

Untersuchungen zur Biosynthese von Antibiotica

Von Heinz G. Floss* und John M. Beale

Die Feinheiten der chemischen Synthesen, die von lebenden Zellen beim Aufbau komplexer organischer Naturstoffe ausgeführt werden, lassen sich durch Markierung mit stabilen Isotopen in Verbindung mit hochentwickelten 2D- und Mehrquanten-NMR-Analysenmethoden detailliert untersuchen. Mechanistische Einzelheiten werden durch Aufklärung der „kryptischen“ Stereochemie biosynthetischer Reaktionen mit Hilfe stereospezifischer Isotopenmarkierung enthüllt. Die Analyse blockierter Mutanten und das Klonieren von Biosynthesegenen bieten neue Möglichkeiten für die Untersuchung von Biosynthesewegen und für die Ausnutzung der chemischen Fähigkeiten lebender Organismen.

1. Einleitung

Lebende Zellen vermögen eine verwirrende Vielfalt organischer Verbindungen zu synthetisieren. Viele davon sind in lebenden Organismen ubiquitär oder weitverbreitet und für den „Lebensablauf“ der Zellen essentiell. Diese Stoffe werden oft „Primärmetaboliten“ genannt; sie bilden das Gerüst und die funktionellen, energieerzeugenden sowie informationstragenden Verbindungen der lebenden Zellen oder sind am Aufbau dieser Verbindungen beteiligt. In der Natur kommen aber auch viele andere organische Verbindungen vor, die von einer beschränkten Anzahl von Organismen produziert werden, manchmal nur von wenigen Spezies. Diese Stoffe werden oft „Sekundärmetaboliten“ genannt, ein Ausdruck, der leider manche Biochemiker dazu verleitet hat, sie für Verbindungen von zweitrangiger Bedeutung zu halten. Einige dieser Verbindungen erfüllen subtile und spezialisierte Aufgaben beim Überleben eines Organismus in seiner Umwelt, oft bei der Kommunikation mit anderen Organismen, der Erhaltung von symbiotischen Beziehungen oder bei der Abwehr von Feinden oder Konkurrenten. Für die Mehrzahl dieser Verbindungen ist aber (bisher) keine spezifische Funktion bekannt. Viele dieser Naturstoffe sind für den Menschen nützlich, zum Beispiel als Arzneimittel (Antibiotica, Alkaloide) und als Aromastoffe oder Färbemittel; andere können schädlich sein, wie Toxine, Giftstoffe oder Reizmittel.

Die Strukturen organischer Naturstoffe reichen von äußerst einfach bis hochkompliziert. Beispiele sind Ameisensäure, der Abwehr- und Schutzstoff gewisser Ameisen und Nesseln, und Boromycin 1 (Abb. 1)^[1,2], ein Bor-haltiges Antibioticum, das von *Streptomyces antibioticus* produziert wird und fünfundvierzig Kohlenstoffatome sowie sechzehn Chiralitätszentren enthält. Die präparative Leistungsfähigkeit lebender Zellen war eine Herausforderung für Generationen von Organikern; der Wunsch, im Laboratorium einen Teil der von der Natur durchgeführten chemischen Reaktionen nachzuvollziehen, wirkte als eine der Hauptantriebskräfte für die Entwicklung neuer Synthesemethoden. Die Naturstoffsynthesen der lebenden Zellen erscheinen noch bemerkenswerter, wenn man die Randbedingungen berücksichtigt: Alle Reaktionen müssen bei

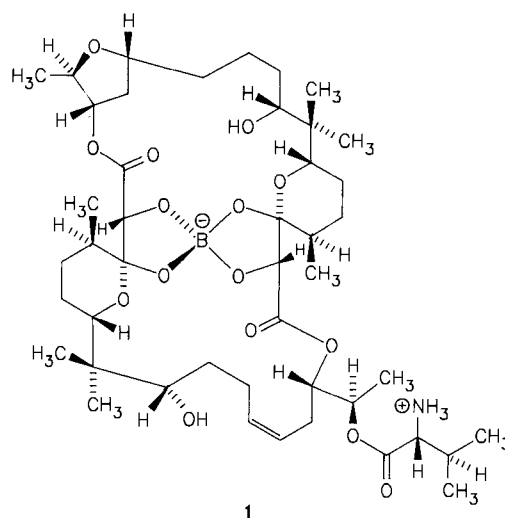


Abb. 1. Boromycin 1.

Raumtemperatur, in neutraler Lösung, unter Normaldruck und in wässrigem Milieu stattfinden! Der Wunsch, die Geheimnisse dieser Chemie zu enträtseln, hat viele Bioorganiker motiviert, die Biosynthese solcher Naturstoffe zu untersuchen. Außer zu neuen Konzepten für die chemische Totalsynthese komplexer organischer Verbindungen (biomimetische Chemie) können die Erkenntnisse aus solchen Biosynthese-Untersuchungen zu verbesserten Methoden für die Produktion kommerziell wertvoller Naturstoffe führen. Diese Untersuchungen können Wege aufzeigen, um in die Bildung von Naturstoffen einzugreifen, die für den Menschen schädlich sind, und sie können die strukturelle Abwandlung von Naturstoffen ermöglichen. Ein Beispiel ist die Umsteuerung der biosynthetischen Maschinerie in die Produktion von Analoga der normalen Naturstoffe aus Analoga der biosynthetischen Vorläufer oder Zwischenprodukte, ein anderes der Austausch genetischer Informationen zwischen verschiedenen Organismen. Biosynthesestudien an Naturstoffen liefern jedoch, neben solchen Anwendungsmöglichkeiten, grundlegendes Wissen, das uns zu verstehen hilft, wie lebende Organismen sich zu hochspezialisierten Synthesechemikern entwickelt haben und wie die Produkte dieser Synthesen der Erhaltung eines Organismus dienen und seine Position in einem speziellen Ökosystem verbessern.

[*] Prof. Dr. H. G. Floss, Prof. Dr. J. M. Beale
Department of Chemistry, University of Washington
Seattle, WA 98195 (USA)

2. Methodik von Biosynthesestudien

Die Biosynthese von Naturstoffen wird mit einer Fülle unterschiedlicher Methoden untersucht^[3]. Die Mehrzahl besteht in der Fütterung eines intakten Organismus mit verschiedenartig isotoopenmarkierten Vorläufern oder Zwischenprodukten, um die Rolle der getesteten Verbindung in der Biosynthese zu etablieren. Solche Untersuchungen können durch Experimente mit zellfreien Systemen oder, letztendlich, gereinigten Enzymen ergänzt oder ausgebaut werden. Eine Alternative zur Untersuchung biosynthetischer Fragen besteht in der Anwendung blockierter Mutanten und, in neuerer Zeit, dem Klonieren von biosynthetischen und regulatorischen Genen.

In einem klassischen Tracerexperiment^[4] wird der hypothetische Vorläufer oder das vermutete Zwischenprodukt mit einem radioaktiven Isotop markiert, z. B. ^{14}C oder Tritium, und dem biologischen System, das den zu untersuchenden Metaboliten produziert, zugesetzt. Wie nahe die Verwandtschaft zwischen Vorläufer und Produkt ist, wird durch Bestimmung der Einbaurate, der spezifischen Einbaurate oder des Verdünnungsfaktors abgeschätzt. Außer wenn die Werte sehr niedrig (unter 0.01% Einbau) oder sehr hoch (über 10% Einbau) sind, ist es oft schwierig, eindeutige Schlußfolgerungen aus diesen Zahlen allein zu ziehen. Daher muß nach solchen Experimenten normalerweise der markierte Metabolit abgebaut werden, um festzustellen, ob sich die Radioaktivität spezifisch in der erwarteten Position befindet^[5]. Eine Alternative ist die Markierung des Vorläufers in weit voneinander entfernten Positionen mit zwei radioaktiven Isotopen, z. B. ^{14}C und Tritium; dadurch läßt sich bestimmen, ob das Verhältnis der beiden Isotopen während der Stoffwechselumwandlung konstant bleibt. Durch Mehrfachmarkierung mit zwei radioaktiven Isotopen kann auch untersucht werden, ob bestimmte Wasserstoffatome ihre Position relativ zum Grundgerüst des Moleküls bei der Umwandlung eines Vorläufers in ein Produkt beibehalten. Solche Fragen können heute jedoch einfacher und/oder schlüssiger durch Markierung mit stabilen Isotopen und anschließende Analyse des Produkts durch Massenspektrometrie oder NMR-Spektroskopie beantwortet werden. Der überragende Vorteil von Experimenten mit radioaktiven Tracern ist ihre große Empfindlichkeit; das macht sie zur Methode der Wahl in all den Fällen, in denen sich der Metabolit sehr langsam bildet, z. B. in vielen Experimenten mit intakten höheren Pflanzen, oder in denen die Menge des produzierten Metaboliten sehr gering ist, z. B. in Untersuchungen zur Biosynthese vieler Vitamine, Cofaktoren, Hormone oder Pheromone. In modernen Arbeiten zur Naturstoff-Biosynthese dienen Untersuchungen mit radioaktiven Tracern jedoch vor allem als Vorstufe zu Fütterungsexperimenten mit stabilen Isotopen.

Die Markierung mit stabilen Isotopen in Verbindung mit der Massenspektrometrie und besonders der Hochfeld-NMR-Spektroskopie hat sich zu einem der besten Werkzeuge der Forschung über die Naturstoff-Biosynthese entwickelt^[6]. Der enorme Vorteil besteht darin, daß die Analysenmethode nicht nur die An- oder Abwesenheit der Isotope anzeigt, sondern auch ihre Verteilung im Molekül und zwischen einzelnen Molekülen einer Population. Somit kann den Produkten eines solchen Markierungsexperi-

ments potentiell mit hochentwickelten spektroskopischen Techniken eine große Fülle an Informationen über den Stoffwechsel entnommen werden. Die Markierung eines Vorläufers mit einem einzelnen stabilen Isotop, z. B. ^{13}C , in einer einzigen Position des Moleküls ermöglicht es, das Schicksal dieses markierten Atoms in einer Stoffwechselreaktionskette zu verfolgen: Es gibt sich im Produkt durch erhöhte Intensität seines (seiner) ^{13}C -NMR-Signals (Signale) zu erkennen. Das Schicksal von Bindungen kann ermittelt werden, indem man die beiden miteinander verbundenen Atome mit zwei stabilen Isotopen markiert, z. B. mit zwei ^{13}C -Atomen, so daß das ^{13}C -NMR-Signal jedes Kohlenstoffatoms durch Kopplung mit dem benachbarten ^{13}C -Kern zu einem Dublett aufgespalten wird. Der zugegebene Vorläufer wird durch unmarkiertes Material verdünnt, das entweder endogen aus den verfügbaren Nährstoffen synthetisiert oder zusammen mit der markierten Substanz zugesetzt wird. Sollte nun die betrachtete Bindung gespalten und wieder geschlossen werden, so ist die Wahrscheinlichkeit der Wiederverknüpfung der beiden Isotopen im selben Molekül sehr klein. Daher geht die Kopplung zwischen den beiden Kernen verloren. Eine Retention der Kopplung im Endprodukt zeigt an, daß die beiden Kerne aus demselben Molekül stammen müssen, was sehr stark vermuten läßt, daß die Bindung zwischen ihnen niemals gespalten wurde.

Die Markierung mit mehreren stabilen Isotopen, die zuerst von *Seto et al.*^[7] und *Battersby et al.*^[8] in Biosynthese-Untersuchungen eingeführt wurde, kann auch zur Unterscheidung intra- und intermolekularer Prozesse bei Gruppenübertragungen und Umlagerungen genutzt werden. In relativ einfachen Fällen lassen sich intra- und intermolekulare Markierung durch Massenspektrometrie unterscheiden; bei komplexeren Verbindungen ist normalerweise die NMR-Spektroskopie die Methode der Wahl. Eine intramolekulare Doppelmarkierung mit zwei magnetisch aktiven Isotopen kann durch Kopplungsanalyse nachgewiesen werden; ein Nachweis ist auch möglich, wenn ein Isotop magnetisch aktiv ist und das andere eine Isotopenverschiebung auf das NMR-Signal des ersteren ausübt. Auf diese Weise läßt sich die Anwesenheit von Deuterium durch eine α - oder β -Deuterium-Isotopenverschiebung eines ^{13}C -NMR-Signals^[9] und die Anwesenheit von ^{18}O durch einen (kleineren) α - ^{18}O -Effekt erkennen^[10]. Mit diesen Techniken ist die Retention von spezifischen Sauerstoff-, Wasserstoff- oder Stickstoffatomen relativ zum Kohlenstoffgerüst des Vorläufermoleküls eindeutig zu bestimmen.

Schlüsselvorläufer wie Glucose^[11,12] oder Glycerin^[13], uniform mit ^{13}C markiert (90–99% Anreicherung in jedem C-Atom), können in solchen Fällen genutzt werden, in denen nicht aus der Struktur oder einfachen spezifischen Fütterungsexperimenten klar hervorgeht, welcher (welche) Stoffwechselweg(e) an der Bildung eines Metaboliten beteiligt ist (sind). Die detaillierte Kopplungsanalyse des Produktes eines solchen Fütterungsexperiments zeigt, welche Kohlenstoffanordnungen im Produkt intakt aus dem Vorläufermolekül übernommen wurden. Da die verschiedenen Wege des Primärstoffwechsels zu vorhersagbaren Kopplungsmustern führen, kann die Beteiligung bestimmter Stoffwechselrouten, z. B. Shikimisäureweg, Pentosephosphat-Shunt, Citronensäurecyclus, an einer Biosynthese abgeleitet werden. Solche Experimente erfordern,

besonders bei Anwendung auf komplexe Moleküle, die detaillierte Analyse der oft sehr komplizierten Kopplungsmuster (zweiter Ordnung und/oder überlappend), wobei umfassender Gebrauch moderner 2D- und Mehrquanten-NMR-Techniken notwendig wird. Der Reichtum der aus solchen Experimenten erhaltenen Stoffwechsellinformationen ist dabei der Feinheit der angewendeten NMR-Methodik weitgehend proportional. Daher ist es keine Überraschung, daß viele der neuesten NMR-Techniken schnell für biosynthetische Experimente genutzt oder modifiziert wurden, z. B. INADEQUATE^[14,15], Tripelquanten-INADEQUATE^[16], COSY^[17] und 2D-heteronucleare Korrelation^[18]. 2D-NMR-Techniken wurden auch für die stereochemische Analyse stereospezifisch Deuterium-markierter Naturstoffe adaptiert, wie Arbeiten von *Vederas* et al.^[19] sowie *Gould* et al.^[20] zeigten.

Sind einmal die wesentlichen Bausteine eines Naturstoffs identifiziert, wenden sich die Untersuchungen oft einer detaillierteren Analyse der biosynthetischen Reaktionssequenz und der mechanistischen Aspekte biosynthetischer Transformationen zu. Die Analyse der Stereochemie solcher Transformationen liefert oft mechanistische Informationen, ermöglicht eine Unterscheidung alternativer Biosynthesewege oder bringt manchmal Beweise für oder gegen die Beteiligung eines bestimmten Enzyms^[21]. Da die Mehrheit der biochemischen Reaktionen an Zentren, normalerweise Kohlenstoffatomen, stattfindet, die a priori nicht chiral sind, beruhen solche Untersuchungen gewöhnlich auf der Synthese stereospezifisch isotopenmarkierter Substrate und der Verfolgung ihres Schicksals in der biosynthetischen Reaktionssequenz. Wiederum kann das in solchen Untersuchungen verwendete Isotop radioaktiv sein, z. B. Tritium, oder stabil, z. B. Deuterium.

Weitere detaillierte Informationen erhält man aus Untersuchungen mit zellfreien Rohextrakten oder mit spezifischen gereinigten Enzymen. Selbst ein zellfreier Rohextrakt hat Vorteile gegenüber ganzen Zellen, da man einigermaßen sicher sein kann, daß der zugegebene Vorläufer den Ort der Synthese erreichen wird. In einem Experiment mit ganzen Zellen kann der Nicht-Einbau der zugegebenen Verbindung von Permeabilitätsbarrieren herrühren, die ihre Aufnahme in die Zellen verhindern. Letztlich liefern Studien mit gereinigten Enzymen eindeutige mechanistische Informationen über spezifische Reaktionsschritte. Sie können auch besondere Aspekte der Regulation eines Biosyntheseweges erhellen. Man muß sich jedoch klarmachen, daß Studien auf enzymatischem Niveau recht schwierig und arbeitsintensiv sein können; daher werden viele biosynthetische Untersuchungen nicht bis zu dieser Stufe vorangetrieben.

Eine grundsätzlich andere Methodik für Biosynthesestudien besteht in der Anwendung genetischer Techniken. Die Herstellung von Mutanten, die in der Synthese des zu untersuchenden Metaboliten blockiert sind, in Verbindung mit einem Test für Cosynthese, in-vivo- oder in-vitro-Komplementation, kann die Mindestzahl der an der Biosynthese beteiligten Schritte aufzeigen. Durch chemische Analyse dieser Mutanten lassen sich die Strukturen von Zwischenprodukten aufklären, so daß schließlich ein detaillierter Biosyntheseweg aufgestellt werden kann. Diese Möglichkeit wurde vielfach genutzt, um die Routen des Primärstoffwechsels aufzuklären. Ihre Anwendung auf die

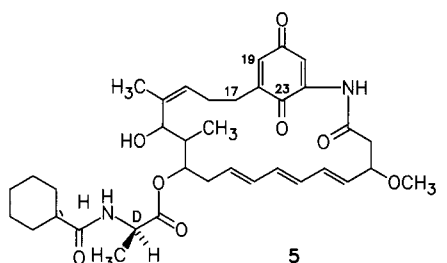
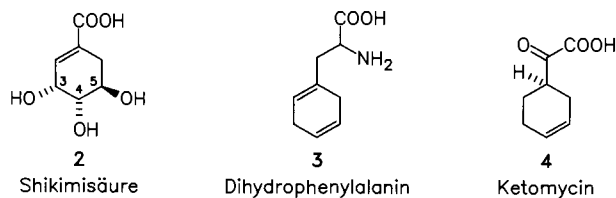
Untersuchung des Sekundärstoffwechsels ist schwieriger, da sich der Verlust der biosynthetischen Fähigkeit in diesem Fall nicht durch eine Wachstumsstörung zu erkennen gibt. Somit ist die Selektion der blockierten Mutanten schwieriger, da üblicherweise eine große Anzahl von Kolonien auf einige identifizierbare Marker analysiert werden muß, z. B. Verlust eines Pigments oder Verlust der antibiotischen Aktivität. Trotzdem wurde diese Methode erfolgreich auf die Untersuchung der Biosynthese von Naturstoffen, besonders Antibiotica, angewendet^[22–24]. Mit der weiteren Entwicklung von Systemen für die genetische Manipulation von Organismen, die Sekundärmetabolite produzieren, zeichnet sich nun der Einfluß moderner Methoden der Molekularbiologie auf solche Biosynthesestudien ab. Es wurden schon eine Anzahl von Genen für die Antibiotica-Biosynthese – auch für einige vollständige Biosynthesewege^[25] – kloniert, und einige dieser Gene wurden auch bereits sequenziert. Diese Gene können nun dazu dienen, die Regulation und die genetische Kontrolle von Antibiotica-Biosynthesen zu untersuchen, Biosynthesegene aus anderen Organismen zu isolieren^[26] und durch Gentechnologie neue Organismen zu konstruieren, die neue Hybrid-Antibiotica produzieren^[27,28]. In den nächsten Jahren wird die Anwendung genetischer Methoden für Untersuchungen der Naturstoff-Biosynthese wahrscheinlich drastisch zunehmen. Diese Methoden, besonders in Kombination mit den traditionellen chemischen und biochemischen Methoden, dürften sich als äußerst wirkungsvoll erweisen.

Im folgenden werden wir einige dieser Methoden und Strategien für die Untersuchung der Biosynthese von Naturstoffen aufzeigen. Wir werden einige Projekte diskutieren, die in unserem Laboratorium auf dem Gebiet der Antibiotica-Biosynthese durchgeführt wurden oder derzeit bearbeitet werden.

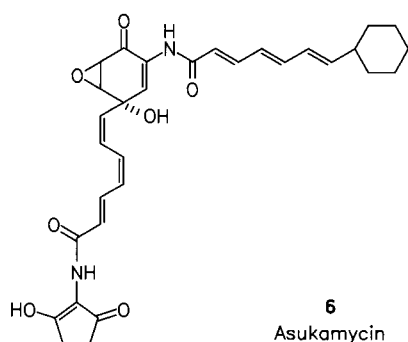
3. Hydroaromatische Verbindungen – Bildung von Cyclohexanringen

Mehrere Antibiotica enthalten partiell oder vollständig reduzierte Benzolringe, die offenbar auf dem Shikimisäureweg entstehen (siehe 2 in Abb. 2). Dabei stellt sich die Frage, wie ein Stoffwechselweg, dessen Funktion die Produktion aromatischer Systeme ist, in die Erzeugung hydroaromatischer Systeme umgesteuert werden kann. Um Informationen über die Bildungsweise dieser Ringsysteme zu erhalten, haben wir mehrere Beispiele (siehe Abb. 2) untersucht, u. a. Dihydrophenylalanin 3 mit nichtkonjugiertem Cyclohexadiensystem^[29] und Ketomycin 4, das einen Cyclohexenring enthält^[30].

Cyclohexanringe findet man in zwei Antibiotica, in Ansatrienin (Mycotrienin) 5, das aus *Streptomyces collinus*^[31–33] und *S. rishiriensis*^[34–36] isoliert wurde, und in dem aus *S. nodosus* var. *asukaensis* stammenden Asukamycin 6^[37,38] (Abb. 2). Über Shikimisäure 2 gebildete Cyclohexanringe wurden auch in den ω -Cyclohexylfettsäuren von thermophilen und anderen Bakterien^[39–42] gefunden, z. B. ω -Cyclohexylundecansäure 12 (vgl. Abb. 4). In Ansatrienin 5 liegt der Cyclohexanring als Cyclohexancarbonsäure vor, die über einen D-Alaninrest an den makrocyclischen Lactamring gebunden ist, während sich der Cyclohexanring in Asukamycin 6 sowie in den ω -Cyclohexylfettsäuren am



Ansatrienin A = Mycotrienin I



Asukamycin

Abb. 2. Shikimisäure 2 und einige ihrer hydroaromatischen Metaboliten.

Ende einer Kohlenwasserstoffkette befindet. Es ist wahrscheinlich, daß in den beiden letztgenannten Fällen der Cyclohexanring aus Cyclohexancarbonsäure entstanden ist, die in Form ihres CoA-Esters als Startereinheit für eine Polyketidkette dient. Der experimentelle Befund stützt diese Ansicht sowohl für die ω -Cyclohexylfettsäuren als auch für Asukamycin. Zum Beispiel bestätigen Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markiertem Acetat und Malonat deutlich die Polyketid-Herkunft der beiden olefinischen Kohlenwasserstoffketten in Asukamycin 6^[43]. Cyclohexan-[carboxy- ^{14}C]carbonsäure wurde sowohl in Asukamycin 6^[43] als auch in Ansatrienin 5^[44] eingebaut; der Abbau von markiertem 5 zeigte, daß die Markierung im wesentlichen auf die Cyclohexancarbonyleinheit beschränkt war. Weitere Untersuchungen ergaben, daß die Cyclohexanringe in 5 und 6 auf dem Shikimisäureweg entstanden sind, allerdings nicht durch Reduktion eines Benzolringes (kein Einbau von markiertem Phenylalanin und markierter Benzoesäure)^[43, 44]. Der Abbau von biosynthetisch aus [U- ^{14}C]-Shikimisäure gewonnenem Ansatrienin 5 zeigte, daß alle sieben Kohlenstoffatome des Vorläufers eingebaut werden und die sieben Kohlenstoffatome der Cyclohexancarbonsäure bilden (Abb. 3). In Einklang mit diesem Befund wurde markiertes 3 kaum eingebaut^[44].

Um weitere Informationen über die Schritte von Shikimisäure 2 zu Cyclohexancarbonsäure zu erhalten, haben wir begonnen, diese Sequenz rückwärts zu verfolgen. Guter Einbau der 1,4-Cyclohexadien[carboxy- ^{14}C]carbonsäure 8 in Ansatrienin 5^[44] und Asukamycin 6^[43] deutete eine

Umwandlung von 2 in dieses nichtkonjugierte Dien an, gefolgt von stufenweiser Reduktion der beiden CC-Doppelbindungen. Dieser Schluß wurde jedoch in Frage gestellt durch die Beobachtung, daß 2,5-Cyclohexadien[carboxy- ^{14}C]carbonsäure 7 in beide Antibiotica vergleichbar gut eingebaut wird. Offensichtlich haben *Streptomyces*-Arten die Fähigkeit, CC-Doppelbindungen etwas unspezifisch zu reduzieren. Die Annahme einer 1,4-Dien-Zwischenstufe wie 8 wurde jedoch durch die Entdeckung erhärtet, daß Ansatrienin A 5 in der Fermentation von 2–3% eines Analogons begleitet wird, das anstelle der Cyclohexancarbonsäure eine 1-Cyclohexencarbonsäure-Einheit (9) enthält^[44]. Die letzten Schritte in der Reaktionssequenz von Shikimisäure 2 zur Cyclohexylcarbonyl-Einheit von Ansatrienin 5 können daher wie in Abbildung 3 gezeigt beschrieben werden.

Fütterungsexperimente mit ^{15}N -markiertem D- und L-Alanin ergaben, daß das D-Isomer der direktere Vorläufer der D-Alanineinheit im Antibioticum 5 ist. Es wurde auch gefolgert, daß der Einbau der Cyclohexancarbonsäure 10 in 5 durch schrittweise Verknüpfung des Makrocyclus mit Alanin und dann mit der Säureeinheit erfolgt und nicht über eine vorherige Bildung von Cyclohexylcarbonylalanin 11. Diese Verbindung, mit ^{13}C und ^{15}N in der Amidbindung markiert, wurde nicht intakt, sondern nur in die Komponenten zerlegt eingebaut^[44].

Die Biosynthese von Cyclohexancarbonsäure wirft die Frage nach der Stereochemie der Umwandlung von Zwischenstufen im Shikimisäureweg auf, d. h. nach der kryptischen Stereochemie der Bildung des symmetrischen Cyclohexanringes. Dieses Problem wurde von der Okuda-Gruppe in Tokio und von uns bearbeitet. In beiden Laboratorien wurde dasselbe Prinzip angewendet: asymmetrische Markierung der Cyclohexancarbonsäure-Einheit durch einen Vorläufer mit einem stabilen Isotop, Umwandlung in ein Derivat mit einer chiralen Hilfsgruppe und anschließende NMR-Analyse. Bei ihren Arbeiten über die Biosynthese von ω -Cyclohexylundecansäure 12 (Abb.

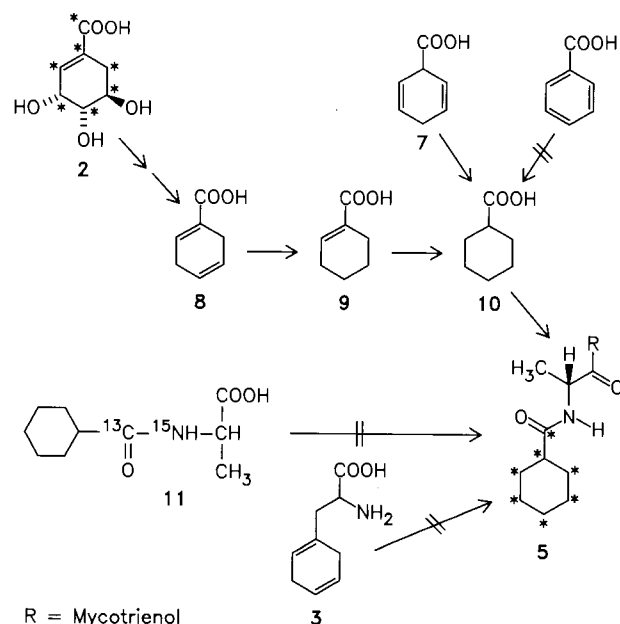


Abb. 3. Bildung der N-(Cyclohexylcarbonyl)alanin-Einheit von Ansatrienin 5 (Mycotrienin) aus Shikimisäure 2.

4) verfütterte die *Okuda*-Gruppe D-[6-²H₂]Glucose an *Curtobacterium pusillum*^[45]. Die resultierende Fettsäure wurde durch mikrobielle Oxidation mit *Candida tropicalis* zur Cyclohexancarbonsäure **10** abgebaut, die mit Phenyllithium zum Cyclohexylphenylketon **13** derivatisiert wurde. Die asymmetrische Reduktion mit (–)-*N*-Methylephedrin/*N*-Ethylanilin-LiAlH₄ ergab (*S*)-α-Cyclohexylbenzylalkohol **14**. Die NMR-Untersuchung von **14** in Gegenwart eines Lanthanoid-Verschiebungsreagens ermöglichte die Bestimmung der Deuterium-Verteilung zwischen den Wasserstoffatomen an C-2 und C-6 und auch zwischen den äquatorialen und axialen Wasserstoffatomen an jeder dieser Positionen. Die Ergebnisse der Untersuchung bewiesen, daß der axiale Wasserstoff an C-2 (wie von den Autoren definiert und in Abb. 7 gezeigt) die bevorzugte Markierungsstelle mit 66% Deuterium-Anreicherung war. Die beiden Wasserstoffatome an C-6 und das andere Wasserstoffatom an C-2 enthielten jeweils 5% Deuterium; von den verbleibenden Positionen war jede zu weniger als 2% markiert. Die Autoren interpretieren dieses Resultat als Hinweis darauf, daß die CC-Doppelbindung der Shikimisäure durch *syn*-Addition des Wasserstoffs von der *Re-Re*-Seite reduziert wird. Bei dieser Interpretation wurde die Annahme gemacht, daß Shikimisäure **2** hauptsächlich an C-2 markiert war.

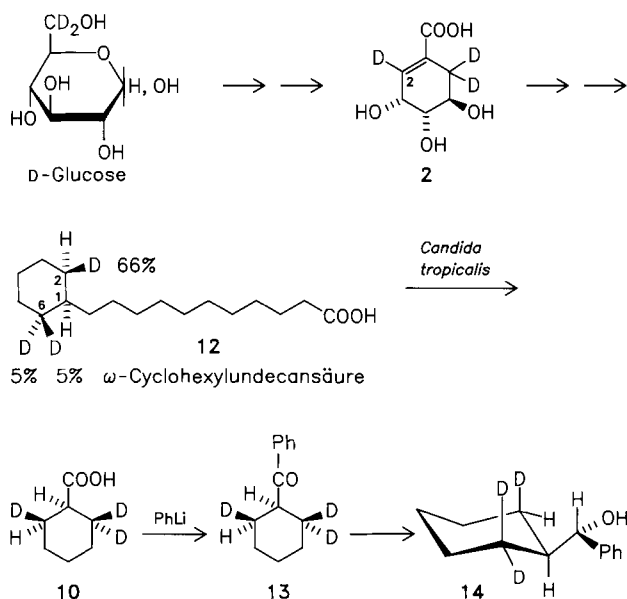


Abb. 4. Stereochemische Analyse der Bildung des Cyclohexanrings bei der Biosynthese von ω-Cyclohexylundecansäure **12** [45].

