

**BEITRÄGE ZUR BIOSYNTHESE DER ANTIPARASITÄREN
NATURSTOFFE HORMAOMYCIN UND BORRELIDIN
SOWIE
STRUKTURAUFKLÄRUNG VON
SEKUNDÄRMETABOLITEN AUS ACTINOMYCETEN**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
MARKUS RADZOM
aus Bad Gandersheim

Göttingen 2006

D 7

Referent: PROF. DR. A. ZEECK

Korreferent: PROF. DR. A. DE MEIJERE

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Juli 2006

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August Universität Göttingen in der Zeit von Januar 2004 bis Mai 2006 unter Anleitung von Herrn PROF. DR. A. ZEECK durchgeführt.

Mein großer Dank gilt Herrn PROF. DR. A. ZEECK für die interessante Aufgabenstellung, sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für viele wertvolle Diskussionen und Anregungen.

INHALTSVERZEICHNIS

A THEORETISCHER TEIL

1 Einleitung	1
1.1 Naturstoffe als Leitstrukturen	1
1.2 Quellen für neue Naturstoffe	8
1.3 Naturstoffe in der Malariatherapie	10
1.4 Aufgabenstellung	14
2 Hormaomycin	15
2.1 Kultivierung von <i>Streptomyces griseoflavus</i> (Stamm W 384)	16
2.2 Chemische und Biologische Verfahren zur Derivatisierung von Naturstoffen	17
2.3 Vorläufer-dirigierte Biosynthese an <i>Streptomyces griseoflavus</i> W 384	21
2.3.1 Variation der 3-(2'-Nitrocyclopropyl)alanin-Einheiten	21
2.3.1.1 Fütterung von 5-Nitronorvalin	22
2.3.1.2 Fütterung von L-Ornithin	26
2.3.1.3 Fütterung von <i>rac</i> -2-(2'-Nitrocyclopropyl)glycin	27
2.3.1.4 Fütterung von 6-Nitronorleucin	31
2.3.1.5 Fütterung von L-5-Nitro-4-thianorvaline	36
2.3.1.6 Fütterung von L- <i>ortho</i> -Nitrophenylalanin	36
2.3.2 Variation der 3-Methylphenylalanin-Einheiten	37
2.3.2.1 Fütterung von fluorierten Phenylalanin-Derivaten	37
2.3.2.2 Fütterung von <i>rac-para</i> -Chlorphenylalanin	39
2.3.2.3 Fütterung von <i>rac-para</i> -Brom-und Nitrophenylalanin	43
2.3.2.4 Fütterung von L-Tyrosin	43
2.3.2.5 Fütterung von <i>rac</i> -Phenylglycin	43
2.3.3 Variation der 5-Chlor- <i>N</i> -hydroxypyrrrolcarbonsäure-Einheit	44
2.3.4 Diskussion der Ergebnisse	45
2.4 Die Biosynthese des Hormaomycins	47
2.4.1 Die frühe Biosynthese nichtribosomaler Peptide	47
2.4.2 Der Mechanismus der (3-Ncp)Ala-Biosynthese	48
2.4.3 Genetische Untersuchungen zur Biosynthese des Hormaomycins	49

2.5 Die Struktur des Hormaomycins	53
2.5.1 Die Struktur von Hormaomycin in Lösung	53
2.5.2 Die Kristallstruktur des Hormaomycins	54
2.5.3 Untersuchung des Zentralions im Hormaomycin	56
2.5.4 Austausch des Zentralions im Hormaomycin	57
2.6 Biologische Aktivitäten	61
2.6.1 Antibakterielle und antimykotische Aktivitäten	61
2.6.2 Antiparasitäre Aktivitäten	62
2.6.3 Quorum sensing	68
3 Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten	69
3.1 Chemisches Screening von Actinomyceten	69
3.1.1 <i>Actinomyces</i> sp. Stamm P4	70
3.1.1.1 Chartreusin (44)	70
3.1.2 <i>Actinomyces</i> sp. Stamm M4-1	71
3.1.2.1 Isoflavone	71
3.1.2.2 Borrelidin (15)	72
3.2 HPLC-DAD Screening	74
3.2.1 <i>Streptomyces</i> sp. Stamm Tü 6319	74
3.2.1.1 Germicidin A (49) und Germicidin B (50)	75
3.2.1.2 SEK4b (47) und AnhydroSEK4b (48)	75
3.2.1.3 Fogacin (46)	77
3.2.1.4 Biologische Aktivitäten der Metaboliten	81
3.2.1.5 Zur Biosynthese der Octaketide 46 , 47 und 48	81
3.2.2 <i>Streptomyces</i> sp. Stamm Tü 2561	84
4 Borrelidin	88
4.1 Allgemeines	88
4.2 Die Biosynthese des Borrelidins	89
4.2.1 Fermentationskurve	93
4.2.2 Fütterung von [1- ¹³ C]Acetat	94
4.2.3 Fütterung von [1- ¹³ C]Propionat	95
4.2.4 Fütterung von [1,2- ¹³ C ₂]Acetat	96
4.2.5 Fütterung von [U- ¹³ C]Glycerin	96
4.2.6 Fütterung von [2- ¹³ C]Acetat	98
4.2.7 Fütterung von [2,3,5,6-d ₄]-, [1- ¹³ C]Tyrosin und d ₃ -Acetat	98
4.2.8 Diskussion der Biosynthese	98

4.3	Vorläufer-dirigierte Biosynthese am Borrelidin	100
4.3.1	Allgemeines	100
4.3.2	Vorläufer-dirigierte Biosynthese an <i>Streptomyces</i> sp. S 1495	101
4.3.3	Diskussion	102
5	Zusammenfassung der Ergebnisse	103
5.1	Untersuchungen am Hormaomycin-Produzenten <i>Streptomyces griseoflavus</i> (Stamm W 384)	103
5.2	Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten	106
5.3	Untersuchungen am Borrelidin-Produzenten <i>Streptomyces</i> sp. S 1495	107
B	EXPERIMENTELLER TEIL	108
1	Allgemeines	108
1.1	Instrumentelle Analytik	108
1.2	Chromatographische Methoden	109
1.3	Mikrobiologische Methoden	111
1.4	Allgemeine Arbeitsvorschriften	113
2	Untersuchungen am Hormaomycin-Produzenten <i>Streptomyces griseoflavus</i> (Stamm W 384)	114
2.1	Stammhaltung	114
2.1.1	Agarplatten	114
2.1.2	Langzeitkonservierung	114
2.1.3	Kultivierung	114
2.2	Isolierung und Charakterisierung von Hormaomycin	115
2.2.1	Untersuchungen des Hormaomycin-Zentralions	115
2.3	Vorläufer-dirigierte Biosynthese an <i>Streptomyces griseoflavus</i> W 384	120
2.3.1	Variation der 3-(2'-Nitrocyclopropyl)alanin-Einheiten	120
2.3.1.1	Isolierung und Charakterisierung der Hormaomycinderivate aus Fütterungsexperimenten mit (NO ₂)Nva und (2-Ncp)Gly	121
2.3.1.2	Isolierung und Charakterisierung der Hormaomycinderivate aus Fütterungsexperimenten mit (NO ₂)Nle	125

2.3.2	Variation der 3-Methylphenylalanin-Einheiten	131
2.3.2.1	Isolierung und Charakterisierung der Hormaomycinderivate aus Fütterungsexperimenten mit <i>para</i> -substituierten Phenylalaninderivaten	131
2.3.2.2	Isolierung und Charakterisierung der Hormaomycinderivate aus Fütterungsexperimenten mit Fluorphenylalaninderivaten	136
2.3.3	Variation der 5-Chlor- <i>N</i> -hydroxypyrrol-2-carbonsäure-Einheit	140
2.4	Untersuchung der Hormaomycin-Biosynthese an <i>E. coli</i> -Mutanten	141
2.4.1	Stammhaltung	141
2.4.1.1	Agarplatten	141
2.4.1.2	Langzeitkonservierung	141
2.4.1.3	Kultivierung	141
2.4.1.4	Aufarbeitung	141
3	Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten	142
3.1	Substanzen aus dem chemischen Screening	142
3.1.1	Stammhaltung	142
3.1.2	Chemisches Screening	142
3.1.3	Substanzen aus <i>Actinomyces</i> sp. Stamm P4	143
3.1.4	Substanzen aus <i>Actinomyces</i> sp. Stamm M4-1	145
3.2	Charakterisierung der Metaboliten aus <i>Streptomyces</i> sp. Stamm Tü 6319	148
3.3	Charakterisierung der Metaboliten aus <i>Streptomyces</i> sp. Stamm Tü 2561	152
4	Untersuchungen an <i>Streptomyces</i> sp. S 1495	153
4.1	Fermentationskurve	153
4.2	Biosyntheseuntersuchungen	153
4.3	Vorläufer-dirigierte Biosynthese	155
C	LITERATURVERZEICHNIS	156

A THEORETISCHER TEIL

1 Einleitung

1.1 Naturstoffe als Leitstrukturen

Zwischen 1900 und 1997 ist die Lebenserwartung in den Industrienationen um mehr als 60 % auf über 76 Jahre gestiegen.¹ Beachtet man hierbei die Hauptursachen der Sterblichkeit, so fällt die dramatische Verringerung der durch Infektionskrankheiten wie Tuberkulose, Lungenentzündung oder Durchfallerkrankungen verursachten Mortalität auf. Zu Anfang des letzten Jahrhunderts waren allein diese drei Krankheitsbilder für 30 % aller Todesfälle verantwortlich, während sie zum heutigen Zeitpunkt nur ca. 1 % (hauptsächlich Lungenentzündung nach Influenzainfektion) hierzu beitragen.² Neben Verbesserungen in der Hygiene und Trinkwasserqualität ist diese Entwicklung vor allem auf die Entdeckung antibiotisch wirksamer Naturstoffe zurückzuführen.

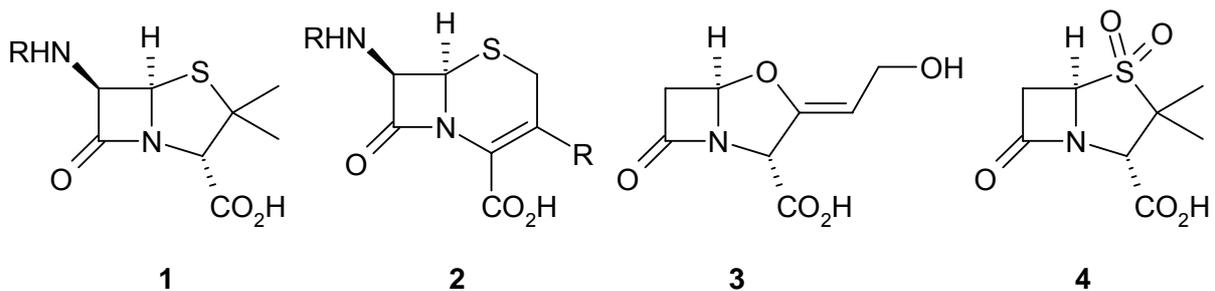
Den Beginn des Zeitalters moderner Antinfektiva leitete A. FLEMING 1928 mit der Entdeckung des Penicillins ein.³ Die Substanz wurde 1941 in der Struktur aufgeklärt und im darauf folgenden Jahr erstmals zur Behandlung von Wundinfektionen bei Soldaten angewandt. Mit diesem ersten Erfolg war der Siegeszug von Sekundärmetaboliten aus Bakterien und Pilzen als Therapeutika nicht mehr aufzuhalten, das „Goldene Zeitalter“ der Antibiotikaforschung war angebrochen.

Die Penicilline (**1**) sind bis heute die erfolgreichste Antibiotika-Substanzklasse und dienen zugleich auch als Leitstruktur. Ausgangspunkt ist das fermentativ gewonnene Penicillin G, welches zu 6-Aminopenicillinsäure deacyliert wurde. Dieses kann anschließend mit verschiedensten Säurederivaten umgesetzt werden, um Substanzen mit verbesserten Eigenschaften zu generieren. Insgesamt beträgt die Zahl der so gewonnenen Penicilline über 10.000.⁴ Mit den Aminoglykosiden⁵, Makroliden⁶, Tetracyclinen⁷, u.a. konnten andere Substanzklassen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen aus Streptomyceten isoliert werden. Die Anwendung dieser Antibiotika führte in den USA bis 1952 zu einem Absinken der Sterblichkeit bei Infektionskrankheiten um jährlich 8.2 %.⁸ Allerdings muss angemerkt werden, dass viele der vermeintlich chronischen Erkrankungen häufig durch Infektionen hervorgerufen werden, aber statistisch als solche nicht erfasst werden. Beispiel hierfür sind durch Chlamydien verursachte koronare Herzkrankheiten.¹

Die beschriebene Entwicklung führte zu der Annahme, dass ein Sieg über die Infektionskrankheiten errungen sei. Wie falsch diese Einschätzung war, zeigte sich ca. 50 Jahre nach der bahnbrechenden Entdeckung von A. FLEMING.

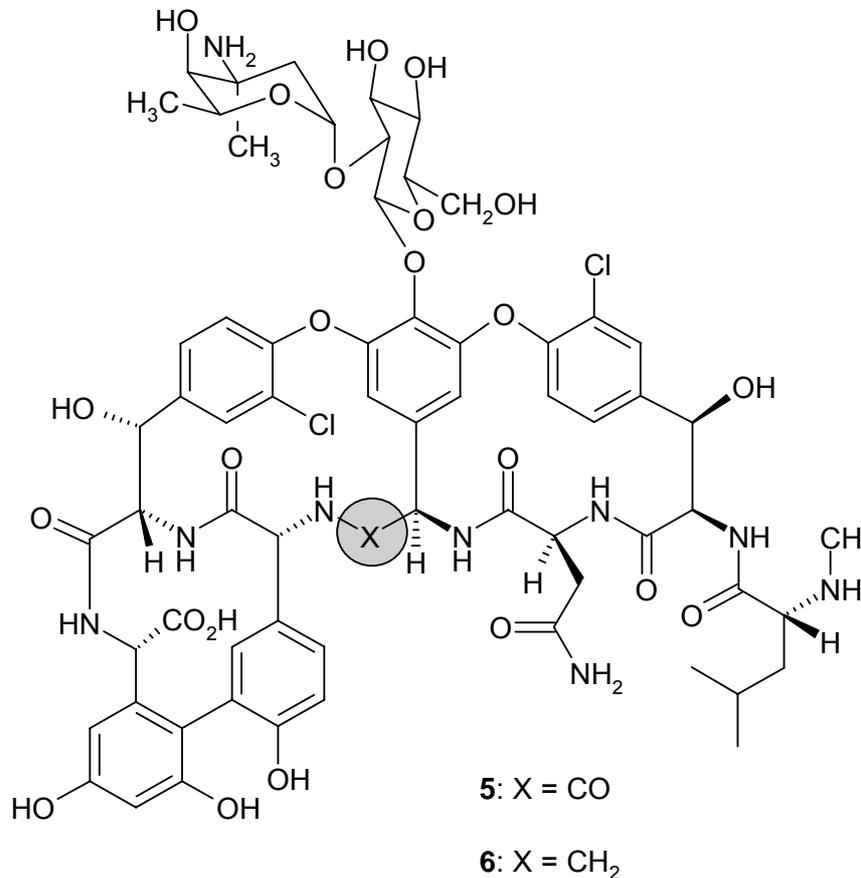
Resistenzentwicklung und ihre Folgen

1981 wurde erstmals seit Einführung der Antibiotikatherapie eine Zunahme der durch Infektionskrankheiten verursachten Todesfälle beobachtet (bis 2002: 4.8 % pro Jahr).¹ Hauptursache hierfür ist die durch den immer häufigeren Einsatz dieser Stoffe entstandene Resistenzausbildung. So entwickeln viele Staphylokokken β -Lactamasen, die in der Lage sind den β -Lactamring der Penicilline zu öffnen, was zu einem Verlust der Aktivität führt. Als Ersatzmedikamente für die Behandlung von Infektionen mit Penicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (PRSA) und anderen Gram-positiven Pathogenen wurden in den sechziger Jahren Methicillin und die aus dem Pilz *Cephalosporium acremonium* isolierten Cephalosporine (**2**)⁹ eingeführt. Erste Resistenzen waren bei Methicillin schon ein Jahr nach der Einführung zu beobachten, heutzutage ist die Substanz bei 50 % der PRSA inaktiv. Während β -Lactamasen bei **2** zuerst keine Ringöffnungen durchzuführen vermochten, führte die Anpassungsfähigkeit der Mikroorganismen später auch hier zur Inaktivierung der Substanzen durch den gleichen Mechanismus wie bei den Penicillinen. Diese Resistenz kann in einigen Fällen durch die in den siebziger Jahren eingeführten Kombinationen von Penicillinen und Cephalosporinen mit β -Lactamaseinhibitoren wie Clavulansäure (**3**) oder Sulbactam (**4**) umgangen werden.¹⁰ Die Inhibitoren **3** und **4** binden kovalent an die β -Lactamasen, welche dadurch inaktiviert werden. Eine zweite Resistenzform gegenüber Penicillinen findet sich in MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) durch die Induktion der Expression zusätzlicher Penicillin Binding Proteins (PBP) durch die Antibiotika selbst.¹¹ Diese neuen PBP's besitzen nur eine geringe Bindungsaffinität gegenüber **1** und **2**.



Als letzte Behandlungsmöglichkeit für MRSA galten lange Zeit Glykopeptide wie das Vancomycin (**5**), für das erst 1986 Resistenzen auftraten. Der Naturstoff **5** greift wie auch **1** und **2** in die Peptidoglycansynthese bakterieller Zellwände ein.¹² Resistenzen gegenüber **5** entwickeln sich durch eine Veränderung der Bindungsstelle. Das D-Ala-D-Ala-Dipeptid des Peptidoglycan-Zellwand Vorläufers wird hierbei gegen D-Ala-D-Lac ausgetauscht, was einem Austausch einer Amid- gegen eine Estergruppe entspricht.¹³ Durch diese Veränderung zum Depsipeptid-Terminus kann **5** nur mit einer 1000fach verringerten Affinität an die Zielstruktur binden.¹⁴ Die hierdurch verringerte Aktivität wird durch das Fehlen der fünften Wasserstoffbrückenbindung zwischen **5** und dem D-Ala-D-Lac-Depsipeptid verursacht und

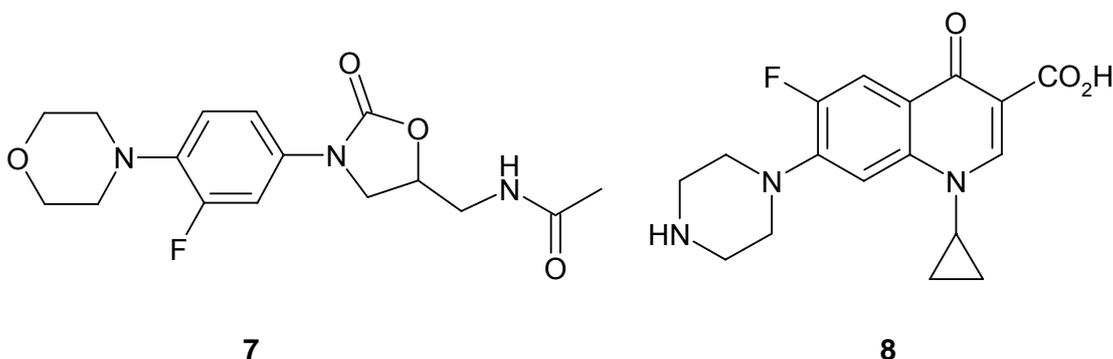
kann durch synthetische Veränderung des Grundgerüsts von **5** aufgefangen werden. So zeigt das $[\psi[\text{CH}_2\text{NH}]\text{Tpg}^4]$ Vancomycinaglykon (**6**) gute Aktivitäten gegen Vancomycin-resistente *Enterococci faecalis*.¹⁵



Zur Therapie Vancomycin-resistenter Bakterien sind in jüngster Zeit das Quinupristin/Dalfopristin Kombipräparat Synercid® (2002) und das synthetisch gewonnene Linezolid (**7**, Handelsname Zyvox®) zugelassen worden. Beide sind „Antibiotika des letzten Ausweges“ für die Behandlung von MDR (Multiple Drug Resistant) Bakterien. Hierbei muss zusätzlich beachtet werden, dass jede Art von Resistenz zu enormen Kosten führt. In den USA werden allein die durch Infektionen mit resistenten Staphylokokken verursachten Therapiekosten auf jährlich 24–36 Milliarden US-\$ geschätzt.¹⁶ Mikroorganismen waren immer in der Lage, sich durch evolutionäre Entwicklung an unwirtliche Umgebungen sowie die Anwesenheit antibiotischer Substanzen anzupassen. Somit werden sich Resistenzen also nie vermeiden lassen. Eine Verlängerung der Phase bis zum ersten Auftreten einer Resistenz kann lediglich durch die Verwendung von Antibiotika mit engem Wirkspektrum und deren moderaten Einsatz erreicht werden. Es gilt hierbei, den durch den Menschen verursachten evolutionären Druck so gering wie möglich zu halten.

Was können wir von Naturstoffen lernen?

Seit Anfang der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts ist zu beobachten, dass pharmazeutische Firmen sich aus der Naturstoffforschung zurückziehen und synthetisch gewonnene Substanzen bevorzugen. Ein Grund hierfür ist die Entwicklung des High-Throughput Screenings. Diese Testsysteme ermöglichen die Prüfung der biologischen Aktivität von tausenden Substanzen pro Tag. Die Naturstoffforschung kann, im Gegensatz zu den riesigen Substanzbibliotheken aus der High-Throughput Synthese¹⁷, diese Quantität nicht erzeugen, da die Kultivierung der Organismen und die Isolierung einzelner Substanzen viel mehr Zeit in Anspruch nimmt. Kombinatorische Synthesemethoden haben in der Wirkstoffforschung bisher nicht zu neuen Leitsubstanzen geführt. Aus der klassischen Wirkstoffsynthese sind in den letzten 20 Jahren jedoch die Fluorchinolone (z.B. Ciprofloxacin, **8**) und Linezolid (**7**) hervorgegangen.



Statistische Untersuchungen über den Zeitraum von 1981 bis 2002 zeigen eine Überlegenheit von Naturstoffen gegenüber rein synthetischen Substanzbibliotheken bei der Wirkstoffsuche. So sind 75 % aller neuen antibakteriellen Substanzen Naturstoffe oder ihre Derivate.¹⁸ Für alle in dieser Zeit neu zugelassenen Arzneien nimmt ihr Anteil 28 %, bei den onkologischen Pharmazeutika fast 50 % ein.

Wie kann die herausragende Stellung von Naturstoffen erklärt werden? Ein großer Unterschied zwischen synthetischen und Naturstoff-Substanzbibliotheken wird bei dem Vergleich ihrer Strukturkomplementarität deutlich, der durch fast alle in dieser Arbeit präsentierten Substanzen anschaulich wird (vgl. z.B. **5** mit **7**).¹⁹ So ist der Anteil von Stickstoff-, Schwefel- sowie Halogenatomen in Naturstoffen deutlich geringer, während eine leicht erhöhte Sauerstoffanzahl sowie eine größere Molmasse zu verzeichnen ist. Zudem sind in Naturstoffen wesentlich mehr sp^3 -hybridisierte Brückenkopfatome, Etherbrücken, Ringe und Chiralitätszentren bei geringerer Anzahl von Aromaten zu finden.²⁰

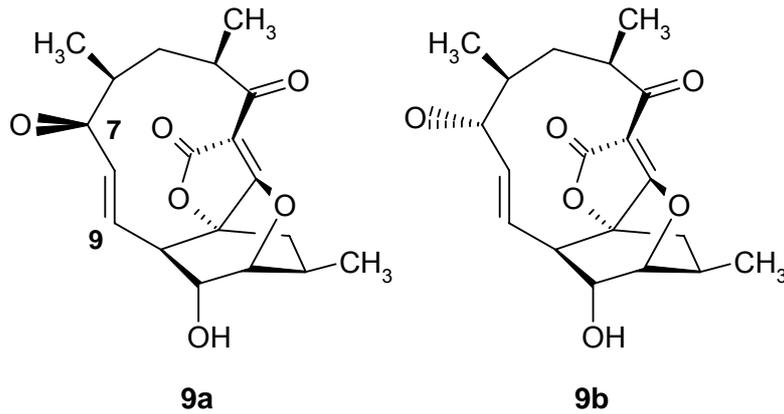
Der vielleicht wichtigste Unterschied zwischen Naturstoffen und synthetischen Verbindungen liegt in der Nutzung von funktionellen (und somit potentiell pharmakophoren) Gruppen. Generell sind in Naturstoffen deutlich mehr sauerstoffhaltige Gruppen wie Alkohole oder Epoxide enthalten, weiterhin finden sich hochreaktive Gruppen, wie in den Endiinen. In

synthetischen Bibliotheken hingegen müssen solche Substituenten vermieden werden, da sie in den meisten Synthesen aufwendig zu schützen wären. Für den Aufbau einer Substanzbibliothek durch kombinatorische Synthese ist die Zahl der zugänglichen Substanzen maßgebend, was oftmals einen Verlust an biologisch relevanter chemischer Komplexität zur Folge hat.²¹ Diese Charakteristika verleihen Naturstoffen im Gegensatz zu vielen Syntheseprodukten ein Höchstmaß an struktureller Diversität und dreidimensionaler Stabilität. Vor allem starre Grundgerüste sind wichtig, um eine selektive Wechselwirkung der funktionellen Gruppen am Wirkort zu ermöglichen.

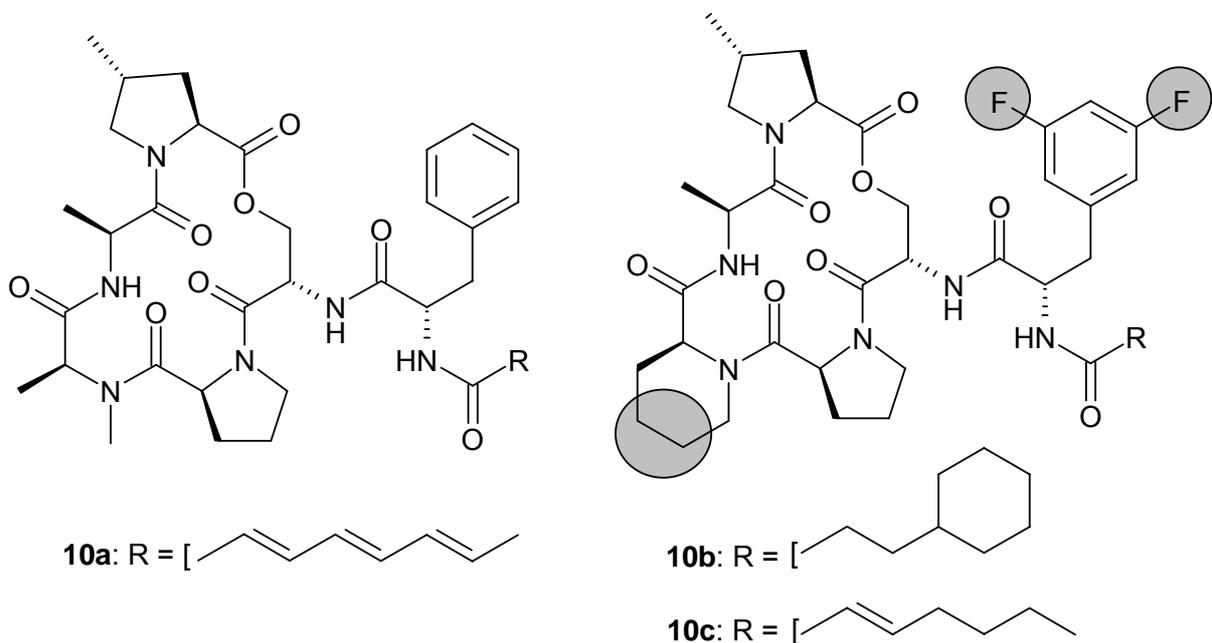
Eine fortwährende Suche nach neuen Leitstrukturen sowie die Verbesserung bekannter Therapeutika ist Bedingung für den entscheidenden Vorsprung im Wettlauf zwischen Pathogenen und Menschen. Hierfür wie auch für andere Wirkstoffklassen sollen im Folgenden Beispiele angeführt werden.

Auffinden und Verwendung neuer Leitstrukturen

Antibiotika sollten immer eine ausreichende Differenzierung zwischen pro- und eukaryotischen Zellen aufweisen. Am Besten ist es wenn Enzyme gehemmt werden, die es nur bei Bakterien, nicht aber beim Menschen gibt. Ein Beispiel für ein Target dieser Art ist die Tetrahydrofolat-Biosynthese, welche nur in Bakterien zu finden ist. Hierbei wird Tetrahydrofolat aus *para*-Aminobenzoessäure (*p*ABA) aufgebaut. Inhibitoren dieses metabolischen Weges sind z.B. die Sulfonamide oder das Trimethoprim. In einem modifizierten Agardiffusionstest können durch Zusatz von mit *p*ABA-getränkten Teststreifen Extrakte von Kulturen auf ihre spezifische inhibitorische Wirkung getestet werden.²² In diesem Screening sind von FIEDLER *et al.* aus dem marinen Actinomyceten *Verrucosispora* AB 18-032 die drei Abyssomycine B–D isoliert worden.²³ Abyssomycin C (**9a**) zeigt eine sehr hohe Aktivität gegen multiresistente *Staphylococcus aureus*-Stämme. Als Wirkmechanismus wird eine irreversible Bindung an die Chorismatmutase über eine Michael-Addition an dem C-7/C-9-Akzeptorsystem angenommen. Dies erklärt zudem die antibakterielle Unwirksamkeit der Abyssomycine B und D, welche nicht über ein solches System verfügen. In den zwei Jahren seit Entdeckung der Abyssomycine sind zwei Synthesen zu Partialstrukturen sowie zwei Totalsynthesen publiziert worden.²⁴ Die Totalsynthese von NICOLAOU *et al.*^{24a} ermöglicht zudem die Gewinnung des atrop-Abyssomycins (**9b**), welches gegen MRSA eine 1.5fach größere Aktivität als **9a** besitzt.



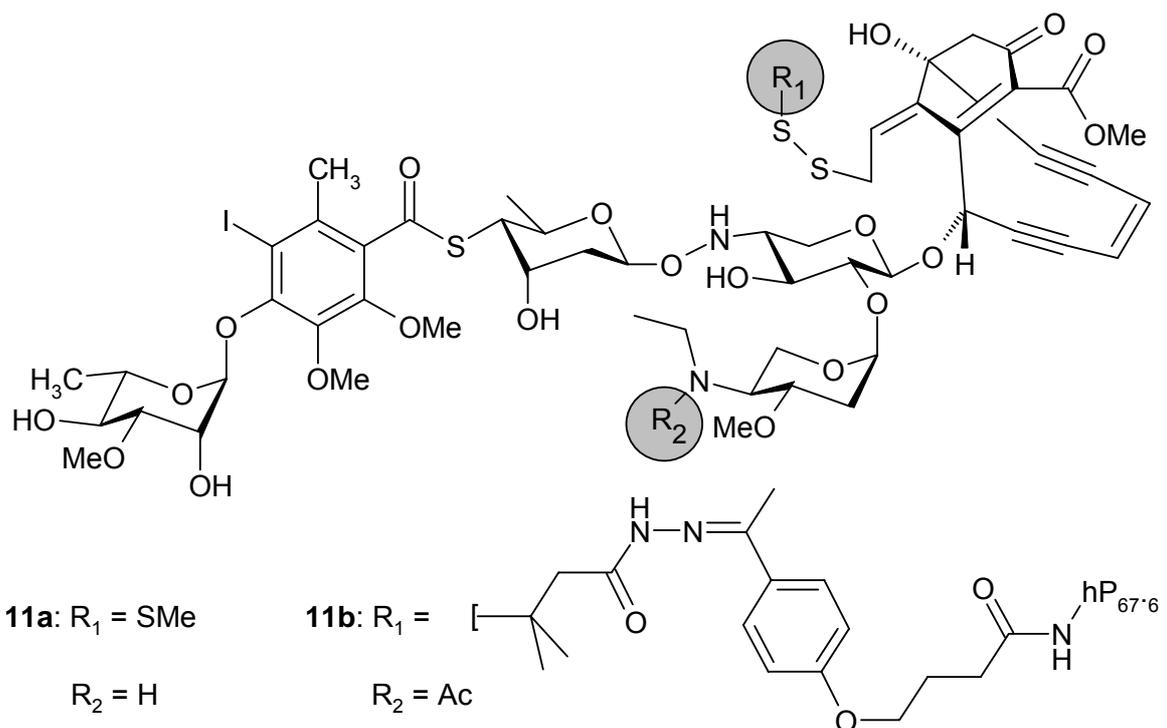
Für das Auffinden von neuen Leitstrukturen mit neuen Targets ist nicht immer ein aufwendiges Screening unbekannter Mikroorganismen nötig. So fand eine Arbeitsgruppe der Bayer HealthCare AG bei Patentrecherchen ein Substanzgemisch, welches trotz hoher Aktivität gegen resistente Stämme nie in seiner Struktur aufgeklärt wurde.²⁵ Durch Anwendung moderner Methoden war dies jedoch möglich und die Substanzen des Gemisches konnten als Cyclopeptide mit der aktiven Komponente ADEP-1 (**10a**) identifiziert werden.²⁶ Nach geglückter Totalsynthese wurden Derivate wie ADEP-2 (**10b**) und ADEP-4 (**10c**) synthetisiert, welche die Aktivität des Naturstoffs übertreffen.



In **10b,c** sind Wasserstoffatome durch Fluoratome ersetzt (vgl. Kap. 2.3.2, S. 37), weitere Veränderungen finden sich im Grundgerüst und in der Seitenkette. In biologischen Assays mit radioaktiv markierten Vorläufern an *Bacillus subtilis* konnte nachgewiesen werden, dass **10a–c** nicht über die herkömmlichen antibakteriellen Targets (DNA-, RNA-, Protein-, Zellwand- und Fettsäurebiosynthese) angreifen, vielmehr ließ sich mit einer ADEP-resistenten *E. coli*-Mutante eine Protease (ClpP) als Resistenzverursacher identifizieren. In

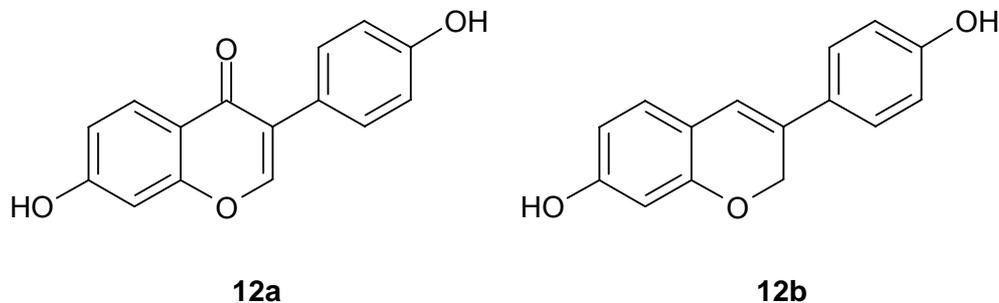
der Mutante existiert eine Punktmutation, welche in anderen Stämmen nicht vorhanden ist. ClpP-Proteasen sind in der Regel stark regulierte Systeme, welche nur nach Aktivierung durch Clp-ATPasen aktiv werden können. Die neuen Antibiotika **10a–c** hingegen verursachen durch Bindung an ClpP eine Aktivierung ohne die Regulationsenzyme, woraufhin ein ungehinderter proteolytischer Abbau einsetzt, der das Absterben der Zelle auslöst. *In vitro* Tests auf antibiotische Aktivität an Nagern zeigen für **10c** eine im Vergleich zu Linezolid (**7**) zehnfach höhere Aktivität.

Wie erwähnt nehmen Naturstoffe auch im Bereich der Antitumorwirkstoffe eine privilegierte Stellung ein. Ein Beispiel hierfür sind Endiine wie γ_1^1 -Calicheamycin (**11a**)²⁷ mit einer extrem innovativen Struktur. Sie besitzen ein hochreaktives konjugiertes olefinisches System, welches über ein Diradikal zur Aromatisierung befähigt ist. Das Diradikal beschädigt die DNA und verursacht damit den Zelltod. Endiine gehören zu den am stärksten cytotoxisch wirkenden Substanzen die je entdeckt wurden. Der LC_{50} -Wert von **11a** liegt im Bereich 10^{-17} M, was theoretisch einem Molekül pro Zelle entspricht. Die starke Toxizität wird durch eine hohe DNA-Spezifität des Endiin-„Sprengkopfes“ und des die Aromatisierung auslösenden Disulfid-Redoxsystems hervorgerufen.²⁸ Problematisch für einen klinischen Einsatz von **11a** ist jedoch, dass keine Spezifität der Substanz bezüglich Tumorzellen besteht. Die Verknüpfung von **11a** mit einem rekombinant gewonnenen IgG4-kappa-Antikörper führte zu dem Konjugat Gemtuzumab-Ozogamicin (Mylotarg®, **11b**),²⁹ durch welches eine hohe Spezifität gegenüber Tumorzellen erreicht wird.



Die Entwicklung von **11b** führt zu einem vollkommen neuen Feld der Krebstherapie und kann dazu dienen, unspezifischen aber stark cytotoxischen Substanzen den Weg in die Chemotherapie zu ebnen. Inzwischen gelang die Konjugation von **11a** mit einem weiteren Antikörper, die Substanz befindet sich in Klinischen Studien der Phase I gegen Non-HODGKIN-Lymphome.³⁰

Auch in der Krebstherapie gibt es Beispiele, dass altbekannte Substanzen unerwartete Eigenschaften besitzen. So wurde unlängst der Sojamehlbestandteil Daidzein (**12a**) (s. Kap. 3.1.2, S. 71) unerwartet zu einer neuen Leitstruktur. Ein Derivat von **12a**, das Phenoxodiol (**12b**), wie auch der Naturstoff sind Inhibitoren des Caspase-regulierenden Enzyms XIAP. Unter Einwirkung von **12a,b** kommt es somit zu einer vermehrten Apoptose der behandelten Zellen.³¹ Der therapeutische Nutzen von **12b** wird momentan in Klinischen Studien der Phase II untersucht.³⁰



1.2 Quellen für neue Naturstoffe

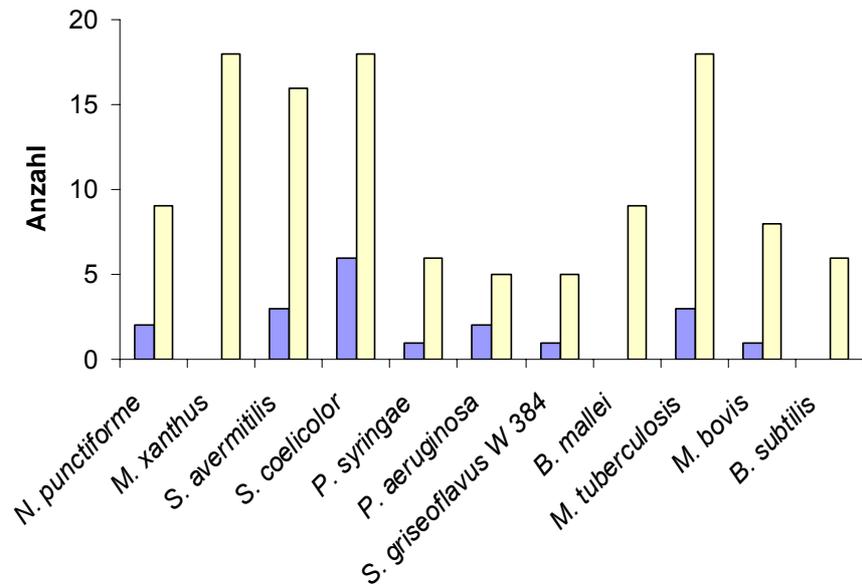
Bei der Suche nach neuen Naturstoffen ist der steigende Anteil bekannter Substanzen bei der Isolierung von Sekundärmetaboliten aus Mikroorganismen ein Problem. Dies führte zu der Annahme, dass der Pool an in der Natur vorhandenen Metaboliten nahezu ausgeschöpft sei. Genomische Analysen von Mikroorganismen sowie von Erdproben weisen jedoch in eine andere Richtung. In einem Gramm einer Erdprobe aus Wäldern lassen sich durchschnittlich 4×10^7 , aus Weideland sogar 2×10^9 prokaryotische Zellen nachweisen. Durch Metagenomanalysen ergibt sich eine Zahl von 2.000–18.000 unterschiedlichen Genomen pro Gramm Erde. Zum jetzigen Zeitpunkt sind insgesamt 20.683³² Prokaryonten bekannt, woraus ersichtlich ist, dass in einem Gramm Erde ähnlich viel genetische Information wie in allen bekannten Prokaryonten vorhanden ist.³³ Es kann davon ausgegangen werden, dass bisher nur ca. 1 % aller Mikroorganismen kultivierbar sind. Umgangen wird dieses Problem bei der heterologen Expression von gefundenen Genabschnitten in besser kultivierbaren Organismen wie *E. coli*.

Die genetische Analyse von Mikroorganismen kann zudem genutzt werden, dass Biosynthesepotential eines Stammes zu offenbaren. Die vollständige Sequenzierung von *Streptomyces coelicolor*³⁴ zeigte, dass dieser wahrscheinlich am besten untersuchte

Sekundärmetabolitenproduzent 18 Biosynthese-Gencluster besitzt,³⁵ wobei bisher lediglich sechs Substanzen isoliert werden konnten (s. Abb. 1 sowie Kap. 3.2.1.5, S. 81). Ähnliches kann bei dem Hormaomycin-Produzenten *Streptomyces griseoflavus* W 384 beobachtet werden, außer dem Peptidolacton konnte bisher kein weiterer Naturstoff gefunden werden, obwohl ein weiterer NRPS-(Nonribosomale Peptidsynthetase) sowie zwei PKS-(Polyketidsynthase) Gencluster im Genom zu finden sind.³⁶

Abb. 1:

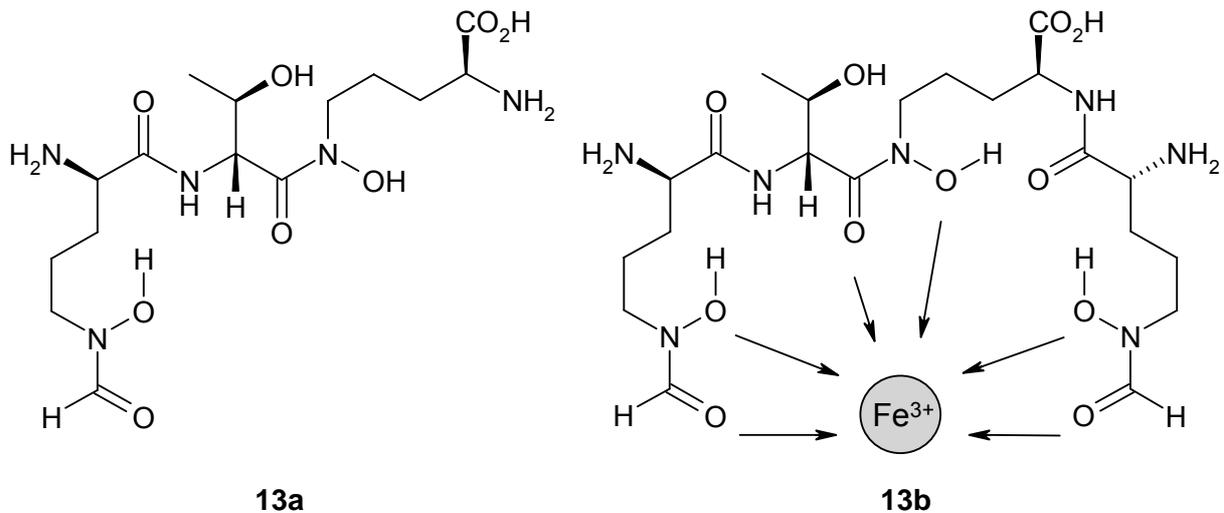
Isolierte NRPS/PKS-Metaboliten (blau) und Gesamtzahl von NRPS-/PKS-Biosynthese-genclustern (gelb) in verschiedenen Mikroorganismen.^{36,37}



Für die Gewinnung neuer Leitstrukturen ist somit das Aktivieren von solchen „stillen“ Biosynthese-genclustern ein attraktives Ziel. Der einfachste, kostengünstigste und schnellste Weg hierzu ist der sogenannte OSMAC-Ansatz (one strain – many compounds).³⁸ Hierbei wird durch Variation von Kultivierungsparametern, wie Nährmedienbestandteilen, Belüftung, Zusatz organischer Lösungsmittel etc., versucht, die stillen Gencluster zu aktivieren und die Produktion neuer Metaboliten anzuregen. So konnten aus dem Aspinonen-Produzenten *Aspergillus ochraceus* DSM7428 15 zusätzliche Metaboliten verschiedener Strukturklassen gewonnen werden.

Ein gezielterer Ansatz bedient sich des so genannten „genome mining“, bei welchem anhand genetischer Informationen über Biosynthese-gencluster die Struktur eines potentiellen Metaboliten vorausgesagt wird. In *S. coelicolor* ist der inaktive Gencluster *cch* zu finden, welcher für eine NRPS codiert. Mit bioinformatischen Methoden können durch Vergleich der gefundenen mit schon bekannten Adenylierungsdomänen dieser NRPS Aussagen über die wahrscheinlich zum Aufbau des Peptids verwendeten Aminosäuren gemacht werden. In Verbindung mit der Kolinearitätsregel³⁹ lässt sich so eine Struktur postulieren. Für *cch* kann nach diesem Prinzip ein aus L- δ -N-Formyl- δ -N-Hydroxyornithin (hfOrn), L-Threonin und L- δ -N-Hydroxyornithin zusammengesetztes Tripeptid (**13a**) vorhergesagt werden, weitere Informationen lassen auf ein potentielles Siderophor schließen.⁴⁰ Bei Kultivierung des

Stammes unter Eisenausschluss wird anstelle von **13a** ein neues Tetrapeptid, Coelichelin (**13b**) gefunden. Das Siderophor **13b** zeigt die vorausgesagten Aminosäuren, wird allerdings im Widerspruch zur Kolinearitätsregel durch iterativen Gebrauch eines Moduls aufgebaut. Dieses Beispiel zeigt die Grenzen der Methode auf. Bei verbesserter Kenntnis der Biosynthese von Sekundärmetaboliten kann sie jedoch zukünftig von Nutzen für das Auffinden neuer Naturstoffe aus bekannten Stämmen sein. Es bleibt zu erwähnen, dass die Sequenzierung eines Genoms große Kosten verursacht und **13b** in einem OSMAC-Ansatz mit der entsprechenden Nährmedienvariation mit geringerem Zeitaufwand und weitaus geringeren Kosten hätte gefunden werden können.



1.3 Naturstoffe in der Malariatherapie

Malaria (lat.: *mala aria* = schlechte Luft) ist eine durch humanpathogene Protozoen hervorgerufene Infektionskrankheit. Die Erreger werden von der weiblichen Anophelesmücke übertragen und führen zu einer Primärinfektion der Leber. Im anschließenden Blutstadium der Krankheit werden Erythrozyten befallen, in welchen sich die Parasiten vermehren. Bei der Freisetzung der Protozoen aus den infizierten Erythrozyten kommt es zu einem Austreten von Zellbestandteilen, welche das charakteristische Fieber auslösen. Die Gattung *Plasmodium falciparum* verursacht das schwerste der vier bekannten Krankheitsbilder, die *Malaria tropica*. Dieser Erreger bewirkt die Einlagerung spezieller Proteine in die Erythrozytenmembran, die zu einer Anhaftung infizierter Blutkörperchen an prävenöse Kapillaren führen. So hervorgerufene Verschlüsse der Blutgefäße führen schließlich zum Tod.

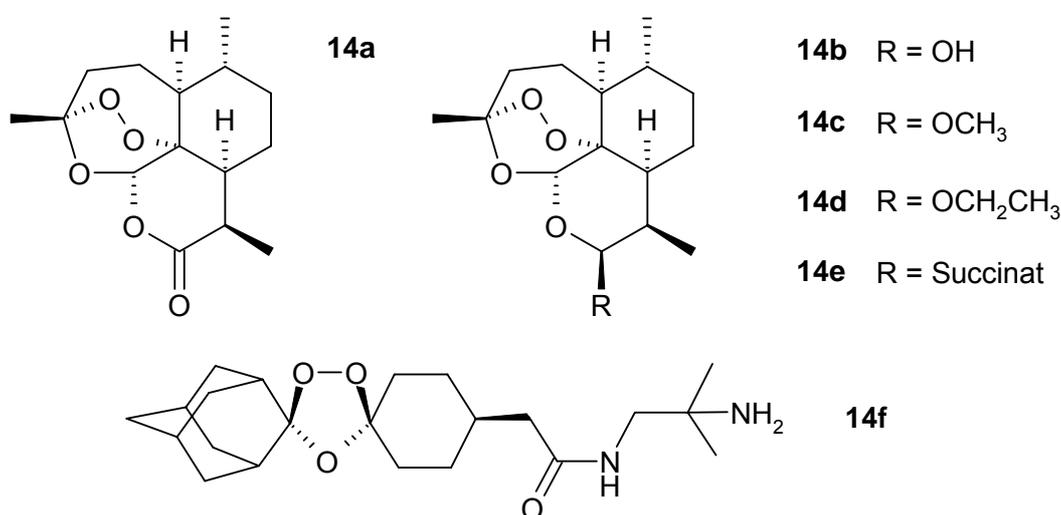
Zum heutigen Zeitpunkt leben ca. 2.2 Milliarden Menschen in *Plasmodium*-Endemiegebieten, von ihnen erkranken jährlich rund 500 Millionen an Malaria.⁴¹ Die Sterblichkeit ist vor allem bei Kindern hoch, insgesamt werden 1.5–3.0 Millionen Todesfälle geschätzt.⁴² Trotz dieser immensen Zahlen sind lediglich fünf von insgesamt 1.300 seit 1975 entwickelten

Medikamenten Antimalaria-Wirkstoffe,⁴³ nahezu alle genutzten Präparate sind weitaus älter. Diese Entwicklung ist vor allem auf den Rückgang kolonialer Interessen der Industrienationen und die geringe Kaufkraft in Entwicklungsländern zurückzuführen.

Antimalaria-Wirkstoffe aus Pflanzen

Chinin war die erste chemische Reinsubstanz in der Malariatherapie. Der Naturstoff konnte 1820 aus der Rinde des in den Anden beheimateten Cinchona-Baumes isoliert werden. Indios benutzten die Rinde zur Fiebersenkung, somit liegt hier das erste Beispiel des oft erfolgreichen ethnomedizinischen Ansatzes bei der Wirkstoffsuche vor.⁴⁴ Ausgehend vom Grundgerüst des Chinins wurden die 4- und 8-Aminochinoline (z.B. Chloroquin, Amodiaquin und Pamaquin, Primaquin) sowie die Arylaminoalkohole (z.B. Mefloquin, Halofantrin) entwickelt. Ihr Wirkmechanismus ist nicht vollständig aufgeklärt, eine Inhibierung der Häm-Polymerisation jedoch nachgewiesen.⁴⁵

In der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) wird der Einjährige Beifuss (*Artemisia annua*) seit mehr als 1500 Jahren für die Behandlung von Hämorrhoiden genutzt, seit 400 Jahren ist der Einsatz bei Fieber dokumentiert. Die Isolierung der aktiven Komponente, Artemisinin (**14a**, auch: Qinghaosu) gelang 1972.⁴⁶ Die Substanz kann, wie viele Naturstoffe aus Pflanzen, nur in sehr geringen Ausbeuten isoliert werden, was hohe Kosten verursacht. Daher ist **14a** vor allem in Afrika nur eingeschränkt als Antimalaria-Wirkstoff nutzbar. Die einzigartige Struktur des Moleküls wie die Anzahl der Ringe oder die Endoperoxidbrücke sind ein weiterer Beleg für die große chemische Diversität von Naturstoffen. Die Grundstruktur wurde bei Derivatisierungen erfolgreich genutzt, um hochpotente Wirkstoffe wie das Dihydroartemisinin (**14b**), Artemether (**14c**), Arteether (**14d**) und Artesunat (**14e**) zu entwickeln. Die pharmakophore Gruppe von **14a** ist die Endoperoxidbrücke, diese kann durch ein sekundäres Ozonid wie in OZ277 (**14f**) ersetzt werden. Das Trioxolan **14f** befindet sich derzeit in klinischen Studien der Phase II.⁴⁷



Antimalaria-Wirkstoffe aus Mikroorganismen

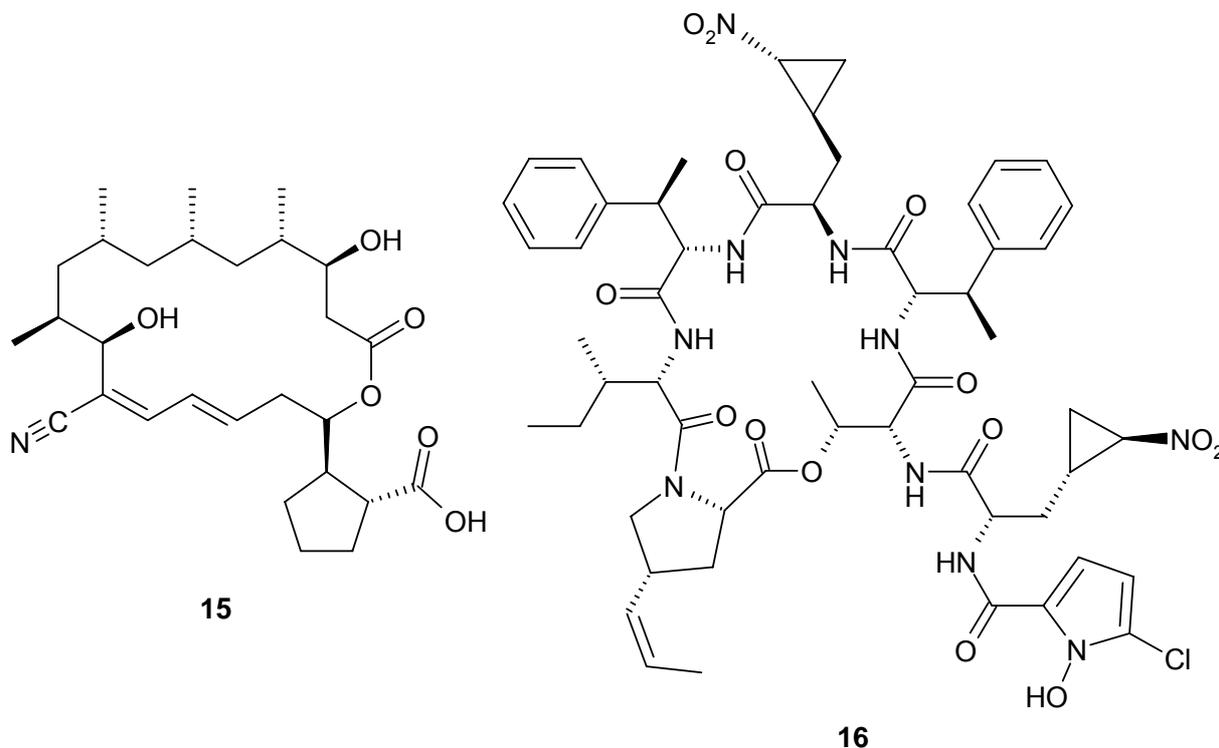
Tetracycline (wie z.B. Doxycyclin) sind antibakterielle Substanzen aus Mikroorganismen, die eine große Aktivität gegen Gram-positive und -negative Organismen sowie *Plasmodium* sp. besitzen. Ihre antibakterielle Wirkung beruht auf einer Inhibierung der Proteinbiosynthese über die Blockade der Bindung der Aminoacyl-tRNA an die 16S rRNA der 30S Untereinheit des prokaryotischen Ribosoms. In Malariaparasiten sind zwei extrachromosomale DNAs mit prokaryotischen Eigenschaften zu finden, ein ähnlicher Wirkmechanismus ist somit wahrscheinlich. Hierdurch besitzen die Tetracycline eine starke, aber langsam einsetzende antiplasmodiale Aktivität, weshalb sie nur als Kombinationspräparat oder zur Prophylaxe eingesetzt werden können. Für eine Reihe weiterer antibakteriell wirksamer Substanzen konnte diese Aktivität nachgewiesen werden.⁴⁸

Ein anderer antibakteriell wirksamer Sekundärmetabolit mit Aktivität gegen *Plasmodium* ist das Borrelidin (**15**). Der Wirkmechanismus des Makrolids **15** unterscheidet sich von dem der Tetracycline. Der Parasit wird von **15** über eine Hemmung der Threonyl-tRNA-Synthetase und eine Aktivierung von Apoptose-induzierenden Enzymen abgetötet (s. Kap. 4, S. 88).⁴⁸

Ein bisher von keinem Malariapräparat genutzter Angriffspunkt für Antimalaria-Wirkstoffe ist die Membran des infizierten Erythrozyten. Nach Infektion wird diese Membran durch den Parasiten verändert, damit dessen Bedarf an Nährstoffen gedeckt werden kann. Weiterhin müssen die Konzentrationen von physiologisch wichtigen Ionen (wie H⁺, K⁺, Na⁺ und Ca²⁺) angepasst werden.⁴⁹ Substanzen, die Transporteigenschaften von Ionenkanälen beeinflussen oder selbst als Ionencarrier fungieren, eignen sich deshalb zur Malariatherapie. Bei einem Screening mit derartigen mikrobiellen Sekundärmetaboliten wiesen VIAL *et al.* für 21 von 22 Ionophoren eine IC₅₀ im nanomolaren Bereich gegen *Plasmodium falciparum* nach.⁵⁰ Eine herausragende Stellung nahm hierbei das Gramicidin D mit einer subnanomolaren Aktivität bei geringer Toxizität ein.⁵¹ Das lineare Peptid kann als dimerer Komplex in Membranen eingelagert werden und einen Ionenkanal bilden. Zudem konnten für einige cyclische Peptide, welche aufgrund ihrer Struktur nicht in der Lage sind ganze Membranen zu überspannen, antiplasmodiale Aktivitäten nachgewiesen werden. Beispiele hierfür sind die Enniatine⁵² oder das in dieser Dissertation bearbeitete Hormaomycin (**16**)⁵³ (s. Kap. 2.6.2, S. 62). Bis auf die Peptide Gramicidin D und **16** sowie die Tetracycline sind für die meisten Antimalaria-Wirkstoffe aus Mikroorganismen klinische Anwendungen aufgrund hoher Toxizität ausgeschlossen.

Resistenzen, wie für Bakterien unter Kap. 1.1 beschrieben, entwickeln sich auch in *Plasmodium falciparum*. In Afrika tragen die meisten Stämme Chloroquinresistenzen, während in Asien zudem Artemisinin (**14a**) seine Wirksamkeit langsam einbüßt. Auch das hier nicht näher beschriebene, lange Zeit erfolgreich eingesetzte, Antifolat-

Kombinationspräparat Sulfadoxin/Pyrimethamin ist in den meisten Endemiegebieten nicht mehr zuverlässig einsetzbar.⁵⁴



Die beschriebene Notwendigkeit in der Chemotherapie nach neuen Targets vor allem für die Behandlung von Infektionskrankheiten zu suchen, das bisherige Versagen kombinatorischer Ansätze in der Leitstruktursuche und der in ausgewählten Beispielen dargestellte Erfolg der Kombination von Naturstoffchemie und Organischer Synthese (und *nicht* ihre Konkurrenz) zeigen, dass die sekundären Naturstoffe aus Pflanzen und Mikroorganismen durch nichts zu ersetzen sind. Die Renaissance der Naturstoffchemie wird von vielen Wissenschaftlern vorausgesagt und kündigt sich weltweit an.⁵⁵

1.4 Aufgabenstellung

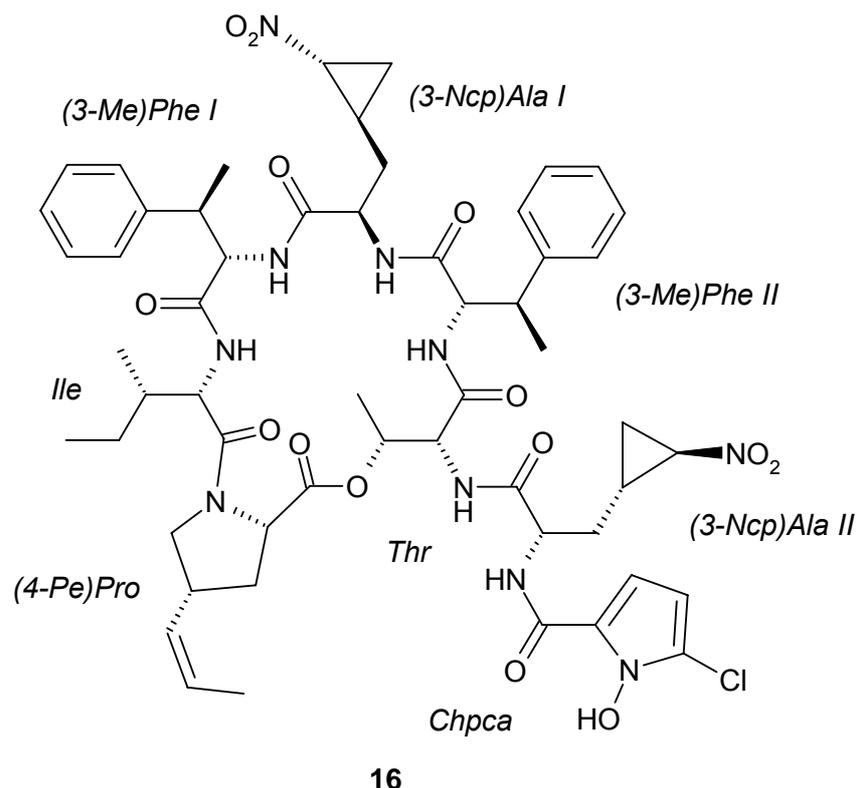
Im Mittelpunkt der vorliegenden Dissertation steht der Hormaomycin-Produzent *Streptomyces griseoflavus* (Stamm W 384). Mit Hilfe der Vorläufer-dirigierten Biosynthese sollten neue Derivate des Hormaomycins (**16**) generiert und anschließend getestet werden, um Struktur-Wirkungsbeziehungen für das Peptidlacton **16** abzuleiten. Weiterhin sind Aussagen zur Spezifität der an der Biosynthese beteiligten Enzyme sowie zu Biosynthesemechanismen der einzelnen Aminosäuren möglich. Für eine effektive Durchführung dieser Experimente waren die Stammhaltung und Kultivierung von *Streptomyces griseoflavus* (Stamm W 384) hinsichtlich einer konstant hohen Hormaomycin-Produktion zu optimieren. Im Rahmen von Kooperationsprojekten mit den Arbeitsgruppen PROF. SHELDRIK (Institut für Anorganische Chemie, Universität Göttingen) und PROF. GRIESINGER (MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen) sollte der Naturstoff **16** für röntgenkristallographische und NMR-Untersuchungen in sehr reiner Form gewonnen werden. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe PROF. PIEL (Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Bonn) sollte der Gencluster der Hormaomycin-NRPS identifiziert werden.

In einem zweiten Arbeitsansatz sollten verschiedene Actinomyceten aus der Mongolei und Portugal einem Chemischen Screening unterzogen werden. Die hierbei ausgewählten Stämme waren in größerem Maßstab zu kultivieren, auffällige Sekundärmetaboliten zu isolieren und die Strukturen der Naturstoffe mit verschiedenen spektroskopischen Methoden aufzuklären. Hierzu gehörte auch die Strukturaufklärung von im Arbeitskreis PROF. FIEDLER (Mikrobiologisches Institut, Universität Tübingen) in einem HPLC-DAD-Screening aufgefallenen Sekundärmetaboliten aus *Streptomyces* sp. Stamm Tü 6319 und Stamm Tü 2561.

Der dritte Teil der Arbeit widmet sich dem im Chemischen Screening entdeckten Borrelidin-Produzenten *Actinomyces* sp. Stamm M4-1. Mit ihm sollte die von LEADLAY und SALAS⁵⁶ mit genetischen Methoden untersuchte Biosynthese des Borrelidins (**15**) durch Fütterungsexperimente mit isotopenmarkierten Vorläufern verifiziert werden. Weiterhin wurde bei dem Makrolid **15** durch Einsatz der Vorläufer-dirigierten Biosynthese die Isolierung neuer Derivate angestrebt.

2 Hormaomycin

Der Hormaomycin-Produzent *Streptomyces griseoflavus* (Stamm W 384) aus Anaradhapura (Sri Lanka) fiel im Arbeitskreis H. WOLF, H. ZÄHNER in einem Screening auf intrazelluläre Signalsubstanzen auf.^{57,58} Als biologisch aktive Komponente konnte das Peptidlacton Hormaomycin (**16**) isoliert werden, welches in der Lage ist, die Sporulation und Sekundärmetabolitenproduktion anderer Actinomyceten anzuregen (*gr. hormao* = *ich rege an*), eine selektive antibakterielle Aktivität gegen coryneforme Bakterien und eine ausgeprägte Wirkung gegen *Plasmodium falciparum*, den Erreger der *Malaria tropica*, besitzt.^{53,59} 1984 wurde **16** erstmals von S. OMURA *et al.* isoliert, eine vollständige Strukturaufklärung gelang der japanischen Arbeitsgruppe zum damaligen Zeitpunkt jedoch nicht, woraufhin sie nur eine Partialstruktur unter dem Namen Takaokamycin veröffentlichten.⁶⁰ Die Identität beider Substanzen konnte später trotz Differenzen in den chemischen Verschiebungen des Protonenspektrums verifiziert werden.



Neben den herausragenden biologischen Aktivitäten zeigt dieses Molekül interessante Strukturbausteine. Die Struktur wurde von E. RÖSSNER aufgeklärt,^{61,62} erste Untersuchungen zur Aufklärung der Konfiguration von HENNE⁶³ und RITZAU⁶⁴ unternommen.⁶⁵ Die vollständige Bestimmung der absoluten Konfiguration gelang durch die Arbeiten von ALVERMANN⁶⁶ und die erfolgreiche Totalsynthese von **16** durch ZLATOPOLSKIY.^{67,68,69} Der Naturstoff **16** besteht aus einer proteinogenen [L-Isoleucin, (*Ile*)] und sechs nicht-proteinogenen Aminosäuren

sowie einer an C-5 chlorierten 1-Hydroxypyrrol-2-carbonsäure [*Chpca*] als Startereinheit. Neben den bereits literaturbekannten nicht proteinogenen Aminosäuren *L-threo*-3-Methylphenylalanin [(β Me)*Phe I* und *II*] und *D-allo*-Threonin (*a-Thr*) sind in **16** mit 3-(1'*R*,2'*R*)-(trans-2'-Nitrocyclopropyl)alanin in *D*- und *L*-Konfiguration [(3-*Ncp*)*Ala I* und *II*] sowie 4-(*Z*)-Propenylprolin [(4*Pe*)*Pro*] drei erstmals beschriebene Aminosäuren enthalten.

2.1 Kultivierung von *Streptomyces griseoflavus* Stamm W 384

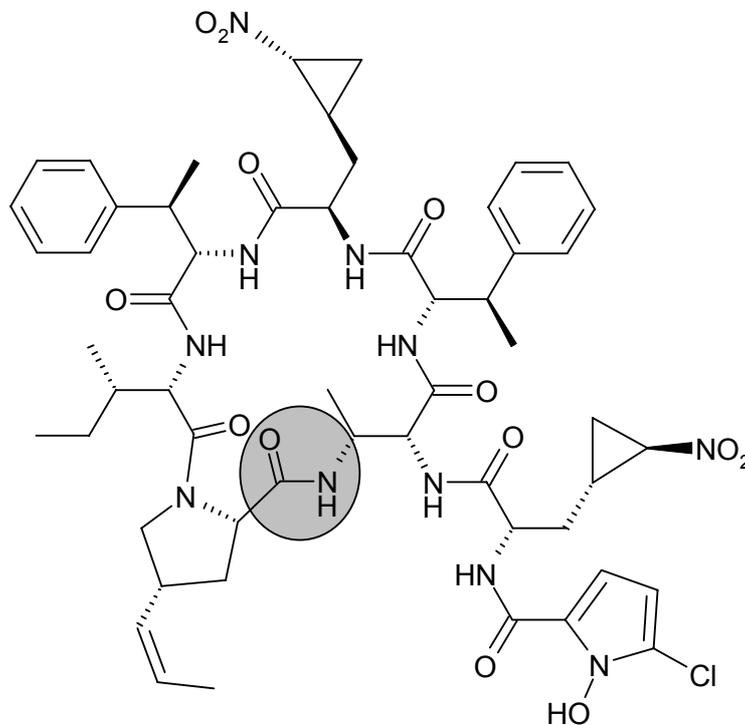
Die Kultivierung von Stamm W 384 erfolgte unter den für die Hormaomycin-Produktion von RAUCH und GEERS optimierten Bedingungen.^{70,71} Als wichtig für eine leichte Isolierung hatte sich die Verwendung eines synthetischen Nährmediums erwiesen, da hierbei störende Bestandteile komplexer Nährmedien nicht auftreten. Für das synthetische Nährmedium wurden Asparagin als Stickstoffquelle und Mannit als Kohlenstoffquelle genutzt, wobei ein hoher Zusatz an NaCl (25 g/L) sich gut auf die Hormaomycin-Ausbeute auswirkte. Zurückgehend auf Beobachtungen von OMURA, wonach die optimale Kultivierungstemperatur in Bezug auf Sekundärmetabolitenproduktion nicht mit der auf optimale Wachstumsbedingungen eines Stammes identisch sein muss,⁷² wurde von ANDRES^{59,73} dieser Parameter in die Ausbeuteoptimierung mit eingebracht. Fortan wurde die Absenkung der Temperatur während der Fermentation von anfänglich 27°C auf 20°C zur 20. Stunde nach Inokulation mit der Vorkultur als Bedingung für hohe Ausbeuten (~ 15 mg/L) von **16** angenommen. Dieser Effekt konnte nicht mehr beobachtet werden, so dass alle Fermentationen nur noch bei konstant 27°C durchgeführt wurden. Die von ALVERMANN beschriebene Steigerung der Ausbeute durch Fütterung von putativen Vorläufern des Peptids, wie Prolin als Vorläufer der Chlorhydroxypyrrolcarbonsäure (*Chpca*), konnte bestätigt werden. Allerdings konnten die Ausbeuten durch Zufütterung von 2-Pyrrolcarbonsäure (2 mM), einem vermeintlichen Intermediat der *Chpca*-Biosynthese, auf bis zu 45 mg/L gesteigert werden. Die Fütterungen erfolgten nach einer Wachstumsphase von 20 h, um eine Störung des Primärstoffwechsels zu vermeiden.

