

- entstandene Mischung filtriert und das gelbe Filtrat wird zum Harz-gebundenen Azid gegeben. Die Mischung wird unter gelegentlichem Schütteln 20 min bei Raumtemperatur belassen. Das Harz wird mit CH_2Cl_2 ($4\times$), DMF ($4\times$) und erneut mit CH_2Cl_2 ($4\times$) gewaschen.
- [9] a) H. Schmitt, G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 321–344; b) T. M. Balasubramanian, N. C. E. Kendrick, M. Taylor, G. R. Marshall, J. E. Hall, I. Vodyanoy, F. Reusser, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 6127–6132; c) H. Kunz, H. Waldmann, C. Unverzagt, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1985**, 26, 493–497.
- [10] R. Caputo, E. Cassano, L. Longobardo, G. Palumbo, *Tetrahedron* **1995**, 51, 12337–12350.
- [11] G. A. Reynolds, F. D. Saeva, J. J. Doney, C. H. Chen, *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 4843–4848.
- [12] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 457–461; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 441–445.
- [13] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriou, Y. Wenqing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 3943–3946.
- [14] H. Brückner, W. A. König, M. Greiner, G. Jung, *Angew. Chem.* **1979**, 91, 508–509; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, 18, 476–477.
- [15] Siehe Hintergrundinformationen.
- [16] J. G. Wise, T. M. Duncan, L. R. Latchney, D. N. Cox, A. E. Senior, *Biochem. J.* **1983**, 215, 343–350.

Reporter-Ribozyme zur Echtzeit-Analyse domänenspezifischer Interaktionen in Biomolekülen: reverse Transkriptase von HIV-1 und der Primer-Templatkomplex**

Jörg S. Hartig und Michael Famulok*

In der „Postgenom-Ära“, der Zeit nach der Aufklärung der verschiedenen Genomsequenzen, gilt es, die Funktion tausender neuer Proteine zu erforschen, ihre Einbindung in regulatorische Netzwerke zu untersuchen und sie auf ihre Eignung als pharmazeutische Zielmoleküle zu überprüfen. Dazu bedarf es neuer Methoden, die eine schnelle und verlässliche Identifizierung molekularer Interaktionen komplexer biologischer Systeme im Hochdurchsatzformat erlauben. Informationen über Interaktionspartner eines Biomoleküls, die Identifizierung von Interaktionsdomänen oder die einfache Quantifizierung von Bindungsstärken bilden die Basis für die Aufklärung der biologischen Funktion und die Identifizierung neuer Proteininhibitoren, Modulatoren und Leitstrukturen für die Medikamentenentwicklung.^[1] Zwar stehen eine Reihe sehr leistungsfähiger Methoden für die Messung und Quantifizierung molekularer Wechselwirkun-

gen zur Verfügung,^[2–7] jedoch sind diese nicht immer breit einsetzbar oder inkompatibel mit Hochdurchsatz-Screening-Formaten und Echtzeit-Analysen. Die Entwicklung neuer Methoden, die möglichst unabhängig von den zu untersuchenden Target-Molekülen und für die genannten Zwecke breit einsetzbar sind, ist daher von großer Bedeutung.

Wir verwenden seit einiger Zeit Ribozyme für die Entwicklung funktionaler Assays, mit denen Wechselwirkungen zwischen biologisch relevanten Molekülen in Echtzeit analysiert werden können. So haben wir Systeme entwickelt, die eine schnelle und verlässliche Analyse der katalytischen Aktivität des Hammerhead-Ribozyms (HHR) erlauben, indem Substratoligonucleotide eingesetzt werden, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind.^[8] Die räumliche Nähe der beiden Farbstoffe im ungeschnittenen Zustand des Substrats führt zu einer Fluoreszenzlöschung des Donorfluorophors durch Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET). Die Spaltungsaktivität des Ribozyms kann dann durch einen zeitlichen Anstieg der Fluoreszenz in Echtzeit verfolgt werden. Mit Hilfe dieser Reporter-Ribozyme haben wir neue Inhibitoren des Hammerhead-Ribozyms^[9] oder des Rev-Proteins aus HIV-1^[10] aus Bibliotheken organischer Moleküle identifiziert, welche auch unter In-vivo-Bedingungen die biologische Aktivität ihres jeweiligen Zielmoleküls spezifisch inhibieren konnten.

In dieser Arbeit berichten wir über das rationale Design eines Reporter-Ribozyms, dessen Aktivität durch die reverse Transkriptase (RT) des humanen Immundefizienz Virus Typ I (HIV-1-RT) spezifisch reguliert werden kann. Wir zeigen, dass das HIV-1-RT-abhängige Reporter-Ribozym nicht nur selektiv die Anwesenheit von HIV-1-RT in Echtzeit anzeigt, sondern darüber hinaus auch die domänenspezifische Bindung des Proteins an andere molekulare HIV-1-RT-Interaktoren, wie etwa den Primer-Templatkomplex.

