

zugegeben. Nach der Komplexbildung, die am Auftreten einer tiefbraunen Farbe zu erkennen war, wurde ca. 12 h stehen gelassen und danach eine wäßrige Lösung (10 mL) von NH_4PF_6 (22 mg, 0.135 mmol) zugegeben. Dabei fiel das Rohprodukt aus. Dieses wurde chromatographisch gereinigt (Aluminiumoxid, 1–6% $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, $R_f = 0.57$ für 5-(PF_6) $_4$ und $R_f = 0.52$ für 6-(PF_6) $_4$ in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 9/1). Danach wurden die rotbraunen Salze aus CH_2Cl_2 /Hexan umkristallisiert.

5-(PF_6) $_4$; 57% Ausbeute; UV/Vis (CH_3CN): λ_{max} (e) 266 (63 800), 302 (67 300), 476 (18 300), 536 nm (sh, 7200); FT-IR (KBr-Preßling): $\tilde{\nu}[\text{cm}^{-1}] = 2070$ ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1638, 1450, 1385, 1262, 1087, 1048, 844 cm^{-1} ; FAB-MS (*meta*-Nitrobenzylalkohol als Matrix): m/z 1536/1538 [$M^+ - 2\text{PF}_6$], 1391/1393 [$M^+ - 3\text{PF}_6$], 1246/1248 [$M^+ - 4\text{PF}_6$]; Analyse für $\text{C}_{62}\text{H}_{42}\text{N}_{12}\text{P}_4\text{F}_{24}\text{RuOs}$ ($M_r = 1826.233$): ber. C 40.78, H 2.32, N 9.20, gef. C 40.50, H 2.09, N 8.93.

6-(PF_6) $_4$; 23% Ausbeute; UV/Vis (CH_3CN): λ_{max} (e) 266 (118 600), 301 (94 400), 478 (24 600), 539 nm (sh, 11 500); FT-IR (KBr-Preßling): $\tilde{\nu}[\text{cm}^{-1}] = 2081$ ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1604, 1450, 1386, 1262, 1089, 1048, 844 cm^{-1} ; FAB-MS (*meta*-Nitrobenzylalkohol als Matrix): m/z 1560/1562 [$M^+ - 2\text{PF}_6$], 1415/1417 [$M^+ - 3\text{PF}_6$], 1270/1272 [$M^+ - 4\text{PF}_6$]; Analyse für $\text{C}_{64}\text{H}_{42}\text{N}_{12}\text{P}_4\text{F}_{24}\text{RuOs}$ ($M_r = 1850.255$): ber. C 41.55, H 2.29, N 9.08, gef. C 41.37, H 2.03, N 8.96.

Meßmethoden: Die Lumineszenzlebensdauern wurden nach Anregung mit einem gepumpten „cavity-dumped“ Farbstofflaser mit zeitkorrelierten Einzelphotonenzählverfahren ermittelt. Es wurden Rhodamin 6G- (für die Anregung bei 600 nm) und frequenzverdoppelte Styryl-9-Farblaser (für die Anregung bei 440 nm) verwendet. Nach Anwendung globaler Analysetechniken auf die entrollten Abklingkurven wies das Gerät eine zeitliche Auflösung von etwa 15 ps auf. Transientenabsorptionsspektroskopische Untersuchungen wurden mit einem frequenzverdoppelten, „mode-locked“ Nd:YAG-Laser (Pulsweite 30 ps, Raman-verschoben auf 598 nm, 2 mJ pro Puls) oder einem frequenzverdoppelten Rhodamin-6G-Zweistrahlfarbstofflaser (Pulsweite 1 ps, 295 nm, 450 μJ pro Puls) durchgeführt. Für die kinetischen Messungen wurde die Rückbildung der Grundzustands-Absorptionsbande bei 450 nm (Bis(terpy)Ru^{II}) oder 650 nm (Bis(terpy)Os^{II}) beobachtet.

Eingegangen am 9. Dezember 1994 [Z 7535]

Stichworte: Energieübertragungen · Osmiumverbindungen · Photochemie · Rutheniumverbindungen

