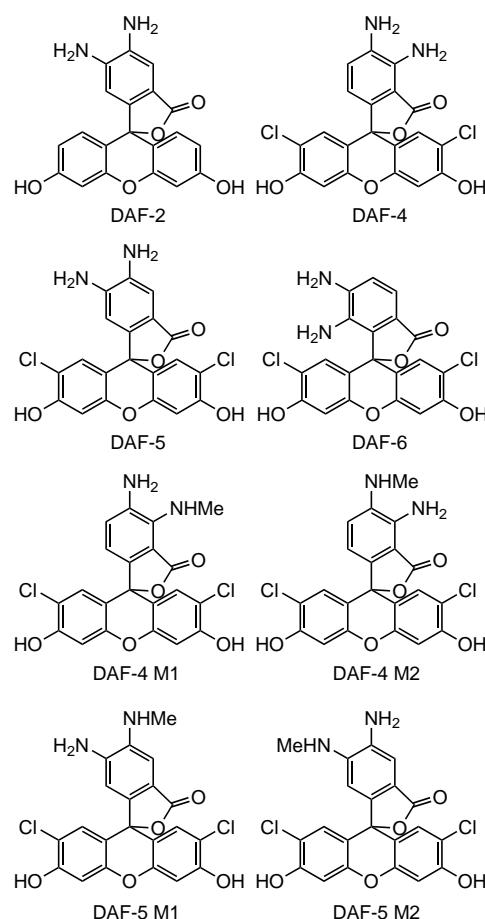


- Styrol: M. Beller, H. Trauthwein, M. Eichberger, C. Breindl, J. Herwig, T. E. Müller, O. R. Thiel, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 1306–1319.
 [12] Das Imin aus 4-Methoxyoxycarbonylanilin und **1a** wurde erfolgreich über diese Methode hergestellt, wohingegen die gewöhnliche Keton-Amin-Kondensation nicht zu befriedigenden Ausbeuten an Produkt führte: F. Takei, K. Yanai, K. Onitsuka, S. Takahashi, *Chem. Eur. J.*, im Druck.
 [13] F. Spindler, B. Pugin, H.-U. Blaser, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 561–562; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 558–559.
 [14] a) M. Balasubramanian, J. G. Keay in *The Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, Vol. 5 (Hrsg.: A. R. Katritzky, C. W. Rees, E. F. V. Scriven), Elsevier, Oxford, **1996**, S. 246–300; b) G. Jones in *The Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, Vol. 5 (Hrsg.: A. R. Katritzky, C. W. Rees, E. F. V. Scriven), Elsevier, Oxford, **1996**, S. 167–243.
 [15] C.-C. Cheng, S.-J. Yan, *Org. React.* **1982**, 28, 37–201; für **4f** und **4g** wurden Ausbeuten von 67 bzw. 55% angegeben.
 [16] G. Lavigne, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 917–930.
 [17] Die Destillation benötigte bei dieser Ansatzgröße 1 h. Längere Destillationszeiten führten zu niedrigeren Ausbeute an isoliertem Produkt (<90%).

Bildung dieser funktionellen Gruppen reagieren. Aus diesem Grund sind nur wenige Reaktionen für diese Anwendung geeignet. Kürzlich wurde über Fluoreszenzsonden für NO (FNOCTs, fluorescent nitric oxide cheletropic traps) berichtet.^[2] Diese reagieren mit NO unter Bildung von nichtfluoreszierenden Verbindungen, die durch in vivo vorkommende Verbindungen wie Ascorbinsäure unter Bildung fluoreszierender Derivate reduziert werden. Sie wurden bisher jedoch noch nicht in biologischen Experimenten eingesetzt.

Wir haben Diaminofluoresceine (DAFs) wie DAF-2 (Schema 1) als Fluoreszenzindikatoren für NO entwickelt.^[3, 4] Die DAFs reagieren nicht direkt mit NO, sondern mit NO⁺-Äquivalenten wie N₂O₃, dem Anhydrid der Salpetrigsäure,



