

schlag. In neueren Veröffentlichungen wird die intermolekulare Lewis-Basen-Stabilisierung monomerer Batrium-bis- $\beta$ -diketonate durch Kronenether<sup>[19]</sup> oder lineare Oligoether<sup>[12]</sup> beschrieben. Verbindung **3** ist jedoch unseres Wissens das erste Beispiel für einen basenfreien monomeren Barium(II)- $\beta$ -Diketonato-Komplex. Diese neue Ligandenklasse wird gegenwärtig weiter untersucht.

### Experimentelles

**1** (HL): Unter trockenem, nachgereinigtem N<sub>2</sub> wurden 44.0 g (0.50 mol) Pinacolon tropfenweise bei Raumtemperatur zu einer kräftig gerührten Suspension von 49.4 g (0.37 mol) MeO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOMe und 15.5 g (0.67 mol) NaH in 190 mL frisch destilliertem DME gegeben. Nach Beendigung der Zugabe wurde die Mischung unter starkem Rühren 18 h zum Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 70 mL konzentrierter wäßriger HCl zu der gebildeten orange-braunen Suspension gegeben. Eine geringe Menge eines weißen, wasserlöslichen Rückstands wurde verworfen. Die wäßrige Phase wurde mit Et<sub>2</sub>O extrahiert (5 × 200 mL), die vereinigten organischen Fraktionen wurden über wasserfreiem MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und mit einem Rotationsverdampfer eingeengt. Die Destillation des Rückstands ergab reines **1** (K<sub>p</sub> = 45 °C bei 0.01 Torr) in 65.5% Ausbeute (49.0 g).

Spektroskopische Daten von **1**: <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.10 (s; C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.85 (m; CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.35 (t; CH<sub>2</sub>CO), 3.30 (s; CH<sub>3</sub>-O), 3.35 (t; O-CH<sub>2</sub>), 5.50 (s; COCH<sub>2</sub>CO); <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 25.13(C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.83(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 35.02(COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 58.17(O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 71.35(CH<sub>3</sub>-O), 94.98(COCH<sub>2</sub>CO), 195.50(COC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 200.10(CH<sub>2</sub>COCH<sub>2</sub>). IR (KBr, Reinsubstanz):  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2960 s, 2920 m, 2860 w, 1720 w, 1700 w, 1600 s, 1480 w, 1460 w, 1360 w, 1270 w, 1120 m, 1020 w.

**2**: In einem offenen Becherglas wurden 1.21 g (6.45 mmol) Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 20 mL destilliertes Wasser, 1.53 g (7.64 mmol) **1**, 20 mL EtOH (95%) und eine zur Bildung einer homogenen, klaren, dunkelblauen Lösung ausreichende Menge wäßriger NH<sub>3</sub>-Lösung (ca. 6 mL) gemischt. Die Lösung wurde mit Et<sub>2</sub>O extrahiert (3 × 50 mL), die organischen Phasen wurden vereinigt, über wasserfreiem MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert, auf 20 mL eingeengt, mit 60 mL Hexan überschichtet und 48 h bei – 20 °C belassen. Die gebildeten Kristalle wurden abfiltriert und an der Luft getrocknet. Fp. = 55–56 °C. Zur Röntgenstrukturanalyse [10] geeignete Kristalle von **2** wurden durch Kühlen einer Lösung der Substanz in Hexan (– 20 °C, 20 h) erhalten.

**3**: Unter trockenem, nachgereinigtem N<sub>2</sub> wurden bei Raumtemperatur 3.41 g (17.0 mmol) **1** auf einmal in einen Kolben mit Magnetrührer und 0.87 g (6.30 mmol) elementarem Barium gegeben. Man ließ röhren, bis keine Metallteilchen mehr zu sehen waren (5–6 h). Überschüssiges **1** wurde destillativ entfernt (10<sup>-2</sup> Torr, 45 °C), worauf eine klare viskose Flüssigkeit zurückblieb, die als Verbindung **3** identifiziert wurde; Ausbeute fast quantitativ.