Für die Herstellung des Reporter-Ribozyms orientierten wir uns an ähnlichen, mit kleinen organischen Molekülen regulierbaren Systemen, bei denen Helix II des HHR, deren Bildung für die Spaltungsaktivität essentiell ist, durch eine Aptamersequenz substituiert worden war.^[11–14] Wir verwendeten ein Aptamer, das von Tuerk et al. aus einer kombinatorischen RNA-Bibliothek isoliert und charakterisiert worden war und die HIV-1-RT mit einer Affinität von 25 pM bindet.^[15] Die Kristallstruktur des RNA-Protein-Komplexes zeigt, dass das anti-HIV-1-RT-Aptamer im Komplex mit HIV-1-RT eine Pseudoknoten-Struktur bildet, bei der die 5'- und 3'-Enden der Sequenz räumlich voneinander entfernt sind.^[16]

Wir wählten ganz bewusst ein Aptamer mit Pseudoknoten-Motiv, denn diese Strukturelemente werden auch in der Natur in verschiedenster Weise als regulatorische Elemente genutzt. So induziert in einigen viralen mRNA-Sequenzen die Bildung eines Pseudoknotens eine Verschiebung des Leserahmens.^[17] In manchen eukaryontischen Transkripten führt die Faltung eines Pseudoknotens in der 5'-nichttranslatierten Region zur Aktivierung eines regulatorischen Proteins, welches dann lokal die Translation des entsprechenden Gens kontrolliert.^[18]

Aufgrund dieser bekannten regulatorischen Eigenschaften von Pseudoknoten-Motiven und ihrer besonderen Struktureigenschaften erschien uns das anti-HIV-1-RT-Aptamer als regulatorisches Element für ein Hammerhead-Ribozym be-

[*] Prof. Dr. M. Famulok, Dipl.-Chem. J. S. Hartig
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49)228-735-388
E-mail: m.famulok@uni-bonn.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Wir danken Dr. T. Restle (MPI Dortmund) für die Überlassung der reversen Transkriptase von HIV-1 und HIV-2 und Dr. Andreas Marx für kritische Kommentare zum Manuskript.

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

sonders gut geeignet. Das Aptamer wurde wie in Abbildung 1a gezeigt in Helix II des HHR so eingefügt, dass ein Fusionskonstrukt FK-1 erhalten wurde, in dem die Ribozym- und die Pseudoknoten-Faltungen miteinander konkurrieren. Eine gleichzeitige Bildung beider Domänen ist bei diesem Design ausgeschlossen, da in Abwesenheit von HIV-1-RT die eingefügte Aptamer-Sequenz als Haarnadel-Schleife vorliegt

(Abbildung 1a, links). Wie in Abbildung 1b gezeigt, wird in Abwesenheit von HIV-1-RT ein aktives Reporter-Ribozym-FK-1 erhalten, weil diese Struktur für die Bildung der Helix II in FK-1 sorgt. Die ungepaarte Schleife wurde durch Spaltungsreaktionen mit Ribonucleasen nachgewiesen, welche spezifisch einzelsträngige RNA spalten (Abbildung 2). In Anwesenheit von HIV-1-RT wird die katalytische Aktivität

