

Abb. 2. Ausschnitt aus der Struktur des Kristallverbandes von **1**. Die alternierenden Mn_4 -Einheiten und die verbrückenden Calcium- und Barium-Ionen sind dargestellt. Blick entlang der $O1b-O2b$ -Achse. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carboxylat-Sauerstoffatomen und den an die Calcium/Barium-Ionen gebundenen Wassermolekülen sind gestrichelt gezeichnet. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

Die biomimetische Aktivität unseres Modells eines S_0 -Zustands wurde mit H_2O_2 als Substrat geprüft [siehe auch Gl. (b)]. Der Komplex **1** zersetzt H_2O_2 katalytisch mit hohen Ausbeuten^[17]. Diese Reaktion legt nahe, daß **1** als *funktionalles* Modell für den S_0 -Zustand von PSII betrachtet werden kann. Die Zersetzung von H_2O_2 durch **1** stützt außerdem die „Dimer-eines-Dimers“-Beschreibung, da ja auch zweikernige Mn^{III} -Zentren unbekannter Koordination Bestandteil der aktiven Bereiche von Catalasen und Pseudocatalasen sind, deren hauptsächliche Funktion in vivo die Zersetzung von H_2O_2 ist^[1a, 18].

Experimentelles

268 mg (80.83 mmol) Ligand **1** wurden in 15 mL H_2O gelöst; mit einer äquimolaren Menge von $Ba(OH)_2$ und $Ca(OH)_2$ wurde der pH auf 7 eingestellt. Nach Zugabe von 406 mg (1.66 mmol) $Mn(OAc)_2 \cdot 4H_2O$, gelöst in 1 mL Methanol, wurde die Lösung unter Rühren auf pH 8.5 gebracht. Das Durchblasen von Luft oder die Zugabe von 1 mL 25% H_2O_2 (Vorsicht! Wärme- und Gasentwicklung!) erzeugt eine dunkelbraune Farbe. Kristalle wurden nach Zugabe von Dimethylformamid und anschließendem langsamen Eindampfen der Mischung erhalten.

Eingegangen am 28. Mai 1990 [Z 3985]

- [1] Nur die neuesten Arbeiten werden zitiert: a) K. Wieghardt, *Angew. Chem.* 101 (1989) 1179; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989) 1153; b) J. B. Vincent, G. Christou, *Adv. Inorg. Chem.* 33 (1989) 197; c) G. Christou *Acc. Chem. Res.* 22 (1989) 328; d) G. W. Brudvig, R. H. Crabtree, *Prog. Inorg. Chem.* 37 (1989) 99.
- [2] a) C. F. Yocum, C. T. Yerkes, R. E. Blankenship, R. R. Sharp, G. T. Babcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 7507; b) J. Amez, *Biochim. Biophys. Acta.* 726 (1983) 1; c) G. C. Dismukes in U. L. Schramm, F. C. Welder (Hrsg.): *Manganese in Metabolism and Enzyme Function*, Academic Press, London 1986, S. 275; d) G. Renger, *Angew. Chem.* 99 (1987) 660; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 643; e) G. W. Brudvig, *J. Bioenerg. Biomemb.* 19 (1987) 91.
- [3] B. Kok, B. Forbush, M. McGloin, *Photochem. Photobiol.* 11 (1970) 457.
- [4] H. T. Witt, O. Saygin, K. Brettel, E. Schlodder, *Prog. Photosynth. Res.* 1 (1987) 523.
- [5] A. Boussac, A. W. Rutherford, *Chem. Scr.* 28A (1988) 123 zit. Lit.
- [6] W. D. Frasch, R. Mei, *Biochem. Biophys. Acta.* 891 (1987) 8.
- [7] J. B. Vincent, C. Christmas, H.-R. Chang, Q. Li, P. D. W. Boyd, J. C. Huffman, D. N. Hendrickson, G. Christou, *J. Am. Chem. Soc.* 11 (1989) 2086.
- [8] **1**: $C_{26}H_{33}N_4O_{22}(Ba,Ca)_2Mn_4 \cdot xH_2O$. An Luft verlieren die rotbraunen Kristalle Wasser. $x = 10$. Elementaranalyse berechnet (beobachtet) [%]: Ca: 2.94(2.99); C: 22.93(22.70); H: 3.85(3.79); N: 4.11(4.19). Einkristall mit den Abmessungen $0.3 \times 0.3 \times 0.6$ mm, Raumgruppe $P2_1/m$ (Nr. 11), $a = 11.203(2)$, $b = 20.506(4)$, $c = 11.741(2)$ Å, $\beta = 98.12(1)^\circ$, $V = 2670(1)$ Å³, $Z = 2$; 6326 unabhängige Reflexe ($3^\circ < 2\theta < 55^\circ$), 3622 beobachtete Reflexe mit $I > 3\sigma(I)$, $R = 0.050$, $R_w = 0.062$, 427 Parameter. Anisotrope Verfeinerung der Nicht-Wasserstoffatome; H-Atome des Anions und einige Wasserstoffatome des Kristallwassers wurden über Differenz-Fourier-Synthesen lokalisiert und unabhängig isotrop verfeinert. Die erste

