

β -Diketoester und deren Enoläther als Aminosäure-Antagonisten

On Amino Acid Antagonists: β -Diketoesters and Their Corresponding γ -Enolethers

Wolfram Trowitzsch und Hermann Sahm

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig-Stöckheim

(Z. Naturforsch. 32 c, 78–84 [1977]; eingegangen am 23. August 1976)

β -Diketoesters, β,γ -Unsaturated- α -keto Acids, Amino Acid Antagonists

Starting with well known β -diketoesters the corresponding γ -enolethers are synthesized and described. Both classes of compounds inhibited the growth of some microorganisms. The inhibition is abolishable by addition of certain amino acids to the definite medium. A possible mechanism of inhibition is discussed and compared with the mechanism of some β,γ -unsaturated α -amino acids. The known unsaturated α -amino acids, their origin and their biological activity are summarized in two tables.

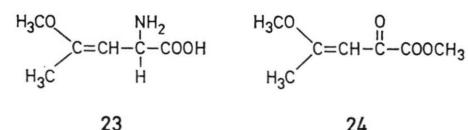
Seit etwa 15 Jahren ist bekannt, daß γ, δ - und δ, ϵ -ungesättigte α -Aminosäuren, die aus biologischem Material isoliert werden, das Wachstum von Mikroorganismen hemmen können (s. Tab. 1)¹. Über den genauen Wirkungsmechanismus dieser Substanzen ist jedoch noch wenig bekannt. Anderson und Fowden² fanden, daß 2-Amino-4-methyl-4-hexen-carbonsäure (**8**) von der Phe-tRNA-Synthetase aus *Aesculus californica* aktiviert wird, aber dann sehr wahrscheinlich nicht auf die entsprechende Phe-tRNA übertragen werden kann, da kein Einbau in das Protein gefunden werden konnte. 3-Cyclohexenyl-glycin (**10**) hemmt bei *Bacillus subtilis* kompetitiv in bezug auf Threonin die Threonin-Desaminase³.

In jüngster Zeit gewinnen Aminosäuren mit β,γ -Doppelbindungen an Bedeutung. Rando konnte kürzlich zeigen, daß die Hemmwirkung von L-2-Amino-4-methoxy-trans-3-butencarbonsäure (**18**) und von Vinyl-glycin (**21**) auf einer irreversiblen Hemmung der Aspartat-Transaminase beruht⁴⁻⁶ (siehe Tab. II).

Ergebnisse

Beim Studium der Synthese von 2-Amino-4-methoxy-3-pentencarbonsäure (**23**), von der wir vermuteten, daß sie ein Inhibitor der Leucin-Biosynthese in Mikroorganismen ist, erhielten wir als Zwischenprodukt den Methylester der entsprechenden α -Ketosäure, den 4-Methoxy-2-oxo-3-pentencarbonsäuremethylester (**24**).

Sonderdruckanforderungen an Dr. Wolfram Trowitzsch
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Ab-
teilung Niedermolekulare Naturstoffe, Mascheroder
Weg 1, D-3300 Braunschweig-Stöckheim.



24 haben wir erstmals kristallin isoliert (Schmp. 19 °C). Wird der Ketoester in einer Konzentration von 12 µg/ml ($8 \cdot 10^{-5}$ M) einer Kultur von *E. coli* MRE 600 in der lag-Phase zugegeben, so erhält man eine vollständige Hemmung des Wachstums (Abb. 1). Die Wachstumshemmung wird durch die beiden Aminosäuren L-Leucin oder L-Valin und deren Biosynthese-Vorstufen α -Ketoisocapronsäure und α -Keto- β -methylbuttersäure vollständig aufgehoben (Abb. 1). Die übrigen biogenen Aminosäuren zeigen keinen Antagonismus mit der Substanz **24**.

