

Prolinmodifizierte DNA als Katalysator der Aldolreaktion**

Zhuo Tang und Andreas Marx*

Professor Peter Welzel zum 70. Geburtstag gewidmet

Die DNA-gesteuerte Synthese hat sich als eine wirksame Methode zur Kontrolle der Reaktivität von Reaktanten bewährt, wobei der Ansatz der Natur, die effektive Molarität zu erhöhen, nachgeahmt wird.^[1] Durch Ausnutzung der DNA-eigenen Fähigkeit, komplementäre Stränge miteinander zu paaren, können daran gebundene niedermolekulare Reaktanten in räumliche Nähe gebracht werden, um somit deren effektive Molarität zu erhöhen und chemische Reaktionen zu beschleunigen. Mehrere Anwendungen sind aus diesem Ansatz hervorgegangen, z.B. zum Auffinden von neuen Substanzen aus synthetischen Bibliotheken, zur Entdeckung neuer Reaktionen und zur Nucleinsäure-Diagnostik.^[1,2] Zusätzlich dienen diese Arten von Reaktionen als Modelle, um die Wirkung von Nucleinsäuren als Katalysatoren chemischer Reaktionen und damit ihre Rolle in der Entstehung von Leben auf der Erde aufzuzeigen.^[3,4]

Alle erwähnten Ansätze haben gemeinsam, dass zwei Reaktanten kovalent an DNA- oder PNA-Stränge gebunden werden, um anschließend durch Selbsthybridisierung oder Anlagerung an einen dritten Nucleinsäurestrang miteinander zu reagieren. Dieses Konzept führt in den meisten Fällen zu einer kovalenten Verknüpfung der beiden modifizierten Oligonucleotide, wozu es nur wenige Ausnahmen gibt.^[1,2,5] Analog dazu wurde über eine DNA-gesteuerte Esterhydrolyse durch einen Cu^{II}-Katalysator und über eine DNA-gesteuerte Staudinger-Verknüpfung berichtet.^[5e,f] In diesen Fällen reagierte ein nichtgebundenes Reagens (Wasser) mit einem DNA-gebundenen Reagens durch DNA-Hybridisierung. Unsere Absicht war es, die Anwendungsmöglichkeiten der DNA-gesteuerten Synthese zu erweitern, um nichtgebundene Reagentien verwenden zu können. Wir berichten hier über einen neuen Ansatz unter Anwendung der gekreuzten Aldolreaktion eines DNA-gebundenen Aldehyds mit freien, nichtgebundenen Ketonen. Unser Ansatz beruht auf der kovalenten Anknüpfung eines Katalysators an ein Oligonucleotid, das zu einer DNA-gebundenen Aldehyd-Komponente komplementär ist.

Seit einigen Jahren findet das Gebiet der Organokatalyse ein großes Interesse.^[6] Für zahlreiche kleine organische Mo-

leküle wurden bemerkenswerte katalytische Selektivitäten und effiziente Transformationen nachgewiesen. Zu den wichtigsten Komponenten der Organokatalyse zählen Prolin und seine Derivate, die außergewöhnliche Katalyseigenschaften zeigten, z.B. die Katalyse der Aldolreaktion über ein Enamin-Intermediat. Wir vermuteten, dass ein DNA-gebundenes Prolin als Katalysator für eine gekreuzte Aldolreaktion zwischen einem weiteren, an eine komplementäre DNA gebundenem Aldehyd und einem freien Keton dienen könnte. Zu beachten ist, dass die für DNA-Umsetzungen notwendigen wässrigen Reaktionsbedingungen immer noch als problematisch für die Organokatalyse gelten.^[8] Es gibt bereits zwei Berichte über DNA-gesteuerte Aldolreaktionen,^[4,9] allerdings unterscheidet sich unser Ansatz konzeptionell durch die kovalente Verknüpfung des Katalysators und einen Reaktionspartner, der nicht DNA-gebunden ist.