Kationlage ist teilweise mit Barium und Calcium besetzt. Die zweite Kationlage ist ausschließlich mit Calcium besetzt. Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Direktor des Cambridge Crystallographic Data Centre, University Chemical Laboratory, Lensfield Road, GB-Cambridge CB2 1EW unter Angabe des vollständigen Literaturzitats angefordert werden.

- [9] Kurze $O \cdots O$ -Abstände mit 2.5 ± 0.1 Å sind für Hydroxy-verbrückte mehrkernige Eisenkomplexe bekannt; a) F. A. Cotton, G. Wilkinson: *Advanced Inorganic Chemistry*, Wiley, New York 1988, S. 90; b) N. V. Gerbeleu, A. S. Batsanov, G. A. Timko, Y. T. Struchkov, K. M. Indrichan, G. A. Popovich, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 293 (1986) 364; c) D. L. Jameson, C.-L. Xie, D. N. Hendrickson, J. A. Potenza, H. J. Schugar, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 740; d) W. Micklitz, S. J. Lippard, *Inorg. Chem.* 27 (1988) 3069; e) A. S. Batsanov, Y. T. Struchkov, G. A. Timko, *Koord. Khim.* 14 (1988) 266.
- [10] Diese Methode wurde auch für einen vierkernigen $(\mu-Oxo)(\mu-acetato)Mn_4^{II}Mn_2^{III}$ -Komplex angewendet. Dabei wurde eine Reduktion mit 1.9(2) Elektronen beobachtet (berechnet 2.0)[11].
- [11] R. J. Kulawiec, R. H. Crabtree, G. W. Brudvig, G. K. Schulte, *Inorg. Chem.* 27 (1988) 1311.
- [12] Die Möglichkeit der Präsenz eines zweiten Protons im (Mn_2O_2H) -Kern wurde berücksichtigt; in diesem Fall würde **1** wahrscheinlich zwei Mn^{II} - und zwei Mn^{III} -Ionen enthalten. Ein Vergleich der Bindungslängen und -winkel mit bekannten zwei- und dreikernigen gemischtvalenten Komplexen läßt dies sehr unwahrscheinlich erscheinen. Auch sollten dann zwei statt drei Elektronen bei der Redox Titration erhalten werden. Trotzdem planen wir noch eine Neutronenbeugungsuntersuchung zur genauen Lokalisierung des (der) Protons (Protonen) im Kern.
- [13] Atomabstände werden häufig zur Festlegung der Oxidationsstufe III für Mangan benutzt. Siehe beispielsweise B. Chiswell, E. D. McKenzie, L. F. Lindoy in G. Wilkinson (Hrsg.): *Comprehensive Coordination Chemistry*, Pergamon Press, New York 1987 Bd. 4, S. 1.
- [14] U. Bossek, K. Wieghardt, B. Nuber, J. Weiss, *Inorg. Chim. Acta.* 165 (1989) 123.
- [15] M. Suzuki, T. Sugisawa, H. Senda, H. Oshio, A. Uehara, *Chem. Lett.* 1989, 1091.
- [16] Zur Untersuchung der Bedeutung der Gegenionen wurde die biologisch relevantere analoge Verbindung zu **1**, der reine Calcium-Komplex **2**, dargestellt. Einkristalle mit der Abmessung $0.1 \times 0.1 \times 0.3$ mm, quasi isomorph zu **1**: $a = 11.336(3)$, $b = 20.710(3)$, $c = 11.559(3)$ Å, $\beta = 98.51(4)^\circ$.
- [17] Geschwindigkeiten für die O_2 -Entwicklung [$mL s^{-1}$]: $MnCl_2$ 0.01; $Mn(OAc)_2$ 0.1; $Mn(TPP)(OAc)$ [TPP = Tetraphenylporphyrinato-Dianion] 0.05; **1** 4.0; festes MnO_2 0.25.
- [18] a) Y. Kono, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6015; b) G. S. Allgood, J. J. Perry, *J. Bacteriol.* 168 (1986) 563.

