

- [20] Nach einmaligem Umkristallisieren wurde der *ee* am GC auf >95 % bestimmt.
- [21] A. J. Mancuso, D. Swern, *Synthesis* **1981**, 165–185.
- [22] Übersicht über Heck-Reaktionen in der Totalsynthese: M. Beller, T. H. Riermeier, G. Stark in *Transition Metals in Organic Synthesis*, Vol. 1 (Hrsg.: M. Beller, C. Bolm), WILEY-VCH, Weinheim, **1998**, S. 208–240.
- [23] T. Jeffery, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 1287–1289.
- [24] a) W. P. Griffith, S. V. Ley, *Aldrichimica Acta* **1990**, 23, 13–19; b) S. V. Ley, J. Norman, W. P. Griffith, S. P. Marsden, *Synthesis* **1994**, 639–666.
- [25] Wir danken Prof. G. Höfle (GBF, Braunschweig) für eine Probe des Naturstoffs.
- [26] Die Konfiguration an C10 konnte durch den Vergleich der CD-Spektren von natürlichem und synthetischem Ratjadon gesichert werden.
- [27] M. Christmann, U. Bhatt, M. Quitschalle, E. Claus, M. Kalesse, noch unveröffentlichte Ergebnisse.

Ein durch Doxycyclin reguliertes allosterisches Ribozym**

Nicolas Piganeau, Andreas Jenne, Vincent Thuillier* und Michael Famulok*

Spezifisch ligandenbindende Nucleinsäuren (Aptamere) können isoliert werden, indem man den „Strukturraum“ großer kombinatorischer Nucleinsäure-Bibliotheken mit Hilfe der In-vitro-Selektion nach funktionalen Sequenzen durchsucht.^[1–3] Für die Isolierung von Aptameren, die ihre Liganden spezifisch und hochaffin binden, wird im Allgemeinen eine komplexe Nucleinsäure-Bibliothek mit dem immobilisierten Zielmolekül inkubiert oder ein vorgebildeter Komplex aus dem Zielmolekül und der Nucleinsäure immobilisiert.

[*] Prof. Dr. M. Famulok, N. Piganeau,^[†] Dr. A. Jenne
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49) 228-735388
E-mail: m.famulok@uni-bonn.de

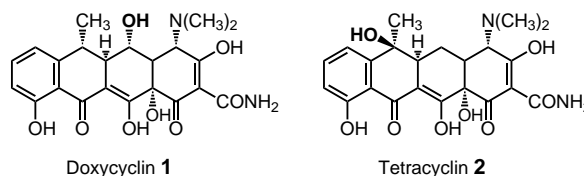
Dr. V. Thuillier
Aventis Gencell
3825 Bay Center Place
Hayward, CA 94545 (USA)
Fax: (+1) 510-887-1680
E-mail: vincent.thuillier@aventis.com

[†] Neue Anschrift: Aventis Gencell
3825 Bay Center Place, Hayward, CA 94545 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von Aventis Gencell und der Volkswagen-Stiftung (Schwerpunktprogramm „Konformationskontrolle“) unterstützt. Wir danken M. Blind, G. Mayer, D. Proske und G. Sengle (Universität Bonn) für hilfreiche Diskussionen sowie J. Crouzet, J. F. Mayaux und M. Finer (Aventis GenCell) für Unterstützung.

Viele RNA-Aptamere, die eine große Bandbreite an Molekülen erkennen, wurden auf diese Weise isoliert und genau charakterisiert. Detaillierte Strukturuntersuchungen an vielen Aptamer/Ligand-Komplexen zeigten, dass die Bildung des Komplexes in der Regel mit starken Konformationsänderungen einhergeht, wobei die Aptamerstruktur sich nur in Gegenwart des Liganden durch adaptive Bindung stabil ausbilden kann.^[4–11] Diese Eigenschaft von Aptameren wurde bereits für die rationale Entwicklung künstlicher allosterischer Ribozyme herangezogen. Diese können durch niedermolekulare Liganden aktiviert oder inhibiert werden, wenn sie an eine entsprechende spezifische Aptamersequenz binden, die unmittelbar an eine Ribozymsequenz fusioniert wurde.^[12–15]

Wir stellen hier die Ergebnisse einer neuen In-vitro-Selektionsstrategie vor, die auf der allosterischen Inhibierung eines kovalent an eine randomisierte RNA-Bibliothek fusionierten Hammerhead-Ribozyms durch das Antibiotikum Doxycyclin **1** bei sehr geringen Konzentrationen basiert. Nach 16 Selektionsrunden konnten wir Ribozyme isolieren, die mit bemerkenswerter Spezifität und mit Inhibierungskonstanten bis zu 20 nM durch **1** inhibiert wurden. Doxycyclin **1** wurde als „Schaltermolekül“ gewählt, weil es ein für höhere Eukaryonten nicht toxisches, zellpermeables kleines Molekül ist. Ein allosterisches, auf **1** reagierendes Ribozym könnte daher potentiell für die Entwicklung konditionaler Genexpressionssysteme eingesetzt werden, die auf der Spaltung von mRNAs durch inserierte Hammerhead-Ribozyme basieren, je nachdem, ob **1** in der Zelle vorhanden ist oder nicht.