- [1] V. Balzani, F. Scandola, *Supramolecular Photochemistry*, Horwood, Chichester, 1991.
- [2] J. P. Sauvage, J. P. Collin, J. C. Chambron, S. Guillerez, C. Coudret, V. Balzani, F. Barigelli, L. De Cola, L. Flamigni, *Chem. Rev.* **1994**, 94, 993.
- [3] A. Slama-Schwok, M. Blanchard-Desce, J. M. Lehn, *J. Phys. Chem.* **1990**, 94, 3894.
- [4] V. Grosshenny, R. Ziessel, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1993**, 817.
- [5] V. Grosshenny, R. Ziessel, *J. Organomet. Chem.* **1993**, 453, C19.
- [6] L. R. Khundkar, A. E. Stigman, J. W. Perry, *J. Phys. Chem.* **1990**, 94, 1224.
- [7] F. Barigelli, L. Flamigni, V. Balzani, J.-P. Collin, J. P. Sauvage, A. Sour, E. C. Constable, A. M. W. Cargill Thompson, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 942; and *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7692.
- [8] A. C. Benniston, V. Goulle, A. Harriman, J. M. Lehn, B. Marcinke, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 7798.
- [9] A. E. Steigman, V. M. Miskowski, J. W. Perry, D. R. Coulter, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 5884.
- [10] A. C. Benniston, V. Grosshenny, A. Harriman, R. Ziessel, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1956; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1884.
- [11] a) F. Vögtle, M. Frank, M. Nieger, P. Belser, A. von Zelewsky, V. Balzani, F. Barigelli, L. De Cola, L. Flamigni, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1706; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1643; b) L. De Cola, V. Balzani, F. Barigelli, L. Flamigni, P. Belser, A. von Zelewsky, M. Frank, F. Vögtle, *Inorg. Chem.* **1993**, 32, 5228.
- [12] V. Grosshenny, R. Ziessel, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 8075.
- [13] D. W. Pipes, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 4042.
- [14] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 2841.
- [15] Am sinnvollsten ist es, 5 mit einem zweikernigen System, das eine Monophenyl-Brücke enthält, zu vergleichen: Bei identischen Triplettenergien sind die Triplettlebensdauern unterschiedlich.
- [16] S. Boyde, G. F. Stroude, W. E. Jones, Jr., T. J. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7395.
- [17] M. T. Indelli, C. A. Bignozzi, A. Harriman, J. R. Schoonover, F. Scandola, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 3768.
- [18] Die Geschwindigkeitskonstanten für die Triplettenergieübertragung wurde mit der Formel $k = (1/\tau_1) - (1/\tau_2)$ bestimmt, wobei τ_1 für die Lebensdauer der Bis(terpy)Ru^{II}-Einheit in 5 oder 6 steht, bestimmt durch Transientenabsorptionsspektroskopie, und τ_2 für die entsprechende Lebensdauer der Vergleichsverbindungen 4 oder 5, die durch zeitaufgelöste Lumineszenzspektroskopie bestimmt wurde.
- [19] J. E. Sutton, H. Taube, *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 3125.
- [20] J. P. Collin, P. Lainé, J. P. Launay, J. P. Sauvage, A. Sour, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 434.

- [21] Hauptsächlich begründet sich die Erwartung, daß eine Energieübertragung vom Förster-Typ bei 77 K im Vergleich zu 295 K langsamer sein sollte, in der Erhöhung des Brechungsindex, die beim Gefrieren der Lösung zu beobachten ist. Mit entsprechenden Werten ergibt die Förster-Formel beim Übergang von der flüssigen Lösung zum Glas eine Verlangsamung um den Faktor 5, vorausgesetzt, daß sich die Orientierung nicht ändert.
- [22] Die aus CPK-Modellen entnommenen Metall-Metall-Abstände von 13.8 und 16.2 Å für 5 und 6 ergeben mit der Geschwindigkeitsabnahme bei steigender Entfernung eine $R^{-2.2}$ -Abhängigkeit.
- [23] V. Balzani, F. Bolletta, F. Scandola, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 2152.
- [24] M. N. Paddon-Row, *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 18.
- [25] A. Osuka, K. Maruyama, N. Mataga, T. Asahi, I. Yamazaki, N. Tamai, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4958.
- [26] A. Vassilian, J. F. Wishart, B. van Hemelryck, H. Schwarz, S. S. Isied, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7278.
- [27] M. N. Paddon-Row, M. J. Shephard, K. D. Jordan, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 1743.
- [28] A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3656.
- [29] D. N. Beratan, J. N. Betts, J. N. Onuchic, *Science* **1991**, 252, 1285.

Neue, gentechnisch hergestellte Tetracenomycine**

Heinrich Decker, Sabine Haag, Györgyi Udvarnoki und Jürgen Rohr*

Wegen der mit Arzneimitteln derzeit nicht behandelbaren Krankheiten und einer steigenden Zahl chemotherapieresistenter Bakterien^[1], Viren, Parasiten und Krebszellen sind innovative Konzepte zur Auffindung von neuartigen Verbindungen erforderlich, die als Leitstrukturen für Pharmazeutika dienen könnten. Naturstoffe haben sich als wichtigste Quelle für neuartige, biologisch aktive Moleküle bewährt. Seit den Pionierexperimenten von Hopwood et al. 1985 werden auch gentechnisch hergestellte Hybrid-Mikroorganismen^[2] mit modifizierten Biosynthese-Genen als Quelle für neue Naturstoffe diskutiert^[3]. Obschon diese Methode der Biotechnologie als wesentlicher Schritt vorwärts gepriesen worden ist^[3e], gab es mit Ausnahme von genetisch gezielt veränderten Makrolid-Antibiotika lange keine weiteren Beispiele für gentechnisch konstruierte Hybridverbindungen^[4]. Erst kürzlich konnten Khosla et al. zeigen, daß das generelle Konzept ausbaufähig ist, indem sie durch Austausch von Polyketid-Synthase-Genen aus unterschiedlichen Produzenten mehrcyclischer, aromatischer Polyketide etliche, zuvor unbekannte Metaboliten herstellten^[5]. Darauf aufbauend könnten zukünftig noch weitere und auch andere Typen von Hybridprodukten zugänglich werden. Die Polyketide, die in den meisten Organismen, z. B. in Bakterien, Pilzen und Pflanzen, vorkommen, sind eine extrem reichhaltige Familie biologisch aktiver Verbindungen, darunter Antibiotika, Antitumormittel und Immunsuppressiva. Viele Polyketid-Biosynthesen wurden aufgeklärt, und an der genetischen Analyse der Polyketidproduktion wird intensiv gearbeitet^[2b]. Daher scheint die gentechnische Bearbeitung dieser Naturstoffklasse mit dem Ziel, neue Hybridmoleküle zu bilden, am vielversprechendsten zu sein^[2c]; dies belegen auch die gegen-

