

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

*Doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat.)

# **Synthese und Funktion von Thiostreptonderivaten: Struktur-Wirkungsuntersuchungen und Zielstrukturaufklärung**

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker

**Sebastian Schoof**

aus Siegen

Tag der mündlichen Prüfung:

3. November 2010

Dekan: Prof. Dr. Heinz Rehage

1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann

2. Gutachter Prof. Dr. Martin Engelhard

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 2006 bis April 2010 unter der Anleitung von Dr. Hans-Dieter Arndt an der Fakultät Chemie der Technischen Universität Dortmund und dem Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie Dortmund.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

### Artikel

1. S. Schoof, G. Pradel, M.N. Aminake, B. Ellinger, S. Baumann, M. Potowski, Y. Najajreh, M. Kirschner, H.-D. Arndt: Potent Anti-Plasmodial Activity of Thiostrepton Derivatives is Based on a Dual Mode of Action Involving the Proteasome, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 3317–21; *Angew. Chem.*, **2010**, *122*, 3389–93.
2. S. Schoof, H.-D. Arndt: D-Cysteine Occurrence in Thiostrepton may not necessitate an Epimerase, *Chem. Commun.*, **2009**, 7113–15.
3. S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H.-D. Arndt: A Fluorescent Probe for the 70 S-Ribosomal GTPase-Associated Center, *ChemBioChem*, **2009**, *10*, 242–45.
4. S. Baumann, S. Schoof, S. D. Harkal, H.-D. Arndt: Mapping the Binding Site of Thiopeptide Antibiotics by Proximity-Induced Covalent Capture, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 5664–66.
5. S. Baumann, S. Schoof, M. Bolten, C. Haering, M. Takagi, K. Shin-ya, H.-D. Arndt: Molecular Determinants of Microbial Resistance to Thiopeptide Antibiotics, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 6973–81.
6. H. R. A. Jonker, S. Baumann, A. Wolf, S. Schoof, F. Hiller, K. W. Schulte, K. N. Kirschner, H. Schwalbe, H.-D. Arndt: NMR structures of thiostrepton derivatives report target shape recognition, *Angew. Chem.*, angenommen (anie.201003582).
7. H.-D. Arndt, S. Schoof, J.-Y. Lu: Thiopeptide Antibiotic Biosynthesis Reveals its Secrets: Ribosomal Peptides Tailor-made (Highlight), *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 6770–73; *Angew. Chem.*, **2009**, *121*, 6900–04.
8. H.-D. Arndt, S. Schoof: Polyamide- and RNA-based Activators in Living Cells: A Major Step Towards Controlling Gene Expression (Highlight), *ChemBioChem*, **2007**, *8*, 1095–98.

### Patente

1. S. Schoof, S. Baumann, H.-D. Arndt, TU Dortmund, **2009**, *PCT/EP2009/001948*.
2. S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H.-D. Arndt, TU Dortmund, **2009**, *PCT/EP2009/001949*.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Allgemeine Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Antibiotika und Resistenzen . . . . .	2
1.2. Naturstoffe als Antibiotika . . . . .	4
1.3. Naturstoffe als Leitstrukturen . . . . .	6
1.4. Das Konzept der Semisynthese . . . . .	7
1.5. Die Klasse der Thiopeptide . . . . .	9
1.5.1. Strukturelle Charakteristika der Thiopeptide . . . . .	9
1.5.2. Biologische Wirkungen der Thiopeptide . . . . .	11
1.6. Zielsetzung . . . . .	13
<b>2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons</b>	<b>17</b>
2.1. Semisynthese als methodischer Zugang zur Klasse der Thiopeptide . . . . .	18
2.2. Funktionalisierung der Dehydroalanine . . . . .	19
2.2.1. Vorkommen der Dehydroaminosäuren . . . . .	19
2.2.2. Strukturstabilisierung durch Dehydroaminosäuren . . . . .	21
2.2.3. Chemische Reaktivität der Dehydroaminosäuren . . . . .	22
2.2.4. Biochemische Bedeutung der Dehydroaminosäuren in Naturstoffen	24
2.2.5. Michael-Additionsreaktionen an Thiostrepton . . . . .	32
2.3. Transformation des Thiazolins . . . . .	43
2.3.1. Vorkommen von Thiazolinen in Naturstoffen . . . . .	44
2.3.2. Hydrolysestabilität der Thiazoline . . . . .	45
2.3.3. Oxidation des Thiazolins zum Thiazol innerhalb der Thiostrepton- struktur . . . . .	46

2.4.	Transformation des Dehydropiperidins . . . . .	48
2.4.1.	Reduktion des Dehydropiperidins der Thiostreptonderivate . . . . .	50
2.4.2.	Reduktion des Dehydropiperidins der oxidierten Thiostreptonderivate . . . . .	56
2.5.	Regioselektive Acylierung . . . . .	57
2.6.	Hydrolyse des B-Ring-Lactons . . . . .	58
2.7.	Synthese funktionstragender Derivate des Thiostreptons . . . . .	61
2.7.1.	Fluoreszente Thiostreptonsonden . . . . .	61
2.7.2.	Biotin-Thiostreptonsonde . . . . .	62
<b>3.</b>	<b>Wirkort: Ribosom</b>	<b>67</b>
3.1.	Einleitung . . . . .	68
3.2.	PICC: Proximity Induced Covalent Capture . . . . .	75
3.2.1.	Konzept des PICC . . . . .	75
3.2.2.	Ergebnisse des PICC an der ribosomalen Bindestelle . . . . .	76
3.2.3.	Diskussion . . . . .	78
3.3.	Modifizierungen der Thiostrepton-Seitenkette . . . . .	80
3.3.1.	Quantifizierung der Bindungsaffinitäten mittels fluoreszenter Thiostreptonsonde . . . . .	80
3.3.2.	Untersuchungen zur antibiotischen Wirksamkeit . . . . .	84
3.4.	Modifizierungen des Thiostrepton-A-Rings . . . . .	85
3.4.1.	Konformationsbestimmung mittels NMR . . . . .	86
3.4.2.	Molekulare <i>Docking</i> -Studien . . . . .	87
3.4.3.	Biochemische Evaluierungen . . . . .	89
3.4.4.	Diskussion . . . . .	93
3.5.	Anwendungen der fluoreszenten Thiostrepton-Sonde . . . . .	97
3.5.1.	Untersuchungen von Thiopeptid-Resistenzmutationen . . . . .	98
3.6.	Anwendungen der Biotinylierten Thiostrepton-Sonde . . . . .	100
3.6.1.	Präparativer Ribosomen- <i>Pull-down</i> . . . . .	101
3.6.2.	Analytischer Ribosomen- <i>Pull-down</i> . . . . .	102
3.6.3.	Affinitäts-Elektronenmikroskopie . . . . .	102

<b>4. Wirkort: Proteasom</b>	<b>103</b>
4.1. Einleitung . . . . .	104
4.1.1. Malaria . . . . .	104
4.1.2. Klinisch relevante Antimalariaverbindungen . . . . .	106
4.1.3. Wirkung klassischer Antibiotika auf Plasmodien . . . . .	112
4.1.4. Aktivität der Thiopeptide gegen Plasmodien . . . . .	119
4.1.5. Kombinationstherapien . . . . .	121
4.1.6. Antimalariawirkung von Proteasominhibitoren . . . . .	123
4.1.7. Das Proteasom . . . . .	124
4.1.8. Die Proteasomarchitektur . . . . .	124
4.1.9. Das Ubiquitin-System . . . . .	127
4.1.10. Die Proteaseaktivitäten der einzelnen Untereinheiten . . . . .	128
4.1.11. Inhibitoren des Proteasoms . . . . .	130
4.1.12. Untereinheiten-spezifische Proteasominhibitoren . . . . .	134
4.2. Ergebnisse . . . . .	136
4.2.1. Wachstumsinhibierung . . . . .	136
4.2.2. Zellmikroskopische Untersuchungen . . . . .	139
4.2.3. Fluoreszenzpolarisationsmessungen . . . . .	141
4.2.4. Zytotoxizitätsuntersuchungen . . . . .	141
4.2.5. Proteasom-Inhibierungs-Assay . . . . .	141
4.3. Diskussion . . . . .	150
<b>5. Biosynthese des Thiostreptons</b>	<b>167</b>
5.1. Einleitung . . . . .	168
5.1.1. Nicht-ribosomale Peptidsynthese . . . . .	172
5.1.2. Ribosomale Peptidsynthese . . . . .	176
5.1.3. Allgemeine Biosynthese der Thiopeptide . . . . .	178
5.1.4. Biosynthese des Thiostreptons . . . . .	181
5.1.5. D-Konfiguration des Thiazolins der Thiostreptonstruktur . . . . .	186
5.2. Ergebnisse . . . . .	188
5.2.1. Identifizierung eines Isomers des verkürzten Thiostreptons . . . . .	188

5.2.2.	pH-abhängige Isomerumwandlung . . . . .	188
5.2.3.	NMR-Strukturuntersuchung des Isomers . . . . .	190
5.2.4.	<i>H-D</i> -Austauschkinetik des Thiostreptons . . . . .	193
5.2.5.	Einfluss des B-Rings der Thiostreptonstruktur auf die Konfiguration des Thiazolins . . . . .	193
5.3.	Diskussion . . . . .	195
5.4.	Zusammenfassung . . . . .	197
<b>6.</b>	<b>Sonstige wissenschaftliche Projekte</b>	<b>199</b>
6.1.	Einleitung . . . . .	200
6.1.1.	Positronen-Emissions-Tomographie . . . . .	200
6.1.2.	Somatostatin-Rezeptor-Liganden . . . . .	202
6.1.3.	Octreotid-Analoga in Diagnostik und Therapie . . . . .	203
6.1.4.	Synthesestrategien der <sup>18</sup> F- <i>Tracer</i> -Moleküle . . . . .	203
6.1.5.	Organosilicium basierte Fluoridakzeptoren . . . . .	206
6.1.6.	Syntheseziel . . . . .	207
6.2.	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	208
6.2.1.	Design des SiFA-Octreotat-Peptids . . . . .	208
6.2.2.	Synthese des ( <i>S</i> )-SiFA-Phenylalanins . . . . .	208
6.2.3.	Synthese des SiFA-Octreotat-Peptids . . . . .	209
6.2.4.	Radiochemische Evaluierung des SiFA-Octreotat-Peptids . . . . .	211
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>215</b>
<b>8.</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>221</b>
8.1.	Methoden . . . . .	222
8.1.1.	Geräte und Verfahren . . . . .	222
8.1.2.	Chromatographie . . . . .	223
8.1.3.	Reagenzien, Lösungsmittel, Harze . . . . .	224
8.1.4.	Biochemische Materialien . . . . .	224
8.1.5.	Pufferlösungen . . . . .	225
8.2.	Allgemeine Arbeitsvorschriften . . . . .	225



8.3. Thiostreptonderivate . . . . .	228
8.3.1. Verkürzungsreaktionen . . . . .	229
8.3.2. <i>Sulfa</i> -Michael-Additionen an einfach verkürztes Thiostrepton <b>23</b> .	232
8.3.3. Mehrfach- <i>Sulfa</i> -Michael-Additionen an Thiostrepton . . . . .	247
8.3.4. Synthese der Thiostrepton-Fluoreszenzsonden . . . . .	253
8.3.5. Synthese des Biotin-Thiostrepton-Addukts . . . . .	260
8.3.6. Oxidation des Thiazolins von Thiostreptonderivaten . . . . .	263
8.3.7. <i>Sulfa</i> -Michael-Additionen an einfach verkürztes oxidiertes Thiostrepton . . . . .	267
8.3.8. Reduktion des Dehydro-Piperidins der Thiostreptonstruktur . . . . .	274
8.3.9. Kombinierte Oxidation / Reduktion . . . . .	278
8.3.10. Regioselektive Acylierung . . . . .	282
8.3.11. Hydrolyse des B-Ring-Lactons . . . . .	284
8.3.12. Epimerisierung des Thiazolins . . . . .	288
8.4. H/D-Austauschkinetik: Thiostrepton . . . . .	290
8.5. Löslichkeitsuntersuchungen . . . . .	290
8.6. Octreotat-Peptid . . . . .	291
8.7. Biologische Testierungen . . . . .	294
8.7.1. Bakterielle Wachstumshemmung . . . . .	294
8.7.2. Polarisations-Assays . . . . .	294
8.7.3. Gekoppelter <i>in vitro</i> Transkriptions-Translations-Inhibitions-Assay	295
8.7.4. Cytotoxizitätsuntersuchung . . . . .	296
8.7.5. Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	297
8.7.6. Plasmodien Wachstumshemmung . . . . .	297
8.7.7. Proteasom-Inhibierungs-Assay . . . . .	298

<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>301</b>
-----------------------------	------------

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>319</b>
------------------------------	------------



# **1. Allgemeine Einleitung**

### 1.1. Antibiotika und Resistenzen

Gegen die heute gebräuchlichen Antibiotika entwickeln pathogene Bakterien in immer größerem Umfang Resistenzen.<sup>[1,2]</sup> Wenn die zur Verfügung stehenden Antibiotika gegen die multiresistenten Bakterien versagen, findet sich die moderne Medizin häufig in die «prä-antibiotische Ära» zurückversetzt. Die Entwicklung neuer antibiotisch wirkender Substanzen ist daher von großer Bedeutung für ein funktionierendes Gesundheitssystem.<sup>[3]</sup> Allerdings haben sich die meisten großen Unternehmen in der letzten Zeit aufgrund verschiedenster Überlegungen<sup>[4]</sup> aus der Entwicklung neuer Antibiotika zurückgezogen, so dass in naher Zukunft Engpässe in der Versorgung mit effektiven Antibiotikatherapien zu erwarten sind.<sup>[5]</sup> Die Situation wird sich vermutlich durch alternde Bevölkerungen in den Industrieländern und durch die allgemeine Kostenexplosion im Gesundheitswesen noch verschärfen.

Nach einem «Goldenen Zeitalter» der Antibiotika-Entwicklung in den 1940–1960er Jahren herrschte über einen Zeitraum von ungefähr 3–4 Jahrzehnten eine Innovationslücke in der Erforschung und Entwicklung neuer Antibiotikaklassen (Abbildung 1.1A).<sup>[6]</sup> Erst im Jahr 2000 wurde mit den Oxazolidinon Linezolid eine neue Klasse antibiotisch wirksamer Moleküle eingeführt, gefolgt von dem Lipopeptid Daptomycin (2003) und dem zur äußeren Anwendung zugelassenen Retapamulin (2007).<sup>[1]</sup>

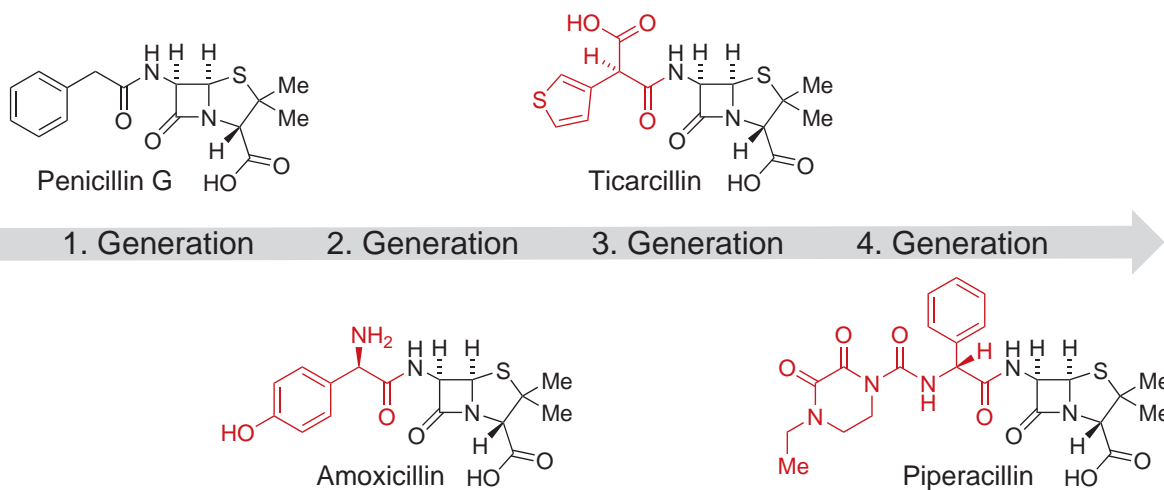
Die wichtigsten in der Therapie verwendeten Antibiotika werden 21 unterschiedlichen Strukturklassen zugeordnet.<sup>[6]</sup> Im Gegensatz zu vielen anderen Indikationsgebieten leiten sich viele der therapeutisch eingesetzten Antibiotika zu einem sehr hohen Anteil von Naturstoffen ab. Insgesamt 16 (76 %) der therapeutisch verwendeten Antibiotika-Strukturklassen gehen auf Naturstoffe zurück, wobei die besonders erfolgreiche Klasse der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika die höchste Anzahl an therapeutisch wirksamen Verbindungen aufweist.

