

Pilzinhaltsstoffe, 25¹⁾

Biosynthese der Seco-anthrachinone Geodin und Dihydrogeodin aus Emodin

Haruhiro Fujimoto²⁾, Hubert Flasch und Burchard Franck*

Organisch-Chemisches Institut der Universität Münster, D-4400 Münster, Orléans-Ring 23

Eingegangen am 4. Oktober 1974

Verfüttern von biosynthetisch gewonnenem [$u\text{-}^{14}\text{C}$]Emodin ([$u\text{-}^{14}\text{C}$]-**2**) an Oberflächenkulturen von *Aspergillus terreus* ergab mit signifikanten Einbauwerten radioaktives Geodin (**5**) und Dihydrogeodin (**3c**). Hierdurch ist bewiesen, daß es sich bei diesen beiden chlorhaltigen Pilzinhaltsstoffen um Seco-anthrachinone handelt, die ähnlich wie die Ergochrome durch oxidative Ringöffnung aus Emodin (**2**) hervorgehen.

Natural Products from Fungi, 25¹⁾

Biosynthesis of the Seco-anthraquinones Geodin and Dihydrogeodin from Emodin

Feeding of biosynthetically prepared [$u\text{-}^{14}\text{C}$]emodin ([$u\text{-}^{14}\text{C}$]-**2**) to surface cultures of *Aspergillus terreus* yielded radioactive geodin (**5**) and dihydrogeodin (**3c**) with significant incorporation rates. Thus it is proven that these two chlorine containing fungus metabolites are seco-anthraquinones formed similarly as the ergochromes from emodin by oxidative ring cleavage.

Emodin (**2**) ist die gemeinsame Biosynthesevorstufe zahlreicher, biologisch aktiver Pilzinhaltsstoffe. Nach Inkorporationsversuchen mit isotoopenmarkierten Vorstufen werden aus **2** außer monomeren und kondensierten Anthrachinonen^{3,4)} auch Naturstoffe mit Xanthon- und Benzophenon-Strukturen, wie die Ergochrome (z. B. **4**)^{1,5,6)} und das Sulochrin (**3b**)⁷⁾, gebildet. Bei den letzteren handelt es sich um „Seco-anthrachinone“⁴⁾, die sich durch oxidative Ringöffnung vom Emodin (**2**) ableiten, eine Reaktion, die nach ihrem ersten Nachweis *in vivo*^{5,6)} auch *in vitro* an Modellverbindungen⁸⁾ durchgeführt werden konnte. Zwei weitere Pilzinhaltsstoffe, deren Strukturen einen viel diskutierten biogenetischen Zusammenhang mit Emodin nahelegen^{9,10)}, sind das chlorhaltige Antibiotikum

¹⁾ 24. Mitteil.: B. Franck und H. Flasch, Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe **30**, 151 (1973).

²⁾ Stipendiat der Alexander-von-Humboldt-Stiftung 1973/74.

³⁾ U. Sankawa, Y. Ebizuka und S. Shibata, Tetrahedron Lett. **1973**, 2125.

⁴⁾ W. Steglich, R. Arnold, W. Lösel und W. Reiningger, J. C. S. Chem. Commun. **1972**, 102.

⁵⁾ B. Franck, F. Hüper, D. Gröger und D. Erge, Angew. Chem. **78**, 752 (1966); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **5**, 728 (1966); Chem. Ber. **101**, 1954 (1968).

⁶⁾ D. Gröger, D. Erge, B. Franck, U. Ohnsorge, H. Flasch und F. Hüper, Chem. Ber. **101**, 1970 (1968).

