

Polyederanordnung von $(\text{NbF}_5)_4$,^[10] in dem vier NbF_6 -Oktaeder über Ecken verknüpft ebenfalls ein Quadrat aufspannen. Dehnt man dieses Quadrat isotrop und unterstellt, dass jedes Polyeder eines der beiden Brückenatome in seiner Koordinationssphäre hält, gelangt man zu einer Polyederanordnung, wie sie in Na_4SeO_5 gefunden wurde. Die Lagen der Selen-, Natrium- und vier der Sauerstoffatome lassen sich in einer monoklinen Raumgruppe beschreiben, und die Elementarzelle selbst lässt sich dementsprechend in eine monokline transformieren. Nur eine Sauerstofflage ist nicht mit dieser kristallographischen Beschreibung vereinbar. Die Kenntnis der Struktur der isotypen Verbindung Na_4MoO_5 ^[11] aber sichert die Strukturanalyse und klärt die beobachtete Pseudosymmetrie zugunsten der niedersymmetrischen Raumgruppe im triklinen System.

Experimentelles

$\text{Na}_6\text{Se}_2\text{O}_9$ wurde durch Festkörperreaktion von Na_2O mit Na_2SeO_4 im molaren Verhältnis 1:2 in verschlossenen und in Glasampullen eingeschmolzenen Silbertiegeln hergestellt. Na_4SeO_5 wurde durch Festkörperreaktion von Na_2O mit Na_2SeO_4 im molaren Verhältnis 1:1 in einem zugeschmolzenen Silberrohr unter einem Druck von 2.5 GPa (Piston-Zylinder-Pressen^[12]) hergestellt. In beiden Fällen betrug die Reaktionszeit zwei Tage und die Reaktionstemperatur 500 °C. Na_2O wurde nach Lit.^[13] hergestellt, und Na_2SeO_4 (purum p.a. > 99%, Fluka) wurde vor der Reaktion im Vakuum getrocknet (10^{-3} mbar, 400 °C, 24 h).

Eingegangen am 10. Juli 2000 [Z15415]

- [1] H. Haas, M. Jansen, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2034–2035; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1910–1911; H. Haas, M. Jansen, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2000**, *626*, 1174–1178.
- [2] J. C. Schön, M. Jansen, *Comput. Mater. Sci.* **1995**, *4*, 43–58; J. C. Schön, M. Jansen, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1358–1377; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1286–1304.
- [3] E. Zintl, W. Morawietz, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1938**, *236*, 372–410.
- [4] a) Kristallstrukturdaten von $\text{Na}_6\text{Se}_2\text{O}_9$: orthorhombisch, Raumgruppe *Pnma* (Nr. 62), $a = 1577.2(7)$, $b = 781.7(3)$, $c = 1475.5(7)$ pm, $V = 1819.1(18)$ Å³, $\rho_{\text{ber.}} = 3.205$ g cm⁻³, $Z = 4$, $\mu(\text{Mo}_{\text{K}\alpha}) = 8.428$ mm⁻¹, $F(000) = 1648$, $\lambda = 0.71073$ Å, Bruker-Smart-CCD-Diffraktometer, Graphitmonochromator, Kristalldimensionen $0.2 \times 0.2 \times 0.2$ mm, $T = 293$ K, 36 800 gemessene, 5226 symmetrieunabhängige Reflexe, 182 verfeinerte Parameter; Strukturlösung mit Direkten Methoden.^[5] Durch anschließende Differenz-Fourier-Synthese wurden die Natrium- und Sauerstofflagen bestimmt. Alle Atomlagen konnten frei anisotrop zu $R1 = 0.030$ und $wR2 = 0.058$ verfeinert werden. b) Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen (Fax: (+49) 7247-808-666; E-mail: crysdata@fiz-karlsruhe.de), unter der Hinterlegungsnummer CSD-411402 ($\text{Na}_6\text{Se}_2\text{O}_9$) und CSD-411401 (Na_4SeO_5) angefordert werden.
- [5] G. M. Sheldrick, SHELXS-86, SHELXL-93, Program for Crystal Structure Analysis, Göttingen, **1986** bzw. **1993**.
- [6] A. Kalman, D. W. J. Cruickshank, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1970**, *26*, 436.
- [7] a) H. Schäfer, H. G. von Schnering, J. V. Tillack, F. Kuhnen, H. Wöhrle, H. Baumann, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1967**, *353*, 281–310; b) H. G. von Schnering, W. May, K. Peters, *Z. Kristallogr.* **1993**, *208*, 368–369.
- [8] a) H. M. Rietveld, *Acta Crystallogr.* **1967**, *22*, 151–152; b) H. M. Rietveld, *J. Appl. Crystallogr.* **1969**, *2*, 65–71; c) R. B. von Dreele, A. C. Larson, *GSAS*, University of California, **1995**.
- [9] Röntgenstrukturanalyse von Na_4SeO_5 : Raumgruppe *P1̄*; $a = 988.3(1)$, $b = 988.4(1)$, $c = 558.6(1)$ pm, $\alpha = 96.25(1)^\circ$, $\beta = 96.24(1)^\circ$, $\gamma = 113.41(1)^\circ$, $V = 490.8(1) \times 10^6$ pm³; $Z = 4$, $\rho_{\text{ber.}} = 3.551$ g cm⁻³; Stoe-Stadi-P-Transmissions-Pulverdiffraktometer, $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung, Germanium-Monochromator, linearer ortsempfindlicher Zähler (Stoe-
- Mini-PSD), Röhrenmessung, Anzahl Datenpunkte: 8000, Messbereich: $10 < 2\theta < 90$, Gesamtmeßzeit: 24 h, Zahl beobachteter Reflexe: 778, Zahl verfeinerter Ortsparameter: 57, Zahl Temperaturparameter: 21, Rietveld-Verfeinerung: $R_p = 0.0783$, $R_{wp} = 0.1037$, $R_F = 0.0773$.^[4b]
- [10] A. J. Edwards, *J. Chem. Soc.* **1964**, 3714–3718.
- [11] H. Haas, M. Jansen, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, im Druck.
- [12] W. Johannes, *Neues Jahrb. Mineral. Monatsh.* **1973**, 337–351.
- [13] A. Klemenc, G. Ofner, H. Wirth, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1951**, 265, 221.

