

Tabelle 2. Berechnete (Gaussian 94, RHF, LANL2DZ) geometrische Parameter und Ladungen (Mulliken) für  $C_6F_5XeZ$ -Moleküle<sup>[a]</sup>.

$C_6F_5XeZ$	Molekül	Sym.	ausgewählte geometrische Parameter <sup>[b]</sup>			ausgewählte Mulliken-Ladungen			
			C(1)-Xe	Xe-Z	C(2)-C(1)-C(6)	Xe	$C_6F_5$	C(1)	Z
$C_6F_5XeF$	<b>1</b>	$C_s$	2.20	2.13	117.7	1.148	-0.415	-1.001	-0.733
$C_6F_5XeC_6F_5$	<b>2</b>	$C_1$	2.34	2.34	117.4	0.980	-0.490	-0.687	-0.490
$C_6F_5XeCN$	<b>3</b>	$C_s$	2.24	2.38	118.1	0.967	-0.403	-0.853	-0.564 <sup>[c]</sup>
Siehe: Lit. [12]									
$C_6F_5Xe \cdots F-AsF_5$		$\simeq C_s$	2.12	2.56	121.3	1.083	-0.134	-1.032	-0.948
$[C_6F_5Xe]^+$		$C_s$	2.16	–	122.7	0.886	0.114	-0.870	–
$FXeF$		$D_{\infty h}$	–	2.03	–	1.306	–	–	-0.653

[a] Z = zweiter Bindungspartner an  $Xe^{II}$ ; [b] In Å bzw. °; [c] Mulliken-Ladung auf C im CN-Liganden: -0.466.

Die Ab-initio-Rechnenergebnisse für **1–3** zeigen folgenden Verlauf der C-Xe-Abstände:  $2 > 3 > 1$ , also umgekehrt zum Verlauf der Mulliken-Ladungen des Liganden Z in  $C_6F_5XeZ$  (Tabelle 2). Der Vergleich der Daten von **1** und  $C_6F_5Xe \cdots FAsF_5$  [12] macht den Unterschied beim Übergang von der asymmetrisch hypervalenten C-Xe-F-Bindung zu einem signifikanten C-Xe  $\cdots$  F-Kontakt deutlich: Die negative Ladung von Z nähert sich -1 während die negative Ladung des  $C_6F_5$ -Restes deutlich abnimmt. Der hohe anionische Charakter des  $C_6F_5$ -Restes in **1–3** ist im Einklang mit den beobachteten Reaktivitäten gegenüber Elektrophilen und erklärt, die gegenüber  $[C_6F_5Xe]^+$  bei tieferen Frequenzen erscheinenden Verschiebungen der p-F-Atome.

### Experimentelles

**1:** Zu einer  $CH_2Cl_2$ -Suspension (1.5 mL) von  $[C_6F_5Xe][AsF_6]$  (131 mg, 0.27 mmol) bei  $-78^\circ C$  in einer 8-mm-FEP-Falle wurde eine gekühlte  $CH_2Cl_2$ -Lösung (1 mL) von  $[NMe_4]F$  (25 mg, 0.27 mmol) gegeben und 2 Tage bei  $-78^\circ C$  gerührt, bis das Fluorid vollständig umgesetzt war. Festes  $[NMe_4][AsF_6]$  wurde abgetrennt und in der verbleibenden Lösung wurde **1** quantitativ bestimmt ( $^{19}F$ -NMR): 0.19 mmol, 70%. Die weiteren Umsetzungen erfolgten in der Regel mit solchen kalten Lösungen von **1**. Durch Abpumpen von  $CH_2Cl_2$  bei  $10^{-2}$  hPa/ $\leq -55^\circ C$  und Nachtrocknen bei  $\leq -40^\circ C$  konnte **1** als farbloser Feststoff erhalten werden, der sich nach Aufwärmen auf  $20^\circ C$  innerhalb von 4 h vollständig zersetzte. In  $CH_2Cl_2$ -Lösung erfolgte eine merkliche Zersetzung ab  $-30^\circ C$  unter Bildung von  $C_6F_5H$  sowie Spuren von  $C_6F_5Cl$ .

**2:** Die auf  $-78^\circ C$  gekühlte  $CH_2Cl_2$ -Lösung (1.5 mL) von **1** (0.08 mmol) wurde mit einer kalten  $CH_2Cl_2$ -Lösung (0.5 mL) von  $Cd(C_6F_5)_2$  (17 mg, 0.04 mmol) versetzt und gerührt. Nach 5 min fiel  $CdF_2$  als Feststoff aus. Nach weiteren 10 min war die Reaktion beendet laut  $^{19}F$ -NMR. Die Mutterlauge wurde abgetrennt und enthält neben 0.06 mmol (75%) **2**, 4  $\mu$ mol  $C_6F_5H$  und 2  $\mu$ mol  $(C_6F_5)_2$ . Die Isolierung von festem **2** erfolgte in der für **1** beschriebenen Weise. **2** zersetzte sich als Feststoff bei RT innerhalb von 1 h und in  $CH_2Cl_2$ -Lösung bei  $-40^\circ C$  innerhalb von 9 h ( $C_6F_5H:(C_6F_5)_2 = 1:0.1$ ).

