

Festphasensynthese doppelt markierter Peptidnucleinsäuren als Sonden für die Echtzeitdetektion der Hybridisierung**

Oliver Seitz*

Die wechselseitige Erkennung zweier komplementärer Nucleinsäurestränge bildet die molekulare Basis für die meisten Anwendungen in Nucleinsäurediagnostik und -therapie. Viel Aufmerksamkeit wurde daher der Entwicklung von Methoden gewidmet, die eine Detektion des Hybridisierungsvorgangs ermöglichen. In der überwiegenden Mehrzahl der Hybridisierungs-Assays wird eine feste Phase eingesetzt, um die Abtrennung ungebundener Analyten zu erleichtern.^[1] Die mit heterogenen Assays verbundenen Nachteile wie unspezifische Adsorption und die Notwendigkeit zeitraubender Waschvorgänge werden bei Assays, die in homogener Lösung verlaufen, vermieden.^[2] Außerdem gestatten es homogene Assays, Echtzeitmessungen *in vitro* und sogar *in vivo* durchzuführen.^[3] Jedoch erschwert die Empfindlichkeit konventioneller DNA-Sonden gegenüber nucleolytischem Abbau deren Anwendung in lebenden Zellen. Im Folgenden soll daher eine Methode vorgestellt werden, bei der mit Hilfe von Peptidnucleinsäuren als enzymatisch stabilen Nucleinsäureanaloga DNA-Messungen in Echtzeit erfolgen können.^[4] Es wird gezeigt, dass die Kombination einer hochorthogonalen Schutzgruppenstrategie mit chemoselektiven Verknüpfungsreaktionen eine rasche und automatisierbare Festphasensynthese doppelt markierter PNA-Sonden ermöglicht, die zur homogenen DNA-Detektion geeignet sind.

Peptidnucleinsäuren binden mit bemerkenswert hoher Affinität und Selektivität an komplementäre Nucleinsäuren.^[5] Die resultierenden Duplexe ähneln strukturell den entsprechenden DNA·DNA- oder DNA·RNA-Duplexmolekülen. Gravierende Unterschiede bestehen jedoch zwischen der Struktur von DNA- und PNA-Einzelsträngen. Für einzelsträngige PNA-Oligomere ergibt die Analyse der temperaturabhängigen UV-Absorption eine sigmoidale Schmelzkurve.^[6] Die beobachtete Hypochromie kann Werte von bis zu 30 % erreichen – anscheinend ist die Basenstapelung in PNA-Einzelsträngen ein vorteilhafter Prozess.

Wir vermuteten daher, dass ein Fluoreszenzdonor und ein Fluoreszenzlöcher, die an das nicht hybridisierte PNA-Molekül **1** angebunden sind, mittels der inter- oder intramolekularen Assoziation in unmittelbarer Nähe lokalisiert werden könnten (Abbildung 1).^[7] Analog zu den auf DNA basierenden „Molecular Beacons“ **2**, die durch die wegbereitenden Arbeiten von Kramer und Tyagi eingeführt wurden, müsste die Fluoreszenz des Donorfarbstoffs durch

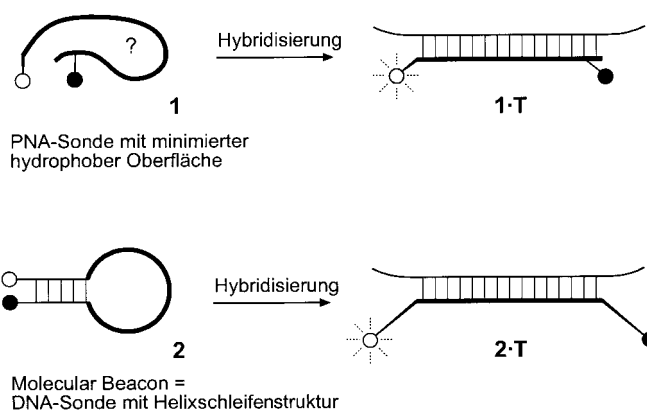


Abbildung 1. Unhybridisierte PNA bildet intra- oder intermolekulare Assoziate mit unbekannter Struktur. Die graphische Darstellung der doppelt markierten PNA-Sonde **1** soll illustrieren, dass geeignet angebrachte Fluoreszenzdonoren und Fluoreszenzlöcher in räumlicher Nähe orientiert werden können. In Analogie zu den Molecular Beacons **2**, die eine Helixschleifenstruktur bilden, wird die Fluoreszenz aufgrund von Stoßdesaktivierung und Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) gelöscht. Die Bindung der Sondensequenz an die Zielsequenz induziert eine Strukturänderung, durch die sich in den Duplexen **1·T** und **2·T** die Donor-Löcher-Distanz vergrößert. In der Folge beginnen die Sonden zu fluoreszieren.