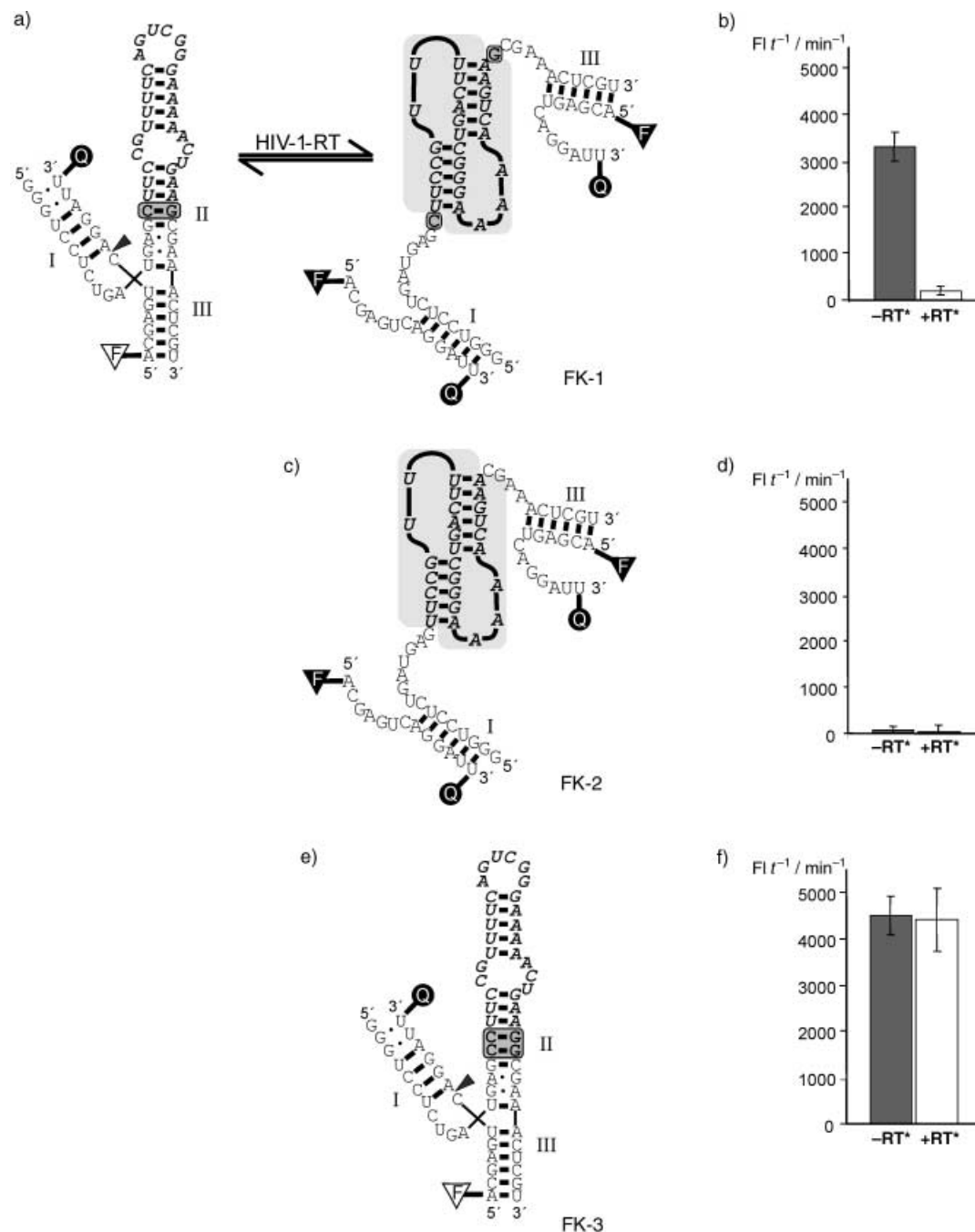


Abbildung 1. Strukturen und Spaltungsaktivitäten von FK-1, FK-2 und FK-3. Die in das Hammerhead-Ribozym eingefügten Aptamersequenzen sind fett und kursiv gedruckt, gezeigt sind Komplexe mit einem oder zwei FRET-markierten Substraten (5'-Fluorophor: F, 3'-Quencher: Q). a) Die Fusion des HIV-1-RT-Aptamers mit einem Hammerhead-Ribozym bildet die korrekte Ribozym-Faltung mit den Helices I, II und III (linke Seite). Pfeilspitze im Substrat: Spaltstelle. Bei Zugabe von HIV-1-RT wird die Bildung eines Pseudoknotens (hellgrau unterlegt) induziert, welcher die Bildung von Helix II verhindert (rechte Seite); b) Spaltungsaktivität von FK-1 in Abwesenheit und in Gegenwart von 200 nM HIV-1-RT (RT*). Gezeigt ist die Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung eines FRET-Substrates in den ersten 5 Minuten, gemessen in Fluoreszenz pro Zeiteinheit ($FI\ t^{-1} / \min^{-1}$).^[8–10] c) Struktur von FK-2 (FK-2 wurde durch Deletion des in FK-1 grau unterlegten GC-Basenpaares erhalten); d) Spaltungsaktivität von FK-2 in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von 200 nM HIV-1-RT (RT*); e) Struktur von FK-3 (FK-3 wurde durch Hinzufügen eines weiteren grau unterlegten GC-Basenpaares erhalten); f) Spaltungsaktivität von FK-3 in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von 200 nM HIV-1-RT (RT*).

