

- [9] a) R. Noyori, *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley, New York 1994; b) H. Brunner, W. Zettelmeyer, *Handbook of Enantioselective Catalysis with Transition Metal Compounds*, VCH, Weinheim, 1993; c) *Metalloporphyrins Catalyzed Oxidations*, (Hrsg.: F. Montanari, L. Casella), Kluwer, Dordrecht, 1994.
- [10] Kristallstrukturdaten von **1**: $C_{72}H_{96}N_8$; $M = 1073.57 \text{ g mol}^{-1}$; Kristalle aus Methanol, Kristallabmessungen $0.30 \times 0.25 \times 0.20 \text{ mm}$; monoklin, Raumgruppe $P2_1/c$, $a = 13.055(1)$, $b = 38.565(1)$, $c = 25.878(1) \text{ \AA}$, $\beta = 90.65(2)^\circ$, $V = 13027.5(12) \text{ \AA}^3$; $Z = 8$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.095 \text{ g cm}^{-3}$; $F(000) = 4672$; $\mu_{\text{Mo}} = 0.064 \text{ mm}^{-1}$; 38374 gemessene, 21095 unabhängige, 10015 beobachtete Reflexe ($F_o^2 > 2\sigma F_c^2$); $\Theta_{\text{max.}} = 25.0^\circ$; $R1 = 0.079$, $wR2 = 0.192$. – Kristallstrukturdaten von **2**: $C_{72}H_{92}N_8$; $M = 1069.6 \text{ g mol}^{-1}$; Kristalle aus Acetonitril, Kristallabmessungen $0.25 \times 0.20 \times 0.10 \text{ mm}$; monoklin, Raumgruppe $P2_1/c$, $a = 13.061(1)$, $b = 38.398(2)$, $c = 25.648(1) \text{ \AA}$, $\beta = 90.86(1)^\circ$, $V = 12861.4(13) \text{ \AA}^3$; $Z = 8$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.105 \text{ g cm}^{-3}$; $F(000) = 4640$; $\mu_{\text{Mo}} = 0.065 \text{ mm}^{-1}$; 18366 gemessene, 18121 unabhängige, 10352 beobachtete Reflexe ($F_o^2 > 2\sigma F_c^2$); $\Theta_{\text{max.}} = 27^\circ$; $R1 = 0.059$, $wR2 = 0.129$. – Kristallstrukturdaten von **6** (Racemat): $C_{72}H_{88}N_8Pd_2$; $M = 1278.30 \text{ g mol}^{-1}$; Kristalle aus *n*-Hexan, Kristallabmessungen $0.25 \times 0.20 \times 0.20 \text{ mm}$; triklin, Raumgruppe $P\bar{1}$, $a = 9.449(1)$, $b = 13.801(1)$, $c = 25.793(1) \text{ \AA}$, $\alpha = 89.78(1)$, $\beta = 96.51(1)$, $\gamma = 108.97(1)^\circ$, $V = 3158.4(4) \text{ \AA}^3$; $Z = 2$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.344 \text{ g cm}^{-3}$; $F(000) = 1336$; $\mu_{\text{Mo}} = 0.618 \text{ mm}^{-1}$; 12403 gemessene, 12403 unabhängige, 7612 beobachtete Reflexe ($F_o^2 > 2\sigma F_c^2$); $\Theta_{\text{max.}} = 26.0^\circ$; $R1 = 0.045$, $wR2 = 0.0942$. – Kristallstrukturdaten von **6** ((*P,P*)-Enantiomer): Kristalle aus Acetonitril, Kristallabmessungen $0.35 \times 0.30 \times 0.25 \text{ mm}$; monoklin, Raumgruppe $P2_1$, $a = 14.131(1)$, $b = 17.714(1)$, $c = 14.226(1) \text{ \AA}$, $\beta = 115.47(1)^\circ$, $V = 3214.9(4) \text{ \AA}^3$; $Z = 2$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.321 \text{ g cm}^{-3}$; $F(000) = 1336$; $\mu_{\text{Mo}} = 0.607 \text{ mm}^{-1}$; 13234 gemessene, 13078 unabhängige, 12347 beobachtete Reflexe ($F_o^2 > 2\sigma F_c^2$); $\Theta_{\text{max.}} = 26.37^\circ$; $R1 = 0.059$, $wR2 = 0.153$; absoluter Strukturparameter (Flack-Parameter): $-0.044(13)$. – Nonius-Kappa-CCD-Diffraktometer, Raumtemperatur, $Mo_K\alpha$ -Strahlung ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Die Strukturen wurden mit Direkten Methoden gelöst und mit F^2 für alle unabhängigen Reflexe verfeinert (Schweratome mit anisotropen, H-Atome mit isotropen Temperaturfaktoren); $wR2 = [\Sigma w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \Sigma w(F_c^2)^2]^{1/2}$. Benutzte Programme: zur Strukturbestimmung SHELXS-97 und zur Verfeinerung SHELXL-97 (G. M. Sheldrick, Universität Göttingen). Gerechnet wurde auf den DV-Anlagen des Regionalen Rechenzentrums der Universität zu Köln. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Strukturen wurden als „supplementary publication no.“ CCDC-120832 (**1**), -120833 (**2**), -121628 (**5**), -120834 (**6**, Racemat, -120835 (**6**, (*P,P*)-Enantiomer), -120836 (**6**, (*M,M*)-Enantiomer) und -120837 (**7**) 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] Weitere Beispiele für Metallkomplexe von **1** und **2**: Lit. [3b].
- [12] Für die Messung der magnetischen Suszeptibilität von **7** und die Auswertung der experimentellen Daten danken wir Dr. E. Bill, Max-Planck-Institut für Strahlenchemie, Mülheim an der Ruhr.
- [13] Übersicht: Y. Okamoto, E. Yashima, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1072; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1021.
- [14] a) S. A. Matlin, S. J. Grieb, A. M. Belenguer, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 301; b) S. J. Grieb, S. A. Matlin, A. M. Belenguer, H. J. Ritchie, *J. Chromatogr. A* **1995**, *697*, 271.
- [15] Nach der Derivatisierung von Hyperprep Si120 (30 μm) mit Dimethyloctylchlorsilan wurden die restlichen SiOH-Gruppen mit Trimethylchlorsilan umgesetzt („endcapped“). Somit war sichergestellt, daß die Enantiomerenselektivität der chiralen Beschichtung nicht durch unspezifische Retention durch das Trägermaterial beeinträchtigt wurde (siehe auch Tabelle 2).
- [16] a) J. Dingenen, J. N. Kinkel, *J. Chromatogr. A* **1994**, *666*, 627; b) A. Werner, *Kontakte* (Darmstadt) **1989**, 3, 50. Eine ausführliche Publikation über Enantiomeren trennung von Cyclooctapyrrolen mit 8er-Konformation und ihren Metallkomplexen ist in Vorbereitung.
- [17] Im Fall der Enantiomeren trennung von **2** sowie seinem Pd^{II} - und Cu^{II} -Komplex **6** bzw. **7** zeigt ein Vergleich der CD-Spektren aller Reinenantiomere, daß sich die Elutionsreihenfolge der optischen Isomere nach der Komplexbildung umkehrt; dem ersteluierten Enantiomer von **2** entsprechen die zweiteluierten Enantiomere der Zweikern-

