

Schema 2.

vorzugen die Spekulation A, nach der jedes Fullerenmolekül in einem Kronenmolekül lokalisiert ist: C_{60} im Körbchen.

Durch Kraftmikroskopie(AFM)-Messungen wurden noch einige unterstützende Hinweise erhalten. Monoschichten aus reinem **4** zeigen homogene, glatte Oberflächen. Überträgt man jedoch die $4/C_{60}$ -Mischung bei 25 mNm^{-1} , so erscheinen irreguläre Aggregate (ca. $1000 \times 200 \text{ \AA}$) auf den Monoschichten, die auf C_{60} -Mikrokristallite hinweisen. Diese Aggregate konnten auch im System $3/C_{60}$ (Abb. 6b) beobachtet werden, wenn beim gleichen Druck übertragen wurde (oberhalb des „Übergangsbereichs“ in Abb. 1). Fand der

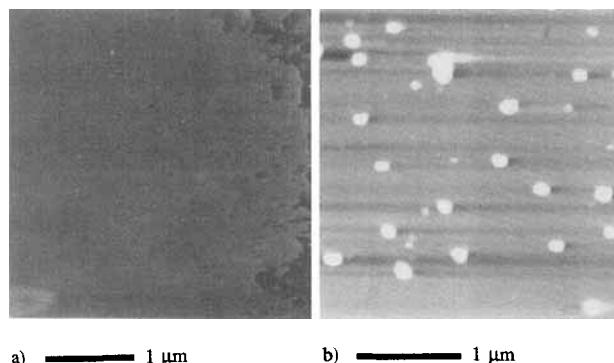


Abb. 6. Durch Kraftmikroskopie (AFM) erhaltene Aufnahmen einer Monoschicht von $C_{60}/3$ (1:1-Mischung) a) bei 5 mNm^{-1} übertragen, wobei ein glatter Film auf Mica sichtbar ist (rechts ist der Filmrand zu erkennen), b) bei 25 mNm^{-1} übertragen, mit Kristalliten auf dem Film.

Transfer der gemischten Monoschicht unterhalb des „Übergangsbereichs“ bei 5 mNm^{-1} statt, so ist die Oberfläche glatt, und in den AFM-Bildern sind keine Aggregate zu sehen (Abb. 6a). Dies kann auf eine gut gemischte Monoschicht bei niedrigem Druck hinweisen, bei der sich die C_{60} -Moleküle eventuell innerhalb der Kronenmoleküle befinden. Bei Drücken von $15-20 \text{ mNm}^{-1}$ findet eventuell eine Entmischung statt, was in einer Kristallisation der Fullerenen endet^[11, 12]. AFM-Messungen an Mischmonoschichten der Calixarene und hydrophobierten Cyclodextrine als „Körbchen“ werden zur Zeit durchgeführt^[17]. Das Verhalten ihrer Mono- und Multischichten stimmt gut mit den hier beschriebenen Ergebnissen der Azakronen/Fulleren-Mischungen überein.

Eingegangen am 5. Juni,
veränderte Fassung am 5. September 1992 [Z 5391]

- [1] Das Fullerenfieber (T. Braun, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 602–603; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 558–589) konnte nicht einmal durch Wasser gekühlt werden – was diese und andere Publikationen [2–4] über das Verhalten von C_{60} an der Luft/Wasser-Grenzfläche beweisen.
- [2] Y. S. Obeng, A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6279–6280.
- [3] T. Nakamura, H. Tachibana, M. Yumura, M. Matsumoto, R. Azumi, M. Tanaka, Y. Kawabata, *Langmuir* **1992**, *8*, 4–6.
- [4] J. Milliken, D. D. Dominguez, H. H. Nelson, W. R. Barger, *Chem. Mater.* **1992**, *4*, 252–254.
- [5] Druck-Flächen-Messungen wurden auf einem selbstgebauten, computer-gesteuerten Teflontröpfchen mit einer Oberfläche von ca. 180 cm^2 und einem

