

# Naturstoffe

## Gutingimycin: ein komplexer Metabolit aus einem marinen Streptomyceten\*\*

Rajendra P. Maskey, Madhumati Sevvana, Isabel Usón, Elisabeth Helmke und Hartmut Laatsch\*

Bei unserer Suche nach neuen biologisch aktiven Sekundärmetaboliten aus marinen Streptomyceten fiel der Ethylacetat-Extrakt des Isolats B8652 durch eine hohe antibiotische Wirkung gegen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) auf. Die Aktivität ließ sich vor allem auf das 2,3-Dihydro-1,4-anthracinon Parimycin<sup>[1]</sup> und die gelben, in Lösung intensiv grün fluoreszierenden Trioxacarcine A–F zurückführen.<sup>[2]</sup>

Das Kulturfiltrat enthielt ein weiteres, sehr polares Trioxacarcin-Derivat, das nach Eindampfen bis zur Trockene durch Extraktion des Rückstandes mit Ethylacetat isoliert wurde. Aus einer 50-L-Fermentation ließen sich auf diese Weise 120 mg einer Substanz mit dem Trioxacarcin-Grundgerüst, jedoch deutlich höherer Komplexität gewinnen, die wir nach Gutingi, dem alten Namen für Göttingen, Gutingimycin (**1c**) benannt haben.

Gutingimycin (**1c**) ist wie die anderen Trioxacarcine gelb, in Lösung grün fluoreszierend und zeigt ein für diese Verbindungen typisches <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum. Die (+)- und (–)-ESI-Massenspektren zeigen Signale bei *m/z* = 1050 ([*M*+Na]<sup>+</sup>) und 1028 ([*M*+H]<sup>+</sup>) bzw. 1063 ([*M*+Cl]<sup>–</sup>) und 1026 ([*M*–H]<sup>–</sup>), was für die Masse 1027 spricht. Hochauflösende Massenspektrometrie ließ die Summenformeln C<sub>49</sub>H<sub>57</sub>NO<sub>23</sub> und C<sub>47</sub>H<sub>57</sub>N<sub>5</sub>O<sub>21</sub> zu. Die <sup>13</sup>C-NMR-, H,H-COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren sowie die Kopplungskonstanten aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum bestätigen, dass die Zuckerreste **I** und **II** mit den Zuckern in Trioxacarcin B (**1b**) übereinstimmen (Abbildung 1) und auch das Aglycon (Abbildung 2) bis auf den Rest an C17 identisch mit dem von **1b** ist. Die HMBC-Kopplungen der anomeren Protonen bei δ = 5.74 (1''H), 5.52 (1'H) und 5.36 ppm (4H) jeweils mit Kohlenstoffsignalen bei δ = 103.3 (C13), 72.2 (C4) und 100.8 ppm (C1'') zeigen, dass der Zucker mit dem Aglycon

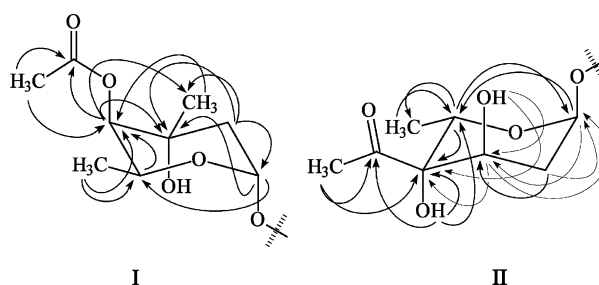


Abbildung 1. HMBC-Kopplungen (H→C) der Zucker in Gutingimycin (**1c**).