**3:** Die auf  $-78^\circ C$  gekühlte  $CH_2Cl_2$ -Lösung (1.5 mL) von **1** (0.10 mmol) wurde mit einer kalten  $CH_2Cl_2$ -Lösung (0.5 mL) von  $Me_3SiCN$  (14  $\mu$ L, 0.10 mmol) (bzw. den  $^{13}CN$ - oder  $^{15}N$ -Derivaten) versetzt und gerührt. Nach 5 min hatten sich die Edukte quantitativ umgesetzt ( $^{19}F$ -NMR) und es lag ein 1:1-Gemisch von **3** und  $Me_3SiF$  vor.  $CH_2Cl_2$  und  $Me_3SiF$  wurden bei  $10^{-2}$  hPa/ $\leq -55^\circ C$  abdestilliert und der weiße Feststoff bei  $10^{-2}$  hPa/ $\leq -40^\circ C$  getrocknet. Der Feststoff zersetzte sich während des schnellen Aufheizens auf RT spontan.  $CH_2Cl_2$ -Lösungen von **3** zersetzten sich bei  $-40^\circ C$  innerhalb von 2 h vollständig unter Bildung von  $C_6F_5CN$  und  $C_6F_5H$  (4:1).

Bei der Reinheitskontrolle der kalten Feststoffe nach Auflösen in  $CH_2Cl_2$  bei  $-78^\circ C$  wurden im Falle von **1** und **2** Zersetzungsgrade bis 10% beobachtet, beim thermisch labileren Produkt **3** bis zu 30%.

Eingegangen am 18. August 2000 [Z15656]

- [1] D. Naumann, W. Tyrre, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 47; H.-J. Frohn, S. Jakobs, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 625.
- [2] H.-J. Frohn, V. V. Bardin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1072.
- [3] V. V. Zhdankin, P. J. Stang, N. S. Zefirov, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 578.
- [4] H.-J. Frohn, A. Klose, G. Henkel, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 114; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 99.
- [5] H.-J. Frohn, T. Schroer, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2751; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2554.
- [6] K. Akiba, *Chemistry of Hypervalent Compounds*, Wiley-VCH, New York, **1998**.
- [7] L. Turbini, R. Aikman, R. Lagow, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 5833.
- [8] H.-J. Frohn, M. Theißen, *Abstr. 2P-20 16th Int. Symp. Fluorine Chem.* (Durham, Großbritannien), **2000**.
- [9] H.-J. Frohn, T. Schroer, M. Theißen, *Abstr. B37 12th Europ. Symp. Fluorine Chem.* (Berlin, Deutschland) **1998**; M. Theißen, H.-J. Frohn, *Abstr. 24 8. Dt. Fluortagung* (Schmitt, Deutschland), **1998**; H.-J. Frohn, A. Klose, V. V. Bardin, A. J. Kruppa, T. V. Leshina, *J. Fluorine Chem.* **1995**, 70, 147.
- [10] V. V. Bardin, I. V. Stennikova, G. G. Furin, T. V. Leshina, G. G. Yakobson, *J. Gen. Chem. USSR* **1988**, 58, 2297; A. P. Lothian, C. A. Ramsden, *Synlett* **1993**, 753; H.-J. Frohn, V. V. Bardin, *J. Organomet. Chem.* **1995**, 501, 155.
- [11] K. O. Christe, E. C. Curtis, D. A. Dixon, H. P. Mercier, J. C. P. Sanders, G. J. Schrobilgen, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 3351.
- [12] H.-J. Frohn, A. Klose, T. Schroer, G. Henkel, V. Buß, D. Opitz, R. Vahrenhorst, *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 4884.

## Enantioselektive Ribozymkatalyse einer bimolekularen Cycloadditionsreaktion\*\*

Burckhard Seelig, Sonja Keiper, Friedrich Stuhlmann und Andres Jäschke\*

Die Entwicklung neuer katalytischer Methoden für die regio- und stereoselektive Synthese ist eine zentrale Aufgabe der modernen chemischen Forschung. Verschiedene Strategien haben den Einsatz und die Verbesserung von syn-

[\*] Priv.-Doz. Dr. A. Jäschke, Dr. B. Seelig, S. Keiper, Dr. F. Stuhlmann  
Freie Universität Berlin  
FB Biologie, Chemie und Pharmazie, Institut für Chemie  
Thielallee 63, 14195 Berlin (Deutschland)  
Fax: (+49) 30-8385-5060  
E-mail: jaschke@chemie.fu-berlin.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ja 794/3-1) und das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BEO 0311861) gefördert. Wir bedanken uns bei Dr. S. Klußmann und Dr. S. Vonhoff (Noxxon Pharma AG, Berlin) für die Synthese des L-Ribozyms.

thetischen Verbindungen, Oberflächen und Biomolekülen als stereoselektive Katalysatoren oder synthetische Auxiliare zum Ziel.<sup>[1–4]</sup> Kombinatorische Techniken haben sich zu leistungsfähigen Werkzeugen in der Katalyseforschung entwickelt und erlauben die Isolierung potentieller Katalysatoren aus umfangreichen Bibliotheken entweder durch Screening oder durch iterative Dekonvolution.<sup>[5, 6]</sup>