Langmuir-Druckaufnehmer durchgeführt. Der gemessene Flächenbedarf für Fulleren ist von der gespreiteten Menge abhängig und variiert zwischen ca. $70 \text{ \AA}^2/\text{Molek\text{u}l}^{-1}$ (Spreitvolumen: $0.14 \mu\text{L cm}^{-2}$ einer 0.1 mM konzentrierten Lösung) und ca. $25 \text{ \AA}^2/\text{Molek\text{u}l}^{-1}$ ($1.7 \mu\text{L cm}^{-2}$; 0.1 mM) im Falle von C_{60} . Für C_{70} wurden Flächen zwischen ca. $50 \text{ \AA}^2/\text{Molek\text{u}l}^{-1}$ ($0.14 \mu\text{L cm}^{-2}$; 0.1 mM) und ca. $25 \text{ \AA}^2/\text{Molek\text{u}l}^{-1}$ ($1.7 \mu\text{L cm}^{-2}$; 0.1 mM) erhalten. Dieses Verhalten ändert sich mit der Trogdimension und ist höchst wahrscheinlich durch Kristallisation und Kollaps des Films am Wasser-Teflon-Rand bedingt.

- [6] Ein γ -Cyclodextrin/ C_{60} -Komplex ist schon von T. Anderson, K. Nilsson, M. Sundahl, G. Westman und O. Wenerström (*J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 604–606) beschrieben worden.
- [7] V. Böhmer, F. Diederich, J. Effing, U. Jonas, L. Jullien, T. Plesnivy, H. Ringsdorf, W. Vogt, unveröffentlicht.
- [8] Die alkalierte Hexaazakrone **3** und die acylierte Octaazakrone **4** wurden in Form einer 0.1 mM -Lösung der reinen Kronenverbindungen in Benzol bei 20°C auf einer Wassersubphase (destilliert, Millipore-gefiltert, $18 \text{ M}\Omega\text{cm}$) gespreitet. Der in [5] beschriebene Trog wurde zum Spreiten von 50 oder $100 \mu\text{L}$ bei den verschiedenen Messungen benutzt. Die 1:1-Mischungen wurden durch Zusammengießen gleicher Volumina der Fulleren- und Kronenlösung (beide 0.1 mM in Benzol) hergestellt. Um die gleiche Oberflächendichte der Kronenverbindung zu gewährleisten, wurden 100 und $200 \mu\text{L}$ dieser 1:1-Mischungen gespreitet. Aufgrund der Annahme, daß sich die Fulleren innerhalb der Krone befinden, wurden alle Flächenberechnungen auf die Kronenkonzentration bezogen.
- [9] An den LB-Filmen (etwa 17 Doppelschichten auf Quarzträgern) wurde Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) mit einem θ - 2θ -Goniometer von Siemens durchgeführt.
- [10] Die langwellige Absorption zwischen 400 und 480 nm , verursacht durch C_{60} -Aggregation, ist relativ intensiv und darf nicht mit den schwachen Banden zwischen 500 und 600 nm einer homogenen Fullerenlösung (violette Farbe!) verwechselt werden. Argumente, die dafür sprechen, daß die relativ starke Absorption bei $400-480 \text{ nm}$ auf eine C_{60} -Aggregation zurückzuführen ist, finden sich zum einen in einem Vergleich des Spektrums einer Hexalösung (H. Ajie, M. M. Alvarez, S. J. Anz, R. D. Beck, F. Diederich, K. Fostiropoulos, D. R. Huffman, W. Krätschmer, Y. Rubin, K. E. Schriver, D. Sensharma, R. L. Whetten, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 8630) mit dem eines kondensierten C_{60} -Films (W. Krätschmer, L. D. Lamb, K. Fostiropoulos, D. R. Huffman, *Nature* **1990**, *347*, 354–358), zum anderen ändert sich das normale Lösungsspektrum einer C_{60}/CHCl_3 -Lösung mit C_{60} -Bodensatz nach einer Ultraschallbehandlung: Man erhält das Spektrum von kondensiertem C_{60} (Suspension von C_{60} -Aggregaten, braune Farbe).
- [11] In Kooperation mit Dr. Lifeng Chi und Dr. Harald Fuchs (BASF Aktiengesellschaft) in Luft mit einem kommerziell erhältlichen Kraftmikroskop (AFM, Park Scientific Instruments) gemessen.
- [12] In Kooperation mit Dr. Christoph Gerber und Dr. Bruno Michel (IBM-Research Laboratories Rüschlikon, Schweiz) in Luft mit einem kommerziell erhältlichen Kraftmikroskop (Nanoscope III, Scientific Instruments) gemessen.