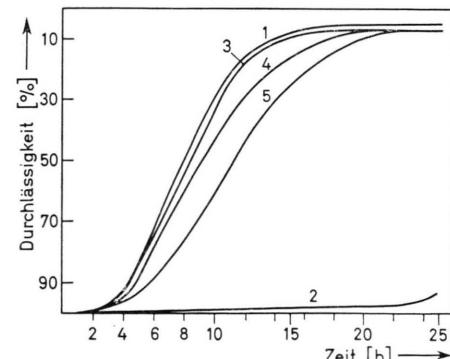


Abb. 1. Wachstumshemmung von *E. coli* MRE 600 durch **24** in definiertem Medium und Aufhebung der Hemmwirkung durch L-Leucin, L-Valin und α -Keto-iso-capronsäure. Zum Zeitpunkt $t=0$ (nach dem Animpfen) wurden bei 2-5 jeweils 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Substanz **24** zugesetzt. 1 = Kontrolle, 2 = 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ **24**, 3 = 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ **24** + 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ L-Leucin, 4 = 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ **24** + 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ L-Valin, 5 = 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ **24** + 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ α -Keto-iso-capronsäure.



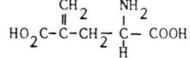
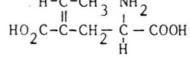
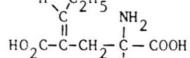
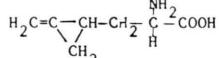
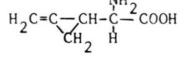
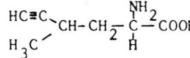
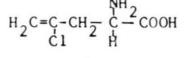
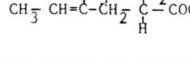
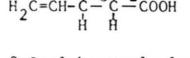
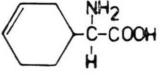
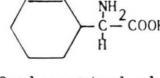
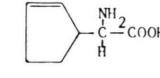
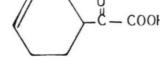
Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

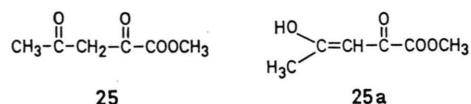
This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Tabelle 1 γ , δ - und β , ε -ungesättigte Aminosäuren, isoliert aus biologischem Material oder synthetisch dargestellt.

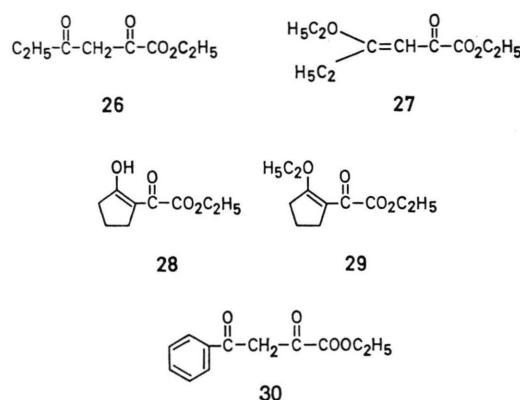
	Aminosäure	Herkunft	Biologische Aktivität	Literatur
1	γ -Methylenglutaminsäure	Tulipa gesneriana, Mycena pura	?	18, 19
				
2	γ -Äthylidenglutaminsäure	Tulipa gesneriana, Mycena pura	?	20
				
3	γ -Propylidenglutaminsäure	Mycena pura (Fr.) Kummer	?	21
				
4	Hypoglycin A	Blighia sapida	Hypoglycaemie	22
				
5	α -(Methylenencyclopropyl)-glycin	Litchi chinensis	Hypoglycaemie	23, 24
				
6	2-Amino-4-methyl-5-hexencarbonsäure, und andere	Euphoria longan	(toxisch) ?	25
				
7	2-Amino-4-chloro-4-pentencarbonsäure	Amanita pseudoporphyrinia Hongo	?	26
				
8	2-Amino-4-methyl-4-hexencarbonsäure und andere	Aesculus californica	Phenylalanin- Antagonist	2, 27
				
9	2-Amino-4-methyl-5-hexencarbonsäure	Streptomyces	Leucin-Antagonist	28
				
10	3-Cyclohexenyl-glycin	Streptomyces, synthetisch	Homoserin-, Threonin- iso-Leucin-Antagonist	29, 30
				
