

Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

154. Mitteilung*. Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der Chitinsynthese bei Pilzen

U. DÄHN, H. HAGENMAIER, H. HÖHNE**, W. A. KÖNIG***, G. WOLF und H. ZÄHNER

Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie I, und Institut für Organische Chemie der Universität, Auf der Morgenstelle 28, D-7400 Tübingen, Bundesrepublik Deutschland

Metabolic Products of Microorganisms

154. Nikkomycin, a New Inhibitor of Fungal Chitin Synthesis

Abstract. From the fermentation broth of *Streptomyces tendae* Tü 901 a substance was isolated, which inhibits the growth of several fungi. The new antibiotic affects the chitin biosynthesis. Its structure was identified by mass spectrometry of the products obtained after chemical degradation. Nikkomycin is a nucleoside-peptide antibiotic consisting of uracil, an amino hexuronic acid and a new amino acid containing a pyridin ring.

Key words: New nucleoside-peptide antibiotic – Chitin biosynthesis – Structure elucidation – Mass spectrometry – *Streptomyces tendae*.

Zusammenfassung. Der Streptomyces Tü 901, *Streptomyces tendae*, bildet ein antifungisch wirkendes Nucleosid-Antibiotikum, Nikkomycin. Als Angriffsort kommt die Chitinsynthese in Frage.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie und des chemischen Abbaus konnten Uracil, eine Amino-hexuronsäure und eine neue, einen Pyridinring enthaltende Aminosäure nachgewiesen werden.

Aus einer Bodenprobe von Nikko, Japan, wurde 1970 im Rahmen eines Antibiotica-Screenings ein Actinomycetales-Stamm (Tü 901) isoliert, der ein Antibioti-

* 153. Mitteilung: G. Wolf, J. Wörth, H. Achenbach: Untersuchungen der Pigmente aus *Streptomyces michiganensis*. Arch. Microbiol. **106**, 245–249 (1975).

** Neue Anschrift: Farbwerke Hoechst AG, Pharma Mikrobiologie, D-6000 Frankfurt a. M. 80.

*** Neue Anschrift: Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität, Martin-Luther-King-Platz, D-2000 Hamburg 13.

cum bildet, welches das Wachstum von *Botrytis cinerea*, *Mucor hiemalis* sowie einer Reihe anderer, zum Teil phytopathogener Pilze hemmt. Das Antibiotikum erhielt den Namen Nikkomycin.

Außer der Hemmung des Wachstums verursacht das Antibiotikum morphologische Veränderungen an den Hyphenspitzen der empfindlichen Pilze. Diese Veränderungen führen bei *Mucor hiemalis* und *Botrytis cinerea* zu keulenartigen oder protoplastenähnlichen Strukturen. Solche morphologischen Veränderungen sind in der Literatur bei anderen antifungischen Antibiotica unter der Bezeichnung „Keulenbildung“ bzw. „bulging effect“ beschrieben. So isolierten Links et al. (1957) aus *Streptomyces* sp. einen „bulging factor“. Auch Filipin verursacht diese Mißbildung (Gottlieb et al., 1960). Ferner ist für die Antibiotica X-5079c = Saramycetin (Gale, 1963; Hütter et al., 1965), Cyanine (Betina et al., 1966), Polyoxin D (Endo et al., 1970), Bulgerin (Shoji et al., 1970), Ropalocidin (Mahl, 1971) und das Antibiotikum 24010 (Mizuno et al., 1971) der „bulging effect“ beschrieben.

Die Ausbildung protoplastenähnlicher Strukturen bei Pilzen unter dem Einfluß eines Antibiotikums deutet in vielen Fällen auf eine Störung der Zellwandsynthese. Für Polyoxin D, einer Komponente aus der mindestens 13 Antibiotica umfassenden Polyoxin-gruppe (Isono et al., 1965, 1967, 1968), ist die Wirkungsweise bekannt. Bei den bisher untersuchten Pilzen hemmt es den Einbau von N-Acetyl-D-glucosamin in Chitin (Endo et al., 1970). Dabei beruht die Hemmung auf einem zu Uridindiphospho-N-acetyl-D-glucosamin kompetitiven Angriff auf die Chitinsynthetase (Endo et al., 1970; Keller u. Cabib, 1971; Bartnicki-Garcia u. Lippman, 1972; Jan, 1974).

Bei den Pflanzenkrankheiten spielen Pilze als Erreger eine viel größere Rolle als in der Human- oder Veterinärmedizin. Obwohl bereits einige Antibiotica zur Bekämpfung von Pilzen in den Pflanzenschutz eingeführt wurden, besteht hier noch ein großer Bedarf.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, das Nikkomycin soweit zu charakterisieren, daß eine Prüfung auf Verwendbarkeit im Pflanzenschutz angeschlossen werden kann.

MATERIAL UND METHODEN

Nährmedien

Komplexmedium für Pilze und Streptomyceten nach Müller (1968): Hefeextrakt 4 g; Malzextrakt 10 g; D-Glucose 4 g; Agar 20 g; Leitungswasser 1 l.

Komplexmedium für *Botrytis cinerea* nach Hütter et al. (1965): Malzextrakt 20 g; Agar 17 g; Leitungswasser 1 l.

Komplexmedium für Oomyceten: Kartoffelextrakt 4 g; D-Glucose 20 g; Agar 15 g; Leitungswasser 1 l.

Minimalmedium für Bakterien, Streptomyceten und Pilze nach Hütter et al. (1966): D-Glucose 8 g; Ammontartrat 4 g; NaCl 5 g; K₂HPO₄ 2 g; MgSO₄ · 7 H₂O 1 g; CaCl₂ 200 mg; MnSO₄ · 7 H₂O 10 mg; Ferrioxamin 20 mg; Agar 15 g; entionisiertes Wasser 1 l.

Komplexmedium für Bakterien nach Corbaz et al. (1957): Fleischextrakt 3 g; Pepton 5 g; NaCl 2 g; Agar 15 g; Leitungswasser 1 l.

Versuchsorganismen

- Aphanomyces stellatus* de Bary CBS 578.67¹.
Aspergillus fumigatus Fresenius ETH M 3636 — Tü 149⁴.
Basidiobolus microsporus Benjamin CBS 130.62 — Tü 174³.
Botrytis cinerea Pers. ex Fr.: Tü 157².
Cercospora beticola Sacc. CBS 152.52³.
Colletotrichum trifolii Bain. u. Essary CBS 149.34³.
Eremothecium ashbyi Guilliermond Tü 173³.
Fusarium larvarum Fuckel Tü 257³.
Fusarium oxysporum lycopersici ETH M 811c³.
Microsporium gypseum (Bodin) Guiart et Grigoraki Tü 282³.
Mortierella isabellina var. *vinacea* Tü 632³.
Mucor hiemalis Wehmer(+) Tü 179¹.
Mucor hiemalis Wehmer(-) Tü 180¹.
Phycomyces blakesleeanus Burgeff(+) CBS 283.35 — Tü 183¹.
Phycomyces blakesleeanus Burgeff(-) CBS 284.35 — Tü 184¹.
Phytophthora infestans CBS 368.51¹.
Pythium debaryanum Hesse CBS 114.19³.
Rhizopus circinans v. Tieghem(+) CBS 319.35².
Rhizopus circinans v. Tieghem(-) CBS 320.35².
Rhizoctonia solani Kühn var. *hortensis* Schultz CBS 325.47³.
Saccharomyces cerevisiae Hansen Tü 125³.
Saprolegnia asterophora de Bary CBS 180.44¹.
Sapromyces elongatus (Cornu) Thaxter CBS 337.39¹.
Sclerotinia fructicola (Wint.) Rehm CBS 329.35³.
Thielaviopsis basicola (Berk. u. Br.) Ferraris CBS 413.52³.
Ustilago maydis (Beckmann) Unger Tü 567³.

Plattendiffusionstest für die Nikkomycinbestimmung

a) Mit *Mucor hiemalis* (+/-): Die Herstellung der Sporensuspension sowie der Testplatten ist bei Kirst (1971) und Kneifel et al. (1974) beschrieben.

b) Mit *Botrytis cinerea*: Die Beschreibung dieses Tests findet sich bei Hütter et al. (1965).

¹ Inkubationstemperatur: 20°C.

² Inkubationstemperatur: 24°C.

³ Inkubationstemperatur: 27°C.

⁴ Inkubationstemperatur: 37°C.

Bestimmung des Wirkungsspektrums

1. Mit sporulierenden Pilzen: Die Testanordnung war für die Zygomycetes die gleiche wie bei Kirst (1971). Mit den anderen Pilzen wurde ähnlich verfahren, bei ihnen wurde die Hemmung des Mycelwachstums gemessen, bei *Mucor hiemalis* jedoch nur die Hemmzonen der Zygosporienbildung registriert. 2. Mit Pilzen, die nicht oder schlecht sporulieren: Hier wurde ebenfalls die Methode von Hütter et al. (1965) verwendet, wobei bei *Botrytis cinerea* eine Wachstumshemmung bereits nach 24 h abgelesen werden konnte, während bei den anderen Pilzen wesentlich längere Inkubationszeiten erforderlich waren. 3. Mit *Saccharomyces cerevisiae* und *Eremothecium ashbyi*: Von den Organismen wurden Schüttelkulturen in Komplexmedium angesetzt, daraus je 1 ml (nach Inkubation über Nacht) entnommen, zu 100 ml auf 40°C abgekühlten Hefeagar gegeben und 17,5 ml-Portionen in sterile Petrischalen gegossen.

Bestimmung des Streptomyceten

Die Bestimmung des Streptomyceten Tü 901 erfolgte nach dem Schlüssel von Hütter (1967). Die elektronenmikroskopischen Bilder der Sporen (zur Untersuchung der Sporenoberfläche) wurden im Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, aufgenommen — hierfür sei an dieser Stelle gedankt.

Fermentation

Die folgenden Züchtungsbedingungen für die Fermentation im 10 l-Maßstab wurden eingehalten: Fermenter: Modell E-14, Fa. New Brunswick Sc., New Brunswick, N.J., U.S.A.; Nährlösung: 2% Sojamehl, 2% Mannit; pH 7,5; Temperatur: 27°C; Impfmenge: 5%; Belüftung: 2 l Luft/min; Rührer: 250 Umdrehungen/min; Antischaummittel: 50% äthanolische Polyollösung (wenige Tropfen); Dauer: 4–5 Tage.

Aufarbeitung der Kulturlösungen

a) Vorklärung, unter Zusatz von 2% Hyflo-Super-Cel wurde abgepreßt (Filterschicht C 150, Fa. Schenk, Schwäbisch Gmünd).

b) Nachklärung des Filtrates durch Filter U 1000 (Fa. Schenk, Schwäbisch Gmünd) mit Hilfe einer Filterpresse.

c) Ionenaustausch-Chromatographie an Dowex 50 WX 4: Das auf pH 4 eingestellte Kulturfiltrat wurde auf die Säule gegeben, bis zur völligen Entfärbung mit entionisiertem Wasser gewaschen und die Aktivität mit 0,01 M Ammoniak eluiert.

d) Ionenaustausch-Chromatographie an Amberlite 252: Das Eluat der Dowex-Chromatographie wurde am Rotationsverdampfer vom Ammoniak befreit, auf pH 4 angesäuert und auf die Säule gegeben. Nach ausgiebigem Waschen wurde mit 0,05 M Ammoniak eluiert.

e) Ionenaustausch-Chromatographie an SP-Sephadex C-25: Das Eluat der Amberlite-Chromatographie wurde am Rotationsverdampfer vom Ammoniak befreit, auf pH 4 angesäuert und auf die Säule gegeben. Nach Waschen mit entionisiertem Wasser und 0,01 M Pyridin-Acetat-Puffer (pH 4,7) wurde mit 0,02 M Pyridin-Acetat-Puffer (pH 4,7) eluiert. Der Aktivitätsverlauf in den Fraktionen wurde mit der Absorption bei 280 nm (LKB Uvicord) verglichen.

f) Gel-Chromatographie an Bio-Gel P 2 (200–400 mesh): Das Eluat der Sephadex-Chromatographie wurde am Rotationsverdampfer auf ein sehr kleines Volumen eingengt, auf die Säule gegeben und mit entionisiertem Wasser eluiert. Der Aktivitätsverlauf in den Fraktionen wurde mit der Absorption bei 280 nm (LKB Uvicord) verglichen.

g) Zur Reinisolierung wurde das unter f) erhaltene Produkt an einer Aminex AG 50 WX 4-Säule weiter gereinigt. Hierzu wurde das Produkt in 0,1 M Pyridinacetat-Puffer, pH 2,8, auf die Säule aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 300 ml 0,1 M Pyridinacetat-Puffer, pH 2,8 und 300 ml 1,5 M Pyridinacetat-Puffer, pH 5,6, eluiert. Die biologisch aktiven Fraktionen wurden gefriergetrocknet und an einer Cellulosesäule mit einem Propanol/Wassergemisch (8:2) chromatographiert.