Um der unaufhaltsamen Resistenzentwicklung bei Bakterien entgegenwirken zu können, ist die permanente Entwicklung neuer Antibiotika notwendig. Bislang wurde vorrangig auf bereits erfolgreiche Strukturklassen zurückgegriffen, die inkrementell modifiziert als neue Antibiotika auf den Markt kamen (Abbildung 1.1B).<sup>[1]</sup> Es stellt sich allerdings die Frage, wie lange die Variation einiger weniger Hauptklassen zukünftig

A

1930	1940	1950	1960
Sulfonamide	Penicilline Polypeptide Aminoglycoside Chloramphenicol Nitro-Heterozyklen	Tetracycline Macrolide Lincosamide Glycopeptide	Chinoline Fusidinsäure Aminopyrimidine (Cephalosporine) Rifamycine
1970	1980	1990	2000
	Fosfomycin (Carbapenem) (Monobactam)		Oxazolidinone Lipopeptide

B



**Abb. 1.1.** A) Neu zugelassene Antibiotika-Klassen geordnet nach dem Jahrzehnt ihrer Einführung. Die Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame gehören wie die in den 1940er Jahren eingeführten Penicilline zur Klasse der  $\beta$ -Lactame und gelten deshalb nicht als komplett neue Antibiotikaklassen. B) Entwicklungsbeispiel eines Antibiotikums auf Grundlage der Naturstoff-Leitstruktur Penicillin G.

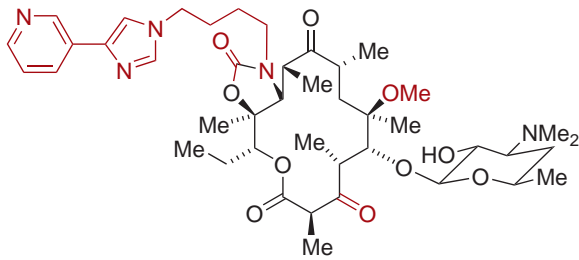
noch zu Verbindungen mit hoher antibiotischer Wirkung führen kann.

### 1.2. Naturstoffe als Antibiotika

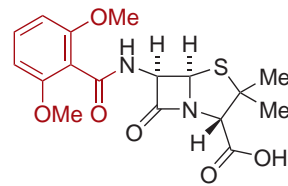
Naturstoffe zeigen eine strukturelle Komplexität und Vielfalt, die von rein organisch-synthetischen *de novo* Ansätzen nur schwer erreicht wird.<sup>[7]</sup> Die Erfahrungen der letzten Jahre zeigen, dass es schwierig ist, die gängigen Methoden zur Entwicklung kleiner Moleküle »anderer« Indikationsgebiete wie z. B. rein *Target*-basierte Ansätze bzw. kombinatorische Chemie auf die Entwicklung von antibiotisch wirksamen Molekülen zu übertragen.<sup>[5,8]</sup> Die viel diskutierten empirischen Regeln der medizinischen Chemie für oral verfügbare Wirksubstanzen (Lipinskis »*rule of five*«<sup>[9]</sup>) können nicht auf antibakterielle Naturstoffe angewandt werden. Antibiotisch wirksame Naturstoffe folgen einer anderen Logik, da sie häufig multivalent sind, im allgemeinen hydrophiler sind, mehrere Targets adressieren, und das Passieren bakterieller Zellmembranen- und wände beherrschen müssen.<sup>[10,11]</sup>

Naturstoffe stellen Strukturen dar, die während eines langen Evolutionsprozesses für die Interaktion mit den zellulären Zielstrukturen (*Target(s)*) optimiert wurden.<sup>[7,12]</sup> Man geht davon aus, dass es im Laufe der Zeit häufig zu einer Co-Evolution zwischen dem Naturstoff und den Ziel-Makromolekülen gekommen ist. Naturstoffe stellen daher »privilegierte« Strukturgerüste dar, die als Leitverbindung als Ausgangspunkt für weitere Modifizierungen dienen können.<sup>[13,14]</sup>

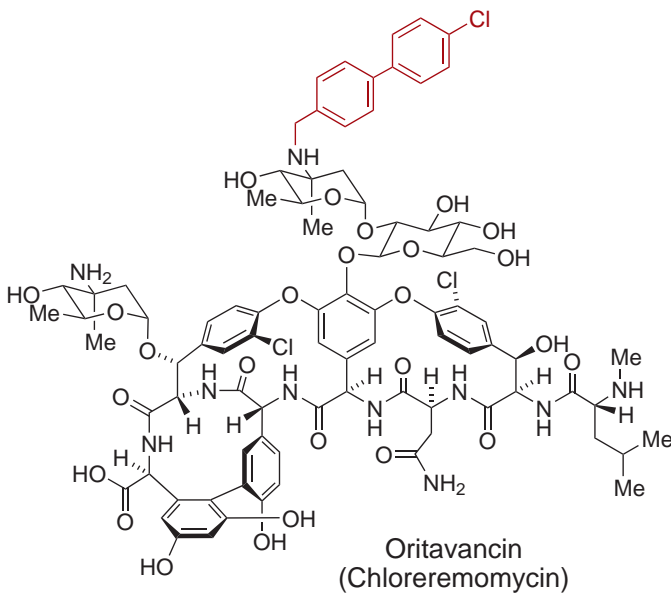
Naturstoffe besitzen häufig eine begrenzte chemische Stabilität oder schlechte Löslichkeit, weil sie im Laufe der Evolution nach den Kriterien eines höheren Selektionsvorteils für den Produzentenstamm optimiert wurden und sich ihre Strukturen biosynthetisch schnell an neue Bedingungen anpassen müssen. Daher verlangt die Entwicklung eines Naturstoffs zum Medikament in den meisten Fällen einen chemischen Optimierungsprozess, in dessen Folge u. a. die Parameter Stabilität, Löslichkeit, Spezifität und Toxizität verbessert, und denjenigen eines therapeutisch wirksamen Medikaments angepasst werden (Abbildung 1.2). Dabei kann selbst die Aktivität eines Naturstoffs durch Modifizierungen noch verbessert werden.<sup>[5]</sup>



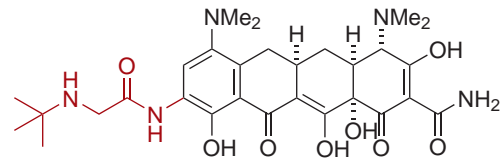
Telithromycin  
(Erythromycin)



Methicillin  
(Penicillin)



Oritavancin  
(Chloreremomycin)



Tigecyclin  
(Minocyclin)

**Abb. 1.2.** Beispiele einiger semisynthetischer Antibiotika. Der Name des Ausgangs-Naturstoffs ist jeweils in Klammern angegeben. Die gegenüber dem Naturstoff modifizierten Gruppen sind rot markiert.

## 1. Allgemeine Einleitung

---

Zur Optimierung ist die Totalsynthese ab einer bestimmten Molekülgröße und Komplexität des Naturstoffs oft nicht praktikabel. Der überwiegende Teil der therapeutisch genutzten Antibiotika, die auf Naturstoffe zurückzuführen sind, werden daher semisynthetisch weiterentwickelt und produziert. Hierbei wird der Naturstoff zunächst fermentativ gewonnen und anschließend durch Semisynthese chemisch modifiziert.

Es wird angenommen, dass Naturstoffe auch zukünftig wichtige neuartige Leitstrukturen bereitstellen werden, die die Grundlage für Medikamente bilden.<sup>[15,16]</sup> Durch Fortschritte in der Genomik und die Kenntnis der Biosynthesecluster wird der Zugang zu bisher unbekanntem Naturstoffen erleichtert.

### 1.3. Naturstoffe als Leitstrukturen

Unterschiedliche Strategien können verfolgt werden, um eine bestimmte biologische Aktivität eines Naturstoffs therapeutisch zu nutzen. Hierbei werden Substanzen generiert, die sich in Abhängigkeit von der verwendeten Strategie in abgestufter Ähnlichkeit von der Leitstruktur des Ausgangsnaturstoffs unterscheiden.

- Die Verwendung des Naturstoffs selbst als therapeutisch wirksame Substanz wird besonders häufig im Bereich der Antibiotika verfolgt (z. B. Penicillin G, Vancomycin). In vielen Fällen besteht eine gewisse strukturelle Variabilität innerhalb der Naturstofffamilie, so dass ihre Vertreter unterschiedlich starke biologischen Aktivitäten und pharmakologische Eigenschaften aufweisen können (vgl. Thiopeptide). Die Entwicklung der Substanz beschränkt sich daher auf die Suche nach dem geeigneten Naturstoff.
- Moderate Modifizierungen des Naturstoffs werden durch Strukturdekoration (*scaffold decoration*) bzw. Semisynthese eingeführt (s. u.). Hierbei wird die Struktur des Grundgerüsts größtenteils beibehalten, während verschiedene Modifikationen v. a. der Seitenketten vorgenommen werden. Strukturdekorationen werden meist semisynthetisch verfolgt, können theoretisch aber auch totalsynthetisch durchgeführt werden.



- Die nächste Stufe der Abwandlung einer Naturstoff-Leitstruktur ist die Veränderung seines Grundgerüsts. In diese Kategorie fällt z. B. das Konzept der Biologieorientierten Synthese (*Biology oriented synthesis*, BIOS).<sup>[17-19]</sup> Hierbei wird die Leitstruktur des Naturstoffs als »privilegierte« Struktur angesehen, die als Ausgangspunkt organisch-synthetischer Variationen dient. Zur Generierung von Substanzbibliotheken kommen häufig kombinatorische Ansätze zum Einsatz.
- Als weiterer Schritt der Abstraktion von einer Naturstoff-Leitstruktur können Fragmentorientierte Ansätze auf Basis von Naturstoffstrukturen angesehen werden.<sup>[20]</sup>
- Die komplette Abwendung von der Naturstoff-Leitstruktur wird verfolgt, wenn der Naturstoff alleinig zur Auffindung der makromolekularen Zielstruktur dienlich war, aber selbst nicht als Wirkstoff geeignet ist (*target identification*). In diesem Fall wird die Entwicklung auf der Grundlage einer *de novo* aufzufindenden Molekülstruktur durch geeignetes *Screening* vorangetrieben.

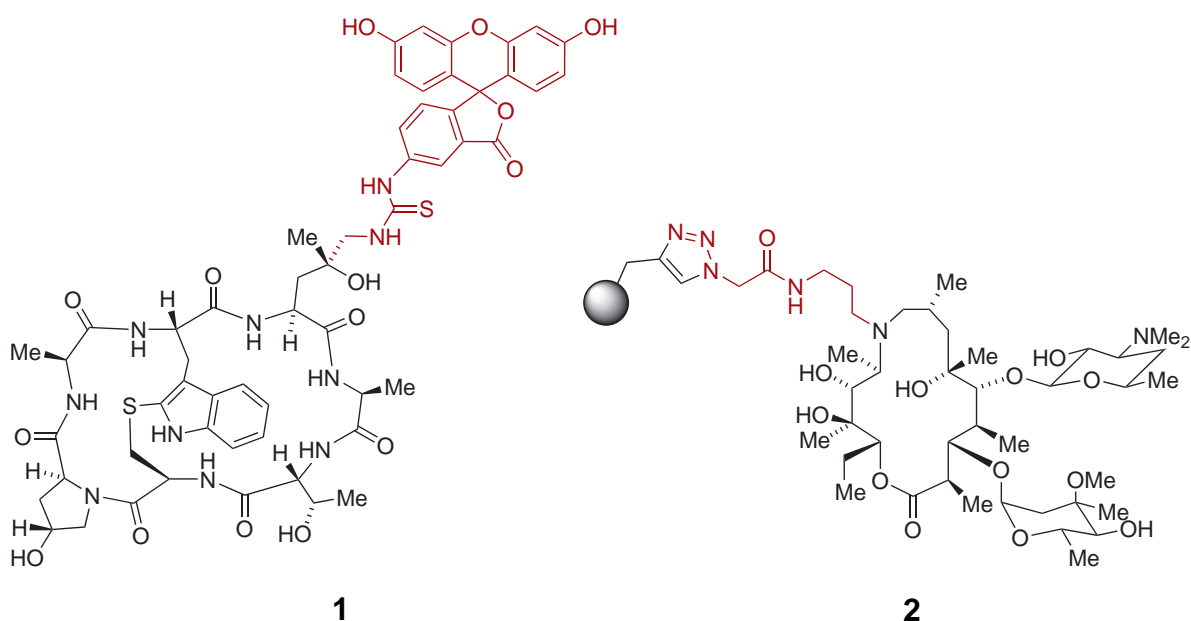
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Strategie der Semisynthese verfolgt, um zu Derivaten der Naturstoffklasse der Thiopeptide zu gelangen. Die Semisynthese soll deshalb näher betrachtet werden.

## 1.4. Das Konzept der Semisynthese

Spätestens seit der Markteinführung des Aspirins stellt die Semisynthese eine etablierte Methode zur Erforschung der Eigenschaften und Wirkungsweise eines Naturstoffs dar.<sup>[21,22]</sup> Die »privilegierte« Struktur des Naturstoffs dient als Ausgangspunkt zur »Erkundung des chemischen Raums« (*chemical space*). Die Semisynthese bietet den Vorteil, dass sie Zugang zu komplexen Molekülen bietet, die totalsynthetisch nur sehr mühsam zu erreichen wären. Hilfreich sind auch die Schnelligkeit der Entwicklung und die Planbarkeit der späteren Produktion im großen Maßstab. Allerdings können Variationen des Grundgerüsts nur eingeschränkt durch Semisynthesen realisiert werden. Durch intelligente Modifizierungen kann dieser Aspekt jedoch in den Hintergrund gedrängt werden.

## 1. Allgemeine Einleitung

---



**Abb. 1.3.** Struktur des semisynthetischen Fluorescein-Phalloidins **1** (links) und des immobilisier-ten Azithromycin-Derivats **2** (rechts).

Setzt man biosynthetische Zwischenstufen als semisynthetischen Ausgangspunkt ein, deren Grundgerüst noch nicht vollendet ist, kann zusätzliche Flexibilität erreicht werden.

Für die Semisynthese ergeben sich vielfältige Anwendungen sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der pharmazeutischen Industrie. Durch das gezielte Anbringen von Reportergruppen können einerseits «Sonden» -Moleküle erhalten werden, die die Aufklärung des Wirkmechanismus eines Naturstoffs voranbringen.<sup>[23]</sup> Hierzu zählen beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe, Affinitätsgruppen (z. B. Biotin), photoaktive Gruppen (*photoaffinity labeling*), oder reaktive Gruppen (*affinity labeling*). Beispielsweise ermöglicht die Funktionalisierung mit Aziden die Immobilisierung des Naturstoffs mittels Kupfer-katalysierter Huisgen-Zykloaddition an Alkin-funktionalisierter fester Phase zur Affinitätschromatographie (Abbildung 1.3, Azithromycin-Derivat **2**).<sup>[24]</sup> Durch semisynthetische Funktionalisierung von Molekülen können Werkzeugverbindungen entwickelt werden, die breite Anwendung in der Zellbiologie finden. Beispielsweise nutzt man zur selektiven Markierung von Aktin-Strukturen in der Zellmikroskopie den Fluorescein-markierten Naturstoff Phalloidin **1** (Abbildung 1.3).<sup>[25]</sup>

Andererseits kann durch gezielte Modifizierung der funktionellen Gruppen des Naturstoffs ein besseres Verständnis der Struktur-Wirkbeziehungen (*structure-activity relationship*: SAR) und des Pharmacophors erhalten werden. Die chemische «Post-Evolution» zur Optimierung pharmakokinetischer bzw. toxikologischer Eigenschaften des Naturstoffs dürfte jedoch einen besonders hohen Stellenwert für die Semisynthese aufweisen.<sup>[5]</sup>

## 1.5. Die Klasse der Thiopeptide

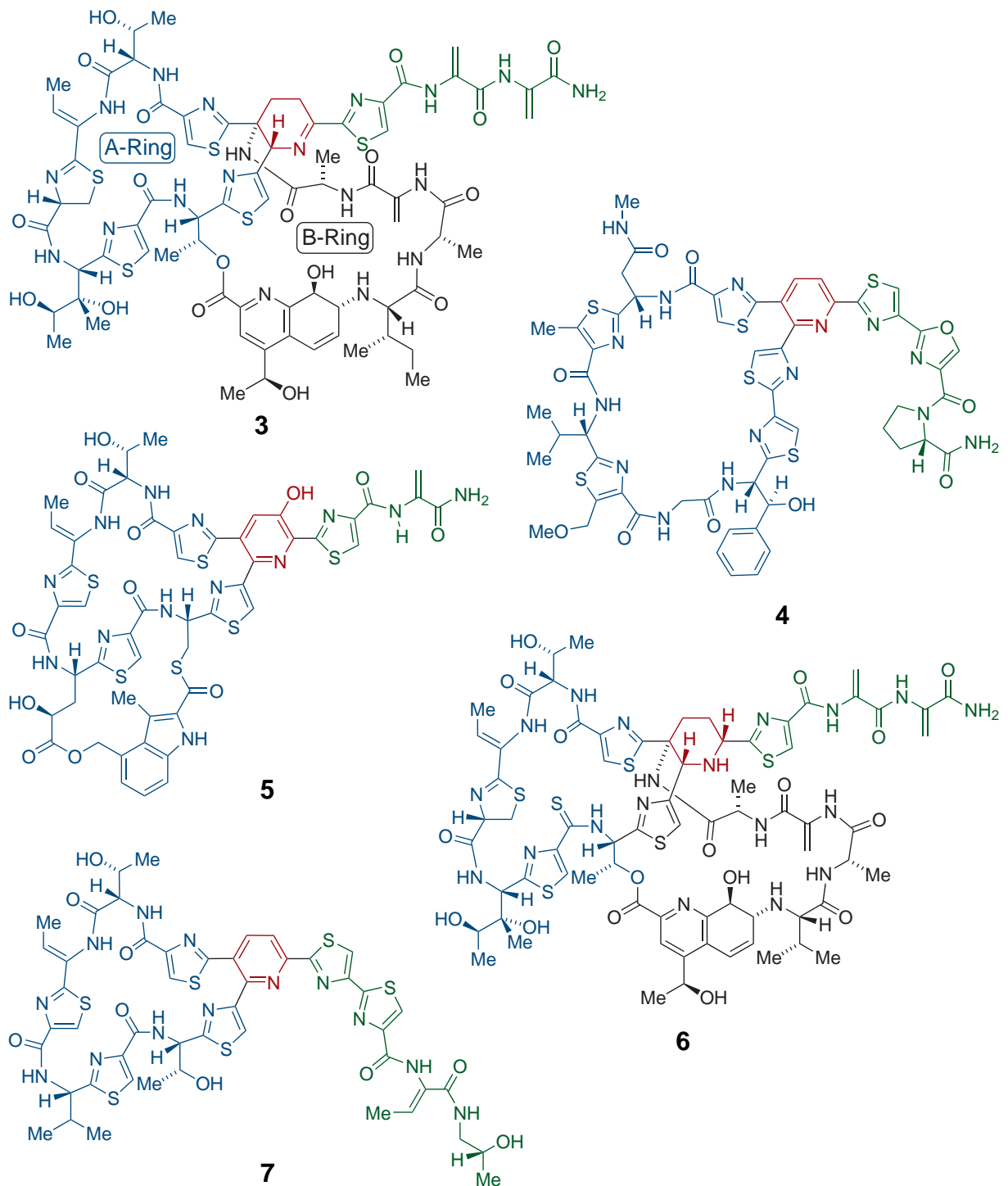
Eine viel versprechende Gruppe antibiotisch hochwirksamer Naturstoffe stellt die Familie der Thiopeptide dar. Die Thiopeptide umfassen mehr als 80 zyklische Peptide von ähnlicher Grundstruktur und makrozyklischem Aufbau (Abbildung 1.4). Die meisten Thiopeptide wurden aus Bakterien der Gattung *Actinomyces* isoliert.<sup>[26,27]</sup> Innerhalb dieser Gruppe ist Thiostrepton **3**, das bereits 1954 beschrieben wurde<sup>[28]</sup>, am besten untersucht (Abbildung 1.4).

