

**Biosynthesen**

**Komplexe Biosynthese in Myxobakterien:  
Bildung der Leupyrrine in *Sorangium  
cellulosum*\*\***

*Helge Björn Bode, Silke C. Wenzel, Herbert Irschik,  
Gerhard Höfle und Rolf Müller\**

*Professor Axel Zeeck  
zum 65. Geburtstag gewidmet*

Die Gram-negativen Myxobakterien sind eine reiche Quelle strukturell neuartiger Sekundärmetabolite mit bemerkenswerten biologischen Aktivitäten.<sup>[1]</sup> Naturstoffe aus Myxobak-

[\*] Dr. H. B. Bode,<sup>+</sup> Dipl.-Chem. S. C. Wenzel, Prof. Dr. R. Müller<sup>+</sup>  
Abteilung Molekularbiologie der Myxobakterien  
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung  
Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig (Deutschland)  
Fax: (+49) 681-302-5473  
E-mail: rom@mx.uni-saarland.de

Dr. H. Irschik  
Abteilung Naturstoffbiologie  
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung  
Braunschweig (Deutschland)  
Prof. Dr. G. Höfle  
Abteilung Naturstoffchemie  
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung  
Braunschweig (Deutschland)

[†] Aktuelle Adresse:  
Pharmazeutische Biotechnologie  
Universität des Saarlandes  
Gebäude 8.1, Postfach 151150, 66123 Saarbrücken (Deutschland)

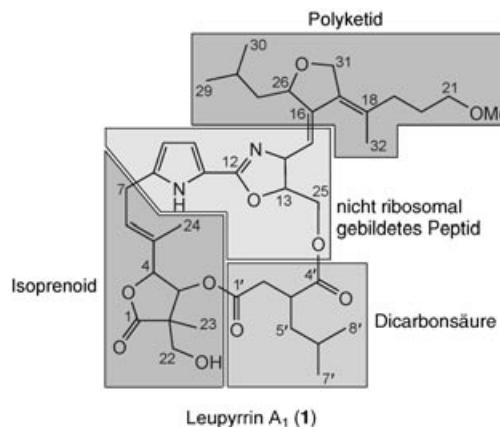
[\*\*] Die Autoren danken Dr. V. Wray und Mitarbeitern der Abteilung Strukturaufklärung der CBF für die Aufnahme der NMR-Spektren sowie Prof. H. G. Floss (University of Washington), Prof. T. Mahmud (Oregon State University) und Priv.-Doz. Dr. M. Müller (Forschungszentrum Jülich) für wertvolle Diskussionen. H.B.B. wurde von der DFG mit einem Forschungsstipendium (Bo 1834/1-1) unterstützt. S.C.W. und R.M. danken dem Fonds der Chemischen Industrie (FCI) für ein Kekulé-Stipendium, G.H. dankt dem FCI für finanzielle Unterstützung.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (alle gefundenen Isotopomere der einzelnen Fütterungsexperimente sowie die Ergebnisse weiterer Fütterungen) sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

terien weisen oft ungewöhnliche Biosynthesemechanismen auf, z.B. solche mit Beteiligung sonst selten vorkommender Zimtsäure- oder Methoxymalonat-Bausteine.<sup>[2,3]</sup> Bei diesen Substanzen handelt es sich häufig um Hybridspezies aus Carbonsäuren und Aminosäuren, deren Zahl gut mit der großen Zahl an gemischten Biosynthesegenclustern aus Polyketidsynthetasen (PKS) und nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) korreliert, die im Genom von Myxobakterien gefunden werden.<sup>[4]</sup> Eine weitere Besonderheit des myxobakteriellen Sekundärmetabolismus ist der geringe Anteil an post-PKS- oder post-NRPS-Modifikationen (z.B. Methylierungen, Oxidationen/Reduktionen, Glycosylierungen), die in anderen Sekundärstoffproduzenten wie den Aktinomyceten relativ häufig vorkommen. In Myxobakterien werden viele derartige Modifikationen von spezialisierten Domänen der PKS- oder NRPS-Proteine katalysiert.<sup>[5–7]</sup> Gene aus dem myxobakteriellen Sekundärstoffwechsel sind aus diesem Grund eine wichtige Ergänzung in der kombinatorischen Biochemie,<sup>[8]</sup> da sie den Zugang zu Strukturelementen ermöglichen, die aus anderen Quellen oft nicht erhältlich sind.

