

Chloroform (Reinheit 99 %) wurden von Sigma bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Das Chloroform war mit Millipore-Wasser gesättigt. Das Protein wurde in 10 mM Phosphatpuffer gelöst. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Um die Adsorption des reinen Proteins zu messen, wurde ein Chloroformtropfen ausreichender Größe an der Spitze einer Messingkapillare erzeugt, die in eine Lösung des Proteins in Phosphatpuffer eintaucht.

Für die Bestimmung der Coadsorption von Lipid und Protein wurden einige Tropfen einer Lösung des Lipids in Chloroform zunächst auf den Boden der mit wässriger Proteinlösung gefüllten Kuvette abgetropft, um eine gesättigte Umgebung zu bilden, und dann wurde ein neuer Tropfen erzeugt. Lipid- und Proteinmoleküle adsorbieren an der Innen- bzw. Außenseite der Chloroform/Wasser-Grenzfläche des hängenden Tropfens und bilden so einen Film. Die zeitliche Entwicklung der Tropfenform wurde mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Aus Form und Größe des Tropfens wurden unter Berücksichtigung der Adsorptionszeit der beiden Komponenten die Grenzflächenspannungen  $\gamma$  ermittelt. Die Aufnahme und Analyse der Bilder des hängenden Tropfens wurden wie in Lit. [2] beschrieben durchgeführt. Die Bildungszeit und die Lebensdauer des Tropfens wurden per Computer exakt erfasst.

Für die AFM-Messungen wurde eine gereinigte Glimmerplatte vorsichtig auf den Küvettenboden gelegt. Die Kuvette wurde mechanisch angehoben, sodass die Glimmerplatte den Tropfen berührte, bevor die Faltung der Oberfläche einsetzte (Abbildung 2b). Die wässrige Lösung in der Kuvette wurde mit einer Hamilton-Pumpe entfernt und das Lösungsmittel im Inneren verdampft. Der so erhaltene Film wurde mittels Oberflächenkraftmikroskopie untersucht. Eine ähnliche Prozedur wurde für den kollabierten Tropfen (Abbildung 2 f) angewendet.

Eingegangen am 4. November 1999,  
veränderte Fassung am 14. September 2000 [Z14230]

- [1] M. Bos, T. Nylander, T. Arnebrant, D. C. Clark, *Food Emulsifiers and Their Applications* (Hrsg.: G. L. Hasenhüttl, R. W. Hartel), Chapman and Hall, New York **1997**, S. 95–146.
- [2] a) J. B. Li, V. B. Fainerman, R. Miller, *Langmuir* **1996**, *12*, 5138–5143;  
b) J. B. Li, H. Chen, J. Wu, J. Zhao, R. Miller, *Colloids Surf. B* **1999**, *15*, 289–295.
- [3] M. A. Bos, T. Nylander, *Langmuir* **1996**, *12*, 2791–2797.
- [4] H. Clausen-Schaumann, M. Grandbois, H. E. Gaub, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 950–952.
- [5] V. B. Fainerman, J. Zhao, D. Vollhardt, A. V. Makievski, J. B. Li, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8998.
- [6] J. B. Li, R. Miller, H. Möhwald, *Colloids Surf. A* **1996**, *114*, 113–121.
- [7] U. Dahmen-Levison, G. Brezesinski, H. Möhwald, *Prog. Colloid Polym. Sci.* **1998**, *110*, 269–274.
- [8] E. Donath, G. B. Sukhorukov, F. Caruso, S. A. Davis, H. Möhwald, *Angew. Chem.* **1998**, *16*, 2324–2326; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *16*, 2201–2205.

## Chirale molekulare Erkennung bei der Bildung eines Metalloanthocyan: ein supramolekulares Metallkomplexpigment aus blauen Blumen der Gattung *Salvia patens*\*\*

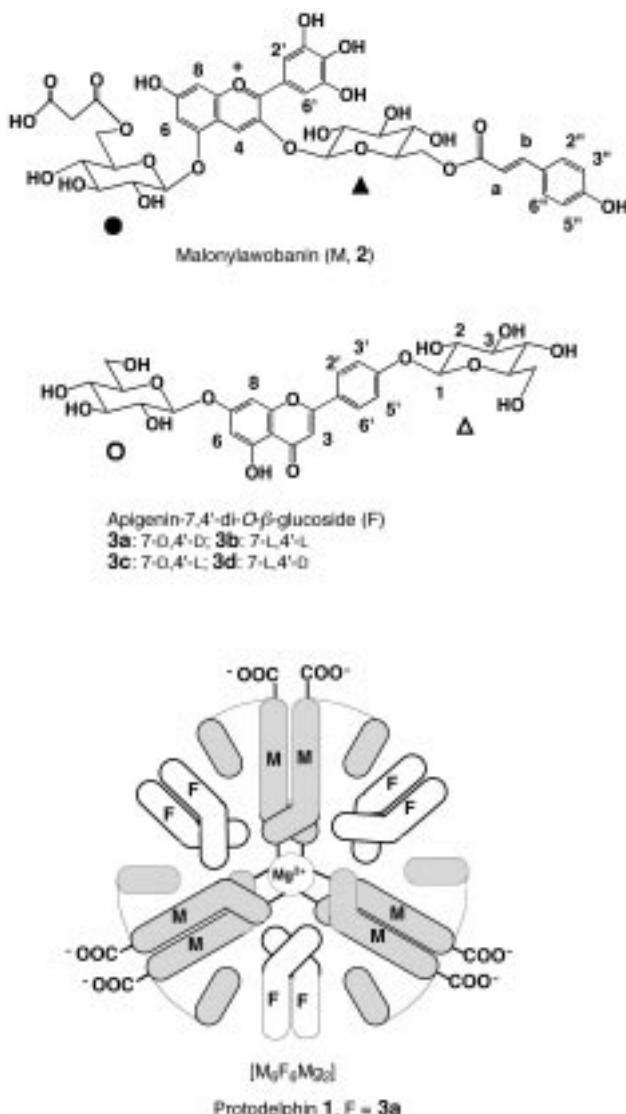
Tadao Kondo,\* Kin-ichi Oyama und Kumi Yoshida