Das Design der randomisierten Bibliothek ist aus Abbildung 1a abzuleiten. Allosterische Ribozyme wurden in früheren Arbeiten durch rationales Design erhalten, indem man die Aptamer-RNA mit der Helix II fusionierte.^[16, 17] Wir wählten diese Stelle ebenfalls für die Positionierung der randomisierten Sequenz, da sie für die Aktivität des Hammerhead-Ribozyms wichtig ist.^[18] Um eine Bibliothek möglichst aktiver Ribozyme zu erhalten, wurden deshalb die ersten zwei Basenpaare der Helix beibehalten. Den Verlauf der Selektion zeigt Abbildung 1c. Nach fünf Selektionszyklen wurde eine Anreicherung des Pools mit Doxycyclin-inhibierten Ribozymen detektiert. Ein Kontrollexperiment ohne **1** zeigte jedoch, dass der selektierte Pool nur schwach auf den Liganden reagierte: In Gegenwart von Doxycyclin **1** wurden 14 % der RNA im Schritt 4 (Abbildung 1b) eluiert, während im Negativkontrollexperiment ohne **1** noch 10 % eluiert werden konnten.

Wir vermuteten deshalb, dass sich im Laufe der Selektion parasitäre Ribozyme mit angereichert hatten, die sich in unterschiedliche Konformationen falten, von denen einige spaltungsaktiv, andere inaktiv in der Spaltung sind. Während

