

Molekulare Architektur mit funktionalisierten β -Peptid-Helices**

Arndt M. Brückner, Pradip Chakraborty, Samuel H. Gellman* und Ulf Diederichsen*

Professor Lutz F. Tietze gewidmet

Helicale Sekundärstrukturen spielen eine zentrale Rolle für die Architektur von Proteinen. In vielfacher Weise sind sie an Erkennungs- und Bindungsprozessen zwischen Proteinen oder Proteinen und Nucleinsäuren beteiligt.^[1] Darüber hinaus wird die Organisation von Peptidhelices zu Bündeln gewöhnlich in membranständigen Domänen von Transmembranproteinen und vielen löslichen Proteinen beobachtet.^[2] Peptidhelices können als Template zur spezifischen Organisation von Peptiden bei der Ligation genutzt werden.^[3] Das Design amphiphiler Helices ist wichtig für Modellstudien dieser komplexen biomolekularen Wechselwirkungen.^[3,4] Im Falle von α -Peptiden werden etwa 15–20 Aminosäuren für eine signifikante Ausprägung helicaler Sekundärstrukturen in wässriger Lösung benötigt. Demgegenüber genügen bereits sechs β -Aminosäuren für eine beträchtliche Population der 14-Helix-Konformation eines β -Peptids.^[5] Diese β -Peptid-Helix ist durch etwa drei Aminosäureeinheiten pro Windung und eine Ganghöhe von 5 Å gekennzeichnet. Bevorzugt wird die 14-Helix von β -Aminosäuren gebildet, deren Seitenketten jeweils mit der β -Position verknüpft sind (β^3 -Reste). Insbesondere haben sich β -Cyclohexanaminocarbonsäuren als gute Stabilisatoren der Helix-Konformation erwiesen. Wasserstoffbrücken zwischen N-H- und C=O-Funktionalitäten im β -Peptid-Rückgrat bilden 14-gliedrige Ringe.^[6] Wegen ihrer repetitiven Struktur eignet sich die 14-Helix hervorragend als Gerüst für die definierte räumliche Ausrichtung von Erkennungseinheiten, die als β -Aminosäure-Seitenketten präsentiert werden.

In Studien zum Aufbau künstlicher Tertiärstrukturen aus Helixbündeln wurde kürzlich gezeigt, dass ein amphiphiles β -Peptid-Dekamer in Wasser aufgrund hydrophober Wechsel-

wirkungen zwischen den Helices kleine lösliche Aggregate bildet.^[7] Aufbauend auf diesem Konzept sollte es möglich sein, kleine β -Peptid-Helices durch Nucleobasenpaarung zu organisieren, um so die Geometrie, Stöchiometrie und Spezifität der Selbstassoziation besser steuern zu können. Wir berichten hier über das Design 14-helicaler β -Peptide mit Nucleobasen in den Seitenketten als Erkennungseinheiten sowie über Untersuchungen zur Sekundärstruktur und zur Organisation durch Nucleobasenpaarung.

Es wurden Nucleo- β -aminosäuren enthaltende β -Peptide hergestellt,^[8] wobei zunächst zu bestimmen war, ob die 14-Helix wie erwartet in wässrigem Puffer gebildet wird (10 mM Tris-HCl, pH 7.6). Anschließend wurde die durch Nucleobasenpaarung induzierte Helixaggregation untersucht.^[9] Die Nucleo- β -aminosäuren (*S*)- γ -(Guanin-9-yl)- β -homoalanin (H- β -HalG-OH), (*S*)- γ -(Cytosin-1-yl)- β -homoalanin (H- β -HalC-OH), (*S*)- γ -(Adenin-9-yl)- β -homoalanin (H- β -HalA-OH), (*S*)- γ -(Thymin-1-yl)- β -homoalanin (H- β -HalT-OH) und (*S*)- γ -(1-Methylguanin-9-yl)- β -homoalanin (H- β -Hal^{1Me}G-OH) wurden als Basenpaar-Erkennungseinheiten eingebaut,^[10] und zwar sequenziell in jede dritte Position, sodass die Nucleobasen entlang einer Flanke der resultierenden 14-Helix aufgereiht sind (Abbildung 1). Die beiden verbleibenden Positionen jeder 14-helicalen Windung

