

10 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und getrocknet (Na_2SO_4). Das nach Entfernen des Lösungsmittels erhaltene Rohprodukt wurde durch Chromatographie an Kieselgel (*n*-Hexan/Essigester, 3/1) gereinigt. Man erhielt 0.075 g (60%) **14** in Form farbloser Kristalle. Schmp. 151–153 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 5.83 (s, 2H; $\text{HC}=\text{CH}$), 3.72 (s, 3H; OCH_3), 3.99 (dd, J = 4.1, 13.5 Hz, 1H; CH_2), 2.89 (s, 3H; CH , CH_2), 2.79 (td, J = 4.0, 12.4 Hz, 1H; CH), 2.34 (t, J = 13.5 Hz, 1H; CH_2), 1.97–1.88 (m, 1H; CH), 1.56–1.43 (m, 7H; 3 CH_2 , OH), 1.38–1.30 (m, 2H; CH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 174.2 (s, $\text{C}=\text{O}$), 150.9 (s, $\text{C}=\text{C}$), 123.5, 122.4 (2d, $\text{HC}=\text{CH}$), 117.8 (s, $\text{C}=\text{C}$), 104.7 (s, $\text{C}\equiv\text{N}$), 75.0 (s, $\text{C}-\text{OH}$), 52.0 (q, OCH_3), 50.0, 44.8, 43.3 (3d, 3 CH), 36.0, 28.4, 28.0, 23.9, 20.9, 19.6 (6t, 6 CH_2); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3515 (br., $\text{O}-\text{H}$), 2940–2860 ($\text{C}-\text{H}$, $=\text{C}-\text{H}$), 2215 ($\text{C}\equiv\text{N}$), 1715 ($\text{C}=\text{O}$), 1640 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$); $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}$ -Analyse (%): ber. für $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ (287.4): C 71.05, H 7.36, N 4.87; gef. C 71.10, H 7.58, N 4.85.

Eingegangen am 2. September 1998 [Z12370]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 789–791

Stichwörter: Carbocyclen • Cyclisierungen • Elektronentransfer • Samariumdiodid

- [1] P. Girard, J. L. Namy, H. B. Kagan, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 2693–2698.
- [2] Übersicht: G. A. Molander, C. R. Harris, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 307–338.
- [3] Übersicht: G. A. Molander, C. R. Harris, *Tetrahedron* **1998**, 54, 3321–3354; allgemeine Übersicht zu sequentiellen Reaktionen: L. F. Tietze, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 115–136.
- [4] G. A. Molander, J. A. McKie, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 3186–3192.
- [5] a) F. A. Khan, R. Czerwonka, R. Zimmer, H.-U. Reißig, *Synlett* **1997**, 995–997; b) C. U. Dinesh, H.-U. Reißig, unveröffentlichte Ergebnisse (1997/1998).
- [6] a) G. A. Molander, G. Kenny, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8236–8246; b) S. C. Shim, J.-T. Hwang, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 4765–4768.

- [7] Die Synthese der Ausgangsverbindungen folgte dem in Lit. [5a] vorgestellten Schema, wobei das Iodaren nicht nach Stille umgesetzt wurde, sondern eine Sonogashira-Kupplung zur Einführung der Alkinyleinheit verwendet wurde. Alle Verbindungen waren racemisch; es wird jeweils nur ein Enantiomer abgebildet.
- [8] Das nicht abgebildete zweite Diastereomer der Verbindungen **6–8** reagierte unter den bisher angewandten Bedingungen nicht.
- [9] O. Rademacher, Institut für Anorganische Chemie der Technischen Universität Dresden, unveröffentlichte Ergebnisse (1998).
- [10] Übersicht: P. W. Rabideau, Z. Marcinow, *Org. React.* **1992**, 42, 1–334.
- [11] N. Kise, T. Suzumoto, T. Shono, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1407–1413. Die Autoren berichten in dieser Arbeit auch von Versuchen, die reduktiven Cyclisierungen mit chemischen Elektronentransferreagentien durchzuführen. Dabei wird ein Experiment mit SmI_2/HMPA (0 °C) erwähnt, bei dem keine Produktbildung beobachtet wurde.
- [12] R. Gorny, H. J. Schäfer, R. Fröhlich, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2188–2191; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2007.
- [13] a) H.-G. Schmalz, S. Siegel, J. W. Bats, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2597–2599; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2383–2385; b) H.-G. Schmalz, S. Siegel, A. Schwarz, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 7, 2947–2950.
- [14] Erste Versuche ergaben, daß *N*-Methylpyrrolidon geeignet sein könnte; siehe auch: M. Shabangi, J. M. Sealy, J. R. Fuchs, R. A. Flowers II, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4429–4432.

