

Die erste Kristallstruktur eines medizinisch relevanten Gold-Protein-Komplexes: unerwartete Koordination von $[\text{Au}(\text{PET}_3)]^+$ an Histidin**

Juan Zou, Paul Taylor, Jacqueline Dornan, Stephen P. Robinson, Malcolm D. Walkinshaw* und Peter J. Sadler*

Antiarthritisch wirksame Gold(I)-Verbindungen wie die intravenös zu verabreichenden Medikamente Aurothiomalat (Myochrysin)^[1] und Aurothioglucose (Solganol)^[2] sowie das oral einzunehmende Medikament $[\text{Au}^{\text{I}}(\text{PET}_3)(2,3,4,6\text{-tetra-}O\text{-acetyl-}\beta\text{-D-thioglucose-}S)]$ (Auranofin)^[3] sind „Prodrugs“, die leicht Ligandenaustauschreaktionen eingehen.^[4, 5] Es wird angenommen, dass Thiolat-Schwefelatome (Cysteinreste) in Proteinen und Enzymen die eigentlichen Bindungsstellen sind,^[4] da Au^{I} ein sehr „weiches“ (Klasse „b“) Metallion ist.^[6, 7] Allerdings fehlt es an Informationen bezüglich der Strukturen von Addukten antiarthritischer Au^{I} -Komplexe mit Proteinen.^[8] Im Folgenden berichten wir über Untersuchungen der Reaktionen zwischen dem Enzym Cyclophilin und dem antiarthritisch wirksamen Komplex $[\text{Au}(\text{PET}_3)\text{Cl}]$ **1**^[9, 10] und stellen die erste Kristallstruktur eines Adduktes aus einem Protein und einem Au^{I} -Phosphin-Komplex vor. Unerwarteterweise bindet Au^{I} in Cyclophilin-Kristallen trotz der vier Cys-Thiolgruppen an das Stickstoffatom eines Histidinrestes der aktiven Bindungsstelle. Diese Ergebnisse sind für das Verständnis der biologischen Chemie von antiarthritisch wirksamen Goldkomplexen von Bedeutung. Ein weiterer wichtiger Aspekt der vorliegenden Arbeit ist der Bedarf an ortsspezifischen Schweratom-Reagentien in der Röntgenstrukturanalyse.^[8]

Cyclophiline sind ubiquitäre Proteine, die an der Faltung, dem Transport und dem Zusammenbau von Proteinen beteiligt sind und mit allgemeinen zellulären Stressreaktionen in Verbindung stehen.^[11] Es handelt sich um Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen); Cyclophilin A (ein Immunophilin) ist der wichtigste intrazelluläre Rezeptor für das Immunosup-

pressivum Cyclosporin A (CsA). Cyclophilin-3 (Cyp-3; eine der am häufigsten exprimierten Cyclophilin-Isoformen des freilebenden Nematoden *Caenorhabditis elegans*) wurde für unsere Studien ausgewählt, da seine Röntgenstruktur bekannt ist^[12] und es vier freie Cys-Thiolgruppen als potentielle Au^{I} -Bindungsstellen aufweist.

Zunächst wurde die Reaktion zwischen Cyp-3 und **1** in Lösung massenspektrometrisch untersucht. Bei einem Cyp-3:**1**-Molverhältnis von 1:3.5 traten nach einem Tag drei neue Peaks mit den Massen 18612.0, 18736.8 und 18932.9 u für die Addukte $\{\text{Cyp-3} + \text{Au}\}$, $\{\text{Cyp-3} + [\text{Au}(\text{PET}_3)]\}$ bzw. $\{\text{Cyp-3} + \text{Au} + [\text{Au}(\text{PET}_3)]\}$ (ber.: 18615.5, 18733.6 bzw. 18930.6 u) auf (Abbildung 1). Bei einem Molverhältnis von 1:7 waren die Massenpeaks für Cyp-3 und $\{\text{Cyp-3} + [\text{Au}(\text{PET}_3)]\}$ nach fünf