komplexe **6** und **7** (jeweils (*M,M*)-Form) und umgekehrt. Dieses Ergebnis wird zusätzlich durch die Präparation der enantiomeren Komplexe aus den Enantiomeren von **2** und den anschließenden Vergleich der CD-Spektren und HPL-Chromatogramme abgesichert. Bei diesen Untersuchungen ist zu beachten, daß Enantiomere von **2** in Lösung unter dem Einfluß von Säuren racemisieren können. Arbeitet man unter basischen Bedingungen (Überschuß von Triethylamin), so lassen sich die enantiomeren Pd^{II} - und Cu^{II} -Komplexe **6** bzw. **7** aus den entsprechenden Enantiomeren von **2** präparieren, ohne daß eine Racemisierung eintritt.

- [18] Eine soeben bekanntgewordene einfache Synthese des Liganden **4** (mit *meso*-Phenylsubstituenten) erscheint geeignet, das Interesse an 8-förmigen Cyclooctapyrrolen und ihren Metallkomplexen zu steigern: Y. Katakami, N. Iizuna, J. Setsune, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8957.
- [19] Anmerkung bei der Korrektur (9. November 1999): Die Synthese eines Octaporphyrins-(1.0.0.1.0.0.0) wurde soeben realisiert. Dieses Cyclooctapyrrol, das zwei CH-Spacer weniger enthält als **4**, vermag keine 8er-Konformation mehr zu bilden. Einer Röntgenstrukturanalyse zufolge liegt es in einer Twisted-boat-Konformation vor; J. L. Sessler, D. Seidel, V. Lynch, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.

Kleine DNA-Ringe als Substrate für Polymerasen: eine Abschätzung der Anforderungen an die Größe der Enzymsubstrate**

Miriam Frieden, Enrique Pedroso* und Eric T. Kool*

Im aktiven Zentrum von DNA-Polymerasen sind nach neuesten Röntgenstrukturanalysen ungefähr fünf Basenpaare doppelsträngiger DNA in einer linearen, A-förmigen Konformation gebunden.^[1] Polymerasen sind relativ große Proteine aus ca. 600–1000 Aminosäuren mit Ausmaßen von 50–100 Å. Trotz der Größe dieser Enzyme und der im allgemeinen starren linearen Konformation ihrer DNA-Substrate können DNA- und RNA-Polymerasen auch kleine Substrate umsetzen.

So wurden beispielsweise synthetische einzelsträngige Oligodesoxynucleotidringe als Substrate für Polymerasen untersucht.^[2, 3] Interessanterweise erwiesen sich DNA-Ringe mit nur 26 Nucleotiden (nt) als geeignete Template für DNA-Polymerasen.^[2b] Auch Versuche mit RNA-Polymerasen (RNAPs) haben gezeigt, daß ringförmige Einzelstrang-DNA

[*] Prof. E. Pedroso, M. Frieden
Departament de Química Orgànica
Facultat de Química, Universitat de Barcelona
Barcelona, E-08028 (Spanien)
Fax: (+34) 93-33-97-878
E-mail: pedroso@admin.qo.ub.es
Prof. E. T. Kool^[+]
Department of Chemistry, University of Rochester
Rochester, NY 14627 (USA)

[+] Gegenwärtige Adresse:
Department of Chemistry, Stanford University
Stanford, CA 94305-5080 (USA)
Fax: (+1) 650-725-0259
E-mail: kool@chem.stanford.edu

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (GM46625), durch das US DOD Breast Cancer Research Program der US Army sowie in Spanien vom Ministerio de Educación (DGES, PB97-941) und der Generalitat de Catalunya (C. R. de Biotecnologia und SGR98-1) gefördert.

mit 34 oder 28 Nucleotiden als Matrizen zur Transkription dienen können.^[3a, 4] Diese überraschenden Ergebnisse geben Anlaß zu der Frage: Wie klein darf ein DNA-Ring sein, um noch als Templat für diese Enzyme fungieren zu können? Indem wir hier zeigen, daß Polymerasen bemerkenswert kleine ringförmige Template verarbeiten, können wir nicht nur die Anforderungen dieser wichtigen Enzyme an die Geometrie ihrer Substrate veranschaulichen, sondern auch praktische Anregungen für erweiterte Synthesemethoden für DNAs und RNAs geben.