### 1.5.1. Strukturelle Charakteristika der Thiopeptide

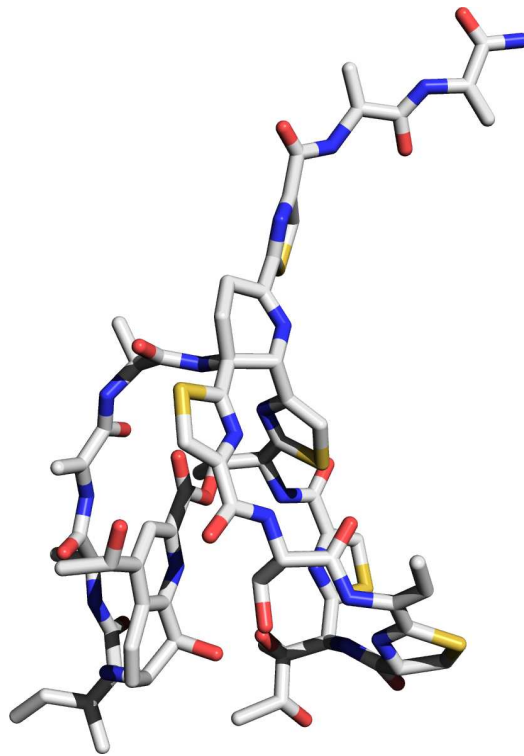
Gemeinsam ist allen Thiopeptiden der zentrale Heterozyklus. Zur Einteilung der Thiopeptide wurde vorgeschlagen, die Oxidationsstufe dieses Heterozyklus zur Grundlage zu machen (Abbildung 1.4).<sup>[29]</sup> Die Thiopeptide der Serie *a* besitzen ein vollständig reduziertes Piperidin (Bsp. Sch-18640 **6**). Zur Serie *b* gehören alle Thiopeptide, die ein zentrales Dehydropiperidin (Bsp. Thiostrepton **3**) aufweisen. Serie *d* Thiopeptide besitzen ein aromatisches Pyridin (Bsp. Micrococcin P<sub>1</sub> **7**, GE2270 A **4**), das bei Vertretern der Serie *e* zusätzlich in *meta*-Stellung mit einer Hydroxygruppe versehen ist (Bsp. Nosiheptid **5**).

Der zentrale Heterozyklus ist stets Bestandteil des makrozyklischen A-Rings. Bei einigen Thiopeptiden treten noch weitere Makrozyklen hinzu. Beispielsweise weist Thiostrepton **3** einen zusätzlichen B-Ring auf, der ebenfalls an den zentralen Heterozyklus anknüpft. Die Thiopeptide Nosiheptid **5**, Nocathiacin **8**, Thiazomycin **9** und verwandte Moleküle besitzen ebenfalls einen zweiten Makrozyklus, allerdings überbrückt er zwei Reste des A-Rings, ohne auf den zentralen Heterozyklus zurückzugreifen. Die makrozyklische Struktur des Thiostreptons **3** gilt als relativ rigide und weist eine wohldefinierte

## 1. Allgemeine Einleitung



**Abb. 1.4.** Strukturen einiger wichtiger Vertreter der Thiopeptide: Thiostrepton **3** (Serie b), GE2270A **4** (Serie d), Nosiheptid **5** (Serie e), Sch-18640 **6** (Serie a) und Micrococin P<sub>1</sub> **7** (Serie d). Folgende Merkmale sind farblich gekennzeichnet: rot = zentraler 6-Ring-Heterozyklus, grün = Seitenkette, blau = A-Ring, schwarz = B-Ring.



**Abb. 1.5.** Kristallstruktur des Thiostreptons **3** (pdb:3df5).

Faltung auf, die bezüglich ihrer Komplexität mit kleinen Proteindomänen vergleichbar ist (Abbildung 1.5).

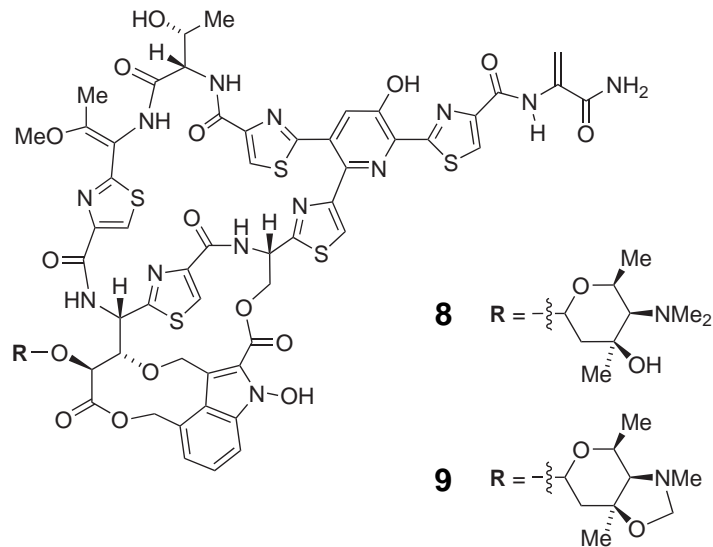
### 1.5.2. Biologische Wirkungen der Thiopeptide

Unter den Thiopeptiden weisen mehrere Vertreter starke antibiotische Wirkung gegen Gram-positive Bakterien auf.<sup>[26]</sup> Alle bisher untersuchten Thiopeptide hemmen die bakterielle Translation durch Hemmung des prokaryotischen Ribosoms. Bisher wurden zwei verschiedene Wirkmechanismen der Translationsinhibierung identifiziert: Thiostrepton **3** und ähnliche Thiopeptide binden an die GTPase-assoziierte Region des Ribosoms, während GE2270 A **4** und ähnliche Vertreter an den Elongationsfaktor EF-Tu binden und den EF-Tu-vermittelten Transport der Aminoacyl-tRNAs an das Ribosom unterbinden.<sup>[30,31]</sup>

Einige Thiopeptide zeigen  $IC_{50}$ -Werte der bakteriellen Wachstumshemmung im subnanomolaren Bereich. Allerdings wird bisher kein Thiopeptid als Antibiotikum in der Humanmedizin verwendet. Ein Grund hierfür ist, dass Thiostrepton **3** eine zu geringe

## 1. Allgemeine Einleitung

---



**Abb. 1.6.** Strukturen der Hydroxypyridin-Thiopeptide Nocathiacin I **8** und Thiazomycin **9**.

Wasserlöslichkeit aufweist. Auch die Bindestelle der Thiostrepton-ähnlichen Thiopeptide an der GTPase-assoziierten Region des prokaryotischen Ribosoms wird bisher nicht als Wirkort für therapeutische Antibiotika genutzt. Anwendung finden einige Thiopeptide bisher nur in der Veterinärmedizin in Kombinationspräparaten zur äußerlichen Anwendung oder – historisch – als Futterzusatzstoffe in der Tierzucht.<sup>[32,33]</sup>

Das Pharmaunternehmen Merck (USA) veröffentlichte vor kurzem Untersuchungsergebnisse zum Thiopeptid Thiazomycin **9** (Abbildung 1.6).<sup>[34]</sup> Thiazomycin weist ähnlich wie Nocathiacin I **8** einen Aminozucker auf, der über eine glykosidische Bindung mit der  $\gamma$ -Hydroxygruppe eines B-Ring-Rests verknüpft ist. Bisher sind nur wenige Thiopeptiden bekannt, die einen solchen Zuckerrest aufweisen. Hervorzuheben ist die besonders hohe Wachstumsinhibierung des Thiopeptids gegen multi-resistente Gram-positive Stämme. Gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) besitzt Thiazomycin **9** einen MIC-Wert von 32 ng/ml (MIC: minimale inhibitorische Konzentration).

### Wirkungen bei Eukaryotischen Zellen

Das Thiopeptid Thiostrepton **3** besitzt über die antibakteriellen Eigenschaften hinaus biologische Wirkung auf verschiedene eukaryotische Zellen. So konnte gezeigt werden, dass Thiostrepton die Expression des Transkriptionsfaktors *Forkhead box M1* (FoxM1)

inhibiert und in verschiedenen menschlichen Krebszelllinien das Zellwachstum hemmt bzw. deren Apoptose einleitet.<sup>[35,36]</sup> Weiterhin wurde gefunden, dass Thiostrepton im Mausmodell immunsuppressive Wirkung zeigt.<sup>[37]</sup> Auch bei Zellen des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* wurde beobachtet, dass Thiostrepton eine wachstumshemmende Wirkung ausübt.<sup>[38,39]</sup> Genaue Kenntnisse über die Zielstrukturen des Thiostreptons in eukaryotischen Zellen lagen jedoch zu Beginn dieser Arbeit nicht vor.

## 1.6. Zielsetzung

Die Thiopeptide stellen eine äußerst interessante Gruppe von Naturstoffen dar, die vielfältige biologische Wirkungen aufweisen. Einige Vertreter binden mit nanomolaren Affinitäten an die GTPase-assoziierte Region des Ribosoms, die sich durch das enge Zusammenwirken der beiden Makromolekülklassen Protein und rRNA auszeichnet. Die Thiopeptide bilden bei der Bindung an diese Stelle Kontakte sowohl zum Protein als auch zur RNA aus. Hiermit stellen die Thiopeptide eine Besonderheit unter den bisher bekannten ribosomalen Inhibitoren dar, die in der Mehrheit alleinig die rRNA adressieren.<sup>[40]</sup> Bisher sind wenige Beispiele von Molekülen bekannt, die Protein/RNA-Komplexe an den Übergängen der einzelnen Komponenten binden, und die Details ihrer Bindung sind wenig erforscht. Die Thiopeptide können daher als interessante Modellverbindungen gelten, deren Studium ein detaillierteres Verständnis der ungewöhnlichen Zielstrukturen erhoffen lässt. Darüber hinaus können die Thiopeptide als mögliche Leitstrukturen in der Entwicklung von Substanzen betrachtet werden, die die Funktionen des Ribosomkomplexes modulieren. Zu Beginn dieser Arbeiten waren nur wenige Details der Bindung der Thiopeptide an den L11/23S rRNA-Komplex bekannt (Kapitel 3). Dabei blieben Fragen sowohl zur Bindegeometrie als auch zu den atomaren Wechselwirkungen bislang unbeantwortet. Vor allem lag noch keine Kristallstruktur eines an die GTPase-assoziierte Region des Ribosoms gebundenen Thiopeptids vor.

Thiostrepton **3** ist der am besten untersuchte Vertreter der Gruppe der Thiopeptide, der eine besonders hohe Affinität zur GTPase-assoziierten Region des Ribosoms aufweist und beachtliche antibakterielle Wirkung zeigt. Es waren verschiedene Wirkungen

## 1. Allgemeine Einleitung

---

des Thiostreptons auf eukaryotische Zellen bekannt, die jedoch nur unzureichend erklärt werden konnten. Thiostrepton galt daher als besonders interessanter Ansatzpunkt, um die biologischen Eigenschaften der Thiopeptide näher zu untersuchen. Das Thiopeptid ist kommerziell verfügbar, so dass es als ideales Modell-Thiopeptid auch für semisynthetische Ansätze dienen konnte.

Im Zentrum der Arbeiten sollten zunächst semisynthetische Modifikationen des Thiostrepton-Grundgerüsts stehen. Es galt herauszufinden, welche semisynthetischen Operationen durchführbar sind, und wie diese optimiert werden können. Neben der Erforschung der Modifikationen im Sinne von Struktur-Wirk-Beziehungen sollten die gewonnenen chemischen Erkenntnisse in Synthesen von Thiostrepton- «Werkzeugverbindungen» münden, mit deren Hilfe weitere zelluläre Zielkomponenten des Thiostreptons identifiziert und die Bindung der Thiopeptid(derivate) biochemisch charakterisiert werden konnten. Im Speziellen sollten auf den semisynthetischen Modifikationen aufbauend folgende Fragestellungen adressiert werden:

- Die Details der Thiopeptidbindung an die Protein/rRNA-Bindestelle am Ribosom waren nur unzureichend bekannt. Insbesondere fehlten quantitative Daten der Bindungsaffinitäten verschiedener Thiopeptid-Naturstoffe. Deshalb sollten Fluoreszenzfarbstoff-markierte Thiostreptonderivate synthetisiert werden, welche die biochemische Bestimmung der Bindungsaffinitäten mittels Fluoreszenzpolarisation ermöglichen sollten (Kapitel 2, 3).
- Die Untersuchungen der Thiopeptid-Bindeaffinitäten sollten anschließend auf die modifizierten Derivate des Thiostreptons ausgeweitet werden. Es sollte untersucht werden, welche strukturellen Determinanten die Bindeeigenschaften der Thiopeptide beeinflussen (Kapitel 3).
- Die antibakterielle Wirkung des Thiostreptons beruht auf der Bindung ans Ribosom. Es sollte herausgefunden werden, welchen Einfluss einzelne Komponenten der Thiostreptonstruktur auf die antibakterielle Wirkung besitzen und welche semisynthetischen Modifikationen des Grundgerüsts unter dem Gesichtspunkt einer pharmakologischen Optimierung toleriert würden (Kapitel 3).



- Es sollte versucht werden, die unbekanntes Zielkomponenten des Thiostreptons in eukaryotischen Systemen zu identifizieren. Insbesondere die interessante Aktivität gegen den Malariaerreger *P. falciparum* sollte hierbei im Fokus stehen (Kapitel 4).
- Neben ihrer antibakteriellen Wirkung sollten die modifizierten Thiostreptonderivate auch auf ihre anti-Malariaeigenschaften hin untersucht werden, um erste Struktur-Wirkbeziehungen der Thiostrepton-Leitstruktur bei Plasmodien aufzuzeigen (Kapitel 3).
- Während dieser Arbeiten wurde die Biosynthese der Thiopeptide überraschend als ribosomaler Syntheseweg aufgeklärt (Kapitel 5). Es sollte geprüft werden, ob aus den bisherigen Erkenntnissen Rückschlüsse auf ungeklärte Details des Biosynthesewegs gezogen werden konnten. Insbesondere konnten bioinformatische Untersuchungen des Biosynthesclusters keine schlüssige Erklärung für die ungewöhnliche D-Konfiguration des Thiazolins liefern.
- Die Auswirkungen der einzelnen semisynthetischen Modifikationen auf die Konformation der Moleküle und die Auswirkungen auf die biologischen Aktivitäten sollten im Rahmen einer Kooperation mit einer NMR-Strukturgruppe und einer Chemieinformatikgruppe untersucht werden (Kapitel 3).



