

Calciumionen als Schalter zur reversiblen Steuerung der Sekundär- und Quartärstrukturen in Biokonjugaten**

Romina I. Kühnle und Hans G. Börner*

Im vergangenen Jahrzehnt standen Peptid-Polymer-Konjugate vermehrt im Fokus der Materialforschung.^[1-4] Die Vielseitigkeit synthetischer Polymere verbunden mit der Präzision von Peptiden ergibt eine neuartige Klasse von Makromolekülen. Diese Biohybridpolymere finden Anwendung als spezifische Wirkstofftransporter, biologisch aktive Gerüststrukturen für die Zellzüchtung, Systeme für die Biomineralisierung oder Komponenten für die Nanoelektronik.^[5-8]

Peptidsegmente in Biokonjugaten sind in der Lage, die Selbstorganisation verschiedener synthetischer Polymere in wässrigen und organischen Medien zu steuern.^[9-12] Obwohl hierdurch das Programmieren hierarchischer Überstrukturen möglich wird, ist die Regulation der Selbstorganisationsprozesse zum Teil noch immer stark eingeschränkt.^[13] Etablierte Kontrollmethoden, um die Sekundärstruktur von Peptiden zu manipulieren, sind Änderungen von pH-Wert, Temperatur oder Redoxpotential sowie enzymatische Modifikationen der Peptide und die Koordinierung von Metallionen an Peptiden.^[14-17] Allerdings ist die Übertragung dieser Prinzipien auf Biokonjugate nicht immer einfach.

Unlängst wurden Methoden beschrieben, um die Kontrolle der Selbstorganisation von Biokonjugaten zu verbessern. Diese beinhalten 1) das Einfügen temporärer Strukturdefekte in das Peptidsegment der Biokonjugate, welche die β -Faltblattbildung inhibieren. Durch Änderung des pH-Wertes werden die „Switch“-Defekte entfernt und die Selbstorganisation ausgelöst.^[10] 2) Enzymatische Hydrolyse phosphorylierter Peptidsegmente in einem Biokonjugat kann dessen Eigenschaften von nicht aggregationsfähig in einen aktiven Zustand schalten.^[18] Ferner wurden 3) Schutzgruppenstrategien verwendet, um die Aggregation von Biokonjugaten zu steuern. Hierbei wird durch Abspaltung der Schutzgruppen, z. B. durch Licht oder pH-Änderungen, die Selbstorganisation ausgelöst.^[19]

Die bisher etablierten Routen sind irreversibel und bieten folglich nicht die Möglichkeit eines umkehrbaren Schaltpro-

zesses. Die Bindung von Metallionen hingegen ist reversibel. Durch die Stabilisierung bestimmter Strukturen oder durch Auslösung von Konformationsänderungen spielt sie eine entscheidende Rolle in der Funktionskontrolle von Proteinen.^[20,21] Eine Änderung der Sekundärstruktur durch Komplexierung von Metallionen wurde bei unterschiedlichen Modellpeptiden beobachtet.^[22-24] Bedingt durch ihr definiertes Komplexbildungsverhalten wurden üblicherweise Übergangsmetalle wie Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} oder Rh^{2+} verwendet.^[25-27]

Hier stellen wir einen neuen Regulationsmechanismus vor, welcher die reversible Kontrolle der Selbstorganisationsfunktion eines Peptidsegments in einem Peptid-Polymer-Konjugat durch Calciumionen ermöglicht. Während Ca^{2+} zuvor verwendet wurde, um bereits gebildete Peptidfasern zu vernetzen,^[28] beinhaltet die vorliegende Strategie die Kon-