Für unsere Versuche^[46] synthetisierten wir zunächst eine Probe [2-¹³C]Shikimisäure nach dem Verfahren von Fleet et al.^[47] Ausgehend von 10 g D-[1-¹³C]Mannose wurde optisch aktive D-(–)-[2-¹³C]Shikimisäure in 17–18% Ausbeute erhalten. Eine Probe dieses Materials wurde an *S. collinus* verfüttert; das resultierende Ansatrienin **5** zeigte eine einzige Markierung im Cyclohexanring. Es wurde zum Cyclohexylmethanol **15** abgebaut, das dann mit (*S*)-Mandelsäure zum Ester **16** umgesetzt wurde (Abb. 5). Das ¹³C-NMR-Spektrum dieses Derivats zeigte eine Verschiebungsdifferenz von Δδ = 0.05 ppm zwischen den Signalen für C-2 und C-6 des Cyclohexanringes, von denen nur eines angereichert war. Eine eindeutige Zuordnung dieser ¹³C-NMR-Signale und auch der entsprechenden ¹H-

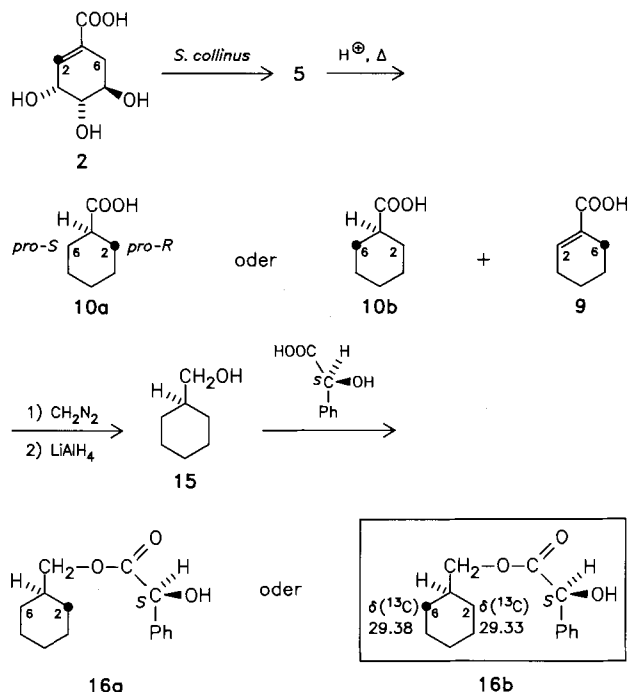


Abb. 5. Stereochemische Analyse der Bildung von Cyclohexancarbonsäure **10** bei der Biosynthese von Ansatrienin **5** [46]. Eingeraht ist der tatsächlich erhaltene Ester **16b**.

NMR-Signale wurde durch Synthese einer authentischen Probe von (1*R*,2*R*)-[2-²H]Cyclohexylmethanol **15** auf dem in Abbildung 6 gezeigten Weg erreicht. Die Analyse der

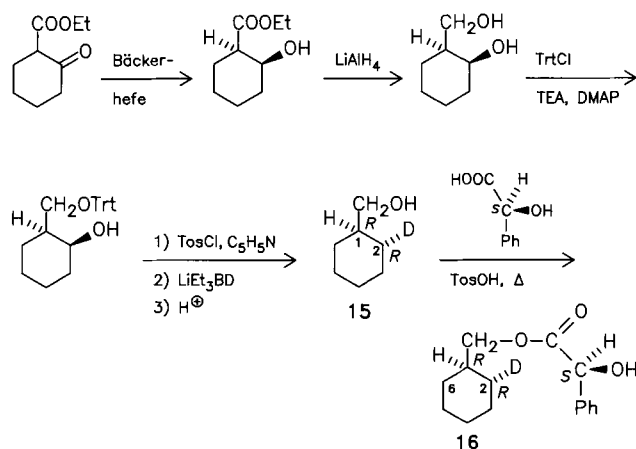


Abb. 6. Synthese von (1*R*,2*R*)-[2-³H]Cyclohexylmethanol **15** zur Bestimmung der Konfiguration seines (*S*)-Mandelsäureesters **16**. TEA = Triethylamin, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin.

(*R*)- und (*S*)-Mandelsäureester dieser Probe ergab, daß beim (*S*)-Mandelsäureester C-2 (*pro-R*-Kohlenstoffatom) bei höherem Feld und C-6 (*pro-S*-C-Atom) bei tieferem Feld erschien. Ein Deuterium-entkoppeltes 2D-(¹H, ¹³C)-Korrelationspektrum^[19] derselben Proben ermöglichte die Zuordnung der Protonen an diesen C-Atomen. Daraus wurde geschlossen, daß ¹³C in der biosynthetischen Probe ausschließlich die *pro-2S*-Position (C-6) markiert; demnach stimmt der sterische Verlauf der Umwandlung von Shikimisäure **2** in Cyclohexancarbonsäure **10** bei der Bildung von Ansatrienin **5** mit dem bei der Biosynthese der Cyclohexylfettsäuren wie **12** überein^[46]. Es wurde jedoch auch gefunden, daß der kleine Anteil an 1-Cyclohexancar-

bonsäure **9**, die als Begleitstoff der Cyclohexancarbonsäure **10** nach Hydrolyse dieser biosynthetischen Probe von **5** auftritt, die ^{13}C -Markierung nicht an C-2, sondern an C-6 (siehe **9**, Abb. 5) enthält. Somit ist der Vorgang komplexer als eine direkte *Re-Re*-Reduktion der CC-Doppelbindung von **2**. Nach dem Verfahren von Fleet et al.^[47] synthetisierten wir auch Proben von **2**, die an C-2 deuteriert und an C-6 stereoselektiv deuteriert waren, und verfütterten sie an *S. collinus*^[48]. Das Deuterium von C-2 wurde sehr gut eingebaut und nimmt die (axiale) 2*R*-Position in der resultierenden Cyclohexancarbonsäure ein, was mit den Ergebnissen von Furukawa et al. übereinstimmt^[45].

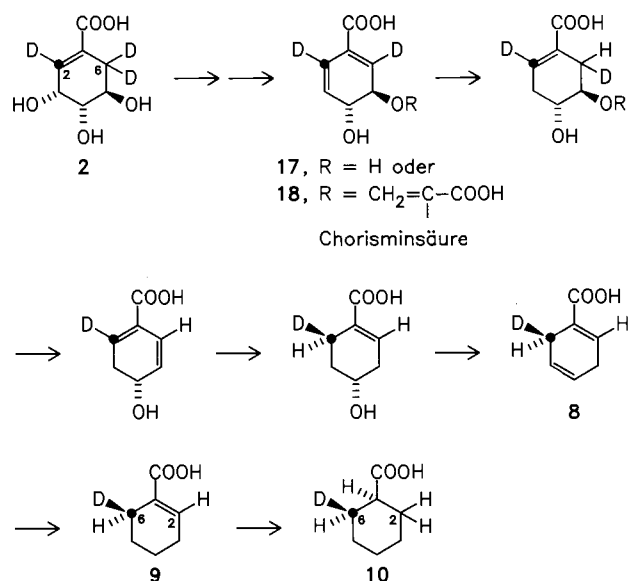


Abb. 7. Hypothetischer Biosyntheseweg zur Cyclohexancarbonsäure-Einheit von Ansatrienin **5**.

Es wurde jedoch kein Deuterium aus der 6-Position von **2** eingebaut; daher muß die Reaktion zwei Schritte der Wasserstoffabspaltung von C-6 umfassen. Abbildung 7 zeigt einen hypothetischen Biosyntheseweg, der mit diesen Ergebnissen in Einklang ist.

4. Bildung von Zuckerkomponenten von Antibiotica

4.1. 2,6-Didesoxyhexosen

2,6-Didesoxyhexosen werden als Zuckerkomponenten einer Vielzahl von Antibiotica gefunden. Zwei Beispiele sind Chlorothricin **20** (vgl. auch Abb. 12)^[49–53] und Granaticin **19** (vgl. auch Abb. 28)^[54–60]. Chlorothricin ist ein ungewöhnliches Makrolid (siehe Abschnitt 5.1), das zwei glycosidisch gebundene 2-Desoxy-D-rhamnoseeinheiten **22** enthält, wobei an eine dieser Einheiten eine modifizierte 6-Methylsalicylsäure geknüpft ist. Granaticin, ein Mitglied der Benzoisochromanchinon-Familie (siehe Abschnitt 7), enthält die Didesoxyhexose **21**, die – recht ungewöhnlich – mit dem aromatischen Aglycon doppelt verknüpft ist. In beiden Fällen ließ sich die Herkunft der Desoxyhexose leicht auf Glucose zurückführen.

Fütterungsversuche mit $[3,4-^{14}\text{C}, 1-^3\text{H}]$ - und $[3,4-^{14}\text{C}, 2-^3\text{H}]$ Glucose an *S. violaceoruber* ergaben Granaticin **19** ohne Verringerung des $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisses^[61], was auf intakten Einbau der Glucose und Retention von sowohl H-

1 als auch H-2 in diesem Prozeß hinweist. Im Gegensatz dazu wurden H-3 und H-5 bei der Umwandlung eliminiert; dies ließ sich mit entsprechend doppelt markierten Glucoseproben zeigen. Tritium von C-6 der Glucose wird in Granaticin eingebaut, und zwar befinden sich 80% in einer oder beiden C-Methylgruppen. Bemerkenswerterweise wird auch Tritium von C-4 der Glucose sehr gut eingebaut, und zwar wiederum fast ausschließlich in eine oder beide C-Methylgruppen, wie durch Wiedergewinnung von 90% des Tritiums in der durch Kuhn-Roth-Oxidation erhaltenen Essigsäure bewiesen wurde. Diese beiden Resultate zusammengenommen lassen kaum einen Zweifel daran, daß das intakte Glucosemolekül, mit Ausnahme von H-3 und H-5, die Desoxyhexoseeinheit **21** von Granaticin **19** bildet (Abb. 8). Bei dieser Umwandlung werden die Sauerstofffunktionen von C-6 und C-2 der Glucose entfernt, und H-4 wandert an C-6 des Zuckers.

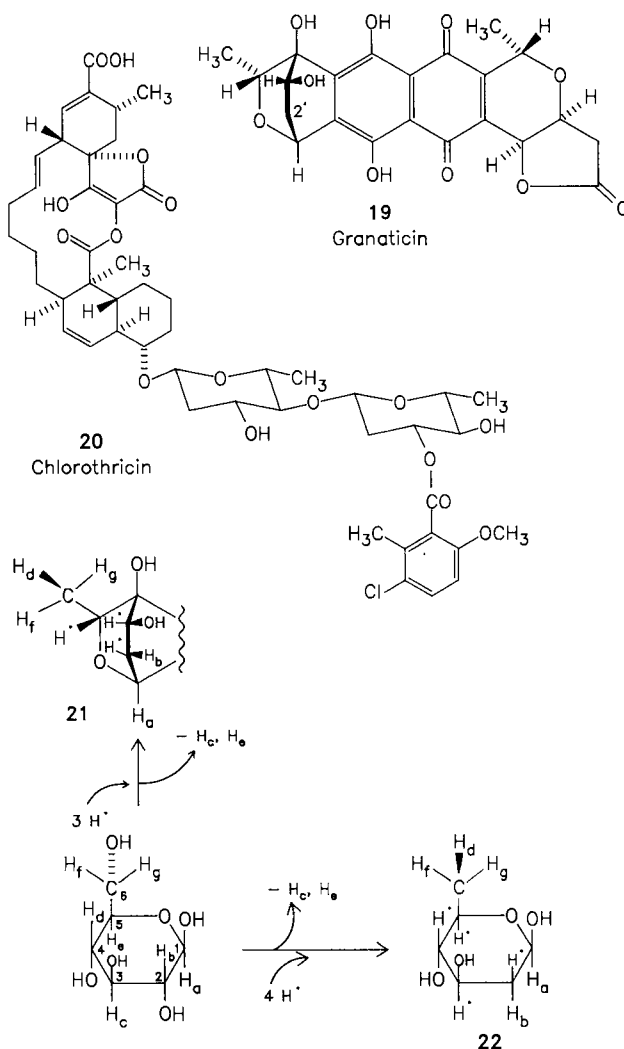


Abb. 8. Schicksal der Glucosewasserstoffatome während der Umwandlung in die 2,6-Didesoxyhexose-Einheiten **21** und **22** von Granaticin **19** bzw. Chlorothricin **20**.

Analoge Resultate brachte die Untersuchung der Bildung der beiden Desoxyhexose-Einheiten **22** von Chlorothricin **20**. Die ersten Experimente mit radioaktiven Tracern^[62] hatten beträchtlichen Einbau von ^{14}C -markierter D-Glucose in **20** gezeigt: Ungefähr 30–35% der gesamten Radioaktivität des Antibiotiums befanden sich in den beiden Zuckern. Später^[63] wurde Glucose, die an C-6 mit ^{14}C und

in verschiedenen Positionen mit Tritium markiert war, an *S. antibioticus* verfüttert. Das erhaltene Chlorothricin wurde durch Methanolyse und alkalische Hydrolyse zu Methyl-2-desoxy- α -D-rhamnosid^[49] abgebaut, das auf Veränderungen des $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisses relativ zum Vorläufer untersucht wurde. Es ergab sich vollständige Retention der Wasserstoffatome in Position 2 und 6 und überwiegende Retention des Wasserstoffatoms an C-1 (67%) (Abb. 8). Die Wasserstoffatome an C-3 und C-5 wurden fast völlig ausgebaut. Ungefähr ein Drittel des Tritiums von C-4 der Glucose blieb im Produkt erhalten; eine Kuhn-Roth-Oxidation zeigte jedoch, daß es sich nicht an C-4, sondern an C-6 des Desoxyzuckers **22** befand.

Der Verlust von H-5 der Hexose und die Hydrid-Wanderung von H-4 nach C-6 sind typisch für die von TDP-Glucose-Oxidoreduktase katalysierte Reaktion^[64]: die Umwandlung von TDP-D-Glucose in TDP-4-Oxo-6-desoxy-D-glucose. Um die Beteiligung dieses Enzyms am ersten Schritt der Transformation des Glucosegerüsts in das der 2,6-Didesoxyhexosen weiter zu untersuchen, haben wir den sterischen Verlauf der Wasserstoffübertragung von C-4 nach C-6 der Hexose-Einheit aufgeklärt.

Wir hatten früher den sterischen Verlauf dieser Reaktion mit einem partiell gereinigten Enzym aus *E. coli* bestimmt, wobei als Substrat eine Mischung aus nichtmarkierter TDP-Glucose und (6*R*)- oder (6*S*)-TDP-D-[4- ^2H ,6- ^3H]Glucose benutzt wurde^[65]. Der Vorläufer war in einer Weise markiert, daß jedes tritiierte Molekül auch Deuterium enthielt. Falls die Wanderung des Deuteriums von C-4 nach C-6 intramolekular verläuft, wird eine chirale Methylgruppe an C-6 gebildet werden, und falls dieser Prozeß stereospezifisch ist, wird vorwiegend oder ausschließlich ein Enantiomer dieser chiralen Methylgruppe resultieren. Zunächst wurde die resultierende TDP-4-Oxo-6-desoxyglucose durch Kuhn-Roth-Oxidation abgebaut. Eine Chiralitätsanalyse der Essigsäure, die aus C-6 und C-5 des Zuckers stammte (nach der Methode von Cornforth et al.^[66] sowie Arigoni et al.^[67] mit einer von uns modifizierten Vorschrift^[68]), schloß sich an. Diese Analyse zeigte, daß die Methylgruppe in der Tat chiral war. Aus dem Vorläufer mit 6*S*-Konfiguration wurde vorwiegend eine Methylgruppe mit *R*-Konfiguration und aus dem 6*R*-Isomer vorwiegend eine *S*-Methylgruppe gebildet^[65]; dies zeigt, daß H-4 die 6-Hydroxygruppe unter Konfigurationsumkehr ersetzt (Abb. 8).

Die stereochemischen Ergebnisse über die TDP-Glucose-Oxidoreduktase-Reaktion ermöglichten es, ein plausibles Modell für die Vorgänge im aktiven Zentrum des Enzyms während des katalytischen Prozesses vorzuschlagen (Abb. 9). Die Kohlenhydrat-Einheit muß in einer Konformation gebunden sein, in der H-5 und die 6-Hydroxygruppe zueinander *syn*-orientiert sind. Eine Art „Sandwich-Anordnung“ des Kohlenhydratrings und des Pyridin-Nucleotid-Cofaktors, in der die Kohlenstoffatome 4 beider Einheiten übereinander liegen, ermöglicht die Übertragung von H-4 an C-6 über das Pyridin-Nucleotid mit einem Minimum an Bewegung. An dieser Reaktion sind zwei protonenübertragende Basen beteiligt – eine nahe der 4-Hydroxygruppe und eine nahe H-5 und der 6-Hydroxygruppe.

Ein intramolekularer Reaktionsablauf und eine Wanderung von H-4 mit derselben Stereochemie wurde für die

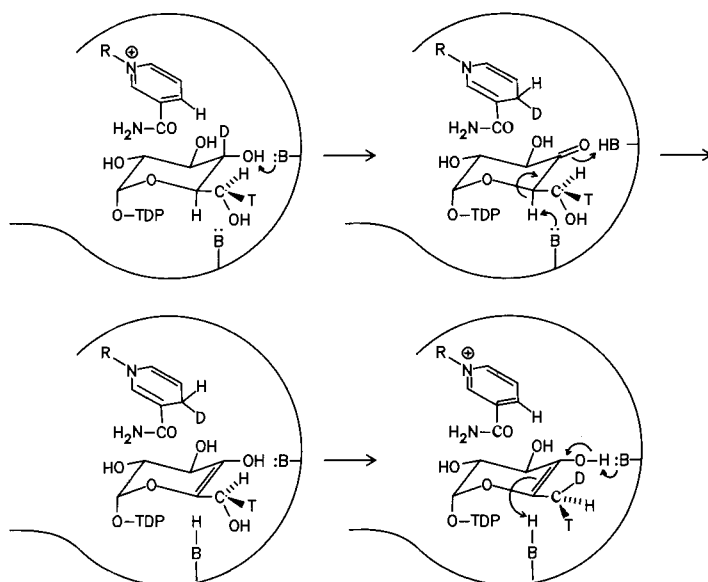


Abb. 9. Vorgeschlagener stereochemischer Mechanismus der TDP-Glucose-Oxidoreduktase-Reaktion [61, 65].

Bildung der Methylgruppe in den 2-Desoxy- α -D-rhamnosid-Einheiten **22** von Chlorothricin **20**^[63] und im Desoxyhexoseteil **21** von Granaticin **19**^[61] gezeigt (vgl. Abb. 8). In diesem Fall wurden (6*R*)- und (6*S*)-D-[6- ^{14}C ,4- ^2H ,6- ^3H]Glucose an Kulturen von *S. antibioticus* bzw. *S. violaceoruber* verfüttert. Chlorothricin **20** wurde zu Methyl-2-desoxy- α -D-rhamnosid abgebaut, das dann nach Kuhn und Roth oxidiert wurde, um die Methylgruppe und das benachbarte C-Atom als Essigsäure für die Chiralitätsanalyse zu isolieren; Granaticin **19** wurde dagegen direkt der Kuhn-Roth-Oxidation unterworfen. Die Ergebnisse lassen wenig Zweifel an der Rolle der TDP-Glucose-Oxidoreduktase als Schlüsselenzym bei der Bildung der Desoxyhexose-Einheiten von **19** und **20**. Wir haben seitdem TDP-Glucose-Oxidoreduktase in zellfreien Extrakten beider Organismen nachgewiesen und gezeigt, daß die Enzymaktivität während der Wachstumsphase gering ist und mit dem Beginn der Antibiotica-Produktionsphase drastisch ansteigt^[69].

Während die Routen zu den beiden 2,6-Didesoxyhexose-Einheiten **21** und **22** in allen bisher untersuchten Merkmalen übereinstimmen, fanden wir einen Unterschied im sterischen Verlauf des Ersatzes der 2-Hydroxygruppe der Glucose durch Wasserstoff. Dies wurde durch Verfütterung von D-[2- ^2H]Glucose an *S. antibioticus* und *S. violaceoruber* gezeigt. Wiederum wurde das resultierende Chlorothricin zu Methyl-2-desoxy- α -D-rhamnosid abgebaut, das dann durch Deuterium-NMR-Spektroskopie analysiert wurde. Das einzige Signal erschien bei der chemischen Verschiebung des äquatorialen Wasserstoffs an C-2. Demnach nimmt Deuterium die H_R -Position an C-2 ein, und der Ersatz der 2-Hydroxygruppe von Glucose durch Wasserstoff verläuft unter Inversion der Konfiguration an C-2^[70] (vgl. Abb. 8). Das resultierende Granaticin wurde ^1H -NMR-spektroskopisch untersucht, und man fand, daß es ausschließlich in der *pro*-2'*S*-Position deuteriert war. Somit nimmt der neu eingeführte Wasserstoff die *pro*-2'*R*-Position ein, d. h. er hat den Sauerstoff von C-2 der Glucose unter Konfigurationserhaltung ersetzt^[61] (Abb. 8). Es

scheint daher, daß die 2,6-Didesoxyhexosen **21** und **22** auf verschiedenen Wegen entstehen, die sich in der Stereochemie und daher vielleicht auch im Mechanismus unterscheiden.

4.2. Spectinomycin und die Stereochemie der Inosit-1-phosphat-Synthase-Reaktion

Da wir in (6*R*)- und (6*S*)-[4-²H,6-³H]Glucose **23** einen recht aufwendig markierten Vorläufer zur Verfügung hatten, der speziell zur Untersuchung der Stereochemie und des Mechanismus der TDP-Glucose-Oxidoreduktase-Reaktion entwickelt worden war, beschlossen wir, die Bildung eines weiteren Antibiotikums, Spectinomycin **24** (Abb. 10), zu untersuchen^[71,72]. Dieses ungewöhnliche Aminoglycosid, ein Metabolit mehrerer *Streptomyces*-Arten^[73,74], hemmt die Proteinsynthese auf der ribosomalen Stufe durch selektive Hemmung der Initiation^[75]. Die Verbindung wird klinisch zur Behandlung der Gonorrhöe und in der Tiermedizin benutzt.

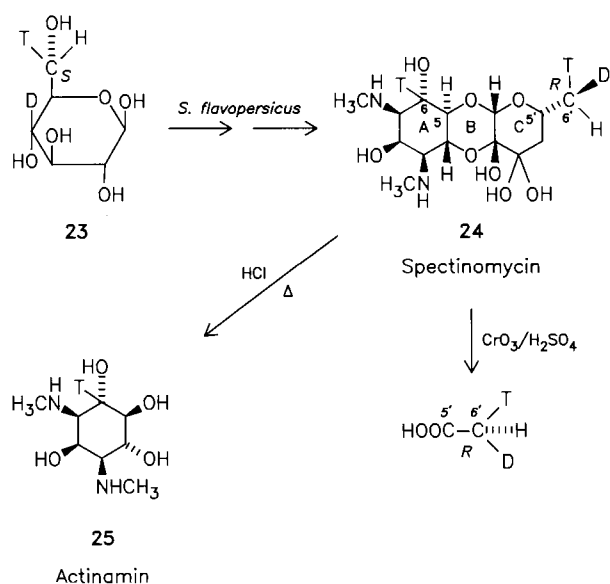


Abb. 10. Biosynthese und chemischer Abbau von Spectinomycin **24**.

Spectinomycin wurde als Zielmolekül gewählt, da es, wie bereits früher gezeigt wurde, aus zwei Molekülen Glucose entsteht^[76,77], die beide stereochemische Veränderungen an C-6 erfahren. Ein Molekül Glucose bildet Ring C des Antibiotikums, eine 4,6-Didesoxyhexose-Einheit, während das andere zu *myo*-Inosit cyclisiert wird, der danach in die Actinamin-Einheit (**25**) von Ring A überführt wird. Bei der letzteren Umwandlung bilden C-1 und C-6 der Glucose schließlich C-5 bzw. C-6 von Spectinomycin **24**^[77,78].

Ein hoher Grad an Tritium-Einbau von C-4 der Glucose in die 6'-Methylgruppe von **24** legt ebenfalls eine Beteiligung der TDP-Glucose-Oxidoreduktase-Reaktion an der Bildung der 4,6-Didesoxyhexose-Einheit dieses Antibiotikums nahe^[78]. Fütterungsversuche mit (6*R*)- und (6*S*)-[6-¹⁴C,4-²H,6-³H]Glucose und anschließende Kuhn-Roth-Oxidation von **24** zeigten dann, daß wie in allen anderen untersuchten Fällen die Oxidoreduktase-Reaktion von einer intramolekularen Übertragung von H-4 an C-6 beglei-

tet wird, wobei die 6-Hydroxygruppe unter Konfigurationsumkehr durch Wasserstoff ersetzt wird (Abb. 10).

Der Abbau eines anderen Aliquots der Proben von **24** aus diesen beiden Fütterungsversuchen zeigte, daß die Actinamin-Einheit dieses Antibiotikums unter vorwiegender Retention des *pro*-6*S*-Wasserstoffs und Verlust des *pro*-6*R*-Wasserstoffs der Glucose gebildet wird (Abb. 10). Dieses Ergebnis war überraschend; Kirkwood et al. hatten die Stereochemie der Cyclisierung von Glucose-6-phosphat **26** zu *myo*-Inosit-1-phosphat **29** (mit Enzymen aus Hoden und Milchdrüsen von Ratten) bereits früher untersucht^[79] und berichtet, daß die Reaktion unter Verlust des *pro*-*S*-Wasserstoffs verläuft. Da *myo*-Inosit als Vorläufer der Actinamineinheit von Spectinomycin gesichert ist, läßt diese Beobachtung vermuten, daß entweder die früheren Ergebnisse unrichtig sind oder die *myo*-Inosit-Synthase-Reaktion nicht in allen Organismen mit der gleichen Stereochemie verläuft. In Zusammenarbeit mit Drs. Frank und Mary Loewus von der Washington State University untersuchten wir daher den sterischen Verlauf der durch Enzyme aus Rinderhoden und Pollen von *Lilium longiflorum* katalysierten *myo*-Inosit-Synthase-Reaktion^[80]. Es wurde gefunden, daß die Cyclisierung in beiden Fällen mit derselben Stereochemie wie bei der Spectinomycin-Biosynthese in *Streptomyces flavopersicus* verläuft, d.h. unter vorwiegendem Verlust des *pro*-*R*- und vorwiegender Retention des *pro*-*S*-Wasserstoffs. Die beobachtete Stereochemie ist in Einklang mit der mechanistischen Klassifizierung dieses Enzyms als Aldolase^[81] und der allgemeinen Stereochemie, die für enzymatische Aldolkondensationen nachgewiesen wurde^[82]. Auf der Grundlage dieser stereochemischen Re-

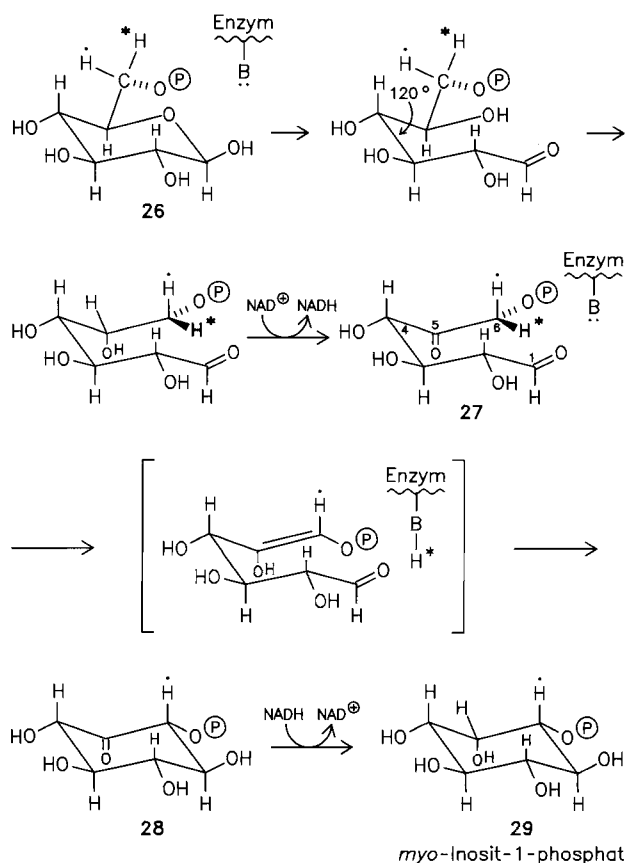


Abb. 11. Vorgeschlagener stereochemischer Mechanismus der *myo*-Inosit-1-phosphat-Synthase-Reaktion [80].

sultate haben wir einen Mechanismus für die *myo*-Inositol-1-phosphat-Synthase-Reaktion vorgeschlagen: Eine einzige basische Gruppe im Enzym, in Nachbarschaft zu C-1 und O-5 (im Substrat) und C-6 (im Produkt) gelegen, katalysiert vier aufeinanderfolgende Protonenübertragungen (Abb. 11). Die erste dieser Reaktionen ist die Abstraktion eines Wasserstoffatoms von der 1-OH-Gruppe, das anschließend auf O-5 übertragen wird, was die Ringöffnung des Hemiacetals Glucose-6-phosphat **26** einleitet. Nachfolgende Dehydrierung an C-5 zu einem Keton **27** und Rotation um die C-4/C-5-Achse bringt C-6 in die Nähe von C-1. Wie die Betrachtung von Molekülmodellen zeigt, ist diese konformationelle Reorientierung ohne Ablösung des Substrats von seinen wesentlichen Bindungsstellen am Enzym dann möglich, wenn das Substrat in einer Konformation gebunden ist, die den Phosphor der Phosphatgruppe in eine Verlängerung der C-4/C-5-Achse plaziert. Die Abstraktion des *pro-R*-Wasserstoffatoms von C-6 durch dieselbe Base und nachfolgende Übertragung dieses Wasserstoffatoms auf die Carbonylgruppe an C-1 ist die Vorbereitung für die Aldolkondensation unter Bildung der C-6/C-1-Bindung in **28**. Die Reduktion der Carbonylgruppe vervollständigt die Sequenz. Dieser Mechanismus macht eine Voraussage: Das β -, nicht das α -Anomer von Glucose-6-phosphat **26** sollte bevorzugt als Substrat dienen. Die Richtigkeit dieser Voraussage wurde kürzlich von der *Sherman*-Gruppe gezeigt^[83].

5. Ungewöhnliche Makrolide

Streptomyceten produzieren außer den klassischen Makrolid-Antibiotika^[84], – Repräsentanten sind das 14gliedrige Makrolidlacton Tylosin und das 16gliedrige Erythromycin –, eine Anzahl „ungewöhnlicher“ Makrolide, die nicht der strukturellen Norm und daher vermutlich auch

nicht den Biosynthese-Mustern der klassischen Verbindungen entsprechen. Drei dieser Verbindungen, Chlorothricin **20**, Boromycin **1** und Aplasmomycin **31**, waren Gegenstand biosynthetischer Untersuchungen in unserem Laboratorium.

5.1. Chlorothricin

Chlorothricin **20** (Abb. 12) wurde aus Kulturen von *Streptomyces antibioticus*^[49] isoliert. Es ist ein Antibiotikum, das die durch Pyruvat-Carboxylase katalysierte anaplerotische CO₂-Fixierung hemmt^[85]. Zusätzliche Untersuchungen der Wirkungsweise haben auf eine Wechselwirkung zwischen Chlorothricin und den Membran-Phospholipiden von *Bacillus subtilis*^[86] hingewiesen. Der Wirkungsmechanismus von Chlorothricin unterscheidet sich deutlich von dem der anderen Makrolid-Antibiotica. Auch die Struktur erwies sich als recht andersartig^[50–53]. Das Aglycon von Chlorothricin (Chlorotricolid) ist ein neuartiges Makrolidringssystem, das eine *trans*-Octahydronaphthalin- und eine Tetronsäure-Einheit, spiroverknüpft mit einem Cyclohexenring, enthält.

