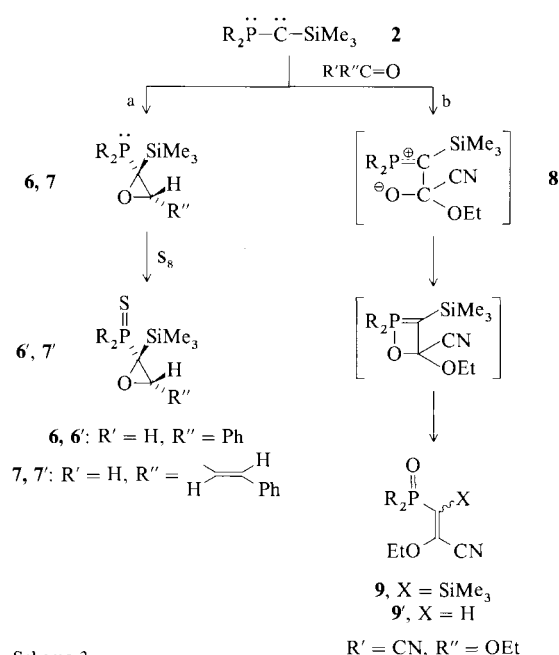
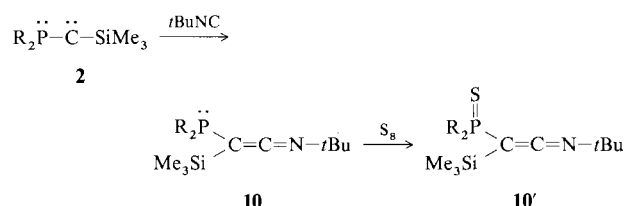


Elektrophile Carbene reagieren mit Carbonylgruppen zu Carbonyl-Yliden ($R_2C=O-CX_2$)^[8]. Es handelt sich dabei um 1,3-dipolare Spezies, die durch [3 + 2]-Cycloadditionen abgefangen oder sogar isoliert werden können^[9]. In einigen Fällen erhält man kleine Anteile des entsprechenden Oxirans^[8a, 10]. Mit Dimethylketon reagiert **2** nicht, addiert sich aber leicht an Benzaldehyd und Zimtaldehyd unter Bildung der Oxirane **6** bzw. **7**. Nach Umsetzung mit Schwefel läßt sich jeweils nur ein Diastereomer von **6'** und **7'** in 80 bzw. 82% Ausbeute isolieren. Diese Ergebnisse stützen einen konzertierten Mechanismus (Weg a), denn ein zwitterionisches Intermediat wie **8** müßte zur Bildung eines Phosphorylalkens führen (Weg b). Verbindungen mit einer sehr elektronenarmen Carbonylgruppe, z. B. Cyanameisensäureethylester, ergeben tatsächlich eine Mischung der *Z*- und *E*-Phosphorylalkene **9** (Tabelle 1); Oxirane werden nicht gefunden (Schema 3)^[11].



Schema 3.

Schließlich reagiert **2** mit *tert*-Butylisocyanid zum Ketenimin **10**. Mit Schwefel ergibt es **10'**, das sich in 90% Ausbeute isolieren läßt. Die Umsetzung von **2** zu **10** kann als Carben-Carben-Kupplung angesehen werden.



Diese Befunde belegen deutlich den nucleophilen Charakter des Carbens **2**. Aufgrund der Konjugation des freien Elektronenpaares des Phosphors hat das p_π -LUMO eine hohe Energie und unterdrückt somit jeglichen elektrophilen Charakter. Nach einfachen Extended-Hückel-Berechnungen sollte Verbindung **2** innerhalb der Carbenselektivitätsskala von Moss^[12] zwischen Dimethoxy- und Dimethylamino(methoxy)-carben liegen: Die Energie des p_π -LUMOs für das Modell $H_2P\dot{C}H$ wird zu -9.2 eV berechnet; die von $(MeO)_2\dot{C}$ und $MeO\dot{C}NMe_2$ liegt bei -9.6 bzw. -8.9 eV. Für den n_σ - p_π -Übergang ergeben die Berechnungen 2.7 eV für $H_2P\dot{C}H$, 2.5 für $(MeO)_2\dot{C}$ und 3.1 für $MeO\dot{C}NMe_2$.

