

- [15] a) S. Hanessian, U. Reinhold, S. Ninkovic, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8967–8970; b) S. Hanessian, S. Ninkovic, U. Reinhold, *ibid.* **1996**, *37*, 8971–8974.
- [16] Ausgewählte Beispiele zu Carbocyclisierungen, die über Alkylnitrin(rv)-Zwischenstufen vermittelt wurden: T. L. Macdonald, C. M. Delahunty, K. Mead, D. E. O'Dell, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1573–1576; T. L. Macdonald, S. Mahalingam, D. E. O'Dell, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6767–6769; Cyclopropanierung von γ -Stannylalkoholen: D. D. Davis, H. T. Johnson, *ibid.* **1974**, *96*, 7576–7577; H. G. Kuvila, N. M. Scarpa, *ibid.* **1970**, *92*, 6990–6991; N. Isono, M. Mori, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7867–7872; Cyclopropanierung von β -Stannylketonen, siehe T. Sato, M. Watanabe, T. Watanabe, Y. Onodo, E. Murayama, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1894–1899; C. R. Johnson, J. F. Kadow, *ibid.* **1987**, *52*, 1493–1500.
- [17] a) S. Hanessian, G. McNaughton-Smith, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1657–1662; siehe auch b) S. Sajio, M. Wada, J.-I. Himizu, A. Ishida, *Chem. Pharm. Bull.* **18**, *28*, 1449; c) T. Katoh, Y. Nagata, Y. Kobayashi, K. Arai, J. Minami, S. Terashima, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5473–5476; d) K.-H. Altmann, *ibid.* **1993**, *34*, 7721–7724; e) J. Ackermann, M. Matthes, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 122–132.
- [18] S. G. Davies, N. M. Garrido, O. Ichihara, I. A. S. Walters, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1153–1159.
- [19] Alle neuen Verbindungen zeigten zufriedenstellende spektroskopische und analytische Daten (^1H -, ^{13}C -NMR, IR, LRMS, HRMS). Arbeitsvorschriften sind auf Anfrage zu erhalten. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Strukturen wurden als „supplementary publication no. CCDC-100227“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Telefax Int. + 1223/336 033; E-mail: deposit@chemistry.cam.ac.uk).
- [20] E. Benedetti, M. R. Ciajolo, A. Maisto, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1974**, *30*, 1783–1788.
- [21] a) V. Teetz, R. Geiger, R. Henning, H. Urbach, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **1984**, *10b*, 1399; b) R. Henning, U. Lerch, H. Urbach, *Synthesis* **1989**, 265–268, zit. Lit.
- [22] Hydrostannylierung von Alkenen: M. Lautens, S. Kumanovic, C. Meyer, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1428–1429; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1329–1330, zit. Lit.
- [23] a) S.-B. Huang, J. S. Nelson, D. D. Weller, *Synth. Commun.* **1989**, *19*, 3485–3496; b) S. A. Hermitage, M. G. Moloney, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1463–1464.
- [24] J. J. Sierkiera, S. K. Y. Hung, M. Roe, C. S. Lin, N. H. Sigal, *Nature* **1989**, *341*, 755–757.
- [25] a) M. W. Harding, A. Galat, D. E. Uehling, S. L. Schreiber, *Nature* **1989**, *341*, 758–760; b) H. Fretz, M. W. Albers, A. Galat, R. F. Standaert, W. S. Lane, S. J. Burakoff, B. E. Bierer, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1409–1410.
- [26] J. Liu, J. D. Farmer, W. S. Lane, J. Friedman, L. Weissman, S. L. Schreiber, *Cell* **1991**, *66*, 807–815.
- [27] T. M. Zabriskie, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3046–3048, zit. Lit.
- [28] P. J. Murray, I. D. Starkey, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1875–1878; A. Claeson, B.-M. Swahn, K. M. Edvinsson, H. Molin, M. Sandberg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1247–1250.

