

–0.03 eV liegt und damit eine Reaktion unter Beteiligung von Wasserstoff endotherm verlaufen sollte.

Eingegangen am 24. März 1995 [Z 7828]

Stichworte: Cluster · Festkörperstrukturen · Galliumverbindungen · Nitridverbindungen

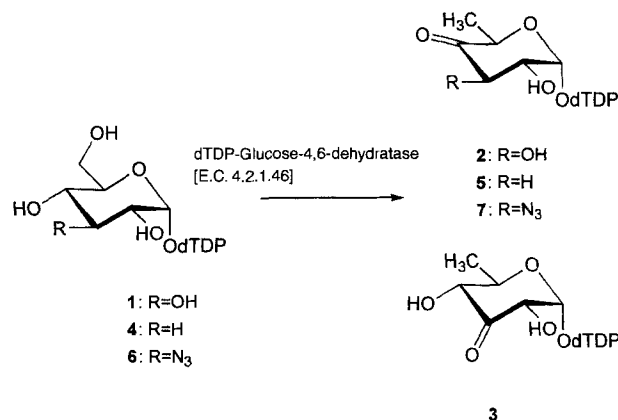
- [1] G. Cordier, H. Schäfer, M. Stelter, *Z. Naturforsch. B* **1984**, 39, 727.
- [2] W. Blase, G. Cordier, M. Ludwig, R. Kniep, *Z. Naturforsch. B* **1994**, 49, 501.
- [3] G. J. Snyder, A. Simon, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 713; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 689.
- [4] P. E. Rauch, A. Simon, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 1505; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 1519.
- [5] G. Cordier, P. Höhn, R. Kniep, A. Rabenau, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1990**, 591, 58.
- [6] G. Cordier, S. Rönninger, *Z. Naturforsch. B* **1987**, 42, 825.
- [7] J. Jäger, D. Stahl, P. C. Schmidt, R. Kniep, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 738; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 709.
- [8] G. Cordier, S. Rönninger, *Z. Kristallogr.* **1988**, Suppl. 27, AGKr/DMG-Tagg.
- [9] A. Gudat, W. Milius, S. Haag, R. Kniep, A. Rabenau, *J. Less-Common Met.* **1991**, 168, 305.
- [10] G. Cordier, *Z. Naturforsch. B* **1988**, 43, 1253.
- [11] P. Verdier, P. L'Haron, M. Maunaye, R. Marchand, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1974**, 30, 226.
- [12] Darstellung von $(\text{Sr}_6\text{N})(\text{Ga}_5)$ und $(\text{Ba}_6\text{N})(\text{Ga}_5)$: Sr und Ga (molares Verhältnis 8:1; Gesamtinwaage 5 g) werden in einem dicht gesinterten Korund-Tiegel unter Argon auf 1100 °C erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt, unter Inertgas gemörsert und schließlich bei 1050 °C im Korund-Tiegel mit Stickstoff (stationär, 1 atm) umgesetzt (Abkühlen auf Raumtemperatur innerhalb von 10 h). Die Bariumverbindung wird durch Erhitzen von Ba und Ga (molares Verhältnis 5:1) auf 1000 °C im Korund-Tiegel und anschließendes Umsetzen des zerkleinerten Regulus mit Stickstoff bei 1100 °C erhalten. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wird durch Herausziehen des Reaktionsrohres aus dem Ofen schnell abgekühlt. Nach Röntgenpulveruntersuchungen fallen beide Verbindungen als kristalline Hauptprodukte neben nicht näher identifizierten Phasen an. Einkristalle haben dunkel-metallischen Glanz und sind spröde mit muscheligen Bruch.
- [13] Daten zur Kristallstruktur von $(\text{Sr}_6\text{N})(\text{Ga}_5)$ ($(\text{Ba}_6\text{N})(\text{Ga}_5)$): $R\bar{3}c$; $Z = 6$; $a = 758.0(3)$ (790.5(3) pm, $c = 4041.3(1)$ (4196.5(7)) pm; $\rho_{\text{ver.}} = 4.40$ (5.21) g cm⁻³. PW 1100 – Vierkreisdiffraktometer, Graphitmonochromator, Szintillationszähler, MoK_α -Strahlung, $5^\circ \leq 2\theta \leq 50^\circ$, $\theta/2\theta$ -Scan. Auswertung: SHELX-86, SHELX-93; Direkte Methoden; kleinste Fehlerquadrate; volle Matrix; 20 freie Variable. $R_1 = 0.0674$ (0.0570); $wR_2(\text{anis}) = 0.157$ (0.133) für $N_{\text{(hkl)}} = 660$ (680). Weitere Einzelheiten zu den Kristallstrukturuntersuchungen können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-59104 angefordert werden.
- [14] J. Donohue, *The Structures of the Elements*, Wiley, London, **1972**.
- [15] M. L. Fornasini, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1983**, 39, 943.
- [16] M. L. Fornasini, M. J. Pani, *J. Alloys Compds.* **1994**, 205, 179.
- [17] W. B. Pearson, *Handbook of Lattice Spacings and Structures of Metals and Alloys*, Vol. 2, Pergamon Press, London **1967**.
- [18] H. G. von Schnering, *Angew. Chem.* **1981**, 93, 44; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, 20, 681.
- [19] Z. Dong, J. D. Corbett, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 3429.
- [20] A. R. Williams, J. Kübler, C. D. Gelatt, jr., *Phys. Rev. B* **1978**, 19, 604. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Atomkugelladien betragen: $r_{\text{Sr}} = 187$ pm, $r_{\text{N}} = 155$ pm, $r_{\text{Ga}} = 177$ pm, $r_{\text{Leerkugel}} = 317$ pm (auf 12c, $z = 0.4168$).
- [21] P. C. Schmidt, D. Stahl, B. Eisenmann, R. Kniep, V. Eyert, J. Kübler, *J. Solid State Chem.* **1992**, 97, 93.
- [22] R. Hoffmann, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 871; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 846.
- [23] Q. Liu, R. Hoffmann, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 9360.
- [24] $E(\text{H}_2)$ setzt sich aus der Gesamtenergie zweier spinpolarisierter H-Atome, der Bindungsenergie eines Wasserstoffmoleküls und der Energie der Nullpunktschwingung zusammen. Vgl. O. Gunnarson, B. I. Lundqvist, *Phys. Rev. B* **1976**, 13, 4274.
- [25] J. F. Janak, *Phys. Rev.* **1974**, 9, 3985.
- [26] V. L. Moruzzi, J. F. Janak, A. R. Williams, *Calculated Electronic Properties of Metals*, Pergamon Press, New York, **1978**.

