

- [15] **7a** wurde mit  $\text{NaOCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  zu Apigenin-7- $O$ - $\beta$ -D-glucosid **9** umgesetzt: M. Nόgradi, L. Farkas, H. Wagner, L. Hόrhammer, *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  $\text{MeONa}/\text{MeOH}$  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  $\text{TFA}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{Wasser}$  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 Flavocommelinolmolekül 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-

[\*] 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](mailto:florian.toepert@charite.de), [jsm@charite.de](mailto: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

Jérôme 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.

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 durchgeföhrten Bindungsstudien abzusichern, wurden einige ausgewählte WW-Varianten mit

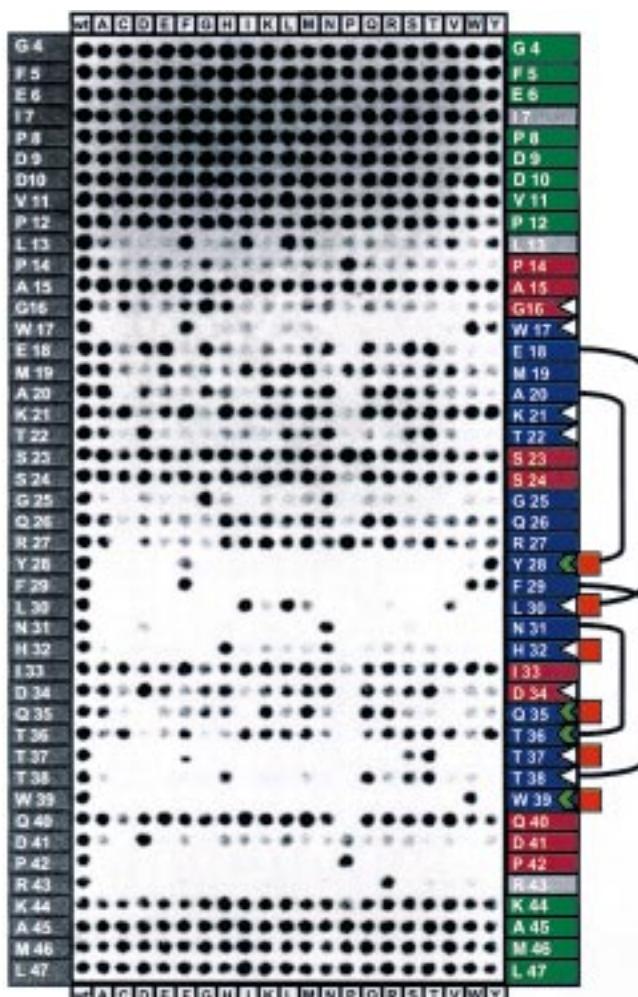


Abbildung 1. Wechselwirkung des mit Peroxidase markierten Peptids EYPPYPPPPYPSG mit einer Bibliothek von hYAP-WW-Varianten. Alle Spots in der linken Spalte enthalten jeweils den Wildtyp (Wt) der hYAP-WW-Domäne. Alle übrigen Spots enthalten Einzelaustausch-Varianten, die wie folgt ausgelesen werden können: Die Zeilen definieren die substituierten Sequenzpositionen. Die jeweils eingebaute 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), orange Quadrate (Domänen-Liganden-Kontakt), schwarze Klammern (intramolekulare Wasserstoffbrücken).

Standardmethoden der Peptidsynthese hergestellt, gereinigt und massenspektrometrisch charakterisiert. Anschließend wurde ihre Affinität zum Peptidliganden mittels Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie bestimmt (Tabelle 1). Die Affinitäten der gereinigten WW-Varianten liegen im Bereich von 1 bis 100  $\mu\text{M}$  und lassen sich gut mit den an den

Tabelle 1. Bindungskonstanten ( $K_D$ ) und Faltungszustand von hYAP-WW-Varianten in Ab- ( $\Delta$ ) und Anwesenheit ( $\Sigma$ ) des Liganden.<sup>[a]</sup>