Nicht-radioaktiver DNA-Hybridisierungsnachweis durch DNA-Templat-vermittelte Bildung eines ternären Tb^{III} -Komplexes in rein flüssiger Phase

Von Andres Oser und Günther Valet*

Der spezifische Nachweis von Nucleinsäure-Sequenzen durch die Hybridisierungstechnik^[1] erfolgt in der Regel im heterogenen Zweiphasen-System, bei dem das zu untersuchende Nucleinsäurematerial auf eine feste Matrix fixiert und in einzelnen Teilschritten (Prähybridisierung, Hybridisierung, Waschungen, Detektion) mit verschiedenen Lösungen inkubiert wird^[2]. Homogene Hybridisierungsansätze in rein flüssiger Phase besitzen günstigere Hybridisierungskinetiken und machen zudem die Prähybridisierungs- und Waschschritte überflüssig, was eine wesentliche Vereinfachung darstellt und für automatisierte Verfahren von großem Interesse ist. Sie erfordern jedoch eine spezielle Markierung der Nucleinsäure-Sonden, so daß sich erst nach Hybridbildung mit der komplementären Sequenz ein meßbares Signal ergibt – zum Beispiel durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)^[3]. Nachfolgend wird ein solches System beschrieben, bei dem geeignete Paare von Oligo-

*] Prof. Dr. G. Valet, Dr. A. Oser
Max-Planck-Institut für Biochemie
D-8033 Martinsried

nucleotiden als Sondenmoleküle verwendet werden, die chemisch so modifiziert sind, daß sie nach Hybridisierung mit der Templat-Nucleinsäure einen ternären Tb^{III} -Komplex bilden. Nach Lichtanregung überträgt eine Salicylat-Gruppe des einen Oligonucleotids als Komplexligand die Anregungsenergie auf das Lanthanoid-Ion des zweiten Oligonucleo-

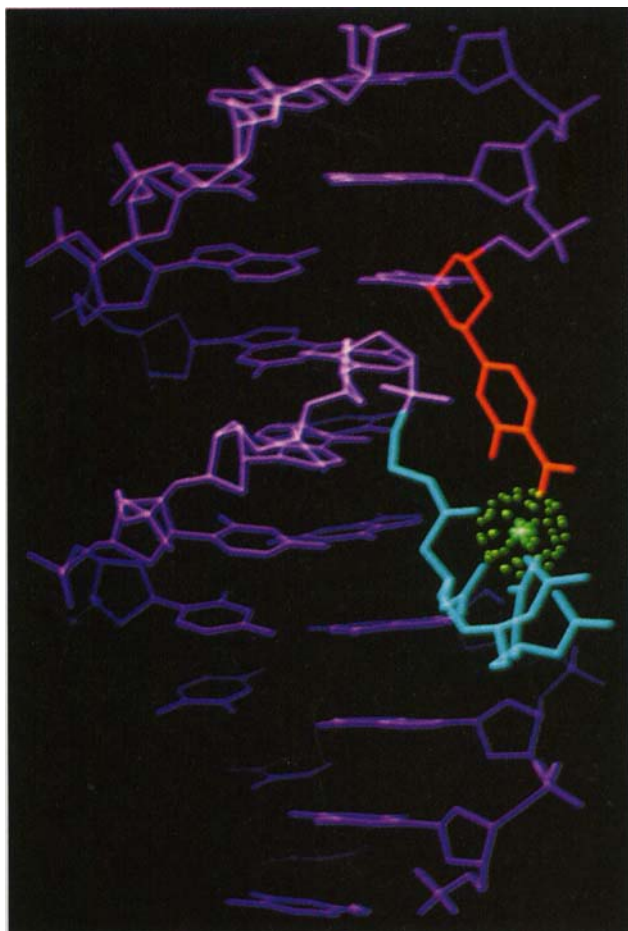
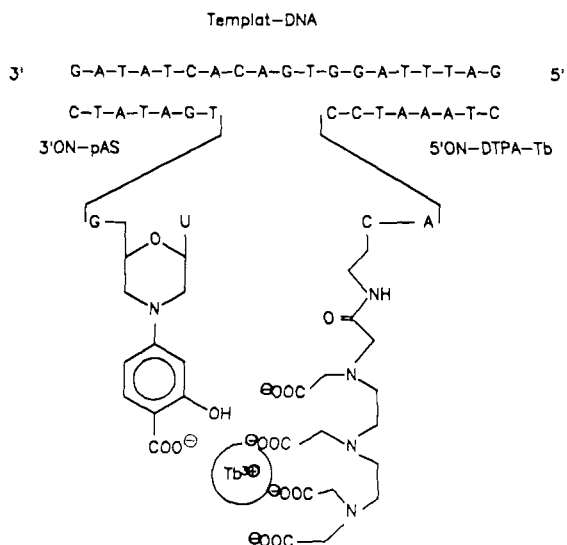


Abb. 1. Schematische (oben) und graphische (unten) Darstellung des Modellsystems zur homogenen Hybridisierung [6]. Die 3'-Endmarkierung des 9mers 3'ON mit pAS und die 5'-Endmarkierung des 10mers 5'ON mit DTPA-Tb sind vergrößert hervorgehoben. In der Graphik bedeutet rot = Salicylat-Rest mit Morpholino-Einheit, hellblau = DTPA, grünelb = Tb^{3+} und violett = B-DNA-Helix.

tids^[4], wonach eine für Tb^{3+} spezifische, langlebige Fluoreszenz emittiert wird.

