

panierten Bindungen von C_{60} tatsächlich um Einfachbindungen handelt ($d = 1.59 \text{ \AA}$) und daher das Fullerenegerüst nicht geöffnet ist. Besonders bemerkenswert sind die Bindungsverhältnisse in dem verbleibenden π -Elektronensystem von **1**, bei dem es sich um einen neuen Typ eines Polycyclophans^[2, 4, 5, 6] handelt (Abb. 3). Die für freies C_{60} charakteristische Bindungslängensalternanz^[14] zwischen 6-6- und 5-6-Bindungen halbiert sich bei **1**

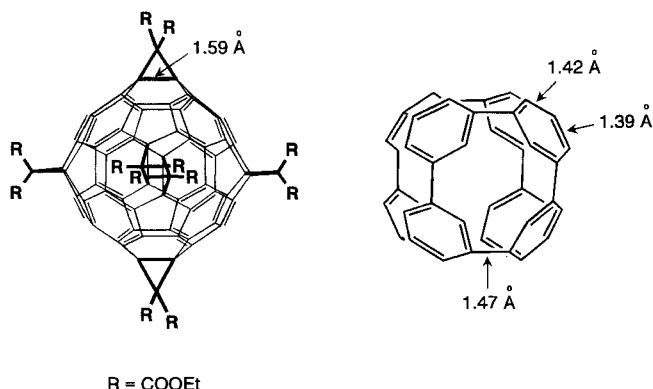


Abb. 3. Schematische Darstellungen von **1** mit ausgewählten Bindungslängen und dem verbleibenden benzoïden π -Elektronensystem.

auf etwa 0.03 \AA . Eine daraus resultierende Erhöhung des benzoïden Charakters macht sich auch in den optischen Eigenschaften der Verbindung **1** bemerkbar. Gegenüber den Lösungen von C_{60} (lila) oder auch denen der Addukte $C_{61}(\text{COOEt})_2$ bis $C_{65}(\text{COOEt})_{10}$ (rot bis orange) weisen die hellgelben Lösungen von **1** nur sehr schwache Absorptionen im sichtbaren Bereich des Spektrums auf ($\epsilon_{\text{vis}} < 2400$). Das gemischte Addukt **5** hat analoge optische Eigenschaften. Interessanterweise ist $C_{1-}C_{67}(\text{COOEt})_{14}$ wieder orange, da sich hier keine rein benzoïden Substrukturen innerhalb des C_{60} -Gerüsts bilden können. Der Hexamalon säureester $C_{66}(\text{COOEt})_{12}$ **1** ist licht-, luft- und feuchtigkeitsunempfindlich. Dies ist eine sehr wichtige Voraussetzung für weitere Modifikationen in den Seitenketten sowie für mögliche praktische Anwendungen. In der Tat lässt sich **1** leicht und quantitativ durch Behandlung mit NaH und Methanol^[15] in das entsprechende, sehr gut wasserlösliche Hexamalon säurederivat **2**^[16] überführen (Schema 3). Diese Verbindung bietet ideale Voraussetzungen als Kernstück für den Aufbau von Dendrimeren, für den Einsatz als Puffersystem oder als Edukt für die Synthese von biologisch aktiven Fullerenderivaten.

Eingegangen am 20. Februar 1995 [Z 7726]

Stichworte: Cyclopropanierungen · Fullereene · Isomerie

- [1] A. Hirsch, I. Lamparth, H. R. Karfunkel, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 453; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 437.
- [2] A. Hirsch, I. Lamparth, T. Grösser, H. R. Karfunkel, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9385.
- [3] In **1** sind alle möglichen *e*- und *trans*-1-Positionsbeziehungen besetzt (vollständig „oktaedrisches“ Additionsmuster, siehe auch Abb. 1–3).
- [4] L. Isaacs, R. F. Haldimann, F. Diederich, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2435; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2339.
- [5] B. Kräutler, J. Maynollo, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 66; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 87.
- [6] P. J. Fagan, J. C. Calabrese, B. Malone, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9408.
- [7] a) J. W. Arbogast, A. P. Darmanyan, C. S. Foote, Y. Rubin, F. Diederich, M. M. Alvarez, S. J. Anz, R. L. Whetten, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 11; b) Y.-Z. An, J. L. Anderson, Y. Rubin, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4799.
- [8] C. Bingel, *Chem. Ber.* **1993**, *126*, 1957.

