

Azid^[1,2] angesehen werden kann. Die N-N-Bindungen im ternären Azid (Mittelwert: 124(2) pm) sind im Vergleich zu Ba[N₃]₂^[10] (Mittelwert: 118.1 pm) oder den Alkalimetallverbindungen M[N₃] (M = K, Rb, Cs; Mittelwert: 117(1) pm)^[1,3] eher lang; dies korrespondiert mit der hohen Koordinationszahl (CN) der Azid-Ionen (CN = 8, im Vergleich dazu CN = 4–5 in Ba[N₃]₂) und mit der im Vergleich zu den Alkalimetallverbindungen (ebenfalls achtfach koordiniertes Azid) höheren Ladung der umgebenden Kationen. In Abbildung 2 ist die Koordination der Azid-Ionen durch Barium-Ionen dargestellt. Die besondere Verknüpfung von Kationen und Anionen führt zu Bändern in Richtung [100]. Die entstandenen N-Atome der Azidgruppen sind von fünf (291(2)–320(2) pm) oder vier (283(2)–312(2) pm) Barium-Ionen umgeben, während das zentrale N-Atom lediglich drei Ba-Nachbarn (294(2)–306(2) pm) aufweist. Dieser Befund stimmt mit MO-Rechnungen an Azid-Ionen^[12, 14] überein, wonach das mittlere N-Atom eine Formalladung von +0.6 trägt, während den terminalen N-Atomen die Formalladung –0.8 zuzuordnen ist, so daß insbesondere diese N-Atome in Wechselwirkung mit benachbarten Kationen treten sollten.

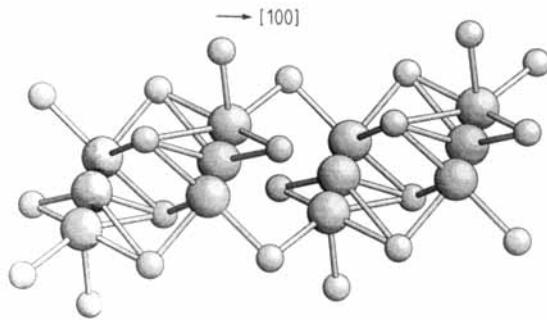


Abb. 2. Koordination der Azid-Ionen (große Kugeln) durch Barium-Ionen (kleine Kugeln) in Ba₉N[N₃]₂[TaN₄]₂ und Verknüpfung zu Bändern in Richtung [100].

Die isolierten Nitrid-Ionen sind verzerrt oktaedisch von Barium-Ionen umgeben (264(2)–295(1) pm); der Mittelwert liegt mit 280(2) pm in einem Bereich, wie er auch für oktaedrisch durch Ba²⁺ koordiniertes N^{3–} im erst kürzlich beschriebenen Subnitrid NaBa₃N^[15] gefunden wurde (273.4 pm).

Die Bildung eines Azids bei einer Reaktionstemperatur von 1223 K ist eher unwahrscheinlich und bisher auch nicht beobachtet worden. Es ist daher anzunehmen, daß Ba₉N[N₃]₂[TaN₄]₂ erst bei tieferen Temperaturen im Verlauf des raschen Temperaturausgleichs zwischen 1223 K und Raumtemperatur entsteht. Zwar ist die Darstellung reproduzierbar, da sich die Ausbeute jedoch auf jeweils nur einige wenige Kriställchen beschränkt, konnten weiterführende Untersuchungen (z.B. schwingungsspektroskopische Messungen) bisher noch nicht durchgeführt werden.

Eingegangen am 5. April 1993 [Z 5981]

- [1] A. Gudat, *Ternäre und quaternäre Nitride und Nitridometallate in Systemen Lithium-Erdalkalimetall-Übergangsmetall-Stickstoff*, Dissertation, Universität Düsseldorf, 1990.
- [2] P. Höhn, *Ternäre und quaternäre Nitridometallate: Verbindungen in den Systemen Lithium-Erdalkalimetall-Übergangsmetall-Stickstoff*, Dissertation, Technische Hochschule Darmstadt, 1993.
- [3] A. Gudat, R. Kniep, A. Rabenau, *Angew. Chem. 1991*, **103**, 217–218; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1991*, **30**, 199–200.
- [4] S. Haag, P. Höhn, R. Kniep, W. Milius, *Angew. Chem. 1991*, **103**, 874–875; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1991*, **30**, 831–832.
- [5] J. Jäger, D. Stahl, P. C. Schmidt, R. Kniep, *Angew. Chem. 1993*, **105**, 738–739; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1993*, **32**, 709–710.