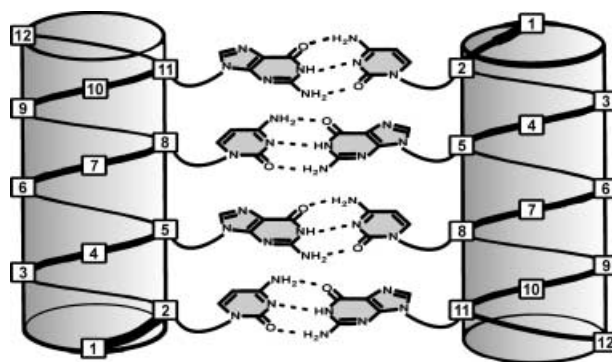


Abbildung 1. Modell der erwarteten β -Peptid-Helixaggregation durch antiparallele Nucleobasenpaarung im Watson-Crick-Modus.

wurden mit (1*R*,2*R*)-2-Aminocyclohexancarbonsäure (ACHC) und β^3 -(*R*)-Homolysin aufgefüllt, wobei ACHC die Bildung einer 14-Helix unterstützt^[5] und β^3 -(*R*)-Homolysin die Wasserlöslichkeit der Oligomere gewährleisten soll.^[11] Zudem wurde aus präparativen Gründen das Harz mit β -Homoglycin (H- β -HGly-OH) beladen. Die Primärstrukturen der synthetisierten Oligomere mit den Sequenzen CGCG (**1**), CGC (**2**), GCG (**3**), C^{1Me}GC (**4**), ^{1Me}GC^{1Me}G (**5**), ATCA (**6**) und TGAT (**7**) sind in Abbildung 2 dargestellt. Die Größe dieser β -Peptide mit 10 bzw. 13 β -Aminosäuren Länge sollte ausreichen, um die 14-Helix-Sekundärstruktur hinreichend zu populieren. Nach Maruzen-Modellbetrachtungen^[12] ist eine antiparallele Assoziation dieser β -Peptide durch Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen komplementären Nucleobasen im Watson-Crick-Modus möglich.

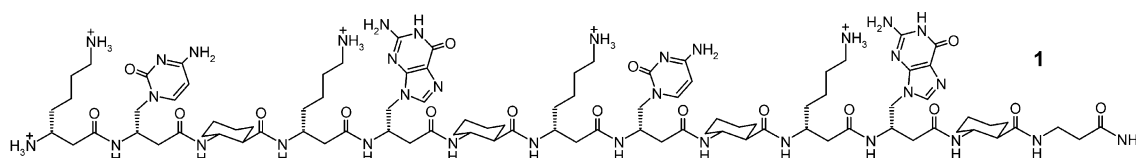
Die mit der Entpaarung von DNA- oder RNA-Doppelsträngen einhergehende kooperative Entstapelung der

[*] Prof. Dr. U. Diederichsen, A. M. Brückner, P. Chakraborty
Institut für Organische Chemie
Georg-August-Universität Göttingen
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-39-2944
E-mail: udieder@gwdg.de

Prof. Dr. S. H. Gellman
Department of Chemistry
University of Wisconsin
1101 University Avenue, Madison WI 53706 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der US National Science Foundation (CHE-0140621) gefördert. A.M.B. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) für Stipendien.