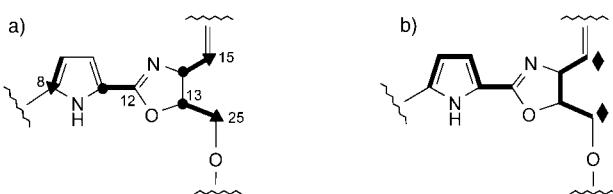
Wir haben uns für die Biosynthese der kürzlich beschriebenen Naturstoff-Familie der Leupyrrine (Abbildung 1) in-



**Abbildung 1.** Struktur und biosynthetischer Ursprung von Leupyrrin A<sub>1</sub> (1).

teressiert. Diese enthalten ungewöhnlich substituierte  $\gamma$ -Butyrolacton-, Pyrrol- und Dehydrofuranringe, deren Bildung nicht durch PKS- oder NRPS-Mechanismen erklärt werden kann.<sup>[9]</sup> Aus diesem Grund haben wir Fütterungsversuche mit möglichen Vorstufen des Leupyrrins durchgeführt (in einfacher und mehrfach <sup>13</sup>C-markierter Form) und den Einbau dieser Substanzen in Leupyrrin A<sub>1</sub> (1), der Hauptkomponente der Leupyrrine aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* So ce690, untersucht. Wegen der Komplexität der beobachteten Einbaumuster werden wir unsere Ergebnisse und die daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen für den Biosynthesemechanismus von **1** für einzelne Strukturelemente vorstellen, die jeweils biosynthetische Einheiten bilden.

**Nichtribosome Peptidbiosynthese:** Die Biosynthese von **1** beginnt sehr wahrscheinlich mit der Bildung einer Pyrrolcarbonsäure (C8–C12) aus Prolin.<sup>[10]</sup> Der Einbau von zwei intakten Acetateinheiten (C8–C9 und C11–C12, Abbildung 2a<sup>[11]</sup>) und einem C<sub>5</sub>-Fragment nach der Fütterung mit



**Abbildung 2.** Markierungsmuster des Peptidteils von Leupyrrin A<sub>1</sub> (1). a) Markierung mit [1-<sup>13</sup>C]Acetat ( $\Delta$ ), [2-<sup>13</sup>C]Acetat ( $\bullet$ ) und [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Acetat (fette Linien); b) Markierung mit [1-<sup>13</sup>C]Propionat ( $\blacklozenge$ ) und mit [<sup>13</sup>C]Proteinextrakt (fette Linien). Weitere Isotopomere sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.

einheitlich <sup>13</sup>C-markierter Proteinmischung bestätigt diese Hypothese (Abbildung 2b). Der beobachtete Einbau entspricht dem erwarteten Markierungsmuster der klassischen Prolin-Biosynthese aus  $\alpha$ -Ketoglutarat und Glutamat.<sup>[12]</sup> Der überraschende Einbau von [2-<sup>13</sup>C]Acetat in C8 und C12 (Tabelle 1) ist das Resultat eines sehr aktiven Intermediärstoffwechsels.<sup>[13]</sup>

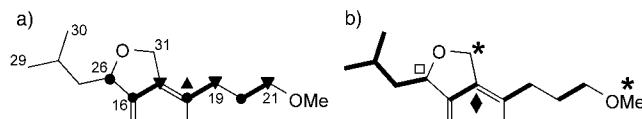
Der nächste Schritt in der Biosynthese ist die NRPS-katalysierte Kondensation (eine aktuelle Übersicht zu NRPS: Lit. [14]) der an ein Acylcarrierprotein gebundenen Pyrrolcarbonsäure mit Hydroxythreonin oder mit Threonin, das später zu Hydroxythreonin oxidiert wird (C13–C15, C25). Der bidirektionale Einbau zweier Acetateinheiten (Abbildung 2a), der Einbau eines C<sub>4</sub>- und zweier C<sub>2</sub>-Fragmente nach Fütterung der markierten Proteinmischung (Abbildung 2b) und der Einbau von [1,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Succinat in C15 und C25 (siehe Hintergrundinformationen) bestätigt die klassische Threonin-Biosynthese mit Oxalacetat und Aspartat als zentralen Intermediaten.<sup>[12]</sup> Die Bildung des Oxazolinrings wird schließlich durch eine NRPS-Heterocyclisierungsdomäne katalysiert.<sup>[15]</sup> Die deutliche Anreicherung von C15 und C25 nach Fütterung von [1-<sup>13</sup>C]Propionat (Abbildung 2b) belegt außerdem Methylmalonyl-CoA/Succinyl-CoA-Mutase-Aktivität, wie sie auch für verschiedene Streptomyces beschrieben wurde.<sup>[16]</sup>