Synthesen von dTDP-6-Desoxy-4-ketoglucose und deren Analoga mit nativer und rekombinanter dTDP-Glucose-4,6-dehydratase**

Andreas Stein, Maria-Regina Kula, Lothar Elling*, Stefan Verseck und Werner Klaffke*

Bei der Biosynthese desoxygenerierter Oligo- und Polysaccharide kommt aktivierten Ketoglucose-Derivaten eine Schlüsselrolle zu, denn von ihnen ausgehend verzweigt sich das weitere Biosynthesemuster zu 2,6- und 3,6-Didesoxy-, Aminodesoxy- und verzweigten desoxygenierten Zuckern. Während die Gencluster für die Desoxyzucker-Biosynthese in Bakterien lokalisiert werden konnten und damit auch die Bereitstellung der erforderlichen Enzyme in greifbare Nähe gerückt ist, stehen die unzureichende Verfügbarkeit der Intermediate und fehlende effektive Analysemethoden^[1–3] einer eingehenderen Untersuchung im Weg. Das Lösen dieser Probleme ist jedoch unabdingbare Voraussetzung jeglicher Versuche, die Erfolge bei der chemoenzymatischen Synthese von N-glycosidisch gebundenen Glycanen auf Desoxyoligosaccharide zu übertragen.

