

Assemblierung von ApophyA65 mit **4** und Belichtung: Rekombinantes HaferApophyA65^[11] (Rohlysat aus *Hansenula-polymorpha*-Hefezeilen;^[11a] 4.5 nmol in 600 µL Phosphatpuffer, pH 7.6) wurde mit **4** (5 nmol in 1 µL DMSO) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Apoprotein-Konzentration wurde separat vor der Inkubation durch Assemblierung eines Protein-Aliquots mit einem Überschuss an **2** bestimmt.

Die Lösung des ApophyA65/**4**-Komplexes wurde mit dem Licht eines Diaprojektors bestrahlt (250 W; Abstand der Probe vom Projektor ca. 20 cm; die Anregungswellenlängen von $\lambda = 614 \pm 7$ und 714 ± 7 nm für $P_r \rightarrow P_{fr}$ bzw. $P_{fr} \rightarrow P_r$ wurden mit Hilfe von Interferenzfiltern erzeugt). Für vollständige Umsätze (maximale Absorptionswerte) der jeweiligen Form waren Belichtungszeiten von ≥ 10 min erforderlich. Die Absorptionspektren wurden mit einem Shimadzu-UV2102PC-Spektrometer aufgenommen.

Verdrängungsexperiment mit ApophyA65/**4**-Komplex und Phycocyanobilin **2**: Zu einer Probe (600 µL) der P_r -ähnlichen Form des ApophyA65/**4**-Komplexes wurde eine Lösung von **2** (1.7 nmol in 1 µL DMSO) hinzugegeben. Die Mischung wurde für einige Minuten im Dunkeln stehen gelassen, bevor erst mit Licht der Wellenlänge 653 ± 7 nm (Interferenzfilter; $P_r \rightarrow P_{fr}$) und darauf mit > 720 nm (Kantenfilter; $P_{fr} \rightarrow P_r$) bestrahlt wurde. Vor der ersten und darauf nach jeder Belichtung wurden UV/Vis-Spektren aufgenommen.

Eingegangen am 11. April 2000 [Z14972]

- [1] W. M. Schluchter, A. N. Glazer in *The Phototrophic Prokaryotes* (Eds.: G. A. Peschek, W. Löffelhardt, G. Schmetterer), Kluwer, New York, **1999**, S. 83–95.
- [2] S. E. Braslavsky, W. Gärtner, K. Schaffner, *Plant Cell Environ.* **1997**, 20, 700–706.
- [3] W. Rüdiger, F. Thümmler, E. Cmiel, S. Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, 80, 6244–6248, zit. Lit.
- [4] S.-H. Wu, M. T. McDowell, J. C. Lagarias, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 25700–25705.
- [5] a) J. C. Lagarias, D. M. Lagarias, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 5778–5780; b) T. D. Elich, J. C. Lagarias, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 12902–12908; c) T. Kunkel, K.-J. Tomizawa, R. Kern, M. Furuya, N.-H. Chua, E. Schäfer, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 215, 587–594; d) C. Hill, W. Gärtner, P. Towner, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 223, 69–77; e) A. Ruddat, P. Schmidt, C. Gatz, S. E. Braslavsky, W. Gärtner, K. Schaffner, *Biochemistry* **1997**, 36, 103–111.
- [6] S. E. Braslavsky, D. Schneider, K. Heihoff, S. Nonell, P. F. Aramendia, K. Schaffner, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7322–7334.
- [7] Eine $Z \rightarrow E$ Isomerisierung einer der lateralen Doppelbindungen (C-5 und C-15) wird initiiert durch eine reversible Addition eines Nucleophils an die zentrale C-10-Methingruppe vor der Photoisomerisierung: H. Falk, *The Chemistry of Linear Oligopyrroles and Bile Pigments*, Springer, New York, **1989**, S. 462–463.
- [8] a) S. H. Bhoo, T. Hirano, H.-Y. Jeong, J.-G. Lee, M. Furuya, P.-S. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11717–11718; b) A. Remberg, P. Schmidt, S. E. Braslavsky, W. Gärtner, K. Schaffner, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 266, 201–208.
- [9] I. Lindner, B. Knipp, S. E. Braslavsky, W. Gärtner, K. Schaffner, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1943–1946; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1843–1846.
- [10] S. J. Davis, A. V. Vener, R. D. Vierstra, *Science* **1999**, 286, 2517–2520.
- [11] a) D. Mozley, A. Remberg, W. Gärtner, *Photochem. Photobiol.* **1997**, 66, 710–715; b) W. Gärtner, C. Hill, K. Worm, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 236, 978–983; c) A. Remberg, A. Ruddat, S. E. Braslavsky, W. Gärtner, K. Schaffner, *Biochemistry* **1998**, 37, 9983–9990.
- [12] Die Methanoladdition an **2** sollte zwei C-3'-Epimere von **4** liefern.^[13] Jedoch ergaben weder das ^1H -NMR-Spektrum noch eine HPLC-Analyse einen Hinweis auf eine Heterogenität, die auf ein Epimerengemisch in der für diese Arbeit verwendeten kristallinen Probe von **4** schließen ließe. Eine Zuordnung der 3'-Konfiguration auf der Basis der vorhandenen analytischen Daten war nicht möglich.
- [13] A. Gossauer, R.-P. Hinze, R. Kutschan, *Chem. Ber.* **1981**, 114, 132–146.
- [14] Für eine Diskussion der 5Z,10Z,15Z-Konfiguration des Chromophors im P_r -Phytochrom siehe C. Kneip, P. Hildebrandt, W. Schlamann, S. E.