**Polyketidbiosynthese:** Der nächste Schritt in der Biosynthese von **1** ist die Kettenverlängerung des Threonicarboxylats (C15) mit einer ungewöhnlichen Verlängerungseinheit (C16, C17, C26–C30; Abbildungen 3 und 4), die durch [2-<sup>13</sup>C]Leucin und die Proteinmischung an C26 bzw. C26–C30 markiert wird (Abbildung 3).<sup>[17]</sup> Dies deutet auf die Biosynthese der Verlängerungseinheit aus Isovaleryl-CoA (**6**) mit einer C<sub>2</sub>-Verlängerungseinheit hin (siehe Abbildung 4). Isovaleryl-CoA selbst stammt aus dem Abbau von Leucin, wobei der verzweigtkettige Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex (BKD, branched-chain keto acid dehydrogenase complex) das Schlüsselenzym ist. BKD ist ein Multienzymkomplex, der essenziell für den Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin ist, wie es bereits bei Myxobakterien und anderen Organismen nachgewiesen wurde.<sup>[12,18,19]</sup> Das Markierungsmuster von C16 und C17 in **1** nach Fütterung von Acetat bzw. Malonat deutet auf die Kondensation von Isovaleryl-CoA (**6**) mit Malonyl-CoA (**10**) (oder mit Acetyl-CoA (**9**) mit anschließender Carboxylierung zur Aktivierung der Verlängerungseinheit) hin. Das so gebildete Intermediat **7** wird weiter zur Verlängerungseinheit **8**

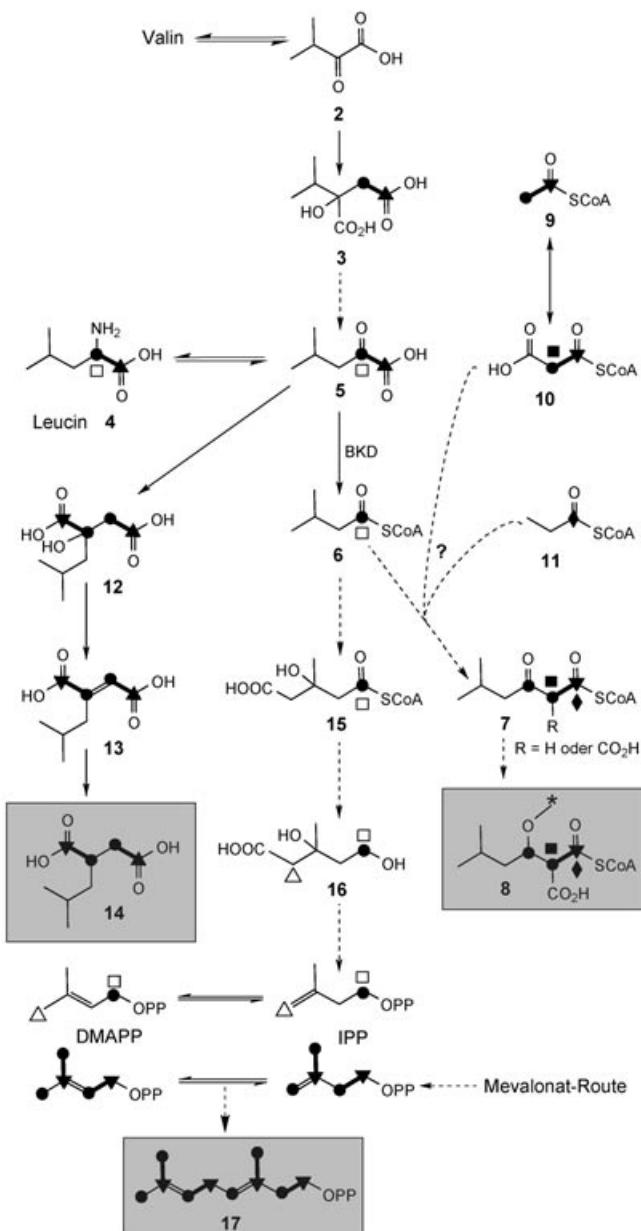
**Tabelle 1:**  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung und Kopplungskonstanten in Leupyrrin A<sub>1</sub> (1) nach Fütterung von [ $1-^{13}\text{C}$ ]Acetat (A), [ $2-^{13}\text{C}$ ]Acetat (B), [ $2-^{13}\text{C}$ ]Malonat (C), [ $1,2-^{13}\text{C}_2$ ]Acetat (D) und der [ $\text{U}-^{13}\text{C}$ ]Proteinmischung (E).

