

## Die antitumorwirksame Hybrid-Verbindung Premithramycinon H verweist indirekt auf ein tricyclisches Intermediat der Biosynthese des Aureolsäure-Antibiotikums Mithramycin\*\*

Felipe Lombó, Eva Künzel, Laura Prado, Alfredo F. Braña, Kai U. Bindseil, Jürgen Frevert, Dan Bearden, Carmen Méndez, José A. Salas\* und Jürgen Rohr\*

Professor Axel Zeeck zum 60. Geburtstag gewidmet

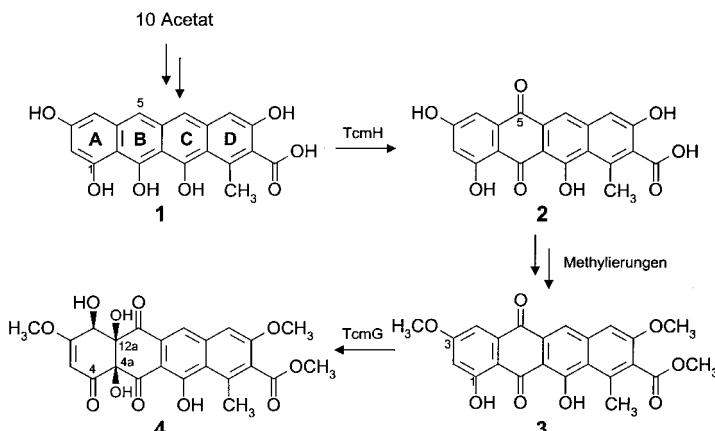
Seit den Pionierarbeiten von Hopwood et al. 1985<sup>[1]</sup> bietet die Nutzung rekombinanter DNA interessante Perspektiven für die Erzeugung neuer „nichtnatürlicher“ oder „Hybrid“-Naturstoffe durch Manipulation von Biosynthese-Genclustern (kombinatorische Biosynthese). Die kombinatorische Biosynthese entwickelt sich derzeit zu einem potennten Werkzeug zur Produktion von struktureller Biodiversität. Daneben sind Gendisruptions- und -rekombinationsexperimente geeignet, Einblicke in Biosynthesewege zu gewähren.<sup>[2]</sup>

Unsere Arbeiten haben sich auf Post-Polyketidsynthese(PKS)-Schritte konzentriert, die hauptsächlich durch Oxi-doreduktasen und Gruppentransferasen katalysiert werden. Diese Schritte erfolgen spät innerhalb der Biosynthese und sind oft maßgeblich an der Umwandlung biologisch inaktiver Zwischenstufen in die aktiven Endprodukte beteiligt.<sup>[3]</sup>

Wir beschreiben hier Experimente, in denen Mithramycin-PKS-Gene mit Oxygenase-Genen aus dem Tetracenomycin-Gencluster rekombiniert wurden. Diese Experimente zielten nicht nur auf die Erzeugung neuer, biologisch aktiver Hybrid-Naturstoffe ab, sondern waren auch konzipiert, ein labiles, frühes Intermediat der Mithramycin-Biosynthese abzufangen und so indirekt Hinweise auf dessen Struktur zu erhalten.

Die Oxygenasen TcmG und TcmH sind für die Einführung von vier Sauerstoffatomen in der Biosynthese von Tetrace-

nomycin C **4** verantwortlich. TcmH katalysiert die Oxidation des ersten tetracyclischen Intermediats, des Anthrons Tetracenomycin F1 **1** zum Naphthacenchinon Tetracenomycin D3 **2**. TcmG ist für den letzten Biosyntheseschritt dieses Wegs verantwortlich, die Umwandlung von Tetracenomycin A2 **3** in **4** (Schema 1), bei der weitere Sauerstoffatome eingeführt werden.<sup>[4]</sup>



Schema 1. Oxygenierungsreaktionen des Tetracenomycin-Biosynthesewegs.