Analytische Daten von **3**: Befriedigende CH-Analyse; Molmasse (kryoskopisch in Benzol): gef. 535, ber. 600 g mol<sup>-1</sup>; TGA (N<sub>2</sub>, 1 atm); bis 270 °C 85%, bis 460 °C 46%, bis 600 °C 39%. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.00 (s), 1.10 (s), 1.85 (br m), 2.10 (br m), 2.40 (s), 3.20 (s), 3.40 (br m), 5.30 (s).

Eingegangen am 2. Januar 1992 [Z 5106]

- [1] Siehe z.B. *Better Ceramics Through Chemistry IV* (Hrsg.: B. J. J. Zelinski, C. J. Brinker, D. E. Clark, D. R. Ullrich), *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **1990**, *180*, 1112.
- [2] C. J. Brinker, G. W. Scherer, *Sol-Gel Science*, Academic Press, New York, 1990.
- [3] G. B. Stringfellow, *Organometallic Vapor Phase Epitaxy: Theory and Practice*, Academic Press, New York, 1989, S. 398ff.
- [4] a) YBa<sub>2</sub>Cu<sub>3</sub>O<sub>7-x</sub>; C. W. Chu, P. H. Hor, R. L. Meng, L. Gao, Z. J. Huang, Y. Q. Wang, J. Bechtold, D. Campbell, M. K. Wu, J. Ashburn, C. Y. Huang, *Phys. Rev. Lett.* **1987**, *58*, 405–407; b) (TlO)<sub>m</sub>Ba<sub>2</sub>Ca<sub>n-1</sub>Cu<sub>3</sub>O<sub>x</sub> ( $m$  = 1, 2;  $n$  = 1, 2, 3); Z. Z. Sheng, A. M. Hermann, *Nature* **1988**, *27*, 138–139; c) BaTiO<sub>3</sub>; T. L. Rose, E. M. Kellner, A. N. Scoville, S. E. Stone, *J. Appl. Phys.* **1984**, *55*(10), 3706.
- [5] W. S. Rees, Jr., M. W. Carris, W. Hesse, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 4479.
- [6] W. S. Rees, Jr., K. A. Dippel in *Chemical Processing of Advanced Materials* (Hrsg.: L. Hench), Wiley, New York, im Druck.
- [7] W. S. Rees, Jr., D. A. Moreno, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1759.
- [8] Einen ausgezeichneten Überblick über die frühen Arbeiten auf diesem Gebiet geben; L. M. Tonge, D. S. Richeson, T. J. Marks, J. Zhao, J. Zhang, B. W. Wessels, H. O. Marcy, C. R. Kannewurf in *Electron Transfer in Biology and the Solid State: Inorganic Compounds With Unusual Properties, Part III* (Hrsg.: M. K. Johnson, R. B. King, D. M. Kurtz, Jr., C. Katal, M. L. Norton, R. A. Scott), *Adv. Chem. Ser.* **1990**, *226*, 351–368.
- [9] J. A. T. Norman, G. P. Pez, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 971.
- [10] Ein Kristall von **2** (Größe 0.8 × 0.6 × 0.3 mm<sup>3</sup>) wurde mit Zweikomponenten-Epoxidklebstoff an einer Glasfaser befestigt. Datensammlung auf einem automatischen Enraf-Nonius-CAD 4-Diffraktometer bei Raumtemperatur,  $\omega/2\theta$ -Scans im Bereich 2 °C < 2θ < 55°, Mo<sub>K<sub>α</sub></sub>-Strahlung ( $\lambda$  =