Stoßdesaktivierung und den abstandsabhängigen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) gelöscht werden.^[8a] Die Hybridisierung mit komplementären Nucleinsäuren induziert eine strukturelle Reorganisation. In der doppelhelicalen Anordnung der Duplexe **1·T** und **2·T** ist der Abstand zwischen Donor und Löcher vergrößert und daher die Wahrscheinlichkeit für Löschprozesse verringert. Durch die Hybridisierung beginnen die doppelt markierten Sonden daher zu fluoreszieren.^[8b,c] Ein besonderes Merkmal dieses auf PNA basierenden Ansatzes ist, dass auf sekundärstrukturbildende, aber an der Bindung nicht beteiligte Sequenzen verzichtet werden kann.^[9, 10]

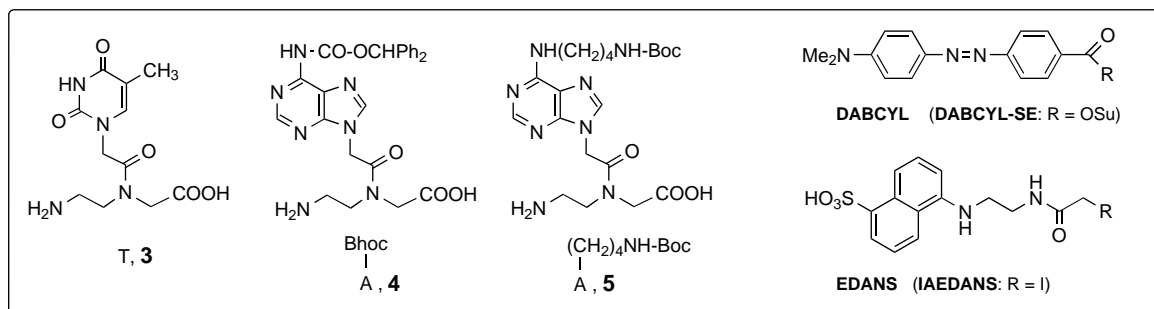
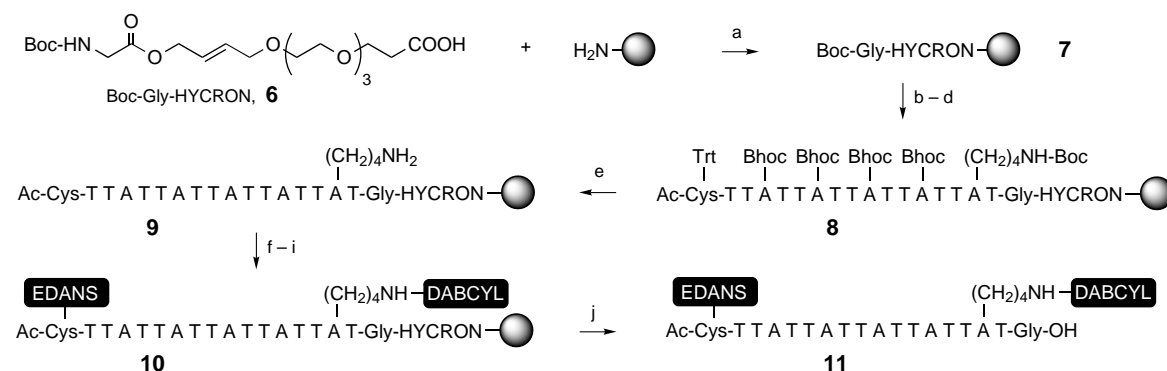
Für die Synthese der doppelt markierten PNA-Konjugate sollte eine flexible und automatisierbare Strategie zum Einsatz kommen, mit der alle Reaktionen inklusive der Fluoreszenzmarkierung an der festen Phase erfolgen können. Aufgrund der unbekannten Struktur einzelsträngiger PNA war unklar, wie eine durch die Hybridisierung induzierte Veränderung des Donor-Löcher-Abstands maximiert werden konnte. Einen hohen Grad an Flexibilität bietet eine Strategie, bei der terminale und interne Markierungen kombiniert werden. Ohne die Oligomerlänge zu ändern, kann durch Verschiebung der internen Konjugationsposition entlang der Sequenz die Donor-Löcher-Distanz variiert werden. Da der Zugang zum C-Terminus an der festen Phase gehindert sein kann, erschien es günstiger, die terminale Markierung am N-Terminus zu platzieren. Die zweite Markierung sollte dann an einer internen Konjugationsposition des *N*⁶-Aminoalkyl-modifizierten Adeninbausteins **5** angebunden werden.^[11] Als Linker wurde der HYCRON-Anker gewählt,^[12] denn sowohl säure- als auch basenlabile Schutzgruppen lassen sich abspalten, ohne die allylische Verankerung zu beeinträchtigen.^[13]

