

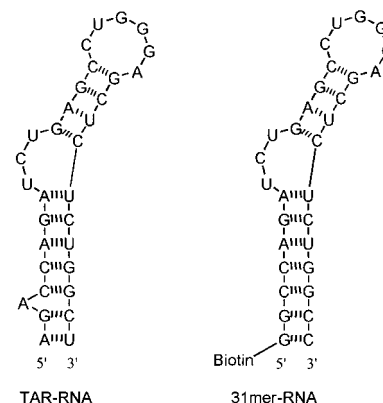
- Ed. Engl. **1992**, 31, 550; c) Z. Havlas, H. Bock, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1998**, 63, 1245, zit. Lit.
- [3] Herstellung und Einkristallzüchtung von [(9,10-Diphenyl-tetrabenzo[a,c,h,j]anthracenyl)²⁻Li⁺(dme)][Li⁺(dme)₃]: 10 mg (1.44 mmol) Lithiumpulver (Teilchengröße 50–200 µm) werden in eine bei 10⁻³ mbar ausgeheizte Schlenck-Falle gefüllt, und unter Argon 150 mg (0.28 mmol) wird Hexaphenylbenzol eingetragen und 10 mL wasserfreies DME aufpipettiert. Die Schlenck-Falle wird etwa 20 min mit Ultraschall behandelt, bis die Lösung tiefgrün ist. Anschließend wird die grüne Reaktionslösung unter Argon über eine G5-Fritte in eine ausgeheizte Schlenck-Falle überführt und nach 12 h mit 15 mL wasserfreiem *n*-Hexan überschichtet. Nach 3 d sind violett glänzende, schwarze Blöcke des Produktes am Boden der Falle gewachsen. – Kristallstrukturbestimmung: dunkle Quader, C₃₈H₆₆O₈Li₂ (*M*_r = 905.0 g mol⁻¹), *a* = 1248.1(2), *b* = 1804.5(2), *c* = 2187.9(3) pm, β = 97.85(1)°, *V* = 4881(1) × 10⁶ pm³ (*T* = 180 K), ρ_{ber.} = 1.231 g cm⁻³, monoklin, *P*2₁/*n*, *Z* = 4, Siemens-P4-Vierkreisdiffraktometer, MoKα-Strahlung, μ = 0.08 mm⁻¹, 10241 gemessene Reflexe im Bereich 3° ≤ 2θ ≤ 50°, davon 5677 unabhängig und zur Verfeinerung verwendet (*R*_{int} = 0.0387). Strukturlösung mit Direkten Methoden und Differenz-Fourier-Technik (SHELXS-86), Verfeinerung gegen *F*² (SHELXL-93), 622 Parameter, *w* = 1/[σ²(*F*_o²) + (0.0437 *P*)² + 2.67 *P*], *R* für 5677 *F*_o > 4σ(*F*_o) = 0.0479, *wR*₂ für alle 10241 Daten = 0.1261, GOF = 1.071, Restelektronendichte 0.26/–0.20 e Å⁻³. Alle C-, O- und Li-Lagen sind anisotrop verfeinert, die Wasserstoffzentren geometrisch ideal positioniert und mit individuellen isotropen Auslenkungsparametern ([*U*_{iso} = 1.2 × *U*_{eq}(C–H/CH₃); [*U*_{iso} = 1.5 × *U*_{eq}(CH₃)] nach dem Reitermodell verfeinert worden. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-115814“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [4] Siehe z.B.: a) H. Bock, K. Ruppert, D. Fenske, *Angew. Chem.* **1998**, 101, 1717; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 1685; b) A. Sekiguchi, K. Ebata, C. Kabuto, H. Sakurai, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7082; c) H. Bock, K. Gharagozloo-Hubmann, C. Näther, N. Nagel, Z. Havlas, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 720; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 631.
- [5] J. C. J. Bart, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1968**, 24, 1277.
- [6] Siehe z.B.: A. Stabel, P. Herwig, K. Müllen, J. Rade, *Angew. Chem.* **1995**, 105, 1768; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1609; M. Müller, V. S. Iyer, C. Kübel, V. Enkelmann, K. Müllen, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1679; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1607, zit. Lit.
- [7] Die Dichtefunktionaltheorie(DFT)-Rechnungen mit anschließender Natural-Bond-Orbital(NBO)-Ladungsverteilungsanalyse sind mit dem Programm Gaussian 94 auf NEC-SX4-Rechnern des Höchstleistungs-Rechenzentrums Stuttgart und der Tschechischen Akademie der Wissenschaften Prag ausgehend von den Strukturdaten^[3,5] durchgeführt worden (Details: H. Bock, Z. Havlas, V. Krenzel, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3305; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3163). Die MNDO-Berechnungen erfolgten mit einer Silicon-Graphics-Octane-Workstation mit dem Programm MOPAC 6. Die Suche nach den mutmaßlichen Reaktionspfad (Abbildung 2) sei wegen der Komplexität des Problems detailliert beschrieben: Zunächst wurde die Struktur des Hexaphenylbenzol-Dianion-Komplexes mit einem DME-solvatisierten Gegenkation {Li⁺(dme)} auf einer MNDO-Enthalpie-Hyperfläche optimiert und bei Δ*H*_f^{MNDO} = 314 kJ mol⁻¹ das Minimum (Abbildung 2B) lokalisiert. Hiervon ausgehend wurde der erste Übergangszustand zur Bildung einer C-C-Bindung unter H₂-Abspaltung (Abbildung 2C) mit „Linear-transit“-Technik gesucht und anschließend mit „Gradient-norm“-Minimierung optimiert. Der erste Sattelpunkt (Abbildung 2C) liegt 29 kJ mol⁻¹ über dem obigen Ausgangskomplex, und die berechnete Hessian-Matrix hat erwartungsgemäß nur einen negativen Eigenwert. Bei der Abspaltung des ersten H₂-Moleküls sinkt die berechnete Enthalpie auf 289 kJ mol⁻¹, und die zweite C-C-Bindung beginnt sich zu bilden, wobei eine zweite Barriere von 23 kJ mol⁻¹ zu überwinden ist. Die Gesamtbildungsenthalpie des 9,10-Diphenyltetrabenzoanthracen-Li⁺-Komplexes (Abbildung 2D) beträgt mit zwei H₂-Molekülen in weitem Abstand 264 kJ mol⁻¹ und die Enthalpiedifferenz 50 kJ mol⁻¹.

