

- [8] Übersichtsartikel: G.-J. Boons, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 1095; G. H. Veeneman, S. Notermans, R. M. J. Liskamp, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6695; L. Yan, C. M. Taylor, R. Goodnow, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6953; S. P. Douglas, D. M. Whitfield, J. J. Krepsinsky, *ibid.* **1991**, *113*, 5095.
- [9] S. J. Danishefsky, M. T. Bilodeau, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1482; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1380.
- [10] S. J. Danishefsky, K. F. McClure, J. T. Randolph, R. B. Ruggeri, *Science* **1993**, *260*, 1307; J. Y. Roberge, X. Beebe, S. J. Danishefsky, *ibid.* **1995**, *269*, 202.
- [11] G. C. Look, C. P. Holmes, J. P. Chinn, M. A. Gallop, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7588; F. Albericio, M. Pons, E. Pedrosa, E. Giralt, *ibid.* **1989**, *54*, 360; M. Mazure, B. Calas, A. Cave, J. Parelo, C. R. Acad. Sci. Ser. 2 **1986**, *303*, 553; A. G. Ludwick, L. W. Jelinski, D. Live, A. Kintanar, J. J. Dumais, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6493; F. Bardella, R. Eritja, E. Pedrosa, E. Giralt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 2793; H. M. Eggenweiler, E. Bayer, vorgestellt auf dem Fourth International Symposium on Solid Phase Synthesis, **1995**, Edinburgh.
- [12] P. A. Keifer, L. Baltusis, D. M. Rice, A. A. Tymiac, J. N. Shoolery, *J. Magn. Res. A* **1996**, *119*, 65; S. S. Sarkar, R. S. Gargipati, J. L. Adams, P. A. Keifer, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2305; W. L. Fitch, G. Detre, C. P. Holmes, J. N. Shoolery, P. A. Keifer, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7955; R. C. Anderson, M. A. Jarema, M. J. Shapiro, J. P. Stokes, M. Ziliox, *ibid.* **1995**, *60*, 2650.
- [13] H. Y. Carr, E. M. Parcell, *Phys. Rev.* **1954**, *94*, 630; S. Meiboom, D. Gill, *Rev. Sci. Instr.* **1958**, *29*, 688.
- [14] A. Bax, S. Subramanian, *J. Magn. Reson.* **1986**, *67*, 565.
- [15] S. J. Danishefsky, R. L. Halcomb, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6661.

Calcium-abhängige Peptidantibiotika mit ungewöhnlichen Bausteinen aus *Streptomyces coelicolor* A3(2)**

Christoph Kempter, Dietmar Kaiser, Sabine Haag, Graeme Nicholson, Volker Gnau, Tilmann Walk, Karl Heinz Gierling, Heinrich Decker, Hans Zähler, Günther Jung und Jörg W. Metzger*

Professor Ernst Bayer zum 70. Geburtstag gewidmet

Hopwood et al.^[1] isolierten 1983 eine Substanz aus *Streptomyces coelicolor* A3(2), die in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen das Wachstum Gram-positiver Bakterien hemmt. Die Autoren nannten sie Calcium-abhängiges Antibiotikum (calcium-dependent antibiotic, CDA). In planaren Lipiddoppelschichten bildet

CDA Kanäle, die in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen selektiv einwertige Kationen transportieren.^[1]

Durch HPLC-MS-Kopplung mit Elektrospray-Ionisierung (ESI) konnten wir im Kulturfiltrat in Abhängigkeit vom verwendeten Kulturmedium zwei oder vier sehr ähnliche, antibiotisch wirksame Hauptkomponenten nachweisen: Mit einem Heffextrakt als N-Quelle wurden CDA1 und CDA2 (relative monoisotopische Massen 1562 bzw. 1576), mit Sojapepton und Fleischextrakt als N-Quellen CDA3a, CDA3b, CDA4a und CDA4b (1480, 1482, 1494 bzw. 1496) festgestellt. Nach optimierter Produktion konnte durch präparative HPLC 10–50 mg L^{-1} aktive Rohfraktion erhalten werden. Rechromatographie ergab in hoher Reinheit CDA1 (8 mg) und CDA2 (16 mg) bzw. CDA3a und CDA3b (zusammen ca. 4 mg) sowie CDA4a und CDA4b (zusammen ca. 8 mg) in Reinheiten bis zu 80%.