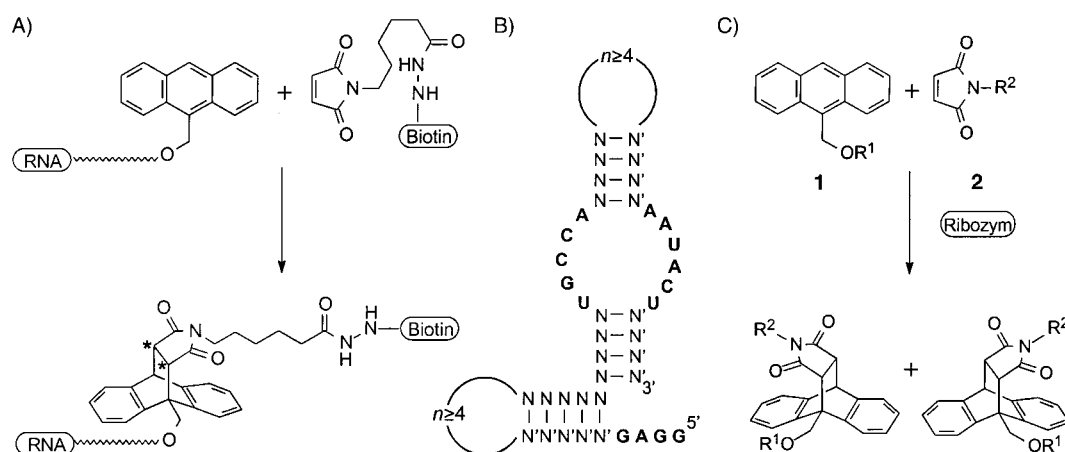
Ribozyme sind RNA-Moleküle mit katalytischen Eigenschaften. Während die Chemie der natürlich vorkommenden Ribozyme auf die Spaltung und Verknüpfung von Internucleotidbindungen beschränkt ist, konnten aus kombinatorischen RNA-Bibliotheken künstliche Ribozyme isoliert werden, die zahlreiche weitere Reaktionen beschleunigen, z. B. Kohlenstoff-Kohlenstoff- und Peptidbindungsknüpfungen.<sup>[7–10]</sup> Diese Ribozyme verhalten sich jedoch anders als typische chemische Katalysatoren oder Proteinenzyme, da bei ihnen mindestens einer der Reaktanten entweder ein RNA-Molekül sein muss oder kovalent an ein solches gekoppelt sein muss. Mit Ausnahme der ribozymkatalysierten Bildung von Dinucleotiden aus aktivierten Mononucleotiden<sup>[11]</sup> gibt es kein Beispiel für Ribozyme, die Bindungsknüpfungen zwischen zwei kleinen organischen Substraten beschleunigen können. Solche Verknüpfungen stellen einen zentralen Reaktionstyp in der organischen Synthese sowie die Grundlage aller anabolen biochemischen Stoffwechselwege dar. Auch ist bisher noch keine enantioselektive Bindungsknüpfung durch Ribozyme beschrieben worden, obwohl RNA-Moleküle beim Binden von Zielmolekülen außerordentlich gut zwischen Enantiomeren unterscheiden können.<sup>[12, 13]</sup>

Die Diels-Alder-Reaktion gehört zu den wichtigsten Reaktionen zur Bildung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen. Bei der Reaktion werden zwei Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen und maximal vier neue Stereozentren generiert. Es besteht derzeit großes Interesse an der Entwicklung katalytischer Methoden zur Erhöhung der Geschwindigkeit und Selektivität der Diels-Alder-Reaktion, da ihr präparativer Wert stark vom Grad der möglichen Stereokontrolle abhängt.<sup>[14–16]</sup>

Wir haben kürzlich die Isolierung von Diels-Alderase-Ribozymen aus einer kombinatorischen RNA-Bibliothek beschrieben, die die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungsknüpfung zwischen Anthracen, welches kovalent an das Ribozym gebunden ist, und einem biotinylierten Maleimid bis zu 20000-fach beschleunigen (Schema 1 A).<sup>[17]</sup> 90 % der aktiven Sequenzen enthielten ein kleines gemeinsames Strukturmotiv (Schema 1 B). Ein synthetisches 49-mer-Oligoribonucleotid, welches alle Elemente dieses Motivs enthält, ist katalytisch aktiv gegenüber einem kovalent gebundenen Anthracen. Hier berichten wir über den Einsatz von Diels-Alderase-Ribozymen als echten Katalysatoren gegenüber zwei kleinen, frei in Lösung befindlichen organischen Substratmolekülen (Schema 1 C).