11	2-Cyclohexenyl-glycin	synthetisch	iso-Leucin-Antagonist	30
				
12	2-Cyclopentenyl-glycin	synthetisch	Valin+Leucin-Antagonist	31
				
13	β -Cyclohexenyl-glyoxylsäure, Ketomycin	Streptomyces	Homoserin-, Threonin -, 3 iso-Leucin-Antagonist	
				

Zu unserer Überraschung zeigte bereits die Vorstufe von **24**, der β -Acetylbenztraubensäuremethyl-ester (**25**), eine seit langem bekannte Substanz⁷, die gleichen biologischen Eigenschaften wie **24**. ^1H NMR- wie auch ^{13}C NMR-Untersuchungen be- weisen, daß **25** vollständig enolisch in Chloroform und Aceton vorliegt. Unter den mesomeren Strukturen sollte daher auch die des β,γ -ungesättigten α -Ketoesters **25 a** beteiligt sein, der das gleiche Ge- rüst wie **24** besitzt.



Zur weiteren Untersuchung dieser Substanzklasse synthetisierten wir den β -Propionylbenztraubensäureäthylester (**26**) aus Äthylmethylketon und Oxalsäurediäthylester⁸, dessen γ -Enoläthyläther (**27**), den in der β -Position verzweigten 2-Oxo-cyclopentyl-glyoxylsäureäthylester (**28**)⁹ sowie den entsprechenden γ -Äthyläther (**29**). Ebenfalls dargestellt wurde der β -Benzoylbenztraubensäureäthylester (**30**)¹⁰.

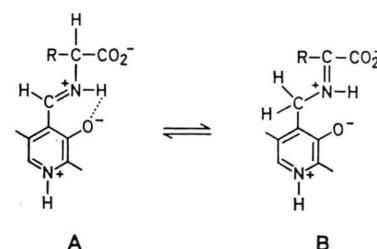
Alle Verbindungen hemmen das Wachstum von *E. coli* MRE 600, *Bac. subtilis*, *Sacch. cerevisiae* und *Candida boidinii*. Die minimalen Hemmkonzentrationen liegen im Bereich von 5×10^{-5} M für **26**, **27**, **28** und **29** und für die Substanz **30** bei $4,5 \times 10^{-6}$ M.



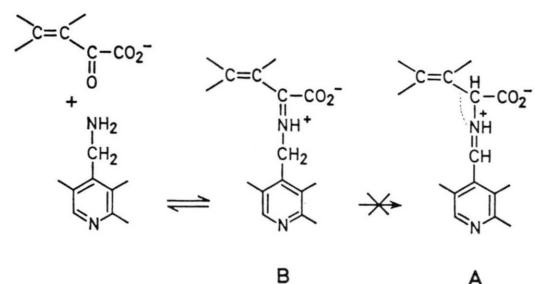
Die Hemmwirkung dieser fünf untersuchten Substanzen auf *E. coli* MRE 600 wird durch 100 μ g/ml Casein-Hydrolysat (frei von Vitaminen) vollständig aufgehoben. Werden die 20 biogenen Aminosäuren einzeln auf ihre antagonistische Wirkung getestet, so zeigten die Aminosäuren L-Valin und L-Leucin eine teilweise Aufhebung der Wachstumshemmung.

Diskussion

Da die wachstumshemmende Wirkung der β -Di- ketoester sowie deren Enoläther auf Mikroorganis- men durch biogene Aminosäuren aufgehoben wer- den kann, ist es sehr wahrscheinlich, daß diese Substanzen Transaminierungsreaktionen auf die von Rando für eine β,γ -ungesättigte Aminosäure nachgewiesene Weise hemmen. Der Kernschritt des Transaminierungsmechanismus ist die reversible Überführung eines Aldimins (**A**) in das tautomere Ketimin (**B**).