- [8] H. Bock, K. Gharagozloo-Hubmann, Z. Havlas, M. Sievert, unveröffentlichte Ergebnisse. Siehe auch: K. Gharagozloo-Hubmann, Dissertation, Universität Frankfurt, **1999**.
- [9] R. A. Pascal, Jr., W. D. McMillan, D. Van Engen, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 5652.
- [10] B. Solouki, P. Rosmus, H. Bock, G. Maier, *Angew. Chem.* **1980**, 92, 56; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, 19, 51; siehe auch Lit. [1a].
- [11] Laserspektroskopische Untersuchungen an der Grundverbindung Cyclohexa-1,4-dien: E. F. Cromwell, D.-J. Liu, M. J. J. Vrakking, A. H. Kung, Y. T. Lee, *J. Chem. Phys.* **1990**, 92, 3230; ihre quantenchemische Diskussion: R. J. Rico, M. Page, C. Doubleday, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1131.

Selektive Spaltung der HIV-1-TAR-RNA durch ein Peptid-Cyclen-Konjugat**

Katrin Michaelis und Markus Kalesse*

Die Möglichkeit, mit kleinen Molekülen die Hydrolyse von Phosphodiestern zu beschleunigen, ist von großem Interesse, da die effiziente Katalyse der Phosphodiester-spaltung den Lebenszyklus von Zellen oder Viren beeinflussen kann. Zur Einschätzung der Bedeutung von Metallionen bei derartigen Hydrolysen verwendeten wir kovalent an Peptide angeknüpfte Metallkomplexe. Als Ziel unserer Hydrolyseexperimente wählten wir die TAR-RNA des HIV-1 (Schema 1). Die TAR-



Schema 1. Die HIV-1-TAR-RNA und die 31mer-RNA, die in unseren Spaltungsexperimenten verwendet wurden.