Schema 1. Strukturformeln der fluoreszierenden NO-Sensoren. DAF-2 und DAF-4 wurden bereits früher beschrieben.^[3]

die bei der Autoxidation von NO gebildet werden. Unter aeroben Bedingungen können die DAFs das NO durch Nitrosierung und Dehydrierung unter Bildung stark fluoreszierender Triazol-Fluoresceine (DAF-Ts) abfangen. Dieser Mechanismus ist vorteilhaft, weil er die Signaltransduktion nicht stört, hat aber Nachteile bezüglich der Empfindlichkeit. Unter physiologischen Bedingungen werden in Abwesenheit von NO keine DAF-Ts gebildet, weswegen die DAFs für den direkten Nachweis des von den Zellen hergestellten NO eingesetzt werden können. Bei der Verwendung von DAF-2 für die NO-Detektion in vaskulären Endothelzellen ergibt

Fluoreszenzindikatoren für die Verfolgung der Stickstoffmonoxid-Bildung**

Hirotatsu Kojima, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi, Yasunobu Hirata und Tetsuo Nagano*

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Signalmolekül im lebenden Organismus.^[1] Viele der für NO vorgeschlagenen Funktionen werden jedoch noch kontrovers diskutiert, weil direkte Beweise hierfür fehlen. Der Einsatz von NO-sensitiven Fluoreszenzindikatoren mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung in Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie sollten dieses Problem lösen können. Für die Entwicklung einer NO-Sonde wird eine Reaktion benötigt, bei der NO direkt abgefangen wird; allerdings weist NO selbst nur geringe Reaktivität gegenüber organischen Verbindungen auf. Außerdem löscht eine Nitroso- oder Nitrogruppe im allgemeinen die Fluoreszenz, wenn Farbstoffe mit NO unter

[*] Prof. T. Nagano, H. Kojima, Dr. Y. Urano, Dr. K. Kikuchi, Dr. T. Higuchi

Graduate School of Pharmaceutical Sciences
University of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033 (Japan)
Fax: (+81)3-5841-4855

E-mail: tlong@mol.f.u-tokyo.ac.jp

Dr. Y. Hirata
The Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine
University of Tokyo

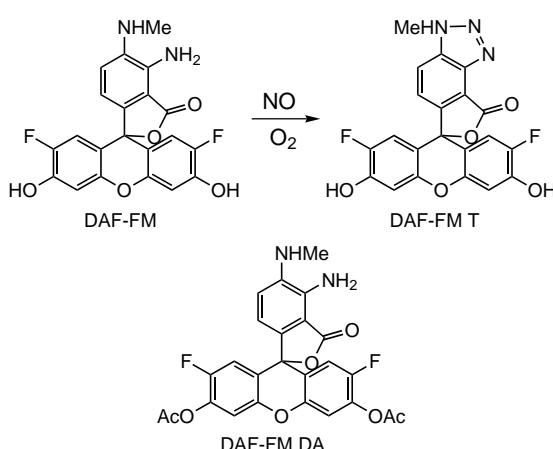
[**] Diese Arbeit wurde durch JSPS Research Fellowships for Young Scientists und durch Grants-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (Nr. 09304061, 10169215 und 10557243) des japanischen Ministeriums für Erziehung, Wissenschaft, Sport und Kultur gefördert. Die Autoren danken Frau M. Morita für ihre Hilfe bei der Herstellung der Zellkulturen von Rinderaorten-Endothelzellen.

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

sich allerdings das Problem der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der DAF-Ts; diese erschwert die Verfolgung von kleinen Änderungen der intrazellulären NO-Konzentration nach einem äußeren Reiz, der zur Verschiebung des intrazellulären pH-Wertes führt. So wurde beispielsweise berichtet, daß die Stimulation mit Bradykinin den pH-Wert in vaskulären Endothelzellen auf 6.5 herabsetzt.^[5] Nachdem wir dieses Problem erkannt hatten, haben wir Dichlorderivate von DAF (DAF-4, DAF-5 und DAF-6; Schema 1) hergestellt.