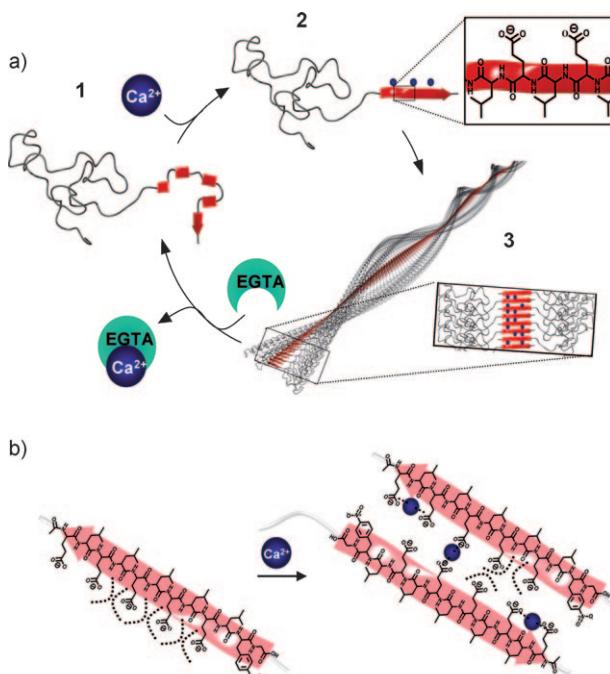


Abbildung 1. a) Idealisierter Mechanismus für die Regulation der Selbstorganisation der Peptid-Polymer-Konjugate durch Calciumionen (Polymer dargestellt als graues Knäuel, Peptid als rote Segmente): 1) Desaktiviertes Biokonjugat ohne Ca^{2+} , das Peptidsegment liegt ungeordnet vor. 2) Die Zugabe von Ca^{2+} stabilisiert das Peptidsegment als β -Strang, der zu helikalen Fasern mit β -Faltblatt-Kern und Polymer-Schale aggregiert (3). Ca^{2+} kann durch Zugabe des kompetitiven Binders Ethyldioxobis(ethylenenitrilo)tetraessigsäure (EGTA) komplexiert werden; dies führt zur Desaggregation der Fasern. b) Die intramolekulare Coulomb-Abstoßung, welche die Bildung des β -Strangs erschwert, wird partiell durch Ca^{2+} -Zugabe kompensiert. (Chemische Strukturen sind nicht maßstabsgetreu dargestellt.)

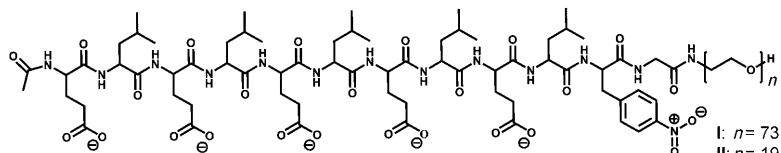
[*] R. I. Kühnle, Prof. Dr. H. G. Börner
Labor der organischen Synthese funktionaler Systeme
Institut für organische Chemie
Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-2093-7266
E-Mail: h.boerner@hu-berlin.de

[**] Diese Arbeit wurde durch das Center of Supramolecular Interactions Berlin (CSI Berlin), die DFG (Emmy Noether BO1762/2) und die Max-Planck-Gesellschaft unterstützt. Wir danken Markus Antonietti für seine Unterstützung und K. Ostwald, J. Brandt, A. Heilig und R. Pitschke für ihre Beiträge zum Projekt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201100141> zu finden.

trolle auf molekularer Ebene. Aktivierung und Desaktivierung der Selbstorganisationsfunktion des Biokonjugats sind das Ergebnis einer durch Ca^{2+} vermittelten Umwandlung der Peptidsekundärstruktur, welche die Aggregation oder den Abbau fibrillärer Peptid-Polymer-Nanostrukturen auslöst (Abbildung 1).