Braslavsky, F. Mark, K. Schaffner, *Biochemistry* **1999**, 38, 15185–15192.

- [15] Für die Induktion von P_r - und P_{fr} -analogen In-vitro-Verschiebungen der Absorptionsbanden linearer Tetrapyrrole in organischen Lösungen siehe a) M. Stanek, K. Grubmayr, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1653–1659; b) M. Stanek, K. Grubmayr, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1660–1666.
- [16] W. Kufer, H. Scheer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1979**, 360, 935–956.
- [17] W. J. Cole, D. J. Chapman, H. W. Siegelman, *Biochemistry* **1968**, 7, 2929–2935.
- [18] J. E. Bishop, H. Rapoport, A. V. Klotz, C. F. Chan, A. N. Glazer, P. Fuglistaller, H. Zuber, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 875–881.

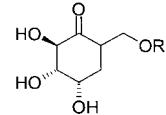
Hexacyclinsäure, ein Polyketid mit neuartigem Grundgerüst aus *Streptomyces***

Regina Höfs, Martina Walker und Axel Zeeck*

Wie aus früheren Untersuchungen bekannt, bildet *Streptomyces cellulosae* subsp. *griseorubiginosus* (Stamm S1013) in Schüttelkulturen mit einem Haferflockenmedium lediglich die Carbazucker Gabosin D, **1**, und **2**.^[1] Mit Hilfe des OSMAC-Ansatzes (OSMAC=one strain/many compounds)^[2] und des chemischen Screenings^[3] sollte untersucht werden, ob sich bei diesem Stamm die Produktion neuer Metabolite induzieren lässt.

Der OSMAC-Ansatz geht von der Beobachtung aus, dass einzelne Sekundärstoffproduzenten mehr Metabolite bilden können, als sich bei der Untersuchung von Standard-Rohextrakten erkennen lässt.^[2]

So ist es bei den für die Sekundärstoffbildung besonders begabten Actinomyceten und Pilzen leicht, auch bei gut untersuchten Stämmen neue Naturstoffe zu entdecken, deren Biosynthese letztlich durch eine Variation der Kultivierungsparameter induziert oder gefördert wird. Dabei gibt es einen fließenden Übergang zwischen der Ausbeutesteigerung einzelner im Prinzip vorhandener und dem erstmaligen Auftreten vorher nicht nachweisbarer Metabolite. Wirkungsvoll variieren lassen sich beim OSMAC-Ansatz neben Nährmedium und Kultivierungsgefäß unter anderem Temperatur, Belüftung, pH-Wert und/oder Belichtung. Im Nährmedium spielen die Auswahl der C- und der N-Quelle sowie die Zugabe von anorganischen Salzen, Enzyminhibitoren oder



1 : R=H
2 : R=COCH₃

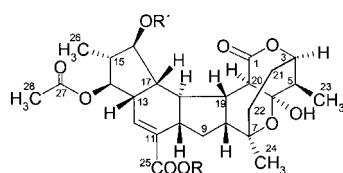
[*] Prof. Dr. A. Zeeck, Dr. R. Höfs, Dr. M. Walker
 Institut für Organische Chemie, Universität Göttingen
 Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)
 Fax: (+49) 551-399660
 E-mail: azeck@gwdg.de

