

KWASY NUKLEINOWE JAKO KATALIZATORY REAKCJI CHEMICZNYCH

NUCLEIC ACIDS AS CATALYSTS IN CHEMICAL REACTIONS

Małgorzata Bukowiecka-Matusiak^{1*}, Marta Sobczak²

¹ Zakład Biologii Strukturalnej, Wydział Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

ul. Żeligowskiego 7/9 90-752 Łódź

e-mail: malgorzata.bukowiecka-matusiak@umed.lodz.pl

² Wydział Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego,

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

e-mail: m_sobczak@op.pl

Abstract

Wstęp

Wykaz stosowanych skrótów

1. Reakcja Dielsa – Aldera

1.1. Wpływ st-DNA na szybkość reakcji Dielsa-Aldera

1.2. Wpływ sekwencji DNA na parametry reakcji Dielsa-Aldera

2. Reakcja alkilowania Friedla-Craftsa i addycja Michaela

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr Małgorzata Bukowiecka-Matusiak ukończyła chemię na Uniwersytecie Łódzkim w Katedrze Chemii Organicznej i Stosowanej. Pracę magisterską wykonała w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, w ramach współpracy naukowej i dydaktycznej pomiędzy UŁ i CBMiM PAN. W trakcie wykonywania pracy magisterskiej rozpoczęła pracę w CBMiM PAN w Zakładzie Chemii Bioorganicznej, gdzie po obronie pracy magisterskiej była słuchaczką Studium Doktoranckiego. Pracę doktorską wykonaną w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMiM pt. „Stereoregularne P-chiralne

chimeryczne oligonukleotydy o zaplanowanych właściwościach hybrydacyjnych jako sondy w biologii strukturalnej” obroniła w 2009 roku. Obecnie pracuje jako adiunkt w Zakładzie Biologii Strukturalnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.



Marta Sobczak ukończyła studia pierwszego stopnia na kierunku biotechnologia medyczna na Wydziale Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w 2010 roku. Pracę dyplomową wykonała w Zakładzie Biologii Strukturalnej pod opieką dr n. chem. Małgorzaty Bukowieckiej-Matusiak. Obecnie kontynuuje naukę na studiach drugiego stopnia na tej samej uczelni. Tematyka jej badań obejmuje ekstrakcję polifenoli z nasion *Oenothera Paradoxa*. Ponadto studiuje chemię kosmetyczną na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego.

ABSTRACT

Nucleic acids, due to their specific structure, are effective and durable carriers of genetic information. They have also been used as catalysts in chemical reactions. The right-handed DNA double helix structure has become one of the icons of modern science, and its share in asymmetric catalysis is undeniable.

In these reactions, DNA is a source of chirality and proximity between oligonucleotides and complexes of copper during catalysis, what allows a direct transfer of chirality from DNA to the reaction product. Almost complete regioselectivity and excellent enantioselectivity of the aforementioned reactions in water are the evidence of the potential of asymmetry based on DNA.

Asymmetric catalysis used in organic synthesis, allows achieving high enantioselectivity. This strategy has been successfully used to create new C-C bonds in Diels-Alder cycloaddition, Friedel-Crafts alkylation and Michael addition using copper complexes with oligonucleotides as catalysts.

The important factor to optimize the reaction of asymmetric catalysis in the presence of DNA constitutes its sequence. It has been shown that the use of the double helix DNA can provide the product with higher enantiomeric excess than using the single strand of DNA.

In addition, the results of the study suggest that Friedel-Crafts alkylation is accelerated by DNA almost 30-fold. The same correlation is observed in Diels-Alder cycloaddition.

Due to promising results, further testing directed at the possibility of using catalytic DNA is being conducted.

Keywords: DNA, catalysis, asymmetric synthesis

Słowa kluczowe: DNA, kataliza, synteza asymetryczna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

| | |
|------------|-----------------------------------|
| DMBPY | - 4',4'-dimetylo-2',2'-bipirydyna |
| DNA | - kwas deoksyrybonukleinowy |
| RNA | - kwas rybonukleinowy |
| E_a | - energia aktywacji |
| ee | - enancjoselektywność |
| k_{app} | - stała szybkości drugiego rzędu |
| X_{pz} | - liczba par zasad |
| st-DNA | - DNA wyizolowany z ikry łososia |
| ΔG | - energia swobodna |

WSTĘP

Większość chemików myśli o kwasach nukleinowych jako nośniku informacji genetycznej. Jednakże już ponad 20 lat temu odkryto katalityczne właściwości naturalnych kwasów nukleinowych [1, 2]. Początek badań nad katalitycznymi kwasami nukleinowymi, ich strukturą i potencjalnym zastosowaniem wiąże się z odkryciem rybozymów oraz deoksyrybozymów. W ostatnim czasie wykazano również, że kompleksy DNA i RNA z metalami, głównie z miedzią, mają właściwości katalityczne i mogą być wykorzystywane w syntezie organicznej.

Wśród reakcji katalizowanych przez kwasy nukleinowe można wymienić: reakcję addycji Michaela [3], cykloaddycji Dielsa-Aldera [4], alkilowanie i acetylowanie Friedla-Craftsa [5], oraz tworzenie wiązań glikozydowych i amidowych.

Zastosowanie katalizy za pomocą DNA zakłada użycie niechiralnego katalizatora, który może oddziaływać z egzogennym elementem przenoszącym chiralność. Doskonałym przykładem chiralności w przyrodzie jest podwójna helisa, dlatego też podjęto próby jej wykorzystania. W rezultacie tych badań udało się otrzymać związki chiralne w postaci czystych enancjomerów.

W 2007 roku ponad 70% nowych niskocząsteczkowych leków posiadało co najmniej jedno centrum stereogenne. W związku z tym, pożądanym stało się opracowanie metod syntezy pozwalających na otrzymanie tylko jednego z enancjomerów, posiadającego właściwości terapeutyczne (ang. *chiral switch*) [6].

Wyróżnić można następujące strategie prowadzące do otrzymania czystych enancjomerycznie produktów końcowych:

- rozdzielanie powstałych mieszanin enancjomerów w wyniku zmiany ich właściwości fizycznych poprzez oddziaływanie z innymi chiralnymi molekułami (rozdzielanie diastereomerów),
- synteza opierająca się na wykorzystaniu czystych enancjomerycznie substratów,
- synteza asymetryczna.

Synteza asymetryczna jest dogodną metodą do otrzymywania czystych enancjomerów. Wymaga ona jednak zastosowania katalizatora chiralnego albo chiralnych reagentów, które poprzez wiązanie się z jednym z substratów spowodują skierowanie reakcji na taką drogę, by otrzymać pożądaną enancjomer [7].

