

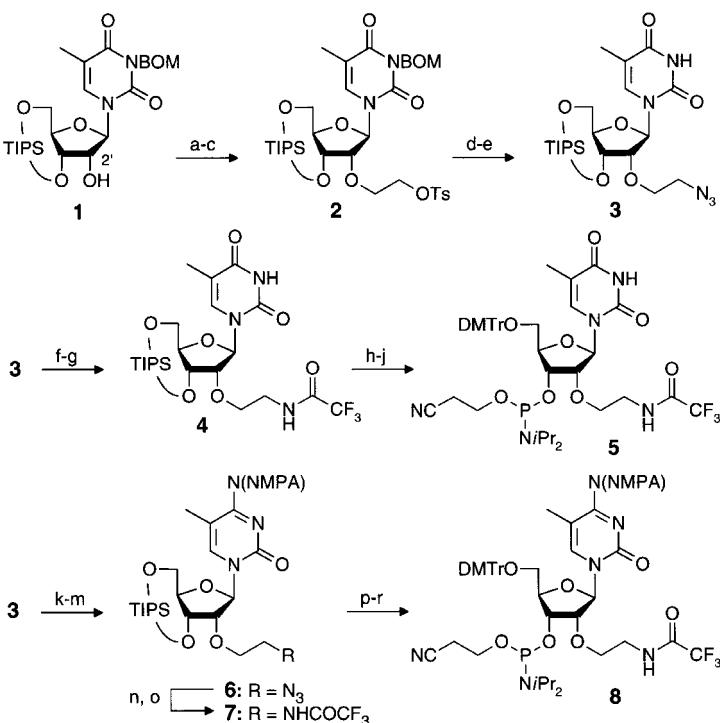
Zweifache Erkennung von doppelsträngiger DNA durch 2'-Aminoethoxy-modifizierte Oligonucleotide**

Bernard Cuenoud,* Florence Casset, Dieter Hüskens, François Natt, Romain M. Wolf, Karl-Heinz Altmann, Pierre Martin und Heinz E. Moser

Die molekulare Erkennung doppelsträngiger DNA durch Proteine spielt eine zentrale Rolle in der Biologie. Obwohl es keine erkennbar einfachen Regeln oder Codes gibt, um die sequenzspezifische Erkennung zu beschreiben, sind Wasserstoffbrückenbindungen zu den Nucleinsäurebasen und auch zum Phosphodiester-Rückgrat hierfür von ausschlaggebender Bedeutung.^[1] Es wurden bereits Versuche unternommen, diese Erkennung mit kleineren Biopolymeren nachzuahmen.^[2] In all diesen Fällen wurden die spezifischen Wechselwirkungen mit der DNA jedoch nur über Wasserstoffbrückenbindungen zu den Basen hergestellt, während mögliche Wechselwirkungen mit dem DNA-Rückgrat unberücksichtigt blieben. Wir berichten hier, daß 2'-Aminoethoxy-modifizierte Oligonucleotide gleichzeitig mit den Basen und dem Phosphodiester-Rückgrat jeder Basenpaar-Sprosse einer DNA wechselwirken können, was zu einer erheblichen Zunahme der Bindungsaffinität und der Assoziationsgeschwindigkeit führt.

Die sequenzspezifische Erkennung von doppelsträngiger DNA durch Pyrimidin-Oligonucleotide führt zur Bildung von Tripelhelices, die durch Hoogsteen-Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen des Ziel-DNA-Duplex und dem Pyrimidin-Oligonucleotid als drittem Strang stabilisiert werden.^[3] Nach Untersuchungen am Molekülmodell einer Tripelhelix mit einer RNA als drittem Strang liegen die 2'-Hydroxygruppen der RNA und die Phosphatgruppen des zweiten DNA-Strangs dicht nebeneinander.^[4] Die Anknüpfung einer kurzen Aminoalkylgruppe an der 2'-Position der Ribose des dritten Strangs könnte also eine spezifische intermolekulare Wechselwirkung zwischen der protonierten Aminogruppe und der benachbarten Phosphatgruppe des DNA-Duplex ermöglichen. Solche elektrostatischen Wechselwirkungen sollten die Affinität des modifizierten Oligonucleotids für doppelsträngige DNA stark erhöhen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, untersuchten wir zunächst die Eigenschaften eines 2'-Aminoethoxy-modifizierten Oligonucleotids bezüglich der Tripelbildung. Die Synthese der 2'-Aminoethoxy-modifizierten monomeren Thymidin- und C5-Methylcytidin-Bausteine ist in Schema 1 zusammengefaßt. Die Alkylierung des geschützten Ribothymidins