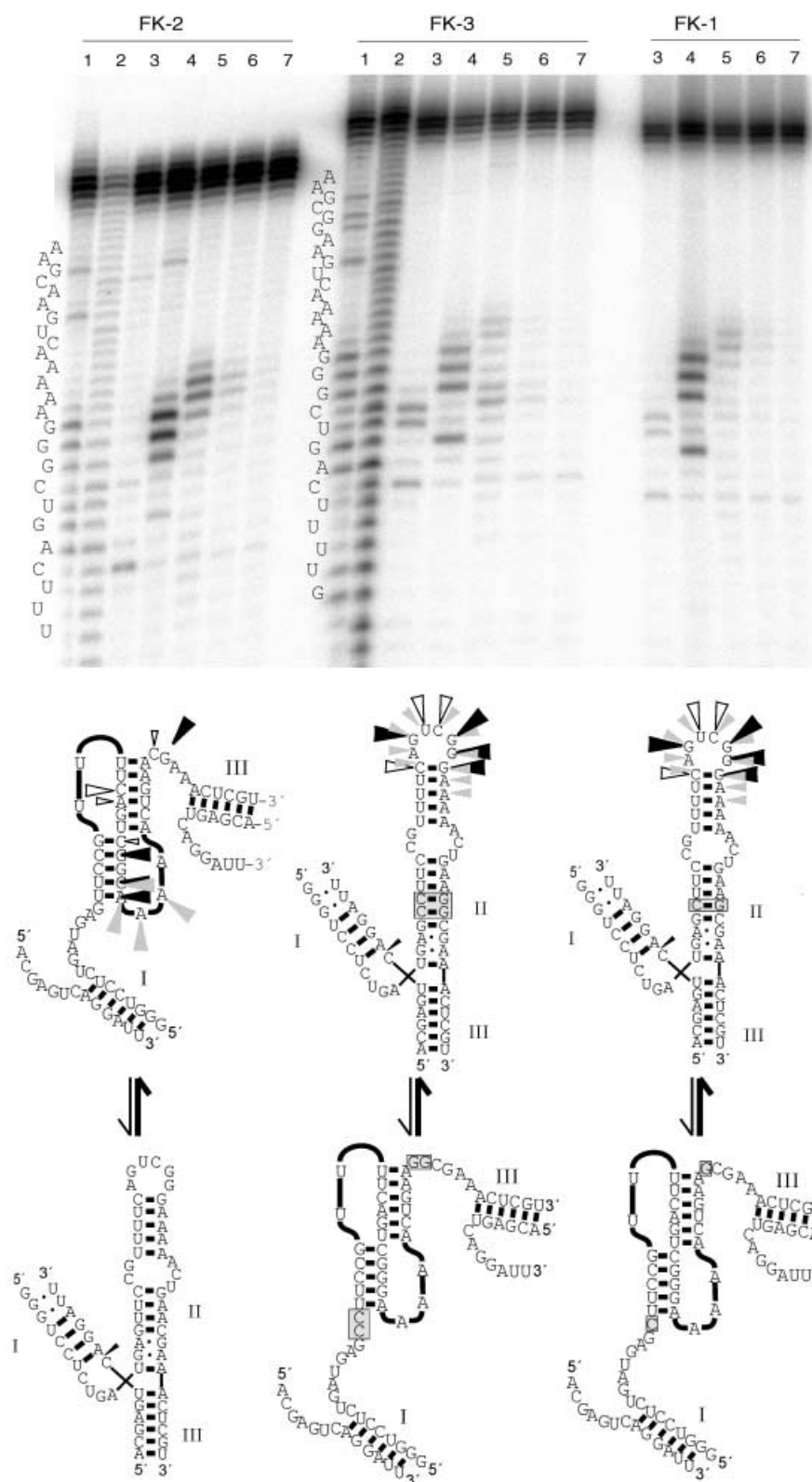


Abbildung 2. Nuclease-Verdau von FK-1, FK-2 und FK-3: Spuren 1: RNase-T1-Leiter unter denaturierenden Bedingungen, 2: OH-Leiter, 3: RNase A, 4: RNase T1, 5: S1 Nuclease, 6: S1 Nuclease 1/10-Verdünnung, 7: S1 Nuclease 1/100-Verdünnung. RNase A spaltet einzelsträngige RNA bei C und U (weiße Pfeile), RNase-T1 einzelsträngig bei G (schwarze Pfeile) und Nuclease S1 bei einzelsträngigen Nucleosiden (graue Pfeile). Die Größe der Pfeile entspricht der Intensität der Spaltung. Die Spaltstellen der Nucleasen stimmen mit den beobachteten Aktivitäten überein: FK-2 bildet keine Hammerhead-Struktur aus, wie der starke Verdau durch Nuclease S1 an der rechten unteren Schlaufe des Knotens zeigt. FK-3 und FK-1 zeigen nur Verdau an der Schlaufe der Haarnadelstruktur von Helix II der Ribozym-Faltung.

von FK-1 inhibiert (Abbildung 1 b), da das Protein die Faltung des Pseudoknotens induziert, was eine Auflösung von Helix II und damit auch der Katalyse der Spaltungsreaktion nach sich zieht.