Frühere Experimente mit radioaktiven Tracern in unserem und im Laboratorium von Professor *Pape* in Münster bewiesen deutlich den Einbau von Acetat sowohl in das Aglycon als auch in die Acylgruppe; dies ist in Einklang mit einem Polyketidsprung dieser beiden Strukturelemente^[62] (siehe Abb. 12). Die Verteilung der Markierung zwischen diesen beiden Einheiten wurde durch Methanolyse des Antibiotiums bestimmt^[49], die das Aglycon als Methyl ester ergab, außerdem Methyl-2-desoxy- α -D-rhamnosid mit und ohne Acylgruppe des Antibiotiums. Die Acylgruppe, aber nicht das Aglycon, wurde auch sehr gut durch die Methylgruppe von Methionin markiert. Das Aglycon ließ sich dagegen deutlich durch Propionat markieren, das ¹⁴C an C-1, C-2 oder C-3 enthielt^[62].

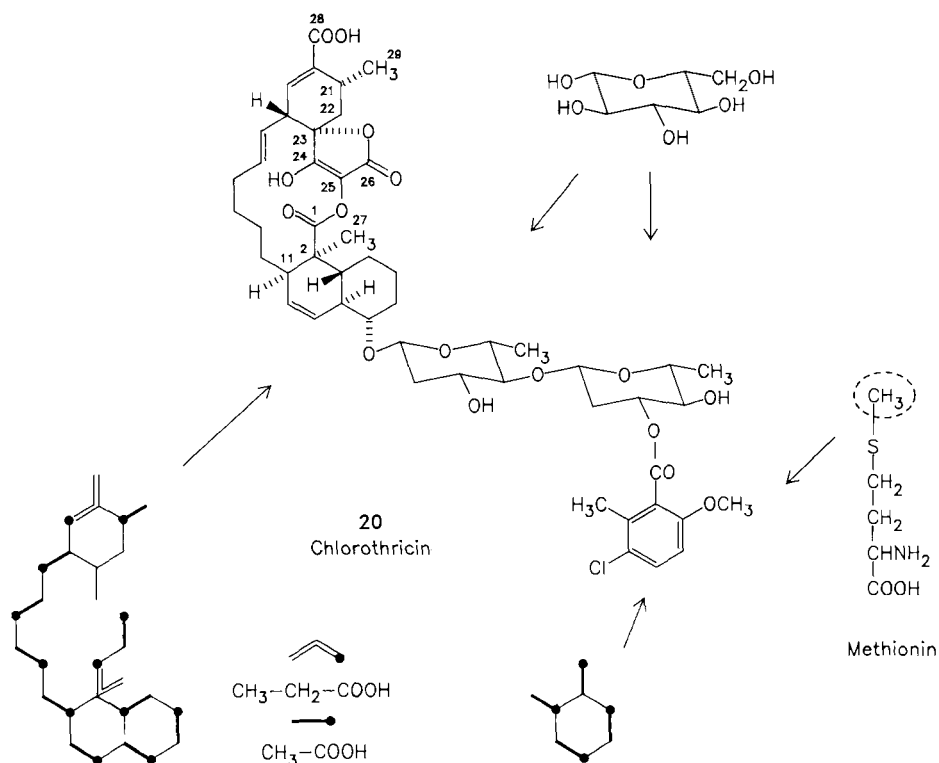


Abb. 12. Biosynthetischer Ursprung von Chlorothricin **20**.

Nach vollständiger Analyse der ^{13}C -NMR-Spektren von Chlorothricin^[87] wurden diese Untersuchungen durch Fütterungsversuche mit spezifisch ^{13}C -markierten Vorläufern fortgesetzt^[63]. Diese zeigten eindeutig die Entstehung der Acylgruppe aus vier Acetat-Einheiten und einer Methylgruppe von Methionin, die den Methoxykohlenstoff lieferte. Die Bildung dieses Molekülteils verläuft vermutlich über 6-Methylsalicylsäure, die durch Chlorierung und Methylierung modifiziert wird. Die neunundzwanzig Kohlenstoffatome des Aglycons repräsentieren zehn Acetat- und zwei Propionat-Einheiten, die ausgehend von einer Acetat-Einheit (C-29/C-21) in einer ununterbrochenen Kette angeordnet sind (Abb. 12). Die beiden Propionat-Einheiten besetzen Position 2 und 11 in der Kette, und in einer dieser Einheiten ist die verzweigende Methylgruppe zu einer Carboxygruppe (C-28) oxidiert worden.

Es war aus den anfänglichen Ergebnissen mit einfach markierten Acetatproben nicht offensichtlich, daß auch C-25 und C-26 von Acetat stammen. Chlorothricolid jedoch, das aus $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat gebildet wurde, zeigte Kopplungen zwischen den Signalen von C-25 und C-26 mit $^1J_{\text{C,C}} = 91.5 \text{ Hz}$ – typisch für Kohlenstoffatome einer Tetrone-Struktur. Demnach stammen C-25 und C-26 aus einer einzigen Acetat-Einheit. Wir schlagen vor, daß C-25 wie in **30** ursprünglich direkt mit C-1 verbunden war und sich am Ende der Polyketidkette befand^[63]. Anschließend wurde die ursprüngliche CC-Bindung des Polyketids durch Baeyer-Villiger-Oxidation in eine Esterbindung umgewandelt (Abb. 13). Dieser Vorschlag wurde inzwischen durch die Isolierung der Tetrocarcine^[88,89] und der Kijanymycine^[90-92] gestützt. In diesen Antibiotica ist die ursprüngliche CC-Bindung in Form einer Acyltetrone-Struktur erhalten geblieben.

Diese Ergebnisse erklären nicht die Herkunft von C-22, C-23 und C-24 des Aglycons. Unter einer Anzahl von getesteten möglichen radioaktiven Vorläufern^[63] zeigte Bernsteinsäure guten Einbau in das Aglycon; insbesondere wurden die mittleren Kohlenstoffatome sehr gut eingebaut. Dies führte uns zu der Spekulation, daß C-22, C-23 und C-24 aus Oxalessigsäure, einem Zwischenprodukt des Citronensäurezyklus, gebildet werden könnten, das unter Verlust der α -Carboxygruppe eingebaut wird. Diese mechanistisch attraktive Idee wurde aber rasch widerlegt, als man fand, daß $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ Bernsteinsäure ausschließlich die beiden von C-1 des Propionats abstammenden Kohlenstoffatome markiert, aber nicht C-24^[63]. Nach detaillierter Prüfung weiterer Verbindungen wurde geschlossen, daß $[2-^{14}\text{C}]$ Glycerin ein spezifischer Vorläufer sein könnte. Diese Hypothese wurde durch Synthese und Verfütterung von $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ Glycerin, angereichert mit 99 Atom-% ^{13}C in jedem der drei Kohlenstoffatome, eindeutig bestätigt. Eine umfassende Analyse des Kopplungsmusters im resultierenden Chlorothricolid zeigte den erwarteten Einbau über Acetyl-CoA in die von Acetat und einen geringeren Einbau in die von Propionat stammenden Einheiten; dies spiegelt den Eintritt von Acetyl-CoA in den Citronensäurezyklus wider. Wesentlich jedoch ist, daß C-22, C-23 und C-24 alle markiert waren und das erwartete Kopplungsmuster für den Einbau einer intakten Glycerin-Einheit zeigten. C-23 ist mit C-22 und C-24 gekoppelt, wie ein Kohlenstoff-Kohlenstoff-Entkopplungsexperiment bestätigte^[70]. Glycerin ist ein symmetrisches Molekül, dessen beide Hydroxymethyl-

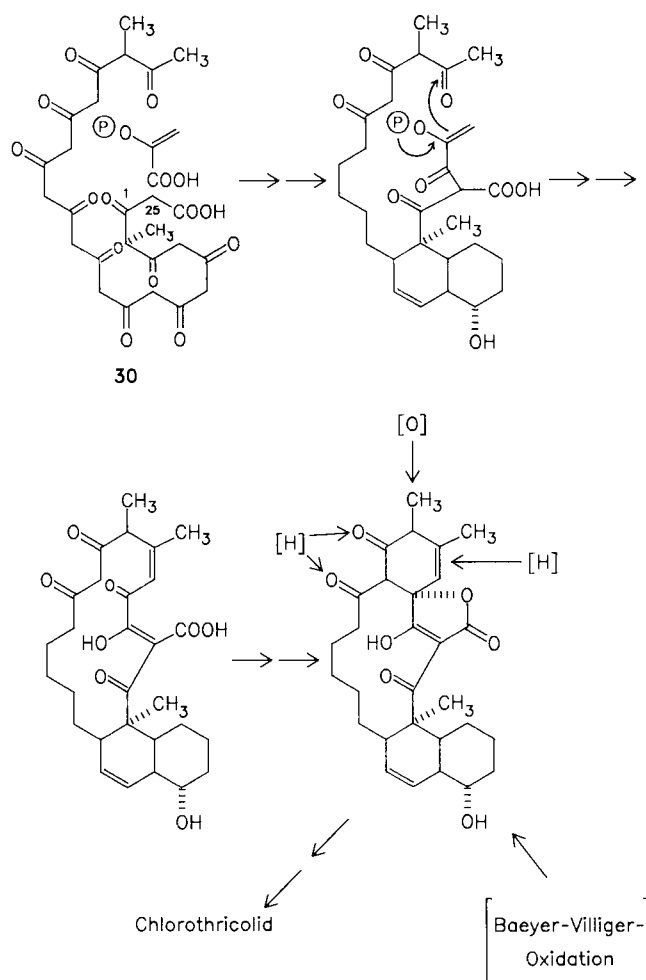


Abb. 13. Vorgeschlagener Biosyntheseweg zum Chlorothricin-Aglycon Chlorothricolid.

gruppen in einer enantiotopen Beziehung stehen und daher durch ein Enzym unterscheidbar sind. Glycerokinase, das Enzym, das den Eintritt von Glycerin in den zellulären Stoffwechsel bewirkt, phosphoryliert die *pro-R*-Hydroxymethylgruppe, die dann C-3 der Triosephosphate sowie von Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat und schließlich Pyruvat und Lactat bildet. Um die „Orientierung“ zu bestimmen, in der Glycerin in die C_3 -Einheit von Chlorothricolid eingebaut wird, synthetisierten und verfütterten wir $(2R)$ - $[1-^2\text{H}_2]$ Glycerin. Das Deuterium-NMR-Spektrum des resultierenden Chlorothricolid-methylesters zeigte zwei deutliche Signale, die dem Wasserstoff der aus Propionat stammenden Methylgruppe, C-27, und dem *pro-R*-Wasserstoffatom an C-22 entsprachen. Folglich wird C-3 von Glycerin zu C-24 von Chlorothricin und C-1 zu C-22. Die stereospezifische Retention von nur einem Wasserstoffatom an C-22 spricht für die intermediäre Bildung einer Doppelbindung zwischen C-21 und C-22, die dann stereospezifisch reduziert wird. Die Verbindung, die tatsächlich mit dem Polyketidteil zur Tetrone-Struktur kondensiert, ist mit ziemlicher Sicherheit nicht Glycerin, sondern ein Metabolit von Glycerin. Aus mechanistischen Gründen schlagen wir vor, daß das eigentliche Substrat Phosphoenolpyruvat ist. Ein plausibler Mechanismus für die Bildung von Chlorothricolid ist in Abbildung 13 gezeigt.

Es wurde versucht, den vorgeschlagenen Mechanismus weiter zu prüfen; dazu wurde der Einbau der Methylwas-

serstoffatome von Acetat in Chlorothricolid verfolgt. Dies untersucht man gewöhnlich durch Verfütterung von $[2-^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3]\text{Acetat}$ und Analyse des Produktes durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie, da Deuterium eine Isotopenverschiebung der ^{13}C -NMR-Signale hervorruft. Deuterium kann durch die α -Verschiebung des Signals des direkt gebundenen Kohlenstoffatoms nachgewiesen werden, am besten unter gleichzeitiger ^1H - und ^2H -Breitbandentkopplung, um eine Aufspaltung durch Deuterium zu vermeiden^[93]. Als Alternative kann man das benachbarte Kohlenstoffatom des Vorläufers mit ^{13}C markieren und Deuterium durch die β -Verschiebung nachweisen, die sich über zwei Bindungen auswirkt. Da die Deuterium-Isotopenverschiebungen additiv sind, ermöglichen sie nicht nur den Nachweis von Deuterium in einer gegebenen Position, sondern auch den Nachweis, wie viele Deuteriumatome an ein bestimmtes Kohlenstoffatom gebunden sind. Überraschenderweise zeigte das aus Natrium- $[2-^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3]\text{Acetat}$ erhaltene Chlorothricolid kein Deuterium in irgendeiner der aus Acetat stammenden Positionen. Das einzige deuterierte Kohlenstoffatom war das aus Propionat stammende C-27 – eine Methylgruppe mit zwei Deuteriumatomen. Daher muß das Deuterium aus der Methylgruppe von Acetat während der Transformation in die Acetat-Einheiten des Polyketids vollständig ausgewaschen worden sein, möglicherweise durch extensive Carboxylierung/Decarboxylierung von Acetyl-CoA.

Acetyl-CoA scheint jedoch in den Citronensäurecyclus unter Retention des Deuteriums einzutreten und Propionat-Einheiten mit dideutierten Methylgruppen zu produzieren. Aus dem angebotenen $[2-^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3]\text{Acetyl-CoA}$ entsteht bei einmaligem Durchlaufen des Cyclus Succinyl-CoA mit zwei Deuteriumatomen an C-3, das nach Umlagerung durch Methylmalonyl-CoA-Mutase an C-2 monodeutiertes Methylmalonyl-CoA ergibt. Bei mehrfachem Durchlaufen des Cyclus kann jeweils höchstens ein Deuteriumatom an C-3 der Propionateinheiten eingeführt werden. Das beobachtete Auftreten von zwei Deuteriumatomen in dieser Position läßt sich auf zwei Arten erklären: Falls Succinyl-CoA und freies Succinat im Gleichgewicht stehen, wird die Hälfte der Succinyl-CoA-Moleküle an C-2 dideutiert sein, so daß Methylmalonyl-CoA mit zwei Deuteriumatomen in der Methylgruppe produziert wird. Als Alternative könnte auf einem neuen, bisher nicht in Betracht gezogenen Weg Succinyl-CoA direkt zu Propionyl-CoA decarboxyliert und anschließend zu Methylmalonyl-CoA carboxyliert werden. Um zwischen diesen beiden

Möglichkeiten zu unterscheiden, synthetisierten wir $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Bernsteinsäure}$. In der Zelle wird diese Verbindung zu einer 1 : 1-Mischung von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ - und $[3,4-^{13}\text{C}_2]\text{Succinyl-CoA}$ metabolisiert. Bei direkter Decarboxylierung (Weg B, Abb. 14) würden Propionat-Einheiten entstehen, die in allen drei Positionen ^{13}C -markiert sind und Kopplungen zwischen C-1 und C-2 aufweisen. Über die Methylmalonyl-CoA-Mutase-Reaktion (Weg A) würden dagegen Propionat-Einheiten resultieren, die ebenfalls in allen Positionen ^{13}C -markiert sind, aber keine direkte ^{13}C - ^{13}C -Kopplung zeigen. Die Verfütterung dieses Vorläufers an die Chlorothricin-Fermentation ergab Chlorothricolid, das in den von Propionat stammenden Kohlenstoffatomen angereichert war, aber mit Sicherheit keine Kopplung über eine Bindung zeigte. Demnach trägt die direkte Decarboxylierung von Succinyl-CoA nicht wesentlich zur Bildung von Propionat-Einheiten bei dieser Polyketidsynthese bei, sondern es wird Weg A beschritten.

5.2. Boromycin und Aplasmomycin

Unter den Tausenden von organischen Naturstoffen gibt es nur eine Handvoll, die Bor enthalten. Als erste dieser Verbindungen wurde das ionophore Antibioticum Boromycin **1** (Abb. 1 und 15) entdeckt, ein Metabolit aus *Streptomyces antibioticus*^[1,94]. Wie chemische Abbaureaktionen und Röntgenstrukturanalyse ergaben^[1,2], ist **1** ein makrocyclisches Dilacton, das aus zwei Kohlenstoffketten mit übereinstimmenden CC-Verknüpfungen und einem zentralen Boratom besteht. Zusätzlich ist eine D-Valin-Einheit über eine Esterbindung an eine dieser Ketten geknüpft. Die antibiotische Aktivität von Boromycin **1** gegen grampositive Bakterien, bestimmte Pilze und Protozoen^[95] beruht auf Wechselwirkungen mit der cytoplasmatischen Membran, die im Zusammenbruch der Permeabilitätsbarriere für Kalium-Ionen resultieren.

Ein zweites Bor-haltiges ionophores Antibioticum, Aplasmomycin **31** (Abb. 15), wurde aus einem *Streptomyces griseus*-Stamm isoliert, der aus einer Schlammprobe aus dem Japanischen Meer gewonnen wurde^[96]. Seine Struktur^[97-99] ähnelt der des Boromycins, doch fehlt die D-Valin-Einheit. Die beiden Makrolidketten in Aplasmomycin sind gleich und haben an jedem Paar von Chiralitätszentren dieselbe Konfiguration. Daher zeigt das ^{13}C -

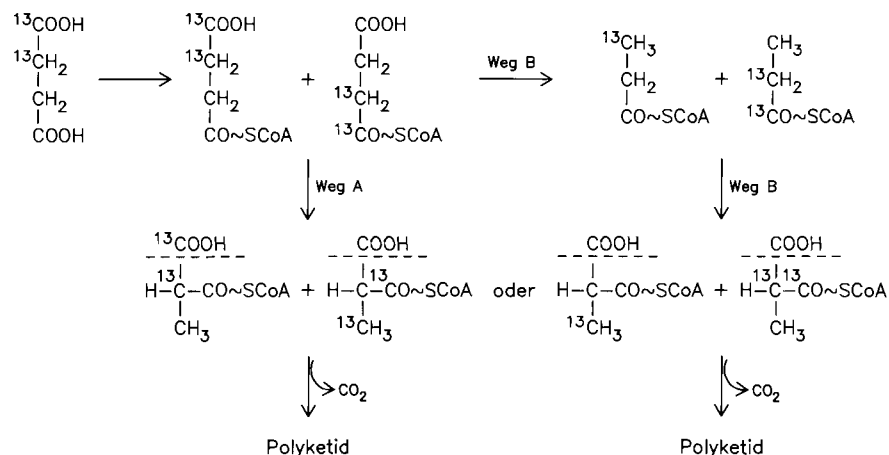
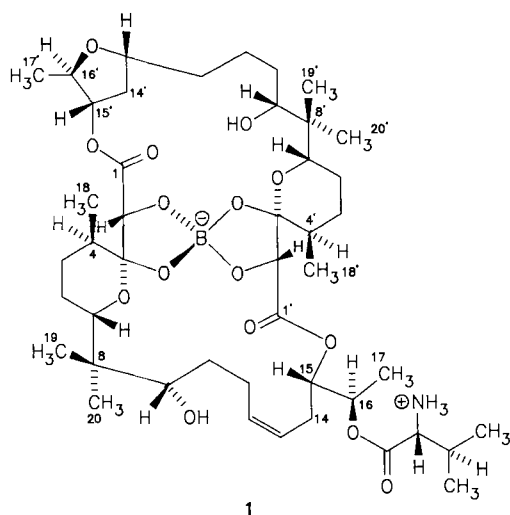
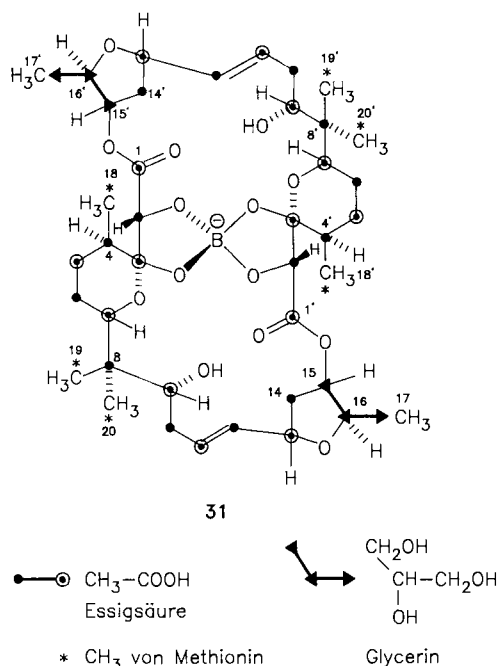


Abb. 14. Anwendung von $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Bernsteinsäure}$ zur Unterscheidung zweier möglicher Biosynthesewege zu Propionat-Einheiten in Polyketiden. Voraussage für Weg A: keine ^{13}C - ^{13}C -Direktkopplung. Voraussage für Weg B: ^{13}C - ^{13}C -Direktkopplung C-1/C-2 und C-19/C-20.



1



31

Abb. 15. Biosynthetische Grundbausteine von Aplasmomycin **31**. Zum Vergleich: Boromycin **1**.

NMR-Spektrum dieser Verbindung für vierzig C-Atome nur zwanzig Signale, die relativ leicht zugeordnet werden konnten^[100]. Die Konformationen von **1** und **31** sind sich sowohl im Kristall^[97, 101] als auch in Lösung^[100, 102, 103] ähnlich und ändern sich interessanterweise nur wenig bei Entfernung des Bors.

Die Biosynthese von Boromycin **1** und Aplasmomycin **31** muß im Zusammenhang mit der der klassischen Makrolid-Antibiotika betrachtet werden. Die letzteren bilden sich auf einem modifizierten Polyketidweg, bei der Ein- oder Zwei-Kohlenstoff-Verzweigungen durch Einbau von Propionat- oder Butyrat-Einheiten anstelle von kettenverlängernden Acetat-Einheiten entstehen (vgl. ^[84]). Darauf basierend würde man vorhersagen, daß die vier Methylverzweigungen an C-4/C-4' und C-16/C-16' durch Einbau von Propionat-Einheiten gebildet werden und die beiden geminalen Dimethylverzweigungen an C-8/C-8' durch Ersatz von Acetat durch Isobutyrate entstehen. *Birch* et al.^[104] schlugen jedoch einen alternativen Biosyntheseweg vor, als

die ersten klassischen Makrolid-Antibiotika entdeckt wurden. Dieser sah die Konstruktion der geradlinigen Polyketid-Kohlenstoffketten ausschließlich aus Acetat-Einheiten vor und die Einführung der Methylverzweigungen durch C-Methylierungen, d.h. durch Übertragung der Methylgruppen von S-Adenosylmethionin. Fütterungsversuche mit ¹³C-markiertem Acetat oder Malonat und [methyl-¹³C]Methionin zeigten sofort, daß das Kohlenstoffgerüst von **1** und **31** nach dem Birch-Modell und nicht auf dem klassischen Biosyntheseweg entsteht (Abb. 15). Die Kohlenstoffatome C-1/C-1' bis C-14/C-14' repräsentieren jeweils sieben Acetat-Einheiten; drei Methylgruppen in jeder Kette, nämlich C-18/C-18' bis C-20/C-20' stammen aus der Methylgruppe von Methionin, und die Starter-Einheiten C-15/C-15' bis C-17/C-17' werden weder von Acetat oder Methionin noch von Propionat markiert^[105–107]. Analoge Resultate zur Biosynthese von Boromycin **1** wurden im Laboratorium von Professor *Pape* in Münster erhalten^[108].

Die D-Valin-Einheit von **1** stammt unmittelbar aus D-Valin. Auch L-Valin wird eingebaut, aber nur nach Umwandlung zur D-Form unter Verlust des α -Wasserstoffs. Dies wurde eindeutig gezeigt: Beim Einbau von D-[2-²H]Valin bleibt Deuterium überwiegend erhalten; beim Einbau des entsprechenden L-Isomers geht Deuterium vollständig verloren^[105]. Diese Entdeckung war überraschend in Anbetracht des Befunds, daß die D-Aminosäure-Einheiten mehrerer Peptid-Antibiotika aus der freien L- und nicht der D-Aminosäure als unmittelbarem Vorläufer stammen^[109–111]. In diesen Fällen findet die Epimerisierung am α -Kohlenstoffatom erst während der Produktbildung nach Bindung der Aminosäure an die Synthase statt^[109–112]. Die Boromycin-Biosynthese verläuft offensichtlich nach einem anderen Mechanismus. Durch Verfütterung anderer markierter Aminosäuren wurde versucht^[113], eine gesteuerte Biosynthese von Boromycin-Analoga zu erzielen, die andere Aminosäuren anstelle von D-Valin enthalten. Außer einem minimalen Einbau der Radioaktivität von D-Leucin war jedoch keine Bildung derartiger Analoga erkennbar.

Da die Boromycin-Fermentation niedrige Ausbeuten und geringen Einbau von markierten Vorläufern ergab und die NMR-Spektren von **1** relativ komplex sind, wandten wir uns dem einfacheren Aplasmomycin **31** zu, um weitere Einzelheiten der Biosynthese dieses ungewöhnlichen Makrolidsystems aufzuklären. Fütterungsversuche mit ¹⁴C-markiertem Pyruvat und Lactat deuteten an, daß diese Verbindungen nur nach Metabolisierung zu Acetat eingebaut werden. Glycerin war ein sehr guter Vorläufer; in einem Experiment mit [1,3-¹³C₂]Glycerin wurde gezeigt, daß diese Verbindung nicht nur die Acetat-Einheiten (nach Metabolisierung zu Pyruvat und Acetyl-CoA) und die von Methionin stammenden Methylgruppen (über Phosphoglycerinsäure, Serin und das Tetrahydrofolsäure-System) markiert, sondern auch spezifisch die Starter-Einheiten (Abb. 15). Eine 3.5-Hz-Kopplung über zwei Bindungen zwischen den hoch angereicherten Kohlenstoffatomen 15 und 17 zeigte eindeutig, daß die drei Kohlenstoffatome der Starter-Einheit aus einem Molekül Glycerin gebildet werden^[107].

Starter-Einheiten für den Aufbau von Polyketidketten sind im allgemeinen Thioester von Carbonsäuren; daher ist Glycerin selbst kein wahrscheinlicher Kandidat, son-

dern eher ein nahe verwandter Metabolit. Da die Starter-Einheit anscheinend nicht über Milch- oder Brenztraubensäure gebildet wird, wurden Lactaldehyd oder Methylglyoxal als mögliche Zwischenstufen in Betracht gezogen, da sie Thioester der Brenztrauben- oder Milchsäure bilden können, ohne die Stufe der freien Säure zu durchlaufen. Beide Verbindungen wurden jedoch ausgeschlossen, und zwar durch stereochemische Experimente, die im folgenden diskutiert werden, und durch den Befund, daß [3-¹³C]Lactaldehyd und [3-¹³C]Methylglyoxal nur in die aus C-2 von Acetat stammenden Kohlenstoffatome, aber nicht in die Starter-Einheit eingebaut werden^[114]. Es wurde auch geprüft, ob Serin die Starter-Einheit oder ein unmittelbarer Vorläufer sein könnte. Ein Fütterungsversuch mit DL-[3-¹³C]Serin zeigte jedoch ¹³C-Einbau nur in die vom Methionin stammenden Methylgruppen (über das Tetrahydrofolsäure-System) und in die Kohlenstoffatome, die vom C-2 des Acetats (über Acetyl-CoA) stammen.

Wir beschlossen dann, durch Verfüterung von [1,1,3,3-²H₄]-, (2R)-[1,1-²H₂]- und [2-²H]Glycerin zu bestimmen, wie das Glycerinmolekül in der Starter-Einheit orientiert ist und welche Wasserstoffatome bei der Umwandlung erhalten bleiben. Das aus [2-²H]Glycerin resultierende Aplasmomycin **31** enthielt überhaupt kein Deuterium, wie durch Massenspektrometrie ermittelt wurde. Die beiden anderen Aplasmomycin-Proben ergaben fast gleiche Deuterium-NMR-Spektren, die überwiegend eine Markierung (38–39% Anreicherung) an C-17/C-17', aber keine signifikante Deuterium-Anreicherung an C-15/C-15' zeigten. Somit wird C-1 von Glycerin, die durch Glycerokinase phosphorylierte *pro-R*-Hydroxymethylgruppe, zu C-17/C-17' von Aplasmomycin **31**, während C-3 in C-15/C-15' übergeht. Nur die Wasserstoffatome von C-1 des Glycerins bleiben erhalten und bilden einen Teil der Methylgruppe der Starter-Einheit^[114]. Zusätzlich wird Deuterium in die von Methionin stammenden Methylgruppen und in sehr geringem Umfang in den von Acetat stammenden Teil des Moleküls eingebaut.

Die obigen Ergebnisse bilden die Grundlage für weitere Experimente über die stereochemischen Aspekte der Methylgruppen-Bildung in Aplasmomycin **31**. Die vier Methylgruppen jeder Polyketidkette werden von C-1 des Glycerins markiert: C-17/C-17' durch direkten Einbau von Glycerin, C-18/C-18' bis C-20/C-20' über die Umwandlung von C-1 von Glycerin in C-3 von Serin und dann in die Methylgruppe von Methionin. Der sterische Verlauf der Übertragung der letztgenannten Methylgruppe auf das Polyketidgerüst wurde durch Verfüterung von (*methyl-R*)- und (*methyl-S*)-[*methyl*-²H₁,³H]Methionin untersucht^[115]. Kuhn-Roth-Oxidation des resultierenden Aplasmomycons ergab radioaktive Essigsäure, die die chiralen Methylgruppen von C-18/C-18' bis C-20/C-20' enthielt. Eine Chiralitätsanalyse dieser Essigsäure-Proben zeigte^[66–68], daß die Methylgruppe von Methionin auf die Polyketidkette unter Inversion der Konfiguration übertragen wird. Dieses Resultat ist in Einklang mit dem sterischen Verlauf, der für die Mehrheit der bis jetzt bekannten *S*-Adenosylmethionin-abhängigen Methyltransferasen beobachtet wurde^[116,117], und läßt einen direkten Transfer der Methylgruppe vom Schwefel des Substrats auf den Acceptor-Kohlenstoff in einem S_N2-Prozeß vermuten. Als jedoch an C-3 mit Deuterium und Tritium markiertes Serin verfüttert

wurde, gaben sowohl das (3R)- als auch das (3S)-Isomer Aplasmomycin mit racemischen Methylgruppen. Daher muß die Umwandlung der terminalen Methylengruppe von Serin in die Methylgruppe von Methionin unter vollständiger Racemisierung verlaufen. Wenn daher eine Probe von Glycerin, stereospezifisch an C-1 tritiert und deuteriert, an die Kulturen verfüttert wird und man das resultierende Aplasmomycin **31** durch Kuhn-Roth-Oxidation abbaut, muß jede Chiralität, die in der resultierenden Essigsäure gefunden wird, ausschließlich C-17/C-17' zugeschrieben werden, da die von Methionin stammenden Methylgruppen nur racemische Essigsäure beisteuern würden. Als dieses Experiment mit (1R,2R)-[1-²H,³H]Glycerin durchgeführt wurde, zeigte die durch Abbau gewonnene Essigsäure einen F-Wert^[*] von 35; dies entspricht *S*-Konfiguration mit 52% *ee*. Daß die von Methionin stammenden Methylgruppen wirklich racemisch waren, wurde durch Abbau einer anderen Probe zu einem Fragment bestätigt, das nur die letztgenannten Methylgruppen (und nicht C-17/C-17') enthielt. Kuhn-Roth-Oxidation dieses Materials ergab racemische Essigsäure. Der Beitrag der von Methionin stammenden racemischen Methylgruppen zur Chiralität der Essigsäure aus der Kuhn-Roth-Oxidation kann aufgrund der früheren Experimente mit deuteriertem Glycerin abgeschätzt werden, und die Korrektur um diesen Betrag zeigt, daß die C-17/C-17'-Methylgruppen *S*-Konfiguration haben und mit 84% *ee* entstanden sind^[114]. Der Befund, daß sich die Methylgruppe der Starter-Einheit aus (1R)-Glycerin in hoher Enantiomerenreinheit und mit *S*-Konfiguration gebildet hat, schließt wiederum die Beteiligung sowohl der Methylglyoxal-Synthase- als auch der Pyruvat-Kinase-Reaktion bei der Bildung der Starter-Einheit aus Glycerin aus. Pyruvat-Kinase hätte eine Methylgruppe mit *R*-Konfiguration^[118] und Methylglyoxal-Synthase eine racemische Methylgruppe erzeugt^[119].