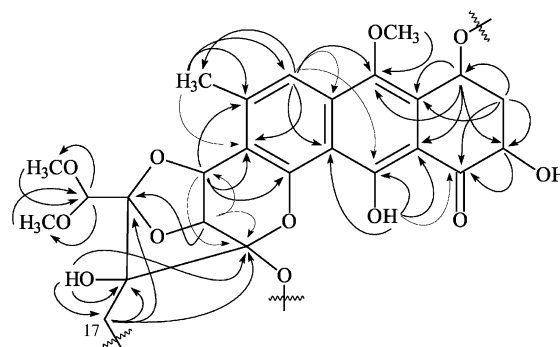
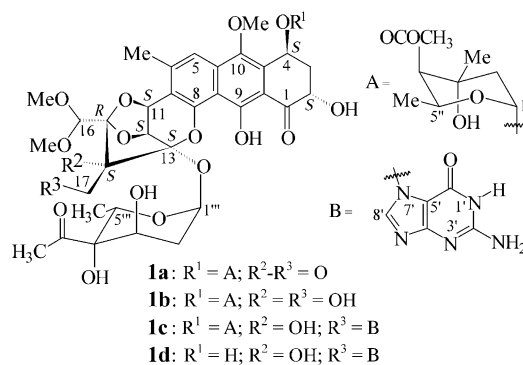


Abbildung 2. HMBC-Kopplungen (H→C) im Aglycon von Gutingimycin (**1c**).

zur Teilstruktur **1c** mit der Masse 877 (C<sub>42</sub>H<sub>53</sub>O<sub>20</sub>) und einem noch unbekannten Rest R<sup>3</sup> verknüpft ist. Diese Annahme wurde durch Vergleich der <sup>13</sup>C-NMR-Daten mit den Werten für Trioxacarcin B (**1b**) gesichert. In den 1D- und 2D-NMR-Spektren von Gutingimycin sind insgesamt neun acide Pro-



tonen nachweisbar. Drei davon lassen sich eindeutig dem Aglycon, zwei den Zuckerresten zuordnen. Das Proton der dritten OH-Gruppe des Zuckers **I** koppelt nicht, daher müssen von den verbliebenen Signalen bei δ = 8.86, 7.55, 6.64 und 6.10 ppm drei zu dem Rest R<sup>3</sup> (in **1c**) gehören.

Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum sieht man ein CH-Singulett bei δ = 8.23 ppm, das bei **1b** fehlt. Nach dem <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum müssen weiterhin die mit Heteroatomen verbundenen C-Atome bei δ = 157.7, 153.4 und 151.7, ein C-Atom bei δ = 140.4 sowie ein C-Atom mit Signal bei δ = 108.3 der

[\*] Dr. R. P. Maskey, Prof. Dr. H. Laatsch  
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie  
Georg-August-Universität Göttingen  
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)  
Fax: (+49) 551-399-660  
E-mail: hlaatsc@gwdg.de

M. Sevvana, Dr. I. Usón  
Institut für Anorganische Chemie  
Georg-August-Universität Göttingen (Deutschland)

Dr. E. Helmke  
Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung  
Bremerhaven (Deutschland)

[\*\*] Marine Bakterien, 26. Mitteilung. Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF 03F0346A) unterstützt. R.P.M. dankt dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) für ein Promotionsstipendium. – 25. Mitteilung: R. P. Maskey, E. Helmke, H. Laatsch, J. Antibiot. **2003**, *56*, 942–949.

Teilstruktur  $R^3$  zugeordnet werden. Im HMBC-Spektrum koppelt das Aren-Proton bei  $\delta = 8.23$  mit C-Atomen des Restes  $R^3$  bei  $\delta = 157.7$ ,  $153.4$  und  $108.3$ .

In Anbetracht der Daten vermuteten wir, dass **1c** formal aus Trioxacarcin A (**1a**) durch Angriff eines Nucleophils entsteht, für das aus der Massendifferenz eine Masse von 151 errechnet wird. Unter den aus Mikroorganismen isolierten Verbindungen kommen mit dieser Masse sowie mit der Zahl der C-Atome und aciden Protonen nur Guanin, Isoguanin oder Akalon<sup>[3]</sup> in Frage. Da HMBC-Korrelationen aber fehlen, die den Rest  $R^3$  mit dem Trioxacarcin-Gerüst verbinden oder Aussagen über die Anordnung seiner C-Atome ermöglichen, war eine weitere Eingrenzung der Struktur mittels NMR-Spektroskopie nicht möglich.

