

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOGENESE DES FLEXIRUBINS—HERKUNFT DES BENZOLRINGES A UND DER AROMATISCHEN C-METHYLGRUPPEN*

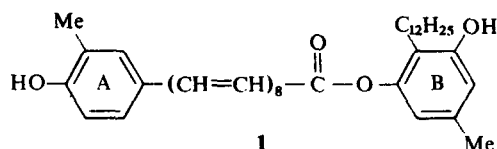
HANS ACHENBACH†, ANGELIKA BÖTTGER†, WERNER KOHL†, ERICH FAUTZ‡ und HANS REICHENBACH‡

† Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg i.Br., W. Germany; ‡ Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, D-3300 Braunschweig-Stöckheim, W. Germany

(Eingegangen am 1. September 1978)

Key Word Index—*Flexibacter elegans*; Cytophagales; bacteria; biosynthesis; flexirubin pigments.

Abstract—In radioactive flexirubins formed in culture from different radioactive precursors, the labelling was located by chemical degradation. The results show unambiguously that only the methyl group of ring A originates from methionine. The benzene ring A is derived from tyrosine, which is incorporated as a C₆-C₃ unit. Acetate acts as the main precursor of the polyene and participates in the biosynthesis of ring B.



Flexirubin (**1**) [1, 2] aus *Flexibacter elegans* ist der erste Vertreter einer neuartigen Klasse natürlicher Pigmente, die in gleitenden Bakterien der *Cytophaga-Flexibacter*-Gruppe vorkommen [3].

In der vorangegangenen Arbeit haben wir über Einbauversuche mit verschiedenen ¹⁴C-markierten potentiellen Precursoren in Flexirubin berichtet [4].

Dabei wurde für folgende Verbindungen ein signifikanter Einbau beobachtet: L-[¹⁴CH₃]-Methionin, [1-¹⁴C]-Acetat, L-[U-¹⁴C]-Tyrosin und DL-[2-¹⁴C]-Tyrosin.

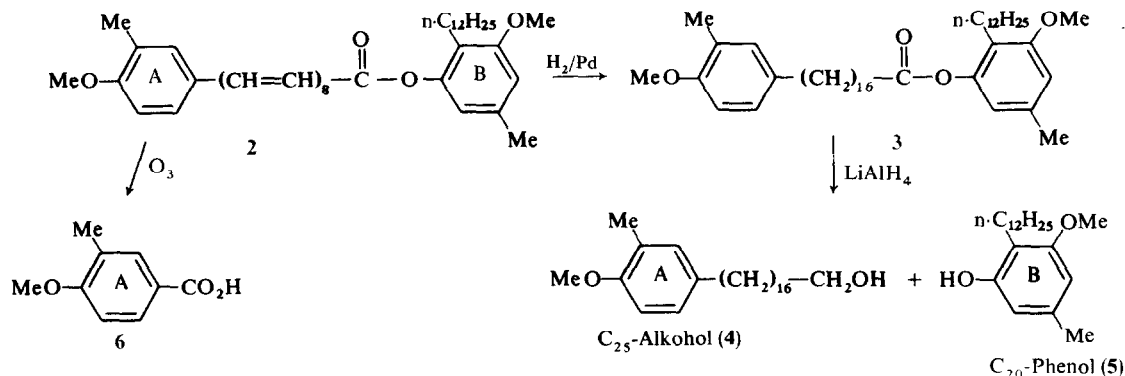
Für eine eindeutige biologische Interpretation dieser Ergebnisse ist noch die Beantwortung folgender Fragen erforderlich: (1) Erfolgt der Einbau der CH₃-Gruppe

aus Methionin als Substituenten an den Ring A und auch an den Ring B? (2) Ist Tyrosin ein spezifischer Vorläufer für den Benzolring A? Um diese Informationen zu erhalten, haben wir die aufgeführten ¹⁴C-markierten Flexirubine chemisch abgebaut und die Radioaktivität lokalisiert.

RESULTATE UND DISKUSSION

Die radioaktiven Flexirubine wurden nach Verdünnung mit inaktivem Material methyliert und zu den Hexadecahydrodimethylethern (**3**) hydriert. Die Perhydroether liefern bei der erforderlichen Spaltung der Estergruppe erheblich bessere Ausbeuten; sie haben außerdem den Vorteil besserer Meßbarkeit im Scintillationszähler als die wegen des starken Quenching-Effektes weniger geeigneten farbigen Flexirubine oder Flexirubineether. Der durchgeführte chemische Abbau ist in Schema 1 dargestellt.