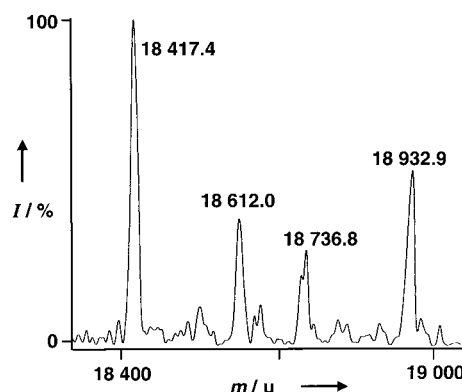


Abbildung 1. LC-ESI-MS von Cyp-3 (13.5 μM) nach 24 h Inkubation mit **1** (47.3 μM) bei 291 K. Die Massenpeaks entsprechen Cyp-3 (18417.4 u, ber.: 18419.2 u), $\{\text{Cyp-3} + \text{Au}\}$ (18612.0 u, ber.: 18615.5 u), $\{\text{Cyp-3} + [\text{Au}(\text{PET}_3)]\}$ (18736.8 u, ber.: 18733.6 u) und $\{\text{Cyp-3} + \text{Au} + [\text{Au}(\text{PET}_3)]\}$ (18932.9 u, ber.: 18930.6 u).

Tagen nicht mehr vorhanden, wohl aber die Peaks für $\{\text{Cyp-3} + \text{Au}\}$ (18618.8 u) und $\{\text{Cyp-3} + \text{Au} + [\text{Au}(\text{PET}_3)]\}$ (18930.8 u, Hauptpeak); daneben traten neue Peaks mit Massen von 19242.5 u für $\{\text{Cyp-3} + \text{Au} + 2[\text{Au}(\text{PET}_3)]\}$ (ber.: 19245.7 u) und von 18812.8 u für $\{\text{Cyp-3} + 2\text{Au}\}$ (ber.: 18812.4 u) auf. Diese Ergebnisse schienen mit dem Verlust von Chlorid und der Koordination von $[\text{Au}(\text{PET}_3)]^+$ an das Protein, gefolgt vom Verlust von PET_3 (und anschließender Oxidation zu OPET_3) im Einklang zu stehen. Eine derartige Austauschreaktion könnte leicht im Bereich von Cys40 und Cys168 (die beide hoch konserviert in allen divergenten Schleifen-Cyclophilinen sind) stattfinden, da deren Schwefelatomen nur 5.5 Å voneinander entfernt sind und diese somit eine lineare S-Au-S-Koordinationsstelle für Au^{I} zur Verfügung stellen könnten.

Reaktionen von Cyp-3 mit dem Disulfid 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) ließen ebenfalls vermuten, dass alle vier Cys-Thiolgruppen zugänglich sind. Der durchschnittliche Thiolgehalt von Cyp-3 wurde UV/Vis-spektroskopisch zu 4.2 mol Thiol pro mol Cyp-3 bestimmt. Die Reaktion wurde außerdem durch Flüssigkeitschromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS) untersucht. Der Peak im Chromatogramm für freies Cyp-3 gehört zu einer Masse von 18418.5 u (Mittelwert; ber.: 18419.2 u).^[13] Dieser Peak war nach der Reaktion von Cyp-3 mit DTNB nicht mehr vorhanden, der neue Hauptpeak im Chromatogramm hatte

[*] Prof. Dr. M. D. Walkinshaw, Dr. P. Taylor, J. Dornan, S. P. Robinson
Institute of Cell and Molecular Biology
Michael Swann Building
The University of Edinburgh, King's Buildings
West Mains Road, Edinburgh EH9 3JR (Großbritannien)
Fax: (+44) 131-650-7055
E-mail: M.Walkinshaw@ed.ac.uk

Prof. Dr. P. J. Sadler, Dr. J. Zou
Department of Chemistry
The University of Edinburgh, King's Buildings
West Mains Road, Edinburgh EH9 3JJ (Großbritannien)
Fax: (+44) 131-650-6452
E-mail: P.J.Sadler@ed.ac.uk

[**] Diese Arbeit wurde vom Wellcome Trust (Stipendium an J.Z.), vom BBSRC, vom CLRC und vom EPSRC unterstützt. Dr. Adam Gouldsworthy und Herrn Mark Scott (Edinburgh Protein Technology Centre) danken wir für ihre Hilfe bei den LC-ESI-MS-Messungen sowie Dr. George Kontopidis, Dr. Su-ying Wu und Dr. Hongzhe Sun für wertvolle Anregungen, Diskussionen und technische Unterstützung.