0.71073 Å). Raumgruppe  $P\bar{1}$  (Nr. 2);  $a$  = 9.444(2),  $b$  = 10.773(2),  $c$  = 13.220(2) Å;  $\alpha$  = 68.72(1),  $\beta$  = 84.32(1)°;  $V$  = 1238 Å<sup>3</sup>;  $Z$  = 2;  $\rho_{\text{ber.}}$  = 1.240 g cm<sup>-3</sup>. Zwei Standardreflexe (025, 312) wurden stündlich gemessen, Intensitätsschwankung < 2% während der gesamten Dauer der Datensammlung. Von 6010 gemessenen Reflexen waren 4356 beobachtet, 3616 mit  $I > 2\sigma(I)$  wurden zur Strukturlösung und -verfeinerung herangezogen (SDP-Programme von Enraf-Nonius). Im letzten Zyklus der Verfeinerung (Methode der kleinsten Fehlerquadrate) ergaben sich bei 262 Parametern Werte von  $R$  = 0.058 und  $R_{\text{w}}$  = 0.064, größte Restelektronendichte 0.880 e Å<sup>-3</sup>. Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, Gesellschaft für wissenschaftlich-technische Information mbH, W-7514 Eggenstein-Leopoldshafen 2, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-56191, der Autoren und des Zeitschriftenzitats angefordert werden.

- [11] Eine gründliche Zusammenfassung der Daten von  $\beta$ -Diketonato-Metallkomplexen geben: R. C. Mehrotra, R. Bohra, D. P. Gaur, *Metal  $\beta$ -Diketonates and Allied Derivatives*, Academic Press, New York, 1978.
- [12] a) P. Van der Sluis, A. L. Spek, K. Timmer, H. A. Meinema, *Acta Crystallogr.* **1990**, *Sect. C 46*, 1741; b) R. Gardiner, D. W. Brown, P. S. Kirlin, A. L. Rheingold, *Chem Mater.* **1991**, *3*, 1053.

### Kovalente Bindung von Ferroceneinheiten an Glucose-Oxidase in inversen Micellen \*\*

Von Alexander D. Ryabov\*, Alexey M. Trushkin, Lidia I. Baksheeva, Raisa K. Gorbatova, Irina V. Kubrakova, Vadim V. Mozhava, Boris B. Gnedenko und Andrey V. Levashov

An Enzymen, die mit einer Elektrode direkt Elektronen austauschen können, besteht derzeit großes Interesse. Bei immer mehr nativen Enzymen wird gefunden, daß sie sich unter geeigneten Bedingungen als elektrochemisch aktiv erweisen<sup>[11]</sup>. Eine Alternative zu diesen mediatorfreien Systemen sind die pseudo-mediatorfreien Systeme, bei denen ein Mediator für den Elektronentransport an ein Redoxenzym gebunden ist<sup>[2, 3]</sup>. Zwar sind viele Mediatoren bekannt<sup>[4, 5]</sup>, doch erwiesen sich Ferrocenderivate<sup>[6]</sup> und Osmiumkomplexe<sup>[7]</sup> als am besten für FAD-abhängige Oxidases geeignet. Die vielen Studien zur Biochemie der Ferrocene<sup>[8]</sup> machen die Entwicklung einfacher Verfahren für die kovalente Bindung dieser Substanzen an Proteine unabdingbar. Die geringe Löslichkeit der Ferrocene in wäßrigem Medium ist hierbei jedoch sehr hinderlich, und die bekannten Verfahren<sup>[9]</sup> sind daher oft heterogener Natur. Darüber hinaus wird die Modifizierung normalerweise bei ziemlich hohen Konzentrationen an Harnstoff durchgeführt, die zu einer Denaturierung (Entfaltung) des Proteins führen, die nicht immer reversibel ist.

Eine mögliche Alternative, welche einerseits die Löslichkeitsprobleme behebt, andererseits die Denaturierung der

[\*] Prof. A. D. Ryabov [+], A. M. Trushkin, L. I. Baksheeva,

Dr. R. K. Gorbatova

Abteilung Chemie

G.-V.-Plekhanov-Institut für Nationalökonomie

Stremyanny per. 28, 113054, Moskau (Rußland)

Dr. I. V. Kubrakova

Institut für Geochemie und Analytische Chemie

Akademie der Wissenschaften, Moskau (Rußland)

Dr. V. V. Mozhava, B. B. Gnedenko, Dr. A. V. Levashov

Institut für Chemie

Staatliche Universität Moskau (Rußland)

[+] Gastwissenschaftler 1991/1992 am

Institut für Anorganische Chemie, Universität Witten/Herdecke  
Stockumer-Straße 10, W-5810 Witten-Annen

[\*\*] Diese Arbeit wurde zum Teil im Rahmen des wissenschaftlichen und technologischen Programms „Neue Methoden in der Biotechnologie“ der Gemeinschaft Unabhängiger Staaten (GUS) gefördert (Nr. 7-192). Wir danken Herrn S. Vakula für technische Hilfe. A. D. R. dankt der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für ein Stipendium.