Um die obengenannte Frage zu beantworten, stellen wir DNA-Ringe mit 28, 23, 18 und 13 Nucleotiden (**1–4**, Abbildung 1) nach bekannten Methoden her.^[5] Wir wählen

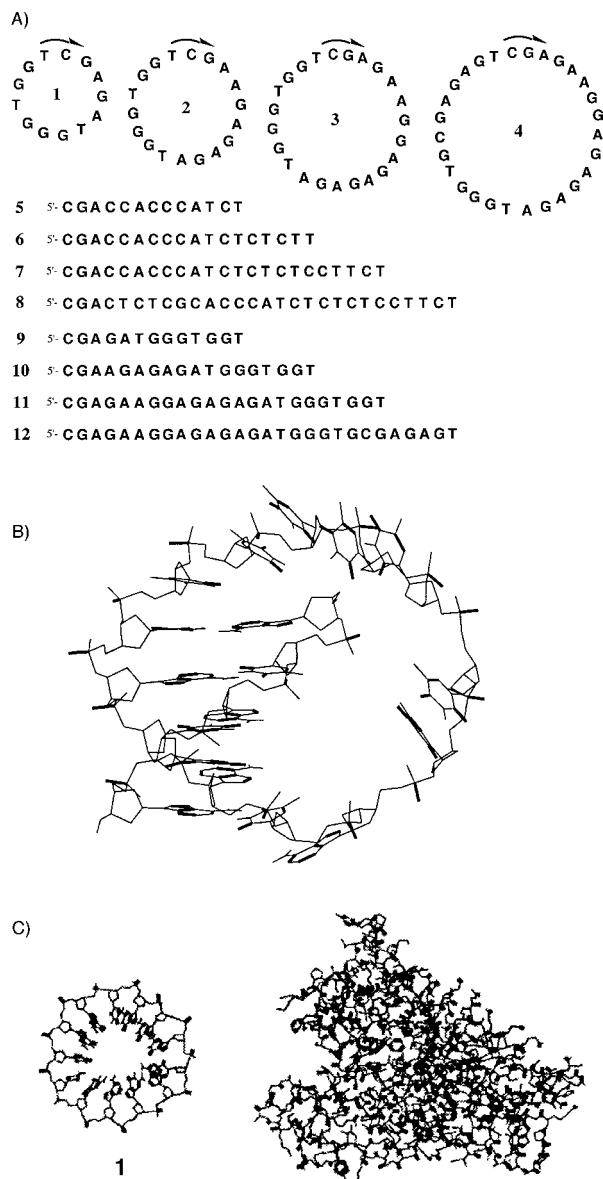


Abbildung 1. Sequenzen und Strukturen der untersuchten Substrate und Primer. A) Ringförmige DNA **1–4**, komplementäre Primer **5–8** und lineare DNA **9–12** (Kontrolle). Der Pfeil kennzeichnet die 5'-→3'-Richtung. B) Molekülmodell des an das aktive Zentrum der Polymerase gebundenen Templat-Primer-Komplexes des ringförmigen 13mers, das zeigt, wie vier Basenpaare eines Doppelstrangs produziert werden könnten, ohne daß eine ausgeprägte Verformung des DNA-Rings auftritt. C) Modelle, die das Größenverhältnis zwischen **1** und dem Klenow-Fragment wiedergeben.

die 28 nt lange DNA als obere Grenze, weil frühere Untersuchungen darauf hinwiesen, daß dieses Substrat für beide Enzymklassen geeignet sein sollte.^[2b, 4] Die Sequenzen wurden vom HIV-1-gag-Gen übernommen; beim Kopieren durch die Polymerasen sollten die komplementären DNA- bzw. RNA-Stränge (Antisense-DNA bzw. -RNA) mit sich wiederholenden Sequenzen erhalten werden. Die Basensequenzen der kleineren Ringe sind Teilmengen der Sequenzen der größeren Ringe. Allen gemeinsam ist die Erkennungssequenz T₄CGA der Restriktionsendonuclease *TaqIa*.

Um die Eignung dieser DNA-Ringe als Enzymsubstrate zu prüfen, inkubierten wir die einzelnen Ringe mit DNA-Polymerasen, einem komplementären Primer (**5–8**, Abbildung 1) und Desoxyribonucleosidtriphosphaten bzw. mit RNA-Polymerasen und Ribonucleosidtriphosphaten. In Kontrollexperimenten untersuchten wir auch die entsprechenden linearen Formen der DNA-Ringe (**9–12**, Abbildung 1). Drei DNA-Polymerasen wurden eingesetzt: Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, T4-DNA-Polymerase und Sequenase 2.0 (eine Mutante der T7-DNA-Polymerase). Die Experimente ergaben, daß keiner der vier DNA-Ringe als Substrat von der T4-DNA-Polymerase und Sequenase angenommen wurde. Dagegen lieferte das Klenow-Fragment mit drei der vier DNA-Ringe, einschließlich des 13 nt großen **1**, Produkte mit einer Länge von ca. 300 bis mehr als 1000 nt (Abbildung 2). Die linearen DNA-Substrate ergaben keine langen DNA-Produkte, was vermuten läßt, daß die Ringstruktur eine Voraussetzung für die Enzymaktivität ist. Die Produkte der Umsetzung von **2** waren kürzer; wir haben bisher keine Erklärung dafür, aber möglicherweise nimmt diese Sequenz eine Sekundärstruktur ein, die die Anlagerung des Primers beeinträchtigt. Das in drei Fällen auftretende regelmäßige Bandenmuster führen wir darauf zurück, daß nach jedem Kreisumlauf vor der Einlagerung von radioaktiv markiertem dGTP der Aufbau der Komplementär-DNA unterbrochen wird, da das markierte dGTP in geringer Konzentration vorliegt. Wie erwartet sind die Produkte Einzelstrang-DNAs mit sich wiederholenden Sequenzen (komplementär zur ringförmigen Matrizen-DNA), und das geordnete Bandenmuster weist auf einen regelmäßigen Aufbau hin.