Die chemischen Modifizierungen wurden so vorgenommen, daß das eine Oligonucleotid am 3'-Ende (3'ON) mit dem Energiedonor Salicylat (3'ON-pAS) und das andere Oligonucleotid am 5'-Ende (5'ON) mit einem Diethylentriaminpentaacetat(DTPA)-Liganden mit dem Energieacceptor und Fluoreszenzemitter Tb^{3+} (5'ON-DTPA-Tb) markiert waren (Abb. 1). Die Oligonucleotid-Sequenzen wurden dabei so gewählt, daß Energiedonor und -acceptor nach Hybridisierung an den komplementären DNA-Strang direkt benachbart waren^[5]. Die am DNA Templat stattfindende Komplexbildung aus DTPA-Tb einerseits und Salicylat andererseits ist gegenüber der Bildung eines ternären Komplexes in freier Lösung stark begünstigt (Abb. 1).

Die 3'-Endmarkierung von 3'ON mit 4-Aminosalicylsäure (pAS) lief nach etablierten Methoden der 3'-Endmarkierung von RNA-Molekülen über eine Periodat-Oxidation^[7] ab. Die Übertragung dieser 3'-Modifizierung auf DNA-Moleküle kann entweder enzymatisch^[8], oder – wie hier durchgeführt – chemisch^[3b, 9] durch das Einbringen einer 3'-terminalen Ribonucleotid-Einheit erfolgen. Die Periodat-Oxidation setzte dann am 3'-Riboserest eine Dialdehyd-Gruppe frei. Doppelte reduktive Aminierung dieser Dialdehyd-Gruppe mit pAS in Gegenwart von Cyanoborhydrid resultierte in einer Überführung der 3'-terminalen Ribose- in eine Morpholino-Einheit mit Salicylat-Rest (Abb. 1 oben).

Zur Markierung von 5'ON mit DTPA-Tb wurde das Oligonucleotid zunächst mit einem Aminoethyl-Linker am 5'-Terminus synthetisiert^[10]. DTPA-Dianhydrid diente dann zur kovalenten Verknüpfung von DTPA mit der primären Aminogruppe des Oligonucleotids^[11] und ermöglichte schließlich die stabile Komplexbildung von Tb^{3+} -Ionen ($K_a = 10^{23}$ ^[12]).

Abbildung 2 zeigt die Tb^{3+} -spezifischen Fluoreszenzwerte nach Hybridisierung des in konstanter Konzentration vorge-

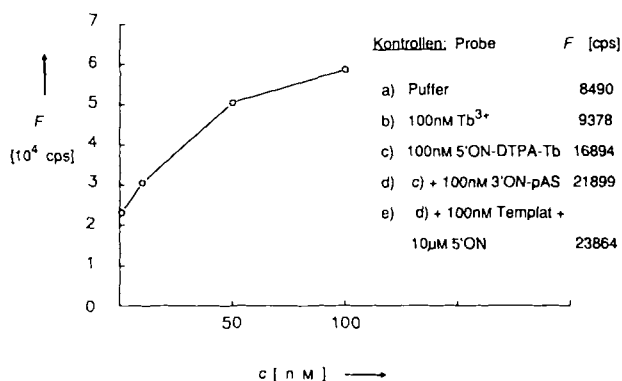


Abb. 2. Zeitverzögerte Tb^{3+} -Fluoreszenz F nach Hybridisierung des Oligonucleotid-Paares gegen steigende Konzentrationen c an Templat-DNA. Die Hybridisierung erfolgte für 30 min in 10 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl pH 8.0 in Gegenwart von 100 nM 3'ON-pAS und 100 nM 5'ON-DTPA-Tb bei 6°C. Anschließend wurde die zeitverzögerte Fluoreszenz in „counts per second“ (cps) mit einem Arcus-1230-Fluorometer (LKB-Wallac, Turku, Finnland) bei 400 µs Verzögerungs- und 400 µs Meßzeit bestimmt (Anregung 268–388 nm, Emission > 435 nm). Rechts in der Abbildung sind Werte von Kontrollproben angegeben.