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Wir danken der Hoechst AG (Frankfurt) für die Überlassung des Stammes S1013, Herrn M. Decke für die experimentelle Mitarbeit und Herrn Prof. Dr. W. Beil für die Durchführung der Zelltests.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Adsorbermaterialien eine große Rolle. Ziel des OSMAC-Ansatzes ist die Erzeugung von Variabilität bei der Stoffbildung und von chemischer Diversität in der Gerüstbildung. Einige unserer begabten Stämme bildeten unter variierten Bedingungen insgesamt bis zu 50 Sekundärmetabolite, wobei der Anteil neuer Metabolite vergleichsweise hoch war.^[2] Der OSMAC-Ansatz erweist sich bei der Metabolitensuche als sehr effizient.^[4] Er basiert auf der Erfahrung und wird aus der Tatsache verständlich, dass Actinomycetengenome mit ca. 8 Mb (1 Mb = 10⁶ Basen) und Pilzgenome mit ca. 30 Mb sehr viel größer sind als es den Grundbedürfnissen der Organismen entspricht,^[5] d.h., es sind die aktivierbaren stillen Sekundärstoff-Biosynthesegene, die das Potential dieses Ansatzes ausmachen.

Unser Stamm S1013 wurde dem OSMAC-Ansatz folgend in unterschiedlichen Kultivierungsgefäßen in dem üblichen Haferflockenmedium angezogen. Bei der Kultivierung im 10-L-Fermenter konnte im Dünnschichtchromatogramm des Kulturfiltrat-Extraktes erstmals ein zusätzlicher Metabolit entdeckt werden, der mit Anisaldehyd blau anfärbt ($R_f = 0.30$, Kieselgel, Chloroform/Methanol 9/1), dessen Menge für eine Strukturaufklärung jedoch nicht ausreichte. Fermentationsversuche unter Zugabe verschiedener Alkalihalogenide ergaben, dass dieser Metabolit in Gegenwart von 1 g L⁻¹ Natriumbromid um den Faktor 10–20 stärker produziert wurde. Dieser Effekt trat bei niederen/höheren Konzentrationen des Salzes oder bei Zugabe anderer Salze nicht auf. In verschiedenen Kulturgefäßen betrug die Ausbeute bis zu 13 mg L⁻¹, bei zusätzlicher Variation der C-Quelle bis zu 56 mg L⁻¹. Der neue Metabolit ließ sich durch Chromatographie der Rohextrakte an Kieselgel (Chloroform/Methanol 7/3 und 9/1) in ausreichender Menge isolieren und wurde seiner Struktur **3** folgend als Hexacyclinsäure bezeichnet.^[6]



3: R=H, R'=H

4: R=CH₃, R'=H

5: R=CH₃, R'=(S)-MTPA

6: R=CH₃, R'=(R)-MTPA

3 kristallisiert aus Methanol/Wasser und ist in organischen Lösungsmitteln gut löslich. Im DCI-MS liegt der Peak höchster Masse bei m/z 508 [$M+NH_4$]⁺. Durch Hochauflösungs(HR)-EI-MS des Molekülions bei m/z 490 wurde die Summenformel zu $C_{26}H_{34}O_9$ bestimmt. Das ¹H-NMR-Spektrum von **3** ist durch einen komplexen Signalbereich aliphatischer Protonen gekennzeichnet, der sich mit [D₅]Pyridin weitgehend differenzieren lässt. Von den 26 Signalen im ¹³C-NMR-Spektrum stehen drei für Carbonylgruppen und zwei für eine Doppelbindung. Aus der Summenformel und den ¹³C-NMR-Daten lässt sich mit Hilfe der errechneten Doppelbindungsäquivalente ein hexacyclisches Grundgerüst für **3** ableiten. Aus den 2D-NMR-Spektren (COSY, HSQC, HMBC) ergeben sich für **3** zwei Partialstrukturen; der linke

Fünfring mit der Acetoxygruppe und das rechte tricyclische System. An der Nahtstelle dieser Molekülteile kommt es jedoch zur Überlappung von Protonensignalen und zu HMBC-Korrelationen, deren J_{CH} -Charakter nicht eindeutig war. Auch der Einsatz von Rechenprogrammen wie COCON führte zu mehr als einem plausiblen Strukturvorschlag.^[7] Die Klärung brachte schließlich die Röntgenstrukturanalyse eines Einkristalls von **3** (Abbildung 1), aus der sich Konstitution und relative Konfiguration des Grundgerüstes ergeben.^[8] NOESY-NMR-Spektren in Verbindung mit den anderen 2D-NMR-Daten ermöglichen die zweifelsfreie Zuordnung aller ¹H- und ¹³C-NMR-Signale von **3**.

