

RNA-Aminoglycosid-Wechselwirkungen: Design und Synthese von „Amino-amino-glycosiden“ und deren Bindung an RNA**

Hai Wang und Yitzhak Tor*

An vorderster Front der RNA-Chemie und -Biologie liegt das weitgehend unerforschte Gebiet der RNA-Erkennung. Obwohl die RNA eine zentrale Rolle in zahlreichen biologischen Prozessen spielt, ist über die Wechselwirkungen zwischen kleinen organischen Molekülen und RNA wenig bekannt.^[1, 2] Die Entdeckung, daß Aminoglycosid-Antibiotica spezifisch mit diversen RNA-Molekülen wie beispielsweise der ribosomalen 16S-RNA,^[3, 4] den Introns der Gruppe-I^[5] und den Hammerhead-Ribozymen^[6] wechselwirken sowie die Bindung des Rev-Proteins^[7] und des Tat-Peptids^[8] an ihre virale Ziel-RNA blockieren, hat beträchtliches Interesse geweckt. Es wurden Versuche unternommen, die Elemente zu identifizieren, die an diesen Erkennungsphänomenen beteiligt sind.^[9, 10] Die Erarbeitung allgemeingültiger „Erkennungsregeln“ für die Wechselwirkungen zwischen RNA und Liganden ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung von kleinen RNA-bindenden Molekülen, die auf besonders wichtige RNA-Positionen von Bakterien und Viren gerichtet sind.

Da Aminoglycoside hochfunktionalisierte polykationische Oligosaccharide sind, liegt es nahe, daß zwischen ihren polaren Gruppen (Amino- und Hydroxygruppen) und dem RNA-Rückgrat und/oder den heterocyclischen Basen Wechselwirkungen stattfinden.^[11] Weil die Aminogruppen bei pH 7.0 weitgehend protoniert vorliegen,^[12] ist die Gesamtladungsdichte der Aminoglycoside mit großer Wahrscheinlichkeit für eine Bindung an die RNA von Bedeutung. Die bisher beschriebenen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der natürlichen Aminoglycoside stützen diese allgemeine Ansicht. So weisen Aminoglycoside mit vier Aminogruppen eine sehr geringe Bindungsaffinität für RNA auf, während die aktivsten Derivate fünf oder sechs Aminogruppen tragen.^[5-8] Da diese Betrachtungsweise nur sehr allgemein ist, kann sie nicht die ausgeprägten Unterschiede erklären, die bei der RNA-Bindung von verwandten Aminoglycosid-Antibiotica auftreten.^[5, 7]

In diesem Beitrag richten wir unser Augenmerk auf die elektrostatischen Wechselwirkungen bei der Bindung zwischen RNA und Aminoglycosiden und widmen uns den folgenden Fragen: 1. Läßt sich die RNA-Bindungsfähigkeit von schlecht an RNA bindenden Molekülen (wie beispielsweise Kanamycin A) dadurch verbessern, daß man eine zusätzliche Aminogruppe in ihre Strukturen einführt? 2. Kann man die RNA-Bindungsfähigkeit der am besten an

RNA bindenden Antibiotica (Tobramycin und Neomycin B) noch steigern, indem weitere Aminogruppen eingebaut werden? 3. Läßt sich ein gemeinsames Bindungsmuster identifizieren? Wir berichten hier über neuartige „Amino-aminoglycoside“, die sich von Kanamycin A, Tobramycin und Neomycin B ableiten: ihr Design, die Synthese und die inhibitorische Wirkung auf ein Hammerhead-Ribozym. Wir liefern experimentelle Beweise für die entscheidende Rolle der Gesamtladung von Aminoglycosiden bei der RNA-Bindung und schlagen ein allgemeingültiges Erkennungsmodell vor, bei dem die stereochemische Anordnung der geladenen Ammoniumgruppen besonders wichtig ist.