## **2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons**

*«Der Derivatisierungsschemiker nähert sich dem Zielmolekül über ein „Minenfeld“ von ungeschützten funktionellen Gruppen.»*

---

(Häbich *et al.* 2006<sup>[5]</sup>)

### 2.1. Semisynthese als methodischer Zugang zur Klasse der Thiopeptide

Ein möglicher Zugang zu den Thiopeptiden und deren Modifikationen besteht in der Totalsynthese der Moleküle. Für einige der Thiopeptide konnten bereits Totalsynthesen entwickelt werden (z. B. Thiostrepton<sup>[41,42]</sup>, GE2270A<sup>[43,44]</sup>, Micrococcin<sup>[45]</sup>). In der Arbeitsgruppe wurde parallel ein Synthesezugang zum Nosiheptid **5** erfolgreich vorangetrieben.<sup>[46]</sup> Aufgrund der Größe und Komplexität der Moleküle weisen die arbeitsaufwendigen Synthesen sehr viele Stufen auf, was in relativ geringen Gesamtausbeuten resultiert.<sup>[27]</sup> Für die zügige Untersuchung und Weiterentwicklung von Thiopeptidderivaten als pharmakologisch interessante Moleküle sind die meisten Totalsynthesen zu aufwendig. Daher bietet sich die Semisynthese als mögliche Alternative an, um modifizierte Thiopeptidderivate bereitzustellen.

Erfolgreiche Derivatisierungsstrategien würden ein tieferes strukturelles Verständnis der Naturstoffklasse und ihrer Wirkmechanismen ermöglichen, woraus Struktur-Wirkbeziehungen abgeleitet werden könnten. Über gezielte Modifizierungen würden die pharmakologischen Eigenschaften der Naturstoffe verändert werden können und die Anwendungspotentiale der Naturstoffklasse als therapeutische Wirkstoffe aufgezeigt werden. Besonders herausfordernd ist hierbei die Frage, ob sich die beachtlich hohe strukturelle Komplexität der Thiopeptide auf synthetisch leichter zugängliche Verbindungen reduzieren ließe, ohne hierbei an biologischer Aktivität einzubüßen. Funktionstragende Derivate würden vermutlich in der Aufklärung noch unbekannter zellulärer Wirkmechanismen behilflich sein.

Im Falle des glykosylierten Thiopeptids Nocathiacin **8** wurde von Seiten der pharmazeutischen Industrie bereits von semisynthetischen Modifikationen am Grundgerüst berichtet. So konnte neben der Funktionalisierung des Hydroxypyridins und -indols<sup>[47,48]</sup> auch Michael-Additionen an das Dehydroalanin der Seitenkette<sup>[49,50]</sup> und Modifikationen des terminalen Amids<sup>[51,52]</sup> vorgenommen werden. Manche der modifizierten Nocathiacinderivate zeigten hohe antibakterielle Aktivitäten bei gleichzeitig verbesserten physikochemischen Eigenschaften.<sup>[53]</sup>

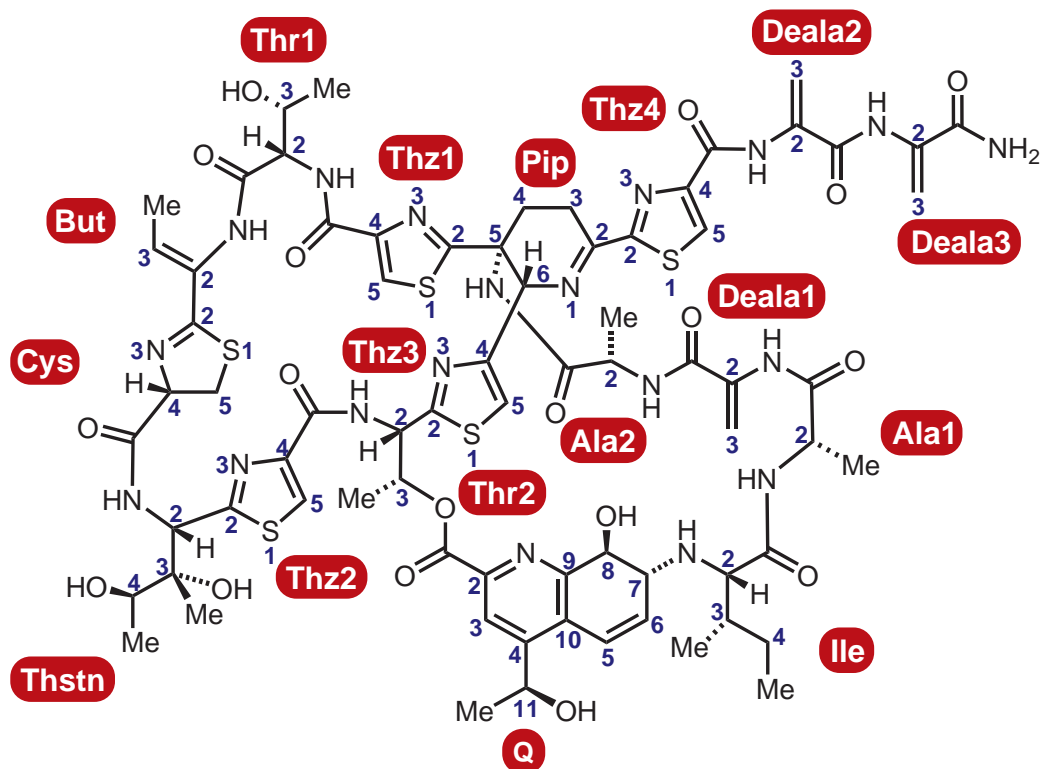
Der Naturstoff Thiostrepton **3** eignet sich ideal als Modellverbindung für semisynthetische Studien der Thiopeptide. Einerseits ist Thiostrepton kommerziell verfügbar, andererseits ist Thiostrepton das bisher komplexeste Thiopeptid innerhalb dieser Familie, so dass sich die entwickelnden Methoden leicht in ähnlicher Weise auf die strukturell einfacheren Mitglieder der Gruppe übertragen lassen sollten. Interessanterweise waren bis zum Beginn dieser Arbeit dazu keine Studien veröffentlicht worden. Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Derivatisierungsstrategien des Thiostreptons beschrieben, geordnet nach den jeweiligen funktionellen Gruppen, die als Ansatzpunkte innerhalb des Moleküls dienen.

## 2.2. Funktionalisierung der Dehydroalanine

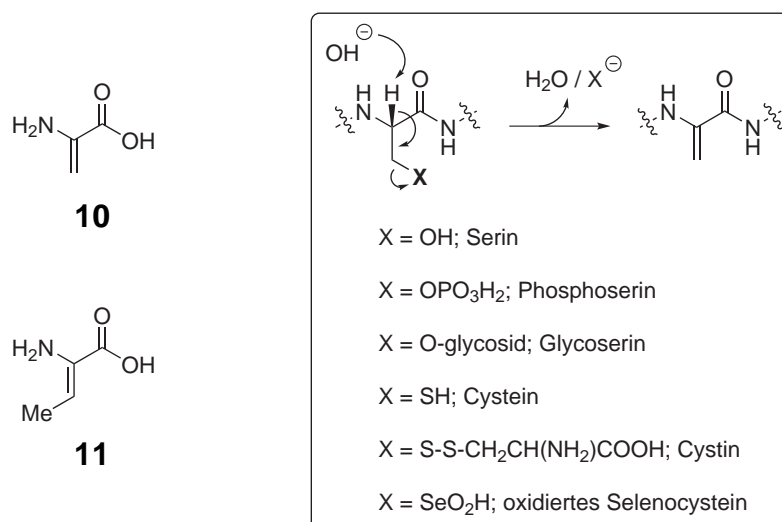
### 2.2.1. Vorkommen der Dehydroaminosäuren

Die ungesättigten Dehydroaminosäuren Dehydroalanin (Deala) und Dehydrobutyrin (Dhb) sind charakteristische Strukturmerkmale der Thiopeptide (Schema 2.1). Beide nichtproteinogenen Aminosäuren zeichnen sich durch eine C-C-Doppelbindung zwischen dem C<sup>α</sup>- und dem C<sup>β</sup>-Atom aus. Während Dehydroalanin biosynthetisch durch Dehydratisierung aus Phospho-Serin gebildet werden kann, geht Dehydrobutyrin aus Phospho-Threonin hervor.<sup>[54,55]</sup> Neben den Thiopeptiden weisen weitere Naturstoffklassen Dehydroaminosäuren als strukturelles Merkmal auf (Kapitel 2.2.4). An dieser Stelle seien beispielhaft die Lantibiotika und die Gruppe der Microcystine genannt. Auf die Biosynthese von Dehydroaminosäuren enthaltenden Naturstoffen wird in Kapitel 5 näher eingegangen.

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons



**Abb. 2.1.** Struktur des Thiostreptons **3** als Ausgangspunkt der semisynthetischen Derivate. Die Bezeichnungen der Aminosäurereste und die Nummerierung der Atome ist angegeben. But: Dehydrobutyrin; Cys: Cystein (Thiazolin); Deala: Dehydroalanin; Pip: Dehydropiperidin; Q: Chinaldinsäure; Thr: Threonin; Thstn: Thiostreptin.



**Schema 2.1** Struktur der nichtproteinogenen Dehydroamino-säuren Dehydroalanin **10** und (Z)-Dehydrobutyrin **11** (links). Mechanismus der basenkatalysierten  $\beta$ -Eliminierung unter Abspaltung der Abgangsgruppe **X** (rechts).

Neben peptidischen Naturstoffen können auch Dehydroalanine in Proteinen auftreten. Sie gehen wahrscheinlich durch nicht-enzymatische  $\beta$ -Eliminierung aus Serin- bzw. Cystinresten hervor: Experimentell konnte schon vor längerer Zeit gezeigt werden, dass hohe Temperaturen und alkalische Bedingungen die Eliminierung *in vitro* begünstigen.<sup>[56]</sup> Tatsächlich werden regelmäßig in Alkali-behandelten Lebensmittelzubereitungen erhöhte Konzentrationen an Dehydroaminosäuren gefunden.<sup>[57]</sup> Auch *in vivo* scheinen in manchen Proteinen Dehydroalanine vorzukommen. Zur Zeit ist noch wenig darüber bekannt, wie verbreitet die Umwandlung zu Dehydroalanin in Proteinen unter physiologischen Bedingungen ist. Kürzlich konnte von Bar-Or *et al.* gezeigt werden, dass etwa 5% des gesamten humanen Serumalbumins (HSA) im Blut *in vivo* mit der Modifikation Cys487  $\rightarrow$  Deala vorliegt.<sup>[58]</sup> Andere Cys-Reste waren nicht betroffen, und in parallel untersuchten Blutproteinen konnten keine Deala-Reste gefunden werden, was auf eine gewisse Spezifität schließen lässt. Cho *et al.* fanden, dass Glutathion Peroxidase 1 (GPx1) durch die Umwandlung des katalytisch aktiven Restes Selenocystein zu Dehydroalanin irreversibel inaktiviert wird.<sup>[59]</sup> Es wird angenommen, dass GPx-SeH durch  $H_2O_2$  zu GPx-SeO<sub>2</sub>H oxidiert wird, so dass eine gute Abgangsgruppe entsteht, die leicht zum Dehydroalanin eliminiert (*syn*-Eliminierung). Interessanterweise wird die Oxidation von Selenocysteinderivaten zum Selenoxid häufig als Methode zur Installation von Dehydroalaninen in der Synthese von Naturstoffen angewandt (Kapitel 2.2.3). Auch bei Cystein könnte die vorhergehende Oxidation des Schwefelatoms zum Sulfoxid die  $\beta$ -Eliminierung einleiten. Offensichtlich gibt es verschiedene Möglichkeiten, wie Dehydroaminosäuren in Proteinen entstehen können. Ob die Modifikationen hauptsächlich spontan entstehen und deshalb als Schäden der Proteine aufzufassen sind, oder ob sie als reguläre posttranslationale Modifikationen von Proteinen zu betrachten sind, denen eine spezifische biologische Rolle zukommt, ist z. T. noch unklar.

### 2.2.2. Strukturstabilisierung durch Dehydroaminosäuren

Die Dehydroaminosäuren haben charakteristischen Einfluss auf die Rückgratkonformation von Peptiden. Der Übergang vom gesättigten, tetraedrischen  $sp^3$ -C-Atom zum trigonalen  $sp^2$ -hybridisiertem C-Atom und der Verkürzung der  $C^\alpha$ - $C^\beta$ -Bindung induziert

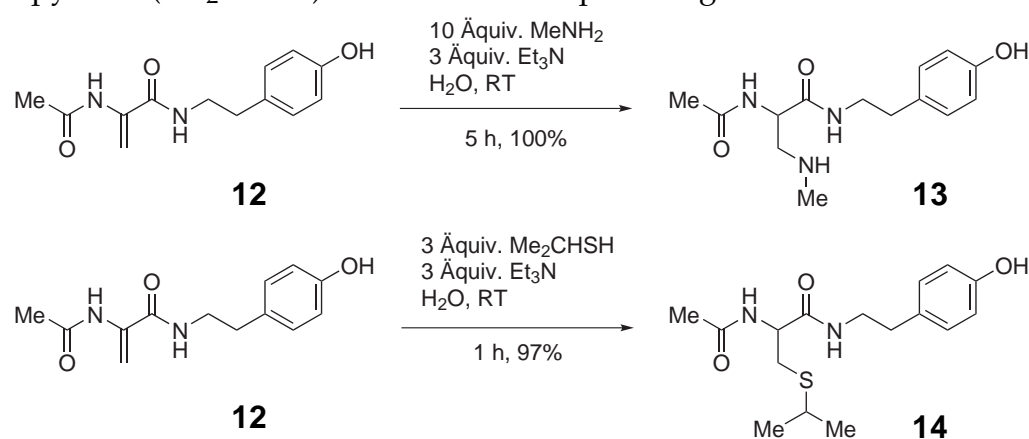
## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons

starke und spezifische sterische Effekte in der Rückgratkonformation. Kristallstrukturen von Modellpeptiden zeigen, dass Dehydroalanin eine planare Konformation einnimmt, mit  $\Phi$  und  $\Psi$ -Torsionswinkeln, die einer *trans*-Orientierung entsprechen.<sup>[60,61]</sup> In den vorhergehenden Aminosäuren innerhalb der Modellpeptide induzierte Dehydroalanin einen inversen  $\gamma$ -Turn im Rückgrat, falls der vorhergehende Rest  $\beta$ -verzweigt ist. Zur Zeit fehlen jedoch noch umfassende Untersuchungen zu den strukturellen Einflüssen der Dehydroaminosäuren auf die Konformation von Proteinen.

### 2.2.3. Chemische Reaktivität der Dehydroaminosäuren

Dehydroalanin kann als Akzeptor in Michael-Additionsreaktionen fungieren, zeigt hierbei jedoch als kryptisches Enamin vergleichsweise schwache Reaktivität. Obwohl die Michael-Addition allgemein eine vielseitige und nützliche Reaktion in der organischen Chemie darstellt, sind bisher nur wenige Arbeiten zur Michael-Addition von Nukleophilen an Dehydroaminosäuren veröffentlicht worden.<sup>[62,63]</sup> Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass Michael-Additionen von Thiolen bzw. Aminen an die Dehydroaminosäuren Deala oder Dhb in Wasser bzw. Wasser/Methanolgemischen eine vielfach höhere Reaktionsgeschwindigkeit aufweisen.<sup>[64]</sup> Generell zeichnet sich die Reaktion durch folgende Eigenschaften aus:

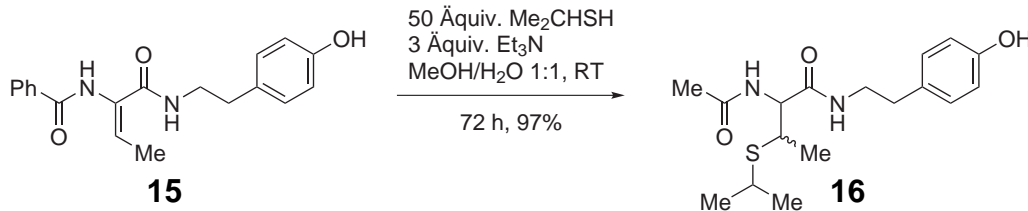
- Reaktionen mit Thiolen als Nukleophil verlaufen schneller als solche mit Aminen: Dehydroalaninamid **12** reagierte beispielsweise mit 10 Äquiv. Methylamin zum Michaeladdukt **13** in 5 h, während das gleiche Dehydroalaninamid mit nur 3 Äquiv. Isopropylthiol ( $\text{Me}_2\text{CHSH}$ ) bereits in 1 h komplett umgesetzt wurde.<sup>[64]</sup>





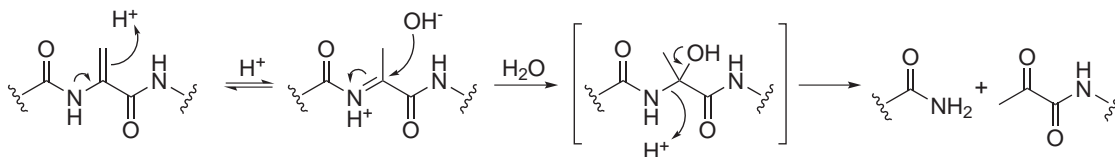
## 2.2. Funktionalisierung der Dehydroalanine

- Dehydrobutyrin ist deutlich weniger reaktiv als Dehydroalanin: Die Umsetzung von Dehydrobutyrinamid **15** mit Isopropylthiol ( $\text{Me}_2\text{CHSH}$ ) gelingt in hoher Ausbeute nur durch Einsatz eines hohen Überschusses an Thiol (50 Äquiv.) und langen Reaktionszeiten.<sup>[64]</sup>



### Stabilität der Deala-Peptide

Im Vergleich zu anderen proteinogenen Aminosäuren sind die Dehydroaminosäuren Dehydroalanin und Dehydrobutyrin als *N*-Acylenamine deutlich weniger stabil gegen Behandlung mit starken Säuren. So konnten Chan *et al.* aufzeigen, dass die säureinduzierte Spaltung (Hydrolyse) des Lantibiotikums Nisin durch die inherente Elektrophilie der Deala-Reste nach dem in Schema 2.2 gezeigten Mechanismus ablaufen kann.<sup>[65]</sup>

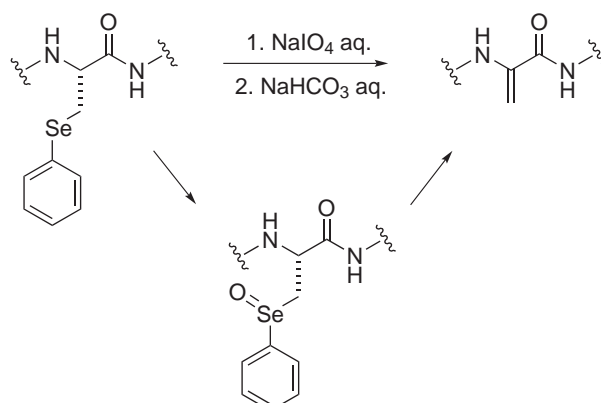


**Schema 2.2** Vorgeschlagener Mechanismus des säureinduzierten Deala-Peptid-Abbaus.<sup>[65]</sup> An das anfänglich reversibel gebildete Iminiumsalz kann Wasser addieren. Das instabile tetraedrische  $\alpha$ -Hydroxyalanyl-Intermediat zerfällt nachfolgend in ein Peptid-Amid und ein Pyruvyl-Peptid-Derivat.