Nach Hydrolyse (6 N HCl, 24 h) und Umsetzung zu *N*-Trifluoracetyl-*n*-propylestern wurden mit Kapillar-GC-MS an Chirasil-Val mit Enantiomer-Labeling^[2] die Aminosäuren L-Asp/Asn (3.04), Gly (0.79), L-Ser (1.00) und L-Thr (0.99) nachgewiesen. Die Hydrolyse unter O_2 -Ausschluss und Thioglycolsäurezusatz lieferte zudem L- und D-Trp im Verhältnis 1:1. Daneben lagen im Hydrolysat die ungewöhnlichen Aminosäuren D-4-Hydroxyphenylglycin und D-3-Hydroxyasparaginsäure (2R,3S) vor, die mit Vergleichsverbindungen identifiziert wurden. Eine dritte ungewöhnliche Aminosäure ähnelte laut GC-MS-Analyse Glutaminsäure, alle Hauptfragmente waren allerdings um 14 Masseneinheiten schwerer. TOCSY^[3]- und HSQC^[4]-NMR-Spektren (TOCSY = Total Correlation Spectroscopy, HSQC = Heteronuclear Single Quantum Coherence) lieferten Hinweise auf 3-Methylglutaminsäure. D,L-3-Methylglutaminsäure wurde durch Michael-Addition von Acetylaminomalonsäurediethylester an Crotonsäurenitril und anschließende saure Hydrolyse sowie Decarboxylierung hergestellt. Durch Vergleich des Massenspektrums der im Hydrolysat festgestellten Aminosäure mit dem der synthetischen D,L-3-Methylglutaminsäure konnte 3-Methylglutaminsäure eindeutig identifiziert werden. Die vier isomeren *N*-Trifluoracetyl-*n*-propylester der synthetischen, racemischen D,L-3-Methylglutaminsäure ergaben im Gaschromatogramm (Trennung an L-Chirasil-Val) zwei Peaks gleicher Intensität, die auf die beiden Diastereomerenpaare zurückzuführen sind (Enantiomere werden erfahrungsgemäß an Chirasil-Val immer aufgetrennt). 3-Methylglutaminsäure aus CDA2 hatte die gleiche Retentionszeit wie der zweite Peak im Chromatogramm des synthetischen Produkts. Da D-konfigurierte α -Aminosäuren in der Regel zuerst eluiert werden, sollte CDA2 L-3-Methylglutaminsäure oder das entsprechende Säureamid enthalten.

Da CDA2 mit Ninhydrin keine Farbreaktion ergab und über Edman-Abbau nicht direkt sequenziert werden konnte, mußte es N-terminal blockiert sein. Über ein HMBC^[5]-NMR-Spektrum (HMBC = Heteronuclear Multiple Bond Correlation) wurde ein 2,3-Epoxyhexanoylrest als N-terminale Gruppe identifiziert. Die $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$ -Kopplungskonstanten für das C-2- und das C-3-Atom des Epoxyhexanoylrestes, die aus einem während der Akquisition nicht ^{13}C -entkoppelten HSQC-NMR-Spektrum ermittelt wurden, betragen für die beiden Ringprotonen 172 bzw. 179 Hz. Diese Werte sind charakteristisch für einen Oxiranring.^[6] Um 2,3-Dihydroxyhexansäure im CDA2-Hydrolysat mit GC-MS zu identifizieren, wurde eine Vergleichsverbindung aus Hex-2-ensäure durch Umsetzung mit Perameisensäure und anschließende Hydrolyse des gebildeten Oxirans hergestellt.

Im Amidprotonen-Bereich des TOCSY-NMR-Spektrums traten mit Ausnahme der Signale des D-3-Hydroxyasparagin/säure-Restes die Signale der Reste aller im Hydrolysat nachge-

[*] Prof. Dr. J. W. Metzger, Dr. C. Kempter
Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft
der Universität
Bandtäte 2, D-70569 Stuttgart
Telefax: Int. + 711/685-3729
E-mail: joerg.metzger@isw.uni-stuttgart.de
Dipl.-Chem. D. Kaiser, G. Nicholson, Dipl.-Chem. V. Gnau, T. Walk,
Prof. Dr. G. Jung
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen
Dr. S. Haag, Prof. Dr. H. Zähler
Biologisches Institut der Universität
Auf der Morgenstelle 28, D-72076 Tübingen
Dr. H. Decker
Hoechst AG, Process Development H780
D-65926 Frankfurt
Dipl.-Chem. K. H. Gierling
Institut für Anorganische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 323) und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Prof. Dr. D. A. Hopwood (John Innes Centre, Genetics Department, Norwich, UK) für die Überlassung des Stammes *Streptomyces coelicolor* A3(2) 2377. Teile dieser Arbeit wurden auf der 8. Irseer Naturstofftagung der DECHEMA (21.–23.02.1996) in Kloster Irsee und auf der 29. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Massenspektrometrie der Deutschen Physikalischen Gesellschaft, der Gesellschaft Deutscher Chemiker und der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie (AGMS 1996, 28.–31.05.96) in Bremen vorgestellt.