Meistens wird die Farbe blauer Blumen durch ein Metalloanthocyan hervorgerufen,<sup>[1, 2]</sup> ein stöchiometrisches, selbst-organisiertes, supramolekulares Pigment aus sechs Molekülen eines Anthocyan und sechs eines Flavons sowie zwei Metallatomen.<sup>[3, 4]</sup> Wir haben Metalloanthocyan aus den Blättern verschiedener blauer Blumen isoliert und deren Strukturen bestimmt sowie die Entstehung der blauen Farbe durch chemisches Nachbauen einiger Übermoleküle und NMR-spektroskopische sowie röntgenographische Strukturanalysen nachvollzogen.<sup>[1, 3]</sup> Bei diesem Nachbauen zeigte sich, dass eine sehr fein strukturierte und strikte molekulare Erkennung<sup>[5]</sup> vorliegt, zu der auch eine chirale molekulare Erkennung gehört. Die aromatischen Chromophore von Commelinin und Protocyan bilden chirale Stapel, wobei sich jeweils zwei Anthocyan- oder zwei Flavonmoleküle im Gegenuhrzeigersinn sowie Anthocyanidin- und Flavonkerne im Uhrzeigersinn stapeln (Copigmentierung).<sup>[3]</sup> Diese Abläufe müssen durch die Chiralität der an die Anthocyanidin- und Flavon-Einheiten gebundenen Zuckerreste bedingt sein, obwohl bislang keine Belege für diese Hypothese vorliegen.

Wir beschreiben hier die chirale molekulare Erkennung bei der Bildung des Metalloanthocyan Protodelphin **1**.<sup>[6]</sup> Die Bestimmung der Zusammensetzung von **1**, einem genuinen Pigment aus den blauen Blättern der Salbeiplanze *Salvia patens* (Abbildung 1), ergab als Bausteine das Anthocyan Malonylawobanin **2**,<sup>[7]</sup> das Flavon Apigenin-7,4'-di-O- $\beta$ -D-glucosid **3a**<sup>[6, 8]</sup> und Mg<sup>2+</sup>-Ionen (Schema 1). Allgemein verwendbare und effiziente Synthesen für Anthocyane und/oder Flavone, die die optischen Antipoden der Glycoside enthalten, sind für Untersuchungen der molekularen Erkennung notwendig. Wir haben eine verlässliche Glycosylierungs methode für wenig reaktive Phenole in Flavonoiden entwickelt, bei der eine neuartige Lewis-Säure/Base-vermittelte Glycosylierung<sup>[9]</sup> mit Peracetylglucosylfluorid **4**<sup>[10]</sup> verwendet wird. Damit ließen sich natürliches Apigenin-7,4'-di-O- $\beta$ -glucosid **3a** und nichtnatürliche Derivate herstellen, die (teilweise) L-Glucose enthalten (**3b–d**). Die Verwendung dieser synthetischen Apigeninderivate und von natürlichem **2** in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup>-Ionen ermöglichte die Untersuchung der

[\*] Prof. Dr. T. Kondo, K.-i. Oyama  
Chemical Instrument Center  
Nagoya University  
Furo-cho, Chikusa, Nagoya 464-8602 (Japan)  
Fax: (+81) 52-789-3062  
E-mail: tkmail@cic.nagoya-u.ac.jp  
Prof. Dr. K. Yoshida  
Graduate School of Human Informatics  
Nagoya University  
Furo-cho, Chikusa, Nagoya 464-8601 (Japan)