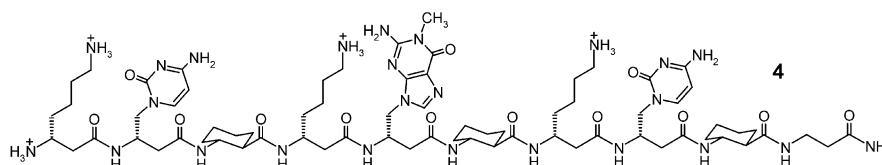
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



H-(β -HLys- β -HaIC-ACHC- β -HLys- β -HaIG-ACHC- β -HLys- β -HaIC-ACHC- β -HLys- β -HaIG-ACHC- β -HGly)-NH₂ (1)

H-(β -HLys- β -HaIC-ACHC- β -HLys- β -HaIG-ACHC- β -HLys- β -HaIC-ACHC- β -HGly)-NH₂ (2)

H-(β -HLys- β -HaIG-ACHC- β -HLys- β -HaIC-ACHC- β -HLys- β -HaIG-ACHC- β -HGly)-NH₂ (3)



H-(β -HLys- β -HaIC-ACHC- β -HLys- β -HaI^{Me}G-ACHC- β -HLys- β -HaIC-ACHC- β -HGly)-NH₂ (4)

H-(β -HLys- β -HaI^{Me}G-ACHC- β -HLys- β -HaIC-ACHC- β -HLys- β -HaI^{Me}G-ACHC- β -HGly)-NH₂ (5)

H-(β -HLys- β -HaIA-ACHC- β -HLys- β -HaIT-ACHC- β -HLys- β -HaIC-ACHC- β -HLys- β -HaIA-ACHC- β -HGly)-NH₂ (6)

H-(β -HLys- β -HaIT-ACHC- β -HLys- β -HaIG-ACHC- β -HLys- β -HaIA-ACHC- β -HLys- β -HaIT-ACHC- β -HGly)-NH₂ (7)

Abbildung 2. Durch Festphasenpeptidsynthese hergestellte Oligomere 1–7.

Nucleobasen führt zu einer sigmoiden Zunahme der UV/Vis-Absorption bei steigender Temperatur (Hyperchromie, A_{rel}).^[13] Die entsprechenden UV-spektroskopischen Daten des Oligomers CGCG (1) lassen bei einer Stabilität von $T_m > 80^\circ\text{C}$ (11 μM β -Peptid, Abbildung 3a) eine sehr starke Selbstassoziation erkennen. Um innerhalb des verfügbaren Temperaturbereichs eine vollständige Entpaarung beobachten zu können, wurden die kürzeren, komplementären Oligomere CGC (2) und GCG (3) untersucht. Der bei 215 nm im

Circulardichroismus(CD)-Spektrum einer äquimolaren Mischung der Oligomere 2 und 3 auftretende starke Cotton-Effekt ist im Einklang mit der Bildung einer rechtsgängigen 14-Helix-Sekundärstruktur in wässriger Lösung (Abbildung 3b), wie es für zahlreiche β -Peptide berichtet wird.^[5–7,14] Ferner wurde ein starker positiver Cotton-Effekt bei 270 nm ermittelt, der zuvor noch nicht bei β -Peptiden beobachtet wurde und vermutlich von einer bevorzugten Orientierung der Nucleobasen in Bezug auf das chirale β -Peptid-Rückgrat

