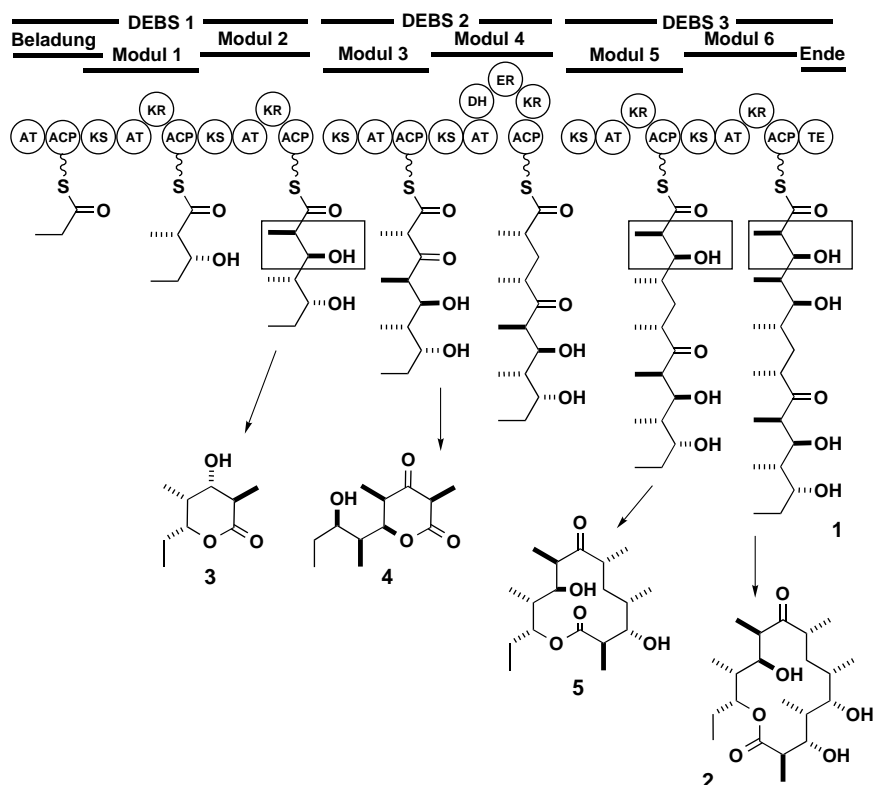


Die Thioesterase der Polyketid-Synthese von Erythromycin: Einfluß der Acylkettenstruktur auf den Abkopplungsmechanismus der Substratanaloga von der Acyl-Enzym-Zwischenstufe**

Kira J. Weissman, Cameron J. Smith, Ulf Hanefeld, Ranjana Aggarwal, Matthew Bycroft, James Staunton* und Peter F. Leadlay

In-vitro-Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Erythromycin-Thioesterase haben ergeben, daß die hydrolytische Spaltung der Acyl-Enzym-Zwischenstufe zu Gunsten einer Ethanolyse unterdrückt wird, wenn das Substratanalogon eine Methylgruppe an C-2 und eine Hydroxygruppe an C-3 aufweist. Dennoch gibt es eine hohe Toleranz in bezug auf stereochemische Variationen an diesen Kohlenstoffatomen. Der Polyketidkern des Antibiotikums Erythromycin A wird von einer Polyketid-Synthase (PKS) aus sieben Einheiten, die jeweils aus dreigliedrigen Kohlenstoffketten bestehen, aufgebaut.^[1] Die einzelnen Ketten werden zu dem wahrscheinlich an das Enzym gebundenen Heptaketid **1** kondensiert, das dann unter Cyclisierung zum Makrolacton 6-Desoxyerythronolid B **2** abgespalten wird (Schema 1). Die PKS besitzt für jeden Schritt der Bildung von **2** separate katalytische Bereiche, die in drei riesigen multifunktionellen Proteinen, DEBS 1–3, untergebracht sind. Der Beladungszone zum Ankoppeln der ersten Acylgruppe folgen sechs Abschnitte (Module) für die Kettenverlängerung, und eine Thioesterase (TE) zum Abkoppeln des vollständigen Produkts befindet sich am Ende der katalytischen Bereiche.^[2]

Ein zentraler Schritt in diesem Biosyntheseschema ist die Thioesterase-katalysierte Cyclisierung des Heptaketids **1** unter Bildung des Makrolidrings **2**. Frühe In-vitro-Studien an einfachen Substratanaloga mit einem gereinigten Extrakt der ACP-TE-Bidomäne vom C-Terminus von DEBS 3 haben ergeben, daß der erste Schritt der Acylesterspaltung eine



Schema 1. Gentechnische Modifikationen an der Erythromycin-PKS.

