

Thioenole aus Peptidyl-Cysteinen: oxidative Decarboxylierung eines ¹³C-markierten Substrats**

Christoph Kempter, Thomas Kupke, Dietmar Kaiser,
Jörg W. Metzger und Günther Jung*

Professor Anton Rieker zum 65. Geburtstag gewidmet

Das Akne-Therapeutikum Epidermin ist ein von dem Gram-positiven Bakterium *Staphylococcus epidermidis* gebildetes Peptidantibiotikum. Es enthält die ungewöhnlichen Aminosäurereste 2,3-Didehydrobutyrin, *meso*-Lanthionin, β -Methylanthionin und C-terminales *S*-(*Z*)-2-Aminovinyl-D-cystein^[1]. Es wird als Vorläuferprotein EpiA mit 52 Aminosäureresten ribosomal synthetisiert und durch posttranslationale Modifikationen in das biologisch aktive tetracyclische 22mer-Peptid überführt. Diese Modifikationen sind: oxidative Decarboxylierung, Dehydratisierung, Thioetherbrückenbildung und Leitpeptidabspaltung^[2] (Abb. 1). Komplementationsexperimente mit Epidermin-negativen Mutanten und DNA-Sequenzierung zeigten, daß die Gene *epiB*, *epiC*, *epiD* und *epiP* die Enzyme der Epiderminbiosynthese codieren^[3]. Das Biosyntheseenzym

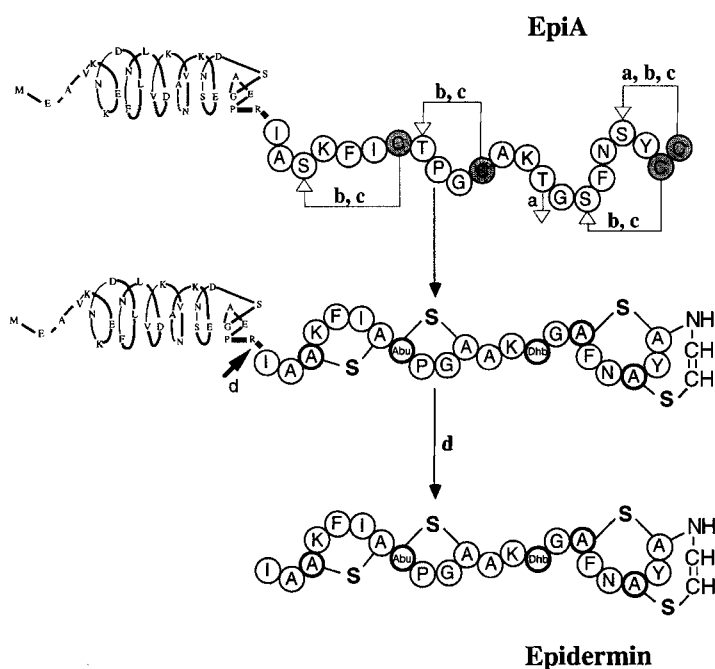


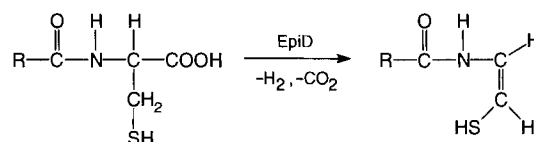
Abb. 1. Modell der Epiderminbiosynthese: Das ribosomal synthetisierte Vorläuferpeptid EpiA wird durch die posttranslationalen Modifikationen a) oxidative Decarboxylierung des C-terminalen Cysteinrestes, b) Dehydratisierung von Serin- und Threoninresten, c) Thioetherbrückenbildung (Lanthionin und β -Methylanthionin) sowie d) Abspaltung des 30mer-Leitpeptids in das antimikrobiell aktive, tetracyclische Lantibiotikum Epidermin überführt; Abu, 2-Aminobuttersäurerest; Dhb, α,β -Didehydrobuttersäurerest; Cysteinreste sind grau unterlegt, modifizierte Aminosäuren fett umrandet.

[*] Prof. Dr. G. Jung, Dipl.-Chem. C. Kempter, Dipl.-Chem. D. Kaiser,
Prof. Dr. J. W. Metzger
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen
Telefax: Int. + 7071/29-6925
E-mail: guenther.jung@uni-tuebingen.de

Dr. T. Kupke
Mikrobielle Genetik der Universität
Waldhäuser Straße 70/8, D-72076 Tübingen

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 323) gefördert.

