

Die hier vorgestellten Verfahren ermöglichen es also, Organometallverbindungen in inversen Micellen an Protein-oberflächen 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 (β -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 (ca. 1 cm²) als Arbeitselektrode verwendet. Letztere wurden vor jeder elektrochemischen Messung mit feingekörntem Al₂O₃-Pulver gereinigt. Die 2 mL-Zelle wurde mit Wasser über einen 2290-Multitemp-Thermostaten (LKB) thermostatiert. 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 enthält, solubilisiert. 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 solubilisierten 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 enthält, solubilisiert. 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. Szues, 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. M. Durst, *Anal. Chim. Acta* **1982**, 140, 1–18.
- [5] G. K. Budnikov, O. Yu. Kargina, 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. Khmel'nitsky, 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 weithin unbekannt^[1]. 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^[1]. Die Komplexbildung 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^[2]. Auf biochemische Fragestellungen übertragen, könnte dies bedeuten, daß man durch Komplexbildung mit Übergangsmetall-Komplexfragmenten die Eigenschaften von Bioliganden so verändern kann, daß daraus weitere Schlüsse auf den Mechanismus der Substraterkennung gezogen werden können.

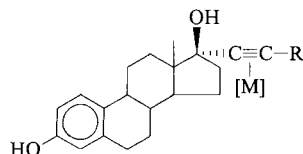
Untersuchungen am Östradiol-Rezeptor legen eine acide Bindungsstelle nahe, die auch eine SH-Gruppe enthalten könnte^[3]. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß Hydroxygruppen an C-3 und C-17 des Östradiols für eine effektive Substraterkennung notwendig sind^[1]. Dagegen spielen relativ große Substituenten in der 17 α -Position für die Substraterkennung nur eine untergeordnete Rolle^[4]. 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, Pirmé, Inserm, MRT und Medgenix gefördert. Wir danken J. Harrod für hilfreiche Diskussionen sowie Johnson Matthey für eine Spende von Edelmetallen.

pierung stabilisiert sind. Verbindungen dieser Art sind daher häufig auch starke Alkylierungsmittel^[5].

Die Synthese von **1** und **2** ist bereits beschrieben^[6]. Die dreikernigen Os- und Ru-Komplexe **3** bzw. **4** wurden durch Reaktion von Ethinylöstradiol mit den aktivierten Clustern $[M_3(CO)_9(MeCN)_2]$ ($M = Os$ bzw. Ru) erhalten. Ihre Acetylen-Protonen weisen eine charakteristische chemische Verschiebung von $\delta = 8.98$ bzw. $\delta = 8.33$ auf. Erhitzt man direkt $[Ru_3(CO)_{12}]$ mit Ethinylöstradiol in Benzol, so erhält man den Hydridokomplex **5**. Die Wanderung des Acetylen-Protons zum Clustergerüst folgt aus der Hochfeldlage des 1H -NMR-Signals bei $\delta = -20.45$.



- 1, $R = Me$, $[M] = [Co_2(CO)_6]$
- 2, $R = Me$, $[M] = [Mo_2Cp_2(CO)_4]$
- 3, $R = H$, $[M] = [Os_3(CO)_{10}]$
- 4, $R = H$, $[M] = [Ru_3(CO)_{10}]$
- 5, kein R , $[M] = [Ru_3(CO)_9H]$

Die relativen Affinitäten („Relative Binding Affinities“, RBA) dieser Verbindungen zum Östradiol-Rezeptor wurden bestimmt und sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Der Molybdänkomplex **2** zeigt eine starke Affinität zum Östradiol-Rezeptor (RBA 33%), während der zweikernige Cobaltkomplex **1** immer noch eine gute, aber schwächere Affinität aufweist (RBA 18%). Selbst die Affinität des dreikernigen Rutheniumkomplexes **4** ist noch akzeptabel (RBA 8%). Die übrigen untersuchten dreikernigen Komplexe dagegen zeigen eine deutlich verminderte Affinität (RBA ca. 2%). Ein Vergleich der RBA-Werte dieser Komplexe zeigt, daß die Affinität schwächer wird, wenn die sterische Hinderung an der 17α -Position zunimmt.

Tabelle 1. RBA des Östradiol-Rezeptors sowie Desaktivierung des Rezeptors in Gegenwart der metallorganischen Hormonderivate 1–5.