Tabelle 1. ^1H - und ^{13}C -chemische Verschiebungen des Peptidantibiotikums CDA2 ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, $c = 16 \text{ mg mL}^{-1}$, 305 K); Eph: 2,3-Epoxyhexanoyl, Hpg: 4-Hydroxyphenylglycin, PHAsn: 3-Phosphohydroxyasparagin, 3MeGlu: 3-Methylglutaminsäure [a].

	NH	$\alpha\text{-C}$	$\alpha\text{-H}$	$\beta\text{-C}$	$\beta\text{-H}$	$\delta(^{13}\text{C})_n/\delta(^1\text{H})_n$
Eph		53.8	3.33	57.4	3.05	(32.8/1.43, 1.55), (18.4/1.39), (13.5/0.9)
^1Ser	7.94	54.1	4.49	61.1	3.61, 3.67	
^2Thr	8.15	55.1	4.46	69.5	5.10	(15.4/0.80)
^3Trp	7.95	53.6	4.58	27.9	2.89, 3.09	(109.2), (123.5/7.02), (NH: 10.66), (135.6), (126.9), (118/7.56), (112.5/6.95), (120.5/7.03), (110.8/7.30)
^4Asp	8.17	49.0	4.61	36.0	2.47, 2.75	
^5Asp	8.08	49.0	4.67	36.0	2.47, 2.65	
^6Hpg	8.25	55.7	5.29			(128.1/7.15), (114.9/6.68), (157), (OH: 9.35)
^7Asp	8.73	49.0	4.69	36.0	2.44, 2.68	
^8Gly	8.05	42.0	3.82			
$^9\text{PHAsn}$	8.4	54.4	5.01	75	4.61	
$^{10}\text{MeGlu}$	7.36	55.1	4.42	33.0	2.30	(37.8/1.98, 2.38), (14.5/0.76)
^{11}Trp	8.51	52.5	4.55	26.0	3.09, 3.20	(108.7), (123.4/7.15), (NH: 11.1), (135.6), (126.8), (118/7.54), (112.5/6.95), (120.5/7.03), (110.8/7.30)

[a] Da die ^{13}C -chemischen Verschiebungen des C-1-Atoms im Phenylring des Hpg-Restes sowie die der meisten Carbonyl-C-Atome nicht aus dem HMBC-NMR-Spektrum ermittelt werden konnten, wird hier auf eine Angabe verzichtet.

wiesenen Aminosäuren auf. Die Signale für die Aminosäurereste und den 2,3-Epoxyhexanoylrest wurden über die ^1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen aus TOCSY- und HSQC-NMR-Spektren zugeordnet (Tabelle 1), die der beiden Protonen am C_α - und C_β -Atom des D-3-Hydroxyasparagin/säure-Restes konnten im Bereich aliphatischer Protonen eindeutig zugeordnet werden. Das ESI-MS-Produktionenspektrum von CDA2 mit einem $[\text{M} + \text{H}]^+$ -Ion bei $m/z = 1577$ wies ein Hauptfragmentation mit einer um 98 niedrigeren Masse als das Mutterion auf. Diese Abspaltung ist typisch für phosphorylierte Peptide. Analog wies das Produktionenspektrum des mit Diazomethan siebenfach methylierten CDA2 (m/z 1675 $[\text{M} + \text{H}]^+$; modifiziert wurden eine phenolische, vier Carboxy- sowie die Phosphogruppe) ein Hauptfragmentation bei m/z 1549 auf, das durch β -Eliminierung von Phosphorsäuredimethylester (-126) erklärt werden kann. Die Position der Phosphorylierungsstelle wurde mit einem $1\text{D-}^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ -HMBC-NMR-Spektrum ermittelt. Es trat ein Signal bei $\delta = 4.62$ auf, das auf die Kopplung des P-Atoms mit dem Proton am C_β -Atom des D-3-Hydroxyasparagin/säure-Restes zurückzuführen ist, da analog zum $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum auch hier im allgemeinen nur ^2J - und ^3J -Kopplungen auftreten.

Da im HMBC-NMR-Spektrum viele für eine Sequenzierung wichtige Wechselwirkungen (NH-CO und $\text{CH}_2\text{-CO}$) nicht detektierbar waren, wurde für die NMR-spektroskopische Sequenzierung das NOESY^[7]-NMR-Spektrum (Abb. 1) herangezogen. Es trat eine NOE-Wechselwirkung zwischen dem NH-Proton des Serinrestes ($\delta(^1\text{H}) = 7.94$) in Position eins und dem Proton am C-2-Atom des 2,3-Epoxyhexanoylrestes ($\delta(^1\text{H}) = 3.33$) auf; deshalb muß dieser Rest den N-Terminus des Peptidantibiotikums bilden. Die Aminosäuresequenz von CDA2 konnte fast vollständig aus dem NOESY-NMR-Spektrum ermittelt werden.