Die Rolle der Ligandendichte bei der enzymatischen Glycosylierung von Kohlenhydraten, die auf einer selbstorganisierten Alkanthiolat-Monoschicht auf Gold präsentiert werden**

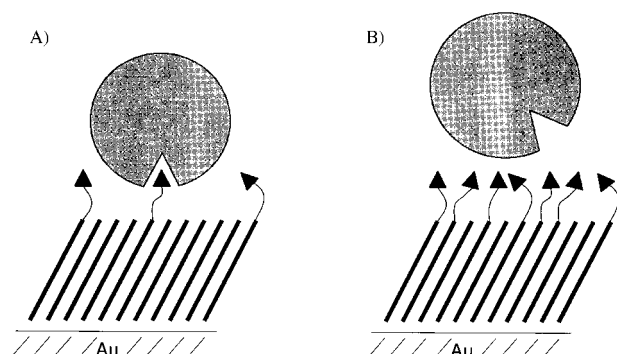
Benjamin T. Houseman und Milan Mrksich*

Die enzymatische Modifizierung von immobilisierten Kohlenhydraten ist wichtig für Prozesse wie Proteintransport,^[1] virale und bakterielle Pathogenese^[2] und Zellmigration.^[3] Viele Modellsysteme, darunter solche, bei denen Polymere,^[4] Dendrimere^[5] oder Liposomen^[6] zur Präsentation von Kohlenhydraten eingesetzt werden, haben unsere Kenntnisse der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und immobilisierten Kohlenhydraten erweitert. Diese Systeme präsentieren die Kohlenhydrate jedoch in einer heterogenen Umgebung und bieten nur geringe Flexibilität bezüglich der Anpassung der Struktur der Gruppen, die die Liganden umgeben. Diese Einschränkungen erschweren mechanistische Studien von enzymatischen Prozessen an diesen Grenzflächen.

[*] Prof. M. Mrksich, B. T. Houseman
Department of Chemistry, The University of Chicago
Chicago, IL 60637 (USA)
Fax: (+1) 773-702-0805
E-mail: mmrksich@midway.uchicago.edu

[**] Wir danken für die Unterstützung durch die National Institutes of Health (GM54621), durch das Searle Scholars Program (The Chicago Community Trust) und durch den Galler Young Faculty Fund. Der National Science Foundation (CHE-9709039) und den Einrichtungen der MRSEC der NSF (DMR-9400379) danken wir für Ausstattungsmittel. B.T.H. dankt für ein Doktorandenstipendium (HD-09007) und ein Searle Stipendium der Universität Chicago.

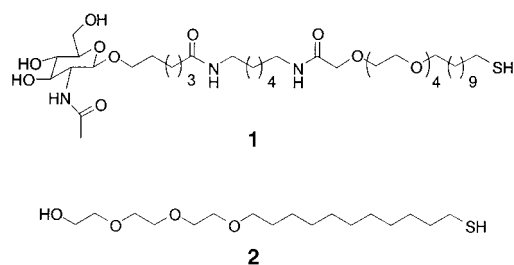
Selbstorganisierte Monoschichten (SAMs) aus Alkanthiolaten auf Gold sind strukturell wohldefinierte Substrate, die ein hervorragendes Modellsystem für Studien an biologischen Grenzflächen darstellen.^[7] SAMs wurden häufig zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen immobilisierten Liganden und Proteinen in Lösung eingesetzt. Aus einem Großteil dieser Arbeiten geht hervor, daß die Zugänglichkeit des Liganden die Bindungseigenschaften des Proteins beeinflusst.^[8a-d] Liganden, die in größerer Dichte immobilisiert werden,^[8e, f] können deutlich andere biologische Eigenschaften haben, als wenn sie in niedriger Dichte vorliegen (Schema 1). Hier beschreiben wir gemischte SAMs, die *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und Triethylenglycol-Gruppen



Schema 1. Liganden, die in niedriger Dichte immobilisiert wurden (A), sollten für die Bindung an ein Protein leichter zugänglich sein als Liganden, die in hoher Dichte immobilisiert wurden (B).

präsentieren, um zu zeigen, daß die Aktivität von Rinder- β -1,4-Galactosyltransferase (GalTase) von der Dichte des immobilisierten Kohlenhydrates abhängt.

Wir präparierten Substrate aus dem Alkanthiol **1**, das mit GlcNAc funktionalisiert ist, und dem Alkanthiol **2**, das mit



einer Triethylenglycol-Einheit funktionalisiert ist.^[9, 10] Das Kohlenhydrat ist ein Substrat für GalTase, während die Triethylenglycol-Einheit die unspezifische Adsorption des Proteins an das Modellsystem verhindert.^[11] Die Dichte von GlcNAc auf der Grenzfläche läßt sich leicht durch die Einstellung des Verhältnisses der Alkanthiole in der Lösung, aus der die SAM gebildet wird, kontrollieren. Bei Anwesenheit von Mn^{II} -Ionen überträgt GalTase Galactose vom Donorsubstrat Uridindiphosphogalactose (UDP-Gal) auf die 4-Hydroxygruppe von GlcNAc (Abbildung 1).^[12] Um die Übertragung von Galactose auf immobilisierte GlcNAc-Gruppen zu quantifizieren, wurde eine Pufferlösung, die das Enzym, [^{14}C]UDP-Gal, UDP-Gal und $MnCl_2$ enthält, auf die SAMs gegeben und dort 8 h bei 37 °C belassen. Die Substrate