Proteine vermeidet, bietet die Reaktion in inversen Micellen („Mikroreaktoren“). Diese Methode wurde schon zur Modifizierung von  $\alpha$ -Chymotrypsin und anderen Biomolekülen mit Fettsäurechloriden eingesetzt<sup>[10]</sup>. Hier berichten wir über die Modifizierung von Glucose-Oxidase (GO)[\*] mit Ferrocencarbonsäure (Fc-COOH) in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)/N-Hydroxysuccinimid in inversen Micellen von AOT in *n*-Octan.

Die Größe der inversen Micellen kann einem Protein angepaßt werden, indem man den Hydratationsgrad ändert; darunter versteht man das Molverhältnis von Wasser zu oberflächenaktiver Substanz,  $w_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$ <sup>[11]</sup>. In unserem Fall mußte die Größe des Hohlraums im Inneren der Micelle einem GO-Molekül mit zwei Untereinheiten und einer Molekülmasse von 160 kDa angepaßt werden, was bei einem  $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$ -Verhältnis von 23 gewährleistet ist. Paßt die Größe des Hohlraums zu der des Enzyms, wird dessen Denaturierung verhindert, so daß nur Aminogruppen *auf der Oberfläche* der GO reagieren. Diese Modifizierung von funktionellen Gruppen auf der Oberfläche scheint weniger schwierig und allgemeiner anwendbar zu sein als die Oxidation von Oligosacchariden auf der Oberfläche von Enzymen<sup>[9d]</sup>. GO wurde mit Fc-COOH unter Aktivierung durch DCC/N-Hydroxysuccinimid in Acetonitril modifiziert<sup>[12]</sup>. Acetonitril, welches im molaren Verhältnis 1:75 mit Wasser vorlag, beeinflußt wahrscheinlich nicht die Größe der inversen Micellen und scheint eine wesentliche Komponente zu sein, da bei einer Aktivierung von Fc-COOH in Benzol oder *n*-Octan keine Modifizierung eintritt. Das aktivierte Fc-COOH reagiert problemlos mit den  $\text{NH}_2$ -Gruppen der GO, die in der wäßrigen Phase der inversen Micellen solubilisiert ist.

Die modifizierte GO unterscheidet sich nur wenig von nativer GO. Pro Molekül GO sind fünf Ferroceneinheiten gebunden (atomabsorptionsspektroskopisch bestimmt); bei Verfahren unter Verwendung von Harnstoff werden normalerweise mehr als zehn Ferroceneinheiten gebunden<sup>[9]</sup>. Elektropherogramme des nativen und des modifizierten Enzyms (SDS, Polyacrylamid-Gel) sind praktisch identisch, wobei lediglich Banden der monomeren 80 kDa-Untereinheiten zu erkennen sind, so daß eine Aggregation ausgeschlossen werden kann. Die Kinetik des Sauerstoffverbrauchs der modifizierten GO wurde mit einer Clark-Elektrode gemessen und ähnelt der des nativen Enzyms, wobei das modifizierte Enzym 22 % der Aktivität des nativen Enzyms aufweist. Die Modifizierung beeinflußt die Aktivität also nur wenig, führt aber zu einer neuen Eigenschaft des Enzyms, die aus den Cyclovoltammogrammen (Abb. 1 links) deutlich wird, welche in Ab- und Anwesenheit von *D*-Glucose aufgenommen wurden.