- [9] Dies wurde bewiesen, indem wir Mischungen von Trisaddukten einer weiteren Cyclopropanierung unterzogen haben, die nicht das C_3 -symmetrische *e,e,e*- $C_{63}(\text{COOEt})_6$ und allenfalls Spuren von *e,e,trans*-1- $C_{63}(\text{COOEt})_6$ enthalten (Vorläufermoleküle von **1**); sondern deren Hauptbestandteil das C_1 -symmetrische Isomer *trans*-3,*trans*-4,*e*- $C_{63}(\text{COOEt})_6$ ist, aus welchem **1** nicht gebildet werden kann. Dabei erhielten wir ebenfalls C_1 - $C_{66}(\text{COOEt})_{14}$ in einer Ausbeute von 17%, aber keine isolierbaren Mengen an **1**.
- [10] Das *cis*-1-Isomer wird nicht gebildet und das Isomer *trans*-1- $C_{62}(\text{COOEt})_4$, welches neben *e*- $C_{62}(\text{COOEt})_4$ ebenfalls ein mögliches Vorläufermolekül von **1** ist, entsteht nur in Spuren (2%, siehe auch Lit. [1]).
- [11] K.-D. Kampe, N. Egger, M. Vogel, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1203; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1174.
- [12] $M = 1595.55$; MS (FAB): m/z 1595 (M^+ , 59%), 1510 ($M^+ - C_4H_8N_2$, 100%); UV/VIS (CH_2Cl_2): λ_{max} [nm] = 245, 268, 286, 312, 334 sh; IR (KBr): $\tilde{\nu}[\text{cm}^{-1}]$ = 2939, 2874, 1738, 1585, 1493, 1452, 1407, 1390, 1327, 1313, 690, 561, 507; $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 4.30 (m, 20H; CH_2), 3.89 (m, 4H; CH_2), 3.11 (m, 4H; CH_2), 1.30 (m, 30H; CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 164.15, 163.92, 163.68, 163.36, 150.16 (4C), 146.42 (4C), 146.36 (4C), 146.19 (4C), 145.45 (4C), 145.15 (4C), 144.86 (4C), 142.13 (4C), 142.02 (4C), 140.04 (4C), 138.81 (4C), 138.11 (4C), 75.38, 69.86, 69.51, 68.95, 67.37, 62.91, 62.82, 62.73, 62.67, 45.96, 45.59, 44.81, 40.05, 14.01.
- [13] Kristallstrukturdaten von **1**: triklin, Raumgruppe $P\bar{1}$, $a = 13.512(3)$, $b = 14.262(3)$, $c = 14.889(4) \text{ \AA}$, $\alpha = 116.631(10)$, $\beta = 96.498(13)$, $\gamma = 113.841(9)^\circ$, $V = 2188.6(8) \text{ \AA}^3$, $Z = 2$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.505 \text{ g cm}^{-3}$, Messung bei $T = 293 \text{ K}$ mit einem Enraf-Nonius-CAD4-Diffraktometer, $\text{Cu}_K\alpha$ -Strahlung, $\lambda = 1.54056$, $\mu = 14.555$, $F(000) = 1016$, 8467 gemessene Reflexe, von denen 7423 unabhängig waren, ($R_{\text{int}} = 0.043$), hkl -Bereich $-1 \rightarrow 15$, ± 16 , ± 17 . Die Daten wurden für Lorentz- und Polarisierungseffekte (SDP) korrigiert. Die Struktur wurde mit Direkten Methoden gelöst (SHELXS86), Absorptionskorrektur mit PSI-Scan. Mit Ausnahme der H-Atome, die nach idealer Geometrie berechnet wurden, konnten alle Atome in der Differenz-Fourier-Synthese lokalisiert und anisotrop verfeinert werden. Die Verfeinerung von 631 Parametern erfolgte an allen unabhängigen F_o^2 -Werten. $R_1 = 0.066$, $R_2 = 0.174$, $\text{GOF} = 1.024$ (SHELXL93). Die abschließende Differenz-Fourier-Synthese zeigte keine Besonderheit, $\Delta\rho_{\text{fin}} = 1.042$. Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-58937 angefordert werden.
- [14] A. Hirsch, *The Chemistry of the Fullerenes*, Thieme, Stuttgart, **1994**.
- [15] I. Lamparth, A. Hirsch, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1727.
- [16] $^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, D_2O 25 °C): δ = 169.91 (br, 12C), 141.49 (24C), 141.25 (24C), 72.70 (12C), 47.30 (6C).

Biosynthese neuartiger Emycine aus dem Mutanten-Stamm *Streptomyces cellulosae* ssp. *griseoincarnatus* 1114-2**

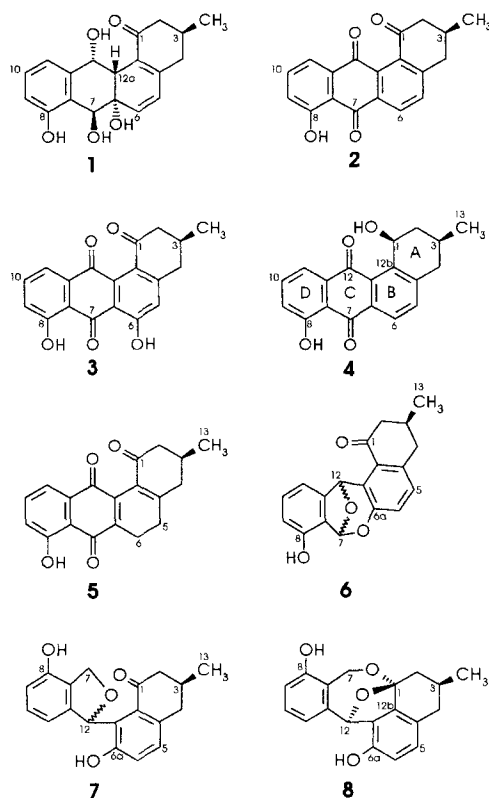
Martin Gerlitz, Györgyi Udvarnoki und Jürgen Rohr*

Das Entwickeln von Konzepten für die Suche nach möglichst neuartig strukturierten Naturstoffen, die als Leitstrukturen für pharmazeutische oder andere Indikationen in Frage kämen, ist – verschärft durch die Resistenzproblematik – eine ständige Herausforderung, insbesondere an akademische Forschungsinstitutionen, da der Industrie genügend Testsysteme zur Verfügung stehen^[1]. Parallel zum Konzept, neue Naturstoffe durch gezielte genetische Veränderung von Polyketidproduzenten der Gattung *Streptomyces* zu erzeugen^[2], verfolgen wir auch den oft schnelleren Weg der ungezielten genetischen Veränderung ausgesuchter Streptomyceten-Stämme^[3], wobei wir uns auf solche Polyketidproduzenten konzentrieren, deren (bekanntes) Produktspektrum auf interessante Oxidoreduktaseaktivitäten hin-

