

Tabelle 3. Spaltprodukte nach Abbau von Ecoflex mit isolierter Reinkultur (Test 1–3) und mit Rein- und Mischkultur aus Kompost (Test 4). × = detektiert; – = nicht detektiert.

Test ^[a]	Monomere ^[b]			aliph. Oligomere ^[b]		arom. Oligomere ^[b]	
	B	A	T	BA	ABA	BT	BTB
1	×	×	×	×	×	×	×
2	×	×	×	×	×	–	–
3	×	×	×	–	–	–	–
4	–	–	–	–	–	–	–

[a] Test 1: 1750 mg Polyester in 80 mL Medium. Abbauprodukte mit isolierter Reinkultur nach 21 d. Abbruch der Enzymaktivität durch pH-Wertänderung (In-situ-Bildung großer Mengen an Säuren). Test 2–4: 350 mg Polyester in 80 mL Medium. Abbauprodukte mit isolierter Reinkultur nach 7 d (Test 2) und nach 21 d (Test 3). Bei Test 4 wurde 7 d mit isolierter Reinkultur und anschließend 14 d mit Komposteluat inokuliert. [b] A: Adipinsäure, B: 1,4-Butandiol, T: Terephthalsäure. Produkte, die von der Spaltung an M (siehe Schema 2) herrühren könnten, sind hier nicht berücksichtigt. Nach Test 4 konnten durch GC-Analyse keine Abbauintermediate mehr detektiert werden.

nicht bewiesen. Ebenso wahrscheinlich ist es, daß der Copolyester „zufällig“ der Struktur von natürlichen Substraten ähnelt und deshalb von den Exoenzymen gespalten werden kann, die Monomere aber dann durch die innerzellulären Biosynthesewege nicht verarbeitet werden können.

Anhand der hier beschriebenen Abbauuntersuchungen konnte gezeigt werden, daß die im Kompost ubiquitär vorhandenen Mikroorganismen in der Lage sind, auf fossilen Rohstoffen basierende aliphatisch-aromatische Copolyester wie Ecoflex vollständig biologisch abzubauen, d. h. vollständig in natürliche Endprodukte des Stoffwechsels zu mineralisieren. Entscheidend ist demnach für die biologische Abbaubarkeit allein die chemische Struktur und nicht die Rohstoffquelle.

Eingegangen am 30. November 1998 [Z12731]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1438–1442

Stichwörter: Biologischer Abbau • Copolyester • Kompostierung • Metabolismus • Polymere

- [1] R. W. Lenz, *Adv. Polym. Sci.* **1993**, 107, 1–40.
- [2] J. Schroeter, *Kunststoffe* **1998**, 88(10), 1822–1830.
- [3] Y. Tokiwa, T. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42, 1071–1072.
- [4] Y. Yakabe, N. Kazuo, T. Hara, Y. Fujino, *Chemosphere* **1992**, 25(12), 1879–1888.
- [5] T. Walter, J. Augusta, R.-J. Müller, H. Widdecke, J. Klein, *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, 17, 218–224.
- [6] U. Witt, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer, *Macromol. Chem. Phys.* **1996**, 197, 1525–1535.
- [7] U. Witt, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer, *J. Environ. Polym. Degrad.* **1997**, 5, 81–89.
- [8] E. Rantze, I. Kleeberg, U. Witt, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer, *Macromol. Symp.* **1998**, 130, 319–326.
- [9] U. Witt, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer, *J. Environm. Polym. Degrad.* **1995**, 3, 215–223.
- [10] J. C. G. Ottow, *Naturwissenschaften* **1978**, 65, 413–423.
- [11] U. Seeliger (BASF AG), Presseinformation, Ecoflex® – Biologisch abbaubarer Kunststoff von BASF, **1998**.
- [12] J. M. G. Cowie, *Chemie und Physik der Polymeren*, VCH, Weinheim, **1976**, S. 96.
- [13] I. Kleeberg, C. Hetz, R. M. Kroppenstedt, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, 64, 1731–1735.