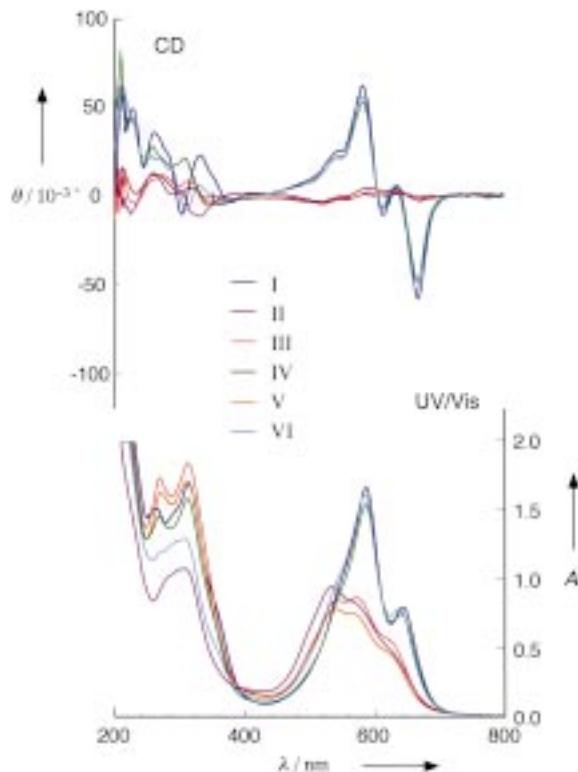
[\*\*] Wir danken Y. Maeda (Chemical Instrument Center, Nagoya University) für Hilfe beim Molecular Modeling. Diese Arbeit wurde vom japanischen Ministerium für Erziehung, Wissenschaft, Sport und Kultur unterstützt (COE-Forschungs-Nr. 07CE2004).

Abbildung 1. *Salvia patens*.Schema 1. Die Komponenten (oben und Mitte) und das ganze Protodelphin **1** (unten). M (**2**) ist als zweizähniger Ligand an  $Mg^{2+}$ -Ionen gebunden, und F (**3a**) ist eingelagert.

chiralen molekularen Erkennung, die bei der Bildung des blauen Komplexpigments abläuft.

Zur Bestimmung der Struktur<sup>[11]</sup> wurde **1** gemäß unserer Nachbaumethode<sup>[3]</sup> aus den Komponenten synthetisiert. Da-

zu wurden die Verbindungen **2** und **3a** sowie  $Mg^{2+}$ -Ionen in einer schwach alkalischen Lösung gemischt und diese durch Gelpermeationschromatographie/Flüssigchromatographie (GPC-LC)<sup>[12]</sup> gereinigt, wobei reines Protodelphin **1** in 61 % Ausbeute erhalten wurde. Die UV/Vis-Spektren des Produkts (Abbildung 2) stimmten völlig mit denen der natürlich vorkommenden Form<sup>[6]</sup> überein. Das Elektrospray-Ionisations-Massenspektrum (ESI-MS)<sup>[13]</sup> von **1** enthielt das Signal

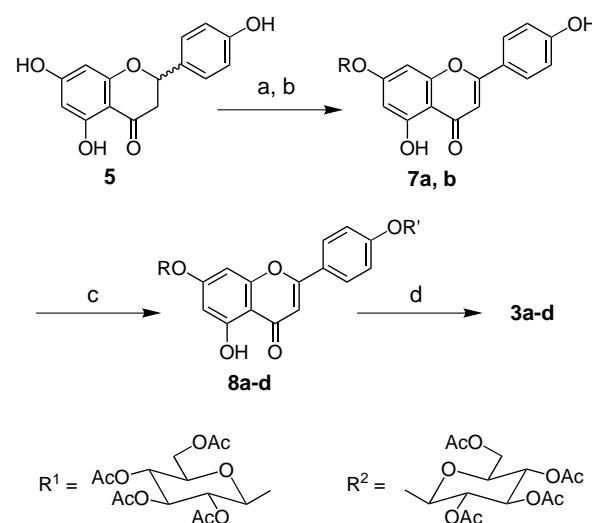
Abbildung 2. CD- und UV/Vis-Spektren von Mischungen aus **2** ( $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) und **3**, **9** oder **10a** (1 Äquiv.) in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen (5 Äquiv.) in Phosphatpuffer (pH 6.0). I = **2 + 3a + Mg<sup>2+</sup>**, II = **2 + 3b + Mg<sup>2+</sup>**, III = **2 + 3c + Mg<sup>2+</sup>**, IV = **2 + 3d + Mg<sup>2+</sup>**, V = **2 + 9 + Mg<sup>2+</sup>**, VI = **2 + 10a + Mg<sup>2+</sup>**.

eines mehrfach geladenen Moleküls bei  $m/z$  1751.8 ( $[M - 5H]^{5-}$ ), das der Zusammensetzung  $C_{396}H_{408}O_{222}Mg_2$  entspricht (durchschnittliche relative Molekülmasse: 8767.95, ber. für  $(M - 5H)^{5-}$ : 1751.37). Im CD-Spektrum (Abbildung 2) ist ein stark negativer Exciton-artiger Cottont-Effekt um 620 nm zu erkennen, demzufolge die Anthocyanidinkerne im Gegenuhrzeigersinn sehr eng gestapelt sein müssen, und das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum enthielt einfache Signale, die einer Anthocyan- und einer Flavon-Einheit zugeordnet werden können. Den weitreichenden Kern-Overhauser-Effekten zwischen Protonen von **2** und **3a** zufolge liegt eine kreuzweise parallele Anordnung der Molekülkerne vor. Diese Daten sprechen dafür, dass die Anordnung der Komponenten in der Bruttostruktur von **1** der in Commelinin sehr ähnlich ist. Daher ist Protodelphin ein stöchiometrisches, supramolekulares Metallkomplexfragment, d.h. ein Commelinin und Protocyan ähnliches Metalloanthocyan (siehe Schema 1).