Zunächst synthetisierten wir das Oligonucleotid-Templat **1**, das an seinem 3'-Ende einen konjugierten Aldehyd trägt, und einen dazu komplementären Strang **2**, der ein Prolin an seinem 5'-Terminus gebunden hat (Abbildung 1).^[10] Im Anschluss testeten wir – zunächst in wässrigem Puffer bei pH 7.2 – die Fähigkeit des Prolinamids **2**, die Reaktion zwischen Aceton und **1** zu katalysieren. Die Reaktionen wurden durch denaturierende HPLC^[11] bei 50 °C analysiert, um die notwendigen Reaktionsschritte zu unterscheiden.

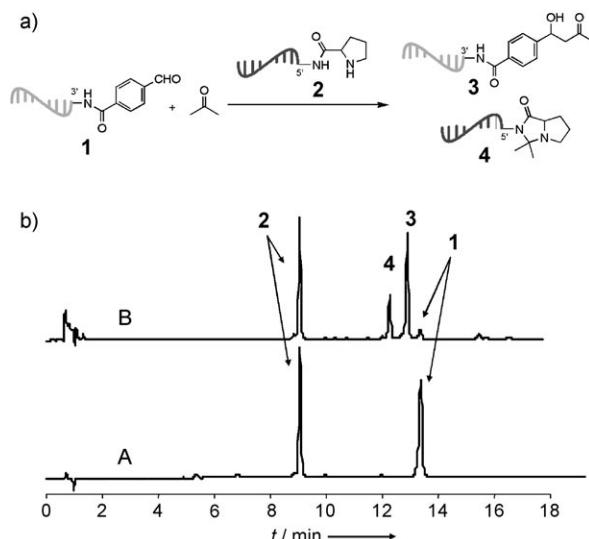


Abbildung 1. a) Durch das Prolinamid **2** katalysierte DNA-gesteuerte gekreuzte Aldolreaktion. b) A) HPLC-Analyse des Reaktionsgemisches von **1** und **2** in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7.2) ohne Zusatz von Aceton. B) HPLC-Analyse der durch **2** katalysierten Reaktion zwischen **1** und Aceton nach 4 Stunden in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7.2) bei 25 °C. Phosphatpuffer: Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; die Reaktion wurde in wässrigem Puffer/Aceton (v/v 4:1) durchgeführt.

[*] Dr. Z. Tang, Prof. Dr. A. Marx

Fachbereich Chemie, Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
Fax: (+49) 7531-88-5140
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de

[**] Z.T. dankt der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für ein Forschungsstipendium.

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

wendige Trennleistung zu erreichen. Die erhaltenen Signale wurden durch ESI-MS-Analyse den entsprechenden Verbindungen zugewiesen.^[10] Wir erhielten das gewünschte Produkt einer gekreuzten Aldolreaktion zwischen dem DNA-gebundenen Aldehyd **1** und Aceton in hohen Ausbeuten (Abbildung 1). Das Verschwinden des Signals von **1** sowie die Bildung von zwei neuen Verbindungen wurde beobachtet. Eine wurde durch ESI-MS als das gewünschte Reaktionsprodukt **3** identifiziert. Das Nebenprodukt wird als **4** gedeutet, dessen Bildung durch eine Kondensation von **2** mit Aceton erklärt werden kann.^[12]

Im weiteren Verlauf der Studie optimierten wir die Reaktionsbedingungen und fanden heraus, dass ein 200 mM Phosphatpuffer mit pH 7.0–8.0 am besten geeignet ist. Um zu bestätigen, dass die beobachteten Ergebnisse tatsächlich durch eine Prolin-abhängige Katalyse verursacht wurden, untersuchten wir die Bildung von **3** unter Zugabe unterschiedlicher Oligonucleotide in einem zeitabhängigen Experiment (Abbildung 2, Tabelle 1). Wenn ein unmodifiziertes