[6] F. K.-H. Helmlinger, P. Höhn, R. Kniep, *Z. Naturforsch. B* **1993**, **48**, 1015–1018.

[7] Strukturanalyse von Ba₉N[N₃]₂[TaN₄]₂: Raumgruppe $P\bar{1}$; $a = 801.2(2)$, $b = 964.7(3)$, $c = 1265.5(2)$ pm, $\alpha = 75.86(2)^\circ$, $\beta = 85.78(1)^\circ$, $\gamma = 87.55(2)^\circ$; $Z = 2$, $\rho_{\text{ber.}} = 6.20 \text{ g cm}^{-3}$; 3430 unabhängige beobachtete Reflexe ($I \geq 3\sigma(I)$); STOE-Stadi4-Diffraktometer, 2 θ -Bereich von 3° bis 60°; Mo_{Kα}-Strahlung; $R(R_{\text{s}}) = 0.059$ (0.036). Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, Gesellschaft für wissenschaftlich-technische Information mbH, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-57257, der Autoren und des Zeitschriftenzitats angefordert werden.

[8] C. Wachsmann, H. Jacobs, *J. Alloys Comp.* **1992**, **190**, 113–116.

[9] P. Buzek, T. M. Klapötke, P. von Ragué Schleyer, I. C. Tornieporth-Oetting, P. S. White, *Angew. Chem. 1993*, **105**, 289–290; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1993*, **32**, 275–276.

[10] E. M. Walitzki, H. Krischner, *Z. Kristallogr.* **1970**, **132**, 19–26.

[11] W. H. Bauer, *Cryst. Rev.* **1987**, **1**, 59–83.

[12] U. Müller, *Struct. Bonding (Berlin)* **1972**, **14**, 141–172.

[13] U. Müller, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1972**, **392**, 159–166.

[14] J. F. Wyatt, I. H. Hillier, V. R. Saunders, J. A. Connor, *J. Chem. Phys.* **1971**, **54**, 5311–5315.

[15] P. E. Rauch, A. Simon, *Angew. Chem. 1992*, **104**, 1505–1506; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1992*, **31**, 1519–1520.

Posttranskriptionale Backbone-Modifikationen unter Bildung heteroaromatischer Fünfringe bei der Biosynthese des glycinreichen Antibioticums Microcin B17 **

Von Anja Bayer, Stefan Freund, Graeme Nicholson, und Günther Jung*

Professor Murray Goodman zum 65. Geburtstag gewidmet

Das Antibioticum Microcin B17 (McB17) gehört zu den Microcinen^[1], einer Gruppe von Polypeptiden, welche von Asensio et al. 1976 entdeckt wurden^[2]. Im Unterschied zu den bekannten Peptidantibiotika, welche durch Multienzymkomplexe synthetisiert werden, sind Microcine viel größere Polypeptide, die durch posttranskriptionale Modifikation eines ribosomal synthetisierten Vorläuferproteins von nicht sporenbildenden Mikroorganismen wie Enterobakterien produziert werden. McB17 ist ein Inhibitor der DNA-Replikation mit einer beachtlichen baktericiden Aktivität gegen Gram-negative Bakterien: Nur ein Molekül genügt, um eine Bakterienzelle zu töten^[1]. Die Wirkungsweise ähnelt der von Chinolinen und einer Reihe von Antitumormedikamenten, die gegenwärtig in der Chemotherapie verwendet werden. McB17 bindet an DNA-gebundene Gyrase und induziert so Doppelstrangschnitte, da die normale Gyraseaktivität (DNA-Entspiralisierung und Wiederverknüpfung der gespaltenen DNA) unterbunden wird^[3].

In früheren Untersuchungen^[4] konnte die Natur der posttranskriptionalen Modifikationen in McB17 nicht ermittelt werden. Hier beschreiben wir die Strukturaufklärung von McB17 unter Einsatz unterschiedlicher analytischer und spektroskopischer Techniken einschließlich multidimensionaler NMR-Spektroskopie; dabei wurde auch ein ¹⁵N-markiertes Isolat untersucht.

