

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-Template 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 Verknüfungsposition 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 Basenlücken-kupplung eine generell anwendbare Reaktion zu sein, die einen Multiplex-Nachweis von Einzelbasenmutationen in homogener Lösung ermöglichen sollte. In weitergehenden Untersuchungen werden wir den PNA-Kupplungsassay 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. Zehnauer, A. Gnirke, 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. Nakamuta, 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**

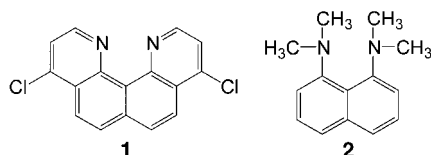
Hans-Ulrich Wüstefeld, William C. Kaska,*
Ferdinand Schüth,* Galen D. Stucky, Xianhui Bu und
Bernt Krebs

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.

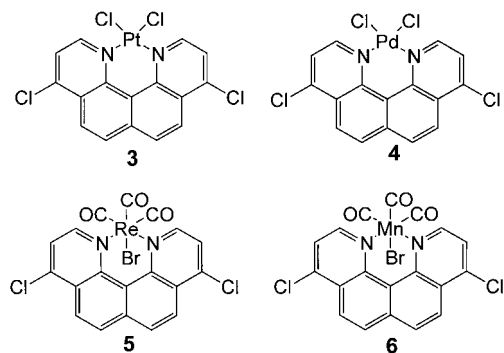
nolin **1**. Der neue Protonenschwamm **1** und dessen Derivate wurden bereits vor 15 Jahren von Zirstein und Staab^[1, 2] synthetisiert und komplett charakterisiert. Diese Protonenschwämme hatten damals bereits eine bewegte Geschichte hinter sich: Obwohl mehrere Autoren bereits über die Synthese dieser Verbindungen berichteten, wurden die Produkte jedoch immer falsch formuliert.^[3, 4] Die Synthese von stabilen Metallkomplexen mit Protonenschwämmen als Liganden ist unseres Wissens nach bisher nicht gelungen.



Der erste Protonenschwamm, 1,8-Bis(dimethylamino)-naphthalin **2**,^[5] ist als Ligand für Metallkomplexe ungeeignet, da die Methylgruppen die Stickstoffatome so abschirmen, dass die zur Komplexbildung erforderliche thermodynamische Stabilität nicht gegeben ist.^[6] Obwohl 1,8-Diaminonaphthalin^[7, 8] kein Protonenschwamm ist, sind hiermit nur wenige Übergangsmetallkomplexe bekannt.

Der Protonenschwamm **1** hingegen ist ein Molekül, in dem die komplexierenden Stickstoffatome Teil des aromatischen Ringsystems sind. Außerdem ist diese Verbindung planar und nicht helical und somit sehr gut als Ligand für Metallkomplexe geeignet. **1** ist im Vergleich mit dem sehr gebräuchlichen *o*-Phenanthrolin aus zwei Gründen ein besserer Ligand: Die ungewöhnlich hohe Basizität von **1** ($pK_a = 10.9$ ^[9] verglichen mit der von *o*-Phenanthrolin ($pK_a = 4.81$ ^[10]) und der kurze N-N-Abstand von 2.685 Å erzwingen eine „Out-of-plane“-Position des komplexierten Metallatoms. Daraus resultiert eine sehr hohe thermische Stabilität der Metallkomplexe. Die extreme Out-of-plane-Position des Metallatoms führt zu einem reaktiven, gut zugänglichen Metallzentrum, an dem eine Vielzahl von Reaktionen wie Substitutionen und Additionen möglich sein sollte. Verbindungen mit solch starken Out-of-plane-Positionen sind momentan ein hochaktuelles Forschungsthema.^[11–13]

Der geringe N-N-Abstand sowie die hohe Basizität von **1** limitieren den Gebrauch von protischen Lösungsmitteln. Der Platin- und der Palladiumkomplex **3** bzw. **4** konnten in Dichlormethan oder Chloroform und der Rhenium- und der



Mangankomplex **5** bzw. **6** in THF synthetisiert werden. Der Platinkomplex **3** wurde durch Umsetzung von Zeises Dimer $[Pt_2(H_2C=CH_2)_2Cl_4]$ in Dichlormethan mit **2** erhalten. Er fiel als gelber Feststoff aus. Die Röntgenstrukturanalyse dieser Verbindung zeigt ein sehr ungewöhnliches Strukturmerkmal: Das aromatische System ist stark gebogen (Abbildung 1). Das