RNA des HIV-1 wird durch ein regulatives Protein, das Tat-Protein (Schema 2), erkannt. Es wurde beobachtet, daß die Bindung von Tat an die TAR-RNA die Transkription von HIV-1 mRNA stimuliert.^[1] Detaillierte spektroskopische Methoden wurden angewendet, um die Tat-TAR-Wechselwirkung zwischen den Aminosäuren Arg52 bzw. Arg53 und der Bulge-Region zu untersuchen (Schema 2).^[2] Die Bindung

[*] Priv.-Doz. Dr. M. Kalesse, K. Michaelis
Institut für Organische Chemie der Universität
Schneiderberg 1B, D-30167 Hannover
Fax: (+49) 511-762-3011
E-mail: Kalesse@mbox.oci.uni-hannover.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ka 913) und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

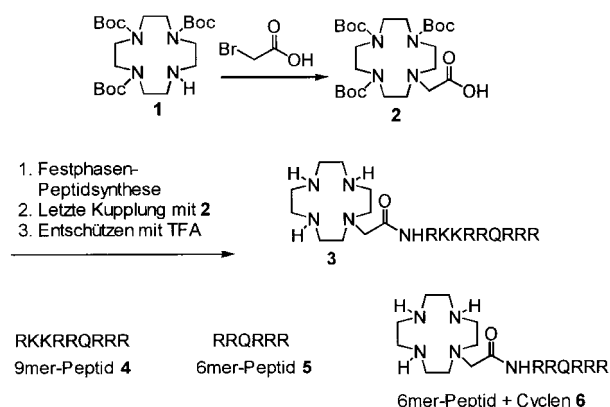
M E P V D P R L E P W K H P G S Q P K T A C T N C T Y C K K C
C F H C Q V C F I T K A L T I S Y G R K K R52 R53 Q54 R R R P
P Q G S Q T H Q V S L S K Q P T S Q S R G D P T G P K E.

Schema 2. Das Tat-Protein. Die Arginin-reiche Region ist in fetten Buchstaben hervorgehoben. Die Arginin-Einheiten Arg52 und Arg53 sind verantwortlich für die selektive Bindung an die Bulge-Region.

des Tat-Proteins an die TAR-RNA ist ein zentraler Prozeß bei der Transkription der viralen DNA, da die Bindung den aktiven Komplex aus Polymerase, dem DNA-Templat und der entstehenden mRNA stabilisiert. Ohne die Bindung des Tat-Proteins an die TAR-RNA wird die Transkription vorzeitig abgebrochen.^[3] Noch interessanter ist, daß bereits die Anwesenheit der Arginin-reichen Region des Tat-Proteins das Ausknospen des Virus *in vivo* induziert. Das Peptidfragment mit der basischen Region des Tat-Proteins hat ähnliche Bindungseigenschaften an die TAR-RNA wie das Wildtyp-Tat-Protein.^[4] Dies ermutigte uns, die Hydrolyse dieser RNA mit Metallkomplexen zu untersuchen, die an die Arginin-reiche Region des Tat-Proteins gebunden waren.

Wir planten ursprünglich, 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan (Cyclen) als Wirtmolekül für Metallkomplexe zu verwenden. Die Arginin-reiche Region des Tat-Proteins erlaubt es, Spaltungsexperimente mit verschiedenen Metallionen an der TAR-RNA durchzuführen. Das Arginin-reiche Nonamer sollte spezifisch an die Ziel-RNA binden und den Metallkomplex in die Nähe der Phosphodiesterbindungen bringen. Als Konsequenz dieses Vorgangs würde ein RNA-Strangbruch auftreten.

Das Nonamer **3** mit angehängter Cycleneinheit wurde durch Festphasensynthese unter Verwendung der Fmoc-Technik hergestellt (Schema 3). Im letzten Kupplungsschritt

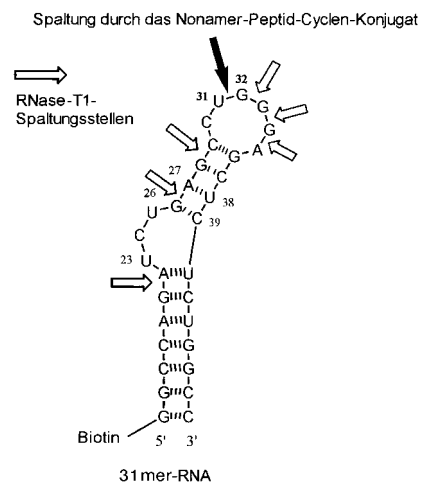


Schema 3. Herstellung der Peptide **3–6** durch Festphasensynthese. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Fmoc = Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl, TFA = Trifluoressigsäure.

