

# Multiplex-Nachweis von Einzelbasenpolymorphie in DNA durch massenspektrometrische Verfolgung einer PNA-Verknüpfung\*\*

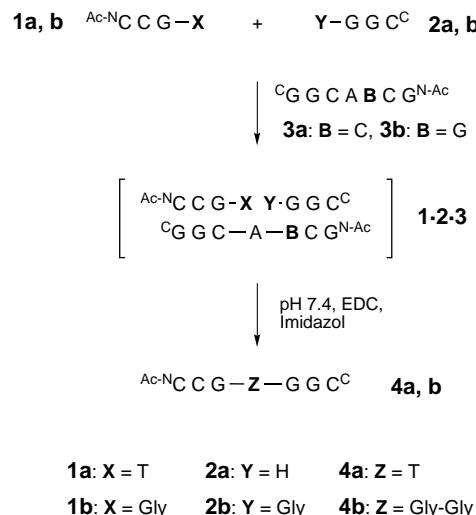
Amos Mattes und Oliver Seitz\*

Der Austausch einzelner Nucleobasen (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ist die am häufigsten auftretende genetische Variation.<sup>[1, 2]</sup> Einzelbasenmutationen können zur Entstehung von Krankheiten wie Zystischer Fibrose,<sup>[3]</sup> erblicher Hypercholesterinämie<sup>[4]</sup> und Krebs<sup>[5]</sup> führen. Den Verfahren zum Nachweis einer DNA-Sequenz ist gemeinsam, dass sie auf der Bindung einer komplementären Oligonucleotid-Sonde mit der nachzuweisenden DNA beruhen. Die Selektivität der Hybridisierung reicht aber nur selten aus, um eine komplementäre DNA-Probe von einer DNA-Probe mit nur einer einzigen Fehlpaarung zu unterscheiden. Eine bessere Diskriminierung kann durch die Nutzung eines Ereignisses erreicht werden, das die Sonden modifiziert. Beispiele hierfür sind der Oligonucleotide Ligation Assay<sup>[6]</sup> und der Primer Extension Assay.<sup>[7]</sup> Ein zunehmender Bedarf besteht an der Entwicklung von Nachweisystemen, bei denen in einer einzigen Untersuchung gleichzeitig mehrere diagnostische Ereignisse erfasst werden können (Multiplexing). Am gebräuchlichsten sind hier Fluoreszenzmethoden wie die Fluorescent Dye-Terminator-Extension,<sup>[7]</sup> der TaqMan Assay,<sup>[8]</sup> Molecular Beacons<sup>[9, 10]</sup> oder Scorpion-Sonden.<sup>[11]</sup> Ein Nachteil ist jedoch die Notwendigkeit einer arbeits- und kostenintensiven Einführung der Fluoreszenzmarker. Darauf hinaus ist der erreichbare Grad des Multiplexings durch die Zahl der spektral aufgelösten Fluorophore begrenzt. Hingegen bietet die matrixassistierte Laserdesorptions/ionisations-Flugzeit(MALDI-TOF)-Massenspektrometrie den Vorteil einer sehr hohen Auflösung, und sie wurde bereits erfolgreich zur Genotypisierung von Einzelbasenmutationen eingesetzt.<sup>[12, 13]</sup> Die bei der Verwendung von Oligonucleotid-Sonden häufig auftretenden Fragmentierungen und die bekannte Tendenz zur Bildung von DNA-Metallsalz-Addukten verringern jedoch die Auflösung der MALDI-Detektion.<sup>[14, 15]</sup> Im Folgenden beschreiben wir einen neuen Ansatz zum Nachweis von Einzelbasenmutationen, in dem die Vorteile der Verwendung von Peptidnucleinsäuren (PNAs)<sup>[16]</sup> – chemisch stabilen, nichtionischen DNA-Analoga, die hervorragende Basenpaarungseigenschaften aufweisen und zudem sehr einfach und präzise nachgewiesen werden können<sup>[17, 18]</sup> – genutzt werden. Anders als in früheren Arbeiten über MALDI-TOF-Genotypisierungen unter Verwendung von

