

- [3] S. E. Cwirla, P. Balasubramanian, D. J. Duffin, C. R. Wagstrom, C. M. Gates, S. C. Singer, A. M. Davis, R. L. Tansik, L. C. Mattheakis, C. M. Boytos, P. J. Schatz, D. P. Baccanari, N. C. Wrighton, R. W. Barrett, W. J. Dower, *Science* **1997**, 276, 1696.
- [4] S. D. Yanofsky, D. N. Baldwin, J. H. Butler, F. R. Holden, J. W. Jacobs, P. Balasubramanian, J. P. Chinn, S. E. Cwirla, E. Peters-Bhatt, E. A. Whitehorn, E. H. Tate, A. Akeson, T. L. Bowlin, W. J. Dower, R. W. Barrett, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 7381.
- [5] J. A. Wells, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1994**, 6, 163.
- [6] A. M. de Vos, M. Ultsch, A. A. Kossiakoff, *Science* **1992**, 255, 306.
- [7] B. Li, J. Y. K. Tom, D. Oare, R. Yen, W. J. Fairbrother, J. A. Wells, B. C. Cunningham, *Science* **1995**, 270, 1657.
- [8] A. C. Braisted, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 5688.
- [9] G. P. Smith, *Science* **1985**, 228, 1315.
- [10] G. P. Smith, J. K. Scott, *Methods Enzymol.* **1993**, 217, 228.
- [11] T. Clackson, J. A. Wells, *Science* **1995**, 267, 383.
- [12] N. C. Wrighton, P. Balasubramanian, F. P. Barbone, A. K. Kashyap, F. X. Farrell, L. K. Jolliffe, R. W. Barrett, W. J. Dower, *Nature Biotechnology* **1997**, 15, 1261.

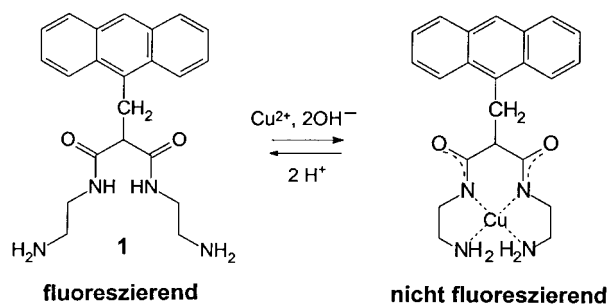
Fluoreszenz-Chemosensoren für Cu^{2+} -Ionen: schnell, selektiv und hochempfindlich

Roland Krämer*

Das Design von Chelatliganden für die selektive Komplexierung von Metallionen ist seit mehreren Jahrzehnten ein zentrales Anliegen der Koordinations- und der supramolekularen Chemie. Durch Kombination des Erkennungsprozesses mit einer leicht quantifizierbaren Signaltransduktion werden chemische Sensoren für Metallionen zugänglich. Zu den Eigenschaften eines „idealen Sensors“ zählen hohe Selektivität für ein Metallion, hohe Empfindlichkeit, schnelles und reversibles Ansprechverhalten, In-situ-Funktion bis hinab in die Mikrometer-Dimension sowie einfache Handhabung. Signaltransduktion auf Fluoreszenzbasis^[1] hat den Vorteil der außerordentlichen Empfindlichkeit und der unmittelbaren Anwendbarkeit in Sensoren mit Glasfaseroptik. Eine neue Generation von fluoreszierenden Verbindungen, in denen eine Chelateinheit und ein Fluorophor diskrete Unter-einheiten eines Moleküls sind,^[2] hat das Potential, den genannten Ansprüchen gerecht zu werden. Versuche, diese Zweikomponentensysteme zur Detektion von Übergangsmetallionen einzusetzen, waren mit Cu^{2+} besonders erfolgreich. Dies überrascht nicht, da Kupfer(II) unter den bedeutenderen Übergangsmetallionen eine besonders hohe Affinität zu typischen N,O-Chelatliganden hat und gleichzeitig eine schnelle Kinetik der Metallionenbindung beobachtet wird. Kupfer ist wegen seiner vielfältigen technischen Verwendung ein in der Umwelt verbreitetes Metall und gleichzeitig ein essentielles Spurenelement in biologischen Systemen. Während es im Vergleich zu anderen Schwermetallen für den Menschen nur wenig toxisch ist, werden Mikroorganismen bereits durch submikromolare Konzentrationen beeinträchtigt. Gegenüber klassischen Fluoreszenzsensoren für Cu^{2+} , in denen die Donoratome Teil des Fluorophor- π -Systems sind,^[3] ermöglicht die räumliche Trennung von chelatbildender Gruppe und Fluorophor ein viel flexibleres Design. Das

wiederum ist die Voraussetzung für die gezielte Optimierung der Sensoreigenschaften im Hinblick auf spezielle Anwendungen.