2.2 Chemische und biologische Verfahren zur Derivatisierung von Naturstoffen

„Wo die Natur aufhört, neue Formen entstehen zu lassen, beginnt der Mensch mit den natürlichen Dingen, mit Hilfe eben dieser Natur, eine unendliche Vielfalt der Formen zu schaffen.“

Leonardo da Vinci

Wie in Kapitel 2 beschrieben zeigt das Peptidlacton **16** interessante biologische Aktivitäten, und kann somit als Leitstruktur dienen. Erste Versuche zur Derivatisierung des Naturstoffs auf chemischem Weg unternahm RITZAU⁶⁴, wobei wegen der geringen Stabilität des Moleküls nur Reaktionen unter milden Bedingungen möglich waren. So gelangen z.B. die Reduktionen der Doppelbindung am Propenylprolin, an der Pyrrolcarbonsäure sowie an den Nitrofunktionalitäten der Cyclopropylalanine.⁶⁴ Die Totalsynthese von **16** hingegen ermöglichte weiterreichende Derivatisierungen und konnte zu strukturellen Veränderungen am Ringsystem genutzt werden. So gelang ZLATOPOLSKIY z.B. die Darstellung des Hormaomycin-Peptidlactams (**17**).^{69,74}



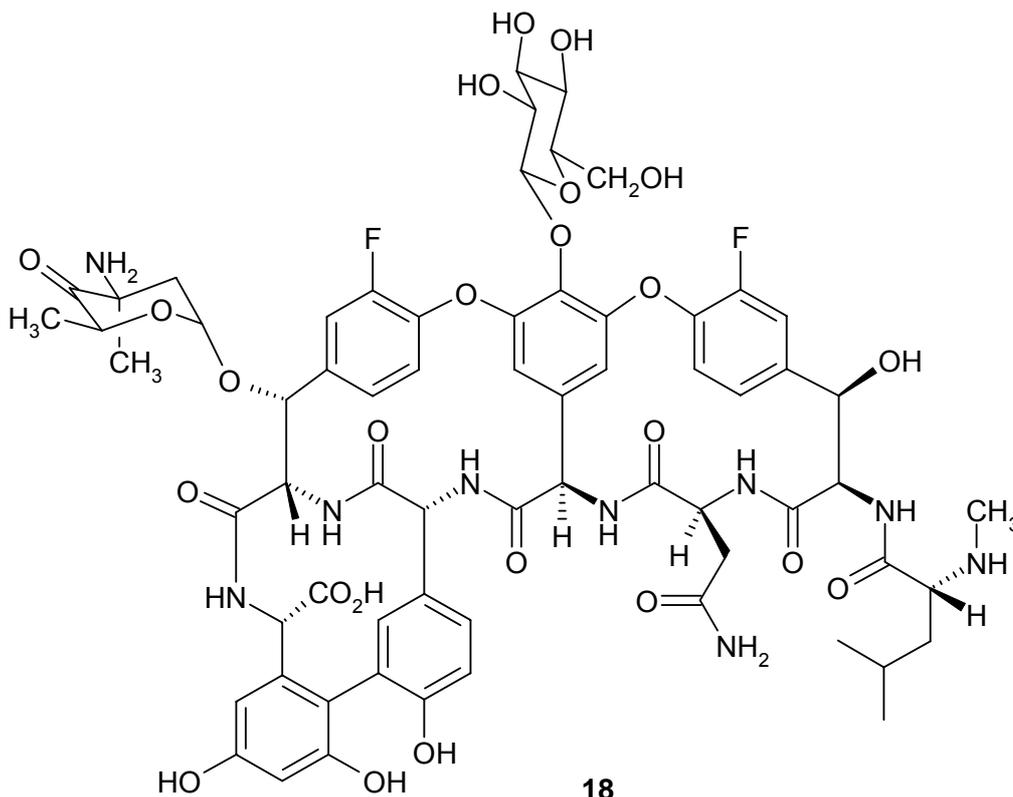
17

Neben den beschriebenen (semi-)synthetischen Veränderungen einer Leitstruktur wie **16** können biologische Methoden genutzt werden, um einen Naturstoff effektiv zu variieren und

so Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erkennen und/ oder eine Verbesserung der biologischen Aktivitäten zu erreichen. Für die biologische Derivatisierung von Naturstoffen können natürliche oder genetisch manipulierte Mikroorganismen, bzw. deren Enzyme genutzt werden.

Ein Beispiel für Arbeiten mit genetisch manipulierten Organismen ist die Mutasynthese. Nach RINEHART⁷⁵ umfasst sie die Generierung von Blockmutanten, Integrierung eines Mutasythons sowie die Isolierung der Substanz. Erste Mutasyntheseexperimente wurden von SHIER⁷⁶ an *Streptomyces fradiae*, einem Neomycin-Produzenten, durchgeführt. Der Stamm wurde unter Zusatz des Punktmutationen verursachenden *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin kultiviert, wodurch Mutanten entstanden, die die Fähigkeit zur Aminoglykosidproduktion erst durch Zufütterung geeigneter Mutasythons erreichten. Hierdurch konnten insgesamt fünf neue Antibiotika gewonnen werden. Ein Nachteil dieser Technik ist die durch die zufällige genetische Manipulation bedingt große Zahl entstehender Mutanten und deren aufwendige Vereinzelung.

Modernere Verfahren der Mutasynthese bedienen sich gezielter Mutationen, z.B. durch *knock-out* eines einzelnen Biosynthesegens. Als Beispiel für diese Derivatisierungstechnik können die Glykopeptidantibiotika Vancomycin⁷⁷ und Balhimycin⁷⁸ genannt werden. So ist die Deletionsmutante OP696⁷⁹ des Balhimycin-Produzenten *Amycolatopsis mediterranei* nicht mehr befähigt β -Hydroxytyrosin zu synthetisieren, was einen Ausfall der Balhimycin-Produktion zur Folge hat. Die Zufütterung von 3-Fluor- β -Hydroxytyrosinderivaten hingegen führt zur Produktion eines neuen Antibiotikums, des Fluorbalhimycins (**18**).



Ein Nachteil der gezielten Mutagenese ist die nötige exakte Kenntnis des Biosynthesegenclusters des jeweiligen Naturstoffproduzenten, dazu müssen Geld und Zeit in erheblicher Größenordnung investiert werden. Wildstämme von Mikroorganismen können einfacher durch Enzyminhibitoren oder die Vorläufer-dirigierte Biosynthese zur Derivatisierung von Naturstoffen angeregt werden. Die gezielte Inhibierung von Enzymen ist möglich, wenn Vorläufer der Biosynthese eines Naturstoffs bekannt sind. Dies kann zur Akkumulation von Vorläufern oder auch Abzweigungen in Biosynthesewegen führen.⁸⁰

Die Vorläufer-dirigierte Biosynthese⁸¹ nutzt eine oftmals vorhandene geringe Substratspezifität in einzelnen Modulen eines Multienzymkomplexes. Hierbei werden zu den im natürlichen Sekundärmetabolit vorkommenden Bausteinen verwandte Substanzen (bei Peptiden z.B. Aminosäuren) zu einer wachsenden Kultur gefüttert und anstelle dieser in das Zielmolekül eingebaut. ISAKA *et al.* ist auf diese Weise die Derivatisierung des Cyclohexadepsipeptids Beauvericin (**19**) durch Zufütterung unnatürlicher Aminosäuren wie D-Isoleucin sowie L- und D-*allo*-Isoleucin gelungen.⁸² Bemerkenswert an diesem Beispiel ist vor allem, dass Epimere der natürlich vorkommenden Aminosäuren in das Peptid eingebaut wurden obwohl Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) zumeist hohe Selektivität bezüglich der C-2-Stereochemie der Aminosäuren aufweisen.⁸³

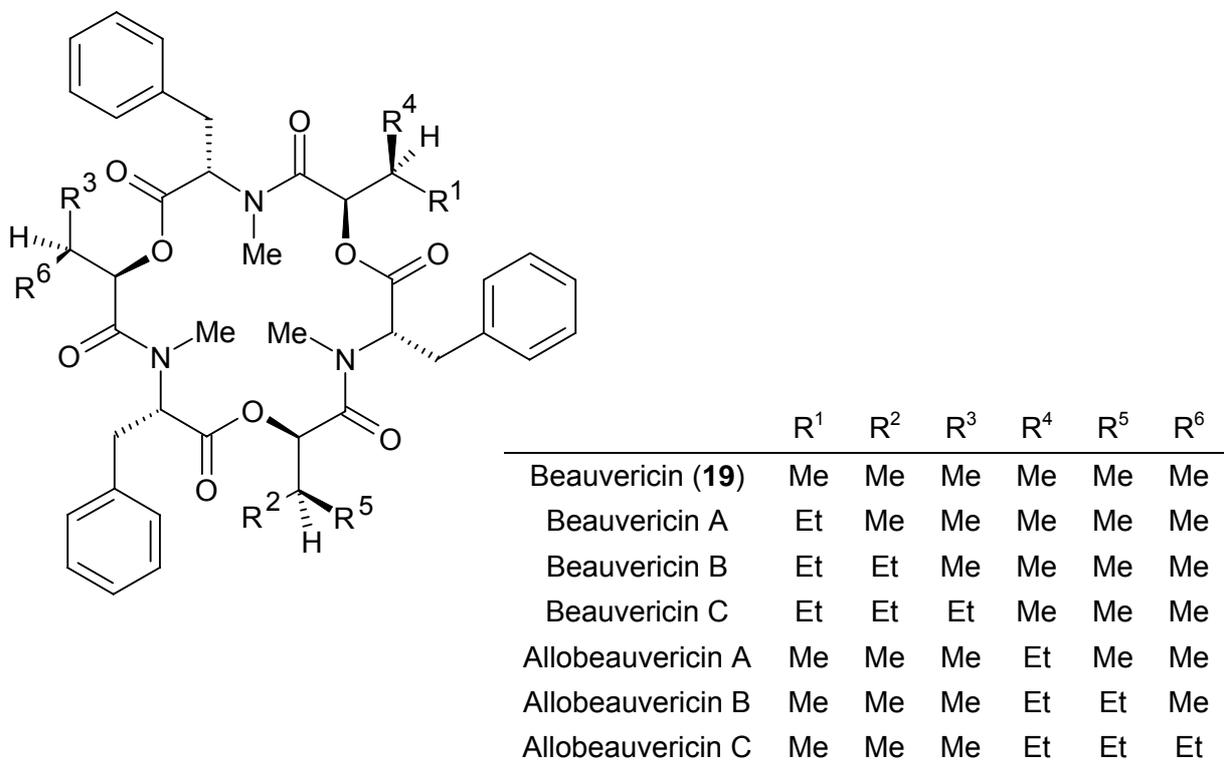
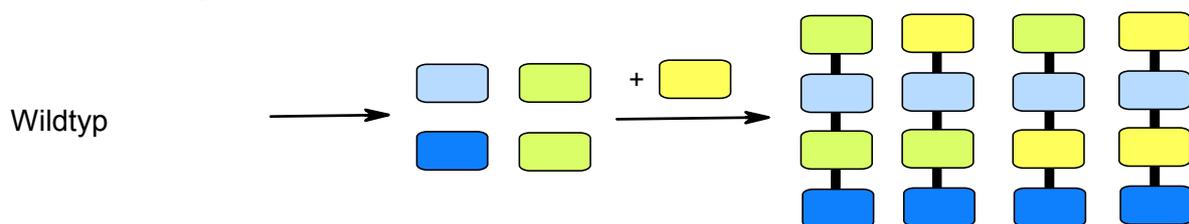


Abb. 2: Allobeauvericine durch Vorläufer-dirigierte Biosynthese an *Paecilomyces tenuipes* BCC1614.

Durch die Konkurrenz zwischen der gefütterten und der natürlichen Aminosäure um den Einbau in ein Peptid entstehen bei der Vorläufer-dirigierten Biosynthese im Gegensatz zur Mutasyntese oftmals Produktgemische von mindestens zwei Substanzen. Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen Naturstoff und Derivat kann es in Folge dessen zu Problemen bei der Isolierung von Reinsubstanzen kommen. Weiterhin enthalten viele Peptide, wie auch das Hormaomycin (**16**), ein und dieselbe Aminosäure mehrfach, woraus eine noch größere Anzahl an Derivaten resultiert (s. Abb. 3). Allerdings ergibt sich hieraus auch gleichzeitig der Vorteil, dass mehr Analoga eines Naturstoffs mit einem Fütterungsexperiment zugänglich sind.

Vorläufer-dirigierte Biosynthese (A)



Mutasyntese (B)

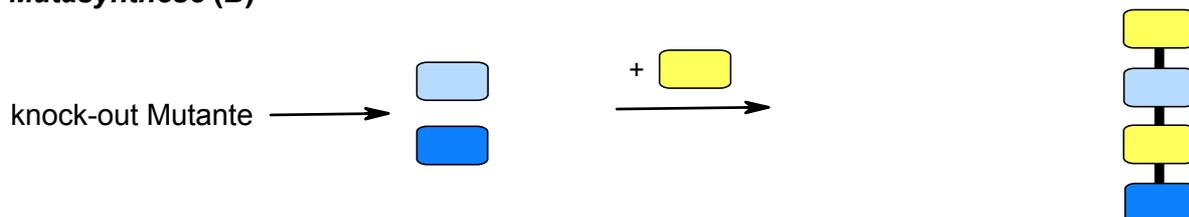


Abb. 3: Vorläufer-dirigierte Biosynthese (A) und Mutasyntese (B) im Vergleich: Die Mutante ist nicht mehr in der Lage den grünen Baustein zu biosynthetisieren, bei Fütterung des „unnatürlichen“ gelben Bausteins resultiert nur ein Derivat (B); der Wildtyp des Naturstoffproduzenten produziert bei Fütterung des gelben Bausteins neben dem Naturstoff drei Analoga (A).

Neben Kenntnissen der Biosynthese eines Sekundärmetaboliten und seiner Vorläufer muss bei den biologischen Derivatisierungen sichergestellt sein, dass die gefütterten Substanzen vom Produzenten toleriert und aufgenommen werden. Für die Variation von Peptiden ist dies zumeist unproblematisch, da in Zellmembranen aktive Transportsysteme für Aminosäuren existieren und somit im Gegensatz zu vielen Polyketidvorläufern (s. Kap. 4.3, S. 100) die Verfügbarkeit am Ort der Sekundärmetabolitenbiosynthese sichergestellt ist.

Weiterhin erscheinen Peptide ideal für den Einsatz in der PDB, da ihre Biosyntheseenzyme häufig eine relativ geringe Substratspezifität aufweisen.⁸⁴ Diese Beobachtung ist allerdings nicht zu verallgemeinern, schon innerhalb ein und desselben NRPS-Komplexes können sehr spezifische neben scheinbar unspezifischen Modulen existieren, wie am Beispiel des

Immunsuppressivums Cyclosporin gezeigt werden konnte.^{85,86} Generell gilt jedoch, dass Enzyme des Sekundärmetabolismus eine geringere Substratspezifität als solche des Primärmetabolismus zeigen.⁸⁷

2.3 Vorläufer-dirigierte Biosynthese mit *Streptomyces griseoflavus* (Stamm W 384)

In der vorliegenden Dissertation sollten neue Hormaomycine mit der Technik der Vorläufer-dirigierten Biosynthese (PDB) dargestellt werden. Hierfür wurden die Kultivierungen in 1 L-Biostat M-Fermentern durchgeführt, ein Scale-up auf 5–50 L zur Vergrößerung der Ausbeute führte trotz Belüftungs- und Rührgeschwindigkeitsvariationen ebenso wie der Versuch einer Kultivierung in Schüttelkulturen zu einem totalen Ausfall der Hormaomycin-Biosynthese. Die verwendeten Vorläufer wurden wie bei der 1 L-Standardfermentation ab der 20. Stunde über einen Zeitraum von 10 h im *continuous flow*-Verfahren zu der Kulturbrühe gepumpt.

2.3.1 Variation der 3-(2'-Nitrocyclopropyl)alanin-Einheiten^a

Die strukturell interessanteste nicht-proteinogene Aminosäure des Hormaomycins (**16**) ist das 3-(2'-Nitrocyclopropyl)alanin [(3-Ncp)Ala]. An diesem Baustein wurden schon erste Versuche zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese durchgeführt, wobei eine allgemeine Substratflexibilität der Hormaomycin-NRPS zu beobachten war.⁶⁶ Cyclopropylalanine, an denen die Nitrogruppe durch einen Carbonsäurerest substituiert war, wurden von dem Multienzymkomplex als Substrate akzeptiert. Bei diesem Fütterungsexperiment kamen die unnatürlichen Aminosäuren 3-(2'-Methoxycarbonylcyclopropyl)alanin [(3-Mcp)Ala] sowie 3-(2'-Carboxycyclopropyl)alanin [(3-Ccp)Ala] zum Einsatz, die beide bevorzugt eingebaut wurden. Es entstand in beiden Ansätzen nur das neue Hormaomycin C (**20**), d.h. die freien Carboxylgruppen werden im Verlauf der Biosynthese methyliert. Natives Hormaomycin (**16**) oder solches mit einmaligem Einbau konnte nicht nachgewiesen werden. Ein elektronenziehender Rest ist für die Erkennung der Aminosäure durch den Multienzymkomplex allerdings notwendig, wie die negativen Resultate von Fütterungen mit 3-Cyclopropylalanin und 3-(2'-Aminocyclopropyl)alanin zeigten.

^a Großer Dank für die Synthese der in Kap. 2.3.1 verwendeten Aminosäuren gilt Herrn DR. B.D. ZLATOPOLSKIY und Herrn PROF. DR. A. DE MEJERE.

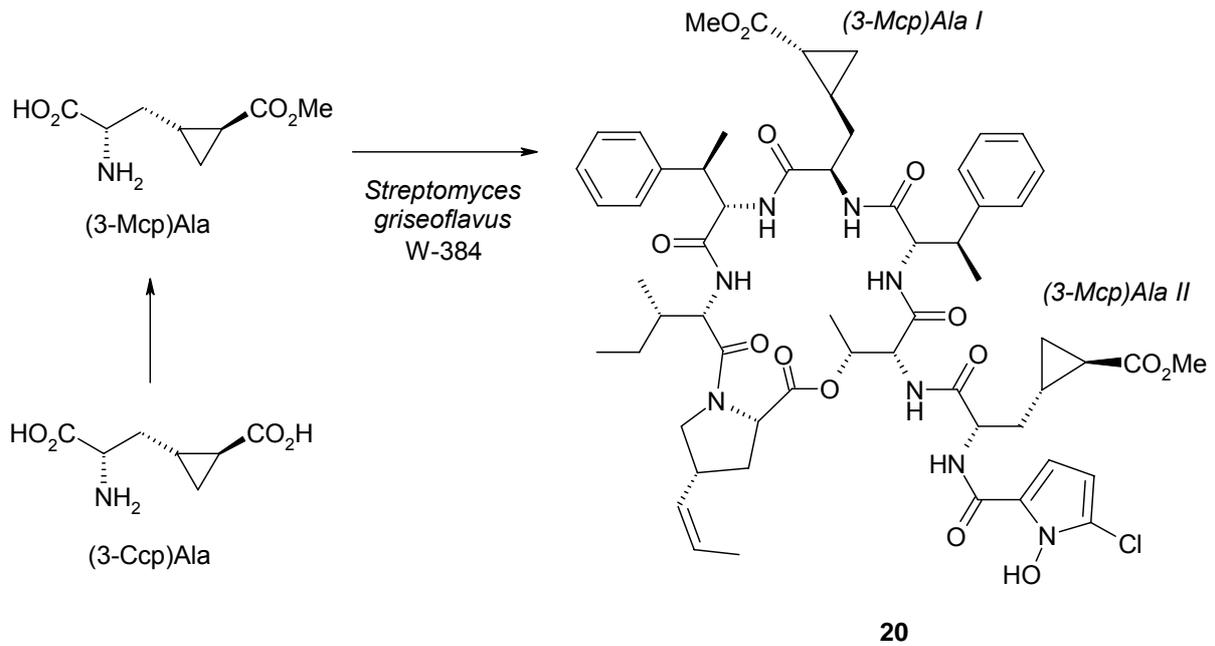
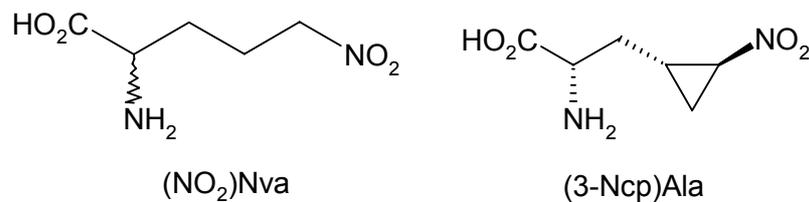


Abb. 4: Vorläufer-dirigierte Biosynthese an *Streptomyces griseoflavus* Stamm W 384.

Diese Ergebnisse zeigen eine Toleranz der Hormaomycin-NRPS gegenüber Cyclopropylalaninen mit einem elektronenziehenden Substituenten am Cyclopropanring. Durch Fütterung von Aminosäuren ohne Cyclopropylring sollten die Erkenntnisse über die Spezifitäten der Biosyntheseenzyme ausgeweitet werden.

2.3.1.1 Fütterung von 5-Nitronorvalin

Das 5-Nitronorvalin [(NO₂)Nva] ist eine nicht proteinogene Aminosäure, welche sich vom (3-Ncp)Ala durch das Fehlen der Methylengruppe des Rings unterscheidet. Der Abstand zwischen den funktionellen Gruppen gleicht hingegen dem des natürlichen Substrats der Hormaomycin Biosynthese. Die Fütterungen wurden mit den enantiomerenreinen D- und L-(NO₂)Nva wie auch dem racemischen Gemisch durchgeführt.



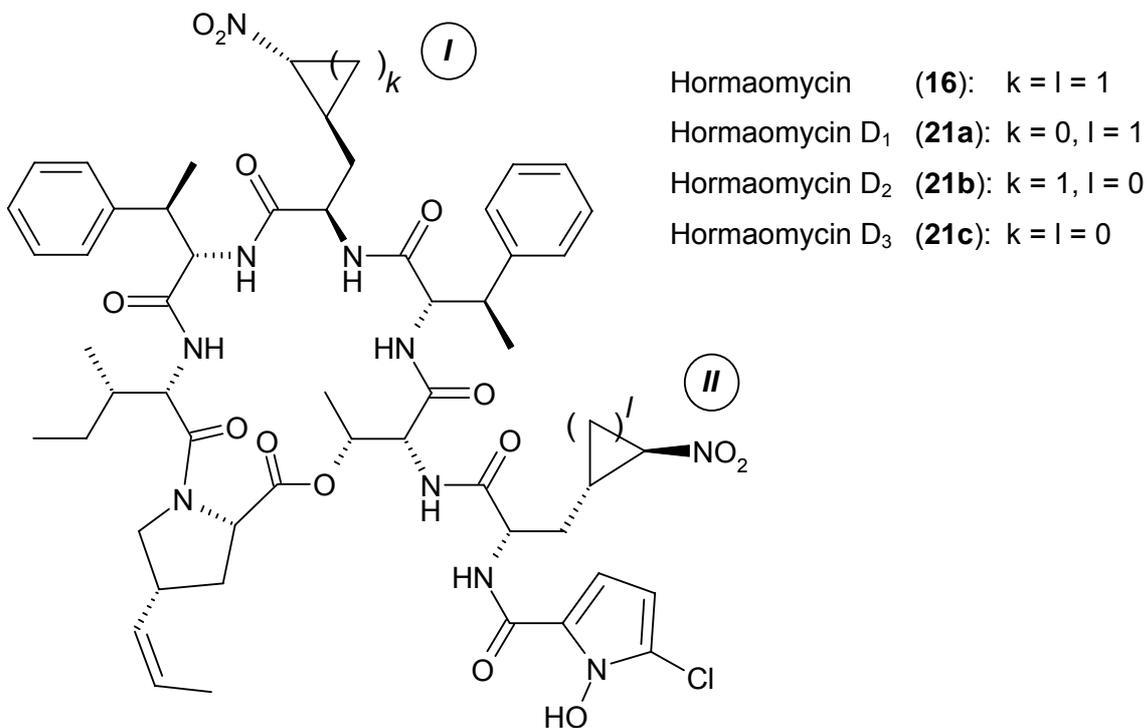
Fütterung von L-5-Nitronorvalin

Die Fütterungen wurden unter den Standardfermentationsbedingungen mit 1.0 und 2.0 mM Endkonzentrationen durchgeführt. Die unterschiedlichen Konzentrationen hatten keinen Einfluss auf Ausbeuten und Einbauverhältnisse der gewonnenen Hormaomycine.

Nach einmaliger Chromatographie an Kieselgel zeigte das ESI-Massenspektrum der Hormaomycin-haltigen Fraktion neben dem Peak für Hormaomycin (**16**) bei $m/z = 1151$ $[M+Na]^+$ zwei weitere Peaks bei $m/z = 1139$ sowie 1127 jeweils $[M+Na]^+$, die in einem Verhältnis von 1.0 : 4.0 : 3.5 (**16** : 1139 : 1127) stehen. Die erhaltenen Molmassen zeigen das Fehlen von einem bzw. zwei Kohlenstoffatomen (Massenunterschied 12) im Vergleich zu **16** an. Die Trennung der Derivate gelang mit semipräparativer HPLC, wobei drei Fraktionen (A–C) gewonnen werden konnten, die sich in ihrem UV-Spektrum glichen.

Das ESI-Massenspektrum der mit einer Ausbeute von 1.5 mg gewonnenen Substanz C ($R_t = 23.9$) weist einen Peak bei $m/z = 1116$ $[M+H]^+$ auf, dessen Hochauflösung die Summenformel $C_{54}H_{69}N_{10}O_{14}Cl$ ergibt, was für einen einfachen Einbau des zugefütterten $(NO_2)Nva$ spricht. Im Protonenspektrum der Substanz fehlen die vier charakteristischen Signale von $3'-H_a$, $3-H_a$, $1'-H$ und $3-H_b$ der $(3-Ncp)Ala$ I-Einheit (im Ring von **16**) im Bereich zwischen $\delta_H = -0.72$ und 0.55 . Die Resonanz des α -H Atoms dieser Aminosäureeinheit erfährt mit einer chemischen Verschiebung von $\delta_H = 3.23$ – 3.33 im Vergleich zu **16** einen Hochfeldshift um $\Delta\delta_H \approx 0.30$. Ein weiteres Signal von zwei Protonen, welche nach einem HSQC-Spektrum an ein Kohlenstoffatom der Verschiebung $\delta_C = 74.4$ gebunden sind, erscheint bei $\delta_H = 3.43$ – 3.52 und ist somit der endständigen Methylengruppe des $(NO_2)Nva$ I zuzuordnen. Im ^{13}C -NMR-Spektrum sind bei $\delta_C = 31.9$ und 21.7 zwei weitere Signale zu erkennen, die eine Verschiebung gegenüber **16** aufweisen und mit einem phasensensitiven HSQC-Spektrum als tertiäre Kohlenstoffe identifiziert werden können. Die zugehörigen Protonen dieser Kohlenstoffatome finden sich in den Bereichen von $\delta_H = 0.15$ – 0.21 sowie 0.22 – 0.30 und können in Verbindung mit den spektroskopischen Daten der freien Aminosäure⁸⁸ (s. Abb. 5, S. 25) als 3- und 4- H_2 identifiziert werden. Die Verschiebungen anderer Kohlenstoffatome und Protonen des Moleküls weisen keine großen Veränderungen gegenüber **16** auf. Da in diesem Fütterungsexperiment das enantiomerenreine L- $(NO_2)Nva$ gefüttert wurde und im Ringteil von **16** das D- $(3-Ncp)Ala$ zu finden ist, musste zusätzlich die Stereochemie der in Substanz C enthaltenen Aminosäuren analysiert werden. Hierzu wurde Substanz C hydrolysiert, mit Marfeys Reagenz⁸⁹ umgesetzt und das Reaktionsprodukt HPLC-analytisch untersucht. Der Vergleich mit synthetischem L- und D- $(NO_2)Nva$ ergab, dass Substanz C nur das D-Epimer enthält und demzufolge eindeutig als Hormaomycin D₁ (**21a**) mit der gezeigten Stereochemie identifiziert werden kann.

Im ESI-Massenspektrum der in einer Ausbeute von 2.3 mg als Reinsubstanz gewonnenen Substanz A ($R_t = 20.9$) ist ein Peak bei $m/z = 1105$ $[M+H]^+$ zu erkennen. Aus der Hochauflösung lässt sich die Summenformel $C_{53}H_{69}N_{10}O_{14}Cl$ ableiten, was einem doppelten Einbau des zugefütterten $(NO_2)Nva$ entspricht. Die für Hormaomycin D₁ (**21a**) beschriebenen Signale für die $(NO_2)Nva$ I-Einheit (im Ring des Moleküls) finden sich mit nur geringen Abweichungen im Protonen- wie auch Kohlenstoffspektrum von Substanz A wieder. Im Bereich der $(3-Ncp)Ala$ II-Einheit des Hormaomycins erscheinen wie erwartet Veränderungen. So erfährt auch hier das α -H Atom der Seitenkettenaminoäure verglichen zu Hormaomycin mit $\delta_H = 5.00$ einen Hochfeldshift um $\Delta\delta_H = 0.12$. Zusätzlich ist eine Methylengruppe bei $\delta_H = 4.34$ zu erkennen, welche zu einem Triplet aufspaltet. In Kombination mit ^{13}C - und HSQC-Korrelationsspektrum kann diese einem Kohlenstoffatom mit der chemischen Verschiebung von $\delta_C = 75.0$, welche für eine Bindung an eine Nitrogruppe spricht, zugeordnet werden. Durch ein phasensensitives HSQC-Spektrum sind zwei weitere Methylengruppen zwischen $\delta_H = 1.68$ – 1.77 ($\delta_C = 29.4$) sowie 1.75 – 1.92 ($\delta_C = 21.8$) identifizierbar, welche aber durch weitere Signale anderer Protonen überlagert werden. Die Zuordnung aller neuen Signale in den Resonanzspektren von Substanz A durch Kombination von 1H -, ^{13}C - und HSQC-Spektrum sowie Vergleich mit Spektren des freien $(NO_2)Nva$ zu zwei $(NO_2)Nva$ -Einheiten bestätigt die Vermutung, dass in diesem Fall die gefütterte Aminosäure erfolgreich beide $(3-Ncp)Ala$ Einheiten des Hormaomycins ersetzt hat und Substanz A als Hormaomycin D₃ (**21c**) identifiziert ist.



Die Fraktion B ($R_t = 21.9$) der chromatographischen Aufreinigung enthielt 0.2 mg eines Gemisches aus zwei Substanzen, welches aufgrund der geringen Substanzmenge nicht weiter getrennt werden konnte. Das ESI-Massenspektrum der Mischfraktion zeigte Peaks bei $m/z = 1117$ und 1105 (jeweils $[M+H]^+$). Nach erfolgreicher Strukturaufklärung von **21a** und **21c** war davon auszugehen, dass in der Mischfraktion neben **21c** das dritte denkbare Derivat, Hormaomycin D₂ (**21b**), enthalten ist. Um diese Annahme zu verifizieren, wurde **21b** von B.D. ZLATOPOLSKIY totalsynthetisch hergestellt.⁶⁷ Die ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der (NO₂)Nva II-Einheit von **21b** stehen in Übereinstimmung mit denen von **21c**. Eine HPLC-analytische Untersuchung bestätigte, dass es sich bei der in Fraktion B neben Hormaomycin D₃ (**21c**) enthaltenen Substanz um Hormaomycin D₂ (**21b**) handelt.

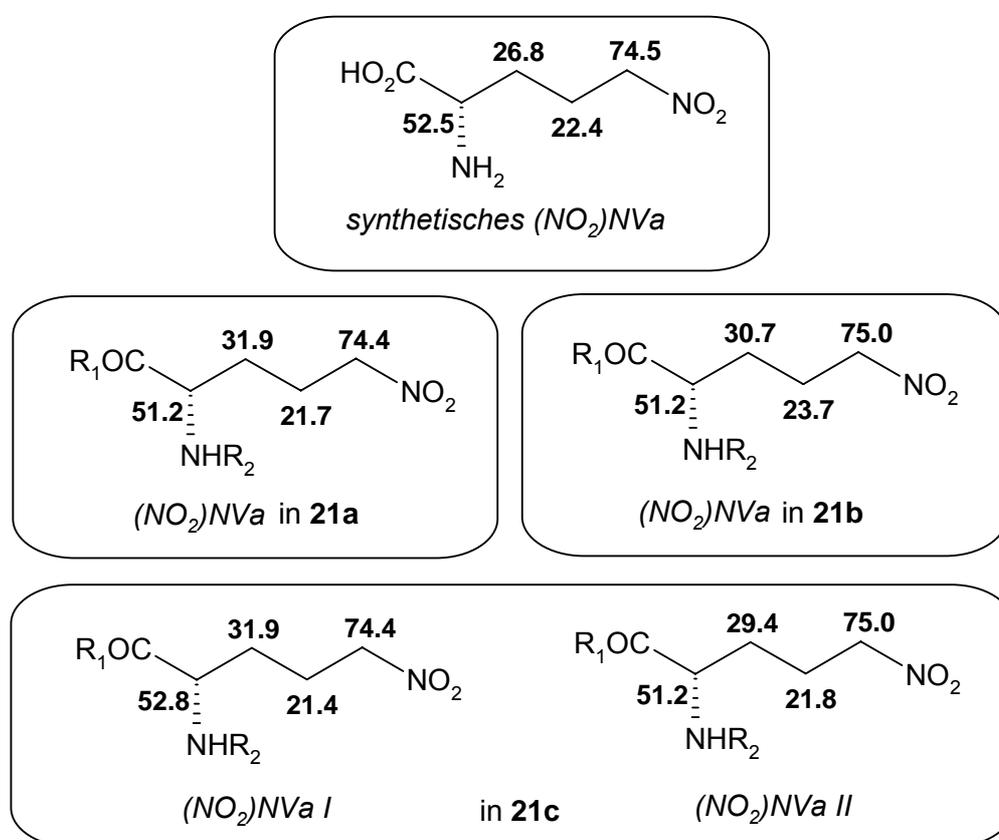


Abb. 5: Gute Übereinstimmung der ¹³C-NMR Verschiebungen des (NO₂)Nva als freie Aminosäure sowie als Baustein der Hormaomycine D₁₋₃ (**21a-c**) [synthetisches (NO₂)Nva: 50.3 MHz in D₂O⁶⁷; **21a-c**: 150.8 MHz in CDCl₃].

Fütterung von D-5-Nitronorvalin

Die Fütterung des D-(NO₂)Nva sollte Aufschluss darüber geben, ob es möglich ist, die Ausbeute von Hormaomycin D₁ (**21a**) gegenüber den anderen Derivaten zu steigern. Dies sollte der Fall sein, wenn eine externe Racemase das L-Epimer vor Bindung an den Synthetasekomplex epimerisieren muss, wie z.B. für das D-Alanin in Cyclosporin gezeigt werden konnte.⁹⁰ Ist hingegen eine interne Epimerase für diese stereochemische Transformation der Aminosäure verantwortlich, müsste die Spezifität der Binderegion im Multienzymkomplex die Aufnahme des D-Epimers vollständig verhindern.

Die Fütterungen wurden unter den Standardfermentationsbedingungen mit 1.0 und 2.0 mM Endkonzentrationen durchgeführt. In beiden Experimenten konnte nur Hormaomycin (**16**) in schlechten Ausbeuten isoliert werden (≈ 5 mg).

Fütterung von rac-5-Nitronorvalin

Die Ergebnisse der ersten Fütterungsexperimente ließen den Schluss zu, dass die Fütterung des racemischen Gemisches des (NO₂)Nva die gleichen Ergebnisse wie die Fütterung von L-(NO₂)Nva ergeben sollte. Der Vorteil ist hierbei die einfachere synthetische Darstellung der Aminosäure.

Das Epimerengemisch wurde unter Standardbedingungen gefüttert (2 mM Endkonzentration nach 34 h). Der Rohextrakt wurde an Kieselgel und semipräparativer HPLC chromatographiert. Die Hormaomycinanaloge **21a–c** konnten in ähnlichen Ausbeuten wie bei Fütterung von enantiomerenreinem L-(NO₂)Nva gewonnen werden.

2.3.1.2 Fütterung von L-Ornithin

Als Vorläufer für die Biosynthese des (3-Ncp)Ala-Bausteins wurde bereits von GEERS die proteinogene Aminosäure Lysin identifiziert.⁷¹ Zudem hatte ALVERMANN versucht, durch die Fütterung von L-Ornithin die Bildung 2-(2'-Nitrocyclopropyl)glycin [(2-Ncp)Gly] zu erreichen (s. Abb. 6, S. 27). Bei diesem Experiment war im ESI-MS-Spektrum der Hormaomycin-haltigen Fraktion ein Peak bei m/z = 1137 [M+Na]⁺ gefunden worden, was einem einfachen Einbau des (2-Ncp)Gly entsprechen würde. Die für eine Isolierung und Identifizierung notwendige Substanzmenge konnte zum damaligen Zeitpunkt nicht erreicht werden, weshalb erneut L-Ornithin gefüttert wurde.

Die Fütterung und Aufarbeitung erfolgten unter Standardbedingungen und ergaben ca. 7 mg eines Hormaomycingemisches. Im ESI-Massenspektrum ist erneut ein Peak bei m/z = 1137 [M+Na]⁺ zu erkennen. Dieser steht jedoch im Verhältnis 1:20 zum Hormaomycinsignal bei m/z = 1151 [M+Na]⁺. Eine Isolierung der Komponente war nicht möglich.

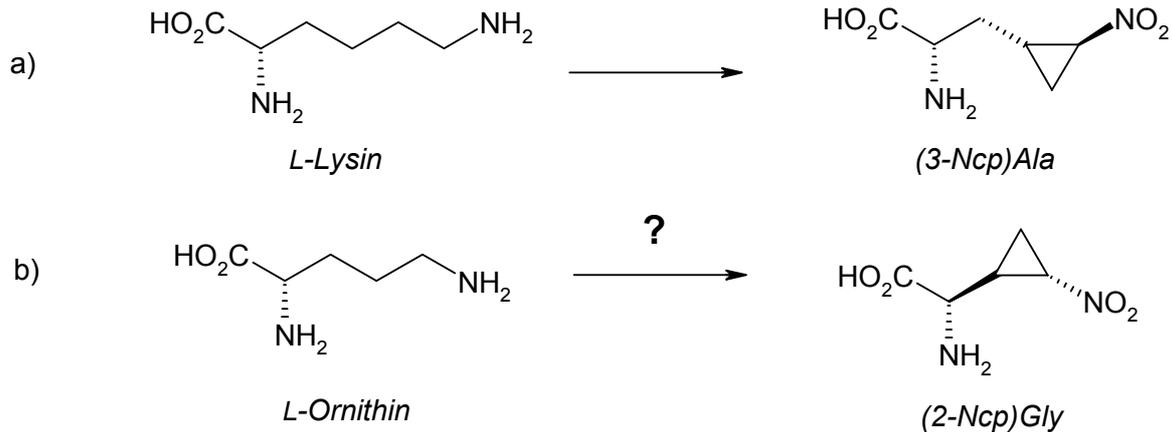


Abb. 6: a) Biosynthese von 3-(2'-Nitrocyclopropyl)alanin aus Lysin, b) Postulierte Biosynthese von 2-(2'-Nitrocyclopropyl)glycin aus Ornithin.

2.3.1.3 Fütterung von *rac*-2-(2'-Nitrocyclopropyl)glycin

ALVERMANN⁶⁶ gelang bei diesem Experiment die Isolierung von drei Substanzen, welche vermeintlich dem Einbau von (2-Ncp)Gly in Hormaomycin (**16**) entsprachen und als Hormaomycin B_{1a,b} und B₂ (**22a–c**) bezeichnet wurden. Die ESI-Massenspektren zeigten Peaks bei $m/z = 1105$ $[M+H]^+$ (für **22c**) und 1117 $[M+H]^+$ (für **22a,b**), die korrekten Molmassen müssten jedoch 1100 (**22c**, C₅₃H₆₅N₁₀O₁₄Cl) und 1114 (**22a,b**, C₅₄H₆₇N₁₀O₁₄Cl) betragen. Hier lag ein Widerspruch vor. Die ¹H- und ¹³C-NMR-Daten für die isolierten Substanzen wiesen trotz einer vermeintlichen Zuordnung der Signale zu (2-Ncp)Gly-Einheiten teils nicht erklärbare Beobachtungen auf. So konnten für die C-2' Kohlenstoffatome von **22c** chemische Verschiebungen von $\delta_C = 74.5$ und 75.9 gefunden werden, während C-2' der synthetischen Aminosäure HO·(2-Ncp)Gly·NH₂ mit $\delta_C = 59.5$ hierzu deutlich ins Hochfeld verschoben ist. In Hinblick auf die an dieses Kohlenstoffatom gebundene Nitrogruppe sind Verschiebungen von $\delta_C \approx 75.0$ nur an einer Alkylkette wie bei Nitropropan o.ä. zu erwarten.⁹¹ Beim Vergleich der spektroskopischen Daten der hier beschriebenen Analoga mit den in Kap. 2.3.1.1 charakterisierten Hormaomycinen D_{1–3} (**21a–c**) (siehe auch Abb. 5, S. 25) fallen große Übereinstimmungen auf. Um zu verifizieren, ob durch Fütterung von (2-Ncp)Gly die Nitronorvalinderivate **21a–c** gewonnen werden, wurden ALVERMANN's Experimente wiederholt.

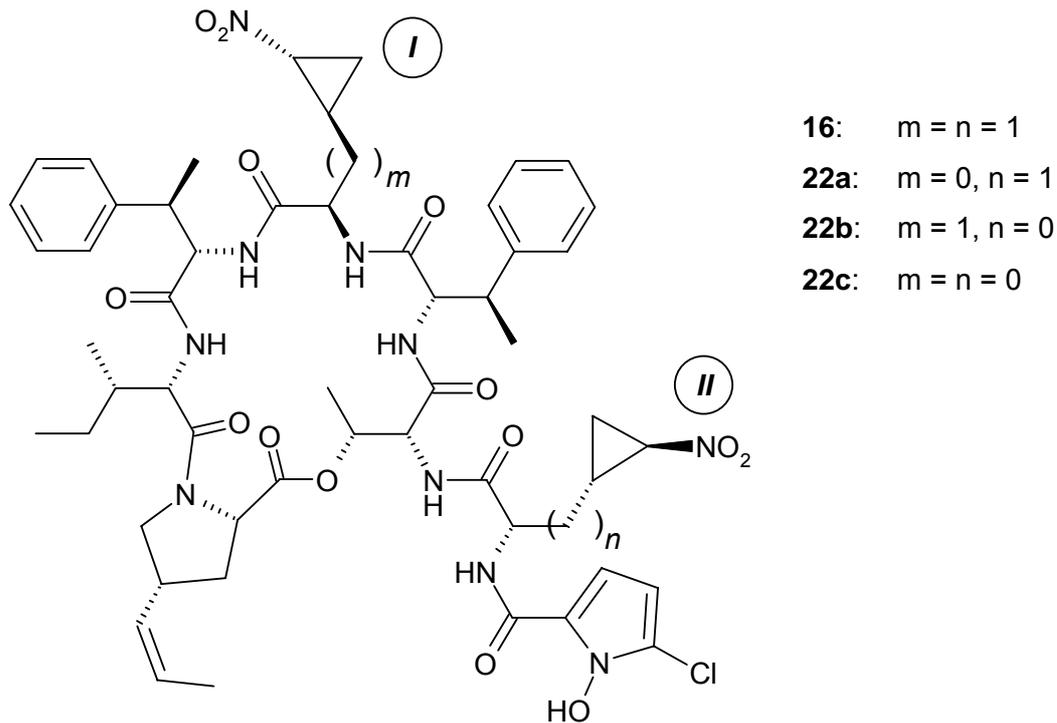


Abb. 7: Vermeintliche Hormaomycinanaloga $B_{1a,b+2}$ (**22a–c**) mit (2-Ncp)Gly-Einheiten nach ALVERMANN.⁶⁶

Die Zufütterung von *rac*-2-(2'-Nitrocyclopropyl)glycin erfolgte unter den Standardfermentationsbedingungen in 1 und 2 mM Konzentration. Das Rohprodukt wurde einmal an Kieselgel chromatographiert und die so erhaltene Hormaomycin-Fraktion (ca. 6 mg) massenspektrometrisch und durch HPLC-Analyse untersucht. Die Fraktion enthielt neben **16** ein Hormaomycin-Analogon mit $m/z = 1117$ $[M+H]^+$, dessen Ausbeute für eine Isolierung jedoch zu gering war. Die Retentionszeit des Analogons ($R_t = 16.2$ min) entspricht der von Hormaomycin D_2 (**21b**), Abb. 8 (S. 29) zeigt die Übereinstimmung der Protonenspektren.

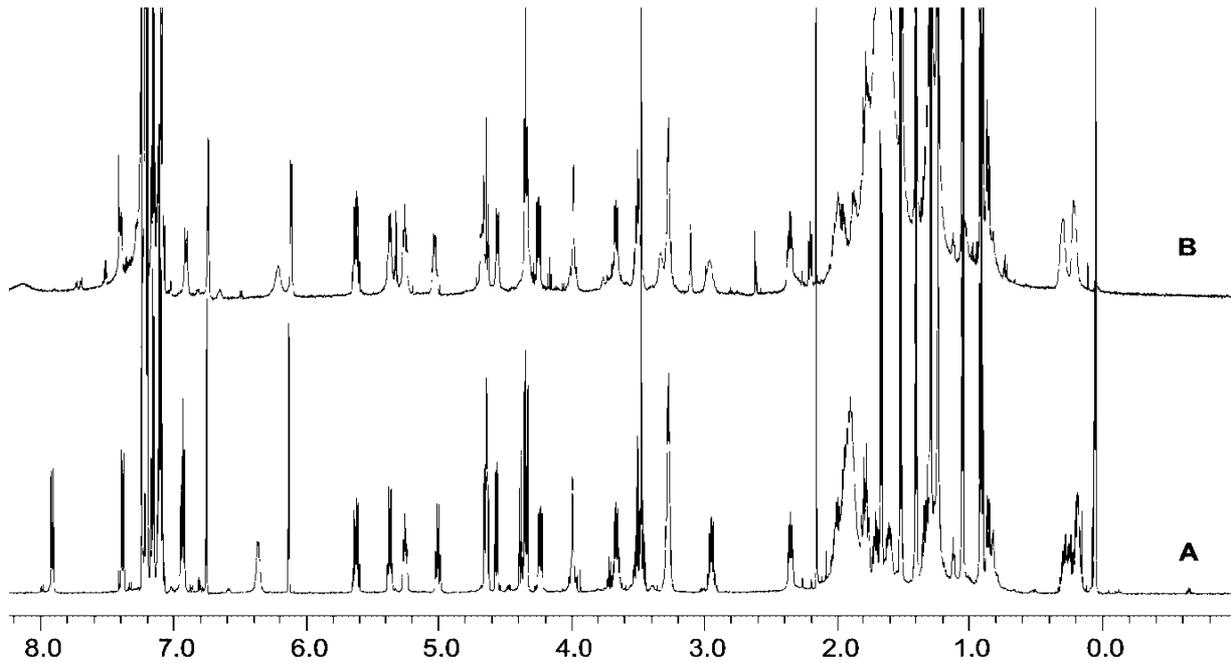


Abb. 8: Identische Protonenspektren von A) Hormaomycin D₃ [**21c**, doppelter Einbau des (NO₂)Nva, (600 MHz, CDCl₃)] und B) „Hormaomycin B₂“ (500 MHz, CDCl₃) beweisen die Identität beider Substanzen.

Überlegungen zur Ringöffnung von (2-Ncp)Gly

Die Beobachtung, dass bei Fütterung von (2-Ncp)Gly eine Ringöffnung der Aminosäure unter Bildung von 5-Nitronorvalin eintritt, ist durch die ausgesprochene Empfindlichkeit des (2'-Nitrocyclopropyl)methylfragments zu erklären. Dieses ist, wie in Abb. 9 gezeigt, in der Lage, eine Umlagerung unter Ringöffnung einzugehen, welche über ein radikalisches^{92,93} oder anionisches^{94,95} Intermediat verläuft. Wahrscheinlich beginnt die Reaktionsfolge mit einer Deprotonierung an C-2, einer für Racemasen charakteristischen Reaktion.⁹⁶ So könnte ein intermediär gebildetes Enolat eine Cyclopropylcarbinyl-Homoallyl-Umlagerung eingehen, um nach anschließender Protonierung die 2-Amino-3-(2'-Nitroethyl)acrylsäure (**23**) zu ergeben. Eine anschließende enzymatische Reduktion führt zum 5-Nitronorvalin.

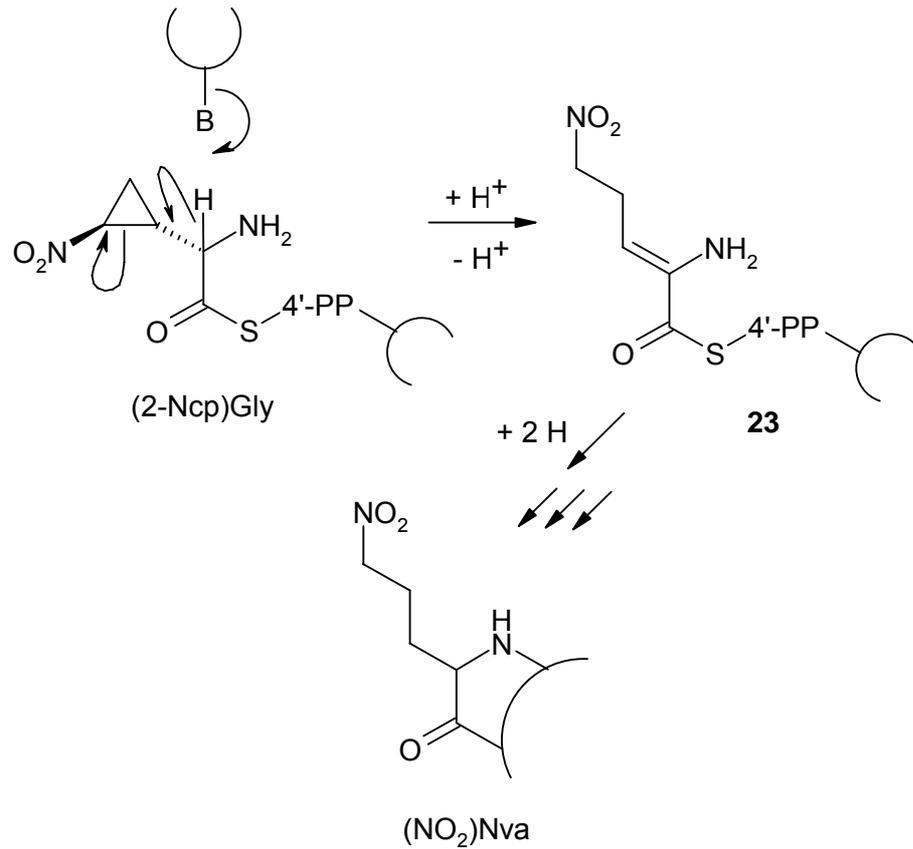


Abb. 9: Postulierter Mechanismus der Umlagerung von (2-Ncp)Gly zu 5-Nitronorvalin.

Ähnliches konnte von LIU *et al.* für Hypoglycin A [(2S,1'R)-Methylencyclopropylalanin, (**24**)]⁹⁷ gezeigt werden. Dieses wird in zwei Schritten zu Methylencyclopropanessigsäure (**25**) metabolisiert. Anschließend erfolgt eine enzymatische C-2-Deprotonierung von **25**, woran sich eine FADH-abhängige Ringöffnung über radikalische oder anionischen Zwischenstufen anschließt.^{98,99} Das Coenzym A Derivat von **25** ist ein Inhibitor der Acyl-CoA Dehydrogenase¹⁰⁰, wodurch der Verzehr unreifer, Hypoglycin A (**24**) haltiger Akipflaumen lebensbedrohliche Hypoglykämie hervorrufen kann.¹⁰¹

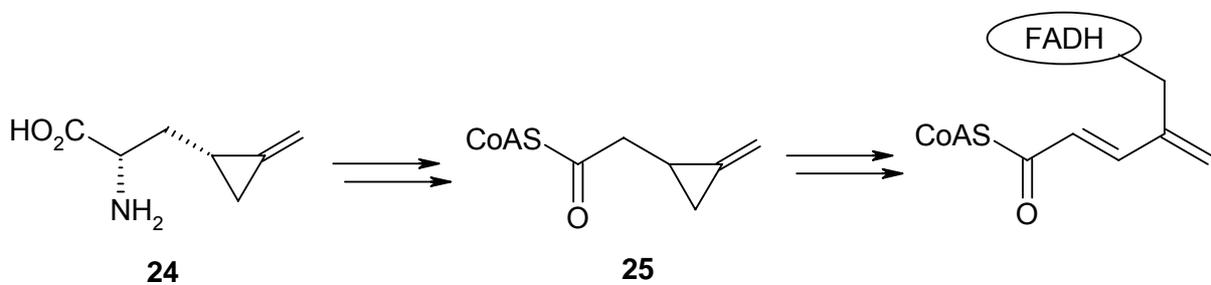
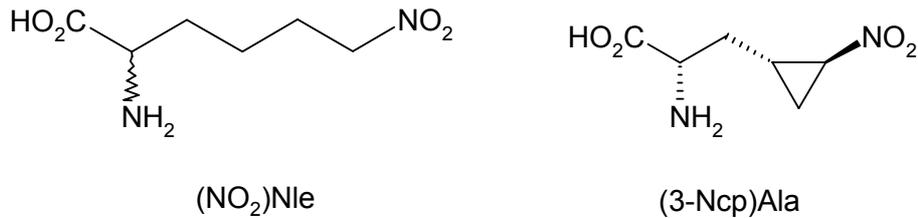


Abb. 10: Mechanismus der Ringöffnung von Hypoglycin A (**24**).

2.3.1.4 Fütterung von 6-Nitronorleucin

Durch die erfolgreichen Fütterungen von (NO₂)Nva ist gezeigt worden, dass die (3-Ncp)Ala-Module der Hormaomycin-Synthetase die Cyclopropyleinheit für die Erkennung nicht benötigen. In einem Experiment mit der gegenüber (NO₂)Nva um eine Methylengruppe verlängerten Aminosäure 6-Nitronorleucin [(NO₂)Nle] sollte die Spezifität gegenüber dem Abstand der funktionellen Gruppen getestet werden.

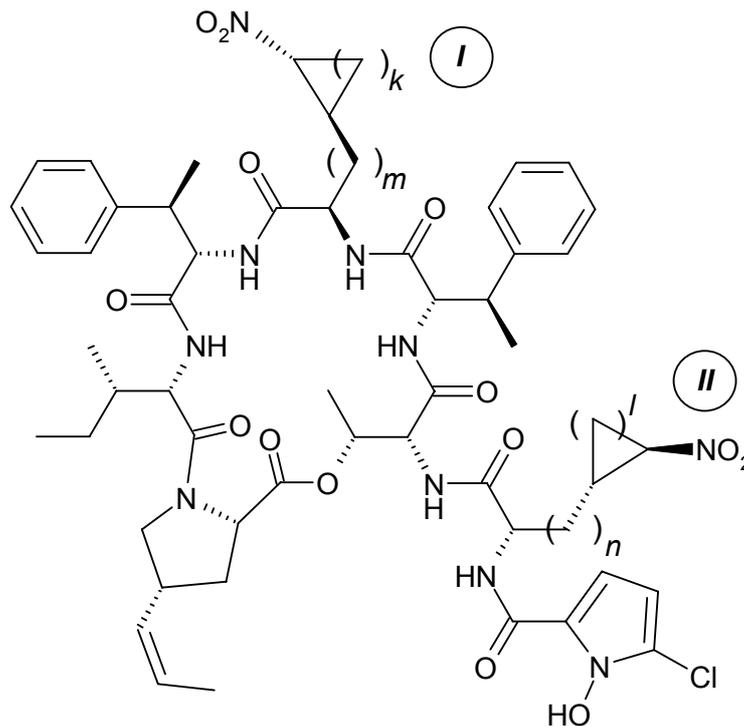


Fütterung von rac- und L-6-Nitronorleucin

Die Kultivierungen unter Zusatz von 1 und 2 mmol racemischem wie auch enantiomerenreinem L-(NO₂)Nle ergaben nach einer Chromatographie an Kieselgel vergleichbare Ausbeuten eines Hormaomycin-Gemisches von vier Komponenten. Das ESI-Massenspektrum des Gemisches zeigt drei Peaks bei $m/z = 1151 [M+Na]^+$, $1153 [M+Na]^+$ bzw. $1155 [M+Na]^+$. Diese Massen sprechen für einen erfolgreichen einfachen und doppelten Einbau sowie die Produktion von nativem Hormaomycin (**16**). Die Aufreinigung des Gemisches durch HPLC ergab 1.0 mg Substanz A ($R_t = 43.0$ min), 4.9 mg Fraktion B ($R_t = 45.1$ min) sowie 1.9 mg Substanz C ($R_t = 48.4$ min).

Aus dem hochauflösenden ESI-Massenspektrum von Substanz A lässt sich die Summenformel C₅₅H₇₁N₁₀O₁₄Cl ableiten, somit enthält die Substanz zwei Protonen mehr als Hormaomycin (**16**), was einem einfachen Einbau von (NO₂)Nle entspricht. Im Protonenspektrum sind die charakteristischen Signale der (3-Ncp)Ala I-Einheit im Ringteil von **16** bei $\delta_H = -0.65, -0.13, 0.29$ und 0.51 weiterhin zu erkennen, so dass ein Einbau in die Seitenkette anzunehmen ist. Ein zusätzliches Signal mit einer zwei Protonen entsprechenden Intensität bei $\delta_H = 4.36$ spaltet zu einem Triplett auf und zeigt im HSQC-Korrelationsspektrum eine Kopplung zu einem Kohlenstoffatom mit der Verschiebung $\delta_C = 75.1$, was auf eine Bindung zu einer Nitrogruppe schließen lässt. Das C-2 dieser Aminosäure-Einheit erfährt im Vergleich zur (3-Ncp)Ala II-Einheit von **16** mit $\delta_C = 51.7$ nur eine geringe Verschiebung im Gegensatz zu 2-H, welches mit $\delta_H = 4.95$ einen Hochfeldshift von $\Delta\delta_H = 0.17$ aufweist. Das phasensensitive HSQC-Spektrum lässt Signale von drei Methylengruppen bei $\delta_C = 22.3, 27.2$ und 29.7 erkennen, die an Protonen der chemischen Verschiebungen $\delta_H = 1.33-1.37, 1.28-1.30$ und $1.94-1.98$ gebunden sind. Aus dem ¹H-¹H-COSY Spektrum lässt sich eine Verknüpfung der CH₂-Gruppen ableiten, deren endständige Protonen mit 2-H bzw. 6-H₂ koppeln.

Ein HR-ESI-MS/MS-Spektrum unterstützt die Zuordnung aus den NMR-Spektren. Die Hochauflösung des Peaks bei $m/z = 401$ $[M+H]^+$ ergibt die Summenformel $C_{22}H_{25}N_4O_5$, welche einem (3-Ncp)Ala I-(β Me)Phe II-Thr-Bruchstück entspricht, so dass die Veränderung nicht den Ring sondern die Seitenkette betrifft. Zudem lässt sich von $m/z = 830$ $[M+H]^+$ die Summenformel der Ringeinheit ableiten ($C_{45}H_{58}N_7O_{10}$), dieser Peak ist auch für das Hormaomycin (**16**) typisch. Substanz A, als Hormaomycin E₂ bezeichnet, besitzt die Struktur **26b**.



Hormaomycin E₁ (**26a**): $k = 0, l = n = 1, m = 2$

Hormaomycin E₂ (**26b**): $l = 0, k = m = 1, n = 2$

Hormaomycin E₃ (**26c**): $k = l = 0, m = n = 2$

Substanz C, dessen Summenformel zu $C_{55}H_{71}N_{10}O_{14}Cl$ bestimmt wurde, zeigt im Gegensatz zu **26b** große Veränderungen in dem konservierten Bereich des Protonenspektrums bei $\delta_H < 0.60$. Die Protonen der (3-Ncp)Ala I-Einheit des Hormaomycins (**16**) fehlen, zusätzliche Signale bei $\delta_H = -0.29$ und 0.12 jeweils für 2 H lassen auf zwei Methylengruppen schließen. Aus einem HSQC-Korrelationsspektrum lässt sich ihre Bindung an Kohlenstoffatome, deren Signale bei $\delta_C = 20.4$ und 32.2 im Kohlenstoffspektrum erscheinen, ableiten. Eine dritte Methylengruppe ist durch Signale bei $\delta_H = 1.15-1.20$ und $\delta_C = 26.8$ zu erkennen. Auch in den Spektren von Substanz C wird ein Signal für C-6 mit der, durch die Bindung an die Nitrogruppe verursachten, charakteristischen chemischen Verschiebung von $\delta_C = 74.6$ detektiert. Die an dieses tertiäre Kohlenstoffatom gebundenen Protonen sind durch ein

Signal bei $\delta_{\text{H}} = 3.83$ im $^1\text{H-NMR}$ charakterisiert. Das $\alpha\text{-H-Atom}$ der neuen Aminosäure in Substanz C erfährt im Vergleich zu **16** mit $\delta_{\text{H}} = 3.25\text{--}3.29$ einen Hochfeldshift, wohingegen das Signal von C-2 mit $\delta_{\text{C}} = 53.0$ kaum Veränderungen aufweist. Die Zuordnung der Protonen zu den Positionen in einer $(\text{NO}_2)\text{Nle}$ -Kette ist wie für **26b** mit einem $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ -Spektrum möglich (Abb. 11). Eine Auswirkung des $(\text{NO}_2)\text{Nle}$ -Einbaus auf die chemischen Verschiebungen benachbarter Aminosäuren ist der Tieffeldshift des $\alpha\text{-H-Atoms}$ der $(\beta\text{Me})\text{Phe I}$ -Einheit auf $\delta_{\text{H}} = 4.64$.

Auch bei dieser Substanz eignet sich ein HR-ESI-MS/MS-Spektrum für die sichere Zuordnung. Für das Bruchstück des Rings lässt sich in diesem Fall eine Summenformel von $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_5$ ableiten, es trägt somit zwei Protonen mehr als bei **26b** bzw. **16** und entspricht somit einer $(\text{NO}_2)\text{Nle-}(\beta\text{Me})\text{Phe II-Thr}$ -Einheit. Eine um zwei Protonen reichere Summenformel findet sich auch für die Ringeinheit bei $m/z = 832$ ($\text{C}_{45}\text{H}_{60}\text{N}_7\text{O}_{10}$). Substanz C kann somit eindeutig als Hormaomycin E_1 (**26a**) identifiziert werden.

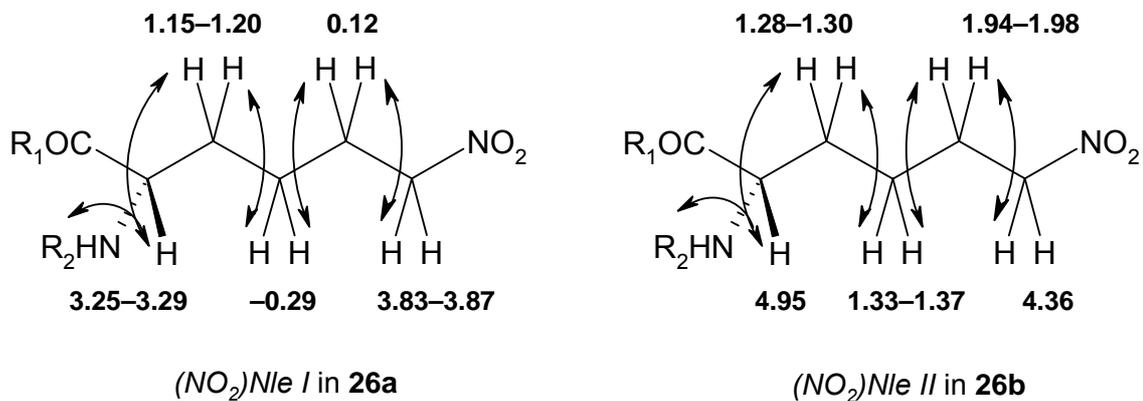


Abb. 11: $^1\text{H-}^1\text{H}$ -Kopplungen und ^1H -chemische Verschiebungen der $(\text{NO}_2)\text{Nle}$ -Einheiten in Hormaomycin $\text{E}_{1,2}$ (**26a,b**) (600 MHz, CDCl_3).

Fraktion B bestand aus zwei Substanzen im Verhältnis 8:5, die sich nicht trennen ließen. Ein ESI-MS ergab zwei Molekülpeaks bei $m/z = 1129$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ und 1133 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Obwohl wegen Überlagerung dieser Signale keine Hochauflösung zu erhalten war, ließ diese Zusammensetzung auf ein Gemisch aus Hormaomycin (**16**) und Substanz B, die scheinbar zwei $(\text{NO}_2)\text{Nle}$ -Einheiten trägt, schließen. Ein Protonenspektrum des Gemisches (s. Abb. 12, S. 35) zeigt neben den Hormaomycin-Signalen die zusätzlichen Signale von zwei $(\text{NO}_2)\text{Nle}$ Einheiten, die sich durch den Intensitätsunterschied eindeutig Substanz B zuordnen lassen. Die chemischen Verschiebungen dieser Resonanzen sind nahezu identisch mit denen der äquivalenten Signale von **26a** bzw. **26b**, welche einen einfachen Einbau des $(\text{NO}_2)\text{Nle}$ aufweisen. So lassen sich die Hochfeldverschiebungen der $\alpha\text{-H-Atome}$ zu $\delta_{\text{H}} = 4.95$ für $(\text{NO}_2)\text{Nle II}$ sowie $\delta_{\text{H}} = 3.25\text{--}3.29$ für $(\text{NO}_2)\text{Nle I}$ ebenso wie die Tieffeldverschiebung des

α -H-Atoms der (β Me)Phe I-Einheit bei **26a** beobachten. Dadurch gelingt die Strukturaufklärung aus dem Gemisch von Fraktion B zu **16** und Hormaomycin E₃ (**26c**).

Fütterung von D-6-Nitronorleucin

Bei der Kultivierung unter Zusatz von D-Nitronorleucin war nach Aufreinigung des Rohprodukts massenspektrometrisch kein Hormaomycin-Analogon nachweisbar. Die Ausbeuten an Hormaomycin (**16**, ca. 3 mg) waren zudem geringer als in gewöhnlichen Fermentationen.

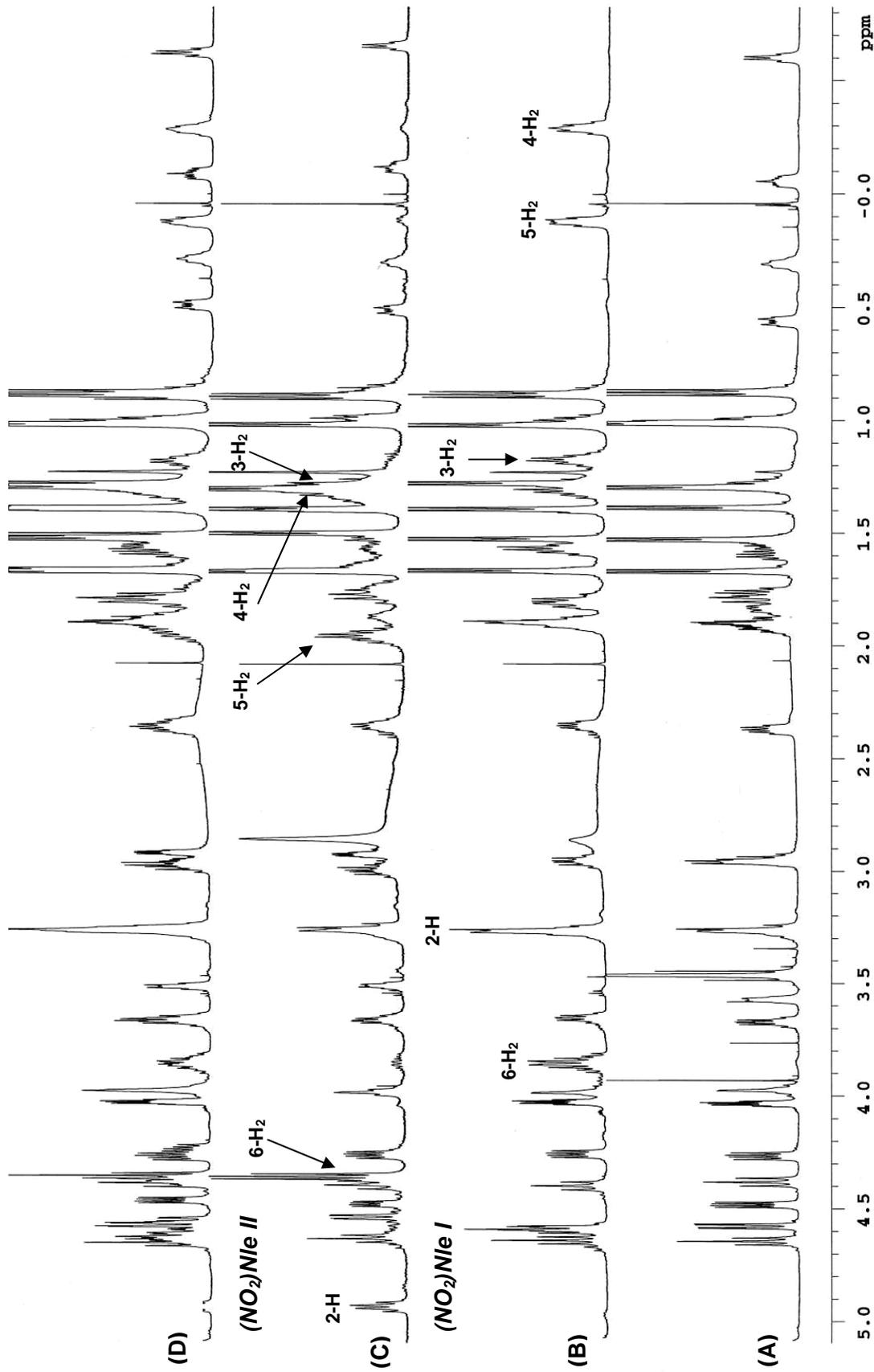
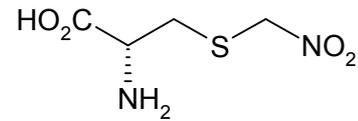


Abb. 12: ¹H-NMR-Spektren von A) Hormaomycin (**16**), B) Hormaomycin E₁ (**26a**), C) Hormaomycin E₂ (**26b**) und D) **16** im Gemisch mit Hormaomycin E₃ (**26c**) (600 MHz, CDCl₃), die Beschriftungen zeigen die Protonen der jeweiligen (NO₂)Nle-Einheit.