Einer der Aktivierungswege zu Desoxyzuckern verläuft in Bakterien von dTDP-D-Glucose **1** (dTPD = Thymidin-5'-diphosphat) zu dTDP-L-Rhamnose über die entsprechende 6-Desoxy-4-keto-Verbindung **2**, deren Synthese wiederum von dTDP-D-Glucose-4,6-dehydratase [EC 4.2.1.46] katalysiert wird (Schema 1). Dieses Enzym ist aus verschiedenen Quellen zur Umsetzung markierter Substrate verwandt worden^[4, 5]. Kürzlich wurde ein entscheidender Fortschritt in der enzymati-



Schema 1. Für wichtige physikalische Daten von **2**, **5** und **7** siehe Tabelle 1.

- [*] Dr. L. Elling, Dipl.-Chem. A. Stein, Prof. Dr. M.-R. Kula
Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf im
Forschungszentrum Jülich
Postfach 2050, D-52404 Jülich
Telefax: Int. + 2461/61-2490
E-mail: L.Elling@kfa-juelich.de
- Dr. W. Klaffke
Universität Hamburg
Martin-Luther-King-Platz 6, D-20146 Hamburg
und
Unilever Research, Bio-Organic Chemistry
Olivier van Noortlaan 120, NL-3133 AT Vlaardingen (Niederlande)
Telefax: Int. + 10/460-5384
E-mail: werner.klaffke@2488bns.urlnl.sprint.com
- Dipl.-Biol. S. Verseck
Institut für Chemische Mikrobiologie FB9 der Universität Wuppertal

[**] Diese Arbeit wurde gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (W.K.), vom Fonds der Chemischen Industrie (W.K.) und von der Studienstiftung des Deutschen Volkes (A.S.). Wir danken Dr. V. Sinnwell und Dr. C. Schulze (Universität Hamburg) für die Aufnahme der NMR- bzw. ESI-Spektren. dTDP = Thymidin-5'-diphosphat.

schen Synthese von dTDP-6-Desoxy-4-ketoglucose **2** erzielt^[6]. Während der Vorbereitung unserer Veröffentlichung erschienen die Arbeiten von Lindqvist et al.^[7] zur Biosynthese der CDP-D-Abequose (CDP-3,6-Didesoxy-D-galactose, CDP = Cytidin-5'-diphosphat), in denen die analytische Trennung aller beteiligten aktivierten Zucker gelang.

Wir beschreiben hier die Darstellung und erstmalige NMR-spektroskopische Charakterisierung der dTDP-6-Desoxy- α -D-xylo-hexopyran-4-ulose **2** in reiner Form sowie die Umsetzungen strukturell verwandter, nichtnatürlicher dTDP-Glucose-Analoga zu den entsprechenden 6-Desoxyzuckern. Daneben stellen wir eine sowohl analytische als auch präparative Trennung dTDP-aktivierter Hexosen mit Ionenpaar-Hochleistungs-flüssigchromatographie (HPLC) vor.