Beim Design von Amino-aminoglycosiden müssen drei wesentliche Einflußfaktoren berücksichtigt werden: 1. die Position der Modifikation, 2. der Substitutionsgrad des Amins und seine Basizität und 3. die synthetische Zugänglichkeit. Wir haben in jüngster Zeit eine Reihe systematisch desoxygrierter Analoga von Tobramycin synthetisiert und untersucht. Wie erste Ergebnisse erkennen ließen, ist die Affinität des 6"-Desoxytobramycins zum Hammerhead-Ribozym nur etwas geringer als die von Tobramycin.^[13] Diese Beobachtung legt den Schluß nahe, daß die 6"-OH-Gruppe zwar für die RNA-Bindung nicht notwendig, jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit am Kontakt mit der RNA beteiligt ist. Was die Basizität der Aminogruppen betrifft, so wurde beobachtet, daß die primären Aminomethyl-Gruppen ($-\text{CH}_2\text{NH}_2$) zahlreicher Aminoglycoside basischer sind (pK_a 8.6–9.0) als andere primäre Amine (pK_a 6.2–8.1).^[12] Weil sich zudem die primären Alkohole einfach derivatisieren lassen, haben wir die Positionen 6" von Kanamycin A und Tobramycin sowie die Position 5" von Neomycin B für die Modifikation ausgewählt.

Bei den untersuchten Verbindungen (Abb. 1) Kanamycin A **1** und 6"-Amino-6"-desoxykanamycin A **2**, Kanamycin B **3**, Tobramycin **4** und 6"-Amino-6"-desoxytobramycin **5** sowie Neomycin B **6** und 5"-Amino-5"-Desoxyneomycin B **7** handelt es sich um Aminoglycoside und ihre Derivate, bei denen eine einzelne primäre Hydroxygruppe durch eine primäre Aminofunktion ersetzt wurde, während alle übrigen funktionellen Gruppen unverändert blieben. Eine repräsentative Synthese gibt das Schema 1 für 6"-Amino-6"-desoxytobramycin **5** wieder. Tobramycin **4** wurde zunächst als Cbz-Derivat **8** geschützt. Anschließend wurde die primäre 6"-Hydroxygruppe tosyliert; das voll Cbz-geschützte Monotosylat **9** wurde mit Natriumazid in **10** überführt, und das Azid **10** anschließend mit Triphenylphosphan und wäßrigem Natriumhydroxid zum Amin **11** reduziert. Die katalytische Hydrierung lieferte schließlich 6"-Amino-6"-desoxytobramycin **5**. Ähnliche Umsetzungen wurden bei der Synthese von 6"-Amino-6"-desoxykanamycin A,^[14] und 5"-Amino-5"-desoxyneomycin B^[15] angewendet.

Die Aminoglycoside und ihre Aminoderivate wurden auf ihre Fähigkeit getestet, das Hammerhead-Ribozym – ein gut untersuchtes kleines RNA-Enzym^[6, 16] – zu inhibieren. Dazu wurde gemessen, welchen Einfluß die Aminoglycosid-Derivate auf die Spaltungsgeschwindigkeit des Hammerhead-Ribozym habent. Diese Untersuchungen wurden bei pH 7.3 unter Single-turnover-Bedingungen bei Mg^{2+} - und Ribozym-Konzentrationen unterhalb der Sättigung durchgeführt. Ab-

[*] Prof. Dr. Y. Tor, H. Wang

Department of Chemistry and Biochemistry
University of California, San Diego
La Jolla, CA 92093-0358 (USA)
Telefax: Int. +619/534-5383
E-mail: ytor@ucsd.edu

[**] Diese Arbeit wurde durch das AIDS-Forschungsprogramm der University of California (Grant No. R96-SD-067) sowie ein Hellman Faculty Fellowship (Y. T.) unterstützt

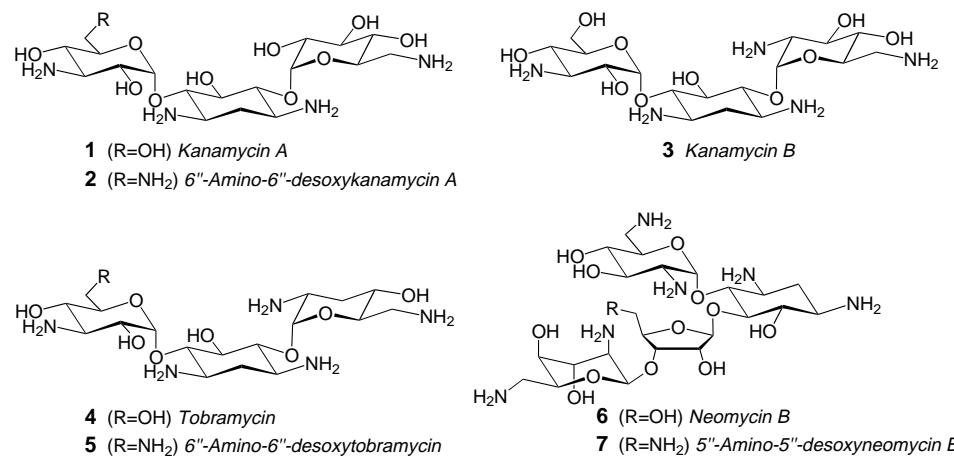
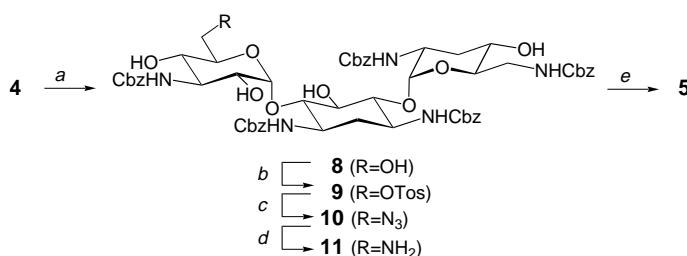


