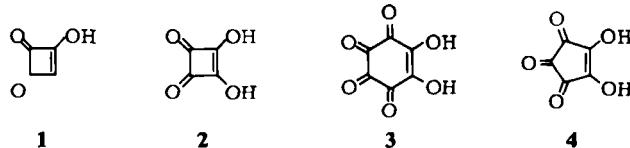


Biosynthese von Moniliformin, einem Toxin aus Schimmelpilzen mit Cyclobutendion-Struktur**

Von Burchard Franck* und Gerhard Breipohl

Das Mycotoxin Moniliformin **1**^[1] wird in hohen Konzentrationen^[2] von den Maisschimmelpilzen *Fusarium moniliforme* und *Gibberella fujikuroi* gebildet. Durch stark toxische Wirkung^[3], hohe Acidität ($pK_a=0.88$ ^[4]) und Verwandtschaft mit Quadratsäure **2** ist **1** von besonderer Bedeutung. Wir berichten nun über Inkorporationsversuche, die Aufschluß über die Biogenese von **1** geben.



Für die Biosynthese von **1** zogen wir drei Hypothesen in Betracht: 1) Cyclisierung und weitere Umwandlung von Erythrose **5**; 2) Kondensation von zwei Acetateinheiten über Malonyl-Coenzym A **8** zu 1,3-Cyclobutandion **9**, anschließende Oxidation zum tautomerisierenden Derivat **10a–10c** und Dehydratisierung; 3) Biosynthese aus Inositol **7** über Rhodizonsäure **3** und Croconsäure **4**^[5,6].

Zur Prüfung dieser Hypothesen wurden [1^{-14}C]Erythrose **5**, [2^{-14}C]Acetat **6** und [$U^{-14}\text{C}$]Inositol **7** an jeweils vier gut angewachsene Kulturen von *G. fujikuroi* (ATCC 12763) auf Mais-Festnährmedium (50 g Mais, 70 mL Wasser) appliziert. Nach 7–14 d wurde das Pilzmycel gefriergetrocknet und mit MeOH extrahiert. **1** wurde mit einem Anionenaustauscher (Dowex AG 1 X2) abgetrennt und als Natriumsalz-Dihydrat bis zur konstanten Radioaktivität aus Methanol umkristallisiert.

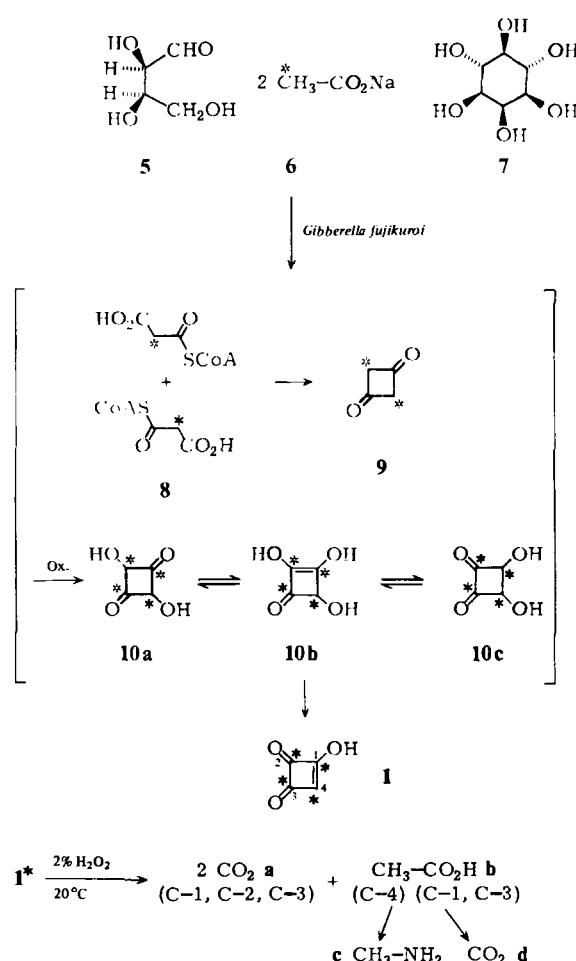
Tabelle 1. Inkorporationsversuche zur Biosynthese von Moniliformin **1**.