Nach ab-initio-Rechnungen^[13] beträgt der energetische Abstand zwischen Singulett- und Triplettzustand nur 3 kcal mol⁻¹ zugunsten des Singulettzustands, doch die Stereospezifität der Cyclopropanbildung sowie die Kupplung mit *tert*-Butylisocyanid deuten bei **2** auf einen Singulett-Grundzustand hin.

Eingegangen am 12. Dezember 1988 [Z 3085]

- [1] a) A. Baceiredo, G. Bertrand, G. Sicard, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 4781; b) A. Baceiredo, A. Igau, G. Bertrand, M. J. Menu, Y. Dartiguenave, J. J. Bonnet, *ibid.* 108 (1986) 7868; c) J. M. Sotiropoulos, A. Baceiredo, G. Bertrand, *ibid.* 109 (1987) 4711.
- [2] A. Igau, H. Grützmacher, A. Baceiredo, G. Bertrand, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 6463.
- [3] a) T. Curtius, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 22 (1889) 2161; b) T. Curtius, R. J. Kastner, *Prakt. Chem.* 83 (1913) 215; c) W. Schlenk, E. Bergmann, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 463 (1928) 76; d) A. T. Blomquist, R. E. Burge, A. C. Sucusy, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 3636; e) A. T. Blomquist, L. H. Liu, J. C. Bohrer, *ibid.* 74 (1952) 3643; f) D. J. Cram, M. Cordon, *ibid.* 77 (1955) 4090.
- [4] Dimethoxycarben, das typische nucleophile Carben, reagiert nicht mit alkylsubstituierten Olefinen. a) R. A. Moss, M. Wlostowski, S. Shen, K. Krogh-Jespersen, A. Matro, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 4443; b) R. W. Hoffmann, W. Lillienblum, B. Dittich, *Chem. Ber.* 107 (1974) 3395; c) R. W. Hoffmann, M. Reiffen, *ibid.* 109 (1976) 2565.
- [5] *Allgemeine Arbeitsvorschrift*: Zu 0.632 g (2 mmol) **2** in 10 mL Toluol gibt man bei Raumtemperatur 0.172 g (2 mmol) Acrylsäuremethylester. Der Reaktionsverlauf wird NMR-spektroskopisch verfolgt. Nach 30 min wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand aus Toluol/Acetonitril umkristallisiert. Zur Lösung des Cyclopropanes **4** in Toluol gibt man Schwefel im Überschuß, rührt 5 h bei Raumtemperatur und isoliert **4'** durch Säulenchromatographie auf Kieselgel. Die Produkte **5**, **6**, **7** und **10** werden in Lösung nachgewiesen und nur als Thiophosphorylderivate **5'**, **6'**, **7'**, bzw. **10'** isoliert.
- [6] Siehe z. B.: M. Brookhart, W. B. Studabaker, *Chem. Rev.* 87 (1987) 411.
- [7] R. A. Moss, S. Shen, L. M. Hadel, G. Kmiecik-Lawrynowicz, J. Wlostowska, K. Krogh-Jespersen, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 4341.
- [8] a) P. De March, R. Huisgen, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 4952, b) *ibid.* 104 (1982) 4953.
- [9] D. S. Wulfman, B. Poling in R. A. Abramovitch (Hrsg.): *Reactive Intermediates*, Vol. 1, Plenum, New York 1980, S. 321.
- [10] M. Regitz, *Synthesis* 1972, 351.
- [11] Extended-Hückel-Rechnungen zeigen, daß der HOMO_{Carb}-LUMO_{CO}-Abstand beim Übergang vom Aldehyd zum Cyanaldehyd um 1 eV verringert ist und somit ein ladungskontrollierter Mechanismus gegenüber einem konzertierten begünstigt ist.
- [12] Genauere Informationen über die relative Elektrophilie und Nucleophilie von Carbenen: R. A. Moss, *Acc. Chem. Res.* 13 (1980) 58.
- [13] M. T. Nguyen, M. A. McGinn, A. F. Hegarty, *Inorg. Chem.* 25 (1986) 2185.