Weitere Informationen über Bildungsweise und Modifizierung der Polyketidkette von Aplasmomycin **31** ergaben sich aus dem Schicksal der Methylwasserstoff- und Carboxysauerstoffatome von Acetat während der Biosynthese. Für diese Untersuchungen wurde die Isotopenverschiebungs-Technik mit intramolekular doppeltmarkierten Vorläufern (¹³C und D oder ¹³C und ¹⁸O) herangezogen. Aus [2-¹³C,²H₃]Acetat gebildetes Aplasmomycin wurde durch ¹³C-NMR-Spektroskopie mit gleichzeitiger ¹H- und ²H-Breitbandentkopplung analysiert. Die Resultate sind in Abbildung 16 zusammengefaßt. Es werden jeweils ein Deuteriumatom an den Kohlenstoffatomen 2/2', 10/10' und 12/12' sowie jeweils zwei Deuteriumatome an den Kohlenstoffatomen 6/6' und 14/14' eingebaut. Bemerkenswerterweise war kein Deuterium an C-4/C-4' lokalisiert und nur je ein Deuteriumatom an C-10/C-10'. Die Herkunft der Sauerstoffatome wurde in ähnlicher Weise mit [1-¹³C,¹⁸O₂]Acetat untersucht. Das ¹³C-NMR-Spektrum des aus diesem Vorläufer erhaltenen Aplasmomycons zeigte Isotopen-verschobene Satelliten für die Signale von C-1/C-1', C-7/C-7', C-9/C-9' und C-13/C-13'. Bemerkenswert ist, daß C-3/C-3' kein Isotopen-verschobenes Signal zeigt; dies weist darauf hin, daß der Sauerstoff des Pyranrings von C-7/C-7' beigesteuert wird und überraschender

[*] Der F-Wert (siehe [68]) ist ein experimentelles Maß für Konfiguration und optische Reinheit einer chiralen Methylgruppe: F = 79 ± 100% *ee* (*R*); F = 50 ± Racemat; F = 21 ± 100% *ee* (*S*).

weise der andere Sauerstoff an C-3/C-3' nicht aus der Carboxygruppe des Acetats stammt^[114].

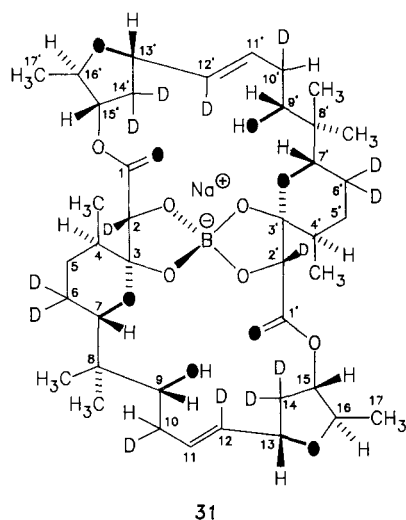


Abb. 16. Herkunft der Wasserstoff- und Sauerstoffatome von Aplasmomycin **31** aus Acetat und Glycerin. D = Deuterium aus $[2-^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3]\text{Acetat}$; ● = ^{18}O aus $[1-^{13}\text{C}, ^{18}\text{O}_2]\text{Acetat}$. Fettgedruckte Linien verbinden ^{18}O mit dem Kohlenstoffatom, von dem es stammt. C-17 und C-17' werden von $(2R)\text{-}[1,1-^2\text{H}_2]\text{Glycerin}$ deuteriert.

Aus diesen Resultaten können mehrere Schlußfolgerungen gezogen werden. Die ^{18}O -Anreicherung an C-1/C-1' ist genauso hoch wie an den anderen markierten Positionen, was darauf hindeutet, daß die Lactonfunktionen direkt aus einem Carboxy-aktivierten Derivat stammen und nicht aus einer freien Carboxygruppe, die durch Hydrolyse eines aktivierten Zwischenproduktes, z. B. eines Thioesters, gebildet wurde. Im letzteren Fall hätte man an C-1/C-1' nur halb so viel ^{18}O finden sollen wie in den anderen Positionen. Eine Methylierung der Polyketidkette, sowohl an C-4/C-4' als auch an C-8/C-8', auf der β -Diketonstufe scheint aus mechanistischen Gründen wahrscheinlich. Eine Methylierung an C-4/C-4' vor der Abspaltung des C-5/C-5'-Sauerstoffs über eine 4,5-En-Zwischenstufe würde die fehlende Deuterium-Retention an C-4/C-4' erklären. Für das C-10/C-10'- bis C-14/C-14'-Segment bedeutet Retention von nur einem Deuteriumatom an C-10/C-10' die Abspaltung der C-11/C-11'-Sauerstofffunktion über eine 10,11-En-Zwischenstufe. Da das Endprodukt eine 11,12-Doppelbindung enthält und C-13/C-13' sich zu Anfang auf der Carbonyl-Oxidationsstufe befand, erscheint eine Doppelbindungsverschiebung plausibel.

Nach dem Ausschluß von Alternativen verbleiben Phosphoglycerinsäure und Phosphoenolpyruvat **32** als wahrscheinlichste Kandidaten für die Polyketid-Startereinheit. Diese Verbindungen wurden noch nicht als Polyketid-Startereinheiten oder in der Natur als Thioester angetroffen; eine weitere Verifizierung dieser Hypothese wäre höchst wünschenswert. In Anbetracht der Impermeabilität von Zellmembranen für Phosphatester sind in-vivo-Fütterungsexperimente leider nicht möglich, sondern es muß die Entwicklung eines zellfreien Systems abgewartet werden. Die Entdeckung, daß der Sauerstoff des Tetrahydrofuranringes von C-13/C-13' und nicht von C-16/C-16' stammt, ist sehr interessant; sie deutet auf einen Austausch des ursprünglichen Sauerstoffs am mittleren Kohlenstoff der Starterein-

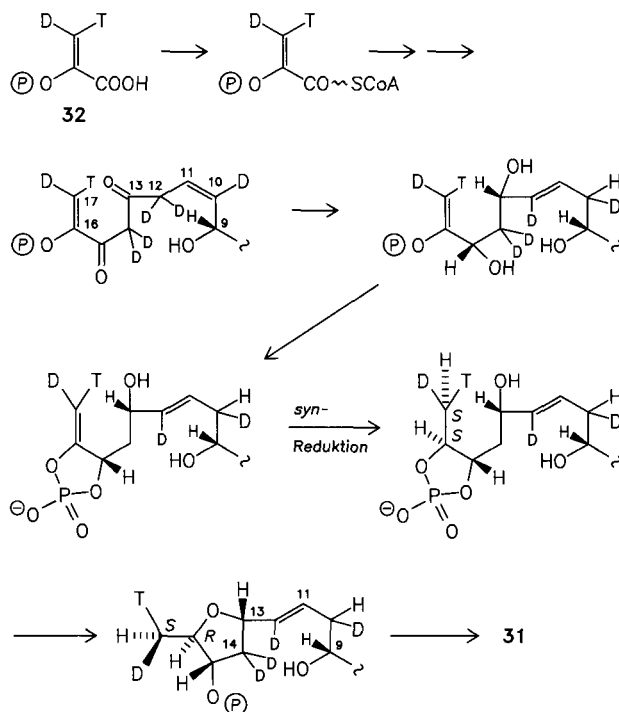


Abb. 17. Hypothetischer Mechanismus für die Bildung der C-9- bis C-17-Einheit von Aplasmomycin **31**.

heit hin. Eine plausible Sequenz der Vorgänge ist in Abbildung 17 skizziert. Dabei wird Phosphoenolpyruvat **32** als Starter-Einheit angenommen, doch sind sicherlich auch Alternativen denkbar^[114].

6. Bildung einiger ungewöhnlicher Strukturelemente in Antibiotica – mC_7N - und C_5N -Einheiten

6.1. Einführung

Das Antibiotikum Asukamycin **6**^[37,38] (Abb. 2) enthält zusätzlich zum Cyclohexanring zwei andere ungewöhnliche Strukturelemente. Eines ist eine C_5N -Einheit in Form von 2-Amino-3-hydroxycyclopent-2-enon, das amidartig an eine kurze Polyketidkette gebunden ist. Dieselbe Struktureinheit findet man im nahe verwandten Manumycin **44**^[120,121] (vgl. Abb. 24) und in Reducomycin **46**^[122] (vgl. Abb. 26) sowie auch in einer Anzahl anderer jüngst entdeckter Antibiotica^[123–127]. Bis vor kurzem war nichts über ihre Biosynthese bekannt.

Das andere ungewöhnliche Strukturelement in Asukamycin **6**, Manumycin **44** und Ansatrienin **5** (Abb. 2) besteht aus einem sechsgliedrigen Carbocyclus, normalerweise aromatisch oder chinoid, der ein zusätzliches Kohlenstoffatom und einen Stickstoffsubstituenten in 1,3- (oder *meta*-)Anordnung enthält (in **6** und **44** auch noch eine Epoxygruppe). Diese mC_7N -Einheit wurde zuerst als ein nicht aus dem Polyketidweg stammendes Strukturelement des Ansamycin-Antibiotiums Rifamycin B **35** entdeckt (Abb. 18)^[128,129]. Es ist sowohl in allen Ansamycinen und in Ansamitocin **34** (Abb. 18) als auch in strukturell recht andersartigen Antibiotica vertreten, z. B. den Mitomycinen (siehe **36**, Abb. 18)^[130]. Andere Verbindungen enthalten mC_7N -Einheiten mit vermutlich ähnlichem biosynthetischem Ursprung^[131], z. B. der Aminocyclit Valien-

Phosphoenolpyruvat 32

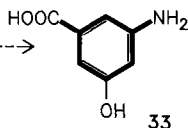
+ Erythrose-4-phosphat

3-Desoxy-D-arabino-heptulonsäure-7-phosphat

Shikimisäure 2

Chorisminsäure 18

Tryptophan



3-Amino-5-hydroxybenzoic acid

Tyrosin

Phenylalanin

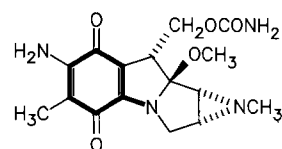
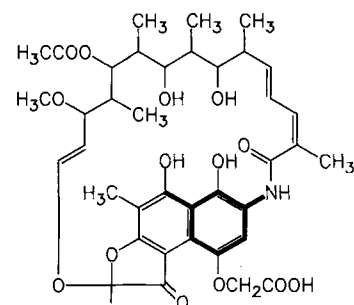
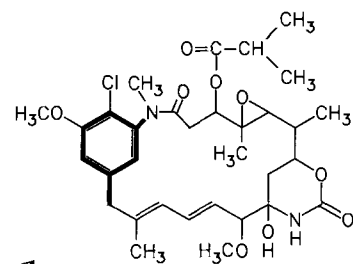


Abb. 18. Herkunft der mC₇N-Einheiten von Ansamitocin 34, Rifamycin B 35 und Mitomycin 36. Die mC₇N-Einheiten sind fett gedruckt.

amin, der sich in Validamycin^[132] und im β -Glucosidase-Inhibitor Acarbose 42 findet^[133] (vgl. Abb. 22).

Fütterungsversuche mit einer Vielzahl markierter Vorläufer^[130, 134–137] etablierten für die mC₇N-Einheit von Ansamycinen und Mitomycin 36 ein Markierungsmuster, das große Ähnlichkeit mit dem der Shikimisäure 2 aufweist. Dennoch waren alle Versuche erfolglos, den Einbau markierter Shikimisäure^[134, 136, 138] oder, im Falle von Mitomycin, auch von Dehydrochinasäure^[137] zu zeigen. Diese ne-

gativen Ergebnisse könnten entweder eine schlechte Aufnahme der Shikimisäure widerspiegeln oder vermuten lassen, daß die Abzweigung für die Bildung der mC₇N-Einheit früher im Shikimisäureweg liegt.

Ein Durchbruch gelang Nüesch und Ghisalba durch genetische Studien und Rickards et al. durch Fütterungsversuche. Diese Arbeitsgruppen wiesen nach, daß 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid 33 ein spezifischer und recht naher Vorläufer der mC₇N-Einheit in Rifamycin 35^[139], dem ver-

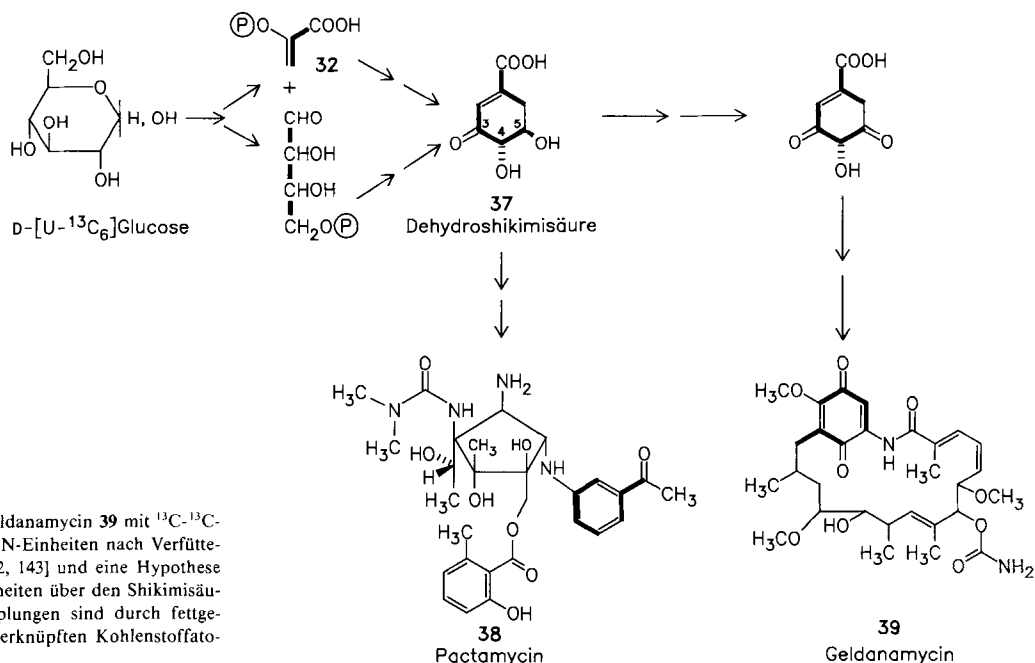


Abb. 19. Pactamycin 38 und Geldanamycin 39 mit ¹³C-¹³C-Kopplungsmustern in den mC₇N-Einheiten nach Verfütterung von D-[U-¹³C₆]Glucose [12, 143] und eine Hypothese für die Bildung der mC₇N-Einheiten über den Shikimisäureweg [143]. Die ¹³C-¹³C-Kopplungen sind durch fettgedruckte Linien zwischen den verknüpften Kohlenstoffatomen angedeutet.

wandten Actamycin^[140], Ansamitocin **34**^[141] und Mitomycin **36**^[142] ist. Unklar blieb jedoch noch, wie 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure **33** über den Shikimisäureweg gebildet wird. Hornemann et al.^[137] haben durch Abbau von Mitomycin-Proben aus mehreren spezifisch markierten Vorläufern nachgewiesen, daß das Stickstoffatom an das Kohlenstoffatom gebunden ist, das C-5 und nicht C-3 der Shikimisäure entspricht. Dieser überraschende Befund schließt eine direkte Transaminierung aus. Dies wurde von Rinehart et al.^[143] bestätigt, die das ¹³C-¹³C-Kopplungsmuster in der mC₇N-Einheit von Geldanamycin **39**, einem Ansamycin-Antibiotikum, analysierten, das aus D-[U-¹³C₆]Glucose erhalten wurde (Abb. 19). Das gleiche Experiment mit Pactamycin **38**^[144] (Abb. 19), das eine noch ungewöhnlichere mC₇N-Einheit enthält, bewies dagegen die Verknüpfung des Stickstoffatoms mit dem Kohlenstoffatom, das C-3 von Shikimisäure oder Dehydroshikimisäure **37**^[12] entspricht. Demnach werden die mC₇N-Einheiten in diesen beiden Verbindungen auf verschiedenen Wegen synthetisiert^[143]. In Einklang mit diesem Unterschied ist, daß die mC₇N-Einheit von Pactamycin **38** über 3-Aminobenzoessäure und nicht über 3-Amino-5-hydroxybenzoessäure **33** gebildet wird. Darauf basierend schlugen Rinehart et al. vor (Abb. 19), daß die mC₇N-Einheit von Pactamycin **38** durch Transaminierung von Dehydroshikimisäure **37** an C-3 entsteht, während **33**, das die anderen mC₇N-Einheiten aufbaut, durch Oxidation von **37** zum 5-Oxo-Analogon mit anschließender Transaminierung an C-5 gebildet werden soll^[143].

6.2. Naphthomycin und Ansatrienin

Bei unseren Arbeiten über die Biosynthese der mC₇N-Einheiten haben wir uns zuerst auf zwei Ansamycin-Antibiotica konzentriert: auf Ansatrienin **5** (vgl. Abb. 2) und Naphthomycin A **40**, das ebenfalls ein Metabolit von *Streptomyces collinus* ist^[145] (Abb. 20). Die Naphthomycine

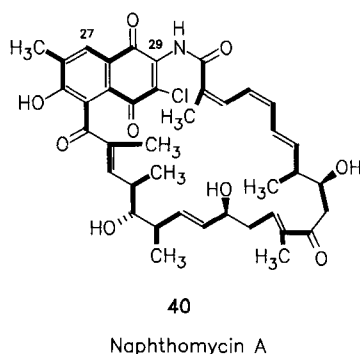
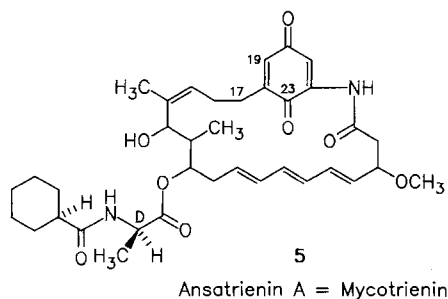


Abb. 20. Naphthomycin A **40** mit ¹³C-¹³C-Kopplungsmuster einer aus [U-¹³C₃]Glycerin biosynthetisch hergestellten Probe (vgl. Legende zu Abb. 19).

repräsentieren eine kleine Gruppe nahe verwandter Antibiotica, deren Strukturen durch chemische und spektroskopische Methoden aufgeklärt wurden^[146–150] und deren antibiotische Aktivität auf einem Vitamin-K-Antagonismus beruht^[145]. Wie zu erwarten war, werden die Ansa-Ketten in beiden Verbindungstypen aus Acetat- und Propionat-Einheiten über den Polyketidweg gebildet^[148, 151, 152]. Ebenso wie Rickards et al.^[140, 142] beobachteten wir sehr guten und spezifischen Einbau von 3-Amino-5-hydroxy-[carboxy-¹³C]benzoesäure **33** in Naphthomycin A (64% Anreicherung an C-27)^[152] und in Ansatrienin **5** (48% Anreicherung an C-17)^[44, 152].

Die Verknüpfungsstelle des Stickstoffs mit dem Kohlenstoffgerüst, das auf dem Shikimisäureweg entsteht, wurde durch Fütterungsversuche mit [U-¹³C₃]Glycerin und eine ¹³C-¹³C-Kopplungsanalyse der Produkte ermittelt^[153, 154]. Glycerin hat als Substrat den Vorteil gegenüber D-[U-¹³C₆]Glucose, daß es, sogar in Gegenwart anderer Kohlenhydrate als Kohlenstoffquelle, besser verwertet wird, und daß das Kopplungsmuster der Produkte nicht durch den Glycolyse-Stoffwechsel des Substrats verändert wird. Allerdings zeigen die Produkte aus Fütterungsexperimenten mit diesem Vorläufer sehr komplexe Kopplungsmuster, deren Analyse umfassenden Gebrauch von 2D-NMR-Techniken erfordert. Besonders wertvoll für diese Analyse ist eine Tripelquanten-Version des 2D-INADEQUATE-Experimentes, die wir zu diesem Zweck entwickelt haben^[155]. Mit diesem Experiment lassen sich spezifisch drei direkt gekoppelte ¹³C-Kerne nachweisen, denen eine spezifische Tripelquanten-Kohärenz-Frequenz gemeinsam ist (siehe Abschnitt 6.3 und Abb. 23). Das aus [U-¹³C₃]Glycerin stammende Naphthomycin A **40** (Abb. 20) zeigte die erwarteten Kopplungen in der Polyketid-Einheit; außerdem enthält die mC₇N-Einheit zwei intakt aus Glycerin erhaltene C₃-Bausteine und ein aromatisches Kohlenstoffatom C-29, das mit Stickstoff verbunden und ¹³C-angereicht ist, aber keine Kopplung zu den benachbarten Kohlenstoffatomen aufweist. Völlig analoge Ergebnisse erhielt man für Ansatrienin **5** (Daten hier nicht aufgeführt). Dies beweist, daß die mC₇N-Einheit in **40** und **5** wie in Mitomycin **36** und Geldanamycin **39** aufgebaut ist, d. h. der Stickstoff ist an ein Kohlenstoffatom gebunden, das C-5 von Shikimisäure **2** entspricht.

Ansatrienin **5** enthält zusätzlich zur mC₇N-Einheit eine von Shikimisäure **2** stammende Cyclohexancarbonsäure-Einheit. Somit bietet sich die einzigartige Gelegenheit für einen Test, ob der Nicht-Einbau von Shikimisäure in die mC₇N-Einheit auf einer Impermeabilität der Zellen beruht. Einen schlüssigen Beweis, daß Shikimisäure nur die Cyclohexancarbonsäure-Einheit, aber nicht die mC₇N-Einheit markiert, lieferte die Verfütterung von D-[2-¹³C]Shikimisäure an *S. collinus*. Die ¹³C-NMR-Spektren des resultierenden Ansatrienins **5** zeigten etwa 5% Anreicherung in C-2/C-6 des Cyclohexanringes, aber keine signifikante Anreicherung (weniger als 0,2%) in C-19 oder C-23, den beiden potentiellen Markierungsstellen der mC₇N-Einheit^[46]. Damit ist klar, daß zumindest bei der Ansatrienin-Biosynthese der Nicht-Einbau von Shikimisäure in die mC₇N-Einheit nicht von Permeabilitätsproblemen herrührt.

Wir schließen daraus, daß der Bildungsweg der 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure **33** zu einem viel früheren Zeit-

punkt vom Shikimisäureweg abzweigen muß. Um alle bekannten Tatsachen über die Biosynthese der mC₇N-Einheit in den Mitomycin-, Ansamycin- und Ansamitocin-Antibiotica zu erklären, schlagen wir für die Bildung von **33** den in Abbildung 21 gezeigten Biosyntheseweg vor. Horne-

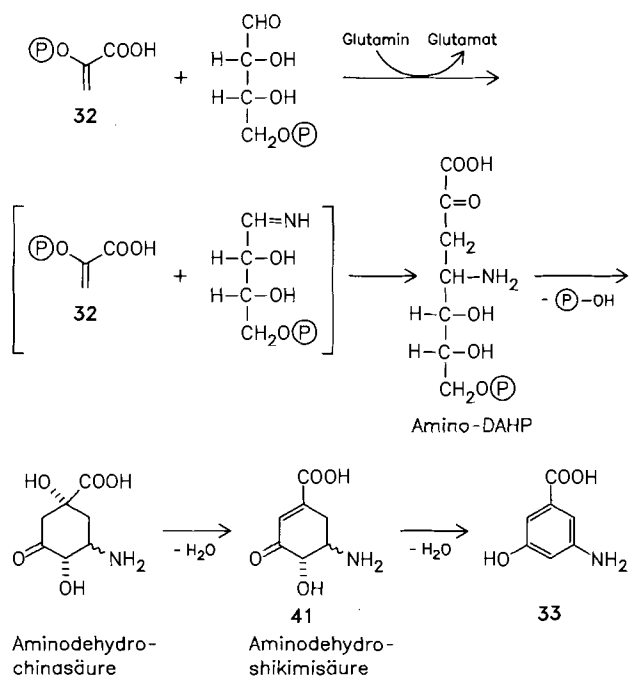


Abb. 21. Vorgeschlagene Bildungsweise von 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure **33**, dem Vorläufer der mC₇N-Einheiten.

mann et al. haben bereits früher angedeutet^[137], daß das 4-Desoxy-4-amino-Analogon von 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonsäure-7-phosphat (DAHP) der Vorläufer der mC₇N-Einheit sein könnte. Wir schlagen vor, daß „Amino-DAHP“ durch ein ähnliches Enzym wie DAHP-Synthase

gebildet wird, das aber eine zusätzliche Untereinheit enthält, die Glutamin zu Ammoniak hydrolysieren kann, der sofort mit der Aldehydgruppe von Erythrose-4-phosphat zu einem Imin reagiert. Die Kondensation dieses Imins mit Phosphoenolpyruvat **32** würde dann Amino-DAHP produzieren. Diese Idee wird durch die Entdeckung der *Jiao*-Gruppe^[156] gestützt, daß der beste Vorläufer für den Stickstoff von Rifamycin der Amidstickstoff von Glutamin ist. Amino-DAHP könnte dann, möglicherweise durch die normalen Enzyme, durch die nächsten beiden Stufen des Shikimisäureweges geführt werden und das 5-Amino-Analogon **41** von 3-Dehydroshikimisäure bilden, das durch Enolisierung und Dehydratisierung 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure **33** ergeben würde. Dieses Schema ist selbstverständlich noch völlig spekulativ und bedarf der experimentellen Prüfung.

6.3. Acarbose

Der α-D-Glucosidase-Inhibitor Acarbose **42** (Abb. 22)^[133, 157] ist ein Pseudotetrasaccharid, das eine ungesättigte Cyclit-Einheit, Valienamin, und einen an Maltose geknüpften 6-Desoxyzucker enthält. Valienamin ist auch eine Komponente des Antibiotiums Validamycin A^[132, 158, 159]; seine mC₇N-Einheit soll, wie vorgeschlagen wurde, in derselben Weise wie die mC₇N-Einheiten der Ansamycine und Mitomycine gebildet werden^[131]. Allerdings unterscheidet sich das Substitutionsmuster von Valienamin beträchtlich von dem der anderen mC₇N-Einheiten, was auf die Möglichkeit einer unterschiedlichen Biosynthese hindeutet. In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Professor Pape an der Universität Münster haben wir diese Frage durch Fütterungsversuche mit [carboxy-¹³C]-3-Amino-5-hydroxybenzoesäure **33** und -3-Aminobenzoessäure **43** an Kulturen von *Actinoplanes* sp. SN 23/29 untersucht. Die NMR-Analyse der resultierenden Acarbose **42** ergab, daß

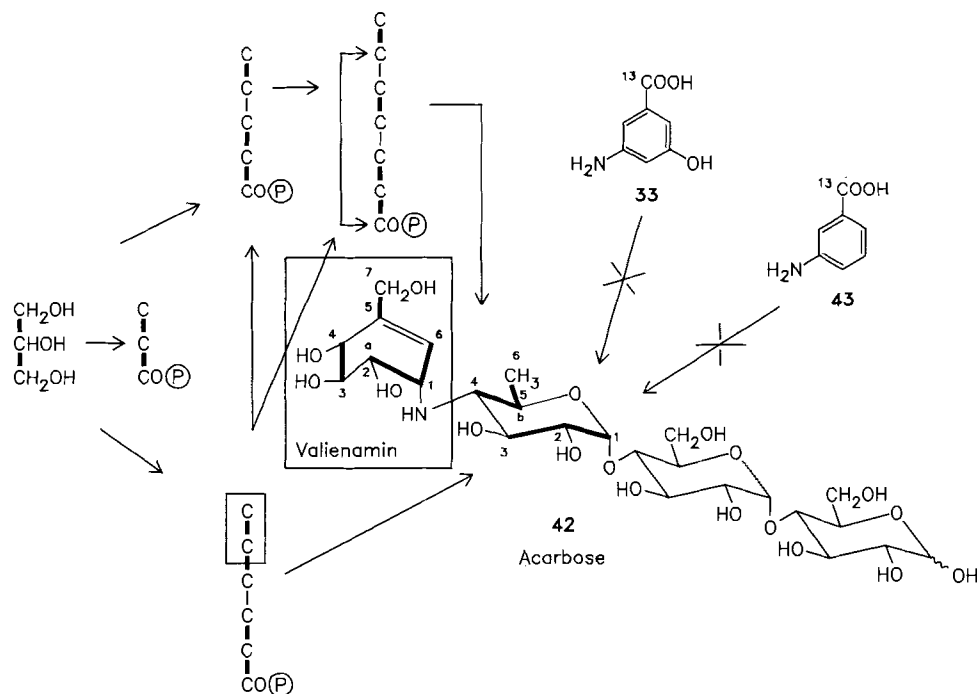


Abb. 22. Acarbose **42** mit ¹³C-¹³C-Kopplungsmuster und Bildungsweise aus [U-¹³C]₃Glycerin.

kein ^{13}C eingebaut worden war^[160]. Es scheint also tatsächlich ein anderer Biosyntheseweg zur mC_7N -Einheit von Acarbose zu führen. Um weitere Informationen zu erhalten, führten wir ein Fütterungsexperiment mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Glycerin}$ durch. Die Analyse der resultierenden Acarbose **42** mit verschiedenen Mehrquanten-2D-NMR-Techniken ergab das in Abbildung 22 angedeutete Markierungs- und Kopplungsmuster. Ganz besonders aussagekräftig war das Tripelquanten-2D-INADEQUATE-Spektrum (Abb. 23). Ein intensives Signal zeigte die Gegenwart dreier benachbarter ^{13}C -Kerne an, und zwar C-6, C-1 und C-2 des Valienaminteils. Die verbleibenden vier Kohlenstoffatome dieser mC_7N -Einheit stammen aus Glycerin; es handelt sich um zwei C_2 -Einheiten. Dieses Kopplungsmuster ist in Einklang mit der Bildung des Valienaminteils durch Cyclisierung einer Heptulose, die durch zwei aufeinanderfolgende

Übertragungen von C_2 -Einheiten durch Transketolase auf ein Triosephosphat gebildet wird (Abb. 22). Rinehart et al.^[161] haben unabhängig davon die gleiche Bildungsweise für den Valienaminteil des Antibiotikums Validamycin nachgewiesen.

6.4. Asukamycin und Manumycin

Manumycin **44** (Abb. 24), ein Metabolit von *Streptomyces parvulus*^[120, 121, 162], und Asukamycin **6** (vgl. Abb. 2)^[37, 38] enthalten beide eine mC_7N - und eine C_5N -Einheit. Zwischen diesen Einheiten befindet sich eine kurze Polyenkette mit terminalen Carboxygruppen, die amidartig an die Stickstoffatome der mC_7N - und C_5N -Einheiten gebunden sind. Die Polyketid-Herkunft dieser Polyketten wurde für Manumycin **44** von Thiericke und Zeeck^[163] und für Asukamycin **6** in unserem Laboratorium^[43] nachgewiesen. Wie in Abbildung 24 gezeigt, wird eine der Polyketidketten in beiden Antibiotica durch den exocyclischen Kohlenstoff der mC_7N -Einheit initiiert, der daher vermutlich zu irgendeinem Zeitpunkt die Oxidationsstufe einer Carboxygruppe gehabt haben muß. Für die andere Polyketidkette dient Acetat bei Manumycin und Cyclohexancarbonsäure bei Asukamycin als Starter-Einheit (siehe Abschnitt 3); dabei liegen beide wahrscheinlich als Coenzym-A-ester vor.