Stabilitätstest

Es wurden Pufferlösungen (Citrat/HCl, resp. Phosphatpuffer) von pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9 hergestellt und von dem Antibioticum soviel eingewogen, daß jede Lösung 0,1 mg/ml enthielt. Die verschiedenen Lösungen wurden in zwei Ansätzen, einmal bei 4°C und einmal bei 20°C, aufbewahrt und 2 Wochen lang täglich auf ihre antibiotische Aktivitäten getestet.

Derivate für die Massenspektrometrie

a) Trimethylsilyl-Derivat (Bayer et al., 1972): 100 µg Antibioticum oder eine entsprechende Menge Hydrolysat wurden in 100 µl Bis(trimethylsilyl)-trifluoacetamid (BSTFA, Regis Chem. Comp., U.S.A.) 1 h bei 100°C im Trockenschrank erhitzt. Danach wurde die Lösung gas-chromatographisch und massenspektrometrisch untersucht.

b) Perdeuterio-trimethylsilyl-Derivat (McCloskey et al., 1968): Analog zu a) unter Verwendung von 100 µl Perdeuterio-bis(trimethylsilyl)-acetamid (Sharp u. Dohme, München).

c) Veresterung und Trimethylsilylierung: Eine Lösung von 100 µm Nikkomycin in 0,5 ml HCl/Methanol (1,25 N) wurde 1 h bei 100°C erhitzt. Danach wurde das Lösungsmittel mit Stickstoff abgeblasen und der Rückstand nach Zugabe von 100 µl BSTFA 1 h bei 100°C erhitzt. Diese Lösung wurde für die GC/MS-Untersuchung verwendet.

d) Methylierung mit Diazomethan: 100 µg Nikkomycin bzw. Hydrolysat wurden in 100 µl Methanol gelöst, mit einem Überschuß an frisch destillierter ätherischer Diazomethanlösung versetzt und dann sofort im Stickstoffstrom eingedampft und massenspektrometrisch untersucht.

e) Trifluoacetylierung und Methylierung mit HCl/Methanol: 100 µg Antibioticum oder eine entsprechende Menge Hydrolysat wurden entsprechend wie unter c) verestert. Die Trifluoacetylierung wurde analog zu d) durchgeführt.

Hydrolysen. a) Totalhydrolyse von Nikkomycin wurde in 6 N HCl bei 110°C während 20 h durchgeführt. Zur Partialhydrolyse wurde Nikkomycin b) 48 h mit 12 N HCl bei 37°C behandelt bzw. c) mit 1 N Trifluoessigsäure versetzt und 1 h bei 100°C erhitzt. Die präparative Isolierung ninhydrin-positiver Spaltprodukte (Substanz I und II, s. Abb.1) aus den Hydrolysaten geschah durch chromatographische Trennung an Beckman M-72-Kationenaustauscher mit einem linearen Gradienten von 300 ml 0,1 M Pyridinacetat-Puffer, pH 2,8 und 300 ml 1,5 M Pyridinacetat-Puffer, pH 5,6.

Dünnschicht- und Papier-Chromatographie. Verwendet wurden Alufolien Kieselgel mit Schichtdicke 0,25 mm der Fa. Merck, Darmstadt, sowie Papierstreifen (MN 212, Fa. Macherey, Nagel & Co., Düren). Die Lokalisierung der aktiven Substanz geschah einmal durch den chemischen Nachweis mit Ninhydrin-Sprühreagens, zum anderen durch Bioautographie.

Papierelektrophorese. Es wurden Papierstreifen (wie oben) von 3 cm Breite und 10 cm Länge geschnitten und eine Niederspannungselektrophorese (140 V; 1 h) mit einer einfachen Trennkammer der Fa. Serva, Heidelberg, durchgeführt. Zur Lokalisierung der Sub-

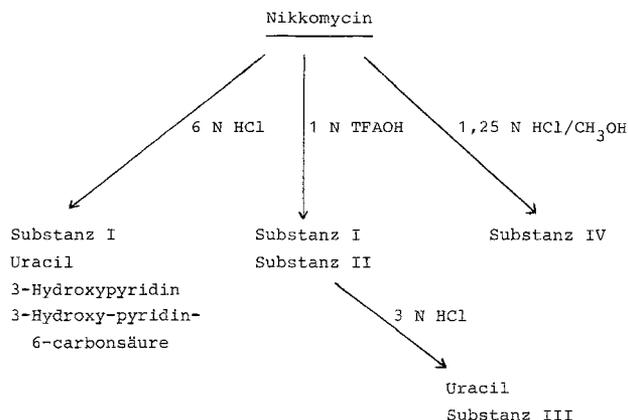


Abb.1. Abbauschema von Nikkomycin

stanz wurden die Papierstreifen der Länge nach halbiert und zum einen mit Ninhydrin behandelt, zum anderen der Bioautographie unterworfen.

Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, Uracil, Isoleucin und N-Acetyl-D-glucosamin in Zellen von *Mucor hiemalis*(+)

Erlenmeyerkolben (50 ml; 1 seitl. Einstich; 10 ml synthetische Nährlösung) wurden mit Sporen von *Mucor hiemalis*(+) beimpft (Endtiter ca. 10^6 Sporen/ml) und 10 h auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 20°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der radioaktiven Vorstufen der jeweils zu untersuchenden Makromolekülsynthese (Zeitpunkt 0 = Versuchsbeginn). Die Kolben enthielten außerdem 50 µg Oxytetracyclin/ml. Zur Prüfung der DNS-Synthese wurde der Vorkultur ^{14}C -Thymidin zugegeben: 10 µg (2,5 µCi).

Die RNS-Synthese wurde mit Hilfe von ^{14}C -Uracil untersucht. Zu der Vorkultur kamen 4,7 µg (2,5 µCi) markiertes sowie 47 µg unmarkiertes Uracil.

Die Proteinsynthese konnte mit ^{14}C -Isoleucin kontrolliert werden: Zugabe 33 µg (2,5 µCi).

Der Einbau von ^3H -N-Acetyl-D-glucosamin sollte auf die Chitinsynthese schließen lassen. 6,5 µg (20 µCi) der markierten und 650 µg der unmarkierten Vorstufe wurden eingesetzt. Die Durchführung der Versuche zur DNS-, RNS- und Proteinsynthese erfolgte nach Siddhikol et al. (1969), verändert nach Wolf (1971).

30 min nach Zugabe der radioaktiven Vorstufen wurden bei allen Versuchen (3 Kolben/Ansatz) die zu prüfenden Antibiotica zugesetzt. Neben Nikkomycin (Endkonzentration 0,5 µg/ml) wurde Cycloheximid (10 µg/ml) verwendet. Dazu blieb ein Kolben je Versuchsansatz zur Kontrolle ohne Antibioticum. Zu den angegebenen Zeiten wurden aus allen Kolben 0,5 ml der Kultur entnommen und für die Prüfung der DNS-, RNS- und Proteinsynthese wie folgt behandelt. Die einzelnen Proben wurden in 0,5 ml eiskalte Trichloressigsäure (7%) pipettiert und die Ausfällung auf Membranfiltern (SM 11306, Porenweite 0,45 µ, 25 mm φ, Fa. Satorius Membranfilter, Göttingen) durch Absaugen erhalten. Die zur Prüfung der Chitinsynthese entnommenen 0,5 ml-Proben kamen in 0,5 ml 5% KOH. Diese Suspensionen wurden 4 h in einem Wasserbad bei 95°C erhitzt und anschließend durch Membranfilter gesaugt. Der Niederschlag auf den Filtern wurde zunächst mit 2% Essigsäure, dann mit entionisiertem Wasser gewaschen. Diese Methode (Fuller u. Barshad, 1960) erlaubt es, lediglich aus Cellulose und Chitin bestehendes Zellwandmaterial zu erhalten.

Die an der Luft getrockneten Membranfilter wurden mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (4 g Diphenyloxazol auf 1 l Toluol) versetzt. In einem Szintillationspektrometer Mark II (Fa. Nuclear Chicago, Des Plaines, U.S.A.) konnte die Radioaktivität des jeweiligen Niederschlags gemessen werden.

Chitinsynthese in vitro

1. Bereitung der partikulären Chitinsynthesensuspension: Ein 500 ml-Erlenmeyerkolben (1 seitl. Einstich) mit 100 ml synthetischer Nährlösung wurde mit Sporen von *Mucor hiemalis*(+) beimpft (Endtiter ca. 10^6) und 14 h bei 20° C auf einer rotierenden Schüttelmaschine inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Abnutschen auf einer Glasfritte gewonnen und mit 50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer, pH 6,5 gewaschen, der zusätzlich 10 mM MgCl₂ enthielt. Die Suspension wurde nun bei 2000 × g 10 min zentrifugiert. Die Zellen des Zentrifugats wurden durch Einfrieren und Auftauen zerstört (McMurrough et al., 1971), mit eiskaltem 25 mM KH₂PO₄-KOH-Puffer (pH 6,5), der 5 mM MgCl₂ enthielt, versetzt und anschließend unter Kühlung mit einem Potter-Stempel homogenisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Die Zelltrümmer wurden noch einmal der Homogenisation und Zentrifugation unterzogen und schließlich in 10 ml des 25 mM KH₂PO₄-KOH-Puffers (pH 6,5; 5 mM MgCl₂) suspendiert. Diese partikuläre Chitinsynthesensuspension wurde in dem folgenden Versuch eingesetzt.

2. Enzymatischer Test: Ein Versuchsansatz enthielt in 25 mM KH₂PO₄-KOH-Puffer (pH 6,5; 5 mM MgCl₂) 20 mM N-Acetyl-D-glucosamin und 0,4 mM ATP. UDP-¹⁴C-N-acetyl-D-glucosamin und Nikkomycin wurden, wie im Ergebnisteil beschrieben, zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 ml der partikulären Chitinsynthesensuspension bei 20° C gestartet. Das Volumen eines Versuchsansatzes betrug 0,5 ml.

McMurrough u. Bartnicki-Garcia haben 1971 gefunden, daß freies N-Acetyl-D-glucosamin die Chitinsynthetase aus *Mucor hiemalis* spezifisch aktiviert und die Aktivierung als allosterischer Effekt angesehen werden kann. Diese Tatsache wurde wie bei Bartnicki-Garcia u. Lippman (1972) berücksichtigt.

Durch Zugabe von 0,2 ml 10 % Trichloressigsäure konnte die Reaktion gestoppt werden. Der entstandene Niederschlag wurde durch Abnutschen auf einem Membranfilter (Porenweite 0,45 µ, 25 mm Ø) gewonnen, mit 0,2 N NaOH gewaschen und anschließend seine Radioaktivität bestimmt.