Die Chloratome erniedrigen aufgrund ihrer Elektronegativität den pK_a -Wert der benachbarten phenolischen OH-Gruppe. Unerwarteterweise waren die Dichlorderivate jedoch schlechter geeignet als DAF-2, was auf ihre instabile Fluoreszenzintensität im neutralen Bereich zurückzuführen ist. Diese Instabilität könnte von einem Triazol-Proton herführen, weshalb wir in die Verbindungen eine Methylgruppe eingeführt haben (DAF-4 M1, DAF-4 M2, DAF-5 M1 und DAF-4 M2; Schema 1). Wegen der geringen chemischen Ausbeute und der niedrigeren Empfindlichkeit von DAF-6, verglichen mit der von DAF-1 bis DAF-5, wurden von DAF-6 keine entsprechenden Derivate hergestellt. Die Empfindlichkeiten dieser neuen Farbstoffe gegenüber NO wurden mit der NO-freisetzenden Verbindung NONOat bestimmt.^[6] Nach 1 h Inkubation mit NONOat bei 37°C (Halbwertszeit: 13.7 min bei 22°C) stieg die Fluoreszenzintensität bei den jeweiligen Emissionswellenlängen von DAF-4, DAF-5, DAF-4 M1, DAF-4 M2, DAF-5 M1 und DAF-5 M2 (jeweils 10 µM) um 360, 339, 75, 417, 195 bzw. 196 Einheiten an. Folglich wies DAF-4 M2 die größte Empfindlichkeit gegenüber NO auf. Die Fluoreszenzintensität der Triazolform von DAF-4 M2 war oberhalb von pH 5.8 stabil.

Es wurde berichtet, daß fluorierte Fluorescein-Derivate resistenter gegen Ausbleichen (photobleaching) als Fluorescein sind und mit der 488-nm-Spektrallinie des Argonionen-Lasers, der in konfokalen Laser-Rastermikroskopen eingesetzt wird, effizient angeregt werden können.^[7] Deshalb haben wir DAF-FM hergestellt (Schema 2), in dem die Chloratome von DAF-4 M2 durch Fluoratome ersetzt sind. Das Ausbleichen wurde im Sonnenlicht getestet. Die Fluoreszenzintensität der Triazolform von DAF-FM (DAF-FM T) sank nach 1, 2 bzw. 3 h von 94 über 63 auf 28% der



Schema 2. Strukturen der fluorierten DAFs und Synthese der Triazolform DAF-FM T.

ursprünglichen Intensität ab, während die Intensitäten von DAF-2 T von 58 über 11 auf 1 % und von DAF-4 T von 81 über 45 auf 20 % abnahmen.

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Fluoreszenzintensität von DAF-FM T wurde ebenfalls untersucht. Der pK_a -Wert der phenolischen OH-Gruppe von DAF-FM beträgt 4.38 ± 0.05 . Die Fluoreszenzintensität ist oberhalb von pH 5.8 stabil (Abbildung 1). Die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften

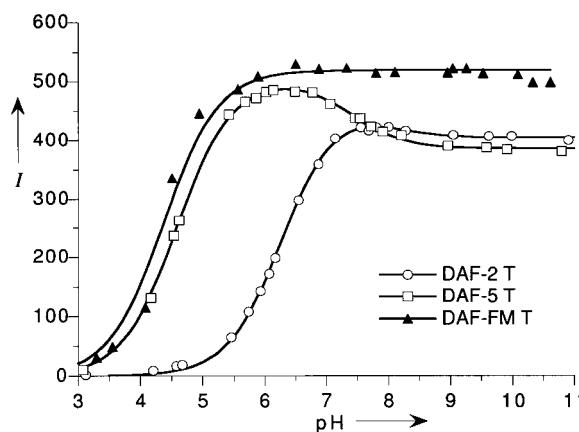


Abbildung 1. Einfluß des pH-Werts auf die Fluoreszenzintensität I der DAF-Ts. Die Triazolformen von DAF-2, DAF-5 und DAF-FM (Endkonzentration 1 µM) wurden zu Natriumphosphatlösungen gegeben, die auf verschiedene pH-Werte eingestellt waren. Die pH-Werte wurden nach dem Mischen gemessen. Die Fluoreszenzintensitäten von DAF-2 T, DAF-5 T und DAF-FM T wurden nach Anregung bei 495, 505 bzw. 495 nm bei 515, 520 bzw. 515 nm detektiert. Die Anpassung der Kurven erfolgte über folgende Gleichungen: DAF-2 T: $I = 460/(1 + 10^{6.27-pH}) - 55.6/(1 + 10^{7.94-pH})$, $R = 1.00$; DAF-5 T: $I = 505/(1 + 10^{4.59-pH}) - 119/(1 + 10^{7.41-pH})$, $R = 1.00$; DAF-FM T: $I = 518/(1 + 10^{4.38-pH})$, $R = 0.994$.