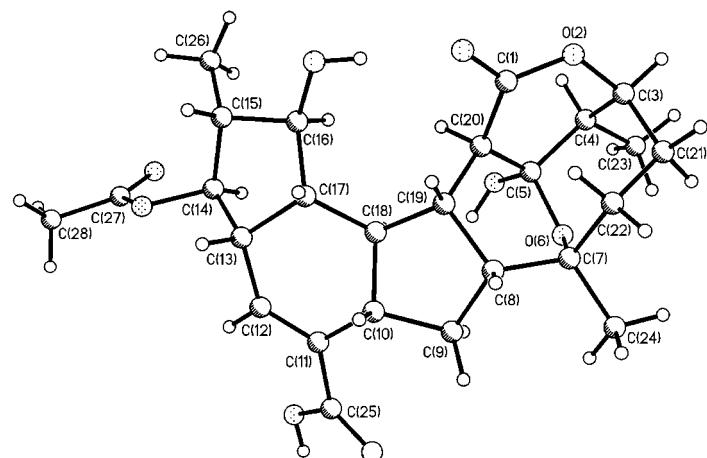


Abbildung 1. Molekülstruktur von Hexacyclinsäure **3** im Kristall mit kristallographische Nummerierung. Die relative Konfiguration folgt aus der Röntgenstrukturanalyse, die angegebene absolute wurde aus den NMR-Daten der entsprechenden Mosher-Ester abgeleitet.

Zur Aufklärung der absoluten Konfiguration wurde Hexacyclinsäuremethylester **4**, der durch Methylierung von **3** mit Diazomethan in THF entsteht, in die diastereomeren Mosher-Ester **5** und **6** umgewandelt (HO-MTPA = α -Methoxy- α -trifluormethylphenylsäure).^[9] Tabelle 1 zeigt ausgewählte

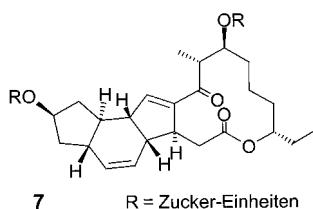
Tabelle 1. Ausgewählte ¹H-NMR-Daten (125.7 MHz, [D₅]Pyridin) von **4** und den Mosher-Estern **5** und **6**.

H-Atom	4	5	6	$\delta(\mathbf{5}) - \delta(\mathbf{6})$
26-H ₃	1.18	1.51	1.47	+ 0.04
15-H	2.36	2.55	2.39	+ 0.16
16-H	4.15	6.03	6.04	<i>S</i> ^[a]
17-H	2.49	2.61	2.73	- 0.12
18-H	2.49	2.54	2.59	- 0.05
19-H	3.21	3.12	3.20	- 0.08

[a] Resultierender Chiralitätssinn.

te ¹H-NMR-Daten von **4**–**6**. Daraus folgen die Position der Mosher-Estergruppen an C-16 von **4** und die (S)-Konfiguration dieses Chiralitätszentrums. Hexacyclinsäure **3** hat somit die Konfiguration 3S,4R,5R,7S,8R,10S,13R,14R,15R,16S,17R,18S,19S,20R.

3 weist ein neuartiges Grundgerüst auf, in dem ein 5/6/5-Ringsystem an einen überbrückten Tricyclus anelliert ist, den ein δ -Lacton und ein cyclisches Halbketal charakterisieren.



Während der linke Teil ähnlich in den Spinosyren **7**^[10] insektizid wirksamen Streptomyceten-Metaboliten, und in Ikaruguamycin vor kommt,^[11] ähnelt das hexacyclische Grundgerüst mit seinen 14 Chiralitätszentren

und den unterschiedlichen funktionellen Gruppen keinem bekannten Naturstoff.