Totalsynthese von (+)-Ratjadon**

Mathias Christmann, Ulhas Bhatt, Monika Quitschalle, Eckhard Claus und Markus Kalesse*

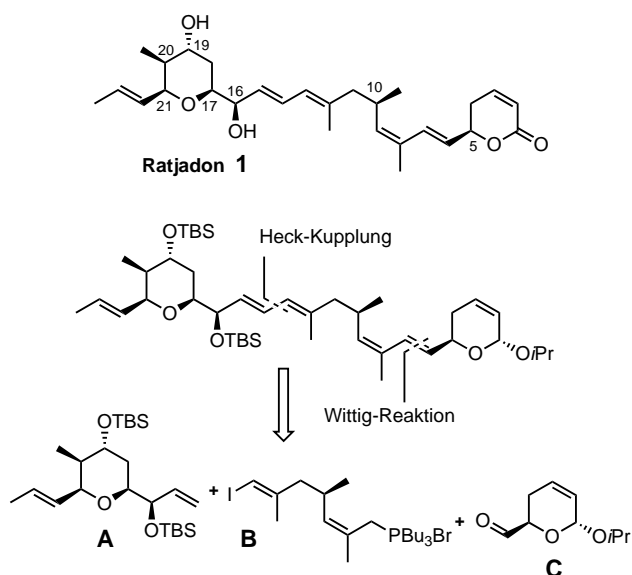
Das Polyketid Ratjadon **1** wurde 1994 von Höfle et al. aus dem Myxobakterienstamm *Sorangium Cellulosum* (So ce360) isoliert.^[1] Strukturell wie auch in seinem biologischen Profil ähnelt es den Leptomycinen^[2] und Calystatin A.^[3, 4] Ratjadon weist eine hohe Cytotoxizität gegenüber der Mauszelllinie L929 auf ($\text{IC}_{50} = 50$ pg mL⁻¹) und inhibiert das Wachstum der HeLa-Zelllinie bei bemerkenswert niedriger Konzentration (40 pg mL⁻¹). Neben anderen interessanten biologischen Effekten, wie z. B. der Änderung der Zellmorphologie von Hefe, zeigt Ratjadon ein enges antibiotisches Spektrum gegen *Mucor hiemalis*, *Phytophthora drechsleri*, *Ceratocystis ulmi* und *Monila brunnea* mit MIC-Werten (MIC = minimale inhibierende Konzentration) von 0.04 bis 0.6 µg mL⁻¹.^[5] Trotz dieser viel versprechenden biologischen Eigenschaften sind weder der genaue Wirkmechanismus noch die molekularen Targets bekannt.