gebenen Oligonucleotid-Paares 3'ON-pAS/5'ON-DTPA-Tb gegen steigende Konzentrationen komplementärer Templat-DNA in Lösung. Die Nachweisempfindlichkeit beträgt ein Picomol Templat-DNA in einem mL. Daß der detektierbare ternäre Komplex tatsächlich durch die Bindung des Oligonucleotid-Paares an die komplementäre DNA gebildet wird,

wird durch die Steigerung der Tb^{3+} -Fluoreszenz mit zunehmender Templat-DNA-Konzentration belegt (Abb. 2). Kontrollmessungen zeigen, daß die Energieübertragung kompetitiv durch einen Überschuß an nicht-markiertem 5'-Oligonucleotid hemmbar ist (Kontrolle e), was die Spezifität der Fluoreszenzanregung demonstriert. Die Kontrollversuche zeigen auch, daß die zeitverzögerte Hintergrund-Fluoreszenz nicht durch die direkte Anregung der Tb^{3+} -Ionen (Kontrolle b), sondern durch einen Energietransfer von Nucleotidbasen des 5'-ON-Oligonucleotids auf das komplexierte Tb^{3+} -Ion^[4a] erzeugt wird, die bereits vor der Hybridisierung meßbar ist (Kontrolle c).

Einen weiteren Beweis für die hybridisierungsabhängige Komplexbildung liefert die inverse Korrelation zwischen Hypochromizität und Steigerung der Tb^{3+} -Fluoreszenz bei der Abkühlung der Hybridisierungslösung – also beim Übergang vom denaturierten in den reassozierten Zustand des Templat/Oligonucleotidpaar-Systems (Abb. 3). Der

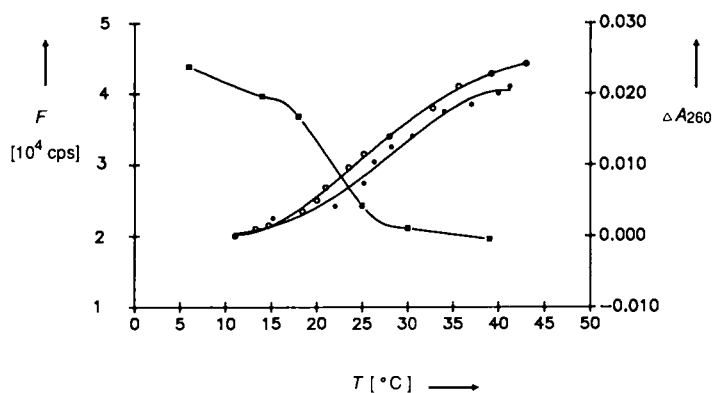


Abb. 3. Zeitverzögerte Fluoreszenz F (■—■) und Änderung der Absorption ΔA_{260} (●—●) des Systems Templat/3'ON-pAS/5'ON-DTPA-Tb (jeweils 100 nM) in Abhängigkeit von der Temperatur T in 10 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl pH 8,0. Über den Hypochromizitätsverlauf wurde ein T_m -Wert von 27°C ermittelt, wohingegen das System ohne 5'-Endmarkierung (Templat/3'ON-pAS/5'ON, ○—○) einen T_m -Wert von 26°C aufweist. Die T_m -Werte von 3'ON und 5'ON einzeln mit der Templat-DNA betragen 19,5 bzw. 20°C.

Schmelzpunkt des Templat/3'ON-pAS/5'ON-DTPA-Tb-Systems ist gegenüber einem System mit den gleichen Komponenten, jedoch ohne 5'-DTPA-Tb-Endmodifizierung, um etwa 1 K erhöht. Dies entspricht einer Enthalpieänderung und damit einem Stabilisierungsbeitrag von etwa $2,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ^[13]. Demnach wird die schon bei der Bindung zweier direkt benachbarter Oligonucleotide an ein komplexiertes Templat vorhandene positive Kooperativität^[14] durch die Chelatbildung weiter erhöht.

Die Abhängigkeit der Energietransfer-Effizienz vom Abstand der Oligonucleotidpaare wurde durch Verkürzung von 5'ON um ein Nucleotid untersucht. Die DTPA-Tb-Markierung befand sich dann am Adeninrest von 5'ON (siehe Abb. 1). Das Hybridisierungssignal bei gleicher Templat-Konzentration ging dabei um 54% zurück. Durch Verlängerung des Spacers zwischen 5'-Phosphatgruppe und DTPA-Tb-Chelat von einem Ethyl- auf einen Hexylarm^[15] konnte jedoch die ursprüngliche Energietransfer-Effizienz zu 88% wiederhergestellt werden.