tionsverfahren beim Einbau solcher Nucleotide bereits nach einer Amplifikationsrunde abbricht.^[21] Wenn die modifizierten Nucleotide allerdings nicht Teil der Zufallsregion sind, die nach jeder Selektion durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt wird, stören sie die Amplifikation nicht. Jedoch müßten bei einer solchen Methode die modifizierten Oligomere nach jedem Selektionszyklus erneut in die Bibliothek eingeführt werden, wodurch das Verfahren sehr mühsam würde. Diese Einschränkung ließe sich umgehen, wenn nicht jedem Selektionszyklus eine Amplifikation folgen würde, sondern statt dessen die Zufallsregion nur einmal nach der letzten Selektionsrunde amplifiziert würde. Wenn die Region mit den modifizierten Nucleotiden von der Zufallsregion durch einen PCR-Primer getrennt wäre (Schema 1), könnte das erfolgreiche Aptamer in ähnlicher

modifizierte(s) Nucleotid(e)	Primer-bereich	Zufallssequenz	Primer-bereich
------------------------------	----------------	----------------	----------------

Schema 1. Aufbau der verwendeten DNA-Aptamere (schematisch).

Weise resynthetisiert werden wie die ursprüngliche Bibliothek. Käme man bei solch einer wiederholten Selektion ohne zwischengeschaltete Amplifikation aus, könnte man hochaffine Aptamere in einem Bruchteil der Zeit gewinnen, die man normalerweise für eine In-vitro-Selektion benötigt. Auch wenn wir hier nicht auf die Verwendung modifizierter Nucleotide eingehen, werden wir doch drei notwendige Voraussetzungen für die In-vitro-Selektion ohne zwischengeschaltete Amplifikation diskutieren und ihre Tauglichkeit nachweisen.

Drei Minimalbedingungen müssen erfüllt sein, um ein In-vitro-Screening von Oligonucleotid-Bibliotheken ohne Amplifikation durchführen zu können. Erstens muß die Zahl der Kopien der ligandenbindenden Sequenzen groß genug sein, um wiederholte Verluste während des gesamten Prozesses verkraften zu können. Zweitens muß das Signal/Rausch-Verhältnis (also das Verhältnis ligandenbindender zu unspezifisch bindenden Sequenzen) mit jedem Selektionszyklus zunehmen, bis das Rauschen vollständig unterdrückt ist. Da das Signal nicht verstärkt wird, muß es gelingen, das Rauschen schrittweise zu verringern, bis das Signal stärker ist als das Rauschen. Und drittens muß die Amplifikation nach dem letzten Selektionszyklus so effektiv sein, daß durch die Polymerasen genügend Kopien von den wenigen verbleibenden Molekülen hergestellt werden, um die Sequenzen zu identifizieren. Als ersten Test dieses Konzeptes haben wir ein schrittweises Screening nach ATP-bindenden Aptameren ohne Amplifikation durchgeführt. Wir verwendeten ATP, weil es schon als Zielmolekül verwendet worden war^[31] und wir so das Ergebnis unserer neuen Methode zur In-vitro-Selektion mit bekannten Daten vergleichen könnten. Die einzelnen Schritte dieser Methode sind in Abbildung 1 schematisch dem bisherigen Verfahren gegenübergestellt.

Die erste Bedingung für eine rekursive Selektion ohne Amplifikation wurde mit der Synthese einer Bibliothek von DNA-Oligonucleotiden mit einer 18 Nucleotide langen Zufallsregion erfüllt;^[4] diese enthielt nach Markierung und Reinigung ca. 17800 Kopien pro Einzelsequenz. Sechs Selektionszyklen ohne zwischengeschaltete Amplifikation wurden durchgeführt (siehe „Experimentelles“).