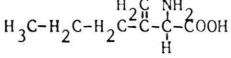
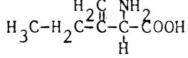
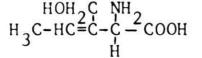
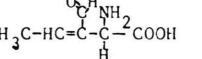
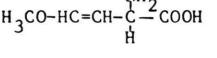
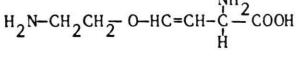
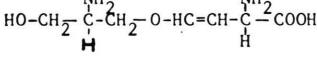
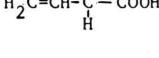
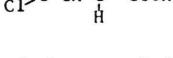


Hydrolytische Spaltung von **A** liefert formal Pyri- doxal und eine α -Aminosäure, während **B** formal zur α -Ketosäure und Pyridoxamin hydrolysiert wer- den kann¹¹. Zur Inhibierung der Transaminase bil- det die β,γ -ungesättigte Aminosäure zunächst mit Pyridoxal den Komplex **A**. **A** wird dann enzymati- sch in **B** überführt, erst **B** stellt mit der β,γ -Dop- pelbindung einen reaktiven Michael-Akzeptor dar. Adduktbildung der in dieser Arbeit beschriebenen Ketoester mit der Pyridoxamin-Form einer Trans- aminase führt dagegen gleich zum Komplex **B**. Die Umlagerung von **B** zum korrespondierenden Aldimin und die anschließende hydrolytische Spaltung zur β,γ -ungesättigten Aminosäure ist wegen der reakti- ven Dien-Struktur blockiert und damit die Trans- aminase irreversibel gehemmt.



Da die wachstumshemmende Wirkung der Sub- stanzen **24** und **25** spezifisch durch L-Leucin oder

Tabelle 2 β, γ -ungesättigte α -Aminosäuren aus biologischem Material und aus Synthesen

	Aminosäure	Herkunft	Biologische Aktivität	Literatur
14	L- β -Methylennorleucin	<i>Amanita vaginata</i> var. <i>fulva</i>	—	32
				
15	L- β -Methylennorvalin	<i>Lactarius helvus</i>	—	33
				
16	L-2-Amino-3-hydroxymethyl-3-pentencarbonsäure	<i>Bankera fuligineo-alba</i>	—	12
				
17	L-2-Amino-3-formyl-3-pentencarbonsäure	<i>Bankera fuligineoalba</i>	—	12
				
18	L-2-Amino-4-methoxy-trans-3-butencarbonsäure	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 2700	D,L-Alanin-, D-Glutamin-, D-Asparagin-Antagonist	34, 35
				
19	L-2-Amino-4-(2-aminoethoxy)-trans-3-butencarbonsäure	<i>Streptomyces</i>	L-Cystein-, L-Lysin-, Arginin-, Ornithin-Antagonist	36
				
20	L-2-Amino-4-(2-amino-3-vdroxypropoxy)-trans-3-butencarbonsäure, Rhizobitoxin	<i>Rhizobium japonicum</i> , synthetisch	Hemmung der Äthylenausscheidung grüner Pflanzen, Methionin-Antagonist	37, 38
				
21	Vinyl-glycin	<i>Rhodophyllum nidorosus</i> , synthetisch	Hemmung der Äthylenausscheidung grüner Pflanzen, Asparagin-Antagonist	39, 4, 40
				
22	L-2-Amino-4,4-dichloro-3-butencarbonsäure	synthetisch	—	41
				

L-Valin aufgehoben wird, hemmen diese sehr wahrscheinlich die Transaminierungsreaktion in der Synthese dieser beiden Aminosäuren. Dagegen scheinen die Substanzen **26**, **27**, **28**, **29** und **30** auch noch Transaminasen anderer Aminosäure-Biosynthesewege zu hemmen, da deren Hemmwirkung nur durch alle biogenen Aminosäuren zusammen vollständig aufhebbar ist.