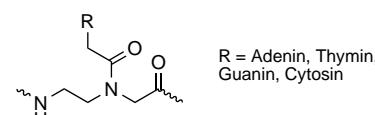
PNAs<sup>[19, 20]</sup> wird hier nicht die Hybridisierung einer einzelnen langen Sonde, sondern die DNA-vermittelte chemische Verknüpfung zweier kurzer Sonden verfolgt.<sup>[21]</sup>

Es wurde bereits gezeigt, dass die MALDI-TOF-Massenpektrometrie hinsichtlich Auflösung und Genauigkeit sehr gut für die Analyse von PNAs geeignet ist.<sup>[19, 20]</sup> Die Sequenzselektivität der PNA-Hybridisierung selbst hängt allerdings von der Basenzusammensetzung, von der Sequenz und vor allem von der Länge des Oligomers ab. Für eine eindeutige Sequenz werden Oligomere mit einer Länge von mehr als 16 Basenpaaren benötigt. PNA-Segmente dieser Länge sind jedoch relativ unselektive DNA-Binder.<sup>[22]</sup> Hingegen zeichnen sich kurze PNA-Oligomere bei einer immer noch ausreichenden DNA-Affinität durch eine sehr gute Einzelbasendiskriminierung aus. Somit sollte eine hochspezifische Sequenzanalyse eines eindeutigen Genabschnittes unter Verwendung einer PNA-Verknüpfungsstrategie möglich sein. Da keine der bekannten Ligasen PNA als Substrat erkennt, muss ein solcher Ansatz auf rein chemischen Methoden beruhen.

PNAs können als Pseudopeptide auf einfache Weise durch Peptidkondensationsreaktionen verknüpft werden.<sup>[21]</sup> Für die Entwicklung einer sequenzspezifischen, auf PNA basierenden Verknüpfungsreaktion untersuchten wir ein PNA-Modellsystem (Schema 1). Zunächst wurde die Carbodiimid-vermittelte Kondensation der PNA-Fragmente **1a** und **2a** untersucht. Die Zugabe des komplementären Templates **3a** beschleunigte die



Struktur eines PNA-Monomers:



Schema 1. PNA-Fragmentkondensation des Tetramers **1a** und des Trimers **2a** sowie die Basenlückenverknüpfung der PNA-Glycin-Konjugate **1b** und **2b** an dem vollständig komplementären PNA-Templat **3a** und dem Einzelbasen-fehlpaarenden Templat **3b** (die Mutationsstelle (B) ist fett hervorgehoben). Konzentration der Kupplungssonden **1** und **2** sowie der PNA-Template: 160  $\mu\text{M}$ . EDC = 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid.

[\*] Dr. O. Seitz, A. Mattes  
 Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie  
 Abteilung Chemische Biologie  
 Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund  
 Fax: (+49) 231-1332499  
 und  
 Institut für Organische Chemie, Universität Dortmund  
 44227 Dortmund (Deutschland)  
 E-mail: oliver.seitz@mpi-dortmund.mpg.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der DFG und vom Fonds der chemischen Industrie unterstützt. A.M. dankt für ein Kekulé-Stipendium und O.S. für ein Liebig- sowie ein DFG-Stipendium.