ten der DAFs sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Erwartungsgemäß unterscheiden sich die Absorptionsmaxima von DAF-FM und DAF-2 nicht, sind aber von denen von DAF-4

Tabelle 1. Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von DAF-Farbstoffen.^[a]

Farbstoff	Extinktionskoeffizient [$\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$], Absorptionsmaximum [nm] Diamin	Fluoreszenz- maximum der Triazolform [nm] Triazol	relative Quantenausbeute Diamin	relative Quantenausbeute Triazol
DAF-2	7.9, 486	7.3, 491	513	0.005
DAF-4	9.7, 501	9.2, 505	530	0.002
DAF-FM	8.4, 487	7.3, 495	515	0.005

[a] Alle Messungen wurden bei 20°C in 0.1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7.4) durchgeführt.

verschieden. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität von DAF-FM nach Zugabe von NO ist in Abbildung 2 gezeigt. Aus mit 7 µM DAF-FM kalibrierten NO-Standardkurven läßt sich eine NO-Nachweisgrenze von 3 nM abschätzen. Die Empfindlichkeit von DAF-FM ist 1.4mal höher als die von DAF-2. Diese Steigerung der Empfindlichkeit läßt sich vermutlich auf die größere Reaktionsgeschwindigkeit mit NO^+ -Äquivalenten zurückführen, die aus dem elektronenschiebenden Effekt der Methylgruppe resultiert.

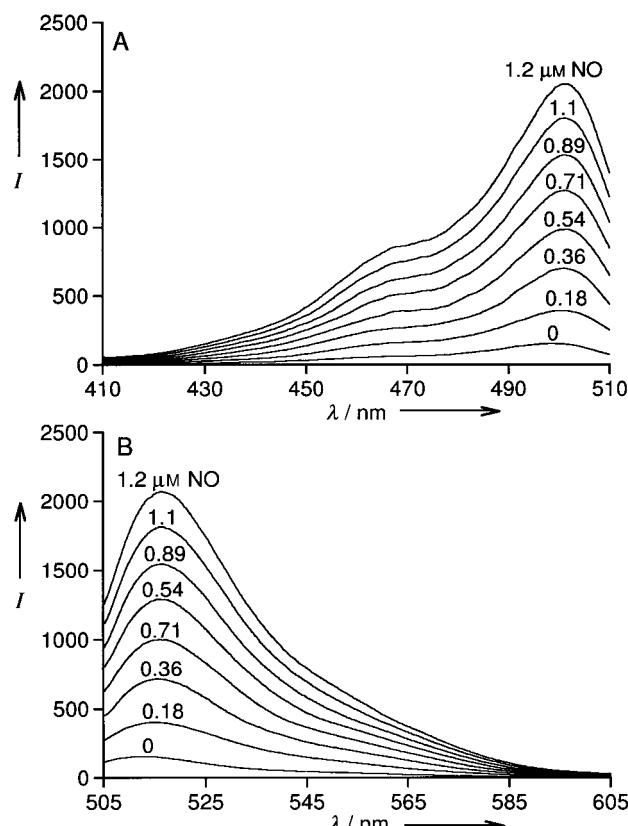


Abbildung 2. Anregungs- (A; Emissionswellenlänge 515 nm) und Emissionsspektren (B; Anregungswellenlänge 500 nm) von DAF-FM bei 37°C in 0.1M Natriumphosphatpuffer (pH 7.4) bei NO-Konzentrationen zwischen 0 und 1.2 μM. Zu einer 7 μM DAF-FM-Lösung wurde unter aeroben Bedingungen eine NO-haltige Lösung gegeben. Die Spektren entsprechen dem Mittelwert aus fünf aufeinanderfolgenden Messungen, die 15 min nach Zugabe der NO-Lösung aufgenommen wurden.