Im Fluoreszenzsensor **1** von Fabrizio et al. ist eine metallbindende Dioxetetraazaeinheit mit einem lichtemittierenden Anthracenfragment verknüpft (Schema 1).^[4] Unter den in



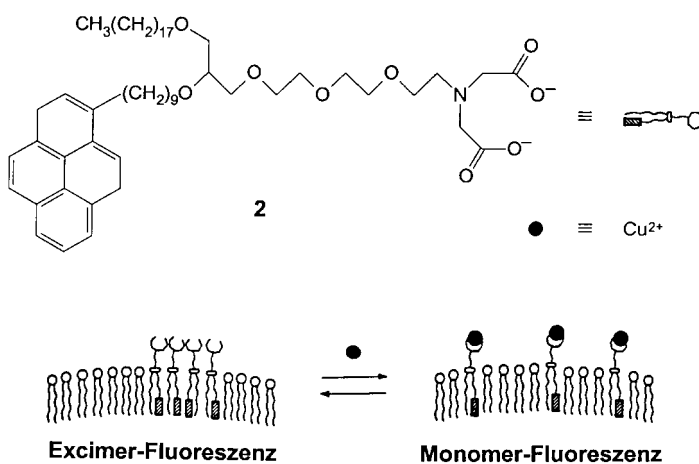
Schema 1. Bindung von Cu^{2+} -Ionen durch **1**.

den letzten Jahren beschrieben Kupfer(II)-Fluoreszenzsensoren dieser Art^[5] zeichnet sich **1** durch reversibles Ansprechverhalten auf nanomolare Cu^{2+} -Konzentrationen bei geringer Querempfindlichkeit gegenüber einer Reihe von anderen Übergangsmetallionen und Protonen aus. Bei Bestrahlung mit 372-nm-Licht zeigt **1** eine intensive Emissionsbande bei 415 nm. Die Fluoreszenz wird durch Koordination eines Kupferions vollständig gelöscht, wahrscheinlich durch einen lichtinduzierten Elektronentransfer vom Metallzentrum zum Fluorophor. Die Kupferkonzentration wird durch Messung der Fluoreszenzintensität mit einem Fluorimeter ermittelt. Metallbindung und Signaltransduktion sind schnell und vollständig reversibel. Die untere Nachweisgrenze liegt bei einer Konzentration von 100 nM Cu^{2+} . Bei pH 7.1 wird das Ansprechverhalten durch Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} in äquimolarer Konzentration nicht beeinflusst, da diese Metalle nicht an den Rezeptor binden. Die Selektivität beruht auf der hohen Affinität von Cu^{2+} -Ionen zu Stickstoffdonoren und auf

[*] Dr. R. Krämer
Anorganisch-chemisches Institut der Universität
Wilhelm-Klemm-Straße 8, D-48149 Münster
Fax: (+49) 251-83-38366
E-mail: KRAMERR@NWZ.UNI-MUENSTER.DE

dessen ausgeprägter Tendenz, im Zuge der Komplexbildung die Deprotonierung von Amid-Stickstoffatomen zu induzieren. Die Metallionen-Selektivität, die Metallbindungskinetik und die Querempfindlichkeit gegenüber Protonen hängen stark von der Struktur der chelatbildenden Gruppe des Fluoreszenzensors ab.^[4]