ERGEBNISSE

Beschreibung des Organismus

Der Stamm Tü 901 gehört zur Gattung *Streptomyces* und ist durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet:

- a) Die Sporen sind ellipsoid. Sie haben die Größe von 0,4–0,6 × 1,2–1,4 µ und eine glatte Oberfläche.
- b) Die Farbe des Luftmycels ist zu Anfang kreideweiß, im ausgereiften Zustand aschgrau (cinereus).
- c) Die Sporenketten sind monopodial verzweigt und in lockeren Schrauben und Schlingen angeordnet.
- d) Auf Pepton-Eisen-Agar wurde bei 27° C ein schwarzes Pigment gebildet. Der Stamm ist chromogen.

Die zusammengefaßten Bestimmungsmerkmale identifizieren den Stamm Tü 901 als zur Art *Streptomyces tendae* Ettliger gehörend.

Fermentation und Isolierung

Die Fermentation wurde unter den im Abschnitt „Material und Methoden“ beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Bildung des Nikkomycins beginnt parallel mit der Mycelbildung und erreicht nach 5 Tagen ein Maximum, das über weitere 2 Tage erhalten bleibt. Die mit Hilfe von *Mucor hiemalis*(-/+) bestimmte Nikkomycinkonzentration in der Kultur erreichte max. 400 mg/l. Die Aufarbeitung via Filtration, Ionenaustausch-Chromatographie an Dowex 50 WX 4, Amberlite 252 und zweimalige Gel-Chromatographie an Bio-Gel P-2 ergab allerdings nur eine Endausbeute von 14 % bei einer Reinheit von 70–80 %. Die aus diesem Produkt durch Chromatographie an Aminex 50 WX 4 und anschließend an Cellulose erhaltene aktive Fraktion zeigte im Plattendiffusionstest maximale Aktivität und erwies sich bei der Dünnschichtchromatographie in neutralen Fließmitteln als einheitlich.

Eigenschaften des Antibioticums

Nikkomycin ist eine farblose, in Wasser und Pyridin sehr gut lösliche, in den sonstigen üblichen organischen Lösungsmitteln unlösliche Substanz. Es zeigt eine positive Reaktion mit Ninhydrin, Natriummetaperjodat-Benzidin und Kaliumpermanganat. Mit Eisen(III)-chlorid erhält man eine Gelbfärbung. Bei der Dünnschichtchromatographie von Nikkomycin treten in allen verwendeten Fließmitteln, die Essigsäure enthielten, drei Ninhydrin-positive Flecken auf, wobei jeweils nur ein Fleck mit der im Bioautogramm aktiven Substanz korrespondiert. Diese Tatsache konnte auf die Labilität des Antibioticums in essigsaurer Lösung zurückgeführt werden. In neutralen Fließmitteln zeigt sich jeweils nur ein Ninhydrin-positiver Fleck (Tab. 1).

Im automatischen Aminosäureanalysator wird Nikkomycin mit einem Volumen eluiert, das dem Elutionsvolumen von Leucin entspricht.

Papierelektrophorese

Das Antibioticum ist amphoter. Um den pH-Wert von 6 ist die Wanderungstrecke klein; hier dürfte der isoelektrische Punkt liegen. Das Verhalten Nikkomycins bei der Elektrophorese zeigt Tabelle 2.

Elementaranalyse

Die Elementaranalyse von Nikkomycin ergab folgende Werte: C 48,21; H 5,08; N 13,58; O 31,58. Daraus errechnet sich eine Elementarzusammensetzung von C₄H₅NO₂. Kryoskopisch wurde das Molekulargewicht mit 404 bestimmt. Die hier vor-

Tabelle 1. R_f -Werte von Nikkomycin. Nur der Fleck R_{f2} zeigt biologische Aktivität. Die Substanz mit R_{f3} entspricht der Substanz I und die mit R_{f1} der Substanz II (s. Abschnitt „Strukturaufklärung“)

Fließmittel	Schichtmaterial	R_{f1}	R_{f2}	R_{f3}
Äthanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)	Cellulose	0,1	0,3	0,5
Propanol/Wasser (8:2)	Cellulose		0,36	
Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1)	Kieselgel	0,05	0,1	0,15
Butanol/Eisessig/Pyridin/Wasser (42:4:24:30)	Kieselgel	0,35	0,45	0,55
Butanol/Pyridin/Wasser (1:1:1)	Kieselgel		0,4	
Propanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (15:10:3:12)	Kieselgel	0,6	0,7	0,75

geschlagene Struktur für Nikkomycin entspricht jedoch dem Molekulargewicht von 495 und der Formel $C_{20}H_{25}N_5O_{10} = (C_4H_5NO_2)_5$. Die daraus errechnete Elementarzusammensetzung ergibt: C 48,49; H 5,09; N 14,14; O 32,29. Abbildung 2 zeigt das UV-Spektrum und Abbildung 3 das IR-Spektrum des Nikkomycins.

Stabilität

Das Antibioticum ist im Bereich von pH 3–9 bei 4°C und 20°C stabil. Es wurden täglich bei den angegebenen Bedingungen Plattendiffusionstests durchgeführt. Dabei konnte während 14 Tagen kein Aktivitätsverlust des Antibioticums in den Pufferlösungen festgestellt werden. Bei pH-Werten unter 3 ist Nikkomycin weniger stabil.

Untersuchung der Hydrolysate des Antibioticums

Nach 20stündigem Erhitzen des Antibioticums in 6 N HCl bei 110°C ergab eine Untersuchung des Hydrolysats, nach Abtrennung eines schwarzen Niederschlags, im automatischen Aminosäureanalysator neben einer auffallend großen Menge Ammoniak drei Ninhydrin-positive Substanzen. Ein Peak wies das Elutionsvolumen von Glycin auf und wurde auch als solches identifiziert, die beiden anderen wurden als unvollständig aufgelöster Doppelpeak mit der Elutionszeit von Tyrosin und Phenylalanin eluiert (Abb. 4). Die dem Doppelpeak entsprechende Substanz I wurde durch präparative Chromatographie des Hydrolysats an Beckman M-72 mit Pyridinacetat-Puffer isoliert. Dabei wurde außerdem im Ausschlußvolumen der Säule 3-Hydroxy-6-pyridincarbonsäure eluiert. Durch Untersuchung des Hydrolysats mit GC/MS konnte neben den erwähnten Komponenten noch Uracil und 3-Hydroxypyridin nachgewiesen werden.

Nach 1stündigem Behandeln von Nikkomycin mit 1 N Trifluoressigsäure bei 100°C zeigte die Untersuchung im automatischen Aminosäureanalysator neben dem der Substanz I entsprechenden Doppelpeak eine weitere Ninhydrin-positive Substanz mit einem

Tabelle 2. Laufstrecken Nikkomycins bei der Papierelektrophorese in Abhängigkeit von den pH-Werten der Puffersysteme

Puffer	pH	Zeit (min)	Laufstrecke (mm)
Pyridin-Eisessig	3,9	60	- 12
Pyridin-Eisessig	6,1	60	- 1
Veronal	8,9	60	+ 16

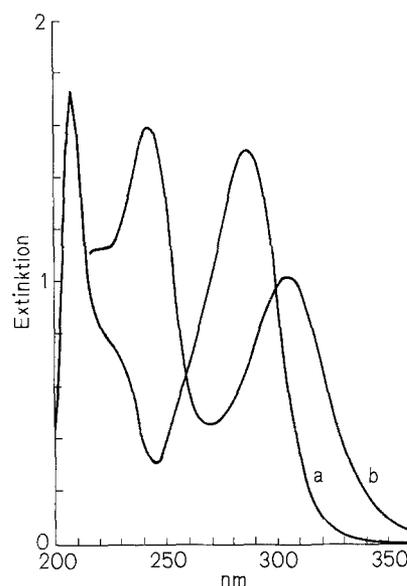


Abb. 2. UV-Spektrum von Nikkomycin; aufgenommen in 0,1 N HCl (a) und 0,1 N NaOH (b)

etwas kleineren Elutionsvolumen als Asparaginsäure. Diese im folgenden als Substanz II bezeichnete Verbindung wurde ebenfalls durch präparative Chromatographie des Hydrolysats an Beckman M-72 mit Pyridinacetat-Puffer isoliert. Im Laufe von Derivatisierungsreaktionen für die massenspektrometrische Untersuchung wurden weitere acidolytische Spaltprodukte erhalten. Abbildung 1 zeigt das Produktschema, das auf diese Weise erhalten wurde.

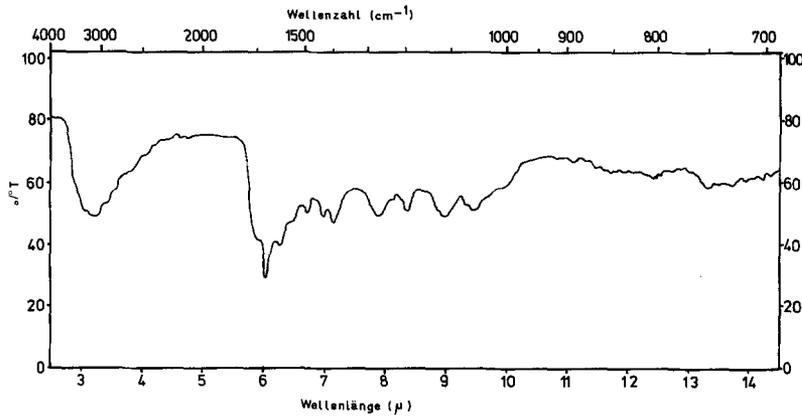


Abb. 3. IR-Spektrum von Nikkomycin; aufgenommen in KBr

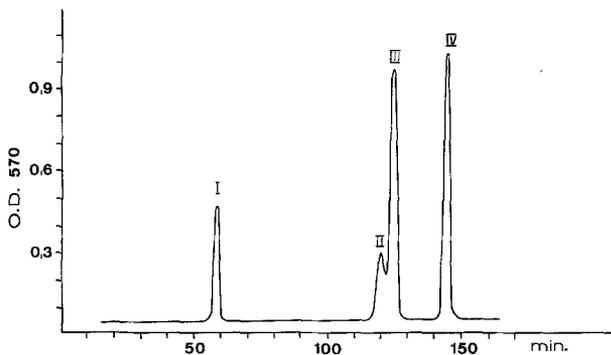


Abb. 4. Auftrennung der Hydrolysate

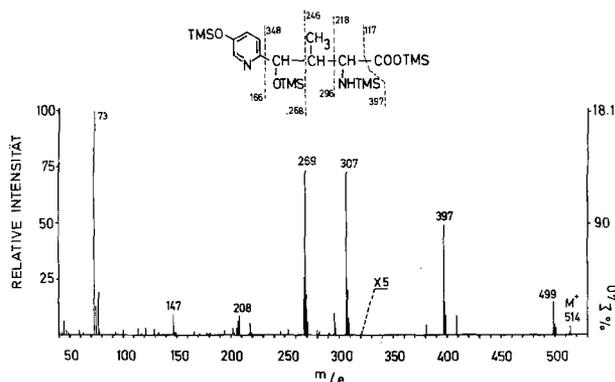


Abb. 5. Massenspektrum des TMS-Derivates der Substanz I

Strukturaufklärung der Substanz I (unbek. AS)

Durch Umsetzung mit Bis-trimethylsilyl-trifluoracetamid (BSTFA) erhält man ein flüchtiges TMS-Derivat der Substanz I, das sich durch kombinierte Gas-Chromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS) charakterisieren läßt. Das Massenspektrum ergab einen Molekülpeak bei m/e 514 (Abb. 5). Die Interpretation des Spektrums erfolgte durch Vergleich mit den Spektren des Perdeuterio-TMS-Derivates (Tabellen 3 und 4) und des TMS-Derivates des Methyl-

esters von Substanz I, sowie durch exakte Massenbestimmung einzelner Fragment-Ionen mit Hochauflösungs-Massenspektrometrie. Die Zuordnung stützt sich dabei auf die durch die mit Substituenten bzw. Isotopen markierten funktionellen Gruppen verursachten Verschiebungen in den Massenzahlen der Spektren.