Das Biokonjugat **I** wurde in einer inversen Konjugationsstrategie nach automatisierten Fastmoc-Standardprotokollen an einem PAP-Harz (PEO-beladenes Polystyrolharz) synthetisiert. Hierzu wurde ein Polyethylenoxidblock (PEO, $M_n \approx 3200$) mit einem $(\text{EL})_5\text{nFG}$ -Peptidsegment verknüpft. Die Peptidsequenz besteht aus fünf sich wiederholenden Diaden von Glutaminsäure (E) und Leucin (L). Die alternierend hydrophil-hydrophobe Sequenz des Peptidsegments sorgt für eine hohe Tendenz zur Bildung einer β -Faltblatt-Sekundärstruktur.^[29] Durch die Carbonsäureseitenketten der Glutaminsäure wird die Sekundärstrukturbildung gestört (Abbildung 1b). Oberhalb $\text{pH} \approx 5$ liegen die COOH-Gruppen deprotoniert vor, und deren negative Ladung sorgt dafür, dass sich die intrinsische Tendenz zur Bildung einer β -Faltblattstruktur zugunsten einer statistischen Knäuelkonformation verschiebt (Abbildung 2). Am C-Terminus wurde *p*-Nitrophenylalanin (*nF*) als spektroskopischer Marker eingeführt, und Glycin dient als flexibler Abstandshalter zwischen Peptid und PEO-Block. Anschließend erfolgte die Abspaltung des vollständig entschützten Biokonjugates vom Harz. Der chemische Aufbau von **I** wurde mit MALDI-TOF-MS, ^1H -NMR- und FTIR-Spektroskopie überprüft (siehe Hintergrundinformationen).



Das Biokonjugat **I** ließ sich leicht in 0.17 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan(TRIS)/HCl-Puffer (pH 8.9) lösen. Im Circulardichroismus(CD)-Spektrum zeigt der charakteristische negative Cotton-Effekt bei $\lambda = 198 \text{ nm}$, dass **I** in einer statistischen Knäuelkonformation vorliegt (Abbildung 2). Das CD-Spektrum von **I** ohne Ca^{2+} -Zusatz bleibt mindestens für einen Zeitraum von fünf Wochen unverändert (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S5), was auf eine ausreichende Unterdrückung der β -Faltblattbildung hindeutet. Untersuchungen mit Rasterkraftmikroskopie (AFM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) unterstützen diese Annahme, da in beiden Fällen keine Anzeichen für die Präsenz anisotroper fibrillärer Strukturen gefunden wurden (Abbildung S6, S7).

Um die Selbstorganisationstendenz des Peptid-PEO-Konjugates zu erhöhen, wurden Lösungen von **I** mit unterschiedlichen molaren Äquivalenten an Calciumchlorid untersucht. Die Calciumionen wurden aufgrund ihrer Biokompatibilität ausgewählt; des Weiteren ist bekannt, dass Ca^{2+} eine starke Affinität zu Carboxylaten hat, da die Bindung enthalpisch vor allem aber entropisch getrieben ist.^[30] Die

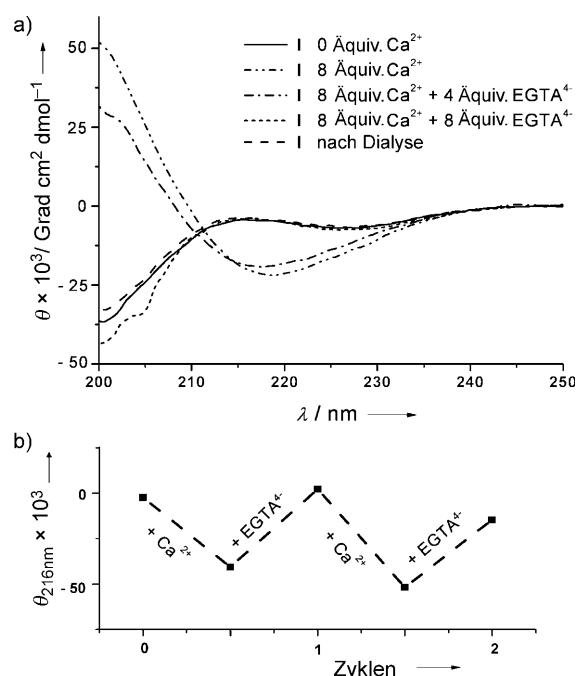


Abbildung 2. a) CD-Spektren von **I** vor und nach Ca^{2+} - und EGTA-Zugabe. b) Schaltdiagramm sequenzieller Sekundärstrukturumwandlungen von **I** durch Verfolgung der Änderung des CD-Signals des charakteristischen negativen Cotton-Effekts bei 216 nm in Abhängigkeit von wiederholter Ca^{2+} - und EGTA^{4-} -Zugabe. Die letzte Umwandlung von β -Faltblatt zu statistischer Knäuel dauerte ca. 3 Tage und erfolgte nicht vollständig.