6.4.1. Herkunft der mC_7N -Einheit

Angesichts der Entstehung der mC_7N -Einheiten der Ansamycin- und Mitomycin-Antibiotica aus 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure **33** verfütterten wir diese Verbindung, mit ^{13}C in der Carboxygruppe markiert, an *Streptomyces nodosus* subspecies *asukaensis* und an *Streptomyces parvulus*. Ein signifikanter Einbau von ^{13}C war weder in Asukamycin **6** noch in Manumycin **44** nachzuweisen^[164]. Ebenso wurde $[\text{carboxy-}^{13}\text{C}]\text{-3-Aminobenzoesäure}$ **43** nicht in Manumycin eingebaut; der Zusatz größerer Anteile **43** zur Fermentation bewirkte jedoch die Bildung einer neuen Verbindung, die einen einfachen Benzolring anstelle des sechsgliedrigen Ringes von **44** enthält^[165]. Fütterungsversuche mit ^{13}C -markiertem Acetat zeigten spezifischen Einbau zweier Acetatmoleküle in die mC_7N -Einheiten von **6** und **44** in einer „Schwanz-Schwanz“-Anordnung (Abb. 24), wobei vier der sieben Kohlenstoffatome dieser Einheit markiert wurden^[163, 164]. Ein solcher Einbau von Acetat in die mC_7N -Einheit ist über den Shikimisäureweg nicht erklärbar, und daher legen diese Ergebnisse einen völlig anderen Ursprung der mC_7N -Einheiten nahe. Um die Herkunft der drei verbleibenden Kohlenstoffatome zu untersuchen, führten wir wiederum Versuche mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Glycerin}$ durch. Eine umfassende Analyse der Kopplungsmuster in den resultierenden Verbindungen **6** und **44** ergab, daß ein intaktes Glycerinmolekül in C-1 bis C-3 eingebaut wird, wenn auch mit etwas geringerer Anreicherung, als sie beim Einbau von Acetat in die anderen vier Kohlenstoffatome der mC_7N -Einheit gefunden wurde^[164]. Dieses Muster ist in der Tat anders als das für den Glycerin-Einbau über den Shikimisäureweg vorhergesagte: zwei benachbarte koppelnde $^{13}\text{C}_3$ -Segmente und ein angereichertes

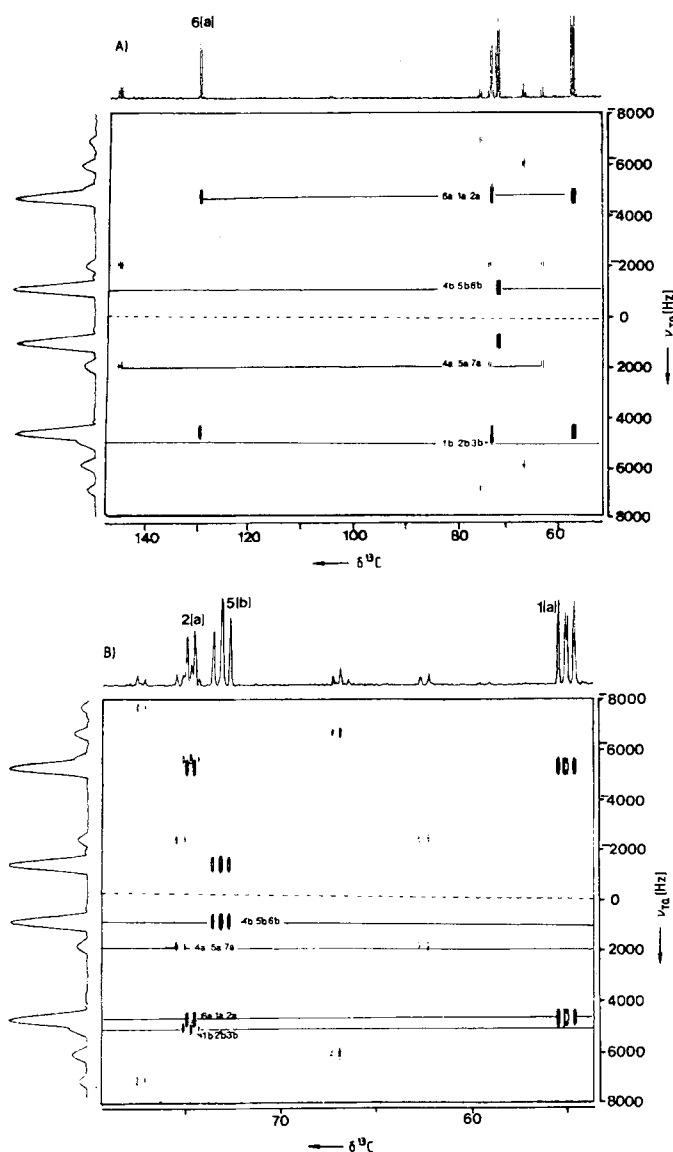


Abb. 23. Tripelquanten-2D-INADEQUATE-Spektrum von Acarbose **42**, biosynthetisch aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Glycerin}$ hergestellt. A) Vollständiges 125 MHz-Spektrum, B) F2-gespreiztes Spektrum. Die Spektren sind symmetrisch um die ($\nu_{\text{IQ}} = 0$)-Achse (gepunktete Linie). Signale mit der gleichen TQ-Frequenz stammen von drei koppelnden, unmittelbar benachbarten ^{13}C -Kernen. Einige der schwächeren Signale, z. B. 4a 5a 7a, sind auf statistische Kopplungen über eine der Bindungen zurückzuführen, wie durch das Doppelquanten-2D-INADEQUATE-Spektrum bestätigt wurde. (Mit „a“ sind die C-Atome im Valienamin- und mit „b“ im anschließenden Zuckerteil gekennzeichnet.)

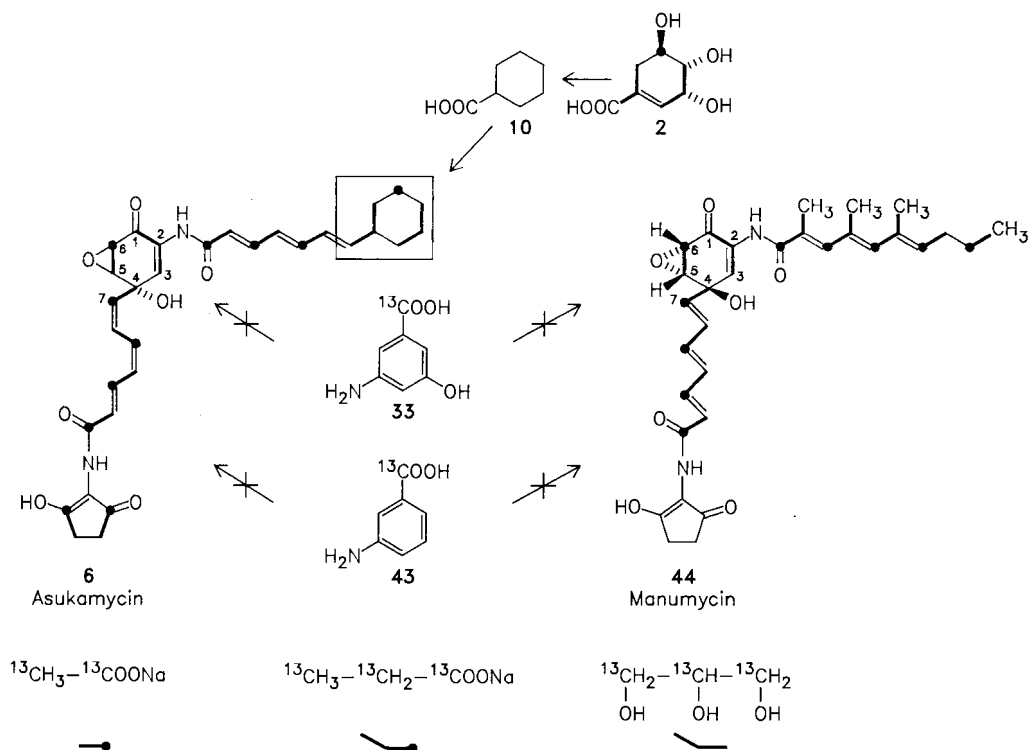


Abb. 24. Biosynthetische Markierungsmuster von Asukamycin 6 und Manumycin 44.

Kohlenstoffatom ohne signifikante ^{13}C - ^{13}C -Kopplung. Das letztere Muster wurde jedoch im Cyclohexanring und dem benachbarten Kohlenstoffatom von Asukamycin 6 gefunden.

Die „Schwanz-Schwanz“-Verknüpfung der beiden Acetatmoleküle in der mC_7N -Einheit von Asukamycin und Manumycin läßt vermuten, daß diese vier Kohlenstoffatome aus einer Dicarbonsäure mit vier Kohlenstoffatomen stammen, die im Citronensäurecyclus erzeugt worden ist. Diese Ansicht wird durch ein Fütterungsexperiment mit $[1,4\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Bernsteinsäure gestützt, das einen geringen, aber spezifischen Einbau in C-6 und C-7 von Asukamycin zeigte^[166]. Die relativ niedrige Anreicherung beruht nach aller Wahrscheinlichkeit auf dem intensiven Stoffwechsel der Bernsteinsäure über den Citronensäurecyclus. Ein näherer Vorläufer der drei intakt aus Glycerin eingebauten Kohlenstoffatome der mC_7N -Einheit wurde noch nicht identifiziert. Ein Fütterungsversuch mit DL- $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ Serin ergab keinen nachweisbaren Einbau in C-1 oder C-3 von 6. Ähnliche Ergebnisse wurden mit 44 erhalten^[167].

Aus diesen Resultaten geht hervor, daß bei der Biosynthese der mC_7N -Einheit dieser Antibiotica wiederum ein völlig anderer Weg als bei der Biosynthese der Ansamycin- und Mitomycin-Antibiotica einerseits und der Valienamin-Einheit von Acarbose 42 und Validamycin andererseits beschrieben wird. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Details dieses neuen Biosyntheseweges aufzuklären. Die Herkunft einer weiteren mC_7N -Einheit, eines Strukturelementes des Antibioticums Kinamycin, wurde von Gould et al. untersucht. In diesem Fall wird die mC_7N -Einheit aus Acetat über den Polyketidweg gebildet^[168]. Alle diese Befunde zusammen zeigen klar, daß die biosynthetischen Ähnlichkeiten zwischen den mC_7N -Einheiten nicht so groß sind, wie die strukturellen Vergleiche ursprünglich angedeutet hatten.

6.4.2. Herkunft der C_5N -Einheit

Eine Betrachtung der Struktur der C_5N -Einheit (2-Amino-3-hydroxycyclopent-2-enon) in Manumycin 44 und Asukamycin 6 zeigt sofort, daß sie alle Kohlenstoff-, Wasserstoff-, Stickstoff- und Sauerstoffatome der 5-Aminolävulinsäure 45 abzüglich eines Moleküls Wasser enthält. Bei Arbeiten mit der Asukamycin-Fermentation testeten wir die Idee, daß die C_5N -Einheit durch intramolekulare Cyclisierung von 45 entsteht^[169]. Damit übereinstimmend ergab $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ Glycin spezifischen Einbau bis zu 20%, während $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ Glycin unter vergleichbaren Bedingungen neunmal geringere Einbauraten zeigte. Der Einbau der intakten C_5N -Einheit von Glycin wurde durch Verfütterung von $[2\text{-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ Glycin gezeigt; das ^{13}C -NMR-Signal für C-2 der C_5N -Einheit bei $\delta = 115.4$ wurde durch das benachbarte ^{15}N in ein Dublett aufgespalten. $[1,4\text{-}^{14}\text{C}]$ Bernsteinsäure wurde nur schwach eingebaut (spezifischer Einbau 0.3–0.6%), was möglicherweise die Citronensäurecyclus-Aktivität in diesem Organismus widerspiegelt. Die Fütterungsversuche mit $[^{13}\text{C}]$ Acetat und $[^{13}\text{C}]$ Glycerin (Abb. 24) erhärteten die Ansicht, daß die Kohlenstoffatome 3, 4, 5 und 1 der C_5N -Einheit aus Bernsteinsäure stammen. Zwei Moleküle Acetat wurden in einer „Schwanz-Schwanz“-Anordnung in diese vier Kohlenstoffatome eingebaut; die Carboxygruppen bilden die Kohlenstoffatome 1 und 3. Schließlich zeigten Fütterungsversuche mit 5-Amino- $[5\text{-}^{14}\text{C}]$ lävulinsäure 45 deutlichen Einbau (spezifischer Einbau 0.2–2.2%) trotz der Tatsache, daß diese Verbindung die Bildung von Asukamycin 6 hemmt und sich während der Fermentation in erheblichem Maße zersetzt.

Aufgrund dieser Resultate schlugen wir vor^[169], daß die 2-Amino-3-hydroxycyclopent-2-enon-Einheit aus Succinyl-CoA und Glycin (1:1) entsteht. Unter Decarboxylierung von Glycin wird 5-Aminolävulinsäure 45 gebildet,

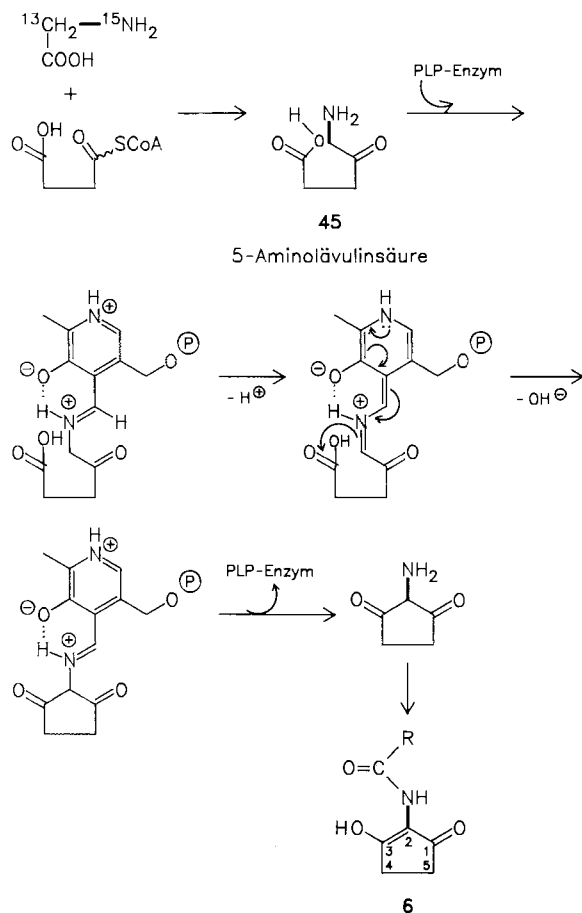


Abb. 25. Vorgeschlagener Mechanismus für die Bildung der C₅N-Einheit von Asukamycin **6** über 5-Aminolävulinsäure **45**.

die intramolekular cyclisiert. Abbildung 25 zeigt einen plausiblen Mechanismus für diese Reaktion, bei dem eine Pyridoxalphosphat(PLP)-Katalyse angenommen wird, um ein Carbanion an C-5 zu erzeugen, das den Carboxykohlenstoff angreift.

6.5. Reduotomycin

Wir wollten die an Asukamycin **6** nachgewiesene biosynthetische Herkunft der C₅N-Einheit an einem anderen Beispiel verifizieren und wählten dafür das Antibiotikum Reduotomycin **46** (Abb. 26). Die Struktur dieses Antibiotikums, eines Metaboliten von *Streptomyces xanthochromogenus*, war Gegenstand einiger Kontroversen^[120, 170, 171], die durch eine Totalsynthese zugunsten von Struktur **46** entschieden wurden^[172]. Fütterungsversuche mit ¹⁴C-markierten Vorläufern ergaben ähnliche Resultate wie für die C₅N-Einheit von Asukamycin **6**^[173]. [2-¹⁴C]Glycin, aber nicht [1-¹⁴C]Glycin, wurde sehr gut in **46** eingebaut, und sowohl [1-¹⁴C]Bernsteinsäure als auch 5-Amino-[5-¹⁴C]ävalinsäure **45** wurden signifikant, aber weniger gut als [2-¹⁴C]Glycin eingebaut.

Einen eindeutigen Beweis für die direkte Abstammung der 2-Amino-3-hydroxycyclopent-2-enon-Einheit aus einem intakten Molekül 5-Aminolävulinsäure **45** erhielt man durch Verfütterung von **45**, das mit ¹³C in den Positionen 4 und 5 doppelt markiert war. Das ¹³C-NMR-Spektrum des resultierenden Reduotomycins **46** zeigte ausschließlich Markierung in den Kohlenstoffatomen 1, 2 und 3 der C₅N-Einheit. C-2 war doppelt so stark wie C-1 und C-3 an-

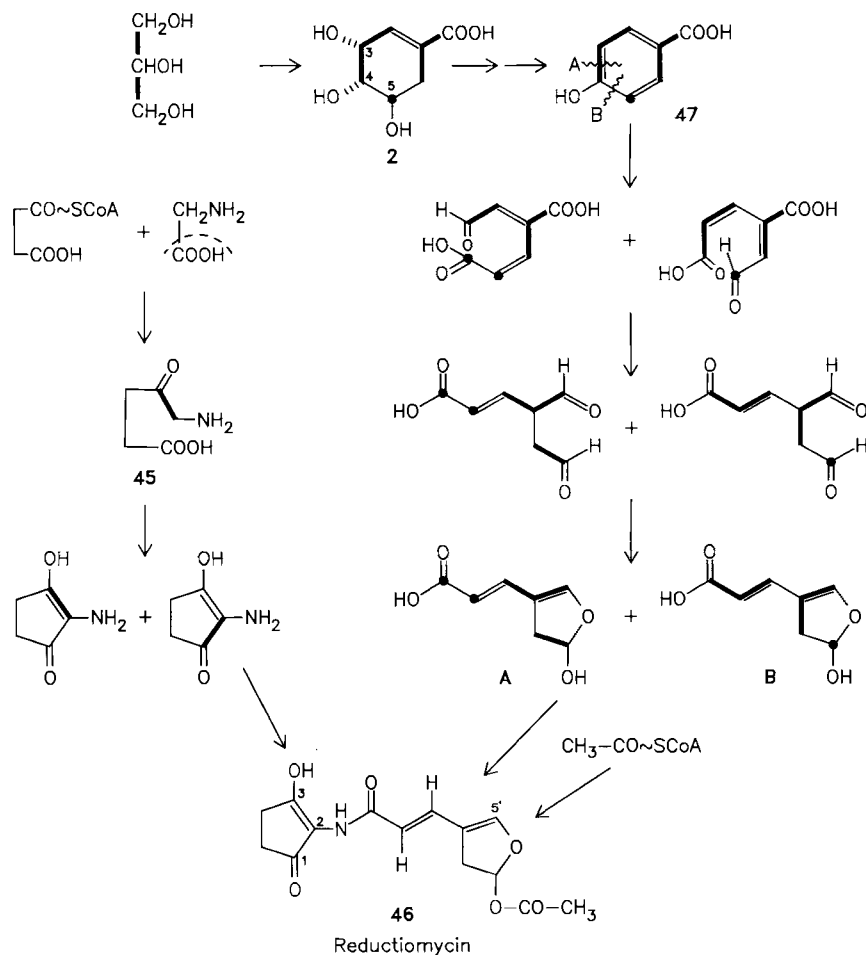


Abb. 26. Biosynthese des Antibiotikums Reduotomycin **46**. A und B entstehen durch Spaltung von **47** bei A bzw. B.

gereichert; in der Hälfte der markierten Moleküle koppelte C-2 an C-1 und in der anderen Hälfte an C-3. Die Einbaumuster von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat und $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ Glycerin waren mit der Bildung der C_5N -Einheit durch intramolekulare Cyclisierung von 5-Aminolävulinsäure **45** völlig in Einklang^[173].

Die Herkunft der verbleibenden neun Kohlenstoffatome von **46** war weniger offensichtlich. Eine Betrachtung der Struktur deutete die Möglichkeit an, daß die gesamte C_9 -Anordnung, einschließlich der Acetoxygruppe, durch Ringspaltung von Tyrosin oder einem seiner Derivate und anschließende Baeyer-Villiger-Oxidation entstanden sein könnte. Diese Idee wurde jedoch rasch widerlegt, als man fand, daß $[1-^{14}\text{C}]$ Tyrosin nicht eingebaut wurde und $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat eine hohe Anreicherung und Kopplung in der Acetoxygruppe gab. Der Ursprung der verbleibenden sieben Kohlenstoffatome, die die Dihydrofuranacrylsäure-Einheit bilden, wurde wiederum in einem Fütterungsexperiment mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ Glycerin untersucht^[173]. Der Einbau von drei C_2 -Bausteinen aus Glycerin in die drei aus Acetat/Succinat stammenden Teile des Reductionmycin-Moleküls wurde schnell nachgewiesen. Die sieben Kohlenstoffatome der Dihydrofuranacrylsäure-Einheit zeigten jedoch ein sehr komplexes Kopplungsmuster. Durch ein 2D-IN-ADEQUATE-Experiment und nachfolgende Simulation der Spektren wurde dies als Überlagerung zweier Kopplungsmuster entschlüsselt, von denen jedes in der Hälfte der markierten Moleküle auftritt (Abb. 26). Eine Hälfte (vgl. **B**) enthielt zwei intakte Moleküle Glycerin sowie ein einzelnes angereichertes, aber nicht koppelndes Kohlenstoffatom, und die andere Hälfte (vgl. **A**) ein C_3 - und ein C_2 -Segment sowie zwei einzelne angereicherte, aber nicht koppelnde Kohlenstoffatome. Das Kopplungsmuster in **B** erinnert unmittelbar an eine Biosynthese über den Shikimisäureweg. Die Spaltung von Shikimisäure **2** zwischen C-4 und C-5 würde das beobachtete Muster ergeben. Das Muster in **A** würde aus einer Spaltung zwischen C-3 und C-4 resultieren. Die Ergebnisse deuteten also an, daß die Dihydrofuranacrylsäure durch Ringspaltung einer symmetrischen Verbindung entsteht, die aus Shikimisäure **2** gebildet wird. Ein logischer Kandidat wäre 4-Hydroxybenzoesäure **47** oder der entsprechende Aldehyd. Der experimentelle Test dieser Idee durch Verfütterung von 4-Hydroxy- $[\text{carboxy}-^{13}\text{C}]$ benzoesäure **47** an *Streptomyces xanthochromogenus* ergab **46** mit 64% ^{13}C ausschließlich in der erwarteten Position C-5^[173]. Weitere Versuche legen nahe, daß die Ringspaltung auf der Stufe des Aldehyds stattfindet.

7. Benzoisochromanchinon-Antibiotica

7.1. Einführung

1947 berichteten Brockmann und Pini^[174] über die Isolierung eines tiefroten, kristallinen Pigments aus Kulturen eines Actinomyceten. Diese Verbindung, Actinorhodin **55**, war der erste Vertreter einer relativ großen Familie von Antibiotica, die als gemeinsames Strukturelement ein disubstituiertes tricyclisches Benzoisochroman-Grundgerüst **48** haben (Abb. 27)^[175]. Zusätzliche gemeinsame Strukturmerkmale sind Sauerstofffunktionen an C-11 und C-13,

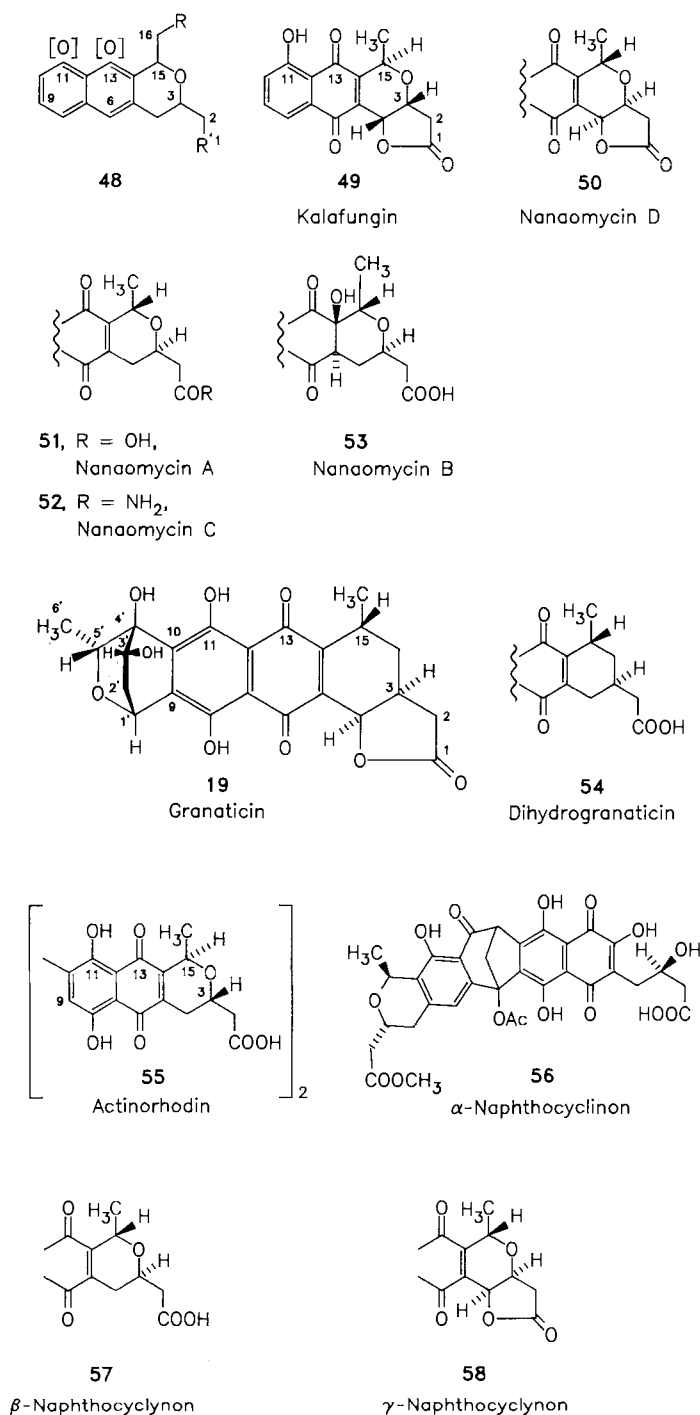


Abb. 27. Einige Benzoisochromanchinon-Antibiotica (Grundgerüst: **48**) und verwandte Antibiotica.

eine Chinonfunktion in einem der aromatischen Ringe und die Abwesenheit einer Sauerstofffunktion an C-9. Die Wasserstoffatome an den beiden gemeinsamen Chiralitätszentren, C-3 und C-15, nehmen *trans*-Stellung zueinander ein. Streptomyceten können entweder Verbindungen der 15*R*-(A-Reihe, Actinorhodin, Kalafungin) oder der 15*S*-Konfiguration (G-Reihe, Granaticin, die Nanaomycine und die Naphthocyclinone) produzieren. Zumindest in einem Fall^[176] konnte gezeigt werden, daß dieselbe Kultur Verbindungen beider enantiomerer Reihen produziert.

Wie schon früher zusammengefaßt^[177], lassen sich die Benzoisochromanchinon-Antibiotica wie folgt einteilen: einfache Monomere, C-16-modifizierte Monomere, Koh-

lenhydrat-modifizierte Monomere und Dimere. Die einfachen Monomere werden durch Kalafungin (**49**), einen Metaboliten aus *Streptomyces tanashiensis*^[178, 179], und die Nanaomycine **50–53**, die aus *S. rosa* var. *notoensis* isoliert wurden, repräsentiert (Abb. 27)^[180–186]. Die meisten dieser Verbindungen zeigen eine ausgeprägte Aktivität gegen gram-positive Bakterien und Mycoplasmen und eine gute fungicide Aktivität^[181]; Nanaomycin A **51** wurde in Japan zur Behandlung der Ringelflechte bei Rindern zugelassen. Beispiele für Kohlenhydrat-modifizierte Monomere sind Granaticin **19** und seine Derivate. Diese wurden zuerst aus *S. olivaceus*^[54] isoliert, konnten aber auch aus anderen *Streptomyces*-Arten erhalten werden^[55–58]. Die Struktur von Granaticin **19** (Abb. 27) wurde mit spektroskopischen Methoden^[59] und durch eine Röntgenstrukturanalyse^[60] aufgeklärt. Granaticin kommt neben anderen Derivaten zusammen mit Dihydrogranaticin **54** vor, in dem der Lactonring geöffnet ist^[57].

Das einfachste dimere Benzoisochromanchinon, Actinorhodin **55** (Abb. 27)^[187–189] aus *S. coelicolor*, ist ein intensiv farbiger Indikator, rot im sauren, blau im alkalischen pH-Bereich. Stärker modifizierte Dimere sind die Naphthocyclinone aus *S.-arenae*-Kulturen. Die Strukturen dieser Verbindungen wurden aus umfassenden spektroskopischen Studien^[190–192] und einer Röntgenstrukturanalyse^[193] abgeleitet. Mengenmäßig herrscht α -Naphthocyclinon **56** vor (Abb. 27), dem im Unterschied zu allen anderen Naphthocyclinonen zwei Kohlenstoffatome im „östlichen“ Teil des Moleküls fehlen.

7.2. Bildung des Polyketidgerüsts

Fütterungsversuche mit ^{13}C -markiertem Acetat und Malonat haben eindeutig gezeigt, daß das Grundgerüst der Benzoisochromanchinon-Antibiotica aus acht Acetat/Malonat-Einheiten über den Polyketidweg aufgebaut wird. In Abbildung 28 ist das Markierungsmuster gezeigt, das sich für Nanaomycin A **51**^[182], Actinorhodin **55**^[194] und Granaticin **19**^[61, 195] ergibt. Das biosynthetische Markierungsmuster wurde in zwei Fällen benutzt, um feine strukturelle Unklarheiten zu beseitigen. *Omura* et al. plazierten die Hydroxygruppe in Nanaomycin A an C-11 und nicht an C-8, weil sie an ein durch $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat^[182] angereichertes Kohlenstoffatom gebunden ist. Wir zeigten, daß die beiden Monomereinheiten in Actinorhodin **55** über C-10 verknüpft sind, das durch die Methylgruppe von Acetat markiert wurde^[194]. Ein Fütterungsversuch mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat bewies für **55**, daß alle acht Acetat-Einheiten intakt in jede Monomer-Einheit eingebaut werden^[194]. Bei α -Naphthocyclinon **56** ergaben ^{13}C -markiertes Acetat und Malonat ein Anreicherungsmuster (Abb. 29), das deutlich zeigt, daß dieses Molekül aus zwei Polyketidketten und einer zusätzlichen Acetat-Einheit aufgebaut wird, die die Acetoxygruppe bildet^[196]. Die Beteiligung zweier Polyketidketten folgt besonders daraus, daß zwei direkt verknüpfte Kohlenstoffatome nahe der Methanobrücke beide von C-2 des Acetats stammen.

Nach weiteren Informationen über die Art des Zusammenbaus von Polyketidketten wurde bei Granaticin **19** gesucht. Dazu wurde das Schicksal der Methylwasserstoff- und der Carboxysauerstoffatome von Acetat in der biosyn-

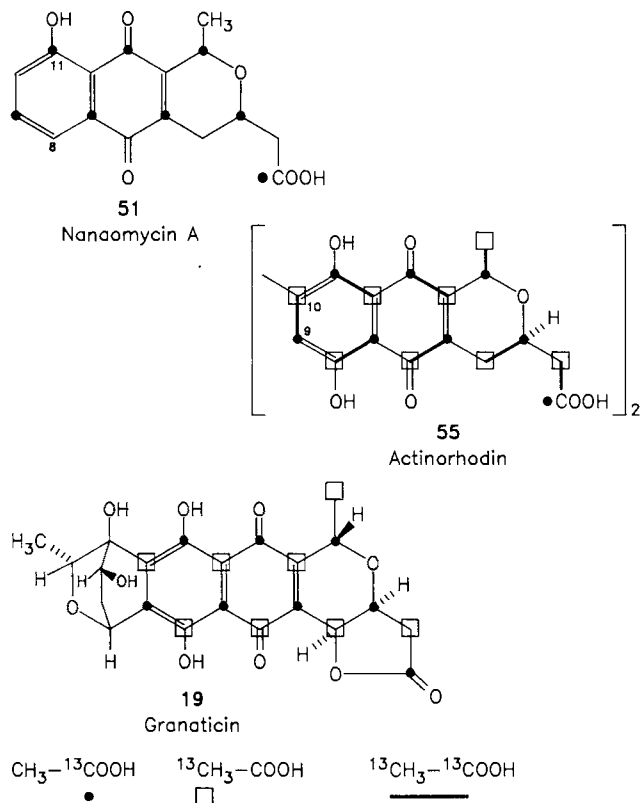


Abb. 28. Markierungs- und Kopplungsmuster von Benzoisochromanchinonen nach Verfütterung von ^{13}C -Acetat.