Die Festphasensynthese der PNA-Konjugate **11** und **12** ist in Schema 1 gezeigt. Es wurden *N*-Fmoc-geschützte Mono-

[*] Dr. O. Seitz

Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
Abteilung Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 11 (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2499
E-mail: oliver.seitz@mpi-dortmund.mpg.de
und
Institut für Organische Chemie
Universität Dortmund (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.



Schema 1. : a) 1. HBTU, HOBt, DIPEA, DMF; 2. Ac_2O , Pyr (1:10); b) 1. TFA; 2. DIPEA:DMF (1:9); c) iterative Zyklen von: 1. Piperidin/DMF (1:4); 2. Fmoc-B^{Bhoc}-OH, HATU, $i\text{Pr}_2\text{NEt}$, Pyr, DMF; 3. Ac_2O , Pyr, DMF; d) 1. Piperidin/DMF (1:4); 2. Ac_2O , Pyr, DMF; e) TFA:Ethandithiol: H_2O (95:2.5:2.5); f) 10 Äquiv. DABCYL-SE, DMF:Pyr:NMM (7:1:1); g) Piperidin/DMF (1:4); h) 10 Äquiv. DTT, DMF: H_2O :NMM (9:3:1); i) 10 Äquiv. IAEDANS, DMF: H_2O :NMM (9:3:1); j) $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, Morpholin, DMSO, DMF, 10 % (bezogen auf **8**). (DIPEA = *N*-Ethyl-*N,N*-diisopropylamin, DTT = Dithiothreitol, HATU = *N*-(Dimethylamino)-1*H*-1,2,3-Triazol[4,5-*b*]-pyridin-1-ylmethyl-*N*-methyl methanaminiumhexafluorophosphat, HBTU = *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol, NMM = *N*-Methylmorpholin).

mere eingesetzt (Fmoc = Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl). Für den permanenten Schutz der exocyclischen Aminogruppe des Adenins **4** und der Aminoalkylgruppe des *N*⁶-modifizierten Adeninbausteins **5** wurden die Benzhydryloxycarbonyl-(Bhoc)- und die *tert*-Butoxycarbonyl(Boc)-Gruppe verwendet.^[14] Nach Abschluss der iterativen Kupplungen der Synthesebausteine erfolgte die Festphasenkonjugation der Fluoreszenzmarker. Vom vollständig geschützten PNA-Harz **8** wurden die *S*-Trityl-, die *N*-Boc- und alle Bhoc-Schutzgruppen durch Behandlung mit einer TFA/Ethandithiol/Wasser-Mischung abgespalten (TFA = Trifluoressigsäure). Dabei verblieb das ungeschützte PNA-Oligomer an der festen Phase.

Zur Anbindung der DABCYL-Gruppe an die primäre Aminogruppe des *N*⁶-Aminoalkyl-modifizierten Adenins wurde das harzgebundene PNA-Oligomer **9** mit 4-(4'-Dimethylaminophenylazo)benzoesäurehydroxysuccinimidester (DABCYL-SE) umgesetzt. Thioester, die durch eine begleitende Cysteinacylierung eventuell gebildet wurden, konnten durch eine nachfolgende Behandlung mit DMF/Piperidin gespalten werden. Ungeschützte Thiolgruppen neigen jedoch zur Bildung von Disulfiden. Daher wurde eine Reduktion mit Dithiothreitol angeschlossen. Die freigesetzten Thiolgruppen wurden sodann zur Anbindung der EDANS-Gruppe genutzt und in einer selektiven Alkylierung mit 5-(2'-Iodacetamidoethyl)aminonaphthalinsulfonsäure (IAEDANS) umgesetzt.

