

Zeitaufgelöste Charakterisierung von Ribozymen durch Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)**

Andreas Jenne, Walter Gmelin, Nikolai Raffler und Michael Famulok*

In zunehmendem Maße werden Ribozyme zur Inhibierung der Genexpression auf der Ebene von Protein-codierenden mRNAs eingesetzt.^[1, 2] Die Möglichkeit, Ribozyme in lebende Organismen endo- oder exogen einzuschleusen, eröffnet ihnen dabei ein breites Anwendungspotential in der Gentherapie,^[1, 3–5] der funktionellen Genomanalyse^[6] und der Biotechnologie.^[7] Das am häufigsten verwendete Ribozym ist das Hammerhead-Ribozym (HHR), eine kleine katalytische RNA, die andere RNA-Moleküle intermolekular spalten kann.^[8] Ihre Spezifität wird über Substratbindungsstellen determiniert, die in ihrer Sequenz und Länge variabel sind, so daß die Spaltungsaktivität gegen fast jede beliebige mRNA gerichtet werden kann. Trotz des universellen Einsatzpotentials gibt es eine Reihe von Faktoren, die bei der Entwicklung therapeutischer Ribozyme in Betracht gezogen werden müssen, etwa die Zugänglichkeit der Ribozymbindungsstellen auf der Ziel-RNA in vivo,^[9] die Selektivität der Substraterkennung^[1] und die Effizienz der Spaltung im intrazellulären Milieu.^[10, 11] Auch wenn zu einigen dieser Faktoren computerunterstützt Vorhersagen möglich sind,^[12] kommt man nicht umhin, solche Vorhersagen experimentell zu verifizieren, indem man die HHR-Konstrukte unter den jeweiligen Bedingungen kinetisch charakterisiert. Verfahren, die ein Hochdurchsatz-Screening von Ribozymen zur schnellen qualitativen Evaluierung der kinetischen Eigenschaften erlauben, sind daher von besonderem Interesse, zumal es bislang keine befriedigenden Lösungen mit den konventionellen Methoden gibt.

Hier berichten wir über eine zeitaufgelöste kinetische Analyse von Ribozymen im Stundenbereich mit Hilfe von FRET-Oligonucleotiden^[13] (FRET = Fluoreszenzresonanzenergietransfer^[14]). Das FRET-Prinzip wurde bereits früher angewendet, z. B. zur Bestimmung der Aktivität von Phosphodiesterasen,^[15] zur Aufklärung der Struktur von RNA-Molekülen^[16, 17] und zur Quantifizierung von PCR-Reaktionen.^[18] Messungen des intermolekularen FRET mit einfach markierten Substraten und Hammerhead-Ribozymen

wurden auch zur Bestimmung der Assoziation und Dissoziation von Substrat und Produkt eingesetzt.^[19, 20]

In dem von uns verwendeten FRET-Substrat ist die Fluoreszenz der Fluorophor-Einheit (z. B. 6-Carboxyfluorescein FAM) durch die räumliche Nähe zu einer fluoreszenzlöschenden Einheit (z. B. 6-Carboxytetramethylrhodamin TAMRA) intramolekular gelöscht (Abbildung 1 a, b). Bei der Spaltung eines solchen Substrats durch das Ribozym wird ein Fluoreszenzsignal erzeugt, das zeitaufgelöst mit geeigneten Spektrometern quantifiziert werden kann (Abbildung 1 c). Da der Anstieg der Fluoreszenz direkt mit der Spaltungsgeschwindigkeit korreliert, eignet sich das System zur sensitiven, nichtradioaktiven und schnellen Analyse von Ribozymaktivitäten.