Übertragung der Acylkette auf die aktive Hydroxygruppe eines Serinrestes in der TE-Domäne unter Bildung der Acyl-Enzym-Zwischenstufe beinhaltet.^[3] Im natürlichen System wird diese Zwischenstufe dann durch einen nucleophilen Angriff der Hydroxygruppe an C-13 unter Ablösung des makrocyclischen Lactons gespalten. Damit diese Reaktion ablaufen kann, muß nicht nur die Hydroxygruppe an C-13 von der Thioesterase erkannt und für den Angriff auf die Acyl-Enzym-Zwischenstufe in Position gebracht werden, sondern auch der alternative Hydrolysemechanismus, der für viele Esterasen charakteristisch ist, unterdrückt werden.

In mehreren neueren Veröffentlichungen wurde gezeigt, daß die Position der TE-Domäne gentechnisch verändert werden kann, um so eine vorzeitige Abkopplung der Ketidkette auf der Stufe des Triketids **3**, Tetraketids **4** und Hexaketids **5** zu erzielen (Schema 1).^[4] Durch weitere gentechnische Veränderungen der PKS konnten auch strukturell modifizierte Derivate dieser Produkte hergestellt werden.^[5] Der Erfolg dieses Verfahrens zur Synthese von Polyketiden hängt stark davon ab, ob eine Thioesterase vorliegt, die das neue Substrat mit in vivo vorhandenen Nucleophilen abspalten und/oder cyclisieren kann. Würde man die Strukturmerkmale kennen, die eine Abkopplung des Produkts durch die TE des Erythromycins begünstigen oder verhindern, könnten die Erfolgsaussichten weiterer gentechnischer Veränderungen erhöht werden, indem Negativeergebnisse beim Design vermieden würden, die dadurch zustande kommen, daß die Thioesterase ihre Fähigkeit zur Ablösung eines Zielmoleküls von der PKS verloren hat.

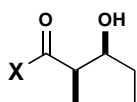
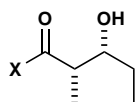
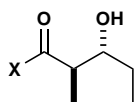
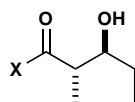
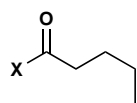
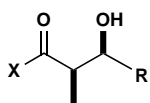
Mit Ausnahme des Tetraketids **4**, haben alle beschriebenen Verbindungen, deren Abkopplung durch die Erythromycin-TE in vivo katalysiert wurde, das (2R,3S)-2-Methyl-3-hydro-

[*] Dr. J. Staunton, K. J. Weissman, C. J. Smith, U. Hanefeld, R. Aggarwal, M. Bycroft
Department of Chemistry, University of Cambridge
Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW (Großbritannien)
Fax: (+44) 1223-226913
E-mail: js24@cus.cam.ac.uk

Dr. P. F. Leadlay
Department of Biochemistry, University of Cambridge
Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QW (Großbritannien)
Fax: (+44) 1223-336656
E-mail: pfl10@mole.bio.cam.ac.uk

[**] Diese Arbeit wurde durch Forschungsstipendien von der Winston Churchill Foundation der Vereinigten Staaten und dem Howard Hughes Medical Institute für K.J.W., vom Cambridge Commonwealth Trust für C.J.S. sowie vom Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) und von GlaxoWellcome PLC für U.H., M.B. und R.A. gefördert.

xy-Substitutionsmuster in Nachbarschaft zum Acylterminus mit dem natürlichen Produkt gemeinsam. Es läßt sich daher nicht sagen, ob eine bestimmte Struktur und Konfiguration an diesen beiden wichtigen Positionen notwendig sind.^[4] Der beste Weg, um Informationen zur Substratspezifität zu gewinnen, besteht in der Durchführung von In-vitro-Experimenten mit synthetischen Analoga. Für die vorliegenden Studien haben wir die Verbindungen **6–9**, die vier Diastereomere der vorgeschlagenen Diketidzwischenstufe, ausgewählt. Damit soll untersucht werden, ob stereochemische