Abb. 1. Die Strukturformeln natürlicher Aminoglycoside und der in dieser Arbeit untersuchten Derivate.



Schema 1. Synthese von 6''-Amino-6''-desoxytobramycin 5. Reagenzien und Bedingungen: a) Ph_2COCl , H_2O , Na_2CO_3 (90% Ausbeute); b) TosCl , Pyridin, 4°C (52%); c) NaN_3 , DMF (80%); d) Ph_3P , THF, NaOH - H_2O ; e) H_2 , Pd/C , AcOH (60% für beide Schritte).

bildung 2 gibt die Ergebnisse eines typischen Experiments wieder; Tabelle 1 faßt die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen pseudo-erster Ordnung für verschiedene Aminoglycosid-Konzentrationen zusammen.

Unter diesen Bedingungen spaltet das Ribozym sein Substrat mit einer Geschwindigkeitskonstante von 0.075 min^{-1} . Bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ bremst Kanamycin A 1 das Ribozym auf 75% seiner Geschwindigkeit ab, während bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ Kanamycin A 1 das Ribozym überhaupt nicht inhibiert. 6''-Amino-6''-desoxykanamycin A 2 senkt bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ die Spaltungsgeschwindigkeit auf ein Fünftel, vergleichbar dem Effekt, den Kanamycin B 3 bewirkt. Diese

Tabelle 1. Inhibition des Hammerhead-Ribozyms durch Aminoglycosid-Derivate.^[a]

Derivat	$k_2[\text{min}^{-1}]$	$100 \mu\text{M}$	$10 \mu\text{M}$	$1 \mu\text{M}$
keines (Kontrolle)			0.075	
Kanamycin A 1	0.058	— ^[b]	— ^[b]	
6''-Amino-6''-desoxykanamycin A 2	0.018	0.050	— ^[b]	
Kanamycin B 3	0.018	0.060	— ^[b]	
Tobramycin 4	0.012	0.051	— ^[b]	
6''-Amino-6''-desoxytobramycin 5	— ^[c]	0.011	— ^[b]	
Neomycin B 6	— ^[c]	0.018	0.062	
5''-Amino-5''-desoxyneomycin B 7	— ^[c]	0.003	0.030	

[a] Bedingungen siehe *Experimentelles*. Die angegebenen Werte sind der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. Der Fehler wird auf 10% geschätzt. [b] Bei dieser Konzentration wird keine Inhibition beobachtet. [c] Unter diesen Bedingungen sind die Derivate zu aktiv, so daß eine komplette Inhibition stattfindet.

Beobachtung macht deutlich, daß ein Molekül, das nur schwach an RNA bindet, durch eine zusätzliche Aminogruppe in ein recht stark bindendes Molekül umgewandelt werden kann. Modifiziert man ein starker RNA-bindendes Molekül wie Tobramycin, so läßt sich seine Affinität zu RNA noch weiter steigern. So vermindert 6''-Amino-6''-desoxytobramycin 5 bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ die Spaltungs geschwindigkeit des Ribozyms fünfmal effektiver als Tobramycin 4.

