

Abyssomicin C – ein polycyclisches Antibiotikum aus einem marinen *Verrucosipora*-Stamm als Inhibitor für die *p*-Aminobenzoesäure/Tetrahydrofolat-Biosynthese**

Bojan Bister, Daniel Bischoff, Markus Ströbele, Julia Riedlinger, Andreas Reicke, Falko Wolter, Alan T. Bull, Hans Zähner, Hans-Peter Fiedler und Roderich D. Süßmuth*

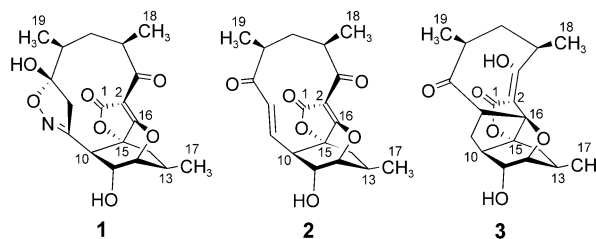
Günther Jung und Louis Moroder gewidmet

Viele Infektionen durch multiresistente Gram-positive Bakterien, z.B. methicillinresistente *Staphylococcus-aureus*-Stämme (MRSA), lassen sich nur mit Glycopeptidantibiotika des Vancomycin- oder Teicoplanin-Typs behandeln. Daher bemühen sich Wissenschaftler unterschiedlicher Disziplinen um die Entdeckung und Entwicklung neuer Antibiotika. Hierbei ist die Natur nach wie vor eine wichtige Quelle. Besonders von der Kultivierung von Mikroorganismen aus seltenen und bislang unerforschten Habitaten sind möglicherweise neue Leitstrukturen mit antibiotischer Aktivität zu erwarten. Auch das Screening auf die Hemmung essentieller und bisher kaum beachteter Biosynthesewege kann zur Entdeckung neuer Antibiotika führen. Beispielsweise verwenden Mikroorganismen *p*-Aminobenzoesäure in der Biosynthese von Tetrahydrofolat (THF).^[1] Aus diesen Gründen konzentrierten wir uns bei der Suche nach Inhibitoren für die Biosynthese von *p*-Aminobenzoesäure (*p*ABA) auf seltene Actinomyceten aus Tiefseesedimenten.

Bekannte Inhibitoren der THF-Biosynthese sind etwa die Sulfonamide und das Trimethoprim. Die *p*ABA-Biosynthese,

die in die THF-Biosynthese einmündet, ist ein vielversprechendes Target, da sie bei Mikroorganismen, nicht aber beim Menschen abläuft. Wir beschreiben hier die Strukturaufklärung von Abyssomicinen, polycyclischen Antibiotika vom Polyketid-Typ, die die oben genannten Kriterien erfüllen: Sie werden von einem Vertreter der seltenen Actinomycetengattung *Verrucosipora* produziert und sind Inhibitoren der *p*ABA-Biosynthese. Nach unseren Erkenntnissen sind die Abyssomicine die ersten Verbindungen natürlichen Ursprungs, die die *p*ABA-Biosynthese hemmen.

Der Actinomycetenstamm *Verrucosipora* AB 18-032 wurde aus einer Sedimentprobe der Japanischen See aus einer Tiefe von 289 m isoliert. Die inhibitorischen Effekte der Abyssomicine, die durch Zugabe von *p*ABA kompetitiv aufgehoben werden, wurden durch einen modifizierten Agardiffusionstest im Biosyntheseweg von Chorismat zu *p*ABA lokalisiert.^[2] In der anschließenden HPLC-Diodenarray-Analytik wurden drei Verbindungen detektiert, die keinem bekannten Metaboliten unserer HPLC-UV/Vis-Datenbank^[15] zugeordnet werden konnten. Die Verbindungen **1–3** (Schema 1) wurden durch Extraktion, Adsorptionschromatographie, Ausschlusschromatographie sowie präparative Umkehrphasen-HPLC isoliert und durch Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse untersucht.



Schema 1. Strukturformeln der Abyssomicine B (**1**), C (**2**) und D (**3**) mit *R*-Konfiguration am C(11)-Atom.