Pep5: Strukturaufklärung eines großen Lantibiotics**

Von Roland Kellner, Günther Jung*, Michaela Josten, Cortina Kaletta, Karl-Dieter Entian und Hans-Georg Sahl
 Professor Hans Zähler zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Thioetheraminosäuren Lanthionin (Lan) und 3-Methylanthionin (MeLan, vgl. Abb. 1) wurden in mehreren biologisch aktiven Polypeptiden aus Gram-positiven Bakte-

[*] Prof. Dr. G. Jung, Dipl.-Chem. R. Kellner
 Institut für Organische Chemie der Universität
 Auf der Morgenstelle 18, D-7400 Tübingen
 Prof. Dr. K.-D. Entian, Dipl.-Biochem. C. Kaletta
 Medizinisch-Naturwissenschaftliches Forschungszentrum der Universität
 D-7400 Tübingen
 Prof. Dr. H.-G. Sahl, M. Josten
 Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität
 D-5300 Bonn

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 323 und Sa 292/4-2) und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken G. J. Nicholson für seine hervorragende technische Hilfe. C. K. erhielt ein Doktorandenstipendium der Dechema, und K.-D. E. ein Heisenberg-Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

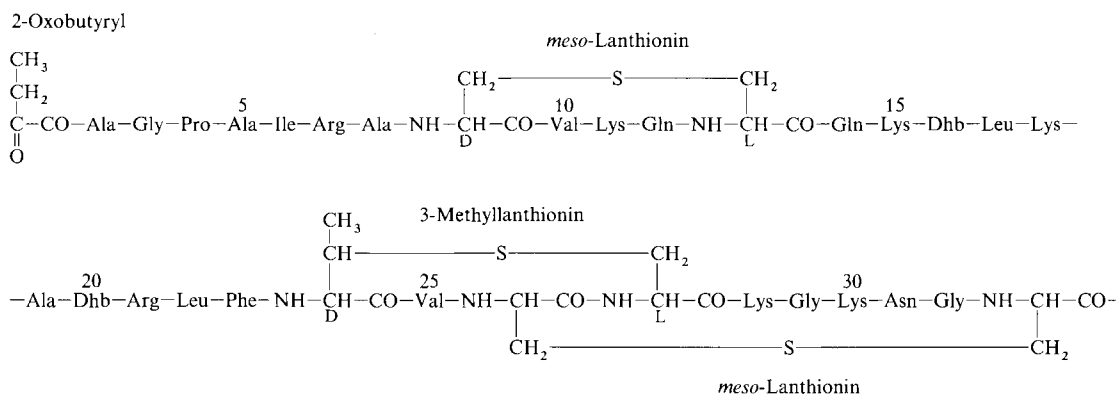


Abb. 1. Struktur des tricyclischen Lantibioticums Pep5. Alle chiralen Aminosäuren haben L-Konfigurationen mit Ausnahme der N-terminalen Hälfte von meso-Lanthionin und (2S,3S,6R)-3-Methyllanthionin. Dhb = Dehydrobutyrin = 2-Amino-but-2-ensäure.

rien identifiziert. Für diese Peptidantibiotica haben wir den Sammelnamen *Lantibiotica* vorgeschlagen^[1]. Bisher wurden insgesamt acht Lantibioticastrukturen aufgeklärt. Das bekannteste Lantibioticum ist Nisin^[2], das von mehreren *Streptococcus-lactis*-Stämmen produziert wird und zum Konservieren von Lebensmitteln Anwendung findet^[3]; andere sind Subtilin^[4], Cinnamycin und Duramycin^[5], Anconvenin^[6], Epidermin^[7], Ro09-0198^[8] und Gallidermin^[9]. Zusätzlich zu Lan und MeLan enthalten die meisten Lantibiotica 2,3-ungesättigte Aminosäuren. Die ungewöhnlichen Aminosäuren bereiten beträchtliche Schwierigkeiten bei der Strukturaufklärung, da sie sich nur durch gezielte Modifikation zu sequenzierbaren Resten umformen lassen.