DNA-Erkennung durch makrocyclische Oligoether-Oligodesoxynucleotid-Hybridverbindungen**

Von Squire Rumney IV und Eric T. Kool*

Die sequenzspezifische Bindung synthetischer Oligonucleotide und Analoga an RNA und DNA wird zur Untersuchung natürlich vorkommender Polynucleotide und zur Entwicklung potentieller Therapeutica intensiv erforscht^[1–3]. Natürliche DNA-Oligomere haben bei diesen Anwendungen zwei Nachteile: ihre niedrige Bindungsaffinität^[2] und ihre begrenzte Stabilität, die auf die in natürlichen Systemen auftretende Spaltung durch Exo- und Endonukleasen zurückzuführen ist^[4, 5]. Hier berichten wir über den Aufbau cyclischer Hybridmoleküle mit zwei Oligonucleotidbereichen, die von zwei Oligoethylenglycol-Ketten verbrückt werden. Diese

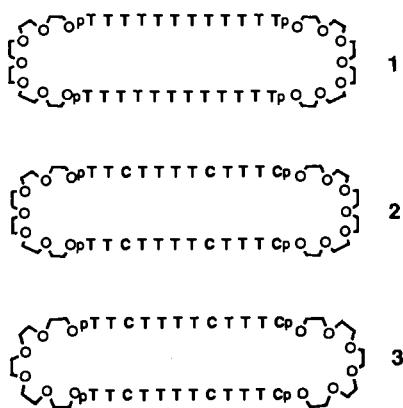
[*] Prof. E. T. Kool, Squire Rumney IV
Department of Chemistry, University of Rochester
Rochester, NY 14627 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde in Teilen durch ein Stipendium der National Institutes of Health (R01-GM46625) gefördert. E. T. K. dankt für Stipendien von den Young Investigator Programs des Office of Naval Research (1992–1995) und von der Arnold and Mabel Beckman Foundation (1992–1994).

Moleküle binden mit hoher Affinität an komplementäre Strände von RNA und DNA und sind gegen Nucleasen außergewöhnlich widerstandsfähig. Oligoethylenglycol-Ketten wurden schon früher verwendet, um Nucleotideinheiten sowohl in linearen^[6] wie auch in haarnadelförmigen Oligonucleotiden zu ersetzen, wobei mit Oligonucleotiden Doppel- und Tripelhelices gebildet werden^[7]. Wir wollten untersuchen, ob solche „Spacer“ in cyclische Verbindungen eingebaut werden können und wie sich dies auf ihr Erkennungsvermögen und ihre Stabilität auswirkt. Wir haben bereits früher gezeigt, daß cyclische Oligonucleotide eine sehr starke Bindungsaffinität^[8] und hohe Sequenzselektivität^[9] für Einzelstrang-DNA und -RNA aufweisen; diese Makrocyclen lagern sich unter Tripelhelixbildung an zwei Seiten eines linearen Oligonucleotidstranges an. Ihr ungewöhnliches Erkennungsvermögen beruht auf der präorganisierten cyclischen Struktur^[10].

Aus der Untersuchung von Modellen^[11] und veröffentlichten Daten von DNA-Triplehelices^[12] ging hervor, daß eine ungefähr 19–21 Å lange Gruppe ideal wäre, um die äußeren Pyrimidinstränge zu überbrücken, und daß Nucleotidschleifen aus fünf Basen durch Penta- oder Hexaethylenglycol-Ketten ersetzt werden könnten. Neben der Bestätigung unseres Bindungsmodells könnte ein solcher Ersatz zu günstigen Eigenschaften wie niedrigeren Kosten und höheren Syntheseausbeuten (durch weniger Nucleotideinheiten), längerer Lebensdauer in biologischem Milieu und möglicherweise besserer Membranpermeabilität (durch Verminderung der negativen Gesamtladung) führen.

Die linearen Vorstufen der hier untersuchten Verbindungen 1–3 wurden durch automatische DNA-Synthese aufgebaut^[1,3], wobei in zwei Positionen Dimethoxytrityl-



hexa- oder -pentaethylenglycol(HEG bzw. PEG)phosphoramidit^[7] eingebaut wurde. Die Oligomere d(A)₁₂ (für **1**) und dAAGAAAAGAAAG (für **2** und **3**) wurden bei der Cyclisierung als Template eingesetzt, um die reaktiven Phosphat- und Hydroxy-Endgruppen in die für eine intramolekulare Veresterung in Gegenwart von BrCN, Imidazol und NiCl₂ geeignete Orientierung zu bringen^[10].