WW-Variante	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]	$\Delta$	$\Sigma$
Wt (G4-L47)	2.4	+++	+++
L13F	4.6	++	++
L13W	22.3	0	+++
L13Y	11.9	+	++
W17Y	8.9	0	++
K21Y	2.5	+++	+++
S23P	3.5	++	+++
S24L	1.5	++	+++
R27P	4.3	+++	+++
L30K	48.6	++	++
H32Y	> 100	+++	+++
V11-A45	2.9	0	+++
P12-K44	7.3	0	++
L13-R43	20.3	0	++

[a] Das Verhältnis von gefalteter zu ungefalteter Domäne wird mit dem Wildtyp (Wt = 100 %) verglichen: +++ (> 66 %), ++ (33–66 %), + (5–33 %), 0 (< 5 %). Die Varianten in den letzten drei Zeilen sind Verkürzungen der Wildtypsequenz (Gly4 bis Leu47). Angegeben sind jeweils der erste und der letzte Rest der Sequenz.

entsprechenden Arraypositionen erhaltenen Signalintensitäten korrelieren. Außerdem wurde der Faltungszustand der konventionell hergestellten Varianten in An- und Abwesenheit des Liganden mittels NMR untersucht (Tabelle 1). Alle untersuchten Varianten sind in Gegenwart des Liganden gefaltet. Ohne den Liganden ist dagegen bei fünf Varianten keine Faltung nachweisbar. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit denen aus Untersuchungen an gentechnisch hergestellten Varianten (Tabelle 2).

Das Array enthält 837 unterschiedliche WW-Varianten, die sich in jeweils einer Position vom Wildtyp (Wt) unterscheiden. Dabei wurde systematisch jeder der 44 Reste der WW-Domäne gegen die übrigen 19 L-Aminosäuren ausgetauscht (Abbildung 1). Ein Vergleich des gesamten Signalmusters mit

Tabelle 2. Ergebnisse aus Untersuchungen an gentechnisch hergestellten hYAP-WW-Varianten.

WW-Variante	Ligand	Bindung	Faltung <sup>[a]</sup>	Lit.
W17F	GTPPPPYTVG	+	nd	[5]
W17F	EYPPYPPPPYPSG	+	+ <sup>[b]</sup>	[6]
Y28F	GTPPPPYTVG	+	nd	[5]
F29Y	GTPPPPYTVG	+	nd	[5]
H32F	GTPPPPYTVG	-	nd	[5]
H32A	GTPPPPYTVG	-	nd	[4]
Q35A	GTPPPPYTVG	+	nd	[5]
W39F	GTPPPPYTVG	-	nd	[5]
W39F	EYPPYPPPPYPSG	-	+ <sup>[c]</sup>	[6]
P42A	GTPPPPYTVG	-	nd	[5]

[a] Die Affinität der einzelnen WW-Varianten zum Peptidliganden wurde in den meisten Fällen nicht quantifiziert. nd: nicht untersucht. [b] Faltung nur in Anwesenheit des Liganden. [c] Faltung in An- und Abwesenheit des Liganden.

vorausgegangenen Strukturuntersuchungen<sup>[4, 13]</sup> legt Zusammenhänge zwischen der Substitutionsanalyse (Abbildung 1) und der Tertiärstruktur (Abbildung 2) der hYAP-WW-Domäne

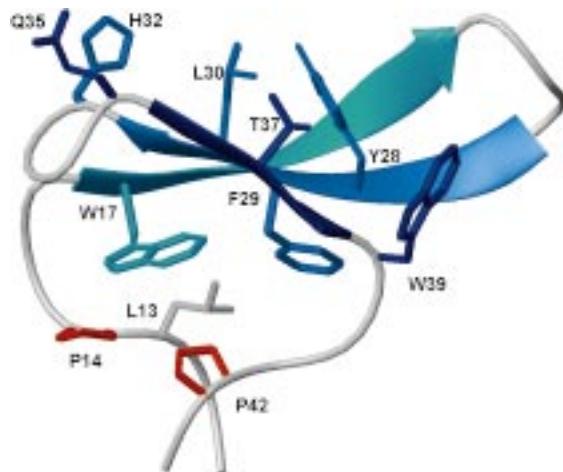


Abbildung 2. Die dreidimensionale Struktur der hYAP-WW-Domäne,<sup>[4]</sup> einschließlich der Reste V11 bis R43. Das dreisträngige  $\beta$ -Faltblatt ist in verschiedenen Blautönen dargestellt (ebenfalls blau in Abbildung 1). Die oberhalb des Faltblatts hervorgehobenen Seitenketten bilden Kontakte zum Liganden. Die unterhalb des Faltblatts dargestellten Seitenketten bilden eine hydrophobe Klammer, die für die Stabilisierung der Struktur der Domäne wichtig ist.