Neomycin B 6 ist einer der stärksten RNA-Binder. Bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ zeigt es eine inhibierende

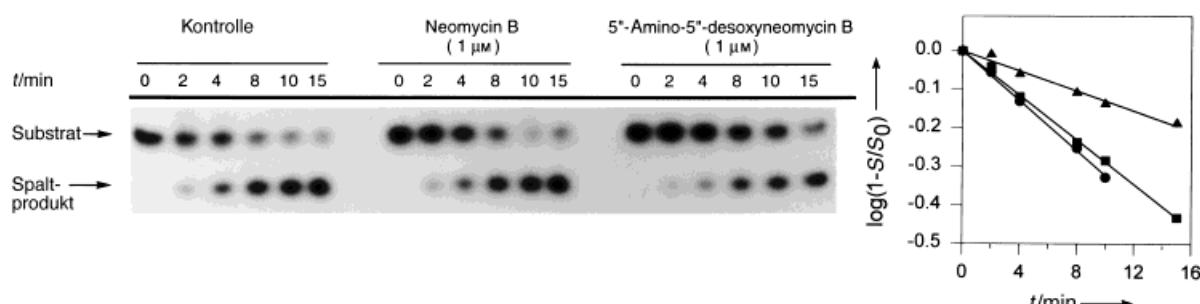


Abb. 2. Links: Autoradiogramme eines 20%igen Polyacrylamidgels, mit dessen Hilfe die Produkte der zeitabhängigen Spaltungsreaktionen des Hammerhead-Ribozyms in Abwesenheit (Kontrolle) und Gegenwart von Neomycin B 6 sowie 5''-Amino-5''-desoxyneomycin B 7 getrennt wurden. Rechts: Kinetische Analyse des quantitativ ausgewerteten Gels. Kontrolle (●), $1 \mu\text{M}$ Neomycin B 6 (■), und $1 \mu\text{M}$ 5''-Amino-5''-desoxyneomycin B 7 (▲).

Wirkung, die etwa so stark ist wie die von 6"-Amino-6"-desoxykanamycin A bei 100 μM . Ersetzt man die primäre OH-Gruppe in der Position 5" durch eine primäre NH₂-Gruppe, erhält man das neuartige Aminoglycosid-Derivat **7**, das sieben Aminogruppen enthält. Bei 10 μM ist **7** ein außergewöhnlich guter Inhibitor, der das Ribozym um den Faktor 25 inhibiert. Bei 1 μM bremst es das Hammerhead-Ribozym doppelt so stark wie die Ausgangsverbindung Neomycin B. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß selbst bei den aktivsten Aminoglycosiden die Fähigkeit zur RNA-Bindung durch eine Erhöhung der Gesamtladung noch weiter gesteigert werden kann.

Daß 6"-Amino-6"-desoxykanamycin A **2** und Kanamycin B **3** das Ribozym ähnlich stark inhibieren, ist wohl kein Zufall. Beide Derivate haben fünf Amino-Gruppen – wenn auch in verschiedenen Positionen des Aminoglycosid-Gerüstes –, und nehmen deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit bei einem gegebenen pH-Wert eine ähnliche positive Gesamtladung an. Wir postulieren, daß diese Aminoglycoside eine ähnliche Verteilung der positiven Ladungen im Raum aufweisen. Dreht man nämlich 6"-Amino-6"-desoxykanamycin A **2** um eine imaginäre pseudo-C₂-Achse, die durch die Positionen 2 und 5 des zentralen 2-Desoxystreptamin-Rings verläuft, dann „überlappen“ die zentralen Ringe dieser beiden Aminoglycoside (Abb. 3). Die Aminogruppen 1 und 3 von **2** kommen mit den Aminogruppen 3 und 1 von **3** zur Deckung. Die 3"-Aminogruppen von **2** nimmt die Position der flexiblen 6"-NH₂-Gruppe in Kanamycin B **3** und die neue 6"-NH₂-Gruppe in **2** die Position der 2"-NH₂-Gruppe in **3** ein. Darüber hinaus kann die 6"-NH₂-Gruppe von **2** die Position der 3"-NH₂-Gruppe in Kanamycin B **3** ausfüllen.^[17] Zieht man weiterhin die Kugelform der Ammoniumgruppe und ihre geometrische Entartung in Betracht, dann präsentieren beide Derivate dem RNA-Gerüst eine ähnliche Verteilung der Ammoniumgruppen und damit der Ladungsdichten (Abb. 3).