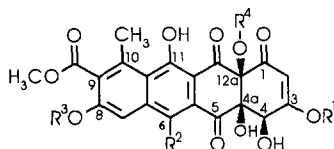
[*] Priv.-Doz. Dr. J. Rohr, Dipl.-Ing. G. Udvarnoki
Institut für Organische Chemie der Universität
Tammannstraße 2, D-37077 Göttingen
Telefax: Int. + 551/39-9660
E-mail: jrohr@gwdg.de

Dr. H. Decker, Dipl.-Biol. S. Haag
Institut für Biologie II der Universität Tübingen

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Herrn Dipl.-Chem. R. Machinek für das H,H-NOESY-NMR-Spektrum, Dr. J. Metzger (Universität Tübingen) für die Elektrospray- und Dr. G. Remberg (Universität Göttingen) für alle übrigen Massenspektren.

wärtig aktuellen Beispiele^[3–5]. Unsere Strategie bestand darin, Biosynthese-Gene von gut untersuchten Produzentenstämmen mehrcyclischer, aromatischer Polyketide zu mischen, da dann Hybridprodukte leichter zu erkennen sind. Als erste Ergebnisse unserer Untersuchungen wurden drei neue Tetracenomycine aus zwei Hybridstämmen isoliert, die durch Transfer der Tetracenomycin- bzw. der Elloramycin-Biosynthese-Gene aus *Streptomyces glaucescens* GLA.O^[6] bzw. *Streptomyces olivaceus* Tü 2353^[6] in den Urdamycin-Bildner *Streptomyces fradiae* Tü 2717 hergestellt worden waren^[7].

Die Tetracenomycine (Tetracenomycin C **1**), die mit ihnen eng verwandten Elloramycine^[6] (Elloramycin A **2**) und die Urdamycine^[7] (Urdamycin A **3**) sind Beispiele für biosynthetisch



1, $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$, $R^4 = \text{H}$

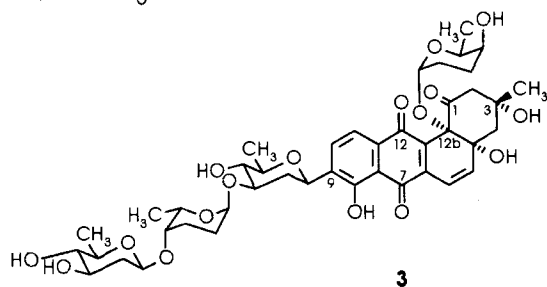
2, $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}_3\text{CO}$, $R^4 = \text{CH}_3$

4, $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{OH}$, $R^3 = \text{CH}_3$, $R^4 = \text{H}$

5, $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}$, $R^4 = \text{H}$

6, $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{HO}$, $R^4 = \text{H}$

7, $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}$, $R^4 = \text{H}$



3

sehr gut untersuchte Polyketid-Antibiotica. Da die Elloramycine und Urdamycine im Zuge ihrer Biosynthese glycosyliert werden, enthalten die Produzentenstämmen neben den Biosynthesegenen, die die Polyketid-Synthese kodieren, zusätzlich die Gene für die Biosynthese der entsprechenden Kohlenhydratbausteine und für deren Verknüpfung mit den Polyketid-Aglyca. Daher konnte man von einer Kombination der Biosynthese-Gene dieser Streptomyceten nicht nur Hybridprodukte erwarten, die aus einer Hybrid-Polyketid-Synthese hervorgehen, sondern auch solche, bei denen die Polyketid-Biosynthese des einen und der post-Polyketid-Biosyntheseapparat des anderen Elternstammes kombiniert wurden. Das sind in unserem Fall die Enzyme für den Kohlenhydrataufbau, einschließlich der Glycosyl-Transferasen, sowie die Enzyme mittlerer und später Biosyntheseschritte, z. B. Methyl-Transferasen oder Oxygenasen, die auch die Produkte oder Intermediate des jeweils anderen Elternstammes umsetzen können. Der Erfolg eines solchen Ansatzes hängt letztendlich von der Substratspezifität aller Enzyme ab, die an den Biosynthesen der Naturstoffe beteiligt sind. Um die generellen Erfolgsaussichten dieses Ansatzes zu testen, wurden zunächst der