Die offenen Fragen konnten durch eine Kristallstrukturanalyse beantwortet werden: Gutingimycin (**1c**) kristallisiert in der monoklinen Raumgruppe  $P2_1$  mit einem Molekül des Naturstoffs und vier Molekülen Wasser in der asymmetrischen Einheit<sup>[4]</sup> (Abbildung 3). Es enthält das Grundgerüst von Trioxacarcin A (**1a**), dessen Epoxidring durch den

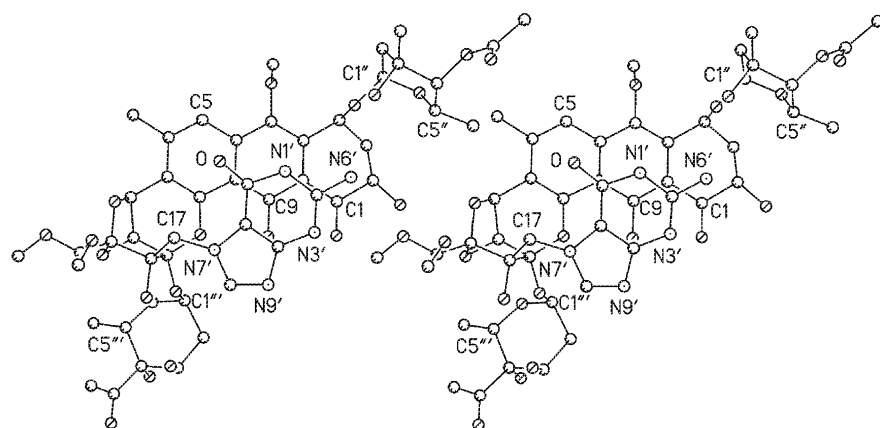
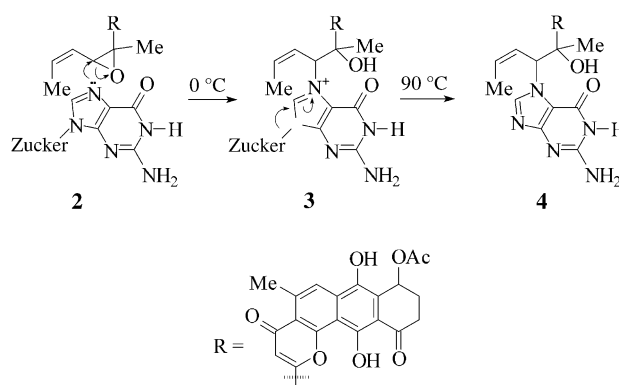


Abbildung 3. Stereo-Plot von Gutingimycin.

nucleophilen Angriff des N7-Atoms einer Guanineinheit geöffnet wurde. Der Guaninrest orientiert sich annähernd parallel zum planaren kondensierten Ringsystem von **1c**, mit einem Abstand von ca.  $3.2 \text{ \AA}$  zwischen den Ebenen. Diese Konformation wird von einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen 2'-OH und einem an N6' gebundenen Wasserstoffatom stabilisiert. Aus der schon früher bestimmten absoluten Konfiguration der Zucker L-Trioxacarcinose A und B<sup>[5]</sup> folgt nun auch die absolute Konfiguration der Trioxacarcine und damit auch von **1c**.

Mit Gutingimycin (**1c**) strukturell verwandte Verbindungen haben Saito et al.<sup>[6]</sup> durch Reaktionen von DNA sowie synthetischen Oligonucleotiden mit Kapurimycin A3 (**2**) erhalten (siehe Schema 1): Bei  $0^\circ\text{C}$  entsteht zunächst das ionische Zwischenprodukt **3**, das beim Erwärmen auf  $90^\circ\text{C}$  unter Bildung von **4** zerfällt. Letzteres ist bisher als Naturstoff unbekannt. Auch Trioxacarcin A (**1a**) bildet mit DNA einen hochpolaren stabilen Komplex, aus dem bei  $100^\circ\text{C}$  rasch **1c** freigesetzt wird. Daher liegt nahe, dass Gutingimycin (**1c**) nicht aus niedermolekularen Vorstufen entsteht, sondern dass



Schema 1. Durch Reaktionen von DNA sowie synthetischen Oligonucleotiden mit Kapurimycin A3 (**2**) entsteht zunächst das Zwischenprodukt **3**, das beim Erwärmen auf  $90^\circ\text{C}$  unter Bildung von **4**, einem dem Gutingimycin verwandten Stoff, zerfällt.

das autotoxische **1a** die DNA der Zelle ähnlich wie **2** an den Guaninresten angreift. Dabei erfolgt eine Alkylierung an N7, wobei die N9-Aminabindung des Nucleotids gelöst wird und unter Strangbruch das gut wasserlösliche **1c** entsteht.