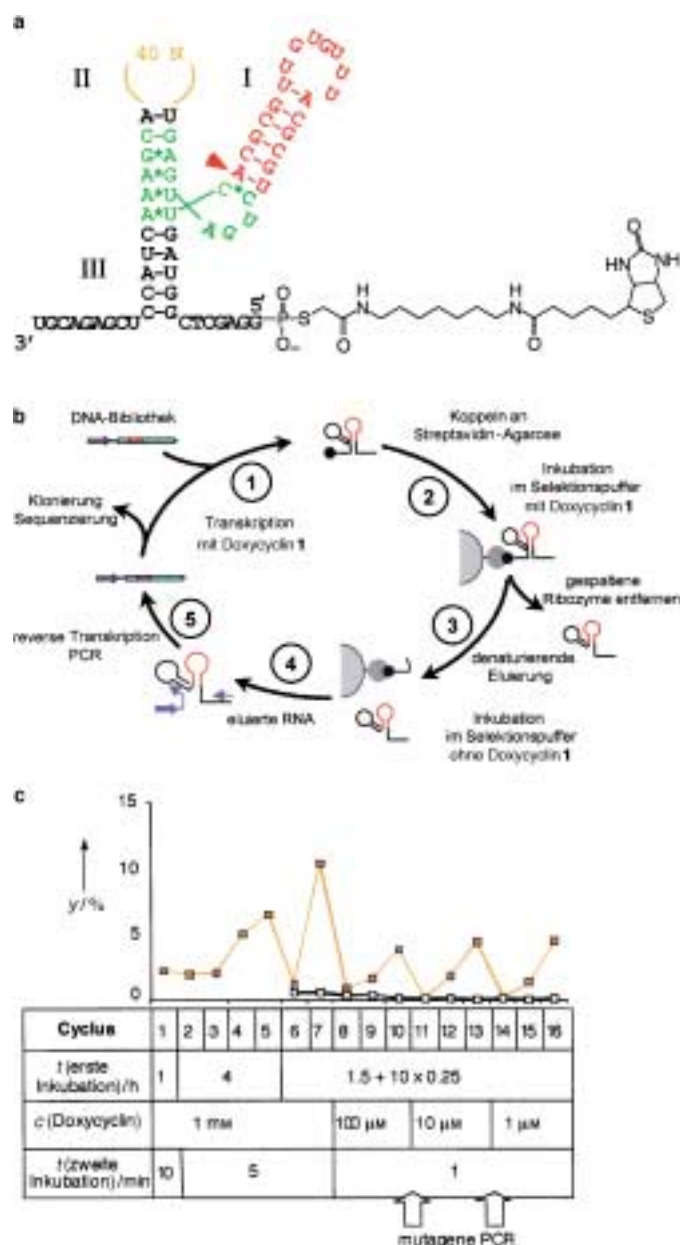


Abbildung 1. Selektion von allosterischen Ribozymen, die durch **1** inhibiert werden. a) Sekundärstruktur der Transkripte aus dem Anfangspool. Die Helix II wurde auf zwei Basenpaare verkürzt und die Schleife II durch eine 40 Nucleotide lange, randomisierte Region ersetzt. Grün: Nucleotide des katalytischen Zentrums des Hammerhead-Ribozyms (HHR); roter Pfeil: Spaltstelle. b) Schematische Darstellung des Selektionsverfahrens. Für Einzelheiten siehe *Experimentelles*. Schritt 1: Transkription der DNA-Bibliothek mit T7-RNA-Polymerase in Gegenwart von Guanosinmonophosphothioat (GMPS) und 1.0 mM **1** (rot: randomisierte Region; blauer Pfeil: T7-Promotor); Aufreinigung der ungespaltenen RNA-Transkripte durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und chemische Biotinylierung der 5'-Sulfanylgruppe (schwarz gefüllter Kreis). Schritt 2: Kupplung an Streptavidin-Agarose und Inkubation mit **1**. Schritt 3: Waschen unter denaturierenden Bedingungen zur Entfernung von **1** und gespaltenen Ribozym-Produkten; Inkubation der verbleibenden immobilisierten RNA ohne **1** im Selektionspuffer. Schritt 4: Eluierung der gespaltenen Ribozyme. Schritt 5: Reverse Transkription und PCR-Amplifizierung; blaue Pfeile: Primer 3 und 4. c) Prozentualer Anteil der nach der zweiten Inkubation eluierten Radioaktivität y . Gelb: in Gegenwart von **1**; schwarz: Kontrollversuch. Die Tabelle setzt jeden Selektionszyklus in Beziehung zu den Selektionsbedingungen. Die Pfeile kennzeichnen Selektionszyklen, bei denen eine mutagenic PCR durchgeführt wurde. Für Einzelheiten siehe Text.

der ersten Inkubation (Schritt 2, Abbildung 1 b) würden diese Ribozyme nur partiell eluiert werden, da ein Teil von ihnen aufgrund der falschen Faltung gar nicht gespalten wird. Während der Denaturierung/Renaturierung zwischen Schritt 2 und 3 (Abbildung 1 b) würde sich ein Teil dieser Ribozyme zurückfalten – wieder nur partiell in die aktive Konformation, die dann ungewollt zusammen mit den durch **1** inhibierten Spezies im zweiten Inkubationsschritt eluiert werden könnten (Schritt 3, Abbildung 1 b), mit der Konsequenz, dass Doxycyclin-unabhängige („parasitäre“) Ribozyme koselektiert würden. Um diese zu eliminieren, modifizierten wir ab Zyklus 6 das Selektionsschema, indem wir den ersten Inkubationsschritt (Schritt 2, Abbildung 1 b) durch repetitive Wasch-Schritte unter Denaturierungs/Renaturierungs-Bedingungen unterbrachen. Tatsächlich war die parasitäre Aktivität des angereicherten Pools nach Zyklus 7 deutlich niedriger (10% Eluierung in Schritt 4 in Gegenwart von **1**, 0.5% ohne **1**). Nach diesem Zyklus wurde der Selektionsdruck graduell erhöht, indem Ligandenkonzentration und Inkubationszeit in Schritt 2 (Abbildung 1 b,c) reduziert wurden. Nach den Cyclen 10 und 13 wurde die Komplexität der Bibliothek durch mutagenic PCR^[19, 20] erhöht. Zugleich erhöhten wir die Selektionsstringenz, um die Anreicherung von Ribozymen mit besseren K_i -Werten und Geschwindigkeitskonstanten zu fördern.

Die Aktivitäten der selektierten Pools aus den Cyclen 10, 13 und 16 wurden durch Zeitverlaufsexperimente bei unterschiedlichen Inhibitor-konzentrationen verfolgt. Die Sensitivität der Pool-Ribozyme für Doxycyclin **1** nahm kontinuierlich zu (Abbildung 2 a), wobei der Pool aus Zyklus 16 schon in Gegenwart von 1 µM **1** vollständig inhibiert wurde (ganz rechte Auftragung). Die selektierten Pools wurden deshalb nach den Cyclen 10, 13 und 16 kloniert und sequenziert (Abbildung 2 b). Wir erhielten acht Sequenzklassen, aus denen jeweils ein repräsentatives Mitglied für weitere Analysen ausgewählt wurde. Eine kinetische Analyse wurde mit (1 µM) und ohne zugesetztes **1** durchgeführt, die k_{obs} -Werte und der Inhibierungsfaktor gegenüber dem unselektierten Pool sind in Abbildung 2 b ebenfalls aufgeführt. Der untersuchte Repräsentant aus Zyklus 10 wirkte bei dieser Konzentration nicht allosterisch inhibierend, was aber nicht überrascht, da dieser Zyklus in Gegenwart von 100 µM **1** durchgeführt wurde. Klone, die unter höherer Stringenz selektiert wurden, zeigten deutliche allosterische Effekte mit 3- bis fast 50fachen Unterschieden in der k_{obs} -Werten. Interessanterweise wiesen die selektierten Ribozyme eine reduzierte katalytische Aktivität in Abwesenheit des Regulatormoleküls auf: Ihre mittleren k_{obs} -Werte liegen bei 0.3 min⁻¹, was etwa zehnmal weniger ist als beim entsprechenden „Wildtyp“-Hammerhead-Ribozym, bei dem keine zusätzlichen Sequenzen an Helix II fusioniert sind und für das ein k_{obs} -Wert um 3.0 min⁻¹ gemessen wurde (Daten nicht gezeigt).