Hier berichten wir über die erste Totalsynthese von Ratjadon.^[6] Mit unserem Ansatz sind wir in der Lage, die biologisch aktiven Strukturelemente durch die konvergente Synthese von Analoga zu untersuchen. Da zu Beginn unserer Arbeiten lediglich die relative Konfiguration der Tetrahydropyran-Untereinheit (C17–C21) bekannt war, mussten wir eine Strategie entwerfen, nach der alle möglichen Stereoisomere rasch synthetisiert werden können.^[7] Bei unserer retrosynthetischen Analyse wählten wir daher die beiden Dien-Systeme als geeignete Schnittstellen für den Aufbau von Ratjadon (Schema 1). Daraus ergaben sich das Tetrahydropyran-Fragment **A**, das Phosphoniumsalz **B** und der Aldehyd **C** als geeignete Vorstufen. In der Synthese werden zunächst **B** und **C** durch eine Wittig-Reaktion verknüpft, der eine Heck-Reaktion mit dem **A**-Fragment folgt.

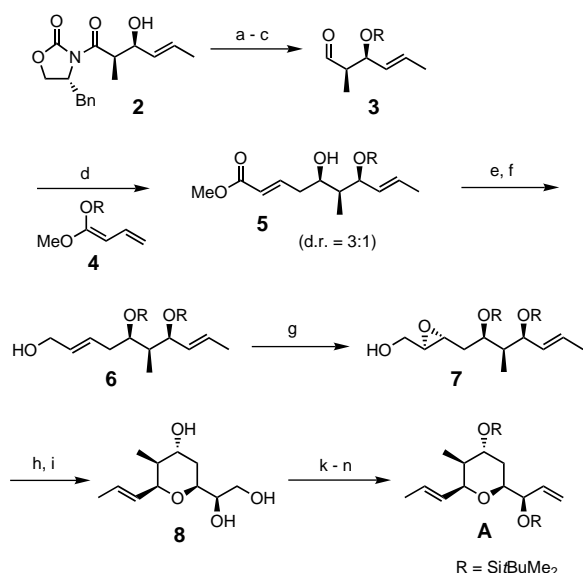
Die Synthese von **A** begann mit der Transamidierung des von Evans beschriebenen Aldoladdukts **2**^[8] zum Weinreb-Amid^[9] (Schema 2). Nach dem Schützen der Hydroxygruppe

[*] Priv.-Doz. Dr. M. Kalesse, M. Christmann, Dr. U. Bhatt, M. Quitschalle, Dr. E. Claus
Institut für Organische Chemie der Universität Hannover
Schneiderberg 1B, 30167 Hannover (Deutschland)
Fax: (+49) 511-762-3011
E-mail: Kalesse@mbox.oci.uni-hannover.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, von der Volkswagenstiftung (Meeresbiotechnologie) und vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.



Schema 1. Retrosynthetische Analyse von Ratjadon. TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl.

