

Bei der Photolyse von **2** in überschüssigem Sauerstoff entsteht unmittelbar Ozon entsprechend den Gleichungen (g) und (i) (Abb. 1 b). Damit ist **2** ein möglicher Vorläufer für das in Gegenwart von CF_2 gebildete Ozon.

Da die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen (f), (g) und (i) nicht bekannt sind, ist eine Aussage, in welchem Verhältnis die Reaktionen (g) und (h) ablaufen, nicht möglich. Das Verhältnis (h)/(g) sollte allerdings bei niedrigem Druck und niedriger Temperatur größer werden, da die Desaktivierung von schwingungsangeregtem CF_2O_2 dann langsamer ist^[15]. Unter den von uns gewählten Bedingungen (1 bar, 298 K) hat (h) noch eine gewisse Bedeutung.

Die hier beschriebenen Experimente zeigen eindeutig – unabhängig davon, welches energiereiche CF_2O_2 -Intermediat vorliegt –, daß sich auch unter Stratosphärenbedingungen CF_2 an der O_3 -Bildung beteiligen kann. Dies ist für die Diskussion um FCKW-Ersatzstoffe, für die Fluorkohlenwasserstoffe in Betracht kommen, von Bedeutung. Zumindest das CF_2 -Bruchstück wird deren möglichem Ozonabbaupotential entgegenwirken. Wieviel O_3 allerdings nach dem von uns vorgeschlagenen Mechanismus gebildet wird, kann erst nach quantitativer Kenntnis sämtlicher Reaktionsschritte berechnet werden.

Eingegangen am 22. Oktober,
veränderte Fassung am 10. Dezember 1993 [Z 6439]

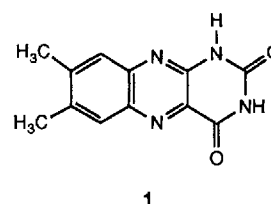
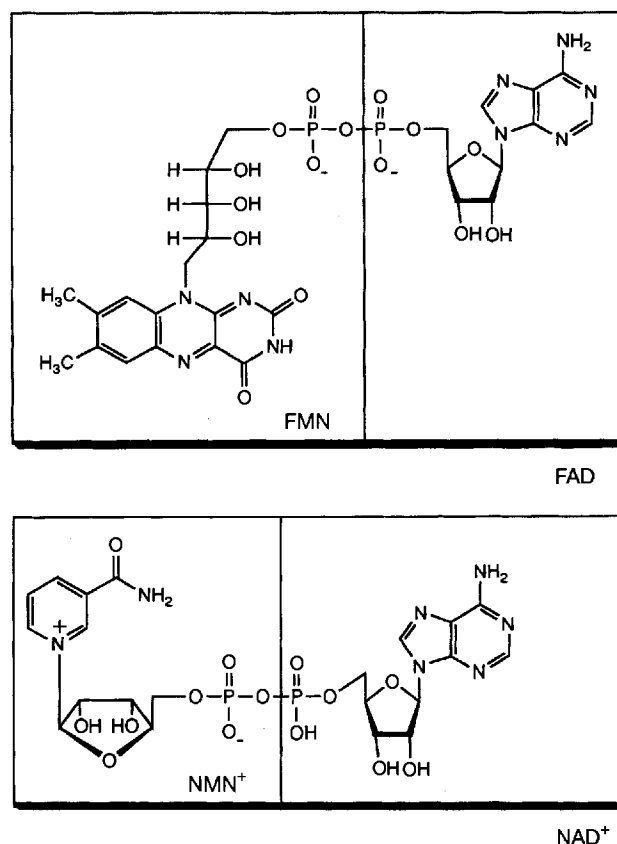
- [1] R. E. Rebert, P. J. Ausloos, *J. Photochem.* **1975**, *4*, 419–434; R. Atkinson, D. L. Bauch, R. A. Cox, R. F. Hampson, Jr., J. A. Kerr, J. Troe, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1992**, *21*, 1509.
- [2] K. K. Irikura, W. A. Goddard III, J. L. Beauchamp, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 48–51.
- [3] C. W. Mathews, *Can. J. Phys.* **1967**, *45*, 2355–2374.
- [4] S. Sharpe, B. Hartnett, H. S. Sethi, D. S. Sethi, *J. Photochem.* **1987**, *38*, 1–13.
- [5] W. J. R. Tyerman, *Trans. Faraday Soc.* **1969**, *65*, 163; F. W. J. Dalby, *J. Chem. Phys.* **1964**, *41*, 2297.
- [6] T. Johnston, J. Hecklen, *J. Chem. Phys.* **1967**, *47*, 475.
- [7] L. Liu, S. R. Davis, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 9719–9724.
- [8] M. Rahman, M. L. McKee, P. B. Shevlin, R. Szttyrbicka, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4002–4007.
- [9] R. A. Mitsch, *J. Heterocycl. Chem.* **1964**, *1*, 59–60.
- [10] Auszuschließen ist die direkte Reaktion von $\text{CF}_2(\text{A}^1\text{B}_1)$ mit O_2 , bei der O_3 sofort entstehen müßte. Die Untersuchung der Gasphasenreaktion zeigt, daß O_3 erst nach einer längeren Induktionsphase gebildet wird.
- [11] A. Russo, D. D. DesMarteau, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 956–958; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 905–907.
- [12] S. Toby, F. S. Toby, *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 206–207.
- [13] W. Sander, G. Bucher, S. Wierlacher, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1583–1621.
- [14] $\lambda_{\text{max},1} = 362 \text{ nm}$, $\sigma_{362} = 0.77 \times 10^{-20} \text{ cm}^2$, Halbwertsbreite = 135 nm; $\lambda_{\text{max},2} < 190 \text{ nm}$, $\sigma_{200} = 1.00 \times 10^{-20} \text{ cm}^2$.
- [15] J. T. Herron, R. I. Martinez, R. E. Huie, *Int. J. Chem. Kinet.* **1982**, *14*, 201–224.