Obwohl Glycosylflavone in Pflanzen weit verbreitet sind und wegen ihrer biologischen und medizinischen Bedeutung

Aufmerksamkeit erregt haben, sind überraschend wenige Synthesen von Poly-*O*-glycosylflavonen mit befriedigenden Ausbeuten beschrieben worden. Die Nucleophilie der 4'-Hydroxygruppe des B-Rings des Flavonkerns ist sehr gering, daher sind nur wenige direkte 4'-*O*-Glycosylierungen bekannt.<sup>[14]</sup>

Uns gelang nun die Synthese von Apigenin-7,4'-di-*O*- $\beta$ -D-glucosid **3a** durch direkte Glycosylierung des Flavonkerns (Schema 2). Die Kondensation von Naringenin **5** mit Peracetyl-D-glucosylbromid **6a** und die Oxidation mit DDQ liefern-



Schema 2. Synthese der Apigenin-7,4'-di-*O*- $\beta$ -glucoside **3**: a) Peracetylglucosylbromid (**6a** oder **6b**),  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ , Chinolin; b) DDQ, 1,4-Dioxan; **7a**:  $\text{R} = \text{R}^1$  (66%), **7b**:  $\text{R} = \text{R}^2$  (66%); c) Peracetylglucosylfluorid (**4a** oder **4b**),  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , DTBMP/TMG (4/1),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{PhCl}$  (1/6); **8a**:  $\text{R} = \text{R}' = \text{R}^1$  (70%), **8b**:  $\text{R} = \text{R}' = \text{R}^2$  (72%), **8c**:  $\text{R} = \text{R}^1$ ,  $\text{R}' = \text{R}^2$  (66%), **8d**:  $\text{R} = \text{R}^2$ ,  $\text{R}' = \text{R}^1$  (68%); d) 1.  $\text{NaOMe}$ ,  $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$  (2/1); 2. Dowex 50W-8X ( $\text{H}^+$ ); **3a** (92%), **3b** (88%), **3c** (92%), **3d** (94%). **4a**, **6a**: D-Glucosylde-  
rivat; **4b**, **6b**: L-Glucosylde-  
rivat. DDQ = 2,3-Dichlor-5,6-dicyanbenzochi-  
non; DTBMP = 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylpyridin; TMG = 1,1,3,3-Tetra-  
methylguanidin.

ten das Apigenin-7-*O*-peracetyl- $\beta$ -D-glucosid **7a**. Durch Umsetzen von **7a** mit Peracetyl-D-glucosylfluorid **4a** in Gegenwart von  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , DTBMP und TMG wurde Apigenin-7,4'-*O*-di- $\beta$ -D-glucosid als Acetat<sup>[14b]</sup> **8a** in 70% Ausbeute erhalten, und dieses wurde zu **3a** entschützt. Die Kombination von DTBMP und TMG war für die Glycosylierung der 4'-Hydroxygruppe von **7a** essentiell. Auf dieselbe Art konnten wir die nichtnatürlichen Apigenin-7,4'-di-*O*- $\beta$ -glucoside **3b-d**, die sich von L-Glucose ableiten, erhalten – das 7,4'-di-L-Glucosid **3b**, das 7-D-Glucosid-4'-L-glucosid **3c** und das 7-L-Glucosid-4'-D-glucosid **3d**.

Um die Rolle des Flavonteils bei der chiralen Erkennung, die bei der Bildung des Metalloanthocyan abläuft, herauszuarbeiten, mischten wir **2** mit **3b-d** in Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen. Von diesen drei nichtnatürlichen Apigenindiglucosiden gab nur **3d** eine blaue Lösung (Abbildung 3, IV); mit **3b** und **3c** wurden violette Lösungen erhalten (II bzw. III). Die Lösung IV ergab nahezu dieselben UV/Vis- und CD-Spektren wie Protodelphin (siehe Abbildung 2), was darauf hinweist, dass mit **3d** ein Protodelphin-artiges Metalloanthocyan entsteht. Die Farbstabilität der Mischungen ist Abbildung 3 zu-

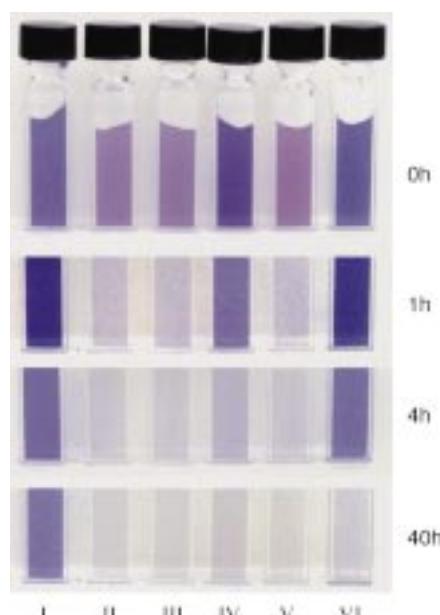


Abbildung 3. Farbstabilität von Mischungen aus **2** ( $5 \times 10^{-4}$  M) und **3**, **9** oder **10a** (1 Äquiv.) in Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen (5 Äquiv.) in Phosphatpuffer (pH 6.0). I = **2** + **3a** +  $\text{Mg}^{2+}$ , II = **2** + **3b** +  $\text{Mg}^{2+}$ , III = **2** + **3c** +  $\text{Mg}^{2+}$ , IV = **2** + **3d** +  $\text{Mg}^{2+}$ , V = **2** + **9** +  $\text{Mg}^{2+}$ , VI = **2** + **10a** +  $\text{Mg}^{2+}$ .