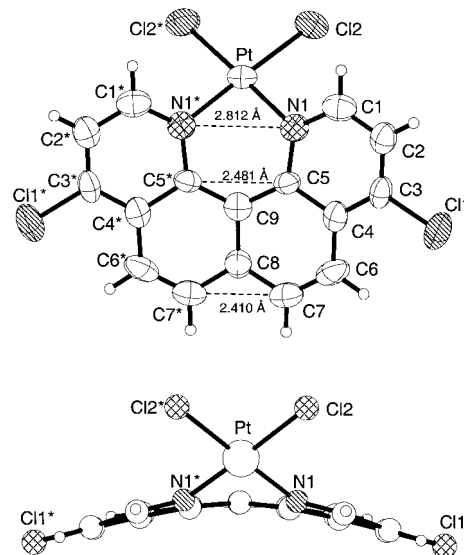


Abbildung 1. Diamond-Darstellung der Struktur von **3** im Kristall in Aufsicht (oben) und Seitenansicht (unten).

Ausmaß der Krümmung kann durch die Abweichung des am weitesten oberhalb und unterhalb der „besten“ Ebene liegenden Kohlenstoff- oder Stickstoffatoms des aromatischen Systems von dieser mittleren Ebene bestimmt werden. Diese Ebene weist das kleinste Abweichungsquadrat bei Berücksichtigung aller Kohlenstoff- und Stickstoffatome des aromatischen Systems auf. Die Summe der Abstände der am weitesten außerhalb dieser Ebene gelegenen Atome des Liganden, N1 (–0.359 Å) und C3 (0.383 Å), gibt das Ausmaß der Krümmung an: 0.742 Å. Der entsprechende Wert für den fast planaren Liganden beträgt 0.151 Å. Das Platinzentrum befindet sich relativ zur besten Ebene in einer extremen Out-of-plane-Position und liegt mit einem Abstand von 1.43 Å eindeutig über dieser Ebene. Das Platinatom selbst ist jedoch relativ unverzerrt quadratisch-planar koordiniert.

Der Rheniumkomplex **5** wurde durch Erhitzen des Liganden mit dem Bromtetracarbonylrhenium(II)-Dimer in THF erhalten. Der Abstand des Rheniumatoms von der „besten“ Ebene beträgt 1.42 Å und ist somit ähnlich groß wie beim Platinkomplex (Abbildung 2). Der Grad der Krümmung des aromatischen Systems ist jedoch mit 0.498 Å viel geringer als bei **3**. Strukturell ist des Weiteren auffällig, dass der N-N-Abstand beim Platin- und beim Rheniumkomplex mit 2.812 bzw. 2.804 Å beträchtlich größer ist als der des freien Liganden (2.685 Å). Dies kann mit den starken Stickstoff-Metall-Bindungen der großen Übergangsmetallionen gut erklärt werden. Der größere N-N-Abstand wird durch eine Stauchung im Naphthalingerüst ausgeglichen, wie an der Peripherie des Naphthalingerüsts erkennbar ist: Der C5-C13- bzw. C5-C5*-Abstand sowie der C7-C10- bzw. C7-C7*-

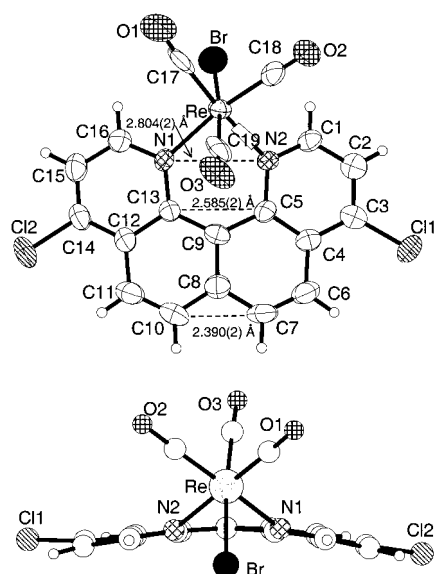


Abbildung 2. Diamond-Darstellung der Struktur von **5** im Kristall in Aufsicht (oben) und Seitenansicht (unten).