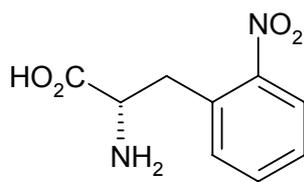
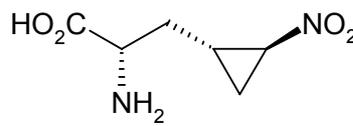
2.3.1.5 Fütterung von L-5-Nitro-4-thianorvalin (**27**)

Die Fermentation von *Streptomyces griseoflavus* (Stamm W 384) unter Zusatz von L-5-Nitro-4-thianorvalin (**27**) sollte zeigen, ob die Hormaomycin-Synthetase weitergehende Modifikationen in der 5-Nitronorvalin-Kette akzeptiert. Ein grundlegendes Problem bei der Fütterung

**27**

der Aminosäure **27** stellt allerdings ihre Instabilität dar. So zeigt sie Zersetzungserscheinungen in Wasser und vor allem an Luft.⁶⁷ Deswegen wurde **27** in fünf 0.4 mmol-Portionen gefüttert, welche erst kurz zuvor angelöst worden waren. Nach Standardaufarbeitung und einmaliger Chromatographie an Kieselgel konnte nur **16** (6.5 mg) isoliert werden. Ob das negative Ergebnis auf der Instabilität von **27** beruht, oder ob die Hormaomycin-Synthetase es nicht akzeptiert, muss offen bleiben.

2.3.1.6 Fütterung von L-ortho-Nitrophenylalanin

**28**

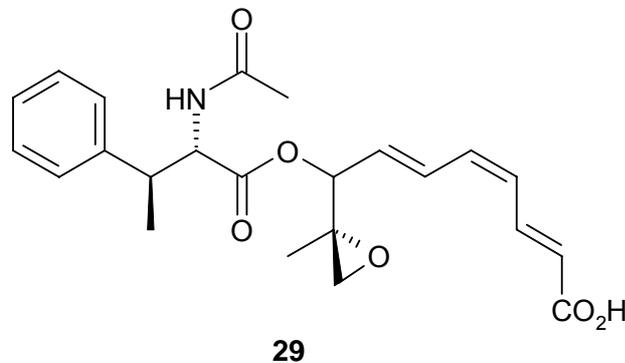
(3-Ncp)Ala

Durch die Fütterung von L-ortho-Nitrophenylalanin (**28**) sollte die Spezifität der Hormaomycin-Synthetase weiter ausgelotet werden. Das Phenylalaninderivat **28** besitzt einen ähnlichen

Abstand zwischen Carbonsäure-, Amino- und Nitrogruppe wie auch (3-Ncp)Ala. Die Fütterung des Nitrophenylalanins erfolgte unter Standardbedingungen, die Hormaomycin-haltige Fraktion zeigt nach Aufreinigung des Rohprodukts allerdings keine neuen Derivate.

2.3.2 Variation der 3-Methylphenylalanin-Einheiten

Die C-methylierte Aminosäure 3-Methylphenylalanin [(β Me)Phe] ist im Gegensatz zu den (3-Ncp)Ala-Einheiten auch in anderen Naturstoffen wie dem bicyclischen Glykopeptidlactam Theonegramid¹⁰², dem Cyclopeptid Bottromycin¹⁰³ oder AK Toxin I (**29**)^{104,105} enthalten.



Die Biogenese dieses dennoch ungewöhnlichen Bausteins konnte zum Teil von GEERS aufgeklärt werden (s. Kap. 2.4.3, S. 49).⁷¹ Als Vorläufer ist Phenylalanin identifiziert worden, welches durch Methionin methyliert wird. Bei der Fütterung von Phenylalaninderivaten ist also nicht nur die Spezifität der Hormaomycin-NRPS sondern auch die der Methyltransferase entscheidend. Versuche von ALVERMANN, durch Zufütterung von Ethylmethionin die Methyl- gegen eine Ethylgruppe auszutauschen, schlugen fehl.⁶⁶

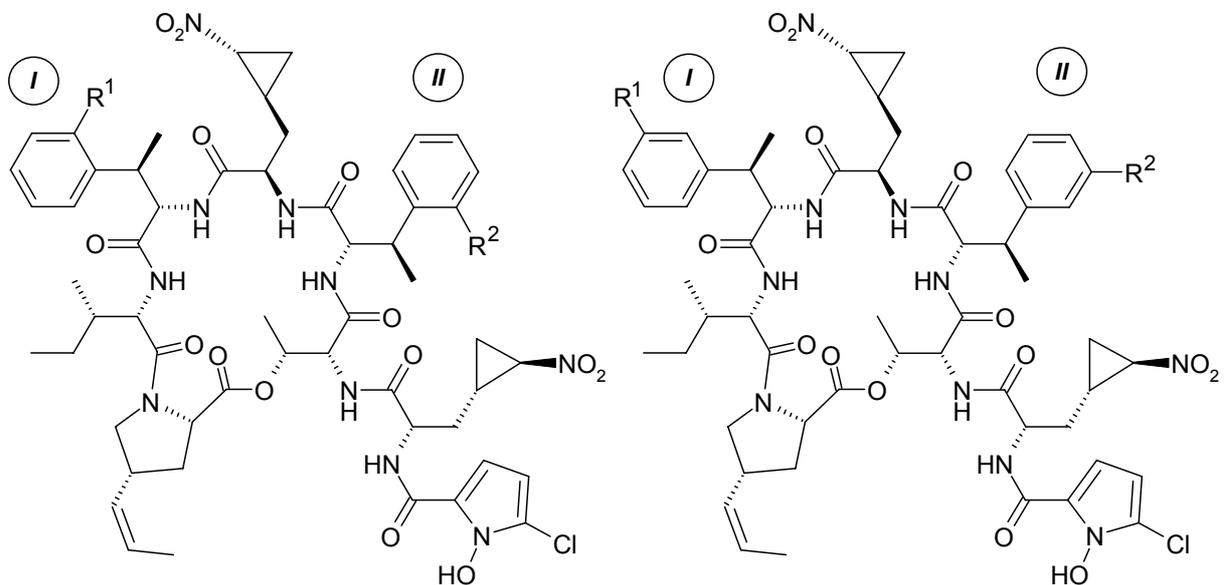
2.3.2.1 Fütterung von fluorierten Phenylalanin-Derivaten

Während chlorierte Naturstoffe [wie auch das Hormaomycin (**16**) selbst] weit verbreitet sind, existieren lediglich 13 fluorierte Naturstoffe.¹⁰⁶ Da die Einführung von Fluor in eine Substanz oftmals zu besserer Bioverfügbarkeit, Aktivität und Stabilität führt,¹⁰⁷ ist das Fluor für die Modifikation biologisch aktiver Naturstoffe interessant. Die ähnliche Größe des Fluors im Vergleich zu Wasserstoff ist für die biologische Derivatisierung von Vorteil, die Erkennung des Substrats durch die Biosynthesenzyme wird erleichtert, wie erfolgreiche Arbeiten an verschiedenen Sekundärmetaboliten zeigen.¹⁰⁸

Fütterung von rac-ortho- und rac-meta-Fluorphenylalanin

Die Fütterungen erfolgten unter den Standardfermentationsbedingungen in 2 mM Konzentration. Nach einmaliger Chromatographie an Kieselgel erhielt man ein Substanzgemisch mit Ausbeuten von 7.7 mg (Fütterung von *o*-Fluorphenylalanin) bzw. 17.8 mg (Fütterung von *m*-Fluorphenylalanin), welches sich nicht weiter aufreinigen ließ. Den Daten liegt das jeweilige Gemisch zugrunde.

In beiden Fällen sind im ESI-Massenspektrum neben Hormaomycin (**16**) zwei Peaks bei $m/z = 1145$ und 1163 $[M-H]^-$ zu erkennen, aus deren Hochauflösung sich Summenformeln von $C_{55}H_{68}N_{10}O_{14}FCl$ und $C_{55}H_{67}N_{10}O_{14}F_2Cl$ ableiten lassen. Im Falle der *o*-Fluorphenylalanin-Fütterung ergibt sich aus den massenspektrometrischen Messungen ein Verhältnis von 1.0 : 0.7 : 1.4 [**16**, Hormaomycin $F_{1,2}$ (**30a,b**), Hormaomycin F_3 (**30c**)], bei der *m*-Fluorphenylalanin-Fütterung betrug es 1.0 : 1.4 : 2.0 [**16**, Hormaomycin $G_{1,2}$ (**31a,b**), Hormaomycin G_3 (**31c**)]. Ob diese Verteilung den realen Verhältnissen entspricht, ist nicht klar, da durch die Einführung von Fluor die Ionisierbarkeit verändert wird. Die erhaltenen Daten sprechen somit für einen einfachen und doppelten Einbau der gefütterten Aminosäuren. Der beobachtete doppelte Einbau legt auch die Produktion beider denkbaren einfach derivatisierten Hormaomycinen **30a,b** und **31a,b** nahe.



Hormaomycin F_1 (**30a**): $R^1 = F, R^2 = H$

Hormaomycin F_2 (**30b**): $R^1 = H, R^2 = F$

Hormaomycin F_3 (**30c**): $R^1 = R^2 = F$

Hormaomycin G_1 (**31a**): $R^1 = F, R^2 = H$

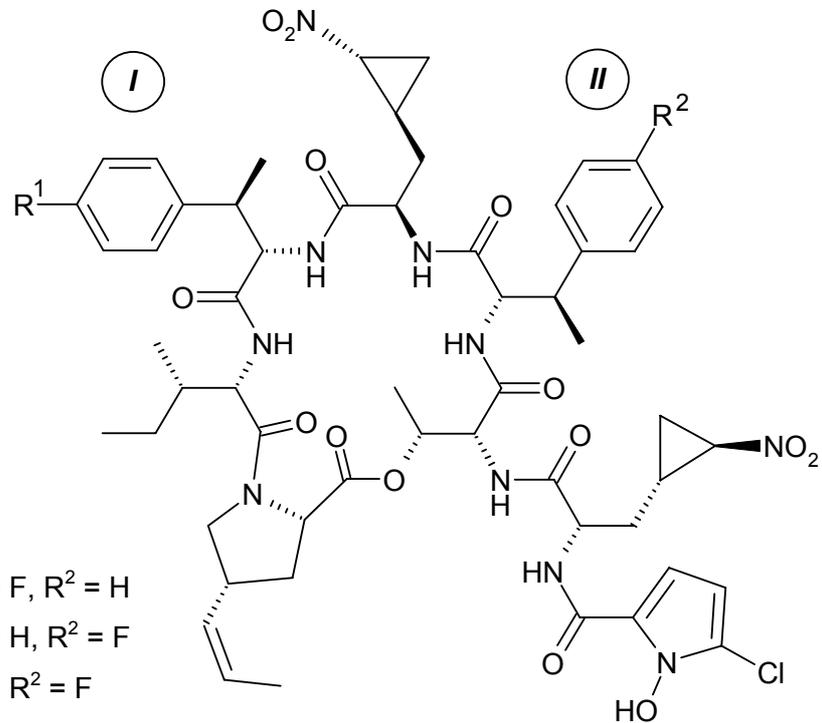
Hormaomycin G_2 (**31b**): $R^1 = H, R^2 = F$

Hormaomycin G_3 (**31c**): $R^1 = R^2 = F$

Fütterung von *rac*-*para*-Fluorphenylalanin

Die Fermentation erfolgte auch bei dem *para*-substituierten Derivat unter den Standardfermentationsbedingungen in 2 mM Konzentration. Das Substanzgemisch konnte nach einmaliger Chromatographie an Kieselgel in einer Ausbeute von 11 mg/L gewonnen werden. Das ESI-MS-Spektrum zeigt neben den erwarteten Peaks von **16** ($m/z = 1151$ $[M+Na]^+$) und dem Derivat (bzw. den Derivaten) mit einfachem Einbau der gefütterten Aminosäure bei $m/z = 1168$ $[M+Na]^+$ [Hormaomycin $H_{1,2}$ (**32a,b**)] einen weiteren bei $m/z = 1137$ $[M+Na]^+$, wohingegen der doppelte Einbau zu Hormaomycin H_3 (**32c**) nicht zu

beobachten war. Eine HPLC-analytische Untersuchung führt zu dem Ergebnis, dass es sich bei dem neuen 1137-Peak um zwei Substanzen handelt, deren Strukturaufklärung im nächsten Absatz beschrieben wird.

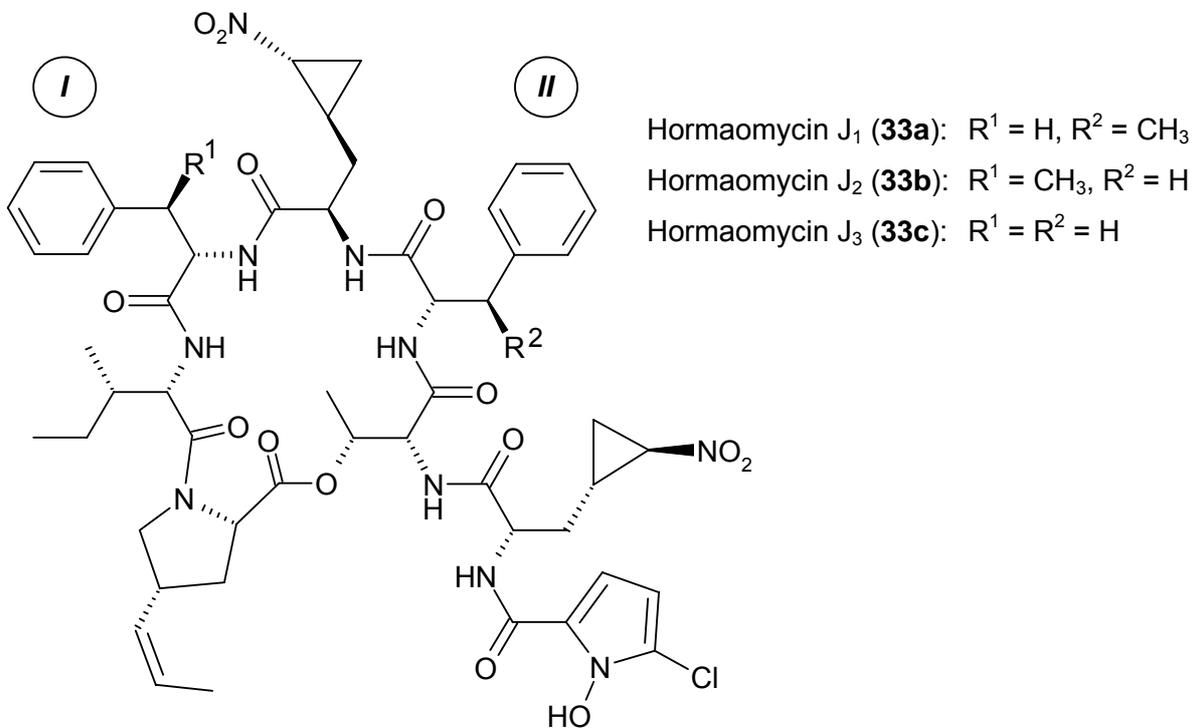


2.3.2.2 Fütterung von *rac*-*para*-Chlorphenylalanin

Nach Fermentation und Aufreinigung unter Standardbedingungen erhielt man ein Gemisch von Hormaomycinderivaten, welche im ESI-Massenspektrum Peaks bei $m/z = 1099$, 1113 und 1127 $[M-H]^-$ ergaben. Die erwarteten Molmassen von 1162 sowie 1196 g/mol für den einfachen und doppelten Einbau des methylierten *para*-Chlorphenylalanins waren nicht zu beobachten. Die HPLC-Aufreinigung des Gemisches ergab neben Hormaomycin (**16**) drei neue Metaboliten, in Ausbeuten von 1.2 mg (Substanz A, $R_t = 14.9$ min), 1.4 mg (Substanz B, $R_t = 16.2$ min) und 1.4 mg (Substanz C, $R_t = 18.5$ min).

Die Hochauflösung des ESI-MS-Signals von Substanz B bei $m/z = 1132$ $[M+NH_4]^+$ führt zu der Summenformel $C_{54}H_{67}N_{10}O_{14}Cl$, was formal dem Verlust einer Methylgruppe ($M-14$) entspricht. Im Einklang mit diesem Ergebnis fällt im Protonenspektrum sofort das Fehlen der Signale bei $\delta_H = 1.39$ und 3.68 , welche der Methylgruppe und dem 3-H der (β Me)Phe I-Einheit in **16** zuzuordnen sind, auf. Das ^{13}C -NMR-Spektrum hingegen zeigt nur das Fehlen der Methylgruppe bei $\delta_C = 13.0$, das C-3 des (β Me)Phe I findet sich nur gering ins Hochfeld verschoben bei $\delta_C = 38.2$. Ein Vergleich mit dem Protonenspektrum des Naturstoffs zeigt Substanz B zudem eine Veränderung im Kopplungsmuster des α -H-Atoms von (β Me)Phe I bei $\delta_H = 4.47$. Im Naturstoff ist hier eine Aufspaltung zum Dublett vom Dublett (Kopplung zu

3-H und -NH) zu erkennen, Substanz B weist hier ein zusätzliches Dublett auf. Die Kopplungspartner dieses Protons sind zwei Signale bei $\delta_{\text{H}} = 2.80$ und 3.37 , die dem Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 38.2$ zuzuordnen sind und eine Kopplungskonstante von $J = 14.5$ Hz zueinander sowie von $J = 11.0$ bzw. 4.5 Hz zu dem α -H-Atom aufweisen, womit gezeigt ist, dass die Methylgruppe der (β Me)Phe I-Einheit gegen ein Wasserstoffatom ausgetauscht wurde. Die Signale der aromatischen Protonen des Spektrums weisen nur geringfügige Veränderungen im Vergleich mit dem Naturstoff **16** auf. Hierdurch ist bewiesen, dass die Zufütterung des chlorierten Phenylalanins zu einem Einbau von natürlichem Phenylalanin (Phe) in die (β Me)Phe I-Einheit von **16** geführt hat. Weitere signifikante Veränderungen im Spektrum sind lediglich für die Verschiebungen der Protonen der (3-Ncp)Ala I-Einheit zu beobachten, welche einen starken Tieffeldshift von bis zu $\Delta\delta_{\text{H}} = 0.36$ erfahren (s. Tab. 1). Für Substanz B ergibt sich somit die Struktur **33a** (Hormaomycin J_1).



Für Substanz C lässt sich nach Hochauflösung des ESI-MS-Peaks die gleiche Summenformel wie für **33a** ableiten, auch hier scheint eine Methylgruppe durch ein Proton ersetzt worden zu sein. So ist im Protonenspektrum der Substanz eine Methylengruppe bei $\delta_{\text{H}} = 2.88$ und 2.96 zu erkennen, welche das gleiche Kopplungsmuster wie bei **33a** aufweist, wobei die Kopplungskonstanten in diesem Fall $^3J = 11.0$ Hz (3- H_{a}) und 5.0 Hz (3- H_{b}) betragen. Als Kopplungspartner dieser Protonen kann mit Hilfe eines ^1H - ^1H -COSY Korrelationsspektrums ein Proton bei $\delta_{\text{H}} = 4.61$ – 4.66 identifiziert werden, welches von dem 2-H der Isoleucin-Einheit überlagert wird. Die Methylgruppe der (β Me)Phe II-Einheit bei $\delta_{\text{H}} = 1.29$ in **16** kann bei Substanz C nicht detektiert werden, so dass der Einbau von Phenylalanin (Phe) in die (β Me)Phe II-Einheit von **16** nachgewiesen und somit nur die

Struktur **33b** für Hormaomycin J₂ in Frage kommt. Auch bei **33b** fallen die Tieffeldverschiebungen der (3-Ncp)Ala I-Einheit auf, welche zum Teil größer als bei **33a** sind (s. Tab. 1). Für **33b** konnten, obwohl die Ausbeuten vergleichbar mit denen von **33a** schienen, keine ¹³C-NMR-Spektren gewonnen werden.

	Hormaomycin (16)	Hormaomycin J ₁ (33a)	Hormaomycin J ₂ (33b)
	δ_{H} [ppm]		
2-H	3.53	3.46	3.65
3-H _a	-0.09	0.05	0.24
(3-Ncp)Ala I 3-H _b	0.58	0.60	0.78
1'-H	0.29	0.55	0.68
2'-H	2.96	3.08	3.10
3'-H _a	-0.62	-0.26	-0.20
3'-H _b	0.99	1.10	0.95

Tab. 1: ¹H-chemische Verschiebungen der (3-Ncp)Ala I Einheit in Hormaomycin (**16**) und in den Desmethylhormaomycinen Hormaomycin J_{1,2} (**33a,b**).

Nach Zuordnung der Molmasse 1114 zu den Hormaomycinen J_{1,2} (**33a,b**) musste Substanz A die geringste Molmasse besitzen. Durch die Hochauflösung des Peaks bei m/z = 1118 [M+NH₄]⁺ ergibt sich die Summenformel C₅₃H₆₅N₁₀O₁₄Cl. Folglich ist bei Substanz A von einem doppelten Einbau des Phenylalanins in die (βMe)Phe-Einheiten des Hormaomycins auszugehen. Ein Protonenspektrum der Substanz bestätigte diese Vermutung, trotz schlechter Qualität des Spektrums aus Substanzmangel und weiterhin enthaltenen Verunreinigungen ist zu erkennen, dass beide Methylgruppen nicht mehr vorhanden sind. Zudem sind die Signale für 3-H_{a,b} der Phe I-Einheit bei $\delta_{\text{H}} \approx 2.82$ und 3.35 sowie die der Phe II-Einheit bei $\delta_{\text{H}} \approx 2.85$ und 3.05 zu erkennen. Die geringe Qualität der Spektren ermöglicht jedoch keine sichere Identifizierung der α-H-Atome der ausgetauschten Einheiten und anderer Protonen. Mit den vorhandenen Daten kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich bei Substanz A um Hormaomycin J₃ (**33c**) handelt.

Durch einen HPLC-Vergleich der bei Fütterung von *para*-Fluorphenylalanin entstandenen Metaboliten mit **33a–c** konnte gezeigt werden, dass in diesem Experiment neben den fluorierten Hormaomycinen H_{1,2} (**32a,b**) die Hormaomycine J_{1,2} (**33a,b**) produziert wurden, also eine ähnliche Hemmung der Methyltransferase induziert wurde.

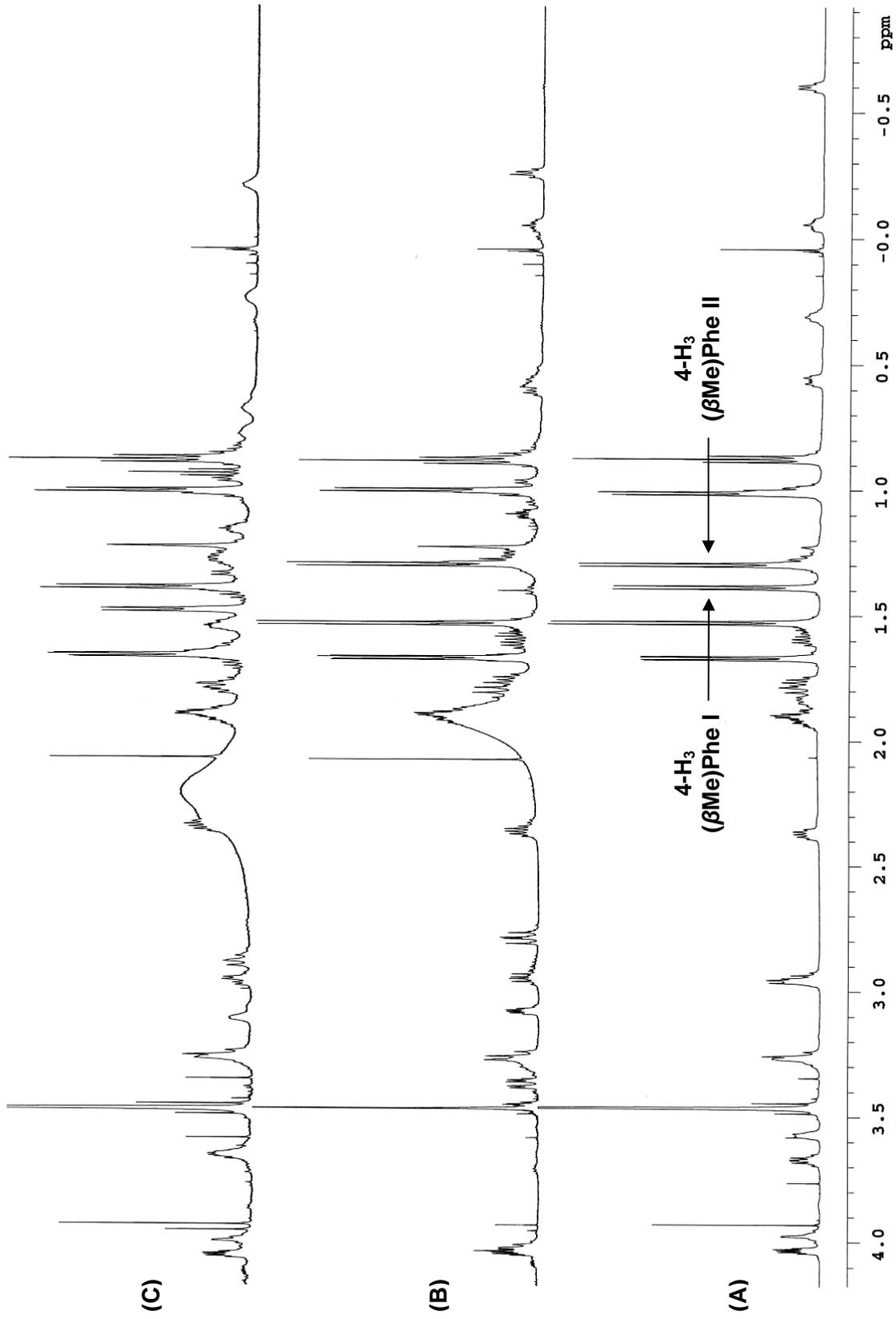


Abb. 13: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (600 MHz, CDCl_3) von A) Hormaomycin (**16**), B) Hormaomycin J_1 (**33a**) und C) Hormaomycin J_2 (**33b**).

2.3.2.3 Fütterung von *rac-para*-Brom- und Nitrophenylalanin

Die Fermentationen von *Streptomyces griseoflavus* (Stamm W 384) unter Zusatz von *rac-para*-Bromphenylalanin ergab nach Chromatographie des Rohprodukts an Kieselgel ein Substanzgemisch mit einer Ausbeute von 9.7 mg. Im ESI-Massenspektrum waren erneut die Hormaomycine J₁₋₃ (**33a–c**) zu erkennen. Die Fütterung des nitrosubstituierten Phenylalanins hingegen ergab eine Ausbeute von 13.4 mg, das doppelt derivatisierte Hormaomycin J₃ (**32c**) war in diesem Fall nicht nachzuweisen. Die relativen Ausbeuten der Fütterungsexperimente sind in Tab. 2 dargestellt.

Gefütterte Substanz	33a	33b	33c	16
D-/L- <i>p</i> -F-Phe	39	39	0	100
D-/L- <i>p</i> -Cl-Phe	45	45	34	100
D-/L- <i>p</i> -Br-Phe	21	21	3	100
D-/L- <i>p</i> -NO ₂ -Phe	24	24	0	100

Tab. 2: Relative Ausbeuten [%] der Desmethylhormaomycine Hormaomycin J₁₋₃ (**33a–c**) im Vergleich zu Hormaomycin (**16**) aus Fütterungsexperimenten mit unterschiedlich substituierten *para*-Phenylalaninen.

2.3.2.4 Fütterung von L-Tyrosin

Da unnatürliche Aminosäuren wie die *para*-halogenierten Phenylalanine eine Methylierung von Phenylalanin verhindern und es so zum Einbau der natürlichen Aminosäure in das Peptid kommt, sollte untersucht werden, ob auch Tyrosin hierzu in der Lage ist. Nach Fütterung in 2 mM Konzentration und Aufarbeitung unter Standardbedingungen fiel in diesem Fall jedoch nur natives Hormaomycin (**16**) an. Diese Beobachtung kann jedoch nicht endgültig klären, ob Tyrosin prinzipiell auch zu einer Inhibierung der Methylierung in der Lage ist, da diese Aminosäure vom Primärstoffwechsel des Organismus metabolisiert werden kann und so eventuell nicht in ausreichender Konzentration vorliegt.

2.3.2.5 Fütterung von *rac*-Phenylglycin

Die für den Einbau der (β Me)Phe-Einheiten verantwortlichen Module der Hormaomycin-NRPS haben, wie in Kap. 2.3.2 (S.37) beschrieben, eine allgemeine Substrattoleranz gezeigt. Durch Fütterung von Phenylglycin sollte versucht werden, diese Aussage mit der

Verkürzung der Kettenlänge zu überprüfen. Die Fütterung von 2 mmol *rac*-Phenylglycin zu der wachsenden Kultur unter Standardbedingungen ergab nach einmaliger Chromatographie an Kieselgel eine Hormaomycin-haltige Fraktion in einer Ausbeute von 13.5 mg. Im ESI-Massenspektrum zeigte sich jedoch nur der Peak für Hormaomycin (**16**), Derivate waren nicht nachweisbar.

2.3.3 Variation der 5-Chlor-*N*-hydroxypyrrolcarbonsäure-Startereinheit

Schon von GEERS wurde postuliert, dass die 5-Chlor-*N*-hydroxypyrrolcarbonsäure (Chpca) die Startereinheit der Hormaomycin-Biosynthese ist (s. Kap. 2.4, S. 47). In ihren Arbeiten identifizierte sie zudem die Aminosäure L-Prolin als Vorläufer dieser ungewöhnlichen Carbonsäure.⁷¹ Ein vermutliches Intermediat in der Biosynthese der Chpca, die 2-Pyrrolcarbonsäure (2-PCA), kommt frei im Kulturfiltrat von *Streptomyces griseoflavus* vor und kann in Ausbeuten von ca. 10 mg/L isoliert werden. Ziel der Fütterungen von zu der 2-PCA verwandten Vorläufern war somit neue Erkenntnisse zur Biosynthese zu erlangen. Weiterhin sollten sich Hinweise auf die Spezifität des ersten Moduls in der Hormaomycin-NRPS sowie vorgeschalteter Enzyme, die für Chlorierung und Hydroxylierung verantwortlich sind, ergeben.

Alle Fermentationen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt und die Vorläufer in 2 mM Konzentration gefüttert.

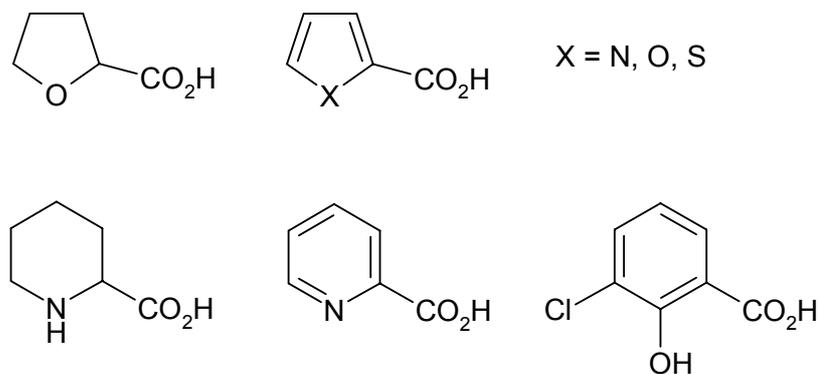


Abb. 14: Vorläufer für Fütterungsexperimente zur Variation der Chpca-Startereinheit.

In den Fütterungsexperimenten mit Furan-, Tetrahydrofuran- und Thiophen-2-carbonsäure sowie Picolin-, Pipecolin- und 3-Chlorsalicylsäure (s. Abb. 14) war nach Standardaufarbeitung lediglich Hormaomycin (**16**) in Ausbeuten von 8–15 mg zu isolieren. Die isolierten Mengen entsprechen somit Fermentationen ohne Zusatz von Vorläufern.

Die Zugabe von 2 mmol 2-Pyrrolcarbonsäure bewirkte eine Steigerung der Ausbeute von **16** (bis zu 45 mg/L), was dem vierfachen einer durchschnittlichen Fermentation ohne Zusatz

dieses Vorläufers entspricht. Durch diese Fütterung scheint also ein *bottle-neck* in der Biosynthese von **16** gefunden zu sein. Die Fütterung von 2-PCA in 4 und 8 mM Konzentration führt zu keiner weiteren Erhöhung der Ausbeute, Zusatz von 1 mmol ergibt **16** in einer Ausbeute von 21 mg/L.

2.3.4 Diskussion der Ergebnisse

Durch die Experimente zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese (PDB) am Hormaomycin-Produzenten *Streptomyces griseoflavus* (Stamm W 384) ist ersichtlich geworden, dass die unterschiedlichen Module der Peptidsynthetase unterschiedliche Substratspezifität besitzen. So konnte ALVERMANN zeigen, dass scheinbar keine Substrattoleranz in den *allo*-Threonin und den Isoleucin-Einheiten besteht, die Fütterungsexperimente bezüglich der Startereinheit zeigen auch hier eine geringe Toleranz. Im Gegensatz hierzu konnte durch die erzielten Ergebnisse eine große Toleranz der Hormaomycin-Synthetase am (3-Ncp)Ala- wie auch am (β Me)Phe-Modul nachgewiesen werden.

Die (3-Ncp)Ala-Einheiten

Durch den erfolgreichen Einbau der offenkettigen Aminosäuren 5-Nitronorvalin und 6-Nitronorleucin [(NO₂)Nle] und die daraus resultierende Bildung der Hormaomycine D₁₋₃ (**21a-c**) und E₁₋₃ (**26a-c**) konnte gezeigt werden, dass der Cyclopropylring für die Modul-Erkennung nicht notwendig ist. Auch spielt der Abstand der funktionellen Gruppen nur eine untergeordnete Rolle, im (NO₂)Nle ist dieser im Vergleich zum (3-Ncp)Ala vergrößert. Grenzen der Substrattoleranz werden durch die Misserfolge bei der Fütterung von 5-Nitro-4-thianorvalin (**27**) und *ortho*-Nitrophenylalanin (**28**) aufgezeigt. Ob die Verkürzung der Aminosäurekette um eine Methylengruppe im Fall des 2-(2'-Nitrocyclopropyl)glycins von dem Modul akzeptiert wird, kann aufgrund der (enzymatischen) Umwandlung der Substanz zu 5-Nitronorvalin nicht gesagt werden. Die Hormaomycine B_{1a,b+2} (**22a-c**) scheinen mit diesem Fütterungsexperiment nicht zugänglich zu sein. Auch die Fütterung von Ornithin brachte keinen Erfolg, die Hormaomycine B_{1a,b} (**21a,b**) sind höchstens in Spuren nachweisbar.

Die (β Me)Phe-Einheiten

Die in *ortho*- und *meta*-Position fluorierten Phenylalaninderivate sind als Substrate für die Methyltransferase wie auch das NRPS-Module gut geeignet und treten in methylierter Form auf, wobei sich die Hormaomycine F₁₋₃ (**30a-c**) und G₁₋₃ (**31a-c**) nicht vom Hormaomycin (**16**) trennen lassen. Das *para*-Fluorphenylalanin wird auch von beiden Enzymen als Substrat erkannt [Hormaomycine H_{1,2} (**32a,b**)], scheint aber, wie auch die in gleicher Position chlorierten, bromierten und nitrierten Phenylalanine, als Inhibitor der Methyltransferase zu wirken. Dies lässt sich an dem Einbau von Phenylalanin in das Peptid erkennen, welcher zur

Bildung der Desmethylhormaomycine J₁₋₃ (**33a-c**) führt. Der Abstand der funktionellen Gruppen zum Phenylring ist für die Erkennung wichtig, wie durch den Misserfolg der Phenylglycinfütterung gezeigt werden konnte.

Die Fütterungsexperimente und die gewonnenen Derivate liefern zudem weitere Erkenntnisse zur Biosynthese des Hormaomycins (**16**), auf die im nächsten Kapitel eingegangen werden soll. Die Biologischen Aktivitäten der neuen Hormaomycine werden in Kap. 2.6 (S. 61) besprochen.

2.4 Die Biosynthese des Hormaomycins

2.4.1 Die frühe Biosynthese nichtribosomaler Peptide

Die Aminosäuren nichtribosomal aufgebauter Peptide zeigen eine wesentlich größere strukturelle Vielfalt als Peptide ribosomalen Ursprungs. Die benötigten Aminosäuren werden zumeist vor der Bindung an einen Multienzymkomplex, der die eigentliche Peptidbiosynthese katalysiert, aus dem Pool der proteinogenen Aminosäuren aufgebaut.

Ein Beispiel für die strukturelle Vielfalt sind Cyclopropylgruppen tragende Aminosäuren wie die Coronaminsäure, einer 2,3-Methanoaminosäure aus dem Peptid-Polyketid-Hybrid Coronatin (**34**), deren Biosynthese von WALSH *et al.* aufgeklärt werden konnte.^{109,110} Da Fütterungsexperimente mit isotoopenmarkierten *L-allo*-Isoleucinen den Vorläufer, nicht aber den Mechanismus der Bildung der Coronaminsäure aufzeigen konnten,^{111,112} wurden molekularbiologische Methoden angewandt. Nach Aufklärung des Biosynthesegenclusters von **34**¹¹³ gelang die Isolierung der Biosyntheseenzyme CmaA–E,¹¹⁴ die genaue Untersuchungen aller Intermediate ermöglichten. Dies führte zu dem Ergebnis, dass der Cyclopropanring nach Aktivierung einer Methylgruppe durch Chlor entsteht.

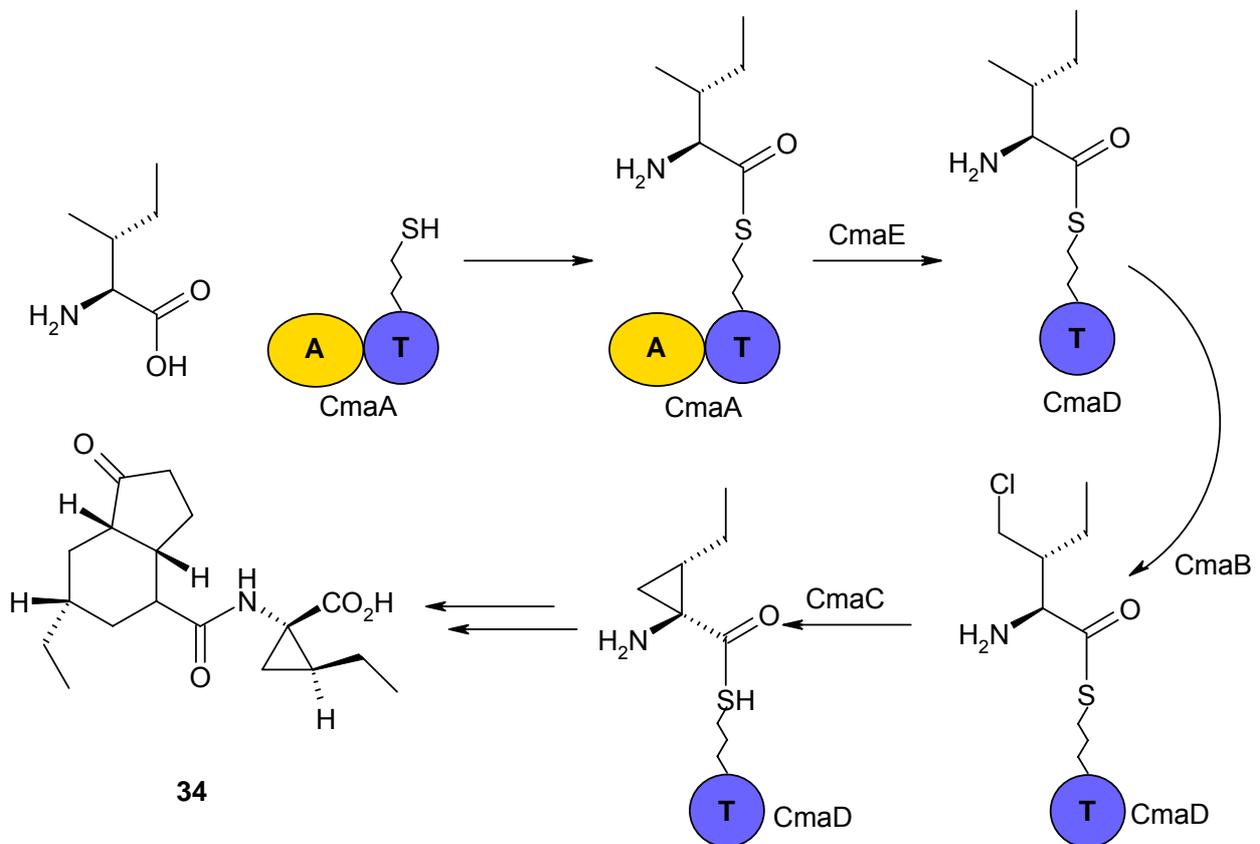


Abb. 15: Darstellung der Biosynthese der Coronaminsäure im Coronatin (**34**).^{109–113}

Die Einführung des Chlors übernimmt eine Nicht-Häm-Eisen-Oxygenase, in deren Zentrum hochreaktives Eisen (IV) vorliegt. In einem radikalischen Mechanismus wird dabei das Halogen in eine reaktionsträge Methylgruppe eingeführt. Ein ähnlicher Mechanismus eines solchen Enzyms ist vor kurzem für die Biosynthese von 4-Chlorthreonin, einer Aminosäure des Peptidlactons Syringomycin E, nachgewiesen worden.¹¹⁵ Untersuchungen an FADH₂-Oxygenasen hingegen zeigen, dass diese Halogene nur für die Halogenierung von ungesättigten Systemen aktivieren können. Die Ergebnisse für Coronatin sind somit ein eindrucksvolles Beispiel dafür, wie gut die Natur die Reaktivität von Enzymen den Substraten anpasst.

2.4.2 Der Mechanismus der (3-Ncp)Ala-Biosynthese

Neben der Möglichkeit, Dreiringe durch intramolekularen Ringschluss zu bilden, wird für andere Naturstoffe die Methylierung einer Doppelbindung angenommen.¹¹⁶ Dieser Mechanismus konnte für Hormaomycin (**16**) durch Fütterungsversuche mit isotoptenmarkierten Aminosäuren von GEERS ausgeschlossen werden.^{68,71} So ist L-Lysin der Ausgangspunkt für die Biosynthese des 3-(2'-Nitrocyclopropyl)alanins, alle Kohlenstoffe und der Stickstoff der endständigen Nitrogruppe stammen aus dieser proteinogenen Aminosäure. Die Kenntnis dieses Vorläufers war die Grundlage für die Untersuchungen von ALVERMANN⁶⁶ zum genauen Mechanismus der Biosynthese dieser außergewöhnlichen 4,5-Methano-aminosäure. Die Fütterung Deuterium-markierter Lysine und die Bestimmung ihrer Einbauraten in **16** führte zu der Erkenntnis, dass mit [6,6-²H₂]Lysin die Markierung verloren geht, was z.B. durch eine intermediäre sp²-Hybridisierung des Kohlenstoffs erklärt werden kann. Durch Fütterung von [3,3-²H₂]-, [5,5-²H₂]Lysin sowie [5,5-²H₂]4-Hydroxylysin und das Auffinden von jeweils zwei Markierungen in den (3-Ncp)Ala-Einheiten hingegen konnte bewiesen werden, dass an diesen Stellen kein Protonenaustausch stattfindet. In der 4-Position wurde durch Fütterung von [4,4-²H₂]Lysin lediglich ein Deuteriumatom gefunden, was ein Cyclisierungsmechanismus berücksichtigen muss.

Durch den in Kap. 2.3.1.4 (S. 31) beschriebenen erfolgreichen Einbau von 6-Nitronorleucin und die Isolierung der daraus resultierenden Hormaomycine E₁₋₃ (**26a-c**) kann weiterhin die vollständige Oxidation der Aminogruppe vor dem Ringschluss ausgeschlossen werden. Die erfolglosen Fütterungsexperimente mit den D-Epimeren der eingebauten Aminosäuren L-5-Nitronorvalin und L-6-Nitronorleucin lässt, wie schon zuvor vermutet, die Beteiligung einer externen Racemase an der Biosynthese des (3-Ncp)Ala I unwahrscheinlich erscheinen. Mit diesen zusätzlichen Informationen kann nun ein neuer Mechanismus für die Biosynthese dieser ungewöhnlichen Cyclopropylaminosäure vorgeschlagen werden (s. Abb. 16, S. 49). Im ersten Reaktionsschritt kommt es dabei zur oxidativen Hydroxylierung von Lysin (**35**) zu

4-Hydroxylysin (**36**). Das offenkettige Hydroxylysin liegt im Gleichgewicht mit der thermodynamisch begünstigten Lactonform (**37**) vor, aus welcher sich durch Oxidation am Stickstoff das Nitrosamin (**38**) bildet. Dieses liegt in einem tautomeren Gleichgewicht vor, welches den Deuteriumaustausch bei Fütterung von $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]$ Lyisin erklärt. Ausgehend vom Hydroxylamin (**39**) kommt es zur Cyclisierung unter Bildung des (2*S*,1'*R*)-3-(2'-Nitrosocyclopropyl)alanin (**40**), welches durch Oxidation zum (2*S*,1'*R*,2'*R*)-3-(2'-Nitrocyclopropyl)alanin [(3-Ncp)Ala] umgesetzt wird.

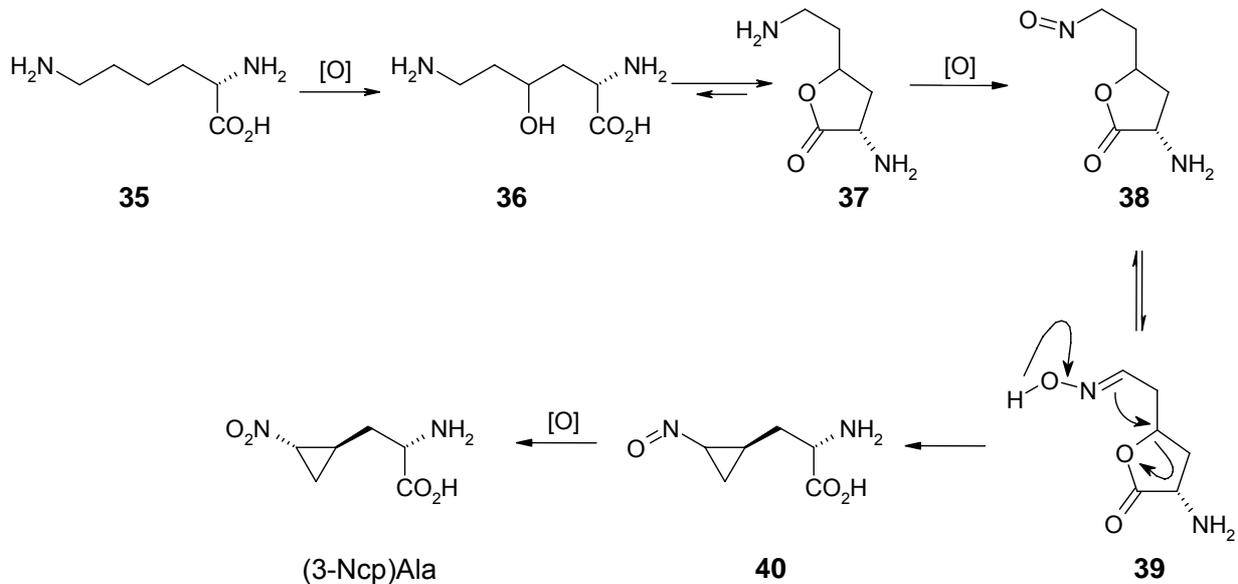


Abb. 16: Vermuteter Mechanismus der Biosynthese von (3-Ncp)Ala in der frühen Biosynthese des Hormaomycins (**16**).

2.4.3 Genetische Untersuchungen zur Biosynthese des Hormaomycins

Schon GEERS⁷¹ hatte nach Auffinden aller Vorläufer des Peptidolactons **16** eine nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) postuliert. Um den zugehörigen Biosynthesegencluster zu finden, wurde *Streptomyces griseoflavus* W 384 in der Arbeitsgruppe PIEL^b auf entsprechende NRPS-Gene gescreent. Hierbei wurden zwei NRPS-Gencluster gefunden, von denen einer der Hormaomycin-Biosynthese zugeordnet werden konnte. Der Cluster trägt wie erwartet Gene für sieben Module mit Kondensations-, Adenylierungs- und PCP-(Peptidyl Carrier Protein, auch: Thionylierungs-) Domänen, sowie eine Adenylierungs- und PCP-Domäne für die Aufnahme der Chpca-Startereinheit am Anfang des Mutlienzymkomplexes.

^b Herrn PROF. DR. J. PIEL (Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Bonn) danke ich für die Überlassung der Informationen aus seinen molekulargenetischen Untersuchungen der Hormaomycin-Synthetase.

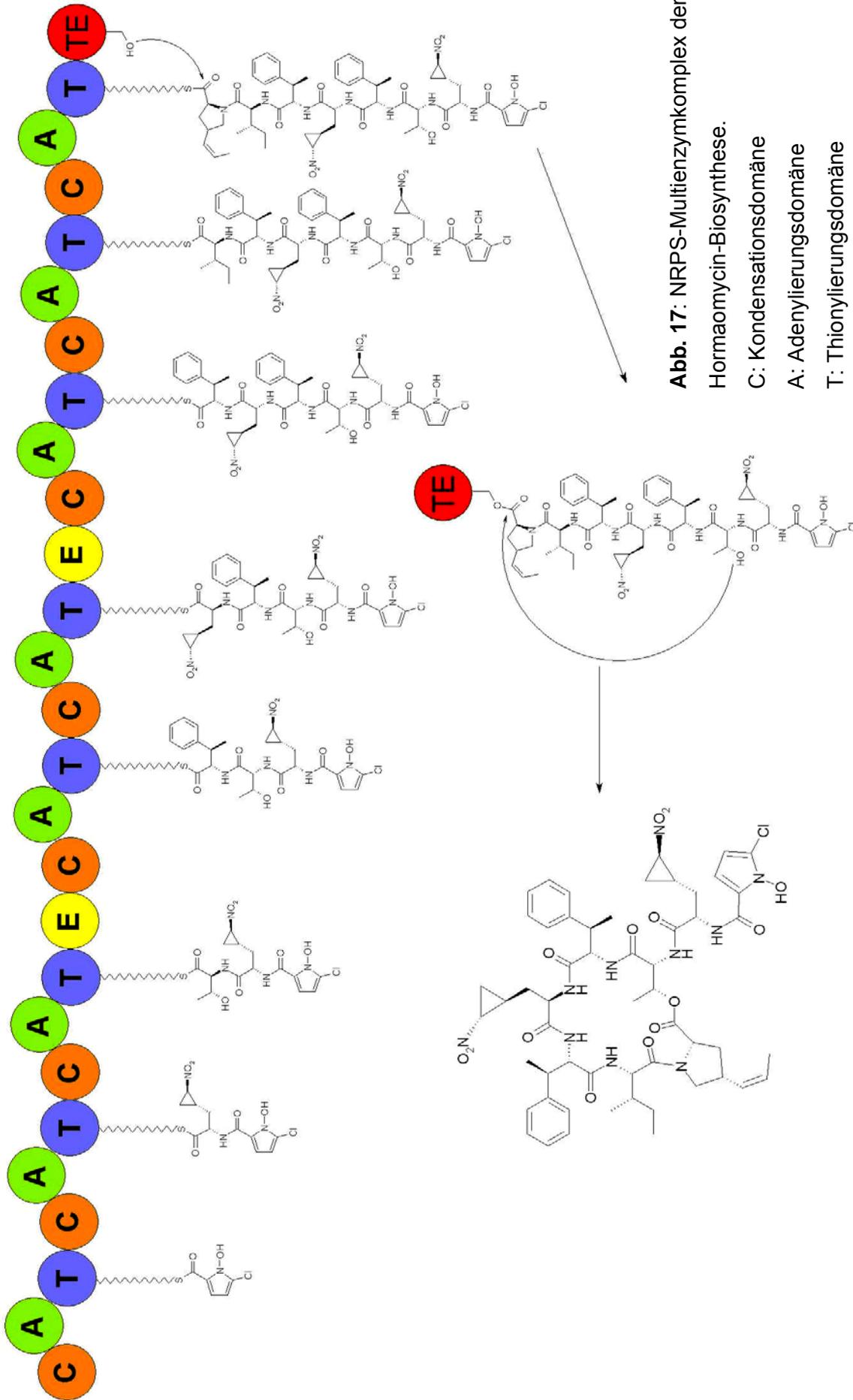


Abb. 17: NRPS-Multienzymkomplex der Hormaomycin-Biosynthese.

- C: Kondensationsdomäne
- A: Adenylierungsdomäne
- T: Thionylierungsdomäne
- E: Epimerase
- TE: Thioesterase

Im zweiten und vierten Modul sind zudem Epimerase-Domänen nachgewiesen worden, welche die Bildung von D-Thr und D-(3-Ncp)Ala I katalysieren. Am Schluss des Komplexes befindet sich wie vorhergesagt eine Thioesterase, die für die Cyclisierung des linearen Peptids zum Peptidlacton **16** notwendig ist. In dem konservierten Bereich des Clusters sind weitere Gene zu finden, welche für die frühe Biosynthese, also den Aufbau der Aminosäuren, von **16** codieren. Durch Homologie dieser Gene mit bekannten Genen anderer Gencluster können die Vorläufer Prolin, Threonin, Isoleucin und Tyrosin [für Chpca, Thr, Ile und (4-Pe)Pro] bestätigt werden. Für die (3-Ncp)Ala und die (β Me)Phe-Einheiten ist keine genaue Zuordnung möglich, da keine Daten über vergleichbare Biosynthesewege existieren. Daher wurden die unbekanntenen Gene, *hrmI*,^J für die (3-Ncp)Ala und *hrmS* für die (β Me)Phe-Biosynthese, jeweils heterolog in *Escherichia coli* exprimiert.¹¹⁷ Durch Zufütterung geeigneter Vorläufer sollten die beiden Aminosäuren entstehen, deren Nachweis den Beweis für die richtige Zuordnung des Clusters zur Hormaomycin-Biosynthese erbringen würde.

Escherichia coli pKZ72^c

Die Mutante enthält mit *hrmS* ein Gen, welches große Übereinstimmungen mit einem Gen einer Methyltransferase aus *Streptomyces lincolnensis* zeigt und daher vermutlich für die Methylierung von Phenylalanin zu (β Me)Phe verantwortlich ist.¹¹⁸ Trotz bewiesener Herkunft des C₁-Fragments aus Methionin ist bisher unklar, ob die Methylierung von Phenylalanin direkt geschieht oder eine Aktivierung hierfür nötig ist, da die Deprotonierung an C-3 aufgrund der geringen Acidität der Methylengruppe im Phenylalanin ($pK_a > 40$)¹¹⁹ sehr erschwert ist. Eine mögliche Zwischenstufe ist das Phenylpyruvat, dessen Methylengruppe mit $pK_a \approx 19$ ¹¹⁹ wesentlich reaktiver ist. Phenylpyruvat könnte unter Beteiligung einer Transaminase direkt aus Phenylalanin entstehen.

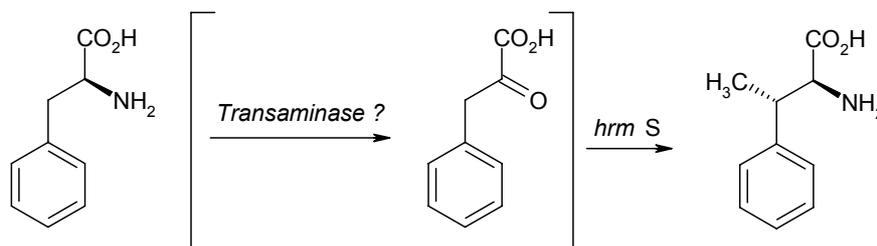


Abb. 18: Die Methylierung von Phenylalanin oder Phenylpyruvat führt zu (β Me)Phe.

Da beide Vorläufer vorstellbar sind, wurde die Mutante unter Zusatz von Phenylpyruvat und Phenylalanin kultiviert. Zur Induktion der Expression wurde zum gleichen Zeitpunkt *m*-Toluylsäure in unterschiedlichen Konzentrationen gefüttert. Die *m*-Toluylsäure ist hierbei

^c Für die Überlassung der *E. coli*-Mutanten gilt mein besonderer Dank Herrn PROF. DR. J. PIEL (Universität Bonn) sowie Frau K. ZIMMERMANN.

für die Aktivierung des vor die Biosynthesegene geschalteten *Pm*-Promotors verantwortlich. In den HPLC-MS-Chromatogrammen der Kulturextrakte waren im Vergleich zur Blindprobe keine neuen Metaboliten nachweisbar.

Escherichia coli pKZ73

Die Gene *hrmI* und *hrmJ* mit unbekannter Funktion sind die zwei letzten Gene des Clusters die für Enzyme der (3-Ncp)Ala-Biosynthese codieren können. Die Kultivierungen erfolgten wie bei der pKZ72-Mutante, als Vorläufer wurde hier Lysin gefüttert. Erneut waren in den Extrakten keine neuen Metaboliten nachweisbar.

Warum die Mutanten nicht die erwarteten Metaboliten produzieren bleibt ungeklärt, eventuell würde schon eine Temperaturänderung zum Erfolg führen. Denkbar wäre jedoch auch, dass die heterologe Expression von *hrmI,J* und *hrmS* aus systemischen Gründen im *E. coli*-Wirtsstamm nicht funktioniert. Zum jetzigen Zeitpunkt wird die heterologe Expression der beiden Gene in *Pseudomonas* sp. im Arbeitskreis von PROF. PIEL untersucht.

2.5 Die Struktur des Hormaomycins

2.5.1 Die Struktur von Hormaomycin in Lösung

Im Arbeitskreis von PROF. GRIESINGER^d wurden die Raumstrukturen des fermentativ gewonnenen Hormaomycins (**16**) sowie einiger synthetischer Derivate in DMSO^{120,121} und Chloroform¹²² durch NMR-Spektroskopie bestimmt. Hierzu wurden aus NOE-(Nuclear Overhauser Effect) Kopplungen Strukturen mit minimaler Energie errechnet und mit RD-(Residual-Dipolar) Kopplungskonstanten verfeinert. Es zeigte sich, dass die Ringstruktur sowohl in DMSO als auch in Chloroform zwei β -turns zwischen (4-Pe)Pro und α -Thr sowie (3-Ncp)Ala I und (β Me)Phe I aufweist. Die Anordnung der Seitenkette ist in den verwendeten Lösungsmitteln jedoch unterschiedlich. In Chloroform ist eine sehr starre Konformation auszumachen, worauf schon der große Unterschied in den chemischen Verschiebungen zwischen den verschiedenen α - und N-H-Atomen schließen lässt, diese Signale sind in DMSO in einem sehr viel kleineren Bereich zu finden. Zudem treten in Chloroform unerwartete NOE-Fernkopplungen von der Chpca- zu der (β Me)Phe I-Einheit auf. Hieraus ergibt sich für die Struktur in Chloroform eine Interaktion der drei aromatischen Ringe von **16**, die Seitenkette ist über den Ring „gebogen“. Dieser Effekt ist in DMSO nicht zu beobachten, die Seitenkette interagiert scheinbar überhaupt nicht mehr mit den Phenylringen.

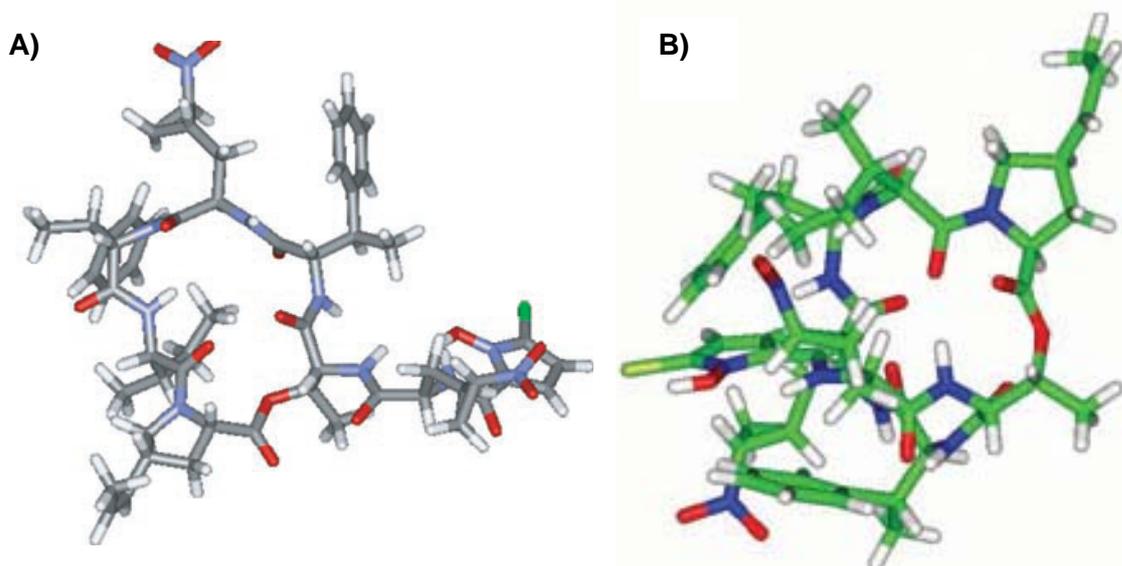


Abb. 19: NMR-Lösungsstruktur von Hormaomycin (**16**), A) in DMSO¹²⁰, B) in Chloroform¹²².

^d Für die NMR-Messungen und die Abbildungen gilt mein besonderer Dank DR. U.M. REINSCHIED, J. FARJON, P. HABERZ sowie PROF. DR. C. GRIESINGER (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen).

2.5.2 Die Kristallstruktur des Hormaomycins

Nach intensiven Kristallisationsversuchen ist es der Arbeitsgruppe SHELDRIK^e gelungen, Hormaomycinkristalle aus wässrigem Ethanol in Gegenwart von 2-Methyl-2,4-pentandiol und $MgCl_2$ zu züchten. Die gewonnene Röntgenstruktur zeigt überraschenderweise eine dimere Anordnung des Peptidlactons **16** im Kristall. Es besteht eine enge Bindung der beiden Monomereinheiten an ein zentrales Kation über die Carbonylsauerstoffe von 3-Nitrocyclopropylalanin I, Isoleucin und Threonin. Da die Auflösung der Röntgenstrukturanalyse zu gering ist, kann noch keine sichere Aussage über die Art des Zentralions gemacht werden. Erstaunlich ist zudem, dass die kürzlich geglückte Röntgenstruktur von synthetischem **16** keine dimere Anordnung aufweist.

Die Raumstruktur der Monomereinheit zeigt zudem große Differenzen zu den Lösungsstrukturen der NMR-Experimente. Am ehesten vergleichbar scheint die Struktur mit der DMSO-Struktur, da in beiden Fällen die Seitenkette nicht über den Ringteil gebogen ist, sondern vom Ring wegzeigt. Der Grund für die Unterschiede kann in der Befähigung unterschiedlicher Lösungsmittel Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden liegen. So ist Chloroform ein schwacher Donor und Akzeptor, DMSO hat starke Akzeptoreigenschaften und beim verwendeten Ethanol/ Wasser Kristallisationsmedium sind sowohl Akzeptor- als auch Donoreigenschaften stark. Eine Verwechslung intramolekularer NOE- mit intermolekularen ROE-Korrelationen bei Erstellung der Lösungsstrukturen konnte ausgeschlossen werden.

^e Großer Dank für die kristallographischen Untersuchungen und die Abbildungen gilt Herrn DR. T. GRÜNE und Herrn PROF. DR. G.M. SHELDRIK (Institut für Anorganische Chemie, Universität Göttingen).

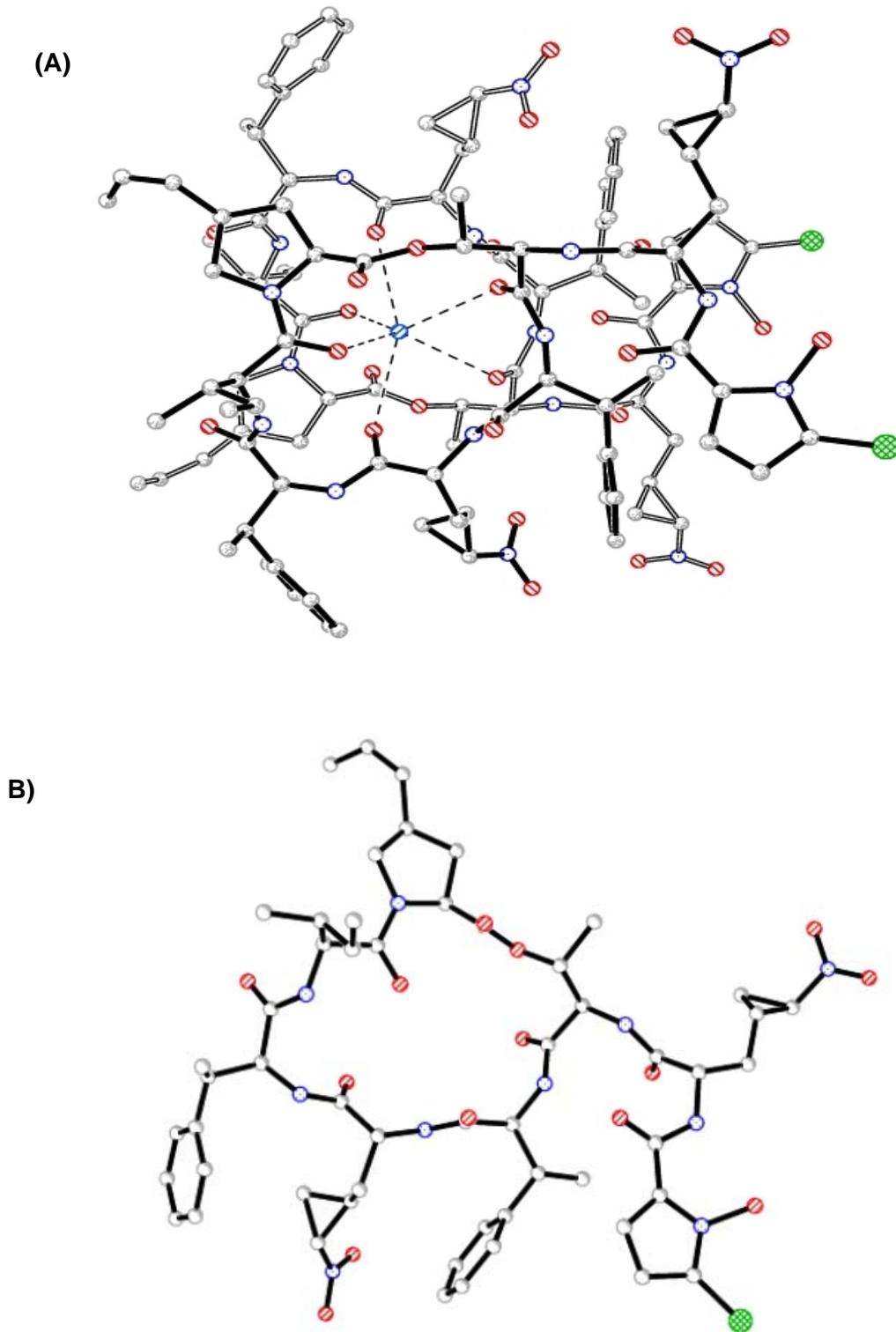


Abb. 20: Kristallstruktur des Hormaomycins (**16**), A) Die Dimereinheit der Hormaomycin-Kristallstruktur (das obere Monomer mit ausgefüllten, das untere mit offenen Bindungen, gestrichelte Linien zeigen die Bindung zum Zentralion an); B) Monomereinheit von **16** (Bindungen zum Zentralion aus Übersichtsgründen nicht dargestellt).

2.5.3 Untersuchung zum Zentralion im Hormaomycin

Die im Kristall aufgefundene dimere Struktur von Hormaomycin (**16**) zeigt die koordinative Bindung von zwei Peptideinheiten an ein Zentralion. Die Kation-Carbonylsauerstoff-Abstände sprechen dabei am ehesten für die Bindung von K^+ , Na^+ oder NH_4^+ . Da im Kristallisationsmedium keine Kationen außer Mg^{2+} vorliegen, muss eine Bindung während der Fermentation oder bei der Aufarbeitung erfolgen.

Die Hochauflösung eines ESI-MS-Peaks der Masse $m/z = 2295$ führt zu der Summenformel $C_{110}H_{138}N_{20}O_{28}Cl_2K$ und entspricht somit einem K^+ -Hormaomycin-Dimer. Der beobachtete Peak ist aufgrund seiner Intensität nicht als einfaches Addukt zu bewerten, allerdings kann mit dieser Methode keine Quantifizierung vorgenommen werden. Um eine quantitative Bestimmung zu ermöglichen, wurde **16** einer ICP-MS (Inductively-coupled plasma mass spectrometry) Untersuchung unterzogen. Hierzu wird **16** oxidativ aufgeschlossen und die Rückstände in der Gasphase untersucht. Bezogen auf 5.0 mg **16** enthielt die Probe lediglich 10 ng K^+ , was 0.2 % des Hormaomycin-Dimers entsprechen würde. In höheren Anteilen konnten Na^+ , Zn^{2+} und Ca^{2+} nachgewiesen werden (s. Tab. 3), wobei Ca^{2+} aufgrund ähnlicher Molmassen durch Rückstände der Hydrolyse wie CO_2 oder CNO vorgetäuscht sein kann.

	Masse [μ g]	Stoffmenge [nmol]	Verhältnis pro 16 -Dimer [mol%]
Na	9.585	416.92	18.4
K	0.090	2.30	0.2
Ca	1.212	30.31	1.4
Fe	0.068	1.21	< 0.1
Cu	0.090	1.42	< 0.1
Zn	2.610	39.93	1.8
Sn	0.045	0.38	< 0.1

Tab. 3: Anteile verschiedener Metallionen in 5 mg (4.4 nmol) Hormaomycin (**16**).