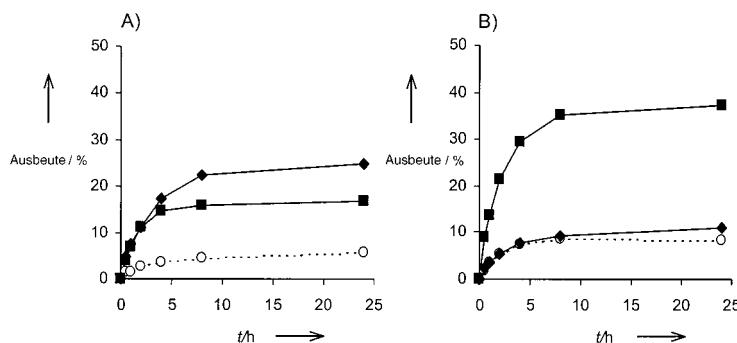
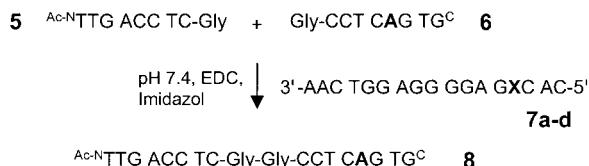


Abbildung 1. Kinetik der Produktbildung in Gegenwart des komplementären Templates **3a** (■), des nichtkomplementären Templates **3b** (◆) und ohne Templat (○). A) PNA-Fragmentkupplung von **1a** und **2a**; B) Verknüpfung der PNA-Glycin-Konjugate **1b** und **2b** unter Bildung einer Basenlücke. Die Ausbeuten der Kupplungsprodukte wurden durch HPLC-Analyse aliquoter Proben bestimmt.

Verknüpfung und erhöhte die Ausbeute deutlich (Abbildung 1 A). Erstaunlicherweise führte das Templat **3b**, welches eine Fehlbase enthält, zu einer noch höheren Ausbeute.

Das Problem der mangelnden Templatselektivität lösten wir, indem die Verknüpfungsreaktion so durchgeführt wurde, dass gezielt eine Basenlücke erzeugt wurde. Unter der Annahme, dass der Einbau einer Basenlücke die Kooperativität der Basenstapelung beeinträchtigt, sollte dadurch der ternäre Komplex **1**·**2**·**3** weniger tolerant gegenüber weiteren Störfaktoren sein.<sup>[23]</sup> Die Basenlücke wurde durch den Austausch des zentralen PNA-Monomers gegen ein isosteres Dipeptid eingebaut, welches durch die Verknüpfung zweier PNA-Glycin-Konjugate wie **1b** und **2b** gebildet wurde. Die Modellstudien bestätigten die Gültigkeit des gewählten Ansatzes (Abbildung 1 B). Die Zugabe des komplementären Templates **3a** erhöhte die Ausbeute des Verknüpfungsproduktes **4b**. Darüber hinaus wies die Verknüpfung eine bemerkenswerte Sequenzselektivität auf: Das fehlpaarende Templat **3b** war nicht in der Lage, die Bildung des PNA-Dipeptid-Hybrides **4b** zu beschleunigen.

Die Bedingungen, die im PNA-Modellsystem eine hohe Sequenzselektivität der Verknüpfungsreaktion gewährleisteten, wurden auf die MALDI-TOF-MS-Analyse einer Einzelbasenmutation in einer 17mer-DNA-Probe übertragen.<sup>[24]</sup> Hierbei testeten wir die Verknüpfung der 8mer-PNA-Glycin-Konjugate **5** und **6** in Gegenwart der DNA-Proben **7a–d**. Diese Oligonucleotide unterscheiden sich in einer Position, die jeweils eine aller möglichen Nucleobasen enthielt (Schema 2). Die Konzentrationen an DNA und den Verknüpfungs sonden betragen 10  $\mu$ M, wodurch die Hintergrundreaktion vollständig unterdrückt wurde. Nach 6 h wurden die DNA-



Schema 2. Basenlückenupplung der PNA-Glycin-Konjugate **5** und **6**. Die DNA-Proben **7** unterscheiden sich in einer Position (fett hervorgehoben): X = T (**7a**), G (**7b**), C (**7c**), A (**7d**)). Die der Mutationstelle gegenüberliegende PNA-Base ist ebenfalls fett dargestellt. Konzentration der Kupplungs sonden **5** und **6** sowie der DNA-Proben **7a–d**: 10  $\mu$ M.