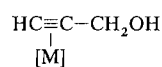
Verb.	RBA [%] [a]	Desaktivierung [%] [b]
1	18	80
2	33	22
3	2.5	65
4	8	68
5	2.6	62

[a] Die Affinität zum Östradiol-Rezeptor wurde in Konkurrenzexperimenten (Competition Radioreceptor Binding Assay) mit Zellextrakten vom Uterus des Lammes, die nach der in [14] beschriebenen Methode hergestellt wurden, und mit $[^3H]$ Östradiol als Marker ermittelt [7]. [b] Die Desaktivierung des Östradiol-Rezeptors durch **1**–**5** wurde durch Inkubation von Zellextrakten vom Uterus des Lammes (0.3 nmol) mit 10 nmol des Hormonderivats bestimmt. Nicht gebundenes Hormonderivat wurde durch Behandlung mit Aktivkohle/Dextran entfernt. Der verbleibende Anteil an reversibel gebundenem Hormonderivat wurde nach Austausch mit 10 nmol $[^3H]$ Östradiol (16–20 h, 20°C) durch einen Protaminsulfat-Fällungs-Assay bestimmt.

Im Anschluß an diese Untersuchungen gingen wir mit Rezeptor-Desaktivierungsversuchen der Frage nach, ob es möglich ist, kovalente Bindungen zwischen Hormonderivat und Rezeptor zu knüpfen. Aufgrund der in Tabelle 1 aufgeführten Ergebnisse lassen sich die Komplexe in drei Kategorien einordnen: Die erste enthält den Cobaltkomplex **1**, der eine starke Desaktivierung des Östradiol-Rezeptors (80%) verursacht, die zweite beinhaltet die dreikernigen Osmium-

und Rutheniumkomplexe **3** bzw. **4** und **5**, die alle eine mäßige desaktivierende Wirkung (65%) zeigen, und in der dritten findet sich der Molybdänkomplex **2**, der nur eine schwache Desaktivierung des Rezeptors bewirkt. Diese ersten Untersuchungen an Uteruspräparaten können dahingehend interpretiert werden, daß die OH-Gruppe in 17β -Stellung des mit dem metallorganischen Komplexfragment markierten Hormons an der Bindungsstelle des Östradiol-Rezeptors selektiv aktiviert wird. Dies könnte durch eine Reaktion mit einer aciden Gruppe, die ein Carbenium-Ion-artiges, reaktives Intermediat erzeugt, hervorgerufen werden. Im Idealfall sollte sich ein Nucleophil in nächster Nähe der aciden Gruppe befinden, so daß ein sofortige Reaktion mit dem kurzlebigen Elektrophil stattfinden kann.

Die Carbenium-Ion-Analoga dieser Hormonderivate können in Gegenwart von Säuren erhalten werden. Ihre pK_R -Werte wurden mit H_2SO_4 in einer 50:50-Mischung aus MeCN und H_2O unter Verwendung geeigneter Koeffizienten nach der Methode von Deno et al.^[8] bestimmt. Aufgrund der begrenzten Stabilität der dreikernigen Hormonkomplexe in Lösung sowie der zusätzlichen Komplikation eines Gleichgewichts zwischen Alkohol, Carbenium-Ion und Eliminierungsprodukt^[9] wurden die Messungen an den Modellverbindungen **6**–**9** vorgenommen (Tabelle 2). Die Kom-



- 6, $[M] = [Co_2(CO)_6]$, 7, $[M] = [Mo_2Cp_2(CO)_4]$
- 8, $[M] = [Os_3(CO)_{10}]$, 9, $[M] = [Ru_3(CO)_{10}]$

Tabelle 2. pK_R -Werte für die Modellverbindungen 6–9 [a].

Verb.	6	8	9	7
pK_R	-5.5 [b]	-3.4	-1.4	+3 [b]

[a] Die pK_R -Werte der Alkohole wurde in wäßriger H_2SO_4 /MeCN-Lösung nach der Methode von Deno et al. [8] spektroskopisch bestimmt. Die **5** entsprechende Modellverbindung konnte nicht synthetisiert werden. [b] Wert aus Lit. [9c].