**6****7****8****9****10**

11, R = (CH₂)₇OH
12, R = (CH₂)₁₀OH

Variationen an C-2 und C-3 die Abkopplung eines neuen Substrats von der DEBS in vivo verhindern. Um den Einfluß der Funktionalität an diesen Schlüsselpositionen zu bestimmen, haben wir die Umsätze der Verbindungen **6–9** untersucht und mit denen von Verbindung **10**, einem nicht funktionalisierten Diketidanalogon mit der gleichen Kettenlänge, verglichen. Andere Strukturanaloga (**11** und **12**) mit längeren Ketten und zusätzlichen, weiter entfernten Hydroxygruppen, die an der Bildung des Lactonrings teilnehmen könnten, wurden ebenfalls getestet.

Die Experimente wurden wie zuvor in vitro durchgeführt. Es wurde ein Teilstück des DEBS-3-Proteins verwendet, das entweder aus der C-terminalen Bidomäne, die ein Acyl-Trägerprotein (Acyl Carrier Protein) und die Thioesterase beinhaltet (ACP-TE), oder der Thioesterase allein besteht und aus *Escherichia coli* überexprimiert wurde.^[3, 6] In diesem Wirt wird zwar das Acyl-Trägerprotein nicht durch die Addition eines Phosphopantetheinrestes nach der Translation modifiziert, aber die Fähigkeit der benachbarten TE-Domäne, unabhängig als Thioesterase zu wirken, wird dadurch nicht beeinflusst. Um den Reaktionsverlauf leichter UV-spektroskopisch verfolgen zu können, wurden die Substrate in ihre *p*-Nitrophenylester überführt. Obwohl die *N*-Acetylcysteaminthioester die natürlichen Derivate am Acyl-Trägerprotein formal besser nachahmen,^[7] zeigte sich in ersten Experimenten, daß die *p*-Nitrophenylderivative schneller reagieren, ohne dabei den beobachteten Trend in der relativen Reaktivität für verschiedenen Acylketten zu verändern.^[3]

Zu Beginn unserer Untersuchungen wurden die Substrate **6–10** mit der ACP-TE in wäßrigem Phosphatpuffer, der zur Verbesserung der Löslichkeit der Substrate 1 % (v/v) Acetonitril enthielt, bei pH 7.4 unter Standardbedingungen inkubiert (Tabelle 1). Die Spaltung der Ester wurden UV-spek-

trokopisch bei 400 nm (λ_{max} des Phenolatanions) verfolgt, und die Geschwindigkeit wurden aus dem anfänglichen linearen Kurvenabschnitt berechnet. In allen Fällen wurde die gemessene Geschwindigkeit in bezug auf den Anteil der chemischen Hydrolyse ohne Enzym korrigiert.

Obwohl die TE alle vier an C-2 und C-3 funktionalisierten Diketide hydrolytisch abkoppelte, waren die Reaktionsgeschwindigkeiten im Vergleich zu der des nichtfunktionalisierten Substrates **10** deutlich verringert (Tabelle 1); das Analogon **6**, das am Acylterminus die gleiche relative Kon-

figuration wie das natürliche Substrat **1** aufweist, besaß die kleinste Geschwindigkeit für die Hydrolyse. Die Erythromycin-TE ist diesen Ergebnissen zufolge hinsichtlich der Erkennung der Funktionalität und der Konfiguration der Substrate am Acylterminus optimiert, eine unnütze, vorzeitige hydrolytische Abspaltung der Acyl-Enzym-Zwischenstufen zu vermeiden. Das trifft vor allem für Substrate zu, die das 2-Methyl-3-hydroxy-Substitutionsmuster und die natürliche 2*R*,3*S*-Konfiguration aufweisen. Die hydrolytische Abspaltung ist aber auch

bei Verbindungen mit den drei nichtnatürlichen Konfigurationen an diesen Positionen deutlich unterdrückt. Darum ist es wahrscheinlich, daß man auch Makrolactone mit einer veränderten Konfiguration an C-2 und C-3 gentechnisch erhalten kann.