Durch Edman-Abbau konnte ein großer Teil der NMR-spektroskopisch bestimmten Sequenz von CDA2 bestätigt werden. Wegen der N-terminalen Blockierung wurde CDA2 vor der Edman-Sequenzierung mit 3-Brom-2-(*o*-nitrophenylsulfenyl)-skatol (BNPS-Skatol)^[8] gespalten. Der Bindungsbruch findet

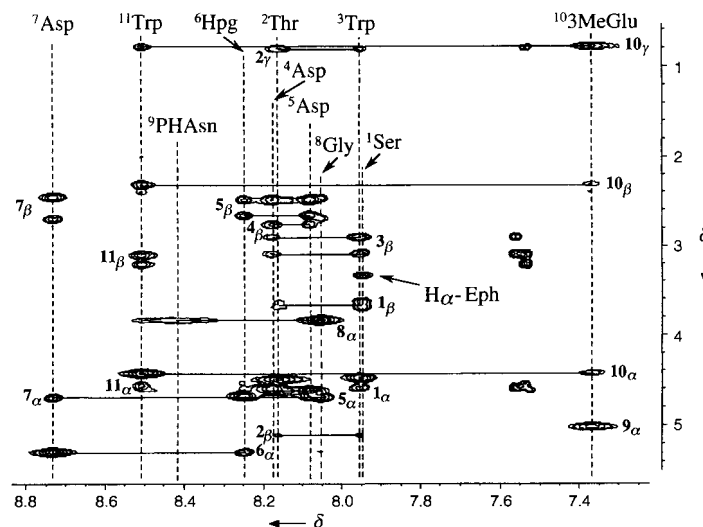


Abb. 1. Amidprotonen-Bereich aus dem NOESY-NMR-Spektrum von CDA2 (Eph, 2,3-Epoxyhexanoyl), das eine fast vollständige Sequenzierung des Peptids ermöglicht.

dabei selektiv nach Tryptophanresten statt. Um die ungewöhnlichen Aminosäuren in CDA2, für die keine Phenylthiohydantoin(PTH)-Vergleichsverbindungen vorhanden waren, zu identifizieren, wurde der Gasphasensequenzator an ein ESI-Massenspektrometer gekoppelt. Nach Umstellung des HPLC-Fließmittels des Sequenzators von Phosphat- auf einen Elektrospraykompatiblen Ammoniumacetat-Puffer (1 mM, pH = 4.3) wurden die Massen der eluierenden PTH-Aminosäuren on-line bestimmt. Die Partialsequenz lautete Asp-Asp-Hydroxyphenylglycyl-Asp-Gly-Xxx-Methylglutaminsäure. Der sechste Abbauzyklus (Xxx, Abb. 2) lieferte ein PTH mit einer relativen Molekülmasse M_r von 247. Es handelt sich demnach um das PTH-Derivat der ungesättigten Aminosäure 2,3-Didehydroasparagin, die unter den Bedingungen des Edman-Abbaus durch β -Eliminierung von Phosphorsäure aus dem D-3-Phosphohydroxyasparaginrest entstanden sein muß. *O*-phosphoryliertes D-3-Hydroxyasparagin wurde unseres Wissens noch nicht in einem Naturstoff nachgewiesen.

Die Summe der Massen der elf identifizierten Aminosäurereste und der Masse des Epoxyhexanoylrestes ergibt eine relative monoisotopische Molekülmasse von 1594 (1576 für natives CDA2). Die Differenz von 18 deutet auf eine Cyclisierung (Lactonringbildung) hin. Da im HMBC- und NOESY-NMR-Spektrum keine eindeutigen Wechselwirkungen festzustellen waren, wurde die Lage der Lactonbrücke über Derivatisierungen bestimmt. Um zu ermitteln, welche Carboxygruppe an der Lactonbildung beteiligt ist, wurden alle freien Carboxygruppen des CDA2 mit 2-Propylamin und HOBT/TBTU (HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol, TBTU = 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborat) im Verhältnis 1 : 1 amidiert. Anschließend wurde mit NaOH (1 N, 30 min, RT) umgesetzt, um eine Ringöffnung und damit eine bessere Fragmentierung im MS zu erreichen, da Produktionenspektren der CDA-Derivate mit geschlossener Lactonbrücke generell nur wenig Sequenzinformationen enthielten. Die Bildung des Produkts mit $M_r = 1661$ kann durch Amidierung der vier Carboxyaminosäurereste mit 2-Propylamin ($+ 4 \times 41$), partielle Hydrolyse ($+ 2 \times 18$) zur Oxiran- und Lactonringöffnung, Dephosphorylierung des 3-Phosphohydroxyasparaginrestes ($- 98$) und Eliminierung von Wasser ($- 18$) erklärt werden. Die Eliminierung von Wasser ist vermutlich auf eine Dehydratisierung des 2,3-Didehydroasparaginrestes zurückzuführen. Das Produktio-