Niezwykle przydatna okazała się koncepcja katalizy hybrydowej, która zakłada, że katalitycznie aktywny kompleks metalu przejściowego wiąże się z chiralnym biopolimerem (np. DNA, białko). Możliwe jest wówczas utworzenie chiralnego środowiska, które pozwala na bezpośrednie otrzymanie pożądanego produktu, z dużym nadmiarem enancjomerycznym [8]. Ogromną zaletą takiego podejścia jest fakt, że kataliza zarówno za pomocą DNA, jak i za pomocą metalu przejściowego, jest optymalizowana niezależnie metodami genetycznymi i syntetycznymi [9, 10, 11].

Od niedawna jako uniwersalne chiralne katalizatory w enancjoselektywnej syntezie wykorzystuje się polinukleotydy występujące w kompleksach z metalami przejściowymi. Najczęściej stosowanym, naturalnym katalizatorem jest DNA

wyzolowany z ikry łososia (st-DNA, ok. 2000 par zasad, o procentowym składzie zasad: 58,8% AT i 41,2% GC). W procesie syntezy chemicznie stabilne DNA wykorzystywane jest jako chiralne rusztowanie, do którego przyłączony jest niechiralny kompleks metalu przejściowego z odpowiednim ligandem [12].

DNA przeważnie występuje jako prawoskrętna helisa (B-DNA), jednak pod wpływem różnych czynników (np. sekwencja, stopień hydratacji bruzd, siła jonowa rozpuszczalnika) może zmieniać swoje właściwości i przechodzić w formę A-DNA lub Z-DNA [13].

Istotną zaletą reakcji katalizowanych przez DNA jest to, że zachodzą one w środowisku wodnym, bez konieczności użycia rozpuszczalników organicznych [14].

Kompleksy miedzi pierwszej generacji, zawierające jako ligand akrydynę prowadziły do enancjoselektywności (*ee*) rzędu 50% w reakcji cykloaddycji Dielsa-Aldera. Jednakże reakcja ta przebiegała wolniej w obecności DNA. Zastosowanie pochodnych bipyridyny (4,4'-dimetylo-2,2'-bipyridyny) (DMBPY), katalizatorów drugiej generacji, pozwoliło zwiększyć wartość *ee* do ponad 99%. Zastosowanie kompleksów miedzi z DMBPY dało bardzo dobre wyniki również w przypadku innych reakcji, np. w addycji Michaela malonianu do α,β -nienasyconego 2-acyloimidazolu, w której enancjoselektywność wynosiła >99% [15].

Tak wysoka selektywność powstawania produktów w obecności DNA jako katalizatora zachęciła Feringę i współpracowników do zbadania mechanistycznych aspektów asymetrycznej katalizy opartej na kwasie deoksyrybonukleinowym oraz określenia roli, jaką odgrywa DNA w tego typu reakcjach. Zadano sobie również pytanie, czy sekwencja i długość fragmentu DNA wpływa na szybkość reakcji oraz jej enancjoselektywność.

Istotne jest, że zarówno w reakcji Dielsa-Aldera, jak i w addycji Michaela, katalizator może być odtwarzany i użyty w innych reakcjach bez znaczącego spadku wydajności i enancjoselektywności [11].

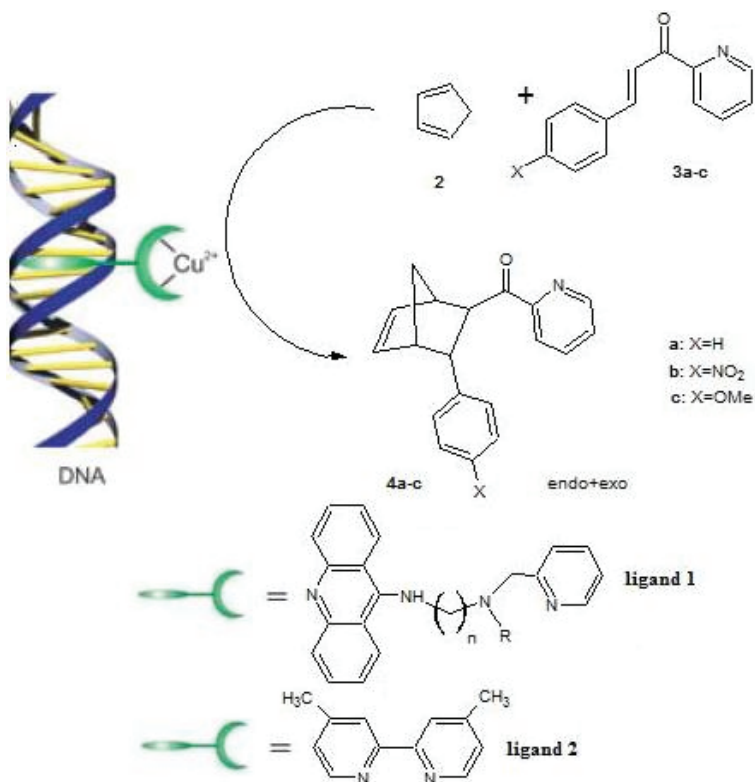
Celem niniejszej pracy jest podsumowanie obecnej wiedzy na temat katalizy opartej o zastosowanie DNA na przykładzie cykloaddycji Dielsa-Aldera, alkilowania metodą Friedla-Craftsa oraz addycji Michaela. Analiza tych reakcji pozwoli na zrozumienie mechanizmu katalizy opartej na kwasach nukleinowych.

1. REAKCJA DIELSA-ALDERA

Klasyczna reakcja Dielsa-Aldera to cykloaddycja dienu do sprzężonego dienofila. Reakcja ta zachodzi w środowisku bezwodnym, w wysokich temperaturach. W wyniku takiej reakcji zawiązują się nowe wiązania C–C. Z tego względu jest to reakcja szeroko stosowana w syntezie organicznej. W 1980 roku Breslow i współpracownicy opisali reakcję Dielsa-Aldera zachodzącą w wodzie i zaobserwowali znaczący wzrost szybkości badanej reakcji [16].

W 1995 roku Otto i Engberts opisali po raz pierwszy reakcję Dielsa-Aldera pomiędzy cyklopentadienem oraz azachalkonem katalizowaną za pomocą kwasów

Lewisa (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) i zachodzącą w środowisku wodnym. Reakcja w wodnym 0,01 M roztworze azotanu miedzi(II) zachodzi 250 000 razy szybciej w stosunku do reakcji prowadzonej w acetonitrylu [17].



Rysunek 1. Reakcja Diels–Aldera pomiędzy azachalconem i cyclopentadieniem [15].

Figure 1. Diels-Alder reaction between azachalcon and cyclopentadien [15].

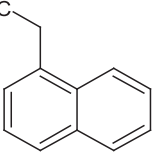
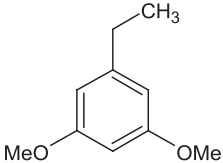
W 2005 roku Feringa oraz Roelfes zaproponowali asymetryczną katalizę opartą na DNA. Wybrali oni katalizator zawierający jony Cu^{2+} , które jako kwasy Lewisa, aktywowały dienofil poprzez wiązanie koordynacyjne do atomu tlenu ketonu oraz atomu azotu pirydyny. Utworzony katalitycznie aktywny kompleks składał się z trzech funkcyjnych składników: domeny wiążącej DNA (np. 9-aminoakrydyna w ligandzie 1), łącznika oraz grupy wiążącej jony metalu.