Wie bereits bei der zweiten Bedingung erwähnt, ist die Reduktion des Rauschpegels von überragender Bedeutung für den Erfolg des Experiments. Daher wurden die radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) nach jedem Selektionszyklus gemessen, um den Fortschritt der Prozedur sichtbar zu machen (Tabelle 1). Die ursprüngliche Bibliothek hatte eine Aktivität von

Eine Methode zur In-vitro-Selektion ohne eingeschobene Amplifikationsschritte **

Joseph Smith und Eric V. Anslyn*

Aptamere für medizinisch wichtige Targets sind potentielle Leitstrukturen für Wirkstoffe.^[1] Bislang sind die Verfahren zur Selektion solcher Aptamere meist auf unmodifizierte DNA und RNA beschränkt, weil Polymerasen die meisten chemisch modifizierten Mononucleotide nicht tolerieren und daher das Selektionsverfahren beim Einbau solcher Nucleotide bereits nach einer Amplifikationsrunde abbricht.^[2] Wenn die modifizierten Nucleotide allerdings nicht Teil der Zufallsregion sind, die nach jeder Selektion durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt wird, stören sie die Amplifikation nicht. Jedoch müßten bei einer solchen Methode die modifizierten Oligomere nach jedem Selektionszyklus erneut in die Bibliothek eingeführt werden, wodurch das Verfahren sehr mühsam würde. Diese Einschränkung ließe sich umgehen, wenn nicht jedem Selektionszyklus eine Amplifikation folgen würde, sondern statt dessen die Zufallsregion nur einmal nach der letzten Selektionsrunde amplifiziert würde. Wenn die Region mit den modifizierten Nucleotiden von der Zufallsregion durch einen PCR-Primer getrennt wäre (Schema 1), könnte das erfolgreiche Aptamer in ähnlicher

[*] Prof. E. V. Anslyn, Dr. J. Smith

The Department of Chemistry and Biochemistry
The University of Texas at Austin
Austin, TX 78712 (USA)
Telefax: Int. + 512/471-8696
E-mail: anslyn@ccwf.cc.utexas.edu

[**] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation und vom Texas Advanced Technology Program sowie von der Sloan and Dreyfus Foundation (E. V. A.) gefördert. J.S. ein Forschungsstipendium der Universität of Texas.

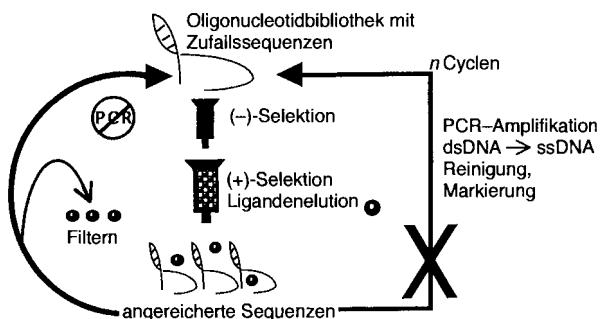


Abb. 1. Schematische Gegenüberstellung der neuen und der konventionellen *In-vitro*-Selektion. Das Symbol „ohne PCR“ soll nur darauf hinweisen, daß während der Selektionszyklen keine PCR-Reaktion durchlaufen wird; eine abschließende Amplifikation durch PCR ist auch hier notwendig. ● = ATP; (–) Selektion bezeichnet eine Agaroseacetat-Vorsäule, (+) -Selektion eine ATP-Agarose-Säule. dsDNA = Doppelstrang-DNA, ssDNA = Einzelstrang-DNA.

Tabelle 1. Überblick über die sechs Selektionszyklen. SV = Säulenvolumen, FP = Faltungspuffer (300 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Tris, pH 7.5).

Cyclus	DNA	cpm	Vor-säule (300 µL)	ATP-Agarose (2.5 mM, 800 µL)	Liganden elution
1	300 µL FP	4.2×10^7	2 SV FP	+5 SV FP	3 mL, 5 mM ATP in FP
2	10 mL 30 µM	1×10^5	1 SV FP	+2 SV FP	FP
	ATP in FP				
3	FP	600	FP	FP	FP
4, 5	FP	—	FP	FP	FP
6	FP	—	FP	FP	3 mL 10 mM ATP in FP

4.2×10^7 cpm. Nach der ersten Selektion wurden mit ATP Oligonukleotide mit etwa 10^5 cpm eluiert; das sind weniger als 0.25% der anfänglich eingesetzten Menge. Da wahrscheinlich fast alle Oligonukleotide, die während der Selektion verloren gingen, nicht an ATP binden, dient dies zur Abschätzung des Rauschens. Nach dem zweiten Cyclus war die Aktivität der ATP-eluierten DNA auf ca. 600 cpm gefallen. Das verbliebene Rauschen war wiederum über 99% reduziert. In den weiteren Cyclen konnte keine Radioaktivität über dem Hintergrund mehr gemessen werden. Da die Höhe des Signals unbekannt war, konnten wir von diesem Punkt der Selektion an nicht mehr feststellen, ob die zweite Bedingung erfüllt war.