Um die Bindung der Makrocyclen an ihre komplementären 12-Basen-Oligonucleotide zu untersuchen, wurden bei einer Konzentration von $3 \mu\text{M}$ in annähernd physiologischer Pufferlösung (pH 7.0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) thermische Denaturierungsversuche durchgeführt (Tabelle 1). Die Dissoziationskurven zeigen für beide Komplexe scharfe, Zweistufen-Übergänge und ähnliche Hyperchromien mit einem Mittelwert von 28% bei 260 nm. „Mischkurven“, in denen die Absorption (bei 260 nm) gegen das Molverhältnis beider Komplexe aufgetragen wird, bestätigen eine 1:1-Bin-

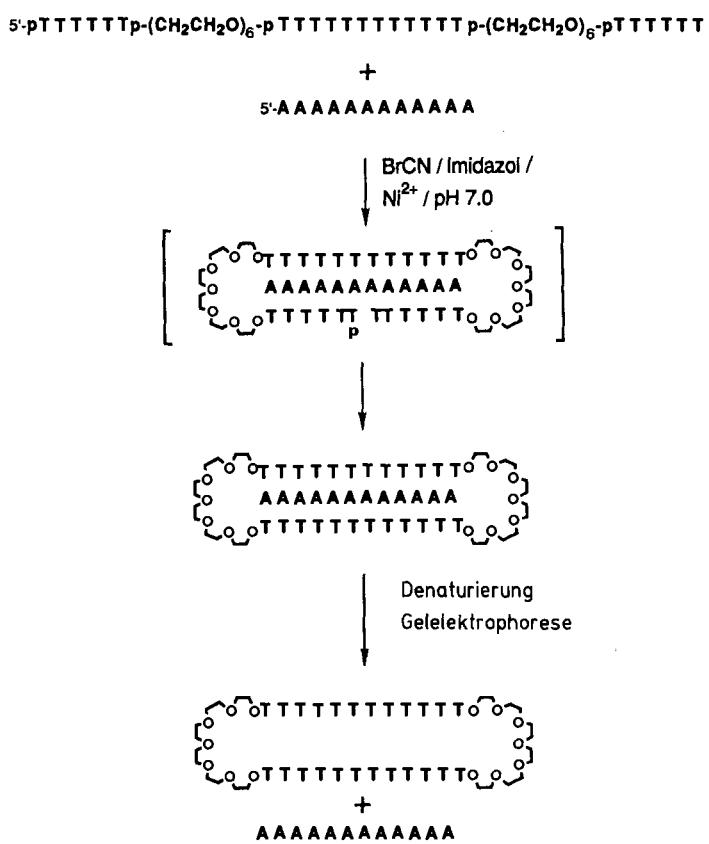


Tabelle 1. Schmelztemperaturen (T_m) und Freie Komplexierungsenergien (ΔG_{37}°) für lineare Doppelhelices und Komplexe aus Oligonucleotid und cyclischen Ether-DNA-Hybrid-Verbindungen.

Komplex [a]	T_m [°C] [b,c]	$-\Delta G_{37}^\circ$ [kcal mol $^{-1}$]
T T T T T T T T T T T T A A A A A A A A A A A A	37	8
pT T T T T T T T T T T T p A A A A A A A A A A A A HEG pT T T T T T T T T T T T p	51	15
T T C T T T C T T T C A A G A A A A G A A A G	42	10
pT T C T T T C T T T C p A A G A A A A G A A A G PEG -pT T C T T T C T T T C p	53	15
pT T C T T T C T T T C p A A G A A A A G A A A G HEG -pT T C T T T C T T T C p	58	17

[a] HEG und PEG stehen für Hexa- bzw. Pentaethylenglycol. [b] Die Daten wurden bei pH 7.0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ und Oligomerkonzentrationen von 3 μ M (pro Strang) gemessen. [c] Die Genauigkeit der T_m -Werte beträgt $\pm 1^{\circ}$ C, die der Freien Energien $\pm 10\%$.

dungsstöchiometrie, die mit der Struktur einer bimolekularen Tripelhelix in Einklang ist. Das aus **1** und $d(A)_{12}$ entstehende Addukt hat eine Schmelztemperatur (T_m) von 51 °C, die damit um 14 K höher ist als die der entsprechenden Watson-Crick-Doppelhelix $d(A)_{12} \cdot d(T)_{12}$ ^[8] (Tabelle 1). Die Kurvenanpassungsanalyse^[14] ergibt eine Gibbs-Energie ΔG° (37 °C) von $-15 \text{ kcal mol}^{-1}$ für den Komplex aus **1** und $d(A)_{12}$, der damit um 7 kcal mol^{-1} günstiger ist als die Doppelhelix. Auf ähnliche Weise entsteht aus **2** und seinem komplementären Oligonucleotid eine Verbindung mit $T_m = 58^\circ\text{C}$ ($\Delta G^\circ_{37} = -17 \text{ kcal mol}^{-1}$); die analoge

Doppelhelix weist entsprechende Werte von 42°C bzw. $-10 \text{ kcal mol}^{-1}$ auf.