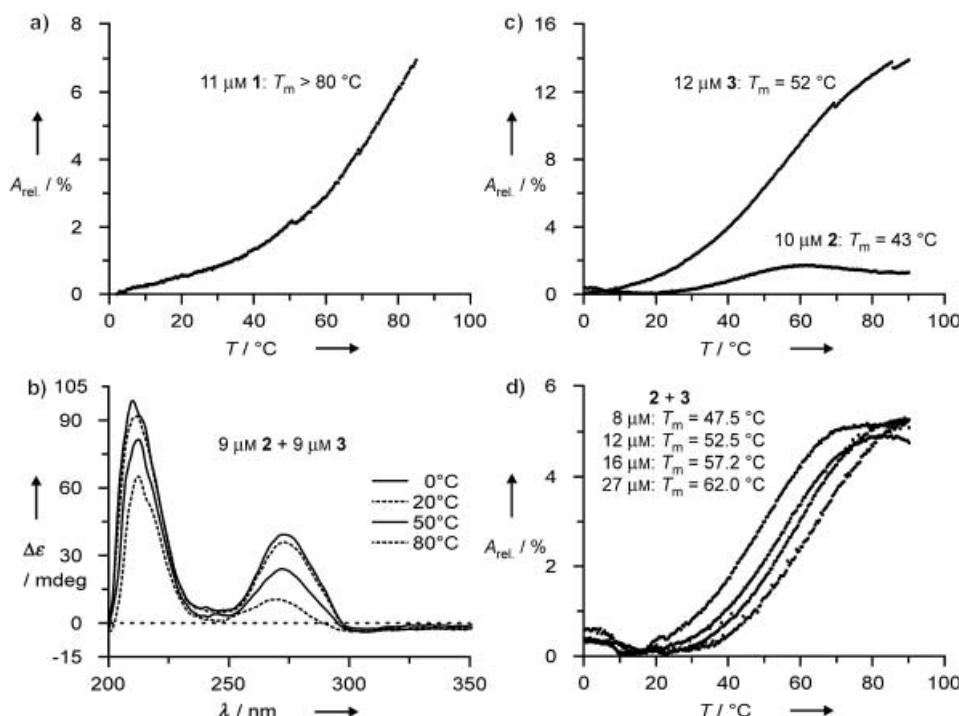


Abbildung 3. Temperaturabhängige UV- und CD-Spektren der β -Peptide 1–3 in wässrigem Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6). Die Selbstaggregation G/C-haltiger Oligomere wird durch die oberen Schmelzkurven angezeigt. Die Wechselwirkungen in äquimolaren Mischungen der Oligomere 2 und 3 führen zu den unten dargestellten temperaturabhängigen UV- und CD-Spektren.

herrührt. Prinzipiell könnte diese Ausrichtung der Nucleobasen entweder der Basenpaarung in Doppelsträngen oder höheren Aggregaten zugeschrieben werden oder einfach auf Stapelungswechselwirkungen der Nucleobasen innerhalb einer einzelnen 14-Helix beruhen.

Die temperaturabhängigen UV-Daten der getrennt voneinander vermessenen Oligomere **2** (CGC) und **3** (GCG) weisen jeweils auf Selbstassoziation hin (Abbildung 3c). Für das β -Peptid **2** wurde eine kooperative Entstapelung mit einem T_m -Wert von 43 °C ($A_{rel}=2\%$, 10 μM) gefunden, während die UV-Kurve des Oligomers **3** als sigmoide Zunahme der Absorption mit einer Stabilität von $T_m=52\text{ °C}$ ($A_{rel}=14\%$, 12 μM) interpretiert werden kann. Für die äquimolaren Mischungen der β -Peptide **2** und **3** wurden sigmoide Schmelzkurven mit ausgezeichneter Reversibilität erhalten, wie sie für komplementäre Oligonucleotide typisch sind. Die Stabilitäten der in den äquimolaren Mischungen der β -Peptide **2** und **3** gebildeten Komplexe sind konzentrationsabhängig und weisen T_m -Werte zwischen 47.5 und 62.0 °C ($A_{rel}=5\%$, 8–27 μM) auf (Abbildung 3d).

Die Bildung von Doppelsträngen wurde auch durch ESI-Massenspektrometrie untermauert. Die beobachteten $[(2M)^{3+}+3H]$ -Signale der Oligomere **1–3**, die bei Verwendung einer wässrigen, auf +1 °C vorgekühlten Lösung des jeweiligen Oligomers erhalten wurden, weisen auf die Bildung von Homodimeren hin.^[15] Die äquimolare Mischung der komplementären Oligomere **2** und **3** ergab Signale der Ionen $[(M_2+M_3)^{3+}+3H]$ sowie der jeweiligen Tochterionen $[M_2^{2+}+2H]$ und $[M_3^++H]$, deren Intensität zehnfach höher war als die der Duplex-Signale $[(2M)^{3+}+3H]$.