Für den Nachweis von NO in vivo haben wir DAF-FM DA (Schema 2) hergestellt, das gut membrangängig ist und durch Esterasen im Cytosol schnell in wasserlösliches DAF-FM überführt wird. Dort kann der Farbstoff lange Zeit verweilen. Der Indikator DAF-FM DA wurde beim fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von NO in Zellkulturen von Rinderarterien-Endothelzellen eingesetzt. Die Zellen wurden zur Beladung mit dem Farbstoff 1 h bei 37°C mit 10 μM DAF-FM DA inkubiert. Abbildung 3 zeigt die Fluoreszenzbilder vor und nach der Anregung der Zellen mit 0.1 μM Bradykinin. Die Kurve A in Abbildung 4 gibt die entsprechenden Daten wieder. Nach der Anregung nimmt die Fluoreszenzintensität in den Zellen zu, wobei sie im Cytosol stärker ansteigt als im Zellkern. Man glaubt, daß Stickstoffmonoxid im Cytosol gebildet wird, wo sich die NO-Synthase befindet. Unsere Beobachtung legt nahe, daß nur wenig des gebildeten NO in den Zellkern diffundiert oder – wenn es in den Kern diffundiert – nur geringe Mengen davon dort oxidiert werden. Die Kurve B in Abbildung 4 repräsentiert die Kontrolldaten, bei denen eine Zunahme der Fluoreszenzintensität durch den NO-Synthase-Inhibitor L-Nitroargininmethylester (L-NAME) unterdrückt wurde.

Aufgrund dieser Ergebnisse halten wir DAF-FM für ein nützliches Werkzeug zum Nachweis der temporären und räumlichen Verteilung von intrazellulärem NO.

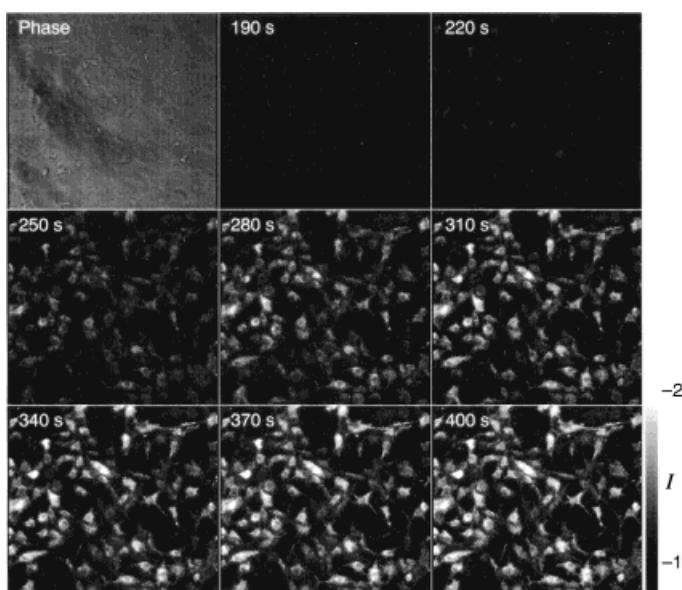


Abbildung 3. Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen von Zellkulturen von Rinderarterien-Endothelzellen, die mit DAF-FM DA inkubiert worden waren. Die bis zur Messung verstrichene Zeit ist angegeben. Nach 200 s wurde Bradykinin (0.1 μM) zugegeben. Die Fluoreszenzaufnahmen sind relativ zur Anfangsintensität zu Meßbeginn dargestellt und entsprechen den Daten der Fluoreszenzintensität in Abbildung 4 (Kurve A).

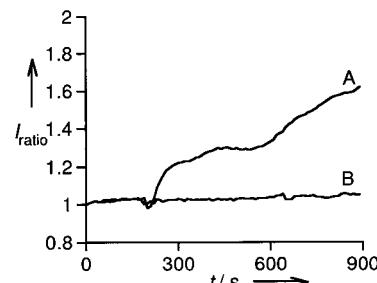


Abbildung 4. Fluoreszenzantwort von mit DAF-FM DA beladenen Zellkulturen von Rinderarterien-Endothelzellen, die die NO-Produktion nach Zugabe von 0.1 μM Bradykinin nach 200 s widerspiegeln. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten in Intervallen von 10 s. A) Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten (I_{ratio}) der Zellen aus Abbildung 3. B) Verhältnis der Fluoreszenzintensität der Zellen in Gegenwart des NO-Synthase-Inhibitors L-NAME (1 mM). Die Kurven entsprechen Mittelwerten der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität in sieben Bereichen, die jeweils eine Zelle enthalten.

Experimentelles

Die Synthese der Indikatoren ist in den Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag beschrieben.