entnehmen. Die Farbe von **1** in neutraler wässriger Lösung (I) war sehr stabil, während sich die blaue Farbe von Lösung IV als nicht so stabil erwies. Das Violett der Lösungen II und III verschwand rasch. Um die Rolle der Glucoside an den 7- und 4'-Hydroxygruppen von Apigenin zu verstehen, stellten wir Apigenin-7-*O*- $\beta$ -D-glucosid **9**<sup>[15]</sup> und -4'-*O*- $\beta$ -D-glucosid **10a**<sup>[16]</sup> her und untersuchten, ob ein Protodelphin-artiges Übermolekül gebildet wird. Mit **10a** wurde in Gegenwart von **2** und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen eine blaue Lösung erhalten, nicht aber mit **9** (Abbildung 2 und 3). Überraschenderweise war die blaue Farbe der Lösung VI, die unter Verwendung von **10a** erhalten wurde, stabiler als die der mit **3d** gebildeten Lösung IV. Weiterhin versuchten wir mit dem enantiomeren Apigenin-4'-*O*- $\beta$ -L-glucosid **10b** einen Komplex zu erhalten, konnten aber kein Metalloanthocyan nachweisen. Dies deutet darauf hin, dass der D-Glucosylrest an der 4'-OH-Position für die Bildung des Metallkomplexpigments unverzichtbar ist. Der D-Glucosylrest an der 7-OH-Position könnte das molekulare Assoziat stabilisieren, während eine L-Glucose den Komplex wegen sterischer Hinderungen destabilisieren würde.

Um die Enantioselektivität der molekularen Erkennung bei der Bildung des Übermoleküls abschätzen zu können, setzten wir **2** mit einer 1:1-Mischung aus **3a** und **3b** sowie  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen um. Die blaue Mischung wurde durch GPC-LC gereinigt, wobei eine blauschwarze Masse in 85% Ausbeute isoliert werden konnte. Das Verhältnis von **3a** zu **3b** im Übermolekül wurde durch HPLC an einer chiralen stationären Phase bestimmt.<sup>[17]</sup> Das Chromatogramm enthielt kein **3b** entsprechendes Signal, d.h., das Verhältnis von **3b** zu **3a** ist kleiner als 2:98.<sup>[18]</sup> Diesem Resultat zufolge wird das L,L-Diglucosid **3b** nicht in den Metallkomplex eingebaut. Das natürliche Anthocyanmolekül „wählt“ demnach nur die D-Serie der Glycosylflavone als Partner zur Bildung des Metalloanthocyan.

Die hohe Enantioselektivität bei der Bildung des Übermoleküls könnte durch die chirale Stapelanordnung der Komponenten in **1** als Folge der Gegenwart der Zuckereinheit verursacht werden. Drei Flavonmoleküle<sup>[19]</sup> lagern sich in **1** zu einer *M*(minus)-Helixstruktur zusammen, die einem Propeller mit drei Blättern ähnelt. Im Zentrum sind sie über ein starkes H-Brückennetzwerk zwischen den Hydroxygruppen an C-2 und C-3 der 4'-*O*- $\beta$ -D-Glucopyranoside gebunden (Abbildung 4). Die beiden Gruppen *M*-helicaler Flavonassoziate passen genau in den freien Raum, der aus dem aus sechs Molekülen **2** und zwei Mg<sup>2+</sup>-Ionen bestehenden Metallkomplex gebildet wird. Ersetzen von D- durch L-Glucose an der 4'-OH-Position von Apigenin könnte die Helizität invertieren, wobei die *P*(plus)-Form entsteht; dies hätte zur Folge, dass die Assoziate der betreffenden Flavone

**3b**, **3c** und **10b** nicht in den freien Raum hineinpassen. Demnach spielt die *M*-Helizität, die durch die drei den D-Glucosylrest an der 4'-Position enthaltenden Moleküle entsteht, eine Schlüsselrolle bei der Bildung des Metalloanthocyans.

Malonylawobanin **2** „wählt“ also selektiv die D-Chiralität des 4'-*O*-Glucosylrests von Apigenin-7,4'-diglucosid beim Bilden des stöchiometrischen supramolekularen Metallkomplexpigments Protodelphin. Diese genaue chirale und strukturelle Erkennung bestimmt die gesamte Metalloanthocyan-Selbstorganisation und bedingt die wunderschöne blaue Farbe der Blumen.