Um den Einfluss der Stabilität von Helix II auf die Fähigkeit zur Strukturänderung von FK-1 genauer zu charakterisieren und rational zu untermauern, wurden zwei Varianten von FK-1 abgeleitet, die sich durch gezielte Stärkung bzw. Schwächung von Helix II, der Verknüpfungsstelle zwischen Aptamer und Ribozym, unterscheiden. Die Deletion des in Abbildung 1 a grau unterlegten GC-Basenpaares führt zu einem Konstrukt, FK-2, mit einer destabilisierten Helix II (Abbildung 1 c). Die völlige Abwesenheit der katalytischen Aktivität in FK-2 (Abbildung 1 d) deutet darauf hin, dass das Fehlen des stabilisierenden GC-Basenpaares die Bildung der katalytisch aktiven Struktur nicht mehr zulässt und sich nur noch die Pseudoknoten-Struktur bildet. Tatsächlich ergeben die in Abbildung 2 gezeigten Nuclease-Spaltungsreaktionen in Übereinstimmung mit den kinetischen Daten in Abbildung 1 d ein Spaltungsmuster für FK-2, welches das ausschließliche Vorliegen des Pseudoknotens unterstützt.

Um diese Hypothese weiter zu untermauern, stellten wir eine dritte Version des Reporter-Ribozyms her, bei der nur noch die Bildung der katalytisch aktiven Version, nicht aber die Bildung des Pseudoknotens möglich ist. Ausgehend von FK-1 wurde daher ein zusätzliches GC-Basenpaar eingefügt, welches in FK-3 zu einer Stabilisierung von Helix II führt (Abbildung 1 e). Abbildung 1 f zeigt wie erwartet, dass FK-3 katalytisch aktiv ist, wobei jedoch die Geschwindigkeit der Spaltung auch bei Anwesenheit von HIV-1-RT unverändert bleibt, da das Protein die Faltung des Pseudoknotens aufgrund der erhöhten Stabilität von Helix II nicht mehr induzieren kann. Tatsächlich zeigt FK-3 bei Nuclease-Verdau ein sehr ähnliches Spaltungsmuster wie FK-1 in seiner aktiven Form (Abbildung 2).

Das Fusionskonstrukt FK-1 stellt somit ein Reporter-Ribozym dar, das durch HIV-1-RT reguliert werden

kann. FK-1 reagiert extrem sensitiv auf die Anwesenheit von HIV-1-RT; eine halbmaximale Inhibierung des Aptazym wird bereits bei einer Proteinkonzentration von 10.4 nM erreicht (Abbildung 3a). Die hohe Sensitivität reflektiert die außerordentlich hohe Affinität des Aptamer-HIV-1-RT-