Von den vier Klonen mit den besten Inhibierungswerten wurden die Inhibierungskonstanten K_i bestimmt (Tabelle 1). Diese Klone erwiesen sich als eindrucksvoll sensitiv für **1** mit K_i -Werten zwischen 20 und 70 nM. Diese Werte gehören zu den höchsten Affinitäten, die man bisher für die Interaktionen zwischen RNA und kleinen Molekülen erhalten hat.^[21]

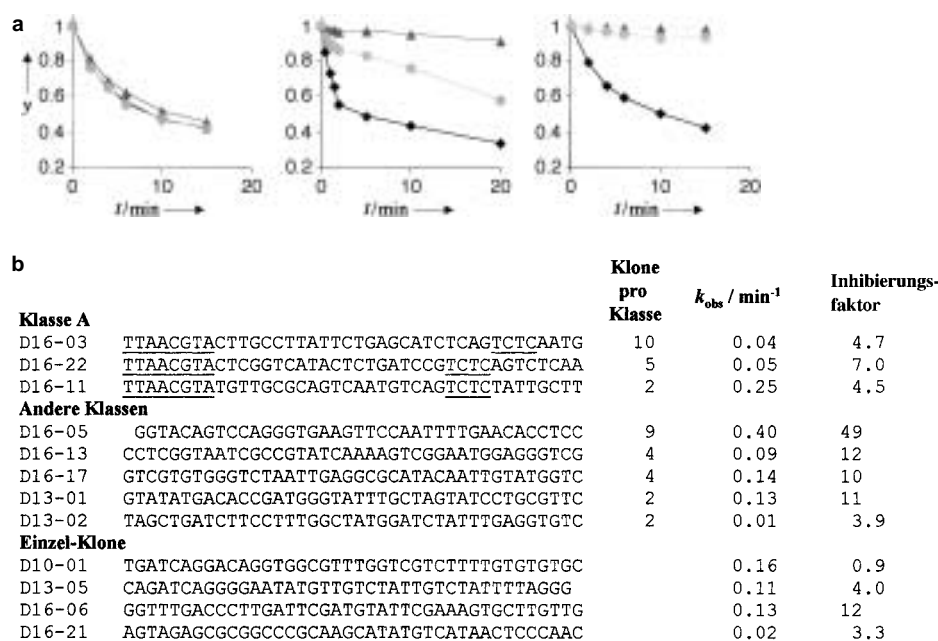


Abbildung 2. Allosterische Inhibition der Bibliothek und von individuellen selektierten Klonen. a) Mit der Zahl der Selektionszyklen (10, 13, 16 von links nach rechts) nimmt die Sensitivität der Bibliothek für den Inhibitor **1** zu. Spaltung im Selektionspuffer (SB; 40 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM NaCl, 10 mM Spermidin, 8 mM MgCl_2) bei 37 °C mit oder ohne **1** [$c(\mathbf{1}) = 0$ (♦), 1 (○), 10 μM (△)], Start durch Zugabe von Mg^{2+} . b) Sequenzen der nach der Selektion analysierten Klone. D10, D13, D16 gibt den Selektionszyklus an, aus dem der Klon stammt. Einige Klone konnten auf der Basis von Sequenzhomologien in Familien gruppiert werden. Sequenzfamilie A enthält ein kurzes konserviertes Motiv (unterstrichen). Anhand der k_{obs} -Werte in den ersten 3 min der Reaktion wurde das Verhältnis der k_{obs} -Werte der inhibierten und der nichtinhibierten Reaktion bestimmt; es ist als Inhibierungsfaktor angegeben.

Tabelle 1. K_i -Werte für **1** und **2** sowie die Reaktionsgeschwindigkeit der nichtinhibierten Reaktion und die maximale Inhibition.

Klon	$k_{\text{obs}}(\text{nichtinhibiert})$ [min^{-1}]	$K_i(\mathbf{1})$ [nM]	maximaler Inhibierungsfaktor	$K_i(\mathbf{2})$ [nM]
D13-01	0.13 ± 0.02	70 ± 20	11	> 1000000
D16-05	0.40 ± 0.02	20 ± 5	49	100 ± 20
D16-06	0.13 ± 0.02	25 ± 3	12	100 ± 20
D16-13	0.09 ± 0.01	50 ± 30	12	> 1000000

Um die Spezifität dieser Klone zu ermitteln, bestimmten wir auch die K_i -Werte in Gegenwart von Tetracyclin **2**, das sich von **1** lediglich in der Position einer OH-Gruppe unterscheidet. Die Klone D13-01 und D16-13 zeigten bei 1.0 mM **2** keinen allosterischen Effekt, was einer mindestens 10000fachen Diskriminierung zwischen **1** und **2** entspricht (Tabelle 1). Die beiden anderen getesteten Klone wiesen eine moderate Selektivität (vier- bis fünffach) auf. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Klone D13-01 und D16-13 eine andere Bindungstasche für **1** bilden als die Klone D16-05 und D16-06.

Der aktivste Klon, D16-05, wurde verwendet, um ein Minimalmotiv für die Doxycyclin-Bindung zu bestimmen. Dazu stellten wir 16 verkürzte Versionen einer spaltungs-inaktiven Mutante dieses Klons her und führten Spaltungsreaktionen in Gegenwart dieser Konstrukte durch, wobei deren Konzentrationen zehnmal so hoch waren wie die des Inhibitors **1**. Wirken verkürzte Konstrukte als Aptamere, können diese den Inhibitor vom allosterischen Ribozym abfangen und so die Ribozymaktivität wiederherstellen.