gesamte Tetracenomycin(*tcm*)-Gencluster (Plasmid pWHM3 mit einem 12.5 kb-DNA-Einschub für die *tcm*-Biosynthese, pWHM1026^[8a]) bzw. Teile des Elloramycin(*elm*)-Genclusters (Plasmid pKC505^[8b]) mit einem 25 kb-DNA-Einschub für Teile der *elm*-Biosynthese, 16F4^[8c]) in den Urdamycin-Produzenten *Streptomyces fradiae* Tü 2717 transformiert^[8c]. Die meisten Metaboliten aus der Kulturlösung der beiden resultierenden Hybridstämmen wurden anhand ihrer UV-Spektren (HPLC/Dioden Array Detektor)^[9a] als Tetracenomycin-, Elloramycin- bzw. Urdamycin-verwandte Naturstoffe erkannt. Die Daten von drei Verbindungen stimmen allerdings nicht mit denen der bekannten Verbindungen überein. Die drei neuen Verbindungen wurden isoliert und ihre Strukturen aufgeklärt: Es handelt sich um die neuen Tetracenomycine 6-Hydroxytetracenomycin C **4** aus *Streptomyces fradiae* Tü 2717(pWHM1026) sowie 3,8-Didesmethyltetracenomycin C **5** und 8-β-D-Olivosyl-8-desmethyltetracenomycin C **6** aus *Streptomyces fradiae* Tü 2717(16F4). Die Strukturen wurden aus der Analyse der NMR- (Tabelle 1 und 2)

Tabelle 1. ¹³C-NMR-Daten der neuen Tetracenomycine **4**, **5** und **6** im Vergleich mit denen von Tetracenomycin C **1** (TMS, 125.7 MHz; δ, Multiplizität (APT)).

	1 [a]	4 [a]	5 [b]	6 [a, c]
C-1	190.8 s	190.6 s	190.8 s	190.3 s
C-2	99.7 d	100.0 d	98.0 d	100.0 d
C-3	175.3 s	174.9 s	187.0 s	175.0 s
3-OCH ₃	57.2 q	57.4 q	–	57.3 q
C-4	70.3 d	71.0 d	74.4 d	70.5 d
C-4a	85.2 s	84.0 s	86.0 s	79.2 s
C-5	194.1 s	196.7 s	196.3 s	193.9 s
C-5a	141.2 s	106.3 s[d]	141.8 s	141.1 s
C-6	120.7 d	161.9 s	120.6 d	121.3 d
C-6a	129.0 s	134.1 s	129.7 s	129.1 s
C-7	108.4 d	102.9 d	112.0 d	112.1 d
C-8	158.3 s	158.8 s	158.0 s	156.0 s
8-OCH ₃	56.6 q	56.8 q	–	–
C-9	129.6 s	131.5 s	129.9 s	131.0 s
9-C=O	167.5 s	167.9 s	168.0 s	167.9 s
9-OCH ₃	52.8 q	52.8 q	52.9 q	52.8 q
C-10	137.9 s	138.9 s	139.5 s	138.4 s
10-CH ₃	21.1 q	21.0 q	21.1 q	21.0 q
C-10a	121.0 s	123.0 s	120.8 s	122.0 s
C-11	168.0 s	167.9 s	170.2 s	168.0 s
C-11a	109.8 s	106.5 s[d]	109.6 s	110.2 s
C-12	197.9 s	199.5 s	199.5 s	197.9 s
C-12a	83.6 s	82.9	82.5 s	83.6 s

[a] In [D₆]Aceton, die C-Atome wurden auch gemäß ihrer Long-range-³J(C,H)-Kopplungen zugeordnet (2D-COLOC oder HMBC). [b] In CD₃OD, Zuordnungen in Analogie zu **1**. [c] Signale der Zucker-C-Atome: 97.8 (d, C-1'), 39.6 (t, C-2'), 71.6 (d, C-3'), 78.0 (d, C-4'), 73.3 (d, C-5'), 18.2 (q, C-6'). [d] Zuordnungen vertauschbar.

und Massenspektren im Vergleich zu denen von Tetracenomycin C **1** abgeleitet. So fehlt im ¹H-NMR-Spektrum von **4** das 6-H-Signal und tritt zusätzlich ein Signal für eine chelatisierende OH-Gruppe auf (δ = 12.68; Tabelle 2); aus dem ¹³C-Spektrum von **4** folgt, daß C-6 ein quartäres C-Atom ist (attached proton test, APT; Tabelle 1). Die Summenformel C₂₃H₂₀O₁₂ (488.4) ergibt sich aus dem Elektrospray(ES)-Massenspektrum (*m/z* 556.5 (100%) [*M*⁺ + 3 Na]) sowie aus dem hochaufgelösten *M*⁺-Peak des EI-MS (488.0954). Die Summenformel C₂₁H₁₅O₁₁ (443.3) und die Struktur von **5** resultiert aus dem ES-Massenspektrum (*m/z* 466.5 (100%) [*M*⁺ + Na]) und den NMR-Spektren, die nur ein Signal für eine OCH₃-Gruppe und eines für eine zusätzliche Carbonylgruppe bei δ = 187.0 aufweisen. Daß die verbleibende OCH₃-Gruppe die des an C-9 gebundenen Methylesters ist, wurde aus den entsprechenden chemischen Verschiebungen in den NMR-Spektren (Tabelle 1 und 2) im Ver-

Tabelle 2. ^1H -NMR-Daten der neuen Tetracenomycine **4**, **5** und **6** im Vergleich zu denen von Tetracenomycin C **1** (TMS, 500 MHz; δ , Multiplizität).