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

eine Masse von 19210.6 u (Abbildung 2) und wurde {Cyp-3 + 2DTNB} (d.h. $4 \times 1/2$ DTNB; ber.: 19211.2 u) zugeordnet. Somit sollten alle vier Cys-Thiolgruppen mit DTNB gemischte Disulfide bilden und folglich zugänglich sein.

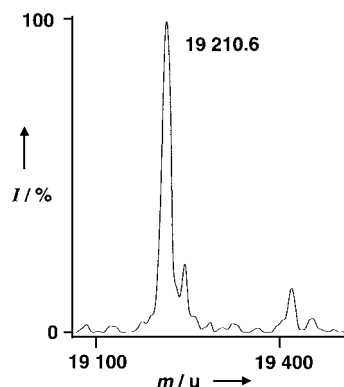


Abbildung 2. LC-ESI-MS von Cyp-3 nach der Reaktion mit DTNB im Überschuss. Der Hauptpeak (19210.6 u) entspricht einem Addukt aus einem Cyp-3-Molekül und vier halben DTNB-Molekülen, d.h., alle vier Cysteinreste sind in Form gemischter Disulfide blockiert (ber.: 19211.2 u).

Um die Au^I-Koordinationsstellen zu identifizieren, inkubierten wir Cyp-3-Einkristalle 0.42, 2, 4 und 6 h sowie 2 Wochen mit **1**. Anschließend wurden die Kristalle jeweils schockgefroren und röntgenographisch untersucht. Das Tränken mit **1** führte in allen Fällen zu einem veränderten Aussehen der Kristalle; sie wiesen Risse auf und hatten ihre scharfen Kanten verloren. Die nach 0.42-stündigem Tränken bestimmte Kristallstruktur gab keinen Hinweis auf Gold in der berechneten Elektronendichtekarte, und das nach sechsständiger Reaktion isolierte Material lieferte keinerlei Reflexe mehr. Nach einer Reaktionsdauer von zwei Wochen war die Rissbildung erheblich fortgeschritten. Die Elektronendichtekarten der nach zwei- oder vierständigem Tränken erhaltenen Kristalle enthielten dagegen einen ausgeprägten Peak, der einer Gold-Koordinationsstelle zugeordnet werden kann (Abbildung 3).

Die Struktur wurde unter Verwendung der Methode des isomorphen Ersatzes gelöst, da die Struktur von freiem Cyp-3 bekannt ist.^[12] In der ersten Differenzkarte wurde eindeutig Au nachgewiesen sowie eine weitere zusätzliche Elektronendichte in einem Bereich, den man für einen zum His133-Nε2-Atom *trans*-ständigen Liganden erwartet, gefunden. Diese konnte anhand der Form der Elektronendichtewolke als PET₃ interpretiert werden. Die Struktur wurde mit dem

Programm SHELXL97^[14] unter Verwendung von 20154 unabhängigen Reflexen (5 % für die Berechnung des freien *R*-Faktors) und Anfangs-Constraints für die Au-N- und Au-P-Bindungslängen von 2.05 bzw. 2.27 Å verfeinert. Diese Werte entsprechen jenen in kristallinem [Au(2-isopropylimidazol)(Pcy₃)]^[15] und [Au(phthalimido)(PET₃)].^[16] Der endgültige *R*-Faktor betrug 18.48 % und der freie *R*-Faktor 24.68 %.

Überraschenderweise war das Goldion nicht an ein Cys-Schwefelatom, sondern an Nε2 von His133 (Au-N 2.06 Å) und an PET₃ (Au-P 2.27 Å) gebunden. Die lineare Geometrie (N-Au-P 167.7°) ist für Au^I charakteristisch. Die Temperaturfaktoren des Komplexes (Nε2 13.86, Au 43.77, P 79.45, C 74.96 (Mittelwert)) lassen darauf schließen, dass die PET₃-Gruppe frei rotieren kann.

Von den vier Histidinresten in Cyp-3 sind nur die Imidazolringe von His54 und His133 dem Lösungsmittel zugänglich, wobei beide in einem Lösungsmittelkanal liegen, der zwischen zwei Cyp-3-Molekülen verläuft, die über eine zur *b*-Achse parallele zweizählige Schraubenachse miteinander in Beziehung stehen. Cys168 scheint ebenfalls leicht zugänglich zu sein, und das Schwefelatom von Cys163 befindet sich an der Proteinoberfläche; aber möglicherweise kann [Au(PET₃)]⁺ an diesen Stellen nicht ohne schwerwiegende strukturelle Verzerrungen und ein Aufbrechen des Kristalls untergebracht werden.