Fluoreszenzspektroskopie: Die DAFs wurden zur Herstellung von 10 mM Stammlösungen in DMSO gelöst. Die relativen Fluoreszenzquantenausbeuten der DAFs und DAF-Ts wurden ermittelt durch den Vergleich der Fläche unter dem korrigierten Emissionspektrum der Testprobe nach Anregung bei 429 nm mit der des Spektrums einer Lösung von Fluorescein in 0.1M Natriumhydroxid, deren Quantenausbeute 0.85 beträgt.^[8] Das Ausbleichen der Farbstoffe (10 μM) wurde in 0.1M Natriumphosphatpuffer (pH 7.4) bestimmt. Die Lösungen wurden an einem schönen Novembertag in Tokyo in 30-mL-Ampullen dem vollen Sonnenlicht ausgesetzt, und jede Stunde wurden Proben entnommen.

Aufzeichnung: Kulturen von primären Rinderarterien-Endothelzellen wurden in nach Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium passagiert, das 10% fetales Rinderserum sowie Antibiotika enthielt. Für die Experimente wurden Zellen zwischen der 13. und 16. Passage verwendet. Die Zellen

wurden zur Beladung 1 h bei 37 °C in PBS(+-Lösung (PBS = phosphate buffered saline), die 10 µM DAF-FM Da (0.2 % DMSO) enthielt, inkubiert und mit PBS(+) gewaschen. Sie wurden auf ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop gebracht (Olympus IX70, Tokyo, Japan), das mit Objektiv ($\times 20$), Anregungsfilter (490 nm), dichroitschem Spiegel (505 nm) und einem Langweg-Emissionsfilter (515 nm) ausgestattet war. Die Lufttemperatur wurde mit einer Wärmebox (IX-IBM, Olympus) auf 37 °C gehalten. Die optischen Signale wurden mit einem Argus-50-Aufzeichnungssystem (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) aufgenommen, das mit einer CCD-Kamera ausgestattet war. Bradykinin und L-NAME wurden von Sigma (St. Louis, MO, USA) bezogen.

Eingegangen am 10. Mai 1999 [Z 13402]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3209–3212

Stichwörter: Farbstoffe • Fluoreszenzspektroskopie • Sensoren • Signaltransduktion • Stickstoffmonoxid

- [1] *Methods Enzymol.* **1996**, *269* (das Zitat bezieht sich auf den ganzen Band).
- [2] M. Bätz, H. G. Korth, R. Sustmann, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1555–1557; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1501–1503.
- [3] H. Kojima, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, T. Nagano, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2446–2453.
- [4] N. Nakatsubo, H. Kojima, K. Kikuchi, H. Nagoshi, Y. Hirata, D. Maeda, Y. Imai, T. Irimura, T. Nagano, *FEBS Lett.* **1998**, *427*, 263–266.
- [5] I. Fleming, M. Hecker, R. Busse, *Circ. Res.* **1994**, *74*, 1220–1226.
- [6] NONOat = (Z)-1-[N-[3-Aminopropyl]-N-[4-(3-aminopropylammonio)butyl]amino]diazene-1-iun-1,2-diolat; siehe: J. A. Hrabie, J. R. Klose, D. A. Wink, L. K. Keefer, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1472–1476.
- [7] W. C. Sun, K. R. Gee, D. H. Klaubert, R. P. Haugland, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6469–6475.
- [8] Y. Nishikawa, K. Hiraki, *Analytical Methods of Fluorescence and Phosphorescence*, Kyoritsu Publishing Company, Tokyo, **1984**, S. 76–80.

Chemisch schaltbare Selbstorganisation von chiralen dreieckigen Metallamakrocyclen**

Tassilo Habereder, Marcus Warchhold, Heinrich Nöth und Kay Severin*

Professor Theodor Severin zum 70. Geburtstag gewidmet

Selbstorganisationsprozesse, die auf Übergangsmetall-Ligand-Wechselwirkungen beruhen, gehören zu den elegantesten Methoden für die Herstellung von großen, makrocyclischen Verbindungen. In den letzten Jahren wurden auf diese Art beeindruckend komplexe Strukturen aufgebaut.^[1] Das Interesse galt dabei zweidimensionalen Polygonen wie Quadraten und Rechtecken, aber auch dreidimensionale Polyeder^[2] und mögliche Anwendungen werden zunehmend