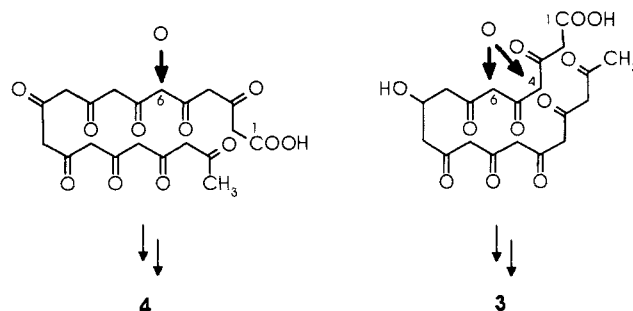
	1 [a]	4 [a]	5 [b]	6 [a]
2-H	5.61 s, br.	5.61 s	[m]	5.61 s, br.
3-OCH ₃	3.83 s	3.83 s	—	3.81 s
4-H	5.05 d[c]	5.02 s	4.82 s	5.04 d[c]
4-OH	4.95 d[c, d]	5.12 s[d, e]	[m]	4.94 d[c, d]
4a-OH	5.16 s[d, e]	5.29 s[d, e]	[m]	5.11 s[d, e]
6-H	8.00 s	—	7.14 s	7.99 s
6-OH	—	12.68 s[d]	—	—
7-H	7.60 s	7.80 s	7.80 s	7.76 s
8-OCH ₃	4.00 s	4.05 s	—	—
8-OH	—	—	[m]	—
9-COOCH ₃	3.90 s	3.95 s	3.94 s	3.93 s
10-CH ₃	2.80 s	2.78 s	2.81 s	2.82 s
11-OH	13.98 s[d]	13.92 s[d]	[m]	14.01 s[d]
12a-OH	5.73 s[d, e]	5.72 s[d, e]	[m]	5.76 s[d, e]
1'-H	—	—	—	5.57 dd[f]
2'-H _a	—	—	—	1.75 ddd[g]
2'-H _c	—	—	—	2.32 ddd[h]
3'-H	—	—	—	3.71 m
3'-OH	—	—	—	4.25 s[d, i]
4'-H	—	—	—	3.05 dd[j]
4'-OH	—	—	—	4.30 s[d, i]
5'-H	—	—	—	3.66 dq[k]
6'-H ₃	—	—	—	1.32 d[l]

[a] In [D₆]Aceton. [b] In CD₃OD. [c] Breit, $J = 7$ Hz (Kopplung nicht immer feststellbar). [d] Breit, H austauschbar mit D₂O. [e] Zuordnungen vertauschbar. [f] $J = 10, 2$ Hz. [g] $J = 12, 12, 10$ Hz. [h] $J = 12, 5, 2$ Hz. [i] Zuordnungen vertauschbar. [j] $J = 9, 9$ Hz. [k] $J = 9, 6$ Hz. [l] $J = 6$ Hz. [m] Wegen H/D-Austausches nicht beobachtbar.

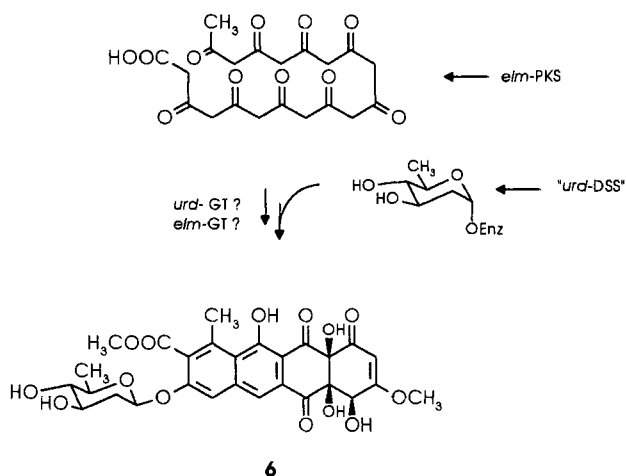
gleich mit denen von **1** geschlossen. Die Verbindung fällt nach der Reinigung bei pH 7 als Natrium-Salz des 1,3-Dioxo-Anions an, das durch Abspaltung eines der aciden 2-H-Atome entsteht. Die Verbindung ähnelt hierin 3-Desmethylelloramycinon, einem Hydrolyseprodukt von **2**^[6a]. Aus den NMR-Spektren der dritten neuen Verbindung **6** folgen als Strukturelemente ein Tetracenomycin C-verwandtes Aglycon und eine D-Olucose-Einheit. Die Summenformel C₂₈H₂₈O₁₄ (588.5) ergab sich aus dem Negativ-Ionen-FAB-MS (m/z 587 (100%) [$M-H$]⁻). Die Bestimmung der Position des Zuckerbausteines war dadurch erschwert, daß keine hierfür nützliche $^3J_{C,H}$ -Kopplung im COLOC oder HMBC-Spektrum detektiert werden konnte. Obwohl eine Hochfeldverschiebung des Signals von C-4a in **6** (gegenüber den Signalen für dieses Kohlenstoffatom in **1**, **4** und **5**, Tabelle 1) zunächst eine Veränderung in dessen Nähe vermuten läßt, ergibt sich dennoch, daß der Zucker an 8-O gebunden ist, und zwar aus dem ^1H -NMR-Spektrum (alle anderen OH-Gruppen sind frei, Tabelle 2), dem UV-Spektrum (das UV-Spektrum der Verbindung bei pH > 7 zeigt nicht die typische, von der 8-OH-Gruppe herrührende Absorption bei 315 nm, die z. B. in Elloramycinon beobachtet wird^[6d]) und dem H,H-NOESY-NMR-Spektrum, das unter anderem einen deutlichen NOE-Effekt zwischen 1'-H und 7-H zeigt. Die β -glycosidische Verknüpfung des Zuckerbausteines folgt aus den Kopplungsmustern des 1'- und des 2'-H_a-Signals im ^1H -NMR-Spektrum, seine absolute Konfiguration aus dem Drehwert des durch saure Methanolyse gewonnenen α -Methylolivosids ($[\alpha]_D = +133$, $c = 0.08$ in EtOH, 21 °C)^[9b].