Template durch Umsetzung mit Trifluoressigsäure (TFA) zerstört. Bei der MALDI-TOF-MS-Analyse wurde nur bei der Reaktion mit der vollständig komplementären DNA (X = T) **7a** ein intensives Signal bei  $m/z$  4437 für das Verknüpfungsprodukt **8** beobachtet (Abbildung 2). Alle anderen DNA-Templat e (X = A, C, G) erwiesen sich als unproduktiv, und es wurden nur Spuren von **8** nachgewiesen.

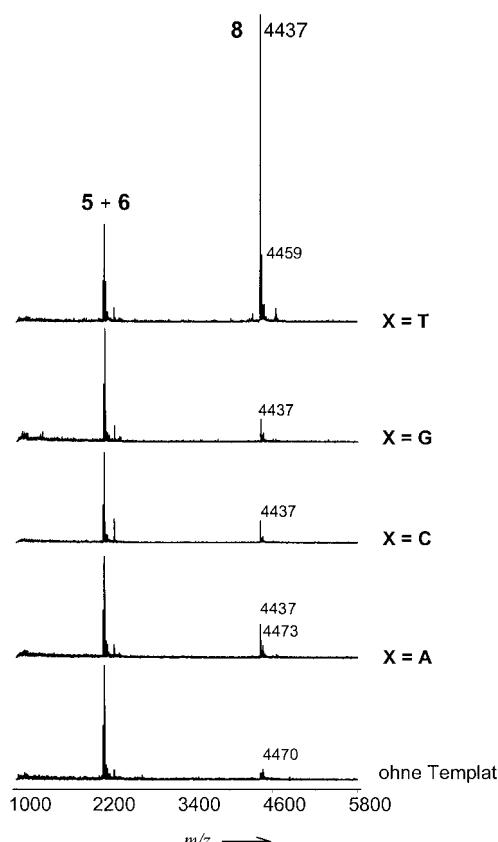


Abbildung 2. MALDI-TOF-MS-Analyse der Basenlückenupplung von **5** und **6** in Gegenwart der DNA-Template **7a–d** nach 6 h ( $m/z$  [ $(M+H)^+$ ]): 2237 (**5**), 2219 (**6**), 4437 (**8**). Matrix: Sinapisäure.

Zur Untersuchung des Diskriminierungsvermögens der Kupplung unter Verwendung einer Basenlücke wurde die Verknüpfungsreaktion mit drei um das Templat konkurrierenden PNA-Glycin-Konjugaten durchgeführt. Das Ziel bestand darin, eine G → T-Mutation im DNA-Segment **11** nachzuweisen (Schema 3). Die drei nucleophilen PNA-Glycin-Konjugate **9a–c** dienten dazu, die Mutationstelle zu erkennen, und wurden mit dem Acyldonor **10** umgesetzt. Der MALDI-TOF-Analyse zufolge wurde in Gegenwart der Mutanten-DNA **11a** (X = T) nur eines der drei möglichen Kupplungsprodukte gebildet (Abbildung 3). Der  $m/z$ -Wert von 4545 entsprach der Molekulmasse des PNA-Diglycin-Hybrids **12a**, d.h., allein die A-enthaltende Sonde **9a** wurde verknüpft. Die Reaktion mit der Wildtyp-DNA **11b** (X = G) führte zur überwiegenden Bildung des C-enthaltenden Produkts **12b**. Die hohe Selektivität der Verknüpfung wurde darüber hinaus durch die Tatsache belegt, dass die T-enthaltende PNA-Sonde **9c** nicht gekuppelt wurde.