Isolierung von RNA-Aptameren für biologische Cofaktoren durch In-vitro-Selektion**

Petra Burgstaller und Michael Famulok*

Durch In-vitro-Selektion läßt sich eine große Zahl ($\geq 10^{15}$) verschiedener DNA- oder RNA-Sequenzen gleichzeitig für bestimmte Funktionalitäten screenen. In-vitro-Selektionsexperi-

mente umfassen mehrere aufeinanderfolgende Schritte, wobei der erste immer die Synthese einer Bibliothek von DNA-Molekülen mit zufälliger Sequenz ist. Nach der Amplifizierung der DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird durch In-vitro-Transkription ein RNA-Pool hergestellt. Aus diesem RNA-Pool werden dann, z.B. durch Affinitätschromatographie, diejenigen RNAs (Aptamere) selektiert, die spezifisch an ein Zielmolekül binden^[1,2]. Solche spezifisch ligandenbindenden Nucleinsäuren könnten nicht nur als potentielle Leitstrukturen für Proteininhibitoren von Nutzen sein^[3], sondern auch unser Wissen über die Mechanismen biochemisch wichtiger RNA-Substrat-Wechselwirkungen – wie der Erkennung von Nucleotiden, Proteinen, Peptiden, Aminosäuren, Metall-Ionen und Antibiotica durch RNA – vermehren helfen. Außerdem können detaillierte Kenntnisse dieser Art die Entwicklung neuer Ribozyme erleichtern. Wir berichten hier über die Isolierung von RNA-Motiven, die an den Flavinteil von Flavinadenindinucleotid (FAD) und Flavinmononucleotid (FMN) binden. Zusätzlich führten wir Selektionsexperimente zur Isolierung von RNA-Aptameren für Nicotinamadenindinucleotid (NAD^+) und Nicotinamidmononucleotid (NMN^+) durch (Schema 1).

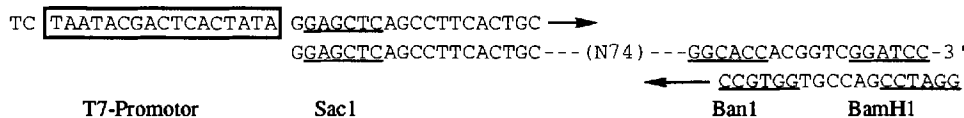


Schema 1. Die in den Selektionen verwendeten Liganden FAD, FMN, NAD^+ und NMN^+ sowie das für die Untersuchung von Bindungsspezifitäten verwendete 7,8-Dimethylalloxazin **1**.

[*] Dr. M. Famulok, Dipl.-Chem. P. Burgstaller
Fachbereich Chemie, Institut für Biochemie der Universität
Am Klopferspitz 18a, D-82152 Martinsried
Telefax: Int. + 89/8578-2470

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Europäischen Union (Projekt-Nr. Biot-CT93-0345) gefördert. Wir danken E.-L. Winnacker für seine Unterstützung und F. Michel, D. Faulhammer und T. Luchterhandt für hilfreiche Diskussionen.