In beiden Fällen ist daher die Bindung durch die Makrocyclen wesentlich stärker als eine einfache Watson-Crick-Bindung derselben Sequenzen und liefert Gleichgewichtsbindungsconstanten (K_{ass}), die bei 37°C um etwa fünf Größenordnungen über denen der Doppelhelices liegen. Ein Vergleich mit den Nucleotidschleifen enthaltenden all-DNA-Analoga zeigt, daß die synthetischen Hybridmakrocyclen nur wenig schwächer binden. Beispielsweise bildet das Analogon von **1** mit Schleifen aus fünf Basen (Sequenz -CACAC-) unter identischen Bedingungen eine Verbindung mit $T_m = 57^{\circ}\text{C}$ ($\Delta G_{37}^{\circ} = -16 \text{ kcal mol}^{-1}$)^[8]. Die geringe Abnahme dieser Werte durch den Einbau der HEG-Kette könnte auf ihre größere Flexibilität verglichen mit einer mehr rotationsgehinderten Nucleotidkette zurückzuführen sein. Die Tatsache, daß dieser Effekt gering ist, stützt auch das Modell der „Kreisbindung“^[10], nach dem die Schleifen hauptsächlich zur Überbrückung und nicht für andere, spezifischere Wechselwirkungen benötigt werden.

Die Analyse von Modellen^[11] und Faserbeugungsdaten^[12] ergab, daß eine Brücke zwischen den äußeren Pyrimidinsträngen bei einer beliebigen Basentriade in einer DNA-Tripelhelix ca. 20 Å lang sein muß. Nach Molekülmodellierungsstudien hat HEG-Monophosphat in seiner gestreckten Konformation eine Länge von 23 Å, während Pentaa- und Tetraethylenglycol(TEG)-monophosphat 19 bzw. 16 Å lang sind. Um zu prüfen, ob die oben genannte Längenansforderung gilt, synthetisierten wir Varianten von **2** mit diesen kürzeren Spacern. Schmelzuntersuchungen am Komplex des PEG-überbrückten Makrocyclus **3** mit dem komplementären Oligonucleotid zeigen, daß dieser Komplex etwas weniger stabil ist als die entsprechende HEG-Verbindung ($T_m = 53^{\circ}\text{C}$, d. h. 5 K niedriger als T_m des Addukts von **2**). Versuche, einen TEG-enthaltenden Makrocyclus aufzubauen, schlugen fehl; anscheinend ist diese Brücke zu kurz, um bei der Cyclisierung die zur vollständigen Komplexierung des 12-Basen-Templats erforderliche Distanz zu überspannen. Von den drei untersuchten Spacern ist die Hexaethylenglycol-Einheit zur Komplexierung am besten geeignet, und die Spacelänge von 23 Å ist in Einklang mit bekannten Modellen für die Struktur einer Tripelhelix^[11].

Die Hauptursache für den Abbau von DNA-Standardoligomeren bei biologischen Anwendungen ist die in den Zellen vorhandene 3'-Exonuclease-Aktivität^[4, 5]. Außerdem wurden auch Endonucleasen mit geringer Aktivität nachgewiesen, die DNA-Oligomere an den inneren Phosphodiester-Bindungen abbauen^[2]. Versuche zur Spaltung von **1** und **2** durch Exonucleasen bestätigen, daß sie aufgrund ihrer cyclischen Strukturen völlig resistent sind. Die linearen Vorstufen von **1** und **2** werden von Exonucleasen nur bis zu den Oligoether-Einheiten gespalten, die von den Enzymen anscheinend nicht erkannt werden.