Wie frühere Untersuchungen gezeigt haben, wechselwirken Aminoglycosid-Antibiotika vorzugsweise mit dem Enzym-

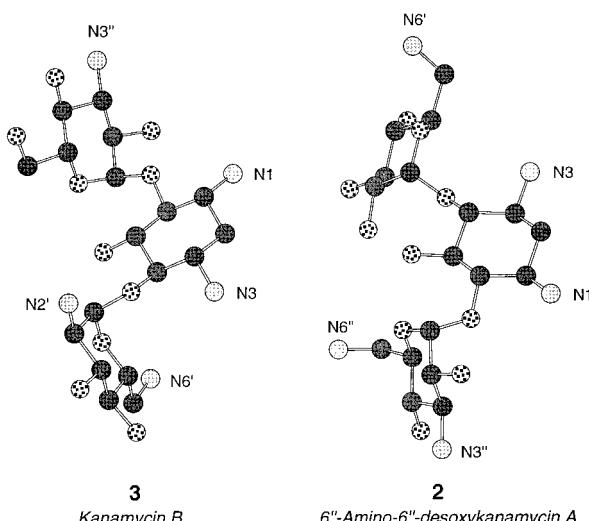


Abb. 3. Energieminimierte Konformationen (Programm Spartan) des voll protonierten 6"-Amino-6"-desoxykanamycins A **2** und des gedrehten Kanamycins B **3**; sie verdeutlichen, daß die Ammoniumgruppen ähnliche Position im Raum einnehmen. C dunkelgrau, N hellgrau, O gepunktet.

Substrat-Komplex des Hammerhead-Ribozyme und inhibieren den Spaltungsschritt.^[6] Man hat vermutet, daß die positiv geladenen Ammoniumgruppen die entscheidenden Mg²⁺-Ionen ersetzen.^[18] Unsere Ergebnisse stützen diese Ansicht und zeigen eindeutig, daß die Gesamtzahl der Aminogruppen im Aminoglycosid mit der inhibierenden Aktivität und der RNA-Bindungsfähigkeit korreliert. Unser Modell der Aminoglycosid-RNA-Erkennung schlägt eine spezifische, gleichzeitig jedoch auch anpassungsfähige, dreidimensionale Anordnung der positiv geladenen Ammoniumgruppen gegenüber den Acceptorgruppen der RNA-Bindungsstelle vor. Diese Sichtweise läßt sich mit den Ergebnissen jüngster NMR-Untersuchungen^[10] und MD-Simulationen^[19] vereinbaren, die statt hochspezifischer Kontakte zwischen den Aminoglycosid-Antibiotica und ihren RNA-Zielmolekülen eher eine dreidimensionale elektrostatische Komplementarität nahelegen.

Unsere Untersuchungen sind für das Design von RNA-bindenden Molekülen wichtig.^[20] RNA-Binder müssen ausreichend viele positive Ladungen tragen, damit sie elektrostatisch an die RNA-Zielposition binden können. Eine Konkurrenz mit gebundenen Mg²⁺-Ionen läßt sich durch den gezielten Einbau von Ammoniumgruppen erreichen, die bestimmte N-N-Abstände und Raumpositionen einnehmen, möglicherweise auch durch den Einbau von funktionellen Gruppen, die Mg²⁺-Ionen koordinativ binden können. RNA-Binder geringer Molekülmasse, die effizienter wirken und weniger giftig sind als die Aminoglycosid-Antibiotica, könnten eines Tages diese Medikamente in der klinischen Anwendung ablösen und darüber hinaus neuartige Anwendungen in der Virusbekämpfung eröffnen.

Experimentelles

Die Synthese der Aminoglycosid-Derivate beschreiben wir an anderer Stelle.

Als Hammerhead-Ribozym wurde HH16 eingesetzt. Es enthält das Enzym E16 sowie das ³²P-5'-markierte Substrat S16.^[6] Sowohl E16 als auch S16 wurden durch In-vitro-Transkriptionen der entsprechenden synthetischen DNA-Stränge unter Einsatz von T7-RNA-Polymerase hergestellt. Die Bedingungen für die Reaktion des Ribozyme: 20 nm E16, Spuren von ³²P-5'-markiertem S16 ($\leq 1 \text{ nm}$), 7.5 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 7.3, mit variierenden Konzentrationen an Aminoglycosiden. Die Reaktionen wurden gestartet, indem gleiche Volumina von zuvor inkubierten Lösungen des Enzyms E16 und des markierten Substrats S16 gemischt wurden. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben gezogen. Die Reaktion wurde in diesen Proben durch Zugabe überschüssiger Stop-Lösung/Auftragspuffer (8 M Harnstoff, 50 mM Na₂-EDTA, pH 7.3, Bromphenolblau und Xylolycianol) zum Stillstand gebracht. Substrat und Produkt wurden auf 20%igen Polyacrylamid/7 M-Harnstoff-Gelen getrennt. Welcher Anteil des Substrats gespalten worden war, wurde mit einem Molecular-Dynamics-Phosphorimager mit ImagQuant-Software quantifiziert. Bei Auftragung von $\log(1-S/S_0)$ gegen die Zeit erhält man eine Gerade mit der Steigung $-k_2$ (Abb. 2 rechts).