Die Reaktion verschiedener Anthracenderivate mit Biotinmaleimid wurde UV-spektroskopisch in Abwesenheit und Gegenwart des 49-mer-Ribozyms in wässrigem Puffer untersucht. Es stellte sich heraus, dass eine kovalente Anknüpfung des Anthracens an die RNA nicht notwendig ist. 9-(Hydroxymethyl)anthracen **1a** ( $R^1 = H$ ) ist das kleinste Dien, das effektiv in das entsprechende Diels-Alder-Produkt umgewandelt wird (Schema 1 C). Die Analyse einer Serie von Fragmenten und Analoga des Biotinmaleimids ergab, dass der Biotinylrest mit nur geringem Aktivitätsverlust entfernt werden kann (Tabelle 1). Die Maleimidylgruppe in Kombination mit einer Alkylkette scheint das strukturelle Merkmal für die Erkennung durch das 49-mer-Minimalribozym zu sein. Selbst so kleine Maleimide wie *N*-Ethylmaleimid wurden als Substrate akzeptiert. Die größte Reaktionsbeschleunigung wurde für *N*-Pentylmaleimid gemessen, welches signifikant schneller als das Biotinmaleimid reagierte. Das 49-mer-Ribozym katalysiert somit eine Bindungsknüpfung zwischen zwei kleinen organischen Molekülen.

Die Kinetik der ribozymkatalysierten Reaktionen wurde durch Messung der Differenz der Anfangsgeschwindigkeiten der katalysierten und der unkatalysierten Reaktion bestimmt. Aus Gründen der Löslichkeit wurden für diese Messungen das Anthracen-Hexaethylenglykol **1** ( $R^1 = (C_2H_4O)_6H$ ) und



Schema 1. RNA-katalysierte Diels-Alder-Reaktionen. A) Bereits beschriebene selektierte Ribozyme beschleunigen die Reaktion eines kovalent an RNA geknüpften Anthracens mit Biotinmaleimid.<sup>[17]</sup> B) Minimalmotiv, das in den meisten selektierten Diels-Alderase-Ribozymen vorkommt. Anthracen war während der in (A) gezeigten Experimente über das 5'-Ende mit dem Ribozym verbunden, während es in (C) als freies Molekül vorlag. N = beliebiges Nucleotid, N' = zu N komplementäres Nucleotid. C) Ribozymkatalysierte bimolekulare Diels-Alder-Reaktion von **1** und **2**. R<sup>1</sup> ist entweder H (**1a**) oder  $(C_2H_4O)_6H$  (**1b**), für R<sup>2</sup> siehe Tabelle 1 und Abbildung 2.

Tabelle 1. Relative Geschwindigkeitskonstanten der ribozymkatalysierten Diels-Alder-Reaktion von **1a** mit verschiedenen Maleimiden.<sup>[a]</sup>

Verbindung	$k_{\text{rel}}$
	1.0
	0.7
	0.7
	0.8
	1.6
	0.7
	0.1
	< 0.1
	0

[a] Reaktionsbedingungen: 100  $\mu\text{M}$  **1a**, 500  $\mu\text{M}$  Maleimid, 7  $\mu\text{M}$  49-mer-Ribozym in folgendem Puffer: 300 mM NaCl, 80 mM  $\text{MgCl}_2$ , 30 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10-proz. Ethanol. Die Reaktionslösung wurde in eine 7- $\mu\text{L}$ -Küvette mit 1 cm Weglänge gefüllt und das Verschwinden der Anthracenbande bei 365 nm beobachtet. Siehe Abbildung 2 für die Sequenz der 49-mer-RNA.<sup>[24]</sup>

Maleimidocaprinsäure **2** ( $\text{R}^2 = (\text{CH}_2)_5\text{COOH}$ ) verwendet. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden aus der Abnahme der Anthracenabsorption bei 365 nm über ~5% Umsatz bestimmt. Die Katalyse wurde als vollkommen zufälliges Zweireaktantensystem (Random Bi-Uni) betrachtet.

Die Anfangsgeschwindigkeit der katalysierten Reaktion war proportional zur Ribozymkonzentration, es wurde Sättigungskinetik bezüglich beider Substrate festgestellt (Abbildung 1 A). Die doppelt reziproke Sekundärauftragung (Abbildung 1 B) ergibt die Michaelis-Konstanten von 370  $\mu\text{M}$  für das Dien und 8 mM für das Dienophil. Die berechnete Maximalgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  beträgt

150  $\mu\text{M min}^{-1}$ , entsprechend einem  $k_{\text{kat}}$  von 21  $\text{min}^{-1}$  ( $[\text{Ribozym}] = 7 \mu\text{M}$ ). Unter nicht gesättigten Bedingungen von 415  $\mu\text{M}$  Dien und 4 mM Dienophil lag die größte direkt gemessene Anfangsgeschwindigkeit bei 43  $\mu\text{M min}^{-1}$  (Abbildung 1 A), was sechs Umsetzungen pro Katalysatormolekül und Minute entspricht. Die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung für die Hintergrundreaktion,  $k_{\text{unkat}}$ , beträgt 3.2  $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ . Ein Maß für den Entropiegewinn dieser ribozymkatalysierten Reaktion kann aus dem Verhältnis  $k_{\text{kat}}/k_{\text{unkat}}$  abgeschätzt werden: Hier beträgt die „effektive Molarität“ 6.6 M, und das Verhältnis  $(k_{\text{kat}}/K_{\text{m,Dienophil}})/k_{\text{unkat}}$  ergibt eine 1100-fache Reaktionsbeschleunigung als unteren Grenzwert.<sup>[15]</sup>

Das Ribozym arbeitet demnach als echtes Enzym mit schnellem, mehrfachem Turnover. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen<sup>[17]</sup> konnte eine Rückreaktion nicht detektiert werden, was auf einen irreversiblen chemischen Reaktionsschritt hinweist. Die Zugabe des Diels-Alder-Produktes hemmt jedoch die Hinreaktion und deutet so auf eine Konkurrenz des Produktes mit den Substraten um dieselben Bindungsstellen hin. Der Inhibitionsmodus wird derzeit untersucht.