Tabelle 1. Wichtige Bindungslängen von **1** sowie den Metallkomplexen **3** und **5**.

| Verb. | N-N [Å] | C5-C13 bzw. C5-C5* [Å] | C7-C10 bzw. C7-C7* [Å] |
|----------|------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 2.685(6) | 2.604(6) | 2.455(6) |
| 3 | 2.812 | 2.481 | 2.410 |
| 5 | 2.804(2) | 2.585(2) | 2.390(2) |

Abstand sind kleiner als die entsprechenden Abstände in **1** (Tabelle 1).

Die ungewöhnliche thermische und chemische Stabilität der Metallkomplexe sind eine Konsequenz der einmaligen Out-of-plane-Position und der konformativen Stabilität des Metallatoms im aromatischen System. Der Pt-Komplex **3** kann beispielsweise mehrere Tage ohne Zersetzung auf 380 °C erhitzt werden und ist sogar in heißer, konzentrierter Schwefelsäure stabil.

Des Weiteren eignet sich dieses System hervorragend für Struktur-Aktivitäts-Studien in der Katalyse, da die Basizität der beiden komplexierenden Stickstoffatome ohne Änderung der sterischen Verhältnisse durch unterschiedliche Substituenten in 4- und 9-Position über einen weiten Bereich „eingestellt“ werden kann. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen legen außerdem den Einsatz als Cytostatikum nahe.

Experimentelles

1: Der Ligand **1** wurde gemäß einer modifizierten Synthesvorschrift von Zirnstein^[9] synthetisiert. Der zweite Reaktionsschritt, die thermische Decarboxylierung, wurde in kleineren Ansätzen durchgeführt, um die Ausbeute zu erhöhen. Insbesondere hat sich der Gebrauch der Aktivkohle RO.0.8 (Aldrich) bei der Aufarbeitung der Carbonsäure im dritten Schritt als besonders wichtig erwiesen. Mit anderer Aktivkohle konnte kein reines Produkt erhalten werden. Schmp. 236 °C (Zersetzung); ¹H-NMR (300 MHz, [D₆]DMSO, 25 °C, TMS): δ = 7.99 (d, ³J = 4.8 Hz, 2H, 3,10-H), 8.38 (AB, ³J = 8.9 Hz, 2H, 6,7-H), 8.54 (AB, ³J = 8.9 Hz, 2H, 5,8-H), 9.19 (d, ³J = 4.8 Hz, 2H, 2,11-H); IR (KBr): ν̄ = 3097 (w), 3074 (w), 3036 (w), 1626 (m), 1606 (s), 1587 (s), 1541 (m), 1522 (m), 1496 (m), 1478 (s), 1409 (s), 1339 (m), 1226 (m), 1013 (s), 840 (s), 769 (s), 691 (s), 681 cm⁻¹ (m); MS (EI):

m/z (%): 298 (100, *M*⁺, Isotopenmuster für 2Cl), 263 (29.95, Isotopenmuster für 1Cl), 236 (4.19, Isotopenmuster für 1Cl), 228 (8.06), 201 (9.33), 174 (4.65), 149 (10.12, *M*²⁺); HR-MS (EI): *m/z*: gef.: 298.00642 (*M*⁺), ber.: 298.00645.

3: Ein Lösung von **1** (59.8 mg, 0.2 mmol) in 20 mL wasserfreiem Dichlormethan wurde unter Argon innerhalb von 2 h zu einer Lösung von Di-μ-chlorodichlorobis(ethylen)platin(II) (Zeises Dimer; 58.8 mg, 0.1 mmol) getropft. Nach anschließendem 1 h Erhitzen wird die Lösung filtriert; das Filtrat ist eine klare, gelbe Lösung. Die Lösung wird eingengt und der ausfallende, gelbe Feststoff aus Dichlormethan umkristallisiert. Ausbeute: 107.3 mg (91.2 %). Schmp. > 315 °C; ¹H-NMR (300 MHz, CD₂Cl₂, 25 °C, TMS): δ = 7.84 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H, 3,10-H), 8.31 (AB, ³J = 9.1 Hz, 2H, 6,7-H), 8.61 (AB, ³J = 9.1 Hz, 2H, 5,8-H), 9.66 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H, 2,11-H); IR (KBr): ν̄ = 3123 (w), 3091 (m), 3060 (m), 3039 (w), 1611 (s), 1575 (s), 1559 (m), 1520 (w), 1478 (s), 1409 (s), 1348 (s), 1221 (s), 1199 (s), 1028 (s), 857 (s), 845 (s), 766 (m), 704 (s), 677 cm⁻¹ (m); MS (EI): *m/z* (%): 563 (4.98, *M*⁺, Isotopenmuster für 4Cl), 528 (10.24, *M*⁺ - Cl, Isotopenmuster für PtCl₃), 492 (6.18, *M*⁺ - H - 2Cl, Isotopenmuster für PtCl₂), 456 (8.56).