Tabelle 1. Geschwindigkeiten v der Abspaltung des *p*-Nitrophenolatanions von **6–10** (X = *p*-Nitrophenoxy) unter Katalyse durch die Erythromycin-Thioesterase.^[a]

Substrat	v [nmol min ⁻¹] ^[a] in MeCN	v [nmol min ⁻¹] in EtOH	Steigerung mit EtOH [%]	normalisierte Steigerung [%] ^[b]
6	1.05	3.50	233	75.4×10^3
7	1.75	4.55	160	51.8×10^3
8	1.40	2.10	50	16.2×10^3
9	1.75	9.45	440	14.2×10^4
10	6.88	15.1	119	38.5×10^3

[a] Gemessen anhand der Absorption des *p*-Nitrophenolatanions (λ_{max} = 400 nm) bei 37 °C im linearen Bereich der Anfangsphase der Reaktion; Substratkonzentration 800 μM ; Enzymkonzentration 1.31 μM ; Kaliumphosphat- (200 mM) und Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)-Puffer (2.5 mM) mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; 50 μM), pH 7.4. [b] Unter Berücksichtigung der relativen Molaritäten von Wasser und Ethanol.

Die Bildung der Makrolactone hängt nicht nur von der Unterdrückung der hydrolytischen Abspaltung ab, sondern auch von der Fähigkeit zur Bildung einer Esterbindung. Da die TE Ethanol gegenüber Wasser als Nucleophil für die Desacylierung bevorzugt,^[3] ist es interessant zu wissen, ob diese Bevorzugung für eine Umsatzsteigerung mit den an C-2 und C-3 funktionalisierten Substraten genutzt werden kann. Ein Beweis für die Bildung der Ester statt der freien Carbonsäuren würde die These, daß die TE zur Bildung von Makrolactonen optimiert werden kann, weiter untermauern.

Die Substrate **6–10** wurden wie oben beschrieben inkubiert, außer daß die Lösungen 1 % (v/v) Ethanol enthielten. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden wieder UV-spektroskopisch ermittelt und in bezug auf die Geschwindigkeit der chemischen Reaktion korrigiert. Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß die Zugabe von nur 1 % (ca. 1/300 molar) Ethanol die Geschwindigkeiten der enzymkatalysierten Reaktion für drei der vier funktionalisierten Diketide im Vergleich zum nicht-funktionalisierten Analogon stark erhöht. Dies wird vor allem deutlich, wenn die Reaktionsgeschwindigkeiten mit der Molzahl der Nucleophile (Wasser oder Ethanol), die sich in der Reaktionsmischung befinden, korreliert werden. Interessanterweise war **6**, das ebenso konfiguriert ist wie das natürliche Derivat **1**, nicht das beste Substrat, sondern **9** ($7.70 \text{ nmol min}^{-1}$), das die gleiche Konfiguration an C-3, aber die entgegengesetzte an C-2 aufweist. Die Verbindung **6** reagierte mit einer nahezu ebenso großen mittleren Geschwindigkeit ($2.45 \text{ nmol min}^{-1}$) wie ihr Enantiomer **7** ($2.80 \text{ nmol min}^{-1}$). Das Substrat mit dem niedrigsten Umsatz (**8**, $0.70 \text{ nmol min}^{-1}$) ist das Enantiomer des besten Substrats (**9**). Daraus läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß alle vier Stereoisomere Substrate sind und daher stereochemische Veränderungen an der C-2-Methylgruppe oder C-3-Hydroxygruppe die Abkopplung des Produkts zum Makrolacton in vivo nicht erschweren, wenn ein zusätzliches, geeignetes hydroxysubstituiertes Zentrum im Substrat vorhanden ist.