Zur Desoxygenierung wurde zunächst mit nativem Enzym in Form des Rohextraktes aus *Escherichia coli* B^[8] gearbeitet. Neben dTDP-D-Glucose **1** wurden auch die 3-Desoxy- und 3-Azido-3-desoxyverbindung **3** bzw. **6** inkubiert, um die Anwendungsbreite der hier beschriebenen präparativen Synthese zu testen. Die Herstellung der 4-Ulose **2** wurde mit Dünnschichtchromatographie (DC) verfolgt. Unerwarteterweise jedoch zeigte das ¹H-NMR-Spektrum des Reaktionsansatzes, der an basischem Ionenaustauscherharz mit nachfolgender Entsalzung aufgearbeitet wurde, zwei mit **1** nicht identische Produkte an. Die genauere Analyse wies diese als ein 3:2-Gemisch von **2** und **3** aus. Die Analoga **4** (K_m 200 μ M, v_{max} 130 μ mol h⁻¹ mg⁻¹) und **6** (K_m 350 μ M, v_{max} 90 μ mol h⁻¹ mg⁻¹) erwiesen sich im Assay^[9] als Substrate, wenn auch gegenüber **1** (K_m 80 μ M, v_{max} 260 μ mol h⁻¹ mg⁻¹) mit nur $1/5$ bzw. $1/10$ der natürlichen Selektivität (v_{max}/K_m). In den Reaktionsansätzen für **4** und **6** wurde nach ca. 1 d bei 37 °C die Bildung eines unpolaren Produkts mit DC nachgewiesen; nach 3 d war die Umsetzung abgeschlossen. Bei der Aufarbeitung der im Vergleich zu **2** wesentlich hydrolyselabileren Verbindungen **5** und **7** mußte schnell bei +4 °C gearbeitet und auf eine sorgfältige Vermeidung zu hoher Konzentrationen an LiCl geachtet werden. Die Didesoxyhexo-4-ulose **5** fiel als weißer Schaum (20 mg) in 41 % Ausbeute an und wurde NMR-spektroskopisch untersucht. Erwartungsgemäß gelang die Darstellung der dTDP-3-Azido-3,6-didesoxyhexo-4-ulose **7** aus einem 166- μ mol-Ansatz ebenso nach sorgfältiger Aufarbeitung, wobei 23 mg (24 % Ausbeute) farbloser Schaum isoliert wurden.

Im weiteren Verlauf unserer Arbeiten entwickelten wir auf der Basis der Umkehrphasen (RP)-Ionenpaarchromatographie ausgehend von Aw et al.^[10] ein HPLC-Verfahren, das mit hoher Selektivität dTDP-aktivierte Hexosen zu trennen erlaubt und ein Scale-up für präparative Ansätze zuläßt (präparativ bzgl. der HPLC bedeutet eine Beladung mit ca. 5 mg des Rohprodukts im Unterschied zu etwa 0.01 mg bei analytischer Trennung). Außerdem wurde in der Synthese von **2** das Wildtyp-Enzym gegen die in *E. coli* BL21 überexprimierte dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase aus *Salmonella typhimurium* LT2 ausgetauscht. Durch die höhere spezifische Enzymaktivität läßt sich der Einfluß störender Nebenaktivitäten weitgehend ausschalten. Die Bildung von **2** wurde mit der neuen Methode verfolgt. In Abbildung 1 ist das Chromatogramm der analytischen Trennung

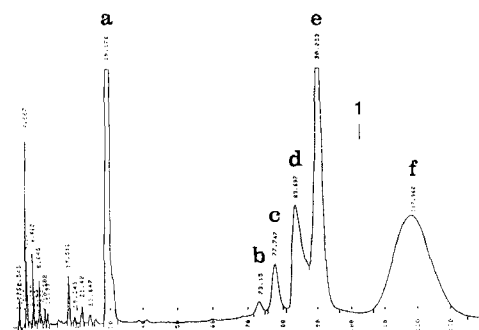


Abb. 1. Chromatogramm einer analytischen HPLC-Trennung von a) dTMP, b. c) Verunreinigungen aus kommerziell erhältlicher dTDPG, d) dTDP, e) dTDPG und f) dTDP-6-Desoxy-D-xylo-4-hexulose. 1) markiert die Retentionszeit von dTDP-L-Rhamnose, wenn diese zur Demonstration der Selektivität bei der Trennung zugesetzt war.

eines Gemisches aus dTDP-Glucose und gebildeter 6-Desoxy-4-ulose **2**, zwei im kommerziellen Edukt vorgefundenen Verunreinigungen sowie dTMP und dTDP gezeigt.