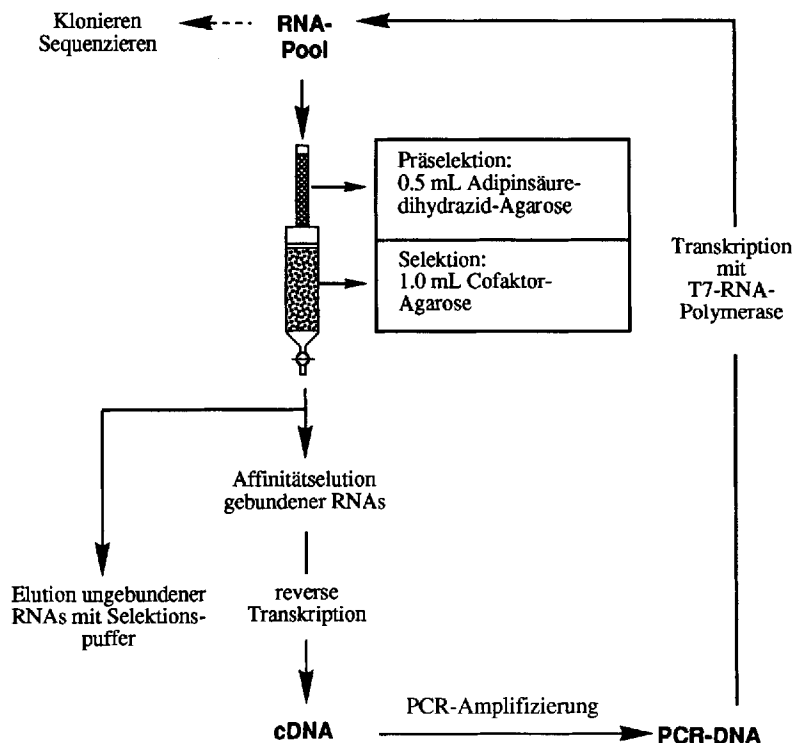
a)



Primersequenzen:

M27.39: 5'-CCGAATTCTAATACGACTCACTATAGG
 M38.27: 5'-TCTAATACGACTCACTATAGGAGCTCAGCCTTCACTGC
 M20.106: 5'-GTGGATCCGACCGTGGTGCC

b)



Schema 2. a) Design der DNA-Bibliothek zur Synthese des verwendeten RNA-Pools. Die eingerahmte Sequenz ist der T7-Promotor, die unterstrichenen Sequenzen sind Restriktionsschnittstellen für die spätere Klonierung. b) Schematische Darstellung des In-vitro-Selektionszyklus. Die RNA wurde auf die Präselektionssäule (0.5 mL Adipinsäuredihydrazid-Agarose) geladen und mit 1.0 mL Selektionspuffer (250 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH = 7.6; 5 mM MgCl₂) auf die Selektionssäule eluiert. Nicht-bindende RNAs wurden mit fünf Säulenvolumina Selektionspuffer entfernt. Gebundene RNAs wurden mit einer Lösung des Liganden im Puffer eluiert und revers transkribiert (50 mM Tris-HCl, pH = 8.3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM DTT, 0.3% TWEEN 100; 0.4 mM des Desoxynucleotridiphosphate dATP, TTP, dGTP, dCTP; 1 µM Primer M20.106; 40 U Superscript Reverse Transcriptase; 45 min Reaktion bei 42 °C). Die cDNA wurde PCR-amplifiziert (10 mM Tris-HCl, pH = 8.3; 50 mM KCl; 0.01% Gelatine; 1.5 mM MgCl₂; 0.3% TWEEN 100; 0.2 mM der Desoxynucleotridiphosphate dATP, TTP, dGTP, dCTP; 3.0 µM Primer M38.27; 3.0 µM Primer M20.106; 2.5 U 100 µL⁻¹ Taq-DNA-Polymerase; Cycler-Bedingungen: 94 °C-1 min, 55 °C-2 min, 72 °C-2 min), die PCR-DNA transkribiert (40 mM Tris-HCl, pH = 7.9; 6.8 mM Spermidin; 22 mM MgCl₂; 0.01% Triton X-100; 5 mM der Nucleotridiphosphate ATP, UTP, GTP, CTP; 10 mM DTT; 50 U T7-RNA-Polymerase; 1-2 µCi α-³²P-GTP; 16 h Reaktion bei 37 °C). Der Selektionszyklus kann nun mit dem angereicherten RNA-Pool wiederholt werden.