EpiD ist gereinigt und charakterisiert worden. Es handelt sich um ein neuartiges Flavoprotein (20.8 kDa) mit nicht kovalent gebundenem Coenzym Flavinmononucleotid (FMN), das unter reduzierenden Bedingungen das Vorläuferprotein EpiA umsetzt^[4]. Das modifizierte Polypeptid zeichnet sich durch größere Hydrophobie, eine erhöhte Absorption bei 260 nm und durch eine Massenabnahme von 46 Da im Vergleich zum Edukt aus^[5]. EpiD katalysiert die oxidative Decarboxylierung ($-H_2$, $-CO_2$) des C-terminalen Cysteinrestes von EpiA und ist somit an der Bildung des *S*-(*Z*)-2-Aminovinyl-D-cystein-Restes (Schema 1) beteiligt. Obwohl der Mechanismus noch nicht näher un-



Schema 1.

tersucht wurde, ist anzunehmen, daß zunächst die Oxidation unter Bildung der Doppelbindung und anschließend die Decarboxylierung zum Thioenol erfolgt^[5]. Das bei der Oxidation des Substrates reduzierte Flavincoenzym wird wahrscheinlich durch Luftsauerstoff reoxidiert.

Mit Hilfe synthetischer Einzelpeptide und Peptid-Bibliotheken^[6] wurde die Substratspezifität des neuen Enzyms untersucht und festgestellt, daß Peptide mit der C-terminalen Consensussequenz AS1-AS2-Cys (AS1 = Val/Ile/Leu/(Met)/Phe/Tyr/Trp; AS2 = Ala/Ser/Val/Thr/Cys/(Ile,Leu)) einen Massenverlust von 46 Da erfahren^[7]. Das MS-MS-Fragmentierungsmuster des Reaktionsproduktes des Heptapeptidsubstrats Ser-Phe-Asn-Ser-Tyr-Thr-Cys zeigte, daß durch EpiD ausschließlich der C-terminale Cysteinrest modifiziert und durch oxidative Decarboxylierung vermutlich in ein C-terminales Thioenol überführt wird. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Strukturbeweis für dieses ungewöhnliche Umsetzungsprodukt zu erbringen.

Zum Nachweis der vermuteten freien Thiolgruppe wurde das Heptapeptid SFNSYTC durch Festphasensynthese mit Fluorenylmethoxycarbonyl/*tert*-Butyl-Schutzgruppen^[8] synthetisiert. Sowohl das präparativ gereinigte als auch das mit EpiD modifizierte Peptid zeigten nach Reaktion mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (Ellmans Reagens) im Elektrosprayionisations-Massenspektrum (ESI-MS) eine Massenzunahme von 197 Da. Dies entspricht der Bildung gemischter Disulfide aus den Thiolgruppen der Peptide und 5-Thio-2-nitrobenzoesäure. Die Disulfide konnten durch Zugabe von *n*-Propanthiol reduziert oder teilweise in das gemischte Disulfid mit *n*-Propanthiol übergeführt werden. Eine Addition von Ellmans Reagens an die vermutete Doppelbindung des Umsetzungsproduktes, die zu einer Massenerhöhung von 199 Da führen würde, wurde dagegen nicht beobachtet.

Zweidimensionale NMR-Experimente zeigten, daß die durch Modifizierung aus SFNSYCC und SFNSYTC entstehenden Peptide in Lösung nicht stabil genug sind, um eine eindeutige Strukturzuordnung treffen zu können. Wie ESI-MS-Messungen ergaben, ist bereits nach 1 h ein deutlicher Zerfall der entstandenen Thioenol-Derivate zu beobachten. Da enzymatisch modifiziertes SFNSYTC in Lösung eine größere Stabilität zeigt als das entsprechende Produkt von SFNSYCC, wurde für die weiteren NMR-Untersuchungen ein Peptid mit der C-terminalen Sequenz Thr-Cys als Substrat für EpiD verwendet. Zur Erfassung der instabilen Reaktionsprodukte verfolgten wir die enzymati-

sche Reaktion im NMR-Spektrometer. Aufgrund der Komplexität der Reaktionsmischung erwies sich die Einführung eines ^{13}C -Isotops im Cysteinrest als notwendig, um durch heteronucleare Korrelationsexperimente die entscheidenden Signale herausfiltern zu können. Durch Festphasensynthese wurde das am Cystein- C_β -Atom ^{13}C -markierte Peptid KKSFNSTYC synthetisiert. Die N-terminalen Lysinreste wurden eingeführt, um eine ausreichende Löslichkeit des Substrats sicherzustellen.