plexe **6**, **8** und **9** haben alle negative pK_R -Werte, sind also hochreaktive Carbokationen, während die Dimolybdänverbindung **7** mit ihrem positiven pK_R -Wert auch hier aus der Reihe fällt und relativ stabil gegenüber einem nucleophilen Angriff sein sollte. Dieses Verhalten korrespondiert mit der relativen Desaktivierung durch die markierten Hormone (Tabelle 1). Der zur Bildung des Carbenium-Ions postulierte acide Charakter der Bindungsstelle des Rezeptors könnte durch Brønstedt- oder Lewis-Säuren, in diesem Falle koordinierte, zweifach positiv geladene Metall-Ionen, hervorgerufen werden^[10]. Erste Ergebnisse zeigen, daß die Modellverbindung 2-Ferrocenylethanol mit Methylcysteinat nicht nur in Gegenwart von CF_3COOH kuppelt, sondern auch, wenn nur Zn^{2+} oder Mg^{2+} vorhanden sind^[11]. Die Reaktion erfolgt ausschließlich am Schwefelatom; das Stickstoffatom wird nicht angegriffen. Interessanterweise deuten neuere Untersuchungen auf das Vorhandensein von Metall-Dikationen im Bereich der Östradiol-Bindungsstelle hin^[12]. Darüber hinaus zeigen Desaktivierungsuntersuchungen mit MMTS (Methylmethanthiosulfat), einem hochspezifischen Reagens für die SH-Gruppe^[13], daß der Östradiol-Rezeptor dabei zu 90% desaktiviert wird. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die metallorganisch markierten Hormone Cystein-spezifische Reagentien sind.

Um das Auftreten einer kovalenten Bindung zwischen den metallorganischen Hormonderivaten und dem Östradiol-Rezeptor zu belegen, wurde der Komplex **1** in zwei radioakti-

ven Formen synthetisiert: „ $[^3\text{H}]\text{I}$ “ ist an den 2- und 4-Positionen tritiert und weist eine spezifische Aktivität von $1.26 \text{ TBq mmol}^{-1}$ (34.2 Cimmol^{-1}) auf, $[^{14}\text{C}]\text{I}$ mit einer spezifischen Aktivität von $500 \text{ GBq mmol}^{-1}$ (135 mCimmol^{-1}) ist mit ^{14}CO an der Clustereinheit markiert. Unter Bedingungen, die geeignet sind, mit ^3H radioaktiv markiertes Östradiol von der Bindungsstelle zu entfernen (z.B. durch 30minütige Einwirkung von Dextran-beschichteter Aktivkohle bei 37°C), blieben $[^3\text{H}]\text{I}$ und $[^{14}\text{C}]\text{I}$ an den Rezeptor gebunden. Es handelt sich hier also tatsächlich um eine irreversible Bindung zwischen dem Östradiol-Rezeptor und dem metallorganischen Hormonderivat. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit $[^{14}\text{C}]\text{I}$ zeigen außerdem, daß die Carbonylcluster-Einheit bei der irreversiblen Bindung des metallorganischen Hormonderivats an den Rezeptor nicht abgespalten wird.

Weitere Untersuchungen über die exakte Lage dieses spezifischen Cysteinrests im Rezeptor unter Beibehaltung der Strategie der Affinitätsmarkierung, allerdings mit noch voluminöseren Clustereinheiten sind notwendig. Vor kurzem wurde die komplette komplementäre DNA-Sequenz des Östradiol-Rezeptors von Mensch^[15], Maus, Ratte, Xenopus (afrik. Wasserfroschart) und Regenbogenforelle geklont, sequenziert und ihre Homologie diskutiert^[1]. Im Bereich der Hormonbindungsstelle des Östradiol-Rezeptors des Menschen (hER)^[15] finden sich in den Positionen 381, 417, 447 und 530 lediglich vier Cysteinreste (Cys). Die Sequenz vor Cys447 ist bei allen Rezeptoren gleich (übereinstimmende Region: 451–471)^[16], auch die Sequenz nach Cys530 stimmt in allen bisher sequenzierten Östradiol-Rezeptoren weitgehend überein^[1]. Diese Region wurde kürzlich durch gezielte Mutagenese als die Schlüsselstelle für die Steroidbindung identifiziert^[17]. Durch „Analyse mit hydrophoben Clustern“ (Hydrophobic Cluster Analysis, HCA)^[18] erhaltene Ergebnisse deuten außerdem darauf hin, daß sich die Lysin-Cystein-Lysin-Sequenz (529–531) am Rande der mutmaßlichen Hormonbindungsstelle befindet^[19]. Die exponierte Lage des starken Schwefelnucleophils Cys530 erklärt die deaktivierende Wirkung der sperrigen Alkinylostradiol-Cluster 1–5. Zwei unabhängige auf Radiosequenzierungen von Peptidfragmenten und selektiver Spaltung in Peptiden basierende Untersuchungen deuten ebenfalls auf eine Beteiligung der Region um Cys530 bei der Bindung von Östradiol hin^[20].