Für die Selektionen verwendeten wir einen Pool aus 113mer ³²P-markierten RNAs mit einer Zufallssequenz von 74 Nucleotiden zwischen zwei definierten Primerbindungsstellen und mit einer Komplexität von 10¹⁵ verschiedene Molekülen. Aus diesem Pool wurden durch Affinitätschromatographie an Agarose, die mit dem jeweiligen Cofaktor derivatisiert war, diejenigen RNA-Sequenzen angereichert, die an die Agarose banden und sich mit dem entsprechenden Liganden in Lösung von der Säule eluieren ließen (Schema 2, Tabelle 1).

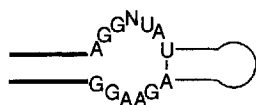
Tabelle 1. Gebundener Anteil [%] der in den Selektionszyklus eingebrachten RNA. Die Werte repräsentieren den Anteil gebundener RNA, der nach fünf Elutionsvolumina mit Selektionspuffer durch eine Lösung des jeweiligen Liganden im Selektionspuffer von der Säule eluiert wurde.

Selektionszyklus	FMN	FAD	NAD ⁺	NMN ⁺
1	0.09	0.11	0.13	0.07
2	1.74	1.20	0.75	0.10
3	1.31	0.14	0.27	0.55
4	0.23	11.09	0.95	0.11
5	0.48	21.38	1.63	0.17
6	33.03		16.07	1.44
7	38.60		36.40	0.12
8				0.33

Nach sechs Cyclen zeigten signifikante Mengen der eingesetzten RNA Bindung an die FMN- und NAD⁺-Säulen. Bindung an die FAD-Matrix war bereits nach vier Cyclen meßbar, während bei NMN⁺ selbst nach acht Selektions/Amplifizierungs-cyclen keine Anreicherung zu erkennen war. Die FMN-, FAD- und NAD⁺-RNA-Pools aus dem jeweils letzten in Tabelle 1 angegebenen Cyclen wurden revers transkribiert, die cDNA PCR-amplifiziert und kloniert. Wir sequenzierten 17 Klone aus dem FMN-, 14 aus dem FAD- und 16 aus dem NAD⁺-Pool (Schema 3).

13 der an FMN bindenden RNAs enthielten zwei konservierte Regionen der Sequenz AGGUAU und AGAAGG (wobei die Sequenz des Klon FMN-2 dreimal auftrat). Beide Konsensussequenzen sind von variablen Nucleotiden flankiert, die miteinander paaren und so eine definierte Sekundärstruktur bilden können. Die monoklonalen RNAs der Sequenzen FMN-2, -7, -12 und -15 zeigten alle Affinität zu FMN. Durch analytische Affinitätschromatographie^[4] bestimmten wir die Dissoziationskonstante K_d für den Komplex aus dem Aptamer FMN-2 und FMN. Die Spezifität dieser RNA wurde durch Affinitätselution mit 7,8-Dimethylalloxazin 1, FAD, ATP und GTP quantifiziert. Anhand der konservierten Sekundärstruktur konstruierten wir eine RNA von 35 Basen Länge (35FMN-2 = 5'-GGCGU-GUAGGAUAUCGUGUUCGAGAAGGACACGCC-3'). Für

FMN-Selektion



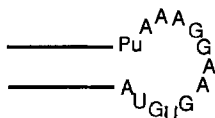
Klon

FMN-2	N ₂₄ -AGCAGGUAUUG-----N ₄ -----CAGAAGGAGU-N ₁ (3x)
FMN-4	CATAAGGUUAUUAU-----N ₁₂ -----GUUAGAAGGAUG-N ₂₉
FMN-5	N ₄₆ -GGUAGCAGGUAUUG-----N ₈ -----CAGAAGGcacc
FMN-7	N ₄₄ -UGGUGCAGGUUAUUG-----N ₄ -----CGUUGAGAAGgaccca
FMN-9	N ₅₁ -CAGCAGCAGGUUAUUG-----N ₄ -----UUUUGAGAAGGAGGUGCC-N ₃₂
FMN-10	N ₆₄ -UCGACUAGGAGGUUAUUG-----N ₆ -----GCAGAAGGCCUUUUGCG-N ₂₈
FMN-12	CUCUCUGAGGAGGUUAUUG-----N ₄ -----AAAGAAGACUCAGGCGAG-N ₃₈
FMN-13	GCATUCCAGGCUUAUUA-----N ₄ -----UAGAAGGAGGAGU-N ₃₆
FMN-15	N ₂₂ -CGUUAGGUAUUG-----N ₃ -----AGAGAAGGAACG-N ₃₈
FMN-22	N ₆₇ -AAGCGUGGUUAGGUUAUUG-----N ₄ -----ACAGAAGGAGCGCGCUU-N ₁₈
FMN-21	N ₁₄ -GUAAGCCAUAGGAUAUUG-----N ₄ -----UGAGAAGGAGCGUUUAD-N ₁₈
FMN-22	N ₅₃ -UGGUGCAGGCUUAUUG-----N ₄ -----GAGAAGGAGGgaccca
FMN-24	N ₅₃ -UUUACAGGAGGUUAUUG-----N ₄ -----CAGAAGGCGUAAA-N ₃₅