Schema 1. Synthese der geschützten 2'-Aminoethoxy-Phosphoramidite von Thymidin (5) und C5-Methylcytidin (8): a) $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$ (5 Äquiv.), NaH (2.2 Äquiv.), DMF , 1.5 h, -5°C , 98%; b) LiBH_4 (4 Äquiv.), MeOH /THF (2/8), 1.5 h, 5°C , 84%; c) Ts-Cl (1.5 Äquiv.), Et_3N (1.6 Äquiv.), DMAP (10 Gew.-%), CH_2Cl_2 , 8 h, 22°C , 89%; d) H_2 , Pd/C (20 Gew.-%), HCl (0.02 Äquiv.), THF/MeOH (1/1), 7 h, 22°C , 88%; e) NaN_3 (3 Äquiv.), DMF , 3 h, 65°C , 92%; f) SnCl_2 (3.5 Äquiv.), MeOH , 1 d, 22°C , 70%; g) $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ (1.2 Äquiv.), Pyridin, 2 h, 22°C , 57%; h) TBAF (2.1 Äquiv.), THF , 15 min, 22°C , 100%; i) DMTr-Cl (1.2 Äquiv.), Pyridin, 16 h, 22°C , 85%; j) $(i\text{Pr}_2\text{N})_2\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ (2.2 Äquiv.), Diisopropylammoniumtetrazolid (2.4 Äquiv.), CH_2Cl_2 , 1 h, 22°C , 85%; k) Triazol (22.5 Äquiv.), POCl_3 (2.5 Äquiv.), Et_3N (23 Äquiv.), $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1/1), 3 h, 22°C ; l) konz. NH_3 (aq.)/Dioxan (1/1), 1 h, 22°C , 84% über zwei Stufen; m) N -Methyl-2,2-dimethoxypyrrolidin (1.8 Äquiv.), Pyridin, 3 h, 22°C , 95%; n) H_2 , Pd/C (10 Gew.-%), MeOH/THF (1/1), 3 h, 22°C ; o) CF_3COOEt (10 Äquiv.), Et_3N (7 Äquiv.), MeOH , 1 h, 22°C , 96% über zwei Stufen; p) TBAF (1.0 Äquiv.), THF , 1 h, 22°C , 100%; q) DMTr-Cl (1.2 Äquiv.), Pyridin, 1 h, 22°C , 85%; r) $(i\text{Pr}_2\text{N})_2\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ (2.2 Äquiv.), Diisopropylammoniumtetrazolid (2.4 Äquiv.), CH_2Cl_2 , 2 h, 40°C , 87%. – TIPS = 1,1,3,3-Tetraisopropylsiloxan, BOM = Benzyloxymethyl, N(NMPA) = *N*-Methylpyrrolidin-Amidin, DMF = *N*-Dimethylformamid, THF = Tetrahydrofuran, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, TBAF = Tetra-*n*-butylammoniumfluorid, DMTr = 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl, Ts = Toluol-4-sulfonyl.

1^[5] mit Methylbromacetat, Reduktion der Estergruppe und Tosylierung lieferten das Tosylat **2**. Durch die hydrogenolytische Abspaltung der BOM-Gruppe und die Verdrängung der Tosyloxygruppe durch einen Azidsubstituenten erhielten wir das Azidoethyl-derivat **3**, das durch Standardverfahren in die gewünschten geschützten Phosphoramidite von 2'-Aminoethoxythymidin und C5-Methylcytidin (**5** bzw. **8**) überführt wurde. Ein pentadecameres Oligonucleotid mit fünf 2'-Aminoethoxy-modifizierten Thymidinresten wurde synthetisiert und seine Affinität für eine doppelsträngige DNA durch auf UV-Messungen beruhende Schmelzpunktbestimmung ermittelt (Abb. 1 A). Im Vergleich zu einem unmodifizierten Kontroll-Oligonucleotid gleicher Länge und Sequenz war die gemessene Schmelztemperatur T_m um 17.5°C höher, was