Die kürzliche Isolierung des Strukturgens von Epidermin^[11] aus *Staphylococcus epidermidis* zeigte, daß Lantibiotica durch individuelle Gene codiert sind. Dieses Resultat bestätigte die Hypothese^[10], daß diese Peptidantibiotica aus ribosomal synthetisierten Vorläuferpeptiden stammen, wie sie z. B. für Epidermin postuliert wurden^[7a]. Vor kurzem wurden auch die Strukturgene für Subtilin^[11], Nisin^[12, 13] und Gallidermin^[14] sequenziert. Alle Vorläufersequenzen („Prälantibiotica“) bestehen aus einer Signalsequenz, gefolgt von der Prosequenz, aus der das Lantibioticum durch Modifizierung entsteht^[1].

Wir berichten nun über die Strukturaufklärung von Pep5, dem bislang größten und stark basischen Lantibioticum^[15]. Pep5 ist ein membranmodifizierendes Polypeptid. Es bildet in Lipidmembranen durch Aggregation spannungsabhängige Ionenkanäle, deren Leitwerte von der Anzahl der am Aggregat beteiligten Monomere abhängen^[15c]. Die chemische Sequenzierung ermöglichte es uns auch hier, eine Prosequenz vorzuschlagen (vgl. Abb. 4), damit ein geeignetes DNA-Fragment zu synthetisieren, das Pep5-Strukturgen auf einem Plasmid zu lokalisieren und das gesamte Prälantibioticum zu sequenzieren^[16].

Das Polypeptid-Antibioticum Pep5 (Abb. 1) wurde aus Kulturüberständen von *Staphylococcus epidermidis* 5 isoliert^[15]. Das saure Hydrolysat von Pep5 enthielt 25 Protein-aminosäuren, dazu Lanthionin(2) und 3-Methyllanthionin(1) (vgl. Tabelle 1). Die Konfigurationsbestimmung

durch Gaschromatographie von N-Trifluoracetyl-aminosäure-n-propylestern an chiraler stationärer Phase^[17] ergab meso-Lanthionin (Lan) und (2S,3S,6R)-3-Methyllanthionin (MeLan); alle anderen chiralen Aminosäuren hatten L-Konfiguration. Das native Antibioticum war N-terminal blockiert; deshalb ließ sich kein chemischer und enzymatischer Abbau durchführen. Aufgrund seiner acht kationischen Aminosäuren und des isoelektrischen Punktes von pI = 10.5 ist Pep5 sehr hydrophil und stark basisch und zeigt ein höchst problematisches chromatographisches Verhalten. Zudem führen die große Anzahl an enzymatischen Spaltstellen sowie zwei Dehydroaminosäuren zu weiteren Komplikationen bei der Strukturaufklärung.

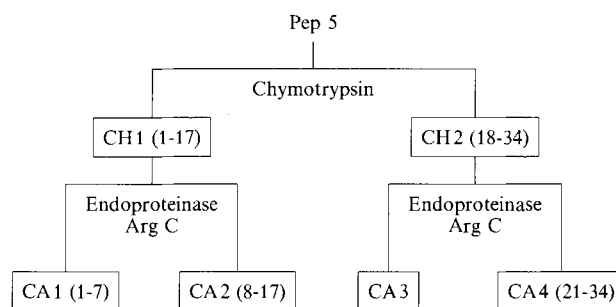


Abb. 2. Enzymatische Spaltungen bei der Sequenzierung des heterodet tricyclischen 34-Peptid-Antibioticums Pep5.