Im Verlauf der Reaktion können zwei Produktenantimere erzeugt werden (Schema 1 C). RNA ist ein homochirales Polymer und sollte deshalb nicht nur die Reaktion beschleunigen, sondern auch die Enantiomerenverteilung beeinflussen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden die Reaktionsprodukte ( $\text{R}^1 = (\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_6\text{-H}$ ,  $\text{R}^2 = (\text{CH}_2)_5\text{COOCH}_3$ ) mittels HPLC an einer chiralen stationären Phase analysiert (Abbildung 2). Die beiden Produktenantimere wurden nach 94 min und 102 min eluiert, was durch Referenzverbindungen, die nach Standardvorschriften synthetisiert wurden, bestätigt wurde. Die unkatalysierte Reaktion ergibt erwartungsgemäß ein racemisches Gemisch, während die durch das 49-mer-Minimalribozym katalysierte Reaktion zwei Verbindungen im Verhältnis 20:1 hervorbrachte, was einem Enantiomerenüberschuss (*ee*) von 90% entspricht. Nach der Korrektur der Peakflächen um die

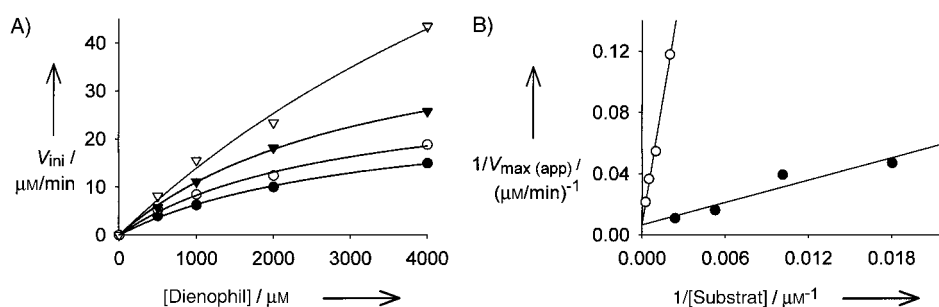


Abbildung 1. Kinetik der ribozymkatalysierten Reaktion von **1b** mit Maleimidocaprinsäure **2** ( $\text{R}^2 = (\text{CH}_2)_5\text{COOH}$ ). A) Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Dienophils bei konstanten Konzentrationen des Diens von  $\bullet$  55,  $\circ$  99,  $\blacktriangledown$  190 und  $\nabla$  415  $\mu\text{M}$ . Mit Ausnahme der Konzentrationen von Ethanol (0%) und DMSO (2%) sind alle Bedingungen wie in Tabelle 1. Anfangsgeschwindigkeiten ( $V_{\text{ini}}$ ) wurden aus dem Verschwinden der UV-Absorption während der ersten 5% Umsatz durch nichtlineare Regression der Kurve errechnet. Die scheinbare maximale Geschwindigkeit  $V_{\text{max (app)}}$  wurde als Schnittpunkt mit der y-Achse aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm ( $1/V_{\text{ini}}$  gegen  $1/[\text{Dienophil}]$ ) erhalten. Die gleiche Bestimmung wurde für variable Dienkonzentrationen bei festgelegten Konzentrationen des Dienophils durchgeführt. B) Auftragung der scheinbaren maximalen Geschwindigkeit gegen die Konzentration des konstant gehaltenen Substrats ( $\bullet$  Dien,  $\circ$  Dienophil), um die tatsächlichen  $V_{\text{max}}$ -Werte als Schnittpunkte mit der y-Achse und die Michaelis-Konstanten ( $K_{\text{m}}$ ) als Schnittpunkte mit der negativen x-Achse zu erhalten.<sup>[25]</sup>