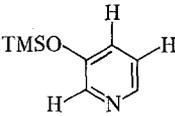
Die Massenzahl des Molekül-Ions ist beim TMSD₃-Derivat um 36 Masseneinheiten nach m/e 550 verschoben, woraus sich die Gegenwart von 4 TMS-Gruppen und das Molekulargewicht 226 für Substanz I ermitteln läßt. Konsistent damit ist das Molekulargewicht 456 des trimethylsilylierten Methylesters von I; die Massendifferenz von 58 gegenüber dem TMS-Derivat läßt auf die Gegenwart einer Carboxylgruppe schließen.

Die α -Aminosäurestruktur geht aus dem Fragment-Ion m/e 218 im Spektrum des TMS-Derivats (Abb. 5) hervor, das im Falle des Methylesters nach m/e 160 verschoben ist. Fragmentierungen, die unter Abspaltung von Molekülteilen verlaufen, die die Estergruppe enthalten, z.B. M-COOR zu m/e 397 und M-TMS-NH-CH-COOR zu m/e 296 ergeben dagegen keine Verschiebung. Die Fragmentierungen von m/e 499 nach m/e 409 ($m^* = 335,5$) und m/e 397 nach 307 ($m^* = 238,0$) erklären sich aus Eliminierungen von Trimethylsilylalkohol, was für die Gegenwart einer aliphatischen Hydroxylgruppe spricht.

Die exakte Massenbestimmung durch Hochauflösungs-Massenspektrometrie (Tabelle 3) ergibt für m/e 397 die Summenformel $C_{18}H_{37}N_2O_2Si_3$, für m/e 307 die Summenformel $C_{15}H_{27}N_2OSi_2$ (397-TMSOH). Für das Molekül-Ion (397 + COOTMS) ergibt sich somit die Summenformel $C_{22}H_{46}N_2O_4Si_4$ und nach Abzug der eingeführten TMS-Gruppen für die Substanz I die Summenformel $C_{10}H_{14}N_2O_4$.

Als Basispeak tritt im Massenspektrum des TMS-Derivates das Ion m/e 269 auf, das die Elementarzusammensetzung $C_{12}H_{33}NO_2Si_2$ hat und direkt aus dem Molekül-Ion unter Abspaltung des Molekülteils

Tabelle 3. Interpretation der wichtigsten Ionen in den Massenspektren der TMS-Derivate von Substanz I

TMS-Derivat	Massenzahl (m/e) Exakte Masse/Summenformel	TMSd ₀	TMS/OMe	Interpretation
514	—	550	456	M
499	—	532	441	M-CH ₃
409	—	433	409	M-(CH ₃ + ROH) ^a
397	C ₁₈ H ₃₇ N ₂ O ₂ Si ₃ , gem. 397, 2171, ber. 397, 2163	424	397	M-COOR
307	C ₁₅ H ₂₇ N ₂ O ₂ Si ₂ , gem. 307, 1663, ber. 307, 1663	325	307	M-(TMSOH + COOR)
296	—	314	296	M-RMS-NH-CH-COOR
269	C ₁₂ H ₂₃ NO ₂ Si ₂ , gem. 269, 1261, ber. 269, 1267	287	269	M-CH ₃ -CH=C-COOR NH-TMS
253	—	268	253	269-CH ₄
218	—	236	160	TMS-NH=CH-COOR
166	—	—	166	

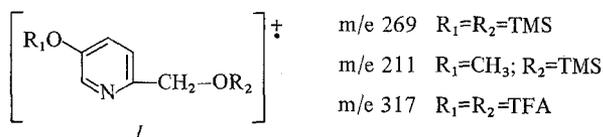
a R = -TMS, -CH₃.

Tabelle 4. Interpretation der wichtigsten Ionen im Massenspektrum der Substanz I nach Veresterung und Trifluoracetylierung

Massenzahl (m/e)	Interpretation	Übergangssignal m*
528	M	
509	M-F	
497	M-OCH ₃	
469	497-CO	442
459	M-CF ₃	397
443	M-(COOCH ₃ + HCN)	
415	M-TFAO	
414	M-TFAOH	
383	415-CH ₃ OH	354
355	469-TFAOH	270
	383-CO	329
344	M-TFA-NH- \ddot{C} H-COOCH ₃	
317	M-CH ₃ -CH=C-COOCH ₃ NHTFA	
301	M-(TFAOH + TFAO)	
230	344-TFAOH	153,5
220	317-TFA	
190	TFA-O- 	

entsteht (m* = 141), der die Estergruppe und die α -Aminogruppe enthält. Diese für α -Aminosäuren ungewöhnliche Fragmentierung läßt sich mit der Gegenwart einer Partialstruktur erklären, welche be-

vorzugt die positive Ladung stabilisieren kann, wie dies bei Aromaten und Heterocyclen der Fall ist. Für das Ion m/e 269 wird die Struktur 1 angenommen.



Zur weiteren Charakterisierung der funktionellen Gruppen der Substanz I wurden verschiedene spezifische Derivatisierungsreaktionen durchgeführt und die erhaltenen flüchtigen Derivate mit GC/MS untersucht. Setzt man die Aminosäure vor der Silylierung mit Diazomethan um, so wird neben der Carboxylgruppe eine weitere funktionelle Gruppe methyliert (M⁺ = m/e 398). Dabei beobachtet man beim Basispeak eine Massenverschiebung von m/e 269 nach m/e 211, woraus auf die Methylierung einer sauren Hydroxylgruppe an einem aromatischen oder heterocyclischen System geschlossen werden kann.

Das Massenspektrum des Trifluoracetylderivates des Methylrestes von I (Abb. 6) läßt sich unter Berücksichtigung der bisherigen Erkenntnisse ebenfalls mit der angenommenen Struktur vereinbaren (Tabelle 4). Die aliphatische Hydroxylgruppe wird durch die Eliminierung von Trifluoressigsäure aus verschiedenen Fragment-Ionen belegt (m/e 469 \rightarrow m/e 355, m* = 270,0; m/e 344 \rightarrow m/e 230, m* = 153,5). Das intensive Fragment-Ion bei m/e 317 entspricht dem Basispeak m/e 269 im Massenspektrum des TMS-Derivates und enthält zwei TFA-Gruppen.

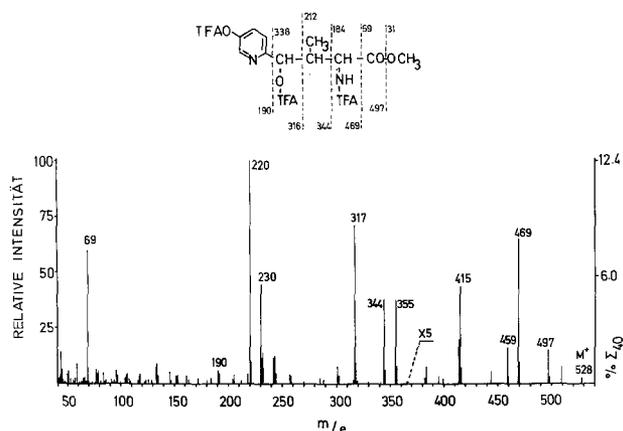


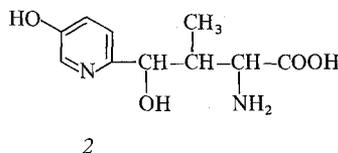
Abb. 6. Massenspektrum des Trifluoracetylderivates des Methylesters der Substanz I

Im Gas-Chromatogramm des TFA-Derivates von I fällt auf, daß neben einem Hauptpeak 3 weitere Banden auftreten, die sich in ihren Massenspektren nur durch geringe Intensitätsabweichungen unterscheiden. Es handelt sich dabei um 4 Diastereomere, die voneinander abgetrennt werden und auf die Gegenwart von mindestens 2 chiralen Zentren schließen lassen. Als wichtigstes Nebenprodukt im Gas-Chromatogramm tritt außerdem ein Produkt mit Molekulargewicht 414 auf, das sich anscheinend aus dem Hauptprodukt (MG 528) durch Eliminierung eines Trifluoressigsäure-Moleküls bildet und auf die Gegenwart einer aliphatischen Hydroxylgruppe schließen läßt. Im Massenspektrum dieser Substanz fällt ein intensives Ion bei m/e 399 (M-15) auf, was als Hinweis auf eine Methylverzweigung interpretiert werden muß.

Die erheblich größere Hydrolysestabilität von N-TFA-Gruppen gegenüber O-TFA-Gruppen läßt sich analytisch ausnützen. Behandlung des TFA-Derivates von I mit Wasser (10 min bei 100°C) führt zu einer vollständigen Verseifung der O-TFA-Gruppen (Weygand u. Rinno, 1959). Die anschließend durchgeführte Silylierung ergibt ein Derivat, das nur noch 1 N-TFA-Gruppe aber 2 O-TMS-Gruppen enthält (MG 480). Dieses Produkt wurde nach der massenspektrometrischen Untersuchung erneut mit Wasser (10 min bei 100°C) behandelt. Dabei werden die O-TMS-Gruppen verseift. Nach Trocknen der Probe wurde das TMSd_3 -Derivat hergestellt, dessen Massenspektrum einen Molekülpeak bei m/e 498 aufweist. In diesem Spektrum tritt neben einem zu erwartenden M-18-Ion (M- CD_3) ein M-15-Ion auf. Auch hier kann die Erklärung nur in einer Methylverzweigung im Molekül zu suchen sein.

Nach dem Nachweis einer Carboxylgruppe, einer Aminogruppe, einer aromatischen und einer aliphatischen

Hydroxylgruppe, sowie einer Methylgruppe und unter Berücksichtigung der durch Hochauflösungs-Massenspektrometrie bestimmten Summenformel ergibt sich die Struktur 2:



Einzelne Elemente der für die Substanz I vorgeschlagenen Struktur sind im Protonenresonanzspektrum des Nikkomycins erkennbar und stimmen mit dem Strukturvorschlag überein.

1. $\text{CH}_3\text{-CH}$: Auftreten eines Dubletts bei 0,63 ppm mit $J = 6$ Hz. Aus der chemischen Verschiebung läßt sich ableiten, daß die Methylgruppe weder zu einer Carbonylgruppe noch zu einem Aromaten in α -Stellung steht.

2. Substitution am Pyridinring: Aus der Aufspaltung der drei Ringprotonen am Pyridinring ($J_{AB} = 8$ Hz, $J_{BX} = 1-2$ Hz) läßt sich ableiten, daß das isoliert stehende Proton (X) aufgrund der chemischen Verschiebung (8,1 ppm) dem N-Atom benachbart sein muß; die Protonen des AB-Teils (7,0–7,35 ppm) sind in β - bzw. γ -Stellung zum N-Atom.

Wir dürfen damit die Struktur dieser bisher weder in der Natur noch als Syntheseprodukt beschriebenen α -Aminosäure als gesichert ansehen, wobei es den Anschein hat, als ob sie vom Produzenten nicht in sterisch einheitlicher Form produziert wird.