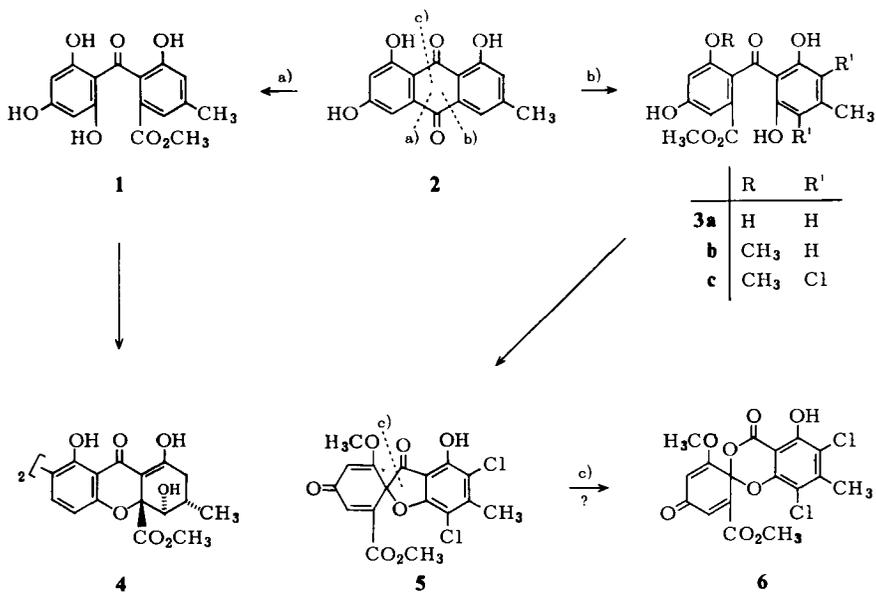
⁷⁾ S. Gatenbeck und L. Malmström, Acta Chem. Scand. **23**, 3493 (1969).

⁸⁾ B. Franck, V. Radtke und U. Zeidler, Angew. Chem. **79**, 935 (1967); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **6**, 1075 (1967).

⁹⁾ W. B. Whalley in P. Bernfeld, Biogenesis of Natural Compounds, S. 1028, Pergamon, Oxford (1967).

¹⁰⁾ A. Rhodes, M. P. McGonagle und G. A. Somerfield, Chem. Ind. (London) **1962**, 611.

Geodin (**5**)¹¹⁾ und Dihydrogeodin (**3c**)¹²⁾ aus *Aspergillus terreus*. Nachstehend teilen wir Biosyntheseversuche mit, die nun beweisen, daß auch **5** und **3c** Seco-anthrachinone sind, die *in vivo* aus Emodin (**2**) hervorgehen.



Schema 1. Bewiesene und mögliche Biosynthese von Seco-anthraquinonen aus Emodin (**2**)

Bisher ist eine oxidative Spaltung von **2** im Stoffwechsel von Mikroorganismen an zwei Ringbindungen erwiesen (Schema 1). Für die Ergochrom-Biosynthese (z. B. von **4**)¹¹⁾ muß einleitend Oxygenolyse bei a)¹³⁾ angenommen werden, die zum Benzophenon **1** führt, das nach Umhydroxylierung, intramolekularer Phenoloxidation^{14, 15)} und Reduktion **4** ergibt. Oxygenolyse bei b) zum Benzophenon **3a** und Methylierung einer phenolischen Hydroxygruppe erklärt die Bildung des Sulochrins (**3b**) aus Emodin (**2**)⁷⁾. Für einen ähnlich wie bei **3b** verlaufenden ersten Reaktionsschritt in der Biosynthese des Geodins (**5**) spricht dessen gemeinsames Auftreten mit Dihydrogeodin (**3c**), dem Dichlorderivat des Sulochrins (**3b**), in Kulturen des Schimmelpilzes *Aspergillus terreus*^{10, 12)}. Durch weitere Oxygenolyse bei c) könnte das vom gleichen Organismus gebildete Geodoxin (**6**) aus Geodin (**5**) entstehen, eine Umwandlung, die *in vitro* durch PbO₂-Oxidation verwirklicht wurde¹⁶⁾.

¹¹⁾ D. H. R. Barton und A. I. Scott, J. Chem. Soc. **1958**, 1767; H. Raistrick und G. Smith, Biochem. J. **30**, 1315 (1936).

¹²⁾ R. F. Curtis, P. C. Harries, C. H. Hassall und J. D. Levi, Biochem. J. **90**, 43 (1964).