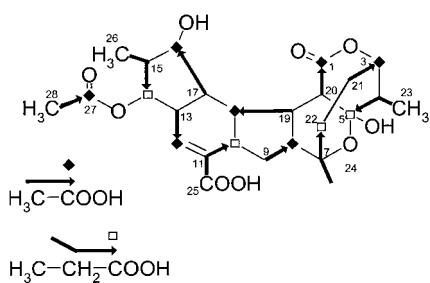
3 ist gegenüber drei getesteten Zelllinien (HM02, HEP G2 und MCF7) mit GI₅₀-Werten bis 14.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ schwach cytotoxisch. Die Ergebnisse weiterer biologischer Tests stehen noch aus.

Polycyclische nichtaromatische Strukturen sind für terpenoide Verbindungen typisch, kommen bei Actinomyceten jedoch nur selten vor. Um Vorstellungen über die Biosynthese zu gewinnen, wurden erste Fütterungsversuche durchgeführt. Wurde [¹⁻¹³C]Acetat in die wachsenden Kulturen unseres Stammes gegeben, führte dies zur ¹³C-Anreicherung in den Positionen C-1, C-3, C-8, C-16, C-18 und C-27 (Tabelle 2, Schema 1). Die Werte für den spezifischen Einbau in den Positionen C-5 und C-12 sind zwar erhöht, aber nicht eindeutig. Der geringe Wert für die Anreicherung in der Position C-12 kann mit der Schwierigkeit der Detektion des zugehörigen vergleichsweise breiten ¹³C-NMR-Signals zusammenhängen. Ein ergänzender Einbauversuch mit [¹⁻¹³C]Propionat führte zu starken ¹³C-Anreicherungen in den Positionen C-5, C-10, C-14 und C-22 (Tabelle 2, Schema 1).

Tabelle 2. ¹³C-NMR-Daten (125.7 MHz, [D₅]Pyridin) von Hexacyclinsäure **3** und spezifische ¹³C-Anreicherungen (relativ zur natürlichen Häufigkeit von C-28) nach Biosyntheseexperimenten mit [¹⁻¹³C]Acetat (A) und [¹⁻¹³C]Propionat (B).

	δ	A	B
C-1	177.0	2.1	0.3
C-3	78.9	3.3	0.3
C-4	45.0	-0.2	0.1
C-5	95.3	0.6	75.9
C-7	72.9	0.2	-0.1
C-8	46.1	3.1	0.2
C-9	31.9	-0.2	0.1
C-10	42.3	-0.4	54.5
C-11	136.4	-0.6	0.0
C-12	139.0	0.6	1.5
C-13	45.7	-0.2	-0.1
C-14	80.0	-0.2	37.6
C-15	47.8	-0.1	0.0
C-16	80.4	3.2	0.0
C-17	50.2	-0.3	0.0
C-18	53.2	1.7	-0.1
C-19	42.8	-0.2	0.4
C-20	48.3	-0.1	-0.3
C-21	23.6	-0.2	0.1
C-22	35.5	0.2	68.0
C-23	8.8	-0.1	0.2
C-24	27.2	-0.1	0.3
C-25	169.0	n.b. ^[a]	1.2
C-26	14.7	-0.1	0.2
C-27	170.8	5.9	0.0
C-28	20.9	0.0	0.0

[a] n.b. = nicht bestimmt.



Schema 1. Markierungsmuster von Hexacyclinsäure **3**. Gezeigt sind die Ergebnisse der Einbauversuche mit [¹⁻¹³C]Acetat und [¹⁻¹³C]Propionat sowie deren vermutete Einbaurichtung.

Diese Versuche machen deutlich, dass Hexacyclinsäure ein Polyketid ist und vermutlich aus sieben Acetat- und vier Propionateinheiten aufgebaut wird (Schema 1). Dies muss durch weitere Experimente abgesichert werden, ebenso wie die Frage nach der Startereinheit. Geht man davon aus, dass dem Molekül nur eine Polyketidkette zugrunde liegt, die mit Hilfe einer modularen Typ-I-Polyketidsynthase entsteht, sind mehrere, für Polyketide dieser Art ungewöhnliche Cyclisierungen erforderlich. Wir vermuten eine intramolekulare Diels-Alder-Reaktion, Aldolreaktionen, Lactonisierung und Ketalisierung, wobei immer die jeweils benötigten Funktionalitäten in den Intermediaten bereitgestellt werden. Hexacyclinsäure **3** lässt als Typ-I-Polyketid somit eine neuartige Biosynthese erwarten, an deren Aufklärung wir arbeiten.