Atom	$\delta$ [ppm]	A	B	C	D	E <sup>[a]</sup>
		$^{13}\text{C}$ -Anreicherung <sup>[b]</sup>			$J_{\text{c-c}}$ [Hz]	
C1	179.3	— <sup>[c]</sup>	6.3	8.7	6	6; 6/50
C2	51.1	1.7	1.8	5.5	33	33; 33/39/50; 33/39/40/50
C3	75.4	2.4	1.7	1.6	6	6; 6/39
C4	85.5	1.2	2.6	1.8	—	50
C5	135.1	2.3	1.9	4.1	43	43; 43/75; 43/50/75
C6	128.4	1.2	2.4	1.7	43	43; 43/75
C7	26.9	1.6	1.0	1.0	43	43
C8	136.5	3.1	2.5	4.9	65	65
C9	109.6	1.2	2.0	1.3	65	65; 50/65
C10	115.2	1.2	1.7	1.0	50	50/69
C11	119.3	—	7.5	7.4	88	88; 69/88
C12	160.6	—	4.2	—	88	88
C13	84.5	1.2	1.8	1.0	42	42; 33/42
C14	68.8	1.2	1.9	1.0	47	47; 33/47
C15	123.0	2.0	1.4	1.2	47	47; 33/47
C16	144.9	1.4	7.0	12.5	56	56
C17	131.2	2.8	2.5	5.3	56	56
C18	134.0	2.7	5.7	11.1	42	42
C19	34.9	3.4	1.0	1.4	42	42
C20	28.3	1.2	3.1	4.0	39	39
C21	72.8	3.1	1.3	1.9	39	39
C22	65.7	1.5	2.8	1.6	—	40
C23	14.6	1.1	2.9	1.8	33	33
C24	11.4	1.1	5.0	3.4	43	43
C25	65.9	2.3	1.6	1.5	42	42
C26	80.5	1.3	2.4	1.5	—	36
C27	44.3	1.3	1.2	1.6	—	34; 36/34
C28	26.1	1.3	1.2	1.7	—	34/34/34
C29	24.1	1.0	1.3	2.0	—	34
C30	22.0	1.1	1.7	2.4	—	34
C31	70.1	1.1	1.0	1.5	—	—
C32	20.2	1.1	1.7	3.2	—	—
C1'	172.1	3.4	2.4	5.3	58	58
C2'	36.4	1.3	3.1	3.8	58	58
C3'	39.8	1.2	2.3	1.5	58	58
C4'	175.4	3.1	3.2	7.4	58	58
C5'	40.1	1.3	1.4	1.7	—	35; 35/35
C6'	26.9 <sup>[d]</sup>	—	—	—	—	35/35/35
C7'	22.9	1.1	1.3	2.0	—	35
C8'	22.7	1.0	1.3	2.1	—	35
OCH <sub>3</sub>	58.8	1.2	1.7	5.2	—	—

[a] Kopplungskonstanten der einzelnen Isotopomere sind durch Semikola getrennt. [b] In Relation zur natürlichen Häufigkeit: 1.0 = keine Anreicherung. [c] —= nicht detektiert. [d]  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen konnten aufgrund der Überlappung von C7 und C6' nicht detektiert werden, sie sind aber vermutlich ähnlich zu der von C28.



**Abbildung 3:** Markierungsmuster des Polyketidteils von Leupyrrin A<sub>1</sub>. Zur Erklärung der Symbole siehe Abbildung 2; zusätzliche Markierungen mit [ $\text{methyl-}^{13}\text{C}$ ]Methionin (\*) und [ $2-^{13}\text{C}$ ]Leucin (□). Weitere Isotopomere sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.



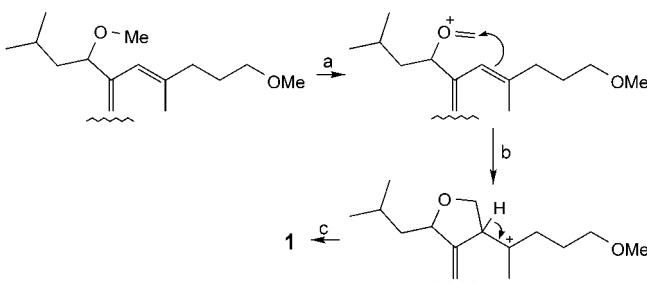
**Abbildung 4:** Postulierte Biosynthese der ungewöhnlichen Verlängerungseinheit 8 und der Dicarbonsäure 14. Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) sind gezeigt wie in Leupyrrin A<sub>1</sub> (1) gefunden. Zur Vereinfachung sind nicht alle Isotopomere abgebildet. Zur Erklärung der Symbole siehe Abbildungen 2 und 3; Markierung mit [ $2-^{13}\text{C}$ ]Malonat (■) und [ $2-^{13}\text{C}$ ]Mevalonolacton (△). Grau hinterlegte Verbindungen sind mögliche direkte Bausteine von 1. Gestrichelte Pfeile deuten auf mehrstufige Reaktionen hin.

umgesetzt, deren Biosynthese weiter unten besprochen wird. Im Unterschied zu anderen Malonyl-CoA/Acetyl-CoA-Verlängerungseinheiten in 1 wurde C17 auch schwach durch [ $1-^{13}\text{C}$ ]Propionat markiert, was auf eine noch komplexere Biosynthese der Verlängerungseinheit 7 hindeutet. Eine Verlängerung von C17 mit zwei Malonyl-CoA-Einheiten, C-Methylierung durch S-Adenosylmethionin (SAM), reduktive Kettenabspaltung wie in der Myxochelin- und der Myxalamid-Biosynthese<sup>[6,20]</sup> und O-Methylierung der so erzeugten Alko-

holfunktion resultieren schließlich im PKS/NRPS-Fragment von **1** (Abbildung 3). Die Isolierung von Leupyrrinen mit einer C19-C20-Doppelbindung deutet darauf hin, dass eine zusätzliche Enoylreduktase die ungesättigte Verbindung reduziert. Alternativ kann eine Oxidase postuliert werden, die die umgekehrte Reaktion katalysiert. In beiden Fällen arbeiten die Enzyme entweder unspezifisch oder nicht sehr effizient, sodass es zu einer Mischung der an C19-C20 reduzierten und nichtreduzierten Leupyrrine kommt.<sup>[9]</sup>