- 9a <sup>c</sup>H-CCT ACA G-Gly  
 9b <sup>c</sup>H-CCT CCA G-Gly + Gly-G CCC ACC A-HH<sup>N-Ac</sup> 10  
 9c <sup>c</sup>H-CCT TCA G-Gly

10  $\mu$ M, pH 7.4,  
 EDC, Imidazol

5'-GGA XGT CGC GGG TGG T-3'  
 11a: X=T, 11b: X=G

- 12a <sup>c</sup>H-CCT ACA G-Gly-Gly-G CCC ACC A-HH<sup>N-Ac</sup> 4545  
 12b <sup>c</sup>H-CCT CCA G-Gly-Gly-G CCC ACC A-HH<sup>N-Ac</sup> 4521  
 12c <sup>c</sup>H-CCT TCA G-Gly-Gly-G CCC ACC A-HH<sup>N-Ac</sup> 4536

Schema 3. Nachweis einer G  $\rightarrow$  T-Mutation (fett markiert) in der DNA 11. Die drei variablen PNA-Glycin-Sonden 9a-c (Sondierungsposition fett) wurden mit einer konstanten PNA-Glycin-Sonde 10 in Gegenwart der Mutanten-DNA 11a (X=T) oder der Wildtyp-DNA 11b (X=G) umgesetzt. Konzentration der Kupplungssonden 9a-c und 10 sowie der DNA-Proben 11a, b: 10  $\mu$ M. H = Histidin.

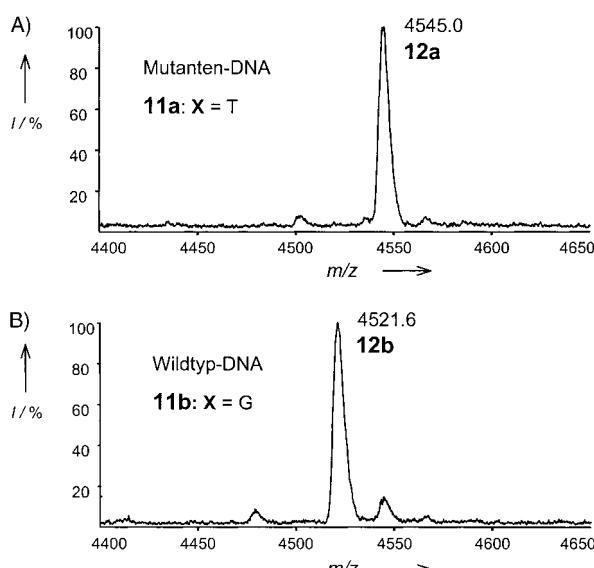


Abbildung 3. MALDI-TOF-MS-Analyse der Konkurrenzreaktion zum Nachweis einer Einzelbasenmutation in Gegenwart von A) der Mutanten-DNA 11a (X=T) und B) der Wildtyp-DNA 11b (X=G). Die detektierten Peaks entsprechen den Kupplungsprodukten 12a ( $m/z$ : 4545 [ $(M+H)^+$ ]) bzw. 12b ( $m/z$ : 4521 [ $(M+H)^+$ ]). Matrix: Sinapinsäure.

Die positiven Ergebnisse aus dem Konkurrenzexperiment ermutigten uns, die hohe Sequenztreue der Kupplung und die hohe Präzision der massenspektrometrischen Detektion für einen Multiplex-Kupplungsassay zu nutzen. Das Ziel war es, in einem einzigen Experiment Informationen über drei potentielle Mutationen im ras-Gen vom Schwein zu erhalten.<sup>[25]</sup> Die untersuchten Mutationen entsprachen den karzinogenen G12V- (G  $\rightarrow$  V), F28L- (T  $\rightarrow$  C) und E63H-Transformationen (G  $\rightarrow$  C, G  $\rightarrow$  T). Jede potentielle Mutationstelle wurde durch die Verknüpfung eines konstanten PNA-Glycin-Acyldonors mit einem Wildtyp- oder Mutanten-PNA-Glycin-Konjugat bestimmt (Abbildung 4A). Insgesamt wurden zur Multiplex-Kupplung sechs nucleophile PNA-Glycin-Sonden und drei Acyldonore verwendet, sodass sechs spezifische Verknüpfungsprodukte und zwölf Kreuzkupplungsprodukte entstehen konnten. Die Konzentrationen an DNA und