Durch reduktive Spaltung der Estergruppe wurde das Molekül in die C₂₅-Alkohole (**4**) und die C₂₀-Phenole (**5**) zerlegt. Beide Komponenten erhält man bei Umsetzung der Perhydroether **3** mit Lithiumaluminiumhydrid nahezu quantitativ; die Produkte können mit DC oder GC ohne Komplikationen getrennt werden [2].



Schema 1. Chemischer Abbau der ¹⁴C-markierten Flexirubine.

Tabelle 1. Ergebnisse der Radioaktivitätsmessungen an Abbauprodukten aus Flexirubin nach Gabe verschiedener ^{14}C -markierter Vorläufer

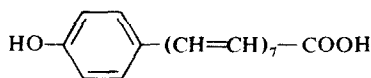
Vorläufer	Hexadecahydroflexirubindimethylether (3)	C_{25} -Alkohol (4)	C_{20} -Phenol (5)	4-Methoxy-3-methylbenzoesäure (6)
L- $^{14}\text{CH}_3$ -Methionin	100 %	97 %	0 %	
[1- ^{14}C]-Acetat	100 %	41 %	63 %	
L-[U- ^{14}C]-Tyrosin	100 %	90 %	5 %	76 %
DL-[2- ^{14}C]-Tyrosin	100 %	93 %	8 %	0 %

Für die Beurteilung des Einbaus von Tyrosin ist eine Kenntnis der Radioaktivitätsverteilung innerhalb der ω -Phenyl-polyenkette von besonderer Bedeutung. Wir haben daher die entsprechenden Flexirubindimethylether (2) einer Ozonolyse unterworfen [2] und die Radioaktivität in der dabei anfallenden 4-Methoxy-3-methylbenzoesäure (6) bestimmt, die neben dem Ring A nur noch 1 Kohlenstoffatom der Polyen-Kette des Flexirubins enthält. Die Säure wurde aus dem Ozonolyseansatz nach Behandlung mit Diazomethan als Methylester isoliert und durch Hochdruckflüssigchromatographie gereinigt. Die Ergebnisse der Radioaktivitätsmessungen an den Flexirubinderivaten und Abbauprodukten sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Die gefundenen Daten erlauben eindeutige Aussagen zu den eingangs gestellten Fragen: Während die CH_3 -Gruppe des Ringes A aus $^{14}\text{CH}_3$ -Methionin stammt, ist dieser Vorläufer an der Biosynthese des Ringes B und seiner Substituenten nicht beteiligt.

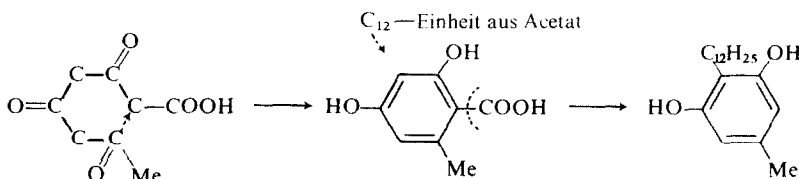
Tyrosin ist biogenetische Vorstufe des Benzolringes A. Wie der Abbau von $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -Tyrosin-markiertem Flexirubin einerseits und nach Gabe von $[\text{2-}^{14}\text{C}]$ -Tyrosin andererseits zeigen, geht offenbar das gesamte Kohlenstoff-Gerüst des Tyrosins in Flexirubin ein. Aus Tyrosin wird offensichtlich eine $\text{C}_6\text{-C}_3$ -Starter-Einheit gebildet, die zur Kondensation mit 7 weiteren Acetat-Einheiten für den Aufbau der ω -Phenyl-octaencarbonsäure dient.

Eine entsprechende Hypothese hatte 1952 Gripenberg [5] als Möglichkeit für die Biogenese der ω -Phenyl-heptaencarbonsäure Cortisalin (7) diskutiert.



7

Unter den getesteten und lokalisierten Verbindungen ist einzig Acetat ein Vorläufer für den Ring B. Man könnte dieses Ergebnis erklären mit der Biogenese des Ringes B als Polyketid über Orsellinsäure via 3-Dodecyl-orcellinsäure gemäß Schema 2.



Schema 2. Mögliche Biogenese des Ringes B aus Acetat.

Aber auch alternative Biogenesewege sind denkbar. Untersuchungen zu diesem Problem sind im Gange.