Experimentelles

Kultivierung: Der Stamm S1013 wurde auf Agarplatten (10 g L⁻¹ lösliche Stärke, 2 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2 g L⁻¹ CaCO₃, 1 g L⁻¹ K₂HPO₄, 1 g L⁻¹ NaCl, 1 g L⁻¹ MgSO₄, 20 g L⁻¹ Agar-Agar, pH 7.0 vor dem Autoklavieren) bei 28 °C bis zur Sporulation kultiviert und dann bei 4 °C aufbewahrt. Für die Vorkulturen verwendete man 300-mL-Erlenmeyerkolben mit 100 mL einer Soja/Mannit-Nährlösung (20 g L⁻¹ D-Mannit, 20 g L⁻¹ entfettetes Sojamehl, pH 7.2 vor dem Autoklavieren). Diese wurden mit einem Achtel der Agarplatten beimpft und bei 30 °C und bei einer Rührgeschwindigkeit von 180 Umdrehungen pro Minute 72 h inkubiert. Die Hauptkultivierung erfolgte im 10-L-Fermenter (Braun, Biostat E, Medium: 20 g L⁻¹ Haferflocken (20 min gekocht und abgesiebt), 1 g L⁻¹ NaBr, 2.5 mL Spurenlementlösung (3 g L⁻¹ CaCl₂ · 2H₂O, 1 g L⁻¹ Fe^{III}-Citrat, 0.2 g L⁻¹ MnSO₄, 0.1 g L⁻¹ ZnCl₂, 0.025 g L⁻¹ CuSO₄ · 5H₂O, 0.03 g L⁻¹ Na₂B₄O₇ · 10H₂O, 0.004 g L⁻¹ CoCl₂, 0.01 g L⁻¹ Na₂MoO₄ · 2H₂O), pH 7.0 vor dem Autoklavieren). Angeimpft wurde mit 900 mL der 72 h alten Vorkultur, es wurde 120 h bei 30 °C, einer Rührgeschwindigkeit von 200 Umdrehungen pro Minute und 10 L min⁻¹ Belüftung inkubiert.

Isolierung von **3**: Die Kultur wurde zentrifugiert, gefriergetrocknet und das Lyophilisat mit Methanol extrahiert. Der Verdampfungsrückstand wurde durch zweimalige Chromatographie an Kieselgel (1. Säule: 4 × 27 cm, Chloroform/Methanol 7/3; 2. Säule: 2.5 × 32 cm, Chloroform/Methanol 9/1) gereinigt. Man erhielt 130 mg **3** als Feststoff.

Isotopenmarkierte Verbindungen und Einbauexperimente: Natrium[¹⁻¹³C]acetat und Natrium[¹⁻¹³C]propionat (je 99 % ¹³C) wurden von der Firma ISOTEC Inc. bezogen. Für die Fütterungsversuche erfolgte die Hauptkultivierung in zehn 300-mL-Erlenmeyerkolben mit 100 mL Medium in 120 h bei 30 °C und einer Rührgeschwindigkeit von 180 Umdrehungen pro Minute. Beimpft wurde mit 1 mL der oben beschriebenen, 72 h alten Vorkultur. Die Vorstufen (je 1 g) wurden in sterilem Wasser gelöst und neutralisiert. Diese Lösungen pipettierte man in fünf gleichen Portionen 80, 86, 94, 100 bzw. 106 h nach dem Animpfen in die wachsenden Kulturen. Die Aufarbeitung und Isolierung von **3** erfolgten wie beschrieben (Ausbeuten: [¹⁻¹³C]Acetat-Fütterung: 1.5 mg; [¹⁻¹³C]Propionat-Fütterung: 56 mg).