- A) DNA-Proben  
 G12V: 5'-CTG (G/T)AG GTG TGG GGA A-3'  
 F28L: 5'-CAC (T/C)TT GTG GAT GAG TA-3'  
 E63H: 5'-GAG (G/C)A(G/T) TAC AGT GCC-3'  
 +  
 konstante PNA-Sonden  
 G12V: <sup>c</sup>Gly-C ACC CCT T<sup>N-Ac</sup>  
 F28L: <sup>c</sup>Gly-C CTA CTC AT<sup>N-Ac</sup>  
 E63H: <sup>c</sup>Gly-G TCA CGG T<sup>N-Ac</sup>  
 +  
 Wildtyp-PNA-Sonden  
 G12V: <sup>c</sup>Gly-GAC CTC C-Gly  
 F28L: <sup>c</sup>Gly-GTG AAA C-Gly + <sup>c</sup>Gly-Gly-GTG GAA C-Gly  
 E63H: <sup>c</sup>Gly-CTC CTC A-Gly  
 Mutanten-PNA-Sonden  
<sup>c</sup>Gly-Gly-GAC ATC C-Gly  
<sup>c</sup>Gly-Gly-GTG GAA C-Gly  
<sup>c</sup>Gly-Gly-CTC CTC A-Gly

500 nM, pH 7.4, EDC, Imidazol

berechneten Massen der Verknüpfungssprodukte  
 Codon 12: Wildtyp 4133, Mutante 4214  
 Codon 28: Wildtyp 4511, Mutante 4584  
 Codon 63: Wildtyp 4285, Mutante 4349

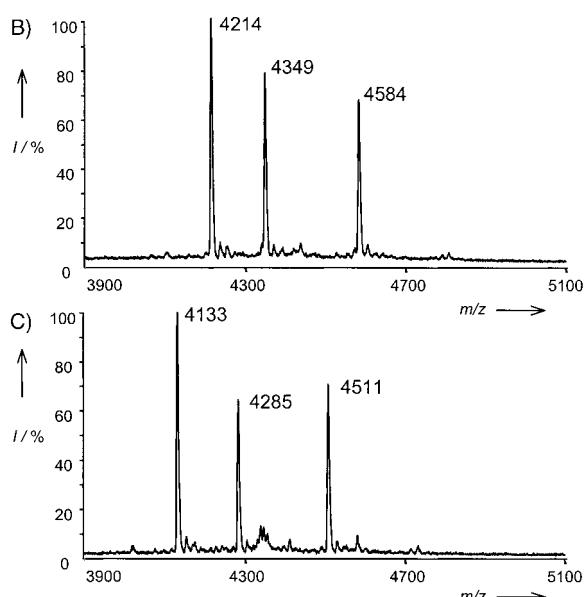


Abbildung 4. A) Für den Multiplex-Nachweis dreier karzinogener Mutationen im ras-Gen-Abschnitt des Schweines (G12V (G  $\rightarrow$  T), F28L (T  $\rightarrow$  C), E63H (G  $\rightarrow$  C, G  $\rightarrow$  T)) wurden drei konstante PNA-Sonden mit drei Wildtyp- und drei Mutanten-PNA-Sonden (die Sondierungsposition ist fett dargestellt) in einem einzigen Experiment umgesetzt. Die kursiv dargestellten Glycinbausteine dienten als Massenmarker. Konzentration der Kupplungssonden und der DNA-Proben: 500 nM. B, C) MALDI-TOF-Massenspektren im Positiv-Ionen-Modus in Gegenwart der drei Mutanten- bzw. der drei Wildtyp-DNA-Proben. Matrix: Sinapinsäure.