FAD-Selektion

Klon (Klone 2, 5, 16 und 22 sind identisch mit FMN-2)

FAD-3	N ₂₁ -CCCCAGAGAAGGcacc-----N ₁₅ -----UCCAGAGGUUAUGAGUGG
-------	---



FAD-1	N ₂ -UUUGCAAAGGAAGUGUA-----N ₃₂
FAD-4	N ₄₀ -UGCGGCAAAAGGAAGUGUA-----N ₆
FAD-9	N ₁₉ -GUCCGUGCAAAGGAAGGUA-----N ₂₆
FAD-11	N ₃₄ -AAACAUAGCAGCAAAGGAAGUGUA-----N ₃
FAD-20	N ₂₇ -UGGUGAGGAGUGCAAAGGAAGUGUA-----N ₃

Schema 3. Sequenzen FMN- und FAD-bindender RNAs. Selektierte RNAs wurden revers transkribiert und mit Hilfe der Primer M27.39 und M20.106 (siehe Schema 2a) PCR-amplifiziert. Der Primer M27.39 wurde verwendet, um die DNA mit der *EcoRI*-Schnittstelle zu versehen. Danach wurde mit *EcoRI* und mit *BamHI* verdaut und das geschnittene Fragment in den Vektor pGem3z (Promega) kloniert [7]. Sequenziert wurde nach der Didesoxymethode [8]. Gezeigt sind nur die für die Bildung der oberhalb der Sequenzen dargestellten Bindungsmotive relevanten Basen. Die Bindungsmotive zeigen die Konsensussequenzen und schematisch die Stemregionen.

35FMN-2 und FMN-2 wurde für die Bindung an FMN eine K_d im Bereich von 0.5 μM gemessen. Der Riboseteil von FMN wird von den Aptameren nicht erkannt, denn an **1** binden sowohl FMN-2 als auch 35FMN-2. Diese beiden Aptamere haben eine recht geringe Affinität zu Adenosintriphosphat (ATP) und binden gar nicht an Guanosintriphosphat (GTP). Erwartungsgemäß binden sie an FAD ähnlich gut wie an FMN (Tabelle 2).

Tabelle 2. Dissoziationskonstanten K_d der Bindung von FMN-2, 35FMN-2, FAD-1 und 27FAD-1 an verschiedene Liganden in Lösung [a].

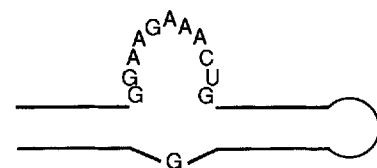
Ligand	K_d [μM]			
	FMN-2	35FMN-2	FAD-1	27FAD-1
FMN	0.5	0.5	84	280
FAD	1.4	0.7	137	273
I	0.5	0.3	23	35
ATP	250	163	4×10^3	2×10^3
GTP	$> 5 \times 10^4$	$> 5 \times 10^4$	3×10^3	3×10^3

[a] Die K_d -Werte wurden durch Affinitätselution von ^{32}P -markierter RNA von einer Säule bestimmt, die 1.0 mL einer 0.5 mM FMN- oder einer 3.0 mM FAD-Agarose enthält. Die Berechnung erfolgte nach der Gleichung $K_d = [L] \times \{(V_0 - V_d) \times (V_e - V_d)^{-1}\}$ [1 f]. [L] ist die Konzentration der Liganden in Lösung, V_d das Elutionsvolumen in Gegenwart der Liganden in Lösung, V_e das Elutionsvolumen mit Selektionspuffer in Abwesenheit der Liganden, V_0 das Durchflussvolumen der Säule (0.7 mL).