2.5.4 Austausch des Zentralions im Hormaomycin

Schon in frühen Arbeiten waren Unterschiede in den Protonenspektren des Hormaomycins (**16**) bei Isolierung des Naturstoffs aus unterschiedlichen Fermentationsansätzen aufgefallen. Auch der Beweis, dass es sich bei Takaokamycin und **16** um identische Substanzen handelt, konnte aufgrund dieser Differenzen erst spät erbracht werden.⁵³ Weiterhin zeigte auch das Syntheseprodukt deutliche Unterschiede der ¹H-NMR-Spektren im Vergleich zum Naturstoff, wobei in allen Fällen die größten Unterschiede in der (3-Ncp)Ala I-Einheit auszumachen waren.

Die chemischen Verschiebungen einiger Protonen in diesem Teil des Moleküls zeigen zudem die Besonderheit, dass sie in einem Bereich $\delta_{\text{H}} = -0.62$ bis $+0.60$ liegen, was durch die Lage dieser Protonen in den Anisotropiekegeln der Phenylringe erklärt werden kann. Dies wird durch die starken Unterschiede der chemischen Verschiebungen der (3-Ncp)Ala I-Einheit in den Desmethylhormaomycinen J_{1-3} (**33a-c**; vgl. Tab. 1, S. 41) im Vergleich zum Naturstoff bestätigt. Bei keiner anderen Aminosäureeinheit des Peptidlactons zeigen die Variationen benachbarter Aminosäuren so große Einflüsse auf die Resonanzspektren. Es muss also festgehalten werden, dass in diesem Bereich des Moleküls kleinste konformative oder konstitutionelle Variationen deutliche Auswirkungen auf die ¹H-chemischen Verschiebungen haben können, die in der Größenordnung bis 0.4 ppm liegen.

Um zu verifizieren, ob die Unterschiede in den Protonenspektren durch das in der Röntgenstruktur beobachtete koordinativ gebundene Zentralion begründet sind, wurde der Naturstoff an einem Ionenaustauscherharz chromatographiert. Das Protonenspektrum der so erhaltenen Substanz zeigt im Vergleich zum Naturstoff starke Veränderungen im Bereich $\delta_{\text{H}} = -0.62$ bis $+0.60$ und $2.90-3.00$ (s. Abb. 21, S. 60 und Tab. 4, S. 59), aber große Übereinstimmungen zum Syntheseprodukt^f. Diese Beobachtung spricht für eine koordinative Bindung von Teilen der Hormaomycin-Moleküle an Metallionen auch in Lösung, die in den Untersuchungen von GRIESINGER *et al.* nicht gefunden werden konnte.

Die Fermentation zur Gewinnung von **16** erfolgt in einem synthetischen Nährmedium, welches die Metalle Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} und Zn^{2+} enthält. Dementsprechend kommen diese Ionen während der Kultivierung mit **16** in Berührung und können je nach Affinität koordinativ gebunden werden, was sich auf die NMR-Spektren auswirkt. Um solche Effekte zu untersuchen, wurde der deionisierte Naturstoff in Chloroform gelöst und mit verschiedenen Salzlösungen der Metalle vorbehandelt (s. Kap. B.2.2.1, S. 115). Um den Zusatz von NMR-aktiven Eisen zu vermeiden, wurde die mögliche Bindung in diesem Fall durch Zusatz einer Gallium(III)-nitratlösung simuliert. Gallium(III) ist aufgrund ähnlicher Ionengröße als Ersatz für Eisen(III) gut geeignet.¹²³

^f Ich danke Herrn DR. V. RAEV und Herrn PROF. DR. A. DE MEIJERE für die Überlassung des Syntheseproduktes.

Beim Vergleich der ^1H -NMR-Spektren der so erhaltenen Substanzen sind Unterschiede in der Lage einzelner Signale zu erkennen. Nach der Zuordnung der Signale fällt auf, dass sich die vorbehandelten Hormaomycine in zwei Gruppen unterteilen lassen, deren Protonen in entgegengesetzter Richtung relativ zum Naturstoff verschoben sind. Zudem sind die Tief- und Hochfeldverschiebungen einzig auf den Bereich der (3-Ncp)Ala I- sowie die Protonen in 2- und 3-Position der (βMe)Phe-Einheiten beschränkt.

Zur ersten Gruppe gehören $\mathbf{16}\cdot\text{K}^+$; ⁹ und $\mathbf{16}\cdot\text{Ga}^{3+}$; ⁹, ihre Protonenspektren sind vergleichbar mit denen des deionisierten Hormaomycins. Bei dieser Gruppe weisen alle Protonen der (3-Ncp)Ala I- und die α -H-Atome der (βMe)Phe-Einheiten Hochfeldverschiebungen auf, während das 3-H der (βMe)Phe II-Einheit ins Tieffeld verschoben ist. Die einzelnen Verschiebungen sind Tab. 4 (S. 59) zu entnehmen.

Im Gegensatz hierzu stehen die Beobachtungen nach Vorbehandlung des deionisierten Hormaomycins mit einer Kupfer(II)-chloridlösung. In diesem Fall erfahren die Protonen des (3-Ncp)Ala und die α -H-Atome der (βMe)Phe Verschiebungen ins Tieffeld. Das 3-H des (βMe)Phe II ist mit $\delta_{\text{H}} = 2.91$ ins Hochfeld verschoben. Die Beobachtungen sprechen somit für konformative Änderungen des Moleküls bei Bindung an ein Metallion. Die Verschiebungen der Kohlenstoffatome hingegen weisen keine Veränderungen auf, alle so gewonnenen Hormaomycine haben gleiche ^{13}C -NMR-Daten. Weiterhin reicht die konformative Änderung nicht aus, um auch die CD- und UV-Spektren zu beeinflussen, auch hier ist bei den vorbehandelten Hormaomycinen kein Unterschied zum Naturstoff auszumachen.

⁹ $\mathbf{16}\cdot\text{X}$:deionisiertes Hormaomycin mit Metallsalz (X) angereichert.

		16	16·De	16·K⁺	16·Ga³⁺	16·Cu²⁺
(βMe) Phe II	2-H	4.38	4.36	4.36	4.38	4.39
	3-H	2.94	3.01	3.00	2.99	2.91
(3-Ncp)Ala I	2-H	3.57	3.46	3.48	3.48	3.62
	3-H_a	-0.06	-0.16	-0.14	-0.11	-0.02
	3-H_b	0.56	0.50	0.54	0.50	0.59
	1'-H	0.31	0.26	0.26	0.28	0.36
	2'-H	2.96	2.89	2.90	2.90	2.92
	3'-H_a	-0.60	-0.71	-0.69	-0.64	-0.55
	3'-H_b	1.01	0.98	0.98	0.99	1.01
(βMe) Phe I	2-H	4.48	4.45	4.45	4.46	4.51
	3-H	3.68	3.67	3.67	3.67	3.69

Tab. 4: δ -Werte in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (600 MHz, CDCl_3) für die (3-Ncp)Ala I und (βMe)Phe-Einheiten in verschiedenen vorbehandelten Hormaomycinen (rot: Hochfeldverschiebung, blau: Tieffeldverschiebung).

Die Beschränkungen der Verschiebungen der vorbehandelten Hormaomycine auf einen bestimmten Abschnitt des Moleküls sind außergewöhnlich und nicht literaturbekannt. Möglicherweise ist diese Eigenschaft durch eine schwach ionophore Eigenschaft von **16** zu erklären. Für verschiedene Ionophore wie z.B. Salinomycin¹²⁴ oder das für die Entstehung von Alzheimer mitverantwortliche Amyloid- $\beta(1-16)$ ^{125,126} sind ähnliche Beobachtungen publiziert. Im Fall des Amyloid- $\beta(1-16)$ verändern sich nach Bindung an Zink oder Cadmium jedoch nicht nur die $^1\text{H-NMR}$ -Verschiebungen, es treten zeitgleich sehr große Unterschiede der CD- und UV-Spektren auf, was bei vorbehandelten Hormaomycinen nicht beobachtet werden konnten.

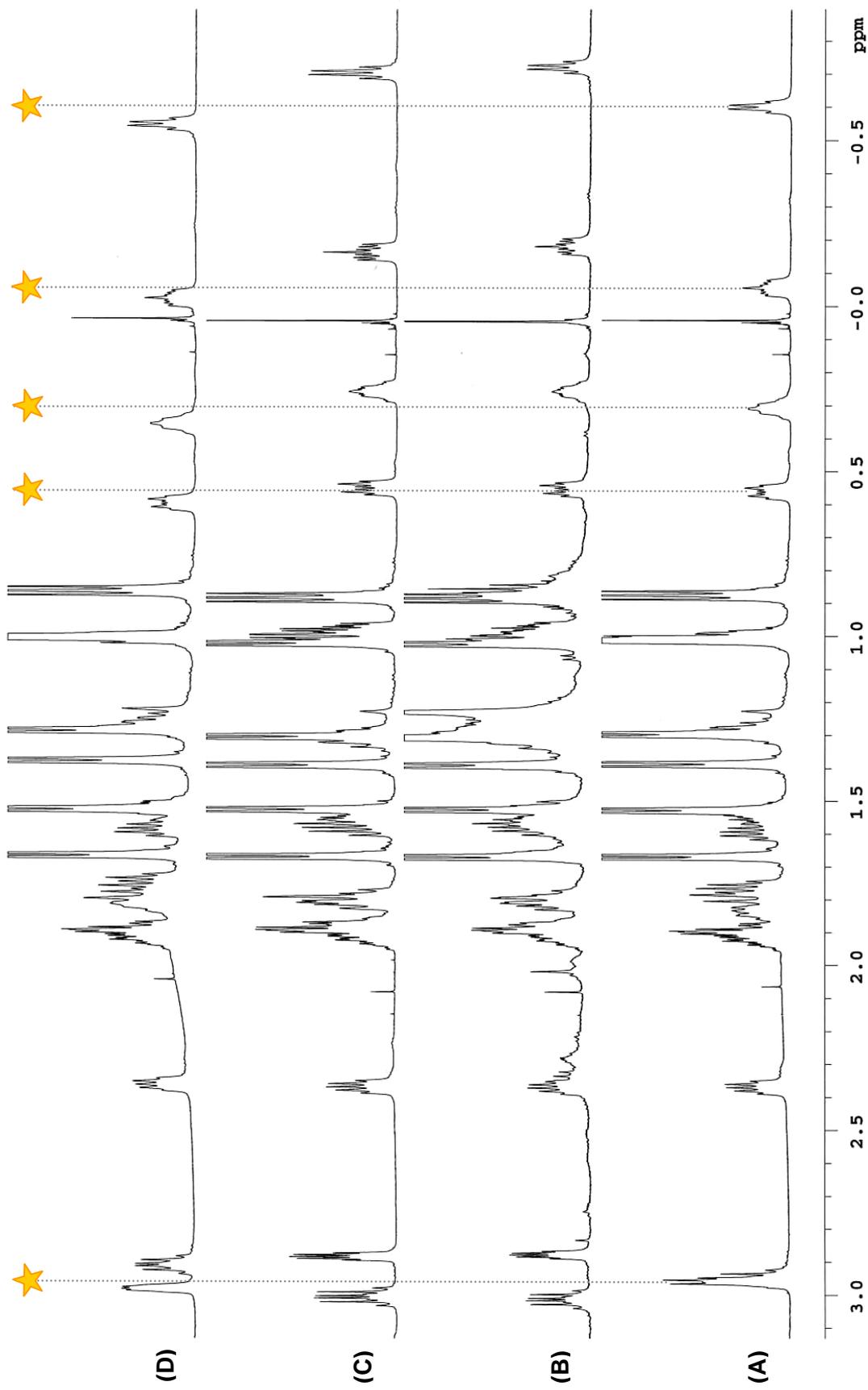


Abb. 21: ¹H-NMR-Spektren (600 MHz, CDCl₃) von (A) nativem Hormaomycin (**16**), (B) synthetischem Hormaomycin (**16**), (C) **16** nach Vorbehandlung mit einem Ionentauscher, (D) **16** nach Vorbehandlung mit Kupfer(II).

2.6 Biologische Aktivitäten

2.6.1 Antibakterielle und antimykotische Aktivitäten

Die aus der Vorläufer-dirigierten Biosynthese gewonnenen neuen Hormaomycine wurden im Plattendiffusionstest gegen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Arthrobacter oxydans* und *Arthrobacter crystallopoites* getestet. Alle getesteten Substanzen besaßen dem Hormaomycin (**16**) vergleichbare Aktivitäten gegen die coryneformen *Arthrobacter* sp.. Die Werte hierfür sind in Tab. 5 relativ zum Naturstoff **16** (= 100 %) zusammengefasst. Zudem zeigte sich, dass weder Derivate noch der Naturstoff selbst gegen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* aktiv sind.

	Substanzmenge [mg] pro Filterplättchen		
	1.5×10^{-2}	1.5×10^{-3}	1.5×10^{-4}
Hormaomycin (16)	100	72	44
Penicillin G	78	0	0
Hormaomycin D ₁ (21a)	57	53	33
Hormaomycin D ₂ (21b)	90 ^a	84 ^a	58 ^a
Hormaomycin D ₃ (21c)	87	83	57
Hormaomycin E ₁ (26a)	97	–	–
Hormaomycin E ₂ (26b)	94	–	–
Hormaomycin E ₃ (26c)	97 ^b	–	–
Hormaomycin F ₁₋₃ (30a-c)	100 ^c	95 ^c	70 ^c
Hormaomycin G ₁₋₃ (31a-c)	100 ^c	95 ^c	70 ^c
Hormaomycin H ₁₋₃ (32a-c)	100 ^c	95 ^c	70 ^c
Hormaomycin J ₁ (33a)	100	93	78
Hormaomycin J ₂ (33b)	100	83	65
Hormaomycin J ₃ (33c)	93	78	75

Tab. 5: Relative antibakterielle Aktivitäten [%] der Hormaomycin-Derivate im Plattendiffusionstest gegen *Arthrobacter oxydans* (Stamm 20119) im Vergleich zum Naturstoff und Penicillin G. [a) Getestet gegen *Arthrobacter crystallopoites* (Stamm 20117); b) Getestet im Gemisch mit Hormaomycin (ca. 5:8); c) Getestet als Gemisch.]

Überraschenderweise zeigte Hormaomycin D₂ (**21b**) gegen *Candida albicans* mit einem Hemmhofdurchmesser von 21 und 13 mm (1.5×10^{-2} und 1.5×10^{-3} mg pro Filterplättchen) eine Aktivität ähnlich dem zum Vergleich eingesetzten Antimykotikum Nystatin. Der

Naturstoff **16** und alle anderen getesteten Derivate hemmten diesen Pilz nicht in seinem Wachstum.

Zusammen mit Testergebnissen für Derivate von RITZAU⁶⁴ und weiteren Hormaomycin-Analoga aus der Synthese⁸⁸ ließen sich bereits erste Erkenntnisse über Struktur-Wirkungsbeziehungen des Hormaomycins (**16**) gewinnen. Hierzu zählt, dass die *N*-Hydroxygruppe der Pyrrolcarbonsäure für eine antibakterielle Aktivität gegen *Arthrobacter* sp. notwendig ist. Die durch Vorläufer-dirigierte Biosynthese gewonnenen Analoga können zu diesen Erkenntnissen nicht beitragen, da ihre Aktivität der von **16** in fast allen Fällen entspricht.

2.6.2 Antiparasitäre Aktivitäten

Die neuen Hormaomycine wurden gegen *Trypanosoma brucei rhodesiense*¹²⁷, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*¹²⁸ sowie *Plasmodium falciparum*¹²⁹ getestet.^h

In vitro Aktivitäten gegen *Plasmodium falciparum* K1

In Tab. 6 (S. 63) sind die IC₅₀-Werte für Hormaomycin (**16**) und seine Analoga gegen *Plasmodium falciparum* K1 und für die Cytotoxizität angegeben. Zusätzlich ist das Verhältnis der beiden Konzentrationen als ein Maß für die therapeutische Breite aufgeführt.

Wie von OMURA⁵³ berichtet besitzt **16** gegen den Erreger der *Malaria tropica* eine Aktivität gleicher Größenordnung wie das Kombinationspräparat Chloroquin/ Artemisinin. Zudem kann eine geringe Toxizität festgestellt werden, woraus ein gutes Verhältnis der IC₅₀-Werte resultiert. Die Analoga von **16** besitzen eine ähnlich gute Aktivität wie der Naturstoff selbst. Auffällig ist, dass größere strukturelle Veränderungen im Ring wie bei Hormaomycin E_{1,3} (**26a,c**) und J_{1,3} (**33a,c**) zu einem Aktivitätsverlust führen, der bei den Desmethylhormaomycin **33a,c** am stärksten ausgeprägt ist. Veränderungen in der Seitenkette [Hormaomycin D₂ (**21b**), E₂ (**26b**) und J₂ (**33b**)] zeigen hingegen keinen großen Einfluss auf die Aktivität. Die fluorierten Derivate Hormaomycin F₁₋₃ (**30a-c**), G₁₋₃ (**31a-c**) und H_{1,2} (**32a,b**) besitzen ähnliche Aktivitäten wie der Naturstoff **16** selbst. Erstaunlich ist die Abhängigkeit der therapeutischen Breite von den enthaltenen Zentralionen. Während die antiparasitäre Wirkung dieser Analoga keine großen Unterschiede zu **16** aufweist, sind die Toxizitäten bis um den Faktor 10 größer.

Diese Erkenntnisse zu Struktur-Wirkungsbeziehungen von **16** lassen sich durch von ZLATOPOLSKIY synthetisierte Analoga erweitern. So zeigte sich, dass Peptidlactamanaloga eine noch größere Aktivität gegen Plasmodien als der Naturstoff besitzen und das Ersetzen

^h Ich danke Herrn PROF. DR. M. KAISER (Swiss Tropical Institute, Basel) für die Durchführung der Tests auf antiparasitäre Aktivitäten.

der Seitenkette durch eine *p*-MeZ-Schutzgruppe zu einer Verringerung der Toxizität führt. Die Substanz BDZ 251-1 (**41**), in welcher das Threonin durch 2,3-Diaminopropionsäure und die HO·(3-Ncp)Ala-Chpca-Seitenkette durch die MeZ-Schutzgruppe ersetzt sind, hat von diesen Substanzen die größte therapeutische Breite (> 1500; IC₅₀: K1 = 0.0605, L6 > 90). Mit vorhandener Seitenkette und ausgetauschter Threonin-Einheit (BDZ 255, **42**) wird hingegen die beste Aktivität erreicht (> 438; IC₅₀: K1 = 0.02285, L6 > 10)

	IC ₅₀ [µg/mL]		Verhältnis ^{a)}
	<i>P. falc.</i> K1 ^{a)}	Cytotox. L6	
Hormaomycin (16)	0.0835	47.20	565
Chloroquin/Artemisinin	0.045	0.005	–
Hormaomycin·K (16·K)	0.171	15.11	88
Hormaomycin·Cu (16·Cu)	0.132	11.13	84
Hormaomycin·De (16·De)	0.124	3.32	27
Hormaomycin D ₁ (21a)	–	–	–
Hormaomycin D ₂ (21b)	0.0925	> 10	> 108
Hormaomycin D ₃ (21c)	–	–	–
Hormaomycin E ₁ (22a)	0.340	16.49	49
Hormaomycin E ₂ (22b)	0.198	16.81	85
Hormaomycin E ₃ (22c)	0.374	53.62	143
Hormaomycin F _{1–3} (30a–c)	0.263	41.97	160
Hormaomycin G _{1–3} (31a–c)	0.181	16.55	92
Hormaomycin H _{1–2} (32a–c)	0.433	36.59	85
Hormaomycin J ₁ (33a)	1.295	36.95	29
Hormaomycin J ₂ (33b)	0.373	30.84	83
Hormaomycin J ₃ (33c)	1.660	41.88	25

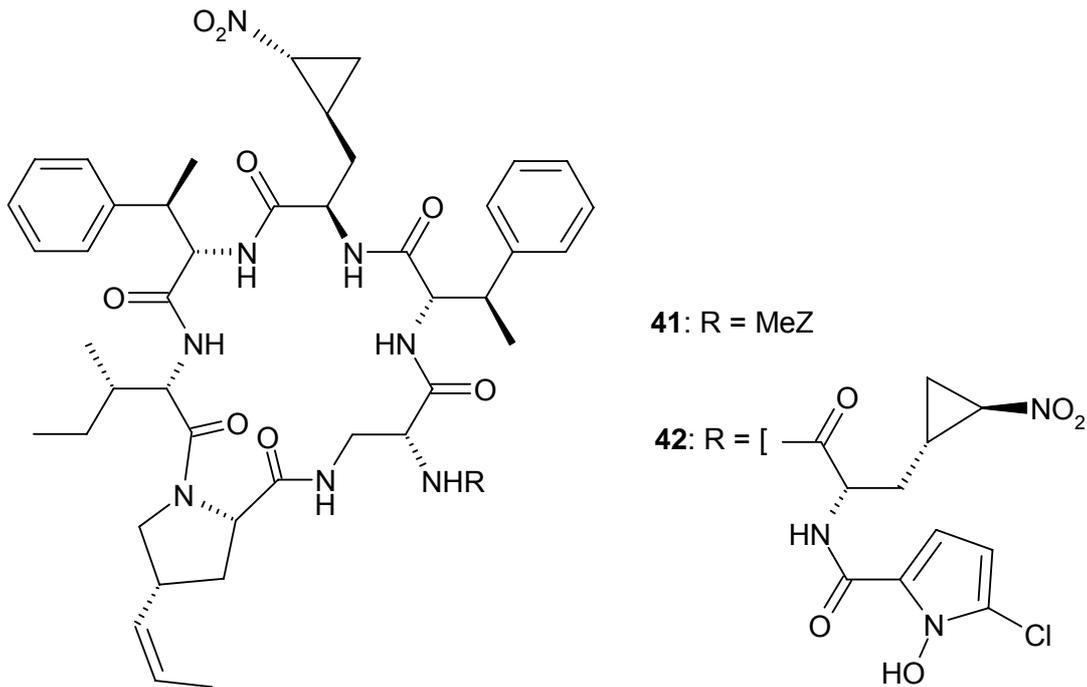
Tab. 6: *In vitro* Aktivitäten gegen *Plasmodium falciparum* K1 sowie Cytotoxizität der Hormaomycine, a) IEF-Stadium.

In vivo Test gegen *Plasmodium berghei*

Für die *in vivo* Experimente wurden natives Hormaomycin (**16**) sowie die synthetischen Derivate **41** und **42** im Mausmodell getestet. Nach viermaliger intraperitonealer Injektion von

25 mg/kg einer DMSO/Wasser-Lösung der Substanzen konnte keine Lebensverlängerung gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden (0 % Aktivität).

Warum die getesteten Hormaomycine keine *in vivo*-Aktivität besitzen, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Denkbar ist eine Ringöffnung (z.B. am Lacton bzw. Lactam), welche nach den vorliegenden Ergebnissen einen Totalverlust an Aktivität zur Folge hätte. Eventuell ist die intraperitoneale Injektionsform hierfür verantwortlich. Weitere *in vivo* Tests sollten durch intravenöse Gabe erfolgen, um enzymatische Öffnungen des Rings zu vermeiden.



Aktivitäten gegen *Leishmania donovani*

Die Ergebnisse der Tests gegen *Leishmania donovani*, den Erreger der Kala-Azar (Hindi: *schwarze Krankheit*) sind in Tab. 7 (S. 65) wiedergegeben. Verwendet wurden ein axenischer sowie ein Makrophagen-Assay, das Verhältnis stellt erneut den Quotienten zwischen IC_{50} und Cytotoxizität dar.

Hormaomycin (**16**) und die Analoga zeigen im Vergleich zum Referenzpräparat Miltefosin im axenischen Assay gegen diesen Parasiten eine vergleichbare und im Falle des **16-K** leicht erhöhte Aktivität. Erneut ist zu beobachten, dass die strukturellen Veränderungen im Ring [Hormaomycin E_{1,3} (**26a,c**) und J_{1,3} (**33a,c**)] zu einer Aktivitätsminderung führen, welche bei Veränderungen in der Seitenkette [Hormaomycin D₂ (**21b**), E₂ (**26b**) und J₂ (**33b**)] nicht ins Gewicht fallen. Im Vergleich zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen der anti-plasmodialen Aktivität ist dieser Effekt aber deutlich geringer ausgeprägt.

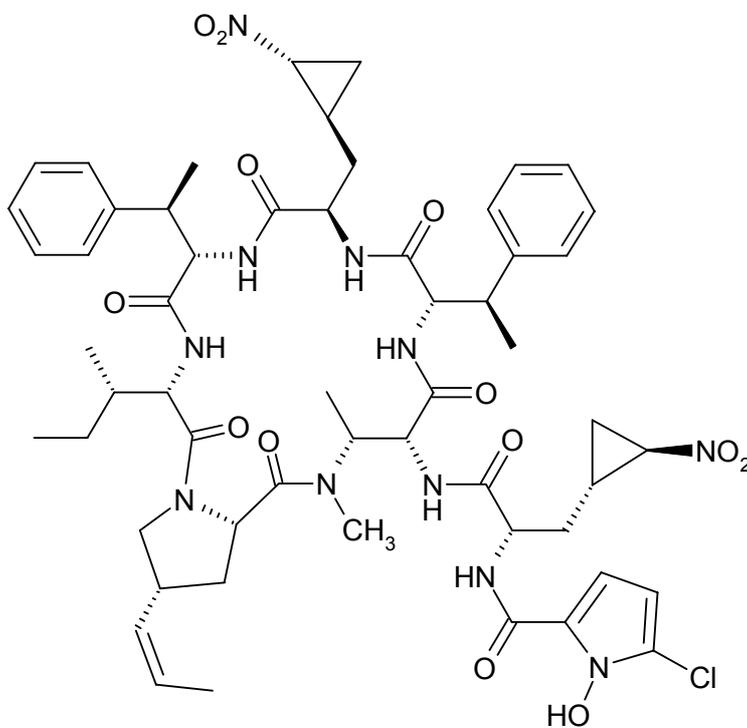
Die synthetischen Derivate von ZLATOPOLSKIY zeigen zudem, dass die Seitenkette für die Inhibierung der *Leishmania*-Protozoen wichtig ist, Substanzen ohne die Seitenkette haben eine 10–100fach geringere Aktivität als **16**. Das Azahormaomycin (**17**) zeigt mit $IC_{50} = 0.11 \mu\text{g/mL}$ eine geringfügig höhere Aktivität als die Substanzen aus der Vorläufer-dirigierten Biosynthese und den Ionenaustauschexperimenten.

	IC_{50} [$\mu\text{g/mL}$] <i>L. don. axen.</i> ^{a)}	Verhältnis ^{a)}	IC_{50} [$\mu\text{g/mL}$] <i>L. don. macr.</i> ^{a)}
Hormaomycin (16)	0.17	278	> 10
Miltefosin	0.14	–	0.41
Hormaomycin·K (16·K)	0.13	116	> 10
Hormaomycin·Cu (16·Cu)	0.14	80	> 10
Hormaomycin·De (16·De)	0.22	15	Tox.
Hormaomycin D ₁ (21a)	–	–	–
Hormaomycin D ₂ (21b)	0.28	> 36	> 10
Hormaomycin D ₃ (21c)	–	–	–
Hormaomycin E ₁ (22a)	0.58	28	–
Hormaomycin E ₂ (22b)	0.20	84	> 10
Hormaomycin E ₃ (22c)	0.59	91	–
Hormaomycin F _{1–3} (30a–c)	0.15	280	> 10
Hormaomycin G _{1–3} (31a–c)	0.17	97	> 10
Hormaomycin H _{1–2} (32a–c)	0.44	83	> 10
Hormaomycin J ₁ (33a)	0.64	57	–
Hormaomycin J ₂ (33b)	0.43	43	–
Hormaomycin J ₃ (33c)	0.71	97	> 10

Tab. 7: *In vitro* Aktivitäten gegen *Leishmania donovani* im axenischen und Makrophagen-Assay sowie das Verhältnis zwischen $IC_{50 \text{ axen.}}/IC_{50 \text{ Cyt}}$ der Hormaomycine, a) Amastigoten-Stadium.

Der Makrophagen-Assay hingegen offenbart, dass der Naturstoff **16** und die in Tab. 7 aufgelisteten Analoga nicht in der Lage sind, Parasiten in Ruhephasen zu bekämpfen. Das deionisierte Hormaomycin (**16·De**) zeigt den Makrophagen gegenüber sogar toxische Eigenschaften. Auffällig ist jedoch, dass zwei synthetische Peptidactame, BDZ 252 (**43**) und

255 (**42**) mit hohen IC_{50} -Werten (1.8 und 4.8 $\mu\text{g/mL}$), zu einer Inhibierung der Parasiten in diesem Stadium befähigt sind. Die geringe Aktivität in diesem Assay kann wahrscheinlich auf eine schlechte Membrangängigkeit von **16** und seinen Derivaten zurückgeführt werden.

**43**

Aktivitäten gegen Trypanosoma sp.

Die in Tab. 8 dargestellten IC₅₀-Werte des Hormaomycins (**16**) und seiner Analoga gegen die zwei Schraubengeißling-Arten zeigen moderate Aktivitäten, welche allerdings um den Faktor 100–1000 geringer als die der Standardpräparate zur Behandlung der Schlafkrankheit (Melarsoprol) und der Chagaskrankheit (Benznidazol) sind. Struktur-Wirkungsbeziehungen sind in diesem Fall weder aus den Analoga der Vorläufer-dirigierten Biosynthese noch den totalsynthetisch gewonnenen Hormaomycinen abzuleiten.

	IC ₅₀ [µg/mL]		
	<i>T. b. rhod.</i> ^{a)}	<i>T. cruzi</i> ^{b)}	Cytotox. L6
Hormaomycin (16)	17.70	12.90	47.20
Referenz ⁱ⁾	0.004	0.19	0.005
Hormaomycin-K (16-K)	10.50	20.03	15.11
Hormaomycin-Cu (16-Cu)	9.24	18.07	11.13
Hormaomycin-De (16-De)	7.63	18.95	3.32
Hormaomycin D ₁ (21a)	–	–	–
Hormaomycin D ₂ (21b)	5.30	> 10	> 10
Hormaomycin D ₃ (21c)	–	–	–
Hormaomycin E ₁ (22a)	7.51	18.26	16.49
Hormaomycin E ₂ (22b)	8.57	17.21	16.81
Hormaomycin E ₃ (22c)	10.45	28.00	53.62
Hormaomycin F _{1–3} (30a–c)	13.55	5.60	41.97
Hormaomycin G _{1–3} (31a–c)	5.45	20.75	16.55
Hormaomycin H _{1–2} (32a–c)	14.97	> 30	36.59
Hormaomycin J ₁ (33a)	11.16	20.41	36.95
Hormaomycin J ₂ (33b)	15.64	>30	30.84
Hormaomycin J ₃ (33c)	11.08	22.46	41.88

Tab. 8: Aktivitäten gegen *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhod.*) und *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) sowie Cytotoxizität von Hormaomycin und Analoga.

i) Referenzsubstanzen/ parasitäres Stadium; a) *T. b. rhod.*: Melarsoprol/ Trypomastigoten;

b) *T. cruzi*: Benznidazol/ Amastigoten; Cytotoxizität: Podophyllotoxin.

2.6.3 Quorum sensing

Obwohl Hormaomycin (**16**) gleich mehrere selektive biologische Wirkungen besitzt, wäre es ohne seine Fähigkeit in anderen Streptomyceten die Luftmycelbildung anzuregen, vielleicht nie entdeckt worden. Für diese morphologische Aktivität ist im Plattendiffusionstest bei *Streptomyces griseoflavus* (Stamm Tü 1306) schon eine Konzentration von 0.1 µg pro Filterplättchen ausreichend. Da der Hormaomycin-Produzent *Streptomyces griseoflavus* (Stamm W 384) das Peptidlacton ohne Kultivierungsoptimierung nur in geringen Mengen produziert, ist ein Screening mit solch hoher Sensitivität für ein positives Ergebnis Voraussetzung.

Das Luftmycel in Actinomyceten bildet sich nach dem Substratmycel in Phasen der Nährstoffarmut und dient dem Fortbestehen der Art. Dies geschieht über eine Differenzierung in Luftmycel und Sporen, welche vermutlich gleichzeitig mit dem Einsetzen des Sekundärmetabolismus stattfindet. Da **16** in der Lage ist, auch die Antibiotikaproduktion anderer Mikroorganismen zu beeinflussen, scheint **16** direkt an der Schnittstelle zwischen beiden Prozessen einzugreifen.

Um auch für diese biologische Aktivität von **16** Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten zu können, sollte der Test auf Differenzierungsaktivität an *Streptomyces griseoflavus* (Stamm Tü 1306) wiederholt werden. Der in Göttingen vorhandene Stamm wie auch ein Isolat des DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) zeigten jedoch ein schlechtes Wachstum auf dem verwendeten nährstoffarmen NSA-Agarmedium. Da schon von GEERS und ANDRES bei 15 aus insgesamt 73 Actinomycetenstämmen eine morphologische Aktivität nachgewiesen werden konnte, sollten weitere Stämme mit dieser Qualität gesucht werden.

Hierfür wurde jeweils ein Stamm am Rand einer M2-Agarplatte in Wellenform ausgestrichen und auf die andere Seite ein Filterplättchen gelegt, welches mit **16** (c = 1.0 mg/mL) getränkt war. Hierbei wirkte Hormaomycin auf 12 Stämme antibiotisch oder schwach wachstumshemmend, bei acht Stämmen war eine schwache morphologische Aktivität mit leichter Steigerung der Luftmycelbildung zu erkennen, ein weiterer Stamm (*Streptomyces* sp. Stamm F1/11) bildete ein blaues Pigment. Die Ausprägung morphologischer Aktivitäten war jedoch äußerst gering, so dass diese Stämme nicht für ein Testsystem geeignet erscheinen. Auch die Bildung des blauen Farbstoffs konnte bei Wiederholung der Versuche nicht sicher angeregt werden. Eine Kultivierung von *Streptomyces* sp. Stamm F1/11 in Schüttelkulturen ergab eine Bildung des Farbstoffs auch ohne Zusatz von **16**. Die blaue Substanz ist in organischen Lösungsmitteln und Wasser vollkommen unlöslich, während die Zugabe von konz. H₂SO₄ eine Lösung intensiv grüner Farbe ergab. Dies könnte dafür sprechen, dass es sich bei der Substanz um einen Indigofarbstoff handelt.¹³⁰

3 Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten

Die in diesem Kapitel charakterisierten Sekundärmetaboliten stammen aus vier verschiedenen Actinomyceten unterschiedlicher Herkunft. Zwei dieser Mikroorganismen (*Actinomyces* sp. Stamm P4 und Stamm M4-1) fielen im chemischen Screening auf. *Streptomyces* sp. (Stamm Tü 6319 und Stamm Tü 2561) hingegen gingen aus einem HPLC-DAD-Screening¹³¹ im Arbeitskreis FIEDLER (Mikrobiologisches Institut, Universität Tübingen) als potente Naturstoffproduzenten hervor.

3.1 Chemisches Screening von Actinomyceten

Die im Rahmen des chemischen Screenings untersuchten Mikroorganismen stammen aus Erdproben von der Algarve (Portugal) und aus der Mongolei. Es handelt sich um taxonomisch nicht weiter bestimmte Actinomyceten.

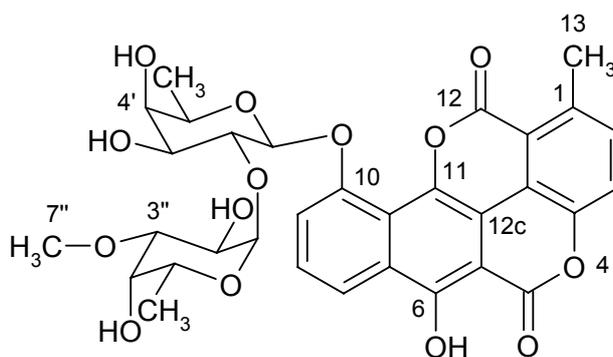
Die Kultivierung von vier Stämmen aus Portugal (P1–P4) und von drei Stämmen aus der Mongolei (M4-1, M4-2 und M8-1) erfolgte in vier verschiedenen Nährmedien (Hafer, M2, SGG und SM). Die Extrakte von Kulturfiltrat und Mycel wurden einem von UMEZAWA *et al.* begründeten und ZÄHNER¹³² und ZEECK^{133,134} weiterentwickelten chemischen Screening¹³⁵ unterzogen. Hierbei bestimmt die Zonenbildung im Dünnschichtchromatogramm und das Anfärbeverhalten gegenüber Sprühreagenzien (Anisaldehyd, Ehrlich, Orcin) die Auswahl der Stämme, die für die Isolierung auffälliger Metaboliten in größeren Maßstab kultiviert werden. *Actinomyces* sp. (Stamm P4) und *Actinomyces* sp. (Stamm M4-1) fielen durch ihre Metabolitenproduktion auf. Nach Kultivierung im 1 L-Maßstab gelang die Isolierung von insgesamt vier literaturbekannten Metaboliten [Chartreusin (**44**), Genistein (**45**), Daidzein (**12a**) und Borrelidin (**15**)]. Die säulenchromatographische Aufreinigung der Metaboliten ist in Kap. B.3.1.3 (S. 143) und Kap. B.3.1.4 (S. 145) beschrieben.

3.1.1 *Actinomyces* sp. Stamm P4

3.1.1.1 Chartreusin (44)

Kulturfiltrat- und Mycelextrakte lieferten im Dünnschichtchromatogramm eine Zone intensiv gelber Eigenfarbe mit blauer Fluoreszenz bei $R_f = 0.4$ (Chloroform/Methanol 9:1). Die zugehörige Substanz konnte mit einer Ausbeute von 35 mg/L aus dem Kulturfiltrat und mit 45 mg/L aus dem Mycel isoliert werden. Sie zeigt eine mäßige Löslichkeit in Methanol, löst sich in Pyridin und DMSO hingegen gut.

Das ESI-Massenspektrum des Metaboliten lieferte einen Peak bei $m/z = 663 [M+Na]^+$, aus dessen Hochauflösung sich die Summenformel $C_{32}H_{32}O_{14}$ ergab. Aus dem 1H -NMR-Spektrum in $DMSO-d_6$ lassen sich zwei 6-Desoxyzucker ableiten, deren anomere Kohlenstoffe unter Berücksichtigung der α -H-Kopplungskonstanten von $^3J = 4.0$ bzw. 8.0 Hz α - und eine β -Konfiguration besitzen. Weiterhin sind im Protonenspektrum jeweils ein aromatisches ABC- und AB-Spinsystem, sowie zwei Methylgruppen bei $\delta_H = 2.82$ und 3.16 zu erkennen. Eine Antibase-Datenbanksuche¹³⁶ mit diesen Informationen führt zum Chartreusin (**44**), ein Abgleich der NMR-Daten mit Literaturwerten¹³⁷ zeigt jedoch im Bereich der Zuckerresonanzen Differenzen. Die Identität der isolierten Substanz mit **44** konnte durch ein 1H -NMR-Spektrum in Pyridin¹³⁸, CD-Wert und einen HPLC-Vergleich bewiesen werden. Wichtig ist jedoch anzumerken, dass Protonenspektren von **44** in DMSO gegenüber anderen Lösungsmitteln Differenzen aufweisen, deren Ursache unklar ist.



44

Das stark antibakteriell wirkende **44** ist erstmals 1953 aus *Streptomyces chartreusis* isoliert worden,¹³⁹ eine Strukturaufklärung gelang durch Derivatisierungs- und Abbaureaktionen.^{140,141} Die Biosynthese erfolgt durch Cyclisierung einer Undecaketidkette zu einem Benzpyrenderivat, welches nach Bindungsspaltung und Decarboxylierung das Aglykon von **44**, das Chartrarin ergibt.¹⁴² Durch Hemmung der Topoisomerase I inhibiert **44** die Biosynthese der DNA¹⁴³ und induziert Doppelstrangbrüche in Verbindung mit

reduzierenden Agentien¹⁴⁴. Diese Aktivität ist der Grund für eine sehr hohe Aktivität gegen Tumorzellen, wobei eine schlechte Bioverfügbarkeit und eine schnelle Metabolisierung einen klinischen Einsatz von **44** verhindern.¹⁴⁵

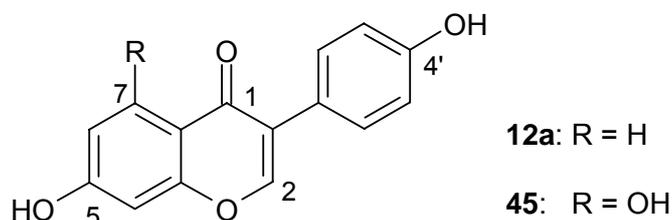
3.1.2 *Actinomyces* sp. Stamm M4-1

Im chemischen Screening fiel der Stamm M4-1 nach Kultivierung im Soja-Mannit-Medium durch drei bei 254 nm UV-löschende Zonen auf. Während die beiden polaren Komponenten im Dünnschichtchromatogramm in Chloroform/Methanol 9:1 bei $R_f = 0.14$ (Genistein, **45**) und 0.31 (Daidzein, **12a**) nur eine sehr schwache Färbung mit Orcin zeigten, färbte die dritte Substanz (Borrelidin, **15**) ($R_f = 0.5$, Chloroform/Methanol 9:1) mit Anisaldehyd braun an. Die Isolierung der Metaboliten ist in Kap. B.3.1.4 (S.145) beschrieben.

3.1.2.1 Isoflavone

Für die farblosen Feststoffe **12a** und **45** lassen sich aus einem HRESI-Massenspektrum Summenformeln von $C_{15}H_{10}O_4$ und $C_{15}H_{10}O_5$ ableiten. Im Protonenspektrum sind acht (**12a**) bzw. sieben (**45**) Signale im aromatischen Bereich zu erkennen, von denen in beiden Fällen zwei, mit einer Gesamtintensität vier Protonen entsprechend, einem A_2B_2 -Spinsystem zugeordnet werden können. Für beide Substanzen ist ein weiteres aromatisches Ringsystem zu erkennen, welches für **12a** mono- und für **45** disubstituiert ist. Eine Antibase-Datenbanksuche¹³⁶ mit den gefundenen Strukturfragmenten und den Summenformeln führt zu Daidzein (**12a**) und Genistein (**45**). Ein Vergleich der spektroskopischen Daten¹⁴⁶ bestätigt diese Zuordnung.

Isoflavone wie **12a** und **45** besitzen neben antimikrobiellen, insektiziden und cytotoxischen Aktivitäten auch eine östrogene Wirkung (s. auch Kap. 1.1).¹⁴⁷ Sie sind Pflanzenmetaboliten, welche vor allem in Soja und Baumwollsaamen stark angereichert werden. Obwohl in zahlreichen Publikationen von der Isolierung aus Mikroorganismen berichtet wird,¹⁴⁸ muss angenommen werden, dass Isoflavone Artefakte aus den Nährmedien sind. Darauf weist auch die Beobachtung von ROSAZZA *et al.* hin, dass der Gehalt an isolierten Isoflavonen aus *Streptomyces griseus* sp. direkt proportional zu dem Anteil an Sojamehl im Nährmedium ist.¹⁴⁹



3.1.2.2 Borrelidin (15)

Die dritte aus *Actinomyces* sp Stamm M4-1 isolierte, ebenfalls farblose Substanz liefert im ESI-Massenspektrum einen Peak bei $m/z = 488 [M-H]^-$, woraus nach der Stickstoffregel auf eine ungerade Zahl an Stickstoffatomen geschlossen werden kann. In Übereinstimmung damit führt die Hochauflösung des Peaks zu einer Summenformel von $C_{28}H_{43}NO_6$. Das IR-Spektrum der Substanz zeigt eine starke Absorption bei $\tilde{\nu} = 2213$ und 1709 cm^{-1} , was auf eine Nitrilgruppe und einen Ester (bzw. Lacton) schließen lässt. Im ^{13}C -NMR-Spektrum können Signale bei $\delta_{\text{C}} = 173.2$ und 180.7 beobachtet werden, ihre chemische Verschiebung ist für Ester bzw. Carbonsäuren typisch. Weiterhin sind bei $\delta_{\text{C}} = 117.4, 119.9, 129.0, 140.2$ und 145.5 fünf Signale für olefinische C-Atome zu beobachten. Aus einem HSQC-Korrelationsspektrum ergibt sich nur für die drei am weitesten ins Hochfeld verschobenen Resonanzen eine Bindung an Protonen, während die restlichen zwei quartären Kohlenstoffatomen zuzuordnen sind. Das HSQC-Spektrum zeigt weiterhin vier Methylgruppen bei $\delta_{\text{C}} = 15.4, 18.7, 19.1$ und 20.9 , acht Methylen- sowie neun Methingruppen. Drei dieser Methingruppen tragen Sauerstoffatome, was die ^{13}C -Daten ($\delta_{\text{C}} = 72.9, 73.1$ und 77.4) belegen. Die Verknüpfung der beschriebenen Gruppen zu zwei Fragmenten (s. Abb. 22, S. 73) gelingt nach Zuordnung der Signale des Protonenspektrums mit einem COSY-Korrelationsspektrum. Die *trans*-Isomerie der C-14/C-15 Doppelbindung wird durch die Kopplungskonstante von $^3J = 15.0 \text{ Hz}$ bestätigt. Eine Datenbanksuche¹⁵⁰ mit den Fragmenten ergibt als einzigen Treffer Borrelidin (**15**). Durch den Vergleich der NMR-Daten mit Literaturwerten¹⁵¹ kann die isolierte Substanz eindeutig als **15** identifiziert werden.

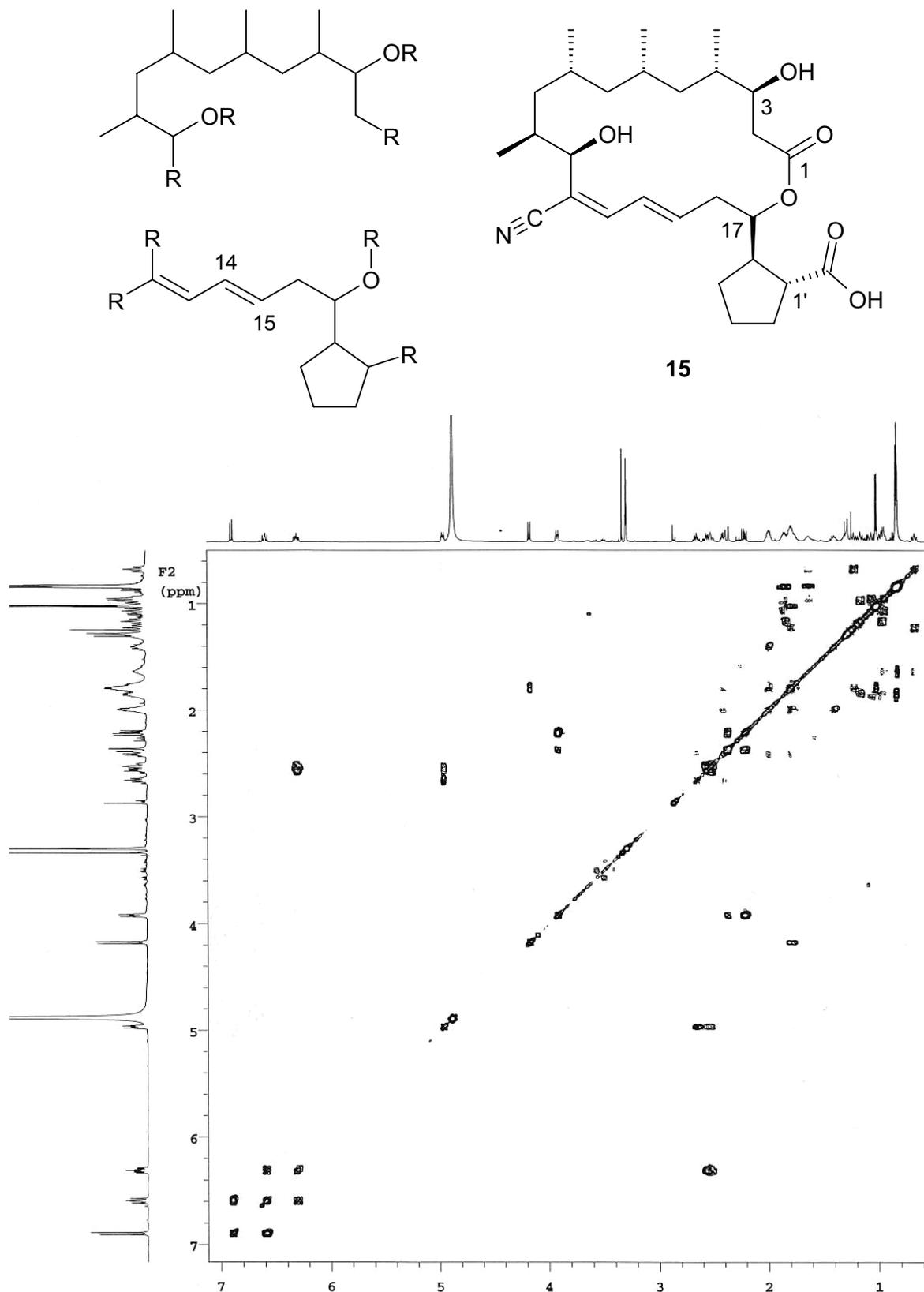


Abb. 22: ^1H - ^1H -COSY-Korrelationspektrum von Borrelidin (15) und daraus abgeleitete Strukturfragmente (600 MHz, CD_3OD).

3.2 HPLC-DAD Screening

Für eine effiziente Naturstoffforschung ist die frühe Identifizierung bekannter Substanzen notwendig. Hierfür sind Techniken, die eine Charakterisierung der Metaboliten aus den Rohextrakten erlauben, vorteilhaft. Beim HPLC-DAD-Screening¹³¹ werden Retentionszeit und UV-Spektrum verbunden, wodurch eine schnelle Identifizierung von in einer Datenbank gespeicherten Substanzen möglich ist. In Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis FIEDLERⁱ wurden *Streptomyces* sp. Tü 6319 und Tü 2561 auf ihre Sekundärmetabolitenproduktion untersucht. Da ein Screening der Stämme in Schüttelkulturen keine Übereinstimmungen mit den 834 in der HPLC/UV-Vis-Datenbank gespeicherten Substanzen ergab, wurde ein Scale-up vorgenommen, um die Metaboliten zu isolieren.

3.2.1 *Streptomyces* sp. Stamm Tü 6319

Die chemotaxonomische Untersuchung des aus einer mit Industrieabfällen kontaminierten Erdprobe aus Fogaras (Rumänien) isolierten Stammes ergab aufgrund des LL-Diaminopimelinsäure-Gehalts der Peptidoglycanschicht eine Zuordnung zur Gattung *Streptomyces*, was die phänomenologische Charakterisierung bestätigte. Weiterhin zeigte Stamm Tü 6319 große Übereinstimmung der 16S rRNA-Gensequenz mit den eng verwandten Stämmen *Streptomyces coelestis* DSM 40421, *S. violaceolatus* DSM 40438 und *S. violaceoruber* DSM 40049.

Die Fermentationen erfolgten in einem 10 L New Brunswick Blattrührfermenter in Hafermedium (2 % Hafermehl in Leitungswasser, pH 7.3, 27°C, 0.5 vvm, 200 rpm, 168 h Kultivierungsdauer), wobei ein Zusatz von 3 % DMSO zum Nährmedium zu einer leicht gesteigerten Ausbeute der Metaboliten führte.

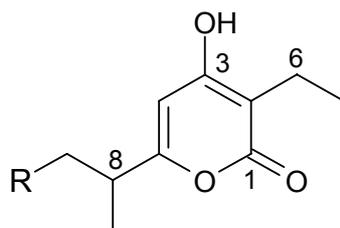
Das Kulturfiltrat wurde an XAD-16 aufgereinigt, die Metaboliten in der 40 % MeOH Fraktion aufgefangen. Die Fraktion wurde *in vacuo* eingengt, auf pH 2 eingestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Dieses Rohprodukt wurde an LiChroprep Diol (CH₂Cl₂ → 5 % MeOH), Sephadex LH-20 (MeOH) und Fraktogel TSK HW-40 (MeOH) aufgereinigt. Insgesamt konnten auf diese Weise sechs Substanzen erhalten werden, von denen sich mit Fogacin (**46**) eine als neu erwies. Vier weitere Metaboliten [SEK4b (**47**, 1 mg/L), anhydroSEK4b (**48**, 0.5 mg/L), Germicidin A (**49**, 0.4 mg/L) und Germicidin B (**50**, 0.3 mg/L) sind literaturbekannte Sekundärmetaboliten, bei der sechsten Substanz (Ferulasäure, 0.8 mg/L) handelt es sich wahrscheinlich um einen Nährmedienbestandteil.

ⁱ Ich danke Herrn PROF. DR. H.-P. FIEDLER sowie Frau DR. N. ANTAL (Mikrobiologisches Institut, Universität Tübingen) für die Isolierung der Substanzen und die gute Zusammenarbeit.

3.2.1.1 Germicidin A (49) und B (50)

Die unpolaren ($R_f \approx 0.8$, Chloroform/Methanol 9:1) öligen Substanzen färben mit Anisaldehyd in der Wärme leicht braun an und zeigen auf Kieselgelplatten bei 254 nm schwache UV-Löschung. Aus der Hochauflösung der EI-MS-Peaks lassen sich Summenformeln von $C_{11}H_{16}O_3$ (**49**) und $C_{10}H_{14}O_3$ (**50**) ableiten. Bei beiden Substanzen ist im 1H -NMR-Spektrum bei $\delta_H \approx 1.00$ eine mit $J = 7.5$ Hz zum Triplett aufgespaltene Methylgruppe zu erkennen, die zu einer Methylengruppe bei $\delta_H \approx 2.40$ koppelt. Substanz **49** zeigt weitere Signale im aliphatischen Bereich für zwei Methylgruppen ($\delta_H = 0.89, 1.19$), eine Methylengruppe bei $\delta_H = 1.54$ und 1.67 und eine Methingruppe ($\delta_H = 2.45$) welche einer sekundären Butyleinheit zugeordnet werden können. Für Substanz **50** ist analog ein *iso*-Propylrest abzuleiten. Die ^{13}C -NMR-Spektren von **49** und **50** zeigen mit $\delta_C \approx 170, 169, 168, 105$ und 102 Signale, die in Verbindung mit den Summenformeln ein 4-Hydroxypyran-2-on erkennen lassen.

Eine Datenbanksuche¹³⁶ führt zu Germicidin A (**49**) und Germicidin B (**50**), alle spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturwerten überein.¹⁵²



49: R = CH₃

50: R = H

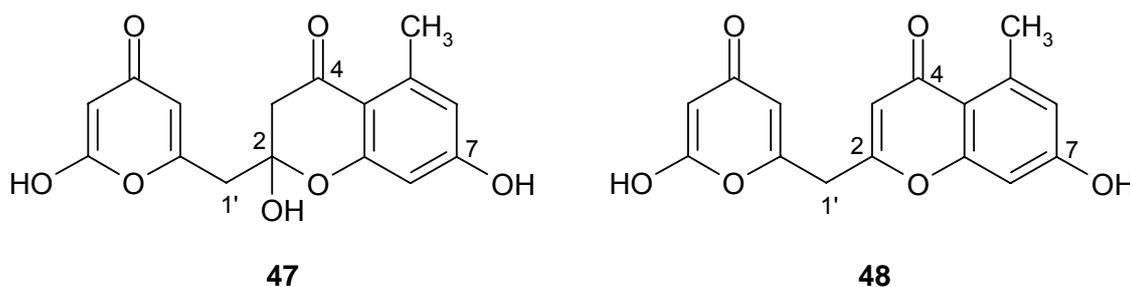
3.2.1.2 SEK4b (47) und AnhydroSEK4b (48)

Die farblosen Substanzen **47** und **48** zeigen im ESI-Massenspektrum jeweils einen Peak bei $m/z = 299$ (**47**) und 281 (**48**) $[M-H]^-$, aus deren Hochauflösung sich Summenformeln von $C_{16}H_{14}O_7$ (**47**) und $C_{16}H_{12}O_6$ (**48**) ableiten lassen.

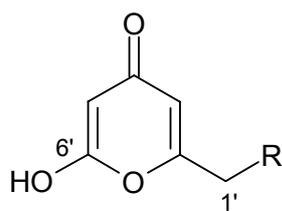
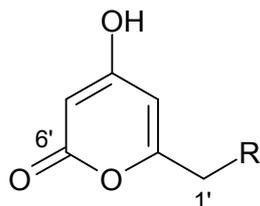
Das Protonenspektrum von Substanz **47** zeigt zum Dublett aufgespaltene Signale bei $\delta_H = 6.18$ und 6.30 , deren Kopplungskonstante mit $J = 2.5$ Hz auf eine *meta*-Kopplung eines Aromaten schließen lässt. Dem Aromaten können mit einem HMBC-Spektrum Kohlenstoffsignale mit chemischen Verschiebungen von $\delta_C = 101.6, 111.9, 112.7, 142.4, 160.9$ und 162.7 sowie ein Carbonyl- und ein Methylsubstituent zugeordnet werden. Zusätzlich weisen die chemischen Verschiebungen auf zwei Sauerstoffreste hin. Methingruppen bei $\delta_C = 88.9$ und 103.5 sind durch HMBC-Korrelationen zu $\delta_C = 160.4, 163.9$ und 170.6 einem 2-Hydroxypyran-4-on-Ringsystem zuzuordnen. Im Protonenspektrum ist weiterhin eine Methylengruppen bei $\delta_H = 2.98$ – 3.14 zu erkennen, aus deren HMBC-Korrelationen sich ihre Bindung an die Pyranoneinheit und ein Halbacetal ($\delta_C = 100.1$) ergibt. Zusätzlich zeigt sie Kopplungen zu einer zweiten Methylengruppe bei $\delta_H = 2.58$ und 2.95 , die

ihrerseits zu dem Carbonyl-Kohlenstoff bei $\delta_c = 190.2$ benachbart ist und somit die Verknüpfung der Fragmente ermöglicht. In Verbindung mit der Summenformel ist nur die gezeigte Strukturformel (SEK4b, **47**) denkbar und kann durch Vergleich mit Literaturdaten¹⁵³ verifiziert werden. Obwohl an C-2 ein Chiralitätszentrum vorhanden ist, beträgt der Drehwert 0° , **47** liegt also offensichtlich als racemisches Gemisch vor (s. Kap. 3.2.1.5, S. 81).

In einem ^{13}C -NMR-Spektrum von Substanz **48** sind wie bei **47** 13 Signale eines methylierten, zweifach mit Sauerstoff substituierten Aromaten sowie eines Hydroxypyranons, welches eine Methylengruppe trägt, zu finden. Im olefinischen Bereich tauchen zwei neue Signale auf, während das Halbacetal und die C-3 Methylengruppe von **47** nicht mehr vorhanden sind, was auf eine Wasserabspaltung aus **47** schließen lässt. Spektroskopische Vergleichsdaten¹⁵⁴ bestätigen die ermittelte Strukturformel (anhydroSEK4b, **48**).



Der Pyranonring in **47** und **48** erlaubt die Formulierung einer Tautomerie zwischen 6'-OH und 4'-O (**52** und **53**). Da in den NMR-Spektren keine Effekte dieser Art nachgewiesen werden konnten, wurden die experimentell bestimmten ^{13}C -NMR chemischen Verschiebungen der beiden Substanzen **47** und **48** mit berechneten Daten¹⁵⁵ verglichen. Die Berechnung der Verschiebungen beider Tautomere ergibt für C-2' keine guten Übereinstimmungen (s. Tab. 9, S. 77), zeigt jedoch an C-3' und C-4', dass wahrscheinlich die 6'-Hydroxypyran-4'-on-Form vorliegt. Bestätigt wird dies durch die in **47** und **48** gefundenen HMBC-Kopplungen von C-1', C-2', C-4' und C-5' zu 3'-H sowie C-3', C-4' und C-6' zu 5-H. Die von MOORE *et al.* publizierte Struktur¹⁵⁴ muss dementsprechend revidiert werden.

**51****52**

	δ_C [ppm]			
	51	52^a	47	48
C-2'	170.0	150.8	160.4	160.0
C-3'	98.5	111.1	103.5	102.0
C-4'	170.9	166.8	170.6	170.3
C-5'	88.2	89.8	88.9	89.1
C-6'	164.6	163.8	163.9	163.4

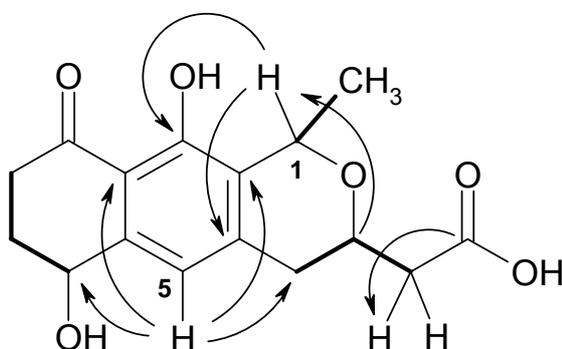
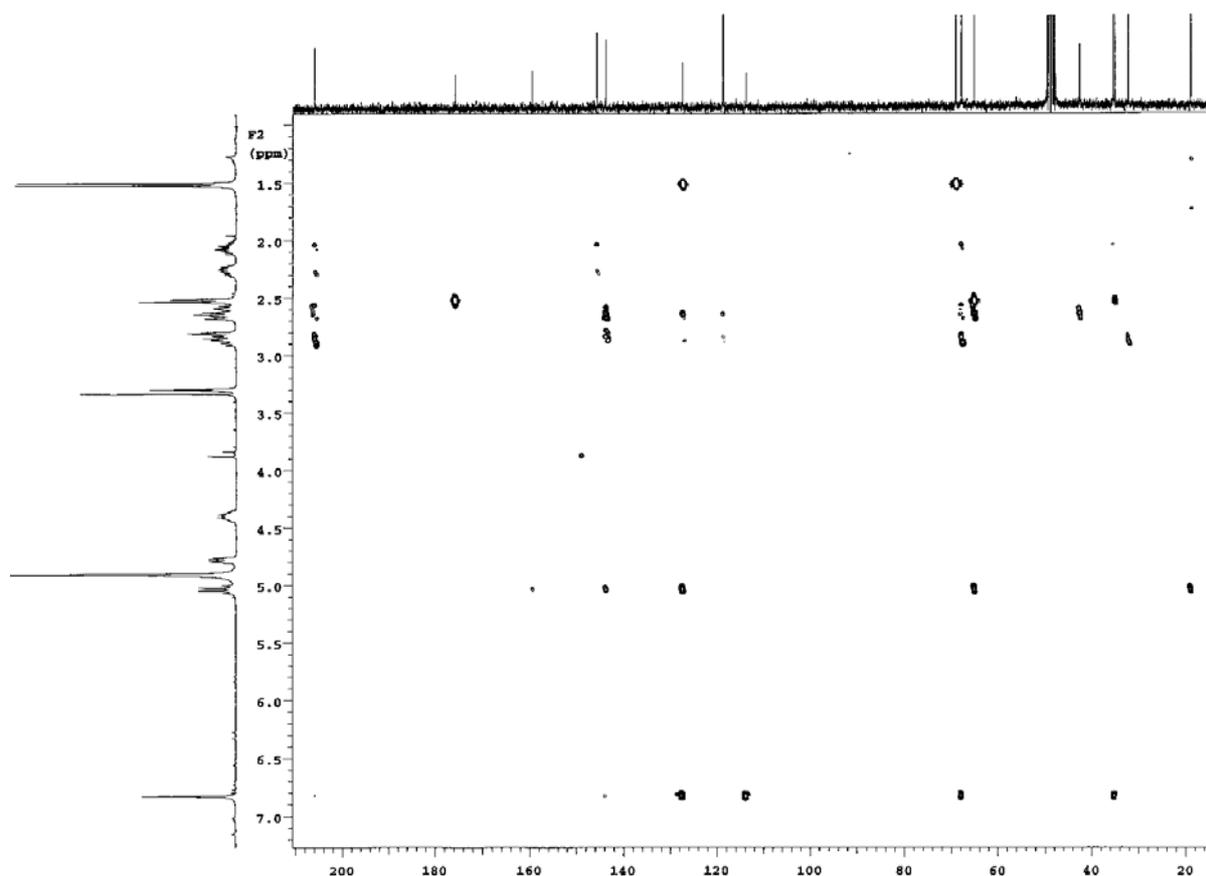
^a Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgt aus Übersichtsgründen wie bei **47** und **48**.

Tab. 9: Berechnete (**51** und **52**) und experimentell bestimmte ^{13}C -Chemische Verschiebungen für die Pyranoneinheit in **47** und **48**.

3.2.1.3 Fogacin (**46**)

Der farblosen mit Anisaldehyd in der Wärme bräunlich anfärbenden Substanz hoher Polarität ($R_f = 0.1$, Chloroform/Methanol 9:1) kann durch das ^{13}C -NMR-Spektrum in Kombination mit einem HRESI-Massenspektrum die Summenformel $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_6$ zugeordnet werden. Aus dem 2D-NMR-Datensatz ergeben sich eine Methylgruppe ($\delta_C = 19.3$), vier Methylengruppen ($\delta_C = 32.5, 35.4, 35.8$ und 42.9), drei oxygenierte aliphatische ($\delta_C = 65.4, 68.1$ und 69.3) und eine aromatische ($\delta_C = 119.1$) Methingruppen sowie sieben quartäre Kohlenstoffatome. Von den quartären Signalen steht eines für ein Keton ($\delta_C = 206.1$) und eines für eine Carboxylgruppe ($\delta_C = 176.0$), die weiteren fünf Signale legen unter Berücksichtigung der aromatischen Methingruppe mit Verschiebungen von $\delta_C = 114.2, 127.8, 144.1, 145.9$ und 159.7 ein Phenol nahe. Die Methylengruppen können durch ein ^1H - ^1H -COSY-Spektrum zwei Spinsystemen zugeordnet werden. Das erste dieser beiden Systeme zeigt eine Methingruppe bei $\delta_H = 4.43$ zwischen zwei CH_2 -Gruppen ($\delta_H = 2.52$ – 2.60 sowie $2.68, 2.85$). Die zweite Partialstruktur lässt sich ausgehend von einer Methylengruppe bei $\delta_H = 2.10$ und 2.29 ableiten, welche Kopplungen zu einer Methingruppe bei $\delta_H = 4.81$ sowie einer weiteren CH_2 -Gruppe ($\delta_H = 2.65, 2.89$) aufweist. Ein weiteres Strukturelement des farblosen Feststoffs ergibt sich durch die Aufspaltung des Signals der Methylgruppe ($\delta_H = 1.55, ^3J = 6.5$ Hz), welche der eines zum Quartett aufgespaltenen Signals einer Methingruppe bei $\delta_H = 5.06$ entspricht. Aus dem HMBC-Spektrum ist die Verknüpfung der drei aliphatischen Partialstrukturen untereinander und mit dem Aromaten erkennbar, zudem gelingt die

Zuordnung der Carbonsäure (s. Abb. 23, S. 79). Die Ketogruppe weist mit $\delta_C = 206.1$ eine ausgesprochen starke Tieffeldverschiebung auf, welche auf den ersten Blick gegen die Stellung in 9-Position, direkt benachbart dem Phenol, spricht. Obwohl die erwartete Verschiebung in diesem Fall $\delta_C \approx 190^{91}$ betragen würde, ist die Struktur von **46** durch die Kopplung der Protonen (6-H/ 7-H_{a,b}/ 8-H_{a,b}) sowie die HMBC-Kopplung zwischen C-6 und 5-H eindeutig bewiesen und wird zusätzlich durch Berechnungen der ¹³C-chemischen Verschiebungen unterstützt.



57

Abb. 23: HMBC-Spektrum (600 MHz, CD₃OD) und wichtige HMBC-Kopplungen von Fogacin (**46**) sowie die daraus abgeleitete Verknüpfung der aus einem COSY-Spektrum gewonnenen Strukturfragmente (fett).

Zur Bestimmung der relativen Stereochemie von **46** wurde ein eindimensionales NOESY-Spektrum aufgenommen. Hierbei ergibt die selektive Anregung der Methylgruppe Kopplungen zu 1-H und 3-H, woraus geschlossen werden kann, dass die Methyl- und Carboxymethylengruppe *trans* zueinander stehen. Somit sind die in Abb. 24 gezeigten

Stereoisomere denkbar. Die Kopplungskonstante zwischen 3-H und 4-H_a beträgt $^3J = 11.0$ Hz, zu 4-H_b ist sie entsprechend kleiner ($^3J = 3.0$ Hz).

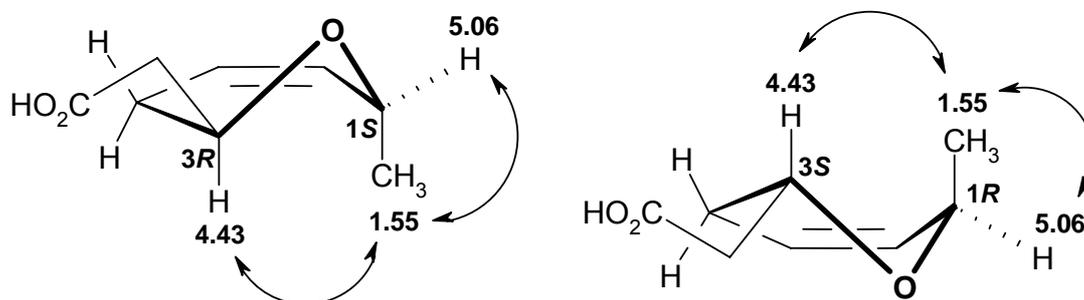


Abb. 24: NOE-Kopplungen bei selektiver Anregung der Methylgruppe können zur Ableitung der relativen Stereochemie von Ring A des Fogacins (**46**) genutzt werden.

Ergänzend können aus den vicinalen Kopplungskonstanten unter Berücksichtigung der Karplus-Kurve die Diederwinkel und somit die Konformation des Cyclohexanrings bestimmt werden. 6-H zeigt eine Aufspaltung zum Dublett vom Dublett mit Kopplungskonstanten von $^3J = 8.5$ und 3.5 Hz was auf eine pseudoaxiale Stellung schließen lässt. Die vicinalen Kopplungen von 8-H_a betragen $^3J = 9.0$ und 4.5 Hz und sind in ihrem Betrag denen von 8-H_b mit $^3J = 8.0$ und 4.5 Hz sehr ähnlich, was für eine Wannenform bei Ring C spricht (s. Abb. 25).