wurde die Boc-geschützte Cyclenylessigsäure^[5] **2** am N-Terminus des Nonamers eingeführt. Die anschließende Abspaltung des Peptids von der festen Phase gelang unter Standardbedingungen (TFA) und lieferte das gewünschte Peptid-Cyclen-Konjugat. Die so erhaltenen Peptide wurden durch halbpräparative RP-HPLC gereinigt und die molekulare Masse durch matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)^[6] bestimmt. Für Kontrollexperimente wurden das entsprechende Nonamer-Peptid ohne Cycleneinheit (**4**) sowie das Hexamer mit

und ohne Cycleneinheit synthetisiert. Die beiden Hexamere **5** und **6** wurden synthetisiert, um die Frage zu beantworten, ob der Abstand der Cycleneinheit von den entscheidenden Arginin-Einheiten (Arg52 und Arg53) einen Einfluß auf die Spaltung der RNA hat.

Die leicht veränderte HIV-1-TAR-RNA konnte von der Firma Genset bezogen werden. Dabei wurde die ungepaarte Adenin-Einheit (A17) ausgespart, und statt A15:U46 wurde das Basenpaar G15:C46 eingebaut. Am 5'-Ende diente Biotin als Markierung für die spätere Analyse der Spaltungsfragmente. Für Spaltungsexperimente mit der markierten RNA, hier als 31mer-RNA bezeichnet, wurden autoklavierte Eppendorf-Reaktionsgefäße verwendet. Für Reaktionen mit Eu^{III} oder Zn^{II} inkubierten wir die Peptide mit den entsprechenden Metallsalzen 15 min bei Raumtemperatur bei drei verschiedenen pH-Werten (pH = 6, 7, 4, 8). Nachdem sich der Metallkomplex gebildet hatte, konnte die 31mer-RNA dazugegeben werden. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von Fischperma-DNA und Formamid-Puffer gestoppt. Die Verwendung von Fischperma-DNA im Formamid-Puffer diente zur Ablösung der RNA vom Peptid. Das Beenden der Reaktion ohne Zugabe von Fischperma-DNA ergab keine Veränderung der Spaltungsergebnisse (Schema 4). Anschließend wurde die Reaktion mit einem 20proz. denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert.



Schema 4. Selektive Spaltung der 31mer-RNA durch **3**. Pfeile geben die Spaltungsstellen an.

Nach dieser Vorgehensweise wurde das Kontrollexperiment mit dem Nonamer-Cyclen-Konjugat **3** in Abwesenheit von Metallionen durchgeführt. Entgegen unseren Erwartungen mußten wir feststellen, daß das Nonamer-Cyclen-Konjugat in Abwesenheit von Metallionen eine selektive und effiziente Spaltung bei pH 6 und 7,4 zeigte. Eine nur geringe Spaltungsaktivität wurde bei pH 8 beobachtet. Diese Ergebnisse weisen auf eine pH-Abhängigkeit des Spaltungsmechanismus hin. Die protonierten Stickstoffatome der Cycleneinheit^[7] könnten dabei die Spaltung des Phosphodiesters katalysieren. Die einzige Spaltungsstelle befand sich zwischen den Basen U31 und G32, wie man durch den Vergleich der Bahnen für die alkalische Verseifung mit der Bahn für die Verdauung mittels RNase T1 erkennen kann. (Abbildung 1).

