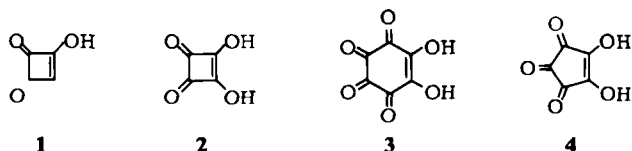


Biosynthese von Moniliformin, einem Toxin aus Schimmelpilzen mit Cyclobutendion-Struktur**

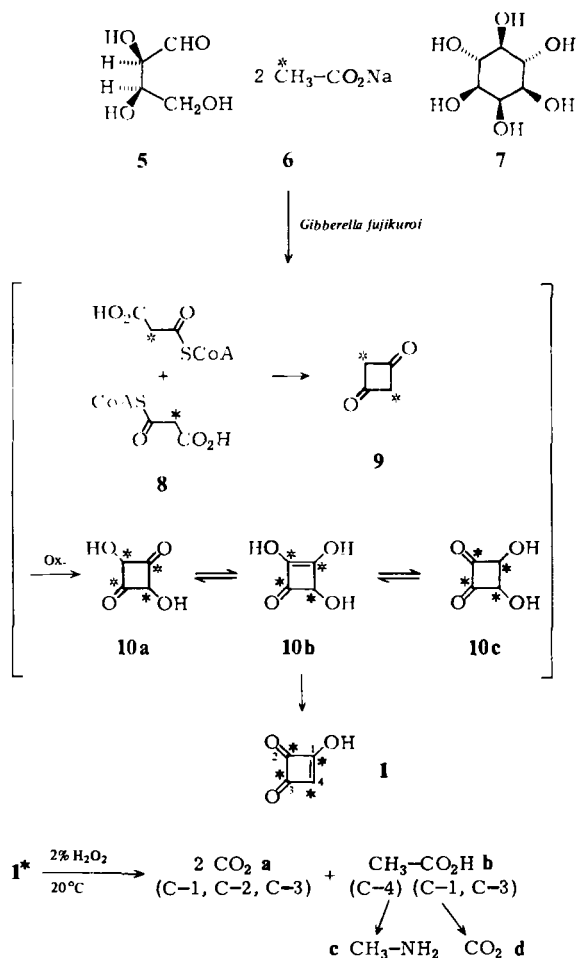
Von Burchard Franck* und Gerhard Breipohl

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 **8** zu 1,3-Cyclobutandion **9**, anschließende Oxidation zum tautomerisierenden Derivat **10a**–**10c** und Dehydratisierung; 3) Biosynthese aus Inosit **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 [$U-^{14}C$]Inosit **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.



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

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

Vorstufe	Spez. Radioakt. [mCi/mmol]	Isoliertes 1 * Menge [mg]	Spez. Radioakt. [nCi/mmol]	Spez. Einbaurrate [%]
[$1-^{14}C$]Erythrose 5	0.667	18.5	263	0.039
[$2-^{14}C$]Acetat 6	0.146	145	514	0.180
[$U-^{14}C$]Inosit 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 [$U-^{14}C$]Glucose, [$U-^{14}C$]Erythrit, [$U-^{14}C$]Asparagin, [$U-^{14}C$]Pyruvat, [$U-^{14}C$]Shikimisäure, [$\beta-^{14}C$]Zimtsäure, [$U-^{14}C$]Phenylalanin und [Methyl- ^{14}C]Methionin keine signifikante Inkorporation. Dagegen erweist sich [$2-^{14}C$]Acetat **6**, obwohl es in zahlreiche Stoffwechselbereiche aufgenommen wird, mit einer spezifischen Einbaurrate 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 [$CH_2(CO-CH_2)_nCO_2H$, $n=1$] 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.