Nach seiner Struktur sollte Gutingimycin (**1c**) keine alkylierenden Eigenschaften haben. Damit stimmt überein, dass es weit weniger cytotoxisch gegen diverse humane Tumorzelllinien ( $\text{IC}_{70} = 3.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) als **1a** ( $\text{IC}_{70} = 0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ist. Die MHK-Werte von **1a** gegen *Bacillus subtilis*, *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57), *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* lagen bei  $0.15$ – $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , der von **1c**  $> 20 \mu\text{g mL}^{-1}$ .<sup>[2]</sup>

Das stark cytotoxische Actinomycin D intercaliert zwischen benachbarten Guanin-Cytosin-Basenpaaren der DNA,<sup>[7]</sup> führt allerdings nicht zum Strangbruch. Viele in der Krebstherapie eingesetzten Alkylierungsmittel, etwa die N- oder S-Lost-Derivate, alkylieren bevorzugt Guaninreste, ohne jedoch zu intercalieren. Es bleibt zu klären, welche Zwischenstufen bei der Bildung von **1c** durchlaufen werden und ob strukturell verwandte Antibiotika, etwa die Indomycinone, auf gleiche Weise wirken. Details der Wechselwirkungen von **1a** und **1c** mit DNA oder RNA werden gegenwärtig untersucht.

## Experimentelles

Materialien, Methoden und Testverfahren wurden bereits früher beschrieben.<sup>[8]</sup> Der marine Streptomycet Isolat B8652 wurde im 50-L-Fermenter unter üblichen Bedingungen<sup>[1]</sup> auf Malz/Hefeextrakt/Glucose 3 Tage bei  $28^\circ\text{C}$  inkubiert und mit Ethylacetat extrahiert (Extrakt A). Die Wasserphase wurde im Vakuum ( $40^\circ\text{C}$  Badtemperatur) auf etwa 3 L eingengt und lyophilisiert. Extraktion des Rückstands mit Methanol ergab Extrakt B. Vortrennung von Extrakt A an Kieselgel ergab eine polare, gelbe, im UV-Licht grün fluoreszierende Gutingimycin-Fraktion. Nachtrennung durch PDC (4 Platten  $20 \times 20 \text{ cm}$ ,  $\text{CHCl}_3/15\% \text{ MeOH}/0.1\% \text{ AcOH}$ ) lieferte aus der langsamsten, bei  $366 \text{ nm}$  intensiv grün fluoreszierenden Zone mit  $R_f = 0.21$  ( $\text{CHCl}_3/10\% \text{ MeOH}$ ) ein Rohprodukt, das durch zwei-