Die dritte Bedingung wurde mit einem PCR-Verfahren für „seltene DNA“ erfüllt, das speziell für DNA niedriger Kopienzahl entwickelt wurde.^[5] Literaturdaten zufolge liegt der effektive Bereich für die optimierte Amplifikationsvorschrift bei 1 bis 20000 Ausgangsmolekülen DNA. Die PCR für seltene DNA wurde bereits eingesetzt, um weniger als 10 Moleküle Herpes-simplex-Virus-DNA in Gegenwart von 100 ng nichtviraler kontaminierender DNA als Hintergrund zu quantifizieren.^[6] Bei einem einzelnen Amplifikationsschritt am Ende der gesamten In-vitro-Selektion sind zwar mehr Reaktionsschritte notwendig, als wenn die DNA nach jedem Selektionsschritt amplifiziert wird, ein Vorteil dieses Verfahrens ist aber, daß die Variationsbreite bei den amplifizierten DNA-Sequenzen in der resultierenden Population geringer ist, als wenn nach jedem Selektionsschritt eine (aus weniger Cyclen bestehende) Amplifikation erfolgt.^[7]

Nach der PCR für seltene DNA (siehe „Experimentelles“) wurde die amplifizierte DNA kloniert, und zehn Klone wurden

sequenziert. Drei Sequenzen kamen doppelt vor. Zwischen diesen und zwei Konsensusregionen gab es offensichtliche Homologien. In Abbildung 2 ist die Basenpaarung dieser Sequenzen so dargestellt, wie es sich aus der von Huijzena und Szostak postulierten allgemeinen Sequenz^[3] eines ATP-DNA-Aptamers ableiten lässt. Tatsächlich entspricht je nach der Zahl der flankierenden Basenpaare, die die G-reichen Regionen der Sequenzen stabilisieren, die Größenordnung der Affinität zu ATP den Voraussagen von Huijzena und Szostak.

allgemeine Sequenz

$$\begin{array}{c}
 \text{5'-NNNGGGGANN}_{\substack{||| \\ |}} \text{ (N)}_{0-n} \\
 \text{3'-NNNAGGAGGNN}
 \end{array}$$

1 5'-GAATTCCAGATCTCTAGGGGGAGG A
3'-ACCCCTAGGACTATAGGAGGCT A

$$K_d = 15-25 \mu\text{M}$$

$$K_d = 27-37 \mu\text{M}$$

3 5'-GAATTCCAGATCTCTAGGGGGATT G
 |||
 3'-ACCCTAGGACTATAGGAGGAA A
 |||
 C

CCCTAGGACATAT

Abb. 2. Basenpaarungen nach der in Lit. [3] vorgeschlagenen allgemeinen Sequenz für ein ATP-DNA-Aptamer. Die fettgedruckten Sequenzen bilden vermutlich zwei gestapelte Guanidin-Quartette. Kursiv gedruckte Sequenzen gehören zur konstanten Primer-Region. Die Dissoziationskonstante des ATP-Aptamer-Komplexes wurde durch isokratische Elution [8], Membranfiltration [1b, 3] und Gleichgewichtsgelfiltration [9] bestimmt. • markiert ein nichtkanonisches Basenpaar.