Noch empfindlicher auf Cu^{2+} -Ionen reagiert ein von Arnold und Mitarbeitern beschriebener Fluoreszenzsensor auf Membranbasis.^[6] Das Lipid **2** ist mit einer fluoreszierenden Pyrengruppe und einer Iminodiacetat-Chelateinheit funktionalisiert. Gibt man **2** bei pH 7.5 zu Distearylphosphatidylcholin-Vesikeln, so bildet es innerhalb der Membran Aggregate (Schema 2). Bei Anregung mit 346-nm-Licht geben die Vesikel zwei Banden im Fluoreszenzspektrum: eine schwache Emission bei 377 nm, die einer geringen Menge isolierter Monomere von **2** zugeordnet wird, und eine breite und intensive Bande bei 470 nm, die Aggregaten von **2** (Pyren-Excimeren) zuzuordnen ist. Die Zugabe von Cu^{2+} -Ionen hat drastischen Einfluß auf das Fluoreszenzspektrum. Die Monomerbande nimmt zu und die Excimerbande ab. Anders als im zuvor beschriebenen Beispiel sind die Kupferionen nicht unmittelbar am Mechanismus der Fluoreszenzlösung beteiligt. Vielmehr bewirkt die Komplexbildung eine Reorganisation der Lipide (Schema 2) durch Dispersion von **2** in der Matrix, was eine Vergrößerung des Monomer-Excimer-Verhältnisses zur Folge hat. Die metallinduzierten Verän-

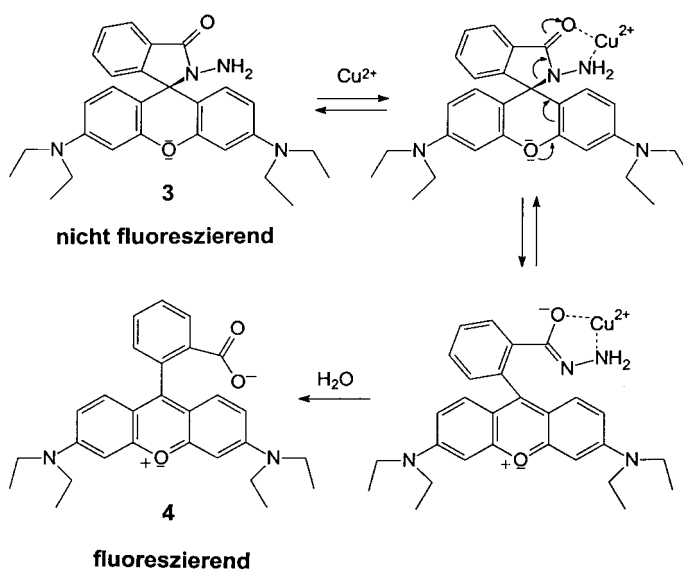


Schema 2. Cu^{2+} -induzierte Änderung der Fluoreszenzeigenschaften einer Phospholipidmembran, die **2** enthält.

derungen im Fluoreszenzspektrum sind schnell und reversibel und ermöglichen die Quantifizierung von Cu^{2+} noch in einer Konzentration von 5 nM. Der Sensor spricht auf Cu^{2+} mindestens zehnmals empfindlicher an als auf Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} und Ca^{2+} . Wiederum ist die Selektivität auf die besondere thermodynamische Stabilität des Iminodiacetatkupferkomplexes zurückzuführen. Eine Optimierung des Systems im Hinblick auf analytische Anwendungen ist naheliegend, z. B. für die kontinuierliche Überwachung der Cu^{2+} -Konzentration durch Durchfluß-Fluorimetrie.

Das Rhodamin-B-Hydrazid **3**^[7] von Czarnik et al. ist, da die Transduktion des Fluoreszenzsignals nicht reversibel ist, kein Sensor im engeren Sinne und wird treffender als „Chemodo-

simeter“ bezeichnet. **3** ist eine nichtfluoreszierende Verbindung. Die Zugabe von Cu^{2+} -Ionen führt zur Bildung eines N,O-Chelatkomplexes mit der Hydrazidgruppe und anschließend zu einer Redoxhydrolyse unter Freisetzung des fluoreszierenden Rhodamin **4** (Schema 3). Stöchiometrische Rea-



Schema 3. Reaktion von **3** mit Cu^{2+} -Ionen.

gentien zur fluorimetrischen Bestimmung von Kupfer, meist auf Basis einer Redoxreaktion, wurden schon vor 30 Jahren beschrieben^[8], aber Czarniks Dosimeter ist das erste, dessen Funktion auf einer Hydrolysereaktion beruht.