Zugabe von Ca^{2+} könnte die negativen Ladungen der Carboxylate partiell abschirmen und somit die β -Faltblattbildung des Peptidsegments zulassen, welche die Selbstorganisation des Biokonjugates nach sich zieht. Die Strukturumwandlung von einer statistischen Knäuelkonformation in die β -Faltblattstruktur konnte CD-spektroskopisch verfolgt werden (Abbildung 2 und Abbildung S8). Ungefähr fünf Minuten nach Zugabe von fünf molaren Äquivalenten Ca^{2+} pro COOH-Gruppe des Biokonjugates konnte das Auftreten der charakteristischen Cotton-Effekte für die β -Faltblattstruktur beobachtet werden ($\lambda = 195 \text{ nm}$ (+) und 216 nm (-)). Die Intensität der Signale nahm mit zunehmender Calciumionenkonzentration zu und erreichte bei 8 Äquiv. Ca^{2+} /COOH ihr Maximum (Abbildung S4).

TEM- und AFM-Untersuchungen der Lösungen von **I** vor und nach Zugabe von 8 Äquiv. Ca^{2+} /COOH bestätigen die Aussage der CD-Daten. Während in Abwesenheit von Ca^{2+} keine anisotropen Strukturen gefunden wurden, resultierte die Zugabe von Ca^{2+} in Fibrillen mit einigen hundert Nanometern Länge (Abbildung 3). Interessanterweise konnte mithilfe von TEM eine helikale Feinstruktur der Fibrillen und ein offenkundiger Trend zur Bildung starrer helikaler Dimere beobachtet werden (Einschub in Abbildung 3).

Um die reversible Umwandlung der Sekundär- und Quartärstruktur zu beweisen, wurde das Verhalten von **I** nach Zugabe des Natriumsalzes des EGTA zur Lösung der Biokonjugatfibrillen untersucht. Das CD-Spektrum bestätigt,

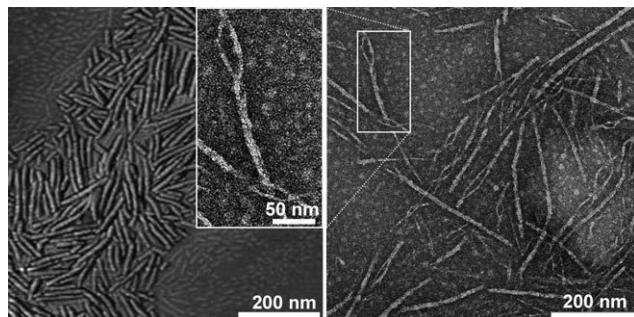


Abbildung 3. Aufnahmen helikaler dimerer Fibrillen aus dem Konjugat I nach Zugabe von 8 Äquivalenten Ca^{2+} . Links: AFM-Phasenbild ($z=150$ mV) auf Glimmer. Rechts: TEM-Aufnahme (negativ angefärbt).

nach erfolgter Zugabe des kompetitiven Ca^{2+} -Binders EGTA, eine Sekundärstrukturumwandlung des Peptids (β -Faltblatt \rightarrow Knäuel; Abbildung 2). Dieser indirekte Beweis für den Abbau der Fibrillen wurde durch TEM- und AFM-Aufnahmen gestützt, da in beiden Fällen keine anisotropen fibrillären Strukturen beobachtet werden konnten (Abbildung S6 und S7). Das System konnte erfolgreich an seinen Ausgangspunkt zurückgebracht werden, indem die Ca^{2+} -EGTA-Komplexe durch Dialyse quantitativ aus der Lösung des Biokonjugates entfernt wurden. Das CD-Spektrum nach der Dialyse zeigt, dass das Peptidsegment des Biokonjugates wieder als statistisches Knäuel vorlag (Abbildung 2). Interessanterweise ist der Schaltprozess komplett reversibel, und multiple Zyklen können wiederholt werden, ohne die Regulatoren (Ca^{2+} oder Ca^{2+} -EGTA-Komplexe) durch Dialyse entfernen zu müssen. Abbildung 2b zeigt, dass zwei An/Aus-Zyklen durchlaufen werden können. Allerdings dauerte die letzte Sekundärstrukturumwandlung von β -Faltblatt zu statistischem Knäuel ca. 3 Tage, nach denen ein Umsatz von etwa 70% erreicht war. Dies liegt möglicherweise an der zu diesem Zeitpunkt bereits sehr hohen Salzkonzentration im System (Abbildung S9).