Die ursprüngliche Methode von Huizenga und Szostak verlief über mehrere Cycles von Screening, Amplifikation, Isolierung von Einzelstrang-DNA, radioaktiver Markierung und Reinigung, bevor eine DNA-Population mit mäßiger Affinität zu ATP isoliert wurde. Aus 17 sequenzierten Klönen konnte keine Konsensussequenz abgeleitet werden. Ein Klon wurde für eine Serie von Deletionsexperimenten ausgewählt; als ATP-bindende Domäne wurde so eine 42 Nucleotide lange Region identifiziert. Diese wurde einer In-vitro-„Evolution“ mit einem Mutagenisierungsgrad von 30 % und vier weiteren In-vitro-Selektionscyclen unterworfen, bevor eine zweite Population kloniert wurde. Aus den neuen Sequenzen konnte eine Konsensussequenz abgeleitet werden. Sicherlich wurde mit diesen Experimenten Pionierarbeit geleistet, sie sind aber auch ein Beispiel dafür, daß die konventionelle Vorgehensweise erheblich komplizierter ist als die hier vorgestellte.

Die neue In-vitro-Selektionsvorschrift wurde entwickelt, um die Vorteile einer kombinatorischen Bibliothek geringer Größe mit zahlreichen Kopien je Sequenz auszunutzen. Für diese Methode werden statt der vielen Tage, die für die typische Screening-Strategie notwendig sind, nur zwei Tage benötigt. Mit diesem Experiment konnte das zugrundeliegende Konzept bewiesen werden, wonach mit der neuen Methode eine große Zahl von Kopien individueller Sequenzen in dem anfänglichen Zufallsgemisch erzeugt werden und der Anteil der unspezifisch bindenden Sequenzen in jedem Selektionszyklus reduziert wird. Anschließend werden die wenigen übrigbleibenden Sequenzen amplifiziert.

Weil nur die ursprünglich synthetisierten Sequenzen alle Screeningschritte durchlaufen, sollte mit dieser Technik auch die iterative In-vitro-Selektion modifizierter Oligonucleotide möglich sein, die bislang nicht für dieses leistungsfähige Verfahren

genutzt werden konnten.^[10] Die beschriebene Methode sollte also die Anwendbarkeit des In-vitro-Selektionsverfahrens erheblich vergrößern. Dies ist ein Ziel, an dessen Erreichung wir arbeiten.

Experimentelles

31 mg der DNA-Bibliothek [4] wurden am 5'-Ende mit $[\gamma-^{32}\text{P}]$ ATP markiert, gel-chromatographisch gereinigt und anschließend in 300 mL „Faltungspuffer“ (300 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Tris, pH 7.5) suspendiert. Nach Denaturierung bei 75 °C wurde die ^{32}P -markierte DNA auf Raumtemperatur gekühlt und auf eine Agaroseacetat-Vorsäule (300 μL) aufgetragen, die unmittelbar auf einer 2.5-mm-ATP-Agarosesäule (800 μL , Sigma) angebracht war. Die Vorsäule wurde mit 600 μL Puffer gewaschen, und die eluierte DNA verblieb zum Äquilibrieren 10 min auf der ATP-Agarosesäule. Die Vorsäule wurde ebenso wie alle anderen Säulen nach einmaligem Gebrauch verworfen. Nach dem Äquilibrieren wurde die ATP-Agarosesäule mit 4 mL Faltungspuffer gewaschen, um nicht oder nur schwach gebundene Oligonukleotide zu entfernen. Die gebundene DNA wurde mit 3 mL ATP-Elutionspuffer (5 mM ATP in Faltungspuffer) eluiert und in 500 μL -Fraktionen aufgefängt. Um einen weiteren Selektionszyklus durchzuführen, mußte das ATP entfernt werden. Dazu wurden die eluierten Fraktionen sofort in Microcon-3-Mikrozentrifugengefäßen gesammelt (Ausschlußgrenze 3000 D. Amicon). Durch diese Membranfiltration wurde etwa 98 % des gesamten ATP entfernt. Die filtrierten Fraktionen wurden vereinigt und mit Faltungspuffer auf 10 mL aufgefüllt. Die so erreichte Konzentration von 30 μM kontaminiertes ATP in der DNA-Probe lag damit um einen Faktor 80 niedriger als die Konzentration von 2.5 mM auf der ATP-Agarosesäule. Jeder Selektionszyklus begann mit einem neuen Satz gekoppelter Affinitäts-säulen, d. h. einer Vorsäule über einer Ligandensäule. Das ganze Screeningverfahren auf ATP-Aptamere ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Die PCR für seltene DNA wurde wie folgt durchgeführt: Am Ende des letzten Cyclus wurde die DNA von der ATP-Agarosesäule mit 3 mL 10 mM ATP in 20 mM Tris, pH 7.5, eluiert. Diese letzte Fraktion wurde zweimal mit Ethanol gefällt und mit den PCR-Reagenten (50 mM KCl, 8 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris, pH 8.8 bei 25 °C, 200 μM dNTPs, 0.1 % Triton X-100, 20 Einheiten Deep-Vent-DNA-(Exo-) Polymerase, 0.5 mM 5'-Primer, 0.5 mM 3'-Primer) versetzt. Die Temperaturzyklen (94 °C für 45 s; 42 °C für 90 s; 60 °C für 45 s; 45 Cycles) wurden in einem UV-bestrahlten Mikrozentrifugenröhren durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde eine verdünnte Lösung mit ca. 20 000 Molekülen eines 52mers, als negative Kontrolle eine Lösung ohne DNA durch die Amplifikation mitgeführt. Die Gelektrophorese nach der Amplifikation zeigte in allen Spuren mit Ausnahme der Negativkontrolle DNA.