Das Design der Oligomere **2** und **3** wurde im Hinblick auf die Bildung eines 1:1-Duplexes gewählt. Die bisher aufgeführten Daten liefern jedoch keinen eindeutigen Beleg für Basenpaarung oder die Bildung von Doppelsträngen. Die Selbstpaarung von **2** und/oder **3** könnte die Heterodimer-Paarung verhindern. Darüber hinaus ist es möglich, dass höhere Aggregate die ermittelten hohen T_m -Werte verursachen. Ein ähnlicher Effekt wurde für α -peptidische CGCG-Oligomere mit linearer Topologie beobachtet.^[16]

Um zu bestimmen, ob eine Wasserstoffbrücken-vermittelte Paarung der Nucleobasen wichtig für die beobachtete Selbstassoziation der β -Peptidhelices ist, wurden die Oligomere **4** ($C^{1Me}GC$) und **5** ($^{1Me}GC^{1Me}G$) synthetisiert. Diese unterscheiden sich von den Oligomeren **2** und **3** nur in der 1-Methylierung der Guanin-Nucleobasen, wodurch Basenpaarung über die Watson-Crick-Seite verhindert wird. Auch für die Oligomere **4** und **5** wurde mithilfe der CD-Spektroskopie die Bildung der Sekundärstruktur beobachtet, die wahrscheinlich der einer 14-Helix entspricht (Maximum bei 215 nm in Abbildung 4a; nur Ergebnisse der äquimolaren Mischung gezeigt). Hingegen liefert die temperaturabhängige UV-Spektroskopie keinen Hinweis auf Wechselwirkungen zwischen den Helices (Abbildung 4b). Die CD-Spektren bei niedrigen Temperaturen lassen mit einem Maximum um 270 nm auf eine bevorzugte Orientierung der Nucleobasen in Bezug auf die Helix schließen, jedoch ist die Abnahme der Intensität des Cotton-Effektes bei 270 nm mit zunehmender Temperatur linear und zeigt nicht das sigmoide Muster, das

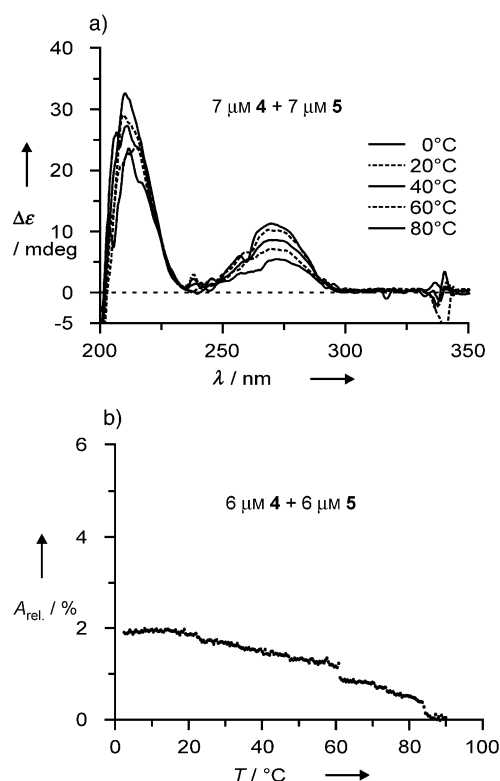


Abbildung 4. CD-Spektren (a) und UV-Schmelzkurve (b) äquimolarer Mischungen der β -Peptide **4** und **5** in wässrigem Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6).

auf basengepaarte Doppelstränge hindeuten würde (unveröffentlichte Daten).