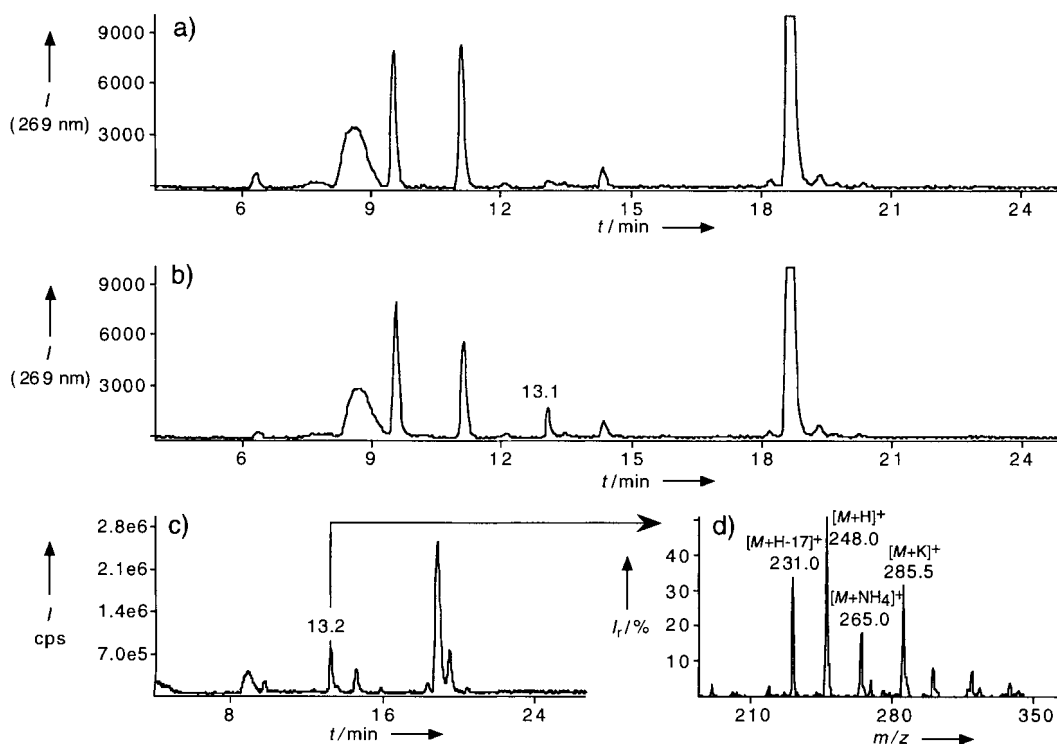


Abb. 2. Edman-Abbau von partiell hydrolysiertem und mit BNPS-Skatol gespaltenem CDA2 mit Online-Kopplung eines Gasphasensequenzators an ein ESI-Massenspektrometer; a) UV-Chromatogramm des 5. Abbaucyclus, b) UV-Chromatogramm des 6. Abbaucyclus, c) MS-Chromatogramm des 6. Abbaucyclus, d) Massenspektrum zum Peak bei 13.2 min. M_r des zugehörigen PTH-Derivates: 247 (m/z 248 $[M + H]^+$, m/z 265 $[M + NH_4]^+$, m/z 286 $[M + K]^+$) ist auf 2,3-Didehydroasparagin zurückzuführen, das durch β -Eliminierung von Phosphorsäure aus 3-Phosphohydroxyasparagin hervorgeht. Das Fragmentation bei m/z 231 entsteht in der Transportregion der ESI-Quelle durch Eliminierung von Ammoniak aus dem Säureamid.