W reakcji tej zaobserwowano przeniesienie chiralności z cząsteczki DNA na otrzymane produkty. W przypadku użycia ligandu 1 proces zachodzi w dwóch etapach. W pierwszym etapie następuje transfer chiralności z DNA na kompleks miedzi(II), natomiast podczas drugiego etapu następuje przeniesienie chiralności z kompleksu miedzi(II) na produkt reakcji. Gdy ligandem jest 4,4'-dimetylo-2,2'-bipyrydyna, chiralność jest przenoszona bezpośrednio z DNA na reagenty, co spowodowane jest prawdopodobnie umiejscowieniem jonów miedzi wewnątrz jednej

z bruzd. Otrzymany produkt to mieszanina *endo*- i *egzo*izomerów ze znaczącym nadmiarem enancjomerycznym. Enancjoselektywność zależy od użytego ligandu (wyniki zestawiono w Tabeli 1). W analogicznych reakcjach, w których nie stosowano DNA, jako produkt otrzymywano mieszaninę racemiczną [13].

Tabela 1. Nadmiary enancjomeryczne otrzymane w reakcji Dielsa-Aldera dla różnych ligandów (R = 1-naftylo-1-metylu i R = 3,5-dimetoksybenzylu) [15].

Table 1. The enantiomeric excesses in Diels-Alder reaction for different ligands (R = 1-naphthyl-1-methyl and R = 3,5-dimethoxybenzyl) [15].

| Lp. | R | Produkt reakcji Dielsa-Aldera | | | | |
|-----|---|-------------------------------|----------|---------------------------|-------------------|-------------------|
| | | n | dienofil | <i>endo</i> / <i>egzo</i> | <i>endo</i> [%ee] | <i>egzo</i> [%ee] |
| 1. |  | 3 | 3a | 98/2 | 49 | 18 |
| 2. | | 3 | 3b | 96/4 | 57 | 16 |
| 3. | | 3 | 3c | 98/2 | 48 | 24 |
| 4. | | 4 | 3a | 98/2 | 33 | 19 |
| 5. | | 5 | 3a | 98/3 | <5 | <5 |
| 6. | | 2 | 3a | 98/4 | -48 | -37 |
| 7. |  | 3 | 3a | 98/2 | -37 | -7 |
| 8. | | 2 | 3a | 98/8 | -37 | -78 |
| 9. | | 2 | 3b | 88/12 | -47 | -78 |
| 10. | | 2 | 3c | 91/9 | -53 | -90 |

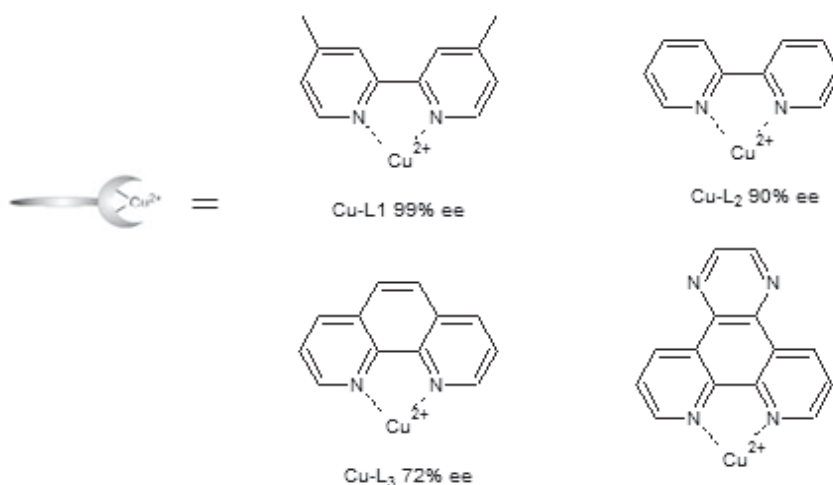
O wysokiej enancjoselektywności reakcji Dielsa-Aldera katalizowanej za pomocą DNA decydują dwa czynniki: długość łącznika w ligandzie 1 (n) oraz podstawnik R.

Z przeprowadzonych badań wynika, że najlepszym podstawnikiem R jest podstawnik aromatyczny (możliwe zaangażowanie oddziaływań π - π pomiędzy podstawnikiem i dienofilem). Najlepsze wyniki osiągnięto dla naftylo-metylu. Stosunek *endo*izomerów do *egzo*izomerów wynosił 98:2 z 49% enancjoselektywnością dla izomeru *endo*. Wydłużanie łącznika w ligandzie 1 do $n = 5$ skutkowało dużym spadkiem enancjoselektywności, ponadto nie zaobserwowano znacznego nadmiaru enancjomerycznego. Natomiast skrócenie łącznika do $n = 2$ dawało podobną wartość *ee* jak dla łącznika o $n = 3$ (Tab. 1), jednak otrzymywano enancjomer o przeciwnej konfiguracji. Z badań tych wynika, że istnieje na tyle bliski kontakt pomiędzy podwójną helisą DNA i katalizatorem, aby przeniesienie chiralności z DNA na ligand niechiralny było skuteczne.

Wysoka selektywność asymetrycznej syntezy opartej na katalizie DNA sprawiła, że podjęto prace nad wyjaśnieniem mechanistycznych aspektów reakcji Dielsa-Aldera katalizowanej przez oligonukleotydy oraz dokonano oceny wpływu sekwencji DNA na szybkość reakcji.

1.1. WPŁYW *st*-DNA NA SZYBKOŚĆ REAKCJI DIELSA-ALDERA

Feringa i współ. [18] przeprowadzili modelową reakcję pomiędzy azachalkonem a cyklopentadienem katalizowaną przez kompleksy miedzi z różnymi ligandami (Rys. 2). Wszystkie reakcje prowadzono zarówno bez *st*-DNA (DNA z ikry lososia), jak i w jego obecności. Dla porównania przeprowadzono również reakcję z azotanem miedzi(II) jako katalizatorem.



Rysunek 2. Ligandy użyte w reakcji D-A [15].

Figure 2. Ligands used in D-A reaction [15].

Porównanie wartości stałych szybkości drugiego rzędu (k_{app}) umożliwiło ocenę wpływu *st*-DNA na szybkość reakcji (Tab. 2).

Tabela 2. Szybkość reakcji D-A katalizowanej przez *st*-DNA i bez *st*-DNA [18].