Von den 14 an FAD bindenden RNAs waren vier identisch mit dem Klon FMN-2. Der Klon FAD-3 kann die gleiche Sekundärstruktur bilden. Im Vergleich zu allen anderen Sequenzen, die dieses Motiv bilden, sind aber die beiden Konsensussequenzen in ihrer Anordnung vertauscht. Insbesondere dieser Befund ist ein starker Hinweis auf die Richtigkeit der vorgeschlagenen Sekundärstruktur. Die FAD-Selektion führte zu einem weiteren Bindungsmotiv, dem konservierten 13mer 5'-Pu-AAAGGAAGUGUA-3'. Dieses ist von miteinander paarenden Basen flankiert, so daß die in Schema 3 gezeigte Stem-loop-Struktur gebildet werden kann. Das Motiv wurde in fünf Sequenzen (FAD-1, -4, -9, -11 und -20) gefunden. Die Affinität von FAD-1 zu FAD oder FMN ist deutlich geringer als die des Motivs FMN-2 zu diesen Liganden (Tabelle 2). Auch FAD-1 erkennt wohl ausschließlich den Flavinteil von FAD, denn die Bindung an **1** ($K_d = 23 \mu\text{M}$) ist deutlich besser als die an FMN ($84 \mu\text{M}$) und die Affinität zum Adenosinteil von FAD fehlt fast ganz ($K_d^{\text{ATP}} \geq 4.0 \text{ mM}$). An GTP bindet FAD-1 ebenfalls nicht. Eine auf der Sekundärstruktur von FAD-1 basierende 27mer Minimal-RNA (27FAD-1 = 5'-GGCAGUCGAAAGGAAGUGUAGACUGCC-3'), in der die 13mer Konsensussequenz und die Stemregion enthalten sind, zeigt Bindungskonstanten, die etwas schwächer, aber in der gleichen Größenordnung wie die des Vollängen-Aptamers FAD-1 sind^[5]. Sie ist somit eine der kleinsten spezifisch ligandenbindenden RNAs, die zur Zeit bekannt sind. Die entsprechende DNA-Version dieses Aptamers hat keine meßbare Affinität zu FAD.

Es stellt sich die Frage, warum bei der FMN-Selektion nur ein Bindungsmotiv mit Affinität für den Flavinteil selektiert wurde, während bei der FAD-Selektion zusätzlich ein zweites mit deutlich geringerer Affinität isoliert werden konnte. Der Grund dafür dürfte wohl die unterschiedliche Konzentration des Liganden in der FMN- und der FAD-Agarose sein (FMN: 0.5 mM; FAD: 3.0 mM). Ein Vergleich der Elutionsvolumina V_e von FAD-1 an den beiden unterschiedlich derivatisierten Agarosen mit $V_e = 2 \text{ mL}$ für FMN-Agarose und $V_e = 13 \text{ mL}$ für FAD-Agarose ergibt K_d -Werte von gleicher Größenordnung. Demnach wurden mit dem während der Selektion angewendeten Waschvolumen von 5.0 mL alle Binder des Typs FAD-1 von der FMN-Agarose entfernt und konnten deshalb nicht angereichert werden.

Alle 16 an NAD^+ bindenden Sequenzen enthielten die Basenfolge GGAAGAAACUG. Die gleiche Konsensussequenz ist Bestandteil eines kürzlich von Sassanfar und Szostak isolierten ATP-bindenden RNA-Motivs^[1d]. Tatsächlich können die von uns isolierten Aptamere zu einem identischen Motiv falten (Schema 4). Dieses bindet den Adenosinteil von ATP mit einer K_d von 4.0 μM , hat aber auch Affinität zu NAD^+ . Um aus dem selektierten Pool eventuell in geringer Menge vorhandene Aptamere anzureichern, die den NMN⁺-Teil zur Bindung an NAD^+ benötigen, führten wir drei zusätzliche Selektionscyclen durch, wobei wir der Affinitätselution mit NAD^+ eine negative Selektion mit ATP voranstellten. Es konnten auf diese Weise jedoch keine weiteren Binder erhalten werden. Bestätigt wird dieses Resultat durch die NMN⁺-Selektion (Tabelle 1), die über acht Cyclen ebenfalls zu keiner Anreicherung von Bindern führte. Die einfachste Erklärung für diesen Befund wäre, daß der Pool keine einzige Sequenz enthielt, die zur Bindung an NMN⁺ fähig ist^[6].



Schema 4. RNA-Bindungsmotiv [1 d] für den Adenosinteil von ATP oder NAD^+ .