Im Heteronuclear-Single-Quantum-Coherence(HSQC)-Spektrum^[9] des Eduktes KKSFNSTYC sind zwei Kreuzsignale bei $\delta(^1\text{H}) = 2.83$, $\delta(^{13}\text{C}) = 29.1$ und $\delta(^1\text{H}) = 3.58$, $\delta(^{13}\text{C}) = 63.3$ zu erkennen. Das erste Signal ist auf das ^{13}C -markierte β -C-Atom und Proton des Substrats zurückzuführen. Das zweite stammt aus den Methylgruppen des Tris(hydroxymethyl)-aminomethans (Tris-Puffer). Im eindimensionalen ^{13}C -NMR-Spektrum des Edukts sind für das β -C-Atom zwei Signale bei $\delta = 29.1$ und 29.2 zu erkennen, die den beiden Epimeren zugeordnet werden können und im HSQC-Spektrum in der ^{13}C -Dimension nicht aufgelöst wurden. Bereits nach 15 min erscheint ein drittes Signal bei $\delta(^1\text{H}) = 6.01$ und $\delta(^{13}\text{C}) = 120.5$, dessen Intensität mit der Zeit zunimmt. Abbildungen 2 und 3 zeigen die Projektionen der HSQC-Spektren auf die F2-(^1H)- bzw. F1-(^{13}C)-Achse über einen Zeitraum von 825 min. Deutlich zu erkennen ist die Zunahme des Produktsignals. Aufgrund der hohen Substratkonzentration läuft die enzymatische Umsetzung langsamer ab (Substrathemmung) als bei den anderen Untersuchungen. Dafür entsteht aber ständig neues Produkt, das den Zerfallsprozeß überkompensiert und somit eine Stabilität des Produktes bei diesen Versuchen vortäuscht. Um die chemische Verschiebung des Protons am Cys- C_α -Atom des Produktes zu ermitteln, wurde nach 16 h ein HSQC-TOCSY-Spektrum^[10] aufgenommen. Auf der ^{13}C -Spur ist bei $\delta = 120.5$ ein zusätzliches Signal bei $\delta(^1\text{H}) = 6.59$ zu erkennen. Die chemischen Ver-

schiebungen für H_α und H_β ($\delta(^1\text{H}) = 6.59$ bzw. 6.01) sowie die für C_β ($\delta(^{13}\text{C}) = 120.5$) sind charakteristisch für eine Doppelbindung. Aufgrund der NMR-Daten, der MS-MS-Experimente, der Umsetzung mit Ellmans-Reagens und der Tatsache, daß die Massendifferenz zwischen Produkt und Edukt genau 46 Da beträgt, kann somit nur ein C-terminales Thioenol vorliegen. Die (Z)-Konfiguration des Reaktionsproduktes konnte durch Ermittlung der Kopplungskonstante zwischen H_α und H_β bestimmt werden. Im ^1H -NMR-Spektrum ist das β -Proton als Dublett von Dubletts mit den Kopplungskonstanten $^3J(\text{H}_\alpha, \text{H}_\beta) = 7.3$ Hz und $^1J(\text{H}_\beta, \text{C}_\beta) = 170$ Hz bei $\delta(^1\text{H}) = 6.01$ zu erkennen (Abb. 4). Die Kopplungskonstante von 7.3 Hz zwischen H_α und H_β ist typisch für die (Z)-Konfiguration der Doppelbindung und vergleichbar mit der des Naturstoffs Epidermin^[11].

Nach 16 h sind im ^{13}C -NMR-Spektrum immer noch zwei Signale bei $\delta = 29.1$ und 29.2 zu erkennen. Das Signal bei $\delta = 29.2$ zeigt nun allerdings nur noch ca. 50 % seiner Intensität und ist nach 40 h vollständig verschwunden. Das Enzym EpiD setzt somit nur das Epimer mit L-Cystein um. In diesem Spektrum ist bei $\delta \approx 250$ kein Signal vorhanden, das für einen Thioaldehyd zu erwarten wäre. Anders als die entsprechenden Enole sind die Thioenole thermodynamisch ähnlich stabil wie Thioaldehyde und sie tautomerisieren sehr langsam^[11].