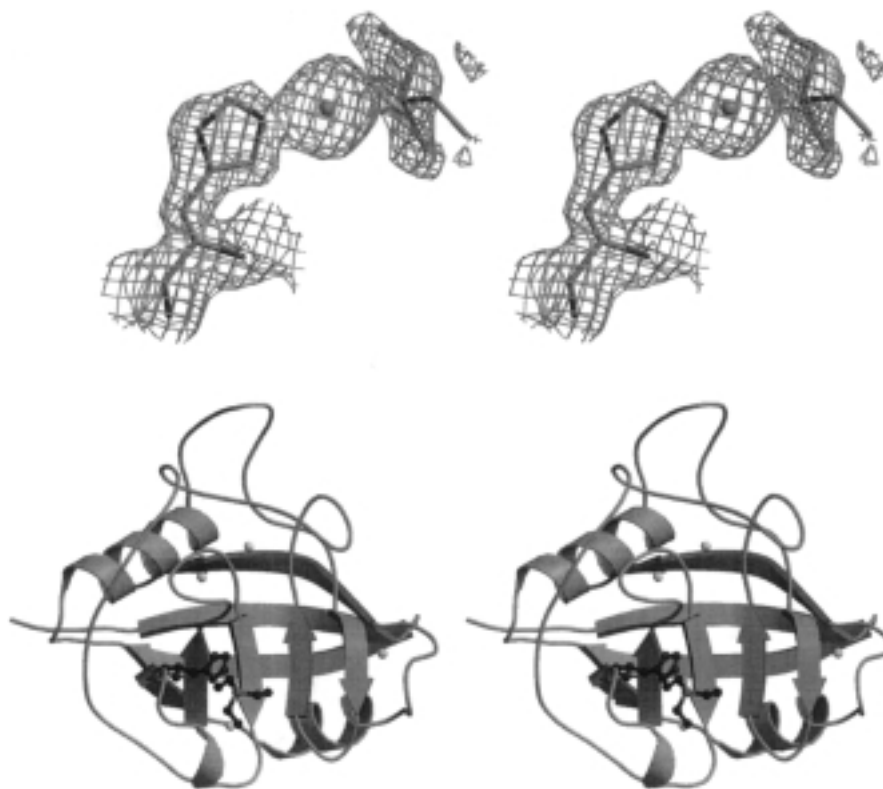


Abbildung 3. Oben: Stereodarstellung der verfeinerten Struktur der Gold-Bindungsstelle in Cyp-3, die die Koordination von Au^I durch His133 und PET₃ zeigt (eingezeichnet sind die Konturen der 1.75-σ-Fläche aus der 2F_o - F_c-Elektronendichtekarte). Die Unschärfe des PET₃-Liganden beruht wahrscheinlich auf einer rotationsbedingten Fehlordnung. Unten: Stereodarstellung von Cyp-3 nach der Reaktion mit **1**. Als Kugeln gezeigt sind die S-Atome der vier Cysteinreste (helle Kugeln: Cys40 (links oben), Cys168 (rechts oben), Cys122 (links unten) und Cys163 (rechts unten)), der His133-Rest mit dem Nε2-Zentrum und das daran gebundene [Au(PET₃)]⁺-Komplekxation. Angefertigt unter Verwendung der Programme Bobscript,^[26] MolScript^[27] und Raster3D.^[28]

Gold sollte durch Koordination an His133 Cyp-3 inhibieren, da His133 zum aktiven Zentrum gehört. Dass dies so ist, wurde anhand eines Chymotrypsin-Tests^[17] der Isomerisierung des Tetrapeptid-Substrats Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-Nitroanilid (Bachem) nachgewiesen. Die zur Hemmung von 50 % der Cyp-3-PPIase-Aktivität benötigte Konzentration an **1** beträgt 14 nM (Abbildung 4), ein Wert, der ähnlich groß ist wie der für die Hemmung von menschlichem CypA durch CsA.^[18]