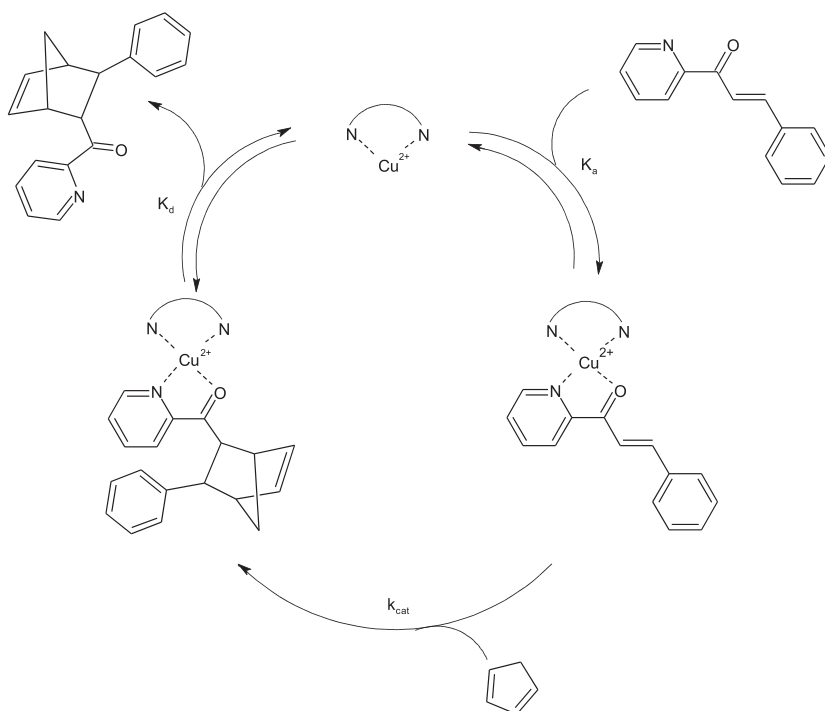
Table 2. Diels-Alder reaction rate catalyzed by *st*-DNA and without DNA [18].

| Lp. | Katalizator | k_{app} ($M^{-1}s^{-1}$) | | |
|-----|----------------------------|------------------------------|----------------|--|
| | | bez DNA | <i>st</i> -DNA | $K_{app} \text{ bez DNA}/k_{app} \text{ st-DNA}$ |
| 1. | Cu - L1 | 0,0069±0,0003 | 0,40±0,04 | 58 |
| 2. | Cu - L2 | 0,0092±0,0004 | 0,022±0,001 | 2,4 |
| 3. | Cu - L3 | 0,010±0,001 | 0,023±0,001 | 2,3 |
| 4. | $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ | 0,095±0,006 | 0,040±0,004 | 0,4 |

Porównanie wartości stałych szybkości reakcji Dielsa-Aldera katalizowanych za pomocą kompleksów miedzi z ligandami L1-L3 bez udziału DNA pokazuje, że wszystkie te reakcje przebiegają wolniej niż w obecności $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ oraz, że istnieją tylko niewielkie różnice pomiędzy ligandami L1, L2 i L3. Jednakże, w obecności *st*-DNA, reakcja z azotanem miedzi(II), prowadząca do 10% nadmiaru enancjometrycznego dla enancjomeru (-) jest znacznie wolniejsza niż dla kompleksów miedzi

z ligandami L2 i L3, gdzie obserwowano dwukrotne zwiększenie szybkości reakcji [15]. O wiele bardziej widoczny efekt uzyskano w przypadku reakcji katalizowanej kompleksem miedzi z L1, w tym przypadku szybkość reakcji wzrosła 58-krotnie. Poza tym stwierdzono, że Cu-L1/DNA jest znacznie lepszym katalizatorem niż $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$. Ligandy L1 i L2 pod względem strukturalnym różnią się tylko obecnością grupy metylowej w pozycjach 4 i 4'. Podstawniki te nie oddziałują z substratami, ponieważ są one zbyt oddalone od miejsca, gdzie zachodzi reakcja. Jednakże odgrywają znaczącą rolę przy projektowaniu najbardziej aktywnych i enancjoselektywnych katalizatorów opartych na DNA.

Pomiar całkowitej szybkości reakcji wymaga wyznaczenia trzech parametrów: stałej równowagi (K_d) dla reakcji wiązania się substratu z kompleksem miedzi, stałej szybkości reakcji Dielsa-Aldera (k_{cat}) oraz stałej dysocjacji utworzonego produktu od kompleksu miedzi (K_d) (Rys. 3).



Rysunek 3. Proponowany cykl katalityczny jonów miedzi(II) katalizujących reakcję D-A pomiędzy azachalconem i cyklopentadienem [20].

Figure 3. Proposed catalytic cycle of Cu(II) ions catalyzed D-A reaction between azachalcone and cyclopentadiene [20].

Tabela 3. Parametry kinetyczne reakcji D-A dla reakcji katalizowanej Cu-L1 i Cu-L1/DNA [15].
 Table 3. Kinetic parameters of Diels-Alder reaction catalyzed by Cu-L1 and Cu-L1/DNA [15].

| | Cu-L1 | Cu-L1/st-DNA |
|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| K_a (M^{-1}) | $(4,0 \pm 0,8) \times 10^2$ | $(5,0 \pm 1,4) \times 10^2$ |
| k_{cat} ($M^{-1}s^{-1}$) | $(4,5 \pm 1,2) \times 10^{-2}$ | $3,8 \pm 0,8$ |
| $k_{(-)}$ ($M^{-1}s^{-1}$) | $(2,2 \pm 0,6) \times 10^{-2}$ | $(5,8 \pm 1,2) \times 10^{-2}$ |
| $K_{(+)}$ ($M^{-1}s^{-1}$) | $(2,2 \pm 0,6) \times 10^{-2}$ | $3,8 \pm 0,8$ |

Z danych przedstawionych w Tabeli 3 wynika, że pod wpływem st-DNA nie ulega zmianie stała równowagi K_a reakcji Dielsa-Aldera, ale stała szybkości reakcji zwiększa się 100-razy. Oznacza to, że obserwowane zwiększenie szybkości reakcji nie jest spowodowane zwiększonym powinowactwem azachalkonu do kompleksu miedzi wiążącego DNA, a raczej zwiększeniem szybkości reakcji Dielsa-Aldera pod wpływem DNA. Wyniki te pokazują, że obecność DNA zapewnia nie tylko odpowiednie chiralne środowisko reakcji, które z kolei stabilizuje aktywny kompleks Cu-L1-4 i powoduje przyspieszenie reakcji, ale również zwiększa reaktywność substratów w obecności kompleksu Cu-L1. Wysoka enancjoselektywność może wynikać z budowy bruzd podwójnej helisy, które prawdopodobnie stabilizują kompleks przejściowy i prowadzą do wytworzenia pożądanego enancjomeru.