[*] Priv.-Doz. Dr. J. Rohr, Dipl.-Chem. M. Gerlitz, 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

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken der Hoechst AG, Frankfurt/Main, für die Überlassung des Wildstammes FH-S 1114.

weist. Ein solcher Stamm ist *Streptomyces cellulosae* ssp. *griseoincarnatus* (FH-S 1114)^[4], ein Angucyclinon^[5]-Produzent, der als Hauptprodukt Emycin D **1**, als Nebenprodukte die schon länger bekannten Antibiotica^[5] Ochromycinon **2** und Desoxyrabelomycin **3** sowie in Spuren unter anderem Emycin A **4** bildet^[6]. Aus diesem Produktspektrum kann man auf



eine biosynthetische Verwandtschaft der vier Metaboliten schließen, die sich aus Oxidoreduktaseaktivitäten ergibt. Insbesondere Oxygenasen können, das ist in vielen Biosynthesen gezeigt worden, z.B. für die Bildung des Polyetherantibiotikums Monensin^[7a, b] oder der Prostaglandine^[7c], eine nachhaltige Veränderung von biosynthetischen Primärgerüsten bewirken, so daß eine Mutation eines Stammes mit ausgeprägten Oxidoreduktaseaktivitäten zu einem Spektrum neuartiger Produkte führen könnte.

Tatsächlich gelang es durch NTG-Mutation^[3] (NTG = *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin) des Stammes FH-S 1114 auf Antrieb, eine Mutante zu erzeugen (Stamm 1114-2), deren Produktspektrum sich gegenüber dem des Wildtyps FH-S 1114 laut DC- und HPLC-Analyse^[3] stark verändert war. Neben den Wildtyp-Produkten **1–4** erschienen vier neue Metaboliten, die Emycine C **5** (Nebenprodukt), D **6**, E **7** und F **8**, wobei die letzteren drei neben **1, 2** und **4** Hauptprodukte von *S. cellulosae* ssp. *griseoincarnatus* (1114-2) sind (Abb. 1). Die Strukturauflösung der neuen Verbindungen **5–8** mit spektroskopischen Methoden^[8] (NMR-Daten siehe Tabellen 1 und 2) ergab als Überraschung, daß die Emycine D **6** und E **7** als nicht auftrennbare^[9] Diastereomerenpaare vorliegen (NMR-Spektren), was die Interpretation der Spektren erschwerte. Die Konstitutionen der neuen Emycine ergaben sich hauptsächlich aus ²J_{CH}-Korrelationen der HMBC-NMR-Experimente (HMBC = *Hetero Multiple Bond Connectivity Spectroscopy*) und der COLOC-NMR-Experimente (COLOC = *Correlation Spectroscopy via*

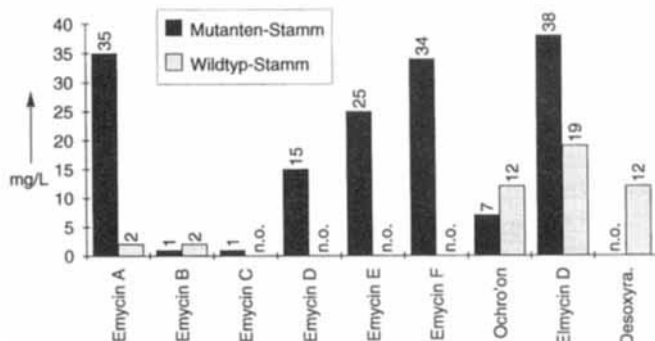


Abb. 1. Vergleich der Produktbildung von Wildstamm S-1114 und Mutantenstamm S-1114-2.

Tabelle 1. ¹H-NMR-Daten der neuen Emycine C **5**, D **6**, E **7** und F **8** (Standard TMS, intern, bei 500 MHz, *J* in Hz). Weitere NMR-Daten der Diastereomere (Diast.) von **6** und **7** sind als Fußnoten angegeben.

	5 [a]	6 [b]	7 [b]	8 [c]
2-H ₂	2.68 ddd (16, 4, 2) 2.26 dd (16, 13)	2.61 ddd (15, 4, 2) [d] 2.50 dd (15, 12)	2.64 ddd (15, 4, 2) [e] 2.50 dd (15, 12)	2.15 dd (14, 3) 1.45 dd (14, 14)
3-H	2.35 m	2.26 m	2.36 m [f]	2.40 m
3-CH ₃	1.11 d (6)	1.08 d (6) [g]	1.12 d (7) [h]	1.11 d (6)
4-H ₂	2.43 m	2.84 ddd (16, 3, 2) [i] 2.64 dd (16, 11)	2.95 ddd (16, 4, 2) [j] 2.64 dd (16, 10)	2.93 dd (16, 6) 2.15 dd (16, 16)
5-H ₍₂₎	2.53 dd (18, 8) 2.34 m	7.09 d (8)	7.19 d (8) [k]	6.95 d (8)
6-H ₍₂₎	2.83 ddd (18, 8, 7) 2.55 dd (18, 7)	6.82 d (8) [l]	6.90 d (8) [m]	6.70 d (8)
7-H ₍₂₎	—	6.75 s	5.40 d (12) [n] 5.06 d (12)	3.95 d (15) 5.20 d (15)
8-OH	12.00 s [o]	9.10 s [o]	9.00 s [o, p]	—
9-H	7.56 m	6.76 d (8)	6.73 d (8)	6.70 d (8)
10-H	7.29 m	7.08 dd (8, 8)	6.99 dd (8, 8)	7.05 dd (8, 8)
11-H	7.56 m	7.05 d (8)	6.37 d (8) [q]	6.95 d (8)
12-H	—	6.71 s [r]	7.33 s [s]	5.85 s