Die beschriebenen Ergebnisse ermöglichen es, einen Mechanismus für die durch Calciumionen gesteuerte reversible Schaltung von I zu postulieren (Abbildung 1). Die negative Nettoladung des Peptidsegments des Biokonjugates verhindert dessen Selbstorganisation. Durch die inter- und intramolekulare Coulomb-Abstoßung nimmt das Biokonjugat eine statistische Knäuelkonformation an. Nach Zugabe von Ca^{2+} werden die negativen Ladungen teilweise abgeschirmt, sodass das Peptidsegment einen β -Strang bilden kann. Dies resultiert in der Selbstorganisation der Biokonjugate zu fibrillären β -Faltblattstrukturen. Ähnlich zu artverwandten Biokonjugaten führt die Amphiphilie des Peptid-Polymer- β -Faltblatts zur Assoziation der Fibrillen, wobei komplexere Strukturen entstehen. Bemerkenswert ist, dass ausgedehnte β -Faltblattaggregate normalerweise in niedrigen energetischen Zuständen vorliegen und deren Bildung daher oft nicht reversibel ist. Trotzdem scheint das Design der Peptidsequenz eine ausreichende Triebkraft zu liefern, um den Abbau der Aggregate nach Entfernen des Ca^{2+} -Regulators zu begünstigen.

Der postulierte Mechanismus ist mit den beobachteten Dimensionen der Fibrillen vereinbar. Für Nanofasern des Konjugats I wurde unter dem AFM eine relativ einheitliche Höhe von ca. (6.1 ± 1.0) nm bestimmt. TEM-Aufnahmen zeigen sehr persistente Fasern mit Breiten von ca. (10.0 ± 1.4) nm. Diese Fasern bestehen aus zwei umschlungenen Fibrillen mit Breiten um (4.5 ± 1.1) nm und sind damit von ähnlicher Größe wie bereits zuvor beschriebene PEO-Peptid-Nanobänder (Abbildung 3; siehe auch Abbildung S6 und S7).^[31]

Um den Einfluss der Länge des PEO-Blocks auf den Ca^{2+} -regulierten Selbstorganisationsprozess zu untersuchen, wurde ein weiteres Konjugat II synthetisiert. Dieses Konjugat beinhaltet die identische Peptidsequenz, aber einen kürzeren PEO-Block mit $M_{n,\text{PEO}} \approx 800$ (siehe Hintergrundinformationen). Das Konjugat II ließ sich leicht bei pH 8.9 lösen, und das CD-Spektrum zeigt, dass das Peptidsegment als statistisches Knäuel vorliegt, das auch nach sechs Monaten noch stabil ist. Während für die effektive Sekundärstrukturumwandlung von I 8 Äquiv. Ca^{2+} /COOH benötigt werden, reichen für II schon 0.5 Äquiv. Ca^{2+} /COOH, um die Strukturumwandlung auszulösen (statistisches Knäuel \rightarrow β -Faltblatt, siehe Abbildung S4 und S5). Eine bessere Stabilisierung des Peptidsegments konnte aufgrund des längeren PEO-Blocks von I erwartet werden, da dieser die Selbstorganisation erschwert. Konjugat II enthält einen kürzeren PEO-Block als I. Somit ist die statistische Knäuelkonformation instabiler, und II benötigt weniger Ca^{2+} , um die Aggregation auszulösen (siehe Abbildung S4).