[*] Dr. B. Cuenoud, Dr. H. E. Moser
Novartis Horsham Research Center
Wimblehurst road, Horsham
West Sussex, RH12 4AB (Großbritannien)
Fax: (+44) 1403-32-33-07
E-mail: bernard.cuenoud@pharma.novartis.com

Dr. F. Casset, Dr. D. Hüskens, Dr. F. Natt, Dr. R. M. Wolf
Dr. K.-H. Altmann, Dr. P. Martin
Novartis Pharma Ltd., CH-4002 Basel (Schweiz)

[**] Wir danken Arlette Garnier und Sue Freier (ISIS Pharmaceuticals) für technische Assistenz sowie den Professoren Albert Eschenmoser und Christian Leumann für hilfreiche Diskussionen.

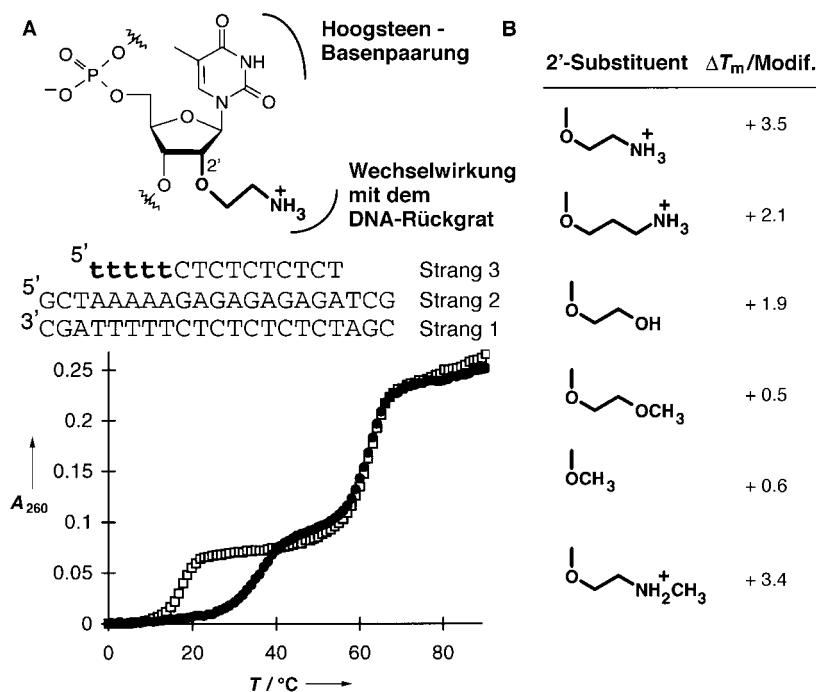


Abb. 1. Affinitäten modifizierter Oligonucleotide für doppelsträngige DNA. A) Ein Pentadecamer mit fünf 2'-Aminoethoxy-modifizierten Thymidinresten (halbfette Kleinbuchstaben, Strang 3) wurde mit dem DNA-Duplex (Stränge 1 und 2) in einer Lösung mit 180 mM KCl, 20 mM Na⁺, 10 mM Phosphat und 0.1 mM EDTA, pH 7.0, hybridisiert. Bei der thermischen Denaturierung traten zwei UV-Übergänge auf. Der erste entsteht durch das Schmelzen der Tripelhelix (Dissoziation von Strang 3), der zweite durch das Schmelzen des DNA-Duplex (Dissoziation der Stränge 1 und 2). Die T_m -Werte der Tripelhelices mit modifizierten Oligonucleotiden (●) wurden mit denen verglichen, die mit einem nichtmodifizierten Kontroll-Oligonucleotid ermittelt wurden (□). A_{260} = Absorption bei 260 nm. B) Struktur-Affinitäts-Beziehungen für unterschiedliche 2'-substituierte Oligonucleotide. Die T_m -Werte wurden durch numerische Kurvenanpassung bestimmt, wobei ein Modell mit zwei Zuständen für jeden UV-Übergang zugrunde gelegt wurde; die berechneten ΔT_m -Werte pro Modifikation sind auf 0.1°C genau. Die Reinheit und die Identität jedes Oligonucleotids wurden durch Kapillarelektrophorese und matrixunterstützte Laserdesorptionsionisations-Flugzeit(MALDI-TOF)-Massenspektrometrie überprüft.^[13] Für 2'-Aminoethoxy-modifiziertes Thymidin wurde ein pK_a -Wert von 8.7 bestimmt, was darauf hindeutet, daß die 2'-Seitenkette unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegt.