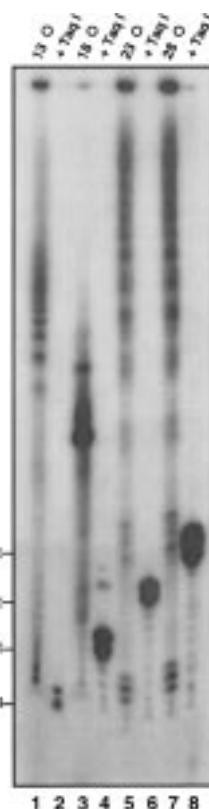


Abbildung 2. Produkte der Umsetzungen der verformten ringförmigen DNA-Template **1–4** mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase 1 aus *E. coli*. Das Autoradiogramm des denaturierenden Polyacrylamidgels beweist die Bildung langer DNA-Produkte (Bahn 1, 3, 5 und 7) und zeigt die *TaqIa*-Spaltprodukte dieser Produkte (Bahn 2, 4, 6 und 8). Die Bandenverdopplung in den geradzahligen Bahnern beruht auf der angewandten Markierungsmethode.^[6]

Die Spaltung der Produkte mit *TaqIa* führte zu den erwarteten kurzen Oligonucleotiden (Abbildung 2).^[6] Dies ist ein weiterer Beweis für die geordnete Synthese des Komplementärstrangs. Schließlich beweist die Sequenzierung der mit Farbstoff endmarkierten Produkte, daß in allen vier Fällen die erwarteten, sich wiederholenden Basensequenzen vorliegen (Experiment mit **1** in Abbildung 3). In diesen Sequenzen treten bezeichnenderweise einige Fehler auf; diese röhren wahrscheinlich von generellen Sequenzierungsfehlern und von Artefakten wie Rückfaltung und Synthesefehlern bei diesen repetitiven polydispersen Produkten her oder basieren vielleicht auf einer verminderten Genauigkeit bei diesen ungewöhnlichen Templaten.

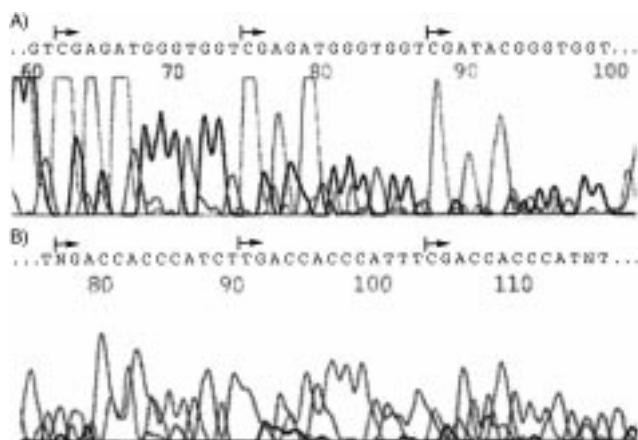


Abbildung 3. Die Sequenzierung der mit Farbstoff endmarkierten DNA-Produkte des Templat **1**. Die Pfeile kennzeichnen die von dem ringförmigen Templat codierten, sich wiederholenden Sequenzen. A) Mit Hilfe des Klenow-Fragments produzierte DNA. B) Mittels T7-RNA-Polymerase produzierte RNA. Es ist zu bemerken, daß nur kurze Abschnitte gelesen werden können, da der Primer sich überall in der sich wiederholenden Sequenz anlagern kann.

Die linearen und ringförmigen DNA-Template boten wir auch zwei RNA-Polymerasen, der T7-RNA-Polymerase und der RNA-Polymerase aus *E. coli*, als Substrate an. Die linearen Template lieferten nur sehr kurze RNAs, während die DNA-Ringe lange RNA-Stränge ergaben (Abbildung 4). Die *E. coli*-RNAP produzierte unter Verwendung des Templat **4** RNAs mit einer Länge von mehr als 1000 nt. Diese Polymerase war auch im Fall des cyclischen 23-nt-Templats **3** aktiv, allerdings in geringerem Ausmaß. Hier scheint die Grenze der Substratgröße für dieses Enzym zu liegen, da die kleineren DNA-Ringe mit 18 und 13 Nucleotiden nicht transkribiert wurden.