mäne offen. Die Unempfindlichkeit gegenüber Substitutionen in den terminalen Bereichen der Sequenz (Positionen 4–12 und 44–47) steht im Einklang mit einer relativ großen Flexibilität dieser Regionen. Die fünf substitutionstoleranten Positionen im wohlgeordneten, zentralen Bereich (Positionen 15, 23, 24, 33, 40) liegen in den Turn-Regionen. Die geringe Substitutionstoleranz einer Position kann entweder durch die Bedeutung dieser Position für die Bildung der Ligandenbindungsstelle oder durch den Einfluss dieser Position auf die stabile Faltung des Proteins erklärt werden. Die dreidimensionale Struktur des Domänen-Liganden-Komplexes erleichtert die Unterscheidung zwischen diesen beiden Grenzfällen. Die hohe Substitutionsempfindlichkeit der beiden C-terminalen Faltblattstränge (Positionen 25–32 und 35–39) ist verständlich, da diese Region die eigentliche Ligandenbindungsstelle ausmacht. Die für die Faltung des Proteins essentielle Rolle von Pro42 als Zentrum einer hydrophoben Klammer auf der Rückseite des Faltblatts spiegelt sich in der fehlenden Substituierbarkeit dieses Restes wider. Ebenso ist die große Bedeutung der beiden namensgebenden Tryptophane Trp 17 und Trp 39 sichtbar. Die Struktur des Domänen-Liganden-Komplexes zeigt direkte Kontakte zwischen Trp 39 und dem Liganden, während Trp 17 sich auf der Rückseite des Faltblatts befindet. Substitutionen, die die Bindungsaktivität der hYAP-WW-Domäne beeinträchtigen, dürften also im Falle von Position 17 primär die Stabilität der gesamten Domäne beeinflussen, während Substitutionen an Position 39 die Ligandenbindungsstelle direkt verändern. Die Einschränkung der Flexibilität des Peptidrückgrats durch den Einbau der Aminosäure Prolin sollte in einer Proteinstruktur nur an relativ wenigen Stellen möglich sein. Entsprechend befinden sich im wohlgeordneten Bereich der Domäne (Positionen 13–43) nur wenige Positionen, die einen

Einbau von Pro tolerieren. Der an der Bildung der Bindungstasche beteiligte Rest Leu30 ist, in Übereinstimmung mit Literaturdaten, durch die beiden anderen aliphatischen Reste Ile und Val ersetzbar.<sup>[7, 14]</sup> Durch den Vergleich der Sequenzen verschiedener WW-Domänen wurde gezeigt, dass das Kernmotiv von WW-Domänen aus etwa 35–40 Aminosäuren zusammengesetzt ist.<sup>[15]</sup> Die Substitutionsanalyse und die Bindungsstudien an drei verkürzten WW-Varianten (Tabelle 1) ergaben, dass sich eine ligandenbindende hYAP-WW-Variante in diesem Fall auf den Bereich V11 bis A45 eingrenzen lässt. Diese Variante ist allerdings nur in Gegenwart des Liganden gefaltet (Tabelle 1).