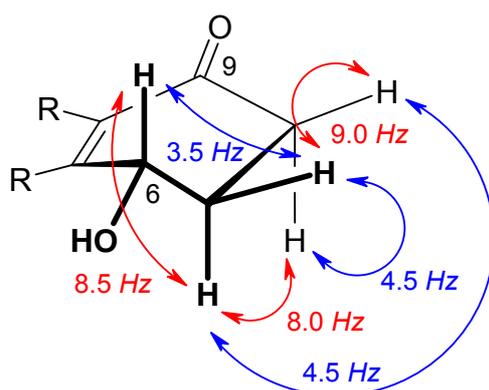
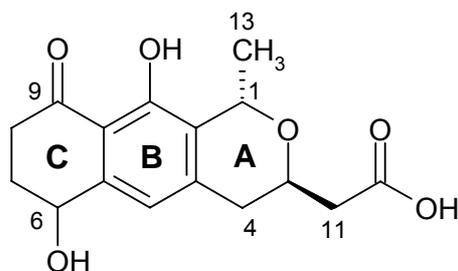


Abb. 25: 3J -Kopplungen der Protonen an Ring C von **46** (blau: pseudo-axial-äquatoriale Kopplung, rot: pseudo-axial-axiale Kopplung).

Die Bestimmung der absoluten Stereochemie der drei Chiralitätszentren in **46** wäre an C-6 durch die Helmchen-Methode möglich. Für Ring A könnten CD-Berechnungen diese Frage lösen. Ein Vergleich der CD-Werte von **46** mit denen bekannter Octaketide (wie den

Nanaomycinen, o.a.) ist nicht möglich, da keine ähnlichen Substanzen mit einem aromatischen Ring B und einem weiteren Stereozentrum in Ring C bekannt sind.

Datenbankvergleiche^{136,150} ergaben, dass die gezeigte Struktur **46** nicht literaturbekannt ist. Substanz **46** wurde in Anlehnung an die Herkunft der Erdprobe, aus welcher *Streptomyces* sp. Stamm Tü 6319 isoliert wurde, Fogacin genannt.¹⁵⁶



46

3.2.1.4 Biologische Aktivitäten der Metaboliten

Die isolierten Metaboliten **46–50** wurden im Plattendiffusionstest (1.5×10^{-2} mg pro Filterplättchen) auf antimikrobielle Aktivität gegen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* untersucht. Die Substanzen zeigten keine antibakterielle oder antimykotische Aktivität. In Tübingen hingegen wies anhydroSEK4b (**48**) mit Hemmhöfen von 11 und 16 mm bei einer Konzentration von 1 mg/mL eine moderate Aktivität gegen *Bacillus subtilis* DSM 10 und *Streptomyces viridochromogenes* Tü 57 auf.

Weitergehend wurden **46–50** im Arbeitskreis BEIL gegen die Krebszelllinien HepG2 (Lebercarcinom), HM02 (Magenadenocarcinom) sowie MCF7 (Mammacarcinom) getestet. Bis zu einer Konzentration von 10 µg/mL war keine Aktivität nachzuweisen.

3.2.1.5 Zur Biosynthese der Octaketide **46**, **47** und **48**

Die aus *Streptomyces* sp. Tü 6319 isolierten Polyketide SEK4b (**47**) und anhydroSEK4b (**48**) sind literaturbekannte „Shuntmetaboliten“ von Mutanten des Actinorhodin-Produzenten *Streptomyces coelicolor* A3(2).^{157,158} Eine C₁₆-Einheit des dimeren Octaketids Actinorhodin (**53**) wird durch eine Typ-II-Polyketidsynthase (PKS II) aus einer Acetat und sieben Malonateinheiten aufgebaut. Der für die Produktion von **53** codierende Gencluster beinhaltet einen Abschnitt für die sogenannte „minimale PKS“ („minPKS“) sowie weitere, für die regio- und stereospezifische Cyclisierung, Reduktion, Oxygenierung etc. verantwortliche Gene. Die „minPKS“ besteht aus einem Acyl-Carrier-Protein und zwei β-Ketoacylsynthasen (KS_α und KS_β¹⁵⁹) und ist in der Lage C₁₆-Polyketide wie **47** und **48** *in vivo*¹⁶⁰ und *in vitro*¹⁶¹ zu bilden. Bei der heterologen Expression des „minPKS“-Gens werden dabei ebenso wie bei Arbeiten

mit den aufgereinigten „minPKS“-Enzymen neben **47** und **48** Metabolite wie SEK4 (**54**) und anhydro SEK4 (**55**)¹⁶² produziert (s. Abb. 26, S. 83), die zwar ein C₁₆-Grundgerüst aufweisen, aber nicht selektiv cyclisiert und reduziert wurden. Wenn die „minPKS“ hingegen mit zusätzlichen Genen für Cyclisierung oder Reduktion exprimiert wird oder einzelne Gene der späten Actinorhodin-Biosynthese im Wildstamm inaktiviert werden, können weitere Metaboliten, wie die teilweise kontrolliert cyclisierten Aloesaponarin II¹⁶³, (S)-DNPA, DMAC¹⁶⁴ oder (S)-NHAB¹⁶⁵, erhalten werden (nicht dargestellt). Bei der heterologen Expression konnte zudem gezeigt werden, dass Gene, welche für die Cyclisierung von Decaketiden wie Tetracenomycin verantwortlich sind, die Fähigkeit haben eine kontrollierte späte Biosynthese von Octaketidketten durchzuführen.^{154,166}

In *Streptomyces* sp. Tü 6319 liegen demnach die Enzyme für die vollständige Biosynthese eines Octaketids wie **46** vor, zeitgleich werden mit **47** und **48** Shuntmetabolite produziert, die über eine nichtenzymatische Cyclisierung entstehen. Die Frage, warum auch die Natur Shuntmetabolite bildet, ist nicht einfach zu beantworten. Denkbar ist, dass in dem vorliegenden Fall ein nicht abgeschlossener evolutionärer Prozess in *Streptomyces* sp. Tü 6319 zu beobachten ist, der einen neuen, aktiven Sekundärmetaboliten hervorbringen könnte. Weiterhin ist der umgekehrte Prozess eines biologisch inaktiven Sekundärmetaboliten **46** denkbar, dessen Biosynthesegene aufgrund fehlenden Nutzens für den Organismus schrittweise deletiert werden. In der Literatur ist eine ähnliche Beobachtung nur für *Streptomyces* Stamm P6417 beschrieben, der neben dem „echten“ Decaketid Balmoralmycin die zuvor von Fu *et al.*¹⁶⁷ beschriebenen Shuntmetaboliten SEK15 und 8-DeshydroxySEK15 produziert.¹⁶⁸

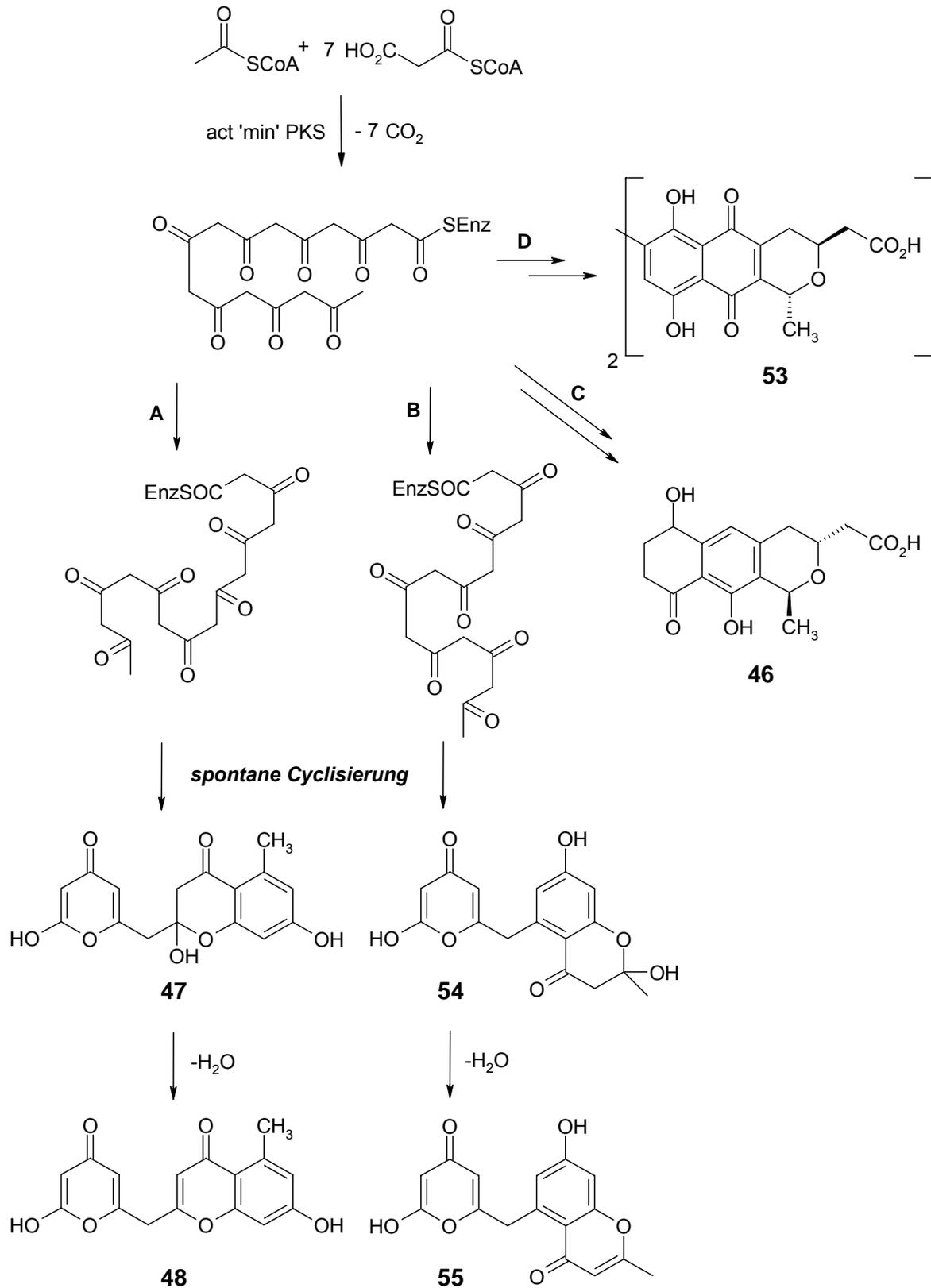


Abb. 26: Typ II Polyketid-Biosynthese verschiedener Octaketide durch spontane Cyclisierung oder enzymatische Umsetzung der Kette (A: *knock-out* Mutanten und *Streptomyces* sp. Tü 6319, B: *knock-out* Mutanten, C: *Streptomyces* sp. Tü 6319, D: *Streptomyces coelicolor* A3(2)).

3.2.2 *Streptomyces* sp. Stamm Tü 2561

Die Fermentationen erfolgten in einem 10 L New Brunswick Blattrührfermenter in Hafermedium (2 % Hafermehl in Leitungswasser, pH 7.3, 27°C, 0.5 vvm, 200 rpm, 168 h Kultivierungsdauer)

Das Kulturfiltrat wurde mit Ethylacetat extrahiert und der Extrakt *in vacuo* eingengt. Die weitere Aufreinigung erfolgte an Kieselgel (CH₂Cl₂ → 10 % MeOH) und zweimalig an Sephadex LH-20 (MeOH). Substanz 2561-1 (**56**) fiel in einer Ausbeute von 4.8 mg/L an.

Der farblose Feststoff ist in Chloroform, Methanol, Benzol und Pyridin gut löslich und zeigt auf dem Dünnschichtchromatogramm mit Anisaldehyd in der Wärme eine braune Färbung. Das ESI-Massenspektrum der bei 254 nm UV-löschenden Substanz mittlerer Polarität ($R_f = 0.35$, Chloroform/ Methanol 9:1) ergibt einen Peak bei $m/z = 1209 [M+Na]^+$, aus dessen Hochauflösung sich mit einer Genauigkeit von $\Delta < 0.05$ ppm eine Summenformel von C₇₃H₈₆O₁₄ ableiten lässt. Die Hochauflösung des Ammoniumadduktsignals bei $m/z = 1204$ kann diese Summenformel nicht unterstützen, ergibt jedoch auch keine Alternative hinreichender Genauigkeit. Eine hochauflösende MS/MS-Untersuchung zeigt Peaks, die zu Summenformeln von [C₇H₁₂O₃]⁺, [C₁₃H₂₂O₆]⁺ und [C₁₉H₃₂O₉]⁺ führen.

Das ¹³C-NMR-Spektrum lässt insgesamt ca. 70 Signale erkennen, die genaue Anzahl ist aufgrund von Überlagerungen nicht zu ermitteln. Von den Resonanzen liegen ca. 60 im aliphatischen Bereich unter $\delta_C \approx 100$. Signale bei $\delta_C = 201.6$ und 206.3 lassen auf zwei Ketogruppen, weitere bei $\delta_C = 157.4$, 167.1 und 180.9 auf zwei Ester sowie eine Carbonsäure schließen. Weiterhin sind vier Doppelbindungen zu erkennen ($\delta_C = 119.1$ – 141.3), denen in Verbindung mit einem HSQC-Spektrum fünf Protonen ($\delta_H = 5.14$ – 5.73) zuzuordnen sind. Im aliphatischen Bereich sind vier Signale bei $\delta_C = 91.0$, 96.8 , 97.9 und 98.2 auszumachen, deren chemische Verschiebung eine Acetalstruktur nahelegt. Durch HSQC-Korrelationen ist ihre Bindung an vier Protonen im Bereich von $\delta_C = 4.46$ – 5.13 belegt. Aus den COSY-Kopplungen dieser Wasserstoffatome wird die Ableitung von zwei vollständigen 2,6-Didesoxyzuckern (Zucker A und B) sowie zwei 2,6-Didesoxyzucker-Partialstrukturen (Zucker C und D) möglich (s. Tab. 10, S. 85; Abb. 27, S. 86), ihre Strukturen werden durch HMBC- und NOESY-Korrelationsspektren gestützt. Durch HMBC-Korrelationen von 1-H sowie 4-H ist für Zucker A weiterhin die Verknüpfung zu Zucker B (1,4-glykosidisch) sowie zu einer Methylgruppe (4A-OCH₃) bewiesen. In gleicher Weise gelingt die Verbindung von Zucker B zu dem Zuckerfragment C (1,3-glykosidisch). Mit diesen Informationen können den in der HR-ESI-MS/MS Untersuchung gefundenen Summenformeln ein methylierter Didesoxyzucker (Zucker A, C₇H₁₂O₃), ein Disaccharid (Zucker A+B, C₁₃H₂₂O₆) und ein Trisaccharid (Zucker A+B+C, C₁₉H₃₂O₉) zugeordnet werden. Allerdings legt eine HMBC-Kopplung von 3C-H zu $\delta_C = 157.4$ eine oxidative Öffnung dieses Rings nahe (s. Abb. 27, S. 86), was gegen die Beobachtung des Trisaccharids in der Masse

spricht. Aus den 3J -Kopplungskonstanten lässt sich weiterhin die relative Stereochemie einzelner Zucker ableiten. So betragen die Konstanten der anomeren Protonen 1A-H und 1C-H jeweils $^3J = 9.5$ und 1.5 Hz, was für eine axiale Position spricht, während für 1B-H und 1D-H die Konstanten ($^3J \approx 4.0$ Hz) für eine äquatoriale Stellung von 1-H charakteristisch sind. Nach dem gleichen Prinzip ergibt sich die Stereochemie für 3-H, 4-H und 5-H der Zucker A und B.

	δ_C / δ_H [ppm]			
	A	B	C	D
1	98.2/ 4.92	90.9/ 5.12	97.9/ 4.77	96.8/ 4.46
2	36.7/ 1.68, 2.15	34.1/ 1.90, 2.12	29.9/ 1.70, 2.36	35.6/ 1.60, 2.79
3	63.9/ 4.27	64.9/ 4.23	66.9/ 4.02	53.6/ 4.39
4	82.08/ 2.85	82.13/ 3.25	–	–
5	68.3/ 3.77	62.0/ 4.00	65.0/ 4.02	69.0/ 3.46
6	18.3/ 1.24	18.3/ 1.14	17.7/ 1.21	16.9/ 1.10
4-OCH ₃	57.3/ 3.42	–	–	–

Tab. 10: 1H - und ^{13}C -chemische Verschiebungen der Zucker A–D in Substanz 2561-1 (**56**) (600 und 150.8 MHz, CDCl₃).

Aus COSY- und HMBC-Spektren ist die Ableitung einer Kohlenstoffkette mit olefinischen und aliphatischen Segmenten möglich, welche insgesamt aus 13 Atomen besteht. Diese Kette trägt an C-4, C-10 und C-12 Methylgruppen, an C-9 einen Propionoylrest, an C-13 Zucker D und muss an C-1, C-5, C-8 und C-13 weitere, bisher nicht identifizierte, Reste aufweisen. Für die C-6/C-7-Doppelbindung ist durch die gefundene Kopplungskonstante von $^3J = 10.0$ Hz eine *cis*-Konfiguration bewiesen. Schwache 1H - ^{13}C -Korrelationen sind weiterhin zwischen 5-H der Kette und der Methylgruppe des C-9-Restes vorhanden, eine Ringverknüpfung an dieser Stelle ist denkbar.

Eine zweite Kohlenstoffkette kann ausgehend von den zwei restlichen olefinischen Protonen durch HMBC-Kopplungen konstruiert werden. So ergibt sich ein konjugiertes System von zwei Doppelbindungen, welches an einen Propylrest grenzt. Eine Verknüpfung dieses Systems mit dem großen Gerüst ist durch eine schwache HMBC-Kopplung von 1-H zu C-4'' wahrscheinlich, für einen Beweis scheint dies aber unzureichend. Die chemischen Verschiebungen aller beschriebenen Strukturelemente sind in den Tabellen 10–12 (S. 85, S. 87) zu finden.

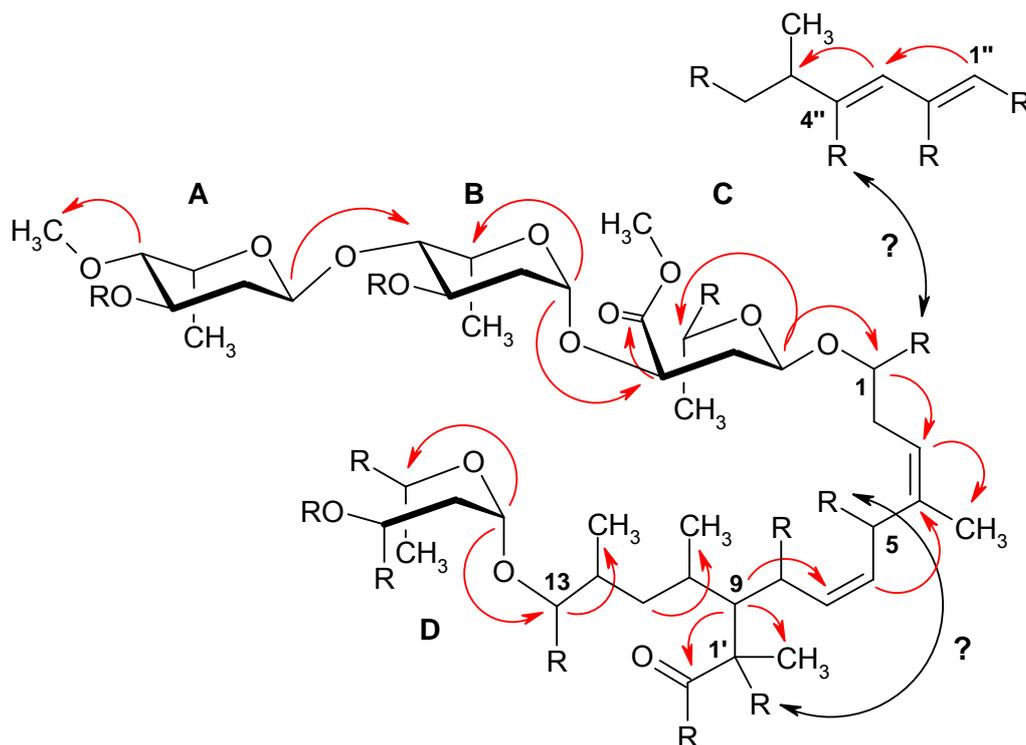


Abb. 27: Wichtige HMBC-Kopplungen (rot) und daraus abgeleitete Partialstruktur der Substanz 2561-1 (**56**); schwarze Pfeile zeigen mögliche, aber nicht eindeutig bewiesene Verknüpfungen.

Die bisher ermittelten Fragmente ergeben die Bruttoformel $C_{52}H_{78}O_{15}$, d.h. gegenüber der ermittelten Summenformel $C_{73}H_{86}O_{14}$ fehlen noch über 20 C-Atome. Selbst wenn einzelne Hydroxygruppen der Zucker verbrückt sind, scheint die Summenformel eventuell falsch zu sein. So führt die Berechnung der Doppelbindungsäquivalente (DBE) für $C_{73}H_{86}O_{14}$ zu insgesamt 31. Unter Berücksichtigung der aus den NMR-Experimenten ersichtlichen Doppelbindungen (neun) und Zucker (vier) müssten in Substanz 2561-1 (**56**) demnach 18 (!) weitere Ringe vorhanden sein, was schwer vorstellbar ist.

Ein großes Problem bei der Strukturaufklärung von **56** ist die Überlagerung vieler aliphatischer Signale in den Protonenspektren, welche durch Lösungsmittelwechsel (von Chloroform zu Pyridin, Benzol, Methanol) nicht aufzuheben ist. Der Einsatz von Europium-Verschiebungsreagenzien führt zwar zu einer Separierung einzelner Signale, eine größere Signalbreite macht diesen Vorteil allerdings zunichte. Wahrscheinlich sind die verbleibenden Fragen durch ein INADEQUATE-Korrelationsspektrum zu lösen, Versuche der Messung dieser ^{13}C - ^{13}C -Korrelationen scheiterten bisher jedoch.

Das ^{13}C -NMR- wie auch ein IR-Spektrum zeigen, dass es sich bei der Substanz um ein Makrolid handeln könnte. Makrolide von ähnlicher Größe wie **56**, z.B. die Quinolidomycine¹⁶⁹ besitzen größere Ringe (bis zu 59 C-Atome), als die gefundenen Substanz. Auffällig ist bei

56 zudem der hohe Anteil an reduzierten, aber nicht olefinisches Strukturteilen und die damit einhergehende niedrige Anzahl an Heteroatomen. Wie erste Fütterungsversuche mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Acetat}$ zeigen, handelt es sich bei **56** um ein mehrfach glykosyliertes Polyketid (wahrscheinlich vom PKS I-Typ). Die Verbindung ist nach Datenbankrecherchen mit den bisherigen Informationen neu und zeichnet sich durch eine bemerkenswerte antibakterielle Wirkung aus. Die Struktur konnte aus zeitlichen Gründen nicht vollständig aufgeklärt werden.

δ_{C} [ppm]		δ_{C} [ppm]		δ_{C} [ppm]	
C-1	78.2	C-10	31.2	1'-CH ₃	15.0
C-2	30.9	C-11	41.6	C-1''	119.1
C-3	123.3	C-12	34.3	C-2''	137.0
C-4	135.7	C-13	83.9	C-3''	121.4
C-5	53.1	4-CH ₃	13.7	C-4''	141.3
C-6	126.3	10-CH ₃	22.2	C-5''	27.9
C-7	125.9	12-CH ₃	14.1	C-6''	35.3
C-8	38.4	C-1'	?	5''-CH ₃	20.1
C-9	43.0	C-2'	206.3		

Tab. 11: ^{13}C -chemische Verschiebungen der Aglykon-Partialstruktur von Substanz 2561-1 (**56**) (150.8 MHz, CDCl_3).

δ_{H} [ppm]		δ_{H} [ppm]		δ_{H} [ppm]	
1-H	4.18	9-H	2.00	12-CH ₃	1.11
2-H ₂	2.25, 2.36	10-H	1.60	1'-CH ₃	1.62
3-H	5.17	11-H ₂	1.51, 1.62	1''-H	5.14
5-H	3.48	12-H	2.21	3''-H	5.52
6-H	5.38	13-H	3.42	5''-H	2.69
7-H	5.73	4-CH ₃	1.32	6''-H ₂	1.85, 2.40
8-H	2.10	10-CH ₃	0.65	5''-CH ₃	1.33

Tab. 12: ^1H -chemische Verschiebungen der Aglykon-Partialstruktur von Substanz 2561-1 (**56**) (600 MHz, CDCl_3).

4 Borrelidin

4.1 Allgemeines

Das Makrolid Borrelidin (**15**) wurde aufgrund seiner antibakteriellen Aktivität gegen verschiedene *Borrelia*-Arten 1949 von BERGER *et al.* entdeckt.¹⁷⁰ Erste Untersuchungen zur Struktur des Moleküls gelangen 1965,¹⁷¹ kurze Zeit später erfolgte die vollständige Strukturaufklärung.¹⁷² Neben einem nicht glykosylierten C₁₈-Ring besitzt das Polyketid eine in Naturstoffen seltene Nitrilgruppe¹⁷³ und eine einzigartige *trans*-1,2-Cyclopentandicarbonsäure (CPDA).

Der antibakteriellen Wirkung von **15**¹⁷⁴ liegt eine selektive Inhibierung der Threonyl-tRNA-Synthetase zugrunde.¹⁷⁵ Die insgesamt 20 bekannten Aminoacyl-tRNA-Synthetasen¹⁷⁶, sind bei Pro- und Eukaryonten ausreichend differenziert, um einen selektiven Angriff auf diese bakteriellen Enzyme zu ermöglichen. Sie sind aufgrund ihrer universellen Verbreitung zudem als hervorragende Targets für Breitspektrumantibiotika geeignet. Ein weiterer Vorteil ihrer Inhibierung ist die Blockade eines in nahezu allen Bakterien vollständig vorhandenen Biosyntheseweges über 20 einzelne Targets, welche unabhängig voneinander angegriffen werden können.¹⁷⁷ Das erste Antibiotikum dieser Art im klinischen Einsatz ist der Isoleucyl-tRNA-Synthetaseinhibitor Mupirocin,¹⁷⁸ der gute Aktivitäten gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) aufweist.¹⁷⁹ Der breite klinische Einsatz hat jedoch, wie bei vielen anderen Antibiotika zuvor, zu ersten Resistenzen geführt.¹⁸⁰

Die wohl interessanteste Aktivität von **15** ist die Fähigkeit, die Angiogenese und Proliferation von Zellen zu inhibieren.¹⁸¹ Die Blutgefäßbildung wird durch eine beim Tumorwachstum häufig auftretende Hypoxie stimuliert und ist somit für die Krebstherapie ein aussichtreiches Target. Der Vorteil ist hierbei das Vermeiden von Resistenzen, da Zellzyklen im Wirt und nicht in der Tumorzelle inhibiert werden.¹⁸² Lange Zeit wurde angenommen, dass die Angiogenese-inhibierende Wirkung von **15** wie die antibakterielle Wirkung auf die Thr-tRNA-Inhibierung zurückzuführen ist. Jüngste Untersuchungen zeigen jedoch, dass das Makrolid **15** auch bei Zusatz von hohen Threoninkonzentrationen nur einen geringen Teil seiner Aktivität verliert. Es konnte gezeigt werden, dass **15** zusätzlich die Proteasen Caspase-3 und -8 aktiviert und somit den programmierten Zelltod, die Apoptose, auslöst.¹⁸³ Weitere biologische Aktivitäten des Naturstoffs **15** sind die Inhibierung der Cyclin-abhängigen Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, eine antivirale sowie eine antiplasmodiale Aktivität (s. auch Kap. 1.3).¹⁸⁴ Die umfassenden biologischen Aktivitäten von **15** zeigen, wie sinnvoll es ist, die evolutionäre Entwicklung von Naturstoffen als Basis für neue Wirkstoffe zu nutzen. Gleichwohl muss für das Makrolid **15** die Einschränkung gemacht werden, dass die Vielzahl an Aktivitäten den Einsatz als Wirkstoff in der Klinik aufgrund zu geringer Selektivität

verhindert. Allerdings können Substanzen dieser Art gut als Leitstrukturen in der Arzneimittelforschung Verwendung finden.

4.2 Die Biosynthese des Borrelidins

Makrolide wie das Borrelidin (**15**) werden durch modulare „Typ I“-Polyketidsynthasen (PKS I) aufgebaut. Nach dem Kolinearitätsprinzip katalysiert in diesen Enzymen jeweils ein Modul einen Kettenverlängerungsschritt und reduziert in direktem Anschluss („*in situ*“) die β -Keto-gegebenenfalls zur Hydroxygruppe, die weiter modifiziert werden kann. Die Bausteine eines PKS I-Polyketids sind Acetat oder Propionat, welche aus Malonat oder Methylmalonat hervorgehen.¹⁸⁵ Auf einem PKS-I-Biosynthesegencluster eines Bakteriums befinden sich im Einklang mit dieser Theorie gerade so viele Gene wie für die Kettenverlängerung notwendig sind.

Das Polyketid **15** wird von *Streptomyces parvulus* Tü 4055 wahrscheinlich aus drei Acetat- und fünf Propionateinheiten aufgebaut, welche an die Startereinheit (*trans*-1,2-Cyclopentandicarbonsäure, s.u.) kondensiert werden. Hiernach müssten also die Gene für eine ‚loading domain‘ und für acht Module zur Kettenverlängerung bereitstehen. LEADLAY und SALAS *et al.* konnten jedoch zeigen, dass im Gencluster *bor*PKS lediglich die Information für sechs Module vorhanden ist.¹⁸⁶ Insgesamt sind im Cluster die PKS-Gene *borA1*–*6* zu finden, wobei die Expression von *borA3* zu dem Enzym BorA3 führt, welches aus zwei Modulen besteht (s. Abb. 28, S. 90).¹⁸⁷ BorA5 weist hingegen nur ein Modul auf, welches aber drei Kettenverlängerungsschritte katalysiert.

Ein ähnliches Prinzip wird für den Lankacidin-Produzenten *Streptomyces rochei* erwartet, dessen Gencluster nur fünf anstatt der erwarteten acht Kettenverlängerungsmodule trägt.¹⁸⁸

Das dritte Beispiel dieser Art ist der Stigmatellin-Gencluster aus *Stigmatella aurantiaca*, welcher nur neun Module für eine Undecaketidproduktion aufweist.¹⁸⁹ Diese drei, in mindestens einem Modul iterativ arbeitenden PKS I-Cluster, sind die ersten Beispiele ihrer Art. Dieser iterative Einsatz einzelner Module wurde bisher als evolutionäre Resteigenschaft bewertet, da sich bei einzelnen Makrolidbildnern Nebenprodukte entsprechender Art finden, z.B. zwei Oktaketide aus dem Erythronolid-Produzenten *Saccharopolyspora erythraea*.¹⁹⁰ Dieser Vorgang wird als „Stottern“ bezeichnet. Das Paradigma einer rein linear funktionierenden PKS I muss also aufgrund der beschriebenen Ausnahmen aufgehoben werden, was als weiteres Beispiel gelten kann, das im Sekundärstoffwechsel variable Wege existieren, um Strukturdiversität zu erreichen.

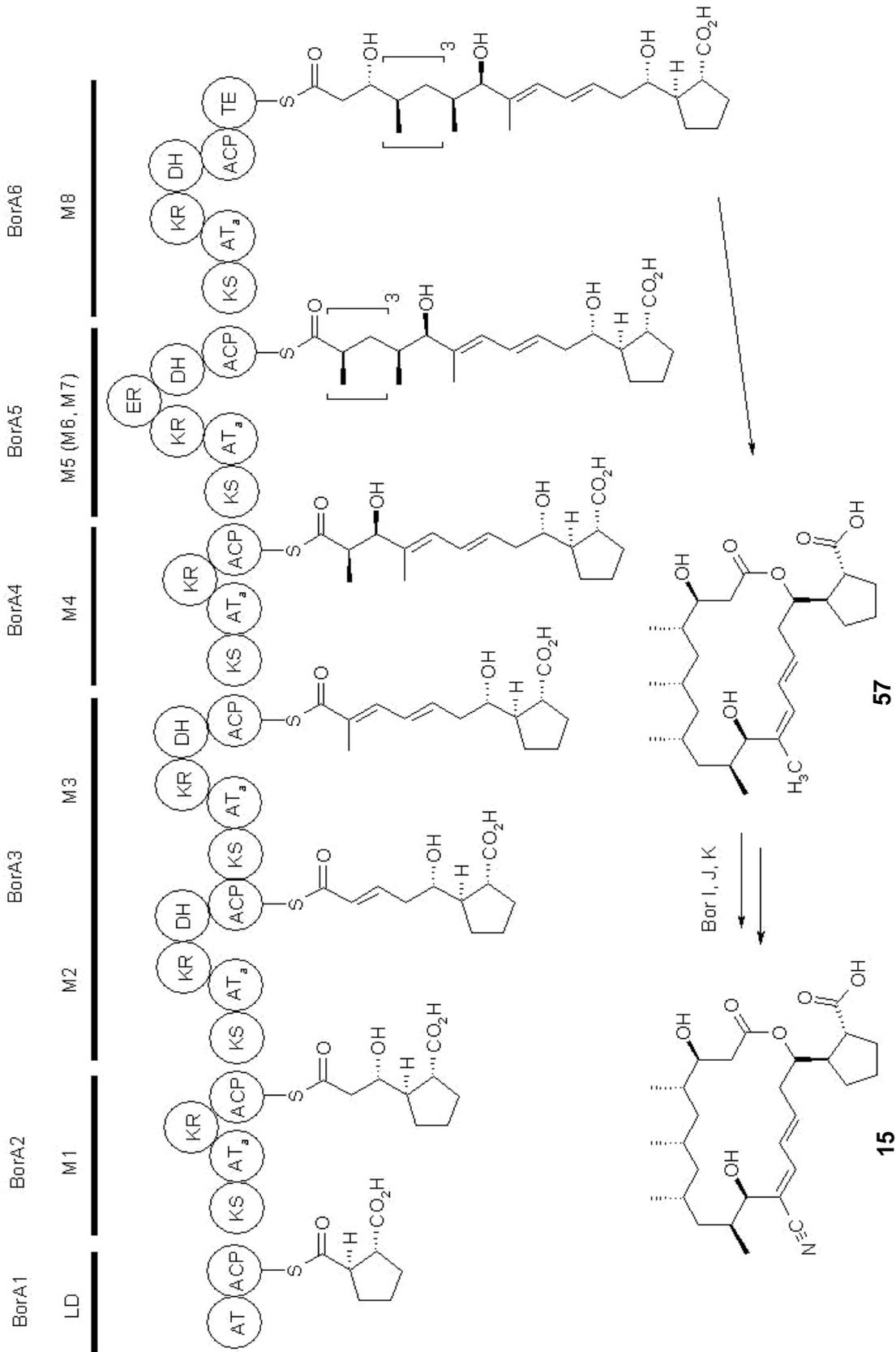


Abb. 28: Biosyntheschema des Borrelidins (15) nach Leadlay und Salas *et al.*¹⁸⁷

Obwohl über 120 Naturstoffe mit Nitrilgruppen aus zumeist pflanzlichen Quellen bekannt sind, ist ihre Biosynthese wenig untersucht. Als Vorläufer dieser ungewöhnlichen funktionellen Gruppe konnten bisher anorganisches Cyanid oder Aminosäuren identifiziert werden. Bei der Umwandlung von Aminosäuren bildet sich nach Hydroxylierung und Decarboxylierung ein Aldoxim, das unter Wasserabspaltung das Nitril liefert.^{173,191}

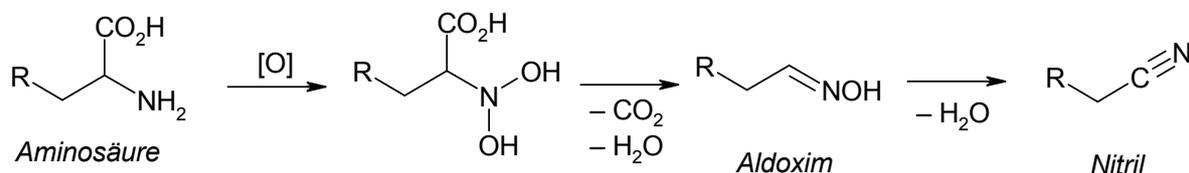


Abb. 29: Biosynthese von Nitrilen aus Aminosäuren.

Durch Analyse des Biosynthesegenclusters *Streptomyces parvulus* Tü 4055 und aus Fütterungsexperimenten mit uniform ¹³C-markiertem Propionat konnte für die Nitrilgruppe des Borrelidins die Herkunft des Kohlenstoffs aus Propionat bewiesen werden.¹⁹² Die Gene *borI*–*K* sind hierbei für die Transformation verantwortlich. Der knock-out von *borI* führt zur Bildung von 12-Desnitril-12-methylborrelidin (**57**), während die Kultivierung der Mutante ohne *borJ*-Gen die Produktion von 12-Desnitril-12-carboxylborrelidin (**58**) ergibt. Diese Beobachtungen führen zu dem in Abb. 30 dargestellten Mechanismus der Nitrilgruppen-Biosynthese. Die Dicarbonsäure **58** ist schon früher als Nebenprodukt aus Borrelidin-Produzenten isoliert worden.¹⁹³

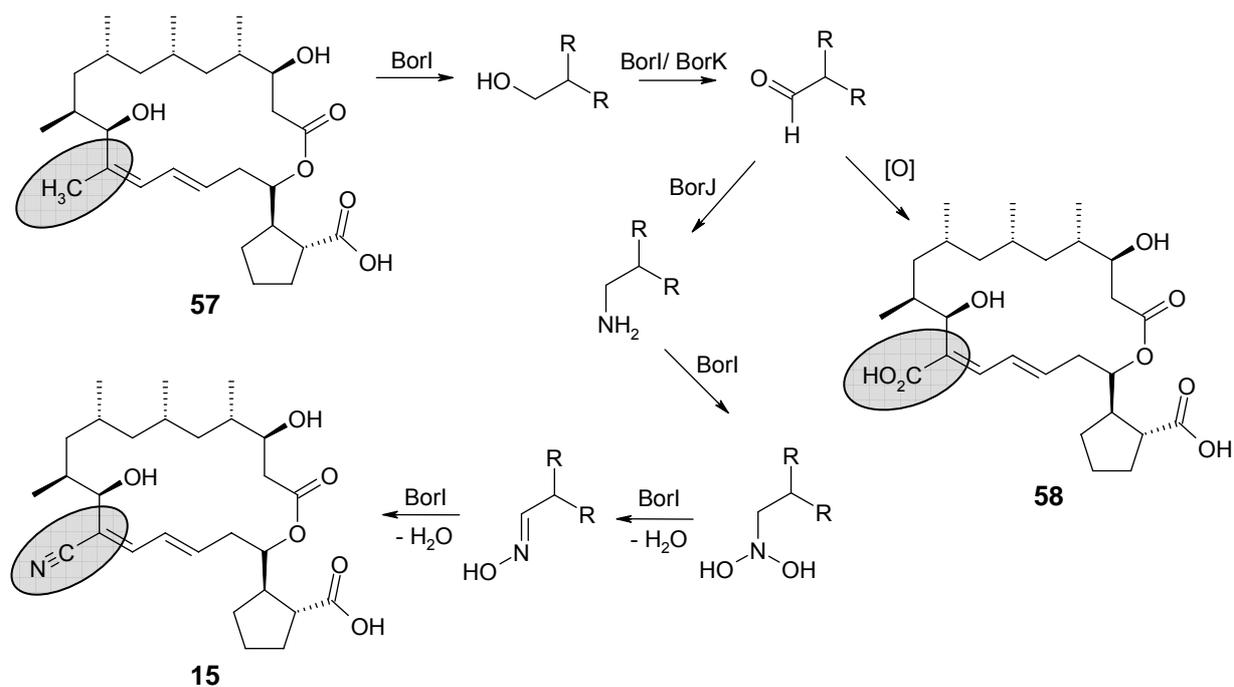


Abb. 30: Postulierter Mechanismus für die Biosynthese der Nitrilgruppe von Borrelidin (**15**).

Den Arbeitsgruppen von LEADLAY und SALAS gelang zudem die Zuordnung von insgesamt zehn Genen, deren Enzyme in die Biosynthese der Startereinheit involviert sind. Der Beweis wurde auch hier über knock-out Mutanten geführt, die nur unter Zusatz von *trans*-Cyclopentan-(1*R*,2*R*)-dicarbonsäure (CPDA) in der Lage waren, Borrelidin (**15**) zu produzieren. Vorläufer der CPDA wurden bisher nicht gefunden, aus Gen-Homologien ergaben sich Hinweise, dass mit 5-Oxo-pent-3-en-1,2,5-tricarbonsäure ein Produkt des Tyrosinkatabolismus¹⁹⁴ ein Ausgangspunkt sein könnte. Der entscheidende Schritt dieses Biosyntheseweges ist die Cyclisierung einer Pentan-1,5-dicarbonsäure. Dieser Schritt wird demnach durch das *borE*-Enzym katalysiert, welches Ähnlichkeit zur Chloromuconat Cycloisomerase aus *Bacillus subtilis* zeigt. Cycloisomerasen gehören zur Superfamilie der Enolasen, welche zur Stabilisierung eines Anions in α -Position einer Carboxylgruppe befähigt sind. Der potentielle Mechanismus für die CPDA-Biosynthese ist in Abb. 35 (S. 99) dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit sollten die genetischen Untersuchungen zur Biosynthese des Borrelidins (**15**) durch Fütterung isotoopenmarkierter Verbindungen verifiziert werden. Aufgrund höherer Ausbeuten wurden die Fütterungsexperimente mit dem zweiten in der Abteilung ZEECK vorhandenen Borrelidin-Produzenten, *Streptomyces* sp. S 1495, durchgeführt.

4.2.1 Fermentationskurve

Um Fütterungsexperimente optimal durchführen zu können, muss man den Zeitpunkt kennen, zu dem bei einer Kultivierung die Sekundärmetabolitenproduktion einsetzt. Nur so kann vermieden werden, dass ein gefütterter Vorläufer in den Primärstoffwechsel eingeht, was geringe Anreicherung im Sekundärstoff zur Folge hätte.

Zur Erstellung der Fermentationskurve wurden aus einem Kultivierungsansatz des Stammes S 1495 in Schüttelkulturen zu jeder 12. Stunde zwei Kolben entnommen, standardisiert aufgearbeitet und mit Hilfe der HPLC analysiert (s. Kap. B.4.1, S. 153). Durch Vergleich der Absorption der Proben bei 280 nm mit denen einer Eichkurve ergab sich die Ausbeute an Borrelidin (**15**), wie in Abb. 26 dargestellt. Die tatsächliche Ausbeute an **15** liegt aufgrund von Verlusten bei der Aufreinigung bei ca. 70 %.

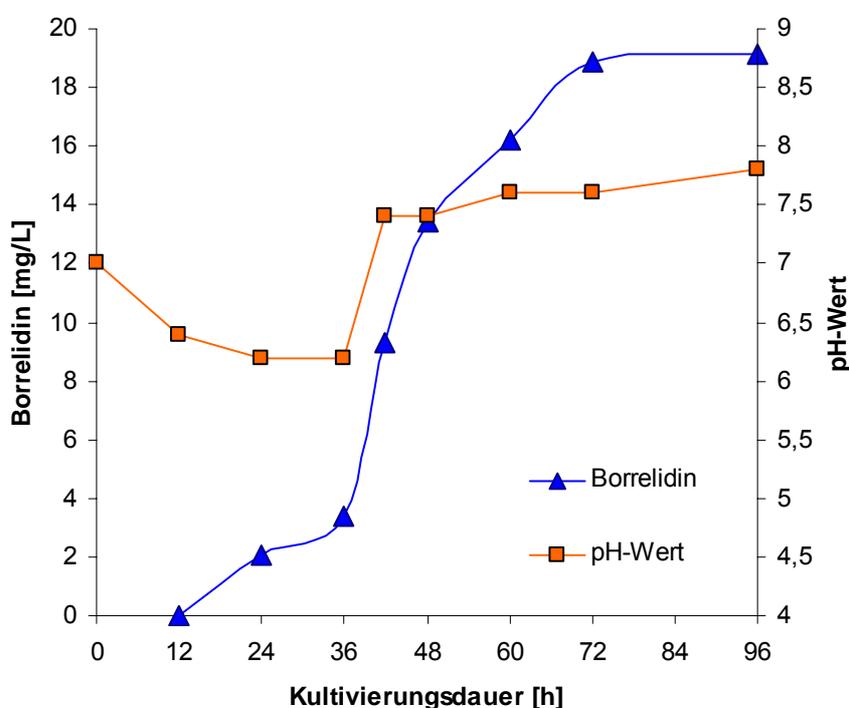


Abb. 31: Fermentationskurve von Borrelidin (**15**) aus *Streptomyces* sp. S 1495.

Die Kurve zeigt, dass die Biosynthese von **15** zwischen der 12. und 24. Stunde einsetzt und die Borrelidin-Konzentration nach der 36. Stunde stark ansteigt. Nach 72 Stunden ist das Produktionsmaximum erreicht, von der 96. bis zur 168. Stunde (nicht dargestellt) ist ein leichtes Absinken des Borrelidin-Gehaltes zu erkennen. Bemerkenswert ist die Beobachtung eines mit der Produktion von **15** nahezu zeitgleich einsetzenden pH-Anstiegs in der Kulturbrühe.

Die Fütterung markierter Verbindungen erfolgte dementsprechend zur 36., 42. und 48. Stunde der Kultivierung. Die Kulturen (1 L verteilt auf 10 Schüttelkolben) wurden nach 60 Stunden aufgearbeitet.

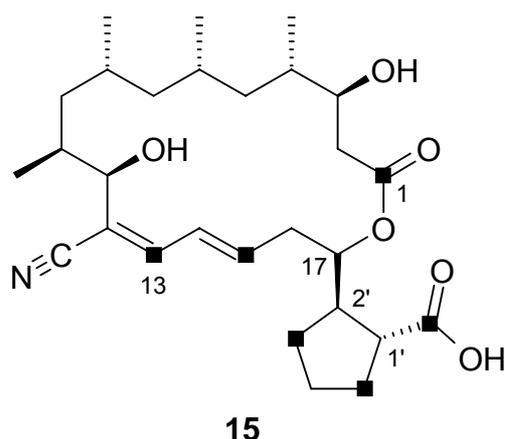
4.2.2 Fütterung von [1-¹³C]Acetat

Zur Überprüfung der in Kap. 4.2 vorgestellten Biosynthese von Borrelidin (**15**) wurde [1-¹³C]Acetat gefüttert. Nach der Aufarbeitung konnte mit 1.3 mg vergleichsweise wenig (Standardausbeute ca. 15 mg) **15** isoliert werden. Ein ¹³C-NMR Spektrum der Substanz zeigte leichte Intensitätserhöhungen für C-1, C-13, C-15, C-3', C-5' sowie 1'-COOH. Unter Berücksichtigung der natürlichen Häufigkeit des ¹³C-Isotops lassen sich die Anreicherung und der spezifische Einbau nach

$$\text{Anreicherung [\%]} = 1.1\% \times \frac{\text{Intensität des Signals der markierten Verbindung}}{\text{Intensität des Signals der unmarkierten Verbindung}} - 1.1\%$$

$$\text{spezifischer Einbau} = \frac{\text{Anreicherung [\%]} \times 100}{\text{Anreicherung des Vorläufers [\%]}} \text{ bestimmen.}$$

Ein Einbau gilt als erfolgreich, wenn die Signalintensität verdoppelt und der spezifische Einbau somit größer eins ist. Für die [1-¹³C]Acetat-Fütterung sind die Einbauraten in Tab. 13, bei Referenzierung auf den Mittelwert der C-4, C-6 und C-8 Methylgruppen wiedergegeben. Die Polyketid-Biosynthese lässt sich durch den Einbau an C-1, C-13 und C-15 bestätigen, auffällig ist jedoch, dass auch die Startereinheit Markierungen aufweist. Während 1'-COOH eine Anreicherung wie die Acetateinheiten des Rings zeigt, entspricht diese für C-3' und C-5' nur etwa der Hälfte. Diese Beobachtung könnte für ein symmetrisches Intermediat in der Biosynthese der Startereinheit sprechen. Eine Tabelle mit den Einbauraten aller Kohlenstoffe ist in Kap. B.4.2 (Tab. 21, S. 154) zu finden.

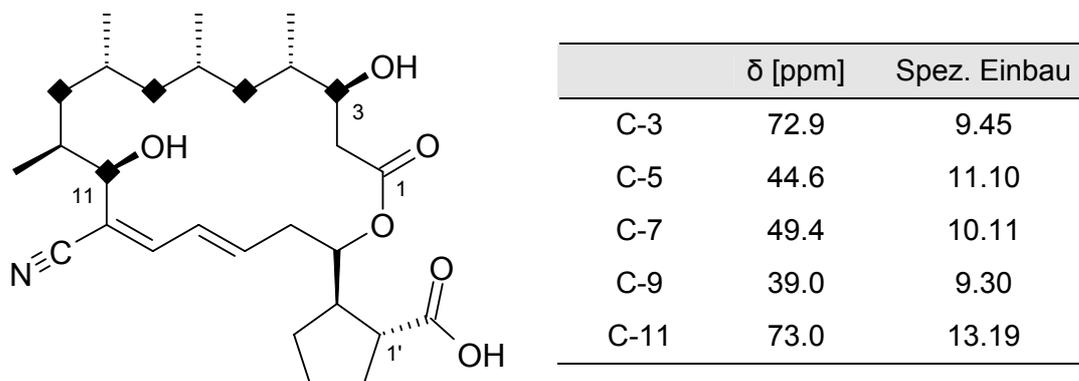


	δ [ppm]	Spez. Einbau
C-1	173.2	2.39
C-13	145.5	2.39
C-15	140.2	2.31
C-3'	30.5	1.22
C-5'	32.5	1.09
1'-COOH	180.7	2.13

Tab. 13: Spezifische Einbauraten in Borrelidin (**15**) für markierte Kohlenstoffatome nach [1-¹³C]Acetat-Fütterung.

4.2.3 Fütterung von [1-¹³C]Propionat

Nach Fütterung von [1-¹³C]Propionat unter Standardbedingungen konnten 6.6 mg Borrelidin (**15**) isoliert werden. Ein ¹³C-NMR-Spektrum zeigt mit 9.3–13.2 hohe spezifische Einbauraten für C-3, C-5, C-7, C-9 sowie C-11. Dieser Einbau bestätigt somit die Biosynthese des Rings wie von SALAS und LEADLAY vorausgesagt.



Tab. 14: Spezifische Einbauraten für markierte Kohlenstoffatome in Borrelidin (**15**) nach [1-¹³C]Propionat-Fütterung.

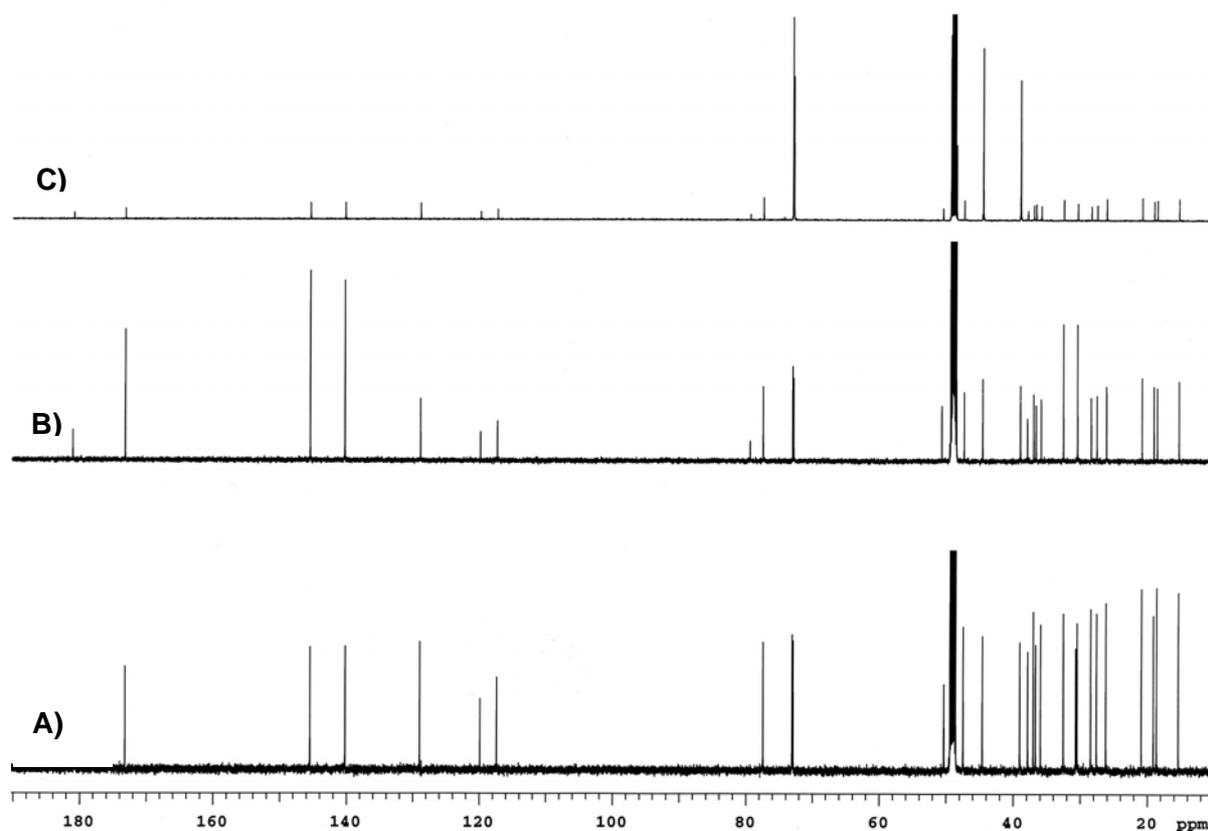


Abb. 32: ¹³C-NMR-Spektren (150.8 MHz, CD₃OD) von **15** aus verschiedenen Fütterungen: A) Referenz, B) [1-¹³C]Acetat, C) [1-¹³C]Propionat.

4.2.4 Fütterung von [1,2-¹³C₂]Acetat

Nach dem erfolgreichen Einbau von [1-¹³C]Acetat dient die Fütterung der doppelt markierten Substanz der Bestimmung intakter Acetateinheiten. Nach Fütterung von [1,2-¹³C]Acetat wurden 15 mg Borrelidin (**15**) erhalten. Im ¹³C-Spektrum sind für alle Kohlenstoffatome Kopplungen zu erkennen, welche für Anreicherungen benachbarter Kohlenstoffatome sprechen. Hierbei muss zwischen statistischen Kopplungen und solchen eines intakten Einbaus des doppelt markierten Vorläufers unterschieden werden. Im ersten Fall entstehen verglichen zu einer intakten Acetateinheit Dubletts weit geringerer Intensität. Ein Beispiel hierfür ist die Propionateinheit C-5/ C-6/ 6-CH₃. Die Methylgruppe zeigt eine Kopplung zu C-6, welches seinerseits noch zur Methylengruppe koppelt. Dieses Kopplungsmuster spricht aufgrund seiner Intensität für einen Einbau des Acetats in die Propionateinheiten nachdem es im Citratcyclus metabolisiert wurde.

Für alle Kohlenstoffatome der Startereinheit von **15** sind Kopplungen zu beobachten, welche leicht höhere Intensitäten als die statistischen Kopplungen der Propionateinheiten aufweisen. Für C-3', C-4' und C-5' ist hierbei der stärkste Einbau zu erkennen. Da C-3' und C-5' wie bei Fütterung von [1-¹³C]Acetat ca. die Hälfte an Intensitätserhöhung des Dubletts verglichen mit den Acetateinheiten des Rings aufweisen, ist ein symmetrisches Intermediat in der Biosynthese von **15** wahrscheinlich. Ob jedoch intakte Acetateinheiten (C-4'/C-5' bzw. C-4'/C-3') vorhanden sind, lässt sich, wie auch für die übrigen C-Atome des Cyclopentanrings, nicht abschließend beweisen (Abb. 34, S. 97).

4.2.5 Fütterung von [U-¹³C₃]Glycerin

Die Anreicherungen der C-3'/C-4'/C-5'-Kohlenstoffatome aus den in Kap. 4.2.2 und 4.2.4 beschriebenen Experimenten sprechen für ein symmetrisches Intermediat oder den Einbau von Acetat in Glycerin, welches dort bei Fütterung von [1-¹³C]Acetat eine 1,3-¹³C₂-Markierung hervorrufen würde. Die Fütterung von [U-¹³C₃]Glycerin ergab einen Einbau in die Acetateinheiten des Rings wie auch in alle Kohlenstoffatome der Startereinheit. Bemerkenswert ist die Markierung von C-17 und C-2', welche hier deutlich ausgeprägter als bei Fütterung von [1,2-¹³C₂]Acetat ist. Das Scrambling war im Vergleich zur Fütterung von doppelt markiertem Acetat geringer ausgeprägt. Wie in Abb. 34 (S. 97) dargestellt, kann davon ausgegangen werden, dass C₂-Einheiten aus Glycerin in die Startereinheit eingebaut werden (C-17/C-2' und C-1'/1'-COOH). Die Signale von C-3'/C-5' weisen im Vergleich mit den anderen Resonanzen eine leichte Verbreiterung auf. Ob dies für eine ²J-Fernkopplung und somit für den Einbau einer intakten Glycerineinheit spricht konnte nicht geklärt werden.

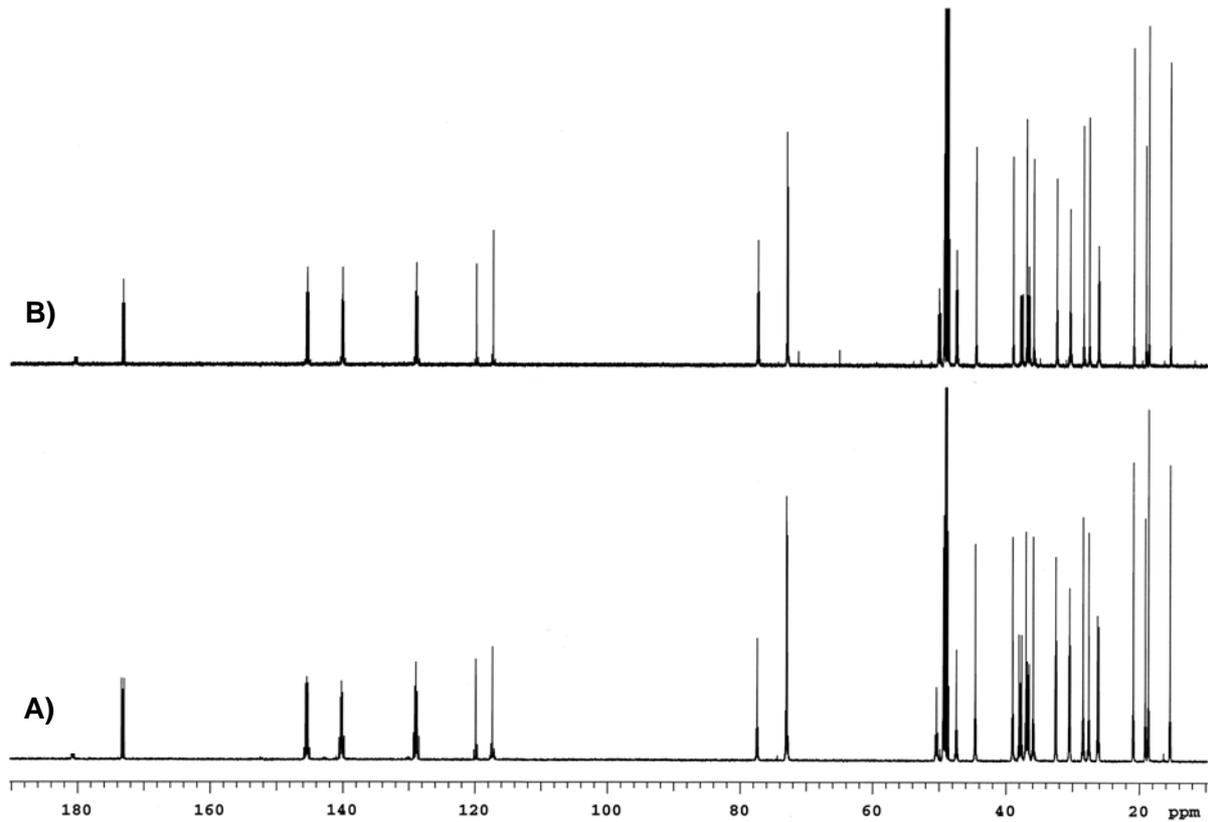


Abb. 33: ^{13}C -NMR-Spektren von Borrelidin (**15**) (150.8 MHz, CDCl_3): **A**) Fütterung von [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Acetat und **B**) [U- $^{13}\text{C}_3$]Glycerin.

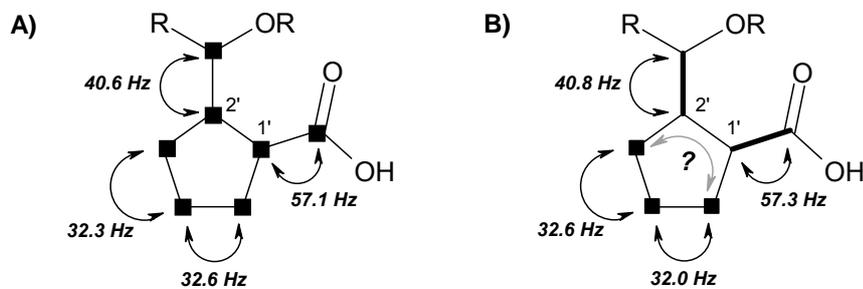
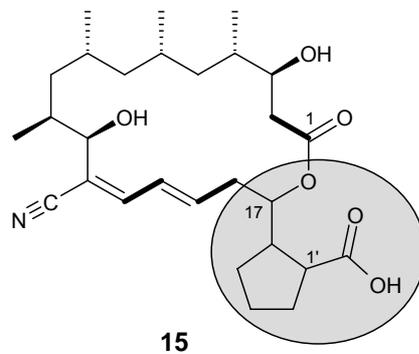


Abb. 34: Einbaumuster von [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Acetat (**A**) und [U- $^{13}\text{C}_3$]Glycerin (**B**) in **15**.

4.2.6 Fütterung von [2-¹³C]Acetat

Mit der Fütterung von [2-¹³C]Acetat sollte überprüft werden, ob die bisher nicht eindeutig bestimmten Kohlenstoffe der Dicarbonsäureinheit (C-17, C-1', C-2' und C-4') aus Acetat hervorgehen. Das Kohlenstoffspektrum des so gewonnenen Borrelidins (**15**) zeigt ein starkes Scrambling mit statistischen Kopplungen für *alle* Kohlenstoffatome, was für eine schnelle Metabolisierung des Vorläufers im Citratcyclus spricht (für eine statistische Kopplung in einer Propionateinheit muss dieser zweimal durchlaufen werden). Aufgrund dieses Effektes ist eine Bestimmung der Anreicherung einzelner Atome nicht möglich. Eine Wiederholung des Experiments mit niedrigerer Konzentration des Vorläufers konnte bis zum Abschluss der Dissertation aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

4.2.7 Fütterung von [2,3,5,6-d₄]-, [1-¹³C]Tyrosin und d₃-Acetat

Um die Tyrosinhypothese für die Bildung der CPDA (**59**) zu überprüfen, wurden in weiteren Experimenten [2,3,5,6-d₄]- und [1-¹³C]Tyrosin gefüttert. Weiterhin wurde eine Kultivierung unter Zugabe von d₃-Acetat durchgeführt, um den Einbau von Acetat in **59** verifizieren zu können. Bei der Fütterung von [1-¹³C]Tyrosin zeigt das isolierte **15** keine Markierung (wie auch beim Tyrosinkatabolismus zu erwarten). Unter Verwendung der deuterierten Vorläufer zeigen die Protonenspektren von **15** bei keinem Signal eine Intensitätserniedrigung, was bei einem erfolgreichen Einbau zu erwarten gewesen wäre. Dieses Ergebnis ist jedoch nicht hinreichend aussagekräftig, weil beim pH-Wert der Kulturlösung am Ende des Experiments (pH = 7.8) ein Protonenaustausch möglich ist.

4.2.8 Diskussion der Biosynthese

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die von LEADLAY und SALAS nach genetischen Experimenten vorausgesagte Biosynthese des Makrolidrings von **15**. Der von den gleichen Autoren postulierte Mechanismus für die Biosynthese der *trans*-Cyclopentan-(1*R*,2*R*)-dicarbonsäure (CPDA, **59**) muss jedoch nach den vorliegenden Ergebnissen in Frage gestellt werden. Wie in Abb. 35 (S. 99) gezeigt, kann Acetat über den Citratcyclus über Bernsteinsäure (**60**) und Phosphoenolpyruvat (**61**) in den Shikimatweg [Shikimisäure (**62**), Chorisminsäure (**63**)] eingebracht werden. Dies führt zu einem Einbau von [1-¹³C]Acetat in Tyrosin (**64**) an C-1. Die anschließende Decarboxylierung zu 4-Hydroxyphenylessigsäure (**65**) hätte einen Totalverlust der Markierung zur Folge. Die zweite Möglichkeit eines Einbaus von Acetat kann hypothetisch über eine Markierung von Erythrose (**66**) erfolgen. Hierbei muss Acetat über mehrere Stufen in Glycerin überführt werden, welches anschließend über

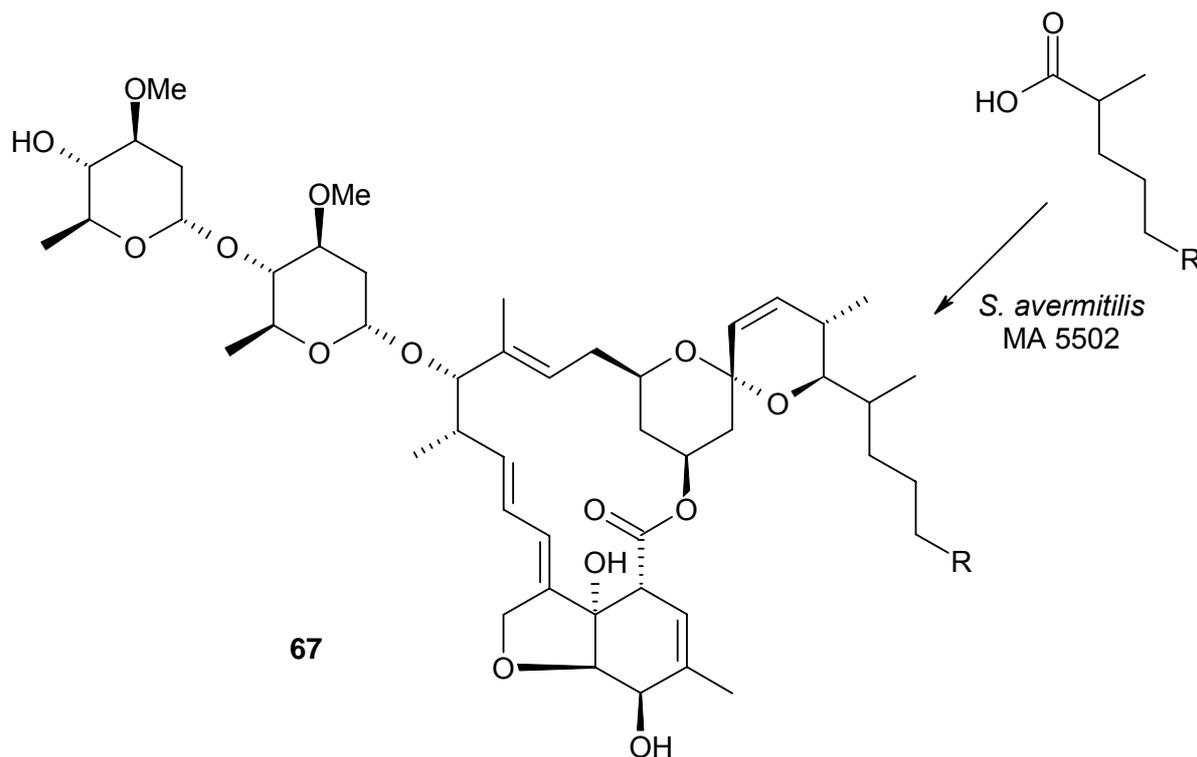
4.3 Vorläufer-dirigierte Biosynthese am Borrelidin

4.3.1 Allgemeines

Während für die Kettenverlängerungsschritte in der Biosynthese von Polyketiden mit Acetat und Propionat lediglich zwei verschiedene Bausteine zur Verfügung stehen, existiert eine wesentlich größere Substratbreite zu Beginn der Biosynthese. Einige unter vielen Beispielen ungewöhnlicher Startereinheiten sind Isovalerat im PKS/NRPS-Hybrid¹⁹⁵ Myxothiazol¹⁹⁶, Cyclohexancarboxylat in Asukamycin¹⁹⁷ und Phoslactomycin B¹⁹⁸ oder Benzoat in Soraphen A¹⁹⁹. Wie in den vorangehenden Kapiteln beschrieben gehört auch Borrelidin (**15**), mit der als Startereinheit einmaligen *trans*-1,2-Cyclopentandicarbonsäure (**59**) in die Gruppe von Polyketiden, deren Biosynthese mit einem ungewöhnlichen Baustein beginnt.

Bei der Vorläufer-dirigierten Biosynthese von Polyketiden lassen sich ungewöhnliche Startereinheiten nutzen, die anstelle der natürlichen in die Substanz eingebaut werden. Im Vergleich mit der Vorläufer-dirigierten Biosynthese an Peptiden (s. Kap. 2.2, S. 17) muss die zugefütterte Einheit von einer größeren Zahl an Enzymen toleriert werden. So ist eine Aktivierung von freien Carbonsäuren durch eine Coenzym A-Ligase nötig, weiterhin kann eine geringe Membranpermeabilität verhindern, dass der Vorläufer den Ort der Biosynthese überhaupt erreicht.⁸¹ Trotzdem gelingt in einer Vielzahl von Fällen die Derivatisierung von Naturstoffen durch die Zufütterung potentieller Startereinheiten. So konnten durch Fütterungsexperimente mit dem Produzenten des Avermectins (**67**) (*Streptomyces avermitilis* MA 5502) die stark antihelminthisch und insektizid wirksamen 2-Pentyl- und 2-Hexylavermectine²⁰⁰ gewonnen werden.²⁰¹ Eine noch breitere Substrattoleranz der loading domain der Avermectin-PKS wurde durch Verwendung der Mutasynthese verifiziert, wobei die Produktion von insgesamt 140 neuen Avermectinen mit 35 verschiedenen Startereinheiten gelang.²⁰² Neben offenkettigen werden auch cyclische (aliphatische und olefinische) Vorläufer, welche teilweise Heteroatome tragen, eingebaut.²⁰³ Eine ähnlich große Substrattoleranz konnte auch für die loading domain der Erythromycin-PKS nachgewiesen werden.²⁰⁴

Da von LEADLAY und SALAS¹⁸⁶ für die Borrelidin loading domain große Ähnlichkeiten zu denen von **67** und des Erythromycins gezeigt werden konnten, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Substrattoleranz von *Streptomyces* sp. S 1495 gegenüber unnatürlichen Startereinheiten getestet werden.