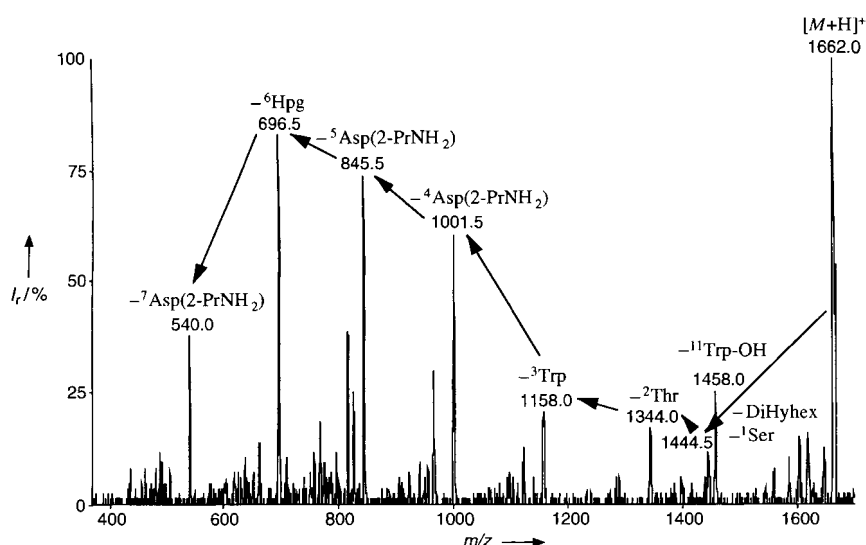


Abb. 3. Produktionspektrum von vierfach 2-propylamidiertem CDA2 mit geöffnetem Oxiran- und Lactonring (Hpg: 4-Hydroxyphenylglycyl, DiHyHex: 2,3-Dihydroxyhexyl); durch Eliminierung von H_2O im Bereich des 3-Phosphohydroxyasparaginrestes bei der alkalischen Partialhydrolyse kommt die relative Molekülmasse von 1661 zustande.

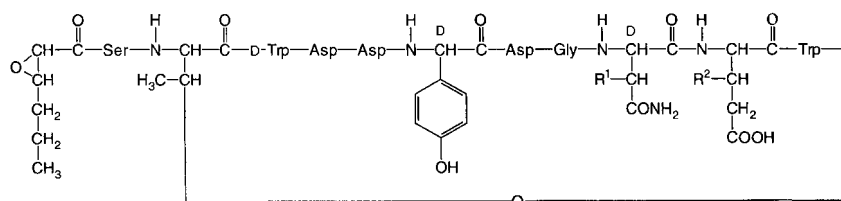


Abb. 4. Strukturen der CDA-Komponenten CDA1, CDA2, CDA3b und CDA4b; Reste, die D-Konfiguration an α -C aufweisen, sind gekennzeichnet, alle anderen sind L-konfiguriert (CDA1: $R^1 = OPO_3H_2$, $R^2 = H$; CDA2: $R^1 = OPO_3H_2$, $R^2 = CH_3$; CDA3b: $R^1 = OH$, $R^2 = H$; CDA4b: $R^1 = OH$, $R^2 = CH_3$).

nenspektrum des amidierten CDA2 (Abb. 3) wies alle C-terminalen Y"-Fragmentationen^[9] (entstanden durch Bindungsbruch zwischen CO und NH) bis zum Glycin in Position acht sowie ein Fragmentation bei m/z 1458 auf, das durch Abspaltung des nichtmodifizierten, C-terminalen Tryptophanrestes entsteht. Somit lagen nach der Reaktion alle Asp-Reste und der 3-Methylglutaminsäurerest als 2-Propylamide vor, während die Carboxygruppe des C-terminalen Tryptophans nicht derivatisiert werden konnte. Die Lactonbrücke geht deshalb vom C-Terminus aus. Nicht an der Lactonbrücke beteiligte Hydroxyaminosäurereste, d.h. alle freien Hydroxygruppen, wurden mit Chromsäure^[10] oxidiert (10 h, RT). Im Hydrolysat konnte nach der Oxidation nur noch wenig Serin nachgewiesen werden, während der Gehalt an Threonin nahezu unverändert war. Folglich liegt die Lactonbrücke in CDA2 zwischen dem C-terminalen Tryptophan- und dem Threoninrest in Position zwei vor.

Um die Konfiguration der beiden in CDA2 enthaltenen Tryptophanreste zu ermitteln, wurde partiell hydrolysiertes CDA2 mit geöffnetem Oxiran- und Lactonring enzymatisch mit Endoproteinase Asp-N gespalten. Das N-terminale Fragment, das durch Spaltung nach Asp in Position sieben gebildet wurde, enthielt D-Trp, das C-terminale L-Trp. Aus diesen Ergebnissen schließen wir, daß CDA2 die in Abbildung 4 dargestellte Struktur hat.