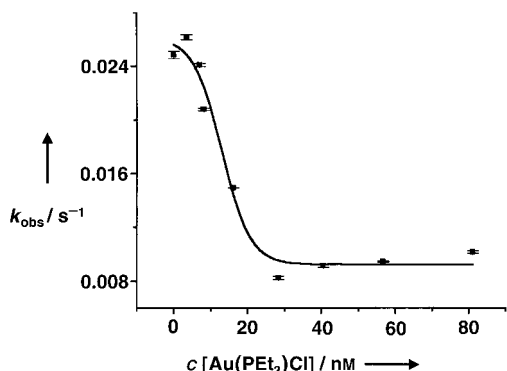


Abbildung 4. Veränderung der gemessenen Geschwindigkeitskonstante k_{obs} der PPIase-Aktivität von Cyp-3 mit steigender Konzentration von **1**. Aus der Kurve ergibt sich ein IC_{50} -Wert von 14 nM.

Au^{I} hat eine mäßige Affinität für Stickstoffliganden niedermolekularer Komplexe,^[19] hingegen eine viel größere Affinität für Thiolatgruppen. Daher verdrängt ein Cys-S-Atom das Cl^- -Ion aus **1** in wässriger Lösung viel effektiver als ein Imidazol-N-Atom.^[20] Komplex **1** bildet mit Histidinresten in Serumalbumin erst dann Addukte, wenn das Thiolat-Schwefelatom von Cys34 mit Au^{I} koordinativ vollständig gesättigt ist, zunächst in Form des Monoadduktes $\{\text{Cys34-S-Au(PEt}_3)\}$ und dann als Bisaddukt $\{\text{Cys34-S-Au(PEt}_3)_2\}$.^[2, 4, 21, 22] Ein derartiges Bisaddukt könnte auch mit Cyp-3 gebildet werden, wenn **1** im Überschuss vorliegt.

Wir haben damit die unseres Wissens erste röntgenkristallographische Charakterisierung eines Adduktes aus einem Gold-Phosphin-Komplex und einem Histidinrest in einem Protein beschrieben.^[8] Es wurde bereits vorgeschlagen,^[23] dass Au^{I} -His-Wechselwirkungen für die Fähigkeit von **1** verantwortlich sind, Übergänge von Low-Spin- zu High-Spin-Zuständen in Häm-Proteinen wie Cytochrom c zu induzieren, aber ein direkter struktureller Nachweis hierfür konnte bislang nicht erbracht werden. Die vorliegenden Ergebnisse belegen eindeutig, dass His-Imidazolringe in der Tat die Zielgruppen für die Koordination von $[\text{Au(PEt}_3)]^+$ in Proteinen sein können.

Experimentelles

$[\text{Au(PEt}_3)\text{Cl}]$ **1** wurde von Strem Chemicals und Alfa-Johnson Matthey plc bezogen. Cyclophilin-3 (Cyp-3) wurde wie in Lit. [12] beschrieben exprimiert und gereinigt.

LC-ESI-MS: Eine Lösung von Cyp-3 in 10 mM Tris(hydroxymethyl)methylamin(Tris)-Puffer (pH 7.3) oder in 20 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure(HEPES)-Puffer (pH 7.0) wurde mit 3.5 oder 7 Moläquivalenten **1** (2.5 mM Stammlösung in Ethanol oder Methanol, vor Gebrauch mit Puffer auf 150 μM verdünnt) versetzt und 1–5 d bei 291 K

inkubiert. Vor der ESI-MS-Messung wurde die Proteinlösung entsalzt und vom freien Goldkomplex auf einer Phenomenex(Jupiter)- C_{18} -Umkehrphasen-Säule mit $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetonitril}/\text{Trifluoressigsäure(TFA)}$ (0.05 Vol.-% TFA) abgetrennt. Die Positiv-Ionen-ESI-MS-Messungen wurden auf einem Plattform-II-Instrument (Micromass) durchgeführt, die Temperatur der Ionenquelle betrug 413 K. Die Daten wurden mit einer Scangeschwindigkeit von 900 us^{-1} im kontinuierlichen Modus gesammelt und mit dem Softwarepaket MassLynx (v. 2.3) auf einem WindowsNT-Rechner unter Verwendung eines Maximale-Entropie-Algorithmus ausgewertet. Die Genauigkeit der Massenbestimmung lag bei 0.1 m/z -Einheiten.