[a] In CDCl₃. [b] In [D₆]Aceton. [c] In CD₃OD. [d] Diast.: 2.75 ddd und 2.20 dd. [e] Diast.: 2.76 ddd und 3.30 dd. [f] Diast.: 2.27 m. [g] Diast.: 1.04 s. [h] Diast.: 1.11 d. [i] Diast.: 2.87 ddd und 2.52 dd. [j] Diast.: 3.00 ddd und 2.70 dd. [k] Diast.: 7.18 d. [l] Diast.: 6.83 d. [m] Diast.: 6.89 d. [n] Diast.: 5.05 d und 5.40 d. [o] Austauschbar mit D₂O. [p] Oder 6a-OH, nur eines beobachtet. [q] Diast.: 6.36 d. [r] Diast.: 6.70. [s] Diast.: 7.25 s.

Long-Range Couplings) (Abb. 2). Die absoluten Konfigurationen der Strukturen von Emycin D **6**, E **7** und F **8** ergaben sich schließlich aus Röntgenstrukturanalysen^[8, 9].

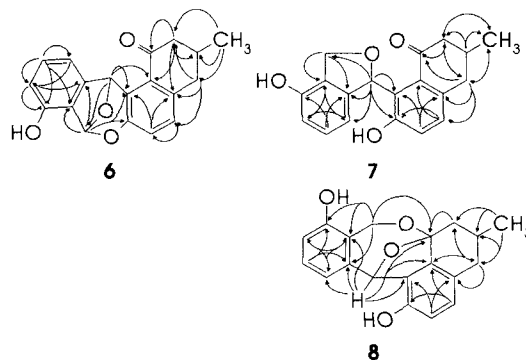


Abb. 2. Beobachtete ²J_{CH}-Kopplungen in Emycin D **6**, E **7** und F **8** (HMBC- bzw. COLOC-Verfahren).

Tabelle 2. ^{13}C -NMR-Daten und Einbau von $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ Acetat (* = angereicherte C-Atome): Elmycin D **1**, Ochromycinon **2** sowie die Emycine A **4**, D **6**, E **7** und F **8** (Standard zu TMS, intern, 125.7 MHz, Multiplizitäten vom APT(attached proton test)-Experiment (J_{cc} in Hz aus Einbauxperiment mit $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Acetat), Zuordnungen über APT, C,H-COSY und HMBC).

C-Atom	1 [a]	2 [b]	4 [b]	6 [c]	7 [c]	8 [d]
1 *	198.1 s (53)	199.1 s (54)	66.6 d (44)	200.0 s (51) 199.5 s (51)	201.2 s (50) 200.6 s (50)	109.6 s (49)
2	46.1 t (–)	47.5 t (–)	39.9 t (–)	48.2 t (–) 47.2 t (–)	49.8 t (–) 48.9 t (–)	42.4 t (–)
3 *	28.2 d (35)	30.8 d (35)	27.4 d (36)	30.9 d (36) 29.8 d (36)	31.7 d (36) 31.0 d (36)	29.3 d (36)
4	37.5 t (40)	38.4 t (40)	40.4 t (41)	37.5 t (42) 37.4 t (42)	39.0 t (42)	35.0 t (43)
4a *	149.4 s (40)	150.4 s (40)	146.9 s (41)	136.6 s (42) 136.3 s (42)	137.3 s (42) 137.0 s (42)	125.0 s (43)
5	127.4 d (67)	132.9 d (58)	135.5 d (57)	129.2 d (58) 129.1 d (58)	130.8 d (58) 130.6 d (58)	129.5 d (60)
6 *	136.8 d (67)	128.9 d (58)	126.4 d (57)	121.9 d (58)	123.0 d (58)	118.7 d (60)
6a	71.7 s (45)	135.8 s (54)	133.7 s (54)	148.6 s (–)	157.0 s (–) 156.9 s (–)	150.7 s (–)
7 *	67.6 d (45)	187.5 s (54)	188.1 s (54)	99.1 d (–) 99.2 d (–)	70.9 t (–)	60.7 t (–)
7a	123.1 s (68)	115.4 s (63)	115.1 s (63)	122.3 s (74)	125.7 s (72) 125.6 s (72)	126.3 s (68)
8 *	156.9 s (68)	161.9 s (63)	161.7 s (63)	151.5 s (74)	152.1 s (72)	155.7 s (68)
9	113.5 d (57)	119.5 d (62)	123.9 d (58)	115.6 d (60)	114.9 d (59) 114.8 d (59)	116.0 d (58)
10 *	127.8 d (57)	135.0 d (62)	136.6 d (58)	130.7 d (60)	129.6 d (59)	128.9 d (58)
11	120.5 d (58)	123.6 d (58)	120.1 d (62)	110.8 d (63)	114.8 d (63)	120.4 d (59)
11a *	140.8 s (58)	136.9 s (58)	134.4 s (62)	148.9 s (63)	143.6 s (63)	144.2 s (59)
12	67.2 d (37)	182.9 s (54)	186.8 s (54)	77.8 d (44) 77.7 d (44)	84.3 d (48)	86.3 d (44)
12a *	37.6 d (37)	133.4 s (54)	132.2 s (54)	127.0 s (44) 126.8 s (44)	125.2 s (48) 124.8 s (48)	126.3 s (44)
12b	128.8 s (53)	136.5 s (54)	143.4 s (44)	127.4 s (51) 127.3 s (51)	132.4 s (50)	138.7 s (49)
13	20.3 q (35)	21.5 q (35)	21.5 q (36)	20.7q (36) 20.1 q (36)	21.6 q (36) 21.0 q (36)	22.1 q (36)
Ø [e]	2.7%	4.5%	4.6%	1.7%	4.5%	3.1%

[a] In $[\text{D}_6]\text{DMSO}$. [b] In CDCl_3 . [c] In $[\text{D}_6]\text{Aceton}$. [d] In CD_3OD . [e] Durchschnittlicher spezifischer Einbau [14].