AFM-Aufnahmen zeigen Fasern mit relativ einheitlicher Höhe von etwa (5.3 ± 0.6) nm. Unter dem TEM sind helikale Fasern mit Breiten um (9.4 ± 1.4) nm zu beobachten. Diese starren Objekte bestehen aus Fibrillen mit Breiten von ca. (6.1 ± 1.4) nm. Trotz der empfindlicheren Schaltung konnten die von II gebildeten Fasern durch kompetitive Komplexierung des Ca^{2+} mit EGTA abgebaut werden. Die Sekundärstrukturumwandlung wurde mithilfe von CD-Spektroskopie beobachtet (Abbildung 4a). Der Abbau der fibrillären Strukturen konnte auch durch AFM- und TEM-Messungen nachgewiesen werden (siehe Abbildung S6 und S7). Indem die Ca^{2+} -EGTA-Komplexe durch Dialyse aus der Biokonjugatlösung entfernt wurden, konnte auch Konjugat II, wie zuvor schon Konjugat I, zum Ausgangspunkt zurückgebracht werden. Wie in Abbildung 4a dargestellt, nimmt das Konjugat II nach erfolgter Dialyse eine statistische Knäuelkonformation ein.

Anders als die Konjugate I und II neigt das Peptid ohne PEO-Block intrinsisch dazu, die β -Faltblattstruktur einzunehmen. Das CD-Spektrum des denaturierten Peptids vor der Ca^{2+} -Zugabe zeigt, dass das Peptid partiell bereits als β -Faltblatt vorliegt, obwohl die statistische Knäuelkonformation klar vorherrscht (Abbildung 4b). Darüber hinaus wurde durch Alterung einer Lösung des Peptids (1 Gew.-%) ohne Calciumionen nach einigen Tagen ein klares selbsttragendes Hydrogel erhalten (siehe Abbildung S10). Die Strukturumwandlung zu einem β -Faltblatt kann, wie die CD-Spektren zeigen, durch Ca^{2+} -Zugabe beschleunigt werden (Abbildung 4b). Übereinstimmend mit den Arbeiten von Mutter et al. zur Peptid-PEGlyierung, stabilisiert der PEO-Block die

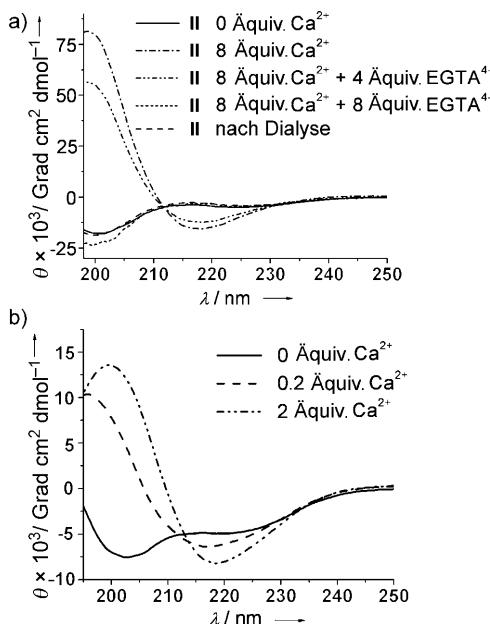


Abbildung 4. CD-Spektren des Konjugates **II** vor und nach Ca^{2+} - und EGTA-Zugabe (a) und des Peptids ohne PEO-Block vor und nach Ca^{2+} -Zugabe (b).

Sekundärstruktur von Peptiden und verlangsamt Strukturübergänge (hier wird die statistische Knäuelkonformation der Peptidsegmente bei **I** und **II** stabilisiert und die spontane Aggregation reduziert).^[32] Über mehrere Wochen bis hin zu Monaten konnten wir keine Sekundärstrukturumwandlung des Peptidsegments in den Peptid-PEO-Konjugaten **I** und **II** beobachten (siehe Abbildung S5). Dies deutet darauf hin, dass das Design von Peptiden mit schaltbaren Strukturen Aminosäuresequenzen benötigt, die ein delikates Gleichgewicht zwischen zwei Sekundärstrukturen aufweisen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Einbau negativer Ladungen in eine Peptidaggregationsdomäne von Peptid-Polymer-Konjugaten deren Selbstorganisation effektiv verhindert. Durch die Zugabe von Calciumionen ließ sich die Bildung hierarchischer Nanostrukturen auslösen. Dieser Selbstorganisationsprozess war, nach Komplexieren der Calciumionen durch den kompetitiven Ca^{2+} -Binder EGTA, vollständig reversibel. Diese Arbeit könnte einen Beitrag zum Verständnis der Rolle von Calcium bei der Amyloidbildung leisten und neue Wege zur reversiblen Kontrolle der Mikro- und Nanostrukturbildung in Hybridelementen aufzeigen.