4.3.2 Vorläufer-dirigierte Biosynthese an *Streptomyces* sp. S 1495

Die Kultivierungen wurden in 2 x 100 mL Schüttelkulturen unter Standardbedingungen (s. Kap. B.4.3, S. 155) durchgeführt. Für die Fütterungen wurden die Vorläufer in sterilem Wasser unter Zusatz von Natronlauge gelöst und zur 36., 42. und 48. Stunde, bis zu einer Endkonzentration von 2 mmol/L zugesetzt. Nach 60 Stunden wurden die Kulturbrühen ohne Trennung in Kulturfiltrat und Mycel aufgearbeitet und HPLC-MS analytisch untersucht.

Bei den Fütterungsversuchen mit insgesamt 36 Vorläufern wurden neben Cyclohexancarbonsäure verschiedene Benzoesäuren, Stickstoff-, Sauerstoff- und Schwefelheterocyclen, sowie offenkettige Substanzen gefüttert (s. Tab. 15, S. 102). Die Untersuchung an der HPLC-MS erbrachte keine Hinweise auf neue Metaboliten mit der jeweils erwarteten Masse, wodurch ein Einbau in das Borrelidin (**15**) bewiesen wäre. Zusätzlich wurden die Extrakte HPLC analytisch untersucht, um auch neue Metaboliten mit schlechten Ionisierungseigenschaften detektieren zu können. Einzig bei der Fütterung von 4-Amino-2-hydroxybenzoesäure war ein neuer Metabolit nachweisbar. Die Substanz besitzt ein ähnliches UV-Spektrum wie der Vorläufer und konnte durch eine Masse von $m/z = 166$ $[M-H]^-$ sowie ein Protonenspektrum als 4-Amino-2-hydroxybenzoesäuremethylester identifiziert werden.

Pipecolinsäure	2,6-Pyridinium-dicarbonsäureoxid	4-Amino-2-hydroxybenzoesäure	3-Amino-2-methylbenzoesäure
2-Picolinsäure	Adipinsäure	1,3,5-Benzoltricarbonsäure	3-Amino-4-methylbenzoesäure
2-Furan-carbonsäure	<i>trans</i> -Aconitsäure	2-Brombenzoesäure	3,5-Diaminobenzoessäure
3-Furan-carbonsäure	Octan-dicarbonsäure	Phthalsäure	3,4-Diaminobenzoessäure
2-Thiophen-carbonsäure	Malonsäure	Benzoessäure	5-Amino-2-nitrobenzoessäure
2,6-Pyridin-dicarbonsäure	2,4-Dihydroxypyrimidin-6-carbonsäure	4-Aminobenzoessäure	5-Amino-2-hydroxybenzoessäure
2-Tetrahydrofuran-carbonsäure	Cyclohexan-carbonsäure	3-Aminobenzoessäure	3-Amino-4-hydroxybenzoessäure
Salicylsäure	4-Amino-2-hydroxybenzoessäure	5-Aminoisophthalsäure	4-Fluor-3-nitrobenzoessäure
Acetylsalicylsäure	3-Amino-4-chlorbenzoessäure	2-Methyl-3,5-dinitrobenzoessäure	4-Hydroxy-3-nitrobenzoessäure

Tab. 15: Bei der Vorläufer-dirigierten Biosynthese an *Streptomyces* sp. S 1495 gefütterte Vorläufer.

4.3.3 Diskussion

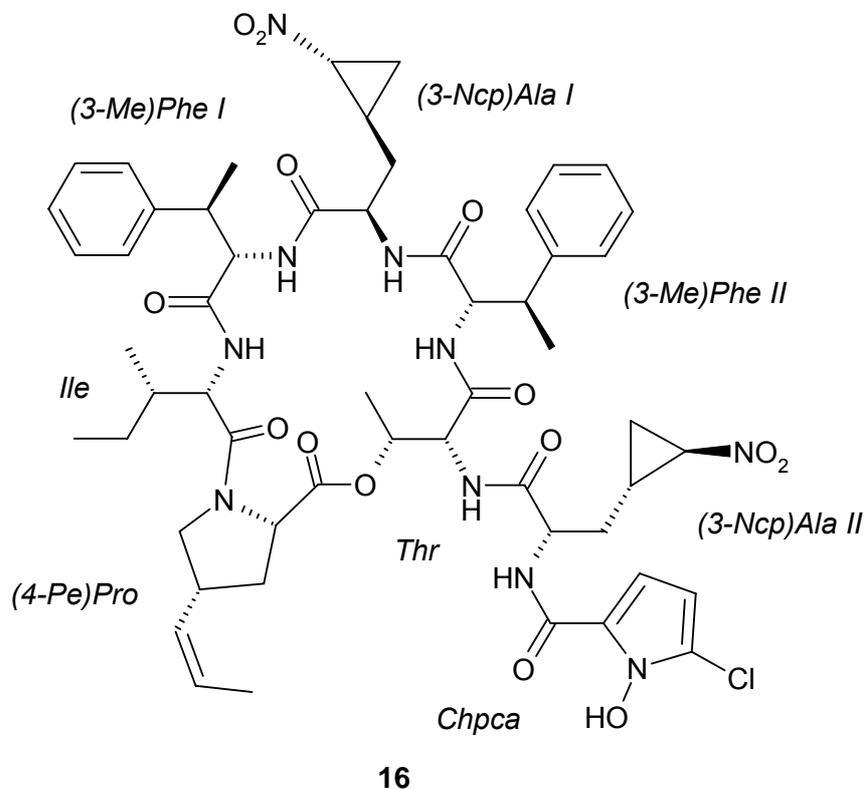
Obwohl eine große Substrattoleranz der Borrelidin-PKS loading domain postuliert wurde, tauchten bei den Fütterungen mit verschiedenen Carbonsäuren (s. Tab. 15) keine neuen Metaboliten auf. Ob die mangelnde Spezifität des Enzyms bei der Bindung der Startereinheit für den Misserfolg verantwortlich ist, muss offen bleiben. Dass die gefütterten Carbonsäuren nicht eingebaut wurden, könnte in zu geringer Membrangängigkeit oder mangelnder Substratflexibilität der Coenzym A-Ligase begründet sein. Dieses Problem kann eventuell durch eine Aktivierung der Substrate als *N*-Acetylcysteaminthioester umgangen werden.²⁰⁵

5 Zusammenfassung der Ergebnisse

5.1 Untersuchungen am Hormaomycin-Produzenten *Streptomyces griseoflavus* (Stamm W 384)

Produktionsoptimierung

Durch Fütterung von 2-Pyrrolcarbonsäure zu 1 L-Kulturen von *Streptomyces griseoflavus* (Stamm W 384) wurde die Ausbeute an Hormaomycin (**16**) von 15 bis auf 45 mg/L gesteigert. Ein Scale-up unter Verwendung von größeren Fermentern (5–50 L) war nicht möglich.



Vorläufer-dirigierte Biosynthese

Variation der 3-(2'-Nitrocyclopropyl)alanin [(3-Ncp)Ala]-Einheiten

1. Nach Fütterung von L-5-Nitronorvalin und *rac*-5-Nitronorvalin konnten die neuen Hormaomycine D₁₋₃ (**21a-c**) isoliert werden. Die Ausbeute an isolierten Derivaten war nicht proportional zur Konzentration des gefütterten Vorläufers. Die Derivate **21a-c** enthalten D-5-Nitronorvalin in der Ringeinheit. Durch Fütterung enantiomerenreinen D-5-Nitronorvalins sank die Ausbeute von **16** auf 5 mg/L, ein Einbau fand nicht statt.
2. Der erwartete Einbau von 2-(2'-Nitrocyclopropyl)glycin [(2-Ncp)Gly] anstelle von (3-Ncp)Ala in **16** war nach Fütterung von L-Ornithin im Rohextrakt der Kulturlösung durch

ESI-MS nachweisbar. Eine Isolierung des neuen Derivates gelang wegen seines geringen Gehalts nicht.

3. Die Fütterung von (2-Ncp)Gly ergab keinen Einbau der intakten Aminosäure in das Peptidlacton. Stattdessen entstanden die Derivate **21a–c**. Für die Ringöffnung des (2-Ncp)Gly zum 5-Nitronorvalin konnte ein Mechanismus postuliert werden.
4. Bei Fermentationen unter Zugabe von L-6-Nitronorleucin und *rac*-6-Nitronorleucin entstanden die neuen Hormaomycine E_{1–3} (**26a–c**). Durch HR-ESI-MSⁿ konnte ein Fragmentierungsschema gewonnen werden, was die aus NMR-Spektren abgeleiteten Strukturen zusätzlich stützt. Die Fütterung des D-Epimers der nichtproteinogenen Aminosäure führt neben einem Absinken der Hormaomycin-Produktion (3 mg/L) zu keinem der neuen Derivate.
5. L-5-Nitro-4-thianorvalin und L-*ortho*-Nitrophenylalanin werden von der Hormaomycin-Synthetase nicht akzeptiert. In beiden Fütterungsexperimenten sinkt die Ausbeute des Naturstoffs **16** unter die der Standardfermentation ohne Zugaben.

Variation der β -Methylphenylalanin [(β Me)Phe]-Einheiten

1. Nach Fütterung von *ortho*- und *meta*-Fluorphenylalanin konnte Hormaomycin (**16**) im Gemisch mit den fluorierten Hormaomycinen F_{1–3} (**30a–c**) bzw. G_{1–3} (**31a–c**) isoliert werden.
2. Durch Zugabe von *para*-Fluorphenylalanin zu *Streptomyces griseoflavus* (Stamm W 384) konnten neben den mono-Fluorhormaomycinen H_{1,2} (**32a,b**) die Monodesmethylhormaomycine J_{1,2} (**33a,b**) gewonnen werden.
3. Fütterungen von *para*-Chlor- und *para*-Bromphenylalanin ergaben neben **33a,b** das Didesmethylhormaomycin J₃ (**33c**) in unterschiedlichen Ausbeuten. Während bei Zusatz von *para*-Nitrophenylalanin **33a,b** zu beobachten waren, führte die Fütterung von Tyrosin ausschließlich zur Produktion des Naturstoffs **16**.
4. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die (β Me)Phe-Domänen der Hormaomycin-NRPS Phenylglycin nicht als Substrat akzeptieren.

Variation der 5-Chlor-N-hydroxypyrrol-2-carbonsäure (Chpca)-Einheit

1. Nach Fütterungen von Furan-, Tetrahydrofuran-, Pyrrol- und Thiophen-2-carbonsäure sowie Picolin-, Pipecolin- und 3-Chlorsalicylsäure konnte immer nur **16** gewonnen werden.
2. Die Zugabe von Pyrrol-2-carbonsäure führte zu einem starken Produktionsanstieg von **16**. Bei Zusatz von 2 mmol/L betrug die Ausbeute bis zu 45 mg/L (ca. 300 %), bei 1 mmol/L 21 mg/L (ca. 150 %). Eine Erhöhung der Konzentration bis zu 8 mmol/L ergab keinen weiteren Produktionsanstieg.

Die Biosynthese des Hormaomycins

1. Die Ergebnisse der Vorläufer-dirigierten Biosynthese zeigen:
 - a) 6-Nitronorleucin als Intermediat sowie eine externe Epimerase können für die Biosynthese von (3-Ncp)Ala ausgeschlossen werden;
 - b) die Methyltransferase in der (β Me)Phe-Biosynthese kann durch *para*-halogenierte und nitrierte Phenylalanine inhibiert werden;
 - c) Pyrrol-2-carbonsäure ist ein Intermediat der Chpca-Biosynthese. Ihre Verfügbarkeit bestimmt die Ausbeute an **16**.
2. Beim HPLC-MS-Screening von Extrakten der Mutanten *E. coli* pKZ72 und pKZ73, in welchen die Biosynthesegene *hrmS* und *hrml*, *hrmJ* exprimiert wurden, konnten weder (β Me)Phe noch (3-Ncp)Ala nachgewiesen werden. Somit fehlt weiterhin der endgültige Beweis, dass der Hormaomycin-Biosynthesegencluster gefunden wurde (AK PIEL, Universität Bonn).

Die Struktur des Hormaomycins

1. Nach der Gewinnung von Hormaomycin (**16**) in gut aufgereinigter Form gelang der Arbeitsgruppe SHELDRIK die Kristallisation und eine Röntgenstrukturanalyse, der ein dimerer Metall-Komplex des Naturstoffs zugrunde liegt.
2. Durch eine ICP-MS-Untersuchung konnte gezeigt werden, dass im dimeren **16** mit Natrium, Calcium und Zink ein Gemisch von Metallionen enthalten ist.
3. Durch Ionenaustauschchromatographie und nachfolgende Beladung von **16** mit verschiedenen Metallionen wurden Konformationsänderungen in **16** erreicht und somit der Grund für die Unterschiede in $^1\text{H-NMR}$ -Spektren verschiedener Fermentationsansätze sowie zwischen Syntheseprodukt und Naturstoff aufgeklärt.

Biologische Aktivitäten der Hormaomycinderivate

1. Die antimikrobiellen Aktivitäten aller Derivate wurden ermittelt und entsprechen gegen *Arthrobacter* sp. mit 60–100 % der des Naturstoffs. Für Hormaomycin D₂ (**21b**) konnte zusätzlich eine hohe Aktivität gegen *Candida albicans* nachgewiesen werden, weder **16** noch andere Derivate besitzen antimykotische Aktivitäten.
2. Für alle Derivate konnten gegen *Plasmodium falciparum* (IC₅₀ = 0.08–1.66 $\mu\text{g/mL}$) und *Leishmania donovani* (IC₅₀ = 0.13–0.71 $\mu\text{g/mL}$) sehr gute, sowie gegen *Trypanosoma* sp. (IC₅₀ = 5.5–17.7 $\mu\text{g/mL}$) moderate *in vitro* Aktivitäten nachgewiesen werden. Die therapeutische Breite der Peptidlactone gegen *Plasmodium falciparum* ist aufgrund geringer Cytotoxizität als gut einzustufen. Für **16** verliefen Tests zur *in vivo* Aktivität gegen *Plasmodium berghei* negativ. Erkenntnisse zu Struktur-Wirkungsbeziehungen wurden diskutiert.

3. Die Tests der mit Metallionen angereicherten Hormaomycine zeigen, dass Aktivität und Cytotoxizität vom gebundenen Ion abhängen, was für keinen antiparasitären Wirkstoff literaturbekannt ist.

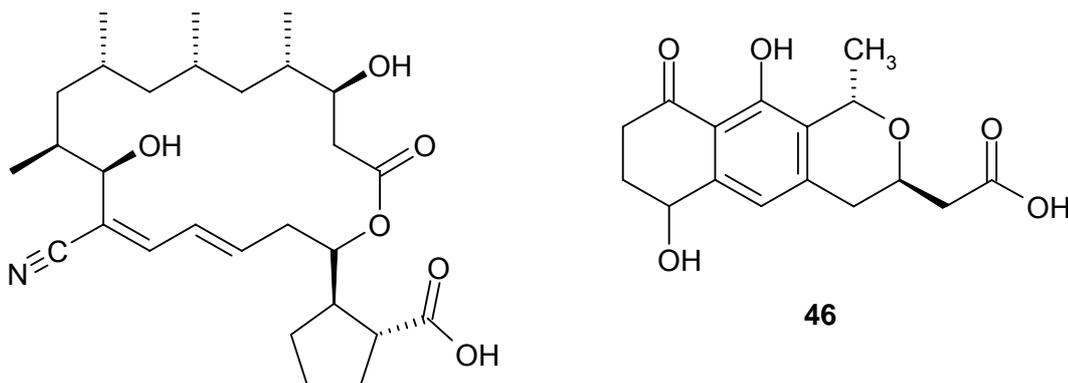
5.2 Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten

Sieben Stämme aus Portugal und der Mongolei wurden einem chemischen Screening nach dem OSMAC-Ansatz unterzogen und zwei zur weiteren Bearbeitung ausgewählt.

1. Aus dem Kulturfiltrat- und Mycelextrakt von *Actinomyces* sp. Stamm P4 konnte der bekannte Metabolit Chartreusin (**44**) in guten Ausbeuten isoliert werden.
2. Von den drei im chemischen Screening von *Actinomyces* sp. Stamm M4-1 aufgefallenen Substanzen erwiesen sich mit Genistein (**45**) und Daidzein (**12a**) zwei als Nährmedienbestandteile, der dritte Metabolit ist das ebenfalls bekannte Borrelidin (**15**).

Die als Reinsubstanzen vorliegenden Metaboliten im Kooperationsprojekt mit PROF. DR. H.-P. FIEDLER (Mikrobiologisches Institut, Universität Tübingen) aus *Streptomyces* sp. Stamm Tü 6319 wurden in ihrer Struktur aufgeklärt. Für die aus *Streptomyces* sp. Stamm Tü 2561 isolierte Substanz 2561-1 (**57**) konnten Partialstrukturen ermittelt werden, die auf ein neues, ungewöhnlich großes Makrolid hinweisen. Die Metaboliten wurden aus Kultivierungsansätzen von jeweils 10 L isoliert.

Aus dem Kulturfiltratextrakt von Stamm Tü 6319 konnten die bekannten Metabolite Germicidin A (**49**), Germicidin B (**50**), Ferulasäure, SEK4b (**47**) und anhydroSEK4b (**48**) in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Weiterhin konnte mit Fogacin (**46**) ein neues Octaketid isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt werden. Die Metaboliten **47** und **48** sind als Shuntmetaboliten aus Actinorhodin-Deletionsmutanten bekannt und konnten erstmals in einem Wildstamm nachgewiesen werden. Ihre und die vermutliche Biosynthese von **46** werden vergleichend diskutiert. Für **48** ließ sich eine moderate Aktivität gegen *Bacillus subtilis* DSM 10 und *Streptomyces viridochromogenes* Tü 57 nachweisen.



15

46

5.3 Untersuchungen am Borrelidin-Produzenten *Streptomyces* sp. S 1495

1. Die bisherigen molekulargenetischen Untersuchungen zur Biosynthese von Borrelidin (**15**) wurden diskutiert. Zur Verifizierung der Befunde wurden Fütterungen mit isotopenmarkierten Vorläufern ([1-¹³C]-, [2-¹³C]-, [1,2-¹³C₂]- und d₃-Acetat; [1-¹³C]Propionat; [U-¹³C₃]Glycerin; [1-¹³C]- und 2,3,5,6-d₄-Tyrosin) durchgeführt.
2. Während sich die von LEADLAY und SALAS postulierte Biosynthese des Borrelidin-Makrolidrings durch die Fütterungen bestätigen ließ, gibt es keine Hinweise darauf, dass die Bildung der *trans*-Cyclopentan-(1*R*,2*R*)-dicarbonsäure (**59**) von Tyrosin ausgeht. Der erkennbare Einbau von Acetat und Glycerin spricht für einen Aufbau aus Bausteinen des Kohlenhydratpools, bzw. Citratcyclus. Ein Beweis dafür steht noch aus.
3. Erste Versuche zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese an *Streptomyces* sp. S 1495 wurden durchgeführt, eine mangelnde Substratflexibilität der beteiligten Enzyme konnte nachgewiesen werden.

B EXPERIMENTELLER TEIL

1 Allgemeines

1.1 Instrumentelle Analytik

Massenspektren:

EI-MS: *Finnigan* MAT 95, 70 eV, Hochauflösungen wurden mit Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz gemessen, die relativen Intensitäten beziehen sich auf den Basispeak ($I = 100\%$) und sind in Klammern angegeben. **DCI-MS:** *Finnigan* MAT 95, 200 eV, Reaktandgas NH_3 . **ESI-MS:** *Finnigan* LC-Q. **HR-ESI-MS:** *Bruker* Apex-Q III, 7 Tesla. **DRC-ICP-MS:** *PerkinElmer* Elan-DRCII, Probenvorbereitung nach AAV 1, interne Standards: Sc, Y, Ga, In, Bi.

Infrarotspektren (IR):

Alle IR-Spektren wurden mit einem FT-IR-Spektrometer der Fa. *Perkin-Elmer* Modell 1600 als KBr-Presslinge gemessen, sh = Schulter.

Elektronenspektren (UV):

Alle Elektronenspektren wurden mit einem Spektrometer der Fa. *Varian* Modell Cary 3E gemessen. Die Wellenlänge λ ist in [nm] angegeben, der molare Extinktionskoeffizient ϵ hat die Dimension [$1000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$], sh = Schulter; Methanol/HCl bzw. Methanol/NaOH: Zu 2 mL methanolischer Lösung wurde jeweils ein Tropfen 1 M HCl bzw. 1 M NaOH gegeben.

Drehwerte:

Alle Drehwerte wurden mit einem Polarimeter der Fa. *Perkin-Elmer* Modell 343 bestimmt, die Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ sind in [$10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ g}^{-1}$] angegeben, die Konzentrationen c in [$10^{-2} \text{ g ml}^{-1}$], Referenz: Natrium D-Linie (589 nm).

Circulardichroismus-Spektren (CD):

Jasco J 500 mit *Jasco* IF 500 A/D-Wandler und *BMC* IF 800 Personalcomputer als Prozessor, die molaren Elliptizitäten θ sind in [$10^{-1} \text{ grad cm}^2 \text{ mol}^{-1}$] angegeben.

¹H-NMR-Spektren:

Varian Inova-600 (600 MHz), *Varian* Inova-500 (500 MHz), *Varian* Mercury-300 (300 MHz), *Varian* Unity-300 (300 MHz), *Bruker* AMX 300 (300 MHz). Chemische Verschiebungen in δ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard; Kopplungskonstanten (J) in Hertz (Hz).

Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett, ddt = Dublett vom Dublett vom Triplet, dt = Dublett vom Triplet, t = Triplet, td = Triplet vom Dublett, q = Quartett, qd = Quartett vom Dublett, quint = Quintett, sept = Septett, m = Multiplett, br = breit.

Alle ¹H-NMR-Spektren wurden näherungsweise als Spektren erster Ordnung interpretiert.

¹³C-NMR-Spektren:

Varian Inova-600 (150.8 MHz), *Varian* Mercury-300 (75.5 MHz), *Varian* Unity-300 (75.5 MHz). Chemische Verschiebungen in δ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard.

¹³C-¹H-Multiplizitäten sind aus HSQC-Experimenten ableitbar. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett.

2D-NMR-Spektren:

¹H,¹H-COSY (**¹H,¹H-Correlated Spectroscopy**), **HSQC** (**Heteronuclear Singular Quantum Coherence**), **HMBC** (**Heteronuclear Multiple Bond Connectivity**), **HMQC** (**Heteronuclear Multiple Quantum Coherence**), **NOESY** (**Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy**).

1.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC):

Merck HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄: 10 x 10 cm, Schichtdicke 0.2 mm; *Merck* DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄: 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm; *Merck* DC-Alufolien RP-18 F_{254s}: 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm. Angegeben sind R_f-Werte (Laufhöhe relativ zur Laufmittelfront).

Sprühreagenzien:

Nach *Merck*, Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie.²⁰⁶ Die DC-Platten wurden nach dem Ansprühen auf ca. 120°C erwärmt.

Anisaldehyd (Anis, Nr. 21): 1.0 mL Anisaldehyd wird in eine Lösung aus 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 5 mL konz. Schwefelsäure gegeben.

Ehrlichs Reagenz (Ehrlich, Nr. 91): 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in einer Mischung von 25 mL Salzsäure (36 %) und 75 mL Methanol gelöst.

Orcin-Sprühreagenz (Orcin, Nr. 120 – 122): 1 g Eisen(III)-chlorid wird in 100 mL Schwefelsäure gelöst und zu gleichen Anteilen mit einer Orcinlösung (6 % in Ethanol) gemischt.

Vanillin-Schwefelsäure (Vanillin, Nr. 322): 1 g Vanillin wird in 100 mL konz. Schwefelsäure gegeben.

Säulen- und Gelchromatographie:

ICN Kieselgel 60 (KG), 32–63 µm, *Fluka* Sephadex® LH-20.

Ionenaustauschchromatographie:

Merck Amberlite CG-50 I.

Adsorptionschromatographie:

Serva Amberlite® XAD-2.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC):

Analytische HPLC:

Pumpe: *Kontron* 322; Mischkammer: *Kontron* HPLC 360; Diode-Array-Detektor: *Kontron* 440; Autosampler: *Kontron* 360 mit analytischer Aufgabeschleife; Software: *Kontron* Kromasystem 2000™ Version 1.60.

Säule A: *Jasco* Nucleosil 100 C-18, 5 µm, 250 x 3 mm, Flussrate 0.5 mL/min.

Säule B: *Kromasil* 100 C-18, 5 µm, 250 x 3 mm, Flussrate 0.7 mL/min.

Säule C: *Macherey-Nagel* Nucleodur 100-5 C-18 ec, 5µm, 250 x 3 mm, Flussrate 0.5 mL/min.

Programm 1: 15 % Acetonitril auf 100 % Acetonitril in Wasser, +0.1 % TFA in 20 min.

(Semi-)Präparative HPLC:

Pumpe: *Jasco* PU-1587; UV-Detektor: *Jasco* UV 1575; manuelles Probenaufgabeventil: *Rheodyne* mit 2.0 mL Aufgabeschleife; Chromatographiesoftware: *Jasco* Borwin; Steuersoftware: *Jasco* Borwin HSS-1500;

Säule D: *Jasco* Nucleosil 100 C-18, 5µm, 250 x 8 mm, Flussrate 3.0 mL/min.

Säule E: *Kromasil*, C-18, 5µm, 250 x 8 mm, Flussrate 2.5 mL/min.

Säule F: *Kromasil*, C-18, 5µm, 250 x 21 mm, Flussrate 17.0 mL/min.

Säule G: *Macherey-Nagel* Nucleodur 100-5 C-18 ec, 5µm, 250 x 21 mm, Flussrate 18.0 mL/min.

LC-MS:

Pumpe: *Flux Instruments* Rheos 4000; Autosampler: *Jasco* AS-851 (0–100 µL variable Aufgabeschleife); UV-Detektor: *Linear* UVIS-205; Massendetektor: *Finnigan* LC-Q; Entgaser: *Flux Instruments* ERC-3415α; Steuersoftware HPLC: *Flux Instruments* Janeiro;

Datensystem: *Finnigan Xcalibur*; Vorsäule: *Grom Supersphere 100 RP-18* endcapped, 4 µm, 10 x 2 mm;

Säule: *Grom Supersphere 100 RP-18* endcapped, 4 µm, 100 x 2 mm.

Programm 1: 20 % Methanol auf 100 % Methanol in 20 min, 10 min 100 % Methanol;

Programm 2: 5 % Methanol auf 100 % Methanol in 20 min, 10 min 100 % Methanol;

Flussrate: 300 µL/min; UV-Detektion: 254 nm, Massendetektion: positive und negative Ionen.

Lösungsmittel:

Die Lösungsmittel für die Säulenchromatographie wurden zuvor destilliert. Für die HPLC wurden nur analysenreine Lösungsmittel und bidestilliertes Wasser verwendet. Lösungsmittel für die semipräparative HPLC wurden im Ultraschallbad (10 min) und durch anschließendes Durchleiten von Helium (10 min) entgast.

1.3 Mikrobiologische Methoden

Nährmedienbestandteile:

Malzextrakt, D-Glucose, Stärke, Caseinpepton, Fleischextrakt und CaCO₃ wurden von der Fa. *Merck* bezogen. Hefeextrakt stammt von der Fa. *Oxoid*, Cornsteep Powder von der Fa. *Marcor*, D-(–)-Mannit von der Fa. *Riedel-deHaën*, Haferkleie mit Keim von der Fa. *Quickvital*, BiTek Agar, Trypton und Casamino Acids von der Fa. *Difco*, Sojamehl fettarm von der Fa. *Henselwerk GmbH*, Kanamycinsulfat von der Fa. *Roth*.

Nährmedien:

Für alle Nährmedien wurde demineralisiertes Wasser verwendet und der pH-Wert vor dem Autoklavieren mit 0.5 M NaOH bzw. 0.5 M HCl eingestellt. Die Nährmedien wurden durch Autoklavieren (feuchte Hitze, 121°C, 1 bar Überdruck, 30 min) sterilisiert.²⁰⁷

M2: Malzextrakt (10 g/L), Hefeextrakt (4 g/L), Glucose (4 g/L), pH = 7.0; für die Stammhaltung Zusatz von Agar (20 g/L).

M2+: Malzextrakt (10 g/L), Hefeextrakt (4 g/L), Glucose (4 g/L), CaCO₃ (0.5 g/L), pH = 7.0; für die Stammhaltung Zusatz von Agar (20 g/L).

SM: Entfettetes Sojamehl (20 g/L), D-(–)-Mannit (20 g/L), pH = 7.0.

Ha: Haferkleie (20 g/L), pH = 7.0.

SGG: Glucose (10 g/L), Glycerin (10 g/L), Stärke (10 g/L), Cornsteep Powder (2.5 g/L), Caseinpepton (5 g/L), Hefeextrakt (2 g/L), NaCl (1 g/L), CaCO₃ (3 g/L), pH = 7.0.

NSA: Hefeextrakt (4 g/L), Stärke (löslich, 20 g/L), Casamino Acids (20 g/L), Agar (20 g/L).

LB_{Kn50}: Trypton (10 g/L), Hefeextrakt (5 g/L), NaCl (10 g/L), Kanamycinsulfat (50 mg/L), pH = 7.0; für die Stammhaltung Zusatz von Agar (15 g/L).

NM6: D-(–)-Mannit (20 g/L), Sojamehl (vollfett, 20 g/L), Fleischextrakt (20 g/L), NaCl (2 g/L), L-Valin (0.3 g/L), ZnSO₄ x 6 H₂O (0.5 g/L), pH = 7.3.

NM10: D-(–)-Mannit (50 g/L), L-Asparagin (3 g/L), K₂HPO₄ (1 g/L), NaCl (25 g/L), MgSO₄ x 7 H₂O (50 mg/L), CaCl₂ x 2 H₂O (50 mg/L), CH₃COONa (420 mg/L), meso-Inosit (100 mg/L), Spurenelementelösung (10 mL/L), Vitaminlösung (1 mL/L).

Spurenelementelösung: CaCl₂ x 2 H₂O (8 g/L), MnCl₂ x 2 H₂O (5 g/L), ZnCl₂ (50 mg/L), CuCl₂ x 2 H₂O (50 mg/L), FeCl₃ x 6 H₂O (50 mg/L).

Vitaminlösung: Thiamin-HCl (1 g/L), Calcium-D-(+)-Pantothemat (1.2 g/L), Flavin-Mononukleotid (1 g/L), Nikotinsäure (2.3 g/L), Pyridoxin-HCl (12 g/L), p-Aminobenzoat (200 mg/L), Vitamin B₁₂ (100 mg/L), Folsäure (10 mg/L), Biotin (6 mg/L).

Isotopenmarkierte Verbindungen:

Alle verwendeten Verbindungen waren, soweit nicht anders angegeben, zu 99 % isotopenmarkiert und wurden bezogen von:

Na-[1-¹³C]Acetat, [U-¹³C₃]Glycerin von *Chemotrade GmbH*; Na-[2-¹³C]Acetat, Na-[1,2-¹³C₂]Acetat von *Deutero GmbH*; Na[2-d₃]Acetat von *Cambridge Isotope Laboratories Inc.*; [1-¹³C]Tyrosin, [2,3,5,6-d₄]Tyrosin (98 %), Na-[1-¹³C]Propionat von *Isotec Inc.*

Schüttler und Fermenter:

Braun Inkubationsschüttelschrank BS4, *Braun* Certomat RM, *Braun* Biostat M (1 L), *Braun* Biostat B (3 L), *Braun* Biostat U (50 L).

Plattendiffusionstest:

Auf die mit den verschiedenen Testkeimen angeimpfte Agarplatte wurden Filterplättchen (Durchmesser: 6 mm, Dicke: 0.5 mm) gelegt, die mit 15 µL Substanzlösung (in Methanol oder Chloroform gelöst, c = 1 mg/mL) getränkt und vor dem Auflegen unter sterilen Bedingungen getrocknet worden waren. Als Testkeime dienten *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, und *Candida albicans*. Die Agarplatten wurden 24 h bei 25°C (*C. albicans*) bzw. 37°C (*B. subtilis*, *E. coli* und *S. aureus*) inkubiert.

Zusammensetzung der Nährböden für die Plattendiffusionstests:

Bac. subt. und *E. coli*: Glucose (5 g/L), Trinatriumcitrat x 2 H₂O (0.5 g/L), KH₂PO₄ (3 g/L), K₂HPO₄ (7 g/L), MgSO₄ x 7 H₂O (0.1 g/L), (NH₄)₂SO₄ (1 g/L) und Agar (15 g/L), keine pH-Einstellung.

Staph. aureus.: Bacto Nutrient Broth (8 g/L), NaCl (5 g/L) und Agar (15 g/L), keine pH-Einstellung.

Cand. albicans: Hefeextrakt (4 g/L), Malzextrakt (10 g/L), Glucose (4 g/L) und Agar (15 g/L), pH = 5.5.

Zum Ansetzen der Testplatten-Medien wurde demineralisiertes Wasser verwendet. Die Glucose wurde erst nach der 30 minütigen Sterilisation hinzugegeben.

Test auf Differenzierungsaktivität:

2 mL einer mit NaCl-Lösung (0.9 %) hergestellten Sporensuspensionslösung des Stammes *Streptomyces griseoflavus* Tü 1306 wurden in 200 mL 40°C warmes NSA-Medium gegeben und als dünne Schichten auf NSA-Agarplatten gegossen. Wie unter den allgemeinen Bedingungen für Plattendiffusionstests beschrieben wurden Filterplättchen aufgelegt und die Platten für 8–10 d bei 28°C inkubiert.

Screening auf Differenzierungsaktivität:

Auf die M2-Agarplatten wurden Filterplättchen (Durchmesser: 6 mm, Dicke: 0.5 mm) gelegt, die mit 15 µL Substanzlösung (in Chloroform gelöst, c = 1 mg/mL) getränkt und vor dem Auflegen unter sterilen Bedingungen getrocknet worden waren. Diese Agarplatten wurden an den Rändern mit den Teststämmen angeimpft und für 7 d bei 28°C inkubiert.

1.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)**AAV 1: Aufschluss von Hormaomycin für DRC-ICP-MS**

2.5 mg Hormaomycin werden in einem Teflongefäß mit 1 mL HNO₃ (60 %, ultrapur), 0.5 mL H₂O₂ (30 %) sowie 0.75 mL Wasser versetzt und einem Mikrowellenaufschluss unterworfen (Programm: 3 min 250 W, 1 min 0 W 4 min 250 W, 5 min 500 W, 3 min 400 W, 4 min 300 W).

2 Untersuchungen am Hormaomycin-Produzenten *Streptomyces griseoflavus* (Stamm W 384)

2.1 Stammhaltung

2.1.1 Agarplatten

Die Haltung von *Streptomyces griseoflavus* (Stamm W 384) erfolgte auf Petrischalen mit M2+-Nährmedium. Sie wurden bei 28°C 7–10 Tage inkubiert und bei 28°C für maximal einen sowie bei 4°C maximal drei Monate gelagert.

2.1.2 Langzeitkonservierung

Aus einer gut bewachsenen Agarplatte wurden mit einseitig zugeschweißten und mit einem Bleistück beschwerten sterilen Halmen aus Polypropylen Agarstückchen ausgestanzt, bis der Halm gefüllt war. Dieser wurde in einen zweiten äußeren Halm gesteckt, der mit einer ausgeglühten Tiegelflange an beiden Seiten zugeschmolzen wurde. Die Halme wurden in einem Dewar über flüssigem Stickstoff bei –196°C gelagert.

2.1.3 Kultivierung

Vorkultur:

Die Kultivierung erfolgte in 250 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen in 50 mL NM6, welches mit einem ca. 1 cm² großen gut bewachsenen Agarstück angeimpft wurde. Die Inkubation erfolgte bei 27°C und 180 rpm für ca. 48 h.

Hauptkultur:

Der Stamm W 384 wurde im Braun 1 L Biostat M-Fermenter mit NM10 unter Zugabe von 2 mL NIAX-Entschäumer kultiviert und mit 10 % Vorkultur beimpft. Nach dem Beimpfen erfolgte die Zugabe der Vitaminlösung durch einen Sterilfilter, der pH-Wert wurde auf 6.5 eingestellt und mit 2 M Citronensäure und 0.5 M NaOH automatisch bei 6.5 ± 1.0 gehalten. Die Fermentation erfolgte für 72 h bei 27°C, 700 rpm und einer Luftzufuhr von 1.6 vvm. Zur Ausbeuteerhöhung wurden ab der 24. Stunde über einen Zeitraum von 10 h 2 mmol Pyrrol-2-carbonsäure (gelöst in 50 mL sterilem Wasser) zu der Kulturbrühe gepumpt.

2.2 Isolierung und Charakterisierung von Hormaomycin (16)

Die Kulturbrühe wurde durch Zentrifugation in Mycel und Kulturfiltrat getrennt, wobei letzteres aufgrund des sehr geringen Hormaomycin-Gehalts (< 1 %) verworfen wurde. Die Extraktion des Mycels erfolgte nach Gefrierdrying und Mörsern mit 2 x 300 mL Ethylacetat pro Liter Kulturbrühe für 15 min im Ultraschallbad. Die organischen Phasen wurden vereint, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend mit kaltem Pentan gewaschen und an Kieselgel chromatographiert (Trennung A: Aceton/Cyclohexan 2:3; Trennung B: CH₂Cl₂/MeOH 98:2). Die höchsten Ausbeuten an **16** (bis zu 45 mg) gelangen durch Fermentationen unter Zugabe von Pyrrol-2-carbonsäure, dem putativen Vorläufer der Startereinheit der Hormaomycin-Biosynthese, ohne Zugabe wurden höchstens 20 mg Ausbeute erreicht.

2.2.1 Untersuchungen des Hormaomycin-Zentralions

10.0 mg **16** wurden in Methanol gelöst und an Amberlite CG-50 I-Ionentauscher (MeOH, 100 x 5 mm) chromatographiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Die erhaltene deionisierte Form von **16** wurde in Chloroform gelöst (c = 1.0 mg/mL), und mit jeweils gleichem Volumen 0.5 M Metallsalzlösung versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und das Lösungsmittel entfernt. Die entstandenen Hormaomycin-Analoga gleichen sich bis auf ihre ¹H-chemischen Verschiebungen in allen spektroskopischen und spektrometrischen Daten.

Hormaomycin (16)

C₅₅H₆₉N₁₀O₁₄Cl (1128.47)

farbloser Feststoff

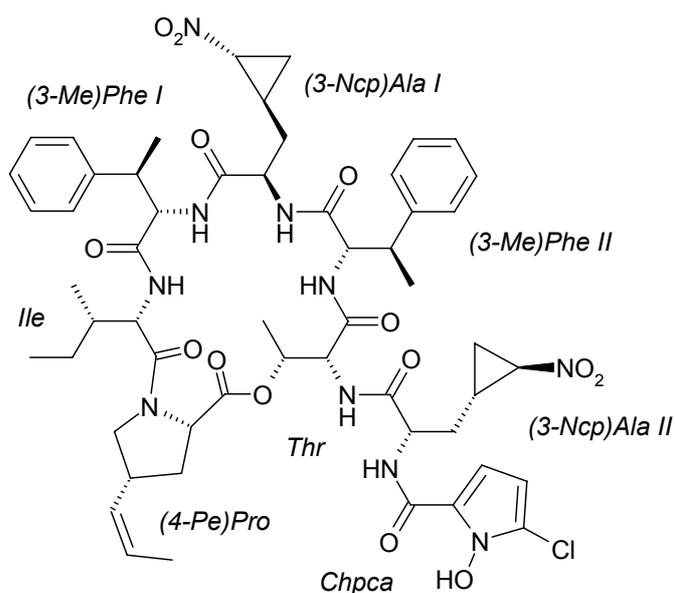
UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rosa (Ehrlich).

R_f: 0.61 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1);

0.25 (KG, Aceton/Cyclohexan 2:3).

Smp.: 166–168°C.



ESI-MS: (pos. Ionen) $m/z = 1151 [M+Na]^+$, $1129 [M+H]^+$.
(neg. Ionen) $m/z = 1127 [M-H]^-$.

HR-ESI-MS: berechnet: $1129.64758 [M+H]^+$.
gefunden: $1129.64755 (\Delta = 0.03 \text{ ppm})$.

DRC-ICP-MS: Na (9.2 mol%), Zn (0.9 mol%), Ca (0.7 mol%).

UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 274 (4.18) \text{ nm}$;

(MeOH, HCl): $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 274 (4.18) \text{ nm}$;

(MeOH, NaOH): $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 274 (4.18) \text{ nm}$.

CD (MeOH): $\lambda_{\text{max}} ([\Theta]^{20}) = 275 (+27500)$, $224 (-60600)$, $207 (+11500) \text{ nm}$.

$[\alpha]_D^{20} = +14^\circ (c = 0.1, \text{ MeOH})$.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3384 (\text{br})$, 2928 , 1742 , $1628 (\text{br})$, 1544 , 1447 , 1370 cm^{-1} .

Natives Hormaomycin (16)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = -0.62$ [ddd, $J = 7.0, 7.0, 7.0 \text{ Hz}$, 1 H, 3'-H_a, (3-Ncp)Ala I], -0.09 [ddd, $J = 14.0, 9.0, 4.5 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H_a, (3-Ncp)Ala I], 0.29 [m, 1 H, 2'-H, (3-Ncp)Ala I], 0.58 [ddd, $J = 14.0, 6.0, 5.0 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H_b, (3-Ncp)Ala I], 0.89 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3 H, 5-H, Ile), 0.99 – 1.01 [m, 2 H, 3'-H_b, (3-Ncp)Ala I, 3'-H_a, (3-Ncp)Ala II], 1.02 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3 H, 1'-H, Ile), 1.29 [d, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 3 H, 4-H, (βMe)Phe II], 1.30 – 1.35 (m, 1 H, 4-H_a, Ile), 1.39 [d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 3 H, 4-H, (βMe)Phe I], 1.53 (d, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 3 H, *a*-Thr), 1.54 – 1.60 [m, 2 H, 3-H_a, (3-Ncp)Ala II, 4-H_b, Ile], 1.67 [dd, $J = 7.0, 2.0 \text{ Hz}$, 3 H, 3'-H, (4-Pe)Pro], 1.76 – 1.84 [m, 2 H, 3-H_b, (3-Ncp)Ala II, 3-H_a, (4-Pe)Pro], 1.84 – 1.95 [m, 3 H, 1'-H, 3'-H_b, (3-Ncp)Ala II, 3-H, Ile], 2.35 [ddd, $J = 13.0, 5.5, 5.5 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H_b, (4-Pe)Pro], 2.94 [dq, $J = 11.0, 6.5 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H, (βMe)Phe II], 2.96 [ddd, $J = 7.0, 3.5, 3.5 \text{ Hz}$, 1 H, 2'-H, (3-Ncp)Ala I], 3.25 – 3.32 [m, 2 H, 4-H, 5-H_a, (4-Pe)Pro], 3.53 [m, 1 H, 2-H, (3-Ncp)Ala I], 3.68 [dq, $J = 7.0, 4.5 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H, (βMe)Phe I], 3.96 – 4.00 [m, 1 H, 5-H_b, (4-Pe)Pro], 4.03 [ddd, $J = 7.0, 3.5, 3.5 \text{ Hz}$, 1 H, 2'-H, (3-Ncp)Ala II], 4.27 [dd, $J = 11.5, 6.0 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H, (4-Pe)Pro], 4.40 [dd, $J = 11.0, 11.0 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H, (βMe)Phe II], 4.48 [dd, $J = 9.0, 4.5 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H, (βMe)Phe I], 4.58 (dd, $J = 9.5, 2.5 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H, *a*-Thr), 4.65 (dd, $J = 9.0, 9.0 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H, Ile), 5.12 [m, 1 H, 2-H, (3-Ncp)Ala II], 5.26 [m, 1 H, 1'-H, (4-Pe)Pro], 5.41 (dq, $J = 7.0, 2.5 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H, *a*-Thr), 5.63 [dq, $J = 10.5, 7.0 \text{ Hz}$, 1 H, 2'-H, (4-Pe)Pro], 6.13 (d, $J = 5.0 \text{ Hz}$, 1 H, 4-H, Chpca), 6.64 [d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 1 H, NH, (3-Ncp)Ala I], 6.80 [d, $J = 10.0 \text{ Hz}$, 1 H, NH, (βMe)Phe II], 6.83 (d, $J = 5.0 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H, Chpca), 6.89 [d, $J = 9.5 \text{ Hz}$, 1 H, NH, (βMe)Phe I], 7.02 – 7.12 (m, 4 H, Ar-H), 7.14 – 7.18 (m, 2 H, Ar-H), 7.19 – 7.22 (m, 4 H, Ar-H), 7.27 (d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, 1 H, NH, Ile), 8.10 [d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, 1 H, NH, (3-Ncp)Ala II], 9.05 (d, $J = 9.5 \text{ Hz}$, 1 H, NH, Thr).

¹³C-NMR (150.8 MHz, CDCl₃): δ = 10.3 (q, C-5, *Ile*), 13.0 [q, C-4, (*β*Me)*Phe* I], 13.1 [q, C-3', (*4-Pe*)*Pro*], 14.7 (q, C-1', *Ile*), 16.8 (q, C-4, *a-Thr*), 17.2 [t, C-3', (*3-Ncp*)*Ala* II] 17.4 [q, C-4, (*β*Me)*Phe* II], 17.4 [t, C-3', (*3-Ncp*)*Ala* I], 19.7 [d, C-1', (*3-Ncp*)*Ala* I], 21.5 [d, C-1', (*3-Ncp*)*Ala* II], 24.7 (t, C-4, *Ile*), 32.6 [t, C-3, (*3-Ncp*)*Ala* I], 34.8 [t, C-3, (*3-Ncp*)*Ala* II], 35.3 [t, C-3, (*4-Pe*)*Pro*], 36.4 [d, C-4, (*4-Pe*)*Pro*], 37.8 (d, C-3, *Ile*), 39.0 [d, C-3, (*β*Me)*Phe* I], 41.5 [d, C-3, (*β*Me)*Phe* II], 50.9 [d, C-2, (*3-Ncp*)*Ala* II], 51.6 [d, C-2, (*3-Ncp*)*Ala* I], 52.6 [t, C-5, (*4-Pe*)*Pro*], 54.4 (d, C-2, *Ile*), 54.7 (d, C-2, *a-Thr*), 57.9 [d, C-2', (*3-Ncp*)*Ala* I], 58.9 [d, C-2', (*3-Ncp*)*Ala* II], 59.7 [d, C-2, (*β*Me)*Phe* II], 59.8 [d, C-2, (*β*Me)*Phe* I], 61.2 [d, C-2, (*4-Pe*)*Pro*], 68.8 (d, C-3, *a-Thr*), 103.4 (d, C-4, *Chpca*), 109.8 (d, C-3, *Chpca*), 119.7 (s, C-2, *Chpca*), 121.3 (s, C-5, *Chpca*), 126.9, 127.1, 127.2, 127.5, 127.8, 128.3, 128.4, 128.6 [d, C-1', C-2', (*4-Pe*)*Pro*, Ar-C], 141.6, 141.8 (s, Ar-C), 159.3 (s, C-1, *Chpca*), 168.8, 169.5, 169.9, 170.9, 171.3, 171.6, 171.9 (s, C-1).

Deionisiertes Hormaomycin (16-De)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = -0.71 [ddd, *J* = 7.0, 7.0, 7.0 Hz, 1 H, 3'-H_a, (*3-Ncp*)*Ala* I], -0.16 [ddd, *J* = 14.0, 9.0, 4.5 Hz, 1 H, 3-H_a, (*3-Ncp*)*Ala* I], 0.26 [m, 1 H, 1'-H, (*3-Ncp*)*Ala* I], 0.50 [ddd, *J* = 14.0, 6.0, 5.0 Hz, 1 H, 3-H_b, (*3-Ncp*)*Ala* I], 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H, 5-H, *Ile*), 0.98 [m, 2 H, 3'-H_b, (*3-Ncp*)*Ala* I, 3'-H_a, (*3-Ncp*)*Ala* II], 1.02 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H, 1'-H, *Ile*), 1.30 [d, *J* = 6.5 Hz, 3 H, 4-H, (*β*Me)*Phe* II], 1.30–1.35 (m, 1 H, 4-H_a, *Ile*), 1.39 [d, *J* = 7.2 Hz, 3 H, 4-H, (*β*Me)*Phe* I], 1.53 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H, *a-Thr*), 1.54–1.60 [m, 2 H, 3-H_a, (*3-Ncp*)*Ala* II, 4-H_b, *Ile*], 1.67 [dd, *J* = 7.0, 2.0 Hz, 3 H, 3'-H, (*4-Pe*)*Pro*], 1.76–1.84 [m, 2 H, 3-H_b, (*3-Ncp*)*Ala* II, 3-H_a, (*4-Pe*)*Pro*], 1.84–1.95 [m, 3 H, 1'-H, 3'-H_b, (*3-Ncp*)*Ala* II, 3-H, *Ile*], 2.37 [ddd, *J* = 13.0, 5.5, 5.5 Hz, 1 H, 3-H_b, (*4-Pe*)*Pro*], 2.89 [ddd, *J* = 7.0, 3.5, 3.5 Hz, 1 H, 2'-H, (*3-Ncp*)*Ala* I], 3.01 [dq, *J* = 11.0, 6.5 Hz, 1 H, 3-H, (*β*Me)*Phe* II], 3.25–3.32 [m, 2 H, 4-H, 5-H_a, (*4-Pe*)*Pro*], 3.46 [m, 1 H, 2-H, (*3-Ncp*)*Ala* I], 3.67 [dq, *J* = 7.0, 4.5 Hz, 1 H, 3-H, (*β*Me)*Phe* I], 3.97 [m, 1 H, 5-H_b, (*4-Pe*)*Pro*], 4.02 [ddd, *J* = 7.0, 3.5, 3.5 Hz, 1 H, 2'-H, (*3-Ncp*)*Ala* II], 4.26 [dd, *J* = 11.5, 6.0 Hz, 1 H, 2-H, (*4-Pe*)*Pro*], 4.36 [dd, *J* = 11.0, 11.0 Hz, 1 H, 2-H, (*β*Me)*Phe* II], 4.45 [dd, *J* = 9.0, 4.5 Hz, 1 H, 2-H, (*β*Me)*Phe* I], 4.57 (dd, *J* = 9.5, 2.5 Hz, 1 H, 2-H, *a-Thr*), 4.65 (dd, *J* = 9.0, 9.0 Hz, 1 H, 2-H, *Ile*), 5.11 [m, 1 H, 2-H, (*3-Ncp*)*Ala* II], 5.26 [m, 1 H, 1'-H, (*4-Pe*)*Pro*], 5.40 (dq, *J* = 7.0, 2.5 Hz, 1 H, 3-H, *a-Thr*), 5.62 [dq, *J* = 10.5, 7.0 Hz, 1 H, 2'-H, (*4-Pe*)*Pro*], 6.13 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H, 4-H, *Chpca*), 6.44 [d, *J* = 7.0 Hz, 1 H, NH, (*3-Ncp*)*Ala* I], 6.78 [d, *J* = 10.0 Hz, 1 H, NH, (*β*Me)*Phe* II], 6.79 [d, *J* = 9.5 Hz, 1 H, NH, (*β*Me)*Phe* I], 6.84 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H, 3-H, *Chpca*), 7.00–7.02 (m, 1 H, Ar-H), 7.02–7.12 (m, 4 H, Ar-H), 7.14–7.18 (m, 1 H, Ar-H), 7.19–7.22 (m, 4 H, Ar-H), 7.26 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, NH, *Ile*), 8.06 [d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, NH, (*3-Ncp*)*Ala* II], 9.08 (d, *J* = 9.5 Hz, 1 H, NH, *Thr*).

Kupfer-Hormaomycin (16-Cu)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = -0.55 [ddd, *J* = 7.0, 7.0, 7.0 Hz, 1 H, 3'-H_a, (3-Ncp)Ala I], -0.02 [ddd, *J* = 14.0, 9.0, 4.5 Hz, 1 H, 3-H_a, (3-Ncp)Ala I], 0.36 [m, 1 H, 1'-H, (3-Ncp)Ala I], 0.59 [ddd, *J* = 14.0, 6.0, 5.0 Hz, 1 H, 3-H_b, (3-Ncp)Ala I], 0.86 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H, 5-H, Ile), 0.98–1.00 [m, 2 H, 3'-H_b, (3-Ncp)Ala I, 3'-H_a, (3-Ncp)Ala II], 1.00 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H, 1'-H, Ile), 1.28 [d, *J* = 6.5 Hz, 3 H, 4-H, (βMe)Phe II], 1.24–1.29 (m, 1 H, 4-H_a, Ile), 1.39 [d, *J* = 7.2 Hz, 3 H, 4-H, (βMe)Phe I], 1.52 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H, *a*-Thr), 1.54–1.60 [m, 2 H, 3-H_a, (3-Ncp)Ala II, 4-H_b, Ile], 1.67 [dd, *J* = 7.0, 2.0 Hz, 3 H, 3'-H, (4-Pe)Pro], 1.76–1.84 [m, 2 H, 3-H_b, (3-Ncp)Ala II, 3-H_a, (4-Pe)Pro], 1.84–1.95 [m, 3 H, 1'-H, 3'-H_b (3-Ncp)Ala II, 3-H, Ile], 2.36 [ddd, *J* = 13.0, 5.5, 5.5 Hz, 1 H, 3-H_b, (4-Pe)Pro], 2.91 [dq, *J* = 11.0, 6.5 Hz, 1 H, 3-H, (βMe)Phe II], 2.98 [ddd, *J* = 7.0, 3.5, 3.5 Hz, 1 H, 2'-H, (3-Ncp)Ala I], 3.25–3.32 [m, 2 H, 4-H, 5-H_a, (4-Pe)Pro], 3.62 [m, 1 H, 2-H, (3-Ncp)Ala I], 3.69 [dq, *J* = 7.0, 4.5 Hz, 1 H, 3-H, (βMe)Phe I], 3.97 [m, 1 H, 5-H_b, (4-Pe)Pro], 4.03 [ddd, *J* = 7.0, 3.5, 3.5 Hz, 1 H, 2'-H, (3-Ncp)Ala II], 4.25 [dd, *J* = 11.5, 6.0 Hz, 1 H, 2-H, (4-Pe)Pro], 4.39 [dd, *J* = 11.0, 11.0 Hz, 1 H, 2-H, (βMe)Phe II], 4.51 [dd, *J* = 9.0, 4.5 Hz, 1 H, 2-H, (βMe)Phe I], 4.58 (dd, *J* = 9.5, 2.5 Hz, 1 H, 2-H, *a*-Thr), 4.64 (dd, *J* = 9.0, 9.0 Hz, 1 H, 2-H, Ile), 5.09 [m, 1 H, 2-H, (3-Ncp)Ala II], 5.24 [m, 1 H, 1'-H, (4-Pe)Pro], 5.40 (dq, *J* = 7.0, 2.5 Hz, 1 H, 3-H, *a*-Thr), 5.62 [dq, *J* = 10.5, 7.0 Hz, 1 H, 2'-H, (4-Pe)Pro], 6.11 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H, 4-H, Chpca), 6.74 [d, *J* = 7.0 Hz, 1 H, NH, (3-Ncp)Ala I], 6.75 [d, *J* = 10.0 Hz, 1 H, NH, (βMe)Phe II], 6.81 [d, *J* = 9.5 Hz, 1 H, NH, (βMe)Phe I], 6.84 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H, 3-H, Chpca), 7.00–7.02 (m, 1 H, Ar-H), 7.02–7.12 (m, 4 H, Ar-H), 7.14–7.18 (m, 1 H, Ar-H), 7.19–7.22 (m, 4 H, Ar-H), 7.26 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, NH, Ile), 8.23 [d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, NH, (3-Ncp)Ala II], 8.96 (d, *J* = 9.5 Hz, 1 H, NH, Thr).

Kalium-Hormaomycin (16-K)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = -0.69 [ddd, *J* = 7.0, 7.0, 7.0 Hz, 1 H, 3'-H_a, (3-Ncp)Ala I], -0.14 [ddd, *J* = 14.0, 9.0, 4.5 Hz, 1 H, 3-H_a, (3-Ncp)Ala I], 0.26 [m, 1 H, 1'-H, (3-Ncp)Ala I], 0.54 [ddd, *J* = 14.0, 6.0, 5.0 Hz, 1 H, 3-H_b, (3-Ncp)Ala I], 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H, 5-H, Ile), 0.98 [m, 2 H, 3'-H_b, (3-Ncp)Ala I, 3'-H_a, (3-Ncp)Ala II], 1.02 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H, 1'-H, Ile), 1.31 [d, *J* = 6.5 Hz, 3 H, 4-H, (βMe)Phe II], 1.30–1.35 (m, 1 H, 4-H_a, Ile), 1.39 [d, *J* = 7.2 Hz, 3 H, 4-H, (βMe)Phe I], 1.53 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H, *a*-Thr), 1.54–1.60 [m, 2 H, 3-H_a, (3-Ncp)Ala II, 4-H_b, Ile], 1.67 [dd, *J* = 7.0, 2.0 Hz, 3 H, 3'-H, (4-Pe)Pro], 1.76–1.84 [m, 2 H, 3-H_b, (3-Ncp)Ala II, 3-H_a, (4-Pe)Pro], 1.84–1.95 [m, 3 H, 1'-H, 3'-H_b (3-Ncp)Ala II, 3-H, Ile], 2.37 [ddd, *J* = 13.0, 5.5, 5.5 Hz, 1 H, 3-H_b, (4-Pe)Pro], 2.90 [ddd, *J* = 7.0, 3.5, 3.5 Hz, 1 H, 2'-H, (3-Ncp)Ala I], 3.00 [dq, *J* = 11.0, 6.5 Hz, 1 H, 3-H, (βMe)Phe II], 3.25–3.32 [m, 2 H, 4-H,

5-H_a, (4-Pe)Pro], 3.48 [m, 1 H, 2-H, (3-Ncp)Ala I], 3.67 [dq, $J = 7.0, 4.5$ Hz, 1 H, 3-H, (β Me)Phe I], 3.97 [m, 1 H, 5-H_b, (4-Pe)Pro], 4.02 [ddd, $J = 7.0, 3.5, 3.5$ Hz, 1 H, 2'-H, (3-Ncp)Ala II], 4.26 [dd, $J = 11.5, 6.0$ Hz, 1 H, 2-H, (4-Pe)Pro], 4.36 [dd, $J = 11.0, 11.0$ Hz, 1 H, 2-H, (β Me)Phe II], 4.45 [dd, $J = 9.0, 4.5$ Hz, 1 H, 2-H, (β Me)Phe I], 4.57 (dd, $J = 9.5, 2.5$ Hz, 1 H, 2-H, *a*-Thr), 4.65 (dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, 1 H, 2-H, *Ile*), 5.11 [m, 1 H, 2-H, (3-Ncp)Ala II], 5.26 [m, 1 H, 1'-H, (4-Pe)Pro], 5.40 (dq, $J = 7.0, 2.5$ Hz, 1 H, 3-H, *a*-Thr), 5.62 [dq, $J = 10.5, 7.0$ Hz, 1 H, 2'-H, (4-Pe)Pro], 6.13 (d, $J = 5.0$ Hz, 1 H, 4-H, *Chpca*), 6.44 [d, $J = 7.0$ Hz, 1 H, NH, (3-Ncp)Ala I], 6.78 [d, $J = 10.0$ Hz, 1 H, NH, (β Me)Phe II], 6.79 [d, $J = 9.5$ Hz, 1 H, NH, (β Me)Phe I], 6.84 (d, $J = 5.0$ Hz, 1 H, 3-H, *Chpca*), 7.00–7.02 (m, 1 H, Ar-H), 7.02–7.12 (m, 4 H, Ar-H), 7.14–7.18 (m, 1 H, Ar-H), 7.19–7.22 (m, 4 H, Ar-H), 7.26 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, NH, *Ile*), 8.06 [d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, NH, (3-Ncp)Ala II], 9.08 (d, $J = 9.5$ Hz, 1 H, NH, *Thr*).

Gallium-Hormaomycin (16-Ga)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = -0.64$ [ddd, $J = 7.0, 7.0, 7.0$ Hz, 1 H, 3'-H_a, (3-Ncp)Ala I], -0.11 [ddd, $J = 14.0, 9.0, 4.5$ Hz, 1 H, 3-H_a, (3-Ncp)Ala I], 0.28 [m, 1 H, 1'-H, (3-Ncp)Ala I], 0.50 [ddd, $J = 14.0, 6.0, 5.0$ Hz, 1 H, 3-H_b, (3-Ncp)Ala I], 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H, 5-H, *Ile*), 0.98–1.00 [m, 2 H, 3'-H_b, (3-Ncp)Ala I, 3'-H_a, (3-Ncp)Ala II], 1.01 (d, $J = 7.0$ Hz, 3 H, 1'-H, *Ile*), 1.30 [d, $J = 6.5$ Hz, 3 H, 4-H, (β Me)Phe II], 1.30–1.35 (m, 1 H, 4-H_a, *Ile*), 1.39 [d, $J = 7.2$ Hz, 3 H, 4-H, (β Me)Phe I], 1.53 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H, *a*-Thr), 1.54–1.60 [m, 2 H, 3-H_a, (3-Ncp)Ala II, 4-H_b, *Ile*], 1.67 [dd, $J = 7.0, 2.0$ Hz, 3 H, 3'-H, (4-Pe)Pro], 1.76–1.84 [m, 2 H, 3-H_b, (3-Ncp)Ala II, 3-H_a, (4-Pe)Pro], 1.84–1.95 [m, 3 H, 1'-H, 3'-H_b, (3-Ncp)Ala II, 3-H, *Ile*], 2.37 [ddd, $J = 13.0, 5.5, 5.5$ Hz, 1 H, 3-H_b, (4-Pe)Pro], 2.90 [ddd, $J = 7.0, 3.5, 3.5$ Hz, 1 H, 2'-H, (3-Ncp)Ala I], 2.99 [dq, $J = 11.0, 6.5$ Hz, 1 H, 3-H, (β Me)Phe II], 3.25–3.32 [m, 2 H, 4-H, 5-H_a, (4-Pe)Pro], 3.48 [m, 1 H, 2-H, (3-Ncp)Ala I], 3.67 [dq, $J = 7.0, 4.5$ Hz, 1 H, 3-H, (β Me)Phe I], 3.97 [m, 1 H, 5-H_b, (4-Pe)Pro], 4.02 [ddd, $J = 7.0, 3.5, 3.5$ Hz, 1 H, 2'-H, (3-Ncp)Ala II], 4.27 [dd, $J = 11.5, 6.0$ Hz, 1 H, 2-H, (4-Pe)Pro], 4.38 [dd, $J = 11.0, 11.0$ Hz, 1 H, 2-H, (β Me)Phe II], 4.46 [dd, $J = 9.0, 4.5$ Hz, 1 H, 2-H, (β Me)Phe I], 4.57 (dd, $J = 9.5, 2.5$ Hz, 1 H, 2-H, *a*-Thr), 4.65 (dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, 1 H, 2-H, *Ile*), 5.11 [m, 1 H, 2-H, (3-Ncp)Ala II], 5.25 [m, 1 H, 1'-H, (4-Pe)Pro], 5.40 (dq, $J = 7.0, 2.5$ Hz, 1 H, 3-H, *a*-Thr), 5.62 [dq, $J = 10.5, 7.0$ Hz, 1 H, 2'-H, (4-Pe)Pro], 6.13 (d, $J = 5.0$ Hz, 1 H, 4-H, *Chpca*), 6.44 [d, $J = 7.0$ Hz, 1 H, NH, (3-Ncp)Ala I], 6.78 [d, $J = 10.0$ Hz, 1 H, NH, (β Me)Phe II], 6.79 [d, $J = 9.5$ Hz, 1 H, NH, (β Me)Phe I], 6.81 (d, $J = 5.0$ Hz, 1 H, 3-H, *Chpca*), 7.00–7.02 (m, 1 H, Ar-H), 7.02–7.12 (m, 4 H, Ar-H), 7.14–7.18 (m, 1 H, Ar-H), 7.19–7.22 (m, 4 H, Ar-H), 7.26 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, NH, *Ile*), 8.06 [d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, NH, (3-Ncp)Ala II], 9.08 (d, $J = 9.5$ Hz, 1 H, NH, *Thr*).

2.3 Vorläufer-dirigierte Biosynthese (PDB) an *Streptomyces griseoflavus* (Stamm W 384)

Die Kultivierungen erfolgten unter Standardbedingungen wie in Kap. B.2.1.3. beschrieben. Die potentiellen Vorläufer wurden in 50 mL sterilem Wasser gelöst (Einstellung des pH auf 6.5–7.0) und ab der 24. Stunde über einen Zeitraum von 10 h kontinuierlich zu der Kulturbrühe gepumpt.

2.3.1 Variation der 3-(2'-Nitrocyclopropyl)alanin-Einheit

Alle im Folgenden aufgelisteten Aminosäuren (Tab. 16) sind Syntheseprodukte⁶⁷, hergestellt von DR. B.D. ZLATOPOLSKIJ, AK PROF. DR. A. DE MEIJERE, Universität Göttingen.

Aminosäure	Gefütterte Menge [mmol]	Hormaomycin-Produktion	Hormaomycin-Derivate
<i>rac</i> -2-(2'-Nitrocyclopropyl)glycin	1.0	+	21a–c
	2.0	+	21a–c
<i>rac</i> -5-Nitronorvalin	2.0	+	21a–c
L-5-Nitronorvalin	2.0	+	21a–c
D-5-Nitronorvalin	1.0	+	–
	2.0	+	–
<i>rac</i> -6-Nitronorleucin	2.0	+	26a–c
L-6-Nitronorleucin	1.0	+	26a–c
	2.0	+	26a–c
D-6-Nitronorleucin	2.0	+	–
L-5-Nitro-4-thianorvalin ^a	2.0	+	–
L- <i>ortho</i> -Nitrophenylalanin	1.0	+	–
	2.0	+	–
L-Ornithin	2.0	+	(22a–c)^b

^{a)} Endkonzentration 2.0 mmol, Fütterung in 5 x 0.4 mmol Portionen über jeweils 2 h aufgrund Instabilität der Aminosäure in Lösung; ^{b)} Ergebnis nicht eindeutig (s. Kap. 2.3.1.2, S. 26).

Tab. 16: Zu *Streptomyces griseoflavus* (Stamm W 384) gefütterte Aminosäuren für den Austausch der (3-Ncp)Ala-Einheiten.

2.3.1.1 Isolierung und Charakterisierung der Hormaomycinderivate aus Fütterungsexperimenten mit 5-Nitronorvalin und 2-(2'-Nitrocyclopropyl)glycin

Die Vorläufer wurden unter Standardbedingungen gefüttert. Das Rohprodukt wurde mit eiskaltem Pentan gewaschen und an Kieselgel (Aceton/Cyclohexan 2:3, 120 x 45 mm) chromatographiert. Die Trennung der Derivate **21a–c** erfolgte mit präparativer HPLC (Säule A, 62 % Acetonitril in Wasser + 0.1 % TFA). Die Ausbeuten der Fütterungen sind in Tab. 17 dargestellt.

	Ausbeuten [mg]		
	21a	21b	21c
<i>rac</i> -2-(2'-Nitrocyclopropyl)glycin	~ 0.1	~ 0.1	~ 0.1
<i>rac</i> -5-Nitronorvalin	2.0	1.3	~ 0.1
L-5-Nitronorvalin	2.5	1.5	0.3

Tab. 17: Ausbeuten der Fütterungsexperimente.

Hormaomycin D₁ (**21a**)

C₅₄H₆₉N₁₀O₁₄Cl (1116.47)

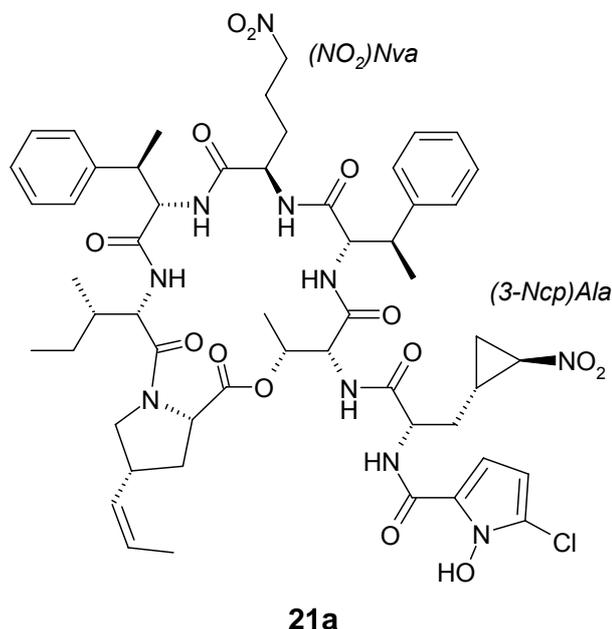
farbloser Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rosa (Ehrlich).

R_t = 23.9 min

(Säule A, 62 % Acetonitril in
Wasser + 0.1 % TFA).



ESI-MS: (pos. Ionen) $m/z = 1139 [M+Na]^+$, $1117 [M+H]^+$.

(neg. Ionen) $m/z = 1115 [M-H]^-$.