Struktur der Substanzen II und III

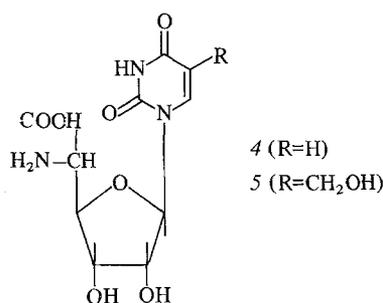
Behandelt man Nikkomycin mit 1 N Trifluoressigsäure bei 100°C , so erhält man bei dünnschichtchromatographischen Untersuchungen der Spaltprodukte auf Cellulose-Fertigplatten (Merck) im Lösungsmittelsystem Äthanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) nach dem Besprühen mit Ninhydrinlösung neben dem Fleck der Substanz I (R_f 0,5) einen weiteren Fleck (R_f 0,1). Entsprechend wird auch bei der Aminosäureanalyse der Spaltprodukte neben Substanz I ein Peak im Bereich der sauren Aminosäuren beobachtet. Die Isolierung dieser Substanz II gelang durch präparative Ionenaustauscher-Chromatographie an Beckman M-72 mit 0,1 M Pyridin-Acetat-Puffer, pH 2,8.

Das Massenspektrum der Substanz II nach Veresterung mit methanolischer HCl und Trifluoracetylierung ist in Abbildung 7 wiedergegeben. Es weist ein Molekül-Ion bei m/e 589 auf. Zur Bestimmung der Anzahl der eingeführten TFA-Gruppen wurde ein entsprechendes Pentafluorpropionylderivat (PFP) hergestellt. Dabei verschiebt sich die Massenzahl des

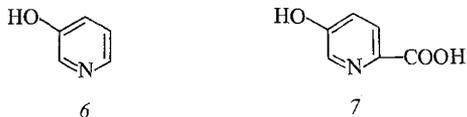
enthält. Das Massenspektrum von Polyoxin C nach Veresterung mit methanolischer Salzsäure und Trifluoracetylierung weist Fragmentierungen auf, die denen der Substanz II völlig analog sind.

Aufschlußreich ist ein Vergleich der bei Behandlung mit 3 N Salzsäure erhaltenen Spaltprodukte von Substanz II und Polyoxin C.

Im Gas-Chromatogramm der TMS-Derivate treten jeweils 2 Komponenten auf: Uracil und Substanz III (Abb. 8 und Tabelle 5) bzw. 5-Hydroxymethyluracil und eine 5-Amino-5-desoxy-Hexuronsäure. Während Isono et al. (1969) für Polyoxin C zeigen konnte, daß sich die 5-Amino-5-desoxyuronsäure von der Allose ableitet, konnte bisher nur nachgewiesen werden, daß die Substanz III zwar der 5-Amino-5-desoxyuronsäure aus Polyoxin C sehr ähnlich aber nicht damit identisch ist. Die Massenspektren der TMS-Derivate unterscheiden sich durch charakteristische Intensitätsunterschiede. Chemische Abbaureaktionen im präparativen Maßstab werden erst nach Isolierung größerer Mengen an Nikkomycin möglich sein.



Interessant ist das Auftreten von zwei Nebenprodukten im Säurehydrolysat von Nikkomycin. Die beiden Verbindungen, 3-Hydroxypyridin (6) und 5-Hydroxypyridin-2-carbonsäure (7),



wurden in Form ihrer TMS- und TFA-Derivate durch kombinierte GC/MS identifiziert. Es lag zunächst die Vermutung nahe, daß es sich bei diesen Nebenprodukten um Zersetzungsprodukte aus der Aminosäure 2 handelt. Paulsen u. Mäckel (1973) konnten jedoch 7 als stabiles Reaktionsprodukt bei der Säurebehandlung von 5-Amino-5-desoxy-L-iduronsäure nachweisen. Es ist also anzunehmen, daß sich 7 in analoger Weise aus dem 5-Amino-5-desoxyuronsäure-Molekül des Nikkomycins bildet. Das 3-Hydroxypyridin (6) könnte aus 7 durch Decarboxylierung entstehen.

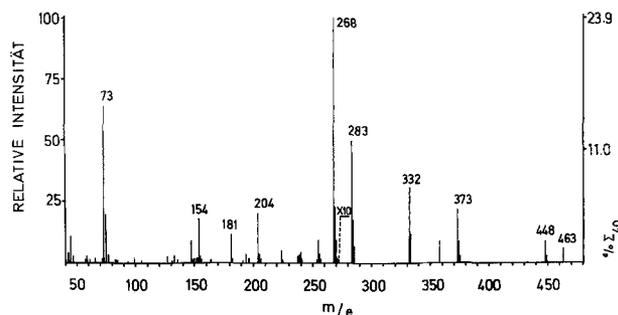


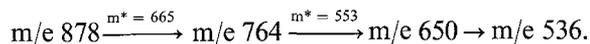
Abb. 8. Massenspektrum des TMS-Derivates der Substanz III

Struktur der Substanz IV (Peptid)

Der Versuch, das Gesamtmolekül Nikkomycin nach Herstellung eines flüchtigen Derivates massenspektrometrisch zu untersuchen, führte bisher nicht zum gewünschten Erfolg, ergab aber weitere Strukturhinweise. Die Derivate, die bei der Trimethylsilylierung von Nikkomycin mit verschiedenen Silylierungsmitteln erhalten wurden, ließen bei der Aufnahme von Massenspektren nur Zersetzungsprodukte, z. B. das Derivat von 2 erkennen. Nach der Methylierung von Nikkomycin mit methanolischer Salzsäure und anschließender Acylierung mit Trifluoressigsäureanhydrid wurde das in Abbildung 9 dargestellte Massenspektrum erhalten.

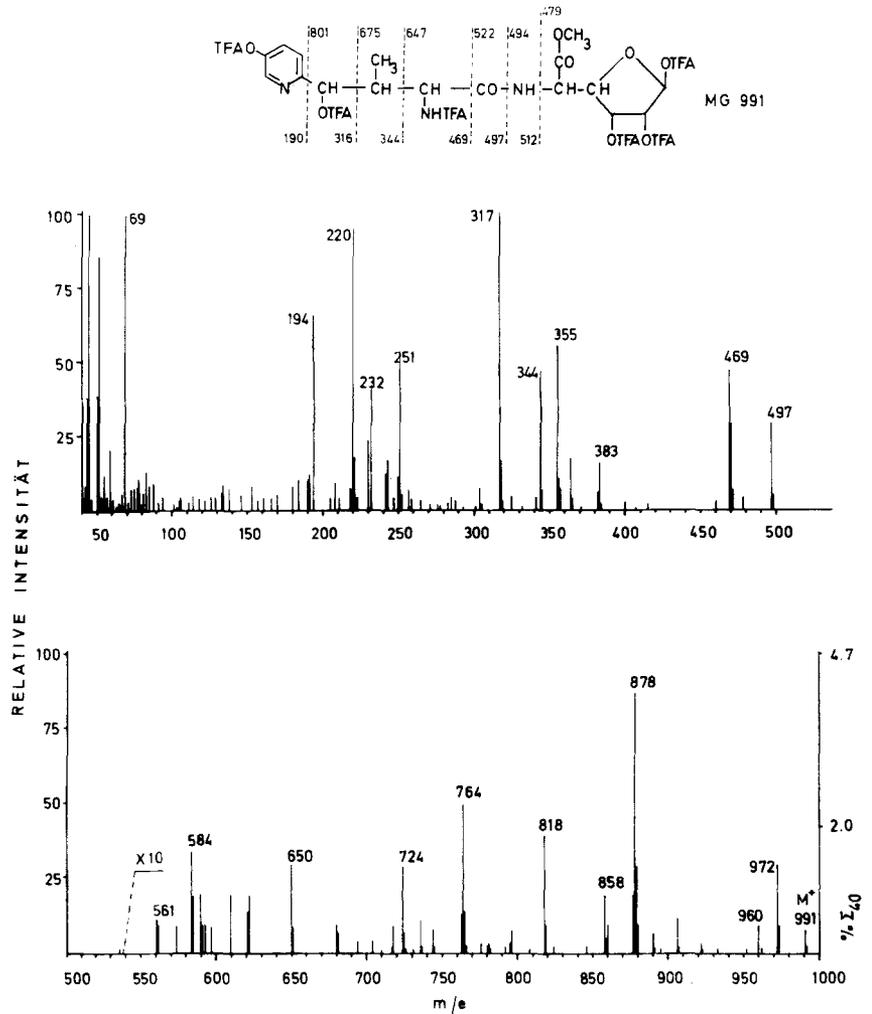
Das Massenspektrum und das durch den Molekülpeak bei m/e 991 angezeigte Molekulargewicht läßt sich mit dem Trifluoracetylderivat des Dipeptids aus der Aminosäure (Substanz I) und der Aminosäure (Substanz III) vereinbaren (Struktur 8). Dabei bildet offenbar die Aminosäure 2 den N-Terminus, was aus den Fragment-Ionen der Massenzahl 497 und 469 eindeutig hervorgeht (s. Fragmentierungs-Schema, Abb. 9).

Der obere Massenbereich wird durch die Fragmentierung des Zuckerderivates bestimmt (König et al., 1973), wobei nach Abspaltung eines CF_3COO -Radikals zu m/e 878 nacheinander mehrere Trifluoressigsäuremoleküle eliminiert werden:

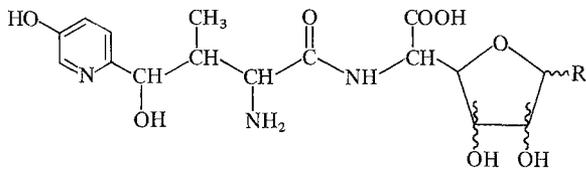


Im Massenbereich unter m/e 500 überlagern sich die Fragmentierungen der Aminosäure 2 (m/e 497, 469, 355, 344, 317, 230, 220, s. Tabelle 4) und der Aminouronsäure (m/e 364, 251, 191). Unter den Bedingungen der Derivatbildung wird offenbar die N-glycosidische Bindung zwischen Uracil und Aminouronsäure weitgehend gespalten. Aus den sich überlappenden Struktureinheiten des Nucleosidderivates 6

Abb.9. Massenspektrum der Substanz, die nach Veresterung und Trifluoracetylierung von Nikkomycin erhalten wird



und des Peptids 8 läßt sich nun auch die Struktur von Nikkomycin (9) ableiten.



8 (R=OH)

9 (R=Uracil)=Nikkomycin

Eichkurven

Vom reinsten Präparat Nikkomycins wurden durch eine Verdünnungsreihe Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Alle so erhaltenen Lösungen wurden im Plattendiffusionstest auf ihre antibiotischen Aktivitäten geprüft. Abbildung 10 zeigt die Eichkurve für *Mucor hiemalis*(+/-). Zusätzlich sind

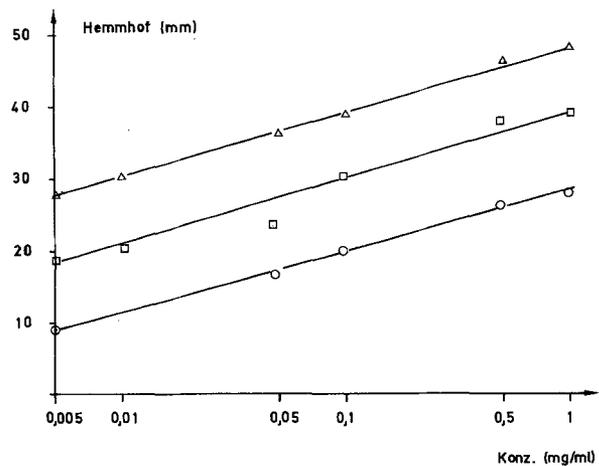


Abb.10. Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von dem dekadischen Logarithmus der Nikkomycinkonzentration. Hemmung der Zygosporienbildung bei *Mucor hiemalis*(+/-) (Δ—Δ). Hemmung des Luftmycelwachstums bei *Mucor hiemalis*(+) (□—□) und (-) (○—○)

Tabelle 6. Minimale Hemmkonzentration (MHK) Nikkomycins im Plattendiffusionstest. T = Testanordnung (s. Methodenteil, 1–3); K = Keulenbildung (+ soweit beobachtet)