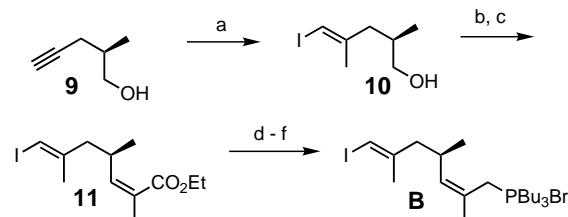


Schema 2. Synthese des **A**-Fragments. a) $\text{MeONHMe} \cdot \text{HCl}$, Me_3Al , CH_2Cl_2 , $-20 \rightarrow -25^\circ\text{C}$; b) TBSOTf, 2,6-Lutidin, CH_2Cl_2 , -78°C ; c) Dibal-H, THF, -78°C , 83 % (über drei Stufen); d) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , Et_2O , -78°C , 67 %; e) TBSOTf, 2,6-Lutidin, CH_2Cl_2 , -78°C ; f) Dibal-H, THF, -78°C ; g) *m*CPBA, NaHCO_3 , CH_2Cl_2 , 0°C , 85 % (über drei Stufen); h) TBAF, THF, 88 %; i) Amberlyst-15, THF, 93 %; k) TBSOTf, 2,6-Lutidin, CH_2Cl_2 , -78°C , 87 %; l) $\text{CHCl}_3 \cdot \text{HCl}$, 97 %; m) Dess-Martin-Periodinan, CH_2Cl_2 , 0°C , 92 %; n) Tebbe-Reagens, THF, 0°C , 95 %. Dibal-H = Diisobutylaluminiumhydrid; *m*CPBA = *m*-Chlorperoxybenzoesäure; TBAF = Tetra-*n*-butylammoniumfluorid; TBSOTf = *tert*-Butyldimethylsilyltrifluormethansulfonat; Tebbe-Reagens = $[\text{Cp}_2\text{Ti}(\mu\text{-CH}_2)(\mu\text{-Cl})\text{AlMe}_2]$.

(TBS) und der Reduktion mit Dibal-H wurde der Aldehyd **3** erhalten. Die all-*syn*-Stereotriade (C19–C21) wurde durch eine vinyloge Mukaiyama-Aldolreaktion^[10] aufgebaut. Die Umsetzung von **3** mit dem Ketenacetal **4** und $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ als Lewis-Säure lieferte den α,β -ungesättigten Ester **5** mit einer Selektivität von 3:1 zugunsten des gewünschten Felkin-Ahn-Produkts. Nach der Silylierung der Hydroxygruppe und der Reduktion des Esters wurde der Allylkohol **6** diastereose-

lektiv (*de* > 95 % zugunsten des *anti*-Isomers) mit *m*CPBA epoxidiert.^[11] Die TBS-Schutzgruppen wurden mit TBAF entfernt und das Epoxid wurde intramolekular mit Amberlyst-15 (6-*exo*-Ringschluss) geöffnet.^[12] Nach dem Schützen aller Hydroxygruppen (TBS) gelang es, die primäre Hydroxygruppe selektiv mit CHCl_3/HCl ^[13] zu entschützen. Durch Dess-Martin-Oxidation^[14] des primären Alkohols und anschließender Tebbe-Olefinierung^[15] wurde das **A**-Fragment erhalten.

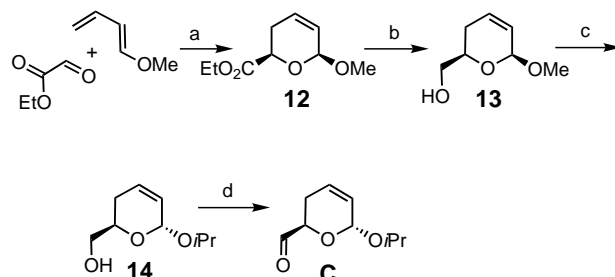
Die Synthese des **B**-Fragments ist in Schema 3 dargestellt. Das aus (*S*)-3-Hydroxyisobuttersäure hergestellte Alkin **9**^[16] wurde nach der Vorschrift von Negishi et al.^[17] carbometalliert und dann mit Iod umgesetzt. Das so erhaltene Vinylidid



Schema 3. Synthese des **B**-Fragments. a) $[\text{Cp}_2\text{ZrCl}_2]$, AlMe_3 , I_2 , CH_2Cl_2 , THF, $-15 \rightarrow -25^\circ\text{C}$, 83 %; b) Dess-Martin-Periodinan, CH_2Cl_2 , 0°C , 81 %; c) $(\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{CHMeCO}_2\text{Et}$, KHMDS, [18]Krone-6, THF, -78°C , 85 %; d) Dibal-H, CH_2Cl_2 , -78°C , 77 %; e) CBr_4 , Ph_3P , CH_3CN ; f) Bu_3P , CH_3CN , 87 % (über zwei Stufen). KHMDS = Kaliumhexamethyldisilazid.

10 wurde mit dem Dess-Martin-Periodinan oxidiert. Durch nachfolgende Still-Gennari-Olefinierung^[18] wurde die trisubstituierte *Z*-Doppelbindung eingeführt. Nach der Reduktion des Esters **11** mit Dibal-H wurde der Allylkohol zunächst in ein Bromid (CBr_4 , PPh_3) und anschließend mit Tributylphosphan^[2] in das Phosphoniumsalz **B** überführt.