5: Eine Suspension aus dem Bromtetracarbonylrhenium(II)-Dimer (75.6 mg, 0.1 mmol) und **1** (59.8 mg, 0.2 mmol) in 50 mL THF wird unter Argon 5 d unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde nach 2 d rotorange, und nach 5 d bildete sich ein dunkelrotorange-farbener Feststoff. Das Produkt wurde unter Argon abfiltriert, mit kaltem THF und Dichlormethan gewaschen und aus THF umkristallisiert. Ausbeute: 83.7 mg (64.5 %). Schmp. 288 °C (Zersetzung); ¹H-NMR (300 MHz, CD₂Cl₂, 20 °C, TMS): δ = 7.81 (d, ³J = 5.8 Hz, 2H, 3,10-H), 8.24 (AB, ³J = 9.0 Hz, 2H, 6,7-H), 8.60 (AB, ³J = 9.0 Hz, 2H, 5,8-H), 9.73 (d, ³J = 5.8 Hz, 2H, 2,11-H); IR (KBr): ν̄ = 2962 (s), 2927 (s), 2854 (m), 2020 (s, ν(C-O)), 1920 (s, ν(C-O)), 1890 (s, ν(C-O)), 1730 (w), 1614 (w), 1577 (w), 1553 (w), 1467 (w), 1023 (s), 864 (m), 843 (m), 701 cm⁻¹ (m); MS (EI): *m/z* (%): 648 (51.71, *M*⁺, Isotopenmuster für ReCl₂Br), 620 (31.18, *M*⁺ - CO), 592 (94.95, *M*⁺ - 2CO), 564 (28.06, *M*⁺ - 3CO); HR-MS (EI): gef.: 647.866, ber.: 647.8655.

Die kristallographischen Daten (ohne Strukturaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Strukturen wurden als „supplementary publication no.“ CCDC-164921 (**3**) und -164920 (**5**) beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Fax: (+44)1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

Eingegangen am 15. März 2001 [Z16779]

- [1] M. A. Zirnstein, H. A. Staab, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 460–461; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 460–461.
- [2] C. Krieger, I. Newsom, M. A. Zirnstein, H. A. Staab, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 72–73; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 84–86.
- [3] I. Iwai, S. Hara, *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1950**, 70, 394–400.
- [4] A. Edel, P. A. Marnot, J. P. Sauvage, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 727–728.
- [5] R. W. Alder, P. S. Bowman, W. R. S. Steele, D. R. Winterman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1968**, 723–724.
- [6] S. N. Gamage, R. H. Morris, S. J. Rettig, D. C. Thackray, I. S. Thorburn, B. R. James, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 894–895.
- [7] J. A. Cabeza, H. Nöth, M. de Jesús Rosales-Hoz, G. Sánchez-Cabrera, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 2327–2332.
- [8] L. A. Oro, M. J. Fernandez, J. Modrego, C. F. Foces, F. H. Cano, *Angew. Chem.* **1984**, 96, 897–898; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, 23, 913–914.
- [9] M. A. Zirnstein, Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **1989**.
- [10] R. D. Alexander, A. W. L. Dudeney, R. J. Irving, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1978**, 74, 1075–1080.
- [11] F. P. Fanizzi, F. I. Intini, L. Maresca, G. Natile, M. Lanfranchi, A. Tiripicchio, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1991**, 1007–1015.
- [12] M. T. Ashby, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2000–2007.
- [13] „Abnormally Distorted Structures: Elongated C–C Bonds and Bowed Aromatic Rings“: M. Kato, K. Tanaka, F. Toda, International Chemical Congress of the Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii, **2000**).