphodiester-Gruppen des Oligodesoxynucleotids nichtspezifische Addukte mit dem positiv geladenen p55F1 und mit den Zn^{2+} -Ionen bilden. Diese Annahme stimmt sehr gut mit der Beobachtung multipler Zn^{2+} -Addukte des Oligodesoxynucleotids im Massenspektrum in Abbildung 1 C überein.

Um die Spezifität des Dreifachkomplexes zu bestätigen, wurde ein weiteres Peptid (LHRH, luteinizing hormone releasing hormone, m/z 1182) zur Probe gegeben (Abb. 1 D). LHRH enthält einen Histidinrest und bindet deshalb potentiell Zn^{2+} -Ionen. Es enthält ausserdem Arginin mit seiner positiv geladenen Seitenkette, das möglicherweise durch elektrostatische Kräfte an die Phosphodiester-Gruppen des Oligodesoxynucleotids binden kann. Diese beiden Wechselwirkungen wären nichtspezifisch. Tatsächlich weist das Spektrum weder ein Zn^{2+} -Addukt dieses Peptids (bei m/z 1246 erwartet) noch einen Dreifachkomplex mit Zn^{2+} und d(TTGTT) (bei m/z 2730 erwartet) auf. Die entsprechenden Komplexsignale von p55F1 sind hingegen genauso stark, d. h. wegen des etwas höheren pH-Wertes sogar stärker als in Abbildung 1 B. Dieses Experiment bestätigt, dass die massenspektrometrisch beobachtete Komplexbildung von Zn^{2+} , p55F1 und d(TTGTT) spezifisch ist.

Wir untersuchten auch, wie sich p55F1 in Gegenwart anderer Metallionen verhält. Es zeigte sich, dass mit Cu^{2+} im Überschuss die Thiolfunktionen des Peptids zu einer intramolekularen Disulfidbindung oxidiert und Cu^{2+} dabei zu Cu^+ reduziert wird.^[10] Da es die Cysteinreste chemisch modifiziert, imitiert Cu^{2+} die Wirkungsweise eines antiviralen Agens. Das modifizierte p55F1 bildet weder mit Zn^{2+} noch mit Oligodesoxynucleotiden Komplexe. Dieses Verhalten spiegelt sich auch im MALDI-Massenspektrum wider: Bei der Zugabe von Cu^{2+} zur Probe werden die Cysteinreste oxidiert und das Signal des Dreifachkomplexes verschwindet (Abb. 1 E). Statt dessen wird ein starkes Signal für das p55F1-Dimer detektiert, da die Oxidation des Peptids unter Beteiligung der dritten Thiolgruppe auch zu intermolekularen Disulfidbindungen führen kann.

Außer d(TTGTT) wurden zur Komplexierung von Zn-p55F1 auch andere Sequenzen, z. B. d(TTATT) und d(ACGCC), eingesetzt. Unsere MALDI-Experimente mit d(TTATT) anstatt d(TTGTT) untermauern die Ergebnisse von Lam et al.^[2] sowie von Gorelick et al.,^[12] die berichten, dass Zn-p55F1 in Lösung nicht sequenzspezifisch ist: Wir fanden, dass der Komplex mit d(TTATT) zu Signalen etwa gleicher Intensität führt wie der mit d(TTGTT). MALDI-Experimente mit Oligodesoxynucleotid-Sequenzen ohne Thymidin waren leider nicht sehr aussagekräftig: Bei der Verwendung von d(ACGCC) als Bindungspartner konnte kaum ein MALDI-Signal detektiert werden, obwohl der entsprechende Dreifachkomplex in Lösung stabil sein sollte.^[3]

Es ist bekannt, dass Oligodesoxynucleotide, die kein Thymidin enthalten, weniger stabil sind und eher fragmentieren. Deshalb sind sie unter den gleichen experimentellen Bedingungen viel schwieriger zu detektieren als solche, die vor allem Thymidin enthalten.^[13]