Oligonucleotid **5** verwendet wurde, das komplementär zu **1** war, so war das gewünschte Reaktionsprodukt nach 24 h unterhalb der Detektionsgrenze (Tabelle 1, Experiment 1). Interessanterweise katalysierte auch ein DNA-gebundenes primäres Amin **6** die gekreuzte Aldolreaktion mit einer Ausbeute von 40% nach 24 h (Experiment 2). Dennoch bleibt festzuhalten, dass die Prolin-modifizierte DNA **2** bereits nach 4 h 92% an **3** erzielte (Abbildung 2 und Tabelle 1, Experiment 3), was auf eine wesentlich niedrigere Effizienz von **6** bei der Katalyse der Reaktion hinweist. Ein Vergleich der anfänglichen Umsatzgeschwindigkeiten macht deutlich, dass die Reaktion durch **2** ($243 \times 10^{-11} \text{ Ms}^{-1}$) rund 170fach schneller als durch **6** ($1.43 \times 10^{-11} \text{ Ms}^{-1}$) katalysiert wird.^[10] Sogar 10faches Verdünnen der Reaktanten **1** und **2** ergab die gleiche Ausbeute (Experiment 4). Wenn das Nebenprodukt **4** zur Katalyse eingesetzt wurde (Experiment 5), konnte eine nur sehr geringe Effizienz beobachtet werden. Im Unterschied zur hohen Wirksamkeit des Oligonucleotid-Konjugats **2** erwies sich nichtkonjugiertes Prolinamid als schlechter Katalysator dieser Reaktion (Tabelle 1, Experimente 6 und 7).

Als nächstes untersuchten wir die Bandbreite der Reaktion. Wir fanden, dass DMSO das beste Zusatzlösungsmittel für wasserunlösliche Ketone ist. Mittlere bis hohe Ausbeuten wurden bei der Verwendung von DNA-gebundenem Prolinamid **2** für die Katalyse der Reaktion von Oligonucleotid **1** mit unterschiedlichen Ketonen gefunden (Abbildung 3).

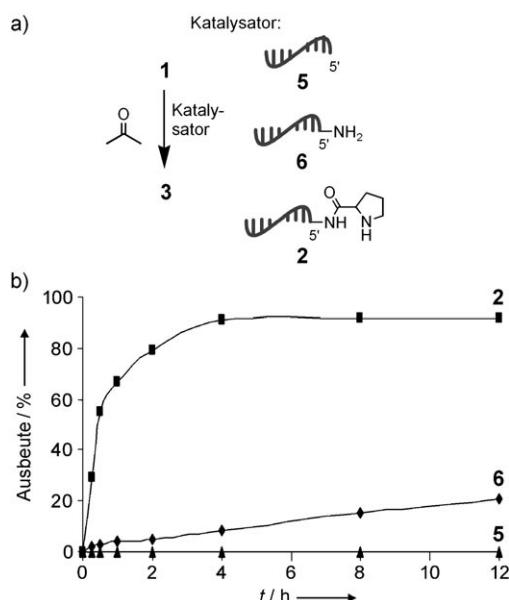


Abbildung 2. a) Katalyse einer gekreuzten Aldolreaktion durch unterschiedliche DNA-Konstrukte. b) Zeitabhängige Bildung der mit unterschiedlichen DNA-Konstrukten erhaltenen Reaktionsprodukte.

Tabelle 1: Gekreuzte Aldolreaktion mit unterschiedlichen Katalysatoren.

Nr.	Katalysator ^[a]	t [h]	Ausb. 3 [%]
1	5	24	< 5
2	6	24	40
3	2	4	92
4	2 ^[b]	4	92
5	4	24	< 5
6	Prolinamid ^[c]	4	6
7	Prolinamid ^[d]	4	15

[a] Bedingungen: Die Konzentration der Oligonucleotide war 3.0 μM in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7.2), und das Verhältnis wässriger Puffer/Aceton betrug 5:1 (v/v). Die Reaktionen wurden bei 25°C inkubiert. [b] Die Konzentration der Oligonucleotide war 0.3 μM . [c] Die Konzentration des Prolinamids war 0.3 mM. [d] Die Konzentration des Prolinamids war 3.0 mM.

Folglich können unter Einsatz des DNA-gebundenen Prolinamids **2** unterschiedliche gekreuzte Aldolreaktionen ausgehend von DNA-gebundenem Aldehyd **1** durchgeführt werden. Die Umsatzgeschwindigkeiten waren jedoch niedriger als für die Reaktion mit Aceton.