Mithramycin **8** ist der wichtigste Repräsentant der Aureolsäure-Antitumorantibiotika.<sup>[5]</sup> Während der letzten drei Jahre konnten wir die Kenntnisse der Biosynthese dieser Antibiotika-Familie erheblich erweitern, wobei eine große Zahl von Genen des Mithramycin-Genclusters charakterisiert und verschiedene Biosynthese-Zwischenstufen identifiziert wurden.<sup>[6-9]</sup> Die frühesten erkannten Intermediate sind das tetracyclische Premithramycinon **6** und sein 4-Demethyl-deri-vat **5**,<sup>[7]</sup> das durch etliche Methyl- und Glycosyltransferschritte in Premithramycin B **7** umgewandelt wird. Aus diesem geht schließlich im Zuge einer oxidativen Ringöffnung und einer sich daran anschließenden Ketoreduktion **8** hervor (Schema 2).<sup>[6a, 8]</sup>

Die Premithramycinone **5** und **6** ähneln Tetracenomycin F1 **1** insofern, als es sich auch um tetracyclische Biosyntheseintermediate handelt und die Ringe C und D von **5** und **6** identisch sind mit den Ringen A und B von **1**. Daher sollte es möglich sein, die Biosynthese von Mithramycin durch Einfluss einer oder beider Oxygenasen des Tetracenomycin-C-Genclusters so umzuleiten, dass Premithramycin- oder Mithramycin-Analoga entstehen, in der die normalerweise aromatischen Ringe wie in **4** hoch funktionalisiert vorliegen. Bei Erfolg könnten auch weitere Erkenntnisse bezüglich des Mithramycin-Biosynthesewegs gewonnen werden, da hierbei eine Zwischenstufe „abgefangen“ werden sollte.

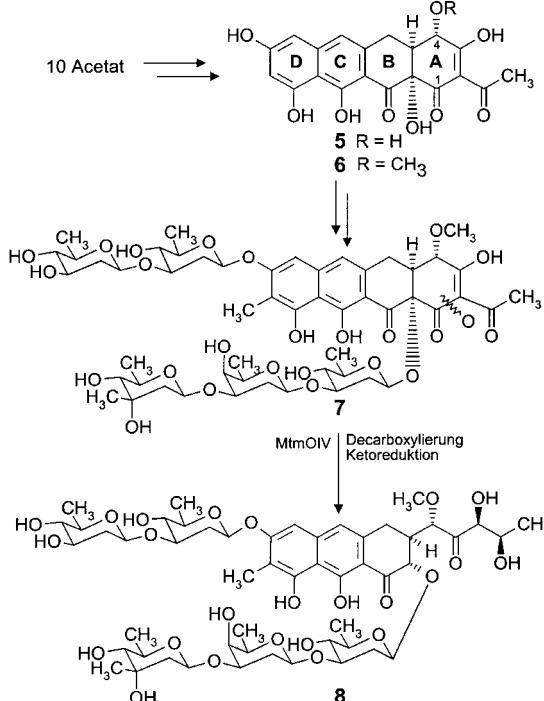
Dieser Hypothese folgend nutzten wir zunächst die Premithramycinon/4-Demethylpremithramycinon produzierende Mutante *Streptomyces argillaceus* M7D1<sup>[6c, 7]</sup> als Wirtstamm, um zu prüfen, ob diese Intermediate durch die Fremdoxygenasen TcmG und/oder TcmH modifiziert werden können. In einem zweiten Experiment (siehe unten) verwendeten wir die Mutante *S. argillaceus* M7O2<sup>[9]</sup>, bei der die Oxygenase MtmOII inaktiviert ist. Dieser Stamm akkumu-

[\*] Prof. Dr. J. Rohr, E. Künzel  
Medical University of South Carolina  
Department of Pharmaceutical Sciences  
171 Ashley Avenue, Charleston, SC 29425-2303 (USA)  
Fax: (+1) 843-953-6615  
E-mail: rohrj@musc.edu

Prof. Dr. J. A. Salas, Dr. F. Lombó, Dr. L. Prado, Dr. A. F. Braña,  
Prof. Dr. C. Méndez  
Departamento de Biología Funcional e Instituto Universitario de  
Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de  
Oviedo  
33006 Oviedo (Spanien)  
Fax: (+34) 985-103652  
E-mail: jasf@sauron.quimica.uniovi.es  
Dr. K. U. Bindseil, Dr. J. Frevert  
AnalytiCon AG, Biotechnologie/Pharmazie  
14473 Potsdam (Deutschland)

Dr. D. Bearden  
NOAA, National Ocean Service  
Center for Coastal Environmental Health and Biomolecular Research  
Charleston, SC 29412-9110 (USA)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Europäischen Union (BIO4-CT96-0068), der Medical University of South Carolina (Institutional Research Funds of 1999-00) und dem Spanischen Ministerium für Bildung und Kultur (BIO97-0771) gefördert. Dr. M. Walla und Dr. W. Cotham (University of South Carolina) danken wir für die Massenspektren.