Wir konnten in dieser Studie zeigen, dass spezifische nichtkovalente Komplexe zwischen Zn^{2+} , dem Zinkfingerpeptid p55F1 und Oligodesoxynucleotiden durch MALDI-Massenspektrometrie detektiert werden können. Darüber hinaus fanden wir, dass auf diese Art die Auswirkungen von pH-Änderungen und chemischen Modifikationen des Zinkfingerpeptids auf die Bildung des Dreifachkomplexes verfolgt werden können. Deshalb ist diese Methode möglicherweise für das rasche Screening antiviraler Agentien geeignet. Die vorliegende Arbeit veranschaulicht nicht nur das Potential der MALDI-Massenspektrometrie für einen schnellen und direkten Nachweis nichtkovalenter Komplexe, sondern verdeutlicht auch, dass unter sorgfältig gewählten Bedingungen massenspektrometrische Daten die Lösungsschemie widerspiegeln können.

Experimentelles

p55F1 (m/z 2049) wurde auf TentaGel-S-Harz aus Fmoc-geschützten Aminosäurederivaten synthetisiert und auf einer C18-Säule gereinigt. Wegen der Oxidationsempfindlichkeit der drei Thiolgruppen der Cysteinreste im CCHC-Motiv wurde p55F1 lyophilisiert und unter Argon oder Stickstoff aufbewahrt. Die Experimente wurden rasch durchgeführt, um die Oxidation zu minimieren. Die Oligodesoxynucleotide d(TTGTT) (m/z 1484), d(TTATT) und d(ACGCC) wurden in entsalzter Form von Microsynth, Balgach, Schweiz, gekauft. Nach der weiteren Entsalzung mit der „Tropfendialyse-Methode“ von Millipore^[10] wurden MALDI-Massenspektren erhalten, die nur das Signal des protonierten Moleküls des Oligodesoxynucleotids aufwiesen und kaum welche von Alkalimetallionen-Addukten. 2-Amino-4-methyl-5-nitropyridin (AMNP) wurde bei der MALDI-Analyse der Zn-p55F1-Oligodesoxynucleotid-Komplexe als Matrix verwendet. Diese schwach basische Matrix ist für die MALDI-Untersuchung von Oligodesoxynucleotiden optimiert,^[14] ermöglichte aber auch den gleichzeitigen Nachweis des p55F1-Peptids und des Oligodesoxynucleotids bei einem physiologischen pH-Wert der Probenlösung. Für die Probenpräparation wurden 10 μL der wässrigen Peptidlösung ($5 \times 10^{-4} \text{ M}$) mit 2.5 μL einer wässrigen ZnCl_2 -Lösung (10^{-2} M) und 2.5 μL einer wässrigen Oligodesoxynucleotid-Lösung ($6.1 \times 10^{-5} \text{ M}$) gemischt. Die ZnCl_2 -Konzentration ist ungewöhnlich hoch für MALDI-Experimente, führte aber zu guten Ergebnissen. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NH_4HCO_3 auf 6.5–7 eingestellt. 3.5 μL dieser Mischung wurden mit 10 μL einer gesättigten, wässrigen AMNP-Lösung vermischt. 2–4 μL der resultierenden Lösung wurden auf die Probenspitze aufgegeben und im kalten Luftstrom getrocknet.

Eingegangen am 7. Juli 1998 [Z12106]

Stichwörter: Massenspektrometrie • Oligonucleotide • Peptide • Zinkfingerprotein

- [1] L. E. Henderson, T. D. Copeland, R. C. Sowder II, G. W. Smythers, S. Oroszlan, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 8400–8406.
- [2] W.-C. Lam, A. H. Maki, J. R. Casas-Finet, J. W. Erickson, B. P. Kane, R. C. Sowder II, L. E. Henderson, *Biochemistry* **1994**, 33, 10693–10700.
- [3] T. L. South, M. F. Summers, *Protein Sci.* **1993**, 2, 3–19.
- [4] a) W. G. Rice, J. G. Supko, L. Malspeis, R. W. Buckheit, Jr., D. Clanton, M. Bu, L. Graham, C. A. Schaeffer, J. A. Turpin, J. Domagala, R. Gogliotti, J. P. Bader, S. M. Halliday, L. Coren, R. C. Sowder II, L. O. Arthur, L. E. Henderson, *Science* **1995**, 270,