McB17 wird durch mehrere Stämme von *Escherichia coli* produziert^[5]. Die genetischen Determinanten zur Produk-

[*] Prof. Dr. G. Jung, Dipl.-Biol. A. Bayer, Dr. S. Freund, G. Nicholson
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen
Telefax: Int. + 7071/29-6925

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert (SFB 323, Projekt C2-Jung). Wir danken Prof. Dr. V. Braun für die Bereitstellung von Laboreinrichtungen, Prof. Dr. K. Hantke für die Überlassung des Microcin-produzierenden Stammes und Dr. M. Spraul für die Aufnahme des 750 MHz-NMR-Spektrums von McB17.

tion von McB17 befinden sich als Cluster auf dem Plasmid. Das Gen *mcbA* codiert für das inaktive 69-Aminosäuren-Vorläufermolekül von McB17^[6] (Abb. 1). McB17 hat die folgenden ungewöhnlichen Eigenschaften: 26 von insgesamt 43 Aminosäureresten der DNA-abgeleiteten Sequenz sind Glycinreste. Das reife Polypeptid ist sehr thermostabil und resistent gegen extreme pH-Werte, seine geringe Löslichkeit in wäßrigen Puffern und in den meisten organischen Lösungsmitteln ist bemerkenswert. Diese Eigenschaften erschweren Isolierung, Reinigung und enzymatische Spaltungen, z. B. mit Lysostaphin, erheblich.

GC-MS-Untersuchungen^[9] eines derivatisierten Totalhydrolysats von McB17 auf einer chiralen Phase zeigten alle erwarteten Aminosäuren, die über Molmasse und Retentionszeit der Trifluoracetylamino-*n*-propylester bestimmt wurden. Wieder wurde Cys nicht entdeckt, und es wurden nur zwei von sechs Ser-Resten gefunden. Eine zusätzliche Verbindung wurde eluiert, die eine lange Retentionszeit aufwies. Aufgrund ihres charakteristischen MS-Fragmentierungsmusters wurde sie als 2-Aminomethylthiazol-4-carbonsäure (Atc) identifiziert. Ein möglicher Mechanismus dieser Ringbildung wäre ein Angriff der

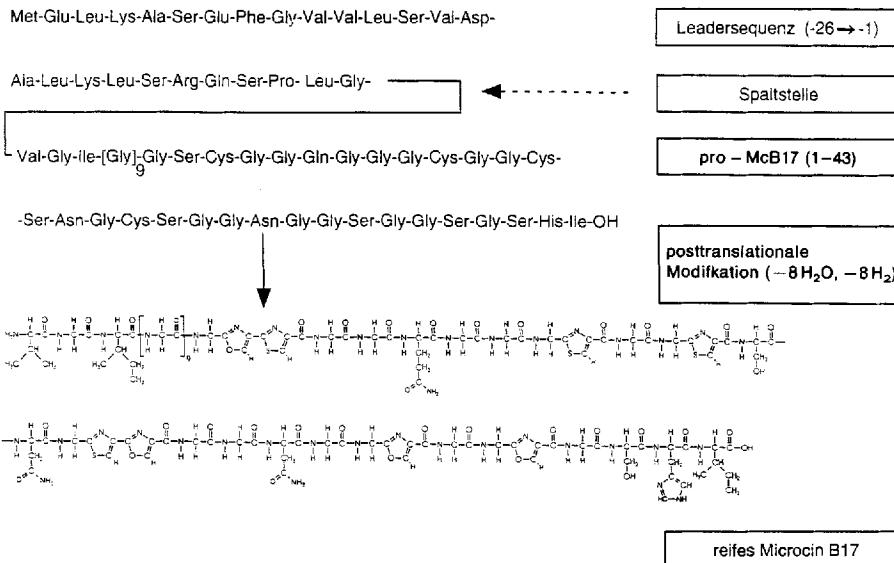


Abb. 1. Primärsequenz des Vorläuferproteins von Microcin B17 und dessen posttranskriptionale Modifikation zum reifen Microcin B17, welches 2-Aminomethylthiazol-4-carbonsäure (Atc), 2-Aminomethoxyazol-4-carbonsäure (Aoc), 2-(2-Aminomethylthiazolyl)-oxazol-4-carbonsäure (Atoc) und 2-(2-Aminomethoxyazolyl)thiazol-4-carbonsäure (Aotc) als heteroaromatische Aminosäuren enthält.

Die Struktur von hochreinem McB17^[7] wurde mit UV-Spektroskopie, Massenspektrometrie (MS), Proteinsequenzierung, Aminosäurenanalyse, Gaschromatographie(GC)-MS und besonders multidimensionaler NMR-Spektroskopie aufgeklärt.