Die Komplexbildung zwischen Energiedonor und -acceptor garantieren einen effizienteren Energietransfer im Vergleich zu einem System, in dem ein Energietransfer nur durch räumliche Nähe zwischen Donor und Acceptor stattfindet – wie dies in den bisher beschriebenen homogenen Hybridisierungsassays nach dem FRET-Prinzip der Fall ist^[3].

Ein weiterer Vorteil des pAS/Tb-Donor/Acceptor-Systems ergibt sich aus der *langlebigen* Tb^{3+} -Fluoreszenz mit einer Fluoreszenz-Lebensdauer von 1,58 ms^[4b], wodurch eine zeitverzögerte Fluoreszenzmessung^[16] ermöglicht wird. Die direkte, kurzlebige und vom Energietransfer-Prozeß unabhängige Donor- und Acceptor-Fluoreszenzemission trägt bei herkömmlichen FRET-Systemen zu einer beträchtlichen, unspezifischen Hintergrund-Fluoreszenz bei^[17]. Diese kann jedoch durch die Bestimmung der zeitverzögerten Fluoreszenz zuverlässig unterdrückt werden. Die DNA-Nachweismöglichkeit des hier beschriebenen Systems könnte durch günstigere Anregungs- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenz und durch Verwendung anderer Ligand/Lanthanoid-FRET-Systeme weiter gesteigert werden.

Neben einer allgemeinen Vereinfachung der Hybridisierungsprozedur gegenüber Zweiphasen-Systemen ist die beschriebene Methodik aufgrund der Notwendigkeit einer direkten Nachbarschaft der beiden Oligonucleotid-Sonden von besonderer Bedeutung für den schnellen Nachweis von Mutationen, Insertionen, Deletionen, Chromosomen-Translokationen oder Spleißstellen.

Experimentelles

Darstellung von 3'ON-pAS: 16 nmol 3'ON mit 3'-Ribouridyl-Einheit [3b, 9] wurden 2 h auf Eis mit 2 $\mu\text{mol NaIO}_4$ in 0,2 mL 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,75 behandelt. Nach Zugabe von 10 μL (90 μmol) Ethylenglycol und Sephadex-G-25-Chromatographie wurde das oxidierte 3'ON mit 4 μmol pAS und 4 μmol NaBH_3CN in 0,15 mL 0,2 M Natriumphosphat-Puffer pH 8,0 ca. 15 h inkubiert. Nach Sephadex-G-25-Reinigung wurde 3'ON-pAS mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (20%, 8 M Harnstoff) isoliert [18a].

Darstellung von 5'ON-DTPA-pAS: 160 nmol des 5'-Aminolink-funktionalisierten Oligonucleotids [10] wurden zweimal in 50 μL 0,2 M Kaliumhydrogencarbonat-Puffer pH 8,2 mit 4 μmol DTPA-Dianhydrid aus einer 0,2 M Lösung in wasserfreiem Dimethylsulfoxid versetzt. Nach Sephadex-G-25-Reinigung wurde das 5'ON-DTPA über Umkehrphasen-HPLC isoliert [18b] und mit einer äquimolaren Menge TbCl_3 versetzt.

Eingegangen am 25. Mai,
ergänzte Fassung am 20. August 1990 [Z 3981]

- [1] a) U. Landegren, R. Kaiser, C. T. Caskey, L. Hood, *Science* 242 (1988) 229; b) J. A. Matthews, L. J. Kricka, *Anal. Biochem.* 169 (1988) 1.
- [2] J. Meinkoth, G. Wahl, *Anal. Biochem.* 138 (1984) 267.
- [3] a) M. J. Heller, L. E. Morrison in D. T. Kingsburg, S. Falkow (Hrsg.): *Rapid Detection and Identification of Infectious Agents*, Academic Press, London 1985, S. 245; b) R. A. Cardullo, S. Agrawal, C. Flores, P. C. Zamecnik, D. E. Wolf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8790; c) J. Telsler, K. A. Cruickshank, L. E. Morrison, T. L. Netzler, C.-K. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 7226.
- [4] a) F. S. Richardson, *Chem. Rev.* 82 (1982) 541; b) M. P. Bailey, B. F. Rocks, C. Riley in T. T. Ngo (Hrsg.): *Nonisotopic Immunoassays*, Plenum, New York 1988, S. 187.
- [5] Da das FRET-Detektionsverfahren nur prinzipiell gezeigt werden sollte, wurden in einem Modellsystem nur kurze Oligonucleotide (9- bzw. 10-mer) verwendet. Für praktische Anwendungen sind längere Oligonucleotide mit höheren Schmelzpunkten (T_m) notwendig.
- [6] Das Molecular-Modeling-System bestand aus einer Evans-&-Sutherland-PS390-Workstation und den Graphik-Programmen „Helix“ (Dr. U. Heinemann, Institut für Kristallographie, Freie Universität Berlin) und „Insight“ (Biosym, München). Für die freundliche Unterstützung von Dr. J. Köhler (Genzentrum München) wird herzlich gedankt.
- [7] a) N. K. Kochetkov, E. I. Budovskii (Hrsg.): *Organic Chemistry of Nucleic Acids, Part B*, Plenum, New York 1972, S. 466; b) T. R. Booker, L. M. Augerer, P. H. Yeu, N. D. Hershey, N. Davidson, *Nucleic Acids Res.* 5 (1978) 363.
- [8] M. Lemaitre, B. Bayard, B. Lebleu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 648.
- [9] T. Tanaka, S. Tamatsukuri, M. Ikehara, *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 6265.
- [10] Zur Verwendung des Aminolink-1-Reagens 2-Methoxy-3-trifluoroacetyl-1,3,2-oxazaphosphacyclopentan siehe *Applied Biosystems User Bulletin* 38 (1986); Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.