1.2. WPŁYW SEKWENCJI DNA NA PARAMETRY REAKCJI DIELSA-ALDERA

Feringa i współpracownicy badali wpływ sekwencji DNA na katalizę, wykorzystując syntetyczne oligonukleotydy o dokładnie zdefiniowanej sekwencji. Na podstawie przeprowadzonych badań wywnioskowano, że struktura mikrośrodowiska ma istotny wpływ na aktywność i selektywność katalizatora w reakcji Dielsa-Aldera, ponieważ zaobserwowano wyraźne zmiany w enancjoselektywności przy użyciu różnych syntetycznych dupleksów DNA. Ogromne znaczenie ma również prawidłowy dobór katalizatora (Rys. 1.).

Użycie w reakcji Dielsa-Aldera katalizatora pierwszej generacji, w którym czynnikiem interkalującym do DNA jest akrydyna, powoduje niską enancjoselektywność (5%) dla oligonukleotydów bogatych w adeninę i tyminę.

O wiele wyższą enancjoselektywność (62%) uzyskano dla podwójnej nici DNA zawierającej głównie guaninę i cytozynę. Dla oligonukleotydów o długości 12 pz o sekwencji $d(GCGCGCGCGCGC)_2$ otrzymano *ee* rzędu 35%, natomiast dla sekwencji $d(CGCGCGCGCGCG)_2$ – 60%. Wysoka enancjoselektywność uzyskana dla sekwencji bogatych w pary GC może być wytłumaczona znacznym powinowactwem akrydyny do tych par zasad.

Użycie 4,4'-dimetylo-2,2'-bipirydyny jako ligandu, (katalizator drugiej generacji), oraz zastosowanie oligonukleotydów (12-merów) zawierających naprzemienne pojawiające się motywy puryna-pirymidyna, np. $d(TCGCGATCGCGA)_2$ oraz $d(TCGCGTACGCGA)_2$ powoduje wzrost enancjoselektywności do ok. 80%. Obec-

ność par GG powoduje wzrost *ee* w zakresie 90–95%, natomiast obecność szlaków GGG daje porównywalną *ee* do st-DNA. Wynika z tego, że oligonukleotydy zawierające szlaki GGG pozwalają osiągnąć najwyższą enancjoselektywność. Z kolei usunięcie zasad AT ze środkowej części oligonukleotydu prowadzi do zwiększenia *ee* > 99%. Sekwencje d(GACTGACTAGTCAGTC)₂ oraz d(CAGTCAGTACTGACTG)₂ dają enancjoselektywność ok. 80%. Nawyższą enancjoselektywność otrzymano, stosując oligonukleotydy o długości 12 pz o sekwencji d(TCAGGGCCCTGA)₂.

Tabela 4 Zależność *ee* od sekwencji DNA w reakcji Dielsa-Aldera [15].

Tabela 4. The dependence of the enantiomeric excess of DNA's sequence in Diels-Alder reaction [15].

| Lp. | sekwencja DNA | <i>ee</i> [%] | T _m (T _m z Cu-L1)[°C] |
|------------------|----------------------------------|---------------|---|
| podwójna nić DNA | | | |
| 1. | st-DNA | 98,5 | 63(–0,5) |
| 2. | d(GCGCGCGCGCGC) ₂ | 95 | 45,5(–6,0) |
| 3. | d(GCGCGCGC) ₂ | 86 | 38,0(–1,0) |
| 4. | d(GACTGACTAGTCAGTC) ₂ | 78 | 33,0(–2,0) |
| 5. | d(CAGTCAGTACTGACTG) ₂ | 83 | 32,5(–0,5) |
| 6. | d(TCGGGATCCCGA) ₂ | 98,4 | 28,0(–4,5) |
| 7. | d(TCGGGTACCCGA) ₂ | 98,6 | 27,0(–4,5) |
| 8. | d(TCAGGGCCCTGA) ₂ | 99,4 | 30,0(–5,0) |
| 9. | d(AGGGCCCT) ₂ | 97 | 28(–4,0) |

Temperatury topnienia badanych fragmentów dwuniciowych obejmują zakres 27–63°C. Cząsteczki, które wiążą DNA poprzez silną interkalację niezwykle często powodują wzrost temperatury topnienia (co zaobserwowano w przypadku Cu-L4, Rys. 2). W obecności Cu-L1 temperatury topnienia nieznacznie spadają, co wskazuje, że dwuniciowe oligonukleotydy są destabilizowane w wyniku wiązania się do Cu-L1 i interkalacja nie jest głównym sposobem wiązania Cu-L1 i DNA. Spadek temperatury topnienia może sugerować również, że Cu-L1 tworzy kompleks słabo wiążący się do DNA. Z badań tych ponadto wynika, że wykorzystane oligonukleotydy podczas reakcji (tj. w temp. 18°C lub 5°C) są dwuniciowe [18].

Prace Feringi dotyczące roli DNA w enancjoselektywnej reakcji Dielsa-Aldera katalizowanej kompleksami miedzi pokazują, że w reakcjach tych DNA nie jest wykorzystywany tylko i wyłącznie jako źródło chiralności, ale w połączeniu z Cu-L1 powoduje wzrost szybkości reakcji o 2 rzędy wielkości w porównaniu do reakcji przeprowadzonej tylko w obecności Cu-L1. Co więcej, zarówno enancjoselektywność, jak i szybkość reakcji Dielsa-Aldera, są silnie związane z sekwencją użytego DNA.

Z danych dotyczących zależności pomiędzy enancjoselektywnością a sekwencją DNA przedstawionych w Tabeli 4. wynika, że najwyższe nadmiary enancjomeryczne otrzymano dla oligonukleotydów o długości 12 pz, niższe dla oligonukleotydów o długości 16 pz. Wykorzystując do reakcji Dielsa-Aldera oktamer (np. AGGGCCCT), uzyskano niewielki spadek enancjoselektywności (97%) w porównaniu z badanymi dwunastomerami.

Ponadto wykazano, że fragmenty jednoniciowe mają mniejszy wpływ na szybkość reakcji Dielsa-Aldera niż oligonukleotydy dwuniciowe. Zastosowanie pojedynczych nukleotydów, np. mieszaniny dNTP pozwala osiągnąć 18% *ee*. Pojedyncza nić DNA założona z traktów G i C daje *ee* < 5%.