Verkürzte Konstrukte ohne Aptamer-Aktivität agieren auch nicht als Köder für **1**, hier bleibt das allosterische Ribozym D16-05 daher inhibiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3a zu sehen. Danach ist die randomisierte Region allein nicht zur Bindung an **1** fähig. Vielmehr wird für eine wirkungsvolle Konkurrenz neben der randomisierten Region zusätzlich die Helix I des ursprünglichen Hammerhead-Ribozyms benötigt. Dabei sind offensichtlich sowohl die Sequenz der Schleifenregion dieser Helix als auch die gepaarte Region wichtig, wie die Experimente 9–11 in Abbildung 3a nahelegen. Demzufolge können wir für Klon D16-05 die in Abbildung 3b wiedergegebene Sekundärstruktur, die mit dem Algorithmus von Turner und Zuker^[22] erhalten wurde, als Minimalmotiv für die aptamerische Bindung von **1** angeben.

Vermutlich ist die Helix I integraler Bestandteil der Doxycyclin-Bindungsstelle. Wenn sich diese unter Konformationsänderung der Tertiärstruktur des Ribozyms bildet, könnte dies die durch **1** induzierte Inhibition erklären. Eine andere mögliche Erklärung für die Beteiligung der Helix I am Minimalmotiv ist, dass **1** die Struktur des Ribozyms in einer definierten Konformation festhält, wodurch der entropische Vorteil der Produktbildung am Ribozym reduziert wird, was wiederum das Gleichgewicht der Reaktion in Richtung Ligation der Spaltprodukte verschieben würde.^[23]

Wir konnten zeigen, dass das auf der allosterischen Regulierung basierende In-vitro-Selektionsschema zu Ribozymen führt, die auf verblüffend niedrige Konzentrationen des Zielmoleküls reagieren und teilweise hochspezifisch für das Regulatormolekül sind. Bei einem von Breaker et al. kürzlich angewendeten analogen Selektionsprinzip wurden allosterische Ribozyme de novo erhalten, die auf cAMP und cGMP als Effektormoleküle reagierten.^[24] Ribozymsspaltung fand dabei nur in Gegenwart von 100 μM cAMP bzw. cGMP statt; ohne diese Moleküle war das Ribozym inaktiv. Sie beschrieben eine mehr als 1000fache allosterische Aktivierung der Hammerhead-Spaltungsaktivität. Unser Selektionsschema für allosterische Inhibition führte zu 10- bis 50facher Inhibition, bei nanomolaren Konzentrationen eines nicht toxischen, zellpermeablen Moleküls mit niedrigem Molekulargewicht. Insetiert in die mRNA eines bestimmten Zielgens könnten allosterische molekulare Schalter dieses Typs als nützliche Werkzeuge für die Entwicklung maßgeschneiderter konditionaler Genexpressionssysteme verwendet werden, die durch die An- oder Abwesenheit beliebiger niedermolekularer Liganden gesteuert werden könnten.