Selbst in Abwesenheit des Substrates *D*-Glucose tritt der für gebundenes Ferrocen typische Kurvenverlauf mit einem Peak bei 0.27 V auf (Kurve a). Die Rolle der Ferroceneinheiten als Mediatoren des Elektronentransfers wird bei Zugabe von *D*-Glucose deutlich (Kurven b–e). Für den Strom ergibt sich eine lineare Abhängigkeit von der *D*-Glucose-Konzentration im Bereich von 0.01–0.15 M. Die elektrochemische Antwort ist auch temperaturabhängig, erreicht bei 40 °C ein Maximum und nimmt bei höheren Temperaturen wegen der Inaktivierung des Enzyms wieder ab. In diesem Zusammenhang war es interessant, die Prozeß-Thermostabilität der nativen und modifizierten GO-Präparationen bei 55 °C anhand des elektrokatalytischen Stroms zu vergleichen. Für native GO wurde die Abnahme des Spitzstroms unter Zusatz von Fc-COOH und *D*-Glucose beobachtet, für modifizierte GO

unter Zusatz von *D*-Glucose. In beiden Fällen ergaben die Strom/Zeit-Diagramme eine Kinetik 1. Ordnung für die thermische Inaktivierung mit  $k_{\text{beob.}} = (5.0 \pm 0.2) \times 10^{-4}$  und  $(6.0 \pm 0.8) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  für native bzw. modifizierte GO (0.5 M *D*-Glucose, pH 5). Die Prozeß-Stabilität wird also durch Modifizierung der GO mit hydrophoben Ferrocenresten nicht wesentlich verringert.

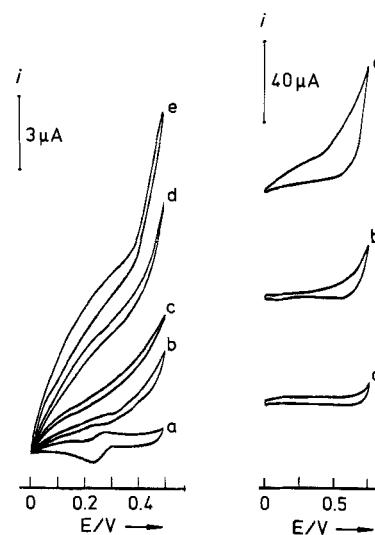


Abb. 1. Links: Cyclovoltammogramme der mit Fc-COOH modifizierten GO bei verschiedenen *D*-Glucose-Konzentrationen: a) 0, b) 0.031, c) 0.046, d) 0.077, e) 0.154 M. GO 2 mg mL<sup>-1</sup>; Vorschubgeschwindigkeit 2.5 mVs<sup>-1</sup>. Rechts: Cyclovoltammogramm von BSA mit adsorbiertem Ferrocen: a) native BSA (2 mg mL<sup>-1</sup>), b) BSA mit adsorbiertem Ferrocen (2 mg mL<sup>-1</sup>); c) entsprechend b) aber in Gegenwart von GO (4 mg mL<sup>-1</sup>) und *D*-Glucose (0.2 M); Vorschubgeschwindigkeit 5 mVs<sup>-1</sup>.