Schema 2. Der Biosyntheseweg von Mithramycin **8** über die wichtigsten Zwischenprodukte Premithramycinon **6** und Premithramycin B **7**.

liert ein bislang unbekanntes, sehr labiles Intermediat des Mithramycin-Biosynthesewegs, das durch die Fremdoxygenasen „abgefangen“ werden sollte. Unerwartet führten beide Experimente zu demselben Hybridprodukt. Das Plasmid pWHM1026 enthält den gesamten Gencluster von **4**.<sup>[10]</sup> Ein 2.5-kB-*NcoI*-*BglII*-DNA-Fragment (= auf beiden Seiten blunt-ended) aus pWHM1026, das die Gene *tcmG* und *tcmH* enthält, wurde in die *BamHI*-Schnittstelle (blunt-ended) des Plasmids pIAGO<sup>[11]</sup> subkloniert und so unter die Kontrolle des Erythromycin-Resistenzpromotors *ermE* gebracht. Dieses Konstrukt (pFLOGH) wurde nun verwendet, um Protoplasten der Mutante M7D1 zu transformieren. Der resultierende neue Hybridstamm *S. argillaceus* M7D1 (pFLOGH) schien zunächst hauptsächlich Premithramycinon **6** anzureichern, wenn er auf R5-Medium angezüchtet wurde, aber nach 7 Tagen Inkubation wurde ein neuer gelber Farbstoff sichtbar, der sich von den bekannten Produkten von M7D1, **5** und **6**, unterschied. Diese Substanz wurde später Premithramycinon H genannt. Die bathochrome Verschiebung in ihrem UV-Spektrum ( $\lambda_{\max} = 290, 442 \text{ nm}$ ; **6**:  $\lambda_{\max} = 280, 418 \text{ nm}$ ) sprach für ein Chinon, was durch die typische Entfärbungsreaktion mit Natrium-dithionit und die NMR-Daten (Tabelle 1) bestätigt wurde. Die Strukturaufklärung war dadurch erschwert, dass das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum fast nur Singulets (d.h. kaum Fernkopplungen) und das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum überwiegend Signale für quartäre C-Atome enthält. Aus dem FAB-Massenspektrum ergab sich die Summenformel  $C_{21}H_{14}O_8$ . Dies und die weni-

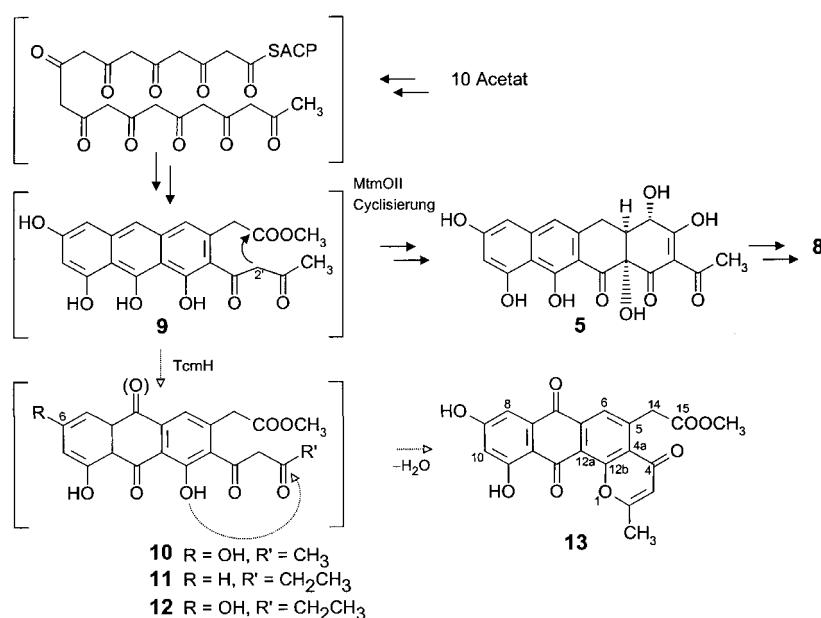
Tabelle 1. NMR-Daten von Premithramycinon H **13**.<sup>[a]</sup>