#### Experimentelles

Nachbau von Protodelphin **1**: Achtung: Bei der Reaktion müssen Konzentrationen von wenigstens 10<sup>-2</sup>–10<sup>-3</sup> M eingehalten werden. Eine Mischung aus **3a** (20 mg) in Wasser (1 mL) und einer 0.5 M Lösung von Mg(OAc)<sub>2</sub> (0.2 mL) wurde unter Rühren bei Raumtemperatur zu einer Lösung von **2** (34 mg, 35 μmol) in Wasser (0.6 mL) gegeben, die mit 1.3-proz. wässrigem Ammoniak neutralisiert worden war. Die resultierende blaue Lösung wurde durch GPC-LC gereinigt (Cellurofine GC-15-m), wobei **1** als blauschwarzer Feststoff erhalten wurde (34 mg, 61%). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O; die Bedeutung von ●, ▲, ○ und △ ist Schema 1 zu entnehmen): δ = 4.53 (br. d, *J* = 7.5 Hz, 1H; ●-1), 4.77 (br. s, 1H; M-8), 4.87 (br. d, *J* = 7.5 Hz, 1H; ▲-1), 4.94 (br. d, *J* = 7.5 Hz, 1H; ○-1), 5.13 (br. d, *J* = 7.5 Hz, 1H; △-1), 5.31 (br. s, 1H; F-8), 5.52 (br. s, 1H; F-3), 5.62 (br. s, 1H; M-6), 5.82 (d, *J* = 16 Hz, 1H; M-a), 5.98 (br. s, 1H; F-6), 6.44 (3H; M-3'', F-2''), 6.62 (br. d, 2H; F-2', 3'), 6.73 (1H; M-4), 6.35 (d, *J* = 9 Hz, 2H; M-2'', 6''), 6.75 (d, *J* = 16 Hz, 1H; M-b), 5.62 (s, 1H; F-3), 7.46 (br. s, 2H; F-5'', 6''), 7.79 (br. s, 1H; M-6'), 8.10 (br. s, 1H; M-2'); MS (ESI): *m/z*: 1751.8 ([M - 5H]<sup>5-</sup>).

Ein eingegangen am 15. August 2000 [Z 15638]

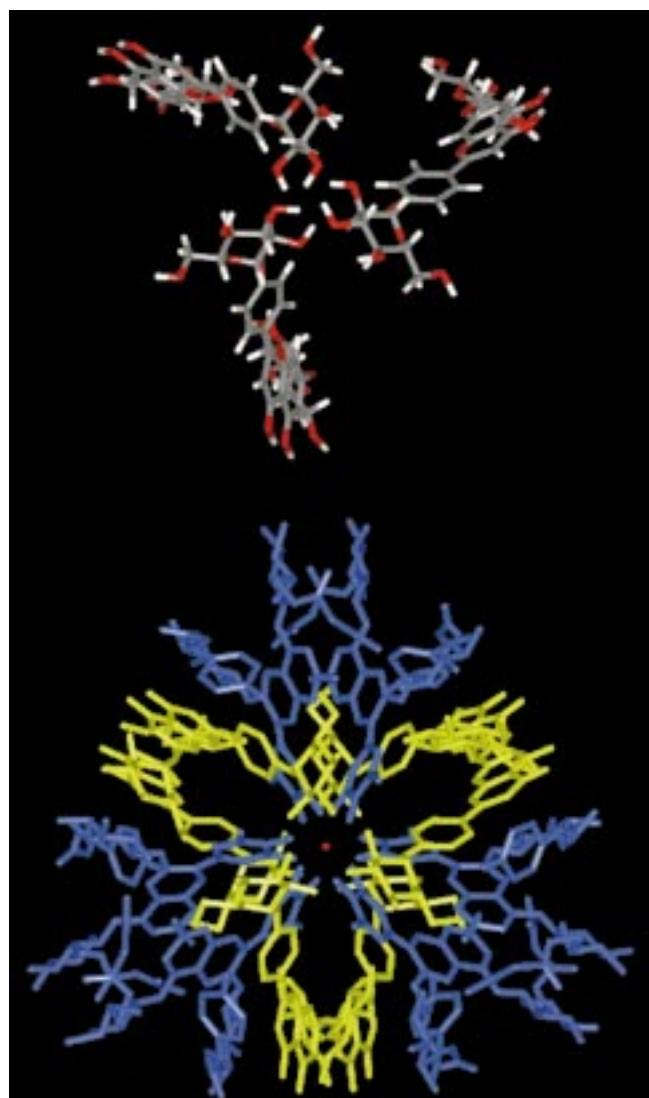


Abbildung 4. Optimierte, einem dreiblättrigen Propeller ähnelndes *M*-helicaler Konformer aus drei Molekülen **3a** (oben) und Bruttostruktur von **1** (unten). Im Pigment ist ein Satz von drei F-Molekülen an der Ober- und einer an der Unterseite vorhanden. Dabei sind die F-Moleküle mit zueinander gerichteten Flächen eingelagert. Die Überstruktur enthält zudem im oberen und unteren Teil je ein Mg<sup>2+</sup>-Ion. Die Wasserstoffatome sind beim Pigment der Übersichtlichkeit halber weggelassen. Farbschema: Anthocyan **2** blau, Flavon **3a** gelb, Mg<sup>2+</sup> rot.