Interessanterweise erhielten wir mit der kleineren T7-RNA-Polymerase völlig andere Resultate. Dieses Enzym verarbeitet alle vier cyclischen DNA-Substrate unter Bildung langer RNA-Stränge (Abbildung 4). Bei der Transkription von **1** wurden kürzere Produkte als im Fall von **3** und **4** erhalten; dies deutet auf eine gewisse Ineffizienz bei der Verwendung dieses am meisten verformten Templat hin. Wiederum trat ein regelmäßiges Bandenmuster auf; wir nehmen an, daß die Synthese bevorzugt durch die Bindung von GTP an den einzigen dCMP-Baustein der DNA-Ringe

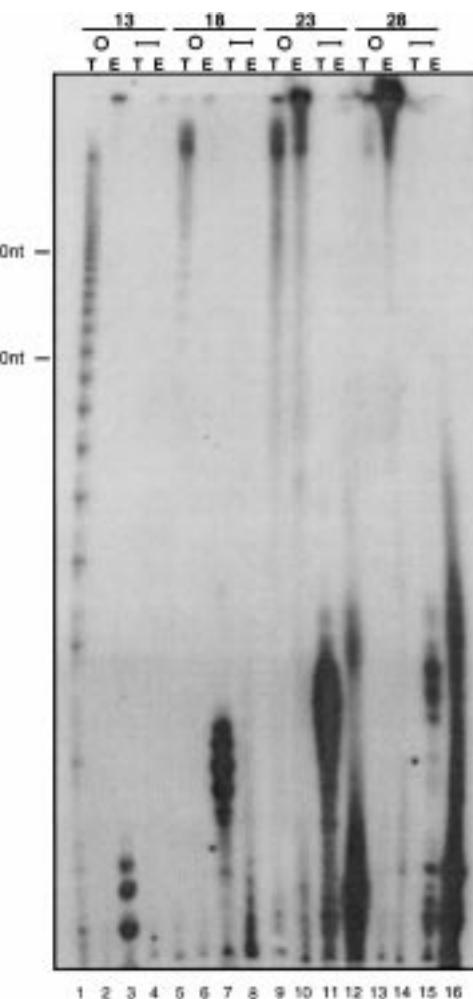


Abbildung 4. Produkte der Umsetzungen der ringförmigen DNA-Templaten **1-4** mit *E. coli*-RNA-Polymerase (E) oder T7-RNA-Polymerase (T); die Templatstruktur (ringförmig oder linear) ist durch Kreise bzw. Linien angegeben.

startet und nach jedem Umlauf ein teilweiser Syntheseabbruch erfolgt.^[4] Dieses Bandenmuster beweist erneut, daß die Polymerase diese sehr kleinen DNA-Substrate verarbeiten kann. Die Sequenzierung der RNA-Produkte bestätigt, daß die identifizierbaren Hauptsequenzen den erwarteten, sich wiederholenden, DNA-codierten Sequenzen entsprechen. Die Untersuchung der Produkte von **1** deutet auf eine mindestens elfmalige Wiederholung der Sequenz hin (entsprechend elf Umläufen auf dem DNA-Ring). Dies ist im Einklang mit der Bandenverteilung im Gel (Abbildung 4), die zeigt, daß unter Verwendung des kleinsten untersuchten DNA-Rings mindestens 15 Wiederholungen synthetisiert werden.

Solche kleinen DNA-Ringe stellen erhebliche topologische Anforderungen an das aktive Zentrum der Polymerase. Im Fall der DNA-Polymerasen ist zunächst die Anlagerung eines Oligonucleotid-Primers an mehrere benachbarte Nucleotide des Rings notwendig, was bei einer Ringgröße von nur 13 Nucleotiden allein schon schwierig ist. Anschließend muß die Polymerase diesen Komplex binden, bevor Nucleosidtriphosphate an das Ende des Primers angelagert werden. Röntgenstrukturanalysen von DNA-Polymerasen mit gebundenen

Doppelstrang-DNAs beweisen, daß die DNA an der Bindungsstelle in dem Enzym gestreckt und in einer sich über ungefähr fünf Basenpaare erstreckenden A-förmigen Konformation vorliegt.^[1] Wenn man annimmt, daß fünf Basenpaare des Doppelstrangs im aktiven Zentrum produziert werden, führt dies zu weiteren topologischen Schwierigkeiten beim cyclischen 13mer. Eine halbe Helixwindung (fünf Basenpaare) der DNA bewirkt, daß die beiden Enden eines Strangs fast auf einander gegenüberliegenden Seiten des Doppelstrangs positioniert sind. Die acht übrigen Nucleotide könnten zwar nach Modellbetrachtungen (Abbildung 1B) diese Distanz überbrücken, aber es ist auch möglich, daß mit diesen ungewöhnlichen Templayen weniger Basenpaare (vielleicht zwei bis vier) im aktiven Zentrum gebildet werden. Da das 13mer **1** als Templat vom Klenow-Fragment und der T7-RNA-Polymerase akzeptiert wird, könnten möglicherweise noch kleinere DNAs als Substrate fungieren, obgleich dies nach unseren Modellen unwahrscheinlich ist.

Zwar stehen weniger Kristallstrukturen von RNA-Polymerasen für Vergleichszwecke zur Verfügung,^[7a] doch ist anzunehmen, daß bei RNA-Polymerasen ähnliche Probleme auftreten.^[7b] Allerdings benötigen die RNAPs gegenüber den DNA-Polymerasen keinen Primer; sie starten sofort an einer intakten doppelsträngigen Promotorsequenz. Unter diesem Aspekt sind unsere Untersuchungsergebnisse sehr ungewöhnlich, da die Template erstens eine stark verformte Struktur aufweisen und zweitens keine Promotorsequenz enthalten.