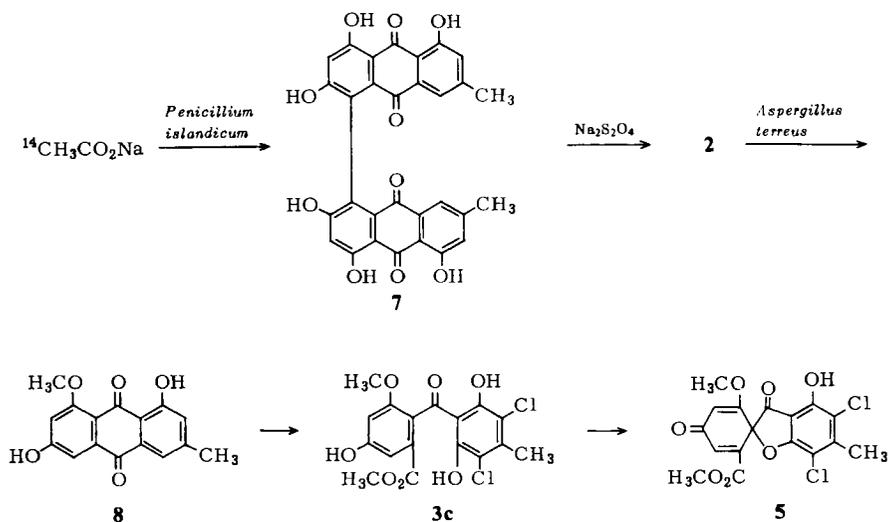
¹³⁾ Nach Modellversuchen ist für diese „Oxygenolyse“ eine mehrstufige Reaktionsfolge mit säurekatalysierter Umlagerung eines Anthronhydroperoxids wahrscheinlich⁸⁾.

¹⁴⁾ H. Musso in W. J. Taylor und A. R. Battersby, Oxidative Coupling of Phenols, S. 1, Dekker, New York 1967.

¹⁵⁾ B. Franck, J. Stöckigt, U. Zeidler und G. Franckowiak, Chem. Ber. **106**, 1198 (1973).

¹⁶⁾ C. H. Hassall und J. R. Lewis, J. Chem. Soc. **1961**, 2312.

Zur Untersuchung der Geodin-Biosynthese wurde [u - ^{14}C]Emodin ([u - ^{14}C]-**2**)¹⁷⁾ verwendet, das biosynthetisch durch Verfüterung von [2 - ^{14}C]Natriumacetat an *Penicillium islandicum* und reduktive Spaltung des isolierten Stryryns (**7**) mit Natriumdithionit erhältlich ist⁶⁾. Inkubation von Oberflächenkulturen des Stammes *Aspergillus terreus* (I. M. I. 16043) mit dem [u - ^{14}C]Emodin unter Zusatz von Lösungsvermittlern ergab nach Aufarbeitung ein radioaktives Rohfarbstoffgemisch. Durch PSC-Trennung und weitere Reinigung bis zur konstanten Radioaktivität ließen sich daraus neben Emodin (**2**) Questin (**8**), Dihydrogeodin (**3c**) und Geodin (**5**) isolieren.



Die aus den spezifischen Radioaktivitäten berechneten spezifischen Einbauraten¹⁸⁾ für [u - ^{14}C]Emodin (Tab.) entsprechen denen ähnlicher Biosyntheseversuche^{3, 6)} und beweisen, daß auch Geodin (**5**) und Dihydrogeodin (**3c**) zur Gruppe der vom Emodin abgeleiteten Seco-anthraquinone gehören.

Tab. Spezifische Radioaktivität und Einbauraten der Inhaltsstoffe von *Aspergillus terreus* nach Verfüterung von [u - ^{14}C]Emodin ([u - ^{14}C]-**2**)¹⁷⁾

	Spezif. Radioaktivität ($\mu\text{C}/\text{mmol}$)	Einbauraten (%) ¹⁸⁾	
		spezif.	absolut
Geodin (5)	0.101	0.27	0.40
Dihydrogeodin (3c)	0.107	0.29	0.012
Questin (8)	3.19	8.70	2.75
Emodin (2)	31.4	85.4	6.45

Aufschlußbereich sind weiterhin die höheren spezifischen Radioaktivitäten bzw. Einbauraten für Questin (**8**) und Emodin (**2**). Sie machen die Annahme wahrscheinlich, daß

¹⁷⁾ „u“ (uniform) dient hier, wie allgemein üblich, zur Kennzeichnung einer Radioaktivitätsverteilung, die sich über eine größere Anzahl von C-Atomen des Moleküls – im vorliegenden Falle auf jedes zweite C-Atom – erstreckt.