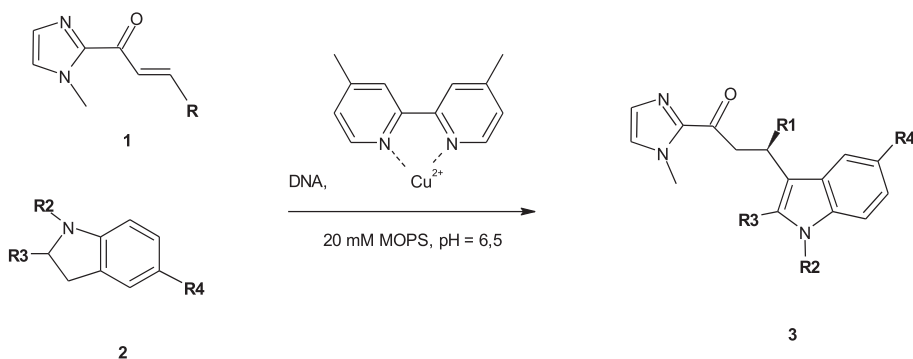
2. REAKCJA ALKILOWANIA FRIEDLA-CRAFTSA I ADDYCJA MICHAELA

Od kilku lat wzrasta znaczenie reakcji Friedla-Craftsa, dzięki odkryciu katalitycznych, enancjoselektywnych wariantów tej reakcji [19, 20]. Tę metodę wykorzystuje się do otrzymywania wielu użytecznych syntonów do syntezy związków farmakologicznych i chemikaliów rolniczych. Jest to jedna z najważniejszych reakcji w chemii organicznej, w której udział mają kwasy Lewisa [21].

Feringa i współ. zbadali wpływ DNA na kinetykę reakcji alkirowania Friedla-Craftsa oraz addycji Michaela katalizowanych kompleksami miedzi z DMBPY [22, 23].

Reakcja Friedla-Craftsa i addycja Michaela to sprzężone addycje enolanu lub neutralnego π nukleofila do elektrofila – α,β -nienasyconego 2-acyloimidazolu.

Feringa i współ. [21] wykazali również, że asymetryczne alkirowanie indolu za pomocą α,β -nienasyconego 2-acyloimidazolu w obecności st-DNA w środowisku wodnym przebiega 30-razy szybciej niż bez udziału st-DNA. Znaczący wpływ na szybkość tej reakcji mają podstawniki, zarówno w cząsteczce indolu, jak i imidazolu, jednakże obecność oraz rodzaj podstawników nie wpływa na enancjoselektywność tej reakcji.



Rysunek 4. Reakcja alkirowania Friedla-Craftsa katalizowana Cu/DMBPY w obecności st-DNA [21].

Figure 4. Friedel-Crafts alkylation reaction catalyzed by Cu/DMBPY in the presence of st-DNA [21].

Autorzy ci wykazali, że 1000-krotne zmniejszenie stężenia katalizatora przy tym samym stosunku Cu(II)/st-DNA pozwoliło przeprowadzić reakcję bez utraty enancjoselektywności, jednakże czas reakcji ulegał znacznemu wydłużeniu z 30 minut do 44 godzin. Na podstawie badań powinowactwa Cu-DMBPY do DNA stwierdzono, że tylko 16% Cu-DMBPY wiąże się do DNA. Wyniki te jednoznacznie pokazują, że za przyspieszenie reakcji Friedla-Craftsa katalizowanej jonami miedzi silnie odpowiada użyty DNA, a niezwiązany kompleks Cu-DMBPY nie zwiększa otrzymanego nadmiaru enancjomerycznego.

Istotną zmienną w planowaniu asymetrycznego alkirowania Friedla-Craftsa jest sekwencja użytego DNA. Ocena syntetycznych oligonukleotydów, zarówno dwuniciowych, jak i jednoniciowych DNA wykazała, że najlepszą enancjoselektywność (93% *ee*) uzyskano, stosując katalizator Cu-DMBPY w połączeniu z komplementarnym oligonukleotydem o sekwencji d(TCAGGGCCCTGA)₂.

Tabela 5. Zależność *ee* od sekwencji DNA w reakcji Friedla-Craftsa [21].

Table 5. The dependence of the enantiomeric excess of DNA's sequence in Friedel-Crafts reaction [21].

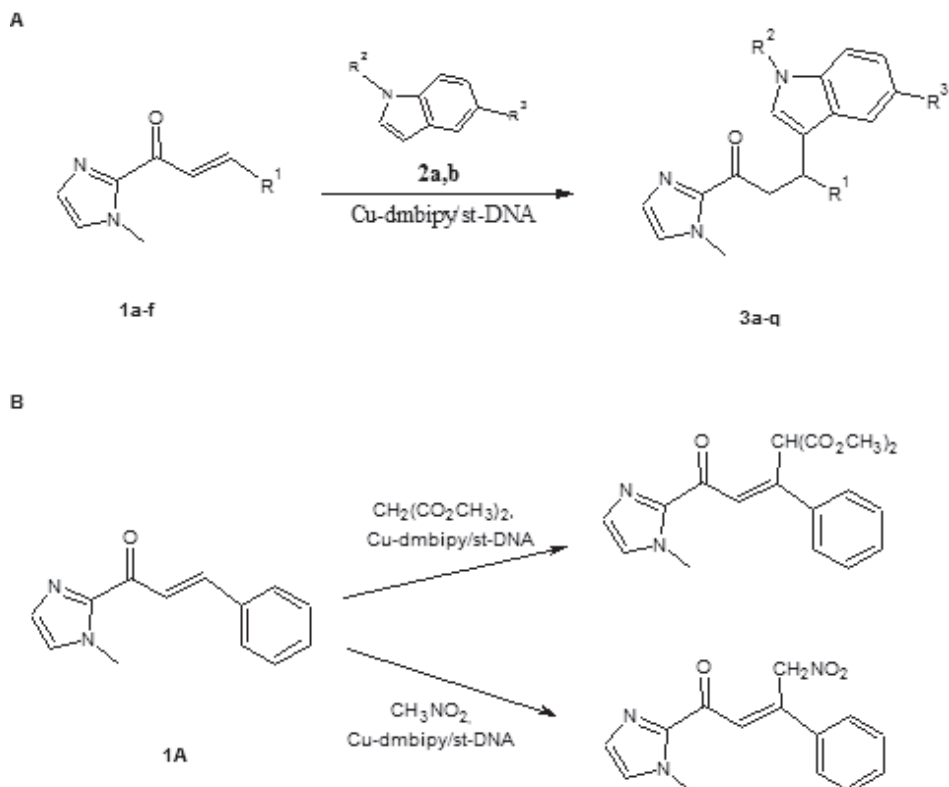
| Lp | Sekwencja DNA | ee [%] |
|------------------|----------------------------------|--------|
| Podwójna nić DNA | | |
| 1 | st-DNA | 83 |
| 2 | d(TCAGGGCCCTGA) ₂ | 93 |
| 3 | d(TCGGGGCCCGA) ₂ | 88 |
| 4 | d(GCGCGCGCGC) ₂ | 83 |
| 5 | d(TCGGGATCCCGA) ₂ | 81 |
| 6 | d(TCAGCGCGCTGA) ₂ | 79 |
| 7 | d(TCGGAATTCCCGA) ₂ | 65 |
| 8 | d(TCAGAGCTCTGA) ₂ | 65 |
| 9 | d(TCAGTGCACTGA) ₂ | 63 |
| 10 | d(TCGCGATCGCGA) ₂ | 62 |
| 11 | d(GACTGACTAGTCAGTC) ₂ | 55 |
| 12 | d(ATATATATATAT) ₂ | 35 |
| Pojedyncza nić | | |
| 13 | d(AGTCCCGTGA) | 12 |
| 14 | d(GGG) | 10 |
| 14 | d(CCC) | 22 |

Najwyższa enancjoselektywność dla reakcji Friedla-Craftsa została osiągnięta dla dwunastomeru o sekwencji d(TCAGGGCCCTGA)₂ i jest ona niższa o 6,4% niż najlepsza enancjoselektywność w reakcji Dielsa-Aldera [15]. Nie porównywano dokładnie tych samych sekwencji oligonukleotydów dla obu reakcji. Wykazano, że w przypadku reakcji Friedla-Craftsa najdogodniej jest użyć oligonukleotyd o długości 12 pz, aby uzyskać *ee* w zakresie 62–93%, wyjątkiem jest oligomer składający się z AT (*ee* 35%). Oligonukleotyd o sekwencji d(GACTGACTAGTCAGTC)₂ (o dł.