Um die Empfindlichkeit solcher makrocyclischer DNA-Verbindungen gegenüber einem Abbau im biologischen Milieu zu untersuchen, inkubierten wir die Verbindung **2** und sein all-DNA-Analogon in frischem Humanserum bei 37°C , entnahmen periodisch aliquote Proben und analysierten die Integrität der Strukturen durch Gelelektrophorese. Für die lineare Variante dieser Sequenz wurde als Halbwertzeit der Spaltung 20–30 min ermittelt, während die beiden cyclischen Verbindungen nach zwei Tagen keine Anzeichen einer Spaltung aufwiesen. Cyclische Oligomere sind somit in diesem Milieu sehr resistent, und Exonucleasen scheinen im Serum – wie bekannt – die Hauptspaltungsenzyme zu sein.

Die Empfindlichkeit gegenüber Endonucleasen untersuchten wir genauer anhand der Spaltung von **2** durch Nuclease S1, ein Enzym, das einsträngige DNA spezifisch ab-

baut. Die Ergebnisse verglichen wir mit denen für das aus 34 Basen bestehende all-DNA-Analogon (Tabelle 2). Die Prüfung der Empfindlichkeit gegenüber einem Abbau wurde

Tabelle 2. Empfindlichkeit von synthetischer cyclischer DNA und DNA-Ether-Verbindungen gegenüber dem Abbau durch Staphylokokken-Endonuclease (S1) in Abwesenheit und in Gegenwart der komplementären Oligonucleotidsequenz.

Oligomer(e) [a]	Nuclease-Spaltung $t_{1/2}$ [min]
	1
	20
	1
	> 24 h

[a] Hexaethylenglycol-Schleifen sind mit HEG abgekürzt.

mit beiden Oligomeren sowohl allein als auch in Gegenwart eines bindenden Oligonucleotids durchgeführt, da hier Sekundärstrukturen, z.B. Tripelhelices, gebildet werden, die von Enzymen nicht erkannt werden und somit zusätzliche Resistenz induzieren.

Die Versuche zeigen, daß beide Makrocyclustypen durch Einzelstrang-Endonuclease gespalten werden (Tabelle 2). Sowohl lineare als auch cyclische Sequenzen haben die gleichen Spaltungsgeschwindigkeiten (Daten hier nicht angegeben). Die beiden cyclischen Oligomere sind gegenüber einer Spaltung deutlich widerstandsfähiger, wenn sie an ihre komplementären Oligonucleotide gebunden sind. Dies ist offenbar auf die Tatsache zurückzuführen, daß die Komplexe einer tripelhelicale Sekundärstruktur haben. Wichtiger ist aber der Befund, daß die all-DNA-Verbindungen auch noch in gebundener Form – wenn auch langsamer – gespalten wird, während wir für den DNA-Oligoether **2** nach 24 h Inkubation keinen Hinweis auf eine Spaltung finden. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Strukturen der beiden Komplexe zurückzuführen: in der all-DNA-Verbindung sind auch im Komplex noch einzelsträngige spaltbare Nucleotide exponiert, während in **2** kein einzelsträngiger DNA-Bereich in das Lösungsmittel ragt. In Gegenwart bindender Strukturen sind Verbindungen wie **1–3** wahrscheinlich keine Substrate für irgendeine Art von Exo- oder Endonucleasen und vermutlich auch bei Diffusion durch das Serum stabil. Die Kombination dieser Stabilität mit hoher Bindungsaffinität macht solche Verbindungen attraktiv für die Verwendung in biologischen Systemen.

Experimentelles

Verbindung **1** wurde aus der linearen Vorstufe 5'-pTTTTTTTpO-(CH₂CH₂O)₆-pTTTTTTTTTpO-(CH₂CH₂O)₆-pTTTTTT. Verbindung **2** wurde aus 5'-pTTTCTTpO-(CH₂CH₂O)₆-pTTCTTTCTTTCpO-(CH₂CH₂O)₆-pCTTCT und **3** aus 5'-pTTTCTTpO-(CH₂CH₂O)₆-pTTCTTTCTTTCpO-(CH₂CH₂O)₆-pCTTCT hergestellt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den bereits früher beschriebenen [10]. Der Umsatz zum Makrocyclus lag in beiden Fällen bei 85–95% (nach Gelanalyse), die cyclischen Produkte wurden durch präparative Gelelektrophorese in 43% (**1**), 48% (**2**) und 24% (**3**) Ausbeute isoliert. Die Ringstruktur wurde bestätigt durch die völlige Resistenz gegenüber einer Spaltung durch T4-Polymerase(Exonuclease) unter Bedingun-

gen, bei denen die linearen Vorstufen bis zur Etherbrücke vollständig abgebaut werden. Dimethoxytrityl-HEG- und PEG-Phosphoramidite wurden nach der Methode von Thuong et al. [7] synthetisiert. Die Ausbeuten für die Verknüpfungen dieser Bindeglieder liegen bei > 90 %. Der intakte Einbau der HEG- und PEG-Spacer nach abschließender Entblockierung wurde auch durch ^1H -NMR- und FAB-MS-Untersuchungen an kurzen Oligomeren mit der Sequenz dTpO-(CH₂CH₂O)_n-pT bestätigt.