Der Vorgang wird durch die besondere Eigenschaft von Cu^{2+} -Ionen induziert, effizient Carbonsäurederivate mit Ankergruppen zu hydrolysieren, z. B. α -Aminoester, Hydroxamsäuren und Hydrazide. Metallerkennung und Signalübertragung sind stöchiometrische, irreversible Prozesse. In einem typischen Experiment wird ein Überschuß an **3** zu einer wäßrigen Cu^{2+} -Probe bei pH 7.5 gegeben und die Menge an freigesetztem **4** durch Messung der Fluoreszenz (Anregung bei 510 nm, Emission bei 578 nm) nach zwei Minuten bestimmt, wenn die Hydrolyse quantitativ ist. Auf diese Weise kann Kupfer noch in einer Konzentration von 10 nM zuverlässig bestimmt werden. Mit der Chemodosimeter-Methode können zwar keine Realzeit-Konzentrationen ermittelt werden, aber die Selektivität für Kupfer ist aufgrund eines doppelten Auswahlprozesses außerordentlich hoch: Das Ansprechen auf ein Metallion setzt einerseits dessen hohe Affinität zum Sensormolekül und andererseits die hydrolytische Reaktivität voraus. Viele andere Metallionen (z. B. Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) in äquimolarer Menge bewirken nach zwei Minuten keinerlei Zunahme der Fluoreszenzintensität.

Eine Arbeit von Imperiali und Mitarbeitern^[9] zeigt das Potential kombinatorischer Methoden zur Optimierung der Sensoreigenschaften auf. In Anlehnung an die Cu^{2+} -Bindungsstelle des Serumalbumins wurde eine Reihe von Pentapeptiden synthetisiert. Das Metallion wird über die aminoterminalen NH_2 -Gruppe und über deprotonierte Amid-N-Atome gebunden. Als Fluorophor ist in der Seitenkette der N-

terminalen Aminosäure eine 5-(Dimethylamino)naphtalin-1-sulfonamid-Gruppe enthalten, die nicht an der Metallkoordination beteiligt ist. Empfindlichkeit und Selektivität für Cu^{2+} ähneln denen des Fluoreszenzensors **1**. Durch Variation der Aminosäuren können die Sensoreigenschaften auf einfache Weise modifiziert werden; beispielsweise führt der Austausch eines Glycin-Bausteins durch β -Alanin zu einer deutlich verbesserten Selektivität für Cu^{2+} gegenüber Ni^{2+} . Die Immobilisierung der fluoreszierenden Peptide durch kovalente Anbindung an eine Polyethylenglycolmatrix ermöglicht eine kombinatorische Peptidsynthese an fester Phase und ein schnelles Screening der Metallionen-Selektivität durch Beobachtung der Fluoreszenzlöschung direkt in der Polymermatrix.

Die hier beschriebenen Fluoreszenzsensoren für Cu^{2+} -Ionen sind außergewöhnlich empfindlich und selektiv. Für viele andere Metallionen ist die Entwicklung von hochselektiven Reagentien dieser Art noch eine Herausforderung. Die Kombination von Fluorophoren mit hydrolysierbaren Gruppen könnte den Zugang zu neuartigen Systemen für die spezifische Bestimmung von Metallionen mit hoher Hydrolyseaktivität (z.B. Lanthanoid(III)- und Pb^{2+} -Ionen, die besonders effizient Phosphatester spalten) eröffnen.