- [11] Eine 5'-Endmarkierung von Oligonucleotiden mit Metallchelaten wurde zuerst beschrieben von: B. C. F. Chu, L. E. Orgel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 963.
- [12] T. Moeller, D. F. Martin, L. C. Thompson, R. Ferrus, G. R. Feistel, W. J. Randall, *Chem. Rev.* 65 (1965) 1.
- [13] Zur Bestimmung der T_m -Werte und Enthalpieänderungen siehe K. J. Breslau, J. M. Sturtevant, I. Tinoco Jr., *J. Mol. Biol.* 99 (1975) 549.
- [14] I. Tazawa, S. Tazawa, P. O. P. Ts'O, *J. Mol. Biol.* 66 (1972) 115.
- [15] Nach Funktionalisierung mit dem Aminolink-2-Reagens, siehe *Applied Biosystems User Bulletin* 49 (1988).
- [16] I. Wieder in W. Knapp, K. Holubar, G. Wick (Hrsg.): *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam 1978, S. 67.
- [17] L. E. Morrison, *Photochem. Photobiol.* 45 Suppl. (1987) 72 S.
- [18] a) R. Wu, N.-H. Wu, Z. Hanna, F. Georges, S. Narang in M. J. Gait (Hrsg.): *Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach*, IRL Press, Oxford 1984, S. 135; b) L. W. McLaughlin, N. Piel, *ibid.* S. 117.

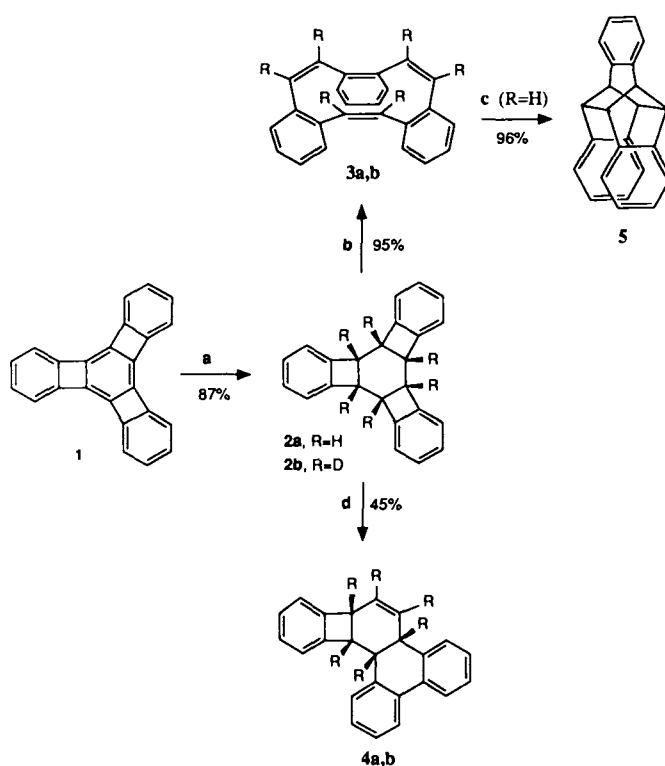
Leichte Hydrierung des zentralen Cyclohexatriens von Tris(benzocyclobutadien)benzol: Synthese und Struktur sowie thermische und photochemische Isomerisierung von all-cis-Tris(benzocyclobuta)cyclohexan**

Von Debra L. Mohler, K. Peter C. Vollhardt* und Stefan Wolff

Wir beschreiben die erste chemische Reaktion des Kohlenwasserstoffs **1**^[1], nämlich seine leichte und stereoselektive Hydrierung zu **2**, das nach einer Röntgenstrukturanalyse einen ungewöhnlichen, bindungsfixierten, planaren Cyclohexanring hat. Durch stereospezifische thermische Retrocyclisierung entsteht aus **2** ausschließlich das Hexaen **3**. Dieser Befund läßt, zusammen mit den dazugehörigen kinetischen Daten, auf einen bisher beispiellosen all-disrotatorischen Prozeß schließen^[2]. Demgegenüber führt die Bestrahlung von **2** über eine Umlagerung zunächst zum neuen Kohlenwasserstoff **4** und schließlich zu Phenanthren und Naphthalin, wohingegen **3** zu **5** photoisomerisiert (Schema 1). Die Ergebnisse erweitern wesentlich die Chemie des Benzocyclobuten-Gerüsts und des Tribenzo(CH)₁₂-Systems.