Bemerkenswert an dem Ergebnis der NAD⁺- und ATP-Selektionen^[1d] ist die Tatsache, daß zwei völlig unabhängige Selektionen, für die strukturell zwar verwandte, aber doch unterschiedliche Agarosen und Liganden (und Nucleinsäurepools!) verwendet worden waren, zu identischen Aptameren führten, und zwar ausschließlich zu solchen mit Affinität zum Adenosin-Teil des Liganden. Die Tatsache, daß dieses Motiv wiederholt aus unabhängigen Pools mit einer Komplexität von 10¹⁴–10¹⁵ angereichert werden kann, beweist die „Treffsicherheit“ und Präzision dieser Selektionstechnik. Zudem deutet dieses Ergebnis darauf hin, daß es sich bei dem adenosinspezifischen Aptamer um eine „optimale Sequenzlösung“ für die molekulare Erkennung von Adenosin durch RNA handelt.

Fazit: Wir konnten neue RNA-Motive für die spezifische Erkennung biologischer Cofaktoren aus randomisierten RNA-Pools selektieren. Die beschriebenen Aptamere erkennen bestimmte Regionen eines Liganden bevorzugt. Andere Regionen werden nur schwach oder gar nicht gebunden. Die RNA-Motive 35FMN-2 und 27FAD-1 repräsentieren eine neue Klasse supramolekularer Systeme zur hochspezifischen Erkennung von Flavinen, basierend auf „irrationalen Rezeptordesign“^[9, 10].

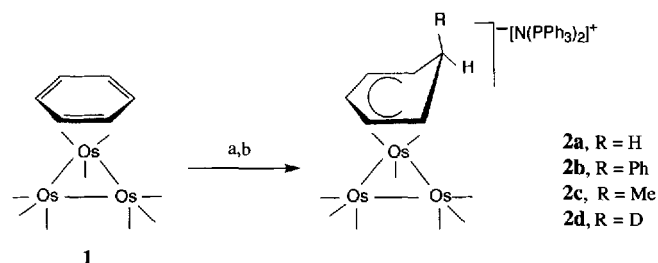
Eingegangen am 25. November 1993,
veränderte Fassung am 18. Januar 1994 [Z 6511]

- [1] a) A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818; b) *ibid.* **1992**, *355*, 850; c) M. Famulok, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3990; d) M. Sasanfar, J. W. Szostak, *Nature* **1993**, *364*, 550; e) D. P. Bartel, J. W. Szostak, *Science* **1993**, *261*, 1411; f) G. J. Connell, M. Illangsekare, M. Yarus, *Biochemistry* **1993**, *32*, 5497; g) M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [2] Übersichten: a) M. Famulok, J. W. Szostak, *Angew. Chem.* **1992**, *103*, 1001; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 979; b) J. W. Szostak, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 89; c) M. Famulok, J. W. Szostak in *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol. 7 (Hrsg.: F. Eckstein, D. M. J. Lilley), Springer, Berlin, **1993**, S. 271.
- [3] a) C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505; b) L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564; c) C. Tuerk, S. MacDougall, L. Gold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6988; d) D. Schneider, C. Tuerk, L. Gold, *J. Mol. Biol.* **1992**, *228*, 862; e) M. L. Riordan, J. C. Martin, *Nature* **1991**, *350*, 442.
- [4] F. H. Arnold, S. A. Scofield, H. W. Blanch, *J. Chromatogr.* **1986**, *355*, 1.
- [5] Es fällt auf, daß 1 von FAD-1 und 27FAD-1 besser gebunden wird als FAD oder FMN. Das könnte daran liegen, daß 1 keinen negativ geladenen Phosphatrest enthält und somit auch keine Abstoßung mit dem Phosphatrückgrat der RNA erfolgen kann. Vergleichbare Phänomene sind ähnlich erklärt worden (siehe [1d]). Als Gründe dafür kämen neben den Ladungsunterschieden auch z.B. Gewinn oder Verlust an Bindungsentropie durch Unterschiede in der Hydrathülle bei 1 und FMN oder FAD, Aryl-Stapelwechselwirkungen oder sterische Phänomene in Frage. Hier können nur detaillierte Strukturuntersuchungen Einblick gewähren.
- [6] Möglicherweise ließ die von uns angewendete Selektionsstringenz eine Isolierung von Aptameren, die an NMN⁺ oder an den NMN⁺-Teil von NAD⁺ binden, nicht zu. Wir testeten derzeit unterschiedliche Pufferbedingungen, Metall-Ionen und Ligandenkonzentrationen sowie Elutionsvolumina (wie bei FAD-1), die durchaus zur Isolierung spezifischer Aptamere führen könnten. Der Pool enthält aber wohl keine NMN⁺-spezifischen Motive, deren K_d-Werte in der Größenordnung der K_d-Werte des ATP-Binders liegen (1–10 µM).
- [7] a) J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1989**; b) F. Asubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York, **1987**.
- [8] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 5463.
- [9] Beispiele für Flavinrezeptoren, die auf rationalem Rezeptordesign basieren: Y. Aoyama, Y. Tanaka, H. Toi, H. Ogoshi, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 634; b) Y. Yano, N. Tamura, K. Mitsui, T. Nabeshima, *Chem. Lett.* **1989**, 1655; c) Y. Aoyama, K. Mizokami, H. Toi, *ibid.* **1990**, 651.
- [10] Siehe Fußnote 2 in G. von Kiedrowski, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 839; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 822.

