

5H); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 19.49 (q; CH_3), 20.0 (q; CH_3), 39.73 (dt; C3), 53.93 (dt; C6), 62.22 (t; C2), 116.39 (dd; CN), 119.36 (m; C4), 125.74 (m; C5), 127.05 (C3_A), 129.58 (C2_A), 129.90 (C4_A), 131.72 (C1_A).

6: 1 mmol LiAlH_4 und 1 mmol AlCl_3 werden in 6 mL THF einige Minuten gerührt, dann wird 1 mmol 5 in 4.5 mL THF langsam zugetropft. Nach 1.5 h bei Raumtemperatur wird in üblicher Weise mit CHCl_3 aufgearbeitet und über Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10/1) chromatographiert. Gelbes Öl. Ausbeute: 18.6% IR (NaCl): ν [cm⁻¹] = 3379, 3319 (NH); ^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3): δ = 1.58 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 2.46–3.03 (m, 6H), 7.14–7.42 (m, 5H), (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 2.86 (d, NH_2); ^{13}C -NMR (63 MHz, CDCl_3): δ = 19.19 (q; CH_3), 20.56 (q; CH_3), 30.05 (q; C3), 41.15 (q; C6), 51.49 (s; C2), 51.93 (tt; CH_2NH_2), 123.08 (m; C4), 125.72 (C5), 126.76 (C4_A), 127.04 (C3_A), 128.31 (C2_A), 142.59 (s; C1_A).

Eingegangen am 18. September 1992 [Z 5581]

- [1] G. Angelini, M. Hanack, M. Speranza, J. Vermehren, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1298.
 [2] R. Glaser, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4237.
 [3] J. Vermehren, M. Hanack, *Chem. Ber.* **1989**, *122*, 331.
 [4] K. Bott, *Angew. Chem.* **1965**, *77*, 132; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1965**, *4*, 148.
 [5] G. A. Olah, N. Friedman, J. M. Bollinger, J. Lukas, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5328.
 [6] R. Beckert, R. Mayer in *Methoden Org. Chem. (Houben-Weyl)* 4th Ed. 1952–, Bd. E11, Teil 1, Thieme, Stuttgart, **1985**, S. 558.
 [7] a) M. Ohoka, T. Kojitani, S. Yanagida, M. Okahara, S. Komori, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3540; b) M. van der Leij, P. A. T. W. Porskamp, B. H. M. Lammerink, B. Zwanenburg, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 811.
 [8] Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, Gesellschaft für wissenschaftlich-technische Informationen mbH, W-7514 Eggenstein-Leopoldshafen 2, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-56716, der Autoren und des Zeitschriftenzitats angefordert werden.
 [9] R. H. Weigmann, E.-U. Würthwein, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3082.
 [10] R. H. Weigmann, E.-U. Würthwein, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6147.

Selektive Photomarkierung in der Mitte von Doppelschichten mit einer photosensitiven Transmembransonde

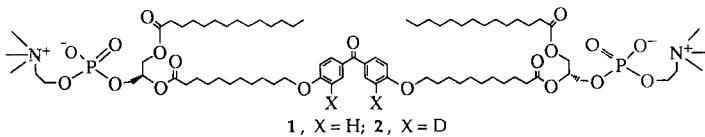
Von *Masakuni Yamamoto, William A. Warnock, Alain Milon, Yoichi Nakatani und Guy Ourisson**

In den siebziger Jahren unternahmen Khorana et al.^[1] und Breslow et al.^[2] den Versuch, das Innere von Membranen mit Hilfe molekularer Sonden zu erforschen, die so aufgebaut waren, daß sie in der richtigen Orientierung in die Phospholipid-Doppelschicht integriert werden sollten. Diese amphiphilen Moleküle enthielten in einem gewissen Abstand von der Kopfgruppe eine photoempfindliche Gruppierung, die nach Aktivierung Kohlenstoffatome der Membrankomponenten in der Nähe der Doppelschichtmitte markieren sollte. Die Ergebnisse waren jedoch enttäuschend: Sowohl wenn Phospholipide als auch wenn Proteine markiert werden sollten, resultierte nach Bestrahlung eine breite räumliche Verteilung der Vernetzungspositionen (bei Proteinen hing die Lage der Vernetzungsposition eher von der Art der Aminosäure als von ihrer Position ab). Mögliche Ursachen hierfür waren die große Beweglichkeit der Phospholipidmatrix, eine durch den Einbau der Sonde oder des Proteins induzierte Fehlordnung oder eine Kombination all dieser Faktoren.