Wir konnten eine Coproduktion von **1** bzw. seines Biosynthese-Intermediates 8-Desmethyltetracenomycin C **7** in den genetisch modifizierten Urdamycin-Bildnern *Streptomyces fradiae* Tü 2717(pWHM1026) bzw. *S. fradiae* Tü 2717(16F4) erreichen. Darüber hinaus wurden in den hergestellten Hybridstämmen drei neue Verbindungen produziert, wobei **5** ein Nebenprodukt, **4** und **6** Hauptprodukte sind (ca. 10 mg L⁻¹). Das Tetracenomycin **7** war bereits von Yue et al. aus einer Mutante von *Streptomyces glaucescens* isoliert worden, bei der der 8-O-Methylierungsschritt behindert war^[10a].

Das Plasmid pWHM1026, das die Tetracenomycin C-Produktion enthält, ist gut charakterisiert, alle darin enthaltenden *tcm*-Gene wurden sequenziert und analysiert^[10b]. Da es von den *tcm*-Genen her keinen Hinweis auf ein Enzym gibt, das eine Hydroxylierung der 6-Position von **1** katalysiert, muß diese Aktivität durch ein Enzym von *Streptomyces fradiae* hervorgerufen werden. Verbindung **4** könnte daher auch durch eine der Oxygenasen der Urdamycin-Biosynthese gebildet werden, durch die normalerweise die Sauerstoffatome an C-12 und C-12b, den C-Atomen 4 bzw. 6 des primären Decaketids, eingeführt werden^[11]. Die 6-Position der Tetracenomycine entspricht der 6-Position der Decaketid-Vorstufe (Schema 1). 6-Hydroxytetracenomycin C **4** ist das Tetracenomycin-Analogon von Elloramycin F (= 6-Hydroxyelloramycin A), das vom Elloramycin-Produzenten *S. olivaceus* als Nebenprodukt (0.01 mg L⁻¹) gebildet wird^[12].

Schema 1. Decaketid-Vorstufen von **4** und **3**.

Das Plasmid 16F4, das einige der Elloramycin-Biosynthese-Gene enthält^[8c], ist weniger gut charakterisiert als pWHM1026. Es enthält das Resistenz-Gen für Elloramycin **2** und Tetracenomycin C **1**, seine Transformation in *Streptomyces fradiae* Tü 2717 oder auch in *Streptomyces lividans* TK24 führt zur Produktion von 8-Desmethyltetracenomycin C **7**^[8c]. Weiterhin produziert der Hybridstamm *Streptomyces fradiae*(16F4) die neuen Verbindungen 3,8-Didesmethyltetracenomycin C **5** und 8- β -D-Olivosyl-8-desmethyltetracenomycin C **6**. Verbindung **5**, ein in nur geringen Mengen (1 mg L⁻¹) anfallendes Nebenprodukt, scheint das Resultat einer unvollständigen Aglycon-Biosynthese zu sein, in der der 3-O-Methylierungsschritt nicht stattfindet. Das Auftreten von **5** ist ein Hinweis darauf, daß die Methylierungssequenz für die Biosynthese von **1** nach Hutchinson et al.^[6c, 10a] auch abgekürzt werden kann. Anders als **5** ist **6** ein echtes Hybridmolekül, weil sein 2,6-Didesoxyzuckerbaustein Olivose normalerweise nur für die Urdamycin-Biosynthese gebraucht wird (er kommt zweimal in Urdamycin A **3** vor). Elloramycin **2** enthält als Zuckerbaustein Permethy-L-Rhamnose, die ebenfalls an 8-O geknüpft ist. Die Gene für die Biosynthese dieser Permethy-L-Rhamnose sind jedoch in Plasmid 16F4 nicht vorhanden^[8c]. Der Hybridstamm *Streptomyces fradiae*(16F4) besitzt offenbar eine Glycosyl-Transferase-Aktivität, die den Didesoxyzucker β -D-Olucose mit dem Elloramycin-Polyketidgerüst zum Hybridprodukt **6** verknüpft (Schema 2). Wir können gegenwärtig nicht ausschließen, daß eine Glycosyl-Transferase im Plasmid 16F4 kodiert ist. Daher könnte diese Reaktion entweder durch ein Enzym aus 16F4 oder durch eines des Urdamycin-Produzenten katalysiert werden. Daß **6** nur bei Gentransfer in *Streptomyces fradiae* und nicht durch mikrobielle Transformation^[13] erhalten werden kann, wurde durch ein Kontrollexperiment gezeigt: Die Zugabe von **7** zu einer wachsenden Kulturlösung des Urdamycin produzierenden Wildstammes gab