Nach dem Beweis der ungewöhnlichen Thioenolstruktur des modifizierten Peptids bleibt die Frage offen, welche Zersetzungsprodukte aus den primär gebildeten Thioenolen entstehen. Mit den bis jetzt erfolgten NMR- und MS-Experimenten sind dazu keine eindeutigen Aussagen möglich, da die Konzentration der entstandenen Folgeprodukte zu gering war, um sie NMR-spektroskopisch detektieren zu können.

Mit der Aufklärung der Thioenolstruktur konnten wir nachweisen, daß bei der Epiderminbiosynthese zuerst die oxidative

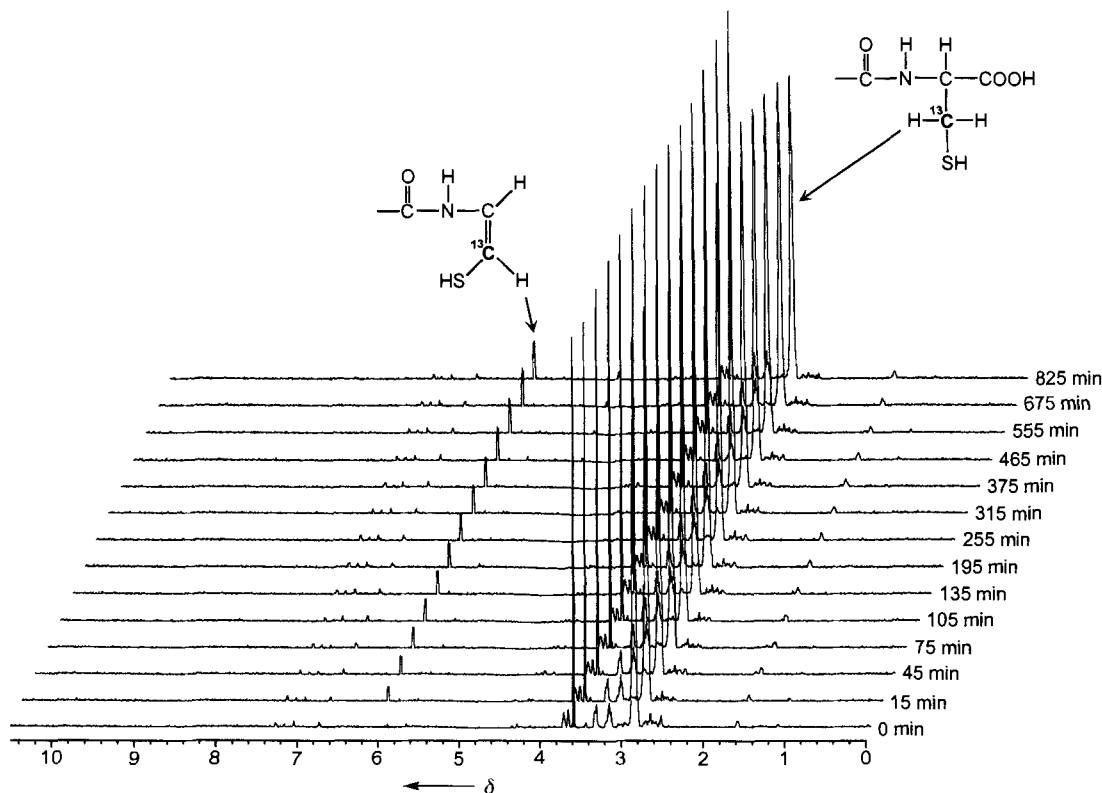


Abb. 2. Umsetzung des DL-Cystein($3\text{-}^{13}\text{C}$)-markierten Substrats KKSFNSTYC mit dem Enzym EpiD. Dargestellt sind die Projektionen der während der Reaktion aufgenommenen HSQC-Spektren auf die F2(^1H)-Achse. Das Produktsignal bei $\delta(^1\text{H}) = 6.01$ nimmt mit der Zeit zu. Das Signal bei $\delta(^1\text{H}) = 2.83$ ist auf die Protonen am ^{13}C -markierten β -C-Atom des Cysteins im Edukt zurückzuführen. Das Signal bei $\delta(^1\text{H}) = 3.58$ stammt von den Methylgruppen des Tris-Puffers.