Eingegangen am 27. Februar 1997 [Z 10170]

Stichworte: Aptamere · In-vitro-Selektion · Kombinatorische Chemie · Nucleotide · Polymerase-Kettenreaktion

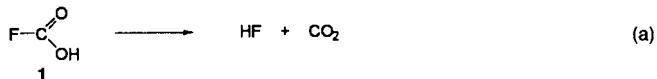
- [1] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564–566; J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1994**, *33*, 973–982; D. Smith, G. P. Kirschenheuter, J. Charlton, D. M. Guidot, J. E. Repine, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 741–750; D. Jellinek, L. S. Green, C. Bell, N. Janjic, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10450–10456; C. Tuerk, S. MacDougal, L. Gold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6988–6992; C. Tuerk, S. MacDougal-Waugh, *Gene* **1993**, *137*, 33–39; D. P. Bartel, M. L. Zapp, M. R. Green, J. Szostak, *Cell* **1991**, *67*, 529; C. T. Lauhon, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1246–1257; P. Burgstaller, M. Famulok, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1163–1166; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1084–1087; M. Famulok, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3990–3991; M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1698–1706; J. G. Connell, M. Illangesekare, M. Yarus, *Biochemistry* **1993**, *32*, 5497; M. Sasanfar, J. W. Szostak, *Nature* **1993**, *364*, 550–553; a) M. G. Wallis, U. von Ahsen, R. Schroeder, M. Famulok, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 543–552; b) R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, B. Polisky, *Science* **1994**, *263*, 1425–1429; J. F. Milligan, M. D. Matteucci, J. C. Martin, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1923–1937; J. D. Ecker, S. T. Crooke, *Biotechnology* **1995**, *13*, 351–360.
- [2] Ausnahmen sind unter anderem 2'-Amino- und 2'-Fluor-Substitution am Zucker (H. Aurup, D. M. Williams, F. Eckstein, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9636–9641) und eine 5'-Pyrimidinsubstitution mit einem 1-Pentinylrest (J. A. Latham, R. Johnson, J. J. Toole, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2817–2822).
- [3] D. E. Huijzen, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1995**, *34*, 656–665.
- [4] Die HPLC-gereinigten Oligonukleotide wurden von Operon gekauft. Die Anfangssequenz war 5'-GAATTCCAGATCTCT-(18N)-GATATCAG-GATCCA-3'. Die beiden Primer waren 5'-GAATTCCAGATCTCT-3' und 5'-TGGGATCTTGATATC-3'. Diese Sequenzen enthielten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI.
- [5] D. M. Coen in *Current Protocols in Molecular Biology*; (Hrsg.: F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith und K. Struhl), Current Protocols, New York, 1994; Kapitel 15.4.