Der stärkste experimentelle Hinweis auf die durch Basenpaarung vermittelte Bildung von β -Peptidhelix-Doppelsträngen stammt aus Experimenten mit den komplementären Oligomeren **6** (ATCA) und **7** (TGAT), denen mit der A-T- und G-C-Paarung im Doppelstrang beide Möglichkeiten zur kanonischen Basenpaarung offenstehen. Für das Oligomer **6** wurde lediglich eine vernachlässigbare Selbstpaarung beobachtet ($T_m < 0\text{ °C}$, 4 μM ; Abbildung 5b), während Oligomer **7** Selbstassoziation mit einer signifikanten Stabilität von $T_m=28\text{ °C}$ ($A_{rel}=11\%$, 4 μM) aufweist. Im Vergleich zur Selbstpaarung wurde bei einer äquimolaren Mischung der Oligomere **6** und **7** mit $T_m=44\text{ °C}$ ($A_{rel}=6\%$, jeweils 4 μM) ein deutlich stabilerer Komplex erhalten. Die β -Peptide **6** und **7** bilden, basierend auf Erkennung durch Basenpaarung, einen stabilen Doppelstrang, der durch das Rückgrat einer 14-Helix vororganisiert wurde. Gestützt wird diese Interpretation durch temperaturabhängige CD-Spektren (Abbildung 5a), die das für diese β -Peptid-Sekundärstruktur charakteristische Maximum bei 215 nm aufweisen.

Mit der von Breslauer zur Behandlung von DNA-Doppelsträngen aufgestellten Gleichung^[17] wurden die thermodynamischen Daten für den aus den Oligomeren **6** (ATCA) und **7** (TGAT) gebildeten Duplex anhand der Abhängigkeit der T_m -Werte von der Konzentration berechnet. Es resultiert ein Entropiewert von $\Delta S^0 = -96\text{ cal mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$ für die Paarung beider Stränge. Damit ist der

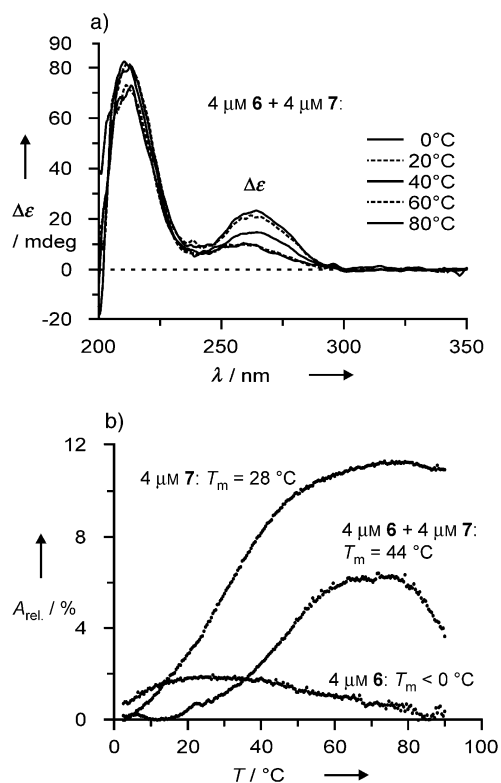


Abbildung 5. Die temperaturabhängigen CD- (a) und UV-Spektren (b) lassen eine Selbstpaarung der β -Peptide **6** und **7** sowie die Bildung stabiler Doppelstränge in einer äquimolaren Mischung der β -Peptide **6** und **7** in wässrigem Puffer erkennen (10 mM Tris-HCl, pH 7.6).

Entropieaufwand für die Paarung von **6** und **7** geringer als bei der Bildung des DNA-Hexamerduplexes $d(GC)_3$ ($\Delta S^0 = -160 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).^[18] Die auf der Bildung der 14-Helix beruhende starke konformative Vororganisation der untersuchten β -Peptide im Einzelstrang scheint einen wichtigen Beitrag zur Energetik der Doppelstrangpaarung zu leisten.

Zusammengefasst steht mit der β -peptidischen 14-Helix ein ausgezeichnetes Gerüst zur Ausrichtung präorganisierter Erkennungseinheiten zur Verfügung. Mit Nucleobasen funktionalisierte 14-helicale β -Peptide bilden sehr stabile Duplexe mit komplementären Helices. Eine solche Doppelstrangbildung ist entropisch günstiger als die Erkennung in DNA-Doppelsträngen, was für die helicale Vororganisation des β -Peptid-Rückgrats spricht. Die ungewöhnlich hohen thermischen Stabilitäten, die für Guanin-haltige β -Peptide ermittelt wurden, sind ein Indiz für die Bildung höherer Aggregate. Die hier vorgestellten Ansätze für die molekulare Gestaltung modifizierter β -Peptide sollen künftig auf den Aufbau komplexerer Assoziate übertragen werden. Ziel wird es sein, molekulare Architekturen, z. B. Helixbündel, zu imitieren.