Doyle und Levenberg konnten für **16** an einer Homoserin-Dehydrogenase aus *Rhodospirillum rubrum* keine Hemmwirkung feststellen¹². Nach den aus der Literatur bekannten Strukturen (Tab. I) besitzen Dehydrogenase-Inhibitoren Doppelbindungen in der δ, ε -Position, während Substanzen mit der Doppelbindung in β, γ -Position Inhibitoren für Transaminasen sind.

Experimenteller Teil

Organismen und Testbedingungen

Die Bakterienstämme: *Escherichia coli* MRE 600 und *Bacillus subtilis* wurden in dem Minimalmedium von Davis und Mingioli¹³ bei 37 °C gezüchtet. Die Hefestämme: *Candida boidinii* (ATCC 32195) und *Saccharomyces cerevisiae* wurden in dem definierten Medium nach Lingens und Oltmanns¹⁴ bei 30 °C kultiviert. Die Versuche zur Ermittlung der Hemmwirkung wurden in Submerskultur mittels eines Biophotometers der Fa. Jouan, Paris, ausgeführt. Die Küvetten wurden jeweils mit 7,5 ml Medium gefüllt und mit ungefähr 10⁶ Zellen beimpft. Die zu testenden Substanzen wurden unmittelbar nach dem Animpfen zugegeben, und das Wachstum wurde dann über 25 Stunden verfolgt.

Darstellung und Beschreibung der Testsubstanzen

Die Elementaranalysen führte das Laboratorium der Fa. I. Beetz aus. Die Schmelzpunkte sind mit einem Kofler-Heiztisch-Mikroskop der Fa. Reichert, Wien, bestimmt. ¹H NMR-Spektren sind mit einem EM-360 Gerät der Fa. Varian aufgenommen. Als Lösungsmittel diente, wenn nicht anders beschrieben, Deutero-Chloroform und Tetramethylsilan als innerer Standard. Die Massenspektren sind mit einem Gerät MS 9 der Fa. AEI aufgenommen. Die Proben einföhrung wurde über einen Hochtemperaturreinlaß vorgenommen. Mit einem registrierenden Spektralphotometer DMR 22 der Fa. Carl Zeiss wurden die UV-Spektren gemessen. Als Lösungsmittel hierfür verwendete man „Uvasole“ der Firma Merck. DC-Karten SIF der Fa. Riedel-de-Haën wurden zur Dünnschichtchromatographie angewendet. Zur Säulenchromatographie diente Kieselgel (ϕ unter 0,08 mm) der Fa. Merck. Die IR-Spektren sind mit einem Perkin-Elmer-Spektralphotometr IR 521 registriert.

β -Acetyl-brenztraubensäuremethylester (25)

Unter Verwendung von Natrium-Methylat anstelle von Natrium-Äthylat erfolgte die Darstellung wie in ref.⁷ beschrieben. Ausbeute: 69%, Schmelzpunkt 63 °C, λ_{\max} 295 nm (Methanol).

$C_6H_8O_4$, MG 144,13

	C	H	O
ber.:	50,00%	5,60%	44,14%
gef.:	50,14%	5,79%	44,19%

¹H NMR-Spektrum: EM 360 (CDCl₃/TMS), δ (ppm); 2,26 (s, 3); 3,90 (s, 3); 6,40 (s, 1); 14,1 (s, 1).

4-Methoxy-2-oxo-3-pentencarbonsäuremethylester (24)¹⁵

Die Darstellung erfolgte wie bei A. Rossi und H. Schinz¹⁶ beschrieben. Die Trennung vom gleichzeitig erhaltenen γ -Dimethylketal erfolgt durch fraktionierter Kristallisation. Dazu wird das Gemisch bei ca. +5 °C aufbewahrt. Dabei kristallisiert **24** in farblosen Stäbchen (Schmelzpunkt 19 – 20 °C). Aus 10 g **25** werden durch einmalige Kristallisation 1,0 g **24** erhalten. Aus der Mutterlauge lässt sich **24** durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Benzol/Aceton = 15/1 vom Ketal abtrennen. Gesamtausbeute: 3,5 g, λ_{\max} 287 nm (Methanol).