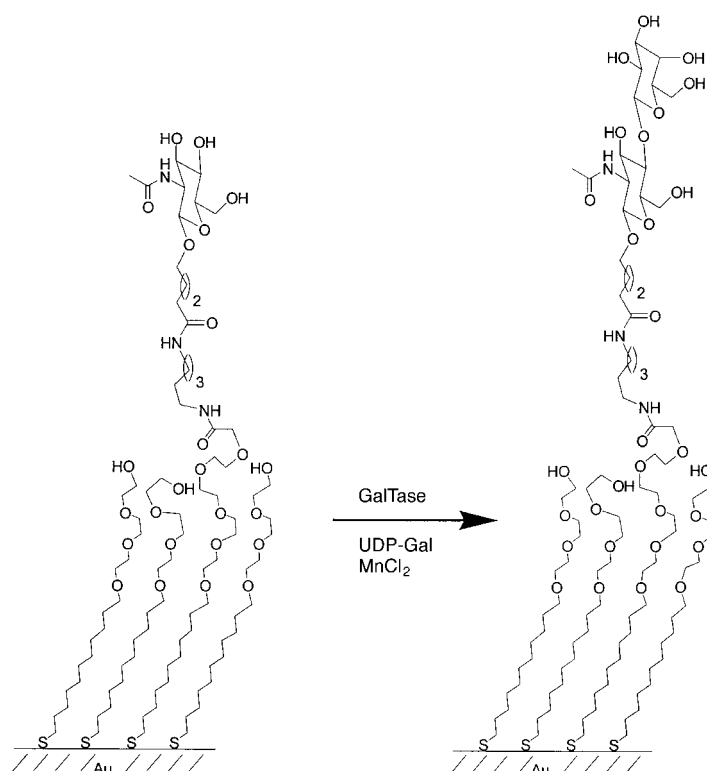


Abbildung 1. In dieser Arbeit wurden SAMs verwendet, die *N*-Acetylglucosamin gemischt mit Triethylenglycol-Einheiten als Modellsystem zur Bestimmung der Beziehung zwischen GalTase-vermittelter Glycosylierung und der Dichte des Kohlenhydrats auf der SAM präsentieren.

wurden daraufhin in eine wäßrige Lösung gegeben und die Alkanthiole durch UV-Bestrahlung von der Goldoberfläche entfernt. Der Überstand wurde durch Flüssigkeitsszintillationszählung analysiert. Dieses Verfahren wurde mit SAMs, die verschiedene Dichten von GlcNAc präsentierten, wiederholt.

Abbildung 2 zeigt den Zusammenhang zwischen der Dichte $\chi_{GlcNAc}^{[13]}$ von GlcNAc auf der SAM und dem Einbau von [^{14}C]markierter Galactose. Der Einbau des Radionuclids stieg zunächst linear mit der GlcNAc-Dichte, erreichte bei $\chi_{GlcNAc} = 0.7$ ein Maximum und nahm bei höheren χ_{GlcNAc} -Werten wieder ab. Bei SAMs, die ausschließlich Kohlenhydrat präsentierten ($\chi_{GlcNAc} = 1.0$), wurde eine extreme Abnahme der Glycosylierung verzeichnet; die Menge an [^{14}C]Galactose auf diesen SAMs entsprach derjenigen, die auf SAMs mit $\chi_{GlcNAc} = 0.2$ ermittelt wurden. Die niedrige Ausbeute war nicht durch eine geringere Reaktionsgeschwindigkeit bedingt; nach der achtstündigen Inkubationszeit wurde keine weitere Glycosylierung festgestellt. Bei den Substraten fand kein unspezifischer Einbau statt – nur schwache Hintergrundwerte von [^{14}C]Galactose wurden auf SAMs gemessen, die ausschließlich Triethylenglycol-Einheiten präsentierten. Um die Spezifität der Reaktion zu demonstrieren, legten wir SAMs, die aus dem Alkanthiol **2** und dem mit *N*-Acetylglucosamin (LacNAc) funktionalisierten Alkanthiol **3** bestanden, bei den beschriebenen Reaktionsbedingungen vor; dabei stellten wir nur Hintergrundwerte an [^{14}C]Einbau fest. Dieses Ergebnis macht deutlich, daß eine sterische Überladung der Oberfläche mit Kohlenhydratligen- den Enzym-Substrat-Wechselwirkungen im hier beschriebe-