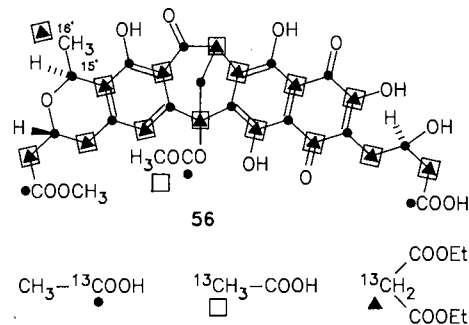


Abb. 29. Markierungsmuster von α -Naphthocyclinon **56** nach Verfütterung von ^{13}C -markiertem Acetat und Malonat.

thetischen Sequenz verfolgt^[197]. Die Analyse einer aus $[2-^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3]$ Acetat biosynthetisierten Probe von **19** durch $^{13}\text{C}\{^1\text{H}, ^2\text{H}\}$ -Tripel-Resonanz-NMR-Spektroskopie zeigte den Einbau jeweils eines Deuteriumatoms an C-2 und C-4 (Abb. 30). C-16 trägt maximal zwei, nicht drei Deuteriumatome. Diese Befunde deuten an, daß C-2 der Polyketidkette die Zwischenstufe eines Methinkohlenstoffs durchläuft, woraus der Ersatz eines der ursprünglichen Deuteriumatome durch ein normales Wasserstoffatom resultiert. Der Befund, daß die Methylgruppe der Starter-Einheit nur zwei und nicht drei Deuteriumatome enthält, ist höchst interessant. Es könnte eine triviale Erklärung geben, z.B. sehr schnelle Äquilibration zwischen Acetyl-CoA und Malonyl-CoA, doch wäre der Befund auch in Einklang mit der Möglichkeit, daß die Starter-Einheit nicht Acetyl-CoA, sondern Malonyl-CoA ist. Das entstandene Polyketid müßte vor der Abspaltung von der Synthese stereospezifisch decarboxyliert werden.

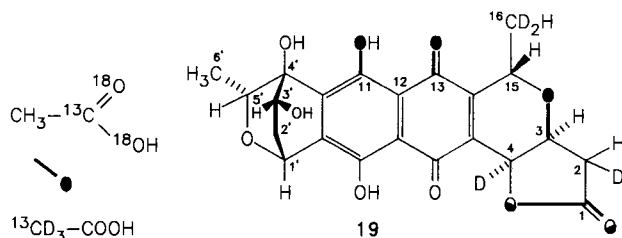


Abb. 30. Schicksal der Methylwasserstoff- und Carboxysauerstoffatome von Acetat bei der Biosynthese von Granaticin **19**.

Das Schicksal der Acetatsauerstoffatome wurde in einem Experiment mit $[1\text{-}^{13}\text{C},^{18}\text{O}_2]\text{Acetat}$ untersucht, und zwar durch anschließende ^{13}C -NMR-Analyse des Produktes mit der ^{18}O -Verschiebungsmethode. Dieser Versuch zeigte den Einbau von ^{18}O an C-1, C-11, C-13 und in den Pyranring (Abb. 30). Die ^{18}O -Verschiebung durch den Pyransauerstoff wurde nur für das ^{13}C -NMR-Signal von C-3, nicht für das von C-15 beobachtet, was beweist, daß dieses Sauerstoffatom von der C-3-Carbonylgruppe des Polyketids beigesteuert wird. Die ^{18}O -Verteilung zwischen dem Carbonyl- und dem Lactonsauerstoff an C-1 wurde nicht bestimmt, da die Granaticin-Probe für die Analyse zum Methylester von Dihydrogranaticin **55** (Abb. 27) umgesetzt worden war. Die ^{18}O -Anreicherung an C-1 dieses Deriva-

C_6 -Einheit ließ sich als eine 2,6-Didesoxyhexose identifizieren, deren Herkunft leicht zur Glucose zurückverfolgt werden konnte^[61]. Einzelheiten über die Umwandlung von Glucose in diese Didesoxyhexose-Einheit wurden in Abschnitt 4.1 erörtert.

Ein interessantes Problem ist die Verknüpfung des Zuckers, vermutlich in Form der TDP-4-Oxo-2,6-didesoxyhexose **59**, mit dem aromatischen System, denn der Vorgang verläuft völlig regiospezifisch. Diese Regiospezifität mag vom Erkennen des Substitutionsmusters am anderen Ende der aromatischen Einheit durch die Enzyme herrühren, die die erste CC-Bindung zur Zucker-Einheit erzeugen. In diesem Fall könnte sich zuerst die C-glycosidische Bindung zwischen C-1 des Zuckers und C-9 des Aglycons bilden (Weg A, Abb. 31). Als Alternative könnte die erste Bindung auf der Stufe eines aromatischen Vorläufers geknüpft werden, der an C-8 noch keinen Sauerstoff trägt (Weg B, Abb. 31). Dies würde bedeuten, daß die erste Bindung durch Aldolkondensation zwischen C-4 des Zuckers und C-10 (aktiviert durch die 11-Hydroxygruppe) des aromatischen Vorläufers zustandekommt. Hydroxylierung an C-8 und Schließung der C-glycosidischen Bindung vervollständigen dann die Struktur. Angesichts des Befundes (siehe Abschnitt 7.6), daß der Zucker auch dann regioselektiv angeknüpft wird, wenn die Konfiguration im Pyranring verändert ist, neigen wir eher zur Möglichkeit B.

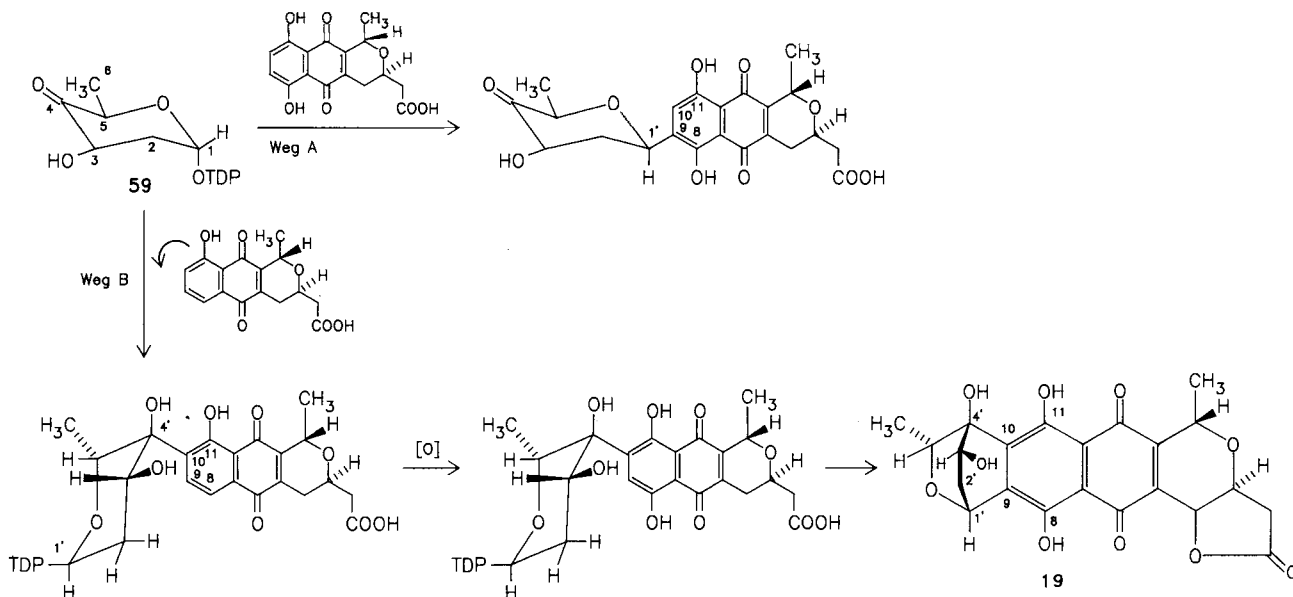


Abb. 31. Möglicher Mechanismus für die Anknüpfung der Zucker-Einheit an den aromatischen Teil von Granaticin **19**.

tes war ungefähr halb so groß wie in den drei anderen Positionen; dies ist mit dem Verlust des halben ^{18}O -Anteils während der Veresterung in Einklang. Dieses Resultat deutet die Retention von einem Sauerstoff am ursprünglichen C-1 von Granaticin **19** an. Hieraus folgt, daß bei der Bildung des Lactonringes von Granaticin aus der Carbonsäure kein ^{18}O verlorengeht^[197].

7.3. Bildung der Zucker-Einheit von Granaticin

In Granaticin **19** ist das über den Polyketidweg erhaltene Grundgerüst durch Anbau einer C_6 -Einheit an das aromatische System unter Bildung einer ungewöhnlichen, starren [2.2.2]-Anordnung modifiziert. Diese zusätzliche

7.4. Biosynthetische Beziehungen zwischen Benzoisochromanchinon-Antibiotica

Biosynthetische Beziehungen zwischen den Nanaomycinen haben Ōmura et al. untersucht^[198]. Unter Anwendung des Fettsäure-Synthase-Inhibitors Cerulenin^[199], der die *de-novo*-Polyketidbildung hemmt, inkubierten sie Kulturen von *S. rosa* var. *notoensis* mit jeweils einem Nanaomycin und beobachteten dessen Umwandlung oder Nichtumwandlung in andere Nanaomycine. Diese Versuche zeigten, daß die biosynthetische Reaktionssequenz in der Umwandlung von Nanaomycin D zu A zu E zu B besteht (Abb. 32). Alle drei Transformationen wurden auch im zellfreien System demonstriert^[200, 201]; Nanaomycin-

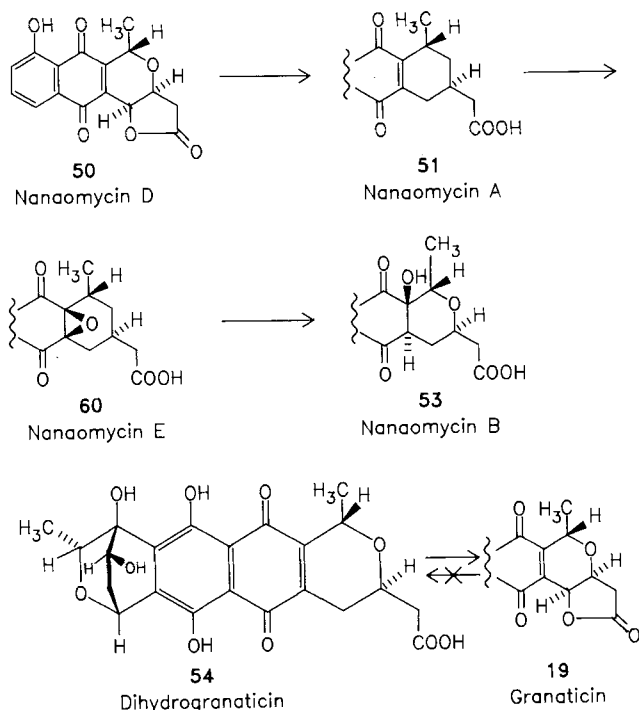


Abb. 32. Biosynthetische Beziehungen in der Nanaomycin- und Granaticin-Reihe.

D-Reduktase, das Enzym, das die erste dieser Reaktionen katalysiert, wurde gereinigt und etwas genauer untersucht^[201, 202]. Die Epoxidierung von Nanaomycin A zu E wird durch eine NADPH- und O₂-abhängige mischfunktionelle Oxygenase katalysiert^[200]. Nanaomycin-B-Synthase, die als erstes Enzym eine reduktive Epoxidöffnung

(von Nanaomycin E zu B) katalysiert, erfordert NADH oder NADPH^[200]. Nanaomycin-D-Reduktase, Katalysator der Transformation von Nanaomycin D zu A, ist ein Flavoprotein mit $M_r = 68\,000$, das FAD enthält und NADH als Reduktionsmittel benötigt^[201]. Die Reaktion, die durch dieses Enzym katalysiert wird, ist praktisch irreversibel; als Substrat können auch einige andere Benzoisochromanichinon-Antibiotica dienen, aber nicht Granaticin. Es ist bekannt^[57, 61, 184, 203], daß die Lactonformen der Benzoisochromanichinon-Antibiotica und ihre ringoffenen Dihydroformen chemisch leicht ineinander überführt werden können. Ein wahrscheinlicher Mechanismus für diese Umwandlungen ist in Abbildung 33 gezeigt. Die einzige Redoxreaktion in diesem System ist die gegenseitige Umwandlung von Chinon- und Hydrochinonform. Das Hydrochinon des

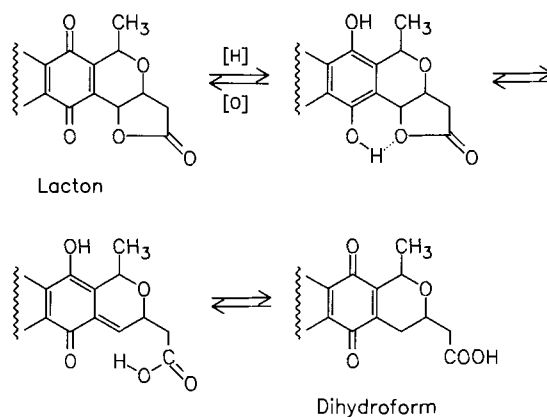


Abb. 33. Mechanismus der wechselseitigen Umwandlung der Benzoisochromanichinonlactone und ihrer ringoffenen Dihydroformen.

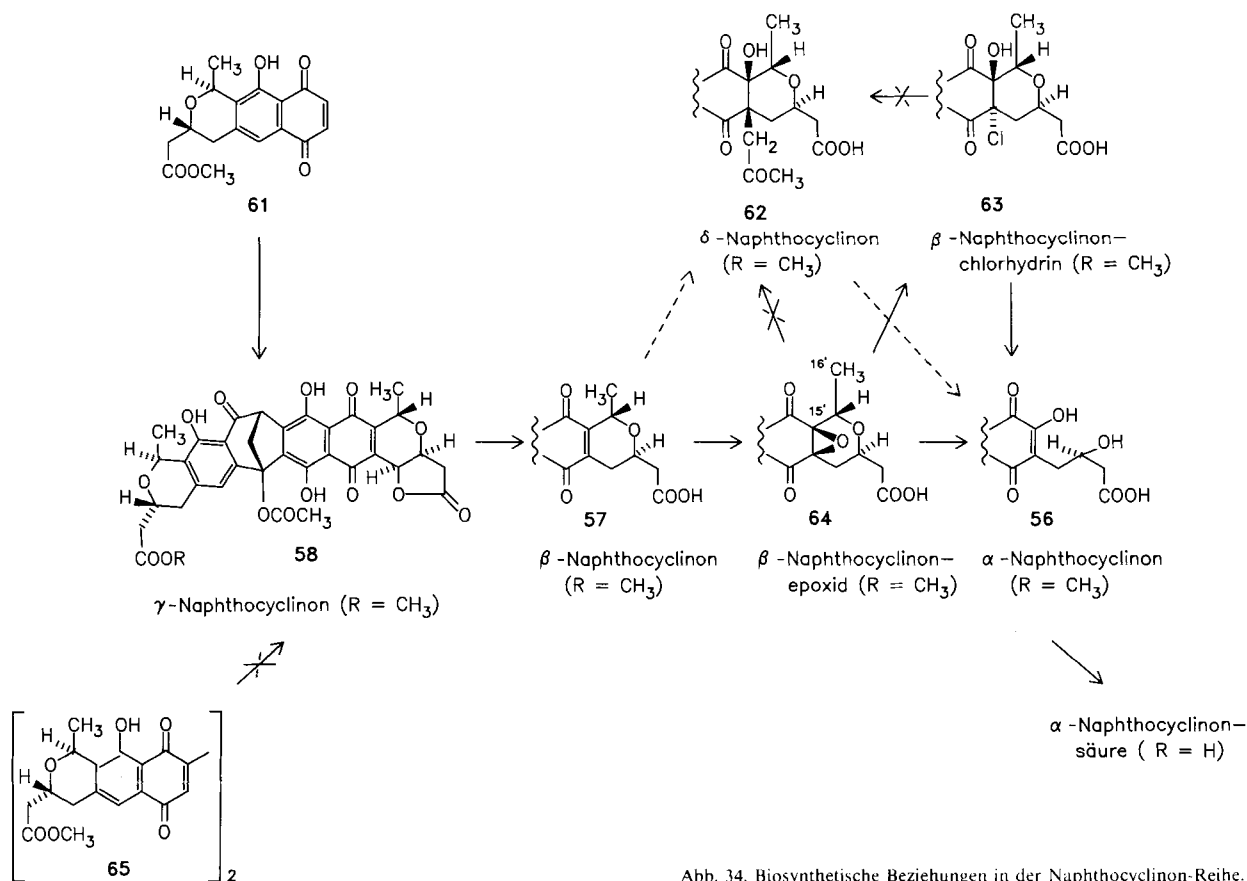


Abb. 34. Biosynthetische Beziehungen in der Naphthocyclin-Reihe.

Lactons steht dann im Gleichgewicht mit dem Chinon der ringoffenen Dihydroform. In Einklang mit dieser Ansicht zeigten Ômura et al.^[202], daß Nanaomycin-D-Reduktase tatsächlich eine NADH-Dehydrogenase ist, die Chinone als fakultative Elektronenacceptoren benutzt.

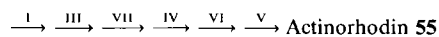
Die Entdeckung, daß in der Nanaomycin-Reihe die biosynthetische Sequenz vom Lacton **50** zur ringoffenen Dihydroform **51** verläuft, steht im auffallenden Gegensatz zu der Situation in der Granaticin-Reihe. Hier verläuft die biosynthetische Sequenz klar von Dihydrogranaticin **54** zu Granaticin **19** (Abb. 32). Dies ergibt sich aus der Reihenfolge des Auftretens beider Komponenten während der Fermentation^[57, 61] und aus der irreversiblen Umwandlung von **54** in **19** in Cerulenin-gehemmten Kulturen^[197] und in zellfreien Extrakten von *S. violaceoruber*^[61]. In Einklang mit dem in Abbildung 33 gezeigten Mechanismus ist die enzymatische Reaktion sauerstoffabhängig; ¹⁸O wird aber nicht in das Produkt eingebaut, wenn die Umwandlung unter ¹⁸O₂-Gas durchgeführt wird^[61].

In einer eingehenden Studie wurden die gegenseitigen Umwandlungen der Naphthocyclinone in *S. arenae* untersucht^[204]. Die ¹⁴C-markierten Naphthocyclinone wurden durch Biosynthese aus Natrium-[1-¹⁴C]acetat hergestellt und dann einzeln an *S. arenae*-Kulturen verfüttert. Die Verteilung der Radioaktivität zwischen den Naphthocyclinonen wurde nach 6 und 24 h Stoffwechsel analysiert. Die daraus abgeleiteten biosynthetischen Beziehungen sind in Abbildung 34 zusammengefaßt. Die wichtigste biosynthetische Reaktionssequenz (**58** → **57** → **64** → **56**) ähnelt derjenigen in der Nanaomycin-Reihe (**50** → **51** → **60** → **53**) und nicht in der Granaticin-Reihe (**54** → **19**, Abb. 32). Das Lacton γ-Naphthocyclinon **58** wird unter reduktiver Ringöffnung in β-Naphthocyclinon **57** umgewandelt, das anschließend zu **64** epoxidiert wird. Nebenreaktionen führen zu δ-Naphthocyclinon **62** und zum Chlorhydrin **63**. Der Hauptweg besteht in der Umwandlung des Epoxids **64** und/oder Chlorhydrins **63** in α-Naphthocyclinon **56** und weiter in α-Naphthocyclinonsäure, die Endprodukte dieses Biosyntheseweges. Der Hauptweg ist chemisch begünstigt; sowohl β-Naphthocyclinonepoxid **64** als auch das Chlorhydrin **63** reagieren unter Photolyse und Hydrolyse zu α-Naphthocyclinon. Nach einem wahrscheinlichen Mechanismus werden C-15' und C-16' als Acetaldehyd eliminiert^[192, 204]. Die Umwandlung von **57** in **62** ist recht unklar; über die Herkunft der drei zusätzlichen Kohlenstoffatome weiß man nichts. Schließlich wurden das „Monomer“ **61**, ein Abbauprodukt der Naphthocyclinone^[190, 191], und das „Dimer“ **65** in radioaktiv markierter Form verfüttert. Das Monomer wurde ungefähr viermal besser in die Naphthocyclinone eingebaut als das Dimer. Dies deutet an, daß **61** als Vorläufer der „westlichen Hälfte“ der Naphthocyclinone dient und die Dimerisierung entweder auf der Stufe eines Produktes stattfindet, das von **61** herührt, oder daß **61** und ein anderes Monomer ein unsymmetrisches Dimer bilden. Es sind jedoch mehr Daten erforderlich, um diesen Punkt zu klären.

7.5. Analyse des Actinorhodin-Biosynthesewegs mit blockierten Mutanten

Als Ergebnis der umfassenden Studien von Hopwood et al.^[205] ist *Streptomyces coelicolor* heute der genetisch am

besten charakterisierte Vertreter der *Streptomyces*-Gattung. Nach Etablierung einer ausführlichen Genkarte für diesen Organismus isolierten Rudd und Hopwood^[206] 76 Mutanten von *S. coelicolor*, die in der Biosynthese des Antibiotikums Actinorhodin **55** blockiert waren. Zur Selektion dieser Mutanten wurden die Kolonien kurzzeitig Ammoniakdampf ausgesetzt, da sich **55** im Basischen dunkelblau verfärbt; nicht-produzierende Mutanten verändern ihre Farbe nicht. Die genetische Analyse dieser blockierten Mutanten (*act*-Mutanten) zeigte, daß alle biosynthetischen Gene in einem engen Cluster auf dem *S. coelicolor*-Chromosom lokalisiert sind. Die 76 *act*-Mutanten wurden nach mehreren Kriterien, hauptsächlich einem Cosynthese-Test, in sieben Klassen eingeteilt. Für den Cosynthese-Test werden zwei verschiedene Mutantenkolonien nebeneinander auf einer Agarplatte angezogen; eine im Biosyntheseweg auf einer späteren Stufe blockierte Mutante (ein „Sekretor“) akkumuliert ein biosynthetisches Zwischenprodukt, das in den umgebenden Agar diffundiert und durch eine früher blockierte Mutante (einen „Konverter“) in **55** umgewandelt werden kann. Man beobachtet dann eine blaue Zone in der Konverter- an der Grenze zur Sekretorkolonie^[206]. Der Cosynthese-Test ermöglicht die Einordnung der sieben Mutantenklassen in eine biosynthetische Sequenz:



Den Mutanten der Klasse II kann keine Position in der Sequenz zugeordnet werden; wahrscheinlich sind sie regulatorische Mutanten. Die Mutanten der Klasse I und III sondern kein diffundierbares Zwischenprodukt ab; daher müssen sie in sehr frühen Schritten der Biosynthese blockiert sein.

Die Mutanten der Klassen VII, IV, VI und V dienen im Cosynthese-Test als Sekretoren. In unserem Laboratorium wurde versucht, die biosynthetischen Zwischenprodukte aus Mutanten zu isolieren, die diese Klassen repräsentieren (Abb. 35). Die Fraktionierung der Kulturextrakte wurde durch eine Variante des Cosynthese-Tests überwacht. Dazu wurden Filterpapier-Scheiben mit den zu untersuchenden Fraktionen getränkt und auf einen Rasen einer Konvertermutante gelegt. Die Bildung eines pigmentierten Hofes um die Papierscheibe zeigte die Anwesenheit des Zwischenproduktes in der Testfraktion an. Die Zwischenprodukte in zwei Klassen (VII und VI) konnten nachgewiesen, aber wegen ihrer Instabilität nicht isoliert werden^[207]. Die sehr große Mutantenklasse V erwies sich als genetisch heterogen und ergab, aus Vertretern zweier Unterklassen, zwei im Cosynthese-Test aktive Verbindungen, **70** und **49** (Kalafungin) (Abb. 35)^[208, 209]. Gestützt auf diese Strukturen und die Struktur von Verbindung **67** aus der Mutante B₁₇ (Klasse IV) sowie auf frühere Fütterungsversuche und mechanistische Extrapolationen wurde der in Abbildung 35 gezeigte hypothetische Stoffwechselweg für die Actinorhodin-Biosynthese postuliert. Insbesondere wird vorgeschlagen, daß die Dimerisierung auf der Stufe von Dihydrokalafungin **71** oder Kalafungin **49** stattfindet und die Einführung der 8-Hydroxygruppe der letzte Schritt der Reaktionsfolge ist. Dies erklärt die völlige Regiospezifität der Dimerisierung, ohne daß ein Enzym po-

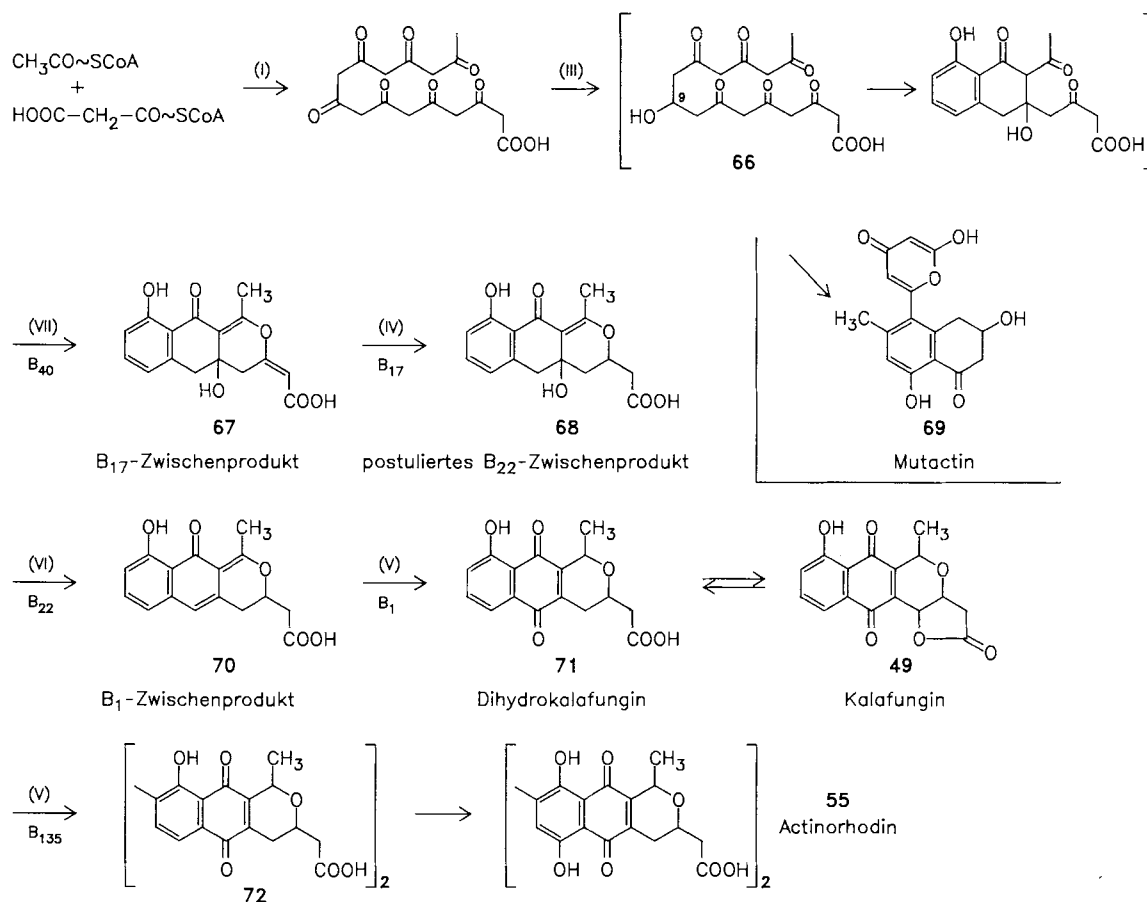


Abb. 35. Zwischenprodukte der Biosynthese von Actinorhodin 55, die aus blockierten Mutanten isoliert wurden, und ihre Anordnung in einem hypothetischen Biosyntheseweg zu 55.

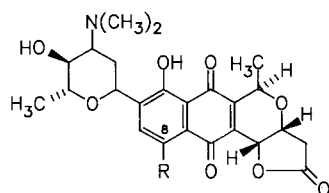
stuiert werden muß, das außerordentlich spezifisch die Struktur und Stereochemie in einer vom Reaktionszentrum weit entfernten Region des Substratmoleküls erkennt.

Die Mutante der Klasse VII, B₄₀, produziert erhebliche Mengen einer neuartigen Verbindung mit sechzehn Kohlenstoffatomen, Mutactin 69 (Abb. 35), die zwar kein Vorläufer von 55 ist, aber doch deutlich mit dessen Biosynthese in Beziehung steht. Die Struktur von 69 wurde durch Röntgenstrukturanalyse und spektroskopische Analyse aufgeklärt^[210]; sie kann durch eine alternative Cyclisierung des vermutlichen offenkettigen, an C-9 reduzierten Polyketidvorläufers 66 von Actinorhodin gebildet werden. Bemerkenswerterweise scheint Mutactin als Racemat vorzuliegen, worauf sowohl die Röntgenstrukturanalyse als auch das Fehlen einer optischen Drehung hindeuten. Ein Fütterungsversuch mit [1,2-¹³C₂]Acetat zeigte die Bildung von Mutactin 69 aus acht intakten Acetatmolekülen mit einem Kopplungsmuster, das völlig dem von Actinorhodin 55 entspricht. Es ist nicht ohne weiteres zu erklären, wie die enzymatische Reduktion einer Carbonylgruppe in einem nicht-symmetrischen Molekül letztlich zu einem racemischen Produkt führen kann oder wie dieses Chiralitätszentrum, falls es stereospezifisch gebildet wurde, anschließend racemisiert. Mutactin 69 wird auch in Spuren vom *S.-coelicolor*-Wildtyp gebildet, aber nicht von *act-I*- und *act-III*-Mutanten, denen die Polyketid-Synthase bzw. die Polyketid-Reduktase fehlt. Das deutet an, daß diese beiden Enzyme sowohl im Mutactin- als auch im Actinorhodin-Biosyntheseweg fungieren.

7.6. Neue Hybrid-Antibiotica

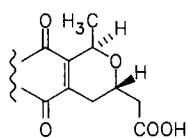
Nach Isolierung und Charakterisierung der *act*-Mutanten und der Entdeckung, daß alle Gene für die Biosynthese von Actinorhodin 55 in einem Cluster enthalten sind, gelang es *Malpartida* und *Hopwood*^[211], den gesamten Biosyntheseweg zu klonieren. Sie konstruierten ein Plasmid, pIJ2303, das ein DNA-Stück mit allen Actinorhodin-Biosynthesegenen enthält. Dies wurde dadurch gezeigt, daß dieses Plasmid den *act*-Mutanten aller Klassen komplementär war und daß seine Einführung dem Organismus *S. parvulus* die Fähigkeit zur Synthese von 55 verleiht, die er normalerweise nicht hat. Durch weitere Subklonierung ließ sich eine Reihe von Plasmiden mit verschiedenen Segmenten des biosynthetischen Genclusters für Actinorhodin konstruieren.