Der Schlüssel zur Sequenzierung des komplizierten Lantibioticums war die enzymatische Spaltung mit Chymotrypsin und Endoproteinas Arg-C (Abb. 2). Andere Proteasen, z. B. Trypsin, ergaben eine komplizierte Mischung aus vielen Fragmenten. Die wichtigsten Ergebnisse wurden durch Edman-Abbau^[18] erhalten (Abb. 3), wobei die Informationen aufgrund der besonderen Eigenschaften der ungewöhnlichen Komponenten allerdings begrenzt waren. Lan und MeLan waren beim automatischen Edman-Abbau wegen der Sulfidbrücken und des ungünstigen chromatographischen Verhaltens ihrer Bis-PTH-Derivate nicht detektierbar. Der Edman-Abbau ließ sich aber glücklicherweise nach einer durch Lan oder MeLan verursachten Sequenzlücke weiterführen. Allerdings blockierten die α,β -ungesättigten α -Aminosäuren den Edman-Abbau durch Desaminierung unter Bildung eines N-terminalen 2-Oxobutyryl-Restes, wie er auch in Position 14 in Epidermin^[7] und Gallidermin^[9] auftrat. Hauptprodukte der chymotryptischen Spaltung von Pep5 waren die beiden Fragmente CH1 und CH2. Der N-terminale Teil von Pep5, CH1, wurde durch Endoproteinas Arg-C in die Fragmente CA1 und CA2 gespalten. Das Fragment CA1 erwies sich wie das native Polypeptid als N-terminal blockiert, und der Ed-

Tabelle 1. Einige charakteristische Daten von Pep5.

Aminosäurenzusammensetzung: L-Ala (4), L-Arg (2), L-Asn (1), L-Gln (2), L-Gly (3), L-Ile (1), L-Leu (2), L-Lys (6), L-Phe (1), L-Pro (1), L-Val (2), meso-Lan (2), (2S,3S,6R)-3-MeLan (1), Dhb (2); N ² -2-Oxobutyryl.
HPLC: Gradient: 12% B nach 40% B in 15 min. Laufmittel A: 0.1% CF ₃ COOH in Wasser. Laufmittel B: 0.1% CF ₃ COOH; 80% Acetonitril; 20% Wasser
Nucleosil 5 C ₁₈ , 4.6 × 250 mm; Flußrate 1 mL min ⁻¹ ; UV-Detektion: 214 nm. Retentionszeit: 23 min (Doppelpack durch Monomer/Dimer-Bildung möglich)
Massenspektrum (FAB-MS): m/z 3489 [Pep5 + H] ⁺

re ungewöhnliche Aminosäure gefunden werden. Die C-terminalen Reste der Fragmente, z. B. Position 34 in CH₂, wurden nach Spaltung mit Carboxypeptidase A/B erhalten.

Die Zuordnung der Thioetherbrücken im C-terminalen Fragment CA4 aus dem Fragmentierungsmuster des FAB-Massenspektrums (m/z 1349 [$M + H^+$]) ergab die Positionen 24 bis 27 für MeLan und 26 bis 33 für Lan. Das Fragment Leu²²-Phe²³-Abu²⁴ wurde ebenfalls im FAB-Massenspektrum von CA4 entdeckt; zudem resultierten unterschiedliche charakteristische Fragmente aus der Sequenz Ala²⁶(S)-Ala²⁷(S), die zwei Schwefelatome in unmittelbarer Nachbarschaft enthält. Die Brückenpositionen wurden in Übereinstimmung mit der Pro-Sequenz von Pep5 zugeordnet, wo Thr/Cys für MeLan und Ser/Cys für Lan enthalten sind (Abb. 4). Bei einer sauren Partialhydrolyse von Pep5 erwies sich das β -Turnsegment Gly³-Pro⁴-Ala⁵ als besonders leicht spaltbar; die Sequenzierung der isolierten hydrolytischen Fragmente ergab die Aminosäuresequenz 3–15. Die Aminosäurezusammensetzung wies auf einen zusätzlichen Alaninrest hin, welcher sich an Position 2 befinden mußte.