Die Molmasse von McB17 wurde durch On-Line-HPLC-Electrospray-MS (HPLC = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)^[8] bestimmt. Wegen seiner geringen Löslichkeit mußte McB17 in 50proz. wäßriger Ameisensäure gelöst werden. Aus den zweifach und dreifach positiv geladenen Quasimolekülien wurde eine Molmasse von 3092 Da bestimmt. Diese experimentell bestimmte Molmasse wichen von der auf der Basis der DNA-Sequenz (Abb. 1) berechneten Molmasse um 160 Da ab. Die um 48 amu höhere Molmasse von ¹⁵N-markiertem McB17 bewies die vollständige Aufnahme von ¹⁵N bei Verwendung von (¹⁵NH₄)₂SO₄ als einziger Stickstoffquelle.

McB17 wurde mit 6 N HCl in einem vollautomatisierten Aminosäurenanalysator in der Gasphase bei 160 °C hydrolysiert. Nach Derivatisierung mit Phenylisothiocyanat und Trennung der Phenylthiocarbamoyl-Derivate mit Microbore-RP-HPLC wurden alle Aminosäuren, die auf der Strukturgen-Sequenz (DNA)^[6] codiert sind, gefunden, mit folgenden Ausnahmen: Keiner der Cys-Reste und nur zwei Ser-Reste wurden detektiert, obgleich vier Cys- und sechs Ser-Reste erwartet wurden. Die Zahl der gefundenen Gly-Reste variierte zwischen 13 und 21, vorhergesagt waren insgesamt 26 Reste. Diese Resultate wiesen deutlich auf eine Modifikation von vier Ser-, vier Cys- und einigen Gly-Resten hin. Die Reduktion von McB17 mit NaBH₄ sollte freie Thiolgruppen ergeben, falls Disulfidbrücken vorhanden sind. Die Reaktion mit Ellman-Reagens war jedoch negativ.

Thiolgruppe des Cysteins auf die Peptidcarbonylgruppe des vorhergehenden N-terminalen Gly-Restes und die Eliminierung von Wasser und H₂ (Abb. 1).

Das UV-Spektrum von McB17 zeigte zwei Absorptionsmaxima bei 210 und 270–280 nm, obgleich die DNA-abgeleitete Aminosäuresequenz von McB17 keine aromatischen Aminosäurereste enthält. Die UV-Absorptionen deuten auf die Anwesenheit weiterer aromatischer Ringsysteme außer den Atc-Resten ($\lambda_{\text{max}} = 225 \text{ nm}$) hin.

Der automatisierte Edman-Abbau von McB17 endete nach den ersten zwölf N-terminalen Aminosäureresten: VGIGGGGGGGGG (Abb. 1). Dies legt den Schluß nahe, daß Gly¹³ und Ser¹⁴ im reifen Peptidantibioticum modifiziert sind.

Die Standardmethode zur Bestimmung der Primärsequenz von Peptidfragmenten durch 2D-NMR-Spektroskopie sind Experimente, die auf skalarer J-Kopplung beruhen, wie Doppelquanten-gefilterte Korrelationsspektroskopie (DQF-COSY) und Totalkorrelationsspektroskopie (TOCSY). Damit lassen sich die Spinsysteme der Aminosäurereste zuordnen und die Verknüpfung von benachbarten Resten über Kern-Overhauser-Effekte (NOEs) erkennen^[10]. In Anbetracht der DNA-abgeleiteten Vorläufersequenz (Abb. 1) mußte diese Methode im Falle von Microcin B17 jedoch scheitern, da bis zu 26 der 43 Reste von Microcin B17 Glycineinheiten sind; es fehlen deshalb charakteristische Signale von Seitenketten. Außerdem wurden einige heteroaromatische Komponenten wie Atc erwartet, da nach Austausch aller labilen Amidprotonen gegen Deuterium acht Singulets im aromatischen Bereich verblieben.

Die Herstellung von einheitlich ¹⁵N-markiertem McB17 und die intensive Nutzung von invers-detektierten heteronu-