In Totalsynthesen werden Deala-Reste oft erst in den letzten Schritten aus maskierten Vorläufern generiert. Sowohl in der Totalsynthese des Thiostreptons<sup>[41,42]</sup>, als auch in der des Argyrins<sup>[66]</sup> wurde beispielsweise Phenylselenocystein<sup>[67]</sup> als Deala-Vorstufe eingesetzt. Am Ende der Synthese wird das Selenid durch selektive Oxidation in das entsprechende Selenoxid überführt, welches dann durch *syn*-Eliminierung in das Dehydroalanin überführt wird (Schema 2.3).

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons

---



**Schema 2.3** Synthesestrategie zur Installation von Dehydroalanin in peptidischer Umgebung.<sup>[67]</sup> Das Phenylselenocystein wird selektiv mittels oxidativer Eliminierung in das Dehydroalanin überführt.

### 2.2.4. Biochemische Bedeutung der Dehydroaminosäuren in Naturstoffen

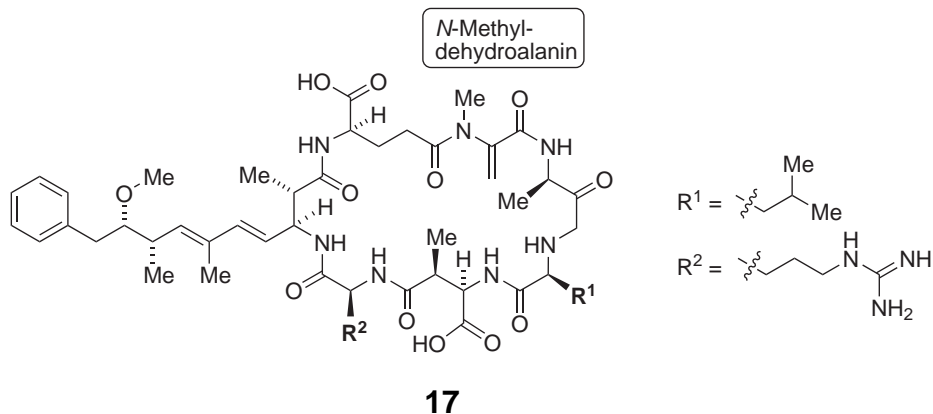
Dehydroaminosäuren enthaltende Naturstoffe zeigen oft selektive kovalente Reaktivität mit Proteinen und sind daher unter den allgemein reaktiven Naturstoffen<sup>[68]</sup> eine Besonderheit.

#### Microcystine

Zur Gruppe der Microcystine (Abb. 2.2) gehören zyklische Heptapeptide, die starke Hepatotoxine darstellen und von Cyanobakterien der Gattungen *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Anabaena* und *Microcystis* gebildet werden.<sup>[69]</sup> Mehr als 65 verschiedene Microcystine wurden bis heute beschrieben, die größten Unterschiede treten an zwei variablen Aminosäurepositionen auf. Die Microcystine sind Produkte kombinierter NRPS/Polyketidsynthetasen.<sup>[70]</sup>

Die toxische Wirkung der Microcystine beruht auf der Inhibierung der Serin/Threonin Phosphatasen 1 (PP1) und 2A (PP2A), die an einer Reihe von zellulären Funktionen wie beispielsweise Glykogenmetabolismus, Apoptose oder Embryogenese beteiligt sind.<sup>[71]</sup> Microcystin LR 17 bindet mit subnanomolarer Affinität an PP1 und zeigt mannigfaltige Interaktionen mit dem aktiven Zentrum des Enzyms in der Kristallstruktur.<sup>[72]</sup> Nach zunächst nichtkovalenter Bindung in der Bindungstasche des Enzyms bildet sich ein kovalentes Michael-Addukt zwischen der Thiolfunktion eines nichtkatalytischen Cysteins

## 2.2. Funktionalisierung der Dehydroalanine



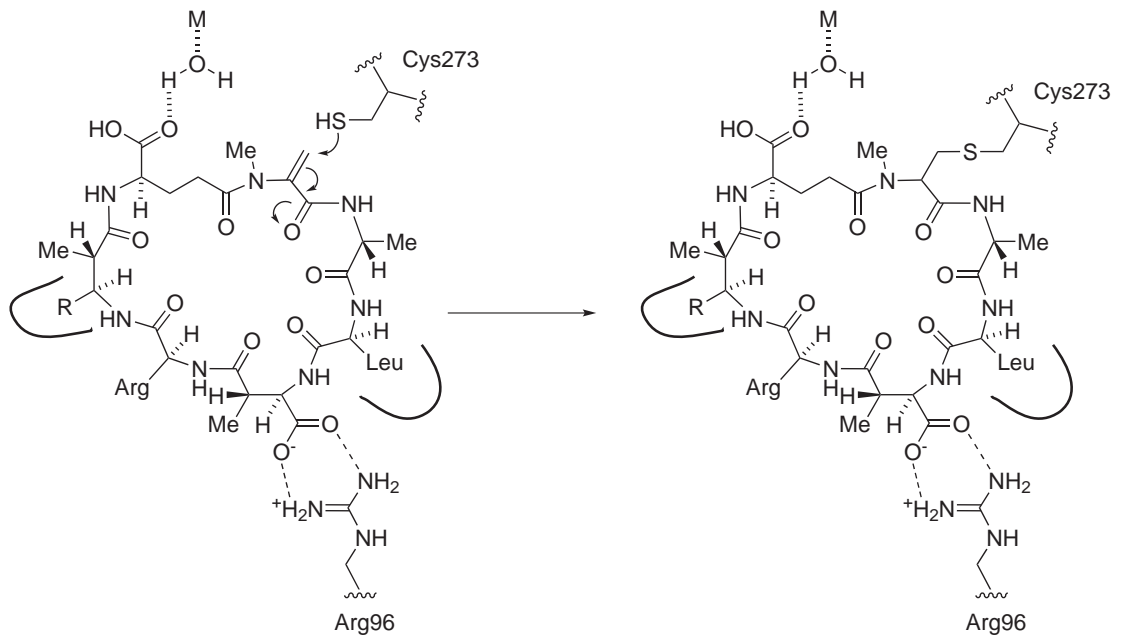
**Abb. 2.2.** Dargestellt ist die Struktur des Microcystins LR **17**, das ein *N*-Methyldehydroalanin aufweist. Variabilität innerhalb der Gruppe der Microcystine besteht u. a. an den Positionen R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup>. LR = Leucin / Arginin.

in der Nähe des aktiven Zentrums (Cys273) und dem *N*-Methyldehydroalanin des Microcystins aus (Schema 2.4, Abbildung 2.3).<sup>[73,74]</sup> Zur erfolgreichen Michael-Addition scheint die vorherige nichtkovalente Bindung des Moleküls in der Bindetasche des Enzyms essentiell zu sein, da denaturiertes Protein in Kontrollreaktionen nicht mit Microcystin reagierte.<sup>[74]</sup> Dagegen bleibt die Wirkung auch auf Cys273-Mutanten erhalten, so dass die kovalente Reaktion nicht für die Funktion entscheidend ist.

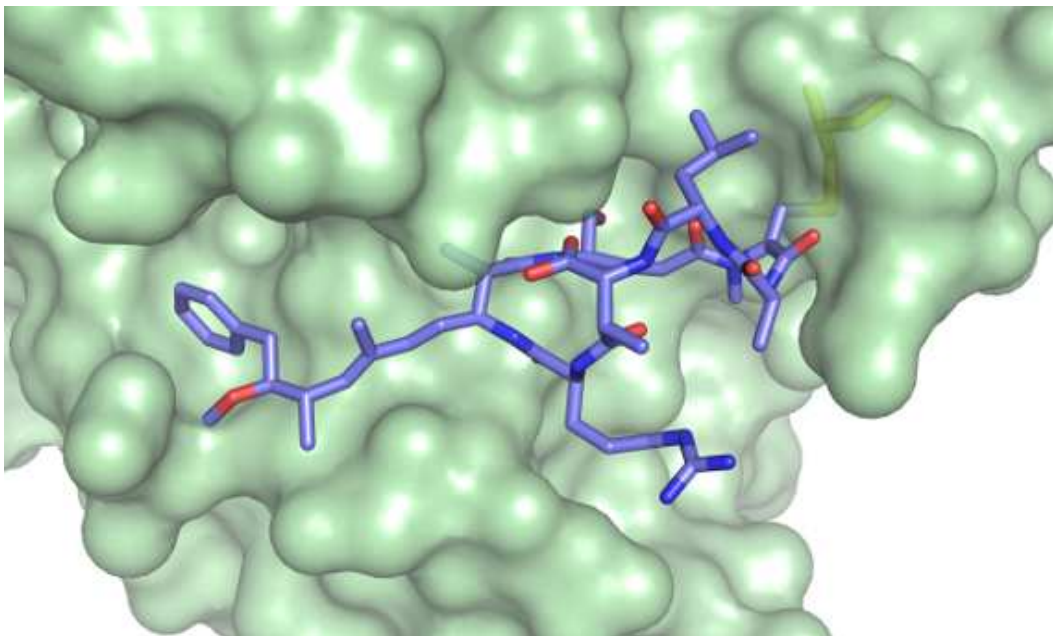
### Lantibiotika

Zur Gruppe der Lantibiotika zählt man ribosomal synthetisierte, posttranslational modifizierte antimikrobielle Peptide, die von *Gram*-positiven Bakterien hergestellt werden und mehrere Wirkmechanismen aufzeigen.<sup>[75]</sup> Charakteristisch für die Lantibiotika sind die Thioether-Aminosäuren Lanthionin **18** (Lan) und Methyllanthionin **19** (Mlan) (Abbildung 2.4). Biosynthetisch werden die Thioetheraminosäuren durch einen zweistufigen Prozess posttranslational gebildet: Die Ser- bzw. Thr-Reste der Vorläuferpeptide (Prepeptide) werden im ersten Schritt enzymatisch zu den entsprechenden Dehydroalaninen (Ser) bzw. Dehydrobutyrinen (Thr) dehydratisiert (vgl. Biosynthese der Thiopeptide, Kapitel 5). Dies geschieht durch Phosphorylierung der Ser/Thr-Reste und nachfolgender  $\beta$ -Eliminierung des Phosphats zur Dehydroaminosäure. Nachfolgend werden durch eine vermutlich stets nucleophile Addition der Thiofunktion eines Cys-Restes auf die Dehy-

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons

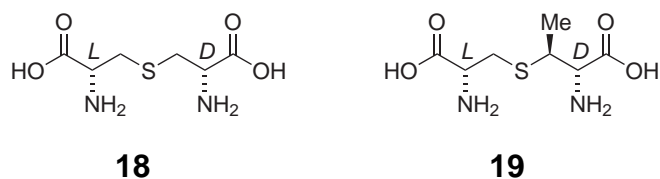


**Schema 2.4** Microcystin RL 17 bindet zunächst nichtkovalent im aktiven Zentrum des Enzyms PP1. Nach ein paar Stunden bildet sich ein kovalentes Michael-Addukt zwischen dem Cys273 des Enzyms und dem *N*-Methyldehydroalanin des Microcystins aus.



**Abb. 2.3.** Microcystin LR 17 gebunden an die Phosphatase PP1 (pdb:1fjm).<sup>[72]</sup> Das reaktive Cystein (gelb) des Proteins bildet eine kovalente Bindung mit dem *N*-Methyldehydroalanin des Microcystin aus.

## 2.2. Funktionalisierung der Dehydroalanine



**Abb. 2.4.** Strukturen der für die Gruppe der Lanthionine charakteristischen Thioether-Aminosäuren Lanthionin **18** (Lan) und Methyllanthionin **19** (Mlan). Man beachte die D-/L-Konfiguration beider Di-Aminosäuren.

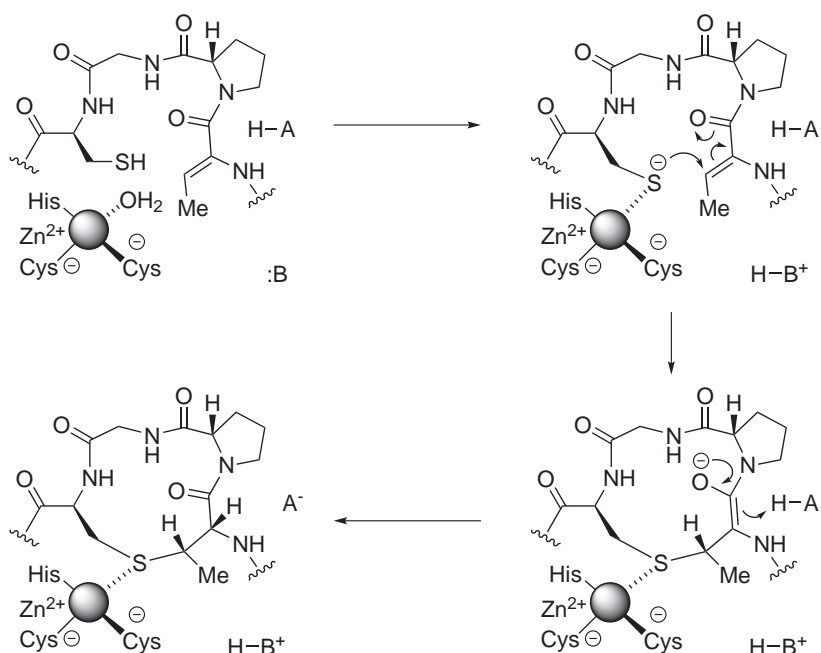
droaminosäure eine Thioetherbrücke in einer Michael-artigen Reaktion gebildet. Dabei entsteht aus der Addition eines Cysteins an ein Dehydroalanin die Thioether-Aminosäure Lanthionin **18**, während Dehydrobutyrin mit einem Cystein zu Methyllanthionin **19** verknüpft wird. Es fällt auf, dass in Lantibiotika stets die L-/D-Alternanz der Stereochemie gefunden wird, rein basenkatalysiert aber immer Diastereomerengemische entstehen. Man nimmt daher an, dass die Ringschlüsse stets enzymkatalysiert ablaufen.

Der zweistufige Prozess der Dehydratisierung und Zyklisierung kann entweder durch zwei verschiedene Enzyme (z. B. Nisin-Biosynthese: NisB bzw. NisC), oder durch ein einziges Enzym mit dualer Funktion katalysiert werden (z. B. Lacticin 481-Biosynthese: LctM).<sup>[55,75]</sup> Vor kurzem konnte vom Enzym NisC, das die Zyklisierung der Thioetherringe in der Biosynthese des Lantibiotikums Nisin A **20** (Abbildung 2.5) katalysiert, eine Kristallstruktur ermittelt werden. Daraufhin wurde für die enzymkatalysierte Michael-Addition folgender Mechanismus vorgeschlagen (Abbildung 2.5):<sup>[76]</sup> Die Thiolfunktion des Cysteins wird zunächst deprotoniert und verdrängt ein gebundenes Wassermolekül vom  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion des aktiven Zentrums. Der folgende Angriff des Thiolats auf das  $\beta$ -Atom des Dehydrobutyrins erzeugt ein Enolat-Intermediat, das stereoselektiv in der  $\alpha$ -Position protoniert wird, so dass die D-Konfiguration entsteht (anti-Addition).