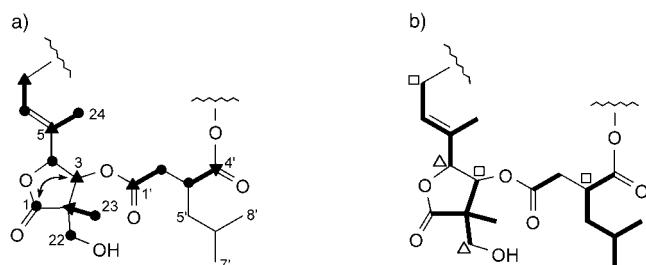
Der unerwartete Einbau von  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ Acetat in C18 kann mit diesem Mechanismus jedoch nicht erklärt werden und ist ein Indiz für zusätzliche Unterschiede in der Biosynthese der C<sub>2</sub>-Verlängerungseinheiten C18-C19 und C20-C21.

**Methylierung und Bildung des Furanringes:** C-Methylierungen werden normalerweise an  $\alpha$ -Positionen des neu entstandenen Carboxylesters beobachtet (hier C18), während Methylierungen von  $\beta$ -Positionen (hier C17) in der Regel analog zur Kondensation von Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA in der Biosynthese von Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) gebildet werden.<sup>[12]</sup> Folglich findet man Gene, die für HMG-CoA-Synthase-Proteine kodieren, auch in den Genclustern einiger Sekundärmetabolite (z. B. Mupirocin aus *Pseudomonas fluorescens*).<sup>[21]</sup> Das Vorliegen zweier benachbarter Methylgruppen, die beide SAM-abhängig gebildet werden, deutet somit auf einen neuartigen Biosynthesemechanismus hin. Deutliche Unterschiede in den Anreicherungen der Methoxygruppe (88fach), von C32 (55fach) und C31 (36fach) nach Fütterung von [*methyl*- $^{13}\text{C}$ ]Methionin stützen diese Hypothese. Unser aktuelles Modell zur Erklärung sowohl des ungewöhnlichen Methylierungsmusters als auch der Bildung des Furanringes ist die Verlängerung des intermediären Carboxylats C15 mit der Verlängerungseinheit **8**, die durch Reduktion und O-Methylierung aus **7** entsteht (Abbildung 4). Nach oder während der Biosynthese des finalen PKS/NRPS-Fragments (siehe oben) wird schließlich der Furanring in Analogie zur Bildung der Methylenbrücke bei der Berberin-Biosynthese in Pflanzen gebildet (Abbildung 5).<sup>[22,23]</sup> Der schwächere Einbau von [*methyl*- $^{13}\text{C}$ ]Methionin in C31 im Vergleich zu C32 und der Methoxygruppe resultiert vermutlich aus einem Verdünnen der Markierung, die durch die Biosynthese von **8** vor der Zugabe des markierten Methionins beruht. Derzeit werden  $^{13}\text{C}$ - und  $^{18}\text{O}$ -markierte mögliche Verlängerungseinheiten synthetisiert, die nach entsprechenden Fütterungsexperimenten zur Aufklärung des Mechanismus führen sollen.



**Abbildung 5.** Postulierte Biosynthese des Furanrings in Leupyrrin A<sub>1</sub> (**1**). a) Oxidation der Methylgruppe, b) Cyclisierung, c) Deprotonierung. Die ersten beiden Reaktionen werden vermutlich ähnlich wie bei der Berberin-Biosynthese durch ein einziges Enzym katalysiert.<sup>[22,23]</sup>

**Isoprenoid- und Dicarbonsäurebiosynthese:** Das C1-C7/C22-C24-Strukturelement wurde komplett durch Acetat markiert (Abbildung 6a). Aufgrund der Position der aus Acetat stammenden Methylverzweigungen wurde eine Be-

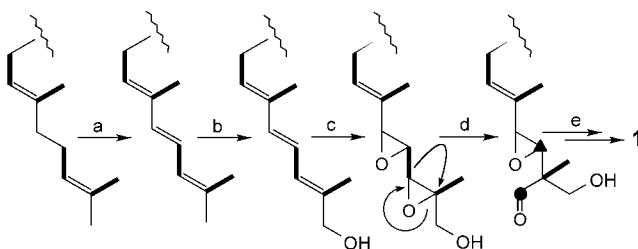


**Abbildung 6.** Markierungsmuster der Dicarbonsäure und des Isoprenoidteils von Leupyrrin A<sub>1</sub> (**1**). Zur Erklärung der Symbole siehe Abbildungen 2, 3 und 4. Die beobachtete  $^2J$ -Kopplung zwischen C1 und C3 ist durch einen Pfeil angegedeutet.