malige Chromatographie an Sephadex (4 × 100 cm, CHCl<sub>3</sub>/40% MeOH) 60 mg gelbes Gutingimycin (**1c**) ergab. Reinigung von Extrakt B lieferte in ähnlicher Weise zusätzliche 60 mg **1c**.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ = 13.88 (s, H/D-austauschbar, 1H, 9OH), 8.86 (br.s, H/D-austauschbar, 1H, NH), 8.23 (s, 1H, 8'H), 7.55 (br.s, H/D-austauschbar, 1H, NH), 7.51 (s, 1H, 5H), 6.64 (br.s, H/D-austauschbar, 1H, NH), 6.52 (br.s, H/D-austauschbar, 1H, 2OH), 6.10 (br.s, H/D-austauschbar, 1H, OH), 5.74 (d, <sup>3</sup>J = 3.2 Hz, 1H, 1''H), 5.52 (d, <sup>3</sup>J = 4.2 Hz, 1H, 1''H), 5.42 (s, H/D-austauschbar, 1H, 16OH), 5.36 (t, <sup>3</sup>J = 2.4 Hz, 1H, 4H), 5.28 (d, <sup>3</sup>J = 4.0 Hz, 1H, 12H), 5.13 (m, 1H, 4''H), 5.12 (m, 1H, 11H), 5.11 (s, 1H, 16H), 5.05 (d, <sup>2</sup>J = 15.1 Hz, 1H, 17H<sub>A</sub>), 5.02 (q, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 1H, 5''H), 4.93 (q, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 1H, 5''H), 4.77 (t, <sup>3</sup>J = 3.2 Hz, 1H, 2H), 4.73 (d, <sup>3</sup>J = 4.1 Hz, H/D-austauschbar, 1H, 3''OH), 4.37 (d, <sup>2</sup>J = 15.9 Hz, 1H, 17H<sub>B</sub>), 4.01 (s, H/D-austauschbar, 1H, 4''OH), 3.97 (s, 3H, 10OCH<sub>3</sub>), 3.75 (m, 1H, 3''H), 3.67 (s, 3H, 16OCH<sub>3</sub>), 3.55 (s, 3H, 16OCH<sub>3</sub>), 2.99 (td, <sup>3</sup>J = 3.9 Hz, <sup>2</sup>J = 13.3 Hz, 1H, 3H<sub>A</sub>), 2.64 (s, 3H, 6CH<sub>3</sub>), 2.51 (s, 3H, 4''COCH<sub>3</sub>), 2.30 (td, <sup>3</sup>J = 3.4 Hz, <sup>2</sup>J = 14.2 Hz, 1H, 2''H<sub>A</sub>), 2.24 (s, 3H, 4''OCOCH<sub>3</sub>), 2.23 (m, 1H, 2''H<sub>A</sub>), 2.00 (td, <sup>2</sup>J = 13.2 Hz, <sup>3</sup>J = 13.2, 2.7 Hz, 1H, 3H<sub>B</sub>), 1.85 (d, <sup>2</sup>J = 14.8 Hz, 1H, 2''H<sub>B</sub>), 1.78 (d, <sup>2</sup>J = 13.6 Hz, 1H, 2''H<sub>B</sub>), 1.25 (d, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 3H, 5''CH<sub>3</sub>), 1.18 (s, 3H, 3''CH<sub>3</sub>), 1.08 ppm (d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 3H, 5''CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125.7 MHz): δ = 210.9 (4''COCH<sub>3</sub>), 207.6 (C1), 173.2 (4''OCOCH<sub>3</sub>), 162.9 (C9), 157.7 (C6'), 153.0 (C4'), 152.7 (C8), 151.7 (C2'), 144.6 (C10), 142.4 (C6), 140.4 (C8'), 135.7 (C10a), 128.4 (C4a), 116.8 (C5), 114.5 (C8a), 113.1 (C7), 108.8 (C9a), 108.3 (C5'), 108.2 (C15), 103.3 (C13), 100.8 (C1''), 99.5 (C16), 92.9 (C1'''), 84.4 (C14), 78.5 (C4'''), 75.8 (C4''), 72.2 (C4), 71.6 (C12), 69.5 (C3'''), 69.0 (C11), 68.2 (C2), 67.2 (C3''), 63.7 (C5''), 62.7 (10OCH<sub>3</sub>), 62.2 (C5'), 55.4 (16OCH<sub>3</sub>), 56.2 (16OCH<sub>3</sub>), 46.2 (C17), 37.8 (C2''), 37.0 (C3), 32.9 (C2'''), 27.8 (4''COCH<sub>3</sub>), 27.2 (3''CH<sub>3</sub>), 21.2 (4''OCOCH<sub>3</sub>), 20.2 (6CH<sub>3</sub>), 16.8 (5''CH<sub>3</sub>), 14.6 ppm (5''CH<sub>3</sub>); (+)-ESI-MS: m/z = 1050 [M+Na], 1028 (M+H); (−)-ESI-MS: m/z = 1063 [M+Cl], 1027 [M−H]; HR-MS für C<sub>47</sub>H<sub>57</sub>N<sub>5</sub>O<sub>21</sub>: ber. 1027.354604, gef. 1027.3257; UV/Vis (MeOH): λ<sub>max</sub> (lg ε) = 269 (5.53), 399 (4.96) nm; IR (KBr): ν̄ = 3438, 2938, 2362, 1695, 1626, 1445, 1385, 1225, 1089, 1000, 871, 822, 755, 672, 554 cm<sup>−1</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = −56.5 (c = 584 μg mL<sup>−1</sup>, CHCl<sub>3</sub>).