Die Spotsynthese hat sich bereits als ein geeignetes Werkzeug zur Charakterisierung von Peptidligand-Protein-Wechselwirkungen erwiesen.<sup>[16, 17]</sup> Bisher wurden allerdings lediglich Variantenbibliotheken des Peptidliganden auf einer Trägeroberfläche synthetisiert, während die Proteine gentechnisch hergestellt wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde mit der schrittweisen Synthese der Variantenbibliothek eines kleinen Proteins zum ersten Mal dieser Ansatz umgekehrt. Frühere Arbeiten belegen, dass Spotsynthese und klassische Festphasenmethoden Peptide ähnlicher Qualität liefern.<sup>[17, 18]</sup> Zur Beurteilung der Qualität der auf der Cellulosemembran synthetisierten WW-Domänen wurden einige den hYAP-WW-Wildtyp enthaltende Spots analysiert. Das gewünschte Produkt konnte eindeutig massenspektrometrisch identifiziert werden (nicht gezeigt). Da nicht auszuschließen ist, dass Abbruchsequenzen nichtbindender WW-Varianten den Liganden binden und auf diese Weise das Ergebnis beeinflussen, wurden mittels Spotsynthese alle Einzeldeletionsvarianten der hYAP-WW-Wildtypsequenz synthetisiert und auf Bindung zum Peptidliganden untersucht (nicht gezeigt). Fast alle Deletionen führen zum Bindungsverlust. Nur die Bereiche 4–12, 23–24 und 44–47 tolerieren das Fehlen einer Aminosäure. Es erscheint daher äußerst unwahrscheinlich, dass Abbruchsequenzen zu falsch positiven Signalen führen. Die Synthese war gut reproduzierbar, mehrere unabhängig voneinander synthetisierte hYAP-WW-Arrays lieferten in Bindungsstudien das gleiche Signalmuster. Ein weiterer Hinweis für die gute Reproduzierbarkeit der Synthese ist die ähnliche Signalintensität der 88 Wildtyp-Spots des Arrays (Abbildung 1).

Die vorliegende Arbeit spiegelt nicht nur die Ergebnisse vorausgegangener Mutagenesestudien an der hYAP-WW-Domäne wider, sondern liefert darüber hinaus eine Vielzahl neuer Erkenntnisse über die Beziehung zwischen Struktur und Funktion in dieser Proteindomäne. Diese systematische Untersuchung aller Einzelaustauschvarianten wäre mit molekulärbiologischen Methoden nur schwer möglich gewesen, da nichtgefaltete Proteine dieser Größe in der Regel *in situ* abgebaut werden. Der parallele Charakter von Synthese und anschließender Bindungstudie macht den vorliegenden Ansatz, insbesondere unter Zuhilfenahme der dreidimensionalen Struktur, zu einem effizienten Werkzeug für die Untersuchung der Faltung und Spezifität kleiner Proteindomänen. Im Hinblick auf neuartige Verfahren zur chemischen Synthese von Proteinen<sup>[19]</sup> sollte die Methode zur Herstellung vollständig synthetischer Protein-Arrays in Zukunft an Bedeutung gewinnen.

## Experimentelles

Synthese der WW-Domänen-Bibliothek: Die Cellulose-gebundenen Peptidbibliotheken wurden mit halbautomatischer Spotsynthese<sup>[12, 18]</sup> (Abimed, Langenfeld; Software LISA (Jerini GmbH, Berlin)) auf Whatman-50-Cellulosemembranen (Whatman, Maidstone, Großbritannien) wie in Lit. [20] beschrieben hergestellt.

HPLC-MS-Analyse Cellulose-gebundener hYAP-WW-Wildtypdomänen: Aus einer Cellulosemembran wurden zehn Spots ausgestanzt (ca. 3 nmol Peptid pro Spot). Die über eine Esterbindung an die Festphase gebundenen Peptide wurden durch 16 h Begasen mit NH<sub>3</sub> abgespalten. Das Peptid wurde aus der Membran mit H<sub>2</sub>O/Trifluoressigsäure (0.5 %) eluiert und mittels HPLC-MS analysiert. System: Hewlett-Packard Serie 1100, gekoppelt mit einem Finnigan-LCQ-Ion-Trap-ESI-Massenspektrometer; Säule: Vydac C18, 150 × 2.1 mm, 5 µm; Fließgeschwindigkeit: 0.3 mL min<sup>-1</sup>; Gradient: 5–95 % B (= Acetonitril) in 17 min. Das gewünschte Produkt wurde bei einer Retentionszeit von 10.1 min identifiziert.

Markierung des Peptidliganden: Der Peptidligand C $\beta\beta$ EYPPYPPPPYPSG ( $\beta=\beta$ -Alanin) wurde über den Cysteinrest mit Maleimid-aktivierter Meerrettichperoxidase (Pierce, Rockford, IL) nach Herstellerangaben verknüpft. Verbliebene Maleimidogruppen wurden mit Sulfanylethanol in zehnfachem Überschuss umgesetzt (1 h, RT). Danach wurde gegen TBS-Puffer (50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 100 mM NaCl, pH 8.0) dialysiert.