teiligung der Mevalonat-abhängigen Isoprenoidbiosynthese vermutet, was durch die zehnfache Anreicherung von C4 und C22 nach Fütterung von  $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Mevalonolacton bestätigt werden konnte (Abbildung 6b). Nach Fütterung von  $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Leucin wurde eine Anreicherung von C3 (18fach) und C7 (6fach) beobachtet, die durch zwei intakte C<sub>5</sub>-Isotopomere nach Fütterung der [ $U\text{-}^{13}\text{C}$ ]Proteinmischung bestätigt wurde (Abbildung 6b). Dieser unerwartete Einbau kann durch den Abbau von Leucin zu Isovaleryl-CoA (**6**) und schließlich zu HMG-CoA (**15**) erklärt werden. HMG-CoA ist das zentrale, normalerweise aus Acetyl-CoA gebildete Intermediat der Mevalonat-abhängigen Isoprenoidbiosynthese (Abbildung 4).<sup>[12,24]</sup> Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich für die Biosynthese des Steroids Cycloartenol aus dem Myxobakterium *Stigmatella aurantiaca* beschrieben.<sup>[25]</sup> Für eine vorherrschende Biosynthese von Mevalonat und Isoprenoiden aus Leucin, wie sie auch in dem Parasiten *Leishmania mexicana* gefunden wurde,<sup>[26]</sup> spricht auch die saprophytische Lebensweise der Myxobakterien, durch die große Mengen an Aminosäuren aus der Spaltung von biologischem Material zur Verfügung stehen.

Nach Fütterung von  $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ Leucin wurde auch eine Anreicherung von C3' in **1** beobachtet (Abbildung 6b). Zusammen mit Ergebnissen aus den anderen Fütterungsexperimenten deutet dies auf die Biosynthese der Dicarbonsäure **14** (C1'-C8') über eine Kondensation von aus Leucin stammendem 2-Ketoisocaproat (**5**) und Acetyl-CoA (**9**) hin (Abbildung 4), sodass **14** ein ähnliches Isotopenmuster aufweist wie die Verlängerungseinheit **8**.

Alle Daten zusammengenommen sprechen für die Prenyllierung des Pyrrolringes mit Geranylpyrophosphat **17** (Abbildung 4), das analog zur Carotenoidbiosynthese oxidiert wird. Im nächsten Schritt findet eine Cytochrom-P450-abhängige Hydroxylierung statt, wie sie auch für Geraniol selbst in der Biosynthese von Loganin und Secologanin in Pflanzen beschrieben wurde (Abbildung 7).<sup>[27]</sup> Epoxidierung der Doppelbindungen und eine zur Semipinakol-Umlagerung ähnliche Reaktion,<sup>[28]</sup> auf die anhand einer Kopplungskonstante von  $^2J = 6.0$  Hz zwischen C1 und C3 nach Fütterung von



**Abbildung 7.** Postulierte Biosynthese des Isoprenoideils (C1–C7/C22–C24) von Leupyrrin A<sub>1</sub> (**1**). Intakte Acetateinheiten der Mevalonat-abhängigen Isoprenoidebiosynthese sind fett markiert. Die gespaltene Acetateinheit ist gekennzeichnet (● und ▲). a) Desaturierung, b) Hydroxylierung, c) Epoxidierung, d) zur Semipinakol-Umlagerung ähnliche Reaktion, e) Oxidation des resultierenden Aldehyds und Öffnung des verbliebenen Epoxids durch das C1-Carboxylat.<sup>[29]</sup>

doppelt markiertem Acetat geschlossen werden kann, resultiert schließlich in der Bildung des Gerüstes des  $\gamma$ -Butyrolactonrings von **1** (Abbildung 7). Durch Öffnung des zweiten Epoxids durch das C1-Carboxylat (nach Oxidation des Aldehyds) entsteht dann schließlich der Butyrolactonring.<sup>[29]</sup>

Aus den hier vorgestellten Daten wird deutlich, dass Leupyrrin A<sub>1</sub> (**1**) in Bezug auf seine Biosynthese ein hochinteressanter Naturstoff ist. An der Biosynthese ist sowohl die Kondensation von Aminosäuren und Carbonsäuren als auch die Isoprenoidebiosynthese beteiligt, wobei alle Strukturelemente noch weiter modifiziert werden, um das Makrodiolid-Grundgerüst zu bilden. Des Weiteren haben die Fütterungsstudien ungewöhnliche Biosynthesen der Vorstufen aufgezeigt (z.B. Isoprenoidebiosynthese aus Leucin und über die Mevalonat-Route). Die beteiligten Mechanismen zu verstehen, ist die Voraussetzung für die Optimierung der Ausbeute dieser und anderer Sekundärmetabolite aus ähnlichen Vorstufen. Zu diesem Zweck arbeiten wir derzeit sowohl an der molekularbiologischen Analyse der Leupyrrinbiosynthese als auch an der Untersuchung der metabolischen Netzwerke in Myxobakterien.