¹⁸⁾ Definitionen s. experimenteller Teil.

bei der Biosynthese von Geodin (5) und Dihydrogeodin (3c) als erstes Umwandlungsprodukt des Emodins (2) dessen Monomethyläther Questin (8) gebildet wird. Aus dem Befund, daß die Radioaktivität des nach dem Inkubationsversuch zurück isolierten Emodins auf 85.4% der Ausgangsradioaktivität verdünnt war, geht hervor, daß die Kulturen von *Aspergillus terreus* inaktives Emodin enthielten. Die Möglichkeit, daß nach Emodinverfütterung erhaltene Biosyntheseprodukte ihre Radioaktivität nicht einem direkten Einbau, sondern einem Ab- und Wiederaufbau des Emodins verdanken, ist nach einer früheren Untersuchung⁶⁾ unwahrscheinlich.

Dem Landesamt für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen danken wir für finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Die ¹⁴C-markierten Stoffwechselprodukte wurden sämtlich zunächst in inaktiver Form isoliert und durch Schmp. sowie spektroskopische Daten vollständig charakterisiert. Die Radioaktivitätsmessungen erfolgten im Flüssigkeitsscintillationszähler Nuclear Chicago Mark I mit einer Lösung von 4.0 g 2,5-Diphenyloxazol und 50 mg 1,4-Bis(5-phenyl-2-oxazolyl)benzol in 1 Liter Toluol als Scintillator. Für die Messungen nahm man die Proben je nach Löslichkeit in 2 ml reinem Toluol oder Toluol/Methanol (1 : 1) auf und versetzte mit 15 ml Scintillatorlösung. Die Radioaktivitäten sind in dpm (disintegrations per minute) angegeben. $2.22 \cdot 10^9$ dpm = 1 mC. Für die ermittelten Einbauraten (s. Tab.) gelten folgende Definitionen:

$$\text{Spezif. Einbaurate (\%)} = \frac{p}{n \cdot v} \cdot 100$$

$$\text{Absol. Einbaurate (\%)} = \frac{P}{V} \cdot 100$$

p = Spezif. Radioaktivität (dpm/mmol) des Biosyntheseproduktes

v = Spezif. Radioaktivität der Biosynthesevorstufe

n = Anzahl der Vorstufenmoleküle, die in ein Molekül des Biosyntheseproduktes eingebaut werden können

P = Gesamtradioaktivität (dpm) des Biosyntheseproduktes

V = Gesamtradioaktivität der Biosynthesevorstufe.

[u -¹⁴C]Emodin ([u -¹⁴C]-2): Analog der früher mitgeteilten Arbeitsvorschrift⁶⁾ wurden 2.00 mC [2 -¹⁴C]Natriumacetat (2.78 mg, spezif. Radioaktivität 59.0 mC/mmol) an 4 d alte Oberflächenskulturen von *Penicillium islandicum* (American Type Culture Collection, Rockville/Md., Nr. 10127) appliziert und das nach weiteren 18 d isolierte Skyrin (7) reduktiv gespalten. Das so erhaltene Emodin (2) reinigte man durch PSC mit Benzol/Essigester/Ameisensäure (2 : 1 : 0.01) an Kieselgel 60 PF (E. Merck) und Umkristallisieren aus Essigester/Methanol (3 : 1) bis zur konstanten Radioaktivität. 202 mg orangefarbige Nadeln vom Schmp. 256.5–257°C (Lit.⁶⁾ 256–257°C). Spezif. Radioaktivität $8.15 \cdot 10^7$ dpm/mmol = 36.7 μ C/mmol. Einbauraten: spezif. 0.00778%; absol. 1.37%.