Bestimmung freier SH-Gruppen: Cyp-3 (14.0 μM , Bradford-Test) wurde mit DTNB (5 mM) in 20 mM HEPES-Puffer (pH 7.0) 30 min bei 291 K inkubiert; anschließend wurde die Absorption bei 412 nm gemessen.^[24, 25]

Kristallisation, Tränken mit Au^{I} und röntgenographische Untersuchung: Tetragonale Kristalle von Cyp-3 wurden nach der Dampfdiffusionsmethode am hängenden Tropfen gezüchtet: Tropfen: 16 mg mL^{-1} Cyp-3 in 50 mM Natriumcitrat-Puffer (pH 5.6), der 16–17.5 % (w/v) Methoxypolyethylenglycol 5000 (MPEG 5000; 4 μL) enthielt; Reservoirlösung: 100 mM Natriumcitrat-Puffer mit 32–35 % MPEG 5000; Temperatur: 291 K. Durchschnittliche Kristallabmessungen $0.5 \times 0.4 \times 0.4$ mm. Für das Tränken der Kristalle wurde ein Aliquot einer Stammlösung von **1** in DMSO mit 100 mM Natriumcitrat-Puffer (pH 5.6), der 33–35 % MPEG 5000 enthielt, auf eine Au^{I} -Endkonzentration von 3.5 mM verdünnt (die Lösung ist dann 5-proz. an DMSO). Die Stammlösung von **1** in DMSO gibt über einen Zeitraum von einem Monat lediglich ein einziges $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Signal bei $\delta = 34.5$, was die Stabilität der Au-P-Bindung unter diesen Bedingungen belegt. Die Kristalle wurden von den Tropfen mit 0.4–0.5 mm Nylonschlaufen in 3 μL der Mutterlauge, die zusätzlich 20 % Glycerin enthielt, überführt, 5 s nach dem Entfernen aus dieser Lösung in einer Nylonschleife (Hampton Research) befestigt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Röntgenstrukturdaten wurden bei 100 K (Oxford Cryosystems) unter Verwendung von MAR-Bildplatten am Daresbury Synchrotron gesammelt und mit dem Programm DENZO verarbeitet. Der Datensatz enthält 185 907 gemessene Reflexe und liefert einen Datensatz von 20 154 unabhängigen Reflexen ($R_{\text{merge}} = 0.068$; Vollständigkeit bis 1.85 Å 0.983). $R_{\text{merge}} = 0.253$ im Bereich einer Auflösung zwischen 1.88 und 1.85 Å.

PPIase-Assay: Cyp-3 wurde mit **1** bei 1:Cyp-3-Molverhältnissen von 0:1 (Kontrolle), 0.43:1, 0.86:1, 1.0:1, 2.0:1, 3.5:1, 5.0:1, 7.0:1 und 10.0:1 48 h in 50 mM HEPES-Puffer (pH 8.0), der 86 mM NaCl enthielt, bei 277 K inkubiert. Danach wurden 4- μL -Aliquote bei 275 K nach der in Lit. [12] angegebenen Vorschrift getestet.

Das ESI-MS-Spektrum von Cyp-3 nach 5 d Reaktion mit **1**, eine Farbdarstellung von Abbildung 3 und Auftragungen der Absorption gegen die Zeit für die Cyp-3-PPIase-Aktivitätstests sind in den Hintergrundinformationen zu finden. Die Atomkoordinaten (Code 1E3B) sind in der Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ, hinterlegt (<http://www.rcsb.org/>).

Eingegangen am 21. Februar 2000 [Z14741]

- [1] R. Bau, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9380–9381.
- [2] M. T. Coffer, C. F. Shaw III, M. K. Eidsness, J. W. Watkins II, R. C. Elder, *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 333–339.
- [3] D. T. Hill, B. M. Sutton, *Cryst. Struct. Commun.* **1980**, 9, 679–686.
- [4] C. F. Shaw III, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2589–2600.
- [5] M. T. Razi, G. Otiko, P. J. Sadler, *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **1983**, 209, 371–384.
- [6] R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3533–3539.
- [7] S. Ahrland, J. Chatt, N. R. Davies, *Q. Rev. Chem. Soc.* **1958**, 12, 265–276.
- [8] Die umfassendste Datenbank von Au-Bindungsstellen in Proteinkristallen: <http://www.bmm.icnet.uk/had/heavyatom.html>. Bei den meisten handelt es sich um $[\text{Au(CN)}_2]^-$ -Bindungsstellen.
- [9] Der Komplex **1** ist wirksam gegen a) Arthritis: B. M. Sutton, E. McGusty, D. T. Walz, M. J. DiMartino, *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 1095–1098; b) und gegen Krebs: C. K. Mirabelli, R. K. Johnson, D. T. Hill, L. F. Faucette, G. R. Girard, G. Y. Kuo, C. M. Sung, S. T. Crooke, *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 218–223.