Daß für Ferrocen ein elektrochemisches Signal zu beobachten ist (Abb. 1 a), läßt darauf schließen, daß die metallorganische Verbindung über einen Spacer kovalent an die GO gebunden und nicht nur an der Oberfläche des Enzyms adsorbiert ist. Darauf deuten auch die Kurvenverläufe in Gegenwart von *D*-Glucose hin, die den von Heller et al. für Ferrocen-modifizierte GO erhaltenen ähneln, bei der die Organometallverbindung über einen kurzen Spacer kovalent gebunden ist<sup>[9d]</sup>. Sie unterscheiden sich von denen von Cass et al., der Mischungen aus nativer GO und Fc-COOH untersuchte<sup>[6]</sup>, für die der Strom als Funktion des Potentials steil ansteigt, um dann einen Grenzstrom zu erreichen. Dagegen wurden keine Ferrocensignale beobachtet, wenn die Modifizierung der GO ohne Zusatz von DCC und/oder N-Hydroxysuccinimid durchgeführt wurde. Der Strom stieg auch bei Zugabe von *D*-Glucose nicht an, obwohl bereits eine kleine Menge des Mediators in Gegenwart des Substrates ein Signal hervorrufen kann. Für Proteine wie Rinderserumalbumin (BSA) könnte man eine nicht-kovalente Wechselwirkung erwarten. Tatsächlich wird in inversen Micellen sogar nicht funktionalisiertes Ferrocen (Fc) an der Oberfläche von BSA absorbiert. In diesem Fall wird selbstverständlich keine aktiverende Kupplung benötigt. Die Präparation ist wiederum elektrochemisch aktiv, der Strom ist jedoch zu sehr viel positiveren Potentialen verschoben (Abb. 1 rechts, Kurve b), was darauf schließen läßt<sup>[13]</sup>, daß Fc im Inneren des globulären BSA eingeschlossen ist und daher durch die Aminosäurereste stark abgeschirmt wird. Trotzdem kann derartig modifiziertes BSA, wie andere kovalent modifizierte Proteine<sup>[14]</sup> als Mediator fungieren und an native GO binden (Abb. 1 rechts, Kurve c).

[\*] Abkürzungen: GO = Glucose-Oxidase, BSA = Rinderserumalbumin, AOT = Aerosol OT [Bis(2-ethylhexyl)natriumsulfosuccinat], Fc = Ferrocen, Fc-COOH = Ferrocencarbonsäure, SDS = Natriumdodecylsulfat.

Die hier vorgestellten Verfahren ermöglichen es also, Organometallverbindungen in inversen Micellen an Proteinoberflächen zu adsorbieren oder kovalent zu binden. Dies kann bei der Entwicklung von Elektronenrelais und neuen Katalysatoren Anwendung finden. Die Organometallverbindungen können als Schwermetallsonden in der Elektronenspektroskopie dienen, und die Konjugate können in vielen anderen Bereichen der metallorganischen Biochemie eingesetzt werden.

### Experimentelles

GO ( $\beta$ -D-Glucose:Sauerstoff-1-Oxidoreductase, EC 1.1.3.4) aus *Aspergillus niger* und BSA wurden von Boehringer bzw. Serva bezogen, Dicyclohexylcarbodiimid und *N*-Hydroxysuccinimid von Merck bzw. Sigma, AOT von Serva, Ferrocen von Reakhim. Fc-COOH wurde wie beschrieben hergestellt [15]. Cyclovoltammogramme wurden mit einem Potentiostat-P-5827 M mit einem XY-Schreiber aufgenommen. Es wurde eine Standard-Dreielektroden-Zelle mit einer Ag/AgCl-Referenz- und einer Pt-Hilfselektrode sowie Pyrographit-Platten ( $\text{ca. } 1 \text{ cm}^2$ ) als Arbeitselektrode verwendet. Letztere wurden vor jeder elektrochemischen Messung mit feingekörnigem  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Pulver gereinigt. Die 2 mL-Zelle wurde mit Wasser über einen 2290-Multitemp-Thermostaten (LKB) thermostattiert. Die Messungen wurden bei pH 6.0 (0.1 M Phosphat-Puffer) unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Alle Potentiale sind gegen Ag/AgCl gemessen.

GO/Fc-COOH-Konjugat: 30 mg GO, gelöst in 6 mL Borat-Puffer (0.05 M, pH 9.0) wurden in 50 mL *n*-Octan, welches 6.67 g (0.015 mol) AOT enthielt, gelöst. Aktivierung der Ferrocen-Carboxygruppen: 6.3 mg (0.027 mmol) Fc-COOH, 6.3 mg (0.030 mmol) DCC und 3.7 mg (0.027 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid wurden in 0.25 mL Acetonitril gelöst (wegen einer möglichen Phasentrennung sollten größere Mengen Acetonitril vermieden werden). Die Lösung wurde 30 min bei 5 °C und 1 h bei Raumtemperatur gehalten und dann zu dem in der inversen Micelle von AOT in *n*-Octan stabilisierten Enzym gegeben. Die resultierende pseudohomogene Lösung wurde 24 h bei 20 °C und 1 h bei 5 °C gehalten. Um die mit Ferrocen modifizierte GO zu fällen, wurden 100 mL kaltes Aceton zugegeben. Die Präparation wurde zentrifugiert, mit kaltem Aceton gewaschen, um mögliche Verunreinigungen mit Fc-COOH zu entfernen, und anschließend im Vakuum getrocknet.