[*] Prof. G. Ourisson, M. Yamamoto, Dr. W. A. Warnock, Prof. A. Milon^[+], Prof. Y. Nakatani
 Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles, associé au CNRS, Université Louis Pasteur
 5 rue Blaise Pascal, F-67084 Strasbourg (Frankreich)

[+] Gegenwärtige Adresse: CRBGC, CNRS, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse (Frankreich)

Wir haben nun versucht, die Regioselektivität solcher Sonden zu verbessern: Zu diesem Zweck wurde die 4,4'-Dialkoxybenzophenon-Einheit, deren photochemische Reaktion mit C-H-Bindungen bekanntlich mit hoher Quantenausbeute verläuft^[3], als photosensitive Gruppe in die Mitte einer Kohlenstoffkette integriert, die an beiden Enden eine Lecithinkopfgruppe trägt und mit ca. 30 Å lang genug ist, um eine normale biologische Membran vollkommen zu durchspannen. Die Synthese von **1**, einer solchen Transmem-



bransonde, wurde von uns bereits beschrieben^[4], ebenso wie einige sehr nützliche Eigenschaften dieser Verbindung: Mischungen aus **1** und 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DMPC) bilden bei der Ultraschallbehandlung in Wasser Vesikel; im Konzentrationsbereich von 2–20 Mol-% wird **1** nahezu vollständig in die DMPC-Vesikel eingebaut; dabei befindet sich das Benzophenon-Chromophor, wie aus dem Absorptionsspektrum ersichtlich wird, in einer lipiden Umgebung, d. h. im Innern der Doppelschicht. Wir zeigen nun, daß der Einbau von **1** in die DMPC-Vesikel mit einer vollständigen Mischbarkeit in der fluiden Phase einhergeht, daß **1** im wesentlichen senkrecht zur Doppelschicht orientiert ist und daß es benachbarte Moleküle (Phospholipide, Sterine und auch Proteine, wie später berichtet werden wird) sehr effizient und regioselektiv nahe der Membranmitte photomarkiert. Diese Regioselektivität ist sehr ausgeprägt (ca. 90% Markierung innerhalb von 3 Å um die Membranmitte), aber nur wenn die DMPC-Vesikel auch einen Cholesteringehalt aufweisen, wie er in biologischen Systemen üblich ist.

Das Phasendiagramm von Mischungen aus DMPC (T_m = 25 °C, ΔH = 24 kJ mol⁻¹) und **1** (T_m = 51 °C, ΔH = 70 kJ mol⁻¹) wurde durch Differentialkalorimetrie (DSC) für zunehmende Konzentrationen an **1** ermittelt (Abb. 1).

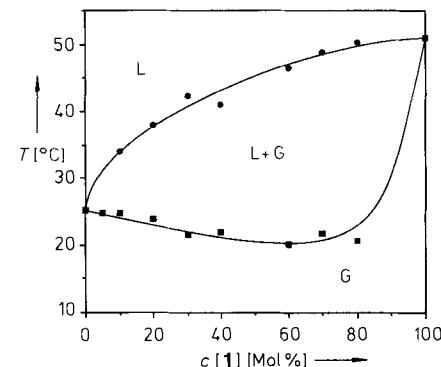


Abb. 1. Phasendiagramm für wässrige Dispersionen aus DMPC + **1**. G: Gelzustand; L: flüssigkristalliner Zustand. ■: Soliduswerte; ●: Liquiduswerte.

Der Phasenübergang von DMPC bei 25 °C bleibt scharf, seine Intensität nimmt jedoch mit wachsendem Gehalt an **1** immer mehr ab. Somit zeigt die Soliduskurve ein monotekisches Phasenverhalten, d. h. eine Nichtmischbarkeit im Gelzustand. Die Temperatur eines weiteren Phasenübergangs (Liquiduskurve) steigt von 25 auf 51 °C, wenn der Anteil an **1** in der Mischung von 0 auf 100 % erhöht wird. Folglich sind die beiden Lipide in der flüssigkristallinen Phase vollständig

mischbar. Dies bestätigt sehr gut die Ergebnisse einer UV-spektroskopischen Untersuchung dieser Liposomen^[4]. Daher haben wir die Markierungsexperimente im flüssigkristallinen Zustand durchgeführt.