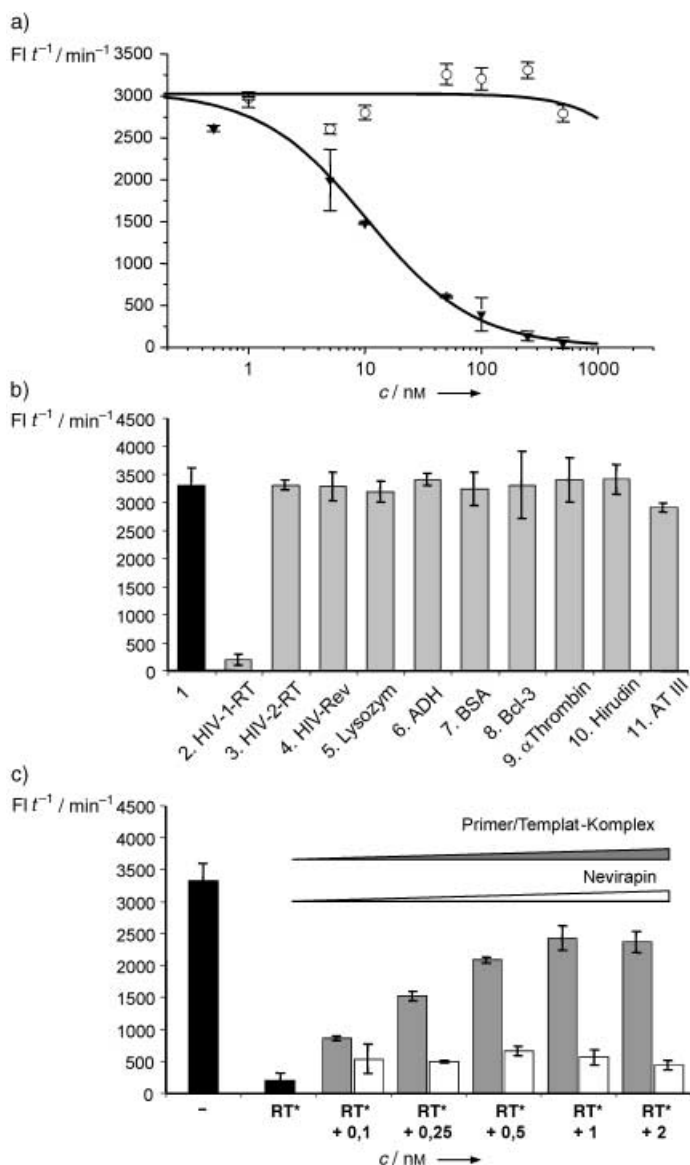


Abbildung 3. Konzentrationsabhängigkeit und Spezifität der Inhibierung von FK-1. a) Konzentrationsabhängigkeit der Inhibierung von FK-1 durch HIV RT (ausgefüllte Dreiecke: HIV-1-RT, offene Kreise: HIV-2-RT), halbmaximale Inhibierung bei $K_I = 10.4 \text{ nM}$, b) Spezifität der Inhibierung von FK-1; aus einer Kollektion zufällig ausgewählter Kontrollproteine konnte nur HIV-1-RT das Reporter-Ribozym inhibieren; alle Proteine wurden bei einer Konzentration von 200 nM eingesetzt: 1: ohne Protein, 2: HIV-1 RT, 3: HIV-2 RT, 4: HIV-1-Rev, 5: Lysozym aus Hühnereiweiß, 6: ADH, Alkoholdehydrogenase, 7: BSA, Rinderserum Albumin, 8: Bcl-3, ein Mitglied der I κ B-Proteinfamilie, 9: Hirudin, 10: humanes α -Thrombin, 11: AT III, Antithrombin III; c) Verdrängung des Aptazym FK-1 von der HIV-1-RT durch einen DNA-Primer/Templat-Komplex. Schwarze Balken: Spaltungsaktivität von FK-1 alleine (-) und bei Anwesenheit von 200 nM HIV-1-RT (RT*). Graue Balken: Reaktivierung der FK-1-katalysierten Spaltungsreaktion durch steigende Mengen des DNA-Primer/Templat-Komplexes in Anwesenheit von 200 nM HIV-1-RT (RT*). Weiße Balken: Steigende Konzentrationen von Nevirapin, einem NNRTI (Nicht-Nucleosid-Reverse-Transkriptase-Inhibitor), der nicht mit der Bindungsstelle des Aptazym konkurriert, können das Reporter-Ribozym nicht reaktivieren.

Komplexes von 25 pM.^[15] Gegenüber den wenigen in der Literatur beschriebenen Protein-regulierten Reporter-Ribozymen bedeutet dies eine Erhöhung der Empfindlichkeit solcher Systeme um zwei Größenordnungen. Eine durch SELEX evolvierte Ligase benötigt für einen halbmaximalen Effekt 1.5 μM Lysozym.^[19] Für ein schaltbares Tetrahymena-group-I-Intron-Ribozym sind mikromolare Konzentrationen von Fusionen aus HIV-Rev und Bakteriophage- λ N-Proteinen erforderlich.^[20]

Um die Spezifität des Reporter-Ribozym zu untersuchen, führten wir Spaltungsreaktionen in Gegenwart verschiedener Nicht-cognate-Proteine durch. Wie Abbildung 3b zeigt, ist aus einer Kollektion von 10 verschiedenen Proteinen nur HIV-1-RT imstande, die Aktivität signifikant zu inhibieren (Abbildung 3a und b). Selbst mit der stark homologen reversen Transkriptase von HIV-2 ist kein Effekt zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, dass das HIV-1-RT-abhängige Ribozym ein äußerst spezifischer Reporter für HIV-1-RT ist. Die für das freie Aptamer beschriebene Diskriminierung bleibt auch im Ribozym-Kontext erhalten, was zeigt, dass der gefaltete Pseudoknoten seine funktionalen Eigenschaften beibehält, ohne dass der Rest des Konstrukts einen störenden Einfluss ausübt.

Um zu untersuchen, ob die Inhibierung des Aptazym FK-1 reversibel ist, nutzten wir die Tatsache, dass das Aptamer an die Primer/Templat-Bindungsstelle der HIV-1-RT bindet.^[16] Demzufolge sollte die Spaltungsreaktion in Gegenwart eines DNA-Primer/Templat-Komplexes^[21] zur kompetitiven Verdrängung der RT vom Pseudoknoten-Motiv führen, was eine Reaktivierung der Spaltung zur Konsequenz hätte. Abbildung 3c zeigt, dass dies auch tatsächlich beobachtet wird. Dieser Effekt ist bei Zugabe von freiem Aptamer anstelle des DNA-Primer/Templat-Komplexes sogar noch deutlicher (Hintergrundinformationen, Abbildung 1). Allerdings nimmt die Ribozymaktivität aufgrund der Hybridisierung des freien Aptamers mit dem Reporter-Ribozym bei hohen Konzentrationen wieder ab (Hintergrundinformationen, Abbildung 1).