## Experimentelles

Markierte Substanzen (160 mg [1-<sup>13</sup>C]Acetat, 160 mg [2-<sup>13</sup>C]Acetat, 200 mg [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Acetat, 120 mg [*methyl*-<sup>13</sup>C]Methionin, 185 mg [1-<sup>13</sup>C]Propionat (alle gelöst in 5 mL H<sub>2</sub>O und 99 % <sup>13</sup>C in den markierten Positionen), 600 mg [2-<sup>13</sup>C]Malonat, 200 mg [2-<sup>13</sup>C]Leucin, 100 mg D,L-[2-<sup>13</sup>C]Mevalonolacton, 500 mg [1,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Succinat, 500 mg [U-<sup>13</sup>C]Algal-Rohproteinextrakt (alle gelöst in 10 mL H<sub>2</sub>O und 99 % <sup>13</sup>C in den markierten Positionen) wurden von Campro Scientific oder Cambridge Isotopes bezogen. *Sorangium cellulosum* So ce690 und seine Kultivierung wurden bereits beschrieben.<sup>[9]</sup> Alle Fütterungsversuche wurden in 2-L-Erlenmeyer-Kolben mit 800 mL Produktionsmedium und 1 % XAD-16 durchgeführt, und markierte Vorstufen wurden in vier bis sieben Portionen zwischen der 103. und der 168. Fermentationsstunde zugegeben. Die Kulturen wurden nach 192 oder 240 Stunden geerntet, nachdem Glucose und Stärke verbraucht waren.

Die Isolierung und Aufreinigung von **1** wurde wie beschrieben durchgeführt:<sup>[9]</sup> Zellen und XAD-16 wurden mit MeOH extrahiert (4 × 200 mL). Nach Evaporation des MeOH wurde die verbleibende wässrige Phase mit wässrigem NH<sub>3</sub> auf pH 10 eingestellt und mit Diethylether extrahiert (4 × 100 mL). Die Etherphase wurde bis zur

Trockne eingedampft, der ölige Rückstand in 3 mL MeOH gelöst und mit *n*-Heptan extrahiert (4 × 4 mL). Eindampfen der erhaltenen MeOH-Phase ergab einen orangefarbenen Feststoff, der mit RP-HPLC getrennt wurde. Es wurden zwischen 6 und 10 mg L<sup>-1</sup> **1** erhalten.

NMR-Spektren wurden bei 300 K an einem Bruker-AMX400- oder einem Advance-DMX-600-NMR-Spektrometer mit CD<sub>3</sub>OD als Lösungsmittel und internem Standard aufgenommen. Für die Bestimmung der relativen <sup>13</sup>C-Anreicherung wurden entweder die Integrale oder die Höhen der Signale der angereicherten Proben mit denjenigen einer nichtangereicherten Probe verglichen.

Eingegangen am 11. März 2004 [Z54240]