Thermische Denaturierungen und Kurvenanpassung erfolgten wie beschrieben [10]. Mischungsversuche wurden mit einer Gesamtkonzentration von 6 μM in einer Pufferlösung aus 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ und 10 mM Tris · HCl bei pH 7.0 durchgeführt. Die Exonuclease-Spaltung erfolgte bei 37 °C mit 20 μM DNA, 6 mM MgCl₂, 4 mM Kaliumphosphat (pH 7.5) und 55 Einheiten pro mL des Enzyms T4-Polymerase von den New England Biolabs. Nuclease S1 wurde von Pharmacia bezogen. Spaltungsreaktionen wurden mit einer Konzentration von 100 mM DNA und 100 U mL⁻¹ Enzym unter beschriebenen Pufferbedingungen [15] durchgeführt. Menschliches Serum wurde nach bekanntem Verfahren [4] hergestellt, Spaltungen erfolgten bei 37 °C und einer Strang-Konzentration von 50 μM DNA und wurden gelektrophoretisch analysiert.

Eingegangen am 1. August 1992 [Z 5495]

- [1] J.-J. Toulié, C. Hélène, *Gene* **1988**, *72*, 51–58.
- [2] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543–584.
- [3] J. S. Cohen, (Hrsg.: *Oligodeoxynucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1989).
- [4] J. M. Dagle, D. L. Weeks, J. A. Walder, *Antisense Res. Dev.* **1991**, *1*, 11–20.
- [5] P. C. Zamecnik, J. Goodchild, Y. Taguchi, P. S. Sarin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, *83*, 4143–4146.
- [6] S. T. Cloyd, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6324–6326.
- [7] a) M. Durand, K. Chevrie, M. Chassignol, N. T. Thuong, J. C. Maurizot, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 6353–6359; b) C. Giovannangeli, T. Montenay-Garestier, M. Rougée, M. Chassignol, N. T. Thuong, C. Hélène, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *113*, 7775–7776.
- [8] G. Prakash, E. T. Kool, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1134–1136.
- [9] E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6265–6266.
- [10] G. Prakash, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3523–3527.
- [11] S. C. Harvey, J. Luo, R. Lavery, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 11795–11809.
- [12] S. Arnott, E. Setsing, *J. Mol. Biol.* **1974**, *88*, 509–533.
- [13] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859–1862.
- [14] M. Petersheim, D. H. Turner, *Biochemistry* **1983**, *22*, 256–263.
- [15] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NJ, USA, 1989.

Geschwindigkeitskonstanten für den Angriff von Carbenium-Ionen an Arene – eine Brücke zwischen der Chemie aliphatischer und aromatischer π -Systeme**

Von *Herbert Mayr*, Jörg Bartl und Gisela Hagen*

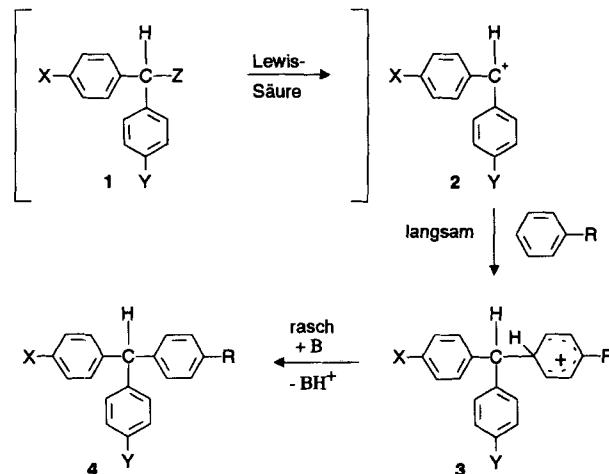
Professor *Klaus Hafner* zum 65. Geburtstag gewidmet