Im Hinblick auf die Domänenspezifität des Reporter-Ribozym ist insbesondere auch die Frage interessant, ob der mit dem freien Aptamer bzw. dem DNA Primer/Templat-Komplex beobachtete Kompetitionseffekt spezifisch für Binder der Primer/Templat-Erkennungsstelle ist. Dies untersuchten wir, indem wir anstelle des Primer/Templatkomplexes Nevirapin verwendeten, einen Inhibitor der RT, welcher nicht an der Primer/Templat-Bindungsstelle, sondern an eine Region nahe des aktiven Zentrums bindet.^[22] Abbildung 3c zeigt, dass auch bei höheren Konzentrationen von Nevirapin keine Reaktivierung des Ribozym zu beobachten ist. Dieses Ergebnis ist besonders wichtig, weil es zeigt, dass Reporter-Ribozyme als Sonden in Hochdurchsatz-Screening-Formaten zur domänenspezifischen Identifizierung bindender Moleküle verwendet werden können; im vorliegenden Beispiel von Molekülen, die an die Primer/Templat-Bindungsstelle, nicht jedoch an das katalytische Zentrum binden.

Das vorgestellte Fusionskonstrukt FK-1 ist unseres Wissens das erste Beispiel eines artifiziellen, konstruierten Schalters auf Basis einer Pseudoknoten-Struktur. FK-1 zeichnet sich durch sehr hohe Sensitivität und Spezifität aus. Das Konzept der Insertion von Pseudoknoten-Motiven in funktionale

RNA-Sequenzen stellt somit ein neues und prinzipiell auch für natürliche Pseudoknoten/Proteinkomplexe anwendbares Prinzip zur Herstellung von RNA-Schaltern dar.

Experimentelles

Synthese von FK-1, 2 und 3: Die korrespondierenden DNA-Sequenzen der Fusionskonstrukte wurden inklusive eines 5'-T7-RNA-Polymerase-Promotors durch Standard-Phosphoramidit-Festphasensynthese synthetisiert, durch PCR amplifiziert, mittels T7-RNA-Polymerase transkribiert und gereinigt wie in Lit [23] beschrieben.

Ribozymreaktionen: Die Reaktionen wurden in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,9, 25 mM NaCl durchgeführt. Die Ansätze enthielten 10 nM der RNA-Fusionskonstrukte FK-1, 2 oder 3, 500 nM Fluoreszenz-markiertes Ribozym-Substrat^[8–10] und optional verschiedene Proteinkonzentrationen in einem Endvolumen von 50 µL. Nach Inkubation für 15 min bei 37°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von Magnesiumchlorid zu einer Endkonzentration von 8 mM gestartet. Die Steigung der Fluoreszenz in den ersten 5 min wurde als Maß für die katalytische Aktivität herangezogen.^[8–10] Steigungen aus Kontrollexperimenten ohne Ribozym wurden automatisch subtrahiert, um Effekte wie das Ausbleichen der Farbstoffe zu minimieren.

Nucleasereaktionen: Der Verdau wurde bei 37°C in Anwesenheit von 200 µM eines nicht spaltbaren Ribozym-Substrats (2'-Desoxycytosin an der reaktiven Stelle) durchgeführt. Die Reaktionen enthielten 8 µM Fusionskonstrukt, Spuren von 5'-³²P-markiertem Konstrukt in einem 10 mM Tris-Puffer, pH 7,5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂ im Falle der RNase A und RNase T1. Die Nuclease-S1-Reaktionen wurden im vom Hersteller (Promega) bereitgestellten Puffer durchgeführt. Nach Ethanol-Präzipitation und 10-%iger PAGE-Auftrennung wurden die Spaltfragmente durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Eingegangen am 5. Juni 2002 [Z19472]

- [1] M. F. Engels, P. Venkatarangan, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2001**, 4, 275.
- [2] S. Fields, R. Sternglanz, *Trends Genet.* **1994**, 10, 286.
- [3] J. Huang, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 13396.
- [4] M. Vidal, H. Endoh, *Trends Biotechnol.* **1999**, 17, 374.
- [5] M. Mann, R. C. Hendrickson, A. Pandey, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, 70, 437.
- [6] C. L. Tucker, S. Fields, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 1042.
- [7] J. Rappsilber, M. Mann, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, 27, 74.
- [8] A. Jenne, W. Gmelin, N. Raffler, M. Famulok, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1383; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1300.
- [9] A. Jenne, J. S. Hartig, N. Piganeau, A. Tauer, D. A. Samarsky, M. R. Green, J. Davies, M. Famulok, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 56.
- [10] J. S. Hartig, S. H. Najafi-Shoushtari, I. Grüne, A. Yan, A. D. Ellington, M. Famulok, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 717.
- [11] G. A. Soukup, R. R. Breaker, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, 10, 318.
- [12] G. A. Soukup, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 3584.
- [13] N. Piganeau, A. Jenne, V. Thuiller, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 4538; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4369.
- [14] M. Koizumi, G. A. Soukup, J. N. Kerr, R. R. Breaker, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 1062.
- [15] C. Tuerk, S. MacDougall, L. Gold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 6988; O. Kensch, B. A. Connolly, H. J. Steinhoff, A. McGregor, R. S. Goody, T. Restle, *J. Biol. Chem.* **2002**, 275, 18271.
- [16] J. Jaeger, T. Restle, T. A. Steitz, *EMBO J.* **1998**, 17, 4535.
- [17] D. P. Giedroc, C. A. Theimer, P. L. Nixon, *J. Mol. Biol.* **2000**, 298, 167.
- [18] Y. Ben-Asouli, Y. Banai, Y. Pel-Or, A. Shir, R. Kaempfer, *Cell* **2002**, 108, 221.
- [19] M. P. Robertson, A. D. Ellington, *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 650.
- [20] S. Atsumi, Y. Ikawa, H. Shiraishi, T. Inoue, *EMBO J.* **2001**, 20, 5453.
- [21] D. Summerer, A. Marx, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3806; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3693.
- [22] J. Ren, R. Esnouf, E. Garman, D. Somers, C. Ross, I. Kirby, J. Keeling, G. Darby, Y. Jones, D. Stuart, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 293.
- [23] M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1698.