3: $C_{26}H_{34}O_9$ ($M_r = 490.55$); Schmp. $162^\circ C$; $[\alpha]_D^{20} = +69^\circ$ ($c = 0.11$ in MeOH); DCI-MS (200 eV): m/z : 508 ($[M+NH_4]^+$, 100%); HR-EI-MS (70 eV): 490.2202, gef. wie ber. für $C_{26}H_{34}O_9$; IR (KBr): $\nu_{max} = 3428, 2926, 1734, 1719, 1702, 1658, 1637, 1381, 1250, 1090, 1033 \text{ cm}^{-1}$; UV (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 202 nm (11.514); 1H -NMR (500 MHz, $[D_6]$ Pyridin): $\delta = 1.07$ (s, 3H, 24-H₃), 1.14 (d, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 3H, 23-H₃), 1.19 (d, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 3H, 26-H₃), 1.55 (dm_c, $J = 15.5 \text{ Hz}$, 1H, 22-H_a), 1.65 (m, 1H, 22-H_b), 1.72 (m, 1H, 21-H_a), 1.79 (ddd, $J = 12.0, 12.0, 12.0 \text{ Hz}$, 1H, 9-H_a), 1.92 (m_c, 1H, 21-H_b), 2.05 (s, 3H, 28-H₃), 2.11 (ddd, $J = 11.5, 11.5, 6.6 \text{ Hz}$, 1H, 8-H), 2.21 (m, 1H, 10-H), 2.26 (dq, $J = 6.9, 3.5 \text{ Hz}$, 1H, 4-H), 2.36 (ddq, $J = 10.0, 10.0, 6.5 \text{ Hz}$, 1H, 15-H), 2.55 (m, 2H, 18-H, 17-H), 2.79 (ddd, $J = 11.5, 6.5, 6.5 \text{ Hz}$, 1H, 9-H_b), 3.11 (dddd, $J \approx 10, 10, 2, 2 \text{ Hz}$, 1H, 13-H), 3.22 (dd, $J = 11.5, 10.5 \text{ Hz}$, 1H, 19-H), 3.95 (s br., 1H, 20-H), 4.17 (dd, $J = 10.0, 5.9 \text{ Hz}$, 1H, 16-H), 4.42 (ddd, $J = 3.5, 3.5, 3.5 \text{ Hz}$, 1H, 3-H), 5.00 (dd, $J = 10.0, 10.0 \text{ Hz}$, 1H, 14-H), 7.26 (dd, $J = 2.5, 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 12-H); ^{13}C -NMR: siehe Tabelle 2.

Daten von **4–6**: siehe Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 15. März 2000 [Z14853]

- [1] G. Bach, S. Breiding-Mack, S. Grabley, P. Hamman, K. Hüttner, R. Thiericke, H. Uhr, J. Wink, A. Zeeck, *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 241–250.
- [2] a) B. Bethe, Dissertation, Universität Göttingen, **1994** (ISBN 3-89588-103-1); b) J. Fuchs, A. Zeeck, *Liebigs Ann. Chem.* **1997**, 87–95; c) H.-J. Schiewe, *J. Antibiot.* **1999**, 52, 635–642.
- [3] S. Grabley, R. Thiericke, A. Zeeck in *Drug Discovery from Nature* (Hrsg.: S. Grabley, R. Thiericke), Springer, Heidelberg, **1999**, S. 124–148.
- [4] H. Bode, M. Walker, A. Zeeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1451–1456.
- [5] D. A. Hopwood, *Microbiology* **1999**, 145, 2183–2202.
- [6] R. Höfs, Dissertation, Universität Göttingen, **1999** (ISBN 3-932325-74-5).
- [7] T. Lindel, J. Junker, M. Köck, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 573–577.
- [8] Kristallstrukturanalyse von Hexacyclinsäure **3**: Stoe-Siemens-Huber-Vierkreisdiffraktometer mit Bruker-CCD-Flächendetektor, graphit-monochromatisierte $Mo_{K\alpha}$ -Strahlung ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$), ϕ - und ω -Scans; empirische Absorptionskorrektur mit SADABS, Strukturlösung mit Direkten Methoden, Verfeinerung gegen F^2 mit SHELXL-97 durch Volle-Matrix-kleinste-Quadrat-Methoden, Wasserstoff wurde auf berechneten Positionen mit fixierten isotropen Auslenkungsparametern nach dem Reitermodell verfeinert, $C_{26}H_{34}O_9$, $0.5 \times 0.4 \times 0.1 \text{ mm}$, orthorhombisch, Raumgruppe $P2_12_12_1$, $a = 12.371(3)$, $b = 13.559(3)$, $c = 30.004(6) \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, $V = 5032.8(17) \text{ \AA}^3$, $Z = 8$, $\rho_{ber.} = 1.319 \text{ g cm}^{-3}$; $\mu = 0.100 \text{ mm}^{-1}$; $2\theta_{max} = 41.84$; 133(2) K; 50542 gemessene Reflexe davon 6207 unabhängig, 5322 bei der Verfeinerung berücksichtigte Reflexe, 674 Parameter verfeinert, $R1 = 0.0390$, $wR2 = 0.0751$, min./max. Restelektronendichte $1.69/ -1.79 \text{ e \AA}^{-3}$. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-141597“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- [9] I. Ohtani, T. Kusumi, Y. Kashman, H. Kakisawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4092–4096.
- [10] H. A. Kirst, K. H. Michel, J. W. Martin, L. C. Creemer, E. H. Chio, R. C. Yao, W. M. Nakatsukasa, L. D. Boeck, J. L. Occolowitz, J. W. Paschal, J. B. Deeter, N. D. Jones, G. D. Thompson, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 4839.
- [11] S. Ito, Y. Hirata, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 1185–1188.