Eingegangen am 12. Mai 2003 [Z51871]

Stichwörter: Basenpaarung · β -Peptide · Helicale Strukturen · Sekundärstrukturen · Selbstorganisation

- [1] a) R. T. Sauer, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 7–9; b) M. Suzuki, J. Suckow, B. Kisters-Woike, H. Aramaki, K. Makino, *Adv. Biophys.* **1996**, 32, 31–52; c) R. L. Stanfield, I. A. Wilson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5, 103–113.
- [2] B. Bechinger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 639–644.
- [3] a) K. Severin, D. H. Lee, A. J. Kennan, M. R. Ghadiri, *Nature* **1991**, 389, 706–709; b) D. Grell, J. S. Richardson, M. Mutter, *J. Pept. Sci.* **2001**, 7, 146–151.
- [4] a) R. B. Hill, D. P. Raleigh, A. Lombardi, W. F. DeGrado, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 745–754; b) L. Baltzer, H. Nilsson, J. Nilsson, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3153–3163.
- [5] a) D. H. Appella, J. J. Barchi, S. R. Durell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2309–2310; b) R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3219–3232.
- [6] a) D. Seebach, M. Overhand, F. N. M. Kühnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 913–941; b) D. Seebach, P. E. Ciceri, M. Overhand, B. Jaun, D. Rigo, *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 2043–2066; c) P. I. Arvidsson, M. Rueping, D. Seebach, *Chem. Commun.* **2001**, 649–650.
- [7] a) T. L. Raguse, J. R. Lai, P. R. LePlae, S. H. Gellman, *Org. Lett.* **2001**, 3, 3963–3966; verwandte Arbeiten: b) R. P. Cheng, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11564–11565; c) P. Garner, S. Dey, Y. Huang, X. Zhang, *Org. Lett.* **1999**, 1, 403–406; d) P. Garner, S. Dey, Y. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2405–2406.
- [8] a) U. Diederichsen, H. W. Schmitt, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 312–315; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 302–305; b) U. Diederichsen, H. W. Schmitt, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 827–835; c) A. M. Brückner, M. Garcia, A. Marsh, S. H. Gellman, U. Diederichsen, *Eur. J. Org. Chem.*, im Druck.
- [9] Die Oligomere wurden durch manuelle Boc-Festphasenpeptidsynthese an 4-Methylbenzhydrylamin(MBHA)-Polystyrolharz erhalten, das mit β -Homoglycin beladen war. Kupplungsreagentien waren *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU) und *N,N*-Diisopropylethylamin; Doppelkupplung bei 50 °C war erforderlich. ESI-MS: *m/z*: **1**: 672.5 [$M^{3+}+3H$], 1008.0 [$M^{2+}+2H$], 1019.0 [$M^{2+}+H+Na$]; **2**: 505.5 [$M^{3+}+3H$], 757.4 [$M^{2+}+2H$]; **3**: 518.9 [$M^{3+}+3H$], 777.6 [$M^{2+}+2H$], 1553.9 [$M^{+}+H$]; **4**: 383.1 [$M^{4+}+4H$], 510.1 [$M^{3+}+3H$], 764.2 [$M^{2+}+2H$], 1527.8 [$M^{+}+H$]; **5**: 528.2 [$M^{3+}+3H$], 791.5 [$M^{2+}+2H$], 802.3 [$M^{2+}+H+Na$], 813.4 [$M^{2+}+2Na$], 1602.8 [$M^{+}+Na$]; **6**: 667.0 [$M^{3+}+3H$], 999.8 [$M^{2+}+2H$], 1332.1 [$(2M)^{3+}+3H$], 1997.9 [$M^{+}+H$]; **7**: 508.4 [$M^{4+}+4H$], 677.5 [$M^{3+}+3H$], 1014.9 [$M^{2+}+2H$], 2028.7 [$M^{+}+H$].
- [10] Zur Synthese von Boc- β -HalC(Z)-OH (Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Z = Benzyloxycarbonyl) und Boc- β -HalG-OH: A. M. Brückner, H. W. Schmitt, U. Diederichsen, *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 3855–3866.
- [11] Boc- β -HLys(Z)-OH wurde ausgehend von der entsprechenden α -Aminosäure Boc-(*R*)-Lys(Z)-OH durch Arndt-Eistert-Homologisierung hergestellt: siehe Lit. [6] und J. V. N. Vara Prasad, J. A. Loo, F. E. Boyer, M. A. Stier, R. D. Gogliotti, W. J. Turner, P. J. Harvey, M. R. Kramer, D. P. Mack, J. D. Scholten, S. J. Gracheck, J. M. Domagala, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1707–1730.
- [12] HGS Biochemistry Molecular Model, Protein Nucleic Acid Set, Maruzen Co., Ltd., Tokyo.
- [13] J. SantaLucia, Jr. in *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach* (Hrsg.: M. G. Gore), Oxford University Press, Oxford, **2000**, S. 329–356.
- [14] a) D. H. Appella, L. A. Christianson, I. L. Karle, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6209–6212; b) J. J. Barchi, X. Huang, D. H. Appella, L. A. Christianson, S. R. Durell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2711–2718; zur Synthese von Boc-ACHC: c) D. H. Appella, P. R. LePlae, T.