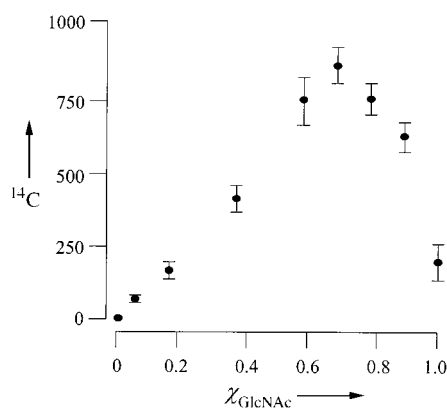
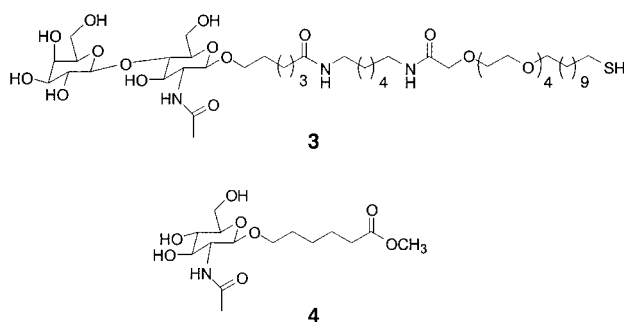


Abbildung 2. Zusammenhang zwischen χ_{GlcNAc} und dem enzymatischen Einbau von ^{14}C aus radioaktiv markiertem UDP-Gal. Mit einer Lösung (40 μL), die GalTase (25 mU), MnCl_2 (10 mM), UDP-Gal (0.4 nmol) und [^{14}C]UDP-Gal (0.2 nmol) in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7.5) enthielt, wurden SAMs behandelt, deren χ_{GlcNAc} -Werte von 0 bis 1.0 variierten (HEPES = 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure). Nach 8 h bei 37 °C wurden die Deckgläser mit destilliertem Wasser gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und mit 750 μL destilliertem Wasser in Probengefäße für die Szintillationsmessungen gegeben. Die SAMs wurden durch 4 \times 15 min Belichten mit UV-Licht abgelöst und der ^{14}C -Einbau durch Flüssigkeitsszintillationszählen quantifiziert. Der Einbau des Radionuclids wurde auf die Fläche der SAMs normiert (die Werte sind in Zählimpulsen pro cm^2 angegeben). Jeder Meßwert repräsentiert etwa vier bis acht Proben.



nen Modellsystem inhibiert; dieser Effekt wurde bei $\chi_{\text{GlcNAc}} > 0.7$ offensichtlich. Es konnte nicht bestimmt werden, ob die Abnahme der Glycosylierung durch eine zu großen Menge an unmodifizierten Liganden oder durch den Einfluß von LacNAc-Gruppen auf einem teilweise modifizierten Substrat bedingt war.

Wir setzten die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (surface plasmon resonance, SPR) ein, um die Bindung von zwei Lectinen, die jeweils für GlcNAc oder LacNAc spezifisch sind, an die SAMs zu messen. Das *BS-II*-Lectin aus *Bandeiraea simplicifolia* bindet an terminale, nichtreduzierende GlcNAc-Gruppen ($K_d \approx 80 \text{ nM}$),^[14] während das Lectin aus *Erythrina cristagalli* an terminale LacNAc-Gruppen ($K_d \approx 400 \mu\text{M}$) bindet.^[15] Bei der SPR-Spektroskopie wird der Winkel θ gemessen, bei dem die Intensität von polarisiertem Licht, das von der Rückseite eines goldbeschichteten Objektträgers mit einer SAM reflektiert wird, minimal ist. Die Größe dieses Winkels hängt linear von der Änderung des Brechungsindex – und somit von der Masse des Proteins – im Grenzflächenbereich ab.^[16, 17] Die spezifische Wechselwirkung der Lectine mit den SAMs bestimmt die Menge der

jeweils auf den Substraten anwesenden Kohlenhydrate.^[18] Die hohe Molekülmasse der Lectine^[19] ist insofern günstig für diese Methode, als dadurch stärkere SPR-Effekte hervorgerufen werden und daher eine höhere Meßempfindlichkeit für den Bindungsvorgang erreicht wird.

Abbildung 3 A zeigt die SPR-spektroskopischen Ergebnisse zur Bindung beider Lectine an eine SAM, die GlcNAc ($\chi = 0.01$) präsentiert. Das *B.-simplicifolia*-Lectin (1 μM in PBS-Puffer) band Kohlenhydratgruppen an der Oberfläche. Wenn