Es wurden nur wenige Beispiele beschrieben, in denen DNA-gesteuerte Reaktionen einen katalytischen Umsatz erreichen.^[13] Wegen der Bildung von bicyclischem Imidazolidinon **4** (Tabelle 1, Experiment 5), das den Katalysator inaktiviert, hielten wir es für unwahrscheinlich, dass die hier dargestellte Reaktion mit katalytischem Umsatz verlaufen würde, wenn nur substochiometrische Mengen von **2** verwendet werden. Um hierfür eine Lösung zu finden, wurde das Oligonucleotid **7** synthetisiert, das zwei über eine Peptidbin-

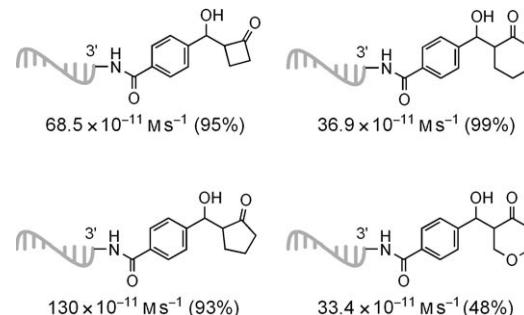


Abbildung 3. Produkte der durch **2** katalysierten gekreuzten Aldolreaktion von **1** mit unterschiedlichen Ketonen. Die Konzentrationen der Oligonucleotide waren 3.0 μM in 100 mM Phosphatpuffer (pH 8.0) mit wässriger Phase/DMSO/Keton 30:10:3 (v/v). Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten und Ausbeuten sind angegeben.

zung verknüpfte Prolineinheiten enthält. Die Bildung eines Imidazolidinons sollte hier verhindert werden, da in γ -Position zum an der Enaminbildung beteiligten N-Atom kein Amidproton vorliegt. Tatsächlich konnte die gewünschte Reaktion ohne die Bildung nennenswerter Mengen an Nebenprodukt erreicht werden, wenn **1** mit Aceton in Gegenwart von **7** zur Reaktion gebracht wurde (Abbildung 4).

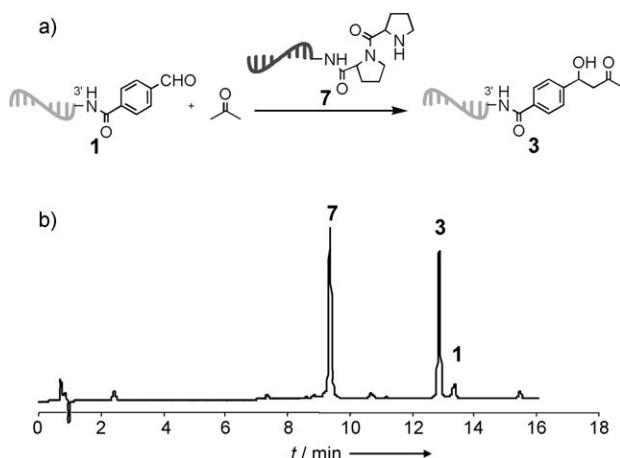


Abbildung 4. a) Durch das Prolinamid **7** katalysierte DNA-gesteuerte gekreuzte Aldolreaktion zwischen **1** und Aceton. b) Analyse der Reaktionsprodukte mit denaturierender HPLC.

Die anfängliche Umsatzgeschwindigkeit ($41.2 \times 10^{-11} \text{ M s}^{-1}$) der durch **7** katalysierten Reaktion war niedriger als für die durch **2** katalysierte Reaktion, aber dennoch wurde eine exzellente Ausbeute des gewünschten Produkts erreicht (Tabelle 2, Experiment 1). Als nächstes untersuchten wir, ob

Tabelle 2: Durch Oligonukleotid **7** katalysierte gekreuzte Aldolreaktion.

Nr.	7 [Mol-%] ^[a]	t [h]	Ausb. [%]
1	100	24	93
2	10	24	26
3	10	48	34
4	10	72	41

[a] Die Konzentration des Oligonukleotids **1** war $3.0 \mu\text{M}$ in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7.3) bei 25°C . Das Verhältnis von wässrigem Puffer/Aceton war 5:1 (v/v).