- [1] T. Goto, T. Kondo, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 17–33; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 17–33.
- [2] a) K. Hayashi, Y. Abe, S. Mitsui, *Proc. Jpn. Acad.* **1958**, *34*, 373–378; b) K. Hayashi, K. Takeda, *Proc. Jpn. Acad.* **1970**, *46*, 535–540; c) K. Hayashi, N. Saito, S. Mitsui, *Proc. Jpn. Acad.* **1961**, *37*, 393–397.
- [3] a) T. Kondo, K. Yoshida, A. Nakagawa, T. Kawai, H. Tamura, T. Goto, *Nature* **1992**, *358*, 515–518; b) T. Kondo, M. Ueda, M. Isobe, T. Goto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8307–8310.
- [4] Durch den Vergleich des natürlichen Pigments mit aus den Einzelkomponenten nachgebauten Pigmenten konnten wir zeigen, dass das blaue Pigment aus *Salvia uliginosa* und *Nemophila menziesii* ein Metalloanthocyan ist: T. Kondo, K.-i. Oyama, K. Yoshida, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [5] T. Kondo, K. Yoshida, M. Yoshikane, T. Goto, *Agric. Biol. Chem.* **1991**, *55*, 2919–2921.
- [6] K. Takeda, M. Yanagisawa, T. Kifune, T. Kinoshita, C. F. Timberlake, *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1167–1169.
- [7] T. Goto, T. Kondo, H. Tamura, S. Takase, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4863–4866.
- [8] N. C. Veitch, R. J. Grayer, J. L. Irwin, K. Takeda, *Phytochemistry* **1998**, *48*, 389–393.
- [9] Unser Glycosylierungsverfahren (K.-i. Oyama, T. Kondo, *Synlett* **1999**, 1627–1629) wurde modifiziert.
- [10] M. Hayashi, S. Hashimoto, R. Noyori, *Chem. Lett.* **1984**, 1747–1750.
- [11] Die Zusammensetzung und die Bruttostuktur von natürlichem **1** konnten noch nicht bestimmt werden, was an Schwierigkeiten bei der Reinigung liegt. Der Komplex **1** ist nur in wässrigen Medien löslich, dissoziert beim Verdünnen rasch und entfärbt sich.
- [12] Das Pigment wurde im GPC-Totvolumen mit Wasser eluiert (Cellurofine GC-15-m).
- [13] T. Kondo, M. Ueda, K. Yoshida, K. Titani, M. Isobe, T. Goto, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7457–7458.
- [14] a) L. Farkas, A. Wolfner, M. Nográdi, H. Wagner, L. Hörhammer, *Chem. Ber.* **1968**, *101*, 1630–1632; b) C. Demetzos, A.-L. Skaltsounis, F. Tillequin, M. Koch, *Carbohydr. Res.* **1990**, *207*, 131–137.

- [15] **7a** wurde mit NaOCH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH zu Apigenin-7-O- $\beta$ -D-glucosid **9** umgesetzt: M. Nográdi, L. Farkas, H. Wagner, L. Hörrhammer, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 2783–2790.
- [16] Apigenin-4'-O- $\beta$ -D- und -L-glucosid **10a** bzw. **10b** wurden nach unserem Verfahren hergestellt: Naringenin **5** wurde selektiv an der 7-OH-Position mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid/Imidazol in DMF silyliert. Das resultierende 7-O-Silylnaringenin wurde oxidiert, mit Peracetyl-D- oder -L-glucosylfluorid glycosyliert und mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) und MeONa/MeOH entschützt, wobei **10a,b** entstand.
- [17] Wässrige Trifluoressigsäure (TFA) wurde zum erhaltenen Pigment gegeben und die Lösung durch HPLC an einer CHIRALCEL-OD-R-Säule (DAICEL CHEMICAL) analysiert, wobei bei Raumtemperatur mit TFA/CH<sub>3</sub>CN/Wasser im Verhältnis 0.3/13/86.7 eluiert wurde.
- [18] Eine Mischung aus **3a** und **3b** (Verhältnis 98:2) lieferte zwei vollständig getrennte HPLC-Signale.
- [19] Die Startstruktur von **1** wurde erhalten, indem das Flavocommelinmolekül auf der Grundlage der Kristallstrukturanalyse von Commelinin<sup>[3]</sup> zu **3a** verändert wurde. Die Struktur wurde unter Verwendung von QUANTA-97-CHARMM (Version 23.2) lokal optimiert.

## Synthese eines Arrays aus 837 Varianten der hYAP-WW-Proteindomäne\*\*

Florian Toepert,\* José R. Pires, Christiane Landgraf, Hartmut Oschkinat und Jens Schneider-Mergener\*

Die Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehungen von Proteinen trägt nicht nur zum Verständnis ihrer Wirkungsweise bei, sondern liefert zudem Hinweise für die Synthese von Agonisten und Antagonisten. Die zur Struktur-Funktions-Analyse benötigten Varianten der zu untersuchenden Proteine werden heute fast ausschließlich mit molekularbiologischen Methoden hergestellt. In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die Spotsynthese<sup>[1]</sup> zur hochparallelen, chemisch-synthetischen Proteinherstellung für Struktur-Funktions-Analysen verwendet werden kann. Als Modell wurde wegen der geringen Länge von ca. 40 Aminosäuren die hYAP-WW-Proteindomäne ausgewählt.<sup>[2–7]</sup> Diese Domäne ist eines der kleinsten bekannten Proteinmodule und darüber hinaus ein gut untersuchtes Modell für Studien an  $\beta$ -Faltblättern.<sup>[4, 6, 8, 9]</sup> WW-Domänen spielen bei zahlreichen Krankheiten wie Alzheimer, Chorea Huntington, Liddle-