Auf der Basis eines bekannten HHR-Substrat-Komplexes^[21] (Abbildung 1 a) haben wir ein FRET-Substrat (SL1) konstruiert und zur zeitabhängigen Messung der Aktivität des Ribozyms HHR1 eingesetzt. Als Referenz und Negativkontrolle wurde eine inaktive HHR-Mutante (HHR1_{mut}) mit identischen Substratbindungsstellen verwendet. Aus dem bei einer Reihe von Substratkonzentrationen ermittelten spaltungsbedingten Fluoreszenzanstieg konnten die Michaelis-Menten-Parameter von HHR1 in einem einzigen Experiment erhalten werden. Abbildung 2 b zeigt die Eadie-Hofstee-Auftragung zur Bestimmung der k_{cat}/K_M -Werte als Ergebnis dieser Messung. Um den Einfluß der FAM/TAMRA-Markierung auf die Spaltungseffizienz zu ermitteln, haben wir die Kinetikparameter auch konventionell (Auftrennung der Spaltprodukte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Auswertung der Gele durch Autoradiographie)^[22] mit einem ³²P-markierten Substrat ohne FRET-Markierung (S1) bestimmt (Abbildung 2 a). Es zeigte sich, daß für beide Substrate (S1 und SL1) sowohl die k_{cat} - als auch die K_M -Werte in der gleichen Größenordnung lagen, was beweist, daß das FRET-Substrat für unsere Zielsetzung bestens geeignet ist.

Um zu testen, ob sich unser Verfahren zur schnellen Charakterisierung von Ribozymen eignet, haben wir in parallelen Ansätzen Aktivitätsmessungen unter Veränderung jeweils eines anderen physikochemischen Parameters durchgeführt. Abbildung 3 a zeigt den zeitabhängigen Verlauf der Spaltung als Ergebnis einer typischen Messung. In den Abbildungen 3 b–d ist die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert, der Temperatur bzw. der Mg^{2+} -Konzentration wiedergegeben. Unter den gewählten Bedingungen waren der optimale pH-Wert 8, die optimale Mg^{2+} -Konzentration 8 mM und die optimale Temperatur 30 °C. Dieses relativ niedrige Temperatur-Optimum reflektiert wahrscheinlich die nicht sehr starke Bindung des Substrats an das Ribozym. Der Grund könnten die kurzen, nur fünf GC-Basenpaare enthaltenden Hybridisierungsbereiche bei zugleich relativ geringer Mg^{2+} -Konzentration (4.0 mM)^[23] sein. Schließlich untersuchten wir den Einfluß des Aminoglycosids Neomycin B, eines HHR-Inhibitors, auf die Spaltung (Daten nicht gezeigt). Es stellte sich heraus, daß die Spaltungsgeschwindigkeit in Gegenwart von 100 µM Neomycin nur noch ein Drittel der Geschwindigkeit ohne den Inhibitor betrug, was mit den Daten übereinstimmt, die in einer früheren Studie mit konventionellen Methoden ermittelt worden waren.^[24]

Um apparative Meßungenauigkeiten und unspezifische Fluoreszenzeffekte (z. B. Fluktuation des Signals als Folge

[*] Prof. Dr. M. Famulok,^[+] Dr. A. Jenne, Dipl.-Chem. W. Gmelin, N. Raffler
Institut für Biochemie der Universität
Feodor-Lynen-Straße 25, D-81377 München
Fax: (+49) 89-74017-448
E-mail: Famulok@lmb.uni-muenchen.de

[+] Neue Adresse:
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität
Gerhard-Domagk-Straße 1, D-53121 Bonn
Fax: (+49) 228-73-5388
E-mail: Famulok@uni-bonn.de

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, den Fonds der Chemischen Industrie und die Karl-Ziegler-Stiftung gefördert. Wir danken E.-L. Winnacker für seine Unterstützung sowie F. Eckstein, M. Blind, G. Sengle, G. Mayer, D. Proske und N. Piganeau für hilfreiche Kommentare. M. Herrmann danken wir für die Bereitstellung von HeLa-Zellkernextrakten und wertvolle Hinweise.

erzeugten Ribozymen in Gegenwart von Zellkernextrakten. Abbildung 4 zeigt das Ergebnis der Messungen einer T7-RNA-Polymerase-abhängigen Transkription von Ribozym-codierenden DNA-Templaten in Gegenwart von HeLa-Zellkernextrakten. Zur Kontrolle wurden parallel Messungen