Vorstufe	Spez. Radioakt. [mCi/mmol]	Isoliertes 1 * [mg]	Spez. Radioakt. [nCi/mmol]	Spez. Einbaurate [%]
[1^{-14}C]Erythrose 5	0.667	18.5	263	0.039
[2^{-14}C]Acetat 6	0.146	145	514	0.180
[$U^{-14}\text{C}$]Inositol 7	278	75.2	8.36	$4.5 \cdot 10^{-6}$

Nach den Ergebnissen in Tabelle 1 können **5** und **7** als Biosynthesevorstufen von **1** ausgeschlossen werden. Ebenso gaben auch [$U^{-14}\text{C}$]Glucose, [$U^{-14}\text{C}$]Erythrit, [$U^{-14}\text{C}$]Asparagin, [$U^{-14}\text{C}$]Pyruvat, [$U^{-14}\text{C}$]Shikimisäure, [$\beta^{-14}\text{C}$]Zimtsäure, [$U^{-14}\text{C}$]Phenylalanin und [$\text{Methyl-}^{-14}\text{C}$]Methionin keine signifikante Inkorporation. Dagegen erweist sich [2^{-14}C]Acetat **6**, obwohl es in zahlreiche Stoffwechselbereiche aufgenommen wird, mit einer spezifischen Einbaurate von 0.18% als ein Vorläufer von **1**. In der großen Gruppe der durch Cyclisierung von Polyketiden gebildeten Naturstoffe ist **1** somit das erste Beispiel, das sich von einem Diketid $[\text{CH}_2(\text{CO}-\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}, n=1]$ ableitet.

[*] Prof. Dr. B. Franck, Dr. G. Breipohl
Organisch-chemisches Institut der Universität
Orléansring 23, D-4400 Münster

[**] 34. Mitteilung über Wirkstoffe aus Schimmelpilzen. Diese Arbeit wurde vom Minister für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen sowie vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. – Als 33. Mitteilung zählt: B. Franck, *Angew. Chem.* 96 (1984) 462; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 493. 32. Mitteilung: B. Franck, A. Stange, *Liebigs Ann. Chem.* 1981, 2106.



Schema 1. Vorstufen, Biosynthese und Abbau von Moniliformin **1**.

Zur Information über den *Biosyntheseverlauf* untersuchten wir die Isotopenverteilung des nach Verfütterung von **6** erhaltenen Moniliformins **1*** (Schema 1). H_2O_2 -Oxidation des mit inaktivem **1** auf 130 000 dpm/mmol^[7] verdünnten Moniliformins **1*** ergab neben CO_2 **a** aus C-1, C-2 und C-3 radioaktive Essigsäure **b**. Bei ihr stammt die Radioaktivität der Methylgruppe aus C-4 und die der Carboxygruppe zu gleichen Teilen aus C-1 und C-3. Die Radioaktivitätsverteilung (Tabelle 2) dieser Abbauprodukte sowie der durch chemischen Abbau der Essigsäure erhaltenen Produkte CO_2 **d** und Methylamin **c** entspricht einem Moniliformin, dessen Radioaktivität sich über alle C-Atome

Tabelle 2. Radioaktivitätsverteilung der Abbauprodukte von Moniliformin **1*** aus dem Biosyntheseversuch (vgl. Schema 1).

Produkt	Spez. Radioakt. [dpm/mmol]	Gef. [a]	Radioaktive C-Atome Ber. für 1*	Radioaktive C-Atome Ber. für 1
1*	130 000	2	2	2
CO_2 a	39 600	0.61	0.5	0.5
Essigsäure b	66 500	1.02	1.0	1.0
Methylamin c	32 000	0.49	0.5	1.0
CO_2 d	32 600	0.50	0.5	0