Die Replikation und Transkription natürlicher DNAs erfordert oft die Verarbeitung von speziellen (z.B. ringförmigen) Templayen wie die von Bakterien und Viren. In einem örtlich begrenzten Ausmaß weisen die bakteriellen und viralen Genome wegen ihrer Länge aber eine lineare Struktur auf. Beispielsweise hat das Genom aus *E. coli* 4.6 Millionen Basenpaare,^[8] und das viel kleinere ringförmige Genom des Bakteriophagen T7 verfügt noch über 40000 Basenpaare.^[9] Es ist bemerkenswert, daß Polymerasen aus diesen Organismen nur 13 nt große DNA-Ringe als Template verarbeiten.

Kleine synthetische DNA-Ringe wurden bereits in mehreren Arbeitsgruppen als mögliche Templaye für DNA- und RNA-Synthesen untersucht.^[2-4] Diese „Rolling-circle“-Replikationen (RCR) und -Transkriptionen (RCT) werden zum Nachweis von Nucleinsäuren und zur In-vitro-Synthese größerer Mengen von DNA und RNA eingesetzt. Die aktuellen Ergebnisse deuten darauf hin, daß im Prinzip sehr kurze DNAs enzymatisch an einem ringförmigen, ein Monomer langen Templat synthetisiert werden können. So liefert beispielsweise die Restriktion der Produkte des Templayen **3** (Abbildung 2) lineare DNA, ähnlich der Sequenz von Oligonucleotiden, die zur Behandlung von HIV-Infektionen klinisch getestet wurden.^[10]

Experimentelles

1–4: Die cyclischen Oligodesoxynucleotide wurden nach bekannten Methoden^[5] im 2-μmol-Maßstab hergestellt. Die Rohausbeuten (%) betrugen: 7 (28mer **4**), 9 (23mer **3**), 8 (18mer **2**) und 7 (13mer **1**). **1** wurde durch halbpräparative HPLC, **2–4** durch präparative Gelelektrophorese in denaturierendem 20proz. Polyacrylamid (PAGE) gereinigt. Die Produkte wurden isoliert, indem die Gelabschnitte mit den Produktbanden herausgeschnitten, zerkleinert und anschließend mit 2M Ammoniumacetat

gewaschen wurden. Salze wurden mittels Chromatographie (Sep Pak C18, Waters) entfernt. Die Menge der DNA wurde UV-spektroskopisch bei 260 nm bestimmt. Die Ringstruktur der Oligodesoxynucleotide wurde durch ihre unterschiedliche, gröszenabhängige Mobilität im Gel, ihren teilweise erfolgenden chemischen und/oder enzymatischen (S1-Nuclease) Abbau (die Banden der Abbauprodukte entsprachen den erwarteten linearen, durch Nicks entstandenen Fragmenten)^[11] und durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie (in allen Fällen wurden die erwarteten relativen Massen gefunden) nachgewiesen. Die linearen DNAs für die Kontrollexperimente und die Primer wurden auf einem DNA-Synthesizer (ABI 392) unter Standardbedingungen synthetisiert. Die Entschüttigung erfolgte in konz. Ammoniaklösung (12 h bei 55°C). Nach der Gefriertrocknung wurden die DNAs durch präparative denaturierende PAGE gereinigt und UV-spektroskopisch bei 260 nm quantitativ nachgewiesen.

Umsetzungen mit DNA-Polymerasen: Bedingungen bei der Verwendung des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I (Pharmacia): 1 μm ringförmiges oder lineares (Kontrolle) DNA-Substrat, 1 μm Primer, 3 U Enzym, jeweils 0.5 mm dATP, dTTP und dCTP, 60 μm dGTP (Roche, Mannheim), 0.30 μCi [α -³²P]dGTP, Pufferlösung (pH 7.5), die 50 mM Tris · HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol (DTT) und 50 μg mL⁻¹ acetyliertes Rinderserumalbumin (BSA) enthielt, Volumen der Reaktionslösung: 15 μL. – Bedingungen bei der Verwendung von T4-DNA-Polymerase (Gibco BRL): 1 μm ringförmiges oder lineares DNA-Substrat, 1 μm Primer, 3.75 U Enzym, jeweils 0.5 mm dATP, dTTP und dCTP, 60 μm dGTP (Roche, Mannheim), 0.30 μCi [α -³²P]dGTP, Pufferlösung (pH 7.9), die 33 mM Tris · Acetat, 66 mM NaOAc, 10 mM Mg(OAc)₂, 100 μg mL⁻¹ acetyliertes BSA und 0.5 mM DTT enthielt, Volumen der Reaktionslösung: 15 μL. – Bedingungen bei der Verwendung von T7-Sequenase 2.0 (Pharmacia): 1 μm ringförmiges oder lineares DNA-Substrat, 1 μm Primer, 4.5 U Enzym, jeweils 0.5 mm dATP, dTTP und dCTP, 60 μm dGTP (Roche, Mannheim), 0.30 μCi [α -³²P]dGTP, Pufferlösung (pH 7.5), die 40 mM Tris · HCl, 20 mM MgCl₂ und 50 mM NaCl enthielt, Volumen der Reaktionslösung: 15 μL. – Die Reaktionsgemische (15 μL) wurden 1.5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die gleiche Menge einer Stopflösung (30 mM EDTA, 8M Harnstoff) zugegeben. Das Gemisch wurde 2 min auf 90°C erhitzt, mit Eis gekühlt und auf ein denaturierendes 10proz. Polyacrylamidgel (0.4 mm dick) gegeben.