clearen Experimenten mit ^{13}C bei natürlichem Isotopengehalt sowie ^{15}N -Markierung (100%) ermöglichen die Aufnahme eines Satzes von zwei- und dreidimensionaler NMR-Spektren, mit denen sich alle ungewöhnlichen Reste von McB17 bestimmen ließen. Basierend auf der Primärstruktur des Vorläuferpeptids, zeigten die Aminosäuren- und GC-MS-Analysen von ^{15}N -markiertem McB17, daß mindestens fünf Glycin-, alle vier Cystein- und vier der sechs Serinreste modifiziert wurden. Wie GC-MS zeigte, sind offensichtlich die drei Gly-Cys-Segmente in McB17 zu Thiazol- oder Oxazolringen modifiziert worden, ein entsprechendes 2-Aminomethyloxazol-4-carbonsäure-Analogon (Aoc), welches sich durch Modifikation von Gly-Ser ergeben sollte, konnte jedoch nicht gefunden werden. Wir erklären die Differenz der Molmasse von ~ 160 Da zwischen Pro-McB17 und McB17 als das Resultat von enzymatischen Modifikationen ($-\text{H}_2\text{O}$, $-\text{H}_2$) zu Thiazol- und Oxazolringen an acht Stellen (Abb. 1). Im folgenden diskutieren wir einen Teil der 2D-NMR-Experimente, mit denen die Modifikationsstellen definiert und lokalisiert werden konnten.

Ein homonukleares TOCSY-Experiment ergab die Spinsysteme aller Aminosäurereste, welche schon durch Aminosäurenanalyse ermittelt wurden, jedoch konnte eines der Spinsysteme der beiden erwarteten nicht modifizierten Serinreste nur in einem ^{15}N -editierten TOCSY-Experiment zugeordnet werden (Abb. 2). Die meisten ^1H -NMR-Signale der

eine vollständige Überlappung der meisten seiner ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale zeigt.

Das ^{13}C - ^1H -HSQC-Experiment ergab acht Signale mit für heteroaromatische Kohlenstoffatome charakteristischen ^{13}C -chemischen Verschiebungen. Somit wurde erwartet, daß diese CH-Fragmente Teile der Modifikationsstellen sind, welche nicht nur die vier Cystein-, sondern auch die Serinreste betreffen. In einem für Weitbereichskontakte optimierten ^{13}C - ^1H -HMQC-Experiment zeigten vier dieser Singulettssignale heteroaromatischer Kohlenstoffatome Kontakte zu Signalen im Bereich um $\delta = 140$, 4 andere zu Signalen um $\delta = 160$. Diese Signale konnten den Positionen C4 (bei $\delta = 140$) und C2 (bei $\delta = 160$) von Thiazol- bzw. Oxazolen zugeordnet werden. Als Signale für die erwarteten Aminomethyl-Backbone-Fragmente wurden drei diskrete Dubletts und drei überlappende Signale im 1D-NMR-Spektrum mit charakteristischen ^{13}C -chemischen Verschiebungen von $\delta = 40$ und $\delta = 44$ gefunden. Weitreichende ^{13}C - ^1H -Kontakte zu Signalen bei $\delta = 160$ bewiesen die Verknüpfung dieser Aminomethylfragmente zu C2-Kohlenstoffatomen der nachfolgenden heterocyclischen Backbone-Fragmente. Eine Betrachtung der Vorläufersequenz (Abb. 1) zeigt, daß die Modifikation benachbarter Serin- und Cysteinreste nicht nur zu monocyclischen, sondern auch zu Einheiten mit zwei verknüpften cyclischen Systemen führen sollte. Zählt man alle möglichen Modifikationsstellen, so sind sechs aus Gly-