7 die Reaktion auch in substöchiometrischen Mengen katalysieren konnte, was tatsächlich der Fall war (Tabelle 2, Experimente 2–4). Mit 10 Mol-% **7** erzielte die Reaktion zwischen Oligonukleotid **1** und Aceton eine Ausbeute von 41% innerhalb von 72 h.

Es ist vorstellbar, dass die niedrigen Umsätze durch die Bildung einer stabilen DNA-Doppelhelix aus Katalysator **7** und Reaktionsprodukt **3** bedingt sind, der sich ein ineffizienter Strangtausch von **3** mit Reaktant **1** anschließt. Unsere Überlegung war, dass der Strangtausch durch einen zyklischen Wechsel der Umgebungstemperatur zwischen 25°C (Reaktionstemperatur) und 80°C (Schmelztemperatur eines DNA-Doppelstrangs) gefördert werden könnte. Es ist anzumerken, dass die Schmelztemperatur (T_m) für den

Doppelstrang aus **1** und **7** bei 63°C liegt.^[10] Während des Anlagers beim Abkühlen von 80°C auf 25°C hat **1** anfänglich eine höhere Wahrscheinlichkeit, sich an den Katalysator **2** anzulagern (wenn es im Überschuss zu Produkt **3** vorliegt), weshalb die Produktbildung bis zum Erreichen des Gleichgewichts bevorzugt sein sollte. Wir fanden, dass der Umsatz tatsächlich durch zyklische Temperaturänderungen deutlich erhöht werden konnte (Tabelle 3). Mit 10 Mol-% Katalysator

Tabelle 3: Durch Oligonukleotid **7** katalysierte gekreuzte Aldolreaktionen bei Anwendung von Temperaturzyklen.^[a]

Nr.	7 [Mol-%]	Zyklen	Ausb. [%]
1	10	25	56
2	10	50	71
3	5	25	41
4	5	50	53
5	0	50	14

[a] Die Temperaturzyklen wurden nach folgendem Programm durchlaufen: Reaktion bei 25°C für 1 h, anschließend Denaturierung bei 80°C für 1 min.

und 25 Temperaturzyklen wurde eine höhere Ausbeute als bei isothermen Bedingungen erhalten (Tabelle 2, Experimente 2–4 und Tabelle 3, Experiment 1). Die Ausbeute konnte durch Erhöhen der Zyklenzahl bis auf 71% gesteigert werden (Tabelle 3, Experiment 2). Zu erwähnen ist, dass die Reaktion unter isothermen Bedingungen bei 80°C für 1 h in Abwesenheit von **7** nur eine geringe Ausbeute an 14% erzielte. Dies schließt aus, dass die erhöhte Ausbeute im Falle der zyklischen Reaktionen durch längere Reaktionszeiten bei erhöhter Reaktionstemperatur bedingt war. Der Katalysatoranteil konnte weiter bis auf 5 Mol-% verringert werden, wobei immer noch ein Umsatz und signifikante Produktbildung beobachtet werden konnten (Tabelle 3, Experimente 4 und 5).

Zusammengefasst ist ein an einen DNA-Strang gebundenes Prolin in der Lage, effizient die gekreuzte Aldolreaktion zwischen einem komplementären DNA-Aldehyd-Konjugat und nichtgebundenem Keton zu katalysieren. Das entwickelte System ist ebenso fähig, die Aldolreaktion zwischen DNA-gebundenen Aldehyden und Ketonen zu katalysieren, wobei DMSO als Zusatzlösungsmittel in Fällen von wasserunlöslichen Ketonen toleriert wird. Interessanterweise konnte durch Optimierung des Prolinkatalysators eine Spezies erzeugt werden, die in der Lage war, katalytische Umsätze zu erreichen. Die Umsatzgeschwindigkeiten ließen sich durch zyklisches Verändern der Umgebungstemperatur zwischen der Reaktionstemperatur und der DNA-Schmelztemperatur weiter steigern. Unsere Erkenntnis, dass DNA-gebundene Proline sogar intermolekulare Aldolreaktionen zwischen gebundenen und nichtgebundenen Reaktanten katalysieren, erweitert das Methodenrepertoire DNA-gesteuerter Reaktionen.