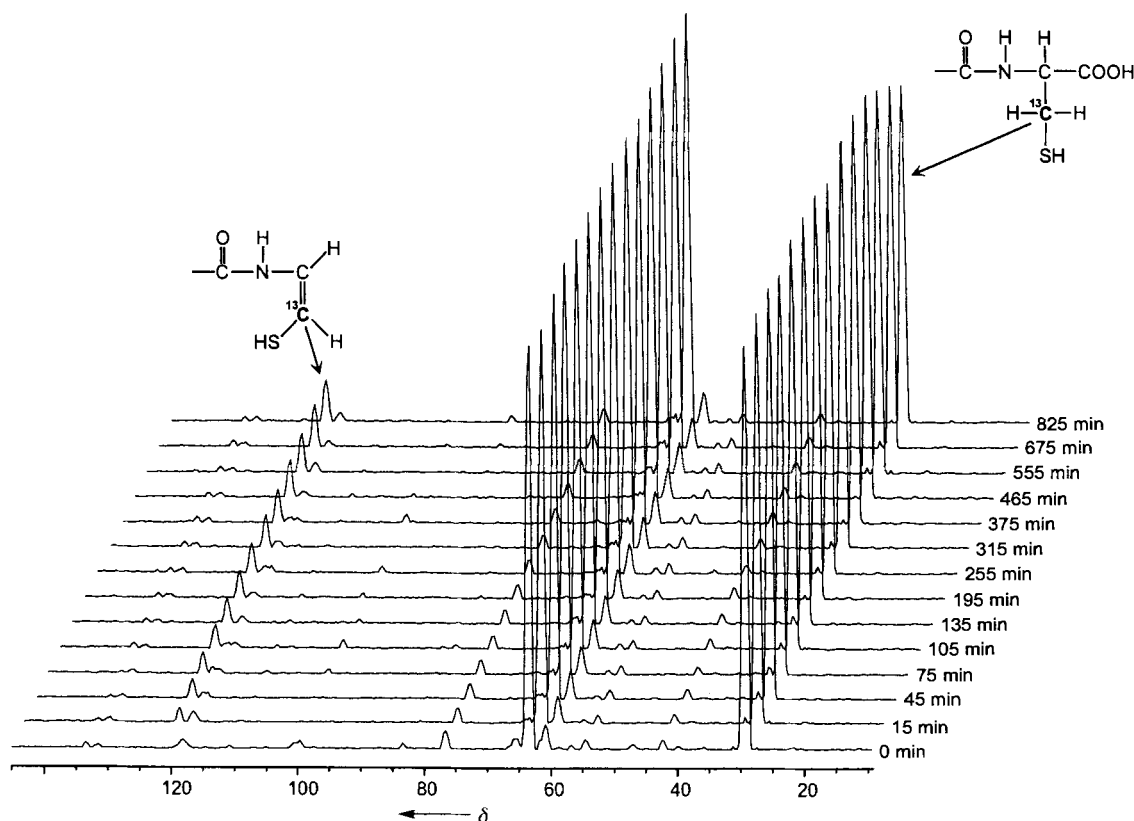


Abb. 3. Umsetzung des DL-Cysteins ($3\text{-}^{13}\text{C}$)-markierten Substrats KKSFNSTYC mit EpiD. Dargestellt sind die Projektionen der während der Reaktion aufgenommenen HSQC-Spektren auf die F1 (^{13}C)-Achse. Das Produktsignal bei $\delta(^{13}\text{C}) = 120.5$ nimmt mit der Zeit zu. Das Signal bei $\delta(^{13}\text{C}) = 29.1$ ist auf das ^{13}C -markierte β -C-Atom des Cysteins im Edukt zurückzuführen. Das Signal bei $\delta(^{13}\text{C}) = 63.3$ rührt von den Methylgruppen des Tris-Puffers her.