Die Komponenten CDA1 ($M_r = 1562$) sowie CDA3a und b ($M_r = 1480$ bzw. 1482) weisen im Hydrolysat (anders als CDA2) L-Glutaminsäure und nicht L-3-Methylglutaminsäure auf, was die Massendifferenz von 14 zwischen CDA1/CDA2 und CDA3a/CDA4a sowie CDA3b/CDA4b erklärt. Der Edman-Abbau mit Online-UV- und -MS-Detektion einer mit BNPS-Skatol gespaltenen Probe von CDA1 bestätigte den Austausch von 3-Methylglutaminsäure in Position zehn gegen Glutaminsäure bei ansonsten identischer Sequenz. Da für die $[M + H]^+$ -Ionen von CDA3a/b und von CDA4a/b im Produktionenspektrum keine Abspaltung von 98 auftrat, liegen diese Verbindungen nicht phosphoryliert vor. Die Massendifferenz von 80 u zwischen CDA3b und CDA1 sowie CDA4b und CDA2 kann durch den Austausch von D-3-Phosphohydroxyasparagin durch D-3-Hydroxyasparagin erklärt werden. Die Edman-Sequenzierung mit UV- und MS-Detektion einer mit BNPS-Skatol gespaltenen Probe von CDA4a/b lieferte beim sechsten Abbaucyclus ein PTH-Derivat mit der Masse 265, entsprechend der Masse des PTH-Derivates von 3-Hydroxyasparagin. Die Strukturen der Komponenten CDA3a und CDA4a mit einer Massendifferenz von zwei zu CDA3b bzw. 4b konnten mangels ausreichender Mengen noch nicht ermittelt werden.

Auffällig an den kanalbildenden CDA-Peptiden sind die zahlreichen sauren und aromatischen Reste. Möglicherweise unterstützt die Wechselwirkung von Ca^{2+} -Ionen mit den sauren Gruppen die Aggregation mehrerer CDA-Moleküle unter Bildung eines Kanals in der Membran. Am selektiven Ionentransport könnte dann das π -System mitbeteiligt sein. Zur Zeit werden Konformationsuntersuchungen mit Circular dichroismus und NMR-Spektroskopie in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen durchgeführt, die hierzu Hinweise liefern sollen.

Experimentelles

Für die Produktion von CDA wurde der Stamm *Streptomyces coelicolor* A3(2) 2377 [11] eingesetzt. Produktionsmedien: Medium 1: Mannit 20, Sojapepton 10, Fleischextrakt 10 g L^{-1} , Histidin 250, Uracil 100 mg L^{-1} , pH = 7.4; Medium 2: Mannit 20, Hefeextrakt 20 g L^{-1} , Histidin 250, Uracil 100 mg L^{-1} , pH = 7.4.

ESI-MS- und MS-MS-Spektren wurden mit einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer API III (Sciex, Thornhill, Kanada) aufgenommen, das mit einer druckluftunterstützten Elektrospray-Quelle ausgerüstet war. Die NMR-Experimente wurden an einem AMX-600-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) mit einem inversen ^{13}C , ^{15}N -Tripelresonanzprobenkopf bei 305 K durchgeführt. Die ^{31}P -NMR-Spektren wurden an einem DRX-250-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) gemessen.

Für die Sequenzierungen wurde ein Proteinsequenzer 476A (ABI, Weiterstadt) verwendet. Die GC- oder GC-MS-Untersuchungen wurden mit einem Gaschromatograph Sichromat I (Siemens) mit N-selektivem Detektor und Spektrophysics-4290-Integrator oder einem Massenspektrometer MAT 112S (Finnigan, Bremen) mit AMD-Intectra-Datensystem durchgeführt. Als Säulen wurden Glas- oder Fused-Silica-Kapillaren ($20 \text{ m} \times 0.3 \text{ mm}$ oder 0.25 mm , L-Chirasil-Val, $d_f = 0.13 \text{ }\mu\text{m}$) verwendet.

RP-18-HPLC: Für die semipräparativen Trennungen (Nucleosil C18, $5 \text{ }\mu\text{m}$, $250 \times 8 \text{ mm}$, Grom, Herrenberg) wurde eine Niederdruckgradientenpumpe (Waters, Eschborn) mit einem Photodiodenarray-Detektor 990 verwendet; Als mobile Phasen dienten Trifluoressigsäure (0.1%, Laufmittel A) und Acetonitril mit 0.1% Trifluoressigsäure (Laufmittel B). Für die HPLC-MS-Kopplung wurde ein HPLC-System (Applied Biosystems ABI 140A, Weiterstadt) wie in Lit. [12] beschrieben verwendet.

Chemische Modifizierungen (anschließende Reinigung jeweils über RP-18-HPLC): 1) Partialhydrolyse mit NaOH: CDA2 (0.1 mg) wurde 30 min mit NaOH in H_2O (1 N, 0.5 mL) bei RT umgesetzt. 2) Enzymatische Spaltung mit Endoproteinase Asp-N: Partiiell hydrolysiertes CDA2 (ca. 50 μg) wurde mit Endoproteinase Asp-N (2 μg , „Sequence Grade“, Boehringer, Mannheim) in Natriumphosphat-Puffer (100 μL , pH = 8) 24 h bei 36°C inkubiert. 3) BNPS-Skatol-Spaltung: CDA2 (0.1 mg) wurde 30 min in 70% Essigsäure mit einer Lösung von 3-Brom-2-(o-nitrophenylsulfenyl)skatol (Sigma, St. Louis) in Essigsäure (0.5 mL, 6 mm) umgesetzt. 4) Amidierung mit 2-Propylamin: CDA2 (0.2 mg), 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborat (TBTU, 2.5 mg), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT, 1.16 mg) und 2-Propylamin (1 μL) wurden in DMF/Acetonitril (20 μL bzw. 0.5 mL) gelöst und die Produkte nach 4 h bei RT gereinigt.