- 1194–1196; b) N. B. McDonnell, R. N. De Guzman, W. G. Rice, J. A. Turpin, M. F. Summers, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1969–1976.
- [5] F. Hillenkamp, M. Karas, R. C. Beavis, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1193 A–1203 A.
- [6] a) I. Gruic-Sovulj, H.-C. Lüdemann, F. Hillenkamp, I. Weyand-Durasevic, Z. Kucan, J. Peter-Katalinic, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32084–32091; b) L. R. H. Cohen, K. Strupat, F. Hillenkamp, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 1046–1052; c) M. O. Glocker, S. H. J. Bauer, J. Kast, J. Volz, M. Przybylski, *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 1221–1227; d) A. S. Woods, J. C. Buchsbaum, T. A. Worrall, J. M. Berg, R. J. Cotter, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4462–4465.
- [7] M. D. Delahunty, T. L. South, M. F. Summers, R. K. Karpel, *Biochemistry* **1992**, *31*, 6461–6469.
- [8] a) L. M. Green, J. M. Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 4047–4051; b) L. M. Green, J. M. Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 6403–6407.
- [9] M. F. Summers, T. L. South, B. Kim, D. R. Hare, *Biochemistry* **1990**, *29*, 329–340.
- [10] E. Lehmann, R. Zenobi, S. Vetter, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, im Druck.
- [11] E. Lehmann, R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1483–1492.
- [12] R. J. Gorelick, D. J. Chabot, A. Rein, L. E. Henderson, L. O. Arthur, *J. Virol.* **1993**, *67*, 4207–4036.
- [13] K. Schneider, B. T. Chait, *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1353–1361.
- [14] M. C. Fitzgerald, G. R. Parr, L. M. Smith, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3204–3211.

Carbinhydridorutheniumkomplexe als Katalysatoren für die selektive, ringöffnende Olefinmetathese von Cyclopenten mit Acrylsäuremethylester**

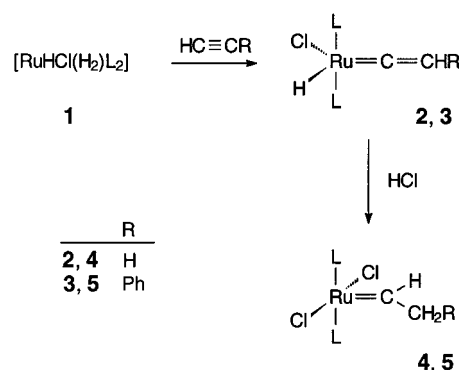
Wolfram Stüer, Justin Wolf, Helmut Werner,*
Peter Schwab und Michael Schulz

Professor Ernst-Otto Fischer zum 80. Geburtstag gewidmet

Carbenrutheniumkomplexe des Typs $[\text{RuCl}_2(=\text{CHR})-(\text{PR}_3)_2]$, die von Grubbs und Mitarbeitern erstmals synthetisiert wurden, sind sehr effiziente Katalysatoren für die Olefinmetathese^[1] und finden zunehmend Verwendung in der organischen Synthese.^[2] Im Unterschied zu den analogen, katalytisch aktiven Verbindungen von Mo und W weisen die Ru-Katalysatoren den Vorteil der Toleranz gegenüber Substraten auf, die polare funktionelle Gruppen enthalten.^[3] Nachteilig ist jedoch die geringere Metatheseaktivität bei