**Stichwörter:** Antibiotika · Biosynthesen · Leupyrrine · Markierungsstudien · Myxobakterien

- [1] K. Gerth, S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 233.
- [2] H. B. Bode, R. Müller, *Plant Physiol.* **2003**, *132*, 1153.
- [3] J. Ligon, S. Hill, J. Beck, R. Zirkle, I. Molnar, J. Zawodny, S. Money, T. Schupp, *Gene* **2002**, *285*, 257.
- [4] B. Silakowski, B. Kunze, R. Müller, *Gene* **2001**, *275*, 233.
- [5] N. Gaitatzis, B. Silakowski, B. Kunze, G. Nordsiek, H. Blöcker, G. Höfle, R. Müller, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13082.
- [6] N. Gaitatzis, B. Kunze, R. Müller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11136.
- [7] S. Weinig, H. J. Hecht, T. Mahmud, R. Müller, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 939.
- [8] C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2001**, *2*, 1681.
- [9] H. B. Bode, H. Irschik, S. C. Wenzel, H. Reichenbach, R. Müller, G. Höfle, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1203.
- [10] M. G. Thomas, M. D. Burkart, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 171.
- [11] Wegen des sehr breiten und niedrigen <sup>13</sup>C-Signals von C12 kann keine Anreicherung nach Fütterung von [1-<sup>13</sup>C]Acetat beobachtet werden (siehe auch Tabelle 1 und Abbildung 2).
- [12] G. Michal, *Biochemical Pathways*, Spektrum, Heidelberg, **1999**.
- [13] Der Einbau von [2-<sup>13</sup>C]Acetat in C-Atome, die eigentlich nur durch [1-<sup>13</sup>C]Acetat markiert werden sollten, kann im ganzen Molekül beobachtet werden (C8, C12, C17, C1', C4'). Durch einen sehr aktiven Citronensäurezyklus wird [2-<sup>13</sup>C]Acetat effektiv zu [2-<sup>13</sup>C]Oxaloacetat umgewandelt, das dann zu [2-<sup>13</sup>C]Pyruvat decarboxyliert werden kann.<sup>[12]</sup> Pyruvat ist eine der besten Quellen für Acetyl-CoA und auch eine der besten C-Quellen für das Myxobakterium *Myxococcus xanthus*. Auf diese Weise kann [1-<sup>13</sup>C]Acetat in wenigen Schritten aus [2-<sup>13</sup>C]Acetat oder [2-<sup>13</sup>C]Malonat gebildet werden. Nach Fütterung von [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Succinat waren fast alle C-Atome markiert (siehe Hintergrundinformationen), was auf einen hochaktiven Intermediärmetabolismus hindeutet, der anhand der hier beschriebenen Daten jedoch nicht aufgeklärt werden kann. Zusätzliche Fütterungsversuche mit unmarkiertem Glyoxylat und markiertem Acetat resultierten in sehr schwachen Anreicherungen durch das markierte Acetat im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen und deuten zusätzlich auf einen aktiven Glyoxylatzzyklus hin (Daten nicht gezeigt).
- [14] D. Schwarzer, R. Finking, M. A. Marahiel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 275.
- [15] T. A. Keating, C. G. Marshall, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2000**, *39*, 15522.
- [16] W. Zhang, K. A. Reynolds, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 2071.
- [17] Ein zweites Isotopomer ergibt sich durch den Einbau von aus [U-<sup>13</sup>C]Valin stammendem 2-Ketoisovalerat (**2**) (der Biosyntheseverstufe von Leucin), das durch ein zusätzliches Dublett an

- C27 detektiert werden kann (Tabelle 1 und Hintergrundinformationen).
- [18] T. Mahmud, H. B. Bode, B. Silakowski, R. M. Kroppenstedt, M. Xu, S. Nordhoff, G. Höfle, R. Müller, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32768.
  - [19] Die De-novo-Biosynthese von Leucin wird durch den Einbau von [2-<sup>13</sup>C]Acetat in C26 bestätigt (Abbildung 3a), wie man für die Bildung von 3-Carboxy-3-hydroxy-isocaproat (**3**) und 2-Ketoisocaproat (**5**) aus **2** und Acetyl-CoA erwarten würde (Abbildung 4).<sup>[12]</sup>
  - [20] B. Silakowski, G. Nordsiek, B. Kunze, H. Blöcker, R. Müller, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 59.
  - [21] A. K. El-Sayed, J. Hothersall, S. M. Cooper, E. Stephens, T. J. Simpson, C. M. Thomas, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 419.
  - [22] T. M. Kutchan, H. Dittrich, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24475.
  - [23] J. A. Bjorklund, T. Frenzel, M. Rueffer, M. Kobayashi, U. Mocek, C. Fox, J. M. Beale, S. Groger, M. H. Zenk, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1533.
  - [24] Die vier- bis sechsfache Anreicherung von C2, C5, C1' und C4' nach Fütterung von [2-<sup>13</sup>C]Leucin deutet auf den Abbau von Leucin zu [1-<sup>13</sup>C]Acetat hin. [1-<sup>13</sup>C]Acetat entsteht aus der Spaltung von Acetoacetat, dem Folgeprodukt der HMG-CoA-Spaltung. In der Biosynthese von Mevalonat **16** und daraus abgeleiteten Isoprenoiden fungiert Acetoacetyl-CoA als direkte Vorstufe für HMG-CoA (**15**).<sup>[12]</sup> Als das Resultat dieses Biosynthese-Abbau-Netzwerkes findet man drei Isotopomere für C2 und C5 nach Fütterung der <sup>13</sup>C-markierten Proteinmischung, hervorgerufen durch Einbau von Acetyl-CoA, Acetoacetyl-CoA und HMG-CoA aus dem Leucinabbau (Tabelle 1 und Hintergrundinformationen).
  - [25] H. B. Bode, B. Zeggel, B. Silakowski, S. C. Wenzel, H. Reichenbach, R. Müller, *Mol. Microbiol.* **2003**, *47*, 471.
  - [26] M. L. Ginger, M. L. Chance, I. H. Sadler, L. J. Goad, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11674.
  - [27] G. Collu, N. Unver, A. M. Peltenburg-Looman, R. van der Heijden, R. Verpoorte, J. Memelink, *FEBS Lett.* **2001**, *508*, 215.
  - [28] M. B. Smith, J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5. Aufl., Wiley-Interscience, New York, **2001**.
  - [29] Alternativ könnte das Epoxid auch durch das C1'-Carboxylat geöffnet werden.