Die Molekülgerüste der Emycine **D 6**, **E 7** und **F 8** sind neuartig; ihr Zustandekommen wollten wir durch Biosyntheseuntersuchungen klären. In allen drei Strukturen sind die gegenüber den Wildstammprodukten weitgehend unveränderten Ringe A, B und D des Benz[*a*]anthracengerüsts der Angucyclinone^[5] (s. Emycin A **4**) erkennbar, so daß eine biosynthetische Verwandtschaft der neuen Emycine mit den Wildstammprodukten offensichtlich ist. Aus Einbauversuchen mit $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -, $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ - und $[1\text{-}^{13}\text{C}, ^{18}\text{O}_2]$ -Acetat und einer Fermentation unter ^{18}O -haltiger Atmosphäre ergaben sich die Quellen aller C- und O-Atome der Hauptprodukte des Mutantenstammes *S. cellulosae* ssp. *griseo-incarnatus* (1114-2), wobei für die typischen Angucyclinone **1**, **2** und **4** der erwartete Acetateinbau gefunden wurde, d. h. ein Aufbau über eine aus zehn Acetateinheiten aufgebaute Polykettide, die von C-13 bis C-2 (unter Decarboxylierung der letzten Acetateinheit) verläuft^[10]. Es ergaben sich auch keine Überraschungen in bezug auf die Sauerstoffbiogenese, weshalb präaromatische Desoxygenierungsschritte ausgeschlossen werden konnten^[10d, 10e, 11]. Bei den neuartigen Emycinen **D 6**, **E 7** und **F 8** ist die vierte Acetateinheit unterbrochen, deren C-Atome (jeweils C-6a und C-7) im ^{13}C -NMR-Spektrum nach Verfütterung von $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -Acetat als angereicherte Singulets erscheinen, wo normalerweise eine C-C-Kopplung (C-6a mit C-7) zu sehen ist. Daraus wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß zwischen C-6a und C-7 eine oxidative C-C-Bindungsspaltung

erfolgt ist, was dann auch durch die Fermentation in $^{18}\text{O}_2$ -haltiger Atmosphäre bestätigt wurde; denn 6a-O stammt in allen drei Verbindungen **6–8** aus dem Sauerstoff der Luft. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2 und 3 und in Abbildung 3 (beispielhaft für die üblichen Angucyclinone ist nur Elmycin **D 1** gezeigt) zusammengefaßt.

Alle Ergebnisse der Biosyntheseuntersuchungen fügen sich in ein hypothetisches Biosyntheschema (Schema 1), das das Zustandekommen der neuartigen Gerüste von Emycin **D–F 6–8** plausibel erklärt. Beginnend mit einer enzymatischen Baeyer-Villiger-Oxidation einer Chinonvorstufe^[11a], vermutlich bei Ochromycinon **2**, woraus die Lactonzwischenstufe **9** resultiert, über eine Öffnung des Lactons **9** und nachfolgender Reduktion zur Zwischenstufe **10** erfolgt eine intramolekulare Ketalbildung zum Emycin **F 8**, das danach teilweise (unter Beteiligung nicht-enzymatischer Prozesse?) zum thermodynamisch stabileren Emycin **E 7** umlagert. Die intramolekulare Ketalbildung ist durch die freie Drehbarkeit um die C-12/C-12a-Achse der durch zwei Alkoholfunktionen gekennzeichneten Zwischenstufe **10** nach Lactonöffnung und Reduktion möglich, und erfolgt enzymatisch, da **8** stereochemisch einheitlich vorliegt. Die Bildung von Emycin **D 6** kommt möglicherweise dadurch zustande, daß in diesem Nebenweg der Biosynthese – ausgehend vermutlich von Lacton **9** – die C-7- und C-12-Ketofunktion zum Halbacetat bzw. sekundären Alkohol (Zwischenstruktur **11**) reduziert

Tabelle 3. ^{13}C -NMR-Hochfeldverschiebungen ($\Delta\delta$) nach Einbauversuchen mit ^{18}O -markierten Vorläufern: Elmycin D **1**, Ochromycinon **2**, Emcyne A **4**, D **6**, E **7** und F **8**; A: Einbau mit $[1\text{-}^{13}\text{C}, ^{18}\text{O}_2]\text{Acetat}$ (99% ^{13}C , 55% ^{18}O); B: Fermentation unter $^{18}\text{O}_2$ (50% ^{18}O)-angereicherter Atmosphäre (% relative ^{18}O -Anreicherung [a]).