¹³C-NMR-Untersuchungen zeigten, daß Pep5 einen möglicherweise am N-Terminus lokalisierten 2-Oxobutyryl-Rest enthält. Deshalb wurde das aufgrund der Sequenzierung saurer Partialhydrolysate in Frage kommende Fragment CA1, bestehend aus 2-Oxobutyryl-Ala²-Gly-Pro-Ala-Ile-Arg⁷ (Abb. 1), synthetisiert und mit dem enzymatisch erhaltenen Fragment CA1 verglichen (HPLC und FAB-MS). Dieser Vergleich erwies die Identität der beiden Fragmente.

Pep5 ist somit ein 34 Aminosäurereste langes Peptid (Abb. 1), wie durch FAB-MS und ¹³C-NMR des nativen Antibiotiums bestätigt werden konnte. Der aus Threonin des Prälantibiotiums stammende 2-Oxobutyryl-Rest am N-Terminus wird als Position 1 mitgezählt. Mit der für Pep5 erhaltenen tricyclischen Sequenz konnte die entsprechende lineare Sequenz des Prolantibiotiums vorgeschlagen und durch genetische Methoden^[1] ermittelt werden. Die aus der Plasmidsequenzierung resultierende Präpeptidsequenz^[16] bestätigte die chemisch gefundene Aminosäuresequenz und insbesondere die Positionen der ungewöhnlichen Aminosäuren. Pep5 zeigt keinerlei Sequenz-Homologie zu einem der acht bekannten Lantibiotica. Somit erweisen sich die Enzyme, die die Umwandlung von Prälantibiotica in Lantibiotica katalysieren, als sehr vielfältig, was ein großes Potential für die mögliche Biotransformation von geeignet ausgelegten Vorläuferpeptiden erwarten läßt. Bisher konnte allerdings noch keines der für die Lantibiotica-Biosynthese maßgeblichen Enzyme isoliert werden.

Eingegangen am 2. Januar 1989 [Z 3110]

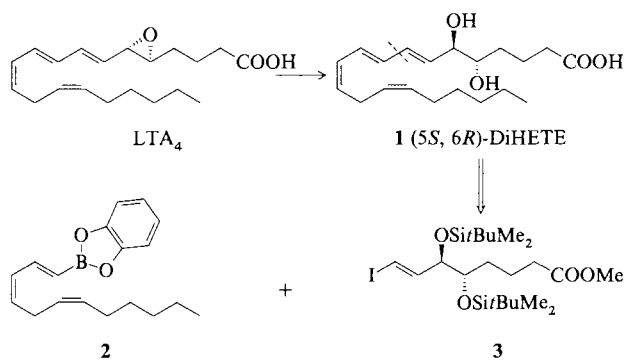
- [1] N. Schnell, K.-D. Entian, U. Schneider, F. Götz, H. Zähler, R. Kellner, G. Jung, *Nature (London)* 333 (1988) 276.
- [2] E. Gross, J. L. Morell, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 4634.
- [3] A. Hurst, *Adv. Appl. Microbiol.* 27 (1981) 85.
- [4] E. Gross, H. Kiltz, E. Nebelin, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354 (1973) 810.
- [5] E. Gross, *Adv. Exp. Med. Biol.* B86 (1977) 131.
- [6] T. Wakamiya, Y. Ueki, T. Shiba, Y. Kido, Y. Motoki, *Tetrahedron Lett.* 26 (1985) 665.
- [7] a) H. Allgaier, G. Jung, R. G. Werner, U. Schneider, H. Zähler, *Angew. Chem.* 97 (1985) 1052; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 1051; b) *Eur. J. Biochem.* 160 (1986) 9.
- [8] a) H. Kessler, S. Steuernagel, D. Gillesen, T. Kamiyama, *Helv. Chim. Acta* 70 (1987) 726; b) H. Kessler, S. Steuernagel, M. Will, G. Jung, R. Kellner, D. Gillesen, T. Kamiyama, *ibid.* 71 (1988) 1924.
- [9] R. Kellner, G. Jung, T. Hörner, H. Zähler, N. Schnell, K. D. Entian, F. Götz, *Eur. J. Biochem.* 177 (1988) 53.
- [10] a) L. C. Ingram, *Biochim. Biophys. Acta* 224 (1970) 263; b) C. Nishio, S. Komura, K. Kurahashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116 (1983) 751.
- [11] S. Banerjee, J. N. Hansen, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 9508.
- [12] G. W. Buchman, S. Banerjee, J. N. Hansen, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 16260.