- L. Raguse, S. H. Gellman, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 4766–4769;
 d) eine kritische Diskussion der Eignung von CD-Spektren zur
 Ableitung der Vorzugskonformation eines β -Peptids: A. Glättli,
 X. Daura, D. Seebach, W. F. van Gunsteren, *J. Am. Chem. Soc.*
2002, 124, 12972–12978.
- [15] **1** (60 μM): 672.7 [$M^{3+}+3\text{H}$], 806.4 [$(2M)^{5+}+5\text{H}$], 1008.3
 [$M^{2+}+2\text{H}$], 1343.4 [$(2M)^{3+}+3\text{H}$]; Tochterionen von 806.4:
 672.4 [$M^{3+}+3\text{H}$], 1007.9, [$M^{2+}+2\text{H}$]; Tochterionen von 1343.4:
 1008.4 [$M^{2+}+2\text{H}$]; **2** (60 μM): 505.1 [$M^{3+}+3\text{H}$], 758.6 [$M^{2+}+2\text{H}$],
 1009.2 [$(2M)^{3+}+3\text{H}$]; **3**: 519.0 [$M^{3+}+3\text{H}$], 777.4 [$M^{2+}+2\text{H}$],
 1035.9 [$(2M)^{3+}+3\text{H}$]; **2 + 3** (jeweils 30 μM): 505.6 [$M_2^{3+}+3\text{H}$],
 518.9 [$M_3^{3+}+3\text{H}$], 758.0 [$M_2^{2+}+2\text{H}$], 778.2 [$M_3^{2+}+2\text{H}$], 1022.6
 [$(M_2+M_3)^{3+}+3\text{H}$]; Tochterionen von 1022.6: 757.3 [$M_2^{2+}+2\text{H}$],
 1553.8 [$M_3^{3+}+3\text{H}$].
- [16] U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1966–1969; *Angew.*
Chem. Int. Ed. Engl. **1997**, 36, 1886–1889.
- [17] a) L. A. Marky, K. J. Breslauer, *Biopolymers* **1987**, 26, 1601–
 1620; b) K. J. Breslauer, *Methods Enzymol.* **1995**, 259, 221–242.
- [18] D. DePrisco Albergo, L. A. Marky, K. J. Breslauer, D. H. Turner,
Biochemistry **1981**, 20, 1409–1413.