C-Atom	1		2		4		6		7		8	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	0.04 (35)	—	0.04 (24)	—	0.01 (40)	—	0.05 (30)	—	—	—	0.01 (22)	0.03 (11)
6a	—	0.03 (8)	—	—	—	—	—	0.02 (9)	—	0.01 (32)	—	0.01 (19)
7	0.02 (26)	—	0.05 (18)	—	0.03 (22)	—	—	0.02 (8)	—	n.b.	n.b.	—
8	0.01 (38)	—	0.02 (23)	—	0.02 (13)	—	0.02 (34)	—	0.01 (10)	—	0.02	— (45)
12	—	0.02 (17)	—	n.b.	—	n.b.	—	0.03 (9)	—	n.b.	—	0.01 (24)

[a] %-Anreicherung = $(I^{13}\text{C}\text{-}^{18}\text{O}/[I^{13}\text{C}\text{-}^{16}\text{O} + I^{13}\text{C}\text{-}^{18}\text{O}]) \times 100\%$; n.b. = nicht beobachtet.

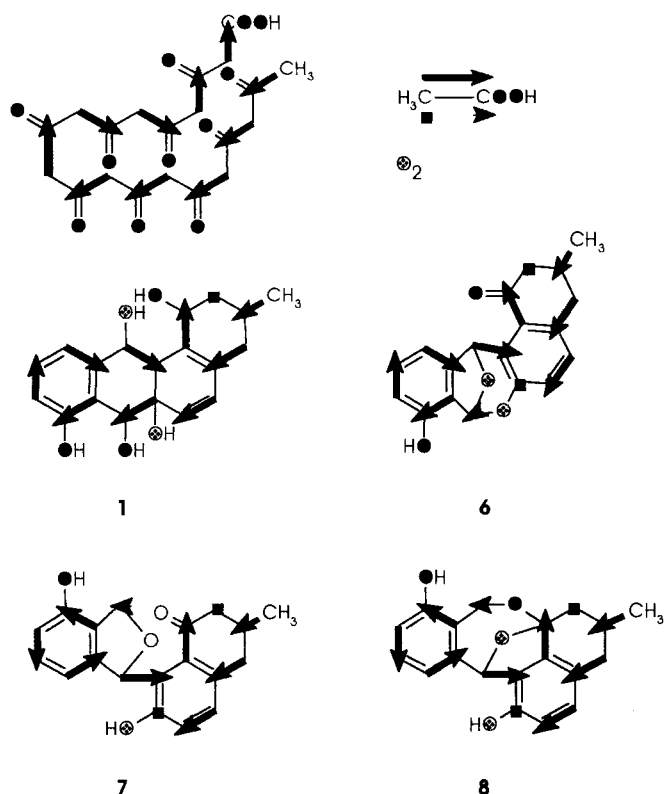
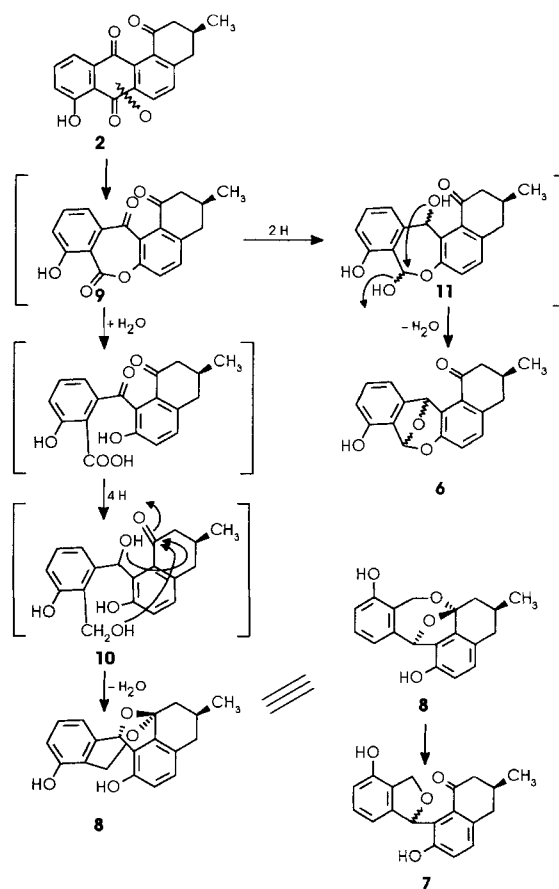


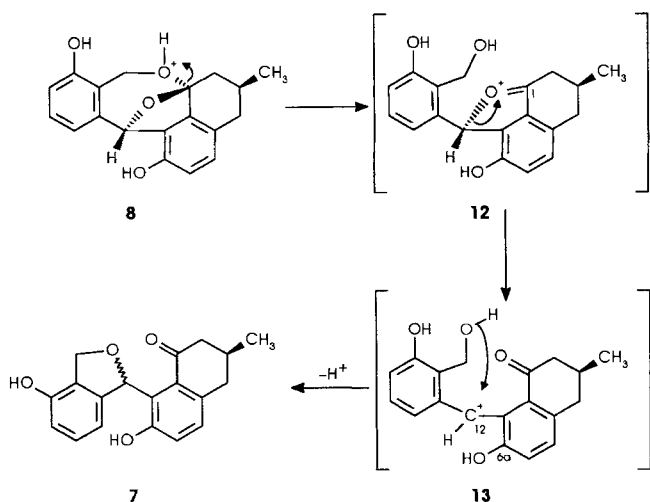
Abb. 3. Ergebnisse der Einbauversuche mit ^{13}C - und ^{18}O -markierten Vorläufern.