Verwendung elektronenarmer Olefine wie Acrylsäure und deren Derivaten. Uns interessiert besonders die selektive Ring-Öffnungs-Metathese (ring opening metathesis, ROM) von Cyclopenten mit verschiedenen acyclischen Olefinen als Kettentransferreagentien (chain transfer agents, CTA), wobei nicht wie in früheren Arbeiten telechele Polymere die gewünschten Produkte sind,^[4] sondern lineare, funktionalisierte Olefine mit einer Kettenlänge von weniger als 20 Kohlenstoffatomen. Durch Arbeiten z.B. von Blechert, Crowe und Mitarbeitern ist bekannt, daß für die Metathese von elektronenarmen, acyclischen Olefinen als CTA die Grubbs-Katalysatoren ungeeignet sind, während die katalytisch aktiven Carbenkomplexe vom Schrock-Typ bedingt eingesetzt werden können.^[5] Wir berichten hier über die ersten Rutheniumkatalysatoren, die in der Lage sind, die selektive ROM von Cyclopenten mit Acrylsäuremethylester als Beispiel für ein elektronenarmes Olefin zu katalysieren und langkettige, funktionalisierte Olefine als Hauptprodukte zu bilden.^[6]

Kürzlich stellten wir eine effektive Eintopfsynthese der Carbenrutheniumkomplexe $[\text{RuCl}_2(=\text{CHCH}_2\text{R})(\text{PCy}_3)_2]$ ($\text{R} = \text{H}$ (**4**), Ph (**5**)) aus RuCl_3 , Mg , PCy_3 , H_2 , $\text{HC}\equiv\text{CR}$ und H_2O vor.^[7] Bei der Entwicklung der Synthese war der Befund wichtig, daß bei der Umsetzung von **1**^[8] mit 1-Alkinen zunächst die Hydridovinylidenverbindungen **2** und **3**^[9] entstehen, die mit HCl oder deren Syntheseäquivalenten zu den gewünschten Carbenkomplexen **4** und **5** reagieren ($\text{L} = \text{PCy}_3$).



Uns interessierte nun, ob durch die Reaktion der Hydridovinylidenverbindungen **2** und **3** mit Säuren HA , deren Anionen *nicht* an Metallzentren koordinieren, kationische Carbenkomplexe der allgemeinen Zusammensetzung $[\text{RuCl}(=\text{CHCH}_2\text{R})(\text{PCy}_3)_2]^+$ (mit A^- als Gegenion) zugänglich sind, die als 14-Elektronen-Spezies der von Caulton et al. kürzlich beschriebenen Verbindung $[\text{Ru}(\text{Ph})(\text{CO})(\text{PtBu}_2\text{Me})_2]^+$ ^[10] an die Seite gestellt werden können. Setzt man Komplex **2** in Dichlormethan/Diethylether bei -80°C mit HBF_4 in Diethylether im Überschuß um, so erhält man nach geeigneter Aufarbeitung einen gelben Feststoff. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um die erwartete kationische Ethylidenverbindung $[\text{RuCl}(=\text{CHCH}_3)(\text{PCy}_3)_2]\text{BF}_4$, sondern wie die NMR-Spektren belegen um den Carbinhydridokomplex **6**. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt kein Signal im Tieffeldbereich, wie es für das α -H-Atom eines Ethylidenliganden zu erwarten wäre, sondern ein Triplett bei $\delta = -6.91$ ($^2J(\text{P,H}) = 15$ Hz), das einem metallgebundenem Wasserstoffatom zuzu-

[*] Prof. Dr. H. Werner, Dipl.-Chem. W. Stüer, Dr. J. Wolf
Institut für Anorganische Chemie der Universität
Am Hubland, D-97074 Würzburg
Fax: (+49) 931-8884605
E-mail: helmut.werner@mail.uni-wuerzburg.de

Dr. P. Schwab, Dr. M. Schulz
BASF Aktiengesellschaft, Ammoniaklaboratorium
D-67056 Ludwigshafen

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 347) und von der BASF AG gefördert. W.S. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Kekulé-Stipendium. Die Autoren danken Dr. A. Schäfer und Dr. M. Schäfer für hilfreiche Diskussionen sowie Dr. W. Buchner für die Aufnahme der ^2H -NMR-Spektren.