- [10] Der Komplex **1** ist ein Hauptprodukt von Reaktionen des oral einzunehmenden Mittels Auranofin in HCl-Lösungen: a) J. Hempel, Y. Mikuriya in *Bioinorganic Chemistry of Gold Coordination Compounds* (Hrsg.: B. M. Sutton, R. G. Franz), SK&F, Philadelphia, **1981**, S. 37–46; sowie von Reaktionen von Auranofin mit Hypochlorit, einem Oxidationsmittel, das in entzündeten Geweben vorhanden ist: b) A. J. Canumalla, Dissertation, University of Wisconsin, Milwaukee, WI, **1998**; c) Lit. [4].
- [11] A. Galat, S. M. Metcalfe, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1995**, 63, 67–118.
- [12] J. Dornan, A. P. Page, P. Taylor, S.-Y. Wu, A. D. Winter, H. Husi, M. D. Walkinshaw, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 34877–34883. Cyp-3 (173 Aminosäurereste) weist eine hohe Sequenz- und Strukturähnlichkeit mit menschlichem Cyp-A auf.
- [13] Im exprimierten Protein fehlt Met1.
- [14] G. M. Sheldrick, SHELXL-97, Universität Göttingen, **1997**.
- [15] B. Bovio, F. Bonati, A. Burini, B. R. Pietroni, *Z. Naturforsch. B* **1984**, 39, 1747–1754.
- [16] S. J. Berners-Price, M. J. Dimartino, D. T. Hill, R. Kuroda, M. A. Mazid, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 3425–3434.
- [17] J. L. Kofron, P. Kuzmic, V. Kishore, E. Colonbonilla, D. H. Rich, *Biochemistry* **1991**, 30, 6127–6134.
- [18] J. Liu, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 4028–4032.
- [19] J. Strähle in *Gold: Progress in Chemistry, Biochemistry, and Technology* (Hrsg.: H. Schmidbaur), Wiley, Chichester, **1999**, S. 311–348.
- [20] a) M. T. Razi, Dissertation, University of London, **1983**; b) M. T. Razi, P. J. Sadler, unveröffentlicht. ³⁵Cl-NMR-Untersuchungen zufolge genügt 1 Moläquivalent L-Cys, um Cl[−]-Ionen von **1** vollständig zu ersetzen, von N-Methylimidazol sind hierfür mehr als 8 Moläquivalente nötig.
- [21] N. A. Malik, G. Otiko, P. J. Sadler, *J. Inorg. Biochem.* **1980**, 12, 317–322.
- [22] C. F. Shaw III, N. A. Schaeffer, R. C. Elder, M. K. Eidsness, J. M. Trooster, G. H. M. Calis, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 3511–3521.
- [23] a) G. Otiko, P. J. Sadler, *FEBS Lett.* **1980**, 116, 227–30; b) M. C. Grootveld, G. Otiko, P. J. Sadler, R. Cammack, *J. Inorg. Biochem.* **1986**, 27, 1–15.
- [24] A. F. S. A. Habeeb, *Methods Enzymol.* **1972**, 25, 457–464.
- [25] P. C. Jocelyn, *Methods Enzymol.* **1987**, 143, 44–67.
- [26] R. M. Esnouf, *J. Mol. Graphics Modelling* **1997**, 15, 132–136.
- [27] P. J. Kraulis, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, 24, 946–950.
- [28] E. A. Merritt, D. J. Bacon, *Methods Enzymol.* **1997**, 277, 505–524.