Organismus	T	K	MHK (µg/ml)
Oomycetes	2.		
<i>Aphanomyces stellatus</i>			> 100
<i>Phytophthora infestans</i>			> 100
<i>Pythium debaryanum</i>			> 100
<i>Saprolegnia asterophora</i>			> 100
<i>Sapromyces elongatus</i>			> 100
Zygomycetes	1.		
<i>Basidiobolus microsporus</i>			10
<i>Mortierella isabellina</i>			10
<i>Mucor hiemalis</i> (+)			1
<i>Mucor hiemalis</i> (-)			5
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> (+)			10
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> (-)			50
<i>Rhizopus circinans</i> (+)			1
<i>Rhizopus circinans</i> (-)			1
Ascomycetes und Deuteromycetes			
Euascomycetidae	1.		
<i>Aspergillus fumigatus</i>			100
<i>Microsporum gypseum</i>			> 100
Helotiales	2.		
<i>Botrytis cinerea</i>		+	5
<i>Sclerotinia fructicola</i>		+	10
Moniliales	2.		
<i>Thielaviopsis basicola</i>		+	10
Melanconiales			
<i>Fusarium larvarum</i>	1.		50
<i>Fusarium oxysporum</i>	1.		10
<i>Colletotrichum trifolii</i>	2.	+	5
Pseudosphaeriales	2.		
<i>Cercospora beticola</i>		+	5
Endomycetidae			
Endomycetales	3.		
<i>Eremothecium ashbyi</i>			> 100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			100
Basidiomycetes			
<i>Ustilago maydis</i>	3.		50
<i>Rhizoctonia solani</i>	2.	+	10

die Hemmhofdurchmesser des Luftmycelwachstums für den (+)- und (-)-Stamm getrennt in Eichkurven dargestellt. Es fällt einerseits die unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Stämme untereinander auf, als auch die größere Empfindlichkeit der Hemmung der Zygosporienbildung gegenüber der Hemmung der Luftmycelien.

Wirkungsspektrum

Es wurde versucht, mit den Organismen für das Wirkungsspektrum einen Querschnitt durch das

System der Pilze zu ziehen (Tabelle 6). Bakterien, gram-negative und gram-positive, waren gegen Nikkomycin unempfindlich.

Einfluß Nikkomycins auf die DNS-, RNS-, Protein- und Chitinsynthese in vivo

Bei den Ergebnissen der Einbauversuche mit radioaktiven Vorstufen der DNS-, RNS- und Proteinsynthese gilt zu bedenken, daß lediglich die Radioaktivität des mit kalter Trichloressigsäure fällbaren Materials gemessen wurde. Mögliche Störeffekte, wie Metabolisierung der jeweiligen Vorstufen, können nicht erfaßt werden.

Anders verhält es sich bei den Versuchen zur Chitinsynthese in vivo. Die Bedingungen, denen die entnommenen Proben ausgesetzt wurden (5% KOH, 95°C, 4 h), sollten außer bei Chitin, Chitosan und Cellulose zur Hydrolyse der meisten polymeren Verbindungen geführt haben. Die gemessene Radioaktivität auf den Membranfiltern kann mit großer Sicherheit dem gebildeten Chitin gleichgesetzt werden.

Cycloheximid wurde bei den Einbauversuchen neben Nikkomycin eingesetzt. Es hemmt primär die Proteinsynthese bei Eukaryonten (Siegel u. Sisler, 1964a, b); die Hemmung der RNS-Synthese scheint die Folge davon zu sein (de Kloet, 1966).

DNS-Synthese

Mit radioaktivem Thymidin konnte kein Einbau in Zellen von *Mucor hiemalis*(+) erreicht werden. Störl u. Venner haben 1972 für *Proteus mirabilis* einen verbesserten Einbau von Thymidin in DNS mit Hilfe der Zugabe von Desoxyadenosin beschrieben. Auch mit Desoxyadenosin im Versuchsansatz konnte hier kein Einbau festgestellt werden. Die Verwendung von Thymidinmonophosphat anstelle von Thymidin führte ebenfalls zu keinem Erfolg, so daß keine Aussage gemacht werden kann, ob Nikkomycin die DNS-Synthese hemmt.

RNS-Synthese

Nach 210 min ist die RNS-Synthese durch Nikkomycin um 63%, durch Cycloheximid um 77% gehemmt (Abb. 11).

Proteinsynthese

Wie Abbildung 12 zeigt, hemmt Nikkomycin 210 min nach Versuchsbeginn die Proteinsynthese zu 40%, Cycloheximid zu 80%. Bis zur 120. min stimmen die Werte des Kontrollansatzes und des Ansatzes mit Nikkomycin gut überein. Die dann erst einsetzende

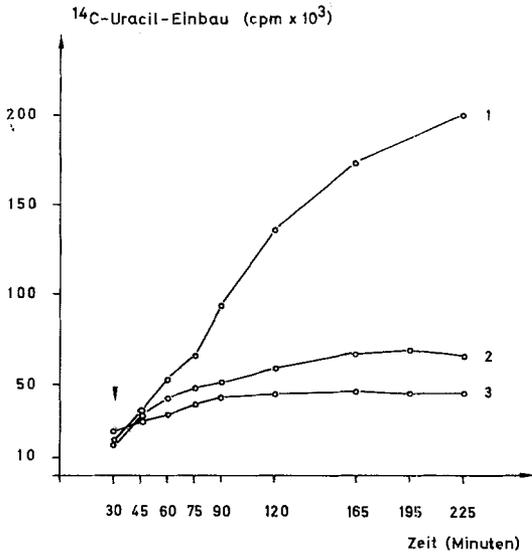


Abb. 11. Wirkung von Nikkomycin auf die RNS-Synthese in Zellen von *Mucor hiemalis*(+). ¹⁴C-Uracil-Einbau (cpm) gegen die Zeit aufgetragen. Antibioticumzugabe: Pfeil. 1 Kontrolle; 2 Nikkomycin 0,5 µg/ml; 3 Cycloheximid 10 µg/ml

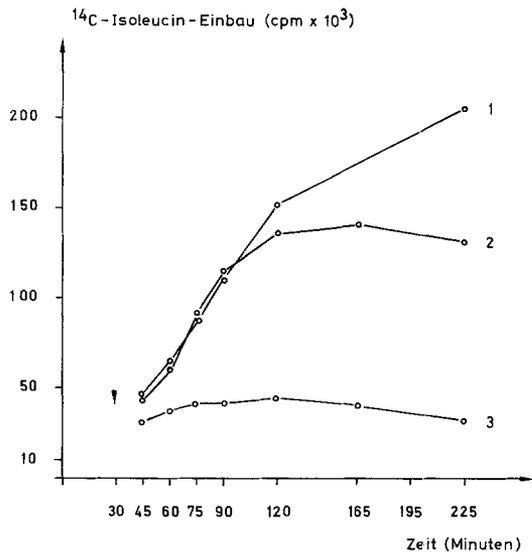


Abb. 12. Wirkung von Nikkomycin auf die Proteinsynthese in Zellen von *Mucor hiemalis*(+). ¹⁴C-Isoleucin-Einbau (cpm) gegen die Zeit aufgetragen. Antibioticumzugabe: Pfeil. 1 Kontrolle; 2 Nikkomycin 0,5 µg/ml; 3 Cycloheximid 10 µg/ml

Hemmung durch Nikkomycin scheint die Folge der Hemmung der RNS-Synthese zu sein.

Chitinsynthese

Bei Zugabe von Nikkomycin zum Versuchsansatz 30 min nach Versuchsbeginn ist die Chitinsynthese 180 min später um 80% gehemmt. Cycloheximid verursacht bei gleichem Zeitablauf eine Hemmung

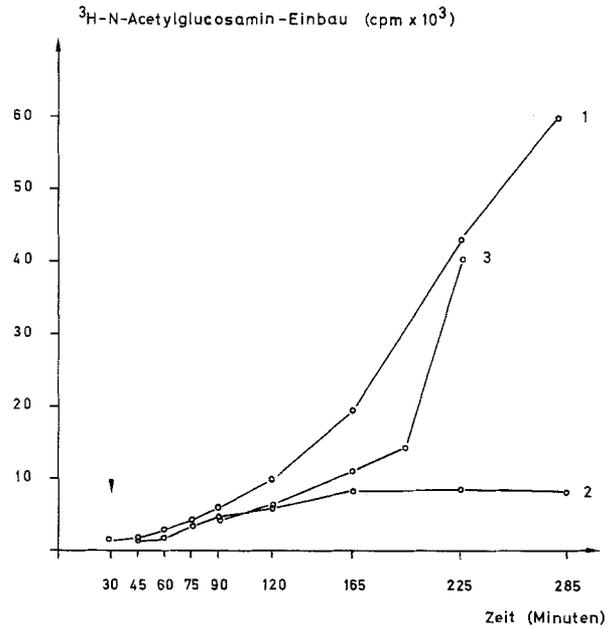


Abb. 13. Wirkung von Nikkomycin auf die Chitinsynthese in Zellen von *Mucor hiemalis*(+). ³H-N-Acetyl-D-glucosamin-Einbau (cpm) gegen die Zeit aufgetragen. Antibioticumzugabe: Pfeil. 1 Kontrolle; 2 Nikkomycin 0,5 µg/ml; 3 Cycloheximid 10 µg/ml

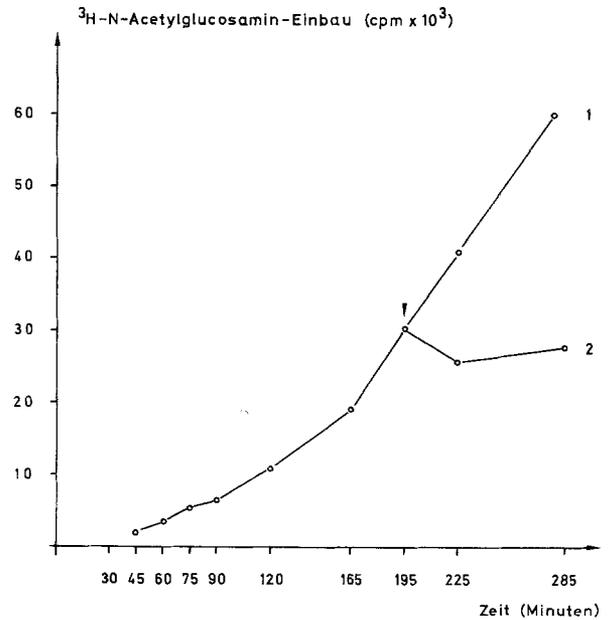


Abb. 14. Wirkung von Nikkomycin auf die Chitinsynthese in Zellen von *Mucor hiemalis*(+). ³H-N-Acetyl-D-glucosamin-Einbau (cpm) gegen die Zeit aufgetragen. Antibioticumzugaben: Pfeil. 1 Kontrolle; 2 Nikkomycin 0,5 µg/ml

von 8%. Das Ergebnis des Einbauversuchs zeigt Abbildung 13. Wird Nikkomycin erst 195 min nach Versuchsbeginn zugegeben, führt das zur sofortigen Hemmung (Abb. 14).