Umsetzungen mit RNA-Polymerasen: Bedingungen einer „Rolling-circle“-Transkription mit interner Markierung: 1 μm ringförmiges oder lineares DNA-Substrat, 3 U *E. coli*-RNA-Polymerase-Holoenzym (Roche, Mannheim) oder 25 U T7-RNA-Polymerase (New England Biolabs), jeweils 0.5 mm ATP, GTP und CTP (Pharmacia Biotech), 60 μm UTP (Roche, Mannheim), 0.30 μCi [α -³²P]UTP, Pufferlösung (pH 8.1), die 25 mM Tris · HCl, 20 mM NaCl, 12 mM MgCl₂, 0.4 mM Spermin · HCl (Sigma), 100 μg mL⁻¹ acetyliertes BSA (New England Biolabs) und 10 mM DTT enthielt, 12.5 U mL⁻¹ RNase-Inhibitor (Promega), Volumen der Reaktionslösung: 15 μL. Das Reaktionsgemisch wurde 1.5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die gleiche Menge Stopflösung zugegeben. Das Produktgemisch wurden durch PAGE wie oben angegeben aufgetrennt.

Spaltung der DNA-Produkte: Die „Rolling-circle“-Replikationen wurden unter interner Markierung durchgeführt, so daß die Spaltungsprodukte ihre Markierung behalten. Die Reaktionen erfolgten analog den obengenannten Umsetzungen der DNA-Substrate mit den DNA-Polymerasen. Nach der Inkubation (1.5 h) wurden die Produkte durch Zugabe von 37.5 μL kaltem Ethanol und 3 μL NaOAc-Lösung (3M, pH 5.2) gefällt. Der Niederschlag wurde mit 20 μL einer Pufferlösung (pH 8.4), die 100 U TaqIα (20 U μL⁻¹) (New England Biolabs), 100 μg mL⁻¹ BSA, 100 mM NaCl, 10 mM Tris · HCl und 10 mM MgCl₂ enthielt, aufgenommen. Das Gemisch wurde 12 h bei 65°C inkubiert. Die Produkte wurden mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und durch Chromatographie (Micro Bio-Spin 6, Bio-Rad) von dNTPs und anderen kleinen Molekülen getrennt. Die Auf trennung des Produktgemisches erfolgte durch denaturierende PAGE.

Sequenzierung der DNA-Produkte: Unmarkierte DNA wurde durch „Rolling-circle“-Replikation wie oben angegeben hergestellt, wobei die Konzentration der vier dNTPs 0.5 mM betrug. Nach der Inkubation (1.5 h, 37°C) wurde das Gemisch 5 min auf 90°C erhitzt und anschließend chromatographisch (Micro Bio-Spin 30, Bio-Rad) teilweise gereinigt. Die Sequenzierung wurde in einer „BigDye Terminator Cycle Sequencing“-Apparatur (Applied Biosystems) nach dem empfohlenen Verfahren durchgeführt. Die linearen Kontroll-DNAs **9–12** wurden als Primer verwendet. Unmarkierte RNA wurde durch „Rolling-circle“-Transkription

wie oben beschrieben hergestellt (Konzentration der vier rNTPs: 0.5 mM). Nach der Inkubation (1.5 h, 37 °C) wurde das Gemisch 5 min auf 90 °C erhitzt. Die RNA-Produkte wurden wie DNA-Produkte chromatographisch teilweise gereinigt. Die Komplementär-DNA wurde unter folgenden Bedingungen erhalten: teilweise gereinigte RNA, 50 pmol lineare Primer-DNA (entweder **9**, **10**, **11** oder **12**), 50 U AMV-reverse Transkriptase (Pharmacia), 10 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 20 U RNase-Inhibitor (Promega), Pufferlösung (pH 8.3), die 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT und 50 mM KCl enthält, Volumen der Reaktionslösung: 20 µL. Das Gemisch wurde 1 h bei 42 °C inkubiert, 5 min auf 90 °C erhitzt und gereinigt (Micro Bio-Spin 30-Säule). Die Komplementär-DNA wurde anschließend unter Verwendung der Primer **5–8** sequenziert.

Eingegangen am 22. März,
veränderte Fassung am 8. September 1999 [Z13195]
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3654–3657