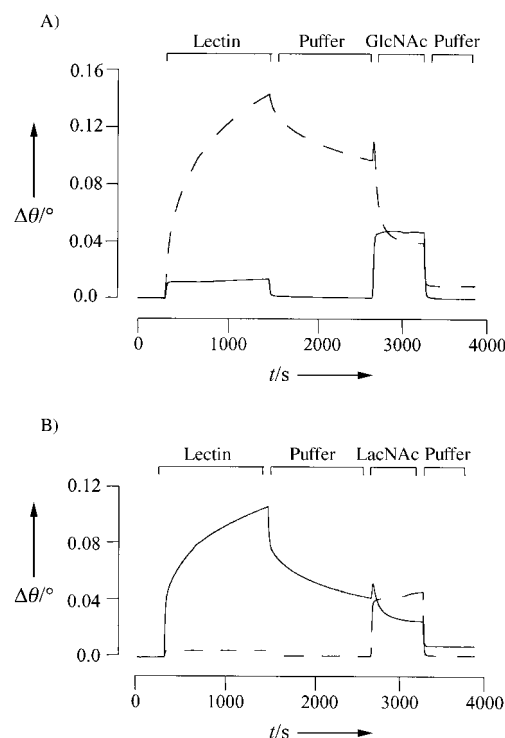


Abbildung 3. SPR-Untersuchung zur Bindung des *BS-II*-Lectins (1 μM in PBS-Puffer, gestrichelte Kurve) und des *Erythrina-cristagalli*-Lectins (5 μM in PBS-Puffer, durchgezogene Kurve) an SAMs, die (A) 1 % GlcNAc oder (B) 1 % LacNAc zwischen Triethylenglycol-Einheiten aufweisen. Man ließ eine Lösung des Lectins in PBS-Puffer 20 min über die SAM fließen, danach wurde die Lectinlösung 20 min durch Pufferlösung ersetzt und anschließend 10 min durch eine Lösung des löslichen Kohlenhydratlignanden (1 mM **4** oder 2 mM LacNAc in PBS-Puffer). Das *BS-II*-Lectin band an SAMs, die GlcNAc-Gruppen präsentierten, während das *E.-cristagalli*-Lectin ausschließlich an die SAMs band, die LacNAc-Gruppen präsentierten. Die Bindung beider Lectine konnte durch die Einführung löslicher Kohlenhydratlignanden kompetitiv gehemmt werden.

die Proteinlösung durch eine Pufferlösung ersetzt wurde, nahm die Menge an immobilisiertem Protein langsam ab (PBS = phosphate buffered saline; pH 7.4). Da das Lectin kooperativ binden kann,^[19] blieb ein großer Teil des Proteins mit dem Substrat assoziiert. Durch Zugabe des GlcNAc-Derivats **4** (1 mM in PBS) und anschließende Behandlung mit Pufferlösung wurde annähernd sämtliches Lectin von der SAM entfernt.^[20] Für das Lectin aus *E. cristagalli* (5 μM in PBS-Puffer) wurde dagegen keine Assoziation mit GlcNAc-Gruppen auf der SAM nachgewiesen.^[21]

Die Kurven in Abbildung 3 B zeigen die Assoziation beider Lectine mit einer SAM, die LacNAc-Gruppen ($\chi = 0.01$) präsentiert. Erwartungsgemäß bindet das *E.-cristagalli*-Lec-

tin, nicht aber das *BS-II*-Lectin, das Disaccharid auf der Grenzfläche. Das Lectin dissoziierte nach Zugabe von löslichem LacNAc (2 mM in PBS-Puffer) und Behandlung mit Pufferlösung.^[21] Diese Experimente zeigen, daß jedes Lectin eine hohe Spezifität bezüglich der Bindung seines Liganden aufweist.

Wir verwendeten die SPR-Methode auch, um die Galactosylierungsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion zu messen. Eine SAM, die GlcNAc ($\chi = 0.01$) präsentiert, wurde 15 min mit einem Puffer behandelt, der GalTase, $MnCl_2$ und UDP-Gal enthielt. Die Lösung wurde durch Meßpuffer ersetzt, anschließend wurde über 20 min eine Lösung von jedem Lectin zugegeben, um GlcNAc- bzw. LacNAc-Gruppen an die SAM zu binden. Abbildung 4A zeigt, daß das *E.-crisagalli*-Lectin, nicht aber das *BS-II*-Lectin mit der SAM assoziiert, und läßt erkennen, daß die Ausbeute dieser Umwandlung nahezu quantitativ war. Zur Demonstration, daß diese Methode Informationen zur Kinetik liefern kann,