16 pz) daje zaledwie 55% *ee*, a w przypadku reakcji Dielsa-Aldera oligonukleotydy o dł. 16 pz wykazywał *ee* 78% i 83% (Tab. 4.)

Oligonukleotydy bogate w zasady AT oraz jednoniciowe DNA powodują niższe wartości *ee*, podczas gdy obecność szlaków zawierających G zwiększa wartość *ee* reakcji.

Innym przykładem reakcji Friedla-Craftsa katalizowanej kompleksami miedzi w obecności DNA jest reakcja pomiędzy enonem i indolem zawierającym różne podstawniki.



Rysunek 5. Alkilowanie Friedla – Craftsa (A) oraz addycja Michaela (B) katalizowane kompleksami miedzi w obecności DNA [22].

Figure 5. Friedel-Crafts alkylation (A) and Michael addition (B) catalyzed by copper complex in the presence of DNA [22].

Autorzy wykazali, że niezależnie od rodzaju podstawnika w substratach, st-DNA znacząco wpływa na wzrost szybkości reakcji (9–27-razy), przy czym reakcja przebiega najszybciej, gdy enon posiada podstawniki wyciągające elektrony, np. związki aromatyczne zawierające halogenki. Z drugiej strony podstawniki oddające elektrony, np. grupa metoksyłowa, powodują obniżenie szybkości reakcji. W przypadku badanych oligonukleotydów nie stwierdzono znaczącego wpływu sekwencji

na szybkość reakcji oraz nadmiar enancjomeryczny otrzymywanych produktów, w odróżnieniu od opisanej wcześniej reakcji Dielsa-Aldera [15].

Addycja Michaela jest kolejnym przykładem reakcji chemicznej, katalizowanej przez kwasy Lewisa, w której dochodzi do zawiązania się nowego wiązania C–C. Aby ograniczyć użycie rozpuszczalników organicznych jako środowiska reakcji, podjęto próby przeprowadzenia tej reakcji w warunkach wodnych. Otrzymano produkty z wysoką enancjoselektywnością 83% i 86%, wykorzystując jako katalizatory chiralne kompleksy zawierające srebro(I) lub pallad(II) [24–26].

W reakcji Michaela wykorzystano chiralne DNA – do reakcji dimetylomalonianu, z α,β -nienasyconym 2-acyloimidazolem. Jako produkty otrzymano addukty Michaela z enancjoselektywnością 99%. Do badanej reakcji najlepszym nukleofilem okazał się nitrometan, a utworzone produkty wykazywały ee 94%. DNA, wykorzystywane w addycji Michaela, może być odzyskiwane prostymi metodami, np. przez ekstrakcję, i ponownie użyte bez znaczącego spadku enancjoselektywności i wydajności reakcji.

Wpływ DNA na szybkość reakcji zależy w dużej mierze od użytego donora. Reakcja enonu z nitrometanem jest hamowana w obecności DNA 2–4-krotnie, jako jedyna ze wszystkich przebadanych reakcji. Natomiast addycja dimetylomalonianu do enonu w obecności DNA jest tylko nieznacznie szybsza.

W przypadku addycji Michaela wpływ sekwencji DNA na szybkość reakcji jest niewielki, pomimo znacznego wpływu na enancjoselektywność otrzymywanego produktu.

Tabela 6. Zależność pomiędzy sekwencją DNA a enancjoselektywnością oraz szybkością addycji Michaela [21].

Table 6. The dependence between DNA's sequence and enantioselectivity and rate in Michael addition [21].

| Lp. | Sekwencja DNA | ee [%] | $k_{app}/M^{-1}s^{-1}$ |
|-----|---------------------|--------|------------------------|
| 1. | d(TC GGG AT CCC GA) | 86 | $2,2 \times 10^{-3}$ |
| 2. | d(TCA GGG CCC TGA) | 93 | $2,6 \times 10^{-3}$ |
| 3. | d(TCGGAA TT CCGA) | 76 | $2,7 \times 10^{-3}$ |
| 4. | d(TCG CGA TCG CGA) | 71 | $1,2 \times 10^{-3}$ |
| 5. | d(TCG CGT ACG CGA) | 74 | $1,5 \times 10^{-3}$ |
| 6. | st-DNA | 90 | $6,5 \times 10^{-3}$ |
| 7. | bez DNA | – | $1,9 \times 10^{-3}$ |

Porównując reakcje Friedla-Craftsa oraz Michaela (sprzężone reakcje addycji) pod względem kinetycznym oraz enancjoselektywności, można zauważyć kilka cech wspólnych, jednakże występują również godne uwagi różnice. Obydwie reakcje są katalizowane efektywnie przez katalizatory miedziowe w obecności DNA, powodu-

jąc otrzymywanie produktów z doskonałą enancjoselektywnością (93%). Poza tym w obu przypadkach enancjoselektywność zależy w różnym stopniu od sekwencji użytego DNA oraz od jego długości.

Główną różnicą jest wpływ DNA na szybkość katalizowanych reakcji. Obecność DNA, w przypadku reakcji Friedla-Craftsa, powoduje znaczny wzrost szybkości reakcji (>27-krotnie). W przypadku addycji Michaela wpływ DNA na szybkość reakcji uzależniony był od rodzaju użytego donora, jednakże jego wpływ był niewielki (dimetylomalonian) lub wręcz powodował on obniżenie szybkości reakcji (nitrometan).

Katalityczne możliwości DNA zostały odkryte również w przypadku reakcji, w których dochodzi do tworzenia wiązania pomiędzy węglem i heteroatomem. Shibata, Toru i współpracownicy udowodnili, że DNA może brać udział w reakcji fluorowania β -ketoestrów indanonu, w której katalizatorem jest Cu-DMBPY w środowisku wodnym. Dochodzi do tworzenia nowego wiązania między węglem i fluorem. Ponadto zaobserwowano, że na enancjoselektywność ogromny wpływ ma struktura ligandu [27].