$C_7H_{10}O_4$ MG 158,15

	C	H	O
ber.:	53,16%	6,37%	40,47%
gef.:	53,05%	6,31%	40,61%

¹H NMR-Spektrum: EM 360 (CDCl₃/TMS), δ (ppm); 2,30 (s, 3); 3,80 (s, 3); 3,86 (s, 3); 6,26 (s, 1).

Massenspektrum: m/e (%): M⁺ = 158 (36); 99 (21,7); 58 (49,2); 43 (100).

IR-Spektrum: ν = 3000, 1730, 1686 und 1570 cm⁻¹.

2,4-Dioxo-hexencarbonsäureäthylester (26) (β -Propionyl-brenztraubensäureäthylester)

Aus 40 g Äthylmethylketon und 48 g Oxalsäure-diäthylester wurden nach der Vorschrift von l. c.⁹ 16,5 g **26** erhalten. Siedepunkt (0,5 Torr), 79 °C, λ_{\max} 292 nm (Methanol).

$C_8H_{12}O_4$ MG 172,18

	C	H	O
ber.:	55,80%	7,03%	37,17%
gef.:	55,80%	6,95%	37,11%

4-Äthoxy-2-oxo-3-hexencarbonsäureäthylester (27)

7 g **26** werden nacheinander mit 6 g Orthoameisensäuretriäthylester, 9,2 g Äthanol und 0,4 g Ammoniumchlorid versetzt. Man lässt für 5 Tage bei Raumtemperatur reagieren. Die Reaktionslösung wird mit 50 ml Diäthyläther versetzt, vom ausfallenden Ammoniumchlorid wird abfiltriert. Die Ätherlösung wird mit Wasser und danach mit 10proz. Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und destilliert. Bei 10⁻³ Torr und 76 °C destilliert reines **27** über. Ausbeute 5,1 g.

$C_{10}H_{16}O_4$ MG 200,13

	C	H	O
ber.:	59,98%	8,05%	31,96%
gef.:	59,98%	7,97%	31,85%

¹H NMR-Spektrum: EM 360 (CDCl₃/TMS), δ (ppm). 6,16 (s, 1); 4,30 (q, 2); 4,02 (q, 2); 2,82 (q, 2); 1,38 (t, 3); 1,35 (t, 3); 1,12 (t, 3).

Massenspektrum: m/e (%) (M+1) = 201 (5,2); M⁺ = 200 (4,9); 173 (3,5); 128 (12,2); 127 (100); 99 (70,1); 69 (10,5); 57 (18,4); 43 (17,5).

IR-Spektrum: ν = 2970, 1730, 1675 und 1570 cm⁻¹.

2-Oxo-cyclopentyl-glyoxylsäureäthylester (28) ³⁴

42 g Pentanon und 73 g Oxalsäurediäthylester werden langsam unter Eis/Kochsalzkühlung zu einer Suspension von 34 g Natriumäthylat in Äther getropft. Man lässt auf Raumtemperatur erwärmen und für weitere drei Stunden reagieren. Das ausfallende Natriumsalz wird abgenutscht und mehrmals mit trockenem Diäthyläther gewaschen, um das Salz von Ausgangsprodukten zu befreien. Das Salz wird in Eiswasser gelöst und mit 1 N Schwefelsäure bis zur leicht sauren Reaktion versetzt. Die Wasserphase wird erschöpfend mit Äther extrahiert (Eisen-(III)-chlorid Probe), die Ätherphasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und destilliert. Es werden 46 g einer bei 15 Torr und 150–153 °C siedenden Fraktion gesammelt. **28** kristallisiert nach Aufbewahrung im Kühlschrank, Schmelzpunkt 27 °C (berichtet: 27–28 °C ¹⁷).