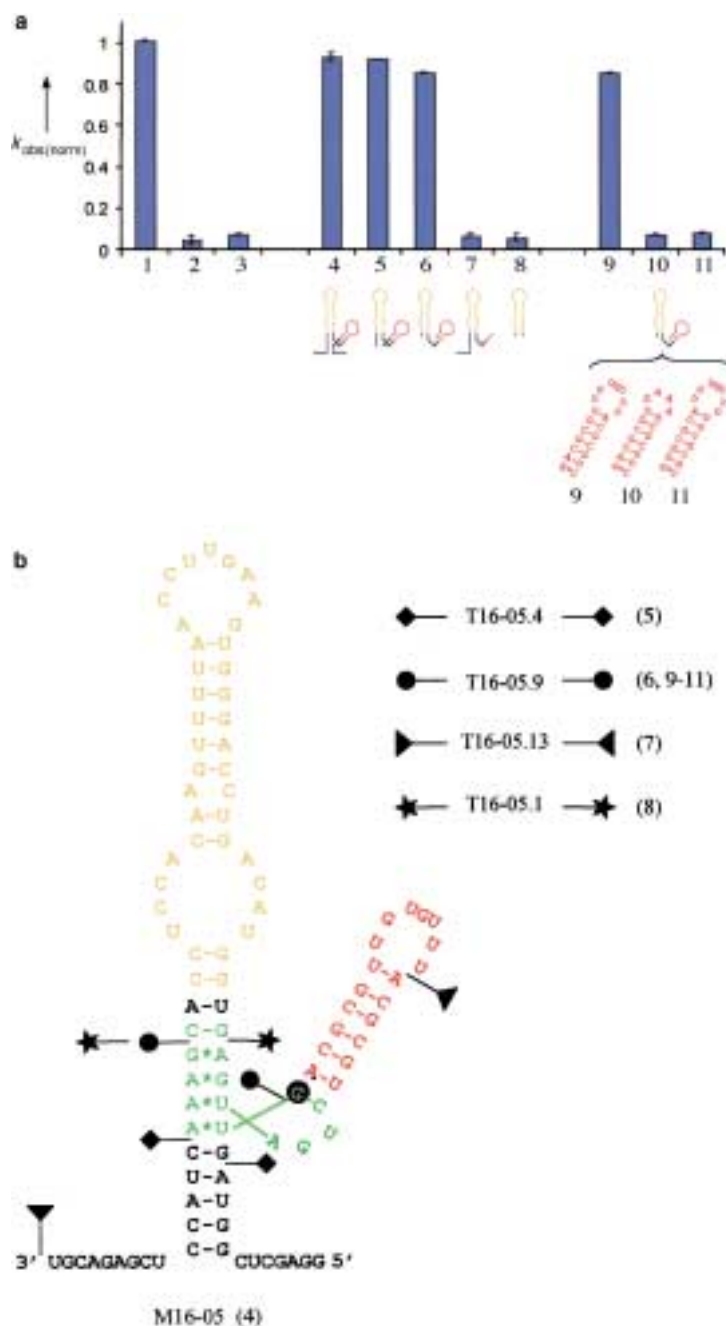


Abbildung 3. Bestimmung der Minimalsequenz von Klon D16-05. a) Relative Aktivität $k_{\text{obs}}(\text{norm})$ der Spaltreaktion unter verschiedenen Bedingungen (immer in Gegenwart von $1 \mu\text{M}$ tRNA als unspezifischem Kompetitor). 1: Spaltaktivität von D16-05 (1 nM), 2: zusätzlich 200 nM **1**, 3: wie 2. Lauf, zusätzlich $2 \mu\text{M}$ unselektierte Bibliothek als unspezifischer Kompetitor; 4–8: wie 2. Lauf, zusätzlich $2 \mu\text{M}$ spaltungs-inaktive Punktmutante M16-05 (4), Konstrukt T16-05.4 (5), Konstrukt T16-05.9 (6), Konstrukt T16-05.13 (7), Konstrukt T16-05.1 (8); 9–11: Wie 2. Lauf, zusätzlich $2 \mu\text{M}$ Konstrukt T16-05.9 mit den gezeigten Variationen in der Helix I. b) Computer-generierte Sekundärstruktur der Punktmutante D16-05. Die Markierungssymbole flankieren die getesteten Sequenzen der verkürzten Versionen. Um die T7-Transkription zu ermöglichen, wurden zwei Guaninreste in die 5'-Positionen der verkürzten Konstrukte eingefügt, die hier nicht gezeigt sind. Orange: die ursprüngliche randomisierte Region; rot: konstante Regionen aus dem Hammerhead-Ribozym (Helix I); grün: katalytisch aktives Zentrum. Der schwarz unterlegte Guaninrest zeigt die Punktmutation C \rightarrow G. Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Numerierung in (a).

Experimentelles

Synthese der Zufallsbibliothek: DNA-Oligonucleotide wurden an einem Expedite-DNA-Synthesizer synthetisiert und durch PAGE gereinigt. Der Pool-Primer (5'-CGC GGT GTG TTT ACG CGT CTG ATG AGT-N₄₀-AC-GAACTACCTCGAGACGT) wurde zunächst mit den Primern 1 (5'-CGCGTTGTGTTTACGCGTCTGATG) und 4 (5'-ACGTCTC-GAGGTAGTTTCGT) amplifiziert.^[25] Unter denselben Bedingungen erfolgte eine weitere Amplifizierung mit den Primern 3 (5'-AGCTGG-TACCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCGGTAGT-CACGCGTTGTGTTTACGCGTCTGATG) und 4. Die resultierende DNA-Bibliothek mit einer Komplexität von 10^{15} verschiedenen Sequenzen wurde als Templat für die In-vitro-Transkription mit T7-RNA-Polymerase für den ersten Selektionszyklus verwendet.

In-vitro-Selektion: Standard-Transkriptionsreaktionen enthielten die folgenden Komponenten: 250 U T7-RNA-Polymerase (Stratagene), T7-Puffer, 2.5 mM dNTPs, 20 mM GMPS, 20 μCi α -³²P-GTP, RNasin (50 U), **1** (1 mM), Templat-DNA ($2 \mu\text{M}$). Die Transkription lief 16 h bei 37 °C. Ungespaltene RNA-Transkripte wurden durch 8proz. denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) gereinigt und die 5'-Sulfanylgruppe anschließend 90 min bei 25 °C mit N-Biotinyl-N'-iodacetylhexamethylendiamin (200facher Überschuss) derivatisiert. Die Biotinylierung erfolgte mit 40% Effizienz. 5'-Modifizierte RNA wurde erneut durch PAGE gereinigt und mit Streptavidin-Agarose (Pierce) inkubiert (30 min, 25 °C). Die immobilisierte RNA wurde anschließend mit je $6 \times 1 \text{ mL}$ der Waschlösung A (WA; 25 mM HEPES, pH 7.4, 1 M NaCl, 5 mM EDTA) und B (WB; 3 M Harnstoff, 5 mM EDTA) sowie Wasser gewaschen. Danach wurde im Selektionspuffer (SB; 40 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM NaCl, 10 mM Spermidin, 8 mM MgCl₂) bei 37 °C unterschiedlich lang und bei unterschiedlichen Konzentrationen an **1** inkubiert (siehe Abbildung 1c). Die Spaltungsreaktionen wurden durch Zugabe von Mg²⁺ gestartet. Nach Zyklus 5 wurde diese Inkubation während der ersten 2.5 h zehnmal durch alternierendes Waschen mit WB, WA und Wasser unterbrochen. Die zweite Inkubation in SB erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die erste, jedoch ohne **1**. Die RNA wurde eluiert, mit Phenol/CHCl₃ extrahiert, mit EtOH ausgefällt und mit Tth-DNA-Polymerase (Boehringer) revers transkribiert; die resultierende cDNA wurde mit den Primern 3 und 4 mit Hilfe der PCR amplifiziert. Die PCR-Primer waren so konzipiert, dass das abgespaltene 5'-Ende von HHR und der T7-Promotor wieder eingeführt wurden. Diese DNA wurde als Templat für die T7-Transkription der RNA in der nächsten Selektionsrunde verwendet.