Eingegangen am 4. Juli 2003 [Z52312]

**Stichwörter:** Antibiotika · Glycoside · Gutingimycin · Naturstoffe · Strukturaufklärung

Space-Recycling-Methoden gelöst (SHELXD<sup>[8]</sup>) und nach dem Kleinst-Fehlerquadrat-Verfahren gegen F<sup>2</sup> verfeinert. Alle Nichtwasserstoffatome konnten anisotrop verfeinert werden. Die Wasserstoffatome wurden geometrisch ideal positioniert und nach dem Reitermodell verfeinert. CCDC-213711 enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos über [www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html](http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html) erhältlich (oder können bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ; Fax: (+44) 1223-336-033; oder [deposit@ccdc.cam.ac.uk](mailto:deposit@ccdc.cam.ac.uk)).

- [5] K. Shirahata, T. Iida, N. Hirayama, *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu* **1981**, 24, 199–206.
- [6] a) K. L. Chan, H. Sugiyama, I. Saito, M. Hara, *Phytochemistry* **1995**, 40, 1373–1374; b) K. L. Chan, H. Sugiyama, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 7719–7722.
- [7] U. Hollstein, *Chem. Rev.* **1974**, 74, 625–652.
- [8] R. P. Maskey, R. N. Asolkar, E. Kapaun, I. Wagner-Döbler, H. Laatsch, *J. Antibiot.* **2002**, 55, 643–649.
- [9] I. Usón, G. M. Sheldrick, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 643–648.

- [1] R. P. Maskey, E. Helmke, H. H. Fiebig, H. Laatsch, *J. Antibiot.* **2002**, 55, 1031–1035.
- [2] a) R. P. Maskey, E. Helmke, O. Kayser, H. H. Fiebig, H. Laatsch, *J. Antibiot.*, eingereicht; b) F. Tomita, T. Tamaoki, M. Morimoto, K. Fujimoto, *J. Antibiot.* **1981**, 34, 1519–1524; c) T. Tamaoki, K. Shirahata, T. Iida, F. Tomita, *J. Antibiot.* **1981**, 34, 1525–1530.
- [3] H. Izumida, K. Adachi, M. Nishijima, M. Endo, W. Miki, *J. Mar. Biotechnol.* **1995**, 2, 115–118.
- [4] Röntgenstrukturanalyse **1c**: C<sub>47</sub>H<sub>57</sub>O<sub>21</sub>N<sub>5</sub> + 4H<sub>2</sub>O, M<sub>r</sub> = 1100.04, monoklin, Raumgruppe P2<sub>1</sub>, a = 17.736(3), b = 7.091(2), c = 19.816(3) Å, V = 2510.3(9) Å<sup>3</sup>, Z = 2, ρ<sub>ber</sub> = 1.379, F(000) = 1164, λ = 1.54178 Å, T = 133 K, Kristallabmessungen 0.3 × 0.1 × 0.05 mm<sup>3</sup>, 2 ≤ 2θ ≤ 118, 18834 Daten, davon 3897 unabhängig (R<sub>int</sub> = 0.015, Friedel-Partner gemittelt). Verfeinerung: 737 Parameter, 729 Restriktionen, R<sub>1</sub> (%) = ΣF<sub>o</sub> − F<sub>c</sub>/ΣF<sub>o</sub> = 4.41 für 3357 F<sub>o</sub> > 4σ(F<sub>o</sub>) und 5.67 für 3897 sämtliche Daten, wR<sub>2</sub> = [Σw(F<sub>o</sub><sup>2</sup> − F<sub>c</sub><sup>2</sup>)/Σw(F<sub>o</sub><sup>2</sup>)]<sup>1/2</sup> = 0.1100 (sämtliche Daten), min./max. Restelektroendichte −0.24/0.23 e Å<sup>−3</sup>. **1c** wurde auf einem Dreikreisdiffraktometer (CCD-Flächendetektor) mit φ-Scans an einem schockgekühlten Kristall im Loop gesammelt. Die Integration der Daten erfolgte mit dem Programm SAINT. Alle Daten wurden nach einem semiempirischen Verfahren für Absorption und andere systematische Fehler korrigiert. Die Strukturen wurden mit Dual-