Die hochauflösende ESI-FTICR-massenspektrometrische Analyse der Na-Addukte von **1**, **2** und **3** ergab Molekülmassen von 400.13654, 369.13079 und 371.14663 Da, die den Summenformeln $C_{19}H_{23}NO_7$ (**1**) [$(M+Na)^+_{\text{theor.}} = 400.13667$; $\Delta m = 0.34$ ppm], $C_{19}H_{22}O_6$ (**2**) [$(M+Na)^+_{\text{theor.}} = 369.13085$; $\Delta m = 0.20$ ppm] und $C_{19}H_{24}O_6$ (**3**) [$(M+Na)^+_{\text{theor.}} = 371.14650$; $\Delta m = 0.32$ ppm] entsprechen. Aus den 1D- und 2D-NMR-Daten wurde das in Abbildung 1 gezeigte Motiv einer Partialstruktur bestimmt, das bei allen Verbindungen **1–3** vorkommt und bestätigt, dass sie der gleichen Verbindungsklasse angehören. Eine zweite Teilstruktur von **2** wurde als Michael-System identifiziert und

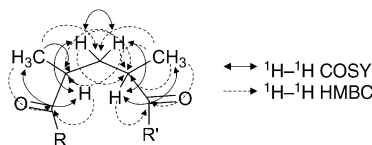


Abbildung 1. Charakteristisches Strukturmotiv der Abyssomicine **1–3**, das anhand von NMR-Daten bestimmt wurde.

[*] B. Bister, Dr. D. Bischoff, F. Wolter, Dr. R. D. Süßmuth
Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen (Deutschland)
Fax: (+49) 707-129-5560
E-mail: roderich.suessmuth@uni-tuebingen.de

Dr. M. Ströbele
Institut für Anorganische Chemie, Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen (Deutschland)

J. Riedlinger, A. Reicke, Prof. Dr. H.-P. Fiedler
Mikrobiologisches Institut, Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 28, 72076 Tübingen (Deutschland)

Prof. Dr. A. T. Bull
Research School of Biosciences, University of Kent
Canterbury CT2 7NJ (Großbritannien)

Prof. Dr. H. Zähner
Kistlerweg 7, 3006 Bern (Schweiz)

[**] Die Arbeiten von R.D.S. wurden durch ein Emmy-Noether-Stipendium für Nachwuchswissenschaftler der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) (SU 239/2-1) und der DFG-Forschergruppe (SU 239/1-1 und 1-2) gefördert. Wir danken Prof. H.-J. Meyer für die Unterstützung bei der Röntgenstrukturanalyse und Prof. M. E. Maier für hilfreiche Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

hatte eine *trans*-Doppelbindung ($J = 13.5$ Hz) in Konjugation mit einem Keton. Die Suche nach den durch FTICR-MS identifizierten Summenformeln von **1–3** in Verbindung mit der aus NMR-Experimenten bestimmten gemeinsamen Partialstruktur (Abbildung 1) in der DNP-^[3] und der CAS-Online-Datenbank^[4] ergab keine Übereinstimmung mit bekannten Verbindungen.

Weiterhin wurde die Struktur durch Auswertung der NMR-Spektren sowie durch Kristallisationsversuche bestimmt. Von allen drei Verbindungen **1–3** wurden Einkristalle erhalten, deren Röntgenstrukturanalyse zu den in Abbildung 2 dargestellten relativen Konfigurationen führte.

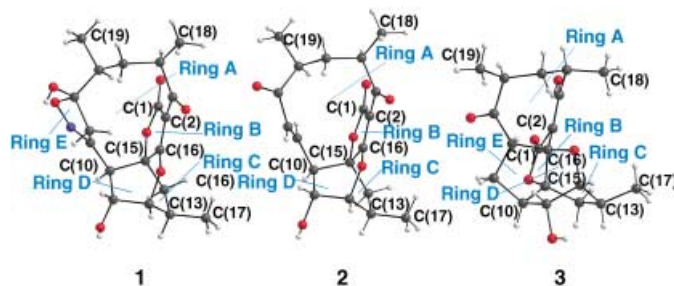


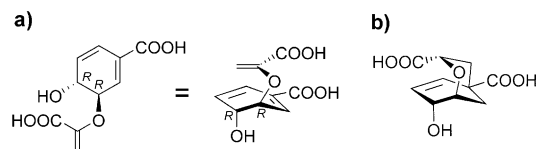
Abbildung 2. Strukturen der Abyssomicine B (**1**), C (**2**) und D (**3**) im Kristall in der relativen Konfiguration. Die Ringsysteme wurden alpha-betisch zugeordnet.

Die erhaltenen Strukturdaten wurden durch die Auswertung der NMR-Spektren von **2** (Tabelle 1) bestätigt. Stellvertretend für alle drei Verbindungen wurde die absolute Konfiguration von **3** mit der Mosher-^[5,6] und der Helmchen-Methode^[7,8] bestimmt. Beide Experimente wiesen überein-

stimmend auf eine *R*-Konfiguration am sekundären C(11) des D-Rings hin. Wegen der Struktur analogie wurde dieselbe Konfiguration für die Verbindungen **1** und **2** angenommen.