HR-ESI-MS: berechnet: 1117.47560 $[M+H]^+$.

gefunden: 1117.47530 ($\Delta = 0.27$ ppm).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.15\text{--}0.21$ [m, 2 H, 4-H, (NO₂)Nva], $0.22\text{--}0.30$ [m, 2 H, 3-H, (NO₂)Nva], 0.89 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H, 5-H, Ile), 1.00 [m, 1 H, 3'-H_a, (3-Ncp)Ala] 1.02 (d,

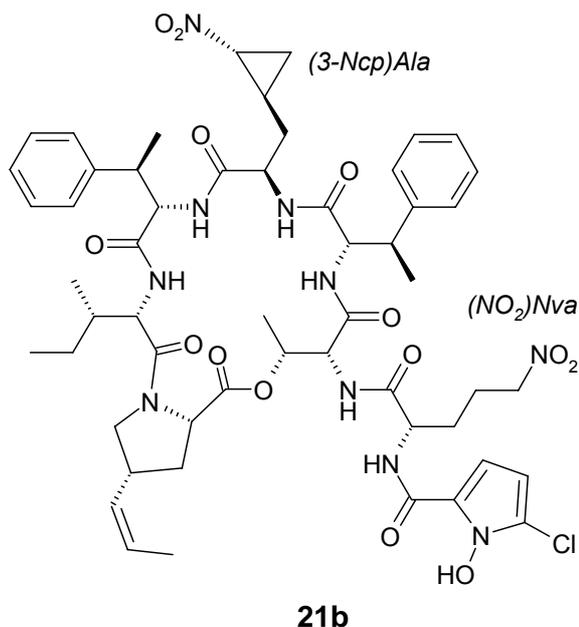
$J = 7.2$ Hz, 3 H, 1'-H, *Ile*), 1.29 [d, $J = 6.6$ Hz, 3 H, 4-H, (β Me)*Phe II*], 1.30–1.35 (m, 1 H, 4-H_a, *Ile*), 1.39 [d, $J = 7.2$ Hz, 3 H, 4-H, (β Me)*Phe I*], 1.53 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H, *a-Thr*), 1.54–1.60 [m, 2 H, 3-H_a (*3-Ncp*)*Ala*, 4-H_b, *Ile*], 1.67 [dd, $J = 7.2$, 1.8 Hz, 3 H, 3'-H, (*4-Pe*)*Pro*], 1.73–1.94 [m, 7 H, 3-H, 1'-H, 3'-H_b (*3-Ncp*)*Ala*, 3-H_a, (*4-Pe*)*Pro*, 3-H, *Ile*], 2.35 [ddd, $J = 13.2$, 5.4, 5.4 Hz, 1 H, 3-H_b, (*4-Pe*)*Pro*], 2.93 [dq, $J = 10.8$, 6.6 Hz, 1 H, 3-H, (β Me)*Phe II*], 3.23–3.33 [m, 3 H, 4-H, 5-H_a, (*4-Pe*)*Pro*, 2-H, (*NO*₂)*Nva*], 3.43–3.52 [m, 2 H, 5-H, (*NO*₂)*Nva*], 3.66 [dq, $J = 3.8$, 7.2 Hz, 1 H, 3-H, (β Me)*Phe I*], 3.97–4.01 [m, 1 H, 5-H_b, (*4-Pe*)*Pro*], 4.03 [ddd, $J = 6.9$, 3.3, 3.3 Hz, 1 H, 2'-H, (*3-Ncp*)*Ala*], 4.26 [dd, $J = 11.1$, 6.3 Hz, 1 H, 2-H, (*4-Pe*)*Pro*], 4.38 [dd, $J = 10.8$, 10.8 Hz, 1 H, 2-H, (β Me)*Phe II*], 4.59 (dd, $J = 9.0$, 2.4 Hz, 1 H, 2-H, *a-Thr*), 4.64 [dd, $J = 10.2$, 3.8 Hz, 1 H, 2-H, (β Me)*Phe I*], 4.65 (dd, $J = 9.0$, 9.0 Hz, 1 H, 2-H, *Ile*), 5.08–5.19 [m, 1 H, 2-H, (*3-Ncp*)*Ala*], 5.23–5.30 [m, 1 H, 1'-H, (*4-Pe*)*Pro*], 5.41 (dq, $J = 6.6$, 2.4 Hz, 1 H, 3-H, *a-Thr*), 5.62 [dq, $J = 10.8$, 7.2 Hz, 1 H, 2'-H, (*4-Pe*)*Pro*], 6.12 (d, $J = 4.8$ Hz, 1 H, 4-H, *Chpca*), 6.40 (d, $J = 7.2$ Hz, 1 H, NH), 6.77 (d, $J = 4.8$ Hz, 1 H, 3-H, *Chpca*), 6.86 (d, $J = 10.2$ Hz, 1 H, NH), 6.99 (d, $J = 10.2$ Hz, 1 H, NH), 7.02–7.12 (m, 4 H, Ar-H), 7.14–7.18 (m, 2 H, Ar-H), 7.19–7.22 (m, 4 H, Ar-H, NH), 7.33 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, NH), 8.00 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, NH), 9.11 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, NH);

¹³C-NMR (150.8 MHz, CDCl₃): $\delta =$ ¹³C NMR (150.8 MHz, CDCl₃): $\delta =$ 10.5 (+, C-5, *Ile*), 13.3 [+ , C-3', (*4-Pe*)*Pro*], 13.5 [+ , C-4, (β Me)*Phe I*], 15.0 (+, C-1', *Ile*), 17.5 (+, C-4, *a-Thr*), 18.5 [+ , C-4, (β Me)*Phe II*], 19.3 [–, C-3', (*3-Ncp*)*Ala*], 21.7 [–, C-4, (*NO*₂)*Nva*], 22.7 [+ , C-1', (*3-Ncp*)*Ala*], 25.0 (–, C-4, *Ile*), 31.9 [–, C-3, (*NO*₂)*Nva*], 35.0 [–, C-3, (*3-Ncp*)*Ala*], 35.5 [–, C-3, (*4-Pe*)*Pro*], 36.7 [+ , C-4, (*4-Pe*)*Pro*], 38.0 (+, C-3, *Ile*), 39.4 [+ , C-3, (β Me)*Phe I*], 42.4 [+ , C-3, (β Me)*Phe II*], 50.9 [+ , C-2, (*3-Ncp*)*Ala*], 51.2 [+ , C-2, (*NO*₂)*Nva*], 52.4 [–, C-5, (*4-Pe*)*Pro*], 54.6 (+, C-2, *Ile*), 54.9 (+, C-2, *a-Thr*), 59.1 [+ , C-2', (*3-Ncp*)*Ala*], 59.56 [+ , C-2, (β Me)*Phe II*], 59.64 [+ , C-2, (β Me)*Phe I*], 61.4 [+ , C-2, (*4-Pe*)*Pro*], 69.1 (+, C-3, *a-Thr*), 74.4 [–, C-5, (*NO*₂)*Nva*], 103.8 (+, C-4, *Chpca*), 109.9 (+, C-3, *Chpca*), 119.7 (C_{quat}, C-2, *Chpca*), 120.2 (C_{quat}, C-5, *Chpca*), 126.9, 127.1, 127.2, 127.5, 127.8, 128.3, 128.4, 128.6 [+ , C-1', C-2', (*4-Pe*)*Pro*, Ar-C], 141.6, 141.8 (C_{quat}, Ar-C), 159.3 (C_{quat}, C-1, *Chpca*), 168.8, 169.5, 169.9, 170.9, 171.3, 171.6, 171.9 (C_{quat}, C-1).

Hormaomycin D₂ (21b)C₅₄H₆₉N₁₀O₁₄Cl (1116.47)

farbloser Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rosa (Ehrlich).**R_t** = 21.9 min(Säule A, 62 % Acetonitril in Wasser
+ 0.1 % TFA).**ESI-MS:** (pos. Ionen) $m/z = 1139 [M+Na]^+$, $1117 [M+H]^+$.(neg. Ionen) $m/z = 1115 [M-H]^-$.**HR-ESI-MS:** berechnet: 1117.47557 $[M+H]^+$.gefunden: 1117.47526 ($\Delta = 0.28$ ppm).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = -0.72-0.59$ [m, 1 H, 3'-H_a, (3-Ncp)Ala], $-0.19-0.06$ [m, 1 H, 3-H_a, (3-Ncp)Ala], $0.25-0.34$ [m, 1 H, 1'-H, (3-Ncp)Ala], 0.55 [ddd, $J = 14.4, 4.8, 4.8$ Hz, 1 H, 3-H_b, (3-Ncp)Ala], 0.92 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H, 5-H, Ile), $0.97-1.04$ [m, 1 H, 3'-H_b, (3-Ncp)Ala], 1.06 (d, $J = 7.2$ Hz, 3 H, 1'-H, Ile), $1.24-1.32$ (m, 1 H, 4-H_a, Ile), 1.30 [d, $J = 7.2$ Hz, 3 H, 4-H, (β Me)Phe II], 1.42 [d, $J = 7.2$ Hz, 3 H, 4-H, (β Me)Phe I], 1.53 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H, *a*-Thr), $1.58-1.65$ (m, 1 H, 4-H_b, Ile), $1.67-1.76$ [m, 1 H, 3-H_a, (NO₂)Nva], 1.69 [dd, $J = 7.2, 1.8$ Hz, 3 H, 3'-H, (4-Pe)Pro], $1.76-1.84$ [m, 2 H, 3-H_b, (NO₂)Nva, 3-H_a, (4-Pe)Pro], $1.85-1.92$ (m, 1 H, 3-H, Ile), $1.92-2.09$ [m, 2 H, 4-H, (NO₂)Nva], 2.38 [ddd, $J = 12.0, 5.4, 5.4$ Hz, 1 H, 3-H_b, (4-Pe)Pro], 2.91 [ddd, $J = 6.6, 3.0, 3.0$ Hz, 1 H, 2'-H, (3-Ncp)Ala], 3.04 [dq, $J = 11.1, 7.2$ Hz, 1 H, 3-H, (β Me)Phe II], $3.24-3.34$ [m, 2 H, 4-H, 5-H_a, (4-Pe)Pro], $3.45-3.52$ [m, 1 H, 2-H, (3-Ncp)Ala], 3.69 [dq, $J = 4.2, 7.2$ Hz, 1 H, 3-H, (β Me)Phe I], $3.95-4.03$ [m, 1 H, 5-H_b, (4-Pe)Pro], 4.26 [dd, $J = 11.7, 6.0$ Hz, 1 H, 2-H, (4-Pe)Pro], 4.36 [t, $J = 6.6$ Hz, 2 H, 5-H, (NO₂)Nva], 4.37 [dd, $J = 11.0, 11.0$ Hz, 1 H, 2-H, (β Me)Phe II], 4.49 [dd, $J = 9.3, 4.2$ Hz, 1 H, 2-H, (β Me)Phe I], 4.56 (dd, $J = 9.0, 2.4$ Hz, 1 H, 2-H, *a*-Thr), 4.66 (dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, 1 H, 2-H, Ile), 5.04 [ddd, $J = 9.0, 9.0, 7.2$ Hz, 1 H, 2-H, (NO₂)Nva], $5.24-5.31$ [m, 1 H, 1'-H, (4-Pe)Pro], 5.38 (dq, $J = 7.2, 2.4$ Hz, 1 H, 3-H, *a*-Thr), 5.64 [dq, $J = 10.8, 7.2$ Hz, 1 H, 2'-H, (4-Pe)Pro], 6.14 (d, $J = 4.8$ Hz, 1 H, 4-H, Chpca), 6.46 (d, $J = 6.6$ Hz, 1 H, NH), $6.75-6.84$ (br, 1 H, NH), 6.82 (d, $J = 4.8$ Hz, 1 H, 3-H, Chpca), 6.88 (d, $J = 9.6$ Hz, 1 H, NH), $7.02-7.05$

(*4-Pe*)*Pro*], 1.68–1.73 [m, 1 H, 3-H_a, (*NO*₂)*Nva II*], 1.75–1.83 [m, 3 H, 3-H_b, 4-H_a, (*NO*₂)*Nva II*, 4-H_b, *Ile*], 1.83–2.03 [m, 3 H, 4-H_b, (*NO*₂)*Nva II*, 3-H, *Ile*, 3-H_a, (*4-Pe*)*Pro*], 2.35 [ddd, *J* = 12.0, 6.0, 6.0 Hz, 1 H, 3-H_b, (*4-Pe*)*Pro*], 2.94 [dq, *J* = 10.6, 7.2 Hz, 1 H, 3-H, (*βMe*)*Phe II*], 3.21–3.31 [m, 3 H, 4-H, 5-H_a, (*4-Pe*)*Pro*, 2-H, (*NO*₂)*Nva I*], 3.42–3.54 [m, 2 H, 5-H, (*NO*₂)*Nva I*], 3.66 [dq, *J* = 5.4, 7.8 Hz, 1 H, 3-H, (*βMe*)*Phe I*], 3.96–4.00 [m, 1 H, 5-H_b, (*4-Pe*)*Pro*], 4.24 [dd, *J* = 11.7, 6.0 Hz, 1 H, 2-H, (*4-Pe*)*Pro*], 4.34 [dd, *J* = 6.6, 6.6 Hz, 2 H, 5-H, (*NO*₂)*Nva II*], 4.37 [dd, *J* = 10.6, 10.6 Hz, 1 H, 2-H, (*βMe*)*Phe II*], 4.57 (dd, *J* = 9.3, 2.4 Hz, 1 H, 2-H, *a-Thr*), 4.61–4.67 [m, 2 H, 2-H, (*βMe*)*Phe I*, 2-H, *Ile*], 5.00 [ddd, *J* = 7.2, 7.2, 7.2 Hz, 1 H, 2-H, (*NO*₂)*Nva II*], 5.22–5.28 [m, 1 H, 1'-H, (*4-Pe*)*Pro*], 5.37 (dq, *J* = 7.2, 2.4 Hz, 1 H, 3-H, *a-Thr*), 5.62 [dq, *J* = 10.8, 6.6 Hz, 1 H, 2'-H, (*4-Pe*)*Pro*], 6.12 (d, *J* = 4.5 Hz, 1 H, 4-H, *Chpca*), 6.36 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, NH), 6.75 (d, *J* = 4.5 Hz, 1 H, 3-H, *Chpca*), 6.92 (d, *J* = 9.6 Hz, 1 H, NH), 6.94 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, NH), 7.06–7.13 (m, 4 H, Ar-H), 7.14–7.17 (m, 2 H, Ar-H), 7.18–7.21 (m, 4 H, Ar-H, NH), 7.38 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, NH), 7.91 (d, *J* = 9.6 Hz, 1 H, NH), 9.11 (d, *J* = 9.6 Hz, 1 H, NH).

¹³C-NMR (150.8 MHz, CDCl₃): δ = 10.5 (+, C-5, *Ile*), 13.3 [+ , C-3', (*4-Pe*)*Pro*], 13.6 [+ , C-4, (*βMe*)*Phe I*], 14.8 (+, C-1', *Ile*), 17.1 (+, C-4, *a-Thr*), 18.0 [+ , C-4, (*βMe*)*Phe II*], 21.4 [–, C-4, (*NO*₂)*Nva II*], 21.8 [–, C-4, (*NO*₂)*Nva I*], 25.0 (–, C-3, *Ile*), 29.4 [–, C-3, (*NO*₂)*Nva II*], 31.9 [–, C-3, (*NO*₂)*Nva I*], 35.6 [–, C-3, (*4-Pe*)*Pro*], 36.7 [+ , C-4, (*4-Pe*)*Pro*], 38.1 (+, C-3, *Ile*), 39.4 [+ , C-3, (*βMe*)*Phe I*], 42.5 [+ , C-3, (*βMe*)*Phe II*], 51.2 [+ , C-2, (*NO*₂)*Nva I*], 52.5 [–, C-5, (*4-Pe*)*Pro*], 52.8 [+ , C-2, (*NO*₂)*Nva II*], 54.6 (+, C-2, *Ile*), 54.9 (+, C-2, *a-Thr*), 59.56 [+ , C-2, (*βMe*)*Phe II*], 59.63 [+ , C-2, (*βMe*)*Phe I*], 61.4 [+ , C-1, (*4-Pe*)*Pro*], 69.3 (+, C-3, *a-Thr*), 74.4 [–, C-5, (*NO*₂)*Nva I*], 75.0 [–, C-5, (*NO*₂)*Nva II*], 103.8 (+, C-4, *Chpca*), 109.8 (+, C-3, *Chpca*), 119.7 (C_{quat}, C-2, *Chpca*), 121.7 (C_{quat}, C-5, *Chpca*), 126.9, 127.16, 127.20, 127.6, 128.5, 128.6 [+ , Ar-C], 127.8 [+ , C-1', (*4-Pe*)*Pro*], 128.3 [+ , C-2', (*4-Pe*)*Pro*], 141.6, 141.8 (C_{quat}, Ar-C), 159.3 (C_{quat}, C-1, *Chpca*), 168.8, 169.4, 169.9, 170.9, 171.3, 171.7, 172.3 (C_{quat}, C-1).

2.3.1.2 Isolierung und Charakterisierung der Hormaomycinderivate aus Fütterungsexperimenten mit 6-Nitronorleucin

Die Vorläufer wurden unter Standardbedingungen (s. Kap. B.2.3) gefüttert. Das Rohprodukt wurde mit eiskaltem Pentan gewaschen und an Kieselgel (Aceton/Cyclohexan 2:3, 120 x 45 mm) chromatographiert. Die Trennung der Derivate **26a–c** erfolgte mit präparativer HPLC (63 % Acetonitril in Wasser, Säule E). Die Ausbeuten sind in Tab. 18 dargestellt.

	26a	26b	26c
<i>rac</i> -6-Nitronorleucin	1.9	1.0	~ 1.5 ^a
L-6-Nitronorleucin	2.2	0.9	~1.3 ^a

^a Nur als Gemisch mit Hormaomycin isolierbar, Ausbeute abgeleitet aus ¹H-NMR-Intensitäten des Gemisches (16/26c ~ 3:1).

Tab. 18: Ausbeuten der Fütterungsexperimente mit Nitronorleucin-Vorläufern.

Hormaomycin E₁ (26a)

C₅₅H₇₁N₁₀O₁₄Cl (1130.48)

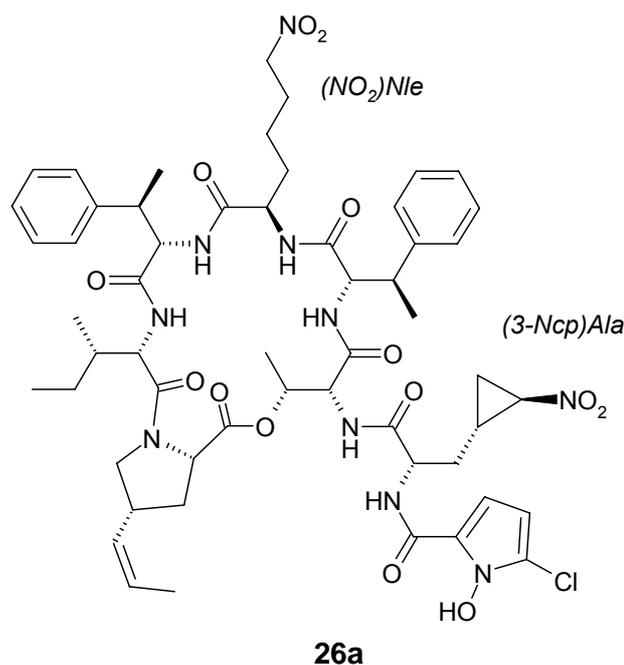
farbloser Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rosa (Ehrlich).

R_t = 48.4 min

(Säule E; 63 % Acetonitril in H₂O).



ESI-MS: (pos. Ionen) $m/z = 1153 [M+Na]^+$, $1131 [M+H]^+$.

(neg. Ionen) $m/z = 1129 [M-H]^-$.

HR-ESI-MS: berechnet: $1131.49125 [M+H]^+$, $1148.51780 [M+NH_4]^+$, $1153.47320 [M+Na]^+$.

gefunden: $1131.49133 (\Delta = 0.07 \text{ ppm})$, $1148.51836 (\Delta = 0.49 \text{ ppm})$,

$1153.47282 (\Delta = 0.33 \text{ ppm})$.

UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 281 (4.12) \text{ nm}$;

(MeOH, HCl): $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 273 (4.07) \text{ nm}$;

(MeOH, NaOH): $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 281 (4.05) \text{ nm}$.

CD (MeOH): $\lambda_{\text{max}} ([\Theta]^{20}) = 276 (+27000)$, $223 (-44000)$, $207 (-1100) \text{ nm}$.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3409 (\text{br})$, 2937 , 2358 , 1642 , 1538 , $1445 (\text{sh})$, 1376 , 1249 , 1181 , $1048 (\text{sh}) \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = -0.29 [m, 2 \text{ H}, 4\text{-H}, (\text{NO}_2)\text{Nle}]$, $0.12 [m, 2 \text{ H}, 5\text{-H}, (\text{NO}_2)\text{Nle}]$, $0.88 (t, J = 7.5 \text{ Hz}, 3 \text{ H}, 5\text{-H}, \text{Ile})$, $1.00 [m, 1 \text{ H}, 3'\text{-H}_a, (3\text{-Ncp})\text{Ala}]$, $1.02 (d, J = 7.0 \text{ Hz}, 3 \text{ H}, 5\text{-H})$.

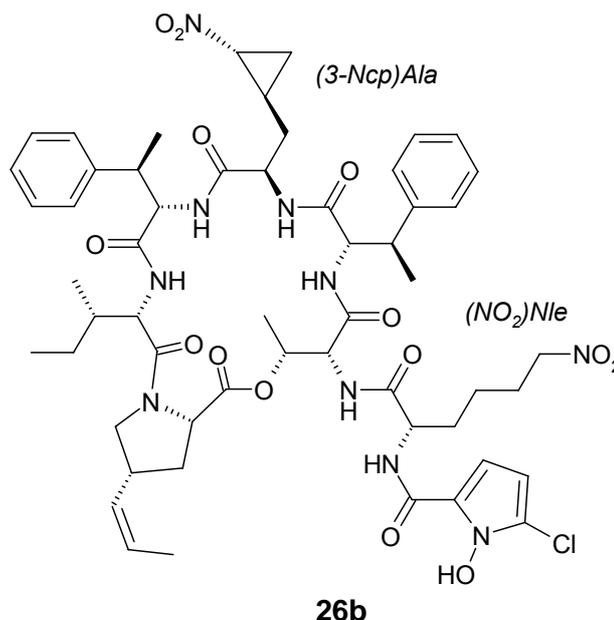
H, *Ile*), 1.15–1.20 [m, 2 H, 3-H, (*NO*₂)*Nle*], 1.28 [d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, 4-H, (*βMe*)*Phe I*], 1.30–1.32 (m, 1 H, 4-H_a, *Ile*), 1.40 [d, *J* = 7.0 Hz, 3 H, 4-H, (*βMe*)*Phe I*], 1.53 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H, 4-H, *a-Thr*), 1.55–1.61 [m, 2 H, 4-H_b, *Ile*, 3-H_a, (*3-Ncp*)*Ala*], 1.67 [dd, *J* = 7.0, 1.5 Hz, 3 H, 3'-H, (*4-Pe*)*Pro*], 1.80–1.90 [m, 5 H, 3-H_b, 1'-H, 3'-H_b (*3-Ncp*)*Ala*, 3-H_a, (*4-Pe*)*Pro*, 3-H, *Ile*], 2.35 [ddd, *J* = 11.5, 6.0, 5.5 Hz, 1 H, 3-H_b, (*4-Pe*)*Pro*], 2.95 [dq, *J* = 10.5, 7.0 Hz, 1 H, 3-H, (*βMe*)*Phe II*], 3.25–3.29 [m, 3 H, 4-H, 5-H_a, (*4-Pe*)*Pro*, 2-H, (*NO*₂)*Nle*], 3.66 [dq, *J* = 4.5, 7.0 Hz, 1 H, 3-H, (*βMe*)*Phe I*], 3.83–3.87 [m, 2 H, 6-H, (*NO*₂)*Nle*], 3.97–4.01 [m, 1 H, 5-H_b, (*4-Pe*)*Pro*], 4.03 [ddd, *J* = 7.0, 3.5, 3.5 Hz, 1 H, 2'-H, (*3-Ncp*)*Ala*], 4.26 [dd, *J* = 11.5, 6.0 Hz, 1 H, 2-H, (*4-Pe*)*Pro*], 4.40 [dd, *J* = 10.5, 10.5 Hz, 1 H, 2-H, (*βMe*)*Phe II*], 4.60 (dd, *J* = 9.5, 2.5 Hz, 1 H, 2-H, *a-Thr*), 4.64 [dd, *J* = 10.0, 5.0 Hz, 1 H, 2-H, (*βMe*)*Phe I*], 4.64 (dd, *J* = 9.0, 9.0 Hz, 1 H, 2-H, *Ile*), 5.09–5.17 [m, 1 H, 2-H, (*3-Ncp*)*Ala*], 5.23–5.29 [m, 1 H, 1'-H, (*4-Pe*)*Pro*], 5.41 (dq, *J* = 7.0, 2.5 Hz, 1 H, 3-H, *a-Thr*), 5.62 [dq, *J* = 10.5, 7.0 Hz, 1 H, 2'-H, (*4-Pe*)*Pro*], 6.09 (d, *J* = 4.5 Hz, 1 H, 4-H, *Chpca*), 6.80 (d, *J* = 4.5 Hz, 1 H, 3-H, *Chpca*), 6.81 (d, *J* = 7.0 Hz, 1 H, NH), 6.86 (d, *J* = 10.0 Hz, 1 H, NH), 7.08–7.14 (m, 4 H, Ar-H), 7.18–7.25 (m, 7 H, Ar-H, NH), 7.35 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, NH), 7.98 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, NH), 9.09 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, NH).

¹³C-NMR (150.8 MHz, CDCl₃): δ = 10.5 (+, C-5, *Ile*), 13.3 [+ , C-3', (*4-Pe*)*Pro*], 13.5 [+ , C-4, (*βMe*)*Phe I*], 14.9 (+, C-1', *Ile*), 17.0 (+, C-4, *a-Thr*), 17.5 [–, C-3', (*3-Ncp*)*Ala*], 18.4 [+ , C-4, (*βMe*)*Phe II*], 20.4 [–, C-4, (*NO*₂)*Nle*], 21.7 [+ , C-1', (*3-Ncp*)*Ala*], 25.0 (–, C-4, *Ile*), 26.8 [–, C-3, (*NO*₂)*Nle*], 32.2 [–, C-5, (*NO*₂)*Nle*], 34.9 [–, C-3, (*3-Ncp*)*Ala*], 35.5 [–, C-3, (*4-Pe*)*Pro*], 36.7 [+ , C-4, (*4-Pe*)*Pro*], 37.9 (+, C-3, *Ile*), 39.3 [+ , C-3, (*βMe*)*Phe I*], 42.2 [+ , C-3, (*βMe*)*Phe II*], 51.1 [+ , C-2, (*3-Ncp*)*Ala*], 52.8 [–, C-5, (*4-Pe*)*Pro*], 53.0 [+ , C-2, (*NO*₂)*Nle*], 54.6 (+, C-2, *Ile*), 54.9 (+, C-2, *a-Thr*), 59.1 [+ , C-2', (*3-Ncp*)*Ala*], 59.7 [+ , C-2, (*βMe*)*Phe II*], 59.7 [+ , C-2, (*βMe*)*Phe I*], 61.4 [+ , C-2, (*4-Pe*)*Pro*], 69.1 (+, C-3, *a-Thr*), 74.6 [–, C-6, (*NO*₂)*Nle*], 103.6 (+, C-4, *Chpca*), 110.0 (+, C-3, *Chpca*), 119.5 (C_{quat}, C-2, *Chpca*), 121.5 (C_{quat}, C-5, *Chpca*), 127.0, 127.2, 127.4, 127.7, 128.5, 128.7 [+ , C-1', C-2', (*4-Pe*)*Pro*, Ar-C], 141.7, 141.9 (C_{quat}, Ar-C), 159.3 (C_{quat}, C-1, *Chpca*), 168.8, 169.7, 170.0, 170.7, 171.2, 171.6, 171.8 (C_{quat}, C-1).

Hormaomycin E₂ (26b)C₅₅H₇₁N₁₀O₁₄Cl (1130.48)

farbloser Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rosa (Ehrlich).**R_t** = 43.0 min(Säule E; 63 % Acetonitril in H₂O).**ESI-MS:** (pos. Ionen) $m/z = 1153 [M+Na]^+$, $1131 [M+H]^+$.(neg. Ionen) $m/z = 1129 [M-H]^-$.**HR-ESI-MS:** berechnet: $1131.49125 [M+H]^+$, $1148.51780 [M+NH_4]^+$, $1153.47320 [M+Na]^+$.gefunden: $1131.49080 (\Delta = 0.40 \text{ ppm})$, $1148.51781 (\Delta = 0.01 \text{ ppm})$, $1153.47240 (\Delta = 0.70 \text{ ppm})$.**UV** (MeOH): $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 275 (4.19) \text{ nm}$;(MeOH, HCl): $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 272 (4.06) \text{ nm}$;(MeOH, NaOH): $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 283 (3.91) \text{ nm}$.**CD** (MeOH): $\lambda_{\text{max}} ([\Theta]^{20}) = 219 (-52000)$, $280 (11100) \text{ nm}$.**IR** (KBr): $\tilde{\nu} = 3430 (\text{br})$, 2939 , 2356 , 1637 , 1544 , 1443 , 1382 , $1253 (\text{sh})$, 1185 , $1079 (\text{sh}) \text{ cm}^{-1}$.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = -0.65$ [ddd, $J = 7.0, 7.0, 7.0 \text{ Hz}$, 1 H, 3'-H_a, (3-Ncp)Ala], -0.13 [ddd, $J = 14.0, 9.0, 4.5 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H_a, (3-Ncp)Ala], $0.27-0.33$ [m, 1 H, 1'-H, (3-Ncp)Ala], 0.51 [ddd, $J = 14.0, 5.0, 5.0 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H_b, (3-Ncp)Ala], 0.90 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3 H, 5-H, lle), $0.98-1.00$ [m, 1 H, 3'-H_b, (3-Ncp)Ala], 1.02 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3 H, 1'-H, lle), $1.28-1.30$ [m, 2 H, 3-H, (NO₂)Nle], 1.30 [d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3 H, 4-H, (βMe)Phe II], $1.29-1.32$ (m, 1 H, 4-H_a, lle), $1.33-1.37$ [m, 2 H, 4-H, (NO₂)Nle], 1.39 [d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3 H, 4-H, (βMe)Phe I], 1.50 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3 H, 4-H, a-Thr), $1.52-1.56$ (m, 1 H, 4-H_b, lle), 1.67 [dd, $J = 7.0, 1.5 \text{ Hz}$, 3 H, 3'-H, (4-Pe)Pro], $1.80-1.86$ [m, 2 H, 3-H_a, (4-Pe)Pro, 3-H, lle], $1.94-1.98$ [m, 2 H, 5-H, (NO₂)Nle], 2.36 [ddd, $J = 11.5, 6.0, 5.5 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H_b, (4-Pe)Pro], 2.93 [ddd, $J = 7.0, 3.5, 3.5 \text{ Hz}$, 1 H, 2'-H, (3-Ncp)Ala], $2.98-3.00$ [m, 1 H, 3-H, (βMe)Phe II], $3.25-3.28$ [m, 2 H, 4-H, 5-H_a, (4-Pe)Pro], $3.49-3.53$ [m, 1 H, 2-H, (3-Ncp)Ala], 3.67 [dq, $J = 7.0, 4.5 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H,

(β Me)Phe I], 3.96–4.00 [m, 1 H, 5-H_b, (4-Pe)Pro], 4.29 [dd, $J = 12.0, 5.5$ Hz, 1 H, 2-H, (4-Pe)Pro], 4.36 [t, $J = 7.0$ Hz, 2 H, 6-H, (NO₂)Nle], 4.40 [dd, $J = 10.0, 10.0$ Hz, 1 H, 2-H, (β Me)Phe II] 4.48 [dd, $J = 9.0, 4.5$ Hz, 1 H, 2-H, (β Me)Phe I], 4.54 (dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, 1 H, 2-H, *a*-Thr), 4.64 (dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, 1 H, 2-H, *Ile*), 4.95 [dt, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1 H, 2-H, (NO₂)Nle], 5.22–5.28 [m, 1 H, 1'-H, (4-Pe)Pro], 5.38 (dq, $J = 7.0, 2.5$ Hz, 1 H, 3-H, *a*-Thr), 5.62 [dq, $J = 10.5, 7.0$ Hz, 1 H, 2'-H, (4-Pe)Pro], 6.12 (d, $J = 4.5$ Hz, 1 H, 4-H, *Chpca*), 6.63 (d, $J = 7.0$ Hz, 1 H, NH), 6.81 (d, $J = 4.5$ Hz, 1 H, 3-H, *Chpca*), 6.88 (d, $J = 10.0$ Hz, 1 H, NH), 7.06–7.13 (m, 4 H, Ar-H), 7.14–7.17 (m, 2 H, Ar-H), 7.18–7.21 (m, 5 H, Ar-H, NH), 7.37 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, NH), 7.97 (d, $J = 9.6$ Hz, 1 H, NH), 8.99 (d, $J = 9.6$ Hz, 1 H, NH).

¹³C-NMR (150.8 MHz, CDCl₃): $\delta = 10.6$ (+, C-5, *Ile*), 13.3 [+ , C-3', (4-Pe)Pro], 13.3 [+ , C-4, (β Me)Phe I], 14.9 (+, C-1', *Ile*), 14.9 (–, C-3', (3-Ncp)Ala], 17.0 (+, C-4, *a*-Thr), 17.8 [+ , C-4, (β Me)Phe II], 20.0 [+ , C-1', (3-Ncp)Ala], 22.3 [–, C-4, (NO₂)Nle], 25.0 (–, C-4, *Ile*), 27.2 [–, C-3, (NO₂)Nle], 29.7 [–, C-5, (NO₂)Nle], 33.1 [–, C-3, (3-Ncp)Ala], 35.6 [–, C-3, (4-Pe)Pro], 36.7 [+ , C-4, (4-Pe)Pro], 37.9 (+, C-3, *Ile*), 39.3 [+ , C-3, (β Me)Phe I], 41.8 [+ , C-3, (β Me)Phe II], 51.7 [+ , C-2, (NO₂)Nle], 51.7 [+ , C-2, (3-Ncp)Ala], 52.8 [–, C-5, (4-Pe)Pro], 54.6 (+, C-2, *Ile*), 54.8 (+, C-2, *a*-Thr), 58.1 [+ , C-2', (3-Ncp)Ala], 59.8 [+ , C-2, (β Me)Phe II], 59.9 [+ , C-2, (β Me)Phe I], 61.4 [+ , C-2, (4-Pe)Pro], 69.3 (+, C-3, *a*-Thr), 75.1 [–, C-6, (NO₂)-Nle], 103.5 (+, C-4, *Chpca*), 109.5 (+, C-3, *Chpca*), 127.0, 127.2, 127.2, 127.4 (+, Ar-C), 127.5 [+ , C-1', (4-Pe)Pro], 127.7 (+, Ar-C), 128.3 [+ , C-2', (4-Pe)Pro], 128.5, 128.6 (+, Ar-C), 142.1, 141.8 (C_{quat}, Ar-C), 168.7, 170.7, 171.3, 171.5, 172.5 (C_{quat}, C-1).

Hormaomycin (16)/ Hormaomycin E₃ (26c)

Mischfraktion (1:3)

C₅₅H₇₃N₁₀O₁₄Cl (1132.50)

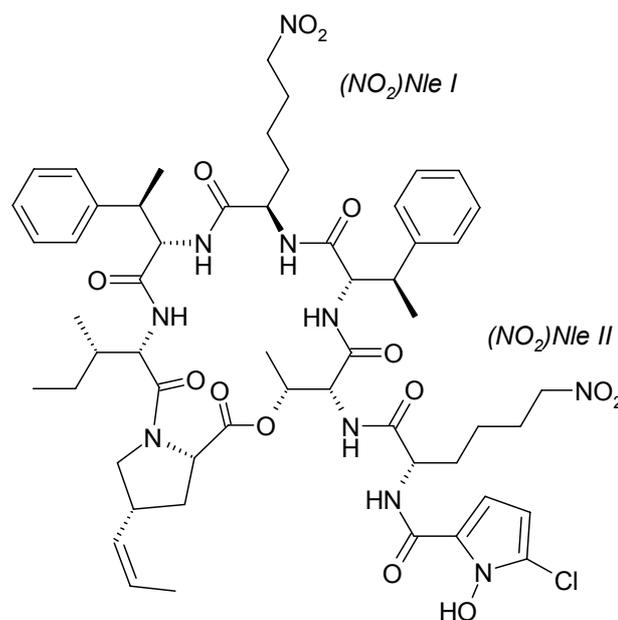
farbloser Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rosa (Ehrlich).

R_t = 45.1 min

(Säule E; 63 % Acetonitril in H₂O).



26c

ESI-MS: (pos. Ionen) $m/z = 1155 [M+Na]^+$, $1133 [M+H]^+$.

(neg. Ionen) $m/z = 1131 [M-H]^-$.

HR-ESI-MS: Aufgrund von Überlagerungen der Signale von **26c** mit Isotopenpeaks von **16** lässt sich keine Hochauflösung gewinnen (s. Kap. 2.3.1.4).

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3444$ (br), 2932, 1636, 1384, 1165, 1114, 1073, 1028 (sh) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): $\delta = -0.29$ [m, 2 H, 4-H, (NO_2)Nle I], 0.12 [m, 2 H, 5-H, (NO_2)Nle I], 0.88 (t, $J = 7.5$ Hz, 3 H, 5-H, Ile), 1.02 (d, $J = 7.0$ Hz, 3 H, 5-H, Ile), 1.15–1.20 [m, 2 H, 3-H, (NO_2)Nle I], 1.28 [d, $J = 6.6$ Hz, 3 H, 4-H, (βMe)Phe II], 1.28–1.30 [m, 2 H, 3-H, (NO_2)Nle II], 1.30–1.32 (m, 1 H, 4-H_a, Ile), 1.40 [d, $J = 7.0$ Hz, 3 H, 4-H, (βMe)Phe I], 1.53 (d, $J = 7.0$ Hz, 3 H, 4-H, *a*-Thr), 1.55–1.61 (m, 1 H, 4-H_b, Ile), 1.67 [dd, $J = 7.0, 1.5$ Hz, 3 H, 3'-H, (*4*-Pe)Pro], 1.77–1.83 [m, 2 H, 3-H_a, (*4*-Pe)Pro, 3-H, Ile], 1.93–1.98 [m, 2 H, 5-H, (NO_2)Nle II] 2.35 [ddd, $J = 11.5, 6.0, 5.5$ Hz, 1 H, 3-H_b, (*4*-Pe)Pro], 2.95 [dq, $J = 10.5, 7.0$ Hz, 1 H, 3-H, (βMe)Phe II], 3.25–3.29 [m, 3 H, 4-H, 5-H_a, (*4*-Pe)Pro, 2-H, (NO_2)Nle I], 3.66 [dq, $J = 4.5, 7.0$ Hz, 1 H, 3-H, (βMe)Phe I], 3.81–3.90 [m, 2 H, 6-H, (NO_2)Nle I], 3.97–4.01 [m, 1 H, 5-H_b, (*4*-Pe)Pro], 4.23 [dd, $J = 11.5, 6.0$ Hz, 1 H, 2-H, (*4*-Pe)Pro], 4.34–4.40 [m, 3 H, 2-H, (βMe)Phe II, 6-H, (NO_2)Nle II], 4.55 (dd, $J = 9.5, 2.5$ Hz, 1 H, 2-H, *a*-Thr), 4.59–4.67 [m, 2 H, 2-H, (βMe)Phe I, 2-H, Ile), 4.91–4.97 [m, 1 H, 2-H, (NO_2)Nle II], 5.23–5.29 [m, 1 H, 1'-H, (*4*-Pe)Pro], 5.34 (dq, $J = 7.0, 2.5$ Hz, 1 H, 3-H, *a*-Thr), 5.62 [dq, $J = 10.5, 7.0$ Hz, 1 H, 2'-H, (*4*-Pe)Pro], 6.08 (d, $J = 4.5$ Hz, 1 H, 4-H, *Chpca*), 6.75 (d, $J = 4.5$ Hz, 1 H, 3-H, *Chpca*), 6.81 (d, $J = 7.0$ Hz, 1 H, NH), 6.86 (d, $J = 10.0$ Hz, 1 H, NH), 7.08–7.14 (m, 4 H, Ar-H), 7.18–7.25 (m, 7 H, Ar-H, NH), 7.35 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, NH).

2.3.2 Variation der 3-Methylphenylalanin-Einheiten

Die Vorläufer wurden in 50 mL sterilem Wasser/DMSO (4:1) gelöst und unter Standardbedingungen (s. Kap. B.2.3) gefüttert.

Aminosäure	Gefütterte Menge [mmol]	Hormaomycin-Produktion	Derivate
<i>o</i> -Fluorphenylalanin	2.0	+	30a–c^a
<i>m</i> -Fluorphenylalanin	2.0	+	31a–c^a
<i>p</i> -Fluorphenylalanin	2.0	+	32a,b/ 33a,b^a
<i>p</i> -Chlorphenylalanin	2.0	+	33a–c
<i>p</i> -Bromphenylalanin	2.0	+	33a–c
L-Tyrosin	2.0	+	–
<i>p</i> -Nitrophenylalanin	2.0	+	33a,b
Phenylglycin	2.0	+	–

Tab. 19: Fütterungen von Vorläufern der (β Me)Phe-Einheiten.

2.3.2.1 Isolierung und Charakterisierung der Hormaomycinderivate aus Fütterungsexperimenten mit *para*-substituierten Phenylalaninderivaten

Das Rohprodukt wurde mit eiskaltem Pentan gewaschen und an Kieselgel (Aceton/Cyclohexan 2:3, 120 x 45 mm) chromatographiert. Die Trennung von **16** und den Derivaten **33a–c** erfolgte mit präparativer HPLC (70 % Acetonitril in H₂O + 0.1% TFA; Säule B). Die Ausbeuten sind in Tab. 20 dargestellt. Die fluorierten Derivate **32a,b** konnten nicht von **16** getrennt werden.

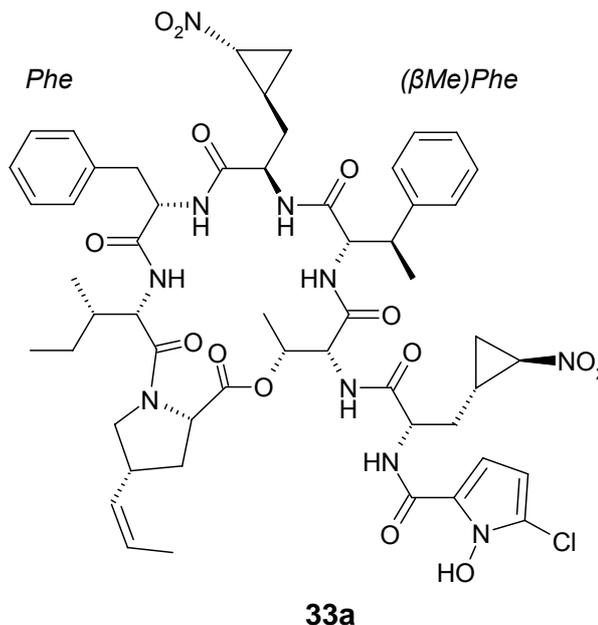
	Ausbeute [mg]		
	33a	33b	33c
<i>p</i> -Fluorphenylalanin	≈ 0.2	≈ 0.2	–
<i>p</i> -Chlorphenylalanin	1.4	1.4	0.7
<i>p</i> -Bromphenylalanin	0.5	0.5	≈ 0.1
<i>p</i> -Nitrophenylalanin	≈ 0.1	≈ 0.1	–

Tab. 20: Ausbeuten aus Fütterungen von *para*-halogenierten Phenylalaninen.

Hormaomycin J₁ (33a)C₅₄H₆₇N₁₀O₁₄Cl (1114.45)

farbloser Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rosa (Ehrlich).**R_t** = 16.2 min(Säule B; 70 % Acetonitril in Wasser,
+ 0.1% TFA).**ESI-MS:** (pos. Ionen) $m/z = 1151 [M+Na]^+$, $1129 [M+H]^+$.(neg. Ionen) $m/z = 1127 [M-H]^-$.**HR-ESI-MS:** berechnet: $1137.44190 [M+Na]^+$, $1132.48650 [M+NH_4]^+$, $1115.45995 [M+H]^+$.gefunden: 1137.44182 ($\Delta = 0.07$ ppm), 1132.48710 ($\Delta = 0.53$ ppm),
 1115.45963 ($\Delta = 0.29$ ppm).**UV** (MeOH): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 269$ (4.00) nm;(MeOH, HCl): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 267$ (3.92) nm;(MeOH, NaOH): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 273$ (3.84) nm.**CD** (MeOH): $\lambda_{\max} ([\Theta]^{20}) = 275$ (+6400), 221 (-40700), 208 (+2500) nm. $[\alpha]_D^{20} = +4^\circ$ ($c = 0.1$, MeOH).**IR** (KBr): $\tilde{\nu} = 3416$ (br), 2940, 2353, 1649, 1534 1369, 1184, 1064 cm^{-1} .

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = -0.26$ [ddd, $J = 7.0, 3.5, 3.5$ Hz, 1 H, 3'-H_a, (3-Ncp)Ala I], -0.05 [m, 1 H, 3-H_a, (3-Ncp)Ala I], 0.55 [m, 1 H, 1'-H, (3-Ncp)Ala I], 0.60 [m, 1 H, 3-H_b, (3-Ncp)Ala I], 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H, 5-H, Ile), 1.00 (d, $J = 7.0$ Hz, 3 H, 1'-H, Ile), 1.01 [m, 1 H, 3'-H_a, (3-Ncp)Ala II], 1.10 [m, 1 H, 3'-H_b, (3-Ncp)Ala I], 1.30 [d, $J = 7.0$ Hz, 3 H, 1'-H, (βMe)Phe], 1.30 (m, 1 H, 4-H_a, Ile), 1.53 (d, $J = 7.0$ Hz, 3 H, α-Thr), 1.55 (m, 1 H, 4-H_b, Ile), 1.60 [m, 1 H, 3-H_a, (3-Ncp)Ala II], 1.67 [dd, $J = 7.0, 2.0$ Hz, 3 H, 3'-H, (4-Pe)Pro], 1.78 – 1.92 [m, 5 H, 3-H_b, 1'-H, 3'-H_b, (3-Ncp)Ala II, 3-H_a, (4-Pe)Pro, 3-H, Ile], 2.36 [ddd, $J = 11.5, 6.0, 6.0$ Hz, 1 H, 3-H_b, (4-Pe)Pro], 2.80 (dd, $J = 14.5, 11.0$ Hz, 1 H, 3-H_a, Phe), 2.95 [dq, $J = 10.0, 7.0$ Hz, 1 H, 3-H, (βMe)Phe], 3.08 [ddd, $J = 7.0, 3.5, 3.5$ Hz, 1 H, 2'-H, (3-Ncp)Ala I], 3.26 – 3.29 [m, 2 H, 4-H, 5-H_a, (4-Pe)Pro], 3.37 (dd, $J = 14.5, 4.5$ Hz, 1 H, 3-H_b, Phe), 3.46 [m, 1 H, 2-H, (3-Ncp)Ala I], 3.97 – 4.04 [m, 2 H, 5-H_b, (4-Pe)Pro, 2'-H, (3-Ncp)Ala II], 4.27 [dd, $J = 11.5, 6.0$ Hz, 1 H, 2-H, (4-Pe)Pro], 4.41 [dd, $J = 11.0, 10.0$ Hz, 1 H, 2-H, (βMe)Phe], 4.47 [ddd,

$J = 10.0, 8.5, 4.5$ Hz, 1 H, 2-H, *Phe*], 4.57 (dd, $J = 9.5, 2.5$ Hz, 1 H, 2-H, *a-Thr*), 4.60 (dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, 1 H, 2-H, *Ile*), 5.09 [ddd, $J = 9.0, 6.5, 6.5$ Hz, 1 H, 2-H, (*3-Ncp*)*Ala II*], 5.26 [m, 1 H, 1'-H, (*4-Pe*)*Pro*], 5.40 (dq, $J = 7.0, 2.5$ Hz, 1 H, 3-H, *a-Thr*), 5.62 [dq, $J = 10.5, 7.5$ Hz, 1 H, 2'-H, (*4-Pe*)*Pro*], 6.15 (d, $J = 5.0$ Hz, 1 H, 4-H, *Chpca*), 6.65 (d, $J = 5.0$ Hz, 1 H, 3-H, *Chpca*), 6.70 (d, $J = 10.0$ Hz, 1 H, NH), 6.82 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, NH), 7.04 (m, 1 H, Ar-H), 7.08–7.16 (m, 4 H, Ar-H), 7.18–7.28 (m, 5 H, Ar-H), 7.30 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, NH), 8.03 (d, $J = 9.0$ Hz, 1 H, NH), 9.06 (d, $J = 9.5$ Hz, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CDCl_3): $\delta = 10.6$ (+, C-5, *Ile*), 13.3 [+ , C-3', (*4-Pe*)*Pro*], 14.8 (+, C-1', *Ile*), 17.0 (+, C-4, *a-Thr*), 17.3 [–, C-3', (*3-Ncp*)*Ala I*], 17.9 [+ , C-4, (βMe)*Phe*], 20.0 [+ , C-1', (*3-Ncp*)*Ala I*], 21.6 [+ , C-1', (*3-Ncp*)*Ala II*], 25.1 (–, C-3, *Ile*), 33.4 [–, C-3, (*3-Ncp*)*Ala I*], 34.8 [–, C-3, (*3-Ncp*)*Ala II*], 35.6 [–, C-3, (*4-Pe*)*Pro*], 36.6 [+ , C-4, (*4-Pe*)*Pro*], 37.6 (+, C-3, *Ile*), 38.2 [–, C-3, *Phe*], 42.0 [+ , C-3, (βMe)*Phe*], 51.4 [+ , C-2, (*3-Ncp*)*Ala II*], 51.6 [+ , C-2, (*3-Ncp*)*Ala I*], 52.8 [–, C-5, (*4-Pe*)*Pro*], 54.7 (+, C-2, *Ile*), 55.1 (+, C-2, *a-Thr*), 56.2 (+, C-2, *Phe*], 58.2 [+ , C-2', (*3-Ncp*)*Ala I*], 59.2 [+ , C-2', (*3-Ncp*)*Ala II*], 59.9 [+ , C-2, (βMe)*Phe*], 61.4 [+ , C-2, (*4-Pe*)*Pro*], 69.2 (+, C-3, *a-Thr*), 103.8 (+, C-4, *Chpca*), 110.6 (+, C-3, *Chpca*), 120.1 (C_{quat} , C-2, *Chpca*), 120.5 (C_{quat} , C-5, *Chpca*), 127.2, 127.29, 127.33, 127.67, 127.73, 128.6, 128.8, 128.9 [+ , C-1', C-2', (*4-Pe*)*Pro*, Ar-C], 141.6, 141.8 (C_{quat} , Ar-C), 159.3 (C_{quat} , C-1, *Chpca*), 168.8, 169.5, 169.9, 170.9, 171.3, 171.6, 171.9 (C_{quat} , C-1).

Hormaomycin J₂ (33b)

$\text{C}_{54}\text{H}_{67}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{Cl}$ (1114.45)

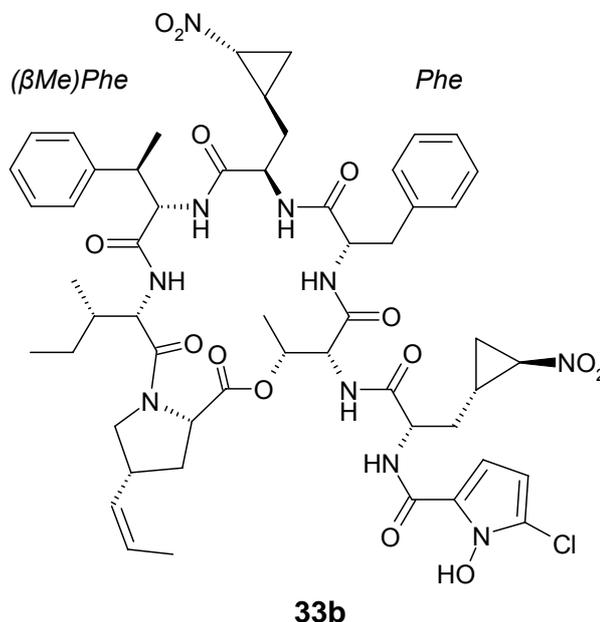
farbloser Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rosa (Ehrlich).

$R_t = 18.5$ min

(Säule B; 70 % Acetonitril in H_2O ,
+ 0.1% TFA).



ESI-MS: (pos. Ionen) $m/z = 1151$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, 1129 [$\text{M}+\text{H}$]⁺.

(neg. Ionen) $m/z = 1127$ [$\text{M}-\text{H}$][–].

HR-ESI-MS: berechnet: 1137.44190 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, 1132.48650 [$\text{M}+\text{NH}_4$]⁺, 1115.45995 [$\text{M}+\text{H}$]⁺.

gefunden: 1137.44160 ($\Delta = 0.26$ ppm), 1132.48664 ($\Delta = 0.12$ ppm),

1115.45946 ($\Delta = 0.44$ ppm).

UV (MeOH): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 278 (4.07) \text{ nm}$;
 (MeOH, HCl): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 271 (3.48) \text{ nm}$;
 (MeOH, NaOH): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 283 (3.80) \text{ nm}$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -8^{\circ}$ ($c = 0.1$, MeOH).

CD (MeOH): $\lambda_{\max} ([\Theta]^{20}) = 280 (+22800)$, $226 (-50300)$, $207 (+8000) \text{ nm}$.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3423, 2929, 1741 \text{ (sh)}, 1630, 1543, 1445, 1377, 1255, 1178, 1129, 1075,$
 $1025 \text{ (sh)} \text{ cm}^{-1}$.

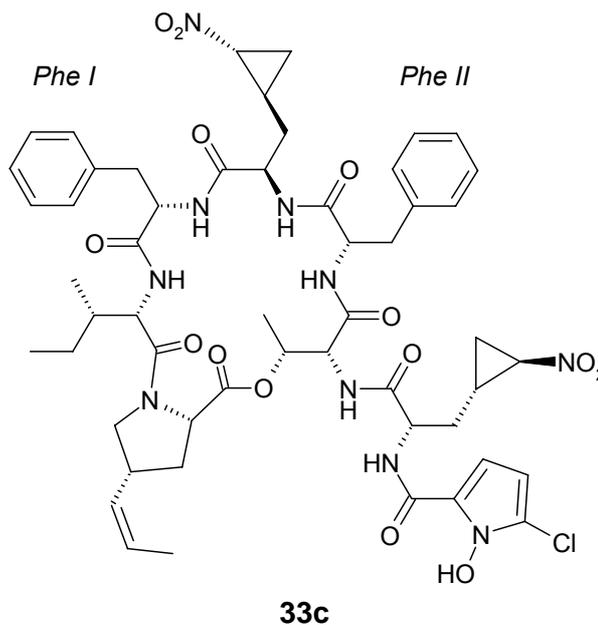
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = -0.20$ [m, 1 H, 3'-H_a, (3-Ncp)Ala I], 0.24 [m, 1 H, 3-H_a, (3-Ncp)Ala I], 0.68 [m, 1 H, 1'-H, (3-Ncp)Ala I], 0.78 [m, 1 H, 3-H_b, (3-Ncp)Ala I], 0.88 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3 H, 5-H, Ile), $0.92\text{--}0.97$ [m, 2 H, 3'-H_a, (3-Ncp)Ala II, 3'-H_b, (3-Ncp)Ala I], 1.00 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3 H, 1'-H, Ile), $1.25\text{--}1.30$ (m, 1 H, 4-H_a, Ile), 1.40 [d, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 3 H, 1'-H, (βMe)Phe], 1.48 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3 H, α-Thr), $1.53\text{--}1.56$ [m, 2 H, 4-H_b, Ile, 3-H_a, (3-Ncp)Ala II], 1.66 [dd, $J = 7.0, 2.0 \text{ Hz}$, 3 H, 3'-H, (4-Pe)Pro], $1.77\text{--}1.82$ [m, 2 H, 3-H_a, (4-Pe)Pro, 3-H_b, (3-Ncp)Ala II], $1.87\text{--}1.92$ [m, 3 H, 1'-H, 3'-H_b, (3-Ncp)Ala II, 3-H, Ile], 2.34 [ddd, $J = 11.5, 6.0, 5.0 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H_b, (4-Pe)Pro], 2.88 (dd, $J = 13.0, 11.0 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H_a, Phe), 2.96 (dd, $J = 13.0, 5.0 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H_b, Phe), $3.10\text{--}3.12$ [m, 1 H, 2'-H, (3-Ncp)Ala I], $3.24\text{--}3.29$ [m, 2 H, 4-H, 5-H_a, (4-Pe)Pro], $3.64\text{--}3.67$ [m, 2 H, 2-H, (3-Ncp)Ala I, 3-H, (βMe)Phe], $3.98\text{--}4.02$ [m, 1 H, 5-H_b, (4-Pe)Pro], 4.06 [ddd, $J = 7.0, 3.5, 3.5 \text{ Hz}$, 1 H, 2'-H, (3-Ncp)Ala II], 4.25 [dd, $J = 11.5, 6.0 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H, (4-Pe)Pro], $4.52\text{--}4.55$ [m, 2 H, 2-H, (βMe)Phe, 2-H, α-Thr], $4.61\text{--}4.66$ (m, 2 H, 2-H, Ile, 2-H, Phe), $5.03\text{--}5.06$ [m, 1 H, 2-H, (3-Ncp)Ala II], $5.23\text{--}5.27$ [m, 1 H, 1'-H, (4-Pe)Pro], $5.38\text{--}5.40$ (m, 1 H, 3-H, α-Thr), 5.62 [dq, $J = 10.5, 7.0 \text{ Hz}$, 1 H, 2'-H, (4-Pe)Pro], 6.13 (d, $J = 5.0 \text{ Hz}$, 1 H, 4-H, Chpca), 6.73 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 1 H, NH), 6.80 (d, $J = 5.0 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H, Chpca), 6.93 (d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, 1 H, NH), $7.08\text{--}7.11$ (m, 4 H, Ar-H), $7.14\text{--}7.24$ (m, 6 H, Ar-H), 7.98 (d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, 1 H, NH), 8.89 (br, 1 H, NH);

Aufgrund zu geringer Substanzmenge konnte kein ¹³C-NMR Spektrum gewonnen werden.

Hormaomycin J₃ (33c)C₅₃H₆₅N₁₀O₁₄Cl (1100.44)

farbloser Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: rosa (Ehrlich).**R_t** = 14.9 min(Säule B; 70 % Acetonitril in H₂O,
0.1% TFA).**ESI-MS:** (pos. Ionen) $m/z = 1151 [M+Na]^+$, $1129 [M+H]^+$.(neg. Ionen) $m/z = 1127 [M-H]^-$.**HR-ESI-MS:** berechnet: $1123.42625 [M+Na]^+$, $1118.47085 [M+NH_4]^+$, $1101.44430 [M+H]^+$.gefunden: 1123.42646 ($\Delta = 0.19$ ppm), 1118.47005 ($\Delta = 0.72$ ppm),
 1101.44438 ($\Delta = 0.07$ ppm).**UV** (MeOH): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 279$ (4.06) nm;(MeOH, HCl): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 270$ (3.89) nm;(MeOH, NaOH): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 282$ (3.97) nm.**CD** (MeOH): $\lambda_{\max} ([\Theta]^{20}) = 281$ (+10500), 223 (-49500), 207 (+4200) nm.**IR** (KBr): $\tilde{\nu} = 3419$ (br), 2941, 2356, 1649, 1536, 1442, 1387, 1442, 1387, 1264, 1185,
1028 cm^{-1} .Aufgrund zu geringer Substanzmenge konnte kein ¹H-NMR Spektrum gewonnen werden
(s. Kap. 2.3.2.2).

2.3.2.2 Isolierung und Charakterisierung der Hormaomycinderivate aus Fütterungsexperimenten mit Fluorphenylalaninderivaten

Das Rohprodukt wurde mit eiskaltem Pentan gewaschen und an Kieselgel (Aceton/Cyclohexan 2:3, 120 x 45 mm) chromatographiert. Die fluorierten Derivate **30a–c**, **31a–c** und **32a,b** konnten nicht von **16** getrennt werden. Alle spektroskopischen und spektrometrischen Daten sind, soweit möglich, aus den Mischfraktionen gewonnen worden.

	Monosubstituierte Analoga a,b [%]	Disubstituierte Analoga c [%]	Hormaomycin (16) [%]
<i>rac-o</i> -Fluorphenylalanin	23	45	32
<i>rac-m</i> -Fluorphenylalanin	32	45	23
<i>rac-p</i> -Fluorphenylalanin	35	–	65

Tab. 21: Prozentualer Anteil der gewonnenen Derivate an der Gesamtproduktion.

Hormaomycin (**16**)/ Hormaomycin F_{1–3} (**30a–c**)

Mischfraktion

C₅₅H₆₉N₁₀O₁₄Cl (1128.47)

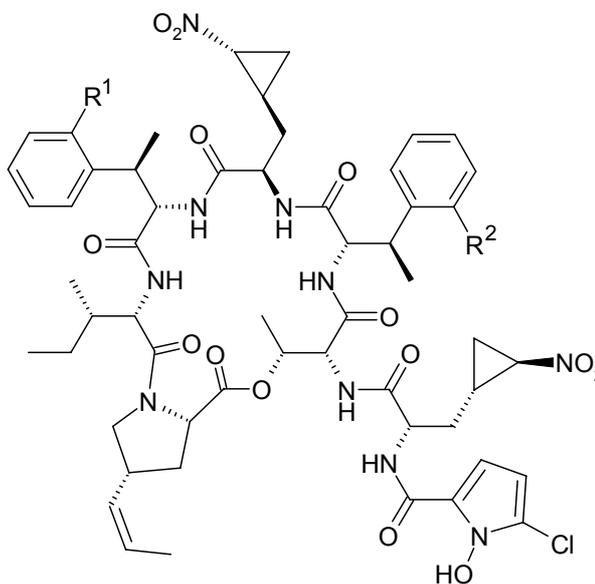
C₅₅H₆₈N₁₀O₁₄FCl (1146.46)

C₅₅H₆₇N₁₀O₁₄F₂Cl (1164.45)

farbloser Feststoff

UV-löschend (254 nm)

	R ¹	R ²
30a	F	H
30b	H	F
30c	F	F



ESI-MS: (pos. Ionen) $m/z = 1151 [M_1+Na]^+$, $1170 [M_2+Na]^+$, $1187 [M_3+Na]^+$;
(neg. Ionen) $m/z = 1127 [M_1-H]^-$, $1146 [M_2-H]^-$, $1163 [M_3-H]^-$.

HR-ESI-MS:

		[M+H] ⁺	[M+NH ₄] ⁺	[M+Na] ⁺
30a,b	berechnet	1147.46671	–	1169.44869
	gefunden ^a	1147.46879 (0.18)	–	1169.44880 (0.09)
30c	berechnet	1165.45730	1182.48001	1187.43927
	gefunden ^a	1165.45853 (0.90)	1182.48385 (1.20)	1187.43877 (0.04)

a: (Δ in ppm)

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ε) = 270 (4.03), 277 (4.05) nm;

(MeOH, HCl): λ_{\max} (lg ε) = 266 (3.99) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{\max} (lg ε) = 279 (3.95) nm.

CD (MeOH): λ_{\max} ([Θ]²⁰) = 280 (+25900), 222 (–32400) nm.

$[\alpha]_D^{20}$ = +11° (c = 0.1, MeOH).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3428 (br), 2930, 2862, 1735, 1641, 1542, 1450, 1374, 1246, 1177, 1094 (sh) cm^{–1}.

Hormaomycin (16)/ Hormaomycin G_{1–3} (31a–c)**Mischfraktion**

C₅₅H₆₉N₁₀O₁₄Cl (1128.47)

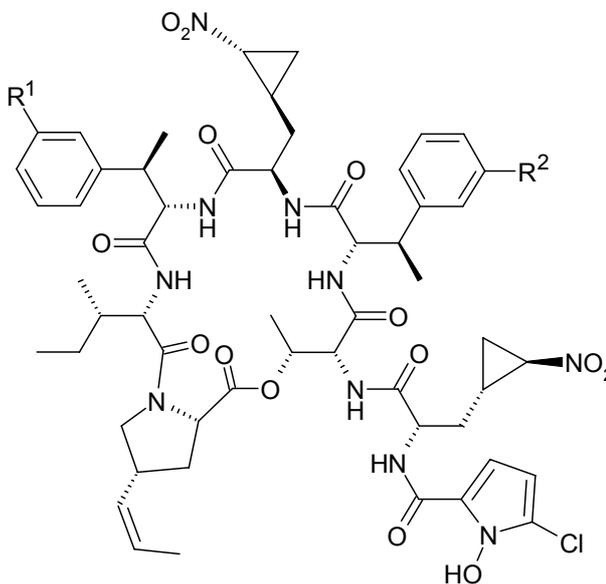
C₅₅H₆₈N₁₀O₁₄FCl, (1146.46)

C₅₅H₆₇N₁₀O₁₄F₂Cl (1164.45)

farbloser Feststoff

UV-löschend (254 nm)

	R ¹	R ²
31a	F	H
31b	H	F
31c	F	F



ESI-MS: (pos. Ionen) m/z = 1151 [M₁+Na]⁺, 1170 [M₂+Na]⁺, 1187 [M₃+Na]⁺;

(neg. Ionen) m/z = 1127 [M₁–H][–], 1146 [M₂–H][–], 1163 [M₃–H][–].

HR-ESI-MS:

		[M+H] ⁺	[M+NH ₄] ⁺	[M+Na] ⁺
31a,b	berechnet	1147.46671	–	–
	gefunden ^a	1147.46877 (0.17)	–	–
31c	berechnet	1165.45730	–	1187.43927
	gefunden ^a	1165.45853 (0.90)	–	1187.43901 (0.02)

a: (Δ in ppm)

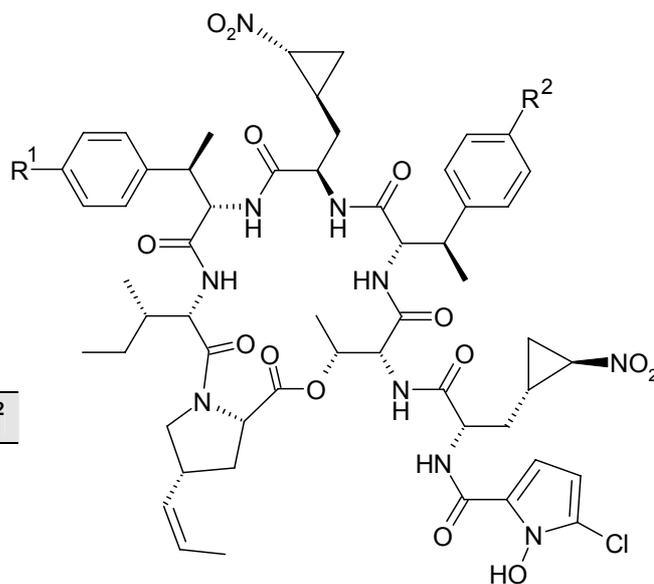
UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 274 (4.18) nm;(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 274 (4.18) nm;(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 274 (4.18) nm.**CD** (MeOH): λ_{max} ([Θ]²⁰) = 275 (+27500), 224 (–60600), 207 (+11500) nm.**IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3384 (br), 2939, 1740, 1628 (br), 1544, 1447, 1370 cm^{–1}.

Hormaomycin (16)/ Hormaomycin H_{1,2} (32a,b)**Mischfraktion**C₅₅H₆₉N₁₀O₁₄Cl (1128.47)C₅₅H₆₈N₁₀O₁₄FCl, (1146.46)C₅₅H₆₇N₁₀O₁₄F₂Cl (1164.45)

farbloser Feststoff

UV-löschend (254 nm)

	R ¹	R ²
32a	F	H
32b	H	F
32c	F	F

**ESI-MS:** (pos. Ionen) m/z = 1151 [M₁+Na]⁺, 1170 [M₂+Na]⁺, 1187 [M₃+Na]⁺;(neg. Ionen) m/z = 1127 [M₁-H]⁻, 1146 [M₂-H]⁻, 1163 [M₃-H]⁻.**HR-ESI-MS:**

		[M+H] ⁺	[M+NH ₄] ⁺	[M+Na] ⁺
30a,b	berechnet	1147.46671	–	1169.44869
	gefunden ^a	1147.46879 (0.18)	–	1169.44880 (0.09)
30c	berechnet	1165.45730	1182.48001	1187.43927
	gefunden ^a	1165.45853 (0.90)	1182.48385 (1.20)	1187.43877 (0.04)

a: (Δ in ppm)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 276 (3.81) nm;(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 269 (3.86) nm;(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 278 (3.80) nm.**CD** (MeOH): λ_{max} ([Θ]²⁰) = 276 (+34500), 223 (–34700) nm.**IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3384 (br), 2928, 1742, 1628 (br), 1544, 1447, 1370 cm⁻¹.

2.3.3 Variation der 5-Chlor-N-hydroxy-pyrrol-2-carbonsäure-Einheit

Die in Tab. 22 aufgelisteten Vorläufer wurden in 50 mL sterilem Wasser unter Zusatz von 1 M NaOH gelöst und unter Standardbedingungen (siehe Kap. B.2.3) gefüttert.

Das Rohprodukt wurde mit eiskaltem Pentan gewaschen und an Kieselgel (Aceton/Cyclohexan 2:3, 120 x 45 mm) chromatographiert. Aus den Fütterungen konnten keine neuen Derivate gewonnen werden.

Carbonsäure	Gefütterte Menge [mmol]	Hormaomycin-Produktion	Hormaomycin-Derivate
2-Pyrrolcarbonsäure	1.0	+	–
	2.0	+	–
	4.0	+	–
	8.0	+	–
2-Thiophencarbonsäure	2.0	+	–
2-Tetrahydrofuran-carbonsäure	2.0	+	–
2-Furancarbonsäure	2.0	+	–
Picolinsäure	2.0	+	–
3-Chlorsalicylsäure	2.0	+	–
Pipecolinsäure	2.0	+	–

Tab. 22: Vorläufer für die Variation der Startereinheit.

2.4 Untersuchung der Hormaomycin-Biosynthese an *Escherichia coli*-Mutanten

2.4.1 Stammhaltung

2.4.1.1 Agarplatten

Die Mutanten *E. coli* pKZ 72 und 73 wurden auf Petrischalen mit LB_{Kn50}-Nährmedium gehalten. Sie wurden bei 37°C 2–3 Tage inkubiert und bei 4°C für maximal drei Monate gelagert.

2.4.1.2 Langzeitkonservierung

Aus einer gut bewachsenen Agarplatte wurden mit einseitig zugeschweißten und mit einem Bleistück beschwerten sterilen Halmen aus Polypropylen Agarstückchen ausgestanzt, bis der Halm gefüllt war. Dieser wurde in einen zweiten äußeren Halm gesteckt, der mit einer ausgeglühten Tiegelzange an beiden Seiten zugeschmolzen wurde. Die Halme wurden in einem Dewar über flüssigem Stickstoff bei –196°C gelagert.

2.4.1.3 Kultivierung

Vorkultur: Die Stämme wurden in 3 mL flüssiges LB_{Kn50}-Medium in Reagenzgläsern inokuliert und bei 37°C und 180 rpm für 12 h wachsen gelassen.

Hauptkultur: Die Hauptkulturen (30 mL LB_{Kn50}-Medium in 100 mL Erlenmeyerkolben mit und ohne Schikane) wurden mit 10 % Vorkultur inokuliert und bis zu OD₆₀₀ = 0.5 (ca. 2 h) wachsen gelassen. Anschließend wurden die Vorläufer (pKZ 72: L-Phenylpyruvat sowie L-Phenylalanin; pKZ 73: L-Lysin) bis zu einer Endkonzentration von 0.3 mM zusammen mit *meta*-Toluylsäure (Endkonzentration 0.1, 0.2 und 0.3 mM) über einen Zeitraum von 12 h in vier Intervallen gefüttert. Die Gesamtfermentationsdauer betrug 36 h.