6

Schema 2. PKS = Polyketid-Synthase; „DSS“ = „Desoxyzucker-Synthase“, d.h. Gene, die für die Biosynthese des Desoxyzuckers Olivose aus Glucose benötigt werden; GT = Glycosyl-Transferase; Enz = Enzym.

kein Olivosyltetracenomycin **6**. Das bedeutet für den Hybridstamm, daß die Glycosyl-Transferase des Urdamycin-Produzenten nicht **7**, sondern ein anderes Biosynthese-Intermediat glycosyliert, oder daß im Plasmid 16F4 eine andere, nicht identifizierte Glycosyl-Transferase kodiert wird, die die Glycosylierung mit dem Zuckerbaustein von **6** katalysiert^[14].

Unsere ersten Experimente dazu zeigen, daß die Coexpression zweier Polyketid-Biosynthesewege in einem resultierenden Hybridstamm eine vielversprechende Methode ist, um neue Naturstoffe in brauchbaren Ausbeuten (10 mg L^{-1}) herzustellen. Nicht fündig wurden wir bislang allerdings hinsichtlich neuer Urdamycine. Auch konnten wir keine Produkte mit neuartigen Polyketidgerüsten erhalten, die sich aus der Aktivität einer hybriden Polyketid-Synthase hätten ergeben können^[5]. Um zu weiteren Hybridprodukten zu gelangen, sollten daher genetisch konstruierte Hybrid-Polyketid-Synthasen in einen Fremdwirt exprimiert werden, wie es von Khosla et al.^[5] erfolgreich demonstriert wurde.

Experimentelles

Bakterienstämme und Plasmide: *S. fradiae* Tü 2717 wurde mit den Plasmiden 16F4 oder pWHM1026 durch Protoplastenfusion transformiert; die Protoplasten wurden auf R2YE-Agar-Platten regeneriert^[15]. Plasmid pWHM1026, das den gesamten *tcn*-Gencluster enthält, wurde bereits beschrieben^[8a]. Plasmid 16F4 enthält den Cosmid-Vector pKC505^[8b] mit einem 25 kb-DNA-Fragment, das aus dem Elloramycin-Produzenten *S. olivaceus* Tü 2353 isoliert wurde^[8c]. Dieses Plasmid enthält alle notwendigen Gene für die Produktion von **7**^[8c].

Kultivierung der rekombinanten Stämme: *S. fradiae* Tü 2717 (16F4) und *S. fradiae* Tü 2717 (pWHM1026) wurden 96 h im Nährmedium (2% Sojamehl, 2% Glucose, pH = 7.2^[7]) mit $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ Apramycin bzw. $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Thiostrepton kultiviert. Isolierung der neuen Produkte: Die Kulturlösungen wurden auf pH 7 eingestellt, zweimal mit Ethylacetat extrahiert und zur Trockene eingedampft. Die Rückstände wurde in CH_2Cl_2 aufgenommen und an oxalsäuregesättigtem Kieselgel chromatographiert (Kieselgel SI 60, Merck), wobei das mit CH_2Cl_2 gewaschene Kieselgel mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5, 9/1 und 8/2) eluiert wurde. Die Fraktionen, die die Urdamycin- bzw. Tetracenomycin-Metaboliten enthielten, wurden gesammelt, zur Trockene eingedampft und an Sephadex LH 20 (MeOH) sowie durch HPLC (präparative Nucleosil-100 C-18-Säule, $10 \mu\text{m}$, Wasser/MeOH-Gradient 40 → 100% MeOH in 15 min) gereinigt.

Instrumente: Alle NMR-Spektren wurden mit einem Varian-VXR-500-Spektrometer bei einer Feldstärke von 11.7 Tesla aufgenommen, mit Ausnahme der HMBC-Spektren und des NOESY-Spektrums, die mit einem Bruker-AMX-300 bei einer Feldstärke von 7.1 Tesla gemessen wurden (weitere Details siehe Tabelle 1 und 2). Alle Massenspektren (mit Ausnahme der Elektrospray-Massenspektren) wurden mit einem Finnigan-MAT-95-Spektrometer erhalten; für die FAB-MS wurde 3-Nitrobenzylalkohol als Matrix verwendet. Die ES-Massenspektren wurden mit einem API-III-Taga-6000-E mit einer Ionen-Spray-Quelle (Sciex, Thornhill, Kanada) gemessen.