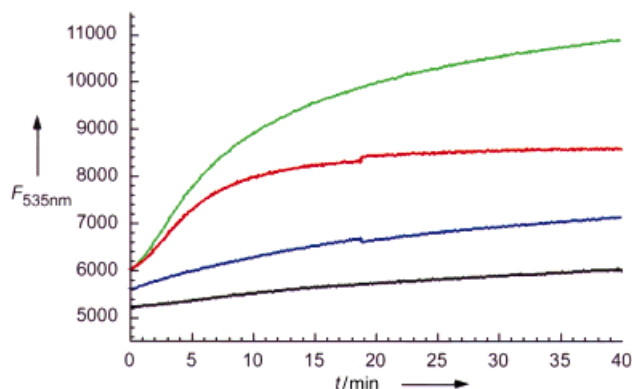


Abbildung 4. Zeitabhängiger Fluoreszenzanstieg von in situ erzeugtem HHR und Kontrollansätzen in Gegenwart von HeLa-Zellkernextrakten. HHR1_{mut}-DNA + T7-RNA-Polymerase (schwarz), HHR1-DNA ohne T7-RNA-Polymerase (blau), HHR1-DNA + T7-RNA-Polymerase (grün), HHR1-DNA + T7-RNA-Polymerase, korrigiert um die unspezifischen Hintergrundaktivitäten (rot; siehe Experimentelles).

ohne T7-RNA-Polymerase (blau) sowie mit der inaktiven HHR-Mutante (schwarz) durchgeführt. In beiden Fällen steigt die Fluoreszenz leicht an, was wohl auf eine unspezifische Spaltung des Substrats durch Nucleasen im Zellkernextrakt zurückzuführen ist. Die grüne Kurve beschreibt die Fluoreszenz, die bei der Erzeugung von HHR1 in situ gemessen wurde. Die rote Kurve gibt dieselbe Messung wieder, korrigiert um die unspezifischen Hintergrundaktivitäten (siehe Experimentelles). Ihr erwartungsgemäß sigmoidaler Verlauf reflektiert den stetigen Anstieg der Ribozymkonzentration während der Transkriptionsreaktion. Diese Ergebnisse belegen, daß es prinzipiell möglich ist, Ribozyme als Reporter zur Messung von Transkriptionsgeschwindigkeiten in vitro und in vivo einzusetzen. Ein derartiges Reportersystem könnte beispielsweise zum Hochdurchsatz-Screening von kombinatorischen Substanzbibliotheken auf Inhibitoren von Transkriptionsfaktoren verwendet werden, da es vollautomatisiert ablaufen kann und ohne zusätzliche Pipettierschritte auskommt.

Fazit: Mit FRET-Substraten gelingt die Charakterisierung von Ribozymen unter den verschiedensten Bedingungen in einem Bruchteil des zeitlichen Aufwands konventioneller Methoden. Insbesondere die sehr einfache Automatisierung und die Echtzeit-Analytik vieler paralleler Reaktionsansätze sowie die Vermeidung radioaktiver Markierung lassen unser System für ein Hochdurchsatz-Screening von Ribozymaktivitäten und Transkriptionsgeschwindigkeiten sehr attraktiv erscheinen.

Experimentelles

Herstellung von HHR1: Der Sense-Strang des Ribozyms, einschließlich der 5'-terminalen T7-Promotor-Sequenz, wurde an einem Expedite Oligonucleotide Synthesizer (Millipore, USA) synthetisiert: 5'-TCTAATACG-

ACTCACATATAGGGTCCCTCTGATGAGGCCGTTAGGCCGAAA-CTCGT-3' (HHR1-DNA; die Primerbindungsstellen sind kursiv geschrieben). Die Synthese des Antisense-Stranges sowie die Amplifizierung des doppelsträngigen Templates erfolgten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit den Primern 5'-TCTAATACGACTCACATATA-3' (5'-Primer) und 3'-GGCAATCCGGCTTTGAGCA-5' (3'-Primer). Ein typischer 100-µL-PCR-Reaktionsansatz enthielt 10 mM Tris-HCl, pH 8.9, 100 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mg mL⁻¹ Rinderserumalbumin, 0.05 % Tween20 (v/v), 200 µM dNTP, 2 µM 5'- und 3'-Primer, ca. 200 nM einzelsträngiges DNA-Templat und 2.5 Einheiten Tth-DNA-Polymerase. Die Amplifizierung erfolgte nach Herstellerprotokoll (Roche, Mannheim) in vier bis fünf PCR-Cyclen a 95 °C/55 s, 55 °C/1 min, 72 °C/1 min. Die amplifizierte DNA wurde nach Standardmethoden isoliert^[25] und über ein Agarosegel von überschüssigen Primern gereinigt.