Eingegangen am 8. Juli 1997 [Z 10657]

Stichwörter: Aminoglycoside • Antibiotica • Elektrostatische Wechselwirkungen • Ribozyme • RNA

[1] C. S. Chow, F. M. Bogdan, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1489–1513.

[2] W. D. Wilson, L. Ratmeyer, M. Zhao, L. Strekowski, D. Boykin, *Biochemistry* **1993**, 32, 4089–4104; L. Ratmeyer, M. L. Zapp, M. R.

- Green, R. Vinayak, A. Kumar, D. W. Boykin, W. D. Wilson, *ibid.* **1996**, 35, 13689–13696.
- [3] D. Moazed, H. F. Noller, *Nature* **1987**, 327, 389–394.
- [4] P. Purohit, S. Stern, *Nature* **1994**, 370, 659–662.
- [5] U. von Ahsen, J. Davies, R. Schroeder, *Nature* **1991**, 353, 368–370; U. von Ahsen, J. Davies, R. Schroeder, *J. Mol. Biol.* **1992**, 226, 935–941; J. Davies, U. von Ahsen, R. Schroeder, *The RNA World* (Hrsg.): R. F. Gesteland, J. F. Atkins), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1993**, S. 185–204.
- [6] T. K. Stage, K. J. Hertel, O. C. Uhlenbeck, *RNA* **1995**, 1, 95–101.
- [7] M. L. Zapp, S. Stern, M. R. Green, *Cell* **1993**, 74, 969–978; G. Werstuck, M. L. Zapp, M. R. Green, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 129–137.
- [8] H.-Y. Mei, A. A. Galan, N. S. Halim, D. P. Mack, D. W. Moreland, K. B. Sanders, H. N. Troung, A. W. Czarnik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 2755–2760.
- [9] S. M. Lato, A. R. Boles, A. D. Ellington, *Chem. Biol.* **1995**, 2, 291–303; M. G. Wallis, U. von Ahsen, R. Schroeder, M. Famulok, *ibid.* **1995**, 2, 543–552; M. Famulok, A. Hüttenhofer, *Biochemistry* **1996**, 35, 4265–4270; Y. Wang, J. Killian, K. Hamasaki, R. R. Rando, *ibid.* **1996**, 35, 12338–12346; M. Hendrix, E.-S. Priestley, G. F. Joyce, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3641–3648; M. I. Pecht, D. Fourmy, S. C. Blanchard, K. D. Dahlquist, J. D. Puglisi, *J. Mol. Biol.* **1996**, 262, 421–436; D. Fourmy, M. I. Pecht, S. C. Blanchard, J. D. Puglisi, *Science* **1996**, 274, 1367–1371.
- [10] L. Jiang, A. K. Suri, R. Fiala, D. J. Patel, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 35–50.
- [11] M. Hendrix, P. B. Alper, E. S. Priestley, C.-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Engl.* **1997**, 109, 119–122; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 95–98.
- [12] D. E. Dorman, J. W. Paschal, K. E. Merkel, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 6885–6888; R. E. Botto, B. Coxon, *ibid.* **1983**, 105, 1021–1028; L. Szilágyi, Z. Sz. Pusztahelyi, S. Jakab, I. Kovács, *Carbohydr. Res.* **1993**, 247, 99–109.
- [13] H. Wang, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8734–8735.
- [14] S. Inouye, *J. Antibiot.* **1967**, 20, 6–14.
- [15] Alle neuen Verbindungen ergaben zufriedenstellende analytische und spektroskopische Daten.
- [16] O. C. Uhlenbeck, *Nature* **1987**, 328, 596–600; M. J. Fedor, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1992**, 31, 12042–12054.
- [17] Alternativ können auch die intramolekularen NH_3^+ – NH_3^+ -Abstände der minimierten Konformationen der beiden Aminoglycosid-Derivate verglichen werden. Dabei erhält man ähnliche Abstände (wobei es sich allerdings um andere Paare von Ammoniumgruppen handelt). Dieses Ergebnis stützt die Ansicht, daß **2** und **3** eine ähnliche Verteilung positiver Ladungen aufweisen, die bei der Bindung an RNA mit Mg^{2+} -Ionen konkurrieren können.
- [18] B. Clouet-d'Orval, T. K. Stage, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry* **1995**, 34, 11 186–11 190.
- [19] T. Hermann, E. Westhof, *J. Mol. Biol.*, im Druck.
- [20] Einen kombinatorischen Ansatz für die Synthese von Aminoglycosid-Analoga beschreiben: W. K. C. Park, M. Auer, H. Jaksche, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10 150–10 155.