Kupplungssonden betragen dabei 500 nM. Nach einer Reaktionszeit von 4 h hatten sich, wie die MALDI-TOF-MS-Analyse ergab, in Gegenwart der Mutanten-DNAs nur drei der 18 möglichen Verknüpfungsprodukte gebildet (Abbildung 4B). Die Verknüpfungen waren hochspezifisch, und ein Vergleich mit den berechneten Massen der möglichen Kupplungsprodukte ergab, dass nur für die drei Mutanten-Kupplungsprodukte signifikante Signale erhalten worden waren. In einem Kontrollversuch wurde die Multiplex-Kupplung in Gegenwart der Wildtyp-DNAs untersucht. Das Massenspektrum der Kupplungsprodukte bestätigte eindeutig das Vorliegen der Wildtyp-DNAs. Die beobachteten Molekülmassen stimmten mit denen der Wildtyp-Kupplungsprodukte überein (Abbildung 4C).

Um die Empfindlichkeit des Detektionssystems zu testen, wurde die Verknüpfung mit einer Mischung der Wildtyp- und Mutanten-Template von Codon 12 der *ras*-Sequenz durchgeführt. Bei einem Wildtyp/Mutante-Verhältnis von 9:1 und einer DNA-Gesamtkonzentration von 500 nm konnte die Mutante problemlos nachgewiesen werden, und auch bei einem Mischungsverhältnis von 99:1 war das Mutantensignal immer noch wesentlich intensiver als das Rauschsignal. Hingegen konnte bei Verwendung eines reinen Wildtyp-Templats kein Mutanten-Kupplungsprodukt detektiert werden. Diese ersten Untersuchungen zur Nachweisempfindlichkeit deuten darauf hin, dass das Kupplungssystem bei einer Konzentration der DNA-Probe von bis zu 5 nm zuverlässige Ergebnisse liefern sollte.

Ausgehend von einem einfachen Modellsystem haben wir eine DNA-gesteuerte PNA-Verknüpfungsstrategie entwickelt, die durch den Einbau einer Basenlücke an der Verknüpfungsposition eine hohe Selektivität bezüglich Einzelbasen-Fehlpaarungen aufweist. PNA ist im Unterschied zu DNA gegenüber einer sauren Hydrolyse stabil, sodass DNA-Hintergrundsignale entfernt werden konnten. Aus diesem Grund kann auf den Einsatz von Festphasen-Hybridisierungstechniken verzichtet werden. Die mit den sechs unterschiedlichen Sequenzen erhaltenen Daten lassen den Schluss zu, dass die Nucleobase gegenüber der Glycylglycin-Basenlücke keine wesentliche Rolle spielt, denn Adenin, Guanin und Thymin wurden toleriert. Daher scheint die Basenlückenkupplung eine generell anwendbare Reaktion zu sein, die einen Multiplex-Nachweis von Einzelbasenmutationen in homogener Lösung ermöglichen sollte. In weitergehenden Untersuchungen werden wir den PNA-Kupplungssassay für PCR-amplifizierte DNA-Proben einsetzen.

Eingegangen am 23. Januar 2001,  
veränderte Fassung am 5. Juni 2001 [Z16484]

- [1] A. J. Brookes, *Gene* **1999**, *234*, 177–186.
- [2] F. S. Collins, M. S. Guyer, A. Chakravarti, *Science* **1997**, *278*, 1580–1581.
- [3] B.-S. Kerem, J. M. Rommens, J. A. Buchanan, D. Markiewicz, T. K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald, L.-C. Tsui, *Science* **1989**, *245*, 1073–1080.
- [4] H. Baron, S. Fung, A. Aydin, S. Bähring, F. Luft, H. Schneider, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1279–1282.
- [5] F. J. Couch, B. L. Weber, *Hum. Mutat.* **1996**, *8*, 8–18.
- [6] U. Landegren, R. Kaiser, J. Sanders, L. Hood, *Science* **1988**, *241*, 1077–1080.
- [7] X. Chen, B. Zehnbauer, A. Gnrke, P. Kwok, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10756–10761.
- [8] P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7276–7280.
- [9] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.
- [10] O. Seitz, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3389–3392; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3249–3252.
- [11] N. Thelwell, S. Millington, A. Solinas, J. Booth, T. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3752–3761.
- [12] P. Ross, L. Hall, I. Smirnov, L. Haff, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 1347–1351.
- [13] T. Griffin, L. Smith, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 77–84.
- [14] E. Nordhoff, M. Karas, R. Cramer, S. Hahner, F. Hillenkamp, F. Kirpekar, A. Lezius, J. Muth, C. Meier, J. W. Engels, *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 99–112.
- [15] L. Zhu, G. R. Parr, M. C. Fitzgerald, C. M. Nelson, L. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6048–6056.