Kinetische Analyse der zwölf Klone: Die Klone wurden am 5'-Ende mit γ -³²P-ATP markiert und 1 nM in SB+8 mM MgCl₂ bei 37 °C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen, die Reaktion mit EDTA und Harnstoff auf Eis gestoppt, das Gemisch auf einem denaturierenden PA-Gel aufgetrennt und die den ungespaltenen und gespaltenen Fraktionen entsprechenden Banden durch PhosphorImaging (Molecular Dynamics) quantifiziert. Die k_{obs} -Werte wurden durch exponentielle Kurvenanpassung der Messwerte der ungespaltenen Ribozymfraktion während der ersten 3 min bestimmt.

Eingegangen am 15. Mai,
veränderte Fassung am 4. August 2000 [Z15120]

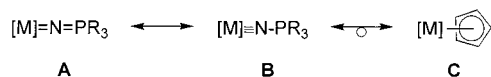
- [1] S. E. Osborne, A. D. Ellington, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 349–370.
- [2] D. S. Wilson, J. W. Szostak, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 611–647.
- [3] M. Famulok, A. Jenne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 320–327.
- [4] D. J. Patel, A. K. Suri, F. Jiang, L. Liang, P. Fan, R. A. Kumar, S. Nonin, *J. Mol. Biol.* **1997**, 272, 645–664.
- [5] T. Hermann, D. J. Patel, *Science* **2000**, 287, 820–825.
- [6] P. Burgstaller, M. Kochoyan, M. Famulok, *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 4769–4776.
- [7] Y. Yang, M. Kochoyan, P. Burgstaller, E. Westhof, M. Famulok, *Science* **1996**, 272, 1343–1347.
- [8] P. Fan, A. K. Suri, R. Fiala, D. Live, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.* **1996**, 258, 480–500.
- [9] F. Jiang, R. A. Kumar, R. A. Jones, D. J. Patel, *Nature* **1996**, 382, 183–186.
- [10] T. Dieckmann, E. Suzuki, G. K. Nakamura, J. Feigon, *RNA* **1996**, 2, 628–640.

- [11] G. R. Zimmerman, R. D. Jenison, C. L. Wick, J.-P. Simorre, A. Paroli, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 644–649.
 [12] J. Tang, R. R. Breaker, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 453–459.
 [13] M. Araki, Y. Okuno, Y. Hara, Y. Sugiura, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3379–3384.
 [14] G. A. Soukup, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3584–3589.
 [15] M. P. Robertson, A. D. Ellington, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 62–66.
 [16] M. Kurz, R. R. Breaker, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1999**, *243*, 137–158.
 [17] G. A. Soukup, R. R. Breaker, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 469–476.
 [18] D. M. Long, O. C. Uhlenbeck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 6977–6981.
 [19] R. C. Cadwell, G. F. Joyce, *PCR Methods Appl.* **1994**, *3*, S136–S140.
 [20] R. C. Cadwell, G. F. Joyce, *PCR Methods Appl.* **1992**, *2*, 28–33.
 [21] M. Famulok, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 324–329.
 [22] D. H. Mathews, J. Sabina, M. Zuker, D. H. Turner, *J. Mol. Biol.* **1999**, *288*, 911–940.
 [23] K. J. Hertel, D. Herschlag, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3374–3385.
 [24] M. Koizumi, G. A. Soukup, J. N. Kerr, R. R. Breaker, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 1062–1071.
 [25] P. J. Unrau, D. P. Bartel, *Nature* **1998**, *395*, 260–263.

Homoleptische Phosphanimato-Komplexe von Seltenerdelementen als Initiatoren für die ringöffnende Polymerisation von Lactonen**

Thorsten Gröb, Gert Seybert, Werner Massa, Frank Weller, Ravi Palaniswami, Andreas Greiner und Kurt Dehnicke*

Phosphanimato-Komplexe von Übergangsmetallen mit der Ligandengruppe NPR_3^- sind als Folge ihrer verschiedenen Bindungsmodi in vielen koordinationschemischen Varianten bekannt.^[1] In Komplexen mit Metallionen in niedrigen Oxidationsstufen (+I, +II) tritt die NPR_3^- -Gruppe als μ_3 -N-Ligand, in mittleren Oxidationsstufen (+III, +IV) bevorzugt als μ_2 -N-Brückenligand und in hohen Oxidationsstufen (+V bis +VIII) ausschließlich als terminaler Ligand auf. In diesem Bindungszustand beobachtet man kurze Metall-Stickstoff-Abstände und lineare oder nahezu gestreckte Achsen M–N–P, die sich mit den Resonanzstrukturen **A** und **B** beschreiben lassen. Die Schreibweise **B** erfordert für die