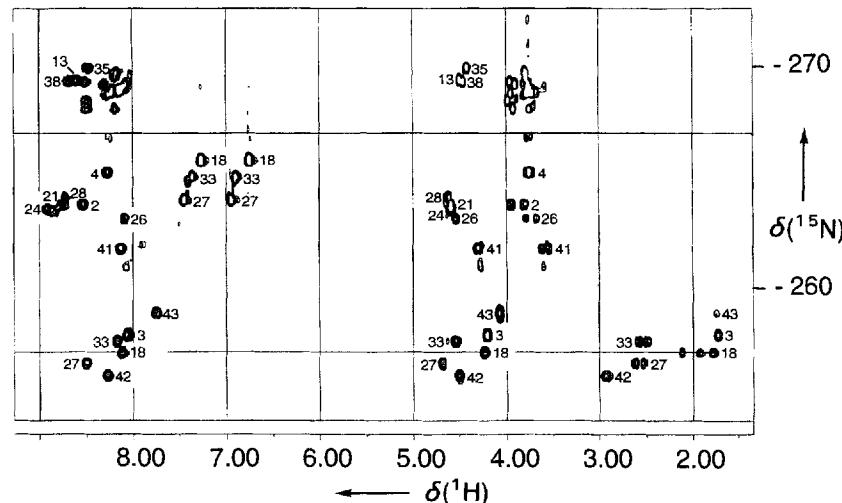


Abb. 2. ^{15}N - ^1H -HSQC-TOCSY-Spektrum von McB17 in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$. Die Bezeichnung entspricht den Positionen der den Modifikationen zugrundeliegenden Aminosäurereste im Vorläuferpeptid (Abb. 1). Wegen der vollständigen Signalüberlappung mußte auf eine Zuordnung der Gly-Reste verzichtet werden. Der abgebildete Ausschnitt enthält die Signale der NH_2 , CH_2 - und $\text{CH}_{3,4}$ -Protonen, die mit dem Amidstickstoffatom des gleichen Spinsystems verknüpft sind. Zwischen $\delta = 7.5$ und 6.5 finden sich die NH_2 -Signale von Asn und Gln. Standards: $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, intern (^1H , $\delta = 2.50$), und MeNO_2 , extern (^{15}N , $\delta = 0$) [12 b].

Glycinreste waren innerhalb von $\delta = 3.8$ – 4.0 vollständig überlappt. Diese Situation blieb unverändert im ^{13}C - ^1H -HSQC-Experiment (HSQC = heteronukleare Einquanten-kohärenz), welches die Zuordnung aller Kohlenstoffatome der zuvor erwähnten Standardaminosäurereste ermöglichte. In diesen beiden Experimenten traten zusätzliche Signale auf, die auf modifizierte Peptidfragmente zurückzuführen waren. Ein NOESY-Spektrum ergab sequentielle NOEs innerhalb der terminalen Positionen 1–4 und 40–43 sowie für die benachbarten Reste von zwei Asn und einem Gln. Die Zuordnung der NOEs bewies, daß sich einer der nicht modifizierten Serinreste in Position 41 befindet. Das Fehlen der sequentiellen NOEs von Gly⁴⁰ zu Rest 39 deutete auf eine Modifikationsstelle an der Position Ser³⁹ hin. Die Abwesenheit von Weitbereichskontakten in diesem 750 MHz-NOESY-Experiment deutet auf eine gestreckte Struktur von McB17 hin und macht eine Vernetzung äußerst unwahrscheinlich. Die Zuordnung des N-Terminus wurde durch das (Gly)₉-Segment erschwert (Abb. 1), das, wie bereits erwähnt,

cinresten stammende Aminomethylfragmente zu erwarten. Dies stimmt mit den sechs gefundenen, partiell überlappenden $\text{NH}-\text{CH}_2$ -Fragmenten überein. Somit haben wir bis jetzt bewiesen, daß nicht nur Gly-Cys-, sondern auch Gly-Ser-Einheiten zu aminomethylierten Fünfring-Heterocyclen im Peptidrückgrat modifiziert sind.

Eine direkte Detektion der ^{15}N -NMR-Signale dieser Heterocyclen wird durch die niedrige Empfindlichkeit dieses Kerns erschwert. Liegen wirklich Thiazol- und Oxazolreste vor, so sollte ein invers-detektiertes ^{15}N - ^1H -HMBC-Experiment (HMBC = heteronukleare Mehrfachbindungs-Korrelation) imstande sein, den ^{15}N -Kern des Thiazols/Oxazols via $^3J_{\text{NH}}$ -Kopplungen mit dem C5-Proton und den Methylenprotonen der Aminomethylfragmente zu verbinden (Abb. 3). Abbildung 3 zeigt zwei Ausschnitte des HMBC-Spektrums mit ^{15}N -NMR-Signalen bei $\delta = -80$ und $\delta = -120$. Diese chemischen Verschiebungen sind charakteristisch für Oxazole und Thiazole^[11, 12]. In beiden Teilstücken wurden je vier Signale gefunden, die auf eine weitrei-

chende Kopplung zwischen C5-H und ^{15}N hindeuteten. Diese beweisen die Modifikation von vier Serin- und vier Cysteinresten zu Oxazol bzw. Thiazol. In beiden Bereichen zeigen je drei ^{15}N -NMR-Signale weitreichende Kontakte zu Aminomethylprotonen, wodurch die Modifikation von sechs Glycinresten zu Aminomethylfragmenten bewiesen wird. Die übrigen ^{15}N -NMR-Signale, welche nicht mit Aminomethylfragmenten verbunden sind, müssen Teile der Einheiten mit zwei verknüpften cyclischen Systemen sein, die aus einem modifizierten Gly-Cys-Ser- und einem Gly-Ser-Cys-Segment stammen. Somit konnte die Atoc-Modifikation in den Positionen 13–15 eindeutig zugeordnet werden, es bleiben jedoch noch zwei Möglichkeiten für die Atoc-Stelle. Sequentielle NOEs von Asn²⁷ zu Ser²⁶ in einem ^{15}N -editierten-NOESY-Spektrum bewiesen die Lage von Atoc in den Positionen 28–30.