Um zu bestätigen, daß die TE tatsächlich Ethanol anstelle von Wasser verwendet hat, wurden die Ansätze mit Ethanol in größerem Maßstab durchgeführt und die Produkte ^1H -NMR-spektroskopisch (Umsatz) und nach Methylierung gaschromatographisch (Anteile an Diketidsäuren und Ethylestern) analysiert. Die GC-Analyse ergab, daß in allen vier Enzymreaktionen mit den Stereoisomeren des Diketids die entsprechenden Ethylester gebildet wurden, außer in der Kontrollreaktion ohne TE. Wenn man in der Kontrollreaktion einen gewissen Anteil für die Hydrolyse berücksichtigt, ist klar, daß in allen Fällen die Ethanolyse der bevorzugte Mechanismus für die Abkopplung war. Wie bei der UV-Auswertung wurde auch hier der größte Umsatz für **9** ($51.6 \pm 0.6\%$ in 1 h unter Standardbedingungen), mittlere Geschwindigkeiten für **6** und **7** ($22 \pm 1\%$ bzw. $19 \pm 1\%$) und ein geringer Umsatz für **8** ($5 \pm 2\%$) erhalten.

Um die Bevorzugung von Ethanol mechanistisch zu begründen, haben wir die Thioesterasereaktion von **9** mit der Elektronenspray-Massenspektrometrie (ES-MS) in Gegenwart von Ethanol oder Acetonitril (9 % v/v) untersucht. Zwar war es nicht möglich, das Protein unter den eigentlichen Reaktionsbedingungen zu analysieren, doch wurden aus Vergleichsgründen die relativen Substrat- und Enzymkonzentrationen beibehalten. Die Spektren wurden transformiert, um Einzelsignale mit einem m/z -Wert entsprechend den einfach geladenen Ionen zu erhalten. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit wurde sowohl mit als auch ohne Ethanol nur ein Signal beobachtet, das der durch die Acylgruppe des Substrats acylierten ACP-TE entspricht. Da die Bildung der Acyl-Enzym-Zwischenstufe im Fall der an C-2 und C-3 funktionalisierten Substrate offensichtlich die Umsetzung nicht erschwert, muß die Desacylierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein. Es scheint wahr-

scheinlich, daß die Erkennung der Funktionalität und/oder Konfiguration an den C-2- und C-3-Positionen dazu führt, daß das TE-Enzym einen Hohlraum um das acylierte Substrat formt, so daß Wassermoleküle vom aktiven Zentrum ferngehalten werden und die hydrolytische Spaltung, wie sie in früheren Arbeiten mit einfacheren Substraten beobachtet wurde,^[3] verhindert wird. Vermutlich wird Ethanol nicht auf die gleiche Weise ausgeschlossen, sondern besetzt die Stelle am Enzym, an der sich gewöhnlich die Alkohol-Funktionalität befindet.

Es war auch von Interesse, ob die Makrolactonisierung gegenüber der Ethanolyse bevorzugt wird, wenn eine zusätzliche, weiter entfernte Hydroxygruppe im Substrat vorhanden ist. Daher haben wir die beiden Verbindungen **11** und **12** mit dem natürlichen (2*R*,3*S*)-2-Methyl-3-hydroxy-Substitutionsmuster und einer zusätzlichen ω -Hydroxygruppe, die die Möglichkeit zur Lactonbildung bietet, untersucht. Die ^1H -NMR-Spektren zeigen, daß die längerkettige Verbindung **12** nicht merklich zum Produkt umgesetzt wurde. Das kürzere Analogon **11** reagierte dagegen unter den Standardreaktionsbedingungen zufriedenstellend. Die Ethanolyse war wieder der vorherrschende Mechanismus ($>95\%$), der Rest des Umsatzes ist auf die Hydrolyse zurückzuführen. Ein weiterer Versuch zur Unterstützung der Lactonisierung durch Austausch von Acetonitril gegen Ethanol lieferte weniger als 0.1 % Lacton oder freie Säure; da die Acyl-Enzym-Zwischenstufe für die beiden Substrate **11** und **12** durch ES-MS detektiert werden konnte, muß die Barriere für die Produktabkopplung in der Desacylierung bestehen. Das Fehlen des Lactons in diesen Experimenten deutet darauf hin, daß die Hydrolyse in vivo nicht ausreichend zugunsten der Makrolactonisierung unterdrückt wird. Zusätzliche Strukturmerkmale in der Kohlenstoffkette des natürlichen Substrats **1** sind notwendig, damit sich die TE-Domäne richtig falten kann.