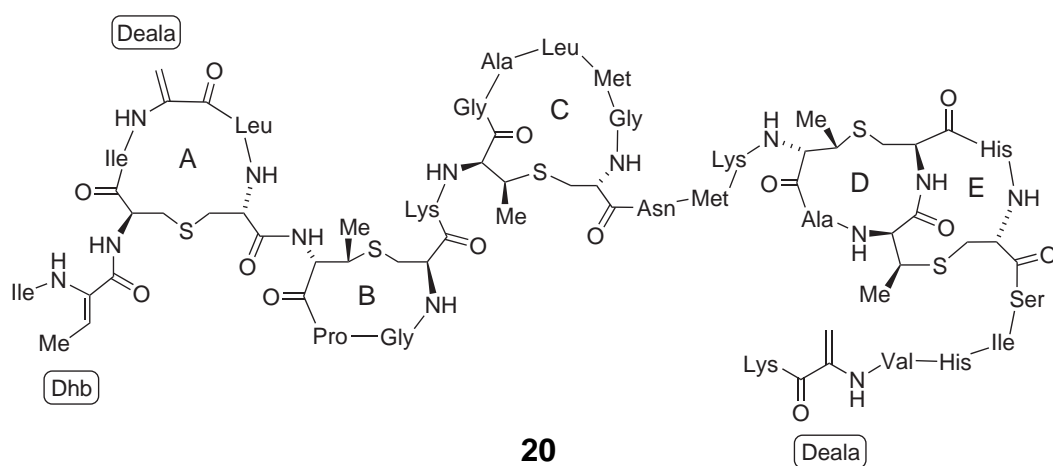
Neben ihres Auftretens während der Biosynthese weisen viele der bekannten Lantibiotika Dehydroaminosäuren auf. Ein Beispiel hierfür ist das gut untersuchte Nisin A **20**, das neben zwei Dehydroalaninen auch ein Dehydrobutyrin besitzt (Abbildung 2.5). Die biochemische Rolle der Dehydroalanine im Wirkmechanismus der Lantibiotika konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Vor kurzem wurde mit Entdeckung der Labyrinthopeptide eine neue Klasse innerhalb der Lantibiotika etabliert.<sup>[77]</sup> Die Labyrinthopeptide zeichnen sich durch carbazyklische

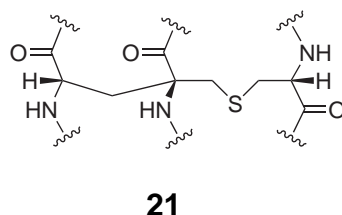
## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thioestreptons



**Schema 2.5** Vorgeschlagener Mechanismus der NisC-katalysierten Zyklisierungsreaktion (Michael-Addition) des B-Rings von Nisin unter Ausbildung eines Methyllantionins (vgl. Abbildung fig:nisin). Das neu gebildete stereogene Zentrum besitzt die *D*-Konfiguration in der  $\alpha$ -Position. (Adaptiert nach van der Donk *et al.*<sup>[76]</sup>).



**Abb. 2.5.** Die Struktur des Lantibiotikums Nisin A **20** enthält neben den Thioetheraminosäuren Lanthionin **18** und Methyllanthionin **19** die Dehydroaminosäuren Dehydroalanin **10** (Deala) und Dehydrobutyrin **11** (Dhb). Die Bezeichnung der Thioether-verbrückten Ringe A–E ist angegeben.



**Abb. 2.6.** Struktur der Triaminosäure Labionin **21** (Lab), die erstmals im Zusammenhang mit den Labyrinthopeptiden beschrieben wurde.<sup>[77]</sup>

Verbrückungen aus, die zusätzlich zu den bekannten Thioetherverbrückungen vorhanden sind. Die carbazyklischen Verbrückung tritt in der neuen Aminosäure Labionin **21** (Lab) auf, die der bekannten Thioether-Aminosäure Lanthionin **18** ähnelt. Im Gegensatz zu Lanthionin **18** weist diese jedoch ein zentrales quartäres C-Atom auf, das über eine zusätzliche Methylenbrücke mit einer weiteren Aminosäure verknüpft ist (Abbildung 2.6). Bezüglich der Biosynthese des Labionins wird eine außergewöhnliche Michaelreaktion angenommen. Nach Dehydratisierung von zwei Ser-Resten zu Dehydroalaninen und dem nukleophilen Angriff eines Cys auf das erste Dehydroalanin wird das entstehende Carbanion am  $\alpha$ -C-Atom stabilisiert und im nächsten Schritt als C-Nukleophil an das verbleibende Dehydroalanin unter Ausbildung der Methylenbrücke addiert.<sup>[78]</sup>

### Thiopeptide

Die meisten Thiopeptide enthalten in ihrer Struktur eine oder mehrere der Dehydroaminosäuren Dehydroalanin oder Dehydrobutyrin (vgl. Kapitel 1). Bisher wurden nach unserem Wissen keine Untersuchungen bezüglich der Notwendigkeit der Dehydroaminosäuren für die antibiotische Wirkung der Thiopeptide beschrieben. Allerdings konnte das Protein TipAL identifiziert und charakterisiert werden, das Thiostrepton **3** und weitere Thiopeptide kovalent bindet und in Mechanismen der Transkriptionsregulation involviert ist. Die Bindung erfolgt dabei über eine Michael-Addition eines Cysteins an ein Dehydroalanin in der Seitenkette des Thiostreptons **3**.

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons

---

### Deala-vermittelte kovalente Bindung der Thiopeptide an den Transkriptionsregulator TipA

TipA-Proteine (*Thiostrepton induced proteins*) wurden erstmals bei *Streptomyces lividans* beschrieben<sup>[79]</sup> und werden in diesen Bakterien in großem Umfang (bis 10 % der löslichen Proteine) induziert, wenn sie in Kontakt mit geringen Konzentrationen ( $10^{-9}$  M) an Thiostrepton **3** kommen<sup>[80]</sup>. Sie gehören zur Familie der MerR-Regulatorproteine und vermitteln schwache Resistenz gegenüber Thiostrepton **3**. TipA-Proteine wurden bisher nur in Nichtproduzenten beschrieben und können neben Thiostrepton **3** auch durch verwandte Thiopeptide (z.B. Micrococcin, Nosiheptid, Promoinducin) induziert werden.<sup>[81,82]</sup> MerR-Regulatorproteine sind bei Bakterien für die Transkriptionskontrolle von Proteinen des MDR-Systems<sup>[83]</sup> (*Multiple drug resistance*) verantwortlich.<sup>[84]</sup> Zu dem MDR-System gehören u. a. Efflux-Membranproteine, die Xenobiotika aus der Zelle schleusen, sowie modifizierende Enzyme, die die toxischen Stoffe durch Konjugation chemisch modifizieren und so entfernen. Die MerR-Regulatorproteine besitzen einen modularen Aufbau aus einer N-terminalen DNA-bindenden Domäne und einer C-terminalen Domäne. Während die N-terminale Domäne große Sequenzähnlichkeit zwischen den verschiedenen Vertretern der MerR-Familie aufweist, ist die C-terminale Domäne als »Sensor« für die jeweilige Gruppe von Effektormolekülen spezifisch.

Das für die TipA-Proteine bei *S. lividans* codierende Gen *tipA* kann durch alternative *in-frame* Translation die beiden Produkte TipAS (*S* für *short*: 144 Aminosäuren) und TipAL (*L* für *long*: 253 Aminosäuren) ergeben. TipAS weist den C-terminalen Teil des Gesamtproteins TipAL und beinhaltet eine Erkennungsdomäne für Thiostrepton **3**. Der N-terminale Teil des TipAL-Proteins hingegen zeigt große Ähnlichkeit mit den entsprechenden MerR-Proteindomänen und ist für die spezifische Bindung des Regulatorproteins an die Promotersequenz *ptipA* verantwortlich. Das Gen *tipA* steht unter der Kontrolle des eigenen Promoters *ptipA*, so dass dieses autoinduziert reguliert wird. Ist Thiostrepton **3** in der Zelle vorhanden, wird dieses von TipAL und TipAS gebunden, und TipAL induziert die Transkription des Gens *tipA*. Hierbei wird TipAS in einem molaren Überschuss von etwa Faktor 20 produziert. Dies lässt eine Dämpfung des regulatorischen Signals und eine Entgiftungsfunktion für TipAS vermuten.



Mit Hilfe von Massenspektrometrie konnte aufgezeigt werden, dass Thiostrepton **3** über einen Deala-Rest kovalent mit dem Cys214 der Proteine TipAS und TipAL in einer Michael-Additionsreaktion reagiert. Die Identität des Deala-Rests wurde nicht bestimmt.<sup>[85]</sup> Durch die Bindung des Thiostreptons an TipAS kommt es zu einer Konformationsänderung im Protein, die mittels NMR nachgewiesen werden konnte (Vergleich von apo-TipAS zu TipAS-Thiostrepton).<sup>[86]</sup> Hierbei kommt es zu einer vermehrten  $\alpha$ -Helixbildung im Linkerbereich des Proteins TipAL und zu einer erhöhten Bindungsaffinität des TipAL-Dimers an die Promotor-DNA (~ Faktor 10), was eine erhöhte Transkription durch die RNA-Polymerase induziert.<sup>[87]</sup>

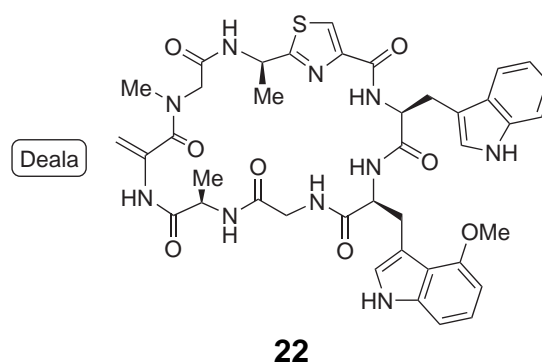
Interessanterweise besitzt TipAS eine *Globin*-ähnliche Faltung, wie mittels NMR nachgewiesen werden konnte.<sup>[86]</sup> Anstelle des Porphyrin-Liganden der Globine (vgl. Hämoglobin) bindet bei TipAS ein Molekül Thiostrepton **3** in der zentralen hydrophoben Tasche. Das reaktive Cys214 liegt bei TipAS am Ende der hydrophoben Tasche, wobei die Thiolfunktion der Seitenkette in Richtung der Taschenöffnung zeigt und dem umgebenden wässrigen Medium zugänglich ist. Im Gegensatz hierzu ist das andere Cys207 des Proteins TipAS inmitten der Helices  $\alpha 2 / \alpha 3$  verborgen und schlecht zugänglich. Es ist davon auszugehen, dass Thiostrepton **3** in der hydrophoben Tasche des Proteins TipAS (bzw. TipAL) bindet, und dass anschließend ein Deala-Rest der Seitenkette des Thiostreptons **3** mit dem reaktiven Cys214 unter Ausbildung einer Thioetherbrücke kovalent reagiert.

### Argyrin

Die zyklischen Octapeptide der Gruppe der Argyrine (Abbildung 2.7) wurden aus dem Myxobakterium *Archangium gephyra* isoliert und zeigen antitumorale und immunsuppressive Eigenschaften.<sup>[88,89]</sup> Neben einem Thiazolring, einem 4'-Methoxytryptophan und der Aminosäure Sarkosin (*N*-Methylglycin) weisen alle Argyrine ein Dehydroalanin **10** auf. Untersuchungen zum Wirkmechanismus der antitumoralen Eigenschaften deuten auf eine Inhibierung des Proteasoms hin (vgl. Kapitel 4).<sup>[90]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die Proteasominhibierung durch Argyrin A **22** der Abbau des Tumorsuppressorproteins p27<sup>kip1</sup> verhindert wird. Bemerkenswerterweise ist die zelluläre Ant-

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons

---



**Abb. 2.7.** Struktur des zyklischen Octapeptids Argirin A **22**.

wort auf Proteinebene bei Proteasominhibierung durch den etablierten Inhibitor Bortezomib **106** deutlich abweichend von der Inhibierung durch Argirin A **22**. Die Funktion des Dehydroalanins im Wirkmechanismus konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

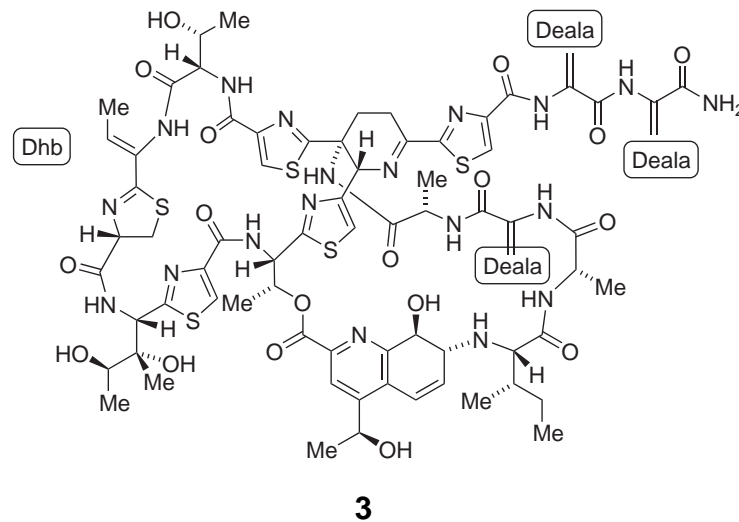
### 2.2.5. Michael-Additionsreaktionen an Thiostrepton

Die Reaktivität der Dehydroalanine als Michael-Akzeptoren sollte sich gut für semi-synthetische Modifikationen des Thiostreptons **3** nutzen lassen. Erste Vorversuche mit Cystein als Michael-Donor ergaben allerdings komplexe Reaktionsmischungen. Massenspektrometrische Analysen (MALDI/LC-MS) der Reaktionsmischungen deuteten auf Mehrfachadditionen hin. Durch die drei Deala-Reste und dem Dhb-Rest ergeben sich mehrere Möglichkeiten der Michael-Addition (Abbildung 2.8). Darüber hinaus könnte sich Cystein sowohl über die Thiolfunktion als auch über das Amin an Thiostrepton **3** addieren, also isomere Produkte ergeben.

### Verkürzung der Thiostrepton-Seitenkette

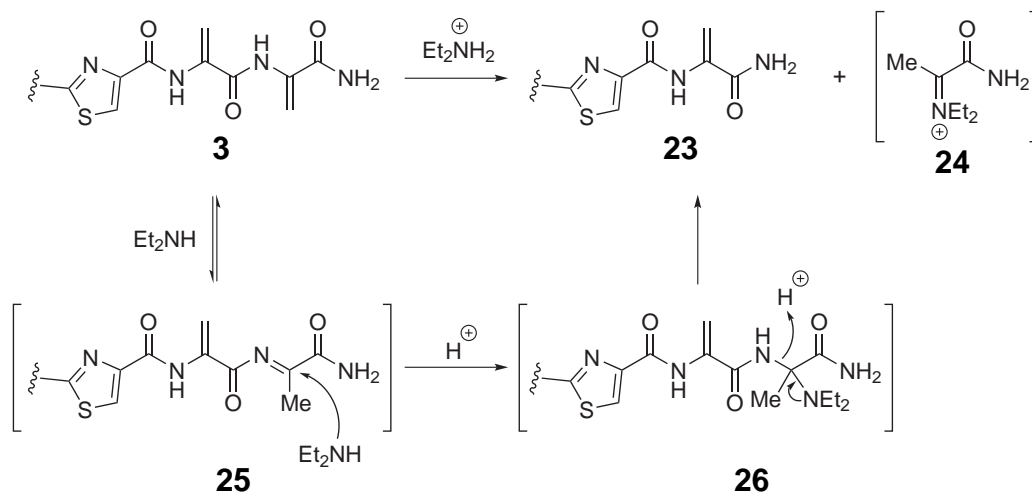
Um eine selektive Reaktionsführung der Michael-Addition zu ermöglichen, wurde nach einer Lösung gesucht, die Komplexität des Thiostreptons **3** bezüglich der Dehydroalanine zu reduzieren ohne die Gesamtstruktur zu beeinträchtigen. Interessanterweise wurde während der Entwicklung der Totalsynthese des Thiostreptons **3** von Nicolaou *et al.* eine Nebenreaktion beobachtet.<sup>[42]</sup> Bei der Entschützung eines Fragments der Bis-Deala-Thiostreptonseitenkette mit Diethylamin ( $\text{Et}_2\text{NH}$ ) trat eine Verkürzungsreaktion des Bis-

## 2.2. Funktionalisierung der Dehydroalanine



**Abb. 2.8.** Struktur des Thiostreptons **3**. Die Position der drei Dehydroalanine (Deala) und des Dehydrobutyrins (Dhb) ist angegeben.