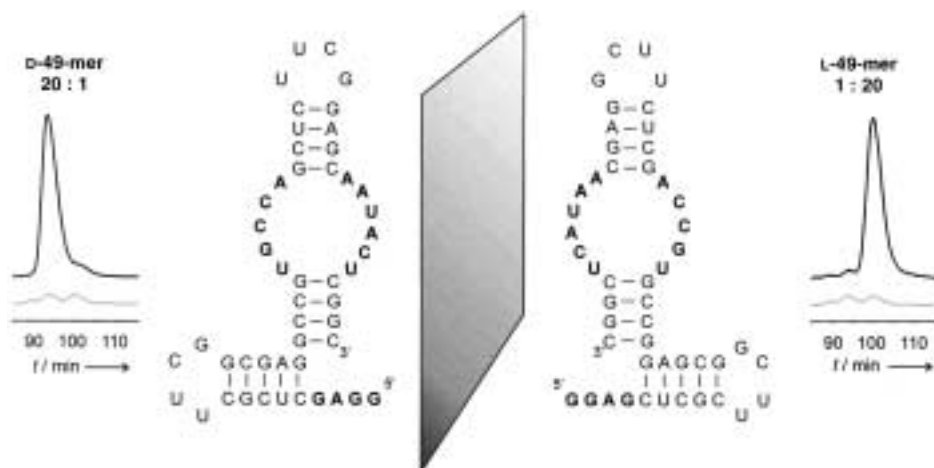


Abbildung 2. HPL-Chromatogramme von Diels-Alder-Reaktionen, die durch 49-mer-D-RNA und die enantiomere 49-mer-L-RNA katalysiert wurden. Unter den gleichen Bedingungen wie in Tabelle 1 wurde 1 mM **1b**, 1.5 mM **2** ( $R^2 = (CH_2)_5COOCH_3$ ) und 80  $\mu$ M Ribozym 6 Minuten umgesetzt. Die Proben wurden auf eine Chiral-NEA-(R)-Säule (YMC Europe 250  $\times$  4.6 mm) gegeben und mit Wasser/Ethanol 65:35 isokratisch bei 0.8 mL  $min^{-1}$  mit UV-Detektion bei 210 nm analysiert. Die untere Linie in den Chromatogrammen stellt die unkatalysierte Hintergrundreaktion dar.

unkatalysierte Hintergrundreaktion erhält man einen *ee*-Wert von über 95 %. Beide Verbindungen haben das berechnete Molekulargewicht (bestätigt durch ESI-MS) und identische UV-Spektren, während sich die CD-Spektren invers verhalten.

Wenn ein homochiraler Katalysator eine Bindungsknüpfung enantioselektiv beschleunigt, sollte entsprechend das andere Enantiomer des Katalysatormoleküls die entgegengesetzte Enantioselektivität zeigen. Während ähnliche Experimente mit RNA-Aptameren reziproke Bindungsspezifitäten der entsprechenden D- und L-Nucleinsäuren ergaben,<sup>[18, 19]</sup> gibt es bis heute kein Beispiel für eine katalytisch aktive L-Nucleinsäure. Erwartungsgemäß zeigte ein synthetisches 49-mer, welches aus L-Nucleotiden aufgebaut ist – ein spiegelbildliches Ribozym – nicht nur die gleiche Reaktionsbeschleunigung, sondern auch das umgekehrte Produktverhältnis (1:20) wie das natürliche 49-mer-D-Ribozym (Abbildung 2).

Der Substituent in der 9-Position des Diens **1** beeinflusst entscheidend die Enantioselektivität der ribozymkatalysierten Reaktion. Wenn  $R^1$  zu  $C_2H_4OH$  verkürzt wird, sinkt die Enantioselektivität auf 33 % *ee*, und die Produkte der Reaktion mit 9-(Hydroxymethyl)anthracen **1a** werden mit lediglich 16 % *ee* erhalten. Variationen des Substituenten am Maleimid,  $R^2$ , rufen dagegen weniger starke Änderungen der Enantioselektivität hervor.

Es gibt noch keine Hinweise auf den Mechanismus der ribozymkatalysierten Diels-Alder-Reaktion. Nach allgemeiner Auffassung findet in einer Diels-Alder-Reaktion die Bindungsknüpfung durch konzertiertes Vermischen des höchsten besetzten Molekülorbitals (HOMO) des Diens und der niedrigsten unbesetzten Molekülorbitals (LUMO) des Dienophils statt.<sup>[20]</sup> Die Mehrzahl der niedermolekularen (Lewis-Säure-)Katalysatoren wirkt durch die Koordination an das Dienophil, wobei sie durch den Abzug von Elektronendichte die Energie seines LUMO absenken.<sup>[14, 16]</sup> Bei antikörperkatalysierten Diels-Alder-Reaktionen wurden sowohl

die Bindung der Reaktanten in einer reaktiven Konformation als auch die Senkung der LUMO-Energie des Dienophils durch Wasserstoffbrückenbindung an dessen Carbonylsauerstoffatom diskutiert.<sup>[21, 22]</sup> Es ist denkbar, dass ähnliche Mechanismen auch an der Ribozymkatalyse beteiligt sind. In jüngsten Mutationsstudien wurden konservierte Nucleotide in den formal einzelsträngigen Regionen des Ribozyms identifiziert (siehe Schema 1B); dies weist auf eine Beteiligung an der Ausprägung einer katalytischen Tasche hin. Experimente zur chemischen Grundlage der Katalyse und zum Ursprung der Stereoselektivität werden zurzeit mit einer Vielzahl von Dienen, Dienophi-

len und Produktanaloga durchgeführt.