[*] Prof. Dr. K. Dehnicke, Dr. T. Gröb, Dipl.-Chem. G. Seybert, Prof. Dr. W. Massa, Dr. F. Weller, Dr. R. Palaniswami
 Fachbereich Chemie der Philipps-Universität
 Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg (Deutschland)
 Fax: (+49) 6421-282-8917

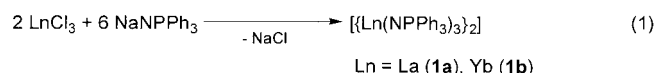
Prof. Dr. A. Greiner
 Institut für Organische Chemie
 Johannes Gutenberg-Universität
 Duesbergweg 10–14, 55099 Mainz (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

$\text{M}=\text{N}$ -Bindung, wie zuerst für Imido-Komplexe (NR^{2-}) abgeleitet wurde,^[2] einen $\sigma, 2\pi$ -Orbitalsatz, der den NPR_3^- -Liganden bei gleicher Ladung als ψ -isolobal mit dem η^5 -Cyclopentadienid(Cp)-Liganden **C** ausweist.^[3] Kürzlich ausgeführte Ab-initio-Rechnungen bestätigen diese Auffassung.^[4]

Nachdem wir den Bindungsmodus **A/B** überraschenderweise auch in den Gemischt-Ligand-Komplexen $[\text{Ln}_2\text{Cp}_3(\text{NPPH}_3)_3]$ ($\text{Ln} = \text{Y}, \text{Dy}, \text{Er}, \text{Yb}$) mit Ln^{3+} angetroffen haben,^[5] bestand Aussicht, auch die homoleptischen Vertreter $[\text{Ln}(\text{NPPH}_3)_3]$ herzustellen und sie mit den ψ -isolobalen Komplexen $[\text{LnCp}_3^*]$ ($\text{Cp}^* = \text{C}_5\text{Me}_5$) zu vergleichen, die als Initiatoren für die ringöffnende Polymerisation (ROP) von Lactonen bekannt sind.^[6–8]

Die Komplexe **1** entstehen in praktisch quantitativen Ausbeuten nach Gleichung (1) aus den Alkalimetall-Phos-



phaniminaten MNPPH_3 ($\text{M} = \text{Na}, \text{K}, \text{Rb}, \text{Cs}$)^[9] und den wasserfreien Metalltrichloriden oder -triflats in THF. Interessant ist, dass nur die Lanthanverbindung als THF-Solvat **1a**·2 THF kristallisiert, während die Ytterbiumverbindung **1b** wegen des im Vergleich mit La^{3+} um 16 pm kleineren Ionenradius des Yb^{3+} -Ions^[10] solvolfrei kristallisiert.

Nach der Kristallstrukturanalyse^[11] hat **1a**·2 THF die in Abbildung 1 wiedergegebene Molekülstruktur, in der die beiden Lanthanatome über die N-Atome zweier NPPH_3^- -Gruppen zu einem nichtebenen La_2N_2 -Vierring mit Butterfly-Anordnung verknüpft sind. Dies ist eine Folge des die beiden La-Atome zusätzlich μ -O-überbrückenden THF-Moleküls,

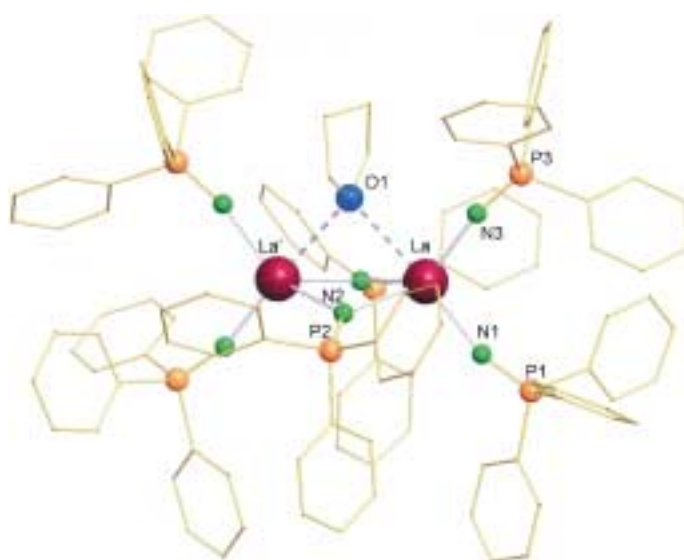


Abbildung 1. Struktur von $[\text{La}(\text{NPPH}_3)_3]_2 \cdot 2 \text{THF}$ (**1a**·2 THF) im Kristall. Ausgewählte Bindungslängen [pm] und -winkel $^\circ$: La–N1 228.3(6), La–N3 231.9(6), La–N2 245.4(7), La–N2A 252.3(7), La–O1 282.5(6); N1–La–O1 174.9(2), N1–La–N3 105.0(3), N1–La–N2 105.7(2), N2–La–N2A 79.9(3), N2–La–N3 120.5(3), N2A–La–N3 130.7(2), La–N1–P1 163.9(4), La–N3–P3 168.1(5).