2.4.1.4 Aufarbeitung

Die Kulturbrühen wurden lyophilisiert und der Rückstand mit 20 mL (pro 100 mL Kulturlösung) 50 mM Na₂HPO₄/Ethanol 1:1 (pH 7)-Puffer extrahiert. Die Lösungen wurden zentrifugiert und HPLC-MS analytisch (Säule B, Programm 2) untersucht.

3 Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten

3.1 Substanzen aus dem chemischen Screening

3.1.1 Stammhaltung

Agarplatten

Die Haltung von *Actinomyces* sp. M1–M4 und P1–P4 erfolgte auf Petrischalen mit M2-Nährmedium. Sie wurden bei 28°C 7–10 Tage inkubiert und bei 28°C für maximal einen sowie bei 4°C maximal drei Monate gelagert.

Langzeitkonservierung

Aus einer gut bewachsenen Agarplatte wurden mit einseitig zugeschweißten und mit einem Bleistück beschwerten sterilen Halmen aus Polypropylen Agarstückchen ausgestanzt, bis der Halm gefüllt war. Dieser wurde in einen zweiten äußeren Halm gesteckt, der mit einer ausgeglühten Tiegelzange an beiden Seiten zugeschmolzen wurde. Die Halme wurden in einem Dewar über flüssigem Stickstoff bei –196°C gelagert.

3.1.2 Chemisches Screening

Die Kultivierung der zu untersuchenden Stämme erfolgte in vier verschiedenen Nährmedien (M2, SM, SGG und Hafer) in 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen die mit jeweils 50 mL Nährmedium befüllt waren. Die Nährmedien wurden mit jeweils einem ca. 1 cm² großen Agarstück beimpft und bei 28°C und 180 rpm für 72 h inkubiert. Unter Zugabe von Celite wurden die vereinigten Kulturbrühen (je 100 mL) filtriert. Das Mycel wurde 15 min im Ultraschallbad mit 100 mL Aceton, das Kulturfiltrat mit 100 mL Ethylacetat extrahiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und die so erhaltenen Extrakte in 2 mL MeOH/H₂O 1:1 gelöst. 5 µL dieser Lösungen wurden auf HPTLC-Kieselgelplatten aufgetragen und in CHCl₃/MeOH 9:1 entwickelt. Die Analyse des Metabolitenmusters erfolgte durch Eigenfarbe, UV-Licht bei 254 und 366 nm sowie Sprühreagenzien (Anisaldehyd, Ehrlich, Orcin).

3.1.3 Substanzen aus *Actinomyces* sp. Stamm P4

Kultivierung und Aufarbeitung

Der Stamm P4 wurde in 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schaumstoffkappen in 100 mL SM-Medium bei 28°C und 180 rpm für 72 h kultiviert. Mycel und Kulturfiltrat wurden durch Filtration im Vakuum getrennt, der pH-Wert des Kulturfiltrats vor der Extraktion auf 5 eingestellt. Die Extraktion des Kulturfiltrats erfolgte mit 2 x 1 L (pro L Kultur) Ethylacetat, die des Mycels mit 2 x 1 L (pro L Kultur) Aceton für 15 min im Ultraschallbad.

Isolierung der Metaboliten

Die jeweiligen Extrakte wurden zweimal an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 95:5 → 9:1, 450 x 55 mm sowie CH₂Cl₂/MeOH 9:1, 550 x 40 mm) chromatographiert, wobei 35.3 mg Chartreusin (**44**) aus dem Kulturfiltrat und 45.1 mg **44** aus dem Mycel erhalten wurden.

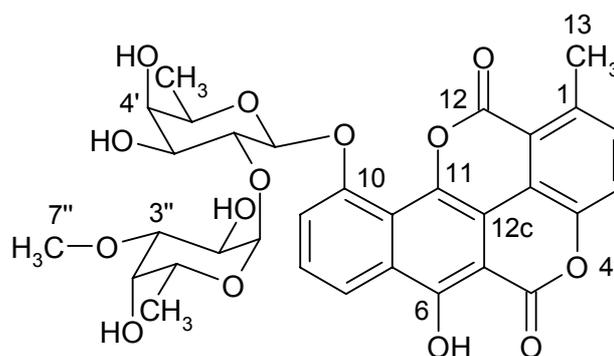
Chartreusin (**44**)

C₃₂H₃₂O₁₄ (640.60)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

blau fluoreszierend (366 nm)



44

Anfärbeverhalten: gelb (Anis).

R_f = 0.37 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

ESI-MS: (pos. Ionen) m/z = 663 [M+Na]⁺, 1303 [2M+Na]⁺.

(neg. Ionen) m/z = 639 [M-H]⁻, 1279 [2M-H]⁻.

HR-ESI-MS: berechnet: 658.21303 [M+NH₄]⁺.

gefunden: 658.21316 (Δ = 0.20 ppm).

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 236 (4.63), 265 (4.61), 334 (4.03), 379 (4.03), 400 (4.19), 422 (4.23) nm;

(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 235 (4.54), 264 (4.56), 333 (3.77), 372 (3.88), 400 (4.12), 422 (4.15) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 238 (4.65), 257 (sh) (4.47), 311 (3.75), 362 (3.85), 438 (4.09) nm.

CD (MeOH): λ_{max} ([Θ]²⁰) = 211 (+6200), 237 (-26300), 276 (+6000) nm.

[α]_D²⁰ = -27° (c = 0.33, MeOH).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3432 (br), 2929, 2364, 1720, 1624, 1501, 1377, 1246, 1141, 1069 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): δ = 0.98 (d, J = 6.5 Hz, 3 H, 6''-H), 1.21 (d, J = 6.5 Hz, 3 H, 6'-H), 2.82 (s, 3 H, 13-H), 3.12 (dd, J = 10.0, 3.0 Hz, 1 H, 3''-H), 3.16 (s, 3 H, 7''-H), 3.41 (m, 1 H, 2''-H), 3.59–3.63 (m, 2 H, 4'-H, 4''-H), 3.65 (m, 1 H, 3'-H), 3.93 (q, J = 6.5 Hz, 1 H, 5'-H), 3.99 (dd, J = 9.5, 8.0 Hz, 1 H, 2'-H), 4.17 (d, J = 4.0 Hz, 1 H, 4'-OH*), 4.22 (q, J = 6.5 Hz, 1 H, 5''-H), 4.51 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, 3'-OH), 4.81 (d, J = 3.0 Hz, 1 H, 4''-OH), 5.36 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 1'-H), 5.44 (d, J = 4.0 Hz, 1 H, 1''-H), 7.47 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 9-H), 7.60 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 2-H), 7.63 (dd, J = 8.0, 8.0 Hz, 1 H, 8-H), 7.66 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 3-H), 8.14 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 7-H) ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Pyridin- d_5): δ = 1.56 (d, J = 6.5 Hz, 3 H, 6''-H₃), 1.57 (d, J = 6.5 Hz, 3 H, 6''-H₃), 2.75 (s, 3 H, 13-H₃), 3.35 (s, 3 H, 7''-H₃), 3.85 (dd, J = 10.0, 3.0 Hz, 1 H, 3''-H), 4.12 (m, 2 H, 5'-H, 4''-H), 4.21 (d, J = 3.5 Hz, 1 H, 4'-H), 4.32 (dd, J = 9.5, 3.5 Hz, 1 H, 3'-H), 4.54 (dd, J = 10.0, 4.0 Hz, 1 H, 2''-H), 5.00 (q, J = 6.5 Hz, 1 H, 5''-H), 5.06 (dd, J = 9.5, 8.0 Hz, 1 H, 2'-H), 5.82 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 1'-H), 6.52 (d, J = 4.0 Hz, 1 H, 1''-H), 7.31 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 2-H), 7.44 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 3-H), 7.64 (dd, J = 8.0, 8.0 Hz, 1H, 8-H), 7.76 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 7-H), 8.36 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 9-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, DMSO- d_6): δ = 16.4 (q, C-6''), 16.5 (q, C-6'), 21.6 (q, C-13), 65.8 (d, C-5''), 66.9 (d, C-2''), 67.5 (d, C-4''), 70.1 (d, C-5'), 71.2 (d, C-4'), 71.9 (d, C-3'), 77.8 (d, C-2'), 79.8 (d, C-3''), 99.3 (d, C-1'), 99.4 (d, C-1''), 109.4 (s, C-12c), 114.1 (d, C-9), 117.1 (d, C-7), 117.1 (s, C-12a), 118.2 (s, C-10a), 120.2 (d, C-8), 132.5 (d, C-2), 137.6 (s, C-10b), 137.7 (s, C-1), 146.9 (s, C-3a), 153.8 (s, C-10), 155.5 (s, C-6), 158.8 (s, C-12), 168.9 (s, C-5) ppm.

3.1.4 Substanzen aus *Actinomyces* sp. Stamm M4-1

Kultivierung und Aufarbeitung

Der Stamm P4 wurde in 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schaumstoffkappen in 100 mL SM-Medium bei 28°C und 180 rpm für 72 h kultiviert. Mycel und Kulturfiltrat wurden durch Filtration im Vakuum getrennt, der pH-Wert des Kulturfiltrats vor der Extraktion auf 6.5 eingestellt. Die Extraktion des Kulturfiltrats erfolgte mit 2 x 1 L (pro L Kultur) Ethylacetat, das Mycel wurde verworfen.

Isolierung der Metaboliten

Der Kulturfiltratextrakt wurde an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, 120 x 45 mm) und Sephadex LH-20 (MeOH, 120 x 35 mm) chromatographiert, wobei 6.7 mg Borrelidin (**15**), 7.8 mg Daidzein(**12a**) und 8.3 mg Genistein (**45**) gewonnen wurden.

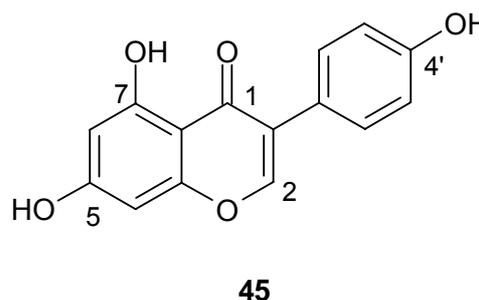
Genistein (45)

(4',5,7-Trihydroxyisoflavon)

C₁₅H₁₀O₅ (270.04)

farbloser Feststoff

stark UV-löschend (254 nm)



Anfärbeverhalten: braun (Anis).

R_f = 0.14 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

ESI-MS: (neg. Ionen) m/z = 269 [M-H]⁻, 539 [2M-H]⁻.

HR-ESI-MS: berechnet: 269.04555 [M-H]⁻.

gefunden: 269.04570 (Δ = 0.56 ppm).

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 262 (4.57) nm;

(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 262 (4.57) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 275 (4.57) nm.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 6.19 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, 6-H), 6.31 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, 4-H), 6.82 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 2 H, 2'-H, 6'-H), 7.37 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 2 H, 3'-H, 5'-H), 8.03 (s, 1 H, 2-H).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 94.8 (d, C-4), 100.2 (d, C-6), 106.2 (s, C-7a), 116.3 (d, C-3',5'), 123.3 (s, C-1'), 124.7 (s, C-1a), 131.4 (d, C-2',6'), 154.8 (d, C-2), 158.8 (s, C-4'), 159.7 (s, C-3a), 163.8 (s, C-7), 166.2 (s, C-5), 182.2 (s, C-1).

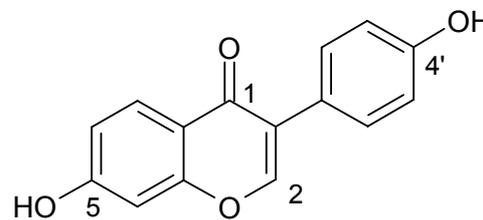
Daidzein (12a)

(4',5-Dihydroxyisoflavin)

C₁₅H₁₀O₄ (270.04)

farbloser Feststoff

stark UV-löschend (254 nm)



12a

Anfärbeverhalten: braun (Anis).

R_f = 0.31 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

ESI-MS: (neg. Ionen) m/z = 253 [M-H]⁻, 507 [2M-H]⁻.

HR-ESI-MS: berechnet: 253.05063 [M-H]⁻.

gefunden: 253.05080 (Δ = 0.67 ppm).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 6.80 (d, J = 8.0 Hz, 2 H, 3'-H, 5'-H), 6.84 (d, J = 2.0 Hz, 1 H, 4-H), 6.92 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 1 H, 6-H), 7.37 (d, J = 8.0 Hz, 2 H, 2'-H, 6-H'), 7.95 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 7-H), 8.25 (s, 1 H, 2-H).

Borreledin (15)

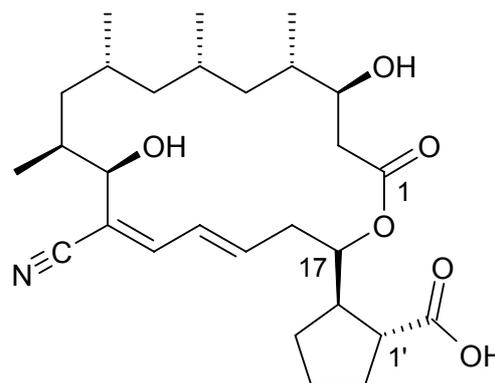
C₂₈H₄₃NO₆ (489.66)

farbloser Feststoff

stark UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: grau-braun (Anis).

R_f = 0.54 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).



15

ESI-MS: (pos.) m/z = 512 [M+Na]⁺, 1001 [2M+Na]⁺, 1490 [3M+Na]⁺.

(neg.) m/z = 488 [M-H]⁻, 977 [2M-H]⁻.

HR-ESI-MS: berechnet: 507.34286 [M+NH₄]⁺, 512.29826 [M+Na]⁺.

gefunden: 507.34296 (Δ = 0.20 ppm), 512.29836 (Δ = 0.20 ppm).

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3435, 2958, 2924, 2213, 1709, 1636, 1560, 1458, 1411, 1382, 1268$
(sh), 1187, 1042 cm^{-1} .

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +67^{\circ}$ (c = 0.1, MeOH).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.68$ (dt, $J = 12.0, 3.0$ Hz, 1H, 9- H_a), 0.83 (d, $J = 5.0$ Hz, 3H, 8- CH_3), 0.84 (d, $J = 5.0$ Hz, 3H, 6- CH_3), 0.85 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 4- CH_3), 0.95 (ddd, $J = 12.5, 6.0, 3.5$ Hz, 1H, 7- H_a), 0.97 (m, 1H, 5- H_a), 1.02 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 10- CH_3), 1.05 (ddd, $J = 12.5, 2.5, 2.5$ Hz, 1H, 7- H_b), 1.19–1.23 (m, 2H, 5- $\text{H}_b, 9-\text{H}_b$), 1.40 (ddt, $J = 8.0, 8.0, 3.5$ Hz, 1H, 3'- H_a), 1.59–1.66 (m, 1H, 8-H), 1.72–1.88 (m, 5H, 4-H, 6-H, 10-H, 4'- $\text{H}_a, 5'-\text{H}_a$), 1.96–2.03 (m, 2H, 3'- $\text{H}_b, 4'-\text{H}_b$), 2.21 (dd, $J = 16.5, 10.5$ Hz, 1H, 2- H_a), 2.37 (dd, $J = 16.5, 3.5$ Hz, 1H, 2- H_b), 2.41 (dt, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1H, 1'-H), 2.49–2.54 (m, 1H, 16- H_a), 2.56 (ddd, $J = 15.0, 5.0, 4.5$ Hz, 1H, 16- H_b), 2.66 (ddt, $J = 11.0, 8.0, 8.0$ Hz, 1H, 2'-H), 3.92 (ddd, $J = 10.5, 6.0, 3.0$ Hz, 1H, 3-H), 4.17 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, 11-H), 4.97 (dt, $J = 10.5, 3.5$ Hz, 1H, 17-H), 6.31 (ddd, $J = 15.0, 10.0, 4.5$ Hz, 1H, 15-H), 6.59 (dd, $J = 15.0, 12.0$ Hz, 1H, 14-H), 6.90 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, 13-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CD_3OD): $\delta = 15.4$ (q, C10- CH_3), 18.7 (q, C8- CH_3), 19.1 (q, C4- CH_3), 20.9 (q, C6- CH_3), 26.2 (t, C-4'), 27.6 (d, C-8), 28.5 (d, C-6), 30.5 (t, C-3'), 32.5 (t, C-5'), 36.0 (d, C-10), 36.7 (t, C-16), 37.0 (d, C-4), 37.9 (t, C-2), 39.1 (t, C-9), 44.6 (t, C-5), 47.5 (d, C-2'), 49.4 (t, C-7), 50.3 (d, C-1'), 72.9 (d, C-3), 73.1 (d, C-11), 77.4 (d, C-17), 117.4 (s, C12-CN), 119.9 (s, C-12), 129.0 (d, C-14), 140.2 (d, C-15), 145.5 (d, C-13), 173.2 (s, C-1), 180.7 (s, C-1'-COOH).

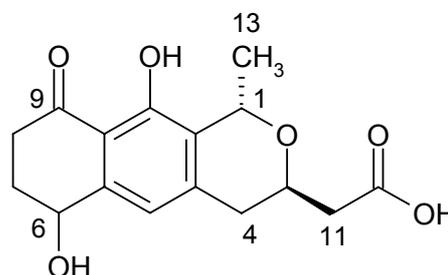
3.2 Charakterisierung der Metaboliten aus *Streptomyces* sp. Stamm Tü 6319

Fogacin (46)

C₁₆H₁₈O₆ (306.32)

farbloser Feststoff

schwach UV-löschend (254 nm)



46

relative Stereochemie

Anfärbeverhalten: braun (Anis).

R_f = 0.06 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

ESI-MS: (pos. Ionen) m/z = 635 [2M+Na]⁺, 329 [M+Na]⁺, 307 [M+H]⁺.

(neg. Ionen) m/z = 305 [M-H]⁻.

HR-ESI-MS: berechnet: 307.11762 [M+H]⁺.

gefunden: 307.11763 (Δ = 0.03 ppm).

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 222 (3.63), 272 (3.40), 333 (2.95) nm;

(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 221 (3.64), 271 (3.40), 331 (3.02) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 223 (3.67), 271 (3.49), 333 (3.11) nm.

CD (MeOH): λ_{max} ([Θ]²⁰) = 268 (−4200), 214 (+8000) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3428 (br), 2937, 2354, 1707, 1625, 1370, 1264, 1155, 1085 cm⁻¹.

[α]_D²⁰ = +7° (c = 0.1, MeOH).

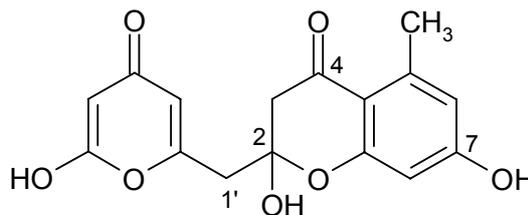
¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 1.55 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 13-H₃), 2.10 (dddd, J = 14.0, 9.0, 4.5, 3.5 Hz, 1H, 7-H_a), 2.29 (dddd, J = 14.0, 8.5, 8.0, 4.5 Hz, 1H, 7-H_b), 2.56 (m, 2H, 11-H₂), 2.65 (ddd, J = 15.0, 9.0, 4.5 Hz, 1H, 8-H_a), 2.68 (dd, J = 17.0, 11.0 Hz, 1H, 4-H_a), 2.85 (dd, J = 17.0, 3.0 Hz, 1H, 4-H_b), 2.89 (ddd, J = 15.0, 8.0, 4.5 Hz, 1H, 8-H_b), 4.43 (m, 1H, 3-H), 4.81 (dd, J = 8.0, 3.5 Hz, 1H, 6-H), 5.06 (q, J = 6.5 Hz, 1H, 1-H), 6.86 (s, 1H, 5-H).

¹³C-NMR (150.8 MHz, CD₃OD): δ = 19.3 (q, C-13), 32.5 (t, C-7), 35.4 (t, C-4), 35.8 (t, C-8), 42.9 (t, C-11), 65.4 (d, C-3), 68.1 (d, C-6), 69.3 (d, C-1), 114.2 (s, C-9a), 119.1 (d, C-5), 127.8 (s, C-10a), 144.1 (s, C-4a), 145.9 (s, C-5a), 159.7 (s, C-10), 176.0 (s, C-12), 206.1 (s, C-9).

SEK 4b (47)C₁₆H₁₄O₇ (318.29)

farbloser Feststoff

schwach UV-löschend (254 nm)

**47****Anfärbeverhalten:** braun (Anis).**R_f** = 0.12 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).**ESI-MS:** (pos. Ionen) m/z = 659 [2M+Na]⁺, 341 [M+Na]⁺.(neg. Ionen) m/z = 635 [2M-H]⁻, 317 [M-H]⁻.**HR-ESI-MS:** berechnet: 319.08123 [M+H]⁺, 341.06317 [M+Na]⁺.

gefunden: 319.08140 (Δ = 0.53 ppm), 341.06329 (Δ = 0.35 ppm).

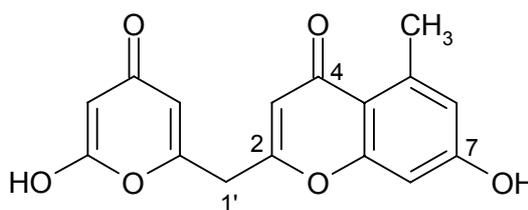
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.45 (s, 3H, 5-CH₃), 2.58 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H, 3-H_a), 2.98 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H, 3-H_b), 3.00 (d, *J* = 10.0 Hz, 2H, 1'-H₂), 5.25 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, 5'-H), 6.05 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, 3'-H), 6.18 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 8-H), 6.30 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 6-H).

¹³C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ = 22.4 (q, 5-CH₃), 44.1 (t, C-1'), 47.5 (t, C-3), 88.9 (d, C-5'), 100.1 (s, C-2), 101.6 (d, C-8), 103.5 (d, C-3'), 111.9 (s, C-4a), 112.7 (d, C-6), 142.4 (s, C-5), 160.4 (s, C-2'), 160.9 (s, C-8a), 162.7 (s, C-7), 163.9 (s, C-6'), 170.6 (s, C-4'), 190.2 (s, C-4).

AnhydroSEK4b (48)C₁₆H₁₂O₆ (300.27)

farbloser Feststoff

schwach UV-löschend (254 nm)

**48****Anfärbeverhalten:** braun (Anis).**R_f** = 0.10 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).**ESI-MS:** (pos. Ionen) m/z = 623 [2M+Na]⁺, 323 [M+Na]⁺.(neg. Ionen) m/z = 599 [2M-H]⁻, 299 [M-H]⁻.**HR-ESI-MS:** berechnet: 301.07066 [M+H]⁺, 323.05261 [M+Na]⁺.

gefunden: 301.07083 (Δ = 0.56 ppm), 323.05288 (Δ = 0.84 ppm).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.56 (s, 3H, 5-CH₃), 3.87 (s, 2H, 1'-H₂), 5.28 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 5'-H), 6.09 (s, 1H, 3-H), 6.16 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 3'-H), 6.60 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 8-H), 6.64 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 6-H).

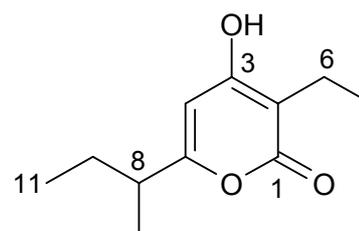
¹³C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ = 22.3 (q, 5-CH₃), 37.0 (t, C-1'), 89.1 (d, C-5'), 100.5 (d, C-8), 102.0 (d, C-3'), 112.1 (d, C-3), 114.3 (s, C-4a), 116.8 (d, C-6), 141.7 (s, C-5), 159.1 (s, C-7), 160.0 (s, C-2'), 160.9 (s, C-2), 161.2 (s, C-8a), 163.4 (s, C-6'), 170.3 (s, C-4'), 178.0 (s, C-4).

Germicidin A (49)

C₁₁H₁₆O₃ (196.25)

farbloses Öl.

schwach UV-löschend (254 nm)



49

Anfärbeverhalten: braun (Anis).

R_f = 0.85 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

ESI-MS: (pos. Ionen) *m/z* = 415 [2M+Na]⁺, 219 [M+Na]⁺, 197 [M+H]⁺.

(neg. Ionen) *m/z* = 391 [2M-H]⁻, 195 [M-H]⁻.

HR-ESI-MS: berechnet: 197.11722 [M+H]⁺.

gefunden: 197.11722 (Δ < 0.01 ppm).

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 290 (3.50) nm

[α]_D²⁰ = +13° (c = 0.1, MeOH).

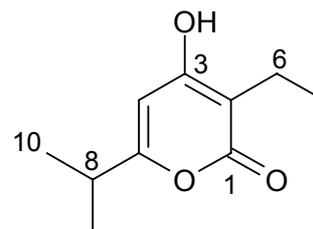
¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 0.89 (dd, *J* = 7.5, 7.5 Hz, 3H, 11-H), 1.02 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, 7-H), 1.19 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 9-H), 1.54 (m, 1H, 10-H_a), 1.67 (m, 1H, 10-H_b), 2.38 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, 6-H), 2.45 (tq, *J* = 7.0, 7.0 Hz, 1H, 8-H), 5.95 (s, 4-H).

¹³C-NMR (150.8 MHz, CD₃OD): δ = 11.9 (q, C-11), 12.9 (q, C-7), 17.3 (t, C-6), 18.3 (q, C-9), 28.5 (t, C-10), 40.9 (d, C-8), 101.3 (d, C-4), 104.9 (s, C-2), 168.1 (s, C-3), 169.0 (s, C-5), 169.3 (s, C-1).

Germicidin B (50)C₁₀H₁₄O₃ (182.22)

farbloses Öl.

schwach UV-löschend (254 nm)

**50****Anfärbeverhalten:** braun (Anis).**R_f** = 0.80 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).**ESI-MS:** (pos. Ionen) m/z = 387 [2M+Na]⁺, 205 [M+Na]⁺.(neg. Ionen) m/z = 195 [M-H]⁻.**HR-ESI-MS:** berechnet: 183.10157 [M+H]⁺.

gefunden: 183.10159 (Δ = 0.11 ppm).

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 292 (3.48) nm

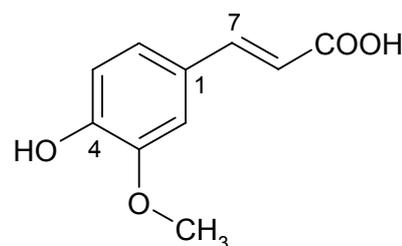
¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = , 1.02 (t, *J* = 7.5, 7.5 Hz, 3H, 7-H₃), 1.21 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, 9,10-H₃), 2.38 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, 6-H), 2.70 (dsept., *J* = 7.0, 0.5 Hz, 1H, 8-H), 5.95 (d, *J* = 0.5 Hz, 1H, 4-H).

¹³C-NMR (150.8 MHz, CD₃OD): δ = 12.9 (q, C-7), 17.3 (t, C-6), 20.4 (q, C-9,10), 33.6 (d, C-8), 99.7 (d, C-4), 105.0 (s, C-2), 168.9 (s, C-3), 169.1 (s, C-5), 169.4 (s, C-1).

Ferulasäure (51)C₁₀H₁₀O₄ (194.19)

farbloser Feststoff

schwach UV-löschend (254 nm)

**51****Anfärbeverhalten:** braun (Anis).**R_f** = 0.04 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).**EI-MS:** m/z (%) = 194 (100) [M], 179 (16) [M-CH₃], 133 (18).**HR-EI-MS:** berechnet: 194.05791.

gefunden: 194.05840.

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 3.88 (q, 3H, -OCH₃), 6.30 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, 8-H), 6.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, 5-H), 7.05 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H, 6-H), 7.18 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 2-H), 7.58 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, 7-H).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 56.4 (q, -OCH₃), 111.6 (d, C-2), 116.2 (d, C-8), 116.4 (d, C-5), 123.9 (d, C-6), 127.8 (s, C-1), 146.7 (d, C-7), 149.3 (s, C-3), 150.4 (s, C-4), 171.2 (s, C-9).

3.3 Charakterisierung der Metaboliten aus *Streptomyces* sp. Stamm Tü 2561

Substanz 2561-1 (56)

C₇₃H₈₆O₁₄ (1186.59)

farbloser Feststoff

schwach UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: braun (Anis).

R_f = 0.48 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1).

ESI-MS: (pos. Ionen) m/z = 617 [M+2Na]²⁺, 1209 [M+Na]⁺.

(neg. Ionen) m/z = 1186 [M-H]⁻.

HR-ESI-MS: berechnet: 1209.59098 [M+Na]⁺.

gefunden: 1209.59106 (Δ < 0.06 ppm).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3431 (br), 2970, 2931, 1720, 1624, 1543, 1457, 1421, 1377, 1345, 1312, 1250, 1123, 1096, 1058, 1013, 946, 866 cm⁻¹.

Eine Partialstruktur der Substanz ist auf S. 86 zu finden.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): s. Tab. 10 und 12, S. 87.

¹³C-NMR (150.8 MHz, CDCl₃): s. Tab. 10 und 11, S. 87.

4 Untersuchungen an *Streptomyces* sp. S 1495

Für die Biosyntheseuntersuchungen wurde aufgrund besserer Ausbeuten (bis 20 mg **15**) der Borrelidin-Produzent *Streptomyces* sp. S 1495 verwendet.

4.1 Fermentationskurve

Der Stamm wurde wie *Actinomyces* sp. M4-1 unter Standardbedingungen (s. Kap. B.3.1.4) für 96 h kultiviert und aufgearbeitet. Alle 12 h wurden zwei Kolben (200 mL) entnommen, die Extrakte in 2 mL Methanol gelöst und an der analytischen HPLC (Säule A, Programm 1, Detektion bei 280 nm) untersucht.

4.2 Biosynthese

Die Kultivierung erfolgte wie unter Kap. B.3.1.4 angegeben im 1 L-Maßstab, die isotopenmarkierten Verbindungen wurden in 30 mL sterilem Wasser gelöst und zur 36., 42. und 48. Stunde zu den Kulturen gegeben. Die Kultivierung wurde nach der 60. Stunde abgebrochen, die Aufarbeitung erfolgte gemäß 4.1. Der Kulturfiltratextrakt wurde an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, 120 x 45 mm) und der präparativen HPLC (Säule G, 55 % Acetonitril in H₂O) chromatographiert, die Ausbeuten sind in Tab. 23 wiedergegeben. Die Anreicherungen und Kopplungskonstanten von markiertem **15** aus den Fütterungsexperimenten sind in Tab. 24 (S. 154) zu finden.

Markierte Substanz	Gefütterte Menge		Ausbeute
	[mmol]	[mg]	[mg]
Na-[1- ¹³ C]Acetat	12.0	1000	1.3
Na-[2- ¹³ C]Acetat	12.0	1000	14.2
Na-[1,2- ¹³ C ₂]Acetat	12.0	1000	15.2
Na-[2-d ₃]Acetat	12.0	1000	20.7
Na-[1- ¹³ C]Propionat	5.0	385	6.6
[U- ¹³ C ₃]Glycerin	5.0	575	12.4
[1- ¹³ C]Tyrosin	2.8	500	0.7
[2,3,5,6-d ₄]Tyrosin	2.8	500	13.3

Tab. 23: Gefütterte isotopenmarkierte Vorläufer und Ausbeuten an Borrelidin (**15**).

	δ [ppm]	I ^{a)}	II ^{b)}	III ^{c)}	IV	V
C-1	173.2	2.39	-0.07	0.18	58.2	58.3
C-2	37.9	0.15	-0.40	0.51	58.2	58.3
C-3	72.9	0.50	9.45	0.20		
C-4	37.0	0.01	-0.24	0.17		
C-5	44.6	0.53	11.10	0.21		
C-6	28.5	-0.03	-0.31	0.26		
C-7	49.4	0.56	10.11	0.00		
C-8	27.6	0.02	-0.21	0.18		
C-9	39.1	0.53	9.30	0.23		
C-10	36.0	-0.08	-0.20	0.06		
C-11	73.1	0.40	13.19	-0.06		
C-12	119.9	0.08	-0.06	0.06		
C-13	145.5	2.39	0.17	-0.06	55.5	55.9
C-14	129.0	0.04	0.13	-0.05	56.0	55.9
C-15	140.2	2.31	0.19	0.05	43.8	43.5
C-16	36.7	-0.01	0.08	0.05	43.2	43.5
C-17	77.4	0.17	0.56	0.08	40.5	40.8
12-CN	117.4	0.02	-0.05	0.10		
4-CH ₃	19.1	0.06	0.05	-0.10		
6-CH ₃	20.9	-0.02	0.06	-0.06		
8-CH ₃	18.7	0.02	-0.08	0.17		
10-CH ₃	15.4	-0.07	0.04	-0.03		
C-1'	50.3	0.59	0.16	0.47	57.1*	57.3
C-2'	47.5	0.13	0.21	0.11	40.5	40.8
C-3'	30.5	1.22	-0.03	0.08	32.6	32.6
C-4'	26.3	0.03	0.10	0.11	32.6	32.0/32.6
C-5'	32.5	1.09	0.13	0.07	32.3	32.0
1'-COOH	180.7	2.13	1.49	0.90	57.1*	57.3

Tab. 24: ¹³C-Anreicherungen in Borrelidin (**15**) nach Fütterungsexperimenten: I) [1-¹³C]Acetat, II) [1-¹³C]Propionat, III) [1-¹³C]Tyrosin (Normierung auf den Mittelwert von 9-, 11-, 13- und 15-CH₃; IV) [1,2-¹³C₂]Acetat, V) [U-¹³C₃]Glycerin (¹J_{C-C}/ [Hz]).

4.3 Vorläufer-dirigierte Biosynthese

Die Kultivierung erfolgte wie unter Kap. B.3.1.4 angegeben in 2 x 100 mL Maßstab je Ansatz. Die potentiellen Vorläufer (für eine Auflistung s. Tab. 15, S. 102) wurden in 6 mL sterilem Wasser/1 M NaOH 1:1 gelöst und zur 36., 42. und 48. Stunde zu den Kulturen gegeben, so dass eine 2 mM Endkonzentration erreicht wurde. Die Kultivierung wurde nach der 60. Stunde abgebrochen. Die Kulturbrühen wurden lyophilisiert und mit 20 mL Methanol extrahiert. Die Abtrennung der festen Bestandteile erfolgte durch Filtration im Vakuum. Die organische Phase wurde bis zur Trockne eingeengt und für die Untersuchung an der HPLC-MS (Säule A, Programm 1) in 2 mL Methanol gelöst.

C LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ M.L. Cohen, *Nature* **2000**, *406*, 762–767.
- ² National Center for Health Statistics, *Health, United States 1999*, US Govt. Printing Office, Washington DC, **1999**.
- ³ A. Fleming, *Brit. J. Pat.* **1929**, *10*, 226.
- ⁴ D.J. Newman, G.M. Cragg, K.M. Snader, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 215–234.
- ⁵ H. Umezawa, I.R. Hooper, *Aminoglycoside Antibiotics*, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, Tokyo, **1982**.
- ⁶ W. Schönfeldt, H.A. Kirst, *Macrolide Antibiotics*, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, **2002**.
- ⁷ J.J. Hlava, J.H. Boothe, *The Tetracyclines*, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, Tokyo, **1985**.
- ⁸ G.L. Armstrong, L.A. Conn, Y. Pinner, *J. Am. Med. Assoc.* **1999**, *281*, 61–66.
- ⁹ a) G.G.F. Newton, E.P. Abraham, *Nature* **1955**, *175*, 548; b) G.G.F. Newton, E.P. Abraham, *Biochem. J.* **1956**, *62*, 651.
- ¹⁰ J.R. Knowles, *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 97–105.
- ¹¹ a) M.D. Song, M. Wachi, M. Doi, F. Ishino, M. Matsushashi, *FEBS Lett.* **1987**, *221*, 167; b) B.G. Spratt, *Science* **1994**, *264*, 388–393.
- ¹² G.M. Sheldrick, P.G. Jones, O. Kennard, D.H. Williams, G.A. Smith, *Nature* **1978**, *271*, 223–225.
- ¹³ C.T. Walsh, *Nature* **2000**, *406*, 775–781.
- ¹⁴ T.D.H. Bugg, *Biochemistry* **1991**, *30*, 10408–10415.
- ¹⁵ B.M. Crowley, D.L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2885–2892.
- ¹⁶ S.R. Palumbi, *Science*, **2001**, *293*, 1786–1790.
- ¹⁷ F.E. Koehn, G.T. Carter, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 206.
- ¹⁸ D.J. Newman, G.M. Cragg, K.M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022–1037.
- ¹⁹ T. Henkel, R.M. Brunne, H. Müller, F. Reichel, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 688–691.
- ²⁰ J. Clardy, C.T. Walsh, *Nature* **2004**, *432*, 829–837.
- ²¹ C.M. Dobson, *Nature* **2004**, *432*, 824–828.
- ²² J. Riedlinger, A. Reicke, H. Zähler, B. Krismer, A.T. Bull, L.A. Maldonado, A.C. Ward, M. Goodfellow, B. Bister, D. Bischoff, R.D. Süssmuth, H.-P. Fiedler, *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 271–279.
- ²³ B. Bister, D. Bischoff, M. Ströbele, J. Riedlinger, A. Reicke, F. Wolter, A.T. Bull, H. Zähler, H.-P. Fiedler, R.D. Süssmuth, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2628–2630; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2574–2576.
- ²⁴ a) K.C. Nicolaou, S.T. Harrison, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3256–3260; b) B.B. Snider, Y. Zou, *ChemInform* **2006**, *37*, 10; c) Jean-Philippe Rath, Stephan Kinast, Martin E. Maier, *ChemInform* **2005**, *36*, 47; d) C.W. Zapf, B.A. Harrison, C. Drahl, E.J. Sorensen, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6691–6695; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6533–6537.
- ²⁵ K.H. Michel, R.E. Kastner, *US patent*, 4492650, **1985**.

- ²⁶ a) J.S. Blanchard, *Nature Med.* **2005**, *11*, 1045–1046; b) H. Brötz-Oesterhelt, D. Beyer, H.-P. Kroll, R. Endermann, C. Ladel, W. Schroeder, B. Hinzen, S. Raddatz, H. Paulsen, K. Henninger, J.E. Bandow, H.-G. Sahl, H. Labischinski, *Nature Med.* **2005**, *11*, 1082–1087.
- ²⁷ M.D. Lee, T.M. Dunne, C.C. Chang, G.O. Morton, D.B. Borders, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3464–3466.
- ²⁸ J.S. Thorson, E.L. Sievers, J. Ahlert, E. Shepard, R.E. Whitwam, K.C. Onwueme, M. Ruppen, *Curr. Pharm. Des.* **2000**, *6*, 1841–1879.
- ²⁹ F. Giles, E. Estey, S. O'Brien, *Cancer* **2003**, *98*, 2095–2104.
- ³⁰ M.S. Butler, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 162–195.
- ³¹ M. Kamsteeg, T. Rutherford, E. Sapi, B. Hanczaruk, S. Shahabi, M. Flick, D. Brown, G. Mor, *Oncogene* **2003**, *22*, 2611–2620.
- ³² National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov), *TaxBrowser*, Stand: Mai **2006**.
- ³³ R. Daniel, *Nature Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 470–478.
- ³⁴ S.D. Bentley, K.F. Chater, A.-M. Cerdeño-Tárraga, G.L. Challis, N.R. Thomson, K.D. James, D.E. Harris, M.A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C.W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C.-H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M.-A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill, D.A. Hopwood, *Nature* **2002**, *417*, 141–147.
- ³⁵ G.L. Challis, D.A. Hopwood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 14555–14561.
- ³⁶ J. Piel, Universität Bonn, *persönliche Mitteilung*.
- ³⁷ H.B. Bode, R. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6828–6846.
- ³⁸ H.B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 619.
- ³⁹ E. Guenzi, G. Galli, I. Grgurina, D.C. Gross, G. Grandi, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32857–32863.
- ⁴⁰ a) B.O. Bachmann, *Nature Chem. Biol.* **2005**, *1*, 244–245; b) S. Lautru, R.J. Deeth, L.M. Bailey, G.L. Challis, *Nature Chem. Biol.* **2005**, *1*, 265–268.
- ⁴¹ R.W. Snow, C.A. Guerra, A.M. Noor, H.Y. Myint, S.I. Hay, *Nature* **2005**, *434*, 214–217.
- ⁴² M. Schlitzer, *Anti-Malaria Wirkstoffe – Status und Perspektiven*, 18. Irseer Naturstofftage der DECHEMA e.V., **2006**.
- ⁴³ R. Pink, A. Hudson, M.-A. Mouriès, M. Bendig, *Nature Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 727–740.
- ⁴⁴ K. Ströch, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2003**.
- ⁴⁵ J. Wiesner, R. Ortmann, H. Jomaa, M. Schlitzer, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5432–5451.
- ⁴⁶ D.L. Klayman, *Science* **1985**, *228*, 1049–1055.
- ⁴⁷ J.L. Vennerstrom, S. Arbe-Barnes, R. Brun, S.A. Charman, F.C.K. Chiu, J. Chollet, Y. Dong, A. Dorn, D. Hunziker, H. Matile, K. McIntosh, M. Padmanilayam, J.S. Tomas, C. Scheurer, B. Scorneaux, Y. Tang, H. Urwyler, S. Wittlin, W.N. Charman, *Nature* **2004**, *430*, 900–904.
- ⁴⁸ K. Shiomi, S. Omura, *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2004**, *80*, 245–258.
- ⁴⁹ H.M. Staines, T. Powell, S.L.Y. Thomas, J.C. Ellory, *Int. J. Parasitol.* **2004**, *34*, 665–673.

-
- 50 C. Gumila, M.-L. Ancelin, G. Jeminet, A.-M. Delort, G. Miquel, H.J. Vial, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 602–608.
- 51 C. Gumila, M.-L. Ancelin, A.-M. Delort, G. Jeminet, H.J. Vial, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 523–529.
- 52 C. Nilanonta, M. Isaka, R. Chanphen, N. Thong-orn, M. Tanticharoen, Y. Thebtaranonth, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 1015–1020.
- 53 K. Otoguro, H. Ui, A. Ishiyama, N. Arai, M. Kobayashi, Y. Takahashi, R. Masuma, K. Shiomi, H. Yamada, S. Omura, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 322–324.
- 54 R.G. Ridley, *Nature* **2002**, *415*, 686–693.
- 55 a) I. Paterson, E.A. Anderson, *Science* **2005**, *310*, 451–453; b) J.J. Kohler, *Nature Chem. Biol.* **2006**, *2*, 288–292.
- 56 C. Olano, B. Wilkinson, C. Sánchez, S.J. Moss, R. Sheridan, V. Math, A.J. Weston, A.F. Braña, C.J. Martin, M. Oliynyk, C. Méndez, P.F. Leadley, J.A. Salas, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 87–97.
- 57 N. Andres, H. Wolf, H. Zähler, E. Rössner, A. Zeeck, W.A. König, V. Sinnwell, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 426–437.
- 58 N. Andres, *Dissertation*, Universität Tübingen **1989**.
- 59 N. Andres, H. Wolf, H. Zähler, *Z. Naturforsch.* **1990**, *45c*, 851–855.
- 60 S. Omura, H. Mamada, N.-J. Wang, N. Imamura, R. Oiwa, Y. Iwai, N. Muto, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 700–705.
- 61 E. Rössner, *Dissertation*, Universität Göttingen **1989**.
- 62 E. Rössner, A. Zeeck, W.A. König, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 84–85; E. Rössner, A. Zeeck, W.A. König, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 64–65.
- 63 P. Henne, *Dissertation*, Universität Göttingen **1994**.
- 64 M. Ritzau, *Dissertation*, Universität Göttingen **1992**.
- 65 A. Zeeck, E. Rössner, M. Ritzau, P. Henne, *DECHEMA Monogr.* **1993**, *129*, 63–72.
- 66 P. Alvermann, *Dissertation*, Universität Göttingen **2001**.
- 67 B.D. Zlatopolskiy, *Dissertation*, Universität Göttingen **2003**.
- 68 B.D. Zlatopolskiy, K. Loscha, P. Alvermann, S.I. Kozhushkov, S.V. Nikolaev, A. Zeeck, A. de Meijere, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4708–4717.
- 69 B.D. Zlatopolskiy, A. de Meijere, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 4718–4727.
- 70 B. Rauch, *Dissertation*, Universität Tübingen **1992**.
- 71 B. Geers, *Dissertation*, Universität Göttingen **1998**.
- 72 Y. Iwai, S. Omura, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 123–141.
- 73 H. Wolf, N. Andres, *DECHEMA Monogr.* **1993**, *129*, 53–62.
- 74 A. de Meijere, S.I. Kozhushkov, *Georgia Augusta Wissenschaftsmagazin*, Georg-August Universität Göttingen, **2005**, *4*, 106–111.
- 75 K.L. Rinehart, *Pure. Appl. Chem.* **1977**, *49*, 1361–1381.
- 76 W.T. Shier, K.L. Rinehart, D. Gottlieb, *Proc. Natl. Acad. Soc.* **1969**, *63*, 198–204.
- 77 S. Weist, C. Kittel, D. Bischoff, B. Bister, V. Pfeifer, G.J. Nicholson, W. Wohlleben, R.D. Süßmuth, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5942–5943.

- 78 S. Weist, B. Bister, O. Puk, D. Bischoff, S. Pelzer, G.J. Nicholson, W. Wohlleben, G. Jung, R.D. Süssmuth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3383–3385.
- 79 O. Puk, P. Huber, D. Bischoff, J. Recktenwald, G. Jung, R.D. Süssmuth, K.-H. van Pée, W. Wohlleben, S. Pelzer, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 2025–2035.
- 80 H.B. Bode, A. Zeeck, *Phytochemistry* **2000**, *54*, 597–601.
- 81 R. Thiericke, J. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 265–289.
- 82 C. Nilanonta, M. Isaka, P. Kittakoop, S. Trakulnaleamsai, M. Tanticharoen, Y. Thebtaranonth, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3355–3360.
- 83 H.D. Mootz, D. Schwarzer, M.A. Marahiel, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 490–504.
- 84 T. Stachelhaus, H.D. Mootz, M.A. Marahiel, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 493–505.
- 85 R. Traber, H. Hoffmann, H. Kobel, *J. Antibiot.* **1989**, *41*, 591–597.
- 86 R. Traber, *Biotechnology of Antibiotica* 2nd ed., M. Dekker Inc., New York, Basel, Hongkong **1997**.
- 87 C. Khosla, R.S. Gokhale, J.R. Jacobsen, D.E. Cane, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 219.
- 88 B.D. Zlatopolskiy, M. Radzom, A. de Meijere, A. Zeeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *6*, 1525–1534.
- 89 D.J. Aberhart, J.-A. Cotting, H.-J. Lin, *Anal. Biochem.* **1985**, *151*, 88–91.
- 90 K. Hoffmann, E. Schneider-Scherzer, H. Kleinkauf, R. Zocher, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12710–12714.
- 91 M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York **1991**.
- 92 A.L.J. Beckwith, K.U. Ingold, in: *Rearrangements in Ground and Excited States*, vol. 1 (Ed. P. de Mayo), Academic Press, New York, **1980**, 161–310.
- 93 J.C. Walton, in: *Methods of Organic Chemistry* (Houben-Weyl), vol. E17c, (Ed.: A. de Meijere) Thieme, Stuttgart **1997**, 2438–2525.
- 94 D. Wendisch, in: *Methoden der Organischen Chemie* (Houben-Weyl), vol. 4/3 (Ed.: E. Müller), Thieme, Stuttgart, **1971**, 399–405.
- 95 G. Boche, H.M. Walborsky, *Cyclopropane-Derived Reactive Intermediates* (Eds.: S. Patai, Z. Rappoport), Wiley, Chichester, **1990**.
- 96 D.B. Stein, U. Linne, M.A. Marahiel, *FEBS Journal* **2005**, *272*, 4506–4520.
- 97 C.H. Hassal, K. Reyle, *Biochem. J.* **1955**, *60*, 334.
- 98 M.-t. Lai, L.-d. Liu, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7388–7397.
- 99 M.-t. Lai, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3160–3162.
- 100 A. Wenz, C. Thorpe, S. Ghisla, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 9809.
- 101 C. Thorpe, R.G. Matthews, C.H. Williams, *Biochemistry* **1979**, *18*, 331.
- 102 C.A. Bewley, J.D. Faulkner, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4849–4852.
- 103 S. Nakamura, *J. Antibiot.* **1965**, *18*, 47–65.
- 104 I. Uemura, H. Miyagawa, T. Uemo, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2351–2358.
- 105 R. Hatta, K. Ito, Y. Hosaki, T. Tanaka, A. Tanaka, M. Yamamoto, K. Akimitsu, T. Tsuge, *Genetics* **2002**, *161*, 59–70.
- 106 C.D. Murphy, *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 539–548.
- 107 D. O'Hagan, D.B. Harper, *J. Fluorine Chem.* **1999**, *100*, 127–133.

- ¹⁰⁸ R.J.M. Goss, H. Hong, *Chem. Commun.* **2005**, 3983–3985.
- ¹⁰⁹ F.H. Vaillancourt, E. Yeh, D.A. Vosburg, S.E. O'Connor, C.T. Walsh, *Nature* **2005**, *436*, 1191–1194.
- ¹¹⁰ N.A. Schnarr, C. Khosla, *Nature* **2005**, *436*, 1094–1095.
- ¹¹¹ R.J. Parry, M.-T. Lin, A.E. Walker, S. Mhaskar, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1849–1850.
- ¹¹² R.J. Parry, M.-T. Lin, A.E. Walker, S. Mhaskar, R. Mafotti, *Can. J. Chem.* **1994**, *72*, 86–97.
- ¹¹³ C.R. Buell, V. Joardar, M. Lindeberg, J. Selengut, I.T. Paulsen, M.L. Gwinn, R.J. Dodson, R.T. Deboy, A.S. Durkin, J.F. Kolonay, R. Madupu, S. Daugherty, L. Brinkac, M.J. Beanan, D.H. Haft, W.C. Nelson, T. Davidsen, N. Zafar, L. Zhou, J. Liu, Q. Yuan, H. Khouri, N. Fedorova, B. Tran, D. Russell, K. Berry, T. Utterback, S.E. Van Aken, T.V. Feldblyum, M. D'Ascenzo, W.-L. Deng, A.R. Ramos, J.R. Alfano, S. Cartinhour, A.K. Chatterjee, T.P. Delaney, S.G. Lazarowitz, G.B. Martin, D.J. Schneider, X. Tang, C.L. Bender, O. White, C.M. Fraser, A. Collmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10181–10186.
- ¹¹⁴ R. Couch, S.E. O'Connor, H. Seidle, C.T. Walsh, R.J. Parry, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 35–42.
- ¹¹⁵ L.C. Blasiak, F.H. Vaillancourt, C.T. Walsh, C.L. Demain, *Nature* **2006**, *440*, 368–371.
- ¹¹⁶ S.D. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 1, Elsevier Verlag, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo **1999**.
- ¹¹⁷ K. Zimmermann, *Diplomarbeit* **2004**, MPI für Chemische Ökologie, Jena.
- ¹¹⁸ J. Piel, *persönliche Mitteilung*, **2005**.
- ¹¹⁹ D.H. Ripins, D.A. Evans, *Advanced Organic Chemistry*, Hrsg.: J.Marsh, 3rd Ed., **1985**.
- ¹²⁰ U.M. Reinscheid, J. Farjon, M. Radzom, P. Haberz, A. Zeeck, M. Blackledge, C. Griesinger, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 287–296.
- ¹²¹ P. Haberz, J. Farjon, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 431–433.
- ¹²² U.M. Reinscheid, B.D. Zlatopolskiy, C. Griesinger, A. Zeeck, A. de Meijere, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2929–2945.
- ¹²³ S. Lautru, R.J. Deeth, L.M. Bailey, G.L. Challis, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 265–269.
- ¹²⁴ E.F. Paulus, M. Kurz, H. Matter, L. Vértessy, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8209–8221.
- ¹²⁵ J. Hardy, D.J. Selkoe, *Science* **2002**, *297*, 353–356.
- ¹²⁶ Y. Mekmouche, Y. Coppel, K. Hochgräfe, L. Guilloreau, C. Talmard, H. Mazarguil, P. Faller, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1663–1671.
- ¹²⁷ T. Baltz, D. Baltz, C. Giroud, J. Crockett, *EMBO J.* **1985**, *4*, 1273–1277.
- ¹²⁸ B. Rätz, M. Iten, Y. Grethen-Bühler, R. Kaminsky, R. Brun, *Acta Trop.* **1997**, *68*, 139–147.
- ¹²⁹ S.M. Jones, J.E. Urch, M. Kaiser, R. Brun, J.L. Harwood, C. Berry, I.H. Gilbert, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5932–5941.
- ¹³⁰ RÖMPP-Lexikon Naturstoffe, Hrsg.: W. Steglich, B. Fugmann, S. Lang-Fugmann, Thieme, Stuttgart, New York, **1997**.
- ¹³¹ H.P. Fiedler, *Nat. Prod. Lett.* **1993**, *2*, 119–128.
- ¹³² H.Zähner, H. Drautz, W. Weber, in *Bioactive Microbial Product-Search and Discovery*, Hrsg.: J.D. Bullock, L.J. Nisbet, D.J. Winstley, Academic Press, London, New York, **1982**, 51–70.

- ¹³³ S. Grabley, R. Thiericke, A. Zeeck, in *Drug Discovery from Nature*, Hrsg.: S. Grabley, R. Thiericke, Springer-Verlag, Heidelberg, **1999**, 124–148.
- ¹³⁴ S. Breiding-Mack, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 953–960.
- ¹³⁵ S. Umezawa, T. Tsuchiya, K. Tatsuna, Y. Horiyuchi, T. Usi, H. Umezawa, M. Hamada, A. Yagi, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 20–27.
- ¹³⁶ H. Laatsch, *Naturstoffdatenbank Antibase*, Version 2002, Chemical Concepts, Weinheim, **2000**.
- ¹³⁷ I. Bergère, *Dissertation*, Universität Göttingen **2000**.
- ¹³⁸ K. Ströck, *Dissertation*, Universität Göttingen **2003**.
- ¹³⁹ B.E. Leach, K.M. Calhoun, L.R. Johnson, C.M. Teeters, W.G. Jackson, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 4011–4012.
- ¹⁴⁰ L.H. Sternbach, S. Kaiser, M.W. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1639–1647.
- ¹⁴¹ a) E. Simonitsch, W. Eisenhut, O.A. Stamm, H. Schmid, *Helv. Chim. Acta* **1960**, *43*, 58–63. b) E. Simonitsch, W. Eisenhut, O.A. Stamm, H. Schmid, *Helv. Chim. Acta* **1964**, *47*, 1459–1475. c) W. Eisenhut, O.A. Stamm, H. Schmid, *Helv. Chim. Acta* **1964**, *47*, 1475–1484.
- ¹⁴² P. Canham, L.C. Vining, A. McInnes, W.J.A. Gavin, J.L.C. Wright, *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 2450–2457.
- ¹⁴³ M. Uramato, T. Nishino, K. Shishido, T. Ando, *FEBS Lett.* **1983**, *153*, 325–328.
- ¹⁴⁴ M. Yagi, T. Nishimura, H. Suzuki, H. Tannaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *98*, 3012–3018.
- ¹⁴⁵ J.P. McGovren, G.L. Neil, S.L. Crampton, M.I. Robinson, J.D. Douros, *Cancer Res.* **1977**, *37*, 1666–1672.
- ¹⁴⁶ J. Goto, Y. Matsuda, K. Asano, I. Kawamoto, T. Yasuzawa, K. Shirahata, H. Sano, H. Kase, *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 3003–3009.
- ¹⁴⁷ a) Y. Inuoye, K. Yamaguchi, Y. Take, S. Nakamura, *J. Antibiot.* **1989**, *32*, 1523; b) T. Akiyama, J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, Y. Fukami, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5592.
- ¹⁴⁸ a) H. Chimura, T. Sawa, Y. Kumada, H. Nagawa, M. Matsuzaki, T. Takita, M. Hamada, T. Takeuchi, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 619; b) K. Komiyama, S. Funayama, Y. Anraku, A. Mita, Y. Takahashi, S. Omura, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1344.
- ¹⁴⁹ I.O. Anyanwutaku, E. Zirbes, J.P.N. Rosazza, *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1498–1504.
- ¹⁵⁰ *Dictionary of Natural Products on CD-ROM*, Version 13:2, Chapman & Hall/ CRC, Boca Raton (FL), **2004**.
- ¹⁵¹ a) M.S. Kuo, D.A. Yurek, D.A. Kloosterman, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1006–1007. b) B.F. Anderson, A.J. Herlt, R.W. Rickards, G.B. Robertson, *Austr. J. Chem.* **1989**, *42*, 717–730. c) H. Maehr, R.H. Evans, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1455–1456.
- ¹⁵² F. Petersen, H. Zähler, J.W. Metzger, S. Freund, R.-P. Hummel, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1126–1138.
- ¹⁵³ H. Fu, S. Ebert-Khosla, D.A. Hopwood, C.J. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4166–4170.
- ¹⁵⁴ L. Xiang, J.A. Kalaitzis, B.S. Moore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15609–15614.
- ¹⁵⁵ ¹³C-NMR Predictor, ACD-Labs, Vs. 6.12, **2005**.

- ¹⁵⁶ M. Radzom, A. Zeeck, N. Antal, H.-P. Fiedler, *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 315–317.
- ¹⁵⁷ A. Zeeck, P. Christiansen, *Liebigs Ann. Chem.* **1969**, *724*, 172–182.
- ¹⁵⁸ a) R. McDaniel, C.R. Hutchinson, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6806–6811; b) B. Shen, R.G. Summers, E. Wendt-Pienkowski, C.R. Hutchinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6811–6821.
- ¹⁵⁹ C. Bisang, P.F. Long, J. Cortes, J. Westcott, J. Crosby, A.L. Matharu, R.J. Cox, T.J. Simpson, J. Staunton, P.F. Leadlay, *Nature* **1999**, *401*, 502.
- ¹⁶⁰ W.L. Bao, E. Wendt-Pienkowski, C.R. Hutchinson, *Biochemistry* **1998**, *37*, 8132.
- ¹⁶¹ a) A.L. Matharu, R.J. Cox, J. Crosby, K.J. Byrom, T.J. Simpson, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 699; b) T.P. Nicholson, C. Winfield, J. Westcott, J. Crosby, T.J. Simpson, R.J. Cox, *Chem. Comm.* **2003**, 686–687.
- ¹⁶² T.S. Lee, C. Khosla, Y. Tang, *J. Antibiot.* **2005**, *58*, 663–666.
- ¹⁶³ P.L. Bartel, C.B. Zhu, J.S. Lampel, D.C. Dosch, S.P. Connors, W.R. Strohl, J.M. Beale, H.G. Floss, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 4816–4826.
- ¹⁶⁴ T. Taguchi, K. Itou, Y. Ebizuka, F. Malpartida, D.A. Hopwood, C.M. Surti, K.I. Booker-Milburn, G.R. Stephenson, K. Ichinose, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 144–152.
- ¹⁶⁵ T. Taguchi, Y. Ebizuka, D.A. Hopwood, K. Ichinose, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 5253–5256.
- ¹⁶⁶ a) B. Shen, R. Hutchinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6600–6604; b) P.J. Kramer, R.J.X. Zawada, R. McDaniel, C.R. Hutchinson, D.A. Hopwood, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 635–639.
- ¹⁶⁷ H. Fu, S. Ebert-Khosla, D.A. Hopwood, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4166–4170.
- ¹⁶⁸ K.U. Bindseil, P. Hug, H.H. Peter, F. Petersen, B.E. Roggo, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 457–461.
- ¹⁶⁹ Y. Hayakawa, K. Shin-Ya, K. Furihata, H. Seto, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1563–1569.
- ¹⁷⁰ J. Berger, L.M. Jampolsky, M.W. Goldberg, *Arch. Biochem.* **1949**, *22*, 476–478.
- ¹⁷¹ K. Anderton, R.W. Rickards, *Nature* **1965**, *498*, 269.
- ¹⁷² W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta.* **1967**, *50*, 731–753.
- ¹⁷³ F.F. Fleming, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 597–606.
- ¹⁷⁴ S.K. Singh, S. Gurusiddaiah, J.W. Whalen, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 239–245.
- ¹⁷⁵ W. Paetz, G. Nass, *Eur. J. Biochem.* **1973**, *35*, 331–337.
- ¹⁷⁶ M. Ibba, D. Soll, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 617–650.
- ¹⁷⁷ J.G. Hurdle, A.J. O'Neill, I. Chopra, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4821–4833.
- ¹⁷⁸ E.B. Chain, G. Mellows, *J. Chem. Soc. Perkins Trans. I* **1977**, *1*, 294–309.
- ¹⁷⁹ R. Sutherland, R.J. Boon, K.E. Griffin, P.J. Masters, B. Slocombe, A.R. White, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 495–498.
- ¹⁸⁰ S. Fujimura, A. Watanabe, *Chemotherapy* **2003**, *49*, 36–38.
- ¹⁸¹ T. Wakabayashi, R. Kageyama, N. Naruse, N. Tsukahara, Y. Funahashi, K. Kitoh, Y. Watanabe, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 671–676.
- ¹⁸² A. Matter, *Drug Discov. Today* **2001**, *6*, 1055–1024.
- ¹⁸³ T. Kawamura, D. Liu, M.J. Towle, R. Kageyama, N. Tsukahara, T. Wakabayashi, B.A. Littlefield, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 709–715.

- ¹⁸⁴ a) E. Tsuchiya, M. Yukawa, T. Miyakawa, K.I. Kimura, H. Takahashi, *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 84–90.
b) M. Lumb, P.E. Macey, J. Spyvee, J.M. Whitmarsh, R.D. Wright, *Nature* **1965**, *206*, 263–265; L. Dickinson, A.J. Griffiths, C.G. Mason, R.F.N. Mills, *Nature* **1965**, *206*, 265–267. c) K. Ootoguro, H. Ui, A. Ishiyama, M. Kobayashi, H. Togashi, Y. Takahashi, R. Masuma, H. Tanaka, H. Tomoda, H. Yamada, S. Omura, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 727–729.
- ¹⁸⁵ D.A. Hopwood, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2465–2498.
- ¹⁸⁶ C. Olano, B. Wilkinson, S.J. Moss, A.F. Braña, C. Méndez, P.F. Leadley, J.A. Salas, *Chem. Commun.* **2003**, 2780–2782.
- ¹⁸⁷ C. Olano, B. Wilkinson, C. Sánchez, S.J. Moss, R. Sheridan, V. Math, A.J. Weston, A.F. Braña, C.J. Martin, M. Oliynyk, C. Méndez, P.F. Leadley, J.A. Salas, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 87–97.
- ¹⁸⁸ S. Mochizuki, K. Hiratsu, M. Suwa, T. Ishii, F. Sugino, K. Yamada, H. Kinashi, *Mol. Microbiol.* **2003**, *48*, 1501–1510.
- ¹⁸⁹ N. Gaitatzis, B. Silakowski, B. Kunze, G. Nordsiek, H. Blöcker, G. Höfle, R. Müller, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13082–13088.
- ¹⁹⁰ B. Wilkinson, G. Foster, B.A.M. Rudd, N.L. Taylor, A.P. Blackaby, P.J. Sidebottom, D.J. Cooper, M.J. Dawson, A.D. Buss, S. Gaisser, I.U. Böhm, C.J. Rowe, J. Cortés, P.F. Leadley, J. Staunton, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 111–117.
- ¹⁹¹ a) Y. Kato, K. Nakamura, H. Sakiyama, S.G. Mayhew, Y. Asano, *Biochemistry* **2000**, *39*, 800–809. b) Y. Kato, R. Ooi, Y. Asano, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 2290–2296.
- ¹⁹² C. Olano, S.J. Moss, A.F. Braña, R. Sheridan, V. Math, A.J. Weston, C. Méndez, P.F. Leadley, B. Wilkinson, J.A. Salas, *Mol. Microbiol.* **2004**, *52*, 1745–1756.
- ¹⁹³ T. Wakabayashi, R. Kageyama, N. Naruse, Y. Yokoyama, Y. Watanabe, K. Dobashi, *Japanese Patent Application* JP09227549A. ChemABS, *127*, 277250S.
- ¹⁹⁴ M.A. Prieto, E. Diaz, J.L. Garcia, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 111–120.
- ¹⁹⁵ B. Silakowski, H.U. Schairer, H. Ehret, B. Kunze, S. Weinig, G. Nordsiek, P. Brandt, H. Blocker, G. Höfle, S. Beyer, R. Müller, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37391.
- ¹⁹⁶ W. Trowitzsch-Kienast, V. Wray, K. Gerth, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, *93*.
- ¹⁹⁷ K. Kakinuma, N. Ikekawa, A. Nakagawa, S. Omura, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3402.
- ¹⁹⁸ a) S. Fushimi, K. Furihata, H. Seto, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1026; b) T. Ozasa, K. Tanaka, M. Sasamata, H. Kaniwa, M. Shimizu, H. Matsumoto, M. Iwanami, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1339.
- ¹⁹⁹ a) A.M. Hill, J.P. Harris, A.P. Siskos, *Chem. Commun.* **1998**, 2361; b) G. Höfle, H. Reichenbach in: *Sekundärmetabolismus bei Mikroorganismen*, ed. W. Kuhn, H.-P. Fiedler, Attempto Verlag, Tübingen, **1995**, 61–78; c) T. Schupp, C. Toupet, B. Cluzel, S. Neff, S. Hill, J.J. Beck, J.M. Ligon, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 3673.
- ²⁰⁰ a) T.S. Chen, E.S. Inamine, O.D. Hensens, D. Zink, D.A. Ostlind, *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *269*, 544; b) T.S. Chen, B.H. Arison, V.P. Gullo, E.S. Inamine, *J. Ind. Microbiol.* **1989**, *4*, 231.
- ²⁰¹ M.D. Schulman, D. Valentino, O. Hensens, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 541.
- ²⁰² a) E.W. Hafner, B.W. Holley, K.S. Holdom, S.E. Lee, R.G. Wax, D. Beck, H.A.I. McArthur, W.C. Wernau, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 349; C.D. Denoya, R.W. Fedechko, E.W. Hafner, H.A.I. McArthur,

-
- M.R. Morgenstern, D.B. Skinner, K. Stutzmann-Engwall, R.G. Wax, W.C. Wernau, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 3504.
- ²⁰³ C.J. Dutton, S.P. Gibson, A.C. Goudie, K.S. Holdom, M.S. Pacey, J.C. Ruddock, J.D. Bu'Lock, M.K. Richards, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 357.
- ²⁰⁴ M.S. Pacey, J.P. Dirlam, R.W. Geldart, P.F. Leadlay, H.A. McArthur, E.L. McCormick, R.A. Monday, T.N. O'Connell, J. Staunton, T.J. Winchester, *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 1029–1034.
- ²⁰⁵ B.S. Moore, C. Hertweck, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 70–99.
- ²⁰⁶ MERCK, *Anfärbereagenzien für die Dünnschicht- und Papierchromatographie*, E. MERCK, Darmstadt, **1998**.
- ²⁰⁷ H.G. Schlegl, *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1992**.

Danksagung

Das Hormaomycin-Thema der vorliegenden Dissertation ist Teil eines Kooperationsprojektes und sein Erfolg war ohne die Partner nicht vorstellbar. Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich deshalb bei Prof. Dr. Armin de Meijere und seinen Mitarbeitern Dr. Boris Zlatopolskij und Vitalij Raev bedanken. Gleiches gilt für Dr. Uwe Reinscheid, Jonathan Farjon, Peter Haberz und Dr. Tim Grüne aus den Gruppen von Prof. Dr. Christian Griesinger und Prof. Dr. George M. Sheldrick sowie Kathrin Zimmermann, Daniel Flachshaar und Prof. Dr. Jörn Piel. Für die antiparasitären Tests danke ich Dr. Marcel Kaiser und seinen Mitarbeitern.

Weiterer Dank gebührt Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler und Dr. Noémi Antal für die Isolierung der Substanzen aus dem Actapharm-Projekt sowie Prof. Dr. W. Beil für die Cytotoxizitätstests.

Für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich Carola Zolke, Martin Weitemeyer und R. Machinek, sowie den Operatoren aus der Abteilung, insbesondere Dr. Sven Meyer und Dr. Oliver Schlörke.

Györgyi Udvarnoki, Frau Krökel, Dr. Karsten Ströch und Dr. Holm Frauendorf danke ich für die MS-Messungen bzw. die Unterstützung an der LC-MS.

Für das Messen der physiko-chemischen Daten meiner Substanzen sowie die Unterstützung bei Fermentationen danke ich Michaela Klingebiel und Hans-Peter Kroll; Jutta Gerber-Nolte für die Bereitstellung von Testplatten. Hans-Jörg Langer gilt zudem großer Dank für die technische Unterstützung, die Schachduelle und den Austausch an Fußballerfahrungen.

Weiterhin möchte ich mich für das sorgfältige Korrekturlesen bei Marko Gentzsch, Tobias Bender und Sandra Lösger bedanken.

Der wichtigste Dank geht an meine Familie, Nina und meine Freunde für ihre stete Unterstützung und die Freude, die sie in mein Leben bringen.

Lebenslauf

Ich bin deutscher Staatsbürger und wurde am 02.07.1977 in Bad Gandersheim geboren.

Von 1984–1988 besuchte ich die Grundschule in Kreiensen, von 1988–1990 die Orientierungsstufe am Schulzentrum Kreiensen/ Greene. 1990 wechselte ich an das Roswitha-Gymnasium in Bad Gandersheim, dessen Besuch ich 1997 nach erfolgreichem Abitur abschloss.

1997 nahm ich an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (TH) das Studium des Chemieingenieurwesens auf, 1998 erfolgte ein Studienfachwechsel zu Chemie (Diplom). 2001 schloss ich das Vorstudium im Studiengang Chemie mit der Diplomvorprüfung ab.

Von 2001–2003 absolvierte ich das Hauptstudium der Chemie an der Georg-August-Universität Göttingen, welches ich am 14.11.2003 mit der Diplomhauptprüfung (Titel der Diplomarbeit: „Isolierung und Charakterisierung von Phenazinderivaten und anderen Sekundärmetaboliten aus Actinomyceten“) erfolgreich beendete.

Seit Januar 2004 arbeite ich unter Anleitung von Prof. Dr. A. Zeeck an der vorliegenden Dissertation.

Göttingen, 30. Mai 2006

Markus Radzom