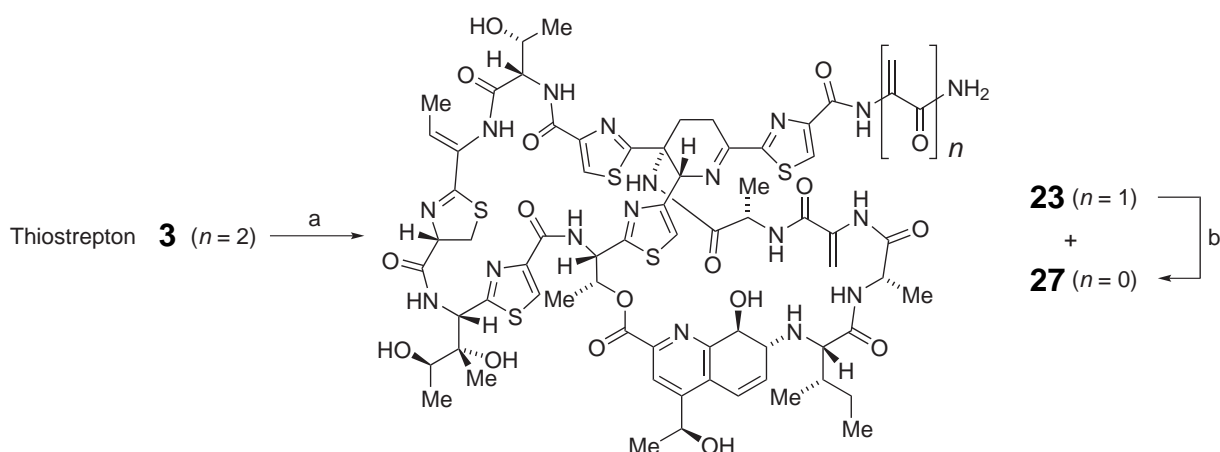
Deala-Fragments auf, wobei das terminale Dehydroalanin abgespalten wurde.



**Schema 2.6** Vorgeschlagener Mechanismus der Verkürzungsreaktion der Thiostrepton-Seitenkette mittels Diethylamin ( $\text{Et}_2\text{NH}$ ). Modifiziert nach Literatur<sup>[42]</sup>.

Der dazu vorgeschlagene Mechanismus ist in Schema 2.6 dargestellt. Das endständige Dehydroalanin tautomerisiert im Basischen zu Acylimin **25**, das über einen nukleophilen Angriff desamins zum Intermediat **26** überführt wird. Umlagerung führt anschließend zur Abspaltung des Iminiums, wodurch das einfach verkürzte Thiostreptonderivat **23** entsteht.

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons

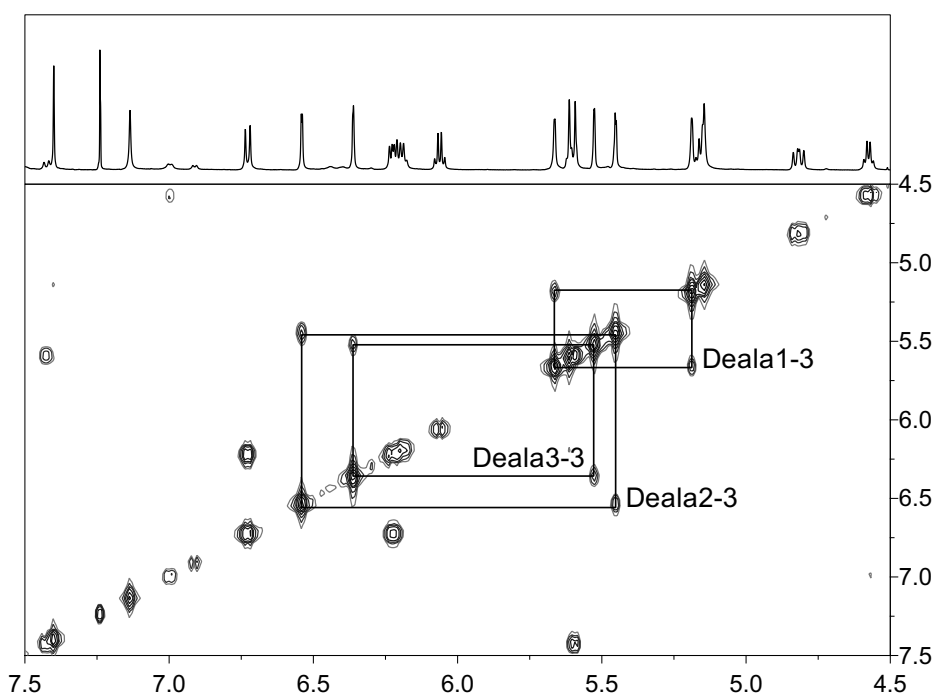


**Schema 2.7** Synthese des einfach verkürzten (**23**) und des zweifach verkürzten (**27**) Thiostreptons aus Thiostrepton **3**. Bedingungen: a) 10%  $\text{Et}_2\text{NH}$  in  $\text{CHCl}_3$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 3 h, 70% **23**, 15% **27**. b) 10–20%  $\text{Et}_2\text{NH}$  in  $\text{CHCl}_3$ ,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 56 h, 48%.

Die beschriebene Verkürzungsreaktion konnte unter leicht veränderten Bedingungen mit  $\text{CHCl}_3$  als Lösungsmittel und 10% Diethylamin ( $\text{Et}_2\text{NH}$ ) auf das Gesamtmolekül Thiostrepton **3** übertragen werden (Schema 2.7). Erfreulicherweise verlief die Reaktion ohne nennenswerte Nebenreaktionen. Als Hauptprodukt entstand das einfach verkürzte Thiostrepton **23** in guter Ausbeute (70%). Die Reaktion konnte erfolgreich im Gramm-Maßstab durchgeführt und die Produkte mittels Kieselgelchromatographie gereinigt werden, so dass größere Mengen des einfach verkürzten Thiostreptons **23** als Ausgangsmaterial dargestellt werden konnten.

Die NMR-Spektren des einfach verkürzten Thiostreptons **23** zeigen deutlich das Fehlen der Signale des Dehydroalanins 3 (Deala3) (vgl. Abbildungen 2.10, 2.9). Die beiden geminalen  $\beta$ -Protonen der Dehydroalanine bilden charakteristische Signalgruppen im NMR aus. Jedes Proton erscheint im  $^1\text{H}$ -Spektrum als Signal-Dublett mit einer kleinen Kopplungskonstante von 1.6–2.2 Hz, wobei im gCOSY-Spektrum ein  $^2J$ -Spinsystem auftritt, das sich leicht identifizieren lässt. Im Thiostrepton **3** treten insgesamt drei dieser Spinsysteme mit Verschiebungen im Bereich 5.0–6.5 ppm auf, die den drei Dehydroalaninen zuzuordnen sind (Abbildung 2.9). Im gCOSY-Spektrum des einfach verkürzten Thiostreptons **23** fehlt eindeutig das Spinsystem des Deala3 (Abbildung 2.10).

Neben dem einfach verkürzten Thiostrepton **23** als Hauptprodukt entstand ein zusätzliches Nebenprodukt (15%), das aufgrund seiner Molekülmasse (MALDI bzw. LCMS) als



**Abb. 2.9.**  $^1\text{H}$ -gCOSY-NMR-Spektrum des Thiostreptons **3**. Die Spinsysteme der drei Aminosäuren Deala1, Deala2 und Deala3 der geminalen  $\beta$ -Protonen sind angegeben.

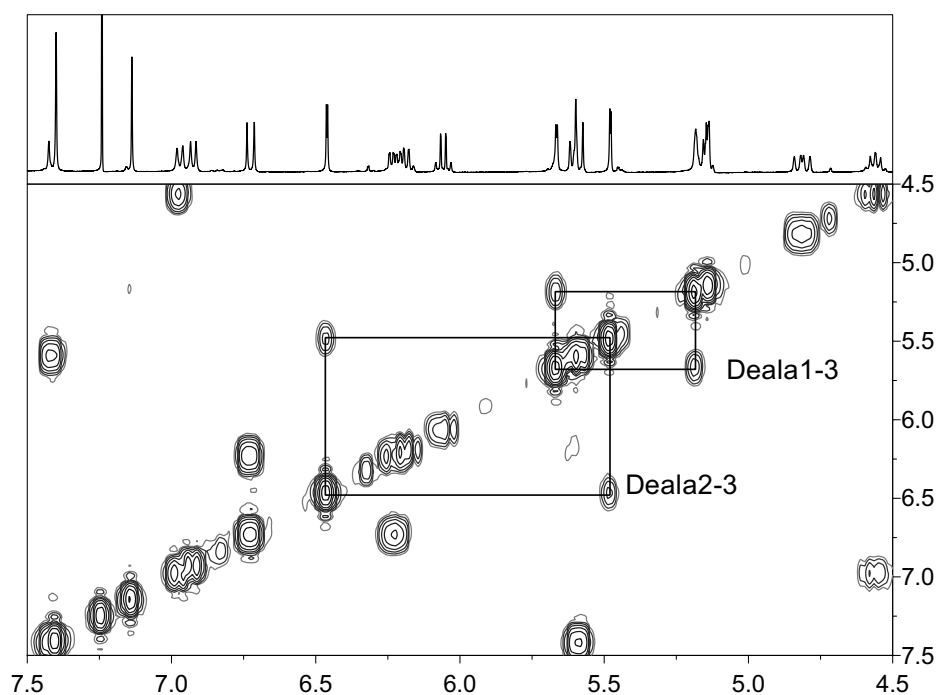
weiter abgebautes Thiostrepton **27** identifiziert werden konnte. Weitergehende HRMS- und NMR-Analytik nach Isolierung des Nebenprodukts bestätigte die Identität des zweifach verkürzten Thiostreptons **27** (Abbildung 2.11). In den NMR-Spektren ist nur noch ein Dehydroalanin-Spinsystem (Deala1) vorhanden.

Zur Überprüfung, ob ein sequentieller Abbau der Thiostrepton-Seitenkette möglich war, wurde die Verkürzungsreaktion mit isoliertem einfach verkürztem Thiostrepton **23** durchgeführt (Schema 2.7). Tatsächlich konnte das zweifach verkürzte Thiostrepton **27** erhalten werden. Die zweite Verkürzungsreaktion verläuft deutlich langsamer als die erste. Um ausreichend hohen Umsatz des einfach verkürzten Thiostreptons **23** zu erreichen, waren größere Mengen Diethylamin  $\text{Et}_2\text{NH}$  (10–20 %) und längere Reaktionszeiten (56 h) erforderlich (Aubeute: 48 %).

### Michael-Additionsreaktion von Thiolen an das einfach verkürzte Thiostrepton **23**

Erste Vorversuche zur Michael-Addition von monofunktionalen Thiolen an das einfach verkürzte Thiostrepton **23** verliefen vielversprechend. Die Reaktion mit *L*-*N*-Acetylcysteinmethylester (1.2 Äquiv.) verlief selektiv ohne Bildung nennenswerter Ne-

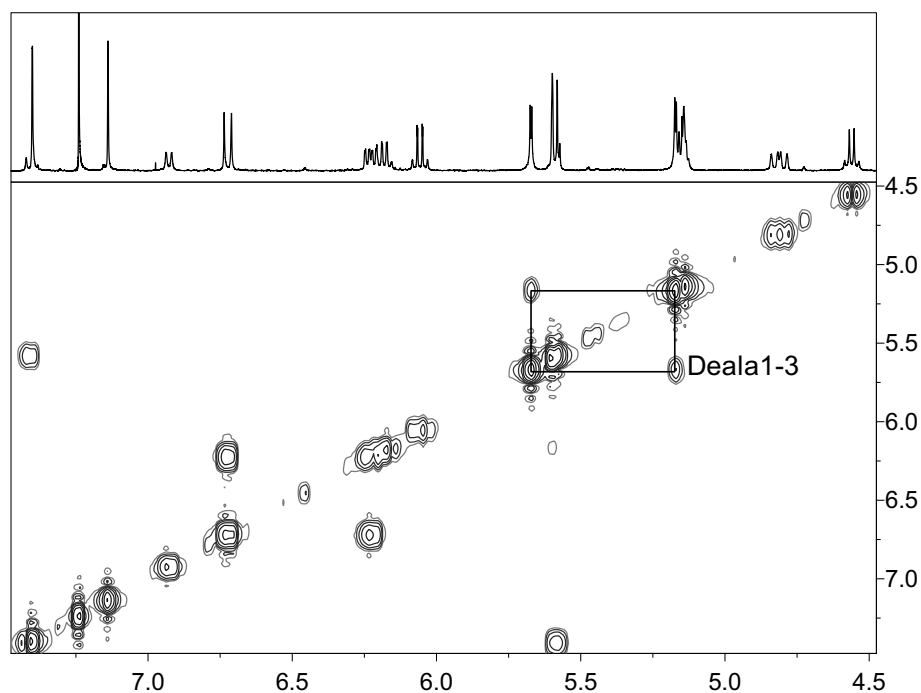
## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons



**Abb. 2.10.**  $^1\text{H}$ -gCOSY-NMR-Spektrum des einfach verkürzten Thiostreptons **23**. Die Spinsysteme der beiden Aminosäuren Deala1 und Deala2 der geminalen  $\beta$ -Protonen sind angegeben. Das Spinsystem der Aminosäure Deala3 (vgl. Thiostrepton **3**) ist nicht mehr vorhanden.

benprodukte zum Michael-Addukt **28** (Schema 2.8). Isolieren der Hauptkomponente und Analyse mittels LCMS und 2D-NMR ergab, dass das geschützte Cystein regioselektiv zum Monoaddukt **28** an das verbleibende Dehydroalanin (Deala2) in der Thiostrepton-Seitenkette addiert. Die besten Resultate erzielten wir in einem Lösungsmittelgemisch aus Trifluorethanol (TFE) / Puffer 2:1. Als Puffer wurde 50 mM Natriumphosphatpuffer pH9 verwendet. Zusätzlich konnte die Reaktion durch die Zugabe von Triethylamin ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) beschleunigt werden, so dass das Ausgangsmaterial schon nach wenigen Stunden komplett umgesetzt wurde.

Die NMR-Spektren des Michael-Addukts **28** zeigen, dass die Signale der Deala2- $\beta$ -Protonen wie erwartet verschwinden (Abbildung 2.12). Durch die Michael-Addition entsteht an der Position des Deala2 ein neues Cystein mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Protonen. Die neuen  $\beta$ -Cys-Protonen treten als Multiplett bei einer Verschiebung von  $\delta = 2.93 - 2.80$  ppm auf. Durch das benachbarte stereogene Zentrum werden die beiden neuen  $\beta$ -Cys-Protonen differenziert und zeigen unterschiedliche Verschiebungen. Allerdings überlagern sie sich mit den beiden  $\beta$ -Cys-Protonen des *N*-Acetylcysteinmethylesters. Das gleiche gilt für die

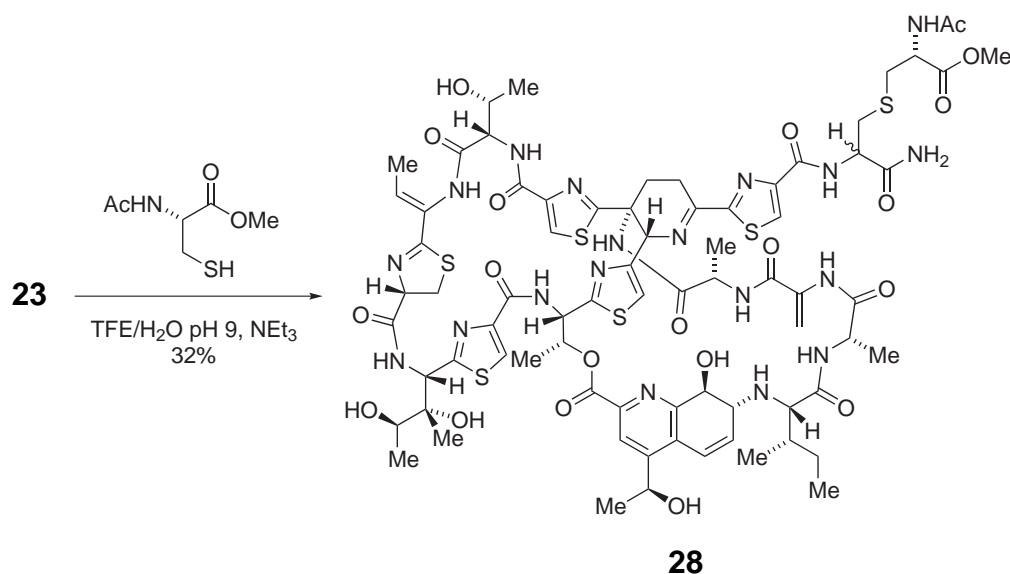


**Abb. 2.11.**  $^1\text{H}$ -gCOSY-NMR-Spektrum des zweifach verkürzten Thiostreptons **27**. Das Spinsystem der Aminosäure Deala1 der geminalen  $\beta$ -Protonen ist angegeben. Die Spinsysteme der Aminosäuren Deala2 und Deala3 (vgl. Thiostrepton **3**) sind nicht mehr vorhanden.

$\alpha$ Cys-Protonen des neu gebildeten Cysteins und des *N*-Acetylcysteinmethylesters, die sich ebenfalls überlagern. Diese beiden  $\alpha$ -Cys-Protonen treten bei einer Verschiebung von  $\delta = 4.59 - 4.50$  ppm auf. Hinzu kommt, dass durch die Michael-Addition zwei Diastereomere gebildet werden, die sich in ihrer Konfiguration am  $\text{C}^\alpha$ -Atom des neu gebildeten Cysteins unterscheiden. Hierdurch kommt es zu einer weiteren Überlagerung von unterschiedlichen Signalen sowohl in der Region der  $\alpha$ - als auch der  $\beta$ -Cys-Protonen. Besonders gut zu unterscheiden sind die beiden Diastereomere im Singulett-Signal des Methylesters bei 3.55 ppm. Im  $^1\text{H}$ -Spektrum sind in diesem Bereich zwei Singulets von ungefähr gleicher Intensität vorhanden, d. h. beide Diastereomere bilden sich in fast gleichem Umfang. Üblicherweise waren die beiden Diastereomere nicht durch Kieselgel-Chromatographie oder HPLC zu trennen.