Position	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>n</sup> J <sub>C,H</sub> beobachtbar im HMBC-Spektrum	<sup>4</sup> J-Kopplung mit: <sup>[b]</sup> ( <sup>4</sup> J <sub>H,H</sub> [Hz])
2		167.5		
3	6.31 (d)	112.7	2-C; 4a-C; 13-C	13-H <sub>3</sub> (0.5)
4		178.5		
4a		126.6		
5		144.2		
6	7.96 (s)	126.6	4a-C; 7-C; 12a-C; 14-C	14-H <sub>2</sub> (nd) <sup>[c]</sup>
6a		134.5		
7		182.1		
7a		136.5		
8	7.07 (d)	108.5	7-C; 10-C; 11a-C	10-H (2)
9	11.37 (s; OH)	165.4		
10	6.61 (d)	109.4	8-C; 9-C; 11-C; 11a-C	8-H (2)
11	12.85 (s; OH)	165.4	10-C; 11-C; 11a-C	
11a		111.1		
12		185.7		
12a		122.4		
12b		156.0		
13	2.44 (d, 3H)	20.4	2-C; 3-C	3-H (0.5)
14	4.31 (s, 2H)	42.0	4a-C; 5-C; 6-C; 15-C	6-H (nd) <sup>[c]</sup>
15		172.1		
15-OCH <sub>3</sub>	3.58 (s, 3H)	52.1		

[a] In [D<sub>6</sub>]DMSO/1% Trifluoressigsäure bei 11.74 T. [b] Aus H,H-COSY-Spektrum ermittelt. [c] nd = nicht detektierbar im 1D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum.

gen detektierbaren H,H- und C,H-Fernkopplungen ließen sich mit nur einer Struktur für Premithramycinon H in Übereinstimmung bringen, nämlich **13** (Tabelle 1).

Premithramycinon H **13** ist ein Biosynthese-Shuntprodukt, das durch spontane Cyclisierung entsteht, z.B. aus **10**, das wiederum durch die Einwirkung von Oxygenase TcmH aus dem tricyclischen Intermediat **9** gebildet wird (Schema 3). Oxygenase TcmH oxidiert das Anthon **9** (in Schema 3 als Enol gezeigt) zum Anthrachinon **10**. Diese Anthrachinonbildung stabilisiert **9** und verändert dessen Eigenschaften. Vermutlich gleichzeitig mit dieser Oxidation erfolgt ein



Schema 3. Normaler Biosyntheseweg zu Mithramycin **8** (durchgezogene Pfeile) und der neue Shuntweg zu Premithramycinon H **13** (gestrichelte Pfeile), der durch die Fremdoxygenase TcmH eingeleitet wird.

Angriff der phenolischen 1-OH-Gruppe auf die 3'-Ketofunktion (gestrichelter Pfeil), während im normalen Biosyntheseweg zu Mithramycin die Interketten-Cyclisierung zwischen C-2' und der Estercarbonylgruppe (durchgezogener Pfeil) stattfindet, der durch eine Mtm-Cyclase, vermutlich MtmX, katalysiert wird.<sup>[6a, 12]</sup> Das Intermediat **10** des vorgeschlagenen, von Oxygenase TcmH eingeleiteten Shuntwegs ähnelt **11**<sup>[12b]</sup> und anderen frühen Zwischenstufen (z. B. Substanz 58B **12**) von Anthracyclin- (z. B. Doxorubicin)-Biosynthesen.<sup>[13]</sup> **9** ähnelt 12-Desoxyaklanonsäure, einer postulierten Zwischenstufe der Doxorubicin-Biosynthese,<sup>[13i]</sup> aber auch Tetracenomycin F2.<sup>[14a]</sup> Wie letzteres für den Tetracenomycin-Biosyntheseweg repräsentiert **9** das bisher früheste Intermediat der Mithramycin-Biosynthese, für das nun Belege existieren. Premithramycinon H **13** ist ein Hybrid-Naturstoff, der unter dem Einfluss der Fremdoxygenase TcmH entsteht, während die andere heterolog exprimierte Oxygenase TcmG keinen Effekt ausübt.<sup>[14b]</sup> TcmG reagiert nicht mit **10**, obwohl dieses seinem natürlichen Substrat Tetracenomycin A2 **3** bezüglich zweier Ringe (s. o.) gleicht. Wahrscheinlich benötigt TcmG eine methylierte 6-OH-Gruppe (diese entspricht der 3-OCH<sub>3</sub>-Gruppe in **3**), um **10** weiter umsetzen zu können.