Inkubation und Entwicklung der Membran: Die membrangebundenen WW-Domänen wurden ca. 14 h mit Blockierungspuffer umgesetzt (10 % Blockierungsreagens (CRB, Norwich, Großbritannien) und 1 % Saccharose in TBS-Puffer). Anschließend wurde der markierte Peptidligand (2 µg mL<sup>-1</sup>) ca. 14 h im gleichen Puffer bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Danach wurde fünfmal mit TBS gewaschen. Zur Detektion wurde ein Chemilumineszenz-Substrat (Pierce, Rockford, IL) und ein Lumineszenzdetektor (Lumi-Imager, Boehringer Mannheim, Mannheim) eingesetzt.

Synthese des Peptidliganden und der löslichen WW-Varianten für die Bindungs- und Faltungsstudien: Die Synthese wurde nach Standard-Fmoc-Vorschriften (Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl) an einem Peptid-Syntheseautomaten durchgeführt (Abimed, Langenfeld). Die Produkte wurden mittels HPLC gereinigt und MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert.

Messung der Bindungsaaffinitäten der WW-Varianten zum Peptidliganden: Die Messungen erfolgten mit einem BIAcoreX-System in HBS-Puffer (10 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazino]ethansulfonsäure (HEPES), pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA), 0.005 % Polysorbat-20). Der Peptidligand C $\beta\beta$ EYPPYPPPPYPSG wurde auf einem CM5-Sensorchip mit der Ligand-Thiol-Methode nach Herstellerangaben über den Cysteinrest immobilisiert. Die Menge des immobilisierten Liganden entsprach einer Signalzunahme um 400 Resonanzeinheiten. In der Referenzzelle wurde nach demselben Verfahren eine entsprechende Menge des nichtbindenden Peptids C $\beta\beta$ EAPPAPPP-PAPSG immobilisiert. Für die Bindungsexperimente wurden die verschiedenen WW-Varianten bei acht Konzentrationen im Bereich von 200 nM bis 125 µM eingesetzt. Alle Bindungsexperimente wurden bei 25 °C mit einer Fließgeschwindigkeit von 15 µL min<sup>-1</sup> ausgeführt. Die Daten wurden mit dem Programm BIAevaluation 3.0 nach dem Gleichgewichtsverfahren ausgewertet.

Bestimmung des Faltungszustandes der WW-Varianten mittels NMR-Spektroskopie: Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der WW-Varianten (1 mM) und der WW-Varianten im Komplex mit dem Peptidliganden K $\beta\beta$ EYPPYPPPPYPSG im Stoffmengenverhältnis 1:2 wurden auf einem 600-MHz-DRX-Bruker-Spektrometer aufgenommen. Die Experimente wurden in 10 mM wässrigem Phosphatpuffer, pH 6.0, 100 mM NaCl, 0.1 mM Dithiothreitol (DTT), 0.1 mM EDTA bei 15 °C durchgeführt. Zur Beurteilung des Faltungszustandes der WW-Varianten wurde das Verhältnis der Flächen der faltungsabhängigen Indol-NH-Signale von W17 ( $\delta=10.27$ ) und W39 ( $\delta=9.96$ ) im gefalteten bzw. im ungefalteten Zustand (beide  $\delta=10.05$ ) verglichen.<sup>[6, 9]</sup>

Ein eingegangen am 29. November 2000 [Z16191]