- [13] C. Kaletta, K.-D. Entian, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 1597.
- [14] N. Schnell, K.-D. Entian, F. Götz, T. Hörner, R. Kellner, G. Jung, *FEMS Microbiol. Lett.* 58 (1989) 263.
- [15] a) H.-G. Sahl, H. Brandis, *J. Gen. Microbiol.* 127 (1981) 377; b) H.-G. Sahl, M. Großgarten, W. R. Widger, W. A. Cramer, H. Brandis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 27 (1985) 836; c) M. Kordei, R. Benz, H.-G. Sahl, *J. Bacteriol.* 170 (1988) 84.
- [16] C. Kaletta, K.-D. Entian, R. Kellner, G. Jung, M. Reis, H.-G. Sahl, *Arch. Microbiol.* (1989), im Druck.
- [17] E. Küsters, H. Allgaier, G. Jung, E. Bayer, *Chromatographia* 18 (1984) 287.
- [18] Zum automatischen Edman-Abbau wurde ein Proteinsequenzer Modell 477 A mit on-line-PTH-Analysator Modell 120 (Applied Biosystems D-6108 Weiterstadt) eingesetzt. Auch Sequenzierungsreagentien und Lösungsmittel stammten von Applied Biosystems. Das saure Totalhydrolysat wurde durch gaschromatographische Enantiomerenanalyse unter Verwendung eines Sichromat Autoderivatisators 100 (Siemens) an der chiralen Phase Chirasil-Val [17] analysiert. FAB-Massenspektren wurden mit einem VG 70/250/SEQ aufgenommen; die Proben wurden in einer Matrix aus 3-Nitrobenzylalkohol und Methanol appliziert.
- [19] a) E. Nebelin, E. Gross, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354 (1973) 807; b) E. Gross, J. L. Morell, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 2919.

Stereokontrollierte Totalsynthese von (5*S*,6*R*)-, (5*S*,6*S*)-, (5*R*,6*R*)- und (5*R*,6*S*)- (7*E*,9*E*,11*Z*,14*Z*)-5,6-Dihydroxy-7,9,11,14-icosatetraensäure-(5,6-DiHETE)methylester **

Von K. C. Nicolaou*, J. Y. Ramphal, J. M. Palazon und R. Spanevello

(5*S*,6*R*)-(7*E*,9*E*,11*Z*,14*Z*)-5,6-Dihydroxy-7,9,11,14-icosatetraensäure **1** (5,6-DiHETE), ein natürlicher, biologisch aktiver Metabolit von Arachidonsäure, entsteht durch regio- und stereoselektive Hydrolyse aus Leukotrien A₄ (LTA₄) (Schema 1)^[1].



Schema 1. Biogenetische Entstehung und retrosynthetische Analyse von (5*S*,6*R*)-DiHETE **1**. LTA₄ = Leukotrien A₄.

Durch nichtenzymatische Hydrolyse erhält man auch das Diastereomer (5*R*,6*R*)-DiHETE. Um diese Verbindungen für biologische Studien gut zugänglich zu machen und speziell um ihre Wirkung mit derjenigen von Lipoxin A₄^[2] zu vergleichen, befaßten wir uns mit der Synthese der vier 5,6-stereoisomeren DiHETE-methylester **4–7** (Schema 2) und ihrer gesättigten Derivate **S4–S7**.

[*] Prof. Dr. K. C. Nicolaou, J. Y. Ramphal, Dr. J. M. Palazon[*], Dr. R. Spanevello[*], University of Pennsylvania, Department of Chemistry Philadelphia, PA 19104-6323 (USA)

[+] NATO-Stipendiat (Spanien), 1987–1988.

[+ +] Stipendiat des CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) (Argentinien), 1986–1987.

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health sowie von Smith Kline and French (USA) gefördert.