C₉H₁₂O₄ MG 184,19 λ_{\max} : 302 nm (Methanol)

	C	H	O
ber.	58,69%	6,57%	34,75%
gef.:	58,62%	6,68%	34,71%

¹H NMR-Spektrum: EM 360 (CDCl₃/TMS), δ (ppm). 12,8 (s, 1), 4,36 (q, 2), 2,97 (t, 2), 2,44 (q, 2), 2,03 (q, 2), 1,35 (t, 3).

Massenspektrum: m/e (%) M⁺ = 184 (17,3); 112 (9,3); 111 (100); 82 (8); 65 (5,3); 55 (22); 54 (8); 53 (9,3); 43 (10,6).

IR-Spektrum: (CHCl₃-Lösung) ν = 3020, 2970, 1720, 1660, 1600 cm⁻¹.

¹ G. Nass, K. Poralla u. H. Zähner, Naturwissenschaften **58**, 603 [1971].

² J. W. Anderson u. L. Fowden, Biochem. J. **119**, 677 [1970].

³ W. Keller-Schierlein, K. Poralla u. H. Zähner, Arch. Mikrobiol. **67**, 339 [1969].

⁴ R. R. Rando, Biochemistry **13**, 3859 [1974].

⁵ R. R. Rando, Nature **250**, 586 [1974].

⁶ R. R. Rando, Accounts of Chemical Research **8**, 281 [1975].

2-Äthoxy-1-cyclopentenyl-glyoxylsäureäthylester (29)

7,45 g an **28** werden mit 7,4 g Orthoameisensäuretriäthylester und 9,2 g Äthanol versetzt. Nach Zugabe von 0,4 g Ammoniumchlorid lässt man für drei Tage bei Raumtemperatur reagieren. Wie für **27** beschrieben wird aufgearbeitet. Destillation liefert 1,20 g (0,1 Torr/80 °C). Eine Vorfraktion (70–75 °C) bestand aus 1,1 g γ -Diäthylketal von **28**.

C₁₁H₁₆O₄ MG 212,24

	C	H	O
ber.:	62,25%	7,60%	30,15%
gef.:	62,25%	7,66%	30,09%

¹H NMR-Spektrum: (CDCl₃/TMS), δ (ppm). 4,27 (q, 2), 4,13 (q, 2), 2,70 (m, 2), 2,50 (m, 2), 1,97 (m, 2), 1,33 (t, 3), 1,30 (t, 3).

Massenspektrum: m/e (%): M⁺ = 212 (6,3); 185 (4,2); 183 (4,2); 130 (100); 111 (80,8); 83 (6,3); 55 (19,1).

IR-Spektrum: ν = 2980, 1735, 1630 und 1600 cm⁻¹.

2,4-Dioxo-4-phenyl-buttersäureäthylester (30)

30 wurde durch Kondensation von Acetophenon und Oxalester in 65-prozentiger Ausbeute erhalten. Schmelzpunkt 43 °C ¹⁰.

C₁₂H₁₂O₄ MG 220,22 λ_{\max} 245, 330 nm
(Methanol)

	C	H	O
ber.:	65,44%	5,49%	29,06%
gef.:	65,53%	5,33%	29,32%

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes in Japan begonnen, mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung und Technologie wurde sie beendet. Der eine von uns (W. T.) bedankt sich für das Forschungsstipendium der Japanischen Regierung. Den Herren Professoren M. Matsui (Tokyo-Universität) und H. Brockmann jr. (Universität Bielefeld) möchten wir für ihr Interesse an dieser Arbeit danken. Für die Durchführung der biologischen Tests danken wir Frau R. Städing.

⁷ C. S. Marvell u. E. E. Dreger, in *Organic Syntheses, Coll. Vol. I*, S. 238 (2nd Edition), John Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sydney 1941.

⁸ O. Diels, J. Sielisch u. E. Müller, Ber. dtsch. Chem. Ges. **39**, 1333 [1906].

⁹ A. Kötz, Liebigs Ann. Chem. **348**, 113 [1906].

¹⁰ A. Kötz u. A. Michels, Liebigs Ann. Chem. **350**, 211 [1906].