Der Schlüsselschritt für den Aufbau des **C**-Fragments ist eine asymmetrische Hetero-Diels-Alder-Reaktion^[19] zwischen 1-Methoxybutadien und Ethylglyoxylat (Schema 4).

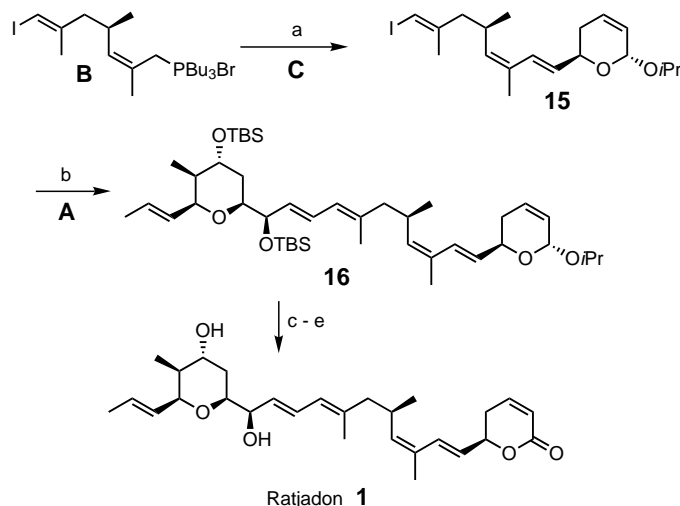


Schema 4. Synthese des **C**-Fragments. a) $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$, (+)-BINOL, 4-Å-Molekularsieb, CH_2Cl_2 , 65 %; b) LiAlH_4 , Et_2O , 0°C ; c) *i*PrOH, PPTS; d) Swern-Oxidation, 77 % (über drei Stufen). BINOL = 2,2'-Dihydroxy-1,1'-binaphthyl; PPTS = Pyridinium-*p*-toluolsulfonat.

Als chirale Lewis-Säure wurde ein Katalysator aus $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$ und (+)-BINOL verwendet (10 Mol-%). Die Hetero-Diels-Alder-Reaktion lieferte die Verbindung **12** als Mischung des *endo*- und des *exo*-Addukts (56 % *de* für das *endo*-Addukt) in hoher Enantioselektivität (90 % *ee*) mit in beiden Diastereomeren *R*-konfiguriertem C5. Der Ester **12** wurde mit LiAlH_4 zum Alkohol **13** reduziert. Während unserer Untersuchungen

zeigte sich, dass das β -Anomer während der Wittig-Reaktion mit dem Aldehyd **C** partiell an C5 epimerisiert. Daher überführten wir das β - in das thermodynamisch stabilere α -Anomer, indem wir die Methoxy- durch eine Isopropoxygruppe substituierten.^[20] Durch die abschließende Swern-Oxidation^[21] wurde das **C**-Fragment in 50 % Gesamtausbeute erhalten.

Nun war der Weg für die Verknüpfung der einzelnen Fragmente bereitet (Schema 5). Die Wittig-Reaktion^[3c,d] zwischen dem Aldehyd **C** und dem Phosphoniumsalz **B** in



Schema 5. Kupplung der drei Fragmente. a) *t*BuOK, Toluol, 0 °C, 76%; b) Pd(OAc)₂, Bu₄NBr, Cs₂CO₃, Et₃N, DMF, 65%; c) Aceton/H₂O, PPTS, 83%; d) TPAP, NMO, 4-Å-Molekularsieb, CH₂Cl₂, 77%; e) HF · Py, THF, Py, 76%. NMO = *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid; Py = Pyridin; TPAP = Tetra-*n*-propylammoniumperthatsäure.

Toluol mit KO^{*t*}Bu als Base lieferte das Vinyljodid **15** in 76 % Ausbeute. Diese Verbindung wurde nun in einer Heck-Reaktion^[22] mit dem **A**-Fragment gekuppelt. Bei dieser Reaktion waren die Jeffery-Bedingungen^[23] einer Reihe anderer Bedingungen mit Pd⁰-Quellen wie [Pd(PPh₃)₄] und [Pd(dba)₂] (dba = Dibenzylidenacetone) überlegen. Das Acetal **16** wurde unter schwach sauren Bedingungen (PPTS, H₂O, Aceton) hydrolysiert und das so erhaltene Hemiacetal mit TPAP/NMO^[24] zum α,β -ungesättigten Lacton oxidiert. Die Entschützungsversuche mit TBAF, Tris(dimethylamino)schwefel-trimethylsilyldifluorid (TASF) und HF · Pyridin waren erfolglos. Lediglich HF · Pyridin in THF unter Zusatz von weiterem Pyridin^[24] führte zur glatten Umsetzung zu Ratjadon.