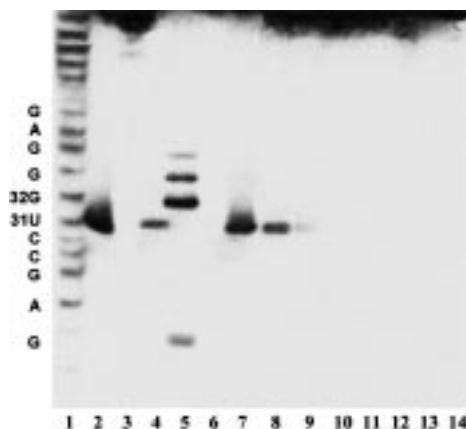


Abbildung 1. Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) der Sequenz-abhängigen Hydrolyse der 31mer-RNA (am 5'-Ende mit Biotin markiert) durch Peptide bei Raumtemperatur und pH 7.4. Peptidkonzentration: 167.2 µM. Bahn 1: alkalische Hydrolyse; Bahn 2: **3** für 3 h; Bahn 3: Kontrolle; Bahn 4: **3** und EDTA (0.5 mM) für 1 h; Bahn 5: Hydrolyse durch RNase T₁ (G-spezifisch); Bahn 6: **4** für 1 h; Bahn 7: **3** für 2 h; Bahn 8: **3** für 1 h; Bahn 9: **3** für ca. 3 min; Bahn 10: **5** für 1 h; Bahn 11: **6** für 1 h; Bahn 12: **3** und Eu^{III} (167.2 µM) für 1 h; Bahn 13: **6** 167.2 µM und Eu^{III} (167.2 µM) für 1 h; Bahn 14: **4** 167.2 µM und Eu^{III} (167.2 µM) für 1 h.

Es war sogar noch überraschender für uns, daß die Zugabe von Eu^{III}^[8] oder Zn^{II}^[9] die bereits erfolgreich in RNA-Spaltungsreaktionen eingesetzt worden waren, die Spaltung mit dem Nonamer-Cyclen-Konjugat unterdrückten. Die Anwesenheit von 13.5 µM Eu(NO₃)₃ inhibiert in Spaltungsreaktionen mit 0.135 µM RNA und 167.2 µM **3** die Hydrolyse der RNA. Die Anwesenheit von Zn(ClO₄)₂ unterdrückt die Spaltung der RNA ebenfalls, jedoch erst in einer Konzentration von 1.35 mM. Interessanterweise scheint die Konzentration, bei der die beiden Metallionen mit der Spaltung interferieren, unterschiedlich zu sein. Dieses Ergebnis könnte das Resultat voneinander abweichender Konstanten für die Bindung mit dem RNA-Peptid-Komplex oder verschiedener Bindungsstellen sein. Es ist bemerkenswert, daß Eu^{III} die Spaltung der RNA bei einer Konzentration von ungefähr 1/10 der Konzentration von **3** verhindert. Obwohl der exakte Mechanismus der Spaltungsinhibition derzeit noch nicht bekannt ist, ist es trotzdem sehr beachtlich, daß Metallionen die Hydrolyse von **3** unterdrücken. Auch bei den Kontroll-experimenten mit den Peptiden ohne Cycleneinheit (**4**, **5**) sowie mit dem Hexamer mit Cycleneinheit (**6**) wurde keine Spaltung beobachtet (Bahnen 6, 10, 11).^[10] Dagegen spaltet **3** bei Raumtemperatur sehr selektiv und effektiv bei pH 6 und 7.4. Die Analyse des Reaktionsgeschehens direkt nach dem Lösen der RNA und Verbindung **3** in Tris-Puffer zeigte bereits eine sehr schwache Spaltung. Eine Inkubationszeit von 1, 2 oder 3 Stunden bei Raumtemperatur resultierte in einer Zunahme der selektiven Spaltung. Der Grad der Spaltung nahm mit der Zeit zu (Bahnen 7–9). Auf der anderen Seite ergaben Kontrollexperimente sowohl mit dem Nonamer **4** ohne Cycleneinheit (Bahn 6) als auch in Gegenwart von Eu^{III} (Bahnen 12 und 13) keine Hydrolyse.

Das Kontrollexperiment in Gegenwart von EDTA (Bahn 4) ergab, daß die beobachtete Hydrolyse nicht auf die Verunreinigung durch Metallionen zurückzuführen ist. Um zu zeigen, daß diese Ergebnisse keine Artefakte waren, haben