- [16] P. Nielsen, M. Egholm, R. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497–1500.
- [17] P. Nielsen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 71–75.
- [18] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2954–2983; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2796–2823.
- [19] P. Ross, K. Lee, P. Belgrader, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4197–4202.
- [20] T. J. Griffin, W. Tang, L. M. Smith, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 1368–1372.
- [21] J. Schmidt, L. Christensen, P. Nielsen, L. Orgel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4792–4796.
- [22] J. Weiler, H. Gausephol, N. Hauser, O. N. Jensen, J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2792–2799.
- [23] Basenlücken setzen die Duplexstabilität erheblich herab: a) H. Ide, H. Shimizu, Y. Kimura, S. Sakamoto, K. Makino, M. Glackin, S. Wallace, H. Nakamura, M. Sasaki, N. Sugimoto, *Biochemistry* **1995**, *34*, 6947–6955; b) C. Gelfand, G. Plum, A. Grollman, F. Johnson, K. Breslauer, *Biochemistry* **1998**, *37*, 7321–7327.
- [24] Die Sequenz wurde dem Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Regulator-Gen entnommen: B.-S. Kerem, J. M. Rommens, J. A. Buchanan, D. Markiewicz, T. K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald, L.-C. Tsui, *Science* **1989**, *245*, 1073–1080.
- [25] M. Plass, E. Hartmann, O. Müller, J. Kuhlmann, *National Center for Biotechnology Information*, AF116346 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## Übergangsmetallkomplexe des Protonenschwammes 4,9-Dichlorchino-[7,8-*h*]chinolin: ein stark gekrümmtes aromatisches System und extreme „Out-of-plane“-Position des Übergangsmetallzentrums\*\*

Hans-Ulrich Wüstefeld, William C. Kaska,\*  
Ferdi Schüth,\* Galen D. Stucky, Xianhui Bu und  
Bernt Krebs

Professor Heinz A. Staab zum 75. Geburtstag gewidmet

Wir berichten über die erste erfolgreiche Synthese und vollständige Charakterisierung von Übergangsmetallkomplexen mit dem Protonenschwamm 4,9-Dichlorchino[7,8-*h*]chi-

- [\*] Prof. Dr. W. C. Kaska, Prof. Dr. G. D. Stucky, Dr. X. Bu  
Department of Chemistry  
University of California, Santa Barbara  
93106 Santa Barbara (USA)  
Fax: (+1) 805-893-4120  
E-mail: kaska@chem.ucsb.edu  
Prof. Dr. F. Schüth, Dipl.-Chem. H.-U. Wüstefeld  
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung  
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)  
Fax: (+49) 208-306-2995  
E-mail: schueth@mpi-muelheim.mpg.de  
Prof. Dr. B. Krebs  
Anorganisch-chemisches Institut  
Westfälische Wilhelms-Universität  
Wilhelm-Klemm-Straße 8, 48149 Münster (Deutschland)
- [\*\*] Diese Arbeit wurde vom Energieinstitut der University of California und von der University of California Santa Barbara (W.C.K.) sowie von der National Science Foundation (DMR-9634396; G.D.S.) gefördert. Wir danken den analytischen Abteilungen des MPI für Kohlenforschung für die Massen- und die NMR-Spektren.