Eingegangen am 27. Dezember 1994 [Z 7577]

Stichworte: Biosynthesen · Gentechnik · Polyketide · Tetracenomycine

- [1] a) N. C. J. Strynadka, S. E. Jensen, K. Johns, H. Blanchard, M. Page, A. Matagne, J.-M. Frère, M. N. G. James, *Nature (London)* **1994**, 368, 657–660, zit. Lit.; b) H. C. Neu, *Science* **1992**, 257, 1064–1073, zit. Lit.; c) J. Travis, E. Culotta, R. Nowak, S. Kingman, R. Stone, *ibid.* **1994**, 264, 360–367; d) L. L. Silver, K. A. Bostian, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37, 377–383; e) V. Webb, J. Davies, *ibid.* **1993**, 37, 2379–2384.
- [2] a) C. R. Hutchinson, *Med. Res. Rev.* **1988**, 8, 557–567; b) L. Katz, S. Donadio, *Annu. Rev. Microbiol.* **1993**, 47, 875–912; c) D. E. Cane, *Science* **1994**, 263, 338–340, zit. Lit.
- [3] a) D. A. Hopwood, F. Malpartida, H. M. Kieser, H. Ikeda, J. Duncan, I. Fujii, B. A. Rudd, H. G. Floss, S. Ōmura, *Nature (London)* **1985**, 314, 642–644; b) S. Ōmura, H. Ikeda, F. Malpartida, H. M. Kieser, D. A. Hopwood, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, 29, 13–19; c) A. L. Demain, *Nature (London)* **1985**, 314, 577–578.
- [4] a) J. M. Weber, J. O. Leung, S. J. Swanson, K. B. Idler, J. B. McAlpine, *Science* **1991**, 252, 114–117; b) S. Donadio, M. J. Staver, J. B. McAlpine, S. J. Swanson, L. Katz, *ibid.* **1991**, 252, 675–679; c) S. Lai, Y. Shizuri, S. Yamamura, K. Kawai, H. Furukawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, 64, 1048–1050; d) S. Donadio, J. B. McAlpine, P. J. Sheldon, M. Jackson, L. Katz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 7119–7123; e) J. K. Epp, M. L. B. Huber, J. R. Turner, T. Goodson, B. E. Schoner, *Gene* **1989**, 85, 293–301; f) O. Hara, C. R. Hutchinson, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 5141–5144.
- [5] a) R. McDaniel, S. Ebert-Khosla, D. A. Hopwood, C. Khosla, *Science* **1993**, 262, 1546–1550; b) *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 11671–11675; c) H. Fu, S. Ebert-Khosla, D. A. Hopwood, C. Khosla, *ibid.* **1994**, 116, 4166–4170; d) *ibid.* **1994**, 116, 6443–6444; e) H. Fu, R. McDaniel, D. A. Hopwood, C. Khosla, *Biochemistry* **1994**, 33, 9321–9326.
- [6] a) J. Rohr, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1990**, 43, 1169–1178, zit. Lit.; b) J. Rohr, S. Eick, A. Zeeck, P. Reuschenbach, H. Zähler, H. P. Fiedler, *ibid.* **1988**, 41, 1066–1073; c) H. Decker, H. Motamedi, C. R. Hutchinson, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 3876–3886, zit. Lit.; d) H. Drautz, P. Reuschenbach, H. Zähler, J. Rohr, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1985**, 38, 1291–1301; e) G. Udvarnoki, C. Wagner, R. Machinek, J. Rohr, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 643–645; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 565–567; f) W. Weber, H. Zähler, J. Siebers, K. Schröder, A. Zeeck, *Arch. Microbiol.* **1979**, 121, 111–116.
- [7] J. Rohr, M. Schönewolf, G. Udvarnoki, K. Eckardt, G. Schumann, C. Wagner, J. M. Beale, S. D. Sorey, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 2547–2551, zit. Lit.
- [8] a) H. Decker, C. R. Hutchinson, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 3887–3892; b) M. A. Richardson, S. Kuhstoss, P. Solenberg, N. A. Schaus, R. Nagaraja Rao, *Gene* **1987**, 61, 231–241; c) H. Decker, J. Rohr, H. Motamedi, H. Zähler, C. R. Hutchinson, *Gene*, eingereicht.
- [9] a) H. P. Fiedler, *Nat. Prod. Lett.* **1993**, 2, 119–128, zit. Lit.; b) T. Henkel, J. Rohr, J. M. Beale, L. Schwenen, *J. Antibiot.* **1990**, 43, 492–503, zit. Lit.
- [10] a) S. Yue, H. Motamedi, E. Wendt-Pienkowsky, C. R. Hutchinson, *J. Bacteriol.* **1986**, 167, 581–586; b) C. R. Hutchinson, H. Decker, H. Motamedi, B. Shen, R. G. Summers, E. Wendt-Pienkowsky, W. Wessel in *Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms* (Hrsg.: R. H. Baltz, T. Ingolia, G. Hegeman), American Society for Microbiology, Washington, DC, **1993**, S. 203–216.
- [11] G. Udvarnoki, T. Henkel, R. Machinek, J. Rohr, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1274–1276.
- [12] H. P. Fiedler, J. Rohr, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1986**, 39, 856–859.
- [13] R. Thiericke, J. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, 10, 265–289, zit. Lit.
- [14] Es kann auch nicht völlig ausgeschlossen werden, daß **7** die Zellmembran von *S. fradiae* nicht passieren konnte. Das ist allerdings nicht sehr wahrscheinlich, denn man konnte eine Abnahme der Konzentration von **7** nach der Fütterung beobachten.
- [15] D. A. Hopwood, M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward, H. Schrepf, *Genetic manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual*, The John Innes Foundation, Norwich, Großbritannien, **1985**.