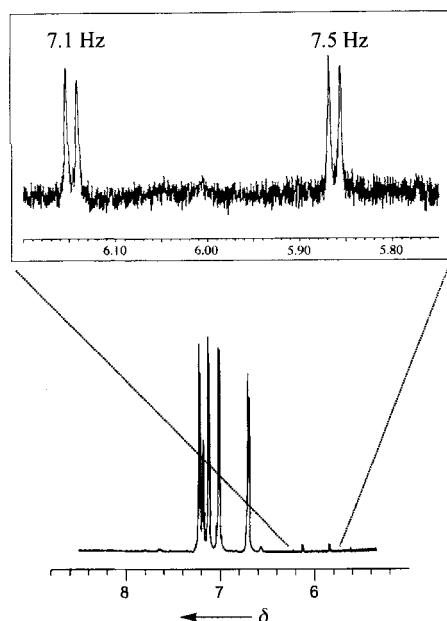


Abb. 4. ^1H -NMR-Spektrum der Umsetzung von KKSFNSTYC mit EpiD nach 16 h. Bei $\delta(^1\text{H}) = 6.01$ ist das Proton am β -C-Atom des C-terminalen Cysteins nach der Modifikation durch EpiD als Dublett von Dubletts mit den Kopplungskonstanten $^3J(\text{H}_\alpha, \text{H}_\beta) = 7.3$ Hz und $^1J(\text{H}_\beta, \text{C}_\beta) = 170$ Hz zu erkennen. Die Kopplungskonstante von 7.3 Hz zwischen H_α und H_β ist typisch für eine (Z)-Konfiguration der Doppelbindung im Reaktionsprodukt [1, 13, 15].

Decarboxylierung auf der Stufe des Thiolgruppen tragenden Vorläuferproteins erfolgt und nicht, wie früher vermutet^[2], erst nach Bildung der Thioetherbrücken. Es ist geplant, das interessante neue Enzym EpiD vollständig mit ^{13}C und ^{15}N zu markie-

ren, um seine Raumstruktur und die des Enzym-Substrat-Komplexes in Lösung NMR-spektroskopisch zu bestimmen. Es ist mit großer Sicherheit zu erwarten, daß die hier beschriebene posttranslationale Modifikation auch bei der Biosynthese des Epidermin-Analogons Gallidermin^[12], des neuartigen Zellwand-Biosynthese-Inhibitors Mersacidin^[13] und des neuen Peptidantibiotikums Cypemycin^[14] vorkommt^[15].

Experimentelles

DL-Cystein ($3\text{-}^{13}\text{C}$) wurde von Isocom (Landshut) und Trimethoxybenzaldehyd von Aldrich (Steinheim) bezogen. N,S-geschütztes $3\text{-}^{13}\text{C}$ -markiertes DL-Cystein wurde wie folgt synthetisiert: Zuerst wurde die Thiolgruppe durch Umsetzung von DL-Cystein ($3\text{-}^{13}\text{C}$) mit 2,4,6-Trimethoxybenzaldehyd unter Zusatz von Trifluoressigsäure mit der 2,4,6-Trimethoxybenzylgruppe (Tmob) [16] geschützt. Die Aminoschutzgruppe wurde mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-O-succinimid (Fmoc-OSu) in einer Lösung von Na_2CO_3 in $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ eingeführt. Mit Fmoc- $3\text{-}^{13}\text{C}$ -DL-Cys(Tmob) wurde 2-Chlor-tritylchlorid-Harz belegt und das Peptid KKSFNSTYC aufgebaut. Die Peptidsynthese wurde auf einem Peptid-Synthesizer (MultiSynTech, Bochum) durchgeführt. Die Fmoc-Aminosäuren wurden mit Diisopropylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol (DIC/HOBT, 1:1) gekuppelt. Das Enzym EpiD wurde nach Überexpression in *Escherichia coli* nach dem in [4] beschriebenen Verfahren gereinigt. ESI-MS- und MS-MS-Spektren wurden mit einem API-III-Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (Sciex, Thornhill, Kanada) gemessen. Die NMR-Experimente wurden an einem AMX-600-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) mit einem ^{13}C , ^{15}N -Tripelresonanzprobenkopf bei 305 K durchgeführt. Das am Cystein- C_β -Atom ^{13}C -markierte Nonapeptid KKSFNSTYC (2.7 mg) wurde in 20 mM Tris-Puffer (Tris/HCl, pH 8.0, 0.5 mL) der 10 mM Dithiothreitol und 10% D_2O enthält, gelöst. In einem NMR-Probengefäß wurden für die Enzymreaktion 6 μg EpiD zugegeben und bei 305 K im Abstand von 20 min HSQC-Spektren mit einer Meßdauer von jeweils 10 min aufgenommen.