Zur Ablösung wurde das harzgebundene PNA-Konjugat **10** einem Pd^0 -katalysierten Allyltransfer auf den Allylfänger Morpholin unterzogen. Die anschließende Reinigung durch

Umkehrphasen-HPLC lieferte das PNA-Konjugat **11** und sein Stellungsisomer **12** in hoher Reinheit. Die Identität der doppelt markierten PNA-Sonden **11** und **12** konnte durch UV/Vis-Spektroskopie, MALDI-TOF- und Nanospray-Massenanalyse bestätigt werden.^[15] Anzumerken ist, dass die Einführung der EDANS- und der DABCYL-Gruppe die Hydrophobie der PNA-Oligomere erhöhte und damit deren Reinigung vereinfachte.

Dass die Anbindung von Fluoreszenzmarkern die Stabilität der Duplexmoleküle beeinträchtigen kann, ist wohl bekannt.^[16] Das PNA-Rückgrat vermittelt jedoch eine beträchtliche Stabilisierung, die ausreichen könnte, die durch die Fluoreszenzmarker induzierte Störung zu kompensieren. Tatsächlich ergab die Analyse der temperaturabhängigen UV-Absorption Schmelztemperaturen T_M von 30.5 °C für den **11**·**13**-Duplex und 28.5 °C für den **12**·**13**-Duplex.^[17] Diese Schmelztemperaturen liegen in guter Übereinstimmung mit der von 30.4 °C des unmodifizierten DNA·DNA-Duplexes.

Beide Konjugate, die doppelt markierten PNA-Sonden **11** und **12**, wurden in Hybridisierungsexperimenten mit dem komplementären Oligonucleotid **13** und dem sequenzunrelierten Oligonucleotid **14** untersucht. Abbildung 2 lässt erkennen, dass die einzelsträngigen PNA-Konjugate tatsächlich eine gelöschte EDANS-Fluoreszenz aufweisen. Die Zugabe eines Überschusses des sequenzunrelierten Oligonucleotids **14** führte nur zu geringen Veränderungen des Fluoreszenzspektrums (Abbildung 2 und 3). Eine deutliche Änderung wurde jedoch beobachtet, als bei 25 °C ein vierfacher Über-

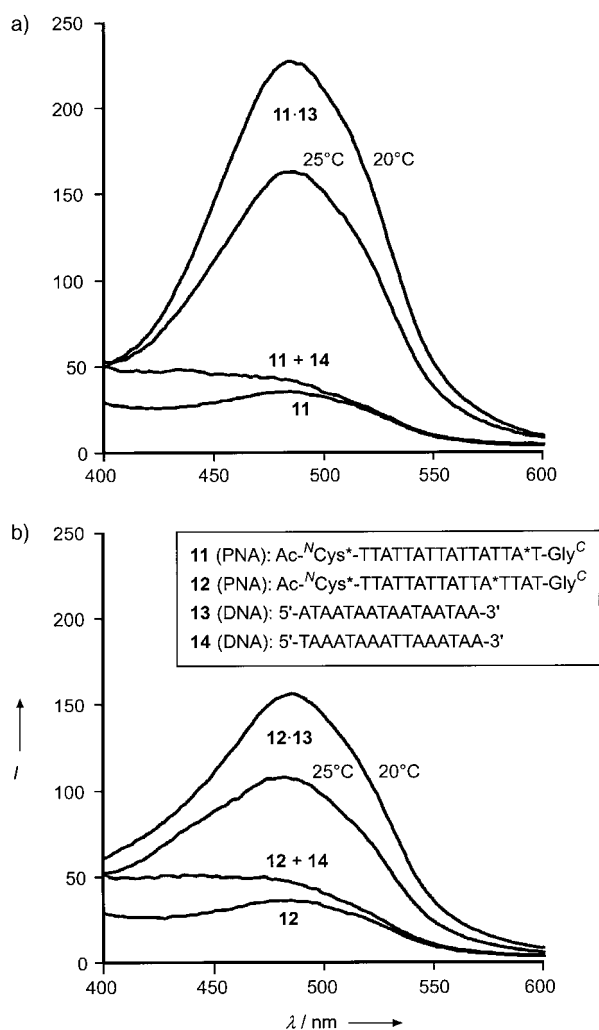


Abbildung 2. Normalisierte Fluoreszenzspektren (willkürliche Einheiten) von a) der PNA-Sonde **11** und b) der PNA-Sonde **12**. Der Kasten zeigt die verwendeten Oligomere (Cys* = Cys(EDANS), A* = A(N⁶(CH₂)₄NH-DABCYL)). Messbedingungen: 100 mM NaCl; 10 mM NaH₂PO₄; 0.1 mM EDTA; pH 7; 298 K; **11** und **12** 1 μM; **13** oder **14** 4 μM, falls zugesetzt; Anregung bei 335 nm. Die oberste Kurve wurde bei 1.5 μM Sondenkonzentration und 293 K gemessen.