Da Premithramycinon H **13** nicht die Hydroxygruppen enthält, die von der Oxygenase MtmOII bei der Bildung von 4-Demethylpremithramycinon **5** eingeführt werden, konnte vermutet werden, dass MtmOII eine nicht hydroxylierte Biosynthesevorstufe von **5**, z. B. **9**, als Substrat benötigt: M7D1 (pFLOGH) hydroxyliert dieses hypothetische Intermediat **9** mit Hilfe der Oxygenase MtmOII, woraus schließlich **5** und **6** resultieren, oder es entsteht Premithramycinon H **13** wegen des Eingreifens von TcmH. Diesem Gedanken folgend wollten wir eine mögliche Reaktion von TcmH mit dem von der Mutante M7O2 akkumulierten, oben erwähnten instabilen Intermediat testen.<sup>[9]</sup> Die Mutante M7O2 wurde mit pFLOGH transformiert, wonach der so rekombinierte Stamm interessanterweise wiederum **13** bildete. Dies stützt die Hypothese eines tricyclischen Intermediats **9**, da Oxygenase MtmOII, von der erwartet wurde, entweder **9** oder ein entsprechendes tetracyclisches Intermediat umzusetzen,<sup>[9]</sup> nicht mehr wirken kann, sobald das Anthrachinon **10** durch Eingreifen von TcmH gebildet wird. Im Unterschied zur Mutante M7D1 (pFLOGH), die neben Premithramycinon H **13** auch **5** und **6** produziert, akkumuliert M7O2 (pFLOGH) nur **13**. Daraus folgt, dass das vorgeschlagene tricyclische Intermediat **9** wahrscheinlich das echte Substrat der Oxygenase MtmOII ist, d. h., im normalen Biosyntheseweg zu Mithramycin erfolgt der Oxygenierungsschritt, der von MtmOII katalysiert wird, vor der Schließung des vierten Rings zu 4-Demethylpremithramycinon **5**. Dies widerspricht früheren Annahmen, in denen wir ein tetracyclisches Substrat für MtmOII formulierten.<sup>[9]</sup> Da es bisher nicht gelang, das instabile Produkt der Mutanten M7O2 zu isolieren, lieferte das hier beschriebene „Abfangexperiment“ die erste indirekte Information bezüglich des MtmOII-Substrats. Da die Bildung von **13** aus **10** wegen der geringen Nucleophilie der Anthrachinon-*peri*-Hydroxygruppen unwahrscheinlich ist,<sup>[14c]</sup> könnte es sein, dass **10** kein echtes Intermediat des Shuntwegs zu **13** ist und TcmH entweder gleichzeitig mit oder kurz nach der Pyranonbildung eingreift, die schon aus **9** heraus spontan

erfolgt. Dies bedeutet wiederum für den normalen Biosyntheseweg zu Mithramycin **8**, dass **9** kein Substrat der vierten Cyclase sein kann und die Cyclisierung zu **5** erst *nach* Einwirken von MtmOII auf das tricyclische Intermediat **9** erfolgt. Die Mutante M7O2 ist hinsichtlich der Desoxyzucker-Biosynthese und des Glycosyltransfers anders als M7D1 nicht beeinträchtigt, hat also noch die volle Fähigkeit, die Mithramycin-Zucker zu bilden und anzuknüpfen. Es wurden dennoch keine glycosylierten **13**-Derivate gefunden, vermutlich wegen mangelnder Substratflexibilität der Mtm-Glycosyltransferasen.

Wie Mithramycin **8** zeigt auch Premithramycinon H **13** antibakterielle Aktivität gegen *Micrococcus luteus* und *Streptomyces albus*. Auch die Antitumorwirksamkeit (Tabelle 2)<sup>[15]</sup> bewegt sich etwa im gleichen Rahmen wie die von Mithramycin, anders als bei Premithramycinon **6**, das nicht antibakteriell wirksam ist und nur eine sehr geringe Antitumorwirkung zeigt.