Die Naturstoffe **1–3** sind bisher unbekannt und wurden in Anlehnung an das natürliche Habitat Abyssomicin B, C (**1, 2**) und D (**3**) genannt (abyssos, griechisch = der Abgrund, die Tiefe). In Agardiffusionstests zeigte allerdings nur Abyssomicin C (**2**) antibiotische Aktivität gegen Gram-positive Bakterien, u. a. gegen pathogene *Staphylococcus aureus*-Stämme.^[2] Die minimalen Hemmkonzentrationen gegen einen methicillinresistenten Stamm von *S. aureus* (MRSA) und gegen einen multiresistenten, u. a. vancomycinresistenten *S. aureus*-Stamm wurden zu $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ bzw. $13 \mu\text{g mL}^{-1}$ bestimmt.^[2] In Anbetracht der geringen Molekülmasse weisen die Abyssomicine ungewöhnlich viele Ringe (vier im Fall von **2** und fünf bei **1** und **3**), quartäre Kohlenstoffatome und Stereozentren auf. Das Tetroneäuremotiv der B-Ringe lässt auf eine Verwandtschaft zu Antibiotika des Tetrocarcin-Typs schließen.^[9] Weitere strukturelle Charakteristika aller drei Verbindungen sind die zwei Methylgruppen (C(18), C(19)) der jeweiligen A-Ringe und das Oxabicyclooctansystem (Ringe C und D).

In den Strukturen sehen wir noch weitere interessante Details, die auf einen möglichen Wirkmechanismus hindeuten und den Abyssomicinen eine besondere Bedeutung zukommen lassen. Eine genauere Betrachtung der Konformation des Oxabicyclooctansystems (C/D-Ringe) von **1–3**, die aus den Röntgenstrukturen abgeleitet wurde, ähnelt einer Lösungskonformation von Chorismat^[10,11] sowie synthetischen Analoga von Chorismatmutaseinhibitoren (Schema 2).^[12,13] Darüber hinaus kann man in dem Michael-



Schema 2. a) Diaxiale Konformation von Chorismat in wässriger Lösung.^[10] b) Synthetisches Übergangszustandsanalogon zur Inhibition der Chorismatmutase.^[13]

System (C(7)–C(9)) von Abyssomicin C (**2**), das dem Oxabicyclooctansystem benachbart ist und bei den unwirksamen Abyssomicinen B (**1**) und D (**3**) nicht vorkommt, eine wichtige Grundbedingung für die Aktivität erkennen. Wir nehmen an, dass bei der Biosynthese der Abyssomicine die D-Variante durch Michael-Addition eines Hydridäquivalents (vermutlich NADH als Donor) an Abyssomicin C als Nebenprodukt entsteht. Ähnlich könnte Abyssomicin B durch eine Michael-Addition von Hydroxylamin (unbekannten Ursprungs) gefolgt von einer Oxidation entstehen. Daher schlagen wir vor, dass das Michael-System direkt am Wirkmechanismus von Abyssomicin C beteiligt ist. Es geht vermutlich mit nucleophilen Aminosäureseitenketten des inhibierten Enzyms irreversibel eine kovalente Bindung ein und hemmt so weitere Biosyntheseschritte von Chorismat zu *p*ABA. Demnach wäre Abyssomicin C ein Substratmimetikum, das mit einem Michael-System das Enzym einfängt.

Tabelle 1: ¹H- und ¹³C-NMR-Verschiebungen von Abyssomicin C.^[a]

Nr.	$\delta(^1\text{H})$ [ppm]	Multiplizität und Kopplungskonstanten [Hz]	$\delta(^{13}\text{C})$ [ppm]
1	–	–	173.8
2	–	–	106.7
3	–	–	202.8
4	–	–	45.3
5	2.01 (a) 1.44 (b)	m, $^2J_{5a,5b} = 14.1$; $^3J_{5a,4} = 11.2$; $^3J_{5a,6} = 10.1$ m, $^2J_{5b,5a} = 14.1$; $^3J_{5b,4} = 2.7$; $^3J_{5b,6} = 1.6$	42.3
6	–	–	50.3
7	–	–	208.4
8	6.55	d, $^3J_{8,9} = 13.5$	137.1
9	5.98	dd, $^3J_{9,8} = 13.5$; $^3J_{9,10} = 9.5$	137.3
10	2.99	dd, $^3J_{10,9} = 9.5$; $^3J_{10,11} = 6.1$	51.5
11	5.06	dd, $^3J_{11,10} = 6.1$; $^3J_{11,12} = 3.3$	76.0
12	4.59 (OH)	–	–
12	4.57	d, $^3J_{12,11} = 3.3$; $^3J_{12,13} = \text{n.b.}^{[b]}$	88.9
13	2.73	n.b. ^[b]	28.1
14	1.26 (a) 2.69 (b)	dd, $^2J_{14a,14b} = 12.4$; $^3J_{14a,13} = 4.8$ dd, $^2J_{14b,14a} = 12.4$; $^3J_{14b,13} = \text{n.b.}^{[b]}$	39.6
15	–	–	81.1
16	–	–	189.8
17	1.17	d, $^3J_{17,13} = 7.0$	21.5
18	1.09	d, $^3J_{18,4} = 6.7$	19.3
19	1.11	d, $^3J_{19,6} = 7.2$	23.0