einer Zunahme von 3.5°C pro Modifikation entspricht (Abb. 1B). Die T_m -Differenz (ΔT_m) wurde durch Veränderung der KCl-Konzentration des Puffers, den Austausch von KCl gegen NaCl, den Zusatz von MgCl₂ oder Spermin sowie die Verwendung eines anderen Puffers kaum beeinflußt. Dagegen war das modifizierte Oligonucleotid empfindlich gegenüber einer einzelnen Basen-Fehlpaarung im DNA-Duplex.^[6]

Um die molekulare Basis dieser markanten Zunahme der Bindungsaaffinität aufzuklären, haben wir die Affinität einer Reihe anderer, verwandter 2'-O-modifizierter Oligonucleotide für doppelsträngige DNA untersucht (Abb. 1B). Die Vergrößerung des Abstands zwischen der protonierten Aminogruppe und dem 2'-Sauerstoffatom durch eine zusätzliche Methyleneinheit (2'-Aminopropoxy-Substituent)^[7] verursachte eine deutliche Abnahme der Stabilität der Tripelhelix. Dies deutet darauf hin, daß die protonierte Aminoethoxy-Seitenkette ideal positioniert ist, um spezifisch mit der benachbarten Phosphatgruppe in Wechselwirkung zu treten, und daß die Zunahme der Tripelhelix-Stabilität nicht von einem nur unspezifischen elektrostatischen Effekt herröhrt. Ersetzte man die Aminogruppe durch einen ungeladenen H-Brücken-Donor (2'-Hydroxyethoxy-Substituent), nahm die Bindungsaaffinität im Vergleich zu der eines unmodifizierten DNA-Drittstrangs zwar ebenfalls deutlich zu, doch war das Ausmaß erheblich kleiner als beim 2'-Aminoethoxy-modifizierten Oligonucleotid. Dieser Befund stimmt mit der vorgeschlagenen intermolekularen Wechselwirkung überein, denn die positiv geladene Aminogruppe sollte stärker an das negativ geladene Phosphatrückgrat binden als die ungeladene Hydroxygruppe. Wurde eine Seitenkette ohne H-Brücken-Donor-Eigenschaft verwendet (2'-Methoxyethoxy-Substituent),^[8] nahm die Affinität des modifizierten Oligonucleotids für doppelsträngige DNA auf eine Stärke ähnlich der des 2'-Methoxyanalogons ab. Es ist unwahrscheinlich, daß dieser

Effekt das Ergebnis nachteiliger sterischer Wechselwirkungen zwischen der zusätzlichen Methylgruppe und der großen Furche der DNA ist, denn die 2'-Aminoethoxy- und die 2'-Monomethylaminoethoxy-Derivate weisen die gleiche Erhöhung der Bindungsstärke im Vergleich zum Kontroll-Oligonucleotid auf.