Dank der Verfügbarkeit dieser Gene konnte geprüft werden, ob die Genübertragung zwischen *Streptomyces*-Stämmen, die verschiedene, aber relativ ähnliche Antibiotica produzieren, zu neuen Naturstoffen führen kann. In einer Zusammenarbeit der Gruppen von *Omura* und *Hopwood* wurde der Medermycin-produzierende *Streptomyces* AM-7161 (Wildtyp) mit Plasmiden transformiert, die einige oder alle biosynthetischen Gene des Actinorhodin-Weges trugen. Drei Transformanten produzierten außer Medermycin 73 ein oder zwei neue Verbindungen, Mederrhodin A 74 und sein ringoffenes Dihydroderivat, Mederrhodin B 75 (Abb. 36)^[212,213]; diese Transformanten enthielten jeweils ein Plasmid mit dem Gen, das in der Klasse V fehlt.



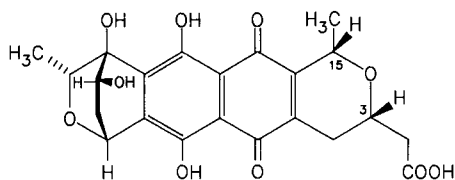
73, Medermycin (R = H)

74, Mederrhodin A (R = OH)



75

Mederrhodin B
(R = OH)



76

Dihydrogranatirhodin

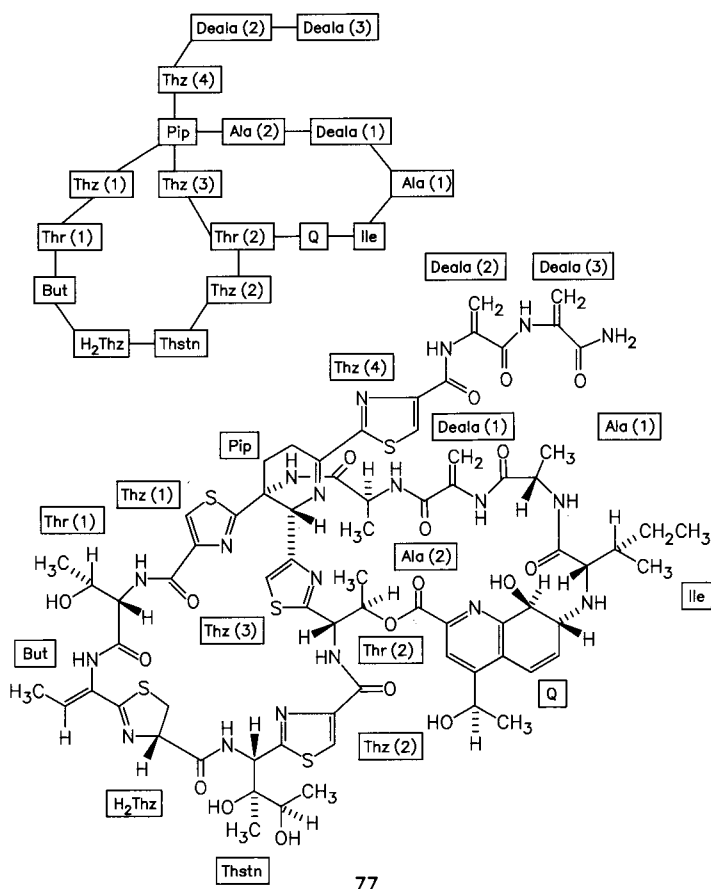
Abb. 36. Medermycin 73 und einige neue Hybrid-Antibiotica in der Benzisochroman-Reihe, die durch Gentechnologie erzeugt wurden.

Mederrhodin A 74 hat die gleiche Struktur wie Medermycin 73, enthält aber zusätzlich eine Hydroxygruppe an C-8, die für Actinorhodin 55 charakteristisch ist. In einer ähnlichen Zusammenarbeit mit unserem Laboratorium transformierten Hopwood et al. den Wildtyp des Granaticin-produzierenden *S. violaceoruber* und eine nicht-produzierende Mutante mit Plasmiden, die einige oder alle Actinorhodin-Biosynthesegene enthielten. Eine neue Verbindung, Dihydrogranatirhodin 76 (Abb. 36), wurde von der Transformante des Wildtyps mit dem Plasmid pIJ2303 produziert. Diese Verbindung hat dieselbe Struktur wie Dihydrogranaticin (54, Abb. 27), aber an C-3 oder C-15 die Konfiguration des Actinorhodins 55^[212].

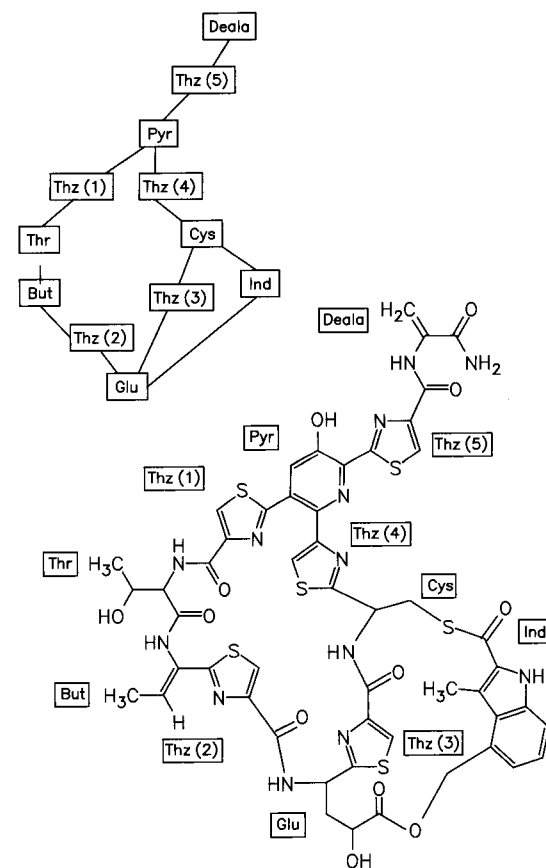
Die Mederrhodine und Dihydrogranatirhodin sind die ersten Beispiele für die Erzeugung neuer Hybrid-Antibiotica durch spezifische Genklonierung zwischen verschiedenen Spezies. Obwohl die erzielten Strukturmodifikationen nur gering sind, demonstrieren sie doch die Realisierbarkeit dieses Konzeptes; Anwendungsbreite und Grenzen müssen noch erforscht werden.

8. Thiopeptid-Antibiotica

Thiostrepton 77 (Abb. 37)^[214–217] und Nosiheptid 78, auch Multithiomycin genannt^[218–220], sind hochmodifizierte, schwefelhaltige Peptid-Antibiotica. Sie gehören zu einer Familie von ungefähr zwanzig Verbindungen, die alle Thiazolringe enthalten und daher auch als Thiopeptid-Antibiotica bezeichnet werden. Die Strukturen wurden durch Kombination von chemischen Abbaureaktionen und Röntgenstrukturanalysen aufgeklärt. Die meisten Mitglieder dieser Familie haben ein gemeinsames Grundgerüst. Es handelt sich um einen Makrocyclus mit vier Thiazolringen und einem Pyridin- oder reduzierten Pyridinring, einer Seitenkette mit einem weiteren Thiazolring und ein oder zwei Dehydroalanineinheiten sowie einer zusätzlichen „Schleife“ mit variabler Struktur. In Einklang mit dieser gemeinsamen Architektur wirken 77 und 78 auf gleiche Weise gegen gram-positive Bakterien; beide werden an die ribosomale 50S-Untereinheit gebunden^[221, 222] und hemmen dabei die Funktionen der Elongationsfaktoren Tu und G^[222].



77



78

Abb. 37. Thiostrepton 77 und Nosiheptid 78. Thstn = Thiostreptin-Rest, Q = Chinaldinsäure-Vorläufer, H₂Thz = Dihydrothiazol-Rest, Thz = Thiazol-Rest, Pip = Dehydropiperidin-Rest.

Resistenz gegen diese Antibiotica ist das Ergebnis der Methylierung einer bestimmten Position auf der 23S-rRNA durch eine spezifische Methylase, was die Bindung der Antibiotica verhindert^[222]. Nosiheptid **78** wird in Europa kommerziell als Futterzusatz verwendet, der die Gewichtszunahme bei Hühnern beschleunigt^[223]; in Japan wurde die Anwendung zu diesem Zweck genehmigt. Thiostrepton findet kommerziell keine Anwendung, wird aber ausgiebig als Werkzeug in der molekularbiologischen Forschung gebraucht. Sowohl **77** als auch **78** enthalten ungewöhnliche Strukturelemente, die uns zur Untersuchung ihrer Biosynthese veranlassen.

8.1. Biosynthese von Nosiheptid

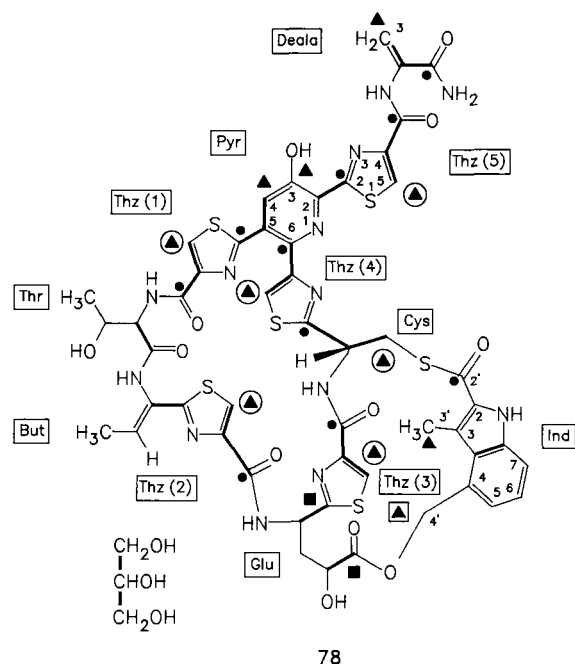
Da Nosiheptid **78** offensichtlich ein modifiziertes Peptid ist, wurde in einleitenden Fütterungsversuchen mit *S. actuosus* der Einbau einer Reihe ¹⁴C-markierter Aminosäuren untersucht. Sehr gut eingebaut wurden L-[U-¹⁴C]Threonin, L-[U-¹⁴C]Cystein, L-[U-¹⁴C]Serin, L-[methyl-¹⁴C]Methionin, L-[3'-¹⁴C]- und DL-[7a-¹⁴C]Tryptophan, nicht eingebaut wurden L-[U-¹⁴C]Alanin und L-[1'-¹⁴C]Phenylalanin^[224]. Als Basis für die weiteren Versuche mit ¹³C-markierten Vorläufern wurden alle einundfünfzig Signale im ¹³C-NMR-Spektrum von Nosiheptid **78** eindeutig zugeordnet. Die Zuordnung ging aus von früheren Arbeiten von *Lukacs et al.*^[218] und basiert auf der Theorie der chemischen Verschiebung sowie auf Multiplizität, ¹H-¹³C-Korrelationen, Fernkopplungen, Kern-Overhauser-Effekten und Mehrquanten-Spektroskopie von mehrfach ¹³C-angereicherten Proben^[225-227].

Die Markierungs- und Kopplungsmuster, die nach Fütterung verschiedener ¹³C-markierter Vorläufer in **78** beobachtet wurden, sind in Abbildung 38 dargestellt. Die spezi-

fische Markierung der Dehydroalanin-Einheit durch L-[3-¹³C]Serin und DL-[1-¹³C]Serin, aber nicht durch DL-[3-¹³C]Cystein zeigt an, daß die Dehydroalanin-Einheit spezifisch durch Dehydratisierung von Serin entsteht^[228]. Dies ist mit der Herkunft der Dehydroalanin-Einheiten in Berninamycin vergleichbar, wie *Pearce* und *Rinehart* zeigten^[229,230]. Die fünf Thiazolringe sollten aus einem Molekül Cystein und der Carboxygruppe einer anderen Säure oder Aminosäure entstehen. Diese Annahme wurde bestätigt, da DL-[3-¹³C]Cystein in allen Thiazolringen C-5 und in der Cystein-Einheit C-3 markiert. C-1 der Cysteinvorstufe Serin, als Racemat verfüttert, markiert die fünf Kohlenstoffatome, die mit C-4 der fünf Thiazolringe verknüpft sind sowie C-2 im Thiazolring Nr. 4. Dieselben Kohlenstoffatome, die durch C-3 von Cystein markiert werden, lassen sich auch durch L-[3-¹³C]Serin anreichern^[224,228].

Die beiden biosynthetisch ungewöhnlichsten Strukturelemente von **78** sind die Pyridin- und die Indolcarbonsäure-Einheiten (Abb. 38). C-6 der Pyridin-Einheit wird vom Cysteinmolekül beigesteuert, das den Thiazolring Nr. 4 liefert. Die verbleibenden vier Kohlenstoffatome stammen aus zwei Molekülen Serin, die „Schwanz-Schwanz“-verknüpft sind, d. h. durch ihre C-Atome 3. Dies folgt aus der spezifischen Markierung von C-3 und C-4 des Pyridinringes durch C-3 von Serin und von C-2 der Thiazolringe Nr. 1 und 5 durch C-1 von Serin^[224,228]. Die beiden Serin-Einheiten können in den Pyridinring entweder intakt oder in Form von Glycin und einer C₁-Einheit eingebaut werden, die aus der Spaltung mit Serin-Hydroxymethyltransferase stammt. Ein Versuch, zwischen diesen beiden Möglichkeiten durch Verfütterung von [U-¹³C₃]Glycerin mit anschließender Kopplungsanalyse zu unterscheiden, gab unvollständige Resultate. Abbildung 38 zeigt die eindeutig ermittelten ¹³C-¹³C-Konnektivitäten; eine Anzahl erwarteter Kopplungen wurde jedoch nicht beobachtet, wahrscheinlich wegen der geringen Anreicherung in der Probe^[221]. Kürzliche Versuche mit L-[1,2-¹³C₂]- und L-[2,3-¹³C₂]Serin zeigten jedoch eindeutig, daß die beiden Serin-Einheiten intakt eingebaut wurden^[227]. Dies wäre in Einklang mit dem von *Bycroft et al.*^[231] vorgeschlagenen Mechanismus, der postuliert, daß der Pyridinring aus zwei Molekülen Dehydroalanin stammt.

Der Einbau von radioaktivem Tryptophan in **78** deutet an, daß die Indolcarbonsäure-Einheit in irgendeiner Weise aus dieser Aminosäure stammt. Man fand, daß C-3 von Serin sowohl C-3' als auch C-4' der Indolcarbonsäure markiert. Serin kann über den Tetrahydrofolsäureweg die Methylgruppe von Methionin markieren. Bei Verfütterung von [methyl-¹³C]Methionin wird in Nosiheptid **78** allerdings nur ein Kohlenstoffatom, C-4', angereichert; C-1 von Serin markiert spezifisch C-2'. Dies führt zur Formulierung einer ungewöhnlichen Hypothese für die Bildung der Indolcarbonsäure-Einheit (Abb. 39): Der Cyclisierung von Tryptophan, bei der die Carboxygruppe und C-2 des Indolringes miteinander verknüpft werden, folgen Extrusion des α-Kohlenstoff- und des Stickstoffatoms der Seitenkette, Methylierung der 4-Position des Indols und Hydroxylierung der Methylgruppe^[228]. Zur Prüfung dieses Postulats stellten wir eine Probe von L-Tryptophan her, die zu 50% mit ¹³C in der 2-Position des Indolringes und zu 90% mit ¹³C in der Carboxygruppe angereichert war. Das markierte Indol wurde chemisch synthetisiert und dann



L-[1,5-¹³C₂]Glutamat: ■ DL-[1-¹³C]Serin: ●
DL-[3-¹³C]Cystein: ○ L-[3-¹³C]Serin: ▲
L-[methyl-¹³C]Methionin: □

Abb. 38. Markierungs- und Kopplungsmuster in Nosiheptid **78** nach Verfütterung verschiedener, mit stabilen Isotopen markierter Vorläufer.

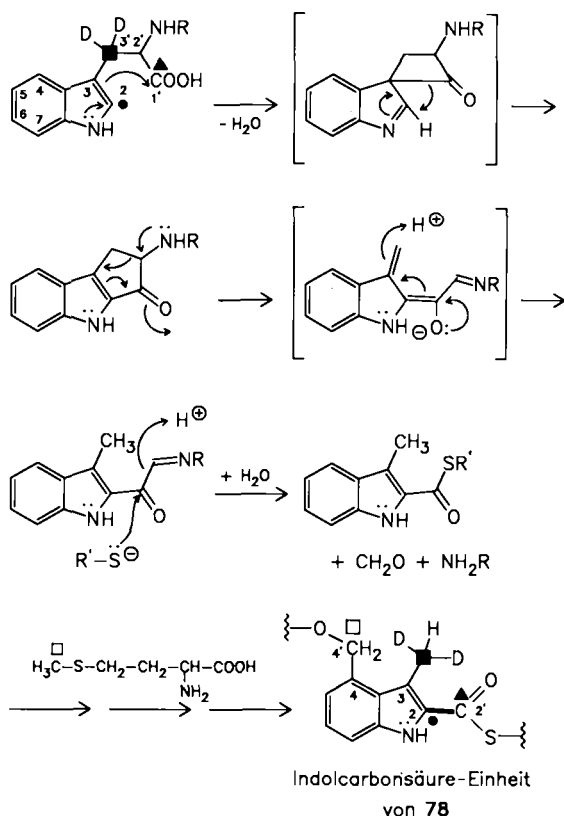


Abb. 39. Bildung der Indolcarbonsäure-Einheit von Nosiheptid **78** aus Tryptophan und ein möglicher Mechanismus dieser Umwandlung. ■, ▲, ●, □: ^{13}C -Markierung.

mit $[1-^{13}\text{C}]$ Serin in Gegenwart von Tryptophan-Synthase kondensiert. Die ^{13}C -NMR-Analyse des durch Verfütterung dieses Vorläufers gewonnenen Nosiheptids zeigte Anreicherung ausschließlich in C-2 und C-2' der Indolcarbonsäure-Einheit und die Kopplung der Signale von C-2 und C-2' miteinander mit dem erwarteten Intensitätsverhältnis der koppelnden und nicht-koppelnden Signale. Daraus geht klar hervor, daß die Indolcarbonsäure-Einheit durch eine recht ungewöhnliche Umlagerung von Tryptophan entsteht. Bei diesem Prozeß bleiben die beiden Wasserstoffatome in der Methylengruppe der Tryptophan-Seitenkette erhalten, was durch einen Fütterungsversuch mit $\text{DL-[3-}^{13}\text{C}, 2\text{H}_2\text{]} \text{Tryptophan}$ bewiesen wurde^[227]. Der Nichteinbau von ^{14}C - und ^{13}C -markiertem 4-Methyltryptophan in Nosiheptid zeigt, daß die Methylierung nicht der erste Schritt in der Reaktionsfolge zur Indolcarbonsäure-Einheit ist^[224, 227, 228].

Die bis jetzt vorliegenden Ergebnisse sind in Einklang mit der Vorstellung, daß Nosiheptid **78** durch ausgiebige Modifizierung eines primären Vorläufer-Peptids gebildet wird, das die Sequenz $\text{H}_2\text{N-Ser-Cys-Thr-Thr-Cys-Glu-Cys-Cys-Cys-Ser-Cys-Ser-OH}$ haben sollte. Um den Makrocyclus zu schließen, müßten Ser-1 und Ser-10 verknüpft werden; dabei entsteht auch der Pyridinring. Ob der Tryptophanrest, der die Indolcarbonsäure-Einheit bildet, ebenfalls ein Teil des ursprünglichen Peptids ist und wie er mit diesem verbunden ist, oder ob er erst auf einer späteren Stufe angeknüpft wird, muß noch untersucht werden. Hemmversuche mit Chloramphenicol legen nahe, daß der Aufbau des ursprünglichen Vorläufer-Peptids ein nicht-ribosomaler Prozeß ist^[227] und daher durch ein Enzym als

Matrix katalysiert werden sollte, wie es z. B. bei der Biosynthese anderer Peptid-Antibiotica der Fall ist^[232].

8.2. Biosynthese von Thiostrepton

Die Biosynthese von Thiostrepton **77** in *S. azureus* verläuft weitgehend ähnlich wie die von Nosiheptid **78** (Abb. 40). Bei den Untersuchungen an **77** war uns die detaillierte ^1H - und ^{13}C -NMR-Analyse dieser Verbindung von *Henssens et al.*^[233, 234] eine große Hilfe, obwohl nach der Analyse markierter Proben mehrere Signalzuordnungen geändert werden mußten^[227]. $\text{DL-[3-}^{13}\text{C}] \text{Cystein}$ markiert fünf Positionen, die C-5 der Thiazol- und Dihydrothiazolringe entsprechen (Abb. 40). Dieselben C-Atome wurden von C-3 des Serins markiert. $\text{DL-[3-}^{13}\text{C}] \text{Serin}$ markiert außerdem C-3 der drei Dehydroalanin-Einheiten, C-3 und C-4 des Piperidinrings sowie C-3 und die Methylgruppe der Chinaldinsäure-Einheit. Die letztgenannte Methylgruppe war auch die einzige Position, die von $\text{L-[methyl-}^{13}\text{C}] \text{Methionin}$ markiert wurde.

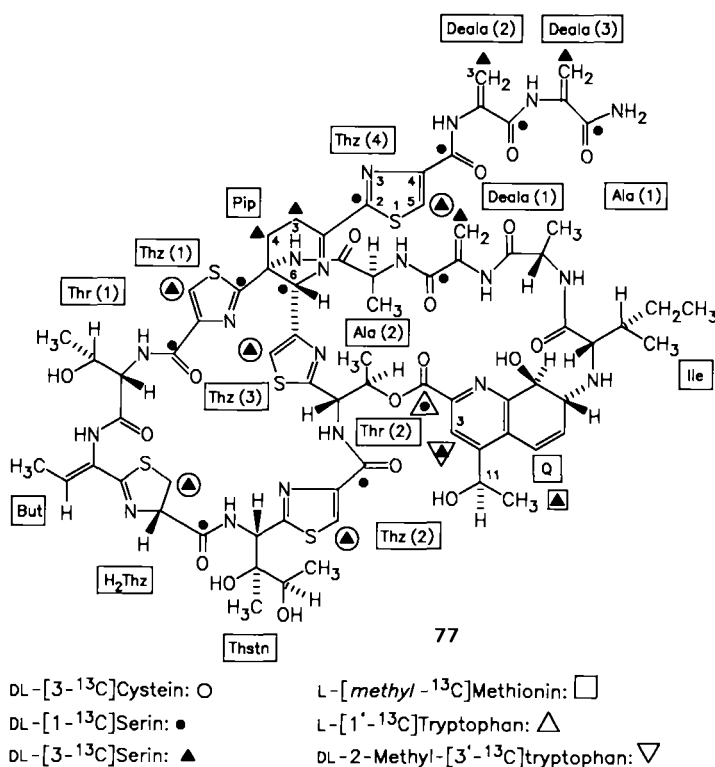


Abb. 40. Markierungsmuster in Thiostrepton **77** nach Verfütterung verschiedener, mit stabilen Isotopen markierter Vorläufer.

$\text{DL-[1-}^{13}\text{C}] \text{Serin}$ markiert elf Positionen: alle mit den Thiazol- und Dihydrothiazolringen verknüpften Carbonylgruppen, die Carbonylgruppen der Dehydroalanin- und Chinaldinsäure-Einheiten, C-6 des Piperidinrings und C-2 der Thiazolringe Nr. 1 und Nr. 4^[235]. Versuche mit $\text{L-[1,2-}^{13}\text{C}_2\text{]-}$ und $\text{L-[2,3-}^{13}\text{C}_2\text{]} \text{Serin}$ zeigten intakten Einbau aller Serinmoleküle, außer bei der Markierung der Methylgruppe der Chinaldinsäure^[227, 236]. $\text{L-[carboxy-}^{13}\text{C}] \text{Tryptophan}$ markiert ausschließlich die Carbonylgruppe der Chinaldinsäure-Einheit^[235]. Es folgt, daß nach aller Wahrscheinlichkeit die Thiazolringe und der Piperidinring in Thiostrepton denselben Ursprung haben wie in Nosiheptid.

Die Chinaldinsäure-Einheit bildet sich offensichtlich durch Erweiterung des Indolringes von Tryptophan. Das Kohlenstoffgerüst von Tryptophan entspricht allen Kohlenstoffatomen der Chinaldinsäure-Einheit mit Ausnahme der aus Methionin stammenden Methylgruppe. Die Ring-erweiterung ähnelt der Bildung von Alkaloiden des Chinintyps aus Tryptophan in höheren Pflanzen^[237], d. h. C-3' der Tryptophanseitenkette (Numerierung siehe Abb. 39) wird zu C-3 der Chinaldinsäure und C-2 von Indol zu C-11 der Chinaldinsäure. Interessanterweise wurde DL-2-Methyl-[3'-¹³C]tryptophan sehr gut eingebaut und markiert spezifisch C-3 der Chinaldinsäure^[236]. Daher scheint in diesem Fall die Methylierung von Tryptophan vor seiner weiteren Modifizierung und/oder dem Einbau in das Peptid stattzufinden. In Einklang mit dieser Ansicht haben wir die Bildung von 2-Methyltryptophan in *S. azureus* durch „Trapping“-Experimente und in einem zellfreien System^[238] nachgewiesen.

Der sterische Verlauf des Einbaus von Methionin in die Chinaldinsäure-Einheit von **77** wurde durch Verfütterung von Methionin mit einer chiralen Methylgruppe untersucht. Das daraus erhaltene Thioestrepton **77** wurden nach Kuhn und Roth oxidiert, und die tritierte Essigsäure wurde auf ihre Chiralität untersucht. Überraschenderweise wurde aus (*methyl-R*)-Methionin eine Methylgruppe mit *R*-Konfiguration und aus (*methyl-S*)-Methionin eine Methylgruppe mit *S*-Konfiguration in **77** erzeugt^[239]. Mit [*methyl*-¹³C²H₃]Methionin wurde ebenfalls gezeigt, daß alle drei Methylwasserstoffatome erhalten bleiben^[238]. So scheint die Übertragung der Methylgruppe unter vollständiger Konfigurationserhaltung zu verlaufen. Die meisten bisher untersuchten Methyltransferasen verhalten sich anders (siehe Abschnitt 5.2). Wir haben allerdings kürzlich ein weiteres Beispiel eines Methyltransfers unter vollständiger Konfigurationserhaltung bei der Biosynthese des Antibiotikums Thienamycin beobachtet, das ebenfalls eine Methylgruppe in Form einer Hydroxyethylfunktion enthält^[240]. Wahrscheinlich zeigt die Retention der Konfiguration an, daß der Methyltransfer in einem Zweistufenprozeß stattfindet.

8.3. Genetik der Nosiheptid- und Thioestrepton-Biosynthese

Unser Fernziel bei den Untersuchungen der Nosiheptid- und Thioestrepton-Biosynthese ist es, parallel die bioorganische Chemie zu entwickeln und die Genetik der Bildung dieser Antibiotica zu studieren. Basierend auf dem so erworbenen Wissen und den neu entwickelten Methoden könnte schließlich die Produktion neuer Hybrid-Strukturen möglich werden. Der Grund für die Wahl dieser Klasse von Verbindungen ist, daß sie biologisch sehr aktiv sind und sich daher für Strukturmodifikationen anbieten. Ihre Komplexität schränkt jedoch die Möglichkeit von Änderungen der Struktur mit chemischen Methoden stark ein. Antibiotica wie **77** und **78** sind aber ideale Objekte für biologische Strukturmodifikationen: Sie haben das gleiche Grundgerüst, bilden sich aber aus etwas unterschiedlichen Bausteinen, die man möglicherweise austauschen kann. Sie haben auch die gleiche Wirkungsweise, was die Wahrscheinlichkeit verringert, daß neu geschaffene Hybrid-Antibiotica den Organismus abtöten, der sie produziert.

Die genetischen Untersuchungen an *S. actuosus* und *S. azureus* werden in Zusammenarbeit mit dem Laboratorium von Professor W. R. Strohl an der Ohio State University durchgeführt. Unsere Strategie basiert auf der Beobachtung, daß in allen untersuchten Fällen die Cluster der Antibiotica-Biosynthesegene auch das Resistenzgen enthalten^[241–243]. Wir klonieren daher größenfraktionierte Partialhydrolysate der Donor-DNA in einem passenden Plasmid, das zur Transformation eines Antibiotica-sensitiven Wirtorganismus verwendet wird. Durch Selektion auf Thioestrepton- oder Nosiheptid-Resistenz und auf einen zusätzlichen Marker auf dem Plasmid werden dann die Resistenzgene und außerdem Biosynthesegene aus dem Cluster isoliert, der das Resistenzgen umgibt. Die in den erneut isolierten Plasmiden klonierte DNA kann dann als Sonde verwendet werden, um den Cluster der Biosynthesegene in der Donor-DNA genauer zu untersuchen. Biosynthesegene von *S. azureus* werden schließlich benutzt, um *S. actuosus* zu transformieren und umgekehrt, und die Transformanten werden geprüft, ob sie neue Verbindungen produzieren. Es ist zu hoffen, daß weitere Informationen über den Biosyntheseweg auch eine direktere Selektion spezifischer Biosynthesegene ermöglichen werden.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Zusammenfassung unserer Arbeiten über die Biosynthese von Antibiotica hat hoffentlich einen kurzen Einblick in die Vielfalt der Methoden und Techniken gegeben, die heute benutzt werden, um die Bildung von Sekundärmetaboliten aufzuklären. Die Untersuchung der Biosynthese von Naturstoffen hat sich während der letzten Jahrzehnte mehrmals grundlegend geändert. Die beginnende Verfügbarkeit Isotopen-markierter Verbindungen Ende der vierziger Jahre eröffnete die Möglichkeit, biosynthetische Untersuchungen mit ihnen durchzuführen. Die Entwicklung der FT-NMR-Spektroskopie war ein weiterer Meilenstein, denn dieses Werkzeug lieferte mit viel größerer Leichtigkeit bei weitem aussagekräftigere Informationen als das bislang möglich war. Eine weitere Revolution auf diesem Gebiet zeichnet sich in der rapiden Entwicklung der Molekularbiologie der Sekundärmetabolit-Bildung ab. Die Einbeziehung genetischer Methoden in Biosynthese-Untersuchungen verspricht, diesem Gebiet eine neue Dimension hinzuzufügen. Dies mag uns dem Verständnis grundlegender Fragen näher bringen, z. B. wie die Natur es fertigbringt, diese verwirrende Fülle organischer Verbindungen zu produzieren, und warum. Außerdem könnten auf diesem Weg wesentliche Fortschritte bei der Erzeugung und Produktion kommerziell wichtiger Naturstoffe erzielt werden.