- [6] J. P. Katz, E. T. Bodin, D. M. Coen, *J. Virol.* **1990**, *64*, 1690–1694.
- [7] S. A. Kauffman, *The Origins of Order: Self Organization and Selection in Evolution*, Oxford University Press, New York, 1993, Kap. 3.
- [8] D. H. Freeman, *Anal. Chem.* **1972**, *44*, 117–120; B. M. Dunn, I. M. Chaiken, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, *71*, 2382.
- [9] J. P. Hummel, W. J. Dreyer, *Biochim. Biophys. Acta* **1962**, *63*, 530.
- [10] Eine weitere Methode zum Einsatz modifizierter Nucleotide in der 5'-Region eines Primers wurde kürzlich beschrieben: J. Burmeister, G. von Kiedrowski, A. D. Ellington, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1379–1381; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1321–1324.

Synthese, NMR-Spektroskopie und eine ab-initio/IGLO/GIAO-MP2-Studie der protonierten Fluorameisensäure und des Fluorcarbonyl-Kations **

George A. Olah,* Arwed Burrichter, Thomas Mathew, Yashwant D. Vankar, Golam Rasul und G. K. Surya Prakash*

Fluorameisensäure, ein Monofluorderivat der Kohlensäure, wurde als Intermediat bei der Oxidation von Fluorkohlenwas-serstoffen^[1] und der Ozonolyse von Fluoralkenen postuliert.^[2] Wegen ihrer potentiellen Rolle beim Abbau der Ozonschicht in der Stratosphäre findet die Fluorameisensäure beträchtliches Interesse.^[3, 4] Kürzlich wurde sie in der Gasphase durch Neutra-lisations-Reionisations-Massenspektrometrie (NMRS) beob-achtet.^[5] Alle Versuche, Fluorameisensäure in Lösung zu syn-thetisieren, sind bis jetzt gescheitert. Im „Cotton/Wilkinson“ steht, daß Fluorameisensäure aufgrund ihrer autokatalytischen Zersetzung in HF und CO₂ [Gl. (a)] in kondensierter Phase nicht existieren kann.



Die Struktur und der Zerfall der Fluorameisensäure wurden in einer Reihe von theoretischen Arbeiten untersucht.^[2, 7–10] Während danach die neutrale Fluorameisensäure **1** instabil sein soll, sollen die entsprechende Säure und Base, die proto-nierte Fluorameisensäure $[\text{FC}(\text{OH})_2]^+$ bzw. das Fluorformiat $[\text{FCO}_2]^-$, aufgrund von Resonanzstabilisierung eine beträchtlich höhere Stabilität aufweisen.

Seppelt et al.^[11] haben vor kurzem stabile Salze des Fluorfor-miat $[\text{FCO}_2]^-$ durch Reaktion von CO₂ mit trockenen quartären Ammoniumfluoriden wie Me₄NF synthetisiert. Das Fluor-formiat ist unter wasserfreien Bedingungen in aprotischen Lö-sungsmitteln, z. B. trockenem Aceto-nitril, bemerkenswert stabil und wur-de durch ¹³C- und ¹⁹F-NMR- sowie IR-Spektroskopie charakterisiert.



[*] Prof. Dr. G. A. Olah, Prof. Dr. G. K. S. Prakash, A. Burrichter, Dr. T. Mathew, Prof. Dr. G. Rasul
Loker Hydrocarbon Research Institute and Department of Chemistry
University of Southern California
University Park, Los Angeles, CA 90089-1661 (USA)
Telefax: Int. + 213/740-5087

Prof. Dr. Y. D. Vankar
Department of Chemistry, Indian Institute of Technology
Kanpur 208016 (Indien)

[**] Onium Ions, 49. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation gefördert. A. B. dankt der Konrad-Adenauer-Stiftung für ein Sti-pendium. – 48. Mitteilung: G. K. S. Prakash, Q. Wang, G. Rasul, G. A. Olah, *J. Organomet. Chem.*, im Druck.