Zur Bestimmung der Orientierung der molekularen Sonde in der Membran wurde das deuterierte Derivat **2** über die 3,3'-Diiodverbindung synthetisiert. Das Festkörper-²H-NMR-Spektrum (Bruker MSL-300) wurde an einer Probe aus ausgerichteten Multidoppelschichten gemessen, die nach einem bereits beschriebenen Verfahren^[5] aus einer Lösung von DMPC (90 Mol-%) und der Sonde **2** (10 Mol-%) in 2-Propanol hergestellt wurden. Das ²H-NMR-Spektrum des Multidoppelschichtsystems (Ausrichtung 90° zum Magnetfeld, $T = 318\text{ K}$; Abb. 2) weist zwei Quadrupolaufspaltungen auf: $\Delta\nu_{Q_A} = 2.75\text{ kHz}$ (ca. 90 % der Intensität) und

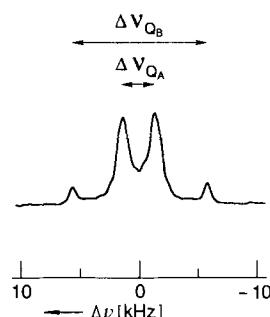


Abb. 2. ²H-NMR-Spektrum von im Winkel von 90° angeordneten Multidoppelschichtsystemen aus DMPC mit 10 Mol-% **2** bei 318 K.

$\Delta\nu_{Q_B} = 10.75\text{ kHz}$ (ca. 10 % der Intensität). Unter Berücksichtigung der inneren Flexibilität und der Geometrie der Benzophenon-Gruppierung^[6] wurde die erste Aufspaltung (A) der gestreckten, membran durchspannenden Orientierung der Sonde **2** zugeordnet und die zweite (B) einer U-förmigen Konformation, bei der beide Kopfgruppen an derselben Seite der Membran angeordnet sind. Auch mit der nichtdeuterierten Sonde **1** in deuteriertem DMPC wurden ²H-NMR-Untersuchungen vorgenommen. Ein Vergleich der Quadrupolaufspaltungen (90°-Winkel, 313 K) von geordneten Doppelschichten aus reinem 1-Myristoyl-2-[D_{2,7}]myristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin ([D_{2,7}]DMPC) und solchen aus [D_{2,7}]DMPC mit 10 Mol-% der Sonde **1** zeigte nur einen Unterschied von weniger als 8 % an jeder Position der 2-Myristoylkette des [D_{2,7}]DMPC. Die Sonde verursacht also in dieser Konzentration nahezu keine Störung der inneren Mobilität der DMPC-Ketten in den Vesikeln.

Bei Bestrahlung (HPK-Quecksilberlampe, 125 W, Philips) einer Suspension von Vesikeln aus 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DPPC, 95 Mol-%) und **1** (5 Mol-%) über 3.5 Stunden bei 50 °C verschwand die Benzophenon-Bande im UV-Absorptionsspektrum vollständig. Nach Gefriertrocknung wurde Natriummethanolat in Methanol zugegeben, um die polaren Kopfgruppen durch Transmethylierung abzuspalten. Die photomarkierten Produkte wurden an einer Sephadex-LH-20-Säule (CHCl₃/MeOH = 1/1) abgetrennt und durch FAB-Massenspektrometrie untersucht (doppeltfokussierendes Massenspektrometer ZAB-HF). Das Intensitätsverhältnis der aus photomarkiertem Palmitat (aus DPPC) und Myristat (aus **1**) erhaltenen Signale (4:1) zeigt, daß intermolekulare und intramolekulare Reaktion fast im gleichen Maße ablaufen. Dies ist in einem kompakten System, bei dem intra- und intermolekulare Reaktionen sich entropisch nicht unterscheiden und bei dem die Sonde in der Phospholipidmatrix stark verdünnt vorliegt,

leicht verständlich: Wenn man annimmt, daß jede membran durchspannende Kette von sechs Fettsäureketten umgeben ist, von denen eine zur molekularen Sonde gehört, folgt als Intensitätsverhältnis 5:1. Dieser geringe Unterschied zwischen inter- und intramolekularer Reaktion ist sehr wichtig, denn die intermolekulare Reaktion ist diejenige, die zur topographischen Analyse herangezogen werden müßte.