Eingegangen am 19. August 1996 [Z9373]

Stichworte: Antibiotika · Ionenkanäle · Peptide · Struktur-aufklärung

- [1] a) J. H. Lakey, E. J. A. Lea, B. A. M. Rudd, H. M. Wright, D. A. Hopwood, *J. Gen. Microbiol.* **1983**, 129, 3565–3573; b) D. A. Hopwood, H. M. Wright, *ibid.* **1983**, 129, 3575–3579.
- [2] H. Frank, G. J. Nicholson, E. Bayer, *J. Chromatogr.* **1978**, 167, 187–196.
- [3] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, 53, 521–528.
- [4] G. Bodenhausen, D. J. Reuben, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 69, 185–188.
- [5] A. Bax, M. F. Summers, *J. Magn. Reson.* **1986**, 108, 2093–2094.
- [6] H.-O. Kalinowski, S. Berger, *^{13}C -NMR-Spektroskopie* (Hrsg.: S. Braun), Thieme, Stuttgart, **1984**.
- [7] J. Jeener, B. H. Maier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1979**, 71, 4546–4553.
- [8] M. M. Vestling, M. A. Kelly, C. Fenselau, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, 8, 786–790.
- [9] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass. Spectrom.* **1984**, 11, 601.
- [10] J. C. Sheehan, H. G. Zachau, W. Lawson, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 3349–3355.
- [11] B. A. Rudd, D. A. Hopwood, *J. Gen. Microbiol.* **1979**, 114, 35–45.
- [12] J. W. Metzger, C. Kemper, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, *Anal. Biochem.* **1994**, 219, 261–277.

Neuartiger Ringschluß von Hex-5-enpyranosiden zu carbocyclischen Verbindungen

Sanjoy Kumar Das, Jean-Maurice Mallet und Pierre Sinay*

Kohlenhydrate wurden oft als Ausgangsverbindungen für die Synthese enantiomerenreiner Naturstoffe und verwandter Substanzen genutzt, die nicht zu den Kohlenhydraten gehören.^[1] Eine attraktive Umsetzung ist der intramolekulare Ringschluß von Kohlenhydraten zu carbocyclischen Verbindungen, die einen direkten Zugang zu hochfunktionalisierten Cyclohexanen ermöglicht. Der Ringschluß kommt meist durch den Angriff eines Carbanions (C-6) am elektrophilen Carbonylzentrum (C-1) zustande. Ein frühes Beispiel hierfür ist die Grosheintz-Fischer-Synthese^[2] von Desoxyinositolen aus 6-Desoxy-6-nitrohexosen.

Durch eine Reaktion von Ferrier aus dem Jahr 1979 können leicht zugängliche Hex-5-enpyranoside in Gegenwart von Quecksilber(II)chlorid bequem zu hochfunktionalisierten Cyclohexanen umgesetzt werden.^[3] Durch die Hydroxymyrcurierung des Vinyletherrestes eines Hex-5-enpyranosides wird ein instabiles Hemiacetal erhalten, das nach Abspaltung von Methanol (Schema 1) eine Dicarbonylverbindung bildet. Diese liefert über eine aldolähnliche intramolekulare Cyclisierung ein substituiertes Cyclohexan. Hierzu wurden Untersuchungen^[4] zum Mechanismus und zur Stereochemie sowie unterschiedliche Reaktionsbedingungen^[5] publiziert. Da hochfunktionalisierte Cyclohexane bei mehreren Naturstoffklassen eine wichtige Rolle spielen, wurde durch diese bemerkenswerte Umlagerung – die Ferrier-II-Reaktion^[6] – ein praktikabler Zugang zu einer großen Zahl bioaktiver Substanzen wie Aminocyclitolen, Pseudozuckern und Inositolen gegeben.^[7] Ein wichtiger Schritt der Ferrier-II-Reaktion ist die Abspaltung eines Alkohols, z. B. von Methanol (Schema 1), so daß der für die Aldolreaktion notwendige elektrophile Aldehyd entsteht.

[*] Prof. P. Sinay, Dr. S. K. Das, Dr. J.-M. Mallet
Département de Chimie, URA 1686
École Normale Supérieure
24 rue Lhomond
F-75231 Paris Cedex 05 (Frankreich)
Telefax: Int. + 33/144 32 3397
E-mail: sinay@chimie.ens.fr