Tabelle 2. Proliferations-Inhibitions-Tests mit vier verschiedenen Krebszelllinien ( $IC_{50}$  [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]).<sup>[15]</sup>

	<b>13</b>	<b>8</b>	<b>6</b>
Squamous cell carcinoma KB	11.7	10	29.3
Melanoma SK-Mel 30	15.3	9.6	— <sup>[a]</sup>
Non-small cell lung carcinoma A549	19.1	12.9	25.2
breast carcinoma MDA-MB 231	15.2	12.3	37.7

[a] Keine Inhibition ( $> 40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### Experimentelles

Mikroorganismen und Anzucht: *S. argillaceus* M7D1<sup>[6c]</sup> und M7O2<sup>[9]</sup> wurden als Wirtstämme für die Transformationen verwendet. *Escherichia coli* XL1-Blue<sup>[16]</sup> wurde als Wirtstamm für das Subklonieren genutzt und wurde bei 37 °C auf TSB-Medium (trypticase soya broth, OXOID) angezogen. Als festes Wachstumsmedium der Klone wurde modifiziertes R5-Agarmedium (R5A) verwendet.<sup>[6d]</sup>

DNA-Manipulationen: Plasmid-DNA-Präparationen, Restriktionsendonuclease-Verdauungen, Behandlungen mit alkalischer Phosphatase, Ligationen und andere DNA-Manipulationen erfolgten nach Standardverfahren für *E. coli*<sup>[16d]</sup> oder *Streptomyces*.<sup>[16c]</sup> Protoplasten-Transformationen der beiden Mutanten erfolgten ebenfalls nach Standardvorschriften,<sup>[16c, d]</sup> und Thiostrepton-resistente Transformanten wurden selektiert (25 mg L<sup>-1</sup> Thiostrepton).

Produktion und Isolierung von Premithramycinon H: Stamm M7D1 (pFLOGH) wurde 17 Tage bei 28 °C auf R5-Agarplatten angezogen. Stamm M7O2 (pFLOGH) wuchs in modifiziertem R5-Flüssigmedium<sup>[6d]</sup> (3 d, 30 °C). In beiden Fällen wurde 50 mg L<sup>-1</sup> Thiostrepton zugesetzt. Die Kulturen wurden viermal mit EtOAc/0.1% HCO<sub>2</sub>H extrahiert, im Vakuum auf etwa 20 mL eingeengt und zentrifugiert. Die HPLC-Analyse der Extrakte ergab ein Hauptprodukt, das durch präparative HPLC weiter gereinigt wurde (Säule: μBondapak C18 radial compression cartridge, PrepPak Cartridge, 25 × 100 mm, Waters; Eluent: MeOH (Gradient von 50 bis 80% in 30 min)/0.1% Trifluoressigsäure (TFA) in H<sub>2</sub>O); Flussgeschwindigkeit 10 mL min<sup>-1</sup>). Die vereinigten Eluate wurden mit 0.2 M Phosphatpuffer (pH 7.0) auf pH 4.0 gebracht und mit der vierfachen Menge H<sub>2</sub>O verdünnt. Die resultierende Lösung wurde durch Festphasenextraktion (Lichrolut RP-18, Merck) gereinigt, mit H<sub>2</sub>O gewaschen, um Salze zu entfernen, mit MeOH eluiert und im Vakuum getrocknet. Eine Endreinigung erfolgte an Sephadex LH-20 (MeOH/TFA 99:1).

Eingegangen am 9. August 1999 [Z13845]