Im nächsten Schritt wurde die Verteilung der markierten Positionen der Myristoylketten in DMPC/**1**-Vesikeln untersucht (Abb. 3). Das Rohprodukt der photochemischen Re-

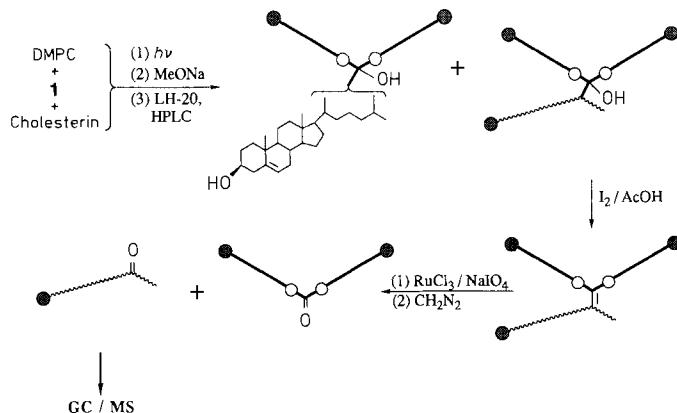


Abb. 3. Reaktionsfolge zur Bestimmung der durch die Photoreaktion funktionisierten Positionen in den Myristoylketten. Bestrahlung von DMPC-Vesikeln, die das Sondenmolekül **1** und Cholesterin enthalten, liefert photomarkiertes Cholesterin und photomarkierte Methylmyristate, die chromatographisch getrennt werden. Cholesterin wird laut Massenspektrum ausschließlich an der Seitenkette markiert. Die photomarkierten Methylmyristate werden mit I₂ dehydratisiert und dann oxidativ mit NaIO₄ zum Dimethylester der aus **1** entstandenen Disäure sowie zu einer Reihe von Methyl-n-oxomyristaten ($n = 4 - 13$) gespalten (Analyse durch GC-MS). Die ausgefüllten Kreise stehen für Methyl-ester-Gruppierungen, die leeren für Phenoxygruppierungen (siehe **1**).

aktion wurde chromatographisch in Fraktionen unterschiedlicher Molekülgröße getrennt, die Fraktion mit tertiären Alkoholen wurde mit Iod dehydratisiert und dann nach der Breslowschen Methode^[2] mit Natriumperiodat und katalytischen Mengen Rutheniumchlorid gespalten. Für jede Photoreaktion an einem anderen Atom als an C-14 liefert diese Aufarbeitung eine Mischung aus Oxoestern mit der Ketofunktion am Reaktionsort; wird das terminale C-14 markiert, so resultiert der Monoester einer α,ω -Disäure, der mit Diazomethan in den α,ω -Diester überführt wird. Die Reaktionsmischung wurde mit GC-MS untersucht. Bei Vesikeln, die nur aus DMPC und der Sonde bestanden, erfolgte die Reaktion hauptsächlich an C-13 ($\omega - 1$: 33 %) und an C-12 ($\omega - 2$: 13 %), war aber auch noch an von der Membranmitte weiter entfernten Positionen nachzuweisen (bis C-4; Abb. 4). C-14 wurde nur wenig angegriffen (ω : 0.6 %), wie aufgrund der geringeren Reaktivität von Methylgruppen im Vergleich zu Methylengruppen auch zu erwarten war.

Die geringe Regioselektivität ist etwas unbefriedigend, obwohl sie ausgeprägter ist als die früher erreichten^[1, 2]. Ursache für die Markierung an weit von der Membranmitte entfernten Positionen wie C-4 könnten die in U-Konformation vorliegenden Sondenmoleküle sein, da bei ihnen die angeregte Carbonylgruppe alle Kohlenstoffatome der benachbarten Ketten erreichen kann. Wir wollten daher das Auftreten einer solchen U-Konformation verhindern; dies könnte man mit unbeweglicheren Varianten der Sonde **1** – solche werden derzeit synthetisiert – erreichen oder auch dadurch, daß man den Anteil der gestreckten Form von **1** weiter erhöht, was, wie wir glaubten, durch Zugabe eines Partners, der das System weniger flexibel macht, d. h. die Anisotropie der Doppelschicht erhöht, gelingen sollte. Tatsächlich bewirkte die