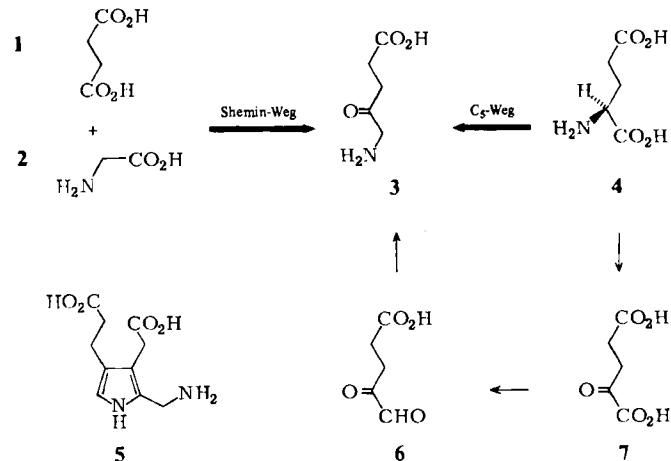
[a] Zur Ermittlung der gefundenen Anzahl radioaktiver C-Atome von **1*** wurden die spezifischen Radioaktivitäten der Abbauprodukte durch die von **1*** dividiert und mit 2 multipliziert.

und nicht nur über C-2 und C-4 verteilt. Demnach ist für die Biosynthese von 1 eine äquilibrierende Zwischenstufe 10a–10c mit vier Sauerstoff-Substituenten anzunehmen.

Wegen der uniformen Radioaktivitätsverteilung des nach Verfütterung von $[2-^{14}\text{C}]$ -Acetat erhaltenen Moniliformins 1* könnte eingewendet werden, daß die Acetateinheiten nicht direkt, sondern auf einem Umweg inkorporiert werden. In diesem Falle würde die spezifische Einbaurate jedoch weit unter der gefundenen (0.18%) liegen. Eine ähnliche Gleichverteilung der Radioaktivität beobachteten wir auch bei einer in Anlehnung an die Biosynthese durchgeföhrten Totalsynthese von 1* aus $[1-^{14}\text{C}]$ -Acetat^[8].

Eingegangen am 8. Juni 1984 [Z 870]

- [1] P. I. Cole, J. W. Kirksey, H. G. Culter, B. L. Doupnik, J. C. Peckham, *Science* 1979 (1973) 1324; J. P. Springer, J. Clardy, R. J. Cole, J. W. Kirksey, R. K. Hill, R. M. Carlson, J. L. Isidor, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 2267.
 [2] C. J. Rabie, W. F. O. Marasas, P. G. Thiel, A. Lübben, R. Vleggaar, *App. Environ. Microbiol.* 43 (1982) 517.
 [3] LD₅₀ (Hähnchen oral) 4 mg/kg, R. J. Cole, R. H. Cox: *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, Academic Press, New York 1981.
 [4] H.-D. Scharf, H. Frauenrath, W. Panske, *Chem. Ber.* 111 (1978) 168.
 [5] Da 3 und 4 durch mikrobiologische Oxidation von 7 gewonnen wurden, sind sie als Naturstoffe anzusehen. A. J. Klugver, T. Hof, A. G. J. Boenzaardt, *Enzymologia* 7 (1939) 257; *Chem. Abstr.* 34 (1940) 6322.
 [6] O. Gelormini, N. E. Arzt, *J. Am. Chem. Soc.* 52 (1930) 2483; A. W. Burgstahler, R. C. Barkhurst, *Trans. Kans. Acad. Sci.* 71 (1968) 150.
 [7] 7 dpm bedeutet Zerfälle pro Minute („decompositions per minute“).
 [8] A. Löbberding, Dissertation, Universität Münster 1983.



2) Ausschluß der Möglichkeit, daß ein Einbau von 4 durch dessen Abbau zu 1 vorgetäuscht wird: Verwendung von $[1-^{14}\text{C}]$ -L-Glutaminsäure 4*, deren Markierung bei Decarboxylierung zu 1 aufgehoben würde.

3) Nachweis, daß 4 direkt inkorporiert wird: Bestimmung der Markierungspositionen im Biosyntheseprodukt Häm 8 durch chemischen Abbau.