EXPERIMENTELLES

Schmelzpunkte wurden auf einem Kofler Heitzischmikroskop (Fa. Reichert) gemessen und sind unkorrigiert. Die Radioaktivitätsmessungen erfolgten mit einem Scintillationszähler BF85 (Fa. Berthold): 2 ml einer Lösung von 5–8 mg Substanz in 5 ml Toluol wurden in einem Zählgefäß mit 5 ml LIPOLUMA (Fa. Lumac) versetzt und zusammen mit einer Blindprobe zweimal 40 min lang gezählt.

Für die spektralphotometrischen Bestimmungen stand ein Spektralphotometer DMR 21 (Fa. Zeiss) zur Verfügung; Lösungsmittel: Hexan (Uvasol), falls nicht anders vermerkt. Die gaschromatographischen Untersuchungen wurden auf einem Gaschromatographen 5750 der Firma Hewlett-Packard an 2-m-Säulen (Glas, 1/8") gepackt mit 2 % SE 30 auf Chromosorb W (AW-DMCS 60/80 mesh) durchgeführt; Trägergas: He (ca 100 ml/min); Detektor: WLD (300°), Einspritzblock: 230°; Temperaturprogramm: 100–300° mit 15°C/min. Durchbruchtemperatur: Für 4 $T_D = 280^\circ$, 5 $T_D = 240^\circ$, 6-methylester $T_D = 155^\circ$. Für die HPLC stand eine Anlage der Fa. Waters zur Verfügung mit Pumpe M 6000A, Injektionssystem U6K und Photometer M 440. Getrennt wurde an Nucleosil 10-C₁₈-Fertigsäulen (4 mm \times 30 cm; Fa. Macherey & Nagel) mit MeOH-H₂O = 2:1; Durchfluß 2 ml/min; Detektion bei 280 nm.

Die Dünnschichtchromatographie (DC) erfolgte auf Platten mit Kieselgel H (Fa. Merck) unter Zusatz des Fluoreszenzindikators F₂₅₄. Schichtdicke 0,25 mm, nach Lufttrocknung Aktivierung bei 105°/30 min; Detektion durch Fluoreszenz bei 366 nm, Laufmittel: Benzol-EtOAc = 9:1. Für die präparative Dünnschichtchromatographie verwendeten wir Kieselgel P (Fa. Merck), Schichtdicke 1 mm, vor Aktivierung gewaschen in MeOH; Laufmittel: Benzol-EtOAc = 9:1.

Flexirubin. Die Isolierung des zur Isotopenverdünnung benötigten Flexirubins erfolgte wie früher beschrieben [2]: R_f 0,2–0,3.

Flexirubin-dimethylether. Beispiel: 50 mg Flexirubin wurden in 50 ml trockenem Aceton mit 5 ml Mel und 100 mg K₂CO₃ versetzt und über Nacht zum Sieden erhitzt. Nach Filtration wird das Produkt über eine Säule an Fractogel OR-PVA 2000

(Fa. Merck) gereinigt ($\text{Benzol-CHCl}_3 = 1:1$); Ausbeute 42 mg (80%); R_f 0.5. Durch Umkristallisation aus Aceton kann der Dimethylether in Nadeln (ca 10 mg) vom Schmp. 147–149° erhalten werden.

Hexadecahydroflexirubin-dimethylether. 30–50 mg Flexirubin-dimethylether wurden in 10–20 ml Essigester suspendiert und an Pd/C wie früher beschrieben hydriert [2]. Nach Filtration fiel der Hexadecahydroflexirubin-dimethylether DC-rein an; Ausbeuten 27–45 mg (90%); R_f 0.5.

[^{14}C]-Flexirubine. Die Herstellung der radioaktiv markierten Flexirubine ist in der vorhergehenden Publikation beschrieben [4]. Für die vorliegende Arbeit standen zur Verfügung:

[^{14}C]-Flexirubin aus Fermentationsansatz mit	Menge (mg)
L-[$^{14}\text{CH}_3$]-Methionin	0.55 (photometrisch)
[1- ^{14}C]-Acetat	0.97 (photometrisch)
L-[U- ^{14}C]-Tyrosin	0.34 (photometrisch)
DL-[2- ^{14}C]-Tyrosin	0.19 (photometrisch)

Die ^{14}C -markierten Flexirubine wurden mit inaktivem Flexirubin auf etwa 10 mg verdünnt und in Aceton-Lösung methyliert (s.o.). Etwa 1/3 der chromatographisch gereinigten radioaktiven Dimethylether wurden eingewogen und mit inaktivem Flexirubin-dimethylether wie folgt verdünnt:

[^{14}C]-Flexirubin-dimethylether aus Fermentationsansatz mit	Einwaage (mg)	verdünnt auf (mg)
L-[$^{14}\text{CH}_3$]-Methionin	3.5	63.4
[1- ^{14}C]-Acetat	3.0	116.3
L-[U- ^{14}C]-Tyrosin	Abbau I – 2.8	72.9
	Abbau II – 2.4	72.4
DL-[2- ^{14}C]-Tyrosin	3.2	73.0

Etwa die Hälfte der inaktiv verdünnten [^{14}C]-Flexirubin-dimethylether haben wir katalytisch zu den [^{14}C]-Hexadecahydroflexirubin-dimethylethern hydriert (s.o.) und an diesen die spezifische Radioaktivität bestimmt:

[^{14}C]-Hexadecahydroflexirubin-dimethylether aus Fermentationsansatz mit	Radioaktivität (cpm/ μmol)
L-[^{14}C]-Methionin	1250
[1- ^{14}C]-Acetat	7480
L-[U- ^{14}C]-Tyrosin	Abbau I – 895
	Abbau II – 773
DL-[2- ^{14}C]-Tyrosin	550

C_{25} -Alkohole (4) und C_{20} -Phenole (5) durch Spaltung der Hexadecahydroflexirubin-dimethylether (3) mit LiAlH_4 . Zur Spaltung wurden 18–22 mg der ^{14}C -markierten Hexadecahydroflexirubin-dimethylether (3) in Etherlösung (ca 5 ml) mit LiAlH_4 umgesetzt

nach [2]. Die Trennung der Produkte 4 und 5 erfolgte durch präparative DC (4: R_f 0.2; 5: R_f 0.6). Die Reinheit der Produkte 4 und 5 wurde gaschromatographisch überprüft. Wir erhielten folgende Ergebnisse:

[^{14}C]-Hexadecahydroflexirubin- dimethylether	aus Fermentations- ansatz mit	eingesetzt (mg)	Produkte			
			C_{25} - Alkohol (4) mg cpm/ μmol	C_{20} - Phenol (5) mg cpm/ μmol		
L-[$^{14}\text{CH}_3$]-Methionin		18.7	3.6	1207	5.2	0
[1- ^{14}C]-Acetat		22.4	5.0	3060	6.7	4658
L-[U- ^{14}C]-Tyrosin	Abbau I –	18.3	3.9	805	5.3	42
DL-[2- ^{14}C]-Tyrosin		19.9	4.3	512	5.7	48

Methylester der 4-Methoxy-3-methylbenzoesäure (6) durch Ozonolyse. Die Ozonolyse der ^{14}C -markierten verdünnten Flexirubin-dimethylether aus den Precursorversuchen mit Tyrosin erfolgte wie früher beschrieben [2]. Bei dieser Aufarbeitung fallen die Methylester der 4-Methoxy-3-methylbenzoesäuren (6) an, von denen wir einen Teil (ca 2/3) durch HPLC gereinigt haben; $t_R = 4.2$ min. Die Gehaltsbestimmungen für die Radioaktivitätsmessungen haben wir spektrophotometrisch (in MeOH) bei 258 nm durchgeführt. Wir erhielten folgende Ergebnisse:

Verdünnter [^{14}C]-Flexirubin-dimethylether aus Fermentations- ansatz mit	eingesetzt (mg)	Produkt Methylester von 6	
		mg	cpm/ μmol
L-[U- ^{14}C]-Tyrosin	Abbau II – 14.4	1.7	586
DL-[2- ^{14}C]-Tyrosin	15.3	2.1	0

Danksagung—Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für Sachbeihilfen.

LITERATUR

1. Reichenbach, H., Kleinig, H. und Achenbach, H. (1974) *Arch. Microbiol.* **101**, 131.
2. Achenbach, H., Kohl, W. und Reichenbach, H. (1976) *Chem. Ber.* **109**, 2490.
3. Achenbach, H., Kohl, W., Alexanian, S. und Reichenbach, H. (1979) *Chem. Ber.* **112**, 196; Achenbach, H., Kohl, W., Wachter, W. und Reichenbach, H. (1978) *Arch. Microbiol.* **117**, 253.
4. Fautz, E. und Reichenbach, H. (1979) *Phytochemistry* **18**, 957.
5. Gripenberg, J. (1952) *Acta Chem. Scand.* **6**, 580.