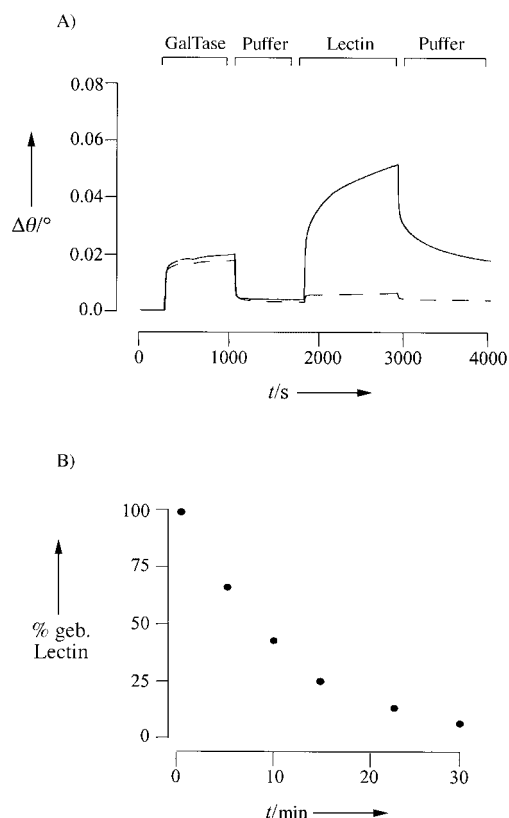


Abbildung 4. A) Das *E.-crisagalli*-Lectin, nicht jedoch das *BS-II*-Lectin, bindet LacNAc-Gruppen, die durch Glycosylierung von immobilisiertem GlcNAc durch GalTase eingeführt wurden. SAMs wurden in die SPR-Zelle eingeführt und 15 min mit einem Puffer behandelt, der GalTase (15 μ M in PBS-Puffer), UDP-Gal (0.4 nmol) und $MnCl_2$ (10 mM) enthielt. Die Reaktionsmischung wurde 15 min durch Meßpuffer ersetzt, dann wurde eine Lösung des entsprechenden Lectins (durchgezogene Kurve: *E. crisagalli*; gestrichelte Kurve: *BS II*) zur Bestimmung der Anwesenheit von GlcNAc oder LacNAc auf der SAM eingeführt. Es wurde eine quantitative Umsetzung der GlcNAc-Gruppen zu LacNAc-Gruppen beobachtet. B) Auftragung der *BS-II*-Lectinbindung gegen die Zeit. Einzelne SAMs wurden mit 1.75 μ M GalTase in der SPR-Zelle über unterschiedliche Zeiträume behandelt und die Bindung des Lectins an die modifizierten Oberflächen ermittelt. Die Meßdaten sind angegeben als der Prozentsatz der Intensität des Signals für die Bindung zwischen dem Lectin und einer unbehandelten, GlcNAc ($\chi = 0.01$) präsentierenden SAM.

verwendeten wir das *BS-II*-Lectin, um die Glycosylierung nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit dem Enzym zu untersuchen. Bei diesen Experimenten wurde eine niedrigere Enzymkonzentration eingesetzt, um die Reaktionsgeschwindigkeit zu verringern und die Beobachtung durch SPR-Spektroskopie zu ermöglichen. Abbildung 4B zeigt, daß es zu einer zeitabhängigen Abnahme der Bindung des *B.-simplicifolia*-Lectins kommt. Nach 30 min kam es zu einer Abnahme der Lectinbindung auf das Niveau des Hintergrundrauschens, weil sämtliche GlcNAc-Gruppen durch das Enzym modifiziert worden waren. Es wurde keine Abnahme der Lectinbindung festgestellt, wenn die Reaktionsmischung entweder kein $MnCl_2$ oder kein UDP-Gal enthielt. Die Kombination von SPR-Spektroskopie und kohlenhydratspezifischen Lectinen kann also eingesetzt werden, um Informationen über die Kinetik der enzymatischen Modifizierung von immobilisierten Substraten zu erhalten.

Wir haben hier beschrieben, wie die Dichte von immobilisierten Liganden deren biologische Eigenschaften beeinflussen kann. Dieser Effekt muß bei Modellsystemen berücksichtigt werden, die biologisch aktive Liganden in hohen Dichten präsentieren. Wir haben ferner einige Charakteristika von SAMs beschrieben, die sie zur bestmöglichen Klasse von Modellsystemen für Studien an biologischen Grenzflächen machen: Sie sind unempfindlich für unspezifische Proteinadsorption, die Ligandendichte auf der Grenzfläche ist kontrollierbar, SPR-Spektroskopie kann für die Messung der Bindung von Proteinen an immobilisierte Liganden verwendet werden, und die Struktur und die Umgebung der Liganden an der Oberfläche können mit Methoden der präparativen organischen Chemie maßgeschneidert werden. Die Erkennung und Glycosylierung von immobilisierter GlcNAc durch GalTase ist besonders bedeutsam für Phänomene an biologischen Grenzflächen, da sie die entscheidende Kenngröße für die Migration von Zellen auf Lamininmatrizes ist.^[3a] Das hier beschriebene Modellsystem könnte eine wichtige Rolle bei der Aufklärung der mechanistischen Details dieses Migrationsprozesses spielen.