¹¹ A. E. Braunstein, Übersichtsartikel in *The Enzymes, Vol. IX*, 3rd Edition, S. 379–481, Academic Press, New York, London 1973.

- ¹² R. R. Doyle u. B. Levenberg, *Biochemistry* **7**, 2457 [1968].
¹³ B. D. Davis u. E. S. Mingoli, *J. Bacteriol.* **60**, 17 [1950].
¹⁴ F. Lingens u. O. Oltmanns, *Z. Naturforsch.* **19b**, 1058 [1964].
¹⁵ **24** ist Gegenstand einer Patentanmeldung beim Deutschen Patentamt, München.
¹⁶ A. Rossi u. H. Schinz, *Helv. Chim. Acta* **31**, 1740 [1948].
¹⁷ S. Ruhemann, *J. Chem. Soc.* **101**, 1732 [1913].
¹⁸ J. Blake u. L. Fowden, *Biochem. J.* **92**, 136 [1964].
¹⁹ R. M. Zacharius, J. K. Pollard u. F. C. Steward, *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 1961 [1954].
²⁰ L. Fowden, *Biochem. J.* **98**, 57 [1966].
²¹ S.-I. Hatanaka u. H. Katayama, *Phytochemistry* **14**, 1434 [1975].
²² C. H. Hassall, K. Reyle u. P. Feng, *Nature* **173**, 356 [1954].
²³ D. O. Gray u. L. Fowden, *Biochem. J.* **82**, 385 [1962].
²⁴ R. J. Abraham, *Biochem. J.* **82**, 389 [1962].
²⁵ M.-L. Sung, L. Fowden, D. S. Millington u. R. C. Shepard, *Phytochemistry* **8**, 1227 [1969].
²⁶ S.-I. Hatanaka, S. Kaneko, Y. Niimura, F. Kinoshita u. G.-I. Soma, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 3931.
²⁷ J. Edelson, C. G. Skinner, J. M. Ravel u. W. Shive, *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 5150 [1959].
²⁸ R. B. Kelly, D. G. Martin u. L. J. Hanaka, *Can. J. Chemistry* **47**, 2504 [1969].
²⁹ W. D. Celmer, *Belg. Pat. Nr. 644682* [1964].
³⁰ J. Edelson, J. D. Fissekis, C. G. Skinner u. W. Shive, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 2698 [1958].
³¹ R. L. Dennis, W. J. Plant, C. G. Skinner, G. L. Sutherland u. W. Shive, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2362 [1955].
³² R. Vervier u. J. Casimir, *Phytochemistry* **9**, 2059 [1970].
³³ B. Levenberg, *J. Biol. Chem.* **243**, 6009 [1968].
³⁴ J. P. Scannell, D. L. Pruess, T. C. Demny, L. H. Sello, T. Williams u. A. Stempel, *J. Antibiotics* **25**, 122 [1972].
³⁵ U. Sahm, G. Knobloch u. F. Wagner, *J. Antibiotics* **26**, 389 [1973].
³⁶ D. L. Pruess, J. P. Scannell, M. Kellett, H. A. Ax, J. Janecek, T. H. Williams, A. Stempel u. J. Berger, *J. Antibiotics* **27**, 229 [1974].
³⁷ L. D. Owens, J. F. Thompson, R. G. Pitcher u. T. Williams, *Chem. Commun.* **1972**, 714.
³⁸ D. D. Keith, J. A. Tortora, K. Ineichen u. W. Leimgruber, *Tetrahedron* **31**, 2633 [1975].
³⁹ P. Friis, P. Helboe u. P. O. Larsen, *Acta Chem. Scand.* **B 28**, 317 [1974].
⁴⁰ G. Dardenne, J. Casimir, M. Marlier u. P. O. Larsen, *Phytochemistry* **13**, 1897 [1974].
⁴¹ Y. Urabe, T. Iwasaki, K. Matsumoto u. M. Miyoshi, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 997.