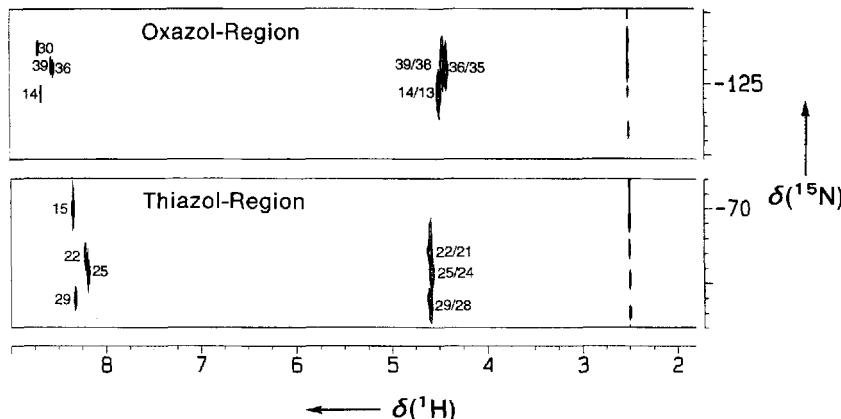


Abb. 3. ^{15}N - ^1H -HMBC-Spektrum von McB17 in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$. Die Ausschnitte zeigen Weitbereichskontakte zwischen ^{15}N und den C5-Protonen der heterocyclischen Modifikationsstellen sowie Weitbereichskontakte zwischen ^{15}N und den Aminomethylfragmenten. Standards: $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, intern (H , $\delta = 2.50$), und MeNO_2 , extern (^{15}N , $\delta = 0$) [12b].

Fassen wir zusammen: McB17 enthält acht Backbone-Modifikationsstellen, die drei Gly-Cys- und drei Gly-Ser-Segmente und jeweils ein Gly-Ser-Cys- und ein Gly-Cys-Ser-Segment des Vorläuferproteins umfassen. Abgesehen vom (Gly)₉-Segment mit vollständig überlappenden NMR-Signalen konnten alle anderen Reste und die Modifikationsstellen auf der Basis der Primärsequenz des Präpeptids zugeordnet werden. Eine vollständige sequentielle Zuordnung ist erschwert durch das Fehlen von NOEs sowie von weitreichenden Kontakten zwischen den Modifikationsstellen und den nachfolgenden Resten. Ein unabhängiger Beweis für die verknüpften heteroaromatischen Fünfringe (Abb. 1) könnte nur durch eine spezifische ^{13}C -Markierung der Glycin- oder der Serinreste erreicht werden. Diese wird zur Zeit biosynthetisch durchgeführt; die chemische Synthese von McB17 ist ebenfalls in Arbeit.

Bisher waren Lantibiotica die einzige bekannte Klasse ribosomal synthetisierter Polypeptide mit posttranslationalen Modifikationen zu ungewöhnlichen Seitenketten wie α,β -Didehydroaminoäuren und mehreren cyclischen Sulfiden^[13, 14], nun haben wir zum ersten Mal posttranslationale Backbone-Modifikationen eines Proteins entdeckt, bei denen heteroaromatische Fünfringe gebildet werden.

Experimentelles

Isolierung von Microcin B17: Der McB17-produzierende Bakterienstamm wurde unter optimierten Bedingungen kultiviert. Das Antibioticum bleibt an der Zellwand gebunden und wird nicht ins Kulturmedium ausgeschieden, folglich wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation isoliert. Zur Gewinnung von McB17 wurde die Zellsuspension in einem Essigsäure- und EDTA-haltigen Puffer bei pH 4.0 ca. 10 min auf 100 °C erhitzt. Nach Abzentrifugieren wurde der McB17-haltige Überstand zur Trockne eingeengt und der Rückstand in 50proz. Ameisensäure gelöst. McB17 wurde gelchromatographisch angereichert und von Komponenten der Zellextraktion mit niedrigerer Molmasse ab-

getrennt. Umkehrphasen-HPLC von antibiotisch aktiven Fraktionen auf RP18 lieferte das Antibioticum McB17 in 95% Reinheit. ^{15}N -markiertes McB17 wurde aus einer Zellkultur mit $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als einziger Stickstoffquelle erhalten.