- [1] R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217.
- [2] a) P. Bork, M. Sudol, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 531–533; b) M. Sudol, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1996**, *65*, 113–132; c) O. Staub, S. Dho, P. Henry, J. Correa, T. Ishikawa, J. McGlade, D. Rotin, *EMBO J.* **1996**, *15*, 2371–2380; d) A. Tommasi di Vignano, G. Di Zenzo, M. Sudol, G. Cesareni, L. Dente, *FEBS Lett.* **2000**, *471*, 229–234; e) S. Y. Guenette, J. Chen, A. Ferland, C. Haass, A. Capell, R. E. Tanzi, *J. Neurochem.* **1999**, *73*, 985–993; f) M. Waragai, C. H. Lammers, S. Takeuchi, I. Imafuku, Y. Udagawa, I. Kanazawa, M. Kawabata, M. M. Mouradian, H. Okazawa, *Hum. Mol. Genet.* **1999**, *8*, 977–987; g) A. K. Bednarek, K. J. Laflin, R. L. Daniel, Q. Liao, K. A. Hawkins, C. M. Aldaz, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2140–2145.
- [3] M. Sudol, H. I. Chen, C. Bougeret, A. Einbond, P. Bork, *FEBS Lett.* **1995**, *369*, 67–71.
- [4] M. J. Macias, M. Hyvonen, E. Baraldi, J. Schultz, M. Sudol, M. Saraste, H. Oschkinat, *Nature* **1996**, *382*, 646–649.
- [5] H. I. Chen, A. Einbond, S. J. Kwak, H. Linn, E. Koepf, S. Peterson, J. W. Kelly, M. Sudol, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 17070–17077.
- [6] E. K. Koepf, H. M. Petrassi, G. Ratnaswamy, M. E. Huff, M. Sudol, J. W. Kelly, *Biochemistry* **1999**, *38*, 14338–14351.
- [7] M. T. Bedford, D. C. Chan, P. Leder, *EMBO J.* **1997**, *16*, 2376–2383.
- [8] a) R. Ranganathan, K. P. Lu, T. Hunter, J. P. Noel, *Cell* **1997**, *89*, 875–886; b) M. J. Macias, V. Gervais, C. Civera, H. Oschkinat, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 375–379; c) X. Huang, F. Poy, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Sudol, M. J. Eck, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 634–638; d) M. A. Verdecia, M. E. Bowman, K. P. Lu, T. Hunter, J. P. Noel, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 639–643; e) T. Kortemme, M. Ramirez-Alvarado, L. Serrano, *Science* **1998**, *281*, 253–6; f) G. T. Ibragimova, R. C. Wade, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2191–2198; g) J. C. Crane, E. K. Koepf, J. W. Kelly, M. Gruebele, *J. Mol. Biol.* **2000**, *298*, 283–292.
- [9] E. K. Koepf, H. M. Petrassi, M. Sudol, J. W. Kelly, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 841–853.
- [10] a) L. Schild, Y. Lu, I. Gautschi, E. Schneeberger, R. P. Lifton, B. C. Rossier, *EMBO J.* **1996**, *15*, 2381–2387; b) P. W. Faber, G. T. Barnes, J. Srinidhi, J. Chen, J. F. Gusella, M. E. MacDonald, *Hum. Mol. Genet.* **1998**, *7*, 1463–1474; c) S. Rentschler, H. Linn, K. Deininger, M. T. Bedford, X. Espanol, M. Sudol, *Biol. Chem.* **1999**, *380*, 431–442; d) T. Russo, R. Faraonio, G. Minopoli, P. De Candia, S. De Renzis, N. Zambrano, *FEBS Lett.* **1998**, *434*, 1–7.
- [11] a) K. S. Ermekova, N. Zambrano, H. Linn, G. Minopoli, F. Gertler, T. Russo, M. Sudol, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32869–32877; b) A. Komuro, M. Saeki, S. Kato, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 36513–36519; c) M. T. Bedford, D. Sarbassova, J. Xu, P. Leder, M. B. Yaffe, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 10359–10369; d) M. T. Bedford, A. Frankel, M. B. Yaffe, S. Clarke, P. Leder, S. Richard, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16030–16036; e) A. Chang, S. Cheang, X. Espanol, M. Sudol, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20562–20571.
- [12] a) H. I. Chen, M. Sudol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7819–7823; b) H. Linn, K. S. Ermekova, S. Rentschler, A. B. Sparks, B. K. Kay, M. Sudol, *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 531–537.
- [13] „Interaction of proline-rich Peptides and the Wild-type and L30 K Mutant WW Domains of hYAP65 Studied in Solution by NMR Spectroscopy“: J. R. Pires, F. Taha-nejad, T. Ast, R. Kuehne, M. J. Macias, H. Oschkinat, *13th Eur. Symp. Qualitative Structure–Activity Relationships* (Düsseldorf), **2000**, im Druck.
- [14] X. Espanol, M. Sudol, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17284–17289.
- [15] P. Bork, <http://www.bork.embl-heidelberg.de/Modules/ww-gif.html>.
- [16] a) W. J. Tegge, R. Frank, *Methods Mol. Biol.* **1998**, *87*, 99–106; b) U. Reineke, A. Kramer, J. Schneider-Mergener, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1999**, *243*, 23–36; c) U. Reineke, J. Schneider-Mergener, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 59–64.
- [17] H. Wenschuh, R. Volkmer-Engert, M. Schmidt, M. Schulz, J. Schneider-Mergener, U. Reineke, *Biopolymers* **1999**, *55*, 188–206.
- [18] A. Kramer, J. Schneider-Mergener, *Methods Mol. Biol.* **1998**, *87*, 25–39.
- [19] P. E. Dawson, S. B. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923–960.
- [20] A. Kramer, U. Reineke, L. Dong, B. Hoffmann, U. Hoffmuller, D. Winkler, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 319–327.