Topologische Verbindung zwischen einer Doppelstrang-DNA und einer ringförmigen Einzelstrang-DNA**

Heiko Kuhn,* Vadim V. Demidov* und Maxim D. Frank-Kamenetskii*

Es ist bekannt, daß DNA eine Reihe topologischer (und pseudotopologischer) Strukturen wie Knoten, Catenane, Borromäische Ringe und Pseudorotaxane bilden kann.^[1] Ebenso weiß man, daß die Topologie der DNA eine entscheidende Rolle bei solch grundlegenden biologischen Phänomenen wie ihrer Überspiralisierung und Topoisomerisierung spielt.^[2] Eine andere Ursache für das erhebliche Interesse an topologischen DNA-Strukturen höherer Ordnung rührt von der Erkenntnis her, daß topologische und pseudotopologische DNA-Formen eine stabile und sequenzspezifische DNA-Adressierung ermöglichen könnten. Entsprechend ließen sich auch eine „punktgenaue“ DNA-Detektion und eine präzise räumliche Positionierung von Liganden an einem DNA-Gerüst realisieren. Dies könnte zu neuen Anwendungen in der molekularen Biotechnologie, der Gentherapie und dem aufblühenden Feld der DNA-Nanotechnologie führen.^[1d, 3]

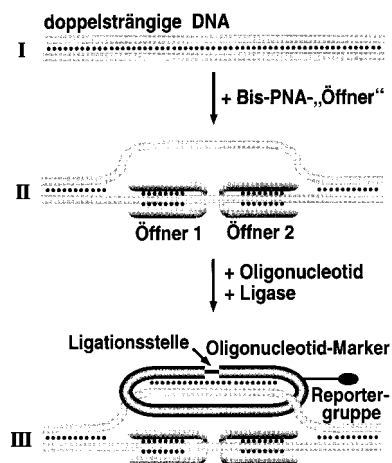
Eine der aussichtsreichen pseudotopologischen DNA-Konstruktionen ist das „DNA-Vorhängeschloß“. Es besteht aus einem langen Einzelstrang(ss)-DNA-Molekül, das zusammen mit einem kurzen, cyclischen Oligodesoxyribonucleotid (cODN) ein Pseudorotaxan bildet.^[4] Eine andere interessante Struktur vom Pseudorotaxantyp, die „gleitende Klammer“, enthält ein kurzes cODN, das auf eine Doppelstrang(ds)-DNA aufgefädelt ist.^[1c] Ohne den prinzipiellen Nutzen der erwähnten pseudotopologischen Strukturen für die DNA-Markierung in Zweifel ziehen zu wollen, ist zu bemerken, daß die cODN-Komponente in solchen Konstruktionen über nennenswerte Distanzen an der Ziel-DNA entlanggleiten kann, so daß die räumliche Präzision der Markierung beeinträchtigt ist.

Wir haben eine neue supramolekulare Struktur aufgebaut, ein „verbundenes“ DNA-Pseudorotaxan, in dem ein Teil einer cODN sequenzspezifisch auf einen Strang einer dsDNA aufgefädelt zu sein scheint (siehe Schema 1 und Abbildung 1a). In diesem System wird so lange eine echte topologische Verbindung aufrechterhalten, wie das dsDNA-Makromolekül die native Doppelhelixkonformation beibehält. Damit bleibt die cODN-Komponente während möglicher Manipulationen nach der Assemblierung korrekt an der

[*] Dr. H. Kuhn, Dr. V. V. Demidov, Prof. M. D. Frank-Kamenetskii
Center for Advanced Biotechnology
and Department of Biomedical Engineering
Boston University
36 Cummington Street, Boston, MA 02215 (USA)
Fax: (+1) 617-353-8501
E-mail: hkuhn@bu.edu
vvd@enga.bu.edu
mfk@enga.bu.edu

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health und von PerSeptive Biosystems (jetzt PE Biosystems) unterstützt. Wir danken Dr. M. Egholm und Dr. P. E. Nielsen für die Überlassung von PNA-Oligomeren.