Eingegangen am 4. September 1998 [Z 12379]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 782–785

Stichwörter: Glycosylierungen • Grenzflächenchemie • Kohlenhydrate • Monoschichten • Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

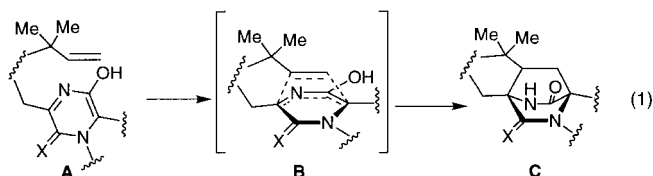
- [1] a) R. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 683, zit. Lit.; b) P. Sears, C. H. Wong, *Cell Mol. Life Sci.* **1998**, 54, 223, zit. Lit.
- [2] Zur Rolle von Kohlenhydraten bei bakterieller Pathogenese: B. B. Finlay, P. Cossart, *Science* **1997**, 276, 718. Zur Rolle von Kohlenhydraten bei viralen Prozessen: S. K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 97.
- [3] a) S. C. Evans, A. Youakim, B. D. Shur, *Bioessays* **1995**, 17, 261; b) S. D. Rosen, C. R. Bertozzi, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1994**, 6, 663; c) K. Drickhamer in *Molecular Glycobiology* (Hrsg.: M. Fukuda, O. Hindsgaul), IRL, Oxford, **1994**, S. 53–87; d) J. B. Lowe in *Molecular Glycobiology* (Hrsg.: M. Fukuda, O. Hindsgaul), IRL, Oxford, **1994**, S. 163–194.
- [4] Zum Einsatz von Polymeren bei molekularer Erkennung: a) H. Kamikatahara, T. Suzuki, N. Nishiguri, Y. Suzuki, O. Kanie, C. H.

- Wong, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1607; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1524; b) L. L. Kiessling, N. L. Pohl, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 71; c) *Neoglycoconjugates, Preparation and Applications* (Hrsg.: Y. C. Lee, R. T. Lee), Academic Press, San Diego, **1994**; zum Einsatz von Polymeren bei der Kohlenhydratsynthese: d) O. Blixt, T. Norberg, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2705; e) K. Yamada, E. Fujita, S. Nishimura, *Carbohydr. Res.* **1998**, *305*, 443.
- [5] a) D. Zanini, R. Roy, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3486; b) P. R. Ashton, E. F. Hounsell, N. Jayaraman, T. M. Nilsen, N. Spencer, J. F. Stoddart, M. Young, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3429, zit. Lit.
- [6] a) J. E. Kingery-Wood, K. W. Williams, G. B. Sigal, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7303; b) A. Reicher, J. O. Nagy, W. Spevak, D. Charych, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *115*, 1146.
- [7] a) M. Mrksich, *Cell Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 653; b) M. Mrksich, G. M. Whitesides, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, *25*, 55.
- [8] a) M. Mrksich, J. R. Grunwell, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12009; b) M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, H. E. Gaub, *Science* **1997**, *275*, 1295; c) J. Spinke, M. Liley, F. J. Schmitt, H. J. Guder, L. Angermaier, W. Knoll, *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 7012; d) J. Spinke, M. Liley, H. J. Guder, L. Angermaier, W. Knoll, *Langmuir* **1993**, *9*, 1821; e) D. J. Revell, J. R. Knight, D. J. Blyth, A. H. Haines, D. A. Russell, *Langmuir* **1998**, *14*, 4517; f) J. K. Whitesell, H. K. Chang, C. S. Whitesell, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 921; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 871.
- [9] 2 wurde synthetisiert nach: C. Pale-Grosdemange, E. S. Simon, K. L. Prime, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 12. Die Kohlenhydratkonjugate **1** und **4** wurden aus bekannten Verbindungen in acht bzw. drei Schritten synthetisiert. Das Disaccharid **3** wurde in zehn Schritten synthetisiert. Details hierzu werden an anderer Stelle beschrieben werden.
- [10] Die Substrate wurden durch die Verdampfung von Titan (1 nm) und anschließend Gold (12 oder 38 nm) auf Deckgläschen präpariert. Die Scheiben wurden in Stücke von ca 1 cm² geschnitten und in eine Ethanollösung (0.4 mL) gelegt, die **1** oder **3** und **2** in unterschiedlichen Verhältnissen (insgesamt 1 mM Thiol) enthielt. Nach 8 h wurden die Substrate aus der Lösung entfernt, mit wasserfreiem Ethanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.
- [11] M. Mrksich, G. M. Whitesides, *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* **1997**, *680*, 361, zit. Lit.
- [12] W. M. Watkins, W. Z. Hassid, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 1432.
- [13] Die Beziehung zwischen der Kohlenhydratkonzentration in Lösung und der Kohlenhydratdichte auf dem Substrat wurde über den Einbau von ¹⁴C-markierter Galactose auf SAMs bestimmt, die aus Lösungen zubereitet wurden, die **1** und **2** in unterschiedlichen Verhältnissen enthielten. χ_{GlcNAc} ist der Anteil von Alkanthiolaten in der SAM, die GlcNAc-Gruppen präsentiert.
- [14] a) P. N. Shankar Iyer, K. D. Wilkinson, I. J. Goldstein, *Arch. Biochem. Biophys.* **1976**, *177*, 330; b) S. Ebisu, P. N. Shankar Iyer, I. J. Goldstein, *Carbohydr. Res.* **1978**, *61*, 129.
- [15] J. L. Iglesias, H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1982**, *123*, 247.
- [16] H. Raether in *Physics of Thin Films*, Vol. 9 (Hrsg.: G. Hass, M. Francombe, R. Hoffman), Academic Press, New York, **1977**, S. 145–261.
- [17] Zum Einsatz der SPR-Spektroskopie zur Charakterisierung der Erkennungsvorgänge von Biomolekülen auf SAMs siehe Lit. [8a,c] sowie: M. Mrksich, G. B. Sigal, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1995**, *11*, 4383.
- [18] Alle Substrate, einschließlich solcher, die ausschließlich GlcNAc oder LacNAc präsentierten, widerstanden selbst der unspezifischen Bindung von Fibrinogen (1 mg mL⁻¹ in PBS-Puffer).
- [19] Das BS-II-Lectin ist ein Tetramer aus vier identischen Untereinheiten (112 kDa), während das Lectin aus *Erythrina cristagalli* ein Homodimer ist (57 kDa).
- [20] Der niedrige Anteil an irreversibler Bindung, der nach dem Austausch des löslichen Kohlenhydrats gegen Meßpuffer verblieb, resultierte wahrscheinlich aus der unspezifischen Adsorption von Protein auf Fehlstellen auf der SAM.
- [21] Die in der Abbildung gezeigten Änderungen $\Delta\theta$ resultieren aus der Zunahme des Brechungsindex der Lectinlösung und der Kohlenhydratlösung relativ zu dem der Pufferlösung; dieselben Änderungen wurden auf Oberflächen beobachtet, die ausschließlich Triäthylen-glycol-Einheiten präsentierten.