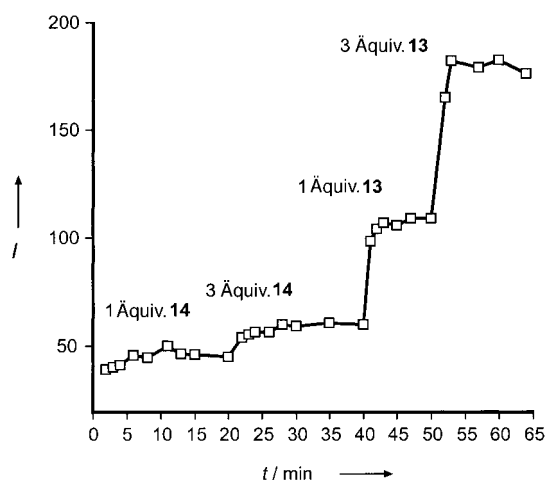


Abbildung 3. Fluoreszenzemission der Sonde **11** nach Zugabe von 1 Äquiv. **14** (0 min), 3 Äquiv. **14** (21 min), 1 Äquiv. **13** (40 min) und 3 Äquiv. **13** (51 min). Messbedingungen: 100 mM NaCl; 10 mM NaH₂PO₄; 0.1 mM EDTA; pH 7; 298 K; **11** 1 μM; Anregung bei 335 nm.

schuss des komplementären Oligonucleotids **13** zugesetzt wurde. Die Fluoreszenzemission der PNA-Sonden **11** und **12** verstärkte sich dabei um einen Faktor von 4.6 bzw. 3. Eine noch stärkere Intensivierung der Fluoreszenz um das 6.4- bzw. 4.3fache wurde verzeichnet, wenn die Hybridisierungen bei 20°C durchgeführt wurden. Eine spektrale Verschiebung, wie sie für eine hydrophobieinduzierte Fluoreszenzverstärkung typisch wäre, konnte nicht detektiert werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Fluoreszenzintensivierung durch einen Mechanismus erfolgt, wie er auch bei den identisch markierten Molecular Beacons beobachtet wird. Ähnlich wie bei diesen waren vorbereitende Denaturierungs- oder Renaturierungsprozesse nicht erforderlich, und die Sonden begannen fast unmittelbar nach Zugabe der Zieloligonucleotide zu fluoreszieren. Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, erreichte die Fluoreszenz der PNA-Sonde **11** bereits nach 5 Minuten ein Plateauwert.

Es konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Verwendung orthogonaler Schutzgruppen und chemoselektiver Konjugationsreaktionen eine rasche Festphasensynthese doppelt markierter PNA-Sonden ermöglicht. Die PNA-Konjugate zeigten im nichthybridisierten Zustand eine nur schwache Fluoreszenz. Die Hybridisierung mit einem komplementären Oligonucleotid vermittelte hingegen eine starke Fluoreszenzintensivierung, durch die eine homogene DNA-Detektion möglich sein sollte. Es muss betont werden, dass auf den Einbau von Armsequenzen, die die strukturelle Integrität der Sonde aufrecht erhalten, aber an der Bindung der Zielsequenz nicht beteiligt sind, verzichtet wurde. Die beobachtete Fluoreszenzlöschung könnte von der Sequenz und der Markierungsposition abhängen. In zukünftigen Studien wird daher untersucht werden, ob die Fluoreszenzverstärkung im Kontext beliebiger Sequenzen gilt. Anwendungen wie die Echtzeitverfolgung der PCR oder die RNA-Echtzeitdetektion in lebenden Zellen könnten von der hohen Biostabilität der PNA-Hybridisierungssonden profitieren.