BSA/Ferrocen-Adsorbat: 8.4 mg BSA wurden in 1.2 mL Borat-Puffer gelöst und in 6 mL *n*-Octan, welches 1.66 g (0.0038 mol) AOT enthielt, gelöst. 1.4 mg (0.0075 mmol) Ferrocen in 0.6 mL *n*-Octan wurden zu der Micellen-Lösung zugegeben und die Reaktionslösung wie oben beschrieben aufgearbeitet (zur Fällung der Präparation wurden 18 mL Aceton verwendet).

Eingegangen am 27. Dezember 1991 [Z 5102]

- [1] a) S. D. Varfolomeev, *Methods Enzymol.* **1988**, *137*, 430–440; b) R. M. Paddock, E. F. Bowden, *J. Electroanal. Chem.* **1989**, *260*, 487–494; c) L. H. Guo, H. A. O. Hill, G. A. Lowrance, *ibid.* **1989**, *266*, 379–396; d) A. Szucs, G. D. Hitchens, J. O. M. Bockris, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1989**, *21*, 133–148; e) S.-I. Yabuki, H. Shinohara, M. Aizawa, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 945–946; f) P. De Taxis Du Poet, S. Miyamoto, T. Murakami, J. Kimura, I. Karube, *Anal. Chim. Acta* **1990**, *235*, 255–263; g) M. Shaolin, X. Huaiguo, Q. Bidong, *J. Electroanal. Chem.* **1991**, *245*, 133–138; h) J. Kulys, R. D. Schmid, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1990**, *24*, 305–311.
- [2] P. N. Bartlett, V. Q. Bradford, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1135–1136.
- [3] A. Heller, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 128–134.
- [4] M. L. Fultz, A. R. Durst, *Anal. Chim. Acta* **1982**, *140*, 1–18.
- [5] G. K. Budnikov, O. Yu. Kargin, I. F. Abdullin, *Zh. Anal. Khim.* **1989**, *44*, 1733–1752.
- [6] A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. A. O. Hill, W. J. Aston, I. J. Higgins, E. V. Plotkin, L. D. L. Scott, A. P. F. Turner, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 667–671; M. J. Green, H. A. O. Hill, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1986**, *82*, 1237–1243.
- [7] Y. Degani, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2357–2358; B. A. Gregg, A. Heller, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 258–263; *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 5976–5980.
- [8] Übersicht: A. D. Ryabov, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 945–955; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 931–941.
- [9] a) Y. Degani, A. Heller, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 1285–1289; b) *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2615–2620; c) P. N. Bartlett, R. G. Whitaker, M. J. Green, J. Frew, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1603–1604; d) W. Shuhmann, T. J. Ohara, H.-L. Schmidt, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1394–1397.
- [10] a) A. V. Levashov, A. V. Kabanov, Yu. L. Khmelnytsky, I. V. Berezin, K. Martinek, *Dokl. AN SSSR* **1984**, *278*, 246–248; b) A. V. Kabanov, A. L.

Klibanov, V. P. Torchilin, K. Martinek, A. V. Levashov, *Bioorg. Khim.* **1987**, *13*, 1321–1324; c) A. V. Kabanov, A. V. Ovcharenko, N. S. Melik-Nubarov, A. I. Bannikov, V. Yu. Alakhov, V. I. Kiselev, P. G. Sveshnikov, O. I. Kiselev, A. V. Levashov, E. S. Severin, *FEBS Lett.* **1989**, *250*, 238–240.