[a] $c = 20.5 \text{ mg mL}^{-1}$, [D₄]Methanol, 298 K. [b] n.b. = nicht bestimmt.

Wegen der Ähnlichkeit zu Antibiotika des Tetrocarcin-Typs^[14] nehmen wir an, dass die Biosynthese über den Polyketidweg verläuft. Weitere Untersuchungen zu der Biosynthese von Abyssomicin, der Bestimmung der inhibierten Enzyme und des genauen Wirkmechanismus werden derzeit durchgeführt.

Experimentelles

Die LC-MS-Experimente wurden mit einem Esquire-3000plus-Massenspektrometer (Bruker-Daltonics, Bremen) durchgeführt, das mit einer AHP-1100-HPLC-Anlage (Agilent, Waldbronn) gekoppelt wurde. Die FTICR-ESI-Massenspektren wurden mit einem APEX-II-ESI-FTICR-Massenspektrometer (4.7 T, Bruker-Daltonics, Bremen) gemessen. Die NMR-Experimente wurden auf einem AMX-600-NMR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) mit einem 5-mm-Z-GRAD-Tripelresonanz-Probenkopf durchgeführt. Die Einkristalldaten der Röntgenstrukturanalyse wurden auf einem STOE-IPDS-1-System mit monochromatischer MoK α -Strahlung gesammelt. CCDC 226556–226558 (**1–3**) enthalten die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos über 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). Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wurden je Mosher^[5,6] und Helmchen-Methode^[7,8] 10 mg Abyssomicin D verwendet. Weitere Daten sind den Hintergrundinformationen zu entnehmen.

Eingegangen am 27. Oktober 2003,
veränderte Fassung am 12. Januar 2004 [Z53160]
Online veröffentlicht am 26. April 2004

Stichwörter: Antibiotika · Metabolismus · Michael-Additionen · Naturstoffe

- [1] A. Bermingham, J. P. Derrick, *BioEssays* **2002**, 24, 637–648.
- [2] Eine detaillierte Beschreibung des Testsystems: J. Riedlinger, A. Reicke, H. Zähner, B. Krismer, A. T. Bull, L. A. Maldonado, A. C. Ward, M. Goodfellow, B. Bister, D. Bischoff, R. D. Süßmuth, H.-P. Fiedler, *J. Antibiot.* **2004**, im Druck.
- [3] *Dictionary of Natural Products on CD-ROM*, Version 11.2, Chapman & Hall, London, **2003**.
- [4] *SciFinder Scholar*, Version 2002.1, American Chemical Society.
- [5] S. Braun, H.-O. Kalinowski, S. Berger in *150 and More Basic NMR Experiments*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 266–268.
- [6] J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 512–519.
- [7] G. Helmchen, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 1527–1530.
- [8] *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)*, Vol. E21a (Hrsg.: G. Helmchen), Georg Thieme, Stuttgart, **1995**, S. 253–265.
- [9] a) F. Tomita, T. Tamaoki, K. Shirahata, M. Kasai, M. Morimoto, S. Ohkubo, K. Mineura, S. Ishii, *J. Antibiot.* **1980**, 33, 668–670;
b) N. Hirayama, M. Kasai, K. Shirahata, Y. Ohashi, Y. Sasada, *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 2559–2560.
- [10] S. D. Copley, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 5009–5013.
- [11] S. G. Sogo, T. S. Widlanski, J. H. Hoare, C. E. Grinshaw, G. A. Berchtold, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 2701–2703.
- [12] P. A. Bartlett, Y. Nakagawa, C. R. Johnson, S. H. Reich, A. Luis, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 3195–3210.
- [13] M. C. Kozlowski, N. J. Tom, C. T. Seto, A. M. Sefler, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2128–2140.
- [14] T. Tamaoki, F. Tomita, *J. Antibiot.* **1983**, 36, 595–598.
- [15] H. P. Fiedler, *Nat. Prod. Lett.* **1993**, 2, 119–128.