wir alle Experimente mit RNA einer anderen Firma und neu synthetisierten Peptiden reproduziert. Die Tatsache, daß keine Hydrolyse in Experimenten mit Peptiden ohne Cycleneinheit beobachtet wurde und daß die Hydrolyse bei höherem pH-Wert abnahm, bekräftigte die Annahme einer Beteiligung von Ammoniumionen, eventuell einer Bis(ammonium)-Spezies, an der Hydrolyse. Obwohl bereits gezeigt wurde, daß basische Amine effizient RNA hydrolysieren können, wurde bislang angenommen, daß Nuclease-Modellsysteme mit Metallionen effizienter wirken als solche mit basischen Gruppen. Die bedeutenden Arbeiten von Komiyama et al.^[11] haben gezeigt, daß Bis(amine) RNA durch einen Säure/Base-Mechanismus spalten können, indem die Nucleophilie an der 2'-OH-Gruppe erhöht und gleichzeitig die Fluchtgruppenqualität durch Wechselwirkung mit einer Ammoniumgruppe erhöht wird. Andererseits konnten Göbel et al.^[12] zeigen, daß eine RNA-Spaltung auch ohne Mitwirken einer internen Base durchgeführt werden kann. Da die Cycleneinheit bei neutralem pH-Wert als Bis(ammonium)-Einheit vorliegt, schlagen wir für die Spaltung einen Bis-Kation-Mechanismus vor. Untersuchungen zur Aufklärung der Bedeutung der Cycleneinheit und des Spaltungsmechanismus werden derzeit in unseren Laboratorien durchgeführt.

Die Tatsache, daß das Nonamer-Cyclen-Konjugat selektiv und hocheffizient bei neutralem pH-Wert und Raumtemperatur die RNA spaltet, vor allem in Abwesenheit von Eu^{III}, läßt es als vielversprechendes Werkzeug für eine selektive Interaktion mit dem Lebenszyklus des HIV-1 erscheinen.

Experimentelles

Alle Experimente wurden in autoklavierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Durch Behandlung des Wassers (Millipore-Qualität) und der gesamten Ausrüstung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) und anschließendes Autoklavieren wurde eine Kontamination mit RNasen ausgeschlossen. Die RNA-Spaltungsreaktionen wurden bei pH 7.4 durchgeführt, unter Verwendung von Tris-HCl (20 mM) mit RNA (75.4 nM), Peptiden (167.2 µM) und NaCl (20 mM). Die Reaktionslösung (5 µL) wurde, wenn nicht anders angegeben, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit 1 µg Fischsperma-DNA und 6 µL Formamid-Puffer versetzt. Die Mischung wurde anschließend 5 min auf 85 °C erhitzt und mit Eis abgekühlt. Die Analyse der Spaltungsexperimente fand mit 7 µL einer jeden Probe mittels eines 20proz. denaturierenden Polyacrylamidgels statt. Nach der Elektrophorese konnte die RNA durch Elektroblothing auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen werden. Es folgte Immobilisierung für 30 min bei 80 °C mit anschließendem Waschen nach einer Anleitung von Ambion. Schließlich wurde die RNA durch Streptavidin/alkalische Phosphatase und CDP-Star auf Kodak-Film detektiert.

Eingegangen am 23. Dezember 1998 [Z12820]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2243–2245

Stichwörter: Makrocyclen • Nucleinsäuren • Peptide • RNA

- [1] a) C. Dingwall, I. Ernberg, M. J. Gait, S. M. Green, S. Heaphy, J. Karn, A. D. Lowe, M. Singh, M. A. Skinner, *EMBO J.* **1990**, 9, 4145; b) U. Delling, L. S. Reid, R. W. Barnett, M. Y.-X. Ma, S. Climie, M. Summer-Smith, N. Sonnenberg, *J. Virol.* **1992**, 65, 7012.
- [2] a) B. J. Calnan, B. Tidor, S. Biancalana, D. Hudson, A. D. Frankel, *Science* **1991**, 252, 1167; b) J. D. Puglisi, R. Tan, B. J. Calnan, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Science* **1992**, 257, 76; c) M. J. Churcher, C. Lamont, F. Hamy, C. Dingwall, S. M. Green, A. D. Lowe, P. J. G.