Eingegangen am 4. April 2000 [Z14940]

- [1] DNA-Arrays als Dot-Blots hoher Parallelität sind ein aktuelles Beispiel für die Leistungsfähigkeit heterogener Assays. Eine Zusammenfassung neuerer Übersichtsartikel findet sich in: C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3039–3043; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2865–2869.
- [2] L. E. Morrison, *J. Fluoresc.* **1999**, *9*, 187–196.
- [3] a) P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7276–7280; b) D. L. Sokol, X. Zhang, P. Lu, A. M. Gewirtz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11538–11543; c) D. Whitcombe, J. Theaker, S. P. Guy, T. Brown, S. Little, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 804–807.
- [4] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497–1500.
- [5] a) E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2954–2983; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2796–2823; b) P. E. Nielsen, G. Haaime, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *73*–78; c) B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 5–23; d) P. E. Nielsen, *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 105–110.
- [6] K. L. Dueholm, P. E. Nielsen, *New J. Chem.* **1997**, *21*, 19–31.
- [7] O. Seitz, F. Bergmann, D. Heindl, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2340–2343; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2203–2206.
- [8] a) S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308; b) Strukturänderungen, die durch Wechselwirkungen mit Proteinen induziert wurden, können ebenfalls detektiert werden: J. J. Li, X.

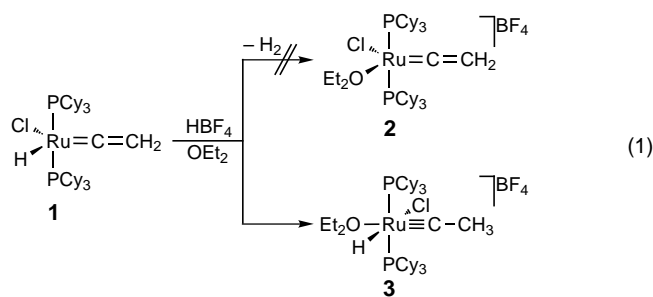
- Fang, S. M. Schuster, W. Tan, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1091–1094; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1052–1054; c) W. Tan, X. Fang, J. Li, X. Liu, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1107–1111.
- [9] Über strukturierte Molecular Beacons bestehend aus PNA-DNA-Hybriden wurde berichtet: E. Ortiz, G. Estrada, P. M. Lizardi, *Mol. Cell. Probes* **1998**, *12*, 219–226.
- [10] Ein ähnlicher Ansatz: J. M. Coull, B. D. Gildea, J. Hyldig-Nielsen (Boston Probes), WO-A 9922018 A2 19990506, **1999**.
- [11] Die Synthese des Fmoc/Boc-geschützten *N*⁶-Aminoalkyadenin-Bausteins **5** wird an anderer Stelle beschrieben werden.
- [12] O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 901–904; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 803–805.
- [13] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813–826.
- [14] Die Fmoc/Bhoc-geschützten Bausteine sind kommerziell erhältlich: http://www.appliedbiosystems.com/ds/pna/fmoc/fmoc_catalog.html.
- [15] MS (**11**, ESI, Positivionenmodus): 5153 (5154 theor.); UV/Vis (H₂O): λ_{max} = 265, 485 nm. Das PNA-Konjugat **12** zeigte identische Analysen.
- [16] Ein aktueller Übersichtsartikel über fluoreszierende Oligonucleotide: C. Wojzewski, K. Stolze, J. W. Engels, *Synlett* **1999**, 1667–1678.
- [17] Schmelzwerte wurden bei 1.25 μM Sondenkonzentration in einer gepufferten Lösung gemessen (100 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, pH 7).

Das erste Beispiel für ein Gleichgewicht zwischen einem Carben- und einem isomeren Carbin-Übergangsmetall-Komplex**

Pablo González-Herrero, Birgit Weberndörfer, Kerstin Ilg, Justin Wolf und Helmut Werner*

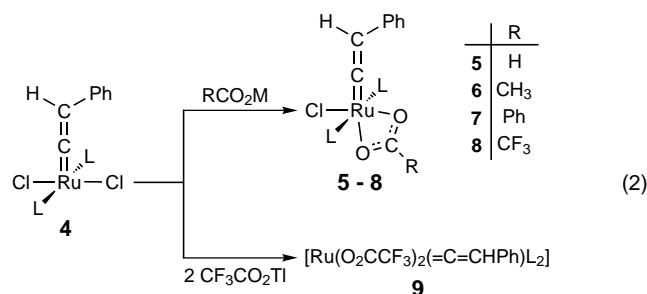
Professor Herbert W. Roesky zum 65. Geburtstag gewidmet