Unsere Ergebnisse zeigen erstmals, dass Ribozyme zwei kleine organische Moleküle erkennen, zur Reaktion bringen, die Produkte abdissoziieren und diesen Zyklus einige Male wiederholen können. Ein weiteres Charakteristikum natürlicher Enzyme wurde zum ersten Mal nachgewiesen: enantioselektive Bindungsknüpfung.

Demnach können selektive Katalysatoren für präparativ relevante Reaktionen durch In-vitro-Selektion aus kombinatorischen Nucleinsäurebibliotheken generiert werden. Gegenüber klassischen chemischen Katalysatoren bieten sie die Vorteile, dass ihre Entwicklung weder Vorkenntnisse über strukturelle Voraussetzungen oder Reaktionsmechanismen noch arbeitsaufwendige „Trial-and-Error“-Synthesen erfordert. Das iterative Verfahren der In-vitro-Selektion, bei der aktive Verbindungen zuerst angereichert und später vereinzelt werden,<sup>[17]</sup> erlaubt die Handhabung von bis zu  $10^{16}$  verschiedenen Verbindungen in einem einzigen Reaktionsgefäß, einer Größenordnung, die weit über den Kapazitäten des Hochdurchsatz-Screenings liegt. Darüber hinaus ist es möglich, über den angelegten Selektionsdruck eine Feinabstimmung der Eigenschaften des Katalysators vorzunehmen.

Die hier beschriebenen Reaktionsbeschleunigungen und Enantioselektivitäten von über 95 % *ee* sind vergleichbar mit denen katalytischer Antikörper für Cycloadditionen. Die hier beschriebenen Ribozyme sind jedoch viel kleiner (Molekulargewicht von 16000) und – was von großer praktischer Bedeutung ist – zugänglich für die präparative chemische oder enzymatische Synthese bei vertretbaren Kosten. Daher könnten in vitro selektierte Oligonucleotide Verwendung als maßgeschneiderte Katalysatoren in der organischen Synthese finden.<sup>[23]</sup>

Die enantioselektive Bindungsknüpfung ist von breitem Interesse über die Synthesechemie hinaus. Die meisten biochemischen Reaktionen verlaufen stereokontrolliert, und die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass der Grad der Stereokontrolle, der von einem Ribozym erreicht werden

kann, vergleichbar mit dem von Proteinenzymen ist. Dies demonstriert auch, wie in einer hypothetischen „RNA-Welt“ Ribozyme den stereochemischen Verlauf von chemischen Reaktionen gesteuert haben könnten.

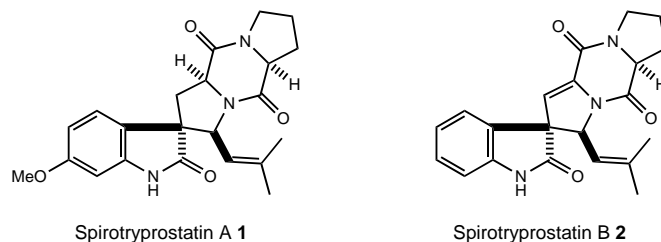
Eingegangen am 18. September 2000 [Z15830]

- [1] E. J. Corey, A. Guzman-Perez, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 402; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 388.
- [2] M. Ortega Lorenzo, C. J. Baddeley, C. Muryn, R. Raval, *Nature* **2000**, *404*, 376.
- [3] S. C. Sinha, C. F. Barbas III, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 14603.
- [4] K.-E. Jaeger, M. T. Reetz, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 68.
- [5] A. Jäschke, B. Seelig, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 257.
- [6] M. T. Reetz, M. H. Becker, H.-W. Klein, D. Stöckigt, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1872; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1758.
- [7] B. Zhang, T. R. Cech, *Nature* **1997**, *390*, 96.
- [8] P. J. Unrau, D. P. Bartel, *Nature* **1998**, *395*, 260.
- [9] T. M. Tarasow, S. L. Tarasow, B. E. Eaton, *Nature* **1997**, *389*, 54.
- [10] C. Wilson, J. W. Szostak, *Nature* **1995**, *374*, 777.
- [11] F. Huang, Z. Yang, M. Yarus, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 669.
- [12] B. J. Hicke, E. L. Christian, M. Yarus, *EMBO J.* **1989**, *8*, 3843.
- [13] A. Geiger, P. Burgstaller, H. von der Eltz, A. Roeder, M. Famulok, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1029.
- [14] U. Pindur, G. Lutz, C. Otto, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 741.
- [15] V. E. Gouverneur, K. N. Houk, B. de Pascual-Teresa, B. Beno, K. D. Janda, R. A. Lerner, *Science* **1993**, *262*, 204.
- [16] T. M. Tarasow, B. E. Eaton, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *55*, 1463.
- [17] B. Seelig, A. Jäschke, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 167.
- [18] S. Klußmann, A. Nolte, R. Bald, V. A. Erdmann, J. P. Fürste, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1112.
- [19] K. P. Williams, X. H. Liu, T. N. Schumacher, H. Y. Lin, D. A. Ausiello, P. S. Kim, D. P. Bartel, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 11285.
- [20] J. Sauer, R. Sustmann, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 773; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 779.
- [21] A. Heine, E. A. Stura, J. T. Yli-Kauhaluoma, C. Gao, Q. Deng, B. R. Beno, K. N. Houk, K. D. Janda, I. A. Wilson, *Science* **1998**, *279*, 1934.
- [22] F. E. Romesberg, B. Spiller, P. G. Schultz, R. C. Stevens, *Science* **1998**, *279*, 1929.
- [23] A. Jäschke, C. Frauendorf, F. Hausch, *Synlett* **1999**, 825.
- [24] Im Falle des Biotinmaleimids wurden aus Löslichkeitsgründen 2% DMSO zugesetzt.
- [25] Die Gleichungen für die Sekundärauftragungen sind  $y = 2.4309x + 0.0066$  ( $R^2 = 0.903$ ) für das Dien und  $y = 54.539x + 0.0066$  ( $R^2 = 0.990$ ) für das Dienophil. Die Standardabweichungen für den Schnittpunkt mit der y-Achse waren trotz der recht guten Regressionskoeffizienten von der gleichen Größenordnung wie die Messwerte ( $\pm 0.0060$  bzw.  $\pm 0.0045$ ), womit die Korrektheit der Werte für  $V_{\max}$  (1/Schnittpunkt mit der y-Achse) und  $K_m$  (–Steigung/Schnittpunkt mit der y-Achse) in Frage gestellt wird. Zur rechnerischen Überprüfung der erhaltenen kinetischen Konstanten haben wir zusätzlich eine direkte nichtlineare Regression der Daten aus Abbildung 1a nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate durchgeführt. Dies erfolgte unter Annahme eines vollkommen zufälligen Zweireaktantensystems (Random Bi-Uni-Mechanismus) und ergab für  $V_{\max}$   $140 \pm 25 \mu\text{min}^{-1}$ , für  $K_{m,\text{Dien}}$   $200 \pm 35 \mu\text{M}$  und für  $K_{m,\text{Dienophil}}$   $5.2 \pm 1.3 \text{ mM}$  mit einem Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0.980$ .