Stichwörter: Analytische Methoden • Fluoreszenzsensoren • Kupfer • Sensoren

- [1] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1515–1566.
- [2] Für Systeme, in denen Fluorophor und Donoratome des Chelatliganden durch mindestens eine CH_2 -Gruppe getrennt sind, wurde der Ausdruck „konjugierte Fluoroionophore“ geprägt. Frühe Beispiele solcher Verbindungen (siehe z.B. L. R. Sousa, J. M. Larson, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 307) waren zwar in organischen Lösungsmitteln aktiv, aber für In-situ-Konzentrationsbestimmungen von Metallionen in wässriger Lösung ungeeignet.
- [3] A. F. Gutierrez, A. M. De la Pena in *Molecular Luminescence Spectroscopy* (Hrsg.: S. G. Schulman), Wiley, New York, **1985**, Kap. 4, S. 371–546, zit. Lit.
- [4] L. Fabrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, A. Perotti, A. Taglietti, D. Sacchi, *Chem. Eur. J.* **1996**, 2, 75–82; L. Fabrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, A. Perotti, D. Sacchi, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2051–2053; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1975–1977.
- [5] J. Yoon, N. E. Ohler, D. H. Vance, W. D. Aumiller, A. W. Czarnik, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3845–3848; G. De Santis, L. Fabrizzi, M. Licchelli, C. Mangano, D. Sacchi, N. Sardone, *Inorg. Chim. Acta* **1997**, 257, 69–76; E. U. Akkaya, M. E. Huston, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3590–3593.
- [6] D. Y. Sasaki, D. R. Shnek, D. W. Pack, F. H. Arnold, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 994–996; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 905–907.
- [7] V. Dujols, F. Ford, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7386–7387.
- [8] Siehe z.B.: K. Ritchie, J. Harris, *Anal. Chem.* **1969**, 41, 163–166.
- [9] A. Torrado, G. K. Walkup, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 609–610.

Von D-Arabinose zum marinen Naturstoff Eleutherobin

Thomas Lindel*

Eine vor Westaustralien gesammelte Lederkoralle der Gattung *Eleutherobia* erwies sich 1994 als Quelle eines Naturstoffs bemerkenswerter biologischer Aktivität. Fenical et al. führten die cytotoxische Wirkung, die ein Extrakt aus diesem Meerestier zeigte, auf das glycosylierte Diterpenoid Eleutherobin **1** zurück, dessen Struktur durch 2D-NMR-Spektroskopie und hochauflösende Massenspektrometrie aufgeklärt wurde (Abb. 1).^[1] **1** enthält ein bisher ausschließlich bei Naturstoffen aus Horn- und Lederkorallen beobachtetes Eunicellan-Kohlenstoffgerüst. Dieses Strukturelement wurde erstmals 1968 bei Eunicellin **2** aus *Eunicella stricta* gefunden.^[2] Im Unterschied zu **2** sind in **1** C-4 und C-7 und nicht C-2 und C-9 durch ein Sauerstoffatom verbrückt. Zur kleinen Gruppe der Naturstoffe mit einem 4,7-Oxaeunicellan-Gerüst gehören außerdem die aus verwandten Korallen gewonnenen Eleuthoside^[3] sowie die nicht glycosylierten Sarcodictyine^[4] und Valdivone.^[5]

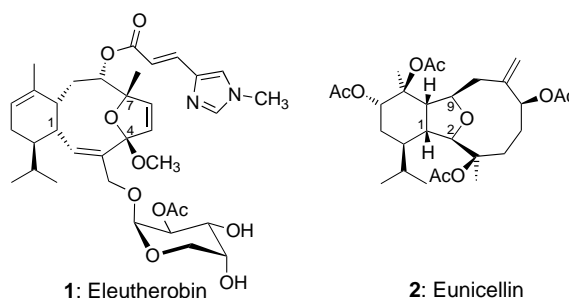


Abb. 1. Die Korallen-Inhaltsstoffe Eleutherobin **1** und Eunicellin **2**.

Eleutherobin **1** konkurriert mit Paclitaxel (ehemals Taxol) um dessen Bindungsstelle an den Mikrotubuli, hemmt deren Depolymerisation und hindert damit Krebszellen an der Teilung.^[6] Paclitaxel war bis 1994 trotz intensiver Suche die einzige Verbindung, für die ein derartiger Wirkmechanismus bekannt war.^[7] Seitdem zeigten mit den Epothilonen^[8] und mit Discodermolid^[9] weitere Naturstoffe diesen Effekt. Die In-vitro-Cytotoxizität reinen Eleutherobins **1** gegen verschiedene Tumorzelllinien beträgt etwa 10–15 nM (IC_{50}), wobei gegenüber bestimmten Brust-, Nieren-, Eierstock- und Lun-

[*] Dr. T. Lindel

Pharmazeutisch-chemisches Institut der Universität
Im Neuenheimer Feld 364, D-69120 Heidelberg
Fax: (+ 49) 6221-546430
E-mail: lindel@convex.phazc.uni-heidelberg.de