Ein Triosmiumcluster mit einem ungewöhnlich gebundenen Carbenliganden**

Andrew J. Edwards, Mark A. Gallop, Brian F. G. Johnson, Jochem U. Köhler, Jack Lewis* und Paul R. Raithby

Übergangsmetallcluster mit flächenüberbrückenden π -Arenliganden sind als Modellverbindungen für die Chemisorption von Arenen an Metalloberflächen interessant^[1]. Dieser Koordinationsmodus wurde zuerst im oktaedrischen Carbidoheptarutheniumcluster [Ru₆C(CO)₁₁(η^6 -C₆H₆)(μ_3 - η^2 : η^2 : η^2 -C₆H₆)]^[2] sowie in den dreikernigen Clustern [M₃(CO)₉(μ_3 - η^2 : η^2 : η^2 -C₆H₆)] (M = Os^[2] 1, Ru^[3]) und [(CpCo)₃(μ_3 -aren)]^[4] nachgewiesen. Bislang ist jedoch wenig über die Reaktivität solcher flächenüberbrückenden Arenliganden bekannt. Der Benzoltriosmiumcluster 1 reagiert mit Carbanionen (PhLi, MeLi) und mit LiB-HeT₃ (oder LiBDEt₃) zu den *exo*-Additionsprodukten 2a–d, die einen dreifach verbrückenden Cyclohexadienylliganden aufweisen (Schema 1)^[5].



Schema 1. Reaktion des Triosmiumclusters 1 mit Carbanionen. a) + R[−], THF, −78 °C; b) + [N(PPh₃)₂]Cl, *i*PrOH.

Mit dem Triphenylmethyl-Kation (Trityl-Kation) kann Wasserstoff als Hydrid aus 2a abgespalten werden, wobei glatt die Ausgangsverbindung 1 zurückgebildet wird. Die analoge Umsetzung mit deuteriertem 2d zeigt, daß es sich um eine stereoselektive *exo*-Wasserstoffeliminierung handelt^[5]. Obwohl aus den meisten einkernigen Komplexen das *exo*-Wasserstoffatom abgespalten wird, sind auch einige *endo*-Wasserstoffeliminierungen aus koordinierten π -Kohlenwasserstoffen mit dem Trityl-Kation bekannt^[6]. Würde das *endo*-Wasserstoffatom aus den anionischen μ_3 -Cyclohexadienyllkomplexen 2b, c abgespalten, sollten die flächenüberbrückenden Arencluster [Os₃(CO)₉(μ_3 - η^2 : η^2 : η^2 -C₆H₅R)] (R = Ph, Me) entstehen. Setzt man jedoch 2b bei −78 °C mit dem Trityl-Kation um, so werden nach der dünnstschichtchromatographischen Reinigung zwei Produkte isoliert: der orangefarbene Carbentriosmiumkomplex 3 und der ebenfalls orangefarbene Cyclohexadienontriosmiumkomplex 4 (Schema 2).

Offenbar ist eine *endo*-Hydridabspaltung durch das sterisch anspruchsvolle Trityl-Kation wegen der *exo*-ständigen Phenylgruppe und den äquatorialen CO-Gruppen am Os₃-Gerüst nicht möglich. Die Resonanzstruktur von 2b (Schema 3) verdeutlicht, warum eine Hydrideliminierung in 4-Stellung des C₆-Rings zu einer Carbenstruktur und damit zu einem neuen Koordinationsmodus eines Benzolisomers an einen Übergangsmetallcluster führt.

[*] Prof. Lord Lewis, Dr. A. J. Edwards, Dr. M. A. Gallop, Prof. B. F. G. Johnson, Dr. J. U. Köhler, Dr. P. R. Raithby
University Chemical Laboratory
Lensfield Road, GB-Cambridge, CB2 1EW (Großbritannien)
Telefax: Int. + 223/336-343

[**] Diese Arbeit wurde von der Europäischen Gemeinschaft durch ein Human Capital and Mobility Fellowship (J. U. K.) gefördert.