Bei der Addition von Alkylthiolen (beispielsweise  $\text{C}_8$ -Kette, Michael-Addukt **30**, *vide infra*) wurde beobachtet, dass die beiden Diastereomere in analytischen HPLC-Läufen leicht unterschiedliche Retentionszeiten aufwiesen. Nach aufwendigen Trennungsläufen mittels präparativer HPLC konnten zur NMR-Analytik ausreichende Mengen der bei-

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons

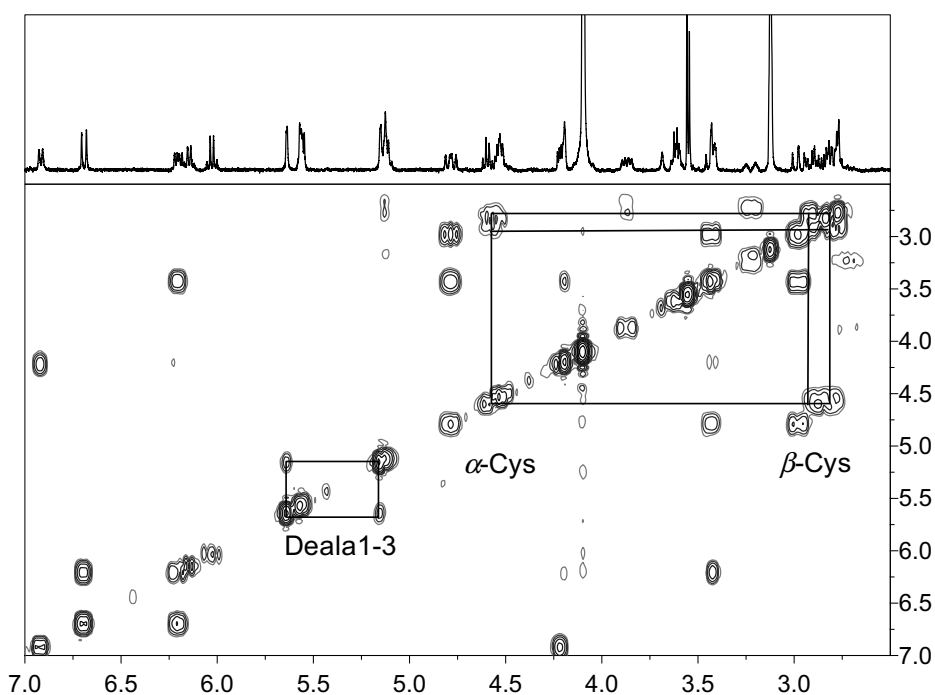


**Schema 2.8** Michael-Addition von L-N-Acetylcysteinmethylester an das einfach verkürzte Thiostrepton **23** zum Additions-Produkt **28**. Bedingungen: a) L-N-Acetylcysteinmethylester, Et<sub>3</sub>N, TFE/H<sub>2</sub>O 2:1, pH 9, RT, 32 %.

den Diastereomere isoliert werden. Durch Koinjektion der beiden Diastereomere in der analytischen HPLC und in der LCMS konnte verifiziert werden, dass es sich um zwei verschiedene Isomere handelte. Die Auswertung der NMR-Spektren ergab, dass fast keine Unterschiede zwischen den beiden Proben auszumachen waren.

Unter den genannten Reaktionsbedingungen wurden keine Mehrfachadditionen beobachtet, obwohl das einfach verkürzte Thiostrepton **23** mit dem Dehydroalanin 1 (Deala1) im B-Ring und dem Dehydrobutyrin (Dhb) des A-Rings noch zwei weitere potentielle Michael-Akzeptoren aufwies. Die Regioselektivität ist vermutlich der unterschiedlichen Reaktivität der Dehydroalanine an den verschiedenen Positionen in der Struktur des Thiostreptons **3** geschuldet (*vide infra*). Gegenüber den Vorversuchen zur Michael-Addition an Thiostrepton **3** mit nicht geschütztem Cystein wurde mit N-Acetylcysteinmethylester ein monofunktionaler Michael-Donor gewählt, der keine weitere nukleophile, Michael-reaktive Funktionalität (vgl. Amin des Cysteins) besitzt. Beide Effekte zusammengenommen sind wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass die Umsetzungen sehr selektiv verliefen, und dass vorrangig nur eine Hauptkomponente als Produkt erhalten wurde.



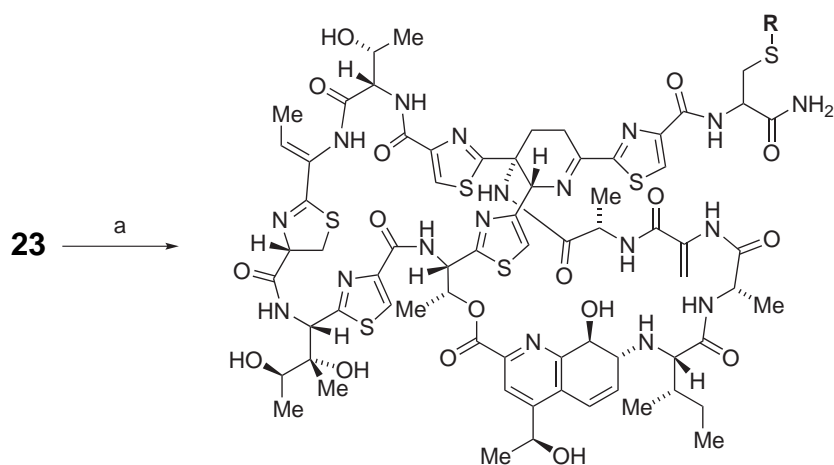


**Abb. 2.12.**  $^1\text{H}$ -gCOSY-NMR-Spektrum des Michael-Additionsprodukts **28** aus der Reaktion von *L*-*N*-Acetylcysteinmethylester mit einfach verkürztem Thiostrepton **23**. Das Spinsystem der Deala2- $\beta$ -Protonen ist nicht mehr vorhanden, da Deala2 an der Reaktion teilnimmt (vgl. Abbildung 2.10). Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cys-Protonen des Acetylcysteinmethylesters und des neu entstehenden Cys-Rests treten als neue Spinsysteme hinzu.

### Generierung einer Substanzbibliothek mittels Michael-Addition an einfach verkürztes Thiostrepton **23**

Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Michael-Addition von Thiolen an einfach verkürztes Thiostrepton **23** wurde eine fokussierte Substanzbibliothek unter Variation des Thiols synthetisiert (Schema 2.9, Tabelle 2.1). Hierbei kamen aliphatische Alkylthiole in den Kettelängen  $\text{C}_4$ – $\text{C}_{16}$ , ein Glucosederivat, zwei Cysteinverbindungen, ein tertiäres Amin und ein funktionalisiertes Polyethylenglykol zum Einsatz. Die Monoaddukte konnten in guten Ausbeuten nach präparativer HPLC (C4-Säule, MeCN/ $\text{H}_2\text{O}$ -Gradient) erhalten werden. Einzig bei den Addukten **30 a/b** konnte eine Trennung der Diastereomere erzielt werden.





**Schema 2.9** Allgemeines Schema zur Michael-Addition verschiedener Thiole R-SH an einfach verkürztes ThioStrepton **23**. Bedingungen: a) R-SH, Et<sub>3</sub>N, TFE/H<sub>2</sub>O 2:1, pH 9, RT, 2–48 h, 21–56%.

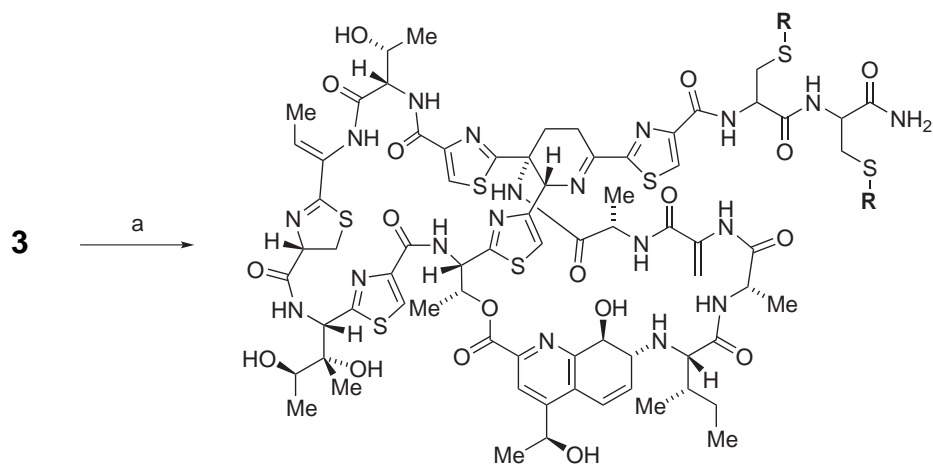
### Doppeladditionen von Thiolen an ThioStrepton

Nach der Optimierung der Reaktionsbedingungen der Michael-Addition wendeten wir uns nochmals der Addition an natives ThioStrepton **3** mit monofunktionalen Thiolen zu (Schema 2.10). Alle Doppeladdukte konnten unter Anwendung der optimierten Reaktionsbedingungen in guten Ausbeuten erhalten werden (Tabelle 2.2). Die Michael-Addition verlief in den Fällen, in denen zusätzlich ein freies Amin zur Verfügung stand, ausschließlich über das nukleophilere Thiol, was durch NMR-Analytik bestätigt werden konnte. Obwohl jeweils das Thiol im Überschuss (2.2–5.0 Äquiv.) zugegeben wurde, bestand das Hauptprodukt immer aus der regioselektiven Doppeladdition an die beiden Deala-Reste (Deala2/3) der Seitenkette des ThioStreptons, während das Dehydroalanin im B-Ring (Deala1) keine Reaktivität zeigte.

### Michael-Additionsreaktion an einfach verkürztes oxidiertes ThioStrepton (**58**)

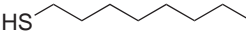
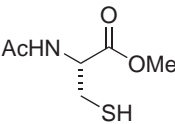
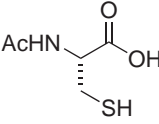
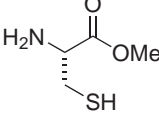
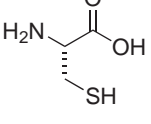
In Kapitel 2.3 wird die Oxidation des Thiazolins im A-Ring der ThioStreptonstruktur zum Thiazol beschrieben. Das einfach verkürzte, oxidierte ThioStrepton **58** wurde ebenfalls als Michael-Donor zu den optimierten Reaktionsbedingungen mit einer Reihe von Thiolen reagiert (Schema 2.11). Wie in Tabelle 2.3 aufgezeigt, konnten die entsprechenden Michael-Addukte in guten Ausbeuten erhalten werden. Es zeigte sich keine veränderte

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons

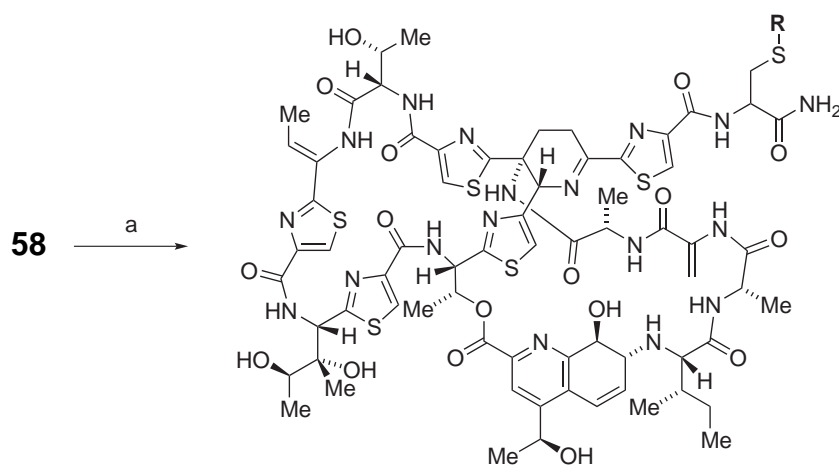


**Schema 2.10** Allgemeines Schema zur Michael-Addition verschiedener Thiole R-SH an Thiostrepton **3**. Bedingungen: a) R-SH, Et<sub>3</sub>N, TFE/H<sub>2</sub>O 2:1, pH 9, RT, 24–53%.

**Tab. 2.2.** Doppeladdukte verschiedener Thiole an natives Thiostrepton **3**.

Verbindung	Thiol	Ausbeute [%] <sup>a</sup>
<b>36</b>	HS- 	24
<b>37</b>		47
<b>38</b>		53
<b>39</b>		31
<b>40</b>		44

<sup>a</sup> Ausbeute nach präparativer HPLC-Aufreinigung.

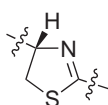


**Schema 2.11** Allgemeines Schema zur Michael-Addition verschiedener Thiole R-SH an das einfach verkürzte oxidierte Thiostrepton **58**. Bedingungen: a) R-SH, Et<sub>3</sub>N, TFE/H<sub>2</sub>O 2:1, pH9, RT, 27–71%.

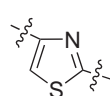
Reaktivität des oxidierten Thiostrepton-Derivats gegenüber der Sulfa-Michael-Addition verglichen mit den zuvor verwendeten Michael-Donoren.

## 2.3. Transformation des Thiazolins

In der Gruppe der Thiopeptide fällt auf, dass alle bisher beschriebenen Piperidin-Thiopeptide im A-Ring ein D-Thiazolin **46** aufweisen (Kapitel 1). Bemerkenswert ist, dass dieses strukturelle Merkmal bei diesen Vertretern mit dem Vorhandensein eines B-Ring-Lactons einhergeht, das die Gesamtstruktur konformativ einschränkt und rigide macht. Dieser letzte Gesichtspunkt spielt eine wichtige Rolle in der Betrachtung der biosynthetischen Herkunft des Thiazolins (Kapitel 5). Alle anderen bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Thiopeptide besitzen an der Position des Thiazolins stattdessen ein vollständig oxidiertes, aromatisches Thiazol **47**.



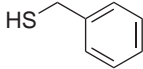
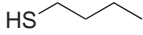
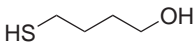

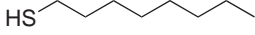
**46**



**47**

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons

**Tab. 2.3.** Michael-Addukte verschiedener Thiole an einfach verkürztes oxidiertes Thiostrepton **58**.

Verbindung	Thiol	Ausbeute [%] <sup>a</sup>
<b>41</b>		71
<b>42</b>		51
<b>43</b>		54
<b>44</b>		27
<b>45</b>		36

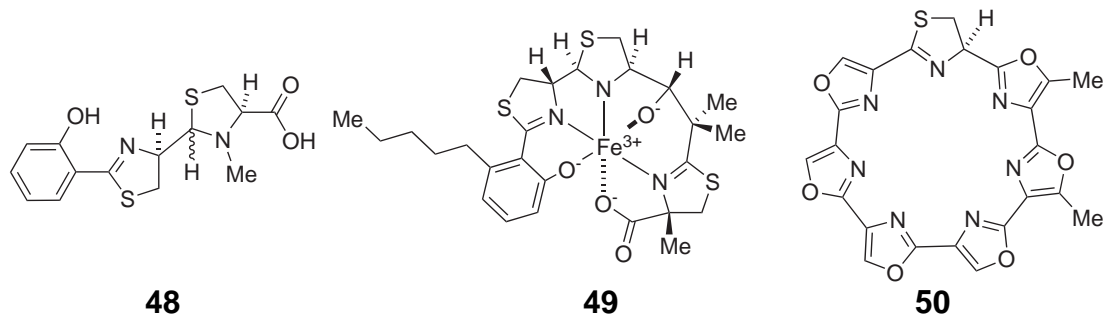
<sup>a</sup> Ausbeute nach präparativer HPLC-Aufreinigung.

### 2.3.1. Vorkommen von Thiazolinen in Naturstoffen

Es sind mehrere Naturstoffe bekannt, die Thiazoline in ihrer Struktur aufweisen, allerdings scheinen diese weitaus weniger verbreitet zu sein als die vollständig oxidierten, aromatischen Thiazole. Im Folgenden werden einige Thiazolin enthaltende Naturstoffe vorgestellt.

#### Pyocheline

Die Gruppe der Pyocheline **48** und die verwandten Naturstoffe Yersiniabactin und Micaocidin **49** sind niedermolekulare, Thiazolin enthaltende Siderophore, die von verschiedenen Bakterien produziert werden und als hochaffine Eisen-Chelatoren wirken (Abbildung 2.13 links bzw. Mitte).<sup>[91]</sup> Interessanterweise sind die Thiazoline dieser Naturstoffe vorrangig *D*-konfiguriert, obwohl sie biosynthetisch aus *L*-Cystein durch nichtribosomale Peptidsynthese (NRPS) hervorgehen. (Vor kurzem wurden zusätzlich Pyocheline mit *L*-Konfiguration beschrieben<sup>[92]</sup>). Die Thiazoline sind wesentlich an der Bindung des Metallions beteiligt.



**Abb. 2.13.** Beispiele für Thiazolin-enthaltende Naturstoffe: Struktur der Pyocheline (I/II) **48**, des Micacocidins A **49** und des Telomestatins **50**.