wird, woraus sich durch intramolekulare Acetalisierung Emycin D **6** ergibt. Überraschend ist hierbei, daß **6** als Diastereomengemisch (mit C-7 und C-12 in *R*- oder mit beiden in *S*-Konfiguration^[8]; *R,R:S,S* = 1:1) anfällt, was eine unspezifische Oxidoreduktase (Dehydrogenase) vermuten läßt, die intermediär die C-12-Ketofunktion zur uneinheitlich-konfigurierten sekundären Alkoholfunktion reduziert (Schema 1). Die Bildung von **6** wird von uns noch untersucht. Den Abschluß der Emycin-Biosynthesekaskade bildet eine neuartige Umlagerung, die durch 7-O-Protonierung eingeleitet wird, was einen Bindungsbruch zwischen C-1 und 7-O erleichtert. Das dabei zunächst entstehende Carbeniumion mit der positiven Ladung an C-1 in **12** bedingt den zweiten notwendigen Bindungsbruch zwischen C-12 und dem daran gebundenen Sauerstoffatom, wobei einerseits die C1-Ketofunktion regeneriert, andererseits ein neues, stabileres Carbeniumion mit der positiven Ladung an C-12 in **13**



Schema 1. Hypothetische Biosynthesekaskade für die Bildung der ungewöhnlichen Emcyne D **6**, E **7** und F **8**.

erzeugt wird (Schema 2). Das C-Atom, das in **13** die positive Ladung trägt, ist zu beiden benachbarten Areneinheiten benzyllständig, wobei insbesondere auch die 6a-OH-Funktion einen stabilisierenden Nachbargruppeneffekt ausübt, und kann daher von beiden Seiten durch das Sauerstoffatom der primären Alkoholgruppe an C-7 intramolekular unter Bildung der Dihydrofuraneinheit angegriffen werden, wodurch Emycin E **7** als Diastereomengemisch anfällt. In einer Modellreaktion (24 h Rühren von **8** bei pH 1) konnte die Umlagerung von **8** nach **7** nachvollzogen werden; **8** wandelte sich quantitativ in **7** um. Da ein solch niedriger pH-Wert weder während der Fermentation von *S. cellulosa* ssp. *griseoincarnatus* (1114-2) beobachtet werden



Schema 2. Umlagerung von Emycin F 8 in Emycin E 7.

kann noch bei der Aufarbeitung auftritt, muß entweder ein Enzym an dieser Umlagerung beteiligt sein oder zwischenzeitlich ein ähnlich saures Milieu im Zellinneren vorliegen. Bei der Umlagerung von Emycin F 8 in Emycin E 7 muß auch eine Hydratstruktur (an C-1, in Schema 2 nicht gezeigt) durchlaufen werden; denn die ^{18}O -Markierung verschwindet bei der Umlagerung oder wird an C-1 eingeführt, wenn die Reaktion von 8 nach 7 in H_2^{18}O durchgeführt wird.

Diese Arbeiten zeigen, daß man durch genetische Veränderungen mit Mutagenen das Sekundärstoff-Produktspektrum eines Streptomyceten nachhaltig verändern und zu neuartigen Verbindungen in beachtlichen Mengen (vgl. Abb. 1) gelangen kann, wobei Oxidoreduktasen eine entscheidende Rolle spielen. Es ist nicht sicher, ob die hierbei erfolgte Mutation direkt eine oder mehrere Oxidoreduktasen verändert hat, oder ob vielmehr eine Blockmutation stattgefunden hat, bei der sich z.B. Ochromycin 2 intermediär anreichert und dann als Substrat für die Oxygenase, die die Baeyer-Villiger-Oxidation bewirkt, in ausreichenden Mengen zur Verfügung steht. Letztere Alternative ist wahrscheinlicher, da die Emycine D, E und F nachträglich ebenfalls – allerdings in Spuren – im Wildstamm detektiert werden konnten. Über interessante Strukturmodifikationen von Angucyclinen durch Oxygenaseeinwirkungen wurde auch kürzlich von Gould et al. berichtet^[12].

Experimentelles

Bakterienstamm, Kultivierung und Isolierung: Der Stamm *S. cellulosa* ssp. *griseocarnatus* (1114-2) dur NTG-Mutation hergestellt [3]. Seine Kultivierung sowie die Isolierung der Produkte wird an anderer Stelle beschrieben werden [8].

Instrumente/NMR-Methoden: siehe Lit. [2 b, 3, 11 a].

Isotopenmarkierte Verbindungen und Einbauexperimente: $[1-^{13}\text{C}]$ - und $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -Acetat (je 99% ^{13}C) wurde von CIL (Cambridge Isotope Laboratories, Cambridge, MA, USA), $^{18}\text{O}_2$ (98% ^{18}O) von Isotec Inc. (Miamisburg, OH, USA) bezogen, das $[1-^{13}\text{C}, ^{18}\text{O}_2]$ -Acetat wurde wie vorher beschrieben synthetisiert [13]. Die markierten Acetate wurden in fünf gleichen Portionen (zusammen jeweils 1 g, H_2O -Lösungen) an wachsende Kulturen von Stamm 1114-2, und zwar 45 h, 53 h, 61 h, 69 h und 77 h nach Animpfen des Fermenters verfüttert. Um O-Austausch mit Wasser zu vermeiden, wurde $[1-^{13}\text{C}, ^{18}\text{O}_2]$ -Acetat jeweils unmittelbar vor der Fütterung aufgelöst. Das $^{18}\text{O}_2$ wurde in der zuvor beschriebenen geschlossenen Apparatur [13 a] zu 50% mit $^{16}\text{O}_2$ verdünnt, diese wurde hier 45 h nach Animpfen bis zum Fermentationsende (96 h) mit dem 1-L-Fermenter verbunden.