Generell führt die Instabilität des Produkts **2** zu Problemen^[6,11]. Wir fanden bereits bei der Lagerung in salz- oder pufferhaltiger Lösung bei +4 bzw. -20 °C, beim Lyophilisieren aus flüchtigen Puffern, aus unvollständig entsalzten Lösungen sowie bei Fällung mit organischen Lösungsmitteln immer eine partielle Zersetzung, wobei dTMP und dTDP entstanden. Die Isolierung schließlich gelang im Anschluß an die präparative HPLC in einer Gesamtausbeute von 70 %. Das Produkt ist bei -20 °C mindestens vier Monate lang ohne Zersetzung lagerbar. **2** ließ sich als 1:5-Gemisch aus Ketoform und deren Hydrat spektroskopisch eindeutig als reine Verbindung charakterisieren.

Die hier beschriebenen Experimente demonstrieren unseres Wissens nach den ersten NMR-spektroskopischen Nachweis der Dehydratase-vermittelten Darstellung des Desoxy-Intermediates **2**. Die erfolgreiche Umsetzung der nichtnatürlichen Nucleotidzucker dTDP-3-Desoxy- α -D-ribo- und -3-azido- α -D-xylo-hexopyranose **4** und **6** eröffnet einen neuen enzymatischen Syntheseweg zu artifiziellen Nucleosiddiphosphat-aktivierten Glycosyldonoren mit leicht zugänglicher Rohextrakte. Durch das HPLC-Verfahren wird erstmals eine umfassende Charakterisierung der dTDP-L-Rhamnose-Biosynthese in einem Schritt möglich. Darüber hinaus gelingt mit der beschriebenen Methode die Isolierung präparativer Mengen von **2** und verwandter Verbindungen.

Experimentelles

2, **5**, und **7**: In einem Kunststoffgefäß wurden unter leichtem Stickstoffüberdruck in 5 mL Tris/HCl-Puffer pH 7.5 (50 mM, 0.5 mM DTT) 50 mg (82 μ mol) dTDP-Glucose **1** als Dinatriumsalz oder dessen 3-Desoxyderivate **4** bzw. **6** (durch Ionenaus-

Tabelle 1. Ausgewählte physikalische Daten der Verbindungen **2**, **5** und **7**.

<p>2: ¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 1.13 (d, 3H, 6''-H), 1.84 (d, 3H, CH₃), 2.24–1.32 (m, 2H, 2a'-H, 2b'-H), 3.53 (ddd, 2''-H), 3.69 (d, 3''-H), 4.01 (q, 5''-H), 4.07–4.11 (m, 3H, 4'-H, 5a'-H, 5b'-H), 4.53 (m, 3'-H), 5.46 (dd, 1''-H), 6.25 (dd, 1'-H), 7.65 (d, 6-H); $J_{1'',2''} = 3.6$, $^3J_{2'',3''} = 7.0$, $^4J_{2'',3''} = 3.1$, $J_{2'',3''} = 10.2$, $J_{5'',6''} = 6.5$ Hz. – ¹³C-NMR (100.7 MHz, D₂O): δ = 11.7 (C-6''), 12.1 (CH₃), 39.0 (C-2'), 65.9 (C-5'), 70.0 (C-5''), 71.1 (C-2'), 71.4 (C-3'), 73.6 (C-3''), 85.4 (C-1'), 85.8 (C-4'), 94.1 (C-4'', hydratisiert), 95.8 (C-1''), 112.2 (C-5), 137.7 (C-6), 152.2 (C-2), 167.0 (C-4); $^2J_{C-1'',2''} = 8.6$, $^3J_{C-5'',6''} = 5.7$ Hz. – ESI-MS (negative mode, +3 kV): m/z: 562.7 [M⁻ – Na]. – Ketoform: ¹³C-NMR (100.7 MHz, [D₆]DMSO): δ = 206.4 (C''-4). – ESI-MS (Negativbedingungen, +3 kV): m/z: 545 [M – Na].</p> <p>5: ¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 1.09 (d, 3H, 6''-H), 1.84 (s, 3H, CH₃), 2.25–2.47 (~ dd und dd, 2H, 3a''-H und 3b''-H), 3.74 (m, 2''-H), 4.02 (q, 5''-H), 5.38 (dd, 1''-H); $J_{1'',2''} = 3.1$, $^3J_{1'',2''} = 6.5$, $J_{2'',3a''} = 5.5$, $J_{2'',3b''} = 11.6$, $^2J_{3a'',3b''} = 12.6$, $J_{5'',6''} = 6.6$ Hz. – ¹³C-NMR (100.7 MHz, D₂O): δ = 11.6 (CH₃), 12.2 (C''-6), 32.4 (C''-3), 69.1 (d, C''-2), 69.8 (C''-5), 93.2 (C''-4, hydratisiert), 95.7 (d, C''-1); $^2J_{C-1'',2''} = 6.4$, $^3J_{C-1'',2''} = 6.4$, $^3J_{C-2'',3''} = 8.5$ Hz. – ¹³C-NMR (100.7 MHz, [D₆]DMSO): δ = 203.1 (C''-4, nicht hydratisiert).</p> <p>7: ¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 1.21 (d, 3H, H''-6), 1.84 (s, 3H, CH₃), 3.40 (m, 2H, H''-2, H''-3), 4.21 (q, H''-5), 5.43 (dd, H''-1); $J_{1'',2''} = 3.8$, $^3J_{1'',2''} = 7.0$, $J_{5'',6''} = 6.4$ Hz. – ¹³C-NMR (100.7 MHz, D₂O): δ = 13.3 (CH₃), 13.6 (C''-6), 60.2 (C''-3), 82.3 (d, C''-2), 94.1 (C''-4, hydratisiert), 95.7 (d, C''-1); $^2J_{1'',2''} = 6.4$, $^3J_{C-1'',2''} = 8.1$ Hz. – ¹³C-NMR (100.7 MHz, [D₆]DMSO): δ = 201.4 (C''-4, nicht hydratisiert).</p>