Bei Versuchen, einen kationischen, möglicherweise solvatisierten Vinylidenruthenium(II)-Komplex mit einer 14-Elektronen-Konfiguration am Metallzentrum zu erzeugen, hatten wir kürzlich festgestellt, dass die Reaktion der Ausgangsverbindung **1** mit HBF₄ in Dichlormethan/Diethylether nicht zu dem erwarteten Vinylidenrutheniumkomplex **2**, sondern zu dem Carbinrutheniumkomplex **3** führt [Gl. (1)].^[1] Obwohl **3** ein hochaktiver Katalysator für die Olefinmetathese, einschließlich der Kreuzmetathese von Cyclopenten mit Methylacrylat, ist (wobei sich mehrfach ungesättigte Ester CH₂(C₅H₈)_nCHCO₂Me mit *n* = 1–3 bilden), ist die Lebensdauer der kationischen Spezies mit einer Ru≡C-Bindung ziemlich begrenzt.^[1, 2] Wir setzten uns daher zum Ziel, stabilere Carbinruthenium(II)-Komplexe herzustellen und



entdeckten im Verlauf dieser Studien das erste Beispiel für ein Gleichgewicht zwischen einem kationischen Carben- und einem isomeren kationischen Carbinmetallkomplex.

Der Dichloro(vinyliden)ruthenium(II)-Komplex **4**^[3] reagiert mit einem Überschuss an HCO₂Na oder CH₃CO₂Na in THF oder Aceton zu den Komplexen **5** bzw. **6** in 77 % bzw. 82 % Ausbeute an isoliertem Produkt [Gl. (2); L = *PiPr*₃]. Der



entsprechende Benzoato(chloro)komplex **7** wird aus **4** und PhCO₂H (Verhältnis 1:1) in Gegenwart von NEt₃ erhalten. Die Reaktion von **4** mit CF₃CO₂Na oder CF₃CO₂K in THF oder Aceton führt dagegen, selbst nach längerem Rühren, zu einer Mischung aus **4**, **8** (als Hauptkomponenten) und der disubstituierten Verbindung **9** (als Nebenprodukt). Bei Zugabe eines Äquivalents CF₃CO₂TI zu einer Lösung von **4** in THF entsteht vorwiegend **8** (ca. 84 %) zusammen mit geringen Mengen an **4** und **9** (jeweils ca. 8 %), die weder durch fraktionierende Kristallisation noch durch Säulenchromatographie abtrennbar sind. In analytisch reiner Form und hoher Ausbeute konnte die Bis(carboxylato)-Verbindung **9** aus **4** und CF₃CO₂TI (Verhältnis 1:2.5) in Aceton hergestellt werden. Die ¹³C-NMR-Spektren von **5–9** zeigen für das α -Kohlenstoffatom des Vinylidenliganden aufgrund einer ¹³C-³¹P-Kopplung jeweils ein Triplett bei δ ≈ 351–353 (für **5–8**) und δ = 362.1 (für **9**); die chemische Verschiebung ist typisch für einkernige Vinylidenruthenium(II)-Komplexe.^[3, 4]

Die Protonierung von **5–7** mit [H(OEt₂)₂][B(Ar_f)₄] (Ar_f = 3,5-C₆H₃(CF₃)₂)^[5] in Dichlormethan ergibt die kationischen Komplexe **10–12** in nahezu quantitativer Ausbeute [Gl. (3); L = *PiPr*₃]. Während die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von **10–12** (typische Daten siehe Hintergrundinformationen) keine eindeutige Entscheidung zulassen, ob ein Carben- oder ein Carbinruthenium-Derivat vorliegt, bestätigt die Einkristallstrukturanalyse von **10** die Bildung eines Metallcarbenkom-

[*] Prof. Dr. H. Werner, Dr. P. González-Herrero, Dipl.-Chem. B. Weberndörfer, Dipl.-Chem. K. Ilg, Dr. J. Wolf
Institut für Anorganische Chemie der Universität
Am Hubland, 97074 Würzburg (Deutschland)
Fax: (+49) 931-888-4605
E-mail: helmut.werner@mail.uni-wuerzburg.de

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Europäische Kommission im Rahmen des Programms „Training and Mobility of Researchers“ (Marie Curie Fellowship an P.G.-H., Förder-Nr. ERBFMBICT972450), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 347) und den Fonds der Chemischen Industrie (Doktorandenstipendium für K.I.).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.