Eingegangen am 2. April 2007,
veränderte Fassung am 16. Juni 2007
Online veröffentlicht am 17. August 2007

Stichwörter: Aldolreaktionen · DNA-gesteuerte Synthese · Organokatalyse · Prolinamid

[1] a) X. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4956; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4848; b) J. B. Doyon, T. M. Snyder, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12372; c) Z. J. Gartner, M. W. Kanan, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10304; d) Z. J. Gartner, B. N. Tse, R. Grubina, J. B. Doyon, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Science* **2004**, *305*, 1601.

[2] A. P. Silverman, E. T. Kool, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3775.

[3] a) W. Gilbert, *Nature* **1986**, *319*, 618; b) G. F. Joyce, *Nature* **2002**, *418*, 214.

[4] M. Oberhuber, G. F. Joyce, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7752; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7580.

[5] a) T. N. Grossmann, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15596; b) N. Graf, M. Göritz, R. Krämer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4117; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4013; c) I. Boll, R. Krämer, J. Brunner, A. Mokhir, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7849; d) J. Cai, X. Li, J. S. Taylor, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 751; e) J. Cai, X. Li, X. Yue, J. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16324; f) F. H. Zelder, J. Brunner, R. Krämer, *Chem. Commun.* **2004**, 902; g) J. Brunner, A. Mokhir, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12410; h) Z. Ma, J. S. Taylor, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2501; i) Z. Ma, J. S. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11159.

[6] Neuere Übersichtsartikel zur Organokatalyse: a) P. I. Dalko, L. Moisan, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5248; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5138; b) J. Seayad, B. List, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 719; c) K. N. Houk, B. List, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *43*, 5138; d) P. Kočovský, A. V. Malkov, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 243 (Organocatalysis in Organic Synthesis).

[7] a) B. List, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 548; b) W. Notz, F. Tanaka, C. F. Barbas III, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 580; c) Z. Tang, Z.-H. Yang, X.-H. Chen, L.-F. Cun, A.-Q. Mi, Y.-Z. Jiang, L.-Z. Gong, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9285; d) Z. Tang, F. Jiang, X. Cui, L.-Z. Gong, A.-Q. Mi, Y.-Z. Jiang, Y.-D. Wu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5755; e) Z. Tang, Z.-H. Yang, L.-F. Cun, L.-Z. Gong, A.-Q. Mi, Y.-Z. Jiang, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2285; f) H. Torii, M. Nakadai, K. Ishihara, S. Saito, H. Yamamoto, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2017; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1983.

[8] a) T. J. Dickerson, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3220–3221; b) N. Mase, Y. Nakai, N. Ohara, H. Yoda, K. Takabe, F. Tanaka, C. F. Barbas III, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 734; c) A. P. Brogan, T. J. Dickerson, K. D. Janda, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 8278; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 8100.

[9] M. M. Rozenman, D. R. Liu, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 253.

[10] Weitere Details sind in den Hintergrundinformationen aufgeführt.

[11] a) O. P. Josef, U. P. Anton, Patent US5795976, **1998**; b) B. Wang, J. M. Sayer, H. Yagi, H. Frank, A. Seidel, D. M. Jerina, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10079.

[12] T. Polonski, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 611. Bei der Aufnahme des Massenspektrums des Nebenprodukts konnte nur **2** identifiziert werden. Wir schlussfolgern, dass das bicyclische Imidazolidinon **4** anfänglich gebildet wurde, jedoch unter den ESI-MS-Bedingungen zerfiel. Wir waren jedoch in der Lage, durch ESI-MS die bicyclische Imidazolidinon-Nebenprodukte der Reaktionen, die die Ketone aus Abbildung 3 verwendeten, zu identifizieren.

[13] a) Z.-Y. J. Zhan, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12420; b) S. Sando, H. Abe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1081; c) C. Dose, S. Ficht, O. Seitz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5495; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5369.