Eingegangen am 7. Januar 2011
Online veröffentlicht am 8. April 2011

Stichwörter: Biokonjugate · Nanofasern · Peptide · Sekundärstrukturen · Selbstorganisation

- [1] H. G. Börner, *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 811.
- [2] H. D. Maynard, S. Y. Okada, R. H. Grubbs, *Macromolecules* **2000**, *33*, 6239.
- [3] J. C. M. van Hest, D. A. Tirrell, *Chem. Commun.* **2001**, 1897.
- [4] P. De, M. Li, S. R. Gondi, B. S. Sumerlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11288.
- [5] H. G. Börner, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 115.
- [6] A. K. H. Hirsch, F. Diederich, M. Antonietti, H. G. Börner, *Soft Matter* **2010**, *6*, 88.
- [7] S. Kessel, A. Thomas, H. G. Börner, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9181; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9023.
- [8] E. Jahnke, I. Lieberwirth, N. Severin, J. P. Rabe, H. Frauenrath, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5510; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5383.
- [9] T. S. Burkoth, T. L. S. Benzinger, D. N. M. Jones, K. Hallenga, S. C. Meredith, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7655.
- [10] J. Hentschel, E. Krause, H. G. Börner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7722.
- [11] J. Hentschel, H. G. Börner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14142.
- [12] L. Ayres, K. Koch, P. Adams, J. C. M. van Hest, *Macromolecules* **2005**, *38*, 1699.
- [13] H. G. Börner, H. Kühnle, J. Hentschel, *J. Polym. Sci. Part A* **2010**, *48*, 1.
- [14] A. Top, K. L. Kiick, C. J. Roberts, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1595.
- [15] C. J. Bowerman, B. L. Nilsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9526.
- [16] R. J. Williams, R. J. Mart, R. V. Ulijn, *Biopolymers* **2010**, *94*, 107.
- [17] K. Pagel, T. Vagt, B. Koks, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3843.
- [18] H. Kühnle, H. G. Börner, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6552; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6431.
- [19] T. B. Yu, J. Z. Bai, Z. B. Guan, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1117; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1097.
- [20] Z. Grabarek, *J. Mol. Biol.* **2006**, *359*, 509.
- [21] L. Belkacemi, I. Bedard, L. Simoneau, J. Lafond, *Cell Calcium* **2005**, *37*, 1.
- [22] S. N. Dublin, V. P. Conticello, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 49.
- [23] J. J. Dong, J. E. Shokes, R. A. Scott, D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3540.
- [24] Q. Y. Dai, C. Xiao, M. X. Dong, Z. G. Liu, Z. Y. Sheng, F. J. Castellino, M. Prorok, *Peptides* **2009**, *30*, 866.
- [25] K. Pagel, T. Seri, H. von Berlepsch, J. Griebel, R. Kirmse, C. Böttcher, B. Koks, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 531.
- [26] D. E. Przybyla, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7866.
- [27] A. N. Zaykov, B. V. Popp, Z. T. Ball, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6651.
- [28] M. A. Greenfield, J. R. Hoffman, M. O. de La Cruz, S. I. Stupp, *Langmuir* **2010**, *26*, 3641.
- [29] W. X. Wang, M. H. Hecht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 2760.
- [30] C. G. Sinn, R. Dimova, M. Antonietti, *Macromolecules* **2004**, *37*, 3444.
- [31] D. Eckhardt, M. Groenewolt, E. Krause, H. G. Börner, *Chem. Commun.* **2005**, 2814.
- [32] V. N. Rajasekharan Pillai, M. Mutter, *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*, 122.