Der Vergleich der spektroskopischen Daten (¹H-NMR, Circular dichroismus (CD), Drehwert) der von uns synthetisierten Verbindung mit denen einer authentischen Probe des Naturstoffs ergab, dass beide Verbindungen identisch sind.^[25] Somit sind die Zentren C5, C10 und C16, deren Konfigurationen bisher unbekannt waren, *R*-konfiguriert.^[26] Die von uns vorgestellte Ratjadon-Synthese umfasst 18 lineare Stufen bei 6.8 % Gesamtausbeute. Wir konnten zeigen, dass die intermolekulare Heck-Reaktion eine interessante Alternative zu Stille- oder Suzuki-Kupplungen in der Synthese komplexer Naturstoffe ist. Diese verlässliche Syntheseroute ermöglicht

es, Strukturanaloga herzustellen, mit denen die von Ratjadon beeinflussten zellulären Prozesse untersucht werden können.^[27]

Eingegangen am 24. Juli 2000 [Z15508]

- [1] D. Schummer, K. Gerth, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs Ann.* **1995**, 685–688.
- [2] a) T. Hammamoto, H. Seto, T. Beppu, *J. Antibiot.* **1983**, 36, 646–650; b) T. R. Hurley, R. H. Bunge, N. E. Willer, G. C. Hokanson, J. C. French, *J. Antibiot.* **1986**, 39, 1651–1656; c) J. P. Schaumburg, G. C. Hokanson, J. C. French, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 1450–1452; d) absolute Konfiguration und Totalsynthese von Leptomycin B: M. Kobayashi, W. Wang, Y. Tsutsui, M. Sugimoto, N. Murakami, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8291–8294.
- [3] Isolierung und Strukturaufklärung: a) M. Kobayashi, K. Higuchi, N. Murakami, H. Tajima, S. Aoki, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 2859–2863; b) N. Murakami, W. Wang, M. Aoki, Y. Tsutsui, K. Higuchi, S. Aoki, M. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5533–5536. Totalsynthesen: c) N. Murakami, W. Wang, M. Aoki, Y. Tsutsui, M. Sugimoto, M. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 2349–2352; d) M. T. Crimmins, B. W. King, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9084–9085.
- [4] a) Kazusamycin: K. Komiyama, K. Okada, H. Oka, S. Tomisaka, T. Miyano, S. Funayama, I. Umezawa, *J. Antibiot.* **1985**, 38, 220–223; b) Anguinomycin: Y. Hayakawa, K. Adachi, N. Koneshima, *J. Antibiot.* **1987**, 40, 1349–1352; c) Y. Hayakawa, K. Sohda, K. Shinya, T. Hidaka, H. Seto, *J. Antibiot.* **1995**, 48, 954–959; d) Leptofurane: Y. Hayakawa, K. Sohda, H. Seto, *J. Antibiot.* **1996**, 49, 980–984.
- [5] K. Gerth, D. Schummer, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1995**, 48, 973–976.
- [6] a) E. Claus, M. Kalesse, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 4157–4160; b) M. Christmann, M. Kalesse, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 7201–7204.
- [7] Während unserer Totalsynthese konnte gezeigt werden, dass C5 und C19 *R*-konfiguriert sind; G. Höfle, persönliche Mitteilung.
- [8] D. A. Evans, D. L. Rieger, T. K. Jones, S. W. Kaldor, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 6260–6268.
- [9] a) S. Nahm, S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 3815–3818; b) R. S. Garigipati, D. M. Tschaen, S. M. Weinreb, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7790–7792.
- [10] D. A. Evans, W. C. Black, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4497–4513.
- [11] Bei der Epoxidierung verwandter Verbindungen wurden mit *m*CPBA bessere Diastereoselektivitäten erzielt als mit dem Sharpless-Epoxidierungsreagens: a) S. Saito, H. Itoh, Y. Ono, K. Nishioka, T. Moriwake, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 5–8; b) K. B. Jorgensen, H. Koshino, T. Nakata, *Heterocycles* **1998**, 47, 679–683.
- [12] Weitere Beispiele für diese Strategie: a) T. Ye, G. Pattenden, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 319–322; b) M. Hashimoto, T. Kan, K. Nozaki, M. Yanagiya, H. Shirahama, T. Matsumoto, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 5088–5107.
- [13] CHCl₃/HCl wurde durch Mischen von Chloroform und konzentrierter wässriger HCl im Schütteltrichter hergestellt. Die organische Phase wurde abgetrennt und in der Reaktion verwendet.
- [14] a) D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 4155–4156; b) D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7277–7287; c) S. D. Meyer, S. L. Schreiber, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 7549–7552.
- [15] F. N. Tebbe, G. W. Parshall, G. S. Reddy, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 3611–3613.
- [16] R. Baker, M. A. Brimble, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 3311–3314.
- [17] a) E. Negishi, D. E. Van Horn, A. O. King, N. Okukado, *Synthesis* **1979**, 501–502; b) C. L. Rand, D. E. Van Horn, M. W. Moore, E. Negishi, *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 4093–4096; c) E. Negishi, D. E. Van Horn, T. Yoshida, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 6639–6647; d) P. A. Wender, M. J. Tebbe, *Synthesis* **1991**, 1089–1094.
- [18] a) W. C. Still, C. Gennari, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 4405–4408; b) C. Patois, P. Savignac, *Synth. Commun.* **1991**, 21, 2391–2396.
- [19] a) K. Mikami, Y. Motoyama, M. Terada, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2812–2820; für verwandte Arbeiten siehe: b) A. G. Dossetter, T. F. Jamison, E. N. Jacobsen, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2549–2552; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2398–2400.