NMR: 2D-NMR-Experimente wurden bei 400 und 750 MHz mit Bruker-AMX-Spektrometern, ausgerüstet mit inversen Tripelresonanz-Probenköpfen und X32-Computern, durchgeführt. Alle 2D-Experimente wurden im „Pure-phase-absorption“-Modus mit der TPPI-Methode (TPPI = Time Proportional Phase Incrementation) aufgenommen. NOESY-Experimente mit Mischzeiten von 250 ms und Clean-TOCSY-Spektren mit einer MLEV17-Mischsequenz von 50 ms zwischen Trim-Pulsen von 2.5 ms wurden bei 305 K aufgenommen. Die ^{13}C - ^1H -HSQC-Spektren und das für weitreichende Kopplungen (7 Hz) optimierte HMQC-Spektrum wurden mit einer Probe mit natürlichem Isotopengehalt aufgenommen. ^{15}N - ^1H -HSQC-, -HSQC-TOCSY-, -HMQC-NOESY-Spektren und ein -HMQC-Spektrum, optimiert für weitreichende Kopplungen ($J = 7$ Hz), wurden mit einer einheitlich ^{15}N -markierten Probe aufgenommen. Im allgemeinen wurden pro Experiment 512–700 Inkremente von 2 K-Datenpunkten in der Akquisitionsdimension (F_2 -Dimension) aufgenommen, mit einer digitalen Auflösung von 4–5 Hz bei einer Bandbreite von 4800 Hz (400 MHz) und 10 500 Hz (750 MHz). Die ^{13}C - ^1H -HSQC- und

-HMQC-Spektren wurden mit einer Bandbreite von 180 ppm in der F_1 -Dimension aufgenommen. Für die ^{15}N - ^1H -HSQC-, -HSQC-TOCSY-, -HMQC-NOESY-Spektren war eine Bandbreite von $\delta = 25$ in der F_1 -Dimension ausreichend. Das HMQC-Spektrum, optimiert für weitreichende Kopplungen, wurde mit einer Bandbreite von 360 ppm aufgenommen. Die Rohdaten wurden durch Zero-Filling auf eine Datenmatrix von 2 K \times 2 K-Datenpunkten erweitert und mit einer quadratischen Sinusfunktion gewichtet. Für das NOESY-Experiment wurde die Zahl der Datenpunkte in der F_1 -Dimension durch lineare Prädiktion auf 700 erhöht.

Eingegangen am 1. April 1993 [Z 5967]

- [1] F. Baquero, F. Moreno, *FEMS Microbiol. Lett.* **1984**, *23*, 117–124.
- [2] C. Ascencio, J. C. Perez-Diaz, M. C. Martinez, F. Baquero, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *7*–14.
- [3] J. L. Vizan, C. Hernandez-Chico, I. del Castillo, F. Moreno, *EMBO J.* **1991**, *10*, 467–476.
- [4] P. Yorgey, J. Lee, R. Kolter in *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics* (Hrsg.: R. James, C. Ladzinski, F. Pattus), Springer, New York, **1992**, S. 19–31.
- [5] J. Davagnino, M. Herrero, D. Furlong, F. Moreno, R. Kolter, *Proteins* **1986**, *1*, 230–238.
- [6] M. Herrero, F. Moreno, *J. Gen. Microbiol.* **1986**, *132*, 393–402.
- [7] A. Bayer, S. Stevanovic, S. Freund, J. Metzger, G. Jung in *Peptides 1992* (Hrsg.: C. Schneider, A. Eberle), Escom, Leiden, **1993**, S. 117–118.
- [8] J. Metzger, W. Beck, G. Jung, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 235–237; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 226–228.
- [9] H. Frank, G. J. Nicholson, E. Bayer, *J. Chromatogr.* **1978**, *146*, 197–206.
- [10] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [11] S. Berger, *NMR-Spektroskopie von Nichtmetallen*, Band 2, Thieme, Stuttgart, **1992**.
- [12] a) U. Schmidt, R. Utz, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 723–724; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 725–726; b) M. A. J. Akkermann, Dissertation, Universität Nijmegen, **1992**; c) H. G. Floss, J. M. Beale, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 147–179; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 146–178.
- [13] G. Jung, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1067–1084; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1051–1068.
- [14] *Nisin and Novel Lantibiotics* (Hrsg.: G. Jung, H.-G. Sahl), Escom, Leiden, **1991**.