Molekulare Gefäße auf Calix[5]aren-Basis für Alkylammonium-Ionen**

Francoise Arnaud-Neu, Saowarux Fuangswasdi, Anna Notti, Sebastiano Pappalardo* und Melchiorre F. Parisi

Professor Francesco Bottino zum 70. Geburtstag gewidmet

Kation- π -Elektronen-Wechselwirkungen spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung positiv geladener Gäste durch elektronenreiche π -Systeme natürlicher^[1] oder synthetischer Wirte.^[2] Geeignet funktionalisierte Calixarene^[3] können in π -basischen Hohlräumen organische Kationen in unpolaren Lösungsmitteln selektiv einschließen.^[4] Kürzlich konnten wir zeigen, daß Kronenetherderivate von (1,3)-*p-tert*-Butylcalix[5]arenen in der Lage sind, zwischen Ammonium-Ionen mit linearen und verzweigten Alkylsubstituenten anhand der *endo*-Komplexierung zu unterscheiden.^[5] Die niedrigen Assoziationskonstanten ($K_{\text{ass}} \sim 48–86 \text{ M}^{-1}$) für den selektiven Einschluß von $n\text{BuNH}_3^+$ hängen wahrscheinlich zum einen von der Form des Hohlräums (C_s -Symmetrie) der Wirtmoleküle ab, zum anderen aber auch von ihrer ausgeprägten Tendenz, sich selbst zu „füllen“, indem die *tert*-Butylphenyl-Gruppen nach innen ragen.^[5]

Anstelle dieser Calixarene mit verzerrter *cone*-Konformation sollten stärker bindende Rezeptoren durch eine Verbesserung der Form und der Präorganisation der permanenten Hohlräume zugänglich sein. Zwar kann die Form des Calix[5]aren-Hohlräumes im Prinzip dadurch optimiert werden, daß die Substituenten sowohl am oberen als auch am unteren Rand durch solche mit anderer Raumbeanspruchung ersetzt werden,^[6] doch müssen am oberen Rand *tert*-Butyl-Substituenten vorhanden sein, damit die *cone*-Konformation der Moleküle beibehalten wird und der selektive Einschluß der RNH_3^+ -Ionen gewährleistet bleibt. Aus diesem Grund wurden die weiteren strukturellen Veränderungen am unteren Rand von *p-tert*-Butylcalix[5]aren **1a** vorgenommen. Die Anknüpfung von langkettigen Gruppen (länger als Ethoxyethoxy)^[7] am unteren Rand von **1a** führte über eine erschöpfende Alkylierung mit Elektrophilen zu den Derivaten **1b–e** mit regelmäßiger, C_{sv} -symmetrischer *cone*-Konformation. Diese Rezeptoren binden stärker und selektiver an RNH_3^+ -Ionen als die bisher bekannten neutralen synthetischen Wirte.

[*] Prof. S. Pappalardo

Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Catania
Viale A. Doria 6, I-95125 Catania (Italien)

Telefax: Int. +95/580-138
E-mail: spappalardo@dipchi.unict.it

Dr. F. Arnaud-Neu, S. Fuangswasdi
Laboratoire de Chimie-Physique de l'ECPM
Université Louis Pasteur, Strasbourg

Dr. A. Notti, Dr. M. F. Parisi

Dipartimento di Chimica Organica e Biologica, Università di Messina

[**] Die italienischen Autoren danken dem Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica (MURST) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit sowie Dr. M. Saitta für die massenspektrometrischen Messungen. S. F. dankt der Société Française d'Exportation des Ressources Educatives (SFERE) für ein Stipendium.