Reaktionsverhalten von Chalkogenostannaten: Ungewöhnliche Synthese und Struktur einer Verbindung mit einem ternären Clusteranion [Co₄(µ₄-Se)(SnSe₄)₄]^{10–**}

Christian Zimmermann, Maike Melullis und Stefanie Dehnen*

Professor Dieter Fenske zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Stabilisierung binärer Aggregate von Hauptgruppenelementen [E_xE_y]^{q–} in der Koordinationssphäre von Übergangsmetallionen Mⁿ⁺ – und damit der Aufbau von Strukturen mit ternären Schweratom-Grundgerüsten – wird seit einigen Jahren verstärkt untersucht (E' und E = Elemente der Gruppe 13–15 bzw. 16).^[1–16] Neben dem Reiz struktureller Vielfalt liegt hierbei das Augenmerk auf der Herstellung ternärer M/E'/E-Systeme wie Rb₃[AgGe₄Se₁₀]·2H₂O^[10] oder K₂[MnSnS₄]^[11] in denen polymere Anionen-Netzwerke in Form „offener Festkörperstrukturen“ auftreten. Solche Verbindungen vereinen zeolithähnliche und halbleiterartige Eigenschaften. Verwendet man zum Aufbau der E'/E-Untereinheiten nicht getrennte Ausgangsstoffe, sondern Salze binärer Anionen oder binäre Phasen, so lassen sich zudem Reaktionsverhalten und Beständigkeit dieser Hauptgruppenelementsysteme in Gegenwart von Übergangsmetallverbindungen untersuchen. Mit Ausnahme einiger Tensid-gestützter Solvothermalsynthesen von mesoporösen Festkörperphasen wie (C₁₆H₃₃NC₅H₅)_x[Pt_ySn₄Se₁₀] (x = 1.9–2.8; y = 0.9–1.6)^[12] bezogen sich jedoch alle bisherigen Veröffentlichungen auf binäre Reaktanden aus Elementen der Gruppen 15 und 16,^[1,13–16] wie die Synthese von [PPh₄]₂[Mn(CO)₃(As₃Se₃)₅] mit [As₄Se₄]^[13b]

Wir versuchen derzeit, Koordinationsverbindungen durch Reaktionen von binären Anionen der Gruppen 14 und 16 herzustellen. Unter den üblichen Synthesebedingungen – d. h. bei Umsetzungen mit metallorganisch substituierten Übergangsmetallkomplexen in aprotischen Lösungsmitteln – war es jedoch bisher nicht möglich, die Sn-E-Bindungen zu erhalten. Die Chalkogenostannat-Anionen wirkten stets als Oxidationsmittel und E^{2–}-Donoren.^[17,18]

Der Übergang zu protischen Lösungsmitteln und einem anderen Übergangsmetallkomplex-Typ führte nun zur Bildung einer Verbindung mit unzersetzten binären Anionen in der Koordinationssphäre der Übergangsmetallionen. In Schema 1 ist die Synthese von **1** und **2**^[19,20] skizziert, die durch Umsetzungen von K₄[SnSe₄]^[21] mit [Co(en)₃]Cl₃ (en = 1,2-Diaminoethan) in einem Wasser-Methanol-Gemisch entstan-

[*] Dr. S. Dehnen, C. Zimmermann, M. Melullis
Institut für Anorganische Chemie
Universität Karlsruhe (TH)
Engesserstraße, Geb. 30.45, 76128 Karlsruhe (Deutschland)
Fax: (+49) 721-608-7021
E-mail: dehnen@achim6.chemie.uni-karlsruhe.de

[**] Diese Arbeit wurde vom Land Baden-Württemberg (Margarete-von-Wrangell-Habilitations-Programm für S.D., Landesgraduierten-Stipendium für M.M.), der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Prof. D. Fenske danken wir für die großzügige Unterstützung der Arbeiten und Prof. R. Ahlrichs für die Bereitstellung von Rechenleistung.