## Totalsynthese von (–)-Spirotryprostatin B und drei Stereoisomeren\*\*

Larry E. Overman\* und Mark D. Rosen

Niedermolekulare Naturstoffe spielen in gegenwärtigen Untersuchungen zum Verständnis und zur Kontrolle der zellulären Proliferation eine wichtige Rolle.<sup>[1]</sup> Osada und Mitarbeiter haben kürzlich in der Fermentationsmischung des Pilzes *Aspergillus fumigatus* eine Gruppe neuartiger Diketopiperazin-Alkaloide identifiziert, welche in mikromolaren Konzentrationen die Entwicklung der G2/M-Phase des Zellzyklus von Säugetieren inhibieren.<sup>[2,3]</sup> Die Spirotryprostatine A **1** und B **2** sind die komplexesten Vertreter dieser Alkaloide,<sup>[2]</sup> die biosynthetisch alle auf die Prenylierung von Diketopiperazinen, abgeleitet von Tryptophan und Prolin, zurückzuführen sind.



Die ungewöhnlichen Strukturen und ihr potentieller Nutzen als Zellzyklusinhibitoren machen die Spirotryprostatine zu attraktiven Zielverbindungen für eine Totalsynthese. Eine zentrale Herausforderung eines stereokontrollierten Synthesepfades ist, die Konfiguration des quartären Spiro-Kohlenstoffatoms mit dem benachbarten Stereozentrum, das die 2-Methylpropenyl-Seitenkette trägt, zu korrelieren. Edmondson und Danishefsky berichteten 1998 über die Totalsynthese von Spirotryprostatin A **1** und damit über die erste Totalsynthese einer Verbindung dieser Klasse.<sup>[4]</sup> Dieses Jahr haben die Arbeitsgruppen von Williams,<sup>[5]</sup> Danishefsky<sup>[6]</sup> und Ganeshan<sup>[7]</sup> die ersten Totalsynthesen von (–)-Spirotryprostatin B **2** abgeschlossen.

Unser Synthesepfad für Spirotryprostatin B **2** und verwandte Verbindungen unterscheidet sich deutlich von den vorherigen Synthesen (Schema 1). Die Strategie basiert auf

[\*] Prof. L. E. Overman, M. D. Rosen

Department of Chemistry, University of California, Irvine  
516 Rowland Hall, Irvine, CA 92697-2025 (USA)  
Fax: (+1) 949-824-3866  
E-mail: leoverma@uci.edu

[\*\*] Wir danken dem NIH NIGMS (GM-30859) für die finanzielle Unterstützung, Prof. A. J. Shaka und N. D. Taylor für die DPGFGE Experimente, Prof. H. Osada für die zur Verfügung gestellten spektroskopischen Daten von natürlichem **1** und Prof. R. M. Williams und P. R. Sebahar für die zur Verfügung gestellten spektroskopischen Daten sowie einer Probe von synthetischem *ent*-**21**. Ebenso sind wir Prof. R. M. Williams und Prof. S. J. Danishefsky für den offenen Informationsaustausch vor der Veröffentlichung dankbar. Die verwendeten NMR- und Massenspektrometer wurden durch die NSF und die NIM finanziert.



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