Analog wurde ein doppelsträngiges DNA-Templat, codierend für eine inaktive Ribozym-Variante, aus folgender einzelsträngigen DNA hergestellt: 5'-TCTAATACGACTCACATATAGGGTCCCTCTTAGGAGGCCGTTAGGCCA GAACTCGT-3' (HHR1_{mut}-DNA; Primerbindungsstellen sind kursiv, die vier Mutationen fett geschrieben). Man verwendete die Primer 5'-TCTAATACGACTCACATATA-3' (5'-Primer) und 3'-GGCAATCCGGCTTTGAGCA-5' (3'-Primer).

Die 5'-FAM- und 3'-TAMRA-markierte Substrat-RNA mit der Sequenz 5'-FAM-ACGAGUCAGGAUU-TAMRA-3' wurde bei Eurogentec (Belgien) HPLC- und gelelektrophoretisch gereinigt bezogen. Es zeigte sich, daß aussagekräftige Kinetikmessungen sehr stark von der Einheitlichkeit des FRET-Substrats abhängig waren. Das Verhältnis von Fluorophor- zu Lösch-Farbstoff, welches ein Maß für die Reinheit der Probe ist, wurde anhand der Fluoreszenz wie beschrieben^[13, 26] berechnet.

Ein typischer 50-µL-Reaktionsansatz zur In-vitro-Transkription für die Ribozym-Herstellung enthielt 40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 2 mM Spermidin, 5 mM Dithiothreitol, 8 mM MgCl₂, 0.2–2 µM HHR1-DNA oder HHR1_{mut}-DNA, 4 mM A/C/G/UTP, 40 Einheiten RNasin (Promega, Madison, WI) und 50 Einheiten T7-RNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg). Die RNA wurde über ein 16 % denaturierendes Polyacrylamidgel (37.5:1) aufgereinigt. Zur Messung der Aktivität von in situ erzeugtem HHR1 enthielt der Ansatz zusätzlich 100 nM SL1 und 10 Einheiten HeLa-Zellkernextrakt (HeLa Cell Extract Transcription System, Promega, Madison, WI). Die In-vitro-Transkription wurde durch Zugabe von Polymerase und Zellkernextrakt gestartet und bei 37 °C für die Dauer der Messung inkubiert.

Die Echtzeit-Messungen des ribozymbedingten Fluoreszenzanstiegs wurden in 50-µL-Reaktionsansätzen durchgeführt. Das Meßsignal umfaßt sowohl den chemischen Schritt der Spaltung als auch die Freisetzung der Spaltprodukte. Die Fluoreszenz wurde automatisiert mit einem temperierbaren ABI-Prism-770-Spektrometer gemessen (Applied Biosystems, USA). In Abständen von 0.5–0.7 s wurden Spektren im Emissionswellenlängenbereich der beiden Farbstoffe (FAM: λ_{max} = 535, TAMRA: λ_{max} = 582 nm) aufgezeichnet (Anregungsenergie: 488 nm). Alle Messungen waren Triplett-Bestimmungen. Durch Auftragen der relativen Fluoreszenz des Fluorophors (ΔR_n-Wert) bei 535 nm gegen die Zeit wurde der Anteil an gespaltenen Substrat-RNA relativ zur Negativkontrolle (identischer Ansatz mit inaktiver HHR1_{mut}-DNA anstatt HHR1-DNA) bestimmt. Die Rohdaten wurden in Microsoft Excel importiert, bearbeitet und anschließend mit dem Programm KaleidaGraph (Abelbeck Software, München) ausgewertet.