Eingegangen am 25. März 1996 [Z 8968]

Stichworte: Biosynthesen · Decarboxylierungen · Epidermin · Peptide · Schwefelverbindungen

- [1] a) H. Allgaier, G. Jung, R.-G. Werner, U. Schneider, H. Zähler, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 1052–1054; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, 24, 1051–1053; b) *Eur. J. Biochem.* **1986**, 160, 9–22.
- [2] N. Schnell, K.-D. Entian, U. Schneider, F. Götz, H. Zähler, R. Kellner, G. Jung, *Nature* **1988**, 333, 276–278.
- [3] a) J. Augustin, R. Rosenstein, B. Wieland, U. Schneider, N. Schnell, G. Engelke, K.-D. Entian, F. Götz, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 204, 1149–1154; b) N. Schnell, G. Engelke, J. Augustin, R. Rosenstein, V. Ungermann, F. Götz, K.-D. Entian, *ibid.* **1992**, 204, 57–68.
- [4] T. Kupke, S. Stevanovic, H.-G. Sahl, F. Götz, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 5354–5361.
- [5] T. Kupke, C. Kempter, V. Gnau, G. Jung, F. Götz, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 5653–5659.
- [6] *Combinatorial Peptide and Non-Peptide Libraries* (Hrsg.: G. Jung), VCH, Weinheim, **1996**.
- [7] T. Kupke, C. Kempter, G. Jung, F. Götz, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 11282–11289.
- [8] Übersichtsartikel: G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Res.* **1990**, 35, 161–214.
- [9] L. Lerner, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1986**, 69, 375–380.
- [10] G. Bodenhausen, D. J. Reuben, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 69, 185–188.
- [11] A.-M. Le Nocher, P. Metzner, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 41, 6151–6154.
- [12] a) R. Kellner, G. Jung, T. Hörner, H. Zähler, N. Schnell, K.-D. Entian, F. Götz, *Eur. J. Biochem.* **1988**, 177, 53–59; b) S. Freund, G. Jung, O. Gutbrod, G. Folkers, W. A. Gibbons in [15b], S. 91–102.
- [13] H. Kogler, M. Baud, H. W. Fehlhaber, C. Griesinger, W. Schubert, U. Teetz in [15b], S. 159–170.
- [14] a) Y. Minami, K. Yoshida, R. Azuma, A. Urakawa, T. Kawauchi, T. Otani, K. Komiyama, S. Omura, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8001–8004; b) K. Komiyama, K. Otoguro, T. Segawa, K. Shiomi, H. Yang, Y. Takahashi, M. Hayashi, T. Otani, S. Omura, *J. Antibiot.* **1993**, 46, 1666–1671.
- [15] Übersichtsartikel: a) G. Jung, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1067–1084; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1051–1068; b) *Nisin and Novel Lantibiotics* (Hrsg.: G. Jung, H.-G. Sahl), Escm, Leiden, **1991**; c) R. Jack, F. Götz, G. Jung in *Biotechnology*, Vol. 7 (Hrsg.: H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler), VCH, Weinheim, im Druck.
- [16] M. C. Munson, C. Garcia-Echeverria, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 3031–3018.

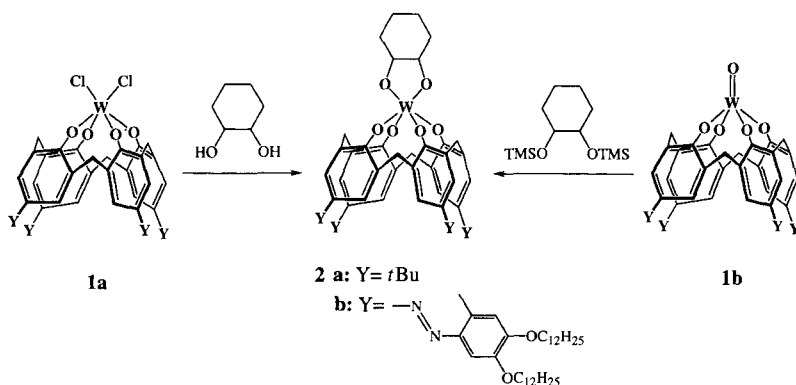
Chirale Metallocalix[4]arene: Trennung durch diastereomere Wolfram(IV)alkoxide**