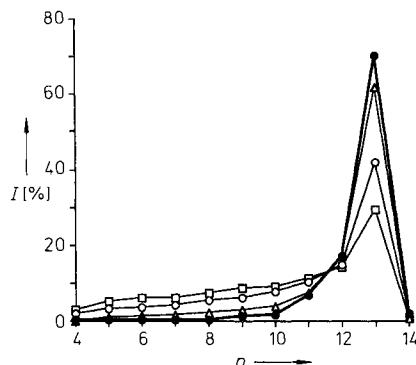


Abb. 4. Verteilung der funktionalisierten Positionen; □: ohne Cholesterin; ○: mit 10 Mol-% Cholesterin; △: mit 20 Mol-% Cholesterin; ●: mit 33 Mol-% Cholesterin. Angegeben ist der prozentuale Anteil I der funktionalisierten Positionen der Myristoylkette. $n = 1$: Carboxy-C-Atom; $n = 14$: C-14 (ω -Position).

Zugabe von steigenden Mengen Cholesterin, einem normalen Bestandteil eukaryontischer Biomembranen, zu der Phospholipidmischung eine spektakuläre Verbesserung der Regioselektivität: Bei einem Gehalt von 33 Mol-% Cholesterin^[7] lag der Reaktionsort zu 90 % an $\omega - 1$ und $\omega - 2$ (Markierung an $\omega - 1$: 72 %). Diese bemerkenswerte Erhöhung der Selektivität lässt sich natürlich durch den ordnenden Einfluß von Cholesterin auf Lipiddoppelschichten erklären, der bereits mit mehreren biophysikalischen Methoden belegt worden ist^[8]. Es gilt noch herauszufinden, ob dieser Einfluß in erster Linie auf die Sonde oder auf die Phospholipidmatrix wirkt.

Erwartungsgemäß wurde auch das aufgenommene Cholesterin von der photochemisch angeregten Sonde angegriffen, allerdings nur an der Seitenkette und nicht am Ringsystem, wie FAB-MS-Untersuchungen an der photomarkierten Cholesterinfraktion zeigten. Welche Position(en) in der Seitenkette genau angegriffen wurde(n), wird zur Zeit untersucht.

Diese Ergebnisse belegen, daß unsere Transmembransonde zusammen mit Cholesterin in Phospholipid-Aggregaten die „inhärente“ Eigenschaft von Lipiddoppelschichten, den geringen Ordnungsgrad oberhalb T_m , überwinden kann. Damit sollte eine genauere topographische Untersuchung der Polypeptidketten von membrangebundenen Proteinen möglich sein; für diesen Fall sollte die außergewöhnliche topographische Spezifität unseres Systems von entscheidener Bedeutung sein. In Zusammenarbeit mit Dr. F. Pattus (EMBL, Heidelberg) und Dr. A. van Dorsselaer (Straßburg) haben wir deshalb versucht, die C-terminale, membrangebundene Domäne des in ein Modell-Membransystem eingebauten bakteriellen Proteins Colicin A^[9] zu charakterisieren; dabei konnte bereits eine Vernetzung zwischen der Sonde und dem Polypeptid nachgewiesen werden. Ort und Spezifität der Markierung werden derzeit genau untersucht.

Die hier beschriebene Vorgehensweise könnte auf eine Vielzahl von Sondenmolekülen, die sich von **1** in ihren Kopfgruppen, ihrer Kettenlänge, der Art und der Stellung der photoaktiven Gruppe usw. unterscheiden, ausgedehnt werden.

Eingegangen am 10. September 1992 [Z 5567]

- [1] a) P. Chakrabarti, H. G. Khorana, *Biochemistry* **1975**, *14*, 5021–5033; b) C. M. Gupta, C. E. Costello, H. G. Khorana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 3139–3143; c) A. H. Ross, R. Radhakrishnan, R. J. Robson, H. G. Khorana, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 4152–4161, zit. Lit.
 [2] M. F. Czarniecki, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3675–3676, zit. Lit.
 [3] J. N. Pitts, Jr., H. W. Johnson, Jr., T. Kuwana, *J. Phys. Chem.* **1962**, *66*, 2456–2461.