Um unspezifische Fluoreszenzeffekte zu eliminieren, mußte berücksichtigt werden, daß bei einem Anstieg der Fluoreszenz als Folge der katalytischen Spaltung die absoluten, nicht aber die prozentualen Fluoreszenzschwankungen zunehmen. Der zeitliche Verlauf der Spaltung wurde anhand der Kurve, die für die Negativkontrollen gemessen wurde, und deren prozentualer zeitlicher Abweichung vom Anfangswert entsprechend Gleichung (1) korrigiert [$F_{\text{kor}}(t)$: korrigierte Fluoreszenz zum Zeitpunkt t ; $F_{\text{neg}}(t)$: Fluoreszenz der Negativkontrolle zum Zeitpunkt t ; $F_{\text{neg}}(t_0)$: Fluoreszenz der Negativkontrolle zum Zeitpunkt $t=0$; $F_{\text{HHR}}(t)$: gemessene Fluoreszenz in Gegenwart von transkribiertem HHR zum Zeitpunkt t].

$$F_{\text{kor}}(t) = \frac{F_{\text{neg}}(t)}{F_{\text{neg}}(t_0)} F_{\text{HHR}}(t) \quad (1)$$

Eingegangen am 3. Dezember 1998 [Z12744]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1300–1303

Stichwörter: Fluoreszenzspektroskopie • Hammerhead-Ribozym • Ribozyme • Screening-Verfahren

- [1] K. R. Birikh, P. A. Heaton, F. Eckstein, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245*, 1–16; B. Bramlage, E. Luzi, F. Eckstein, *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 434–438.
- [2] N. Usman, D. T. Stinchcomb in *Catalytic RNA*, Vol. 10 (Hrsg.: F. Eckstein, D. M. J. Lilley), Springer, Berlin, **1996**, S. 243–264.
- [3] N. Lan, R. P. Howrey, S.-W. Lee, C. A. Smith, B. A. Sullenger, *Science* **1998**, *280*, 1593–1596; D. J. Weatherall, *Curr. Biol.* **1998**, *8*, R696–R698.
- [4] P. D. Good, A. J. Krikos, S. X. Li, E. Bertrand, N. S. Lee, L. Giver, A. Ellington, J. A. Zaia, J. J. Rossi, D. R. Engelke, *Gene Ther.* **1997**, *4*, 45–54.
- [5] D. Looney, M. Yu in *Methods in Molecular Biology: Ribozyme Protocols*, Vol. 74 (Hrsg.: P. C. Turner), Humana, Totowa, NJ, **1997**, S. 469–486.
- [6] R. E. Christoffersen, *Nature Biotechnol.* **1997**, *15*, 483–484.
- [7] X. Yang, Y. Yie, F. Zhu, Y. Liu, L. Kang, X. Wang, P. Tien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4861–4865.
- [8] J. Haseloff, W. L. Gerlach, *Nature* **1988**, *334*, 585–591.
- [9] H. Chen, G. Ferbeyre, R. Cedergren, *Nature Biotechnol.* **1997**, *15*, 432–435; J. M. Burke, *Nature Biotechnol.* **1997**, *15*, 414–415.
- [10] E. Jankowsky, B. Schwenzer, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 129–134.
- [11] R. Hormes, M. Homann, I. Oelze, P. Marschall, M. Tabler, F. Eckstein, G. Szakiel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 769–775.
- [12] V. Patzel, G. Szakiel, *Nature Biotechnol.* **1998**, *16*, 64–68.
- [13] K. J. Livak, S. J. A. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, K. Deetz, *PCR Methods Appl.* **1995**, *4*, 357–362.
- [14] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescent Spectroscopy*, Plenum, New York, **1983**.
- [15] A. Berkessel, R. Riedl, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1518–1520; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1481–1483.
- [16] T. Tuschl, C. Gohlke, T. M. Jovin, E. Westhof, F. Eckstein, *Science* **1994**, *266*, 785–789.
- [17] N. G. Walter, K. J. Hampel, K. N. Brown, J. M. Burke, *EMBO J.* **1998**, *17*, 2378–2391.
- [18] P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7276–7280.
- [19] T. A. Perkins, J. Goodchild in *Methods in Molecular Biology: Ribozyme Protocols*, Vol. 74 (Hrsg.: P. C. Turner), Humana, Totowa, NJ, **1997**, S. 221–229.
- [20] T. A. Perkins, D. E. Wolf, J. Goodchild, *Biochemistry* **1996**, *35*, 16370–16377.
- [21] M. Fedor, O. C. Uhlenbeck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1668–1672.
- [22] P. Hendry, M. J. McCall, T. J. Lockett in *Methods in Molecular Biology: Ribozyme Protocols*, Vol. 74 (Hrsg.: P. C. Turner), Humana, Totowa, NJ, **1997**, S. 221–229.
- [23] Die Mg^{2+} -Konzentration wurde so gewählt, daß sie der Konzentration in eukaryontischen Transkriptionsansätzen in Gegenwart von Zellkernextrakten entspricht. Unter diesen Bedingungen soll unser Spaltungsassay später eingesetzt werden.
- [24] T. K. Stage, K. J. Hertel, O. C. Uhlenbeck, *RNA* **1995**, *1*, 95–101.
- [25] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl., CSHL, Cold Spring Harbor, **1989**.
- [26] W. A. Rudert, E. R. Braun, S. J. Faas, M. R. A. Jaquins-Gerstl, M. Trucco, *BioTechniques* **1997**, *22*, 1140–1145.