tausch aus chemisch synthetisiertem Dilithiumsalz) [12, 13] gelöst. Der Ansatz wurde mit 0.083 U ($1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol min}^{-1}$) der Dehydratase (1.45 mL Rohextrakt aus *E. coli* B, [8]) versetzt, mit destilliertem Wasser auf 10 mL aufgefüllt und bei 37 °C unter stetem Schütteln inkubiert. Nach 2 d konnte im DC (2-Propanol/Ethanol/Wasser = 5:3:2, 5% HOAc, 2% Triethylamin; Produkt $R_F = 0.4$, Edukt $R_F = 0.3$, dTMP $R_F = 0.5$, dTDP $R_F = 0.2$) keine weitere Produktbildung mehr detektiert werden. Der Ansatz wurde 30 s im siedenden Wasserbad denaturiert, auf ca. 3 mL gefriergetrocknet und an Sephadex G-10 ($2 \times 160 \text{ cm}$; 1 mL min^{-1}) vorfraktioniert. Die Nucleotidzucker enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, durch Ionenaustauschchromatographie (Dowex 1×2 , Cl^- -Form, $5 \times 18 \text{ cm}$) gereinigt (800 mL linearer Gradient 0–0.8 M LiCl) und eingeengt. Entsalzung an Sephadex G-10 und anschließendes Lyophilisieren lieferten die Dilithiumsalze der Produkte als weiße Schäume. Ausb. 2 und 3 (ca. 3:2 gemäß $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum): 26 mg (54%); Ausb. 5: 20 mg (41%); Ausb. 7: 23 mg (24%).