Um diese starke Zunahme der Bindungsaaffinität besser zu verstehen, bestimmten wir die kinetischen und thermodynamischen Parameter für die Bindung eines vollständig modifizierten 2'-Aminoethoxy-Oligonucleotids an eine doppelsträngige DNA. Die Messung der Hybridisierungskinetik mit Echtzeit-Oberflächen-Plasmonenresonanz^[9] ergab, daß die Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation des vollständig modifizierten 2'-Aminoethoxy-Oligonucleotids **I** mehr als 1000mal größer als die des nichtmodifizierten Kontroll-Oligonucleotids **II** war (Abb. 2 und Tabelle 1). Die Größenordnung dieses Unterschiedes in den Assoziationsgeschwindigkeiten deutet darauf hin, daß die Bildung spezifischer Wechselwirkungen zwischen den 2'-Aminoethoxy-Seitenketten und dem Phosphatrückgrat der DNA-Doppelhelix aktiv zum durch Nucleation vermittelten Assoziationsprozeß (nucleation-zipping association) beiträgt.^[10] Mit diesem stabilisierenden Effekt der zusätzlichen spezifischen Wechselwirkungen zwischen den Strängen ist auch die Dissoziationsgeschwindigkeit des Drittstrangs in Einklang: Danach dissoziert ein Strang des modifizierten Oligonucleotids **I** 40mal langsamer vom DNA-Duplex als einer des Kontroll-Oligonucleotids **II**. Auch die Dissoziationskonstante, die sich aus den Geschwindigkeitskonstanten errechnen läßt, ist für **I** (10^{-9} M) 46000mal kleiner als für **II**, was einer zusätzlichen Bindungsenergie von 6.3 kcal mol⁻¹ entspricht.

Durch eine Moleküldynamik(MD)-Simulation erhielten wir das Modell einer Tripelhelix mit einem vollständig 2'-Aminoethoxy-modifizierten Drittstrang. Aus diesem Modell konnten wir ableiten, daß die protonierte 2'-Aminoethoxy-

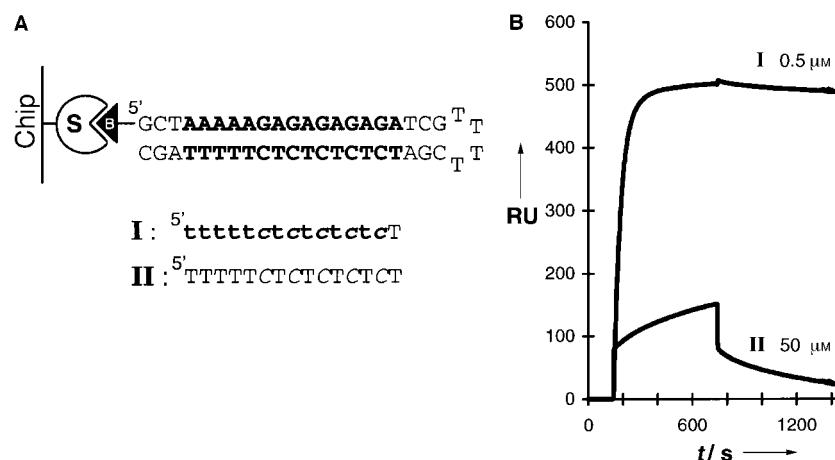


Tabelle 1. Assoziations- (k_a) und Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten (k_d), berechnete Dissoziationskonstanten K_D und freie Dissoziationsenthalpien ΔG_D (25 °C) für das 2'-Aminoethoxy-modifizierte Oligonukleotid I und das Kontroll-Oligonukleotid II.^[a]

Oligo-nukleotid	k_a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_d [s ⁻¹]	K_D [M]	ΔG_D [kcal mol ⁻¹]
I	$3.6 \pm 1.6 \times 10^4$	$3.3 \pm 1.3 \times 10^{-5}$	0.91×10^{-9}	- 12.2
II	33 ± 19	$1.4 \pm 0.2 \times 10^{-3}$	4.2×10^{-5}	- 5.9

[a] Durch quantitative DNase-I-Footprint-Experimente^[16] wurde $K_D = 4.8 \times 10^{-9}$ M für I bestimmt (Puffer: 140 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM Spermin, 20 mM 3-(N-Morpholin)propansulfonsäure (MOPS), pH 7.2), was nahe bei dem mit einem Oberflächen-Plasmonenresonanz-Experiment bestimmten Wert liegt.

gruppe tatsächlich mit einer benachbarten Phosphatgruppe des zweiten Strangs wechselwirken kann, ohne daß die Gesamtstruktur des Triplex beeinträchtigt wird (Abb. 3).^[11] Aus der MD-Trajektorie ließen sich mehrere Anhaltspunkte für eine spezifische Wechselwirkung ableiten. Die protonierte Aminoethoxy-Seitenkette (in einer niedrigerenergetischen (+)-gauche-Konformation) steht immer mit dem pro-R-Sauerstoffatom des Restes $i - 1$ in Wechselwirkung, nicht aber mit dem Rest i , und zwar unabhängig davon, ob sie ursprünglich trans- oder gauche-orientiert war. Ähnliche MD-Experimente mit einem 2'-Aminopropoxy-modifizierten Drittstrang ergaben, daß die Aminogruppe in diesem Fall keine Präferenz für das pro-R-Sauerstoffatom des Restes $i - 1$ im Vergleich zu dem des Restes i aufweist und außerdem auch mit dem eigenen 2'-Sauerstoffatom wechselwirken kann.