- [20] Nach einmaligem Umkristallisieren wurde der *ee* am GC auf >95 % bestimmt.
- [21] A. J. Mancuso, D. Swern, *Synthesis* **1981**, 165–185.
- [22] Übersicht über Heck-Reaktionen in der Totalsynthese: M. Beller, T. H. Riermeier, G. Stark in *Transition Metals in Organic Synthesis*, Vol. 1 (Hrsg.: M. Beller, C. Bolm), WILEY-VCH, Weinheim, **1998**, S. 208–240.
- [23] T. Jeffery, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 1287–1289.
- [24] a) W. P. Griffith, S. V. Ley, *Aldrichimica Acta* **1990**, 23, 13–19; b) S. V. Ley, J. Norman, W. P. Griffith, S. P. Marsden, *Synthesis* **1994**, 639–666.
- [25] Wir danken Prof. G. Höfle (GBF, Braunschweig) für eine Probe des Naturstoffs.
- [26] Die Konfiguration an C10 konnte durch den Vergleich der CD-Spektren von natürlichem und synthetischem Ratjadon gesichert werden.
- [27] M. Christmann, U. Bhatt, M. Quitschalle, E. Claus, M. Kalesse, noch unveröffentlichte Ergebnisse.

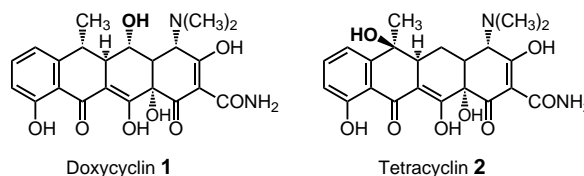
Ein durch Doxycyclin reguliertes allosterisches Ribozym**

Nicolas Piganeau, Andreas Jenne, Vincent Thuillier* und Michael Famulok*

Spezifisch ligandenbindende Nucleinsäuren (Aptamere) können isoliert werden, indem man den „Strukturraum“ großer kombinatorischer Nucleinsäure-Bibliotheken mit Hilfe der In-vitro-Selektion nach funktionalen Sequenzen durchsucht.^[1–3] Für die Isolierung von Aptameren, die ihre Liganden spezifisch und hochaffin binden, wird im Allgemeinen eine komplexe Nucleinsäure-Bibliothek mit dem immobilisierten Zielmolekül inkubiert oder ein vorgebildeter Komplex aus dem Zielmolekül und der Nucleinsäure immobilisiert.