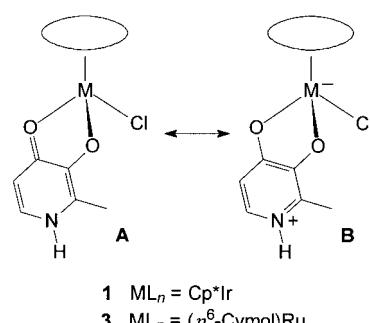
[*] Dr. K. Severin, Dipl.-Chem. T. Habereder, Dipl.-Chem. M. Warchhold, Prof. Dr. H. Nöth
Institut für Anorganische Chemie der Universität
Butenandtstraße 5–13, D-81377 München
Fax: (+49) 89-2180-7866
E-mail: kse@cup.uni-muenchen.de

[**] K.S. dankt Prof. Dr. W. Beck für die großzügige Unterstützung und E. Karaghiosoff für technische Hilfe. Die Arbeit wurde durch den Bayerischen Habilitations-Förderpreis (K.S.) unterstützt.

untersucht.^[1, 3] Im Vergleich zur Literatur zu rechteckigen Aggregaten gibt es vergleichsweise wenig Berichte über dreieckige Metallamakrocyclen.^[4–6] Dies gilt besonders für Komplexe mit starren heterocyclischen Liganden, eine Verbindungsklasse, die sehr erfolgreich bei der Konstruktion von anderen mehrkernigen Aggregaten eingesetzt wurde. Eine mögliche Erklärung, die von Stang et al. vorgeschlagen wurde,^[1b] ist die Tatsache, daß der erforderliche 60°-Winkel relativ selten in der Übergangsmetallchemie vorkommt.^[7]

Wir beschreiben hier die Synthese und die Struktur von zwei chiralen, dreieckigen Makrocyclen, bei denen Halbsandwichkomplexe von Iridium(III) und Ruthenium(II) die Eckplätze besetzen. Der heterocyclische verbrückende Ligand ist 3-Hydroxy-2-methyl-4(1H)-pyridon. Dieser Ligand^[8] sowie N-substituierte Derivate^[9] können ausgehend von kommerziell erhältlichem 3-Hydroxy-2-methyl-4-pyron (Malitol) leicht synthetisiert werden. Sie haben beachtliches Interesse gefunden, da sie sehr gute Chelatliganden für zahlreiche Metallionen darstellen, besonders für Eisen(II).^[10] Kürzlich haben wir über erste Beispiele von metallorganischen Komplexen mit N-Alkyl- und N-Arylpyridonen berichtet.^[11] Im Laufe unserer Arbeiten erkannten wir, daß das unsubstituierte 3-Hydroxy-2-methyl-4(1H)-pyridon ideal für die Synthese von wohldefinierten, mehrkernigen Übergangsmetall-Aggregaten sein sollte. Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war der chirale Pentamethylcyclopentadienyl(Cp*)-Iridium(III)-Komplex **1**. Diese Verbindung konnte als racemische Mischung ausgehend von $[(\text{Cp}^*\text{IrCl}_2)_2]$ und 3-Hydroxy-2-methyl-4(1H)-pyridon in der Gegenwart von einem Äquivalent Base erhalten werden.

In Übereinstimmung mit früheren Studien über Übergangsmetall-Pyridon-Komplexe wurde angenommen, daß die mesomere Form B (Abbildung 1) signifikant zu der elektronischen Struktur von **1** beiträgt.^[11, 12] Wir gingen daher davon



1 $\text{ML}_n = \text{Cp}^*\text{Ir}$

3 $\text{ML}_n = (\eta^6\text{-Cymol})\text{Ru}$

Abbildung 1. Mesomere Formen, die zur elektronischen Struktur von **1** und **3** beitragen.

aus, daß das Proton am Stickstoffatom sauer sein sollte. Gleichzeitig sollte der Chloridligand labil sein. Die Kombination dieser beiden Charakteristika sollte eine baseninduzierte Oligomerisierung von **1** ermöglichen. Und in der Tat entsteht der gelbe Komplex **2** in quantitativer Ausbeute, wenn **1** mit einem Äquivalent NaOMe (oder NEt₃) in Methanol gerührt wird (Schema 1).^[13] Alternativ kann **2** durch direkte Umsetzung von $[(\text{Cp}^*\text{IrCl}_2)_2]$, dem Pyridonliganden und NaOMe (Molverhältnis 1:2:4) erhalten werden.