Alle diese Ergebnisse sind mit den spezifischen Effekten vereinbar, die bei der Bindung von 2'-Aminoethoxy-modifi-

zierten Oligonukleotiden an DNA auftreten, und sprechen für die Existenz einer neuartigen Wechselwirkung zwischen den Strängen, mit strengen geometrischen Anforderungen an die Orientierung der protonierten Aminoethoxy-Seitenkette und des Phosphodiester-Sauerstoffatoms des DNA-Rückgrats. Außerdem bestätigen sie die aus energetischen Gründen wichtige Rolle von Wechselwirkungen zum DNA-Rückgrat, wie sie oft in Protein-DNA-Komplexen vorkommen.

Die experimentelle Modulation der Genexpression durch Oligonukleotid-gesteuerte Bildung von Tripelhelices wurde bislang zum mindesten teilweise durch die schwache Bindungsaffinität, die langsame Assoziation an die Ziel-DNA und die ungenügende Nucleaseresistenz von unmodifizierten Oligonukleotiden eingeschränkt. Die 2'-Aminoethoxy-modifizierten Oligonukleotide eröffnen nun erstmals eine effiziente Lösung dieser Probleme, indem sie hohe Affinität, schnelle Assoziationsgeschwindigkeit und hohe Nucleaseresistenz miteinander verbinden (Lit. [12] und weitere, nicht gezeigte Ergebnisse). Daher sollten sie effektiv mit Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren,

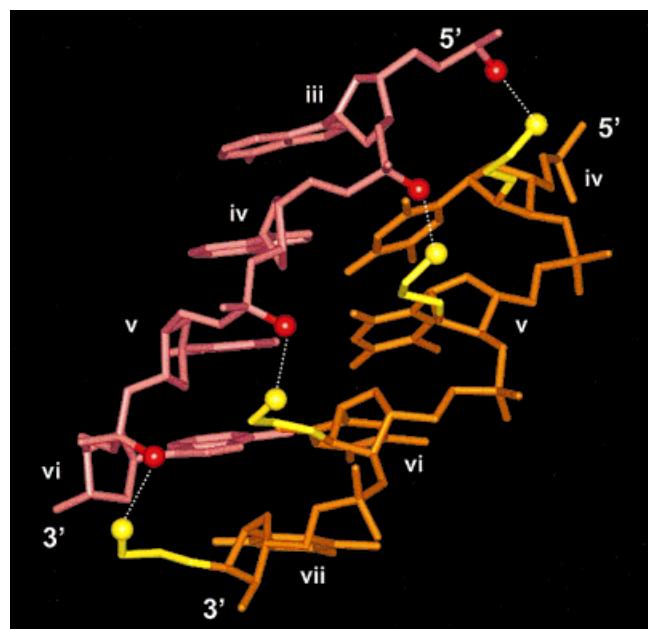


Abb. 3. Molekülmodell, das die Wechselwirkung zwischen den 2'-Aminoethoxy-Seitenketten (gelb) und den pro-R-Phosphat-Sauerstoffatomen (rot) verdeutlicht (N-O 2.8 Å). Wegen der größeren Übersichtlichkeit sind nur vier Reste des zweiten (pinkfarben) und dritten Strangs (orangefarben) dargestellt. Dieses Modell wurde aus der gemittelten MD-Struktur nach 1 ns Simulationsdauer mit einer T₁₀:A₁₀:T₁₀-Tripelhelix mit einem vollständig 2'-Aminoethoxy-modifizierten dritten Strang (Kleinbuchstaben) abgeleitet. Mit einer entfernungsabhängigen dielektrischen Funktion wurde eine wäßrige Umgebung ohne Berücksichtigung der Gegenionen simuliert; diese Näherung wurde für die Analyse der geometrischen Faktoren als ausreichend erachtet.^[15]

um die Bindung an die DNA konkurrieren können und vielleicht nützliche Verbindungen für die Regulation der Genexpression sein.