Friedel-Crafts-Alkylierungen gehören zu den mechanistisch am besten untersuchten Reaktionen der Organischen Chemie^[1], und zahllose Untersuchungen befassten sich mit der Bestimmung relativer Reaktivitäten unterschiedlich substituierter Arene^[2]. Erstaunlicherweise sind absolute Geschwindigkeitskonstanten für den Angriff von Carbenium-Ionen an Arene, den Schlüsselschritt dieser Reaktionen, bisher kaum verfügbar. Einige Untersuchungen über den Angriff Metall-koordinierter Carbenium-Ionen an stark aktivierte Arene^[3] sowie die kürzlich hier publizierten Studien mit laserblitzphotolytisch generierten Fluorenyl-Kationen^[4a] sind unseres Wissens die bisher einzigen Quellen für solche Daten^[4b].

[*] Prof. Dr. H. Mayr, Dr. J. Bartl, Dr. G. Hagen
Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule
Petersenstraße 22, W-6100 Darmstadt

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

Wir berichten nun, daß die von uns verwendete Methode^[5] zur Bestimmung der Nucleophilie aliphatischer π -Systeme auch auf Arene übertragen werden kann. Wie früher beschrieben^[5], erzeugen wir durch quantitative Ionisation von Diarylhalogenmethanen **1** mit Lewis-Säuren farbige Lösungen von Diarylcarbenium-Ionen **2**, deren Entfärbung bei Zusatz von Nucleophilen photometrisch verfolgt wird (Schema 1). Methoxy-substituierte Benzolderivate sind so reaktiv,



Schema 1. X, Y, Z siehe Tabelle 1.

daß die Kinetik ihrer Reaktionen mit den Donor-substituierten Benzhydryl-Kationen **2** ($X = \text{OCH}_3$, $Y = \text{H}$, OCH_3) problemlos studiert werden kann. Da Alkoxy-substituierte Arene mit den üblicherweise zur Ionisation (**1** \rightarrow **2**) eingesetzten Lewis-Säuren BCl_3 , TiCl_4 oder GaCl_3 Komplexe bilden, verwenden wir in diesen Fällen Trimethylsilyl triflat Me_3SiOTf zur Ionisation der Diarylchlor- und Diarylfluoromethane. Die Reaktionen der Arene mit den so erzeugten Benzhydryl-Kationen folgen einem Geschwindigkeitsgesetz 2. Ordnung (1. Ordnung nach Ar_2CH^+ , 1. Ordnung nach Aren). Die Reaktionsgeschwindigkeit ist von der Konzentration von Me_3SiOTf (im Überschluß) unabhängig, so daß eine Koordination zwischen Me_3SiOTf und dem Sauerstoffatom der Arylethereinheit ausgeschlossen werden kann.

Um das stark elektrophile Bis(*p*-chlorphenyl)carbenium-Ion zu erzeugen, das mit Benzol und seinen Methylderivaten umgesetzt wurde, setzten wir die starke Lewis-Säure GaCl_3 ein. Allerdings sind bei Ionenkonzentrationen $\leq 10^{-4}$ mol L⁻¹ komplexe Geschwindigkeitsgesetze zu beobachten, die wir durch einen teilweise reversiblen Alkylierungsschritt deuten. In Einklang damit ist, daß durch Zusatz von Benzyltriethylammonium-tetrachlorogallat (10^{-3} – 10^{-2} mol L⁻¹) die Reaktion beschleunigt wird und wiederum eine Kinetik 2. Ordnung vorliegt, weil nun bei der erhöhten Konzentration des als Base fungierenden GaCl_4^- -Ions^[6] das intermediäre Benzenium-Ion rasch deprotoniert wird. Die Irreversibilität des C-C-Verknüpfungsschrittes unter diesen Bedingungen wird durch das Fehlen eines primären kinetischen Isotopie-Effektes bei der Reaktion von $(p\text{-ClC}_6\text{H}_4)_2\text{CH}^+\text{GaCl}_4^-$ mit *p*-Deuterotoluol gestützt ($k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 1.01$). Wie wir in einer Reihe früherer Arbeiten^[5, 7] gezeigt haben, hat die Natur des Gegenions keinen Einfluß auf die Elektrophilie der Diarylcarbenium-Ionen, so daß die in Tabelle 1 wiedergegebenen Geschwindigkeitskonstanten direkt miteinander verglichen werden können.

Aus den partiellen Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen mit Benzol und Toluol ergibt sich für die Reaktions-