Zur Information über den Biosyntheseverlauf untersuchen wir die Isotopenverteilung des nach Verfütterung von **6** erhaltenen Moniliformins **1*** (Schema 1). H_2O_2 -Oxidation des mit inaktivem **1** auf 130000 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 *	130000	2	2	2
CO_2 a	39600	0.61	0.5	0.5
Essigsäure b	66500	1.02	1.0	1.0
Methylamin c	32000	0.49	0.5	1.0
CO_2 d	32600	0.50	0.5	0

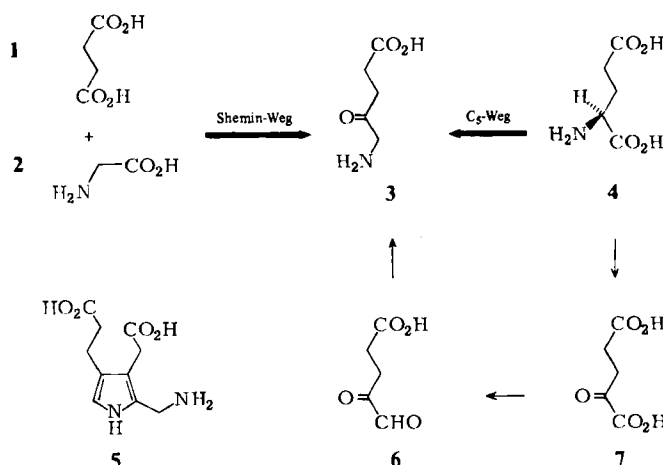
[a] Zur Ermittlung der gefundenen Anzahl radioaktiver C-Atome von **1*** wurden die spezifischen Radioaktivitäten der Abbauprodukte durch die von **1*** dividiert und mit 2 multipliziert.

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 durchgeführten 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. Pinske, *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. Boezaardt, *Enzymologia* 7 (1939) 257; *Chem. Abstr.* 34 (1940) 6322.
 [6] O. Gelormini, N. E. Artz, *J. Am. Chem. Soc.* 52 (1930) 2483; A. W. Burgstahler, R. C. Barkhurst, *Trans. Kans. Acad. Sci.* 71 (1968) 150.
 [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 Hämin **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-Oxoglutarinsäure **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:

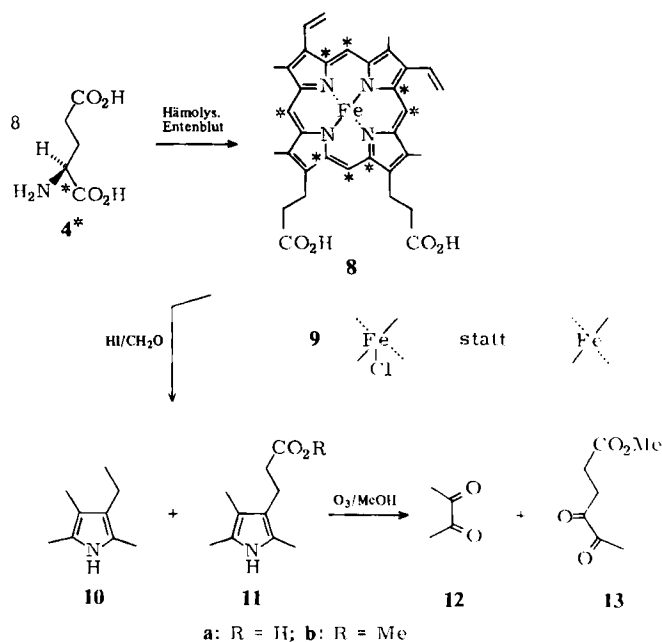
1) *Reproduzierbarkeit:* Die Inkorporationsversuche mit hämolysiertem Entenblut^[4] wurden unter systematischer Variation von Jahreszeit der Entnahme, Konzentration und Inkubationszeit während drei Jahren mehrfach wiederholt.

[*] 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.

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] [%] × 10 ³
$[2-^{14}\text{C}]$ Glycin 2	0.96	50	14.7	29.5
$[1,4-^{14}\text{C}_2]$ Bernsteinsäure 1	0.86	100	8.04	8.04
$[1-^{14}\text{C}]$ L-Glutaminsäure 4*	1.01	50	3.74	7.49



a: R = H; b: R = Me