Reverse und „normale“ Prenyltransferasen haben unterschiedliche Seitenselektivitäten bei der Biosynthese von Paraherquamid**

Emily M. Stocking, Juan F. Sanz-Cervera* und Robert M. Williams*

Die Paraherquamide **1**–**10**^[1] sind eine Gruppe von Pilzmetaboliten, die ebenso wie die strukturell ähnlichen Verbindungen Sclerotamid **11**,^[2] Marcfortin A **12**,^[3] Asperparalin A (Aspergillimid VM55598) **14**, SB202327 **15**^[4] und die Brevianamide (Brevianamid A **16** und Brevianamid B **17**)^[5] viel Aufmerksamkeit erregt haben wegen ihrer vielfältigen (z. B. anthelmintischen, paralytischen und insektiziden) biologischen Wirkungen.^[1–5] Die Substanzen haben unterschiedliche biogenetische Herkunft und entstehen durch die oxidative Polycyclisierung von Aminosäuren und Isopreneinheiten. Besonders interessant sind die zunehmenden Hinweise darauf, daß das gemeinsame Bicyclo[2.2.2]-Strukturmotiv bei der Biosynthese durch eine intramolekulare [4+2]-Cycloaddition einer von Isopren abgeleiteten Olefineinheit an einen Azadienrest entsteht, der wiederum aus einer Piperazindioneinheit stammt [**A** → **B** → **C**, Gl. (1)].^[6, 7]



[4+2]-Cycloadditionen werden in der organischen Synthese vielfach eingesetzt, in der Natur sind pericyclische Reaktionen aber ziemlich selten, und nur in wenigen Fällen gab es experimentelle Hinweise darauf, daß Reaktionen über eine Diels-Alder-artige Cycloaddition als Zwischenschritt verlaufen.^[7, 8] Bei unseren Untersuchungen haben wir uns auf die

[*] Prof. Dr. J. F. Sanz-Cervera
Departamento de Química Orgánica
Universidad de Valencia
E-46100 Burjassot, Valencia (Spanien)
Fax: (+349) 963864328
E-mail: Juan.F.Sanz@uv.es

Prof. Dr. R. M. Williams, E. M. Stocking
Department of Chemistry, Colorado State University
Fort Collins, CO 80523 (USA)
Fax: (+1) 970-491-5610
E-mail: rmw@chem.colostate.edu

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (Forschungsmittel für R.M.W., Nr. CA 70375, sowie Shared Instrumentation Grant Nr. GM49631 für die Massenspektrometer) und der Dirección General de Investigación Científica y Técnica des spanischen Ministeriums für Erziehung und Wissenschaft (Forschungsmittel für J.F.S.-C., Nr. PB95-1089) gefördert. Die NMR-Spektren wurden von Dr. Clifford J. Unkefer (Los Alamos Stable Isotope Resource) auf einem Bruker-AMX-500-MHz-Spektrometer aufgenommen. Die Autoren danken Professor Rodney Croteau und Professor J. Alberto Marco für hilfreiche Diskussionen.

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