- Butler, M. J. Gait, J. Karn, *J. Mol. Biol.* **1993**, 230, 90; d) F. Hamy, U. Assline, J. Grasby, S. Iwai, C. Pritchard, G. Slim, P. J. G. Butler, J. Karn, M. J. Gait, *J. Mol. Biol.* **1993**, 230, 111; e) F. Aboul-ela, J. Karn, G. Varani, *J. Mol. Biol.* **1995**, 253, 313; f) M. A. Farrow, F. Aboul-ela, D. Owen, A. Karpeisky, L. Beigelman, M. J. Gait, *Biochemistry* **1998**, 37, 3096.
- [3] P. A. Sharp, R. A. Marciniak, *Cell* **1989**, 59, 229.
- [4] a) K. M. Weeks, C. Ampe, S. C. Schultz, T. A. Steitz, D. M. Crothers, *Science* **1990**, 249, 1281; b) A. D. Frankel, *Protein Sci.* **1992**, 1, 1539.
- [5] Zur Synthese von **1**: E. Kimura, S. Aoki, T. Koike, M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3068. Synthese von **2**: Das Boc-geschützte Cyclen **1** (950 mg, 1.7 mmol) und K_2CO_3 (300 mg, 2.15 mmol) wurden in Acetonitril (10 mL) gelöst. Bromessigsäuremethylester (0.20 mL, 2.15 mmol) wurde über 4 h bei Raumtemperatur (RT) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 4 Tage gerührt, filtriert und das Filtrat eingeeengt. Das Rohprodukt wurde in Methanol/Wasser (12 mL, 3:1) gelöst, und LiOH (90 mg, 2.15 mmol) wurde dazugegeben. Die Reaktionslösung wurde 12 h bei RT gerührt, mit NH_4Cl neutralisiert und mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet, eingeeengt und durch Flash-Chromatographie (MeOH/Essigester, 5:1) gereinigt. **2** kristallisierte als Feststoff aus (0.6 g, 66%). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.35–3.62 (m, 14H), 2.8–3.0 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.45 (s, 18H); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 175.7, 173.6, 156.15, 155.43, 80.0, 79.6, 54.21, 52.1, 49.87, 47.55, 28.59, 28.39. Synthese von **3**: Das Nonapeptid wurde nach der Fmoc-Technik synthetisiert. Jeder Kupplungsschritt wurde mit dem Kaiser-Test auf Vollständigkeit hin überprüft. Die Kupplung des Nonapeptids mit der Cycleneinheit **2** wurde in CH_2Cl_2 mit DCC, HOBT und DMAP als Kupplungsreagentien durchgeführt (DCC = N,N' -Dicyclohexylcarbodiimid, HOBT = 1-Hydroxy-1H-benzotriazol, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin). Das Peptid-Cyclen-Konjugat wurde mit TFA vom Träger abgespalten. Unter diesen Bedingungen wurden auch die Boc-Schutzgruppen an der Cycleneinheit vollständig abgespalten. Verbindung **3** wurde durch halbpräparative RP-HPLC gereinigt und durch MALDI-TOF-MS analysiert.^[6]
- [6] Spektrometer: Kompakt Maldi 3 von Kratos. Die Experimente wurden im positiven Linear-high-Modus mit α -Cyaninzimtsäure als Matrix durchgeführt. Die Matrix wurde mit einer Mischung aus MeCN/0.1proz. wäBr. TFA (2:1) gesättigt. Die berechnete Masse für **6** ist 1552, die beobachtete Masse war 1552 und entspricht $[M^+]$ von **6**.
- [7] K. C. Chang, E. Grunwald, L. R. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 3794; Cyclen: $pK_1 < 1$, $pK_2 < 2$, $pK_3 = 9.6$, $pK_4 = 10.53$.
- [8] J. Hall, D. Hüsken, U. Picles, H. E. Moser, R. Häner, *Chem. Biol.* **1994**, 1, 185.
- [9] a) S. Matsuda, A. Ishikubo, A. Kuzuya, M. Yashiro, M. Komiyama, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3477; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3284; M. Yashiro, A. Ishikubo, M. Komiyama, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1793.
- [10] Hydrolyseexperimente mit nicht angebundenem Cyclen ergaben keine RNA-Spaltung unter den hier beschriebenen Bedingungen über einen Zeitraum von 4 Stunden. Das Hexamer **6** zeigte auch keine unspezifische Spaltung über einen Zeitraum von 6 Stunden.
- [11] a) M. Komiyama, T. Inokawa, K. Yoshinari, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 77; b) M. Endo, K. Hirata, T. Ihara, S. Sueda, M. Takagi, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5478; c) M. Komiyama, K. Yoshinari, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2155; d) aktueller Übersichtsartikel zur Spaltung von RNA durch Basenkatalyse: M. Oivanen, S. Kuusela, H. Loennberg, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 961; aktueller Übersichtsartikel zu Modellsystemen für basische RNase: K. Kurz, *Chem. Unserer Zeit* **1998**, 32, 94.
- [12] K. Kurz, M. W. Göbel, *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 1967.