Verfütterung von [u -¹⁴C]Emodin ([u -¹⁴C]-2) an *Aspergillus terreus*: 9.02 μ C [u -¹⁴C]-2 (66.26 mg der spezif. Radioaktivität 36.7 μ C/mmol), gelöst in 63.0 ml Propylenglycol, und 1.80 g Tween 20 (Schuchardt), wurden in gleichen Anteilen unter die Myceldecke von 9 gut angewachsenen, 6 d alten 400-ml-Oberflächenskulturen (Czapek-Dox-Nährlösung) von *Aspergillus terreus* (I. M. I. 16043) gespritzt. Nach weiteren 29 d tötete man die Kulturen mit je 10 ml Toluol ab. Das von der Nährlösung abgeseibte Mycel wurde dreimal mit Wasser gewaschen, 24 h bei 50°C getrocknet (Trockengewicht 21.7 g), nacheinander im Soxhlet-Apparat 5 h mit Petroläther entfettet (4.28 g

Lipoide) und 15 h mit Essigester extrahiert (1.20 g Extraktückstand). Die Nährlösung säuerte man mit konz. Salzsäure auf pH 2 an, extrahierte fünfmal mit Essigester, vereinigte den Essigesterrückstand (2.93 g) mit dem vom Mycel und trennte das Rohfarbstoffgemisch durch viermalige PSC mit Benzol/Essigester/Ameisensäure (5 : 1 : 0.03) an Kieselgel 60 PF (E. Merck) in seine Komponenten auf. Diese wurden dann mit Methanol eluiert und bis zur konstanten Radioaktivität aus den nachstehend benannten Lösungsmitteln umkristallisiert.

$[u\text{-}^{14}\text{C}]/\text{Questin}$ ($[u\text{-}^{14}\text{C}]\text{-8}$): Die bei der PSC des Rohfarbstoffgemisches am langsamsten laufende Fraktion ($R_E^{19}) = 0.30$) ergab 22 mg radioaktives Questin in orangegelben Nadeln, aus Methanol Zers.-P. 282.5°C. – IR: 3200 (OH), 1600 (CO, cheliert), 1580, 1340, 1260 cm^{-1} . – UV (Methanol): $\lambda_{\text{max}}(\epsilon) = 285$ (23 500), 430 nm (9 100). – MS (70 eV): $m/e = 284$ (100%, M^{\oplus}), 266 (50%, $\text{M}^{\oplus} - \text{H}_2\text{O}$). – Spezif. Radioaktivität und Einbauraten s. Tab.

$[u\text{-}^{14}\text{C}]/\text{Dihydrogeodin}$ ($[u\text{-}^{14}\text{C}]\text{-3c}$): Die PSC-Fraktion vom $R_E\text{-Wert}^{19}) 0.42$ ergab 4 mg radioaktives Dihydrogeodin in hellgelben Kuben aus CHCl_3 vom Schmp. 221–222°C (Lit.¹¹⁾ 216–218°C). Spezif. Radioaktivität und Einbauraten s. Tab.

$[u\text{-}^{14}\text{C}]/\text{Geodin}$ ($[u\text{-}^{14}\text{C}]\text{-5}$): Die PSC-Fraktion vom $R_E\text{-Wert}^{19}) 0.70$ ergab 142 mg radioaktives Geodin in hellgelben Nadeln ($\text{CCl}_4/\text{CHCl}_3$) vom Schmp. 228–230°C (Lit.¹¹⁾ 228–231°C). $[\alpha]_D^{22} = +133^\circ$ ($c = 0.015$ in CHCl_3) (Lit.¹¹⁾ +140°C, $c = 0.80$ in CHCl_3). Spezif. Radioaktivität und Einbauraten s. Tab.

$[u\text{-}^{14}\text{C}]/\text{Emodin}$ ($[u\text{-}^{14}\text{C}]\text{-2}$): Aus der PSC-Fraktion vom $R_E\text{-Wert}^{19}) 1.00$ wurden 5 mg radioaktives Emodin in orangefarbigen Nadeln (Essigester) vom Schmp. 258.5–259°C (Lit.⁶⁾ 256 bis 257°C) erhalten. Spezif. Radioaktivität und „Einbaurate“ s. Tab.

¹⁹⁾ Gefundene Laufstrecke dividiert durch die des Emodins (2).