Bing Xu, Patrick J. Carroll und
Timothy M. Swager*

Effiziente Synthesewege für chirale supramolekulare Systeme sind für die Planung neuer Materialien und Katalysatoren wichtig. Calixarene^[1] gehören zu den vielseitigsten Verbindungen für die Konstruktion von supramolekularen Rezeptorsystemen mit wohldefinierten Strukturen und spezifischen Funktionen^[2]. Seit neuestem verwendet man Calixarene als hochspezifische Liganden^[3], Sensoren^[4], nichtlineare optische Chromophore^[5], poröse Monoschichten^[6] und schüsselförmige Flüssigkristalle^[7]. Chirale Calix[4]arene sind durch unsymmetrische Substitutionen am unteren Rand^[8], durch das „Anhängen“ chiraler Verbindungen^[9] und durch den Einbau unsymmetrischer Substitutionsmuster in die Phenylringe^[10] hergestellt worden. *meta*-substituierte, *C*₄-symmetrische Calix-

arene letztgenannten Typs sind in Form der Racemate^[10b] hergestellt worden, und ein Weg zu Analoga mit vielen funktionellen Gruppen wurde vor kurzem beschrieben^[11]. Trotz des Interesses an chiralen Calix[4]arenen wurden nur wenige Trennverfahren entwickelt. Wir haben übergangsmetallhaltige Calix[4]arene^[12] mit starren, wohldefinierten Rezeptorhohlräumen für die Entwicklung von supramolekularen Materialien und Katalysatoren untersucht und berichten nun über die erste Trennung von chiralen Metallocalix[4]arenen. Diese Methode nutzt Wolframalkoxide^[13], die effizient in Lewis-saure Oxowolfram(VI)-Calix[4]aren-Komplexe oder Dichlorwolfram(VI)-Calix[4]arene umgewandelt werden können^[7a, 12a].

Unter vielen Trennmethode haben wir uns auf die Verwendung von diastereomeren Zwischenprodukten konzentriert, um die chiralen Metallocalix[4]arene zu trennen. Weil man das racemische $R_4W=O$ als Analogon von $R_2C=O$ ansehen kann, wurde der Komplex $R_4W(OR^*)_2$ gewählt, um Diastereomere zu erhalten, die getrennt werden können, so wie chirale Ketone über diastereomere Ketale getrennt werden. Nach der Trennung liefert die Entfernung der Alkoxygruppe die einzelnen Enantiomere in reiner Form. Um die Zugänglichkeit und Stabilität von cyclischen Wolfram(VI)-Calix[4]arenalkoxiden^[14] zu testen, synthetisierten wir die auf *trans*-1,2-Cyclohexandiol basierenden Chelate **2a** und **2b**. Zwei Synthesewege wurden entwickelt (Schema 1). Bei der einen Route wurde das Dichlorwolfram(VI)-*p*-*t*Bu-Calix[4]aren **1a** mit zweifach deprotoniertem Cyclohexandiol vier Stunden in Toluol unter Rückfluß erhitzt und lieferte **2a** in 96% Ausbeute. Alternativ wird das Oxowolfram(VI)-Calix[4]aren **1b** mit 10% Ausbeute in **2b** umgewandelt, wenn es zwei Tage mit silyliertem Cyclohexandiol in siedendem



Schema 1. Synthese von **2**.

Toluol umgesetzt wird. ¹H-NMR-Spektren dieser Calix[4]arene weisen die für **2** charakteristischen Signale auf. Wegen der niedrigeren Symmetrie von **2** sind die Methylengruppen des Calix[4]arenkerns nicht äquivalent und liefern zwei Sätze von gekoppelten geminalen Protonen (insgesamt vier Dubletts). Sowohl **2a** als auch **2b** können durch Chromatographie an einer Kieselgelsäule ohne Zersetzung gereinigt werden.

Nach der Synthese der Wolfram(VI)-Dialkoxy-calix[4]arene bemühten wir uns, diastereomere Komplexe, in denen sowohl das Calix[4]aren als auch die Dialkoxygruppen chiral sind, mit denselben Methoden herzustellen (Schema 2). Wir verwendeten das 3,4-Dimethylcalix[4]aren, das kürzlich von Böhmer et al. beschrieben wurde, weil es eine interessante, inhärent chirale Struktur mit *C*₄-Symmetrie aufweist^[10b]. Die Reaktion von 3,4-Dimethylcalix[4]aren mit WCl_6 in Benzol lieferte den Dichlorwolfram(VI)-Komplex **3** in 81% Ausbeute. Das ¹H-NMR-Spektrum enthielt vier Dubletts der Calix[4]aren-Methylenpro-

*] Prof. T. M. Swager, Dr. B. Xu
Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology
Cambridge, MA 02139 (USA)
Telefax: Int. +617/258-7500
Dr. P. J. Carroll
Department of Chemistry, University of Pennsylvania
Philadelphia, PA 19104-6323 (USA)

**] Diese Arbeit wurde vom Office of Naval Research und mit einem Camille und Henry Dreyfus Teacher Scholar Award unterstützt.