Die Ergebnisse zeigen, daß Zwischenstufen mit einer 2-Methyl-3-hydroxy-Funktionalität in jeder beliebigen stereochemischen Konfiguration abgekoppelt werden können, wenn eine zusätzliche Hydroxygruppe in geeigneter Position vorhanden ist. Allerdings findet auch dann keine schnelle Abkopplung der Acyl-Enzym-Zwischenstufen nach dem alternativen In-vivo-Mechanismus statt, wenn die Lactonisierung durch das Fehlen einer geeigneten Hydroxygruppe oder durch andere Umstände verhindert wird. Die vergleichsweise geringen Hydrolysegeschwindigkeiten dieser substituierten Analoga sind möglicherweise eine ernste Einschränkung für neuartige Produkte, die von der Erythromycin-Thioesterase abgespalten werden können.

Eingegangen am 22. Mai 1997 [Z10465]

Stichwörter: Antibiotica • Biosynthesen • Enzyme • Erythromycin • Polyketide

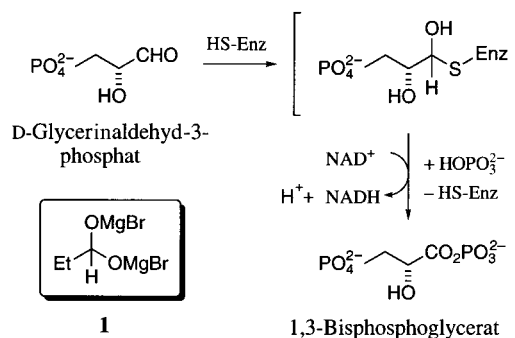
- [1] a) J. R. Martin, W. Rosenbrook, *Biochemistry* **1967**, 6, 435–440; b) J. W. Corcoran, A. M. Vygantas, *ibid.* **1982**, 21, 263–269.
- [2] J. Staunton, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1331–1335; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 10, 1302–1306.
- [3] R. Aggarwal, P. Caffrey, P. F. Leadlay, C. J. Smith, J. Staunton, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1519–1520.

- [4] a) J. Cortés, K. Wiesmann, G. A. Roberts, M. J. B. Brown, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Science* **1995**, 268, 1487–1489; b) C. M. Kao, G. Luo, L. Katz, D. E. Cane, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9105–9106; c) C. M. Kao, G. Luo, L. Katz, D. E. Cane, C. Khosla, *ibid.* **1996**, 118, 9184–9185.
- [5] a) M. Oliynyk, M. J. B. Brown, J. Cortés, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 833–839; b) P. F. Leadlay, J. Staunton, A. F. A. Marsden, B. Wilkinson, N. J. Dunster, J. Cortés, M. Oliynyk, U. Hanefeld, M. J. B. Brown in *Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics* (Hrsg.: R. H. Baltz, G. D. Hegeman, P. L. Skatrud), American Society for Microbiology, Washington, DC, **1997**, im Druck.
- [6] P. Caffrey, B. Green, L. C. Packman, B. J. Rawlings, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 195, 823–830.
- [7] a) S. Yue, J. S. Duncan, Y. Yamamoto, C. R. Hutchinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 1253–1255; b) D. E. Cane, C.-C. Yang, *ibid.* **1987**, 109, 1255–1257.

Biomimetische Oxidation von Aldehyden mit NAD^+ -Modellverbindungen – Wasserstoffübertragung vom Glycolyse-Typ in einem NAD^+/NADH -Modellsystem**

Nobuhiro Kanomata,* Masayuki Suzuki, Mamiko Yoshida und Tadashi Nakata

Das Coenzym NAD^+ und seine reduzierte Form, NADH , dienen als Redoxreagentien für biologische Reaktionen, die durch L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in anaeroben Glycolysen katalysiert werden.^[1] Es wurde bereits über eine Reihe synthetisch hergestellter NADH -Analoge einschließlich unserer überbrückten NADH -Modellverbindungen^[2a] für die asymmetrische Reduktion vom LDH-Typ berichtet,^[2, 3] aber nur wenige wurden im Hinblick auf die biomimetische Oxidation untersucht. Zwar ist bekannt, daß einige NAD^+ -Modellverbindungen Alkohole/Alkoxide^[4, 5] oder Formiat^[6] unter Bildung des NADH -Analogons und des entsprechenden Oxidationsproduktes umsetzen, doch konnte eine GAPDH-katalysierte Oxidation eines Aldehyds zum Carboxylat noch nicht nachgeahmt werden.^[7] Um diese bisher beispiellose Modellreaktion zu verwirklichen, haben wir unsere Aufmerksamkeit auf das Aldehyd-Äquivalent **1**^[8] gerichtet. Diese Verbindung ist ein Analogon der Thiohemiacetal-Zwischenstufe,^[1, 9] die aus D-Glycerinaldehyd-3-phosphat und einem Cysteinrest von GAPDH gebildet wird (Schema 1). Wir beschreiben hier die erste GAPDH-analoge Oxidation eines Aldehyds zum Carboxylat in Verbindung mit