Allosterische Regulation der Aktivität einer künstlichen Phosphodiesterase durch Metallionen**

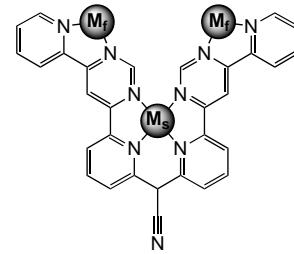
Igor O. Fritsky, Reina Ott und Roland Krämer*

In der enzymatischen Katalyse versteht man unter allosterischer Regulation die Kontrolle der Enzymaktivität durch nichtkovalent gebundene Effektoren (Moleküle oder Ionen), die die Konformation des aktiven Zentrums ändern, indem sie an das Enzym – nicht aber an das aktive Zentrum selbst – binden. Im aktiven Zentrum der Alkalischen Phosphatase aus *E. coli* wird das Phosphatmonoester-Substrat an einer Dizink(II)-Einheit hydrolysiert, während ein die aktive Konformation stabilisierendes („strukturelles“) Mg^{2+} -Ion, das etwa 6 Å von den Zink-Ionen entfernt ist, als starker allosterischer Aktivator wirkt.^[1] Der Ersatz des Mg^{2+} -Ions durch andere zweiwertige Metallionen führt zur Änderung oder gar Inhibition der katalytischen Aktivität natürlicher Alkalischer Phosphatasen^[2] oder ihrer Mutanten.^[3]

In der supramolekularen Wirt-Gast-Chemie wurde die allosterische Modulation von Rezeptoreigenschaften durch Metallionen oder organische Moleküle eingehend untersucht.^[4] Hinweise auf die allosterische Regulation synthetischer molekularer Katalysatoren sind jedoch äußerst selten. Auf der Basis kinetischer Daten wurde Allosterie für die Cyclodextrin-katalysierte Ester- und Alkylnitrit-Hydrolyse, die durch Zusatz bestimmter organischer Moleküle beschleunigt wird, vorgeschlagen.^[5]

Hier beschreiben wir die allosterische Regulation eines synthetischen Metallkatalysators für die Phosphodiester-Spaltung. In diesem System treten zwei funktionelle Metallionen (als M_f bezeichnet) direkt mit dem Substrat in Wechselwirkung, während die Reaktivität durch ein drittes, strukturelles Metall (M_s) moduliert wird.

Der neue Polypyridyl-Ligand L mit einer vierzähnigen und zwei zweizähnigen Chelateinheiten wurde ausgehend von 4-(2-Pyridyl)-pyrimidin in zwei Stufen hergestellt (Schema 1).^[6] Die C-C-Kupplung mit 2-Brom-6-lithiopyridin lieferte 4-(6-Brom-2-pyridyl)-6-(2-pyridyl)pyrimidin. Nach einer Methode zur Herstellung von Makrocyclen aus Brompyridinen und Cyanacetamid^[7] wurde L im nächsten Schritt als dunkelroter, kristal-



[*] Prof. Dr. R. Krämer, Dr. I. O. Fritsky,^[+] Dipl.-Chem. R. Ott
Anorganisch-Chemisches Institut der Universität
Im Neuenheimer Feld 270
69120 Heidelberg (Deutschland)
Fax: (+49) 6221-54-8599
E-mail: roland.kraemer@urz.uni-heidelberg.de

[+] Weitere Adresse:
Department of Chemistry
Shevchenko University
01033 Kiev (Ukraine)

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG gefördert (Gerhard-Hess-Programm).