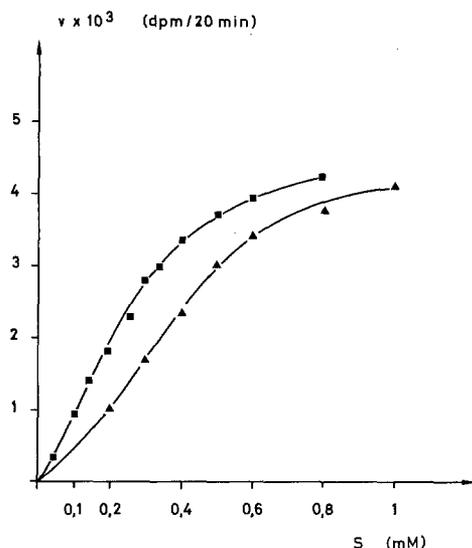


Abb. 15. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit [v : Bildung von Chitin (dpm)/20 min] von der UDP-GlcNAc-Konzentration [S (mM)]. ■ Kontrolle; ▲ Nikkomycin 0,25 $\mu\text{g/ml}$

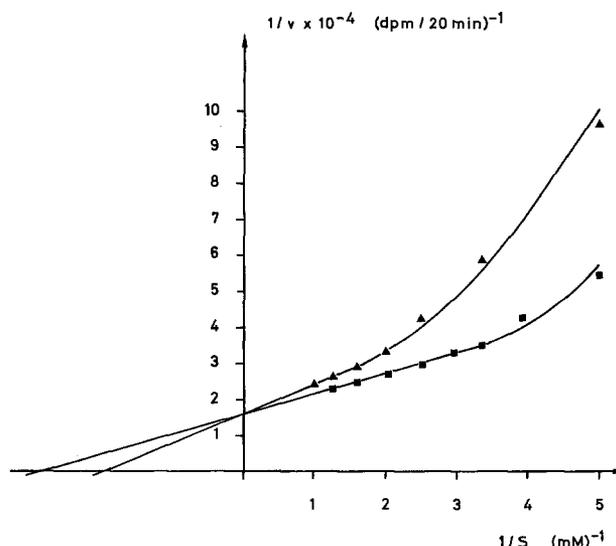


Abb. 16. Lineweaver-Burk-Diagramm der Werte aus Abbildung 15

Aus den Einbauversuchen ergibt sich erwartungsgemäß, daß Cycloheximid die Protein- und RNS-Synthese hemmt, während es die Chitinsynthese nahezu unbeeinflusst läßt. Von daher sollte bestätigt sein, daß durch die verwendete Versuchsanordnung diese Makromolekülsynthesen erfaßt werden können.

Einfluß Nikkomycins auf die Chitinsynthese in vitro

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit [v : Bildung von Chitin (dpm)/20 min] von der Substratkonzentration [S : UDP-GlcNAc (mM); spezifische Aktivität 500 $\mu\text{Ci/mmol}$] wurde untersucht. Das geschah in einer Kontrollreihe ohne und in einer Versuchsreihe mit Nikkomycin (Endkonzentration 0,25 $\mu\text{g/ml}$). Wie Abbildung 15 zeigt, ist in sehr schwacher Ausprägung ein sigmoider Kurvenverlauf der Sättigungskurve des Kontrollansatzes zu beobachten. In Gegenwart von Nikkomycin ist die Sigmoidität des Kurvenverlaufs verstärkt. In Abbildung 16 sind die Werte aus Abbildung 15 in einem Diagramm nach Lineweaver u. Burk (1934) wiedergegeben. Die Werte hoher UDP-GlcNAc-Konzentrationen in reziproker Auftragung gegen die reziproken Werte der Reaktionsgeschwindigkeit ergeben in beiden Ansätzen linearen Verlauf. Bei niedrigen Konzentrationen verlaufen die Werte in nach oben konkav gekrümmten Kurven. Der gemeinsame Schnittpunkt beider Kurven auf der $1/v$ -Achse läßt auf einen kompetitiven Hemmungsmechanismus schließen. Aus dem Schnittpunkt konnte die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt werden: 6250 dpm/20 min.

Die Verlängerung der Geraden des Kontrollansatzes im negativen Bereich der Koordinaten führt zum Schnittpunkt mit der $1/S$ -Achse und gibt den $-1/K_m$ -Wert für UDP-GlcNAc an. Die Michaelis-Konstante ist 0,35 mM.

DISKUSSION

Beziehungen zu anderen Antibiotica

Mit Nikkomycin verwandt sind: Polyoxine, Ablastmycin (Hashimoto et al., 1968), Bulgerin (Shoji et al., 1970) und das Antibioticum 24010 (Mizuno et al., 1971). Das sind Substanzen, die außer einem charakteristischen UV-Spektrum (das auf eine Purin- oder Pyrimidinkomponente im Molekül hinweist) die antibiotische Wirkung gegen einige phytopathogene Pilze gemeinsam haben.

Die Identität Nikkomycins mit den Polyoxinen (Unterscheidungsmerkmal: unterschiedliche Stabilität, UV-Spektrum), Ablastmycin (UV-Spektrum, Summenformel) und dem Antibioticum 24010 (UV-Spektrum, Summenformel) kann ausgeschlossen werden. Obwohl Nikkomycin im UV-Spektrum wie auch in den R_f -Werten bei der Dünnschicht- und Papierchromatographie mit Bulgerin gut übereinstimmt, ist auch hier eine Identität auszuschließen (Bulgerin: $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{10}\text{N}_4$ - MG 444). Bulgerin wurde aus dem Kulturfiltrat von *Streptomyces aburaviensis* var. *tuftiformis* teilweise gereinigt. Vergleichbare Präparate von Nikkomycin und Bulgerin zeigten bei der Chromatographie an dem Kationenaustauscher M-72 ein unterschiedliches Elutionsverhalten.

Tabelle 7. Struktur der Polyoxine (Isono et al., 1969; Hori et al., 1974)

Grundkörper	Polyoxin	R ₁	R ₂	R ₃	
	A	-CH ₂ OH	CH ₃ CH=	-OH	
	B	-CH ₂ OH	-OH	-OH	-OH
	D	-COOH	-OH	-OH	-OH
	E	-COOH	-OH	-OH	-H
	F	-COOH	-COOH	CH ₃ CH=	-OH
	G	-CH ₂ OH	-OH	-OH	-H
	H	-CH ₃	-CH ₃	CH ₃ CH=	-OH
	J	-CH ₃	-OH	-OH	-OH
	K	-H	-H	CH ₃ CH=	-OH
	L	-H	-OH	-OH	-OH
	M	-H	-OH	-OH	-H
	C			R -OH	
	I			CH ₃ CH=	

Die vorliegenden Ergebnisse erlauben, Nikkomycin als neues Antibioticum anzusehen.

Eine Gegenüberstellung der in Tabelle 7 zusammengestellten Formeln der bisher in der Struktur aufgeklärten Polyoxine zeigt sowohl die Verwandtschaft wie auch die Unterschiede deutlich. Das Nikkomycin weicht wesentlich ab von allen bisher bekannten Polyoxinen, so daß sich ein eigenständiger Name rechtfertigt.

In chemischer Hinsicht stellen die Nucleosid-Antibiotica (Zusammenstellung, s. Suhadolnik, 1970) eine relativ geschlossene Gruppe dar, die sehr zahlreiche Glieder umfaßt. In bezug auf Wirkungsweise sind die Nucleosid-Antibiotica so heterogen wie möglich, wobei für zahlreiche Glieder dieser Gruppe sich schon von der molekularen Wirkungsweise her eine Anwendung in der Humanmedizin oder eine andere breite Anwendung verbietet.

Wirkungsweise

Die Bildung von Keulen bzw. Protoplasten ähnlichen Gebilden bei *Botrytis* und einigen anderen Pilzen ist ein erster Hinweis auf einen Angriffsort in der Zellwandsynthese. Nachdem sich alle chitinfreien Oomyceten resistent erwiesen, lag eine direkte Überprüfung der Chitinsynthese nahe.

Glaser u. Brown gelang 1957 die erste Chitinbiosynthese mit zellfreien Extrakten von *Neurospora crassa*. Sie zeigten, daß UDP-GlcNAc die unmittelbare Vorstufe für die Chitinsynthese ist. Andere Autoren haben dies in ihren Arbeiten bestätigt. McMurrough et al. (1971) und McMurrough u. Bartnicki-Garcia (1971) fassen die bisherigen Ergebnisse zusammen und beschreiben folgenden Biosyntheseweg für Chitin:

Eine ATP-abhängige Kinase (N-Acetyl-D-glucosamininkinase) phosphoryliert GlcNAc in Position 6.

Da bisher nur GlcNAc-1-P als Komponente der Pyrophosphorylase-Reaktion bekannt ist (UDP-N-acetyl-D-glucosaminpyrophosphorylase, Glaser u. Brown, 1955), muß die Umwandlung von GlcNAc-6-P in GlcNAc-1-P durch N-Acetyl-D-glucosaminphosphomutase erfolgt sein. Dieses Enzym wurde schon 1953 von Leloir u. Cardini und von Reissig (1956) bei *Neurospora crassa* beschrieben. Als Cofaktor benötigt es Glucose-1,6-diphosphat. UDP-N-acetyl-D-glucosaminpyrophosphorylase führt mit UTP die Synthese zu UDP-GlcNAc aus, von welchem schließlich GlcNAc durch Chitinsynthetase in Chitin eingebaut wird. Es ist unklar, ob bei dem letzten Syntheseschritt ein Lipidfaktor beteiligt ist. McMurrough u. Bartnicki-Garcia (1971) fanden eine 2–6fache Stimulierung der Chitinbiosynthese bei *Mucor rouxii* durch Lipidrohextrakte, jedoch keinen Einbau von Radioaktivität (von UDP-¹⁴C-GlcNAc) in einen möglichen Lipidcofaktor.

Die Versuche mit der partikulären Chitinsynthetase machen es wahrscheinlich, daß Nikkomycin ein kompetitiver Hemmstoff zu UDP-GlcNAc ist.

Aus dem v/S -Diagramm geht ein schwächer sigmoider Kurvenverlauf für den Kontrollansatz, eine verstärkte Sigmoidität der Sättigungskurve des Ansatzes mit Nikkomycin hervor. Der sigmoide Verlauf der Sättigungskurven im v/S -Diagramm und ebenfalls die reziproke Darstellung deuten auf positiv kooperatives Verhalten des UDP-GlcNAc hinsichtlich seiner Affinität zur Chitinsynthetase. Nach Betz (1974) bedeutet das: Die Bindung von Substratmolekülen verändert das Enzym so, daß seine Affinität zum Substrat wächst. Kooperatives Verhalten wurde bisher nur bei Enzymen gefunden, deren Molekül aus mehreren Peptidketten zusammengesetzt ist und die mehrere katalytische Zentren aufweisen (Betz, 1974).

Die Ergebnisse dieser Versuche stehen in Übereinstimmung mit Befunden von McMurrough u. Bartnicki-Garcia (1971). Die spezifische Aktivierung der Chitinsynthese durch GlcNAc und die damit verbundene Reduzierung des ohne GlcNAc sigmoiden Kurvenverlaufs wird beschrieben. Daraus wird gefolgert, daß außer GlcNAc auch UDP-GlcNAc ein positiv-allosterischer Effektor ist. Nikkomycin könnte somit als negativ-allosterischer Effektor angesehen werden.

Ein Vergleich der bisher ermittelten Michaelis-Konstanten für UDP-GlcNAc bei der Chitinbiosynthese mit der Konstante aus dieser Arbeit (Tabelle 8) ergibt, besonders bei den Werten aus den Versuchsansätzen mit Enzympräparationen aus Zygomyceten, gute Übereinstimmung.