Das Prinzip der unpassenden Koordinationszahlen: Design und Konstruktion von supramolekularen $M_2M'_3L_6$ -Clustern mit C_{3h} -Symmetrie**

Xiankai Sun, Darren W. Johnson, Dana L. Caulder, Ryan E. Powers, Kenneth N. Raymond* und Edward H. Wong*

Viele elegante oligomere' und polymere Strukturen basieren auf Metall-Ligand-Wechselwirkungen, die zu wohlorganisierten supramolekularen Architekturen führen. Beispiele sind ausgedehnte zwei- oder dreidimensionale Anordnungen^[1–7] und verschiedene diskrete Cluster.^[8–30] Allerdings sind bislang nur relativ wenige dieser Cluster gezielt hergestellt worden. Wir haben ein rationales Design für die Synthese hochsymmetrischer Cluster durch die Verwendung des „Prinzips der unpassenden Koordinationszahlen“ entwickelt. Beispiele sind M_2L_3 -Helicate^[15, 24, 31, 32] und ihre *meso*-Gegenstücke (Mesocate)^[32] sowie M_4L_6 ^[12, 33–35] und M_4L_4 -Tetraeder.^[36] Bei diesen Clustern koordinieren drei zweizählige Chelatbildner ein drei- oder vierwertiges Metallion pseudo-oktaedrisch und bilden so eine dreizählige Achse. Ein symmetrischer, mehrfach zweizähliger Ligand erzeugt das andere Symmetrieelement: eine zwei-^[15, 24, 31, 32] oder dreizählige Achse^[36] oder eine Spiegelebene.^[32]

Im folgenden stellen wir das rationale Design eines Heterometall-Clusters vor. Alternativ zur Einführung des Symmetrieelements durch einen symmetrischen Liganden werden dabei zwei Metalle verwendet, um zwei nicht zueinander passende Symmetrieelemente zu erhalten (Abbildung 1). So beruht dann die Clusterbildung auf dem „Prinzip der unpassenden Koordinationszahlen“.^[37] Prinzipiell bildet der Ligand einen Teil der asymmetrischen Einheit des Clusters und muß zwei Bindungsstellen enthalten, z. B. einen harten und einen weichen Donor, welcher jeweils ein Metallatom gegenüber dem anderen bevorzugt.

Ein chirales Dreifach-Helicate hat idealisiert D_3 -Symmetrie, während ein achirales Dreifach-Mesocate C_{3h} -symmetrisch ist. Um ein Heterometall-Helicate (oder -Mesocate) der Zusammensetzung $M_2M'_3L_6$ zu synthetisieren, muß eine dreizählige und senkrecht hierzu eine zweizählige (Spiegelebene) Bindungsstelle gebildet werden (Abbildung 1).^[38]

[*] Prof. Dr. K. N. Raymond, D. W. Johnson, Dr. D. L. Caulder, Dr. R. E. Powers
Department of Chemistry, University of California
Berkeley, CA 94720 (USA)
Fax: (+1) 510-486-1460
E-mail: raymond@socrates.berkeley.edu
Prof. Dr. E. H. Wong, X. Sun
Department of Chemistry, University of New Hampshire
Durham, NH 03824 (USA)
Fax: (+1) 603-862-4278
E-mail: ehw@christa.unh.edu

[**] Coordination Number Incommensurate Cluster Formation, 9. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der NSF (Grant CHE-9709621) und durch ein Research Corporation Research Opportunities Grant gefördert. – 8. Mitteilung: Lit. [34].



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.