Jeweils 75 mL hämolysiertes Entenblut^[4] wurden mit 1 μmol der radioaktiven Vorstufen 24 h inkubiert; das anschließend isolierte Häm 9 wurde durch Umkristallisieren bis zur konstanten Radioaktivität gereinigt. In Tabelle 1 sind die aus zahlreichen Ansätzen ermittelten Meßergeb-

Häm-Biosynthese aus L-Glutaminsäure**

Von Burchard Franck*, Manfred Bruse und Jürgen Dahmer

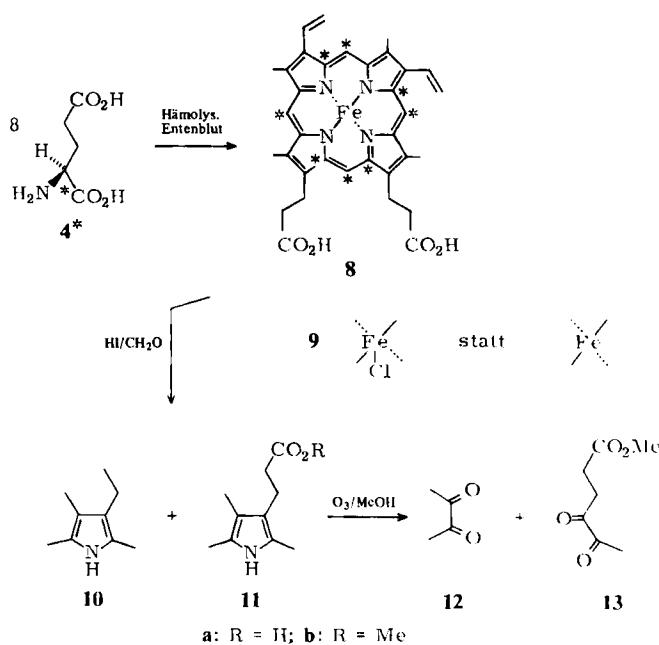
Lehrbücher der Chemie und Biochemie geben an, daß der rote Blutfarbstoff Häm 8 in den höheren Organismen aus Bernsteinsäure 1 und Glycin 2 synthetisiert wird, 1 und 2 bilden zunächst 5-Aminolävulinsäure 3, von der zwei Moleküle zum Häm-Baustein Porphobilinogen 5 kondensieren^[1]. Alternativ zu diesem *Shemin-Weg*^[2] entsteht in Pflanzen die zum Aufbau der Chlorophylle in großer Menge gebrauchte 5-Aminolävulinsäure 3 hauptsächlich auf einem *C₅-Weg* aus L-Glutaminsäure 4^[3] über 2-Oxoglutaräure 7 und 4,5-Dioxovaleriansäure 6. Wir berichten nun über Inkorporationsversuche, die zeigen, daß auch in tierischen Organismen der *C₅-Weg* in erheblichem Ausmaß an der Häm-Biosynthese beteiligt ist.

Für diese Versuche verwendeten wir das Enzymsystem aus Entenblut^[4] (mit dem auch die Häm-Biosynthese nach dem Shemin-Weg nachgewiesen worden war). Dabei waren drei wichtige Voraussetzungen zu erfüllen:

1) Reproduzierbarkeit: Die Inkorporationsversuche mit hämolysiertem Entenblut^[4] wurden unter systematischer Variation von Jahreszeit der Entnahme, Konzentration und Inkubationszeit während drei Jahren mehrfach wiederholt.

Tabelle 1. Vergleichende Inkorporationsversuche zur Biosynthese des roten Blutfarbstoffs Häm 8.

Vorstufe	Vorstufe		Isoliertes Häm 9	
	Menge [μmol]	Gesamt- radioakt. [μCi]	Gesamt- radioakt. [nCi]	Absolute Einbaurate [5] [%] $\times 10^3$
$[2-^{14}\text{C}]$ -Glycin 2	0.96	50	14.7	29.5
$[1,4-^{14}\text{C}]$ -Bernsteinsäure 1	0.86	100	8.04	8.04
$[1-^{14}\text{C}]$ -L-Glutaminsäure 4*	1.01	50	3.74	7.49



[*] Prof. Dr. B. Franck, Dr. M. Bruse, Dipl.-Chem. J. Dahmer
Organisch-chemisches Institut der Universität
Orléansring 23, D-4400 Münster

[**] Tetrapyrrol-Biosynthese. 17. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. – Als 16. Mitteilung zählt [1]. 15. Mitteilung: B. Franck, W. Bock, U. Wolters, *Angew. Chem.* 94 (1982) 226; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 215.