Trägerfixierte Metallodendrimere: isolierte Moleküle im Nanomaßstab**

Bart-Hendrik Huisman, Holger Schönherr, Wilhelm T. S. Huck, Arianna Friggeri, Henk-Jan van Manen, Edoardo Menozzi, G. Julius Vancso, Frank C. J. M. van Veggel* und David N. Reinhoudt*

Unter Verwendung moderner Technologien können heute Oberflächen im Submikrometerbereich strukturiert werden. Es zeichnet sich aber gegenwärtig ein Trend ab, die Dimensionen dieser Strukturen bis in den Nanometerbereich zu reduzieren.^[1] Die Nanotechnologie ermöglicht das Design und die Fertigung von Funktionseinheiten im Nanometerbereich,^[2] deren Komponenten letztendlich aus einzelnen Molekülen bestehen können. Zwei minimale Forderungen müssen hierfür erfüllt werden: zum einen die einfache Synthese funktionaler Verbindungen im Nanomaßstab und zum anderen eine definierte Positionierung dieser Moleküle. Dendrimere sind eine Klasse von Polymeren im Nanomaßstab, die mit einer begrenzten Zahl von Syntheseschritten hergestellt werden können. Sie weisen eine wohldefinierte, baumartig verzweigte Struktur auf. Die Synthese einer ganzen Reihe von Dendrimern mit verschiedenen Kernen, Monomereinheiten und funktionellen Gruppen ist beschrieben worden.^[3, 4] Die spontane Selbstorganisation, insbesondere die spontane Aggregation von schwefelorganischen Verbindungen auf Goldoberflächen, ist ein vielseitig einsetzbares Verfahren, um geordnete zweidimensionale Schichten an Grenzflächen zu bilden.^[5, 6] Rastertunnelmikroskopie (STM)-Untersuchungen haben gezeigt, daß Thiole durch Insertion in Dodecanthiolmonoschichten auf Goldsubstraten definiert isoliert werden können.^[7] Analog dazu sollte es möglich sein, durch Modifizierung einer Goldoberfläche mit Dendrimermonoschichten definierte Strukturen im Nanometerbereich zu gestalten. Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen von durch Düsen-Gußformen hergestellten Dendrimerfilmen.^[8] Von Crooks et al. wurde die spontane Oberflächenaggregation zur Anlagerung von Dendrimern an Goldoberflächen über die Endgruppen der Dendrimere genutzt.^[9, 10]

[*] Dr. Ir. F. C. J. M. van Veggel, Prof. Dr. Ir. D. N. Reinhoudt, Dr. B.-H. Huisman, Dr. W. T. S. Huck, Dr. A. Friggeri, Ir. H.-J. van Manen, E. Menozzi
Supramolecular Chemistry and Technology und
MESA Research Institute, University of Twente
P.O. Box 217, NL-7500 AE Enschede (Niederlande)
Fax: (+31) 53-4894645
E-mail: smct@ct.utwente.nl

Dipl.-Chem. H. Schönherr, Prof. Dr. G. J. Vancso
Polymer Materials Science and Technology, University of Twente
P.O. Box 217, NL-7500 AE Enschede (Niederlande)

[**] Wir danken L. J. Prins für die Unterstützung bei Synthesearbeiten, K. G. C. van Leerdam, F. A. J. Geurts und E. M. E. F. Biemond (AKZO Nobel) für die Durchführung der XPS- und SIMS-Messungen sowie Prof. N. M. M. Nibbering und R. H. Fokkens (Institut für Massenspektrometrie, Universität Amsterdam) für MALDI-MS-Messungen. Diese Arbeit wurde vom Rat der Chemischen Wissenschaften der Niederlande, Organisation für Wissenschaftsforschung, (CW-NWO) im Schwerpunktprogramm Materialien (PPM) gefördert.