Neben der Wirkung von Nikkomycin auf die Chitinsynthese wurde eine starke Hemmung der RNS-Synthese beobachtet. Dabei bleibt offen, ob die Hemmung durch einen Angriff entweder auf die DNS-

Tabelle 8. Bisher ermittelte Michaelis-Konstanten für UDP-GlcNAc bei der Chitinbiosynthese

Organisms	K_m (mM)	
<i>Allomyces macrogynus</i>	1,20	Porter u. Jaworski (1965)
<i>Nurospora crassa</i>	1,43	Endo et al. (1970)
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	0,6–0,9	Keller u. Cabib (1971)
<i>Mucor rouxii</i>	0,50	McMurrough et al. (1971)
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	0,60	Jan (1974)
<i>Mucor hiemalis</i>	0,35	diese Arbeit

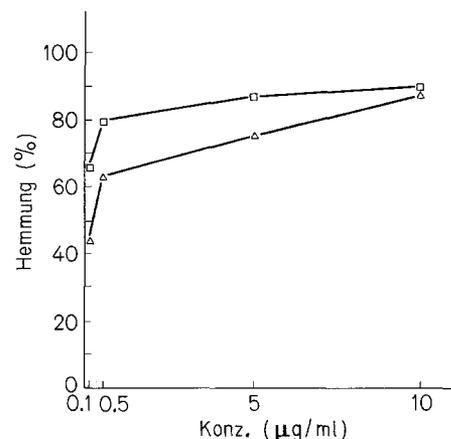


Abb. 17. Abhängigkeit der Stärke der Hemmung von der Nikkomycinkonzentration bei der RNS-Synthese (Δ—Δ) und bei der Chitinsynthese (□—□)

Matrize oder auf die RNS-Polymerase zustande kommt. Ebenso wäre ein Eingriff in die Phosphorylierung der RNS-Vorstufen denkbar. Als Ursache für diese Hemmung können folgende Punkte diskutiert werden:

1. Die Hemmung der RNS-Synthese ist eine Folge der Hemmung der Chitinsynthese. Dies würde voraussetzen, daß eine Koppelung zwischen den Synthesen der beiden Makromolekültypen besteht.

Für diese Möglichkeit sprechen die folgenden Überlegungen:

a) Die maximale Hemmung der Chitinsynthese wird mit geringeren Konzentrationen erreicht als die Hemmung der RNS-Synthese, die Größenordnung der Hemmstoffkonzentrationen sind aber gleich (Abb. 17).

b) Werden die Versuche mit keimenden Sporen gemacht, die eine erhöhte RNS-Synthese, aber eine geringe Chitinsynthese aufweisen, so findet man eine viel geringere Hemmung der RNS-Synthese als bei Versuchen mit wachsendem Mycel.

2. Die Hemmung der RNS-Synthese könnte unabhängig von der Hemmung der Chitinsynthese sein. Da Nucleosid-Antibiotica an ganz verschiedenen Stellen angreifen, ist auch diese Möglichkeit in Betracht zu ziehen.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung der Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 76, Herrn Professor Dr. Keller-Schierlein, Eidgen. Techn. Hochschule, Zürich, für die Mithilfe bei der Interpretation der Protonenresonanzspektren und Herrn Dr. Y. Yasuda, Shionogi Research Laboratory, Shionogi and Co., Ltd., Fukushima-ku, Osaka, Japan, für die Überlassung von Polyoxinen.

LITERATUR

- Bartnicki-Garcia, S., Lippman, E.: Inhibition of *Mucor rouxii* by polyoxin D: Effect on chitin synthetase and morphological development. *J. gen. Microbiol.* **71**, 301–309 (1972)
- Bayer, E., Gugel, K. H., Hägele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., König, W. A., Zähler, H.: Phosphinothricin und Phosphinothricyl-Alanyl-Alanin. *Helv. chim. Acta* **55**, 224–239 (1972)
- Betina, V., Betinova, M., Kutkova, M.: Effect of cyanein on growth and morphology of pathogenic fungi. *Arch. Mikrobiol.* **55**, 1–16 (1966)
- Betz, A.: *Enzyme. Gewinnung, Analyse, Regulation.* Weinheim: Verlag Chemie 1974
- Corbaz, R., Ettliger, L., Keller-Schierlein, W., Zähler, H.: Zur Systematik der Actinomyceten. 1. Über Streptomyceten mit rhodomycinartigen Pigmenten. *Arch. Mikrobiol.* **25**, 325–332 (1957)
- Endo, A., Kakiki, K., Misato, T.: Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D. *J. Bact.* **104**, 189–196 (1970)
- Fuller, M. S., Barshad, I.: Chitin and cellulose in the cell walls of *Rhizidiomyces* sp. *Amer. J. Bot.* **47**, 105–109 (1960)
- Gale, G. R.: Effects of the antifungal peptides Ro-27758 on morphology of *Mucor corymbifera*. *J. Bact.* **85**, 833–837 (1963)
- Glaser, L., Brown, D. H.: The enzymatic synthesis in vitro of hyaluronic acid chains. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **41**, 253–260 (1955)
- Glaser, L., Brown, D. H.: The synthesis of chitin in cell-free extracts of *Neurospora crassa*. *J. biol. Chem.* **228**, 729–742 (1957)
- Gottlieb, D., Carter, H. E., Lung-chi Wu, Sloneker, J. H.: Inhibition of fungi by filipin and its antagonism by steroly. *Phytopathology* **50**, 594–603 (1960)
- Hashimoto, T., Kito, M., Takeuchi, T., Hamada, M., Maeda, K., Okami, Y., Umezawa, H.: Ablastmycin, a new anti-pruricularia antibiotic. *J. Antibiot. A* **21**, 37–43 (1968)
- Hori, M., Kakiki, K., Misato, T.: Interaction between polyoxin and active center of chitin synthetase. *Agr. Biol. Chem.* **38**, 699–705 (1974)
- Hütter, R.: *Systematik der Streptomyceten.* Basel-New York: Karger 1967
- Hütter, R., Keller-Schierlein, W., Nüesch, J., Zähler, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 48. Mitteilung. Scopamycine. *Arch. Mikrobiol.* **51**, 1–8 (1965)
- Hütter, R., Poralla, K., Zachau, H. G., Zähler, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 51. Mitteilung. Über die Wirkungsweise von Borrelidin-Hemmung des Threonineinbaus in sRNS. *Biochem. Z.* **344**, 190–196 (1966)
- Isono, K., Asahi, K., Suzuki, S.: Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. XIII. The structure of polyoxins. *J. Amer. chem. Soc.* **91**, 7490–7505 (1969)
- Isono, K., Kobinata, K., Suzuki, S.: Isolation and characterization of polyoxins J, K and L, new components of polyoxin complex. *Agr. Biol. Chem.* **32**, 792–793 (1968)
- Isono, K., Nagatsu, J., Kawashima, Y., Suzuki, S.: Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. Part I. Isolation and characterization of polyoxins A and B. *Agr. Biol. Chem.* **29**, 848–854 (1965)
- Isono, K., Nagatsu, J., Kobinata, K., Sasaki, K., Suzuki, S.: Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. Part V. Isolation and characterization of polyoxins C, D, E, F, G, H and I. *Agr. Biol. Chem.* **31**, 190–199 (1967)
- Jan, Y. N.: Properties and cellular localization of chitin synthetase in *Phycomyces blakesleeana*. *J. biol. Chem.* **249**, 1973–1979 (1974)
- Keller, F. A., Cabib, E.: Chitin and yeast budding. Properties of chitin synthetase from *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. biol. Chem.* **246**, 160–166 (1971)
- Kirst, G.: Untersuchungen zur Hemmung der Zygosporienbildung bei *Mucor hiemalis*. Dissertation, Universität Tübingen (1971)
- de Kleot, S. R.: Ribonucleic acid synthesis in yeast. The effect of cycloheximid on the synthesis of ribonucleic acid in *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochem. J.* **99**, 566–581 (1966)
- Kneifel, H., König, W. A., Wolf, G., Zähler, H.: Metabolic products of microorganisms. 123.: Thraustomycin, a new antifungal nucleoside antibiotic from *Streptomyces exfoliatus*. *J. Antibiot. A* **27**, 20–27 (1974)
- König, W. A., Bauer, H., Voelter, W., Bayer, E.: Gaschromatographie und Massenspektrometrie von trifluorcetylierten Kohlehydraten. *Chem. Ber.* **106**, 1905–1979 (1973)
- König, W. A., Smith, L. C., Crain, P. F., McCloskey, J. A.: Mass spectrometry of trifluoroacetyl derivatives of nucleosides and hydrolysates of deoxyribonucleic acids. *Biochemistry* **10**, 3968–3979 (1971)
- König, W. A., Zech, K., Uhmman, R., Voelter, W.: Massenspektrometrische Untersuchungen von Analogen des Adenosins. *Chem. Ber.* **105**, 262–272 (1972)
- Leloir, L. F., Cardini, C. E.: The biosynthesis of glucosamin. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **12**, 15–22 (1953)
- Lineweaver, H., Burk, D.: The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. chem. Soc.* **56**, 658–666 (1934)
- Links, J., Rombouts, J. R., Keulen, P.: The “bulging factor”, a fungistatic antibiotic produced by a streptomycetes strain, with evidence of an active waterexcreting mechanism in fungi. *J. gen. Microbiol.* **17**, 596–600 (1957)
- Mahl, D.: Ropalocidin, ein antifungisches Antibiotikum aus *Streptomyces violaceoniger*. Dissertation, Universität Tübingen (1971)
- McCloskey, J. A., Stillwell, R. N., Lawson, A. M.: Use of deuterium-labeled trimethylsilyl derivatives in mass spectrometry. *Analyt. Chem.* **40**, 233–236 (1968)
- McMurrough, I., Bartnicki-Garcia, S.: Properties of a particulate chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *J. biol. Chem.* **246**, 4008–4016 (1971)
- McMurrough, I., Flores-Carreón, A., Bartnicki-Garcia, S.: Pathway of chitin synthesis and cellular localization of chitin synthetase in *Mucor rouxii*. *J. biol. Chem.* **246**, 3999–4007 (1971)
- Mizuno, M., Shimojima, Y., Sugawara, T., Takeda, I.: An antibiotic 24010. *J. Antibiot. A* **24**, 896–899 (1971)
- Müller, A.: Siderochrome aus Mikroorganismen. Dissertation, Universität Tübingen (1968)
- Paulsen, H., Mäkel, E.: Synthese und Reaktionen von 5-Amino-5-desoxy-L-iduronsäure. *Chem. Ber.* **106**, 1525–1536 (1973)
- Porter, C. A., Jaworski, E. G.: Biosynthesis of chitin during various stages in the metamorphosis of *Prodenia eridania*. *J. Insect Physiol.* **11**, 1151–1160 (1965)
- Reissig, J.: Phosphoacetylglucosamine mutase of *Neurospora*. *J. biol. Chem.* **219**, 753–767 (1956)

- Shoji, J., Sakazaki, R., Mayama, M., Kawamura, Y., Yasuda, Y.: A new antibiotic bulgerin, active against phytopathogenic fungi. *J. Antibiot. A* **23**, 295–299 (1970)
- Siddhikol, C., Erbstoesz, J. W., Weisblum, B.: Mode of action of streptolydigin. *J. Bact.* **99**, 151–155 (1969)
- Siegel, M. R., Sisler, H. D.: Site of action of cycloheximide in cells of *Saccharomyces pastorianus*. I. Effects of the antibiotic on cellular metabolism. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **87**, 70–82 (1964a)
- Siegel, M. R., Sisler, H. D.: Site of action of cycloheximide in cells of *Saccharomyces pastorianus*. II. The nature of inhibition of protein synthesis in a cell-free system. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **87**, 83–89 (1964b)
- Störl, K., Venner, H.: Einbau von Thymin und Thymidin in die DNS von *Proteus mirabilis*. *Z. allg. Mikrobiol.* **12**, 479–486 (1972)
- Suhadolnik, R. J.: Nucleoside antibiotics. New York: Wiley 1970
- Weygand, F., Rinno, H.: Serin- und Threonin-Verbindungen. *Chem. Ber.* **92**, 517–527 (1959)
- Wolf, H.: Kirromycin, ein Hemmstoff der Funktion der ribosomalen 30S-Untereinheit. Dissertation, Universität Tübingen (1971)

Eingegangen am 25. September 1975