- [1] a) D. A. Hopwood, F. Malpartida, H. M. Kieser, H. Ikeda, J. Duncan, I. Fujii, B. A. Rudd, H. G. Floss, S. Omura, *Nature* **1985**, *314*, 642–644; b) S. Omura, H. Ikeda, F. Malpartida, H. M. Kieser, D. A. Hopwood, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, *29*, 13–19.
- [2] a) C. R. Hutchinson, I. Fujii, *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *49*, 201–238; b) D. A. Hopwood, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2465–2497; c) J. Rohr, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 963–967; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 881–885; d) C. J. Tsai, C. Khosla, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 355–362; e) D. E. Cane, *Science* **1994**, *263*, 338–340; f) A. Bechthold, J. A. Salas in *Combinatorial Biosynthesis of Microbial Metabolites* (Hrsg.: G. Jung), WILEY-VCH, Weinheim, **1999**, im Druck; g) D. E. Cane, C. T. Walsh, C. Khosla, *Science* **1998**, *282*, 63–68; h) C. R. Hutchinson, *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**, *1*, 319–329; i) P. F. Leadlay, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 162–168; j) C. Khosla, R. J. Zawada, *Trends Biotechnol.* **1996**, *14*, 335–341; k) J. A. Salas, C. Méndez, *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 475–482.
- [3] a) H. Motamedi, A. Shafiee, S.-J. Cai, S. L. Streicher, B. H. Arison, R. R. Miller, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 5243–5248. b) J. Rohr in *Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds* 1997 (Hrsg.: J. R. Heys, D. G. Melillo), 1. Aufl., Wiley, Chichester, **1998**, Kap. 52, S. 267–271; c) Y. Q. Xue, D. Wilson, L. S. Zhao, H. W. Liu, D. H. Sherman, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 661–667; d) R. J. Walczak, M. L. Dikken, N. D. Priestley, W. R. Strohl, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 298–304; e) H. Decker, S. Haag, G. Udvarnoki, J. Rohr, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1214–1217; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1107–1110; f) S.-E. Wohlert, G. Blanco, F. Lombó, E. Fernández, A. F. Braña, S. Reich, G. Udvarnoki, C. Méndez, H. Decker, J. Frevert, J. A. Salas, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10596–10601.
- [4] a) B. Shen, C. R. Hutchinson, *Biochemistry* **1993**, *32*, 6656–6663; b) B. Shen, C. R. Hutchinson, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 30726–30733; c) H. Decker, H. Motamedi, C. R. Hutchinson, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 3876–3886; d) G. Udvarnoki, C. Wagner, R. Machinek, J. Rohr, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 643–645; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 565–567; e) M. G. Anderson, C. L.-Y. Khoo, R. W. Rickards, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 640–643.
- [5] a) S. E. Wohlert, E. Künzel, R. Machinek, C. Méndez, J. A. Salas, J. Rohr, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 119–121; b) W. A. Remers *The Chemistry of Antitumor Antibiotics*, Vol. 1, Wiley-Interscience, New York, **1979**, S. 133; c) J. D. Skarbek, M. K. Speedie in *Antitumor Antibiotics of the Aureolic Acid Group: Chromomycin A<sub>3</sub>, Mithramycin A, and Olivomycin A*, Vol. 1 (Hrsg.: A. Aszalos), CRC, Boca Raton, FL, **1981**, S. 191; d) R. Katahira, Y. Uosaki, H. Ogawa, Y. Yamashita, H. Nakano, M. Yoshida, *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 267–274; e) R. Katahira, M. Katahira, Y. Yamashita, H. Ogawa, Y. Kyogoku, M. Yoshida, *Nucl. Acid Res.* **1998**, *26*, 744–755; f) M. Sastry, R. Fiala, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.* **1995**, *251*, 674–689.
- [6] a) J. Rohr, C. Méndez, J. A. Salas, *Bioorg. Chem.* **1999**, *27*, 41–54; b) F. Lombó, G. Blanco, E. Fernández, C. Mendez, J. A. Salas, *Gene* **1996**, *172*, 87–91; c) F. Lombó, K. Siems, A. F. Braña, C. Méndez, K. Bindseil, J. A. Salas, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 3354–3357; d) E. Fernández, U. Weißbach, C. Sánchez Reillo, A. F. Braña, C. Méndez, J. Rohr, J. A. Salas, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 4929–4937; e) E. Fernández, F. Lombó, C. Méndez, J. A. Salas, *Mol. Gen. Genet.* **1996**, *251*, 692–698; f) F. Lombó, A. F. Braña, C. Méndez, J. A. Salas, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 642–647.
- [7] J. Rohr, U. Weißbach, C. Beninga, E. Künzel, K. Siems, K. U. Bindseil, F. Lombó, L. Prado, A. F. Braña, C. Méndez, J. A. Salas, *Chem. Commun.* **1998**, 437–438.
- [8] L. Prado, E. Fernández, U. Weißbach, G. Blanco, L. M. Quirós, A. F. Braña, C. Méndez, J. Rohr, J. A. Salas, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 19–30.