2: In einem 2-mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 41 mg (60 μmol) dTDP-Glucose-Dinatriumsalz (Sigma) in 2 mL Tris/HCl-Puffer pH 7.5 (50 mM) gelöst, mit 1 U rekombinanter dTDP-D-Glucose-4,5-Dehydratase (65 μL Rohextrakt, 9.5 mg mL^{-1} Protein) versetzt und bei 37 °C inkubiert. Nach vollständigem Umsatz (ca. 2 h) wurde der Ansatz 2 min bei 95 °C denaturiert, 2 min bei $12\,400 \times g$ zentrifugiert und durch eine 0.45- μm -Membran filtriert. Die Auftrennung erfolgte durch präparative HPLC (Hypersil ODS-10 μ , $2 \times 25 \text{ cm}$, Macherey Nagel, Düren, 0.04 M NH_4CO_3 -Lösung (pH 3), 0.0038% (v/v) Octylamin, 1% (v/v) Methanol, isokratisch, Fließgeschwindigkeit 20 mL min^{-1} , Detektion 260 nm). Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt und nach Verdünnen mit bidestilliertem Wasser mit 250 mL min^{-1} auf ein Membran-Anionenaustauschermembran (KN107Q, Sartorius, Göttingen) gepumpt, die Salze des HPLC-Laufmittels mit 5 mM NaCl-Lösung entfernt und 2 mit 150 mM NaCl-Lösung eluiert. Im Vakuum wurde bei 30 °C auf 10 mL eingeengt, an Sephadex G-10 ($2.6 \times 93 \text{ cm}$, Flußgeschwindigkeit 1 mL min^{-1}) entsalzt und nach Lyophilisation das Dinatriumsalz des Produkts als voluminöser weißer Feststoff erhalten. Ausb.: 24 mg (70%). Selbst Spuren von 3 ließen sich in diesem Ansatz nicht nachweisen.

Eingegangen am 17. März 1995 [Z 7806]

Stichworte: Biotechnologie · Chromatographie · Dehydratasen · Desoxyzucker · Enzyme

- [1] S. F. Lo, V. P. Miller, Y. Lei, J. S. Thorson, H.-W. Liu, J. L. Schottel, *J. Bacteriol.* **1994**, 176(2), 460–468.
- [2] S. Chang, B. Duerr, G. Serif, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263(4), 1693–1697.
- [3] B. W. Jarvis, C. R. Hutchinson, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, 308(1), 175–181.
- [4] C. E. Snipes, C. J. Chang, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 701–706.
- [5] C. E. Snipes, G. U. Brillinger, L. Sellers, L. Mascaro, H. G. Floss, *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 8113–8117.
- [6] K. Marumo, L. Lindqvist, N. Verma, A. Weintraub, P. R. Reeves, A. A. Lindberg, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 204, 539–545.
- [7] L. Lindqvist, K. H. Schweda, P. R. Reeves, A. A. Lindberg, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 225, 863–872.
- [8] R. D. Bevil in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Hrsg.: H. U. Bergmeyer), VCH, Weinheim, **1974**, S. 2268–2269.
- [9] R. Okazaki, T. Okazaki, J. L. Strominger, A. M. Michelson, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 3014–3026.
- [10] T. Y. Aw, D. P. Jones, *Anal. Biochem.* **1982**, 127, 32–36.
- [11] H. P. Wahl, H. Grisebach, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, 568, 243–252.
- [12] J. G. Moffatt, *Methods Enzymol.* **1966**, 136–142.
- [13] B. Leon, S. Liemann, W. Klaffke, *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, 12, 597–610; A. Naundorf, S. Liemann, W. Klaffke, *Synthesis of Deoxy Sugar Phosphates*, Eurocarb VII, Krakau, **1993**, Abstr. C004.

Totalsynthese von (\pm)-Dymecicin A**

Matthew D. Shair*, Tae-young Yoon und Samuel J. Danishefsky

Dymecicin A 1 (Schema 1), ein Stoffwechselprodukt von *Micromonospora chersina*, das DNA zu spalten vermag und in vitro Antitumoraktivität zeigt, hat unter Chemikern erhebliche Begeisterung hervorgerufen^[1]. Obwohl es schwer zugänglich und schwer formulierbar ist und geringe biologische Spezifität aufweist und deshalb kaum je als Arzneimittel zu nutzen sein wird, ist das Interesse an Dymecicin wegen seiner faszinierenden Struktur ungebrochen. Fragen zum Mechanismus seiner Bioaktivierung^[2], die Suche nach einfachen Analoga, die das zentrale Strukturmerkmal des Dymecicins enthalten^[3], und die Bemühungen aufzuklären, wie der Wirkstoff durch das DNA-Zielmolekül erkannt wird, befruchten auch weiterhin die Forschung^[4].