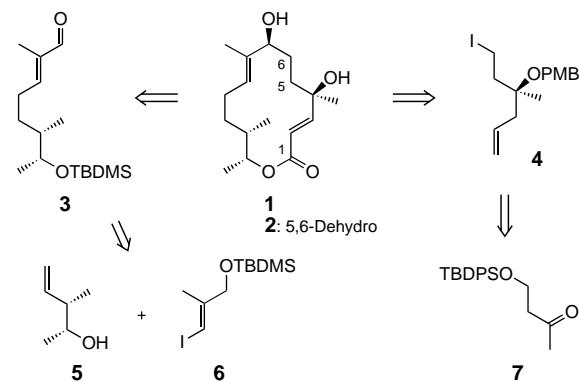
## Totalsynthese des Makrolid-Antibiotikums 5,6-Dihydrocineromycin B\*\*

Lutz F. Tietze\* und Ludwig Völkel

Professor Burchard Franck zum 75. Geburtstag gewidmet

5,6-Dihydrocineromycin B **1** gehört zur Gruppe der Makrolid-Antibiotika mit einer 14-gliedrigen Lacton-Funktionalität und wurde kürzlich von Zeeck et al. zusammen mit Cineromycin B **2** und weiteren Metaboliten aus *Streptomyces* sp. Gö 40/10 isoliert.<sup>[1]</sup> Der Gruppe der Cineromycine und Albocycline – 18 Verbindungen sind zurzeit bekannt – kommt aufgrund ihrer antibiotischen Wirkung insbesondere gegen Staphylokokken erhebliche Bedeutung zu. Bisher gibt es nur eine Arbeit, die sich mit der Synthese dieser Verbindungs-klasse beschäftigt.<sup>[2]</sup> Hier beschreiben wir die erste Totalsynthese von 5,6-Dihydrocineromycin B **1** sowie des 7-*epi*-Dia-steromers **17** und der entsprechenden 2,3,5,6-Tetrahydro-Verbindung **14**.

Die Retrosynthese von **1** führt zu den chiralen Bausteinen **3** und **4** (Schema 1). **3** kann aus dem bekannten Homoallylalkohol **5**<sup>[3]</sup> und dem Vinyliodid **6**<sup>[4]</sup> aufgebaut werden; der tertiäre Homoallylether **4** ist über eine seitenselektive Allylierung<sup>[5]</sup> des Ketons **7** zugänglich.



Schema 1. Retrosynthese von 5,6-Dihydrocineromycin B **1**. TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl, PMB = 4-Methoxybenzyl, TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl.

Der Alkohol **5** wurde für die Kreuzkupplung mit **6** in die silylgeschützte Verbindung **8** und anschließend intermediär durch Umsetzung mit 9-BBN in das entsprechende Boran überführt (Schema 2).<sup>[6]</sup> Bei dessen nachfolgender Reaktion mit **6** führte eine kleine Variation der für derartige Kupplungen üblichen Reaktionsbedingungen zu einer beträchtlichen Steigerung der Ausbeute und Reaktionsbeschleunigung: Die

[\*] Prof. Dr. Dr. hc. L. F. Tietze, Dipl.-Chem. L. Völkel  
Institut für Organische Chemie der Universität  
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)  
Fax: (+49) 551-39-9476  
E-mail: ltietze@gwdg.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der DFG (SFB 416) und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Wir danken Herrn Prof. Dr. A. Zeeck für die Bereitstellung der Daten der Titelverbindung sowie der BASF, der Degussa-Hüls und der Wacker-Chemie für Chemikalien-spenden.