- [9] L. Prado, F. Lombó, A. F. Braña, C. Méndez, J. Rohr, J. A. Salas, *Mol. Gen. Genet.* **1999**, *261*, 216–225.
- [10] a) H. Decker, H. Motamedi, C. R. Hutchinson, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 3876–3886; b) H. Motamedi, C. R. Hutchinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 4445–4449; c) R. G. Summers, E. Wendt-Pienkowski, H. Motamedi, C. R. Hutchinson, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 1810–1820.
- [11] I. Aguirre-Zabalaga, unveröffentlichte Ergebnisse, **1999**.
- [12] a) E. Künzel, S.-E. Wohlert, C. Beninga, S. Haag, H. Decker, C. R. Hutchinson, G. Blanco, C. Mendez, J. A. Salas, J. Rohr, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1675–1678; b) es ist etwas unerwartet, dass **13** eine Carboxymethylgruppe enthält, da bislang kein Carboxymethyltransferase-Gen, ähnlich *dauC*,<sup>[13e–g]</sup> im Mithramycin-Gencluster (*mtm*) gefunden werden konnte. Jedoch könnte entweder eine der gefundenen *mtm*-Methyltransferasen (*mtmMI*, *mtmMII*, *mtmC*)<sup>[6a]</sup> auch für diese Carboxymethylierung verantwortlich sein, oder es erfolgte eine spontane Reaktion mit Methanol während der Aufarbeitung.
- [13] a) H. Tobe, A. Yoshimoto, T. Ishikura, H. Naganawa, T. Takeuchi, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1641–1645; b) C. Wagner, K. Eckardt, G. Schumann, W. Ihn, D. Tresselt, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 691–692; c) K. Eckardt, D. Tresselt, G. Schumann, W. Ihn, C. Wagner, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1034–1039; d) K. Eckardt, C. Wagner, *J. Basic Microbiol.* **1988**, *28*, 137–144; e) N. C. Connors, P. L. Bartel, W. R. Strohl, *J. Gen. Microbiol.* **1990**, *136*, 1887–1894; f) W. R. Strohl, P. L. Bartel, N. C. Connors, C.-B. Zhu, D. C. Dosh, J. M. Beale, H. G. Floss, K. Stutzmann-Engwall, S. L. Otten, C. R. Hutchinson in *Biosynthesis of Natural and Hybrid Polyketides by Anthracycline-Producing Streptomyces* (Hrsg.: C. L. Hershberger, S. W. Queener, G. Hegemann), American Society Microbiology, Washington, DC, **1989**, S. 68–84; g) P. L. Bartel, N. C. Connors, W. R. Strohl, *J. Gen. Microbiol.* **1990**, *136*, 1877–1886; h) C. Wagner, K. Eckardt, W. Ihn, G. Schumann, C. Stengel, W. F. Fleck, D. Tresselt, *J. Basic Microbiol.* **1991**, *31*, 223–240; i) A. Grimm, K. Madduri, A. Ali, C. R. Hutchinson, *Gene* **1994**, *151*, 1–10; j) M. L. Dickens, J. Ye, W. R. Strohl, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 536–543; k) V. B. Rajgarhia, W. R. Strohl, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 2690–2696.
- [14] a) B. Shen, H. Nakayama, C. R. Hutchinson, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1288–1293; b) Premithramycinon H **13** kann nicht nachgewiesen werden, wenn das Gen *tcMH* fehlt, nicht einmal in Spuren; c) die Autoren danken den Gutachtern für diesen und andere wichtige Hinweise.
- [15] a) Für experimentelle Details bezüglich des Antitumor-Tests siehe auch Lit. [3f]; b) P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. MacMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M. R. Boyd, *J. Natl. Canc. Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112.
- [16] a) M. J. Bibb, S. Biró, H. Motamedi, J. F. Collins, C. R. Hutchinson, *EMBO J.* **1989**, *8*, 2727–2736; b) W. O. Bullock, J. M. Fernández, J. N. Short, *Biotechniques* **1987**, *5*, 376; c) 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. Schrempp: *Genetic manipulation of Streptomyces. A laboratory manual*, The John Innes Foundation, Norwich, UK, **1985**; d) J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, **1989**.

## Generationsabhängige, intramolekulare CT-Komplexbildung in einem dendrimeren Elektronenschwamm mit Viologengerüst

Susanne Heinen und Lorenz Walder\*

Nachdem in den vergangenen zwanzig Jahren effiziente Wege zur Kaskadensynthese von Dendrimeren zugänglich gemacht worden sind, interessieren heute insbesondere synergistische Phänomene, die durch die Dendrimertopologie im Zusammenspiel mit gezielt eingebauten molekularen Funktionen zustande kommen.<sup>[1]</sup> Eine wichtige Klasse bilden dabei redoxaktive Funktionen, die a) im Kern,<sup>[2, 3]</sup> b) in der Peripherie<sup>[4–7]</sup> oder c) im Kern, in der Peripherie und in den Ästen vorliegen können.<sup>[8–11]</sup> Die resultierenden dendritischen Ef-

[\*] Prof. Dr. L. Walder, Dipl.-Chem. S. Heinen  
Institut für Chemie, OCII, Universität Osnabrück  
Barbarastraße 7, 49069 Osnabrück (Deutschland)  
Fax: (+49) 541-969-12-58  
E-mail: LoWalder@rz.uni-osnabrueck.de