- [4] Y. L. Divizou, A. Genevois, T. Lazrak, G. Wolff, Y. Nakatani, G. Ourisson, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5743–5746.
 [5] a) I. Schuler, A. Milon, Y. Nakatani, G. Ourisson, A. M. Albrecht, P. Benveniste, M. A. Hartmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 6926–6930; b) M. A. Krajewski-Bertrand, A. Milon, Y. Nakatani, G. Ourisson, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1105*, 213–220.
 [6] K. M. Gough, T. A. Wildman, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9141–9144.
 [7] Man kann bis zu 33 Mol% Cholesterin in DMPC-Doppelschichten einbauen, ohne daß eine Fehlordnung auftritt; siehe R. A. Demel, B. de Kruyff, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *457*, 109–132.
 [8] M. R. Vist, J. H. Davis, *Biochemistry* **1990**, *29*, 451–464.
 [9] M. W. Parker, F. Pattus, A. D. Tucker, D. Tsernoglou, *Nature* **1989**, *337*, 93–96.

Polyoxovanadiumorganophosphonate – Eigenschaften und Struktur einer ungewöhnlichen Pentavanadatverbindung mit einer ins Innere des Clusterhohlraums gerichteten V=O-Gruppe**

Von Qin Chen und Jon Zubieta*

Metallphosphonate wurden in den letzten Jahren aufgrund ihrer potentiellen Verwendbarkeit als Sorbentien, Katalysatoren und Katalysatorträger intensiv untersucht^[1–5]. Zahlreiche neue Verbindungen sind synthetisiert worden, darunter monomolekulare Koordinationsverbindungen^[6, 7], eindimensionale Komplexverbände^[8] sowie Schichtverbindungen^[9, 10]. Speziell für die festen Oxovanadiumorganophosphonate, die zur strukturell vielfältigen Klasse der V-P-O-Feststoffe gehören^[11–13], sind Schichtstrukturen mit abwechselnd organischen und anorganischen Schichten vorgeschlagen worden. Diese Verbindungen können Alkohole erkennen und selektiv voneinander unterscheiden^[10, 14]. Weiter wurde die Technik der Hydrothermalsynthese angewendet, um eine Anzahl großer Polyoxovanadiumorganophosphonat-Anionen herzustellen, die mit kationischen oder neutralen Molekülen Einlagerungsverbindungen wie $[\text{Me}_4\text{N}^+ \subset \text{H}_6(\text{VO}_2)_{16}(\text{CH}_3\text{PO}_3)_8]^{7-}$ ^[15] und $[(\text{H}_2\text{O})_x \subset \text{H}_{12}(\text{VO}_2)_{12}(\text{PhPO}_3)_8]^{4-}$ ^[16] bilden. Im Gegensatz zu diesen Entwicklungen in den Bereichen Feststoffchemie und Hydrothermalsynthese großer Oxovanadiumorganophosphonat-Cluster wurde die Chemie dieser Verbindungen in organischen Lösungsmitteln unter konventionellen Synthesebedingungen kaum untersucht. Wir beschreiben hier Synthese und Struktur des neuartigen fünfkernigen Oxovanadiumorganophosphonats **1** · CH_3OH .



Rote Kristalle von **1** · CH_3OH , die die Form eines Parallelipipeds haben, wurden in ca. 32.4 % Ausbeute bei der Reaktion von $(\text{Bu}_4\text{N})_3[\text{V}_5\text{O}_14]$ ^[17] mit PhPO_3H_2 in Methanol gebildet^[18]. Die Röntgenstrukturanalyse^[19] von **1** · CH_3OH zeigt das Vorliegen von diskreten Bu_4N^+ -Ionen und von Methanol innerhalb des Gitters sowie von $[\text{V}_5\text{O}_7(\text{OCH}_3)_2(\text{PhPO}_3)_5]^{7-}$ -Anionen (Abb. 1). Im Gegensatz zu den auf hydrothermalem Weg synthetisierten zwölf- und sechszehnkernigen V^{IV} -Verbündungen mit hochsymmetrischen, toroidalen Strukturen^[15, 16] ist die Struktur des Anions von **1** die eines sehr unregelmäßigen VV-Clusters. Die zentrale Baugruppe der Struktur ist eine dreikernige $[(\text{VO})_3(\mu_2\text{-O})_2]$ -Einheit. Vier der fünf Phenylphosphonato-

[*] Prof. J. Zubieta, Dr. Q. Chen
 Department of Chemistry, Syracuse University
 Syracuse, NY 13244 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation (Grant CHE 9919910 für J. Z.) gefördert.