Die Totalsynthese ist keine geringere Herausforderung. Wesentliche Fortschritte auf diesem Gebiet wurden von Schreiber et al. gemacht. Ihnen gelang erstmals die Synthese einfacher Modellverbindungen des Dymecicins, denen das Anthrachinon-Segment fehlt^[5a]. Diese Bemühungen gipfelten schließlich in der bemerkenswerten Synthese von geschützten Derivaten des Dymecicins^[5b]. Selbst angesichts dieser Erfolge wurde nicht aufgegeben, neue Synthesewege zu Dymecicin zu erforschen. Dymecicin mit all seinen außergewöhnlichen strukturellen Details zu synthetisieren, war nach wie vor ein lohnendes Ziel.

Unsere anfänglichen Bemühungen richteten sich auf die Erprobung einiger neuer Ansätze, über die eine Totalsynthese verwirklicht werden könnte. Wir zeigten, daß die *cis*-Orientierung zwischen den C-4- und C-7-Substituenten (Dymecicin-Numerierung) in Dymecicin-Vorstufen über eine intramolekulare Diels-Alder-Reaktion erzielt werden kann ($2 \rightarrow 3 \rightarrow 4$) (Schema 1)^[6]. Wir entwickelten ein Verfahren, die C5-C6-Doppelbindung zu funktionalisieren, das nicht nur die Fortführung der Synthese, sondern auch die korrekte Konfiguration von C-2 und C-7 gewährleistet ($4 \rightarrow 5 \rightarrow 6$, Schema 1)^[6, 7]. Ein neuerer Reaktionstyp, die Palladium-induzierte Kreuzkupplung von Diiodalkinen mit einem (*Z*)-Distannylethen ($6 + 7 \rightarrow 8$) wurde angewendet, um die Endiin-Brücke aufzubauen (Schema 2)^[7]. Schließlich lernten wir, wie die β -Ketosäure-Enolether-Einheit an C-5 und C-6 eingeführt werden kann ($8 \rightarrow 9 \rightarrow 10$)^[7].

Nun war es an der Zeit, sich mit dem Aufbau der CDE-Trihydroxyanthrachinon-Einheit zu beschäftigen. Wir berichteten kürzlich über eine Methode, Chinonimine des Typs 11 (Schema 2) zu synthetisieren^[3a]. Diese Chinonimine gehen bereitwillig Cycloadditionen ein, die zum Aufbau der Anthrachinon-Einheit geeignet sind. Zeitgleich veröffentlichten Myers et al. die Synthese eines eng verwandten Chinonimins, wobei sie allerdings von ganz anderen Vorläufern ausgingen^[8]. Auch ihr Chinonimin reagiert in Cycloadditionen mit Dien, die im Hinblick auf das „DE-Problem“ bedeutsam sind^[9]. In der Tat gelang Myers et al. in einer eindrucksvollen Arbeit die erste

[*] M. D. Shair, Prof. S. J. Danishefsky^[1+], T. Yoon
Department of Chemistry, Havemeyer Hall
Columbia University, New York, NY 10027 (USA)
Telefax: Int. + 212/854-7142

[+] Alternative Adresse:
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
Laboratory for Bioorganic Chemistry
1275 York Avenue, Box 106, New York, NY 10021 (USA)
Telefax: Int. + 212/772-8691

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (Grant CA 28824) und vom Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (Stipendium für M.D.S.) gefördert. Wir danken Dr. I. J. Kim für die Darstellung des Arylbromids 17 und Dr. Dolatrai M. Vyas vom Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute für eine authentische Probe von Dymecicin A.