Schema 1. GAPDH-Oxidation und Struktur von **1**.

einer hochselektiven 1,4-Reduktion von NAD^+ - zu NADH -Modellverbindungen und ihre Anwendung auf Übertragungsreaktionen vom GAPDH- und LDH-Typ.

Das Diolat **1** wurde nach Literaturangaben hergestellt.^[8] Die regioselektive Wasserstoffübertragung von **1** verläuft besonders effizient auf *N*-Benzylpyridinium-Salze **2**, die eine tertiäre Amidgruppe haben (Tabelle 1; siehe Tabelle 2 für

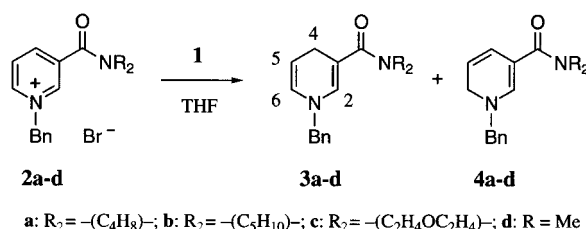


Tabelle 1. Reaktionen von **2a–d** mit **1**.^[a]

Nr.	2	T [°C]	t [h]	3:4 ^[b]	Ausb. [%] ^[c]
1	2a	RT	5	> 95:5	58
2 ^[d]	2a	RT	5	> 95:5	87
3	2a	50	3	91:9	73
4	2a	90	1	91:9	92
5 ^[d]	2b	RT	5	93:7	61
6	2b	90	1	95:5	90
7	2c	90	1	91:9	72
8	2c	90	4	84:16	62
9	2d	90	1	93:7	69
10	2d	90	4	73:27	59

[a] Alle Reaktionen wurden in THF unter Argon durchgeführt mit 5 Äquiv. **1**, sofern nicht anders angegeben. [b] Die Verhältnisse wurden aus den Integralen der ^1H -NMR-Spektren bestimmt. [c] Ausbeuten beziehen sich auf die Rohproduktmischung von **3** und **4** nach der Extraktion. [d] 10 Äquiv. **1**.

analytische Daten der Produkte). Die Reaktion von **2a** mit **1** (5 oder 10 Äquiv.) wurde in THF bei Raumtemperatur (RT) innerhalb von 5 h durchgeführt und lieferte fast ausschließlich das 1,4-Dihydropyridinamid **3a**^[10] (Nr. 1 und 2). Bei höheren Temperaturen waren die Reaktionen schon nach 1–3 h beendet und führten in guter Ausbeute vorwiegend zu **3a** neben 1,6-Dihydropyridinamid **4a**^[11] (Verhältnis ca. 9:1; Nr. 3 und 4). Propionsäure, das Produkt der Oxidation von **1**, wurde aus der sauren wäßrigen Lösung isoliert und ^1H -NMR-spektroskopisch identifiziert. Die hohe 1,4-Selektivität wurde auch bei den anderen NAD^+ -Modellverbindungen **2b**, **2c**^[4d] und **2d**^[12] erreicht; man erhielt vorwiegend die gewünschten

[*] Dr. N. Kanomata, M. Suzuki, M. Yoshida, Prof. Dr. T. Nakata
The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)
Wako-shi, Saitama 351-0198 (Japan)
Fax: (+81) 48-462-4666
E-mail: nobkano@riken.go.jp

[**] N. K. dankt für den Banyu-Preis (Organische Synthesechemie), Japan, und ein Stipendium zur Förderung der Forschung vom RIKEN. N. K. ist ein Wissenschaftler des Basic Science Program, RIKEN (1994–1997).