Experimentelles

Kinetische Messungen: $2\mu\text{m}$ biotinylierte DNA (mit Haarnadelkonformation) in Bindepuffer (siehe Legende zu Abb. 2) wurden auf einen mit Streptavidin beschichteten Chip (SA-5, Pharmacia Biosensor) aufgetragen und gründlich gewaschen. Die Assoziationskurve wurde ermittelt, indem das Oligonukleotid in Bindepuffer mit einer Geschwindigkeit von $5\mu\text{Lmin}^{-1}$ innerhalb von 10 min bei 25°C injiziert wurde. Anschließend wurde die Oligonukleotidlösung durch reinen Bindepuffer ersetzt und die Dissoziationskurve über 10 min aufgenommen. Der Sprung in den Resonanzeinheiten (RU) zwischen der Assoziations- und der Dissoziationskurve entspricht der Änderung im Brechungsindex der beiden Lösungen. Um den Drittstrang (Oligonukleotid) vollständig vom Chip zu entfernen, wurde nach jeder Kinetikmessung ein Denaturierungsschritt (10mM NaOH , 1 min) und anschließend ein Waschschritt mit Bindepuffer durchgeführt. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden mit einem Programm ermittelt, das unter Annahme einer Kinetik erster Ordnung die Kurve nichtlinear anpaßt (BIA Evaluation, Pharmacia Biosensor).

Über einen Konzentrationsbereich von $0.1\text{--}1.0\mu\text{m}$ (Oligonukleotid **I**) sowie $10\text{--}100\mu\text{m}$ (Oligonukleotid **II**) wurden die Tests mit verschiedenen Mengen immobilisierter biotinylierter Haarnadel-DNA durchgeführt. Die aufgeführten Geschwindigkeitskonstanten wurden aus mindestens zwölf Messungen bei unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt. In Kontrollexperimenten wurde bestätigt, daß **I** und **II** allein nicht an den Streptavidin-Chip binden.

Eingegangen am 3. November 1997 [Z11115]

Stichwörter: Bioorganische Chemie • DNA-Erkennung • Molekulare Erkennung • Oligonukleotide • Tripelhelices

- [1] C. O. Pabo, R. T. Sauer, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 1053–1095; D. Rhodes, J. W. R. Schwabe, L. Chapman, L. Fairall, *Phil. Trans. R. Soc. London B* **1996**, *351*, 501–509.
- [2] P. E. Nielsen, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 505–508; H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, *238*, 645–650; J. W. Trauger, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature* **1996**, *382*, 559–561.
- [3] S. Neidel, *Anti-Cancer Drug Des.* **1997**, *12*, 433–442; C. Giovannangeli, C. Hélène, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 413–421; L. J. Maher, *Cancer Invest.* **1996**, *14*, 66–82.
- [4] C. Escudé, J.-C. François, J.-S. Sun, G. Ott, M. Sprinzl, T. Garestier, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5547–5553.
- [5] W. T. Markiewicz, *J. Chem. Res. Synop.* **1979**, 24–25; M. Krecmerova, H. Hrbacecky, A. Holly, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1990**, *55*, 2521–2536.
- [6] Die Schmelztemperatur eines Triplex mit dem 2'-Aminoethoxy-modifizierten Oligonukleotid als Drittstrang und durchgehend korrekter Basenpaarungen liegt um 9.9°C höher als die des analogen Komplexes mit einer G-C-Fehlpaarung in der Doppelstrang-DNA ds(GCTAAGAAGAGAGAGATCG), mit dem nichtmodifizierten Kontroll-Oligonukleotid als Drittstrang beträgt diese Differenz 2.4°C .
- [7] C. J. Guinoss, G. D. Hoke, S. Frier, J. F. Martin, D. J. Ecker, C. K. Mirabelli, S. T. Crooke, P. D. Cook, *Nucleosides Nucleotides* **1991**, *10*, 259–262.
- [8] P. Martin, *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 486–504.
- [9] A. Szabo, L. Stolz, R. Granzow, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 699–705.
- [10] M. Rougée, B. Faucon, J.-L. Mergny, F. Barcelo, C. Giovannangeli, T. Garestier, C. Hélène, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9269–9278; L. E. Xodo, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228*, 918–926.
- [11] Wenn das Oligonukleotid **I** an den DNA-Duplex band, stellten wir im CD-Spektrum zwei ausgeprägte Minima bei 220 und 265 nm fest, die auf die Bildung eines dreisträngigen Komplexes hindeuten. V. N.