Syndrom und Muskelatrophie eine Rolle.<sup>[10]</sup> Zur Ausübung ihrer Funktion binden WW-Domänen an kurze, prolinreiche Sequenzabschnitte.<sup>[3, 11]</sup> Die ausgewählte hYAP-WW-Domäne bindet an das Peptid-Kernmotiv PPXY (X = L-Aminosäure).<sup>[5, 12]</sup>

Wir berichten hier über die Synthese eines Arrays aus 837 Varianten der hYAP-WW-Domäne mittels schrittweiser Peptidspotsynthese auf einer Cellulosemembran<sup>[1]</sup> und die Untersuchung der Bindungseigenschaften aller Varianten gegenüber dem Peptidliganden EYPPYPPPPYPSG (Abbildung 1). Um die mit dem Array durchgeführten Bindungsstudien abzusichern, wurden einige ausgewählte WW-Varianten mit

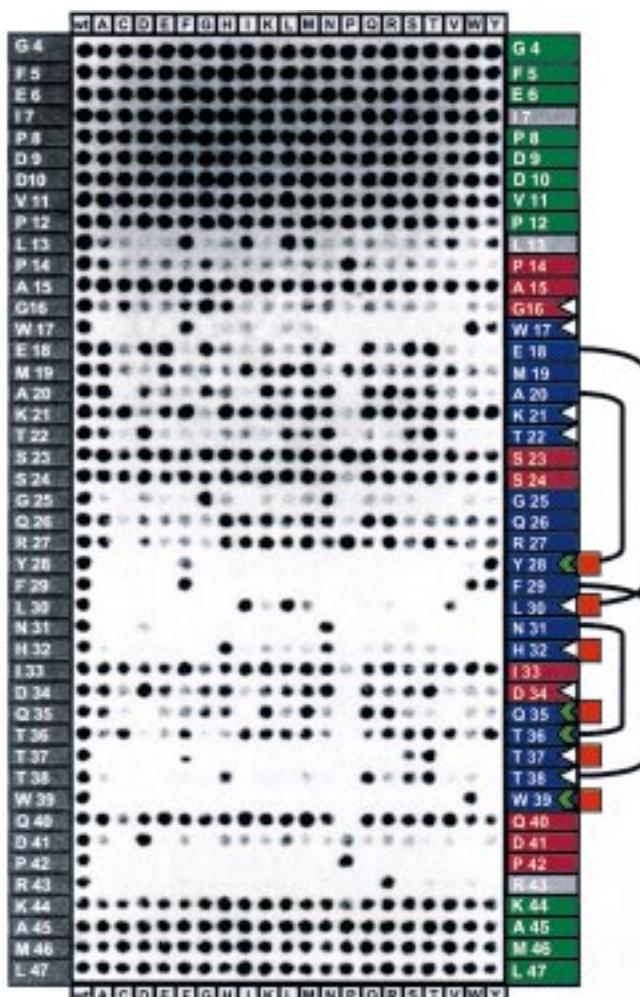


Abbildung 1. Wechselwirkung des mit Peroxidase markierten Peptids EYPPYPPPPYPSG mit einer Bibliothek von hYAP-WW-Varianten. Alle Spots in der linken Spalte enthalten jeweils den Wildtyp (Wt) der hYAP-WW-Domäne. Alle übrigen Spots enthalten Einzelaustausch-Varianten, die wie folgt ausgelesen werden können: Die Zeilen definieren die substituierten Sequenzpositionen. Die jeweils eingegebene Aminosäure ist durch die Spalte festgelegt. Die Abbildung zeigt eine komplett Einzelsubstitutionsanalyse der hYAP-WW-Proteindomäne. Die Nummerierung der Sequenzpositionen und die farbigen Markierungen am rechten Rand beziehen sich auf NMR-Strukturanalysen der hYAP-WW-Domäne:<sup>[4, 13]</sup> grüne Rechtecke (flexible Regionen), rote Rechtecke (Turn-Regionen), blaue Rechtecke (Faltblattregionen), weiße Dreiecke (Veränderung der chemischen Verschiebung bei Ligandenbindung um ca. 0.2 ppm), grüne Dreiecke (starke Veränderung der chemischen Verschiebung bei Ligandenbindung um >0.5 ppm), orangefarbene Quadrate (Domänen-Liganden-Kontakt), schwarze Klammern (intramolekulare Wasserstoffbrücken).

[\*] Dipl.-Biochem. F. Toepert, Prof. Dr. J. Schneider-Mergener,<sup>[+]</sup>

C. Landgraf

Institut für Medizinische Immunologie

Charité, Humboldt-Universität Berlin

Schumannstraße 20–21, 10098 Berlin (Deutschland)

Fax: (+49) 030-2802-6460

E-mail: florian.toepert@charite.de, jsm@charite.de

Dr. J. R. Pires, Prof. Dr. H. Oschkinat

Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie

Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)

[+] Derzeitige Adresse:

Jerini AG

Rudower Chaussee 29, 12489 Berlin (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der DFG (INK 16/B1-1), vom Fonds der Chemischen Industrie und vom Universitätsklinikum Charité, Berlin, unterstützt.