Es ist uns eine Freude, den vielen enthusiastischen und unermüdlichen Mitarbeitern, deren Namen in den entsprechenden Literaturziten erwähnt werden, für ihre Beiträge zu danken. Unsere Arbeiten wurden durch die finanzielle Unterstützung der National Institutes of Health (Grant AI 20264) ermöglicht; von großer Hilfe waren uns die Dienste der Los Alamos Stable Isotope Resource (finanziert durch NIH Grant RR 02231 und das Department of Energy), des Purdue University Biological Magnetic Resonance Laboratory (finanziert durch NIH Grant RR 01077) und des Ohio State

Eingegangen am 11. November 1987 [A 707]
Übersetzt von Dr. Ursula Mocek, Seattle, WA (USA)

- [1] R. Hütter, W. Keller-Schierlein, F. Knüsel, V. Prelog, G. C. Rodgers, P. Suter, G. Vogel, W. Voser, H. Zährner, *Helv. Chim. Acta* 50 (1967) 1533.
- [2] J. D. Dunitz, D. M. Hawley, D. Miklos, D. N. J. White, Y. Berlin, R. Marusic, V. Prelog, *Helv. Chim. Acta* 54 (1971) 1709.
- [3] Übersichtsartikel: a) S. A. Brown, *Biosynthesis* 1 (1972) 1–39; b) U. Sequin, A. I. Scott, *Science (Washington)* 186 (1974) 101.
- [4] H. G. Floss in E. A. Evans, M. Muramatsu (Hrsg.): *Radiotracer Techniques and Applications*, Vol. 2, Dekker, New York 1977, S. 689–732.
- [5] H. Simon, H. G. Floss: *Bestimmung der Isotopenverteilung in markierten Verbindungen*, Springer, Berlin 1967.
- [6] M. Tanabe, *Biosynthesis* 2 (1973) 241–299; 3 (1974) 247–285; 4 (1976) 204–247.
- [7] H. Seto, T. Sato, H. Yonehara, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 8461.
- [8] A. R. Battersby, E. Hunt, E. McDonald, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1973, 442.
- [9] M. J. Garson, J. Staunton, *Chem. Soc. Rev.* 8 (1979) 59.
- [10] J. C. Vederas, *Can. J. Chem.* 60 (1982) 1637.
- [11] D. E. Cane, T. Rossi, A. M. Tillman, J. P. Pachlatko, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 1838.
- [12] K. L. Rinehart, M. Potgieter, D. L. Delaware, H. Seto, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 2099.
- [13] J. M. Beale, J. P. Lee, A. Nakagawa, S. Ōmura, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 331.
- [14] N. E. Mackenzie, R. L. Baxter, A. I. Scott, P. E. Fagerness, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1982, 145.
- [15] P. J. Keller, Q. Le Van, A. Bacher, J. P. Kozłowski, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 2505.
- [16] J. M. Beale, C. E. Cottrell, P. J. Keller, H. G. Floss, *J. Magn. Reson.* 72 (1987) 574.
- [17] A. Bax, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* 44 (1981) 542.
- [18] a) A. Bax, G. Morris, *J. Magn. Reson.* 42 (1981) 164; b) M. R. Bendall, D. T. Pegg, D. M. Doddrell, D. M. Thomas, *ibid.* 46 (1982) 43.
- [19] L. A. Trimble, P. B. Reese, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 2175.
- [20] S. J. Gould, V. A. Palaniswamy, H. Bleich, J. Wilde, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1984, 1075.
- [21] H. G. Floss in P. K. Stumpf, E. E. Conn (Hrsg.): *The Biochemistry of Plants*, Vol. 7, Academic Press, New York 1981, S. 177–214.
- [22] K. F. Chater, D. A. Hopwood in M. Goodfellow, M. Mordarski, S. T. Williams (Hrsg.): *Biology of the Actinomycetes*, Academic Press, New York 1984, S. 229.
- [23] C. R. Hutchinson, *Nat. Prod. Rep.* 3 (1986) 133.
- [24] K. L. Cox, S. E. Fishman, J. L. Larson, R. Stanzak, P. A. Reynolds, W. K. Yeh, R. M. van Frank, V. A. Birmingham, C. L. Hersherberger, E. T. Seno, *J. Nat. Prod.* 49 (1986) 971.
- [25] F. Malpartida, D. A. Hopwood, *Nature (London)* 309 (1984) 462.
- [26] F. Malpartida, S. E. Hallam, H. M. Kieser, H. Motamedi, C. R. Hutchinson, M. J. Butler, S. A. Sugden, M. Warren, C. McKillop, C. R. Bailey, G. O. Humphreys, D. A. Hopwood, *Nature (London)* 325 (1987) 818.
- [27] D. A. Hopwood, F. Malpartida, H. M. Kieser, H. Ikeda, J. Duncan, I. Fujii, B. A. M. Rudd, H. G. Floss, S. Ōmura, *Nature (London)* 314 (1985) 642.
- [28] H. G. Floss, *Trends Biotechnol.* 5 (1987) 111.
- [29] K. Shimada, D. J. Hook, G. F. Warner, H. G. Floss, *Biochemistry* 17 (1978) 3054.
- [30] Y. Takeda, V. Mak, C.-C. Chang, C.-j. Chang, H. G. Floss, *J. Antibiot.* 37 (1984) 868.
- [31] M. Damberg, P. Russ, A. Zeeck, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 59.
- [32] W. Weber, H. Zährner, M. Damberg, P. Russ, A. Zeeck, *Zentralbl. Bakteriell. Mikrobiol. Hyg. Abt. 1 Orig. C2* (1981) 122.
- [33] G. Lazar, H. Zährner, M. Damberg, A. Zeeck, *J. Antibiot.* 36 (1983) 187.
- [34] M. Sugita, K. Furihata, H. Seto, N. Ōtake, T. Sasaki, *Agr. Biol. Chem.* 46 (1982) 1111.
- [35] M. Sugita, Y. Natori, T. Sasaki, K. Furihata, A. Shimazu, H. Seto, N. Ōtake, *J. Antibiot.* 35 (1982) 1460.
- [36] M. Sugita, T. Sasaki, K. Furihata, H. Seto, N. Ōtake, *J. Antibiot.* 35 (1982) 1467.
- [37] K. Kakinuma, N. Ikekawa, A. Nakagawa, S. Ōmura, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 3402.
- [38] S. Ōmura, C. Kitao, H. Tanaka, R. Oiwa, Y. Takahashi, A. Nakagawa, M. Shimada, Y. Iwai, *J. Antibiot.* 29 (1976) 876.
- [39] M. DeRosa, A. Gambacorta, L. Minale, J. D. Bu'lock, *Biochem. J.* 128 (1972) 751.
- [40] M. DeRosa, A. Gambacorta, J. D. Bu'lock, *J. Bacteriol.* 117 (1974) 212; *Phytochemistry* 13 (1974) 905, 1793.
- [41] M. Oshima, T. Ariga, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 6963.
- [42] K. Suzuki, K. Saito, A. Kawaguchi, S. Okuda, K. Komagata, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 27 (1981) 261.
- [43] T. S. Wu, A. Nakagawa, J. M. Beale, P. J. Keller, H. G. Floss, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [44] T. S. Wu, J. Duncan, S. W. Tsao, C.-j. Chang, P. J. Keller, H. G. Floss, *J. Nat. Prod.* 50 (1987) 108.
- [45] J. Furukawa, T. Tsuyuki, N. Morisaki, N. Uemura, Y. Koiso, B. Umezawa, A. Kawaguchi, S. Iwasaki, S. Okuda, *Chem. Pharm. Bull.* 34 (1986) 5176.
- [46] R. Casati, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 8102.
- [47] G. W. J. Fleet, T. K. M. Shing, S. M. Warr, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1984, 905.
- [48] R. Casati, H. Cho, J. M. Beale, H. G. Floss, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [49] W. Keller-Schierlein, R. Muntwyler, W. Pache, H. Zährner, *Helv. Chim. Acta* 52 (1969) 127.
- [50] R. Muntwyler, W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* 55 (1972) 2071.
- [51] M. Brufani, S. Cerrini, W. Fedeli, F. Mazza, R. Muntwyler, *Helv. Chim. Acta* 55 (1972) 2094.
- [52] R. Muntwyler, J. Widmer, W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* 53 (1970) 1544.
- [53] A. Gerhard, R. Muntwyler, W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* 58 (1975) 1323.
- [54] R. Corbaj, L. Ettlinger, E. Gäumann, J. Kalvoda, W. Keller-Schierlein, F. Kradolfer, B. K. Manukian, L. Neipp, V. Prelog, F. Reusser, H. Zährner, *Helv. Chim. Acta* 40 (1957) 1262.
- [55] S. Barcza, M. Brufani, W. Keller-Schierlein, H. Zährner, *Helv. Chim. Acta* 49 (1966) 1736.
- [56] C.-j. Chang, H. G. Floss, P. Soong, C.-T. Chang, *J. Antibiot.* 28 (1975) 156.
- [57] J. S. Pyrek, O. Achmatowicz, A. Zamojski, *Tetrahedron* 33 (1977) 673.
- [58] W. F. Fleck, D. G. Strauss, H. Prauser, *Z. Allg. Mikrobiol.* 20 (1980) 543.
- [59] W. Keller-Schierlein, M. Brufani, W. Barcza, *Helv. Chim. Acta* 51 (1968) 1257.
- [60] M. Brufani, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* 51 (1968) 1269.
- [61] C. E. Snipes, C.-j. Chang, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 701.
- [62] R. Holzbach, H. Pape, D. Hook, E. F. Kreutzer, C.-j. Chang, H. G. Floss, *Biochemistry* 17 (1978) 556.
- [63] O. A. Mascaretti, C.-j. Chang, D. Hook, H. Otsuka, E. F. Kreutzer, H. G. Floss, *Biochemistry* 20 (1981) 919.
- [64] O. Gabriel, *Adv. Chem. Ser.* 117 (1973) 387.
- [65] C. E. Snipes, G.-U. Brillinger, L. Sellers, L. Mascaro, H. G. Floss, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 8113.
- [66] J. W. Cornforth, J. W. Redmond, H. Eggerer, W. Buckel, C. Gutschow, *Eur. J. Biochem.* 14 (1970) 1.
- [67] J. Lüthy, J. Rétay, D. Arigoni, *Nature (London)* 221 (1969) 1213.
- [68] H. G. Floss, M. D. Tsai, *Adv. Enzymol.* 50 (1979) 243.
- [69] K. Goeke, R. M. Mayer, H. G. Floss, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [70] J. J. Lee, J. P. Lee, P. J. Keller, C. E. Cottrell, C.-j. Chang, H. Zährner, H. G. Floss, *J. Antibiot.* 39 (1986) 1123.
- [71] P. F. Wiley, A. D. Argoudelis, H. Hoeksema, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 2652.
- [72] T. G. Cochran, D. J. Abraham, L. L. Martin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1972, 494.
- [73] D. J. Mason, A. Dietz, R. M. Smith, *Antibiot. Chemother. (Washington)* 11 (1961) 118.
- [74] T. J. Oliver, A. Goldstein, R. R. Bower, J. C. Holper, R. H. Otto, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1961, 495.
- [75] B. J. Wallace, P.-C. Tai, B. D. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 1634.
- [76] L. A. Mitscher, L. L. Martin, D. R. Feller, J. R. Martin, A. W. Goldstein, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1971, 1541.
- [77] R. M. Stroschane, M. Taniguchi, K. L. Rinehart, J. P. Rolls, W. J. Haak, B. A. Ruff, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 3024.
- [78] H. Otsuka, O. A. Mascaretti, L. H. Hurley, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 6817.
- [79] S. M. Byun, R. Jenness, W. P. Ridley, S. Kirkwood, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54 (1973) 961.
- [80] M. W. Loewus, F. A. Loewus, G.-U. Brillinger, H. Otsuka, H. G. Floss, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 11710.
- [81] M. W. Loewus, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 7221.
- [82] K. R. Hanson, I. A. Rose, *Acc. Chem. Res.* 8 (1975) 1.
- [83] Y.-H. H. Wong, W. R. Sherman, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 11083.
- [84] S. Ōmura: *Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology and Practice*, Academic Press, New York 1984.
- [85] P. W. Schindler, M. C. Scrutton, *Eur. J. Biochem.* 55 (1975) 543.
- [86] W. Pache, D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta* 255 (1972) 348.
- [87] O. A. Mascaretti, C.-j. Chang, H. G. Floss, *J. Nat. Prod.* 42 (1979) 455.

- [88] F. Tomita, T. Tamaoki, *J. Antibiot.* 33 (1980) 940.
- [89] N. Hirayama, M. Kasai, K. Shirahata, Y. Ohashi, Y. Sasada, *Tetrahedron Lett.* 21 (1980) 2559.
- [90] A. K. Mallams, M. S. Puar, R. R. Rossman, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 3938.
- [91] A. K. Mallams, M. S. Puar, R. R. Rossman, A. T. McPhail, R. D. McFarlane, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 3940.
- [92] A. K. Mallams, M. S. Puar, R. R. Rossman, A. T. McPhail, R. D. McFarlane, R. L. Stephens, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1983, 1497.
- [93] A. G. McInnes, J. A. Walter, J. L. C. Wright, *Tetrahedron Lett.* 1979, 3245.
- [94] B. M. Miller, R. W. Burg, US-Patent 3864479 (4. Febr. 1975).
- [95] W. Pache in J. W. Corcoran, F. E. Hahn (Hrsg.): *Antibiotics*, Vol. 3, Springer, New York 1975, S. 585.
- [96] Y. Okami, T. Okazaki, T. Kitahara, H. Umezawa, *J. Antibiot.* 29 (1976) 1019.
- [97] H. Nakamura, Y. Iitaka, T. Kitahara, T. Okazaki, Y. Okami, *J. Antibiot.* 30 (1977) 714.
- [98] E. J. Corey, D. M. Hua, B.-C. Pan, S. P. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 6818.
- [99] J. D. White, T. R. Vendananda, M.-c. Kang, S. C. Choudhry, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 8105.
- [100] T. S. S. Chen, C.-j. Chang, H. G. Floss, *J. Antibiot.* 33 (1980) 1316.
- [101] W. Marsch, J. D. Dunitz, D. M. J. White, *Helv. Chim. Acta* 57 (1974) 10.
- [102] T. C. Somers, J. D. White, J. J. Lee, P. J. Keller, C.-j. Chang, H. G. Floss, *J. Org. Chem.* 51 (1986) 464.
- [103] J. J. Lee, *Ph. D. Thesis*, Purdue University, West Lafayette, IN (USA) 1984.
- [104] A. J. Birch, R. J. English, R. A. Massy-Westropp, M. Slaytor, H. J. Smith, *J. Chem. Soc.* 1956, 356.
- [105] T. S. S. Chen, C.-j. Chang, H. G. Floss, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 2661.
- [106] T. S. S. Chen, C.-j. Chang, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 5826.
- [107] T. S. S. Chen, C.-j. Chang, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 4565.
- [108] H.-G. Kirk, H. Pape, vorgetragen beim International Meeting on Medicinal Plant Research, Münster, Mai 1978.
- [109] F. Lipmann, *Acc. Chem. Res.* 6 (1973) 361.
- [110] K. Kurahashi, *Annu. Rev. Biochem.* 43 (1974) 445.
- [111] E. Katz, A. L. Demain, *Bacteriol. Rev.* 44 (1976) 449.
- [112] E. Adams, *Adv. Enzymol.* 44 (1976) 69.
- [113] C. P. Gorst-Allman, C.-j. Chang, H. G. Floss, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [114] J. J. Lee, P. M. Dewick, C. P. Gorst-Allman, F. Spreafico, C. Kowal, C.-j. Chang, A. G. McInnes, J. A. Walter, P. J. Keller, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 5426.
- [115] R. W. Woodard, L. Mascaro, R. Hörhammer, S. Eisenstein, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 6314.
- [116] D. Arigoni, *Ciba Found. Symp.* 60 (1978) 243.
- [117] H. G. Floss in P. A. Frey (Hrsg.): *Mechanisms of Enzymatic Reactions: Stereochemistry*, Elsevier, Amsterdam 1986, S. 71–88.
- [118] I. A. Rose, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 6052.
- [119] M. Summers, I. A. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 4475.
- [120] K. Schröder, A. Zeeck, *Tetrahedron Lett.* 1973, 4995.
- [121] A. Zeeck, K. Schröder, K. Frobel, R. Grote, R. Thiericke, *J. Antibiot.* 40 (1987) 1530.
- [122] Y. Konda, K. Onda, K. Hinotozawa, S. Ōmura, *J. Antibiot.* 34 (1981) 1222.
- [123] P. Welzel, F.-J. Witteler, D. Müller, W. Reimer, *Angew. Chem.* 93 (1981) 130; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 121.
- [124] H. Nakano, M. Yoshia, K. Shirahata, S. Ishii, Y. Arai, M. Morimoto, F. Tomita, *J. Antibiot.* 35 (1982) 760.
- [125] S. Ōmura, N. Inamura, K. Hinotozawa, K. Otagura, G. Lukacs, R. Faghih, R. Tolmann, R. H. Arison, J. L. Smith, *J. Antibiot.* 36 (1983) 1783.
- [126] G. Werner, H. Hagenmaier, H. Drautz, A. Baumgartner, H. Zähler, *J. Antibiot.* 37 (1984) 110.
- [127] M. A. Goetz, P. A. McCormick, R. L. Monaghan, D. A. Ostlund, O. D. Hensens, J. M. Liesch, G. Albers-Schönberg, *J. Antibiot.* 38 (1985) 161.
- [128] R. J. White, E. Martinelli, G. G. Gallo, G. Lancini, P. Beynon, *Nature (London)* 243 (1973) 273.
- [129] M. Brufani, D. Kluepfel, G. C. Lancini, J. Leitich, A. S. Mesentsev, V. Prelog, F. P. Schmock, P. Sensi, *Helv. Chim. Acta* 56 (1973) 2315.
- [130] U. Hornemann, J. P. Kehr, J. H. Eggert, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1974, 1045.
- [131] U. Hornemann, J. P. Kehr, C. S. Nunez, R. L. Ranieri, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 320.
- [132] S. Horii, Y. Kameda, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1972, 747.
- [133] E. Truscheit, W. Frommer, B. Junge, L. Müller, D. D. Schmidt, W. W. Wingender, *Angew. Chem.* 93 (1981) 738; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 744.
- [134] A. Karlsson, G. Sartori, R. J. White, *Eur. J. Biochem.* 47 (1974) 251.
- [135] R. J. White, E. Martinelli, *FEBS Lett.* 49 (1974) 233.
- [136] A. Haber, R. D. Johnson, K. L. Rinehart, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 3541.
- [137] U. Hornemann, J. H. Eggert, D. P. Honor, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1980, 11.
- [138] G. S. Bezanson, L. C. Vining, *Can. J. Biochem.* 49 (1971) 911.
- [139] O. Ghisalba, J. Nüesch, *J. Antibiot.* 34 (1981) 64.
- [140] J. J. Kibby, I. A. McDonald, R. W. Rickards, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1980, 768.
- [141] K. Hatano, S. Akiyama, M. Asai, R. W. Rickards, *J. Antibiot.* 35 (1982) 1415.
- [142] M. G. Anderson, J. J. Kibby, R. W. Rickards, J. M. Rothschild, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1980, 1277.
- [143] K. L. Rinehart, M. Potgieter, D. A. Wright, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 2649.
- [144] D. D. Weller, K. L. Rinehart, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 6757.
- [145] M. Balerna, W. Keller-Schierlein, C. Martius, H. Wolf, H. Zähler, *Arch. Mikrobiol.* 65 (1969) 303.
- [146] T. H. Williams, *J. Antibiot.* 28 (1975) 85.
- [147] M. Brufani, L. Cellai, W. Keller-Schierlein, *J. Antibiot.* 32 (1979) 167.
- [148] J. A. McDonald, R. W. Rickards, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 1149.
- [149] W. Keller-Schierlein, M. Meyer, A. Zeeck, M. Damberg, R. Machinek, H. Zähler, G. Lazar, *J. Antibiot.* 36 (1983) 484.
- [150] W. Keller-Schierlein, M. Meyer, L. Cellai, S. Cerrini, D. Lamba, A. Segre, W. Fedeli, M. Brufani, *J. Antibiot.* 37 (1984) 1357.
- [151] M. Sugita, Y. Natori, N. Sueda, K. Furihata, H. Seto, N. Ōtake, *J. Antibiot.* 35 (1982) 1474.
- [152] S. W. Lee, *Ph. D. Dissertation*, Purdue University, West Lafayette, IN (USA) 1983.
- [153] X.-G. He, J. P. Lee, J. M. Beale, P. J. Keller, H. G. Floss, unveröffentlichte Ergebnisse; siehe auch J. P. Lee, *Ph. D. Dissertation*, Ohio State University, Columbus, OH (USA) 1987.
- [154] J. J. Wang, J. M. Beale, H. G. Floss, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [155] J. M. Beale, C. E. Cottrell, P. J. Keller, H. G. Floss, *J. Magn. Reson.* 72 (1987) 574.
- [156] R. Jiao, C. Liu, Z. Jin, X. Zhang, L. Ni, Z. Lu, *Sci. Sin. Ser. B (Engl. Ed.)* 27 (1984) 380.
- [157] B. Junge, F.-R. Heiker, J. Kurz, L. Müller, D. D. Schmidt, C. Wünsche, *Carbohydr. Res.* 128 (1984) 235.
- [158] T. Iwasa, H. Yamamoto, M. Shibata, *J. Antibiot.* 23 (1970) 595.
- [159] S. Ogawa, T. Nose, T. Ogawa, T. Toyokuni, Y. Iwasawa, T. Suami, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1985, 2369.
- [160] U. Degwert, R. von Hülst, H. Pape, R. E. Herrold, J. M. Beale, P. J. Keller, J. P. Lee, H. G. Floss, *J. Antibiot.* 40 (1987) 855.
- [161] T. Toyokuni, W.-Z. Jin, K. L. Rinehart, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 3481.
- [162] R. Thiericke, M. Stellwaag, A. Zeeck, G. Snatzke, *J. Antibiot.* 40 (1987) 1549.
- [163] R. Thiericke, A. Zeeck, *J. Antibiot.* 41 (1988) 694.
- [164] J. M. Beale, R. E. Herrold, H. G. Floss, R. Thiericke, A. Zeeck, A. Nakagawa, S. Ōmura, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 4435.
- [165] R. Thiericke, A. Zeeck, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1988, 2123.
- [166] R. E. Herrold, J. M. Beale, A. Nakagawa, P. J. Keller, S. Ōmura, H. G. Floss, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [167] R. Thiericke, J. M. Beale, P. J. Keller, A. Zeeck, H. G. Floss, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [168] Y. Sato, S. J. Gould, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 4625.
- [169] A. Nakagawa, T.-S. Wu, P. J. Keller, J. P. Lee, S. Ōmura, H. G. Floss, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1985, 519.
- [170] K. Shimizu, G. Tamura, *J. Antibiot.* 34 (1981) 649, 654.
- [171] Y. Shizuri, M. Ojika, K. Yamada, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 4291.
- [172] M. Ojika, H. Niwa, Y. Shizuri, K. Yamada, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1982, 628.
- [173] J. M. Beale, J. P. Lee, A. Nakagawa, S. Ōmura, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 331.
- [174] H. Brockmann, H. Pini, *Naturwissenschaften* 34 (1947) 190.
- [175] Um Vergleiche zu erleichtern, bevorzugen wir eine biosynthetische Nummerierung, wie in Abb. 27 gezeigt, und nicht die systematische IUPAC-Nummerierung.
- [176] K. Tsuzuki, Y. Iwai, S. Ōmura, H. Shimizu, N. Kitajima, *J. Antibiot.* 39 (1986) 1343.
- [177] H. G. Floss in J. W. Corcoran (Hrsg.): *Antibiotics*, Vol. 4, Springer, Berlin 1981, S. 215–235.
- [178] M. E. Bergy, *J. Antibiot.* 21 (1968) 454.
- [179] H. Hoeksema, W. C. Krueger, *J. Antibiot.* 29 (1976) 704.
- [180] S. Ōmura, H. Tanaka, Y. Koyama, R. Oiwa, M. Katagiri, T. Hata, *J. Antibiot.* 27 (1974) 363.
- [181] H. Tanaka, Y. Koyama, J. Awaya, R. Oiwa, M. Katagiri, T. Nagai, S. Ōmura, *J. Antibiot.* 28 (1975) 860.
- [182] H. Tanaka, Y. Koyama, T. Nagai, H. Marumo, S. Ōmura, *J. Antibiot.* 28 (1975) 868.
- [183] H. Tanaka, H. Marumo, T. Nagai, M. Okada, K. Taniguchi, S. Ōmura, *J. Antibiot.* 28 (1975) 925.

- [184] S. Ōmura, H. Tanaka, Y. Okada, H. Marumo, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1976, 320.
- [185] M. Kasai, K. Shirahata, S. Ishii, K. Mineura, H. Marumo, H. Tanaka, S. Ōmura, *J. Antibiot.* 32 (1979) 442.
- [186] Y. Iwai, K. Kimura, Y. Takahashi, K. Hinotozawa, H. Shimizu, H. Tanaka, S. Ōmura, *J. Antibiot.* 36 (1983) 1268.
- [187] H. Brockmann, A. Zeeck, K. van der Merwe, W. Müller, *Justus Liebig's Ann. Chem.* 698 (1966) 209, zit. Lit.
- [188] A. Zeeck, P. Christiansen, *Justus Liebig's Ann. Chem.* 724 (1969) 172.
- [189] B. Krone, A. Zeeck, *Liebigs Ann. Chem.* 1983, 510.
- [190] A. Zeeck, M. Mardin, *Liebigs Ann. Chem.* 1974, 1063.
- [191] A. Zeeck, H. Zähler, M. Mardin, *Liebigs Ann. Chem.* 1974, 1100.
- [192] B. Krone, A. Zeeck, *Liebigs Ann. Chem.* 1983, 471.
- [193] E. Egert, M. Noltemeyer, G. M. Sheldrick, W. Saenger, H. Brand, A. Zeeck, *Liebigs Ann. Chem.* 1983, 503.
- [194] C. P. Gorst-Allman, B. A. M. Rudd, C.-j. Chang, H. G. Floss, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 455.
- [195] A. Arnone, L. Camarda, R. Cardillo, G. Fronza, L. Merlini, R. Mondelli, G. Nasini, J. S. Pyrek, *Helv. Chim. Acta* 62 (1979) 30.
- [196] K. Schröder, H. G. Floss, *J. Org. Chem.* 43 (1978) 1438.
- [197] X.-G. He, C.-C. Chang, C.-j. Chang, J. C. Vederas, A. G. McInnes, J. A. Walter, H. G. Floss, *Z. Naturforsch. C41* (1986) 215.
- [198] C. Kitao, H. Tanaka, S. Minami, S. Ōmura, *J. Antibiot.* 33 (1980) 711.
- [199] S. Ōmura, *Bacteriol. Rev.* 40 (1976) 681.
- [200] S. Ōmura, S. Minami, H. Tanaka, *J. Biochem. (Tokyo)* 90 (1981) 291.
- [201] S. Ōmura, H. Tanaka, S. Minami, I. Takahashi, *J. Biochem. (Tokyo)* 90 (1981) 355.
- [202] H. Tanaka, S. Minami-Kakinuma, S. Ōmura, *J. Antibiot.* 35 (1982) 1565.
- [203] N. Tsuji, M. Kobayashi, Y. Terui, K. Tori, *Tetrahedron* 32 (1976) 2207.
- [204] B. Krone, A. Zeeck, H. G. Floss, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 4721.
- [205] D. A. Hopwood, K. F. Chater, J. B. Dowding, A. Vivian, *Bacteriol. Rev.* 37 (1973) 371.
- [206] B. A. M. Rudd, D. A. Hopwood, *J. Gen. Microbiol.* 114 (1979) 35.
- [207] S. P. Cole, *Ph. D. Thesis*, Purdue University, West Lafayette, IN (USA) 1985.
- [208] H. G. Floss, S. P. Cole, X.-G. He, B. A. M. Rudd, J. Duncan, I. Fujii, C.-j. Chang, P. J. Keller in H. Kleinkauf, H. von Döhren, G. Nese-mann, H. Dornauer (Hrsg.): *Regulation of Secondary Metabolite Formation*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1985, S. 283–304.
- [209] S. P. Cole, B. A. M. Rudd, D. A. Hopwood, C.-j. Chang, H. G. Floss, *J. Antibiot.* 40 (1987) 340.
- [210] H.-L. Zhang, J. M. Beale, J. Gallucci, X.-G. He, A. A. Adeferati, S. P. Cole, P. J. Keller, C.-j. Chang, H. G. Floss, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [211] F. Malpartida, D. A. Hopwood, *Nature (London)* 209 (1984) 462.
- [212] D. A. Hopwood, F. Malpartida, H. M. Kieser, H. Ikeda, J. Duncan, I. Fujii, B. A. M. Rudd, H. G. Floss, S. Ōmura, *Nature (London)* 314 (1985) 642.
- [213] S. Ōmura, H. Ikeda, F. Malpartida, H. M. Kieser, D. A. Hopwood, *Antimicrob. Agents Chemother.* 29 (1986) 13.
- [214] D. F. W. Gross, G. W. Kenner, R. C. Sheppard, C. E. Stehr, *J. Chem. Soc.* 1963, 2143.
- [215] M. Bodansky, J. Fried, J. T. Sheehan, N. J. Williams, J. Alicino, P. I. Cohen, B. T. Keeler, C. A. Birkheimer, *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 2478.
- [216] M. Bodansky, J. A. Scozzie, I. Muramatsu, *J. Antibiot.* 23 (1970) 9.
- [217] B. Anderson, D. Crowfoot Hodgkin, M. A. Viswamitra, *Nature (London)* 225 (1970) 233.
- [218] H. Depair, J. P. Thomas, A. Brun, A. Olesker, G. Lukacs, *Tetrahedron Lett.* 1977, 1397, 1403, zit. Lit.
- [219] C. Pascard, A. Ducruix, J. Lunel, T. Prange, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 6418.
- [220] T. Endo, H. Yonehara, *J. Antibiot.* 31 (1978) 623.
- [221] S. Pestka, J. W. Bodley, *Antibiotics (N. Y.)* 3 (1975) 551–573.
- [222] E. Cundliffe, J. Thompson, *J. Gen. Microbiol.* 126 (1981) 185.
- [223] F. Benazet, M. Cartier, J. Florent, C. Godard, G. Jung, J. Lunel, D. Mancy, C. Pascal, J. Renaut, P. Tarridec, J. Theilleux, R. Tissier, M. Dubost, L. Ninet, *Experientia* 36 (1980) 414.
- [224] D. R. Houck, L.-C. Chen, P. J. Keller, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 5800.
- [225] L. C. Chen, *Master Thesis*, Ohio State University, Columbus, OH (USA) 1985.
- [226] D. R. Houck, *Ph. D. Thesis*, Ohio State University, Columbus, OH (USA) 1986.
- [227] U. Mocek, J. M. Beale, C. Unkefer, H. G. Floss, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [228] D. R. Houck, L.-C. Chen, P. J. Keller, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 1250.
- [229] C. J. Pearce, K. L. Rinehart, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 5069.
- [230] K. L. Rinehart, D. D. Weller, C. J. Pearce, *J. Nat. Prod.* 43 (1980) 1.
- [231] B. W. Bycroft, M. S. Gowland, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1978, 256.
- [232] H. Kleinkauf, H. von Döhren (Hrsg.): *Peptide Antibiotics. Biosynthesis and Function*, De Gruyter, Berlin 1982.
- [233] O. D. Hensens, G. Albers-Schönberg, B. F. Anderson, *J. Antibiot.* 36 (1983) 799.
- [234] O. D. Hensens, G. Albers-Schöneberg, B. F. Anderson, *J. Antibiot.* 36 (1983) 832.
- [235] D. O'Hagan, J. M. Beale, H. G. Floss, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [236] P. Zhou, U. Mocek, J. M. Beale, H. G. Floss, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [237] E. Leete, J. N. Wemple, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 2698.
- [238] P. Zhou, T. Frenzel, J. M. Beale, H. G. Floss, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [239] L.-D. Yuen, P. Zhou, J. M. Beale, H. G. Floss, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [240] D. R. Houck, K. Kobayashi, J. M. Williamson, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 5365.
- [241] F. Malpartida, D. A. Hopwood, *John Innes Report 1983–1984* (1984) 90.
- [242] K. F. Chater, C. J. Bruton, *Gene* 26 (1983) 67; *EMBO J.* 4 (1985) 1893.
- [243] T. Ohnuki, T. Imanaka, S. Aiba, *J. Bacteriol.* 164 (1985) 85.