Experimentelles

4: Zu einer Lösung von $[\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}]$ (100 mg, 0.16 mmol) in 10 mL CH_2Cl_2 und 3 mL CH_3CN wurde bei 0°C eine Lösung von Me_3NO (26 mg, 0.35 mmol) in 7 mL CH_2Cl_2 innerhalb von 15 min getropft. Die Lösung wurde eine Stunde gerührt, über Kieselgel filtriert und das Filtrat zur Trockne eingengt. Der Rückstand, oranges $[\text{Ru}_3(\text{CO})_{10}(\text{MeCN})_2]$, wurde dann in 20 mL THF aufgenommen, und Ethinylostradiol (46 mg, 0.16 mmol) wurde als Feststoff zugegeben. Die resultierende tieforange Lösung wurde eine Stunde lang gerührt. Entfernung des Lösungsmittels und Dünnschichtchromatographie des Rückstands an Kieselgel (Eluent: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}/\text{Pentan}$, 3:1:6) ergab leuchtend oranges $[\text{Ru}_3(\text{CO})_{10}(\text{Ethinylostradiol})]$ in einer Ausbeute von 47%.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3COCD_3 , 20°C): $\delta = 7.24$ (d, H1), 6.71 (dd, H2), 6.68 (d, H4), 8.03 (s, O-H3), 4.30 (s, O-H17), 1.15 (s, Me-13), 8.33 (s, $\equiv\text{CH}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (62.87 MHz, CDCl_3 , 20°C): $\delta = 153.4$ (C3), 138.1 (C5), 132.2 (C10), 126.5 (C1), 115.2 (C4), 112.7 (C2), 85.5 (C17), 48.6 (C13), 15.1 (C18), 192.8 (C19), 136.7 (C20), 197.7 (CO); IR (Pentan): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 2096\text{vw}$, 2059s, 2052w, 2029m, 2011m, 1884w (CO).

3 wurde auf ähnliche Weise aus $[\text{Os}_3(\text{CO})_{10}]$ in 63% Ausbeute hergestellt.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 20°C): $\delta = 7.18$ (d, H1), 6.65 (dd, H2), 6.56 (d, H4), 6.67 (s, O-H3), 4.47 (s, O-H17), 0.92 (s, Me-13), 8.98 (s, $\equiv\text{CH}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (62.87 MHz, CDCl_3 , 20°C): $\delta = 153.5$ (C3), 138.1 (C5), 132.4 (C10), 126.5 (C1), 115.3 (C4), 112.8 (C2), 92.5 (C17), 47.8 (C13), 15.1 (C18), 169.3 (C19), 115.4 (C20), 174.5 (m, CO); IR (CH_2Cl_2): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 2098\text{w}$, 2059m, 2050m, 2022s, 2014s, 1845vw (CO).

Spektroskopische Daten von 5: $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3COCD_3 , 20°C): $\delta = 7.22$ (d, H1), 6.73 (dd, H2), 6.62 (d, H4), 8.10 (s, O-H3), 4.80 (s, O-H17),

1.01 (s, Me-13), – 20.45 (s, Ru-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (62.87 MHz, CDCl_3 , 20°C): $\delta = 153.9$ (C3), 138.1 (C5), 132.4 (C10), 126.5 (C1), 115.2 (C4), 112.7 (C2), 90.7 (C17), 48.6 (C13), 15.0 (C18), 103.8 (C19), 162.9 (C20), 197.1 und 188.5 (s, s, CO, 1:2). IR (CH_2Cl_2): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 2096\text{w}$, 2070s, 2050s, 2017s, 1986w (CO).

Eingegangen am 16. Dezember 1991 [Z 5073]