- [11] N. L. Klaychko, A. V. Pshezhetsky, A. V. Kabanov, S. V. Vakula, K. Martinek, A. V. Levashov, *Biol. Membr.* **1990**, *7*, 467–472.
- [12] Für eine ausführliche Behandlung von Aktivierungsverfahren vgl.: a) Y. S. Klausner, M. Bodansky, *Synthesis* **1972**, 453–463; b) E. W. Colwin in *Comprehensive Organic Chemistry. The Synthesis and Reactions of Organic Compounds* (Hrsg.: D. Barton, W. D. Ollis), Pergamon Press, Oxford, **1983**, Vol. 2, S. 634–635.
- [13] A. D. Ryabov, E. M. Tyapochkin, S. D. Varfolomeev, A. A. Karyakin, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1990**, *24*, 257–262.
- [14] F. Mizutani, M. Asai, *Denki Kagaku oyobi Kogyo Butsuri Kagaku* **1988**, *56*, 1100–1101.
- [15] K. L. Rinehart, Jr., K. L. Motz, S. Moon, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2749–2754.

### Carbonylmetallcluster-modifizierte Östradiole als Suizid-Substrate zur Untersuchung von Rezeptorproteinen: Anwendung beim Östradiol-Rezeptor \*\*

Von Anne Vessières, Siden Top, Colette Vaillant, Domenico Osella, Jean-Paul Mornon und Gérard Jaouen\*

Die Wirkung eines Hormons wird durch dessen Bindung an einen Rezeptor ausgelöst; der zugrundeliegende Mechanismus ist allerdings noch weitgehend unbekannt<sup>[1]</sup>. Ein Ansatz zur Identifizierung der für die Hormon-Rezeptor-Bindung verantwortlichen Aminosäurereste ist die Affinitätsmarkierung, d.h. der Einsatz molekularer Sonden, die die Bindungsstelle erkennen und sich an dieser irreversibel anlagern<sup>[11]</sup>. Die Komplexierung an Metalle ändert die Eigenschaften organischer Verbindungen drastisch. Es werden so Reaktionen möglich, die mit herkömmlichen Verfahren nur schwer oder überhaupt nicht ausgeführt werden können<sup>[22]</sup>. Auf biochemische Fragestellungen übertragen, könnte dies bedeuten, daß man durch Komplexierung mit Übergangsmetall-Komplexfragmenten die Eigenschaften von Biologanden so verändern kann, daß daraus weitere Schlüsse auf den Mechanismus der Substraterkennung gezogen werden können.

Untersuchungen am Östradiol-Rezeptor legen eine acide Bindungsstelle nahe, die auch eine SH-Gruppe enthalten könnte<sup>[3]</sup>. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß Hydroxygruppen an C-3 und C-17 des Östradiols für eine effektive Substraterkennung notwendig sind<sup>[11]</sup>. Dagegen spielen relativ große Substituenten in der 17 $\alpha$ -Position für die Substraterkennung nur eine untergeordnete Rolle<sup>[44]</sup>. Wir haben uns daher zunächst der Synthese der metallorganischen Hormonderivate **1–5** zugewandt, mit dem Ziel, Östradiol kovalent an seinen Rezeptor zu binden. Dabei wollten wir uns zunutze machen, daß sich Alkohole leicht in die korrespondierenden Carbenium-Ionen umwandeln lassen, wenn sie am C-Atom der OH-Gruppe durch eine metallorganische Grup-

[\*] Prof. Dr. G. Jaouen, Dr. A. Vessières, Dr. S. Top, Dr. C. Vaillant  
Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris  
URA CNRS 403  
11 rue P. et M. Curie, F-75231 Paris Cedex 05 (Frankreich)

Prof. Dr. D. Osella  
Dipartimento di Chimica Inorganica, Torino (Italien)  
Dr. J.-P. Mornon  
Université Pierre et Marie Curie, Paris (Frankreich)

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Centre National de la Recherche Scientifique, Pirmed, Inserm, MRT und Medgenix gefördert. Wir danken J. Harrod für hilfreiche Diskussionen sowie Johnson Matthey für eine Spende von Edelmetallen.