Stichwörter: DNA-Erkennung • Polymerasen • RNA • Transkription

- [1] a) S. Doublie, S. Tabor, A. M. Long, C. C. Richardson, T. Ellenberger, *Nature* **1998**, *391*, 251–258; b) J. R. Kiefer, C. Mao, J. C. Braman, L. S. Beese, *Nature* **1998**, *391*, 304–307; c) H. Huang, R. Chopra, G. L. Verdine, S. C. Harrison, *Science* **1998**, *282*, 1669–1675; d) C. A. Brautigam, S. Sun, J. A. Piccirilli, T. A. Steitz, *Biochemistry* **1999**, *38*, 696–704.
- [2] Zur Aktivität von DNA-Polymerasen bei kleinen ringförmigen DNA-Substraten: a) A. Fire, S. Q. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4641–4645; b) D. Liu, S. L. Daubendiek, M. A. Zillmann, K. Ryan, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1587–1594; c) P. M. Lizardi, X. Huang, Z. Zhu, P. Bray-Ward, D. C. Thomas, D. C. Ward, *Nat. Genet.* **1998**, *19*, 225–232; d) J. Baner, M. Nilsson, M. Mendel-Hartvig, U. Landegren, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5073–5078.
- [3] Zur Aktivität von RNA-Polymerasen bei kleinen ringförmigen DNA-Substraten: a) S. L. Daubendiek, K. Ryan, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7818–7819; b) S. L. Daubendiek, E. T. Kool, *Nature Biotechnology* **1997**, *15*, 273–277; c) A. M. Diegelman, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3235–3241; d) A. M. Diegelman, S. L. Daubendiek, E. T. Kool, *BioTechniques* **1998**, *25*, 754–758; e) A. M. Diegelman, E. T. Kool, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 569–576.
- [4] S. L. Daubendiek, Dissertation, University of Rochester, **1997**.
- [5] E. Alazzouzi, N. Escaya, A. Grandas, E. Pedrosa, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1564–1567; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1506–1508.
- [6] Die Spaltung mit *TaqI* führte zu den beiden erwarteten Oligonucleotiden mit der Länge *n* und *n* + 1 (*n* = Kreismfang). Die Produkte mit der Länge *n* entstehen durch normale Spaltung abseits der Enden der sich wiederholenden Sequenz; die Spaltung nahe dem 3'-Terminus eines Strangs führt zu den *n*+1-Produkten. Der 3'-Terminus der meisten Stränge ist der C-Baustein unmittelbar nach der *TaqI*-Erkennungssequenz (TCGA); dies röhrt von der geringen dGTP-Konzentration während der radioaktiven Markierung her, wodurch eher ein Syntheseabbruch als eine Einlagerung von G erfolgte.
- [7] a) R. Sousa, Y. J. Chung, J. P. Rose, B. C. Wang, *Nature* **1993**, *364*, 593–599; b) T. A. Steitz, S. J. Smerdon, J. Jager, C. M. Joyce, *Science* **1994**, *266*, 2022–2025.
- [8] F. R. Blattner, G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, Y. Shao, *Science* **1997**, *277*, 1453–1474.
- [9] F. W. Studier, *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 477–535.
- [10] a) J. Lisziewicz, D. Sun, F. F. Weichold, A. R. Thierry, P. Lusso, J. Tang, R. C. Gallo, S. Agrawal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7942–7946; b) S. Agrawal, Q. Zhao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 519–528.
- [11] E. Rubin, S. Rumney, E. T. Kool, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 3547–3553.

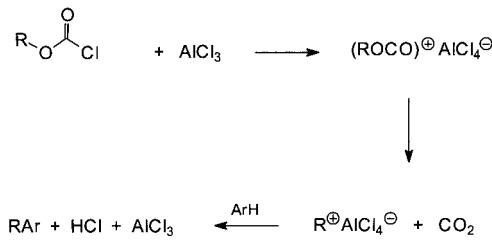
Friedel-Crafts-Alkylierung von Alkenen: Ethylaluminiumsesquichlorid-induzierte Alkylierungen mit Chlorameisensäurealkylestern**

Ursula Biermann und Jürgen O. Metzger*

Professor Hansjörg Sinn zum 70. Geburtstag gewidmet

Die Alkylierung von Alkenen ist von großer Bedeutung.^[1] Uns interessiert die Alkylierung langkettiger ungesättigter Fettstoffe wie Ölsäure **1a**, da sie nachwachsende Rohstoffe sind^[2, 3] und alkylverzweigte Fettstoffe interessante Eigenschaften haben.^[4] Es gibt jedoch keine Methoden zur direkten Alkylierung von nichtaktivierten C-C-Doppelbindungen mit einfachen Alkylresten wie der Isopropylgruppe. Die thermische radikalische Addition von Alkanen ist nur auf terminale, nicht jedoch auf innere Doppelbindungen anwendbar.^[5] Friedel-Crafts-Alkylierungen von Alkenen, die von Mayr et al. eingehend untersucht wurden, führen nur unter bestimmten eingeschränkten Bedingungen zu 1:1-Addukten.^[6–9] So ergaben ZnCl₂-induzierte Umsetzungen von Isopropylchlorid mit Propen oder Isobuten keine Monoalkylierungsprodukte, sondern ausschließlich Oligomere.^[6] Kationische Additionen von Alkanen sind auf tertiäre Alkane beschränkt, z. B. die Bildung von Isooctan durch Reaktion von Isobuten und Isobutan in Gegenwart von konzentrierten Säuren.^[1, 10]

Friedel und Crafts^[11] sowie Rennie^[12] zeigten, daß Benzol in Gegenwart von AlCl₃ mit Chlorameisensäureethylester ethyliert wird (Schema 1).^[13] Chlorameisensäureester fragmentieren in Gegenwart von Lewis-Säuren unter Bildung von Carbeniumionen.^[13, 14] Wir berichten nun erstmals über Alkylierungen von Alkenen mit Chlorameisensäurealkylestern.



Schema 1. Friedel-Crafts-Alkylierung von Arenen durch AlCl₃-induzierte Bildung von Carbeniumionen aus Chlorameisensäureestern.^[13] Ar = Aryl, R = Alkyl.

Die Umsetzung von Ölsäure **1a** mit Chlorameisensäure-isopropylester **2a** in Gegenwart von Ethylaluminiumsesquichlorid (Et₃Al₂Cl₃) lieferte nach 2 h ein 1:1-Regioisomeren-gemisch aus 9- und 10-Isopropyloctadecansäure **3a** in 73 % Ausbeute (Schema 2). Die analoge Reaktion von *trans*-4-Octen **1b** ergab 4-Isopropyloctan **3b** in 67 % Ausbeute; daneben wurden geringe Mengen (ca. 10 %) der regioiso-

[*] Prof. Dr. J. O. Metzger, Dr. U. Biermann
Fachbereich Chemie der Universität
Postfach 2503, D-26111 Oldenburg
Fax: (+49) 441-798-3329
E-mail: juergen.metzger@uni-oldenburg.de

[**] Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (Förderkennzeichen 97NR174) gefördert.