- [1] T. Ojasoo, J. P. Raynaud, P. P. Mornon, in *Comprehensive Medicinal Chemistry, Vol. 3: Membranes and Receptors* (Hrsg.: J. C. Emmet), Pergamon, Oxford, 1990, S. 1175–1225, zit. Lit.
- [2] a) G. Jaouen in *Transition Metal Organometallics in Organic Synthesis Vol. II* (Hrsg.: H. Alper), Academic Press, New York, 1978, Kap. 2; b) A. D. Ryabov, *Angew. Chem.* 1991, 103, 945–955; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, 30, 931–941.
- [3] a) J. A. Katzenellenbogen, K. E. Carlson, D. F. Heiman, D. W. Robertson, L. L. Wei, B. S. Katzenellenbogen, *J. Biol. Chem.* 1983, 258, 3487–3495; b) E. V. Jensen, D. J. Hurst, E. R. DeSombre, P. W. Jungblut, *Science (Washington, DC)* 1967, 158, 385–387.
- [4] A. Vessières, G. Jaouen, M. Gruselle, J. L. Rossignol, M. Savignac, S. Top, S. Greenfield, *J. Steroid Biochem.* 1988, 30, 301–305.
- [5] K. M. Nicholas, *Acc. Chem. Res.* 1987, 20, 207–214.
- [6] M. Savignac, G. Jaouen, C. A. Rodger, R. E. Perrier, B. G. Sayer, M. J. McGlinchey, *J. Org. Chem.* 1986, 51, 2328–2332.
- [7] A. Vessières, S. Top, A. A. Ismail, I. S. Butler, M. Louer, G. Jaouen, *Biochemistry* 1988, 27, 6659–6666.
- [8] a) N. C. Deno, J. J. Jaruzelski, A. Schriesheim, *J. Am. Chem. Soc.* 1955, 77, 3044–3051; b) C. A. Bunton, M. Carrasco, W. E. Watts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1979, 1267–1273.
- [9] a) S. Aime, A. J. Deeming, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1981, 828–832; b) S. Ermer, R. Karpelus, S. Miura, E. Rosenberg, A. Tiripicchio, A. M. M. Lanfredi, *J. Organomet. Chem.* 1980, 187, 81–90; c) M. Gruselle, C. Cordier, M. Salmain, H. El Amouri, C. Guérin, J. Vaisserman, G. Jaouen, *Organometallics* 1990, 9, 2993–2997.
- [10] a) E. Kimura, T. Koike, *Comments Inorg. Chem.* 1991, 11, 285–301; b) B. L. Allee, D. S. Auld in *Perspectives in Biochemistry* (Hrsg.: H. Neurath), American Chemical Society, Washington, DC, 1991, Kap. 6, S. 69–81.
- [11] B. Misterkiewicz, R. Dabard, A. Darchen, H. Patin, *C. R. Acad. Sci. Ser.* 2 1989, 309, 875–880; b) S. Top, G. Jaouen, unveröffentlicht.
- [12] N. Medici, S. Minucci, V. Nigro, C. Abbondanza, I. Armetta, A. M. Molinari, G. A. Puca, *Biochemistry* 1989, 28, 212–219.
- [13] J. E. Bodwell, N. J. Holbrook, A. Munck, *Biochemistry* 1984, 23, 1392–1398.
- [14] A. Vessières, C. Vaillant, M. Salmain, G. Jaouen, *J. Steroid Biochem.* 1989, 34, 301–305.
- [15] S. Green, P. Walter, V. Jumar, A. Krust, J. M. Bornert, P. Argos, P. Chambon, *Nature* 1986, 320, 134–139.
- [16] J. P. Mornon, V. Bissery, C. Gaboriaud, A. Thomas, T. Ojasoo, J. P. Raynaud, *J. Steroid Biochem.* 1989, 34, 355–361.
- [17] S. E. Fawell, J. A. Lee, R. White, M. G. Parker, *Cell* 1990, 60, 953–962.
- [18] L. Lemesle-Varloot, B. Henrissat, C. Gaboriaud, V. Bissery, A. Morgat, J. P. Mornon, *Biochimie* 1990, 72, 555–574.
- [19] L. Lemesle-Varloot, T. Ojasoo, J. P. Mornon, J. P. Raynaud, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1992, 41, 369–388.
- [20] a) K. W. Harlow, D. N. Smith, J. A. Katzenellenbogen, G. L. Greene, B. S. Katzenellenbogen, *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 17476–17485; b) S. E. Fawell, J. A. Lees, M. G. Parker, *Molec. Endocrinol.* 1989, 3, 1002–1005.

Ionenselektive Hydrazon-Azin-Tautomerisierung eines 14gliedrigen makrocyclischen Liganden**

Von Thomas W. Bell* und Andrew T. Papoulis

Verbrückte Pyridinliganden^[1] einschließlich Toranden^[2] sind vielseitige Komplexbildner für Metall-Ionen. Bei unseren Untersuchungen zur Synthese pyrrolhaltiger Toranden über die Piloty-Umlagerung von Azinen^[3] konnten wir den

[*] Prof. T. W. Bell, A. T. Papoulis
Department of Chemistry, State University of New York
Stony Brook, NY 11794–3400 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (PHS Grant GM 32937) gefördert. Das 600 MHz-NMR-Spektrometer wurde mit Fördermitteln der National Institutes of Health (RR05547 A), der National Science Foundation (CHE 8911350), des Center for Biotechnology und der State University of New York, Stony Brook, erworben.