Emycin C 5: $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_4$ (308.33); $[\alpha]_D^{20} = +108.1^\circ$ ($c = 0.0074$, MeOH); EI-MS (70 eV): m/z (%) 308 (35, M^+ , HR ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_4$ und gef. 308.1048), 266 (60), 94 (100); ^1H -NMR: siehe Tabelle 1; ^{13}C -NMR (125.7 MHz, CDCl_3): $\delta = 194.6$ (s, C-1), 46.0 (t, C-2), 29.5 (d, C-3), 39.8 (t, C-4), 129.0 (s, C-4a), 29.1 (t, C-5), 19.0 (t, C-6), 141.6 (s, C-6a), 188.7 (s, C-7), 114.8 (s, C-7a), 161.0 (s, C-8), 119.3 (d, C-9*),

136.2 (d, C-10*), 123.5 (d, C-11*), 133.0 (s, C-11a), 182.0 (s, C-12), 141.9 (s, C-12a), 130.5 (C-12b), 21.0 (q, C-13); * Zuordnungen austauschbar.

Emycin D 6: $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_4$ (308.33); $[\alpha]_D^{20} = -34.9^\circ$ ($c = 0.072$, CHCl_3); EI-MS (70 eV): m/z (%) 308 (60, M^+ , HR ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_4$ und gef. 308.1049), 279 (30), 239 (100); ^1H - und ^{13}C -NMR: siehe Tabellen 1 bzw. 2.

Emycin E 7: $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_4$ (310.35); $[\alpha]_D^{20} = +49.0^\circ$ ($c = 0.071$, MeOH); EI-MS (70 eV): m/z (%) 310 (100, M^+ , HR ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_4$ und gef. 310.1207), 295 (85), 239 (70); ^1H - und ^{13}C -NMR: siehe Tabelle 1 und 2.

Emycin F 8: $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_4$ (310.35); $[\alpha]_D^{20} = +209.9^\circ$ ($c = 0.016$, MeOH); EI-MS (70 eV): m/z (%) 310 (100, M^+ , HR ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_4$ und gef. 310.1205), 295 (85), 239 (30); ^1H - und ^{13}C -NMR: siehe Tabellen 1 und 2.

Eingegangen am 24. März 1995 [Z 7831]

Stichworte: Antibiotica · Biosynthesen · Oxidoreduktasen · Polyketide · Umlagerungen

- [1] a) H. C. Neu, *Science* **1992**, 257, 1064–1073, zit. Lit.; b) J. Travis, E. Culotta, R. Nowak, S. Kingman, R. Stone, *ibid.* **1994**, 264, 360–367; c) W.-D. Busse, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1994**, 42, 1231.
- [2] a) Vgl. hierzu das Highlight: J. Rohr, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 963–967; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 881–885; zit. Lit.; b) H. Decker, S. Haag, G. Udvarnoki, J. Rohr, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1214–1217; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1107–1110.
- [3] a) J. Rohr, M. Schönewolf, G. Udvarnoki, K. Eckardt, G. Schumann, C. Wagner, J. M. Beale, S. D. Corey, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 2547–2551, zit. Lit.
- [4] Der Bakterienstamm wurde von Dr. M. Wink, Hoechst AG, Frankfurt, bestimmt [8].
- [5] J. Rohr, R. Thiericke, *Nat. Prod. Rep.* **1992**, 9, 103–137, zit. Lit.
- [6] a) S. Dobreff, Dissertation, Universität Göttingen, **1989**; b) S. Dobreff, A. Zeeck, M. Wink, S. Grabley, unveröffentlicht.
- [7] a) D. E. Cane, W. D. Celmer, J. W. Westley, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 3594–3600; b) Vgl. hierzu auch Highlight i Heft 3 (1995): U. Koert, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 326–328; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 298–300, zit. Lit.; c) B. Samuelsson, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3011–2013.
- [8] J. Rohr, M. Gerlitz, G. Udvarnoki, J. Machinek, C. Zolke, J. Wink, M. Walker, E. Pohl, G. M. Sheldrick, noch unveröffentlicht.
- [9] Die diastereomeren Verbindungen verhalten sich wegen ihrer nahezu spiegelbildlichen Raumstruktur (Molekülmodell) wie Enantiomere, sogar ihre Kristallisation und die des *o*-Brombenzoats von 6 ergab keine Trennung, sondern Cokristalle beider Diastereomere im Verhältnis 1:1 [8].
- [10] a) N. Imamura, K. Kakinuma, N. Ikekawa, H. Tanaka, S. Omura, *J. Antibiot.* **1982**, 35, 602–608; b) J. Rohr, J. M. Beale, H. G. Floss, *ibid.* **1989**, 42, 1151–1157; c) S. J. Gould, K. A. Halley, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5092–5093; d) S. J. Gould, X.-C. Cheng, C. Melville, *ibid.* **1994**, 116, 1800–1804; e) S. Weber, C. Zolke, J. Rohr, J. M. Beale, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4211–4214.
- [11] a) H. Bockholt, G. Udvarnoki, J. Rohr, U. Moeck, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 2064–2069, zit. Lit.; b) S. J. Gould, X.-C. Cheng, K. A. Halley, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10066–10068.
- [12] S. J. Gould, X. C. Cheng, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 400–405.
- [13] a) G. Udvarnoki, T. Henkel, R. Machinek, J. Rohr, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1274–1276; b) P. D. Boyer, O. J. Koeppe, W. W. Luchsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 356–357.
- [14] A. I. Scott, C. A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwar, R. J. Cushley, P. J. Whitman, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 8069–8080.