- Soyfer, V. N. Potaman, *Triple-Helical Nucleic Acids*, 1. Aufl., Springer, New York, **1995**, S. 54–55.
- [12] R. H. Griffey, B. P. Monia, L. L. Cummins, S. Freier, M. J. Greig, C. J. Guinoss, E. Lesnik, S. M. Manalili, V. Mohan, S. Owens, B. R. Ross, H. Sasmor, E. Wancewicz, K. Weiler, P. D. Wheeler, P. D. Cook, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 5100–5109.
- [13] U. Pieles, W. Zürcher, M. Schär, H. E. Moser, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3191–3196.
- [14] T. J. Povsic, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3059–3061.
- [15] V. Fritsch, R. Wolf, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1994**, *11*, 1161–1174.
- [16] E. S. Priestley, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4761–4765.

Acetylenyclophane als Fullerenvorstufen: Bildung von C_{60}H_6 und C_{60} bei der laserdesorptionsmassenspektrometrischen Untersuchung von $\text{C}_{60}\text{H}_6(\text{CO})_{12}$ **

Yves Rubin,* Timothy C. Parker, Salvador J. Pastor, Satish Jalasatgi, Christophe Boulle und Charles L. Wilkins*

In früheren Berichten^[1] haben wir vorgeschlagen, daß hochgradig ungesättigte makrocyclische Cyclophane wie **1** und **2** in einem Prozeß, der der Isomerisierung von Mono- und Polycyclen mit sp-hybridisierten Kohlenstoffatomen in der Gasphase zu Fullerenen bei der Verdampfung von Graphit analog ist, als Vorstufen von Fullerenen C_{60} und seinen endohedralem Metallkomplexen dienen können (Schema 1).^[2, 3] Die Bildung endohedralem Übergangsmetallkomplexe auf diese Weise ist im Hinblick auf die außergewöhnlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften von C_{60} besonders reizvoll.^[4] Wir berichten hier, daß der Acetylen-makrocyclus **3** bei Laserdesorptionsmassenspektrometrieexperimenten in der Gasphase zu $\text{C}_{60}\text{H}_6^-$ und C_{60} -Ionen führt.^[5]

Bei der Untersuchung der Thermochemie von **2** durch matrixunterstützte Laserdesorption/ionisations-Fourier-Transform- (MALDI-FT-) und APCI-Negativ-Ionen-Massen-spektrometrie (APCI = chemische Ionisation bei Atmosphärendruck) wurde festgestellt, daß das Stammion ($\text{C}_{60}\text{H}_{18}$) nur wenig dazu neigt, Wasserstoff zu verlieren.^[1a] Dies erschien einigermaßen überraschend angesichts der Leichtigkeit, mit der Endiine durch Bergmann-Cyclisierung 1,4-Benzoldiradi-

[*] Prof. Y. Rubin, Dr. T. C. Parker, Dr. S. Jalasatgi, Dr. C. Boulle
Department of Chemistry and Biochemistry
University of California, Los Angeles
Los Angeles, CA 90095-1569 (USA)
Fax: (+1) 310-206-7649
E-mail: rubin@chem.ucla.edu

Prof. C. L. Wilkins, S. J. Pastor
Department of Chemistry
University of California, Riverside
Riverside, CA 92521 (USA)
Fax: (+1) 909-787-4713
E-mail: cwilkins@citrus.ucr.edu

[**] Wir danken dem US Office of Naval Research (N00014-94-1-0534) (Y.R.) und den NIH (GM44606) (C.L.W.) für finanzielle Unterstützung.