Die Hydrierung von **1** zu **2a** gelingt unter außergewöhnlich milden Bedingungen^[3], was dem hohen Grad der Bindungslagerung und der hohen Spannung in **1** zuzuschreiben ist. Das 2,3,6,7,10,11-Hexakis(trimethylsilyl)-Derivat von **1**^[1] war hingegen sogar bei erhöhtem Wasserstoffdruck (80 atm, THF, Pd-C) inert.

Die Stereochemie von **2a** wurde zunächst NMR-spektroskopisch ermittelt; dabei waren das Signal für die Protonen am zentralen Ring (ein Singulett bei $\delta = 4.19$) im ¹H-NMR und die vier Signale im ¹³C-NMR-Spektrum sowie die Analogie im Verhalten der entsprechenden angulären und linearen [3]Phenylene^[4] besonders wichtig. Nach einer Röntgenstrukturuntersuchung (Abb. 1)^[5] ist der zentrale Cyclohexanring planar, was durch die drei anellierten Benzocyclobuten-Einheiten verursacht wird. Der durchschnittliche Di-



Schema 1. a) H₂ oder D₂ (1 atm), Pd-C, THF, 18 h; b) C₆D₆, Bombenrohr, 125–160 °C; c) Et₂O, h ν (254 nm), –22 °C, 4.5 h; d) Et₂O, h ν (254 nm), –2 °C, 3.5 h.

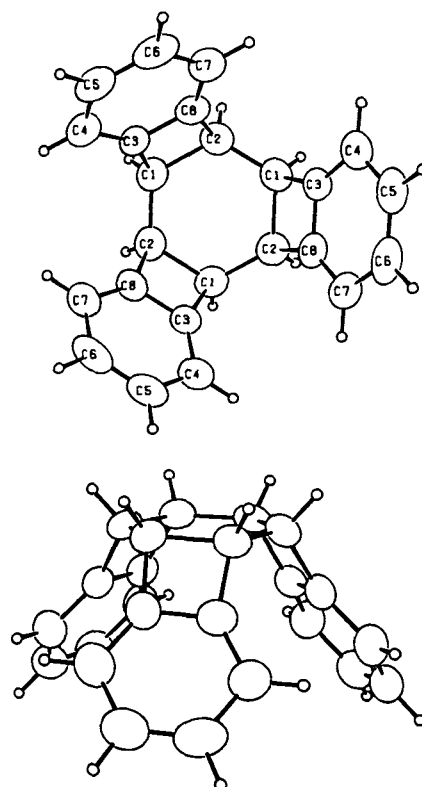


Abb. 1. Zwei Ansichten (von „oben“ und „von der Seite“) der Struktur von **2a** im Kristall (ORTEP). Ellipsoide mit 50% Wahrscheinlichkeit, Wasserstoffatome mit willkürlichem Radius. Ausgewählte Bindungslängen [Å] und -winkel [°]: C1–C2 1.599(4), C1–C2' 1.511(4), C1–C3 1.516(3), C2–C8 1.526(3), C3–C4 1.393(4), C3–C8 1.379(4), C4–C5 1.394(4), C5–C6 1.379(5), C6–C7 1.391(4), C7–C8 1.376(3); C2–C1–C2' 119.8(2), C2–C1–C3 85.6(2), C1–C2–C8 86.0(2), C4–C5–C6 122.2(3), C5–C6–C7 121.9(2), C6–C7–C8 116.1(3), C2–C8–C3 93.5(2), C3–C8–C7 122.5(2).

*] Prof. Dr. K. P. C. Vollhardt, D. L. Mohler, Dr. S. Wolff
Department of Chemistry, University of California at Berkeley
und

the Materials and Chemical Sciences Division
Lawrence Berkeley Laboratory
Berkeley, CA 94720 (USA)

**] Diese Arbeit wurde vom Office of Energy Research, Office of Basic Energy Sciences, Materials Science Division of the U.S. Department of Energy (Contract No. DE-ACO3-76 SF 00098) gefördert. S. W. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ein Postdoktoranden-Stipendium (1989/1990).