Viele RNA-Aptamere, die eine große Bandbreite an Molekülen erkennen, wurden auf diese Weise isoliert und genau charakterisiert. Detaillierte Strukturuntersuchungen an vielen Aptamer/Ligand-Komplexen zeigten, dass die Bildung des Komplexes in der Regel mit starken Konformationsänderungen einhergeht, wobei die Aptamerstruktur sich nur in Gegenwart des Liganden durch adaptive Bindung stabil ausbilden kann.^[4–11] Diese Eigenschaft von Aptameren wurde bereits für die rationale Entwicklung künstlicher allosterischer Ribozyme herangezogen. Diese können durch niedermolekulare Liganden aktiviert oder inhibiert werden, wenn sie an eine entsprechende spezifische Aptamersequenz binden, die unmittelbar an eine Ribozymsequenz fusioniert wurde.^[12–15]

Wir stellen hier die Ergebnisse einer neuen In-vitro-Selektionsstrategie vor, die auf der allosterischen Inhibierung eines kovalent an eine randomisierte RNA-Bibliothek fusionierten Hammerhead-Ribozyms durch das Antibiotikum Doxycyclin **1** bei sehr geringen Konzentrationen basiert. Nach 16 Selektionsrunden konnten wir Ribozyme isolieren, die mit bemerkenswerter Spezifität und mit Inhibierungskonstanten bis zu 20 nM durch **1** inhibiert wurden. Doxycyclin **1** wurde als „Schaltermolekül“ gewählt, weil es ein für höhere Eukaryonten nicht toxisches, zellpermeables kleines Molekül ist. Ein allosterisches, auf **1** reagierendes Ribozym könnte daher potentiell für die Entwicklung konditionaler Genexpressionssysteme eingesetzt werden, die auf der Spaltung von mRNAs durch inserierte Hammerhead-Ribozyme basieren, je nachdem, ob **1** in der Zelle vorhanden ist oder nicht.



Das Design der randomisierten Bibliothek ist aus Abbildung 1a abzuleiten. Allosterische Ribozyme wurden in früheren Arbeiten durch rationales Design erhalten, indem man die Aptamer-RNA mit der Helix II fusionierte.^[16, 17] Wir wählten diese Stelle ebenfalls für die Positionierung der randomisierten Sequenz, da sie für die Aktivität des Hammerhead-Ribozyms wichtig ist.^[18] Um eine Bibliothek möglichst aktiver Ribozyme zu erhalten, wurden deshalb die ersten zwei Basenpaare der Helix beibehalten. Den Verlauf der Selektion zeigt Abbildung 1c. Nach fünf Selektionszyklen wurde eine Anreicherung des Pools mit Doxycyclin-inhibierten Ribozymen detektiert. Ein Kontrollexperiment ohne **1** zeigte jedoch, dass der selektierte Pool nur schwach auf den Liganden reagierte: In Gegenwart von Doxycyclin **1** wurden 14 % der RNA im Schritt 4 (Abbildung 1b) eluiert, während im Negativkontrolllexperiment ohne **1** noch 10 % eluiert werden konnten.

Wir vermuteten deshalb, dass sich im Laufe der Selektion parasitäre Ribozyme mit angereichert hatten, die sich in unterschiedliche Konformationen falten, von denen einige spaltungsaktiv, andere inaktiv in der Spaltung sind. Während

[*] Prof. Dr. M. Famulok, N. Piganeau,^[†] Dr. A. Jenne
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49) 228-735388
E-mail: m.famulok@uni-bonn.de

Dr. V. Thuillier
Aventis Gencell
3825 Bay Center Place
Hayward, CA 94545 (USA)
Fax: (+1) 510-887-1680
E-mail: vincent.thuillier@aventis.com

[†] Neue Anschrift: Aventis Gencell
3825 Bay Center Place, Hayward, CA 94545 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von Aventis Gencell und der Volkswagen-Stiftung (Schwerpunktprogramm „Konformationskontrolle“) unterstützt. Wir danken M. Blind, G. Mayer, D. Proske und G. Sengle (Universität Bonn) für hilfreiche Diskussionen sowie J. Crouzet, J. F. Mayaux und M. Finer (Aventis GenCell) für Unterstützung.