PODSUMOWANIE

Nowy sposób asymetrycznej katalizy stosowany w reakcjach Dielsa-Aldera, Friedla-Craftsa oraz Michaela prowadzi do otrzymania nowych połączeń zawierających wiązania C–C przy wykorzystaniu dwuniciowych fragmentów DNA. Reakcje te katalizowane są kompleksami miedzi(II) z różnymi ligandami, przy czym najlepszym ligandem okazała się 4,4'-dimetylo-2,2'-bipirydyna. W opisanych reakcjach elementem chiralnym, wymuszającym wysoką enancjoselektywność procesu, jest dwuniciowy DNA użyty jako kokatalizator. Rola DNA nie ogranicza się jedynie do stanowienia źródła chiralności, bierze również udział w zwiększeniu szybkości reakcji. Bardzo istotną zaletą tak kontrolowanego procesu jest prawie całkowita regioselektywność i wysoka enancjoselektywność (>99% dla reakcji Dielsa-Aldera).

Kolejną korzyścią świadczącą o potencjale katalizy opartej na DNA jest odtworzenie wykorzystanego fragmentu DNA. Ponadto, zastosowany układ katalityczny umożliwia przeprowadzenie tych reakcji w łagodnych warunkach w wodzie.

Z omawianych prac Feringi wynika, że enancjoselektywność reakcji Dielsa-Aldera, Friedla-Craftsa oraz addycji Michaela zależy od sekwencji i długości użytego DNA, aczkolwiek efekt ten jest mniej widoczny w reakcjach Friedla-Craftsa i Michaela, niż w reakcji Dielsa-Aldera. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że w większości omawianych reakcji (głównie Dielsa-Aldera i Friedla-Craftsa) największy nadmiar enancjomeryczny otrzymywano z wykorzystaniem oligonukleotydu o sekwencji: $d(\text{TCA GGG CCC TGA})_2$, jednak nie znaleziono optymalnej sekwencji DNA, której użycie dawałoby jak najwyższą enancjoselektywność przeprowadzanych procesów. Podsumowując, zarówno w reakcji Dielsa-Aldera, Friedla-Craftsa, jak również w addycji Michaela, DNA odgrywa podobną rolę. Ponieważ reakcje te

angażują strukturalnie różne kompleksy aktywujące, jest mało prawdopodobne, że stan przejściowy stabilizowany przez DNA jest głównym czynnikiem decydującym o przebiegu reakcji. Stąd hipoteza, że DNA wywiera wpływ na enecjoselektywność i szybkość tych reakcji. Jedynym wyjątkiem jest addycja Michaela nitrometanu, która to reakcja jest hamowana w obecności DNA, jednakże przyczyny takiego stanu rzeczy nie są do końca poznane.

Niniejszy przegląd powstał na podstawie pracy licencjackiej studentki Marty Sobczak wykonanej w Zakładzie Biologii Strukturalnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (kierowanym przez prof. dr hab. Lucynę Woźniak), której opiekunem była dr Małgorzata Bukowiecka-Matusiak.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K. Kruger, P.J. Grabowski, A.J. Zaug, J. Sands, D.E. Gottschlingand, T.R. Cech, *Cell*, 1982, **31**, 147.
- [2] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell*, 1983, **35**, 849.
- [3] D. Coquiere, B.L. Feringa, G. Roelfes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 9308.
- [4] G. Roelfes, A.J. Boersma, B.L. Feringa *Chem. Commun.*, 2006, 635.
- [5] A.J. Boersma, B.L. Feringa, G. Roelfes, *Ang. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 3346.
- [6] A.M. Thayer, *Chem. Eng. News*, 2008, **86**, 12.
- [7] E.N. Jacobsen, A. Pfaltz, *Comprehensive Asymmetric Catalysis*, 1999 Vol. 1–3, Berlin: Springer.
- [8] J. Steinreiber, T.R. Ward, *Coord. Chem. Rev.*, 2008, **252**, 751.
- [9] C. Letondor, A. Pordea, N. Humbert, A. Ivanova, S. Mazurek, M. Novic, T. Ward, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 8320.
- [10] M.T. Reetz, J.J.-P. Peyralans, A. Maichele, Y. Fu, M. Maywald, *Chem. Commun.*, 2004, 4318.
- [11] G. Klein, N. Humbert, J. Gradinaru, A. Ivanova, F. Gilardoni, U.E. Rusbandi, T.R. Ward, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 7764.
- [12] G. Roelfes, B.L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 323.
- [13] M. Bukowiecka-Matusiak, L.A. Woźniak, *Postępy Biochemii*, 2006, **52**, 229.
- [14] D. Coquiere, B.L. Feringa, G. Roelfes, *Angew. Chem. Int.*, 2007, **46**, 9308.
- [15] B.L. Feringa, G. Roelfes, *Angew. Chem. Int.*, 2005, **44**, 3230.
- [16] D.C. Rideout, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 7817.
- [17] S. Otto, J.B.F.N. Engberts, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 2645.
- [18] A.J. Boersma, J.E. Klijn, B.L. Feringa, G. Roelfes, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 11783.
- [19] T.B. Poulsen, K.A. Jørgensen, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2903.
- [20] a) B.M. Trost, C. Muller, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 2438; b) M. Rueping, B.J. Nachtsheim, S.A. Moreth, M. Bolte, *Angew. Chem.*, 2008, **120**, 603; c) D.A. Evans, K.R. Fandrick, H.-J. Song, K.A. Scheidt, R. Xu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 10029; d) D.A. Evans, K.R.Fandrick, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 2249; e) C. Palomo, M. Oiarbide, B.G. Kardak, J.M. Garca, A. Linden, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 4154; f) D.A. Evans, K.R. Fandrick, H.-J. Song, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 8942; g) J. Zhou, M.-C. Ye, Z.-Z. Huang, Y. Tang, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 1309.
- [21] M. Toyota, N. Ihara, *Nat. Prod. Rep.*, 1998, **15**, 327.
- [22] A.J. Boersma, B.L. Feringa, G. Roelfes, *Angew. Chem. Int.*, 2009, **48**, 2246.
- [23] E.W. Dijk, A.J. Boersma, B.L. Feringa, G. Roelfes, *Org. & Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 3868.
- [24] S. Kobayashi, K. Kakumoto, Y. Mori, K. Manabe, *Isr. J. Chem.*, 2004, **41**, 247.

-
- [25] Y. Hamashima, D. Hotta, N. Umebayashi, Y. Tsuchiya, T. Suzuki, M. Sodeoka, *Adv. Synth. Catal.*, 2005, **347**, 1576.
- [26] T.S. Huang, C.J. Li, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 2037.
- [27] N. Shibata, H. Yasui, S. Nakamura, T. Toru, *Synlett.*, 2007, 1153.

Praca wpłynęła do Redakcji 27 października 2011