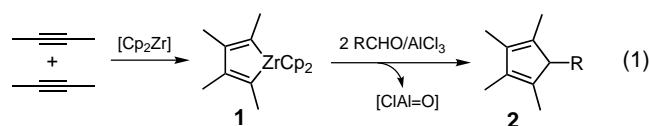
Aluminiumtrichlorid- und Zirconocen-vermittelte Desoxygenierung und Cycloaddition von Aldehyden an Alkine unter Bildung von Cyclopentadienderivaten**

Zhenfeng Xi* und Pixu Li

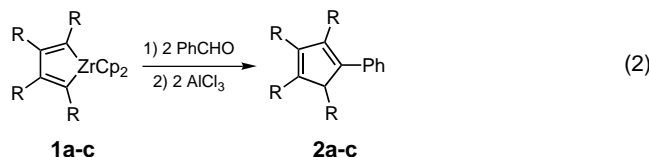
Die Spaltung oder Desoxygenierung der C-O-Doppelbindungen in Carbonylverbindungen ist in der organischen Synthese von sehr großem Interesse.^[1–4] Die metallkatalysierte Cycloaddition ungesättigter organischer Substrate hat

große Aufmerksamkeit auf sich gezogen, weil solche Reaktionen einen einfachen Weg zu nützlichen cyclischen Verbindungen darstellen.^[5] Bisher gibt es unseres Wissens noch keine Methoden zur Bildung cyclischer Verbindungen durch Cycloaddition von Aldehyden an Alkine bei gleichzeitiger Desoxygenierung der Carbonylgruppe.

Zwar gehören Aldehyde zu den meistverwendeten ungesättigten Substraten, doch sind übergangsmetallvermittelte Cycloadditionen von Aldehyden an Alkine selten.^[6] Tsuda, Saegusa und Mitarbeiter haben die ersten Cyclisierungen von Diinen mit Aldehyden unter Bildung von sechsgliedrigen Oxacyclen wie Pyranen unter Ni⁰-Katalyse beschrieben,^[6a] formal eine [2+2+2]-Cycloaddition. Hier berichten wir über die erste Cyclisierung von zwei Alkinmolekülen mit einem Aldehyd unter Desoxygenierung der C=O-Bindung, die mehrfach substituierte Cyclopentadienderivate ergibt. Die Reaktionen werden durch AlCl₃ und eine in situ präparierte Cp₂Zr^{II}-Spezies vermittelt [Gl. (1); Cp = η⁵-C₅H₅].



Zwei Moleküle desselben Alkins oder verschiedener Alkine gingen bereitwillig eine Cyclisierungsreaktion mit einem niedervalenten Zirconocenkomplex ein, wobei die Zirconacyclopentadiene **1** entstanden.^[7, 8] Zugabe von zwei Äquivalenten Benzaldehyd und zwei Äquivalenten frisch sublimiertem AlCl₃ zu einer in situ in Toluol hergestellten Lösung von **1a** führte zu einer schnellen Reaktion [Gl. (2)]: Die GC-Analyse ergab, dass die Reaktion innerhalb von 30 min beendet war und **2a** in 89 % Ausbeute (Ausbeute an



a: R = nPr	89% (65%)
b: R = Me	(45%)
c: R = Ph	(47%)

isoliertem Produkt: 65 %) gebildet wurde. Ebenso wurde **2b** in 45 % Ausbeute bei der Reaktion von **1b** mit Benzaldehyd in Gegenwart von AlCl₃ isoliert. Abhängig von den Reaktionsbedingungen und der Aufarbeitung können verschiedene Regioisomere der Cyclopentadienderivate erhalten werden, aber unter den von uns gewählten Reaktionsbedingungen wurde nur das in Gleichung (2) gezeigte Isomer erhalten. Die Reaktion von **1c** mit Benzaldehyd bei Raumtemperatur verlief vergleichsweise langsam und lieferte **2c** als farblose Kristalle in 47 % Ausbeute. Die NMR-spektroskopischen Daten und der Schmelzpunkt von **2c** stimmen mit Literaturangaben überein.^[9] Reaktionen von Metallacyclopentadienen mit C₁-Äquivalenten zu Cyclopentadienderivaten sind selten.^[10] Reaktion (2) ist die erste dieser Art, in der sich ein Aldehyd formal wie eine C₁-Einheit verhält. Es ist erwäh-

[*] Prof. Dr. Z. Xi, P. Li
Department of Chemistry, Peking University
Beijing 100871 (China)
Fax: (+86) 10-6275-1708
E-mail: zfxi@pku.edu.cn

[**] Wir danken für finanzielle Unterstützung durch die National Natural Science Foundation of China (29702001), den National Science Fund for Distinguished Scholars (29825105) und den Peking University President Fund. Yunhai Xiao führte einige experimentelle Arbeiten durch.