Doppelhelix positioniert. Schema 1 verdeutlicht den schrittweisen Aufbau des Komplexes. Als erstes öffneten wir die dsDNA an zwei eng benachbarten Stellen mit einem Paar von Peptidnucleinsäure(PNA)-Öffnern.^[5, 6] Diese binden an einen der beiden DNA-Stränge und verdrängen den gegenüberliegenden Strang so aus seiner Position, daß er für die Hybridisierung mit einem ODN zugänglich wird.^[5a]



Schema 1. Die wichtigsten Schritte beim Zusammenfügen topologisch verbundener Pseudorotaxane und Catenane **III** an doppelsträngiger DNA **I**. Zunächst wird die Zielsequenz in der dsDNA (linear oder circular) an zwei dicht benachbarten Stellen durch das Einbringen eines Paares von PNA-Öffnern zwischen die Stränge geöffnet. Dadurch bildet sich Struktur **II**, in der einer der beiden dsDNA-Stränge für die Hybridisierung mit einem ODN zugänglich wird. Das ODN kann eine oder mehrere Reportergruppen enthalten; die Sequenz ist so gewählt, daß die Enden komplementär zu der freigelegten Ziel-DNA sind und durch die Hybridisierung in unmittelbarer Nachbarschaft zu liegen kommen. Nach der Hybridisierung wird das ODN durch enzymatische Ligation circularisiert.

Wie im Fall des Vorhängeschlosses^[4a] synthetisierten wir ein lineares ODN; es enthielt eine nichthomologe Sequenz, die von zwei zum verdrängten DNA-Strang komplementären Sequenzen aus 8–10 Nucleotiden flankiert wurde (siehe *Experimentelles*). Nach der Hybridisierung mit der Ziel-DNA lagen die beiden Enden der linearen ODN nebeneinander und wurden durch eine DNA-Ligase kovalent verknüpft. Das entstehende cODN bildete fast zwei Doppelhelixwindungen mit der verdrängten DNA und war daher mit der Zielsequenz topologisch verbunden. Folglich kann der entstandene cODN-dsDNA-Komplex nur durch Spaltung des DNA-Rückgrats oder durch vollständige Trennung der komplementären DNA-Stränge aufgelöst werden. Auf diese Weise wurde eine topologische Markierung in Form eines Ochrings sequenzspezifisch in dsDNA eingeführt (siehe Abbildungen 1a und 2a).

In unseren ersten Experimenten verwendeten wir ein lineares, 340 Basenpaare (bp) langes dsDNA-Fragment, das die Zielsequenz enthält, und analysierten den resultierenden Komplex anhand der Veränderung der elektrophoretischen Beweglichkeit (EMSA = electrophoretic mobility shift assay). In Abbildung 1b sieht man, daß nur wenn T4-DNA-Ligase und das ODN vorhanden sind (Spur 3), ein spezifisches Produkt (**III**) entsteht (das so langsam wie ein 1050 bp langes DNA-Fragment wandert).^[7] Unsere topologische Markierung

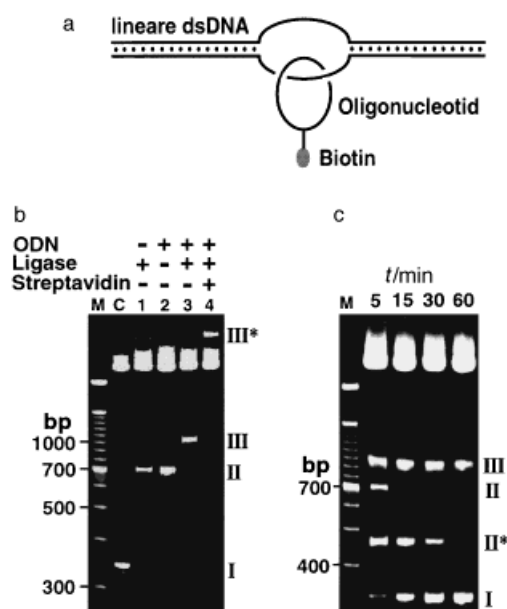


Abbildung 1. a) Nicht maßstabsgetreue, schematische Darstellung des mit einem linearen, 340 bp langen dsDNA-Fragment aufgebauten Pseudorotaxans **III**. Als Reportergruppe wurde ein biotinyliertes Segment in das Rückgrat des Oligonucleotids eingefügt. b) EMSA-Nachweis der spezifischen Bildung von **III** (siehe Schema 1; Spuren 3 und 4; Details sind unter *Experimentelles* beschrieben). In Spur C ist das Fragment **I** allein aufgetragen, in Spur M befinden sich (wie auch in den anderen EMSA-Auftragungen) Markerfragmente von 100 bp Größendifferenz (Gibco BRL). Die Spuren 1 und 2 geben Kontrollexperimente wieder. Ein Ansatz, der vor der Elektrophorese mit Streptavidin inkubiert wurde, ist in Spur 4 aufgetragen. Banden, die so schnell wie 700 bp lange Fragmente laufen, entsprechen dem DNA-PNA-Komplex **II**. c) EMSA-Analyse der Stabilität von **III**. Eine Mischung aus **II** und **III** wurde im Ligationspuffer die angegebenen Zeiten auf 65°C erhitzt. Während die PNA-Öffner allmählich von **II** abdissoziieren und dabei Komplex **II*** als Zwischenprodukt (Ziel-dsDNA + ein PNA-Öffner) sowie die ursprüngliche dsDNA **I** entstehen, bleibt die Menge an Pseudorotaxan **III** nahezu unverändert.

trug ein Biotinmolekül, und nach Zugabe von Streptavidin (Spur 4) wurde eine weitere spezifische Verzögerung von **III** sichtbar, die durch die Komplexbildung von Biotin durch Streptavidin zustandekam (**III***). Wenn **III** ein „verbundenes“ Pseudorotaxan ist, sollte es bei Temperaturen noch stabil sein, bei denen normale ODN-DNA-Doppelhelices bereits zerfallen. Um dies zu prüfen, erhitzen wir **III** zusammen mit dem PNA-DNA-Komplex **II** eine Stunde lang auf 65°C. Während dieser Zeit dissoziierten die PNA-Öffner, die sehr stabile Komplexe mit DNA bilden,^[6] vollständig von der DNA ab, während die Menge an **III** unverändert blieb (Abbildung 1c).

Nur die Bindung von allen drei spezifischen Liganden (den beiden PNA-Öffnern und der ODN-Sonde) an die dsDNA führte zur Produktbildung. Es durfte erwartet werden, daß bei der Komplexbildung so gut wie keine Fehlpaarungen zwischen cODN und dsDNA toleriert würden. Und tatsächlich können Fehlpaarungen an den Bindestellen der Öffner einfach kinetisch beim PNA-Bindeschritt unterschieden werden.^[8] Außerdem beeinflussen solche Fehlpaarungen die supramolekulare Zusammenlagerung zweimal, nämlich während der Öffnung der dsDNA und während der Hybridisierung mit dem ODN. Folglich wirken sie sich extrem ungünstig

aus. Eine Fehlpaarung dürfte sich weniger gravierend auswirken, wenn sie sich zwischen den Bindestellen der PNA-Öffner befindet. In diesem Fall ist die Fehlpaarung jedoch direkt an der Ligationsstelle oder in ihrer unmittelbaren Nähe, so daß die Schwächung des ODN-DNA-Komplexes zusammen mit der intrinsischen niedrigen Fehlertoleranz des Ligationselements^[9] die Circularisierung des ODN verhindern sollte. Tatsächlich gelang es uns nicht, ein „verbundenes“ Pseudorotaxan auf einem dsDNA-Fragment zusammenzufügen, das eine einzige Fehlpaarung in der Sequenz zwischen den beiden PNA-Bindestellen trug (Daten nicht gezeigt; die Position der Fehlpaarung ist unter *Experimentelles* angegeben).

Als nächstes „bauten“ wir ein DNA-Catenan mit einem sequenzspezifisch verschlossenen Verbindungselement, für das wir ein geschlossenes circuläres (cc=closed circular) dsDNA-Plasmid als Zielverbindung nutzten (Abbildung 2). Das Vorgehen mit „gleitenden Klammern“ ist für die

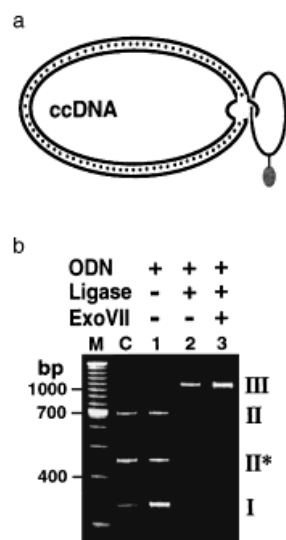


Abbildung 2. a) Nicht maßstabsgetreue, schematische Darstellung der Catenanstruktur, die mit einer ccDNA als Zielverbindung erhalten wurde. b) Nach Bildung des Komplexes mit der ccDNA wurde die Probe zur Vorbereitung der EMSA-Analyse mit *PvuII*-Endonuclease verdaut. Der Komplex **III** bildete sich fast quantitativ (Spur 2). Um die Circularisierung des Oligonucleotids nachzuweisen, wurde das Produkt in diesem Experiment mit 10 Einheiten ExoVII eine Stunde bei 37 °C verdaut (Spur 3).^[10] Spur C ist ein Kontrollversuch, in dem das ODN mit 10 Einheiten ExoVII bei den gleichen Bedingungen vorinkubiert wurde, bevor eine zu Spur 2 analoge Ligation durchgeführt wurde. In diesem Kontrollversuch tauchen ebenso wie in dem ohne Ligase (Spur 1) mehrere Banden auf, die den Strukturen **I**, **II*** (entstanden durch das partielle Abdissoziieren von PNA-Oligomeren vom Komplex **II** während der Enzymreaktion) und **II** entsprechen.

topologische Markierung von ccDNA ungeeignet, weil dafür zugängliche Enden der doppelsträngigen Ziel-DNA notwendig sind.^[1c] Um das Produkt mit EMSA zu analysieren, wurde es mit einem Restriktionsenzym geschnitten, so daß ein 340 bp langes dsDNA-Fragment entstand. Es wurde ebenfalls ein Komplex **III** mit charakteristisch verringerter elektrophoretischer Beweglichkeit beobachtet (Spur 2). Dieser war unempfindlich gegen Exonuclease VII (ExoVII, Spur 3).^[10] Dagegen wurde nicht circularisiertes ODN durch ExoVII

abgebaut (Spur C), was ein überzeugender Beleg für die Circularisierung der ODN-Sonde in diesem Versuchsansatz ist.

So stimmen alle Daten mit der vorgeschlagenen Bildung von „verbundenen“ Pseudorotaxanen und Catenanen überein, in denen sequenzspezifische, ohrringähnliche Markierungen unbeweglich mit der Ziel-dsDNA verbunden sind. Die beschriebenen topologischen DNA-Strukturen unterscheiden sich wesentlich von früher hergestellten Pseudorotaxanen,^[1c, 4a] da in ihnen eine echte topologische Verbindung zwischen dsDNA und cODN besteht, bei der die präzise positionierte Markierung eine genau festgelegte Stelle an der Doppelhelix einnehmen muß. Zusammen mit der bemerkenswerten Sequenzspezifität der Strukturbildung sollte diese Eigenschaft bei der sehr genauen Lokalisierung von Markersequenzen innerhalb von Genomen helfen. Außerdem wurden mit dem hier beschriebenen PNA-gesteuerten Zusammenbau von Komplexen, PNA-Oligomere in das Repertoire nanotechnologischer DNA-Werkzeuge eingeführt.

Experimentelles

Das Zielplasmid mit der Sequenz 5'-GATC₄T₂CGA₂C₂T₂CT₂TGATC-3'/3'-GATCA₃GA₂G₂T₂CGA₂G₄ATC-5' wurde durch Klonieren der entsprechenden Oligonucleotidpaare in die *Bam*HI-Schnittstelle von pUC19 hergestellt (die ODN-Bindestelle ist kursiv, die PNA-Bindestellen sind halbfett dargestellt). Die Ziel-DNA mit einer einzigen Fehlpaarung enthält ein A-T anstelle des unterstrichenen G-C-Basenpaares zwischen den PNA-Bindestellen. Folgende nach bekannten Verfahren^[11] hergestellte, durch Umkehrphasen-HPLC gereinigte und durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisierte PNAs wurden als Öffner verwendet: H-TC₄T₂C-egl₁(Lys)₂-egl₁-JT₂J₄T-Lys-NH₂ und H-Lys₂-T₃JT₂J₂-(egl₁)₃-C₂T₂CT₃-Lys-NH₂ (Lys = Lysin, J = Pseudoisocytosin, egl₁ = 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure als Linker). Für die Circularisierung wurde das 5'-phosphorylierte ODN 5'-GA₂G₄AT₃GT₃CT₂AXT₂GT₃AT₃A₂GA₂G₂T₂C-3' (hergestellt von Operon; X symbolisiert ein biotinyliertes Reportersegment von Ibioteg, das in das Rückgrat eingefügt wurde) eingesetzt. Die 8–10 Nucleotide langen Endstücke, die zur Ziel-DNA komplementär sind, sind kursiv gedruckt.

Für die Synthese des Pseudorotaxans **III** wurde zunächst die Plasmid-DNA mit *PvuII*-Endonuclease in zwei Fragmente von 2367 und 340 bp Länge gespalten; das kürzere Fragment ist das Zielfragment **I**. Die verdaut DNA wurde dann mit alkalischer Phosphatase (CIP, New England BioLabs) dephosphoryliert. In einem typischen Experiment wurde der PNA-DNA-Komplex **II** hergestellt, indem 10 µL 0.1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6.8), 63 µL Wasser und je 10 µL der beiden 20 µM PNA-Lösungen zu 7 µL verdauter, dephosphorylierter Plasmid-DNA (7 µg, 4 pmol) gegeben wurden und alles 4 h bei 37 °C inkubiert wurde. Ungebundene PNA wurde durch Gelfiltration über Sephadex G-50 (Sigma) entfernt. Zu einem 10-µL-Aliquot dieser Lösung (ca. 0.7 µg Gesamt-DNA) wurden 2 µL Ligationpuffer (10 ×, Fermentas), 5 µL Wasser, 2 µL 4 µM ODN und 1 µL T4-DNA-Ligase (30 Einheiten pro µL, Fermentas) gegeben und der Ansatz nacheinander 2 h bei 16 °C, 15 min bei 45 °C und 2 h bei 16 °C inkubiert. Die Behandlung mit Exonuclease VII (USB) wurde in 1 × Ligationpuffer durch Zugabe von 1 µL ExoVII (10 Einheiten) gestartet und der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Vor der Elektrophorese wurden die Proben durch Gelfiltration entsalzt, mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und wieder aufgenommen in 10 µL TE-Puffer (10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 0.1 mM Ethylendiamintetraessigsäure, pH 7.4). Der Komplex **III*** wurde durch 1 h Inkubation von 10 µL einer Probe von **III** mit 2 µL 1 mM Streptavidin bei 37 °C hergestellt.

Für die analoge Synthese des Catenans wurde überspiralisierte Plasmid-DNA eingesetzt. In diesem Fall wurden die Proben nach der Ligation mit *PvuII*-Endonuclease verdaut.

Die EMSA-Analysen wurden in nichtdenaturierenden 10proz. Polyacrylamidgelen in TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8.0) durchgeführt. Die Elektrophorese lief 4 Stunden bei Raumtempe-

ratur, 250 V und 20 mA. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einer CCD-Kamera mit dem digitalen Bildauswertesystem IS-1000 von Alpha Innotech ausgewertet.

Eingegangen am 25. November 1998,
ergänzte Fassung am 29. Januar 1999 [Z12713]
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1446–1449

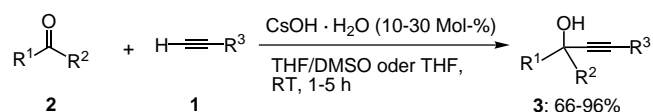
Stichwörter: Catenane • DNA-Strukturen • Nanostrukturen
• Rotaxane • Supramolekulare Chemie

- [1] a) M. D. Frank-Kamenetskii, *J. Mol. Struct. (Theochim)* **1995**, 336, 235–243; b) N. C. Seeman, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, 27, 225–248; c) K. Ryan, E. T. Kool, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 59–67; d) N. C. Seeman, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3408–3428; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3220–3238.
- [2] a) M. D. Frank-Kamenetskii, *Unraveling DNA: The most important molecule of life*, Addison-Wesley, Reading, MA, USA, **1997**, S. 214; b) R. Sinden, *DNA Structure and Function*, Academic Press, San Diego, CA, USA, **1994**, S. 398.
- [3] a) N. C. Seeman, *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30, 357–363; b) C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 603–606; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 585–587.
- [4] a) M. Nilsson, H. Malmgren, M. Samiotaki, M. Kwiatkowski, B. P. Chowdhary, U. Landegren, *Science* **1994**, 265, 2085–2088; b) M. Nilsson, K. Krejci, J. Koch, M. Kwiatkowski, P. Gustavsson, U. Landegren, *Nat. Gen.* **1997**, 16, 252–254; c) P. M. Lizardi, X. Huang, Z. Zhu, P. Bray-Ward, D. C. Thomas, D. C. Ward, *Nat. Gen.* **1998**, 19, 225–232; d) J. Banér, M. Nilsson, M. Mendel-Hartvig, U. Landegren, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 5073–5078.
- [5] a) N. O. Bukanov, V. V. Demidov, P. E. Nielsen, M. D. Frank-Kamenetskii, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 5516–5520; b) V. V. Demidov, N. O. Bukanov, M. D. Frank-Kamenetskii in *PNA: Protocols and Applications* (Hrsg.: P. E. Nielsen, M. Egholm), Horizon Scientific, Wymondham, Großbritannien, **1999**, S. 187–198.
- [6] a) P. E. Nielsen, *Pure Appl. Chem.* **1998**, 70, 105–110; b) E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2954–2983; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2796–2823.
- [7] Die optimale Ausbeute an **III** liegt nach einem Ligationsschritt bei etwa 70–80%. Der Hauptfaktor, der die Ausbeute beeinflusst, ist die ODN-Konzentration: Die Ausbeute an **III** nimmt deutlich ab, wenn die ODN-Konzentration zu niedrig (<0.1 µM) oder zu hoch (>1 µM) ist. Auch unter optimalen Bedingungen bleiben also etwa 20–30% der dsDNA-Moleküle topologisch unverbunden mit cODN. Eine zweite Ligationrunde, nachdem bei erhöhter Temperatur die ODNs, die ohne topologische Verbindung an die dsDNA gebunden waren, abgespalten worden waren, lieferte das „verbundene“ Produkt nahezu quantitativ.
- [8] a) V. V. Demidov, M. V. Yavnilovich, M. D. Frank-Kamenetskii, *Biophys. J.* **1997**, 72, 2763–2769; b) H. Kuhn, V. V. Demidov, M. D. Frank-Kamenetskii, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 582–587.
- [9] a) U. Landegren, R. Kaiser, J. Sanders, L. Hood, *Science* **1988**, 241, 1077–1080; b) D. Y. Wu, R. B. Wallace, *Gene* **1989**, 76, 245–254; c) K. Harada, L. E. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 2287–2291.
- [10] ExoVII ist eine Exodesoxyribonuclease, die ssDNA vom 3'- und vom 5'-Ende her abbaut. Die cODN ist kein Substrat für dieses Enzym. ExoVII wurde bereits verwendet, um die Bildung der „Vorhängeschloß“-Form nachzuweisen.^[4a]
- [11] a) M. Egholm, L. Christensen, K. L. Dueholm, O. Buchardt, J. Coull, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 217–222; b) L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, *J. Peptide Sci.* **1995**, 3, 175–183.

Caesiumhydroxid: eine hochwertige Base zur katalytischen Alkinylierung von Aldehyden und Ketonen und zur katalytischen Alkenylierung von Nitrilen**

Dimitrios Tzalis und Paul Knochel*

Die metallkatalysierte Bildung von neuen C-C-Bindungen ist eine wichtige Synthesemethode.^[1] Besonders interessant sind dabei Additionen an Mehrfachbindungen, wobei keine Nebenprodukte gebildet werden (atomökonomische Reaktionen).^[2] Somit hat die metallkatalysierte Addition von Alkinen vom Typ **1** an Carbonylkomponenten vom Typ **2** unter Bildung von Propargylalkoholen vom Typ **3** eine beträchtliche präparative und industrielle Bedeutung. Derartige Reaktionen in Gegenwart einer stöchiometrischen Menge von Base, z. B. einem Organolithium oder Organomagnesiumreagens, wobei ein intermediäres Metallacetylid^[3] gebildet wird, sind ausführlich beschrieben worden. Dagegen sind nur wenige Berichte über die katalysierte Aktivierung von Alkinen und Additionen an Carbonyl-Derivate bekannt.^[4,5] Sie sind hauptsächlich auf Acetylen^[4] oder auf einige Carbonylverbindungen wie Cycloalkanone^[5] beschränkt. Wir wollen über die außergewöhnliche Aktivität von Caesiumhydroxid^[6,7] zur katalytischen Bildung von stark nukleophilen, stabilisierten metallorganischen Spezies berichten (Schema 1). In Gegenwart einer katalytischen Menge CsOH · H₂O



Schema 1. CsOH-katalysierte Alkinylierung von Aldehyden und Ketonen mit terminalen Alkinen. R¹, R² = Alkyl, H; R³ = Alkyl, Aryl, Alkenyl.

(10 Mol-%) addiert Phenylacetylen **1a** (1.5 Äquiv.) an Cyclohexanon **2a** in THF in 1 h bei RT. Nach Aufarbeitung wird der gewünschte Propargylalkohol **3a** in 88% Ausbeute erhalten (Nr. 1 in Tabelle 1). Unter diesen Bedingungen addiert Phenylacetylen an verschiedene aliphatische Ketone^[8] oder aliphatische Aldehyde mit Ausbeuten zwischen 66 und 96%. Einige dieser Reaktionen sind nach 5 min bei RT abgeschlossen. Für die Addition von weniger aciden Alkinen wurde als Lösungsmittel eine 1:1-Mischung aus THF und DMSO zusammen mit CsOH · H₂O (30 Mol-%) verwendet. Unter diesen Bedingungen gehen die meisten terminalen Alkine eine glatte Addition an sekundäre oder tertiäre aliphatische Aldehyde oder aliphatische Ketone ein, wobei die entsprechenden Propargylalkohole vom Type **3** (Tabelle 1) gebildet werden. Um die konkurrierende Aldolreaktion

[*] Prof. Dr. P. Knochel, Dr. D. Tzalis
Fachbereich Chemie der Universität
Hans-Meerwein-Straße, D-35032 Marburg
Fax: (+49) 6421-28-21-89
E-mail: knochel@ps1515.chemie.uni-marburg.de

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG (SFB 260, Leibniz-Programm) und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken der BASF AG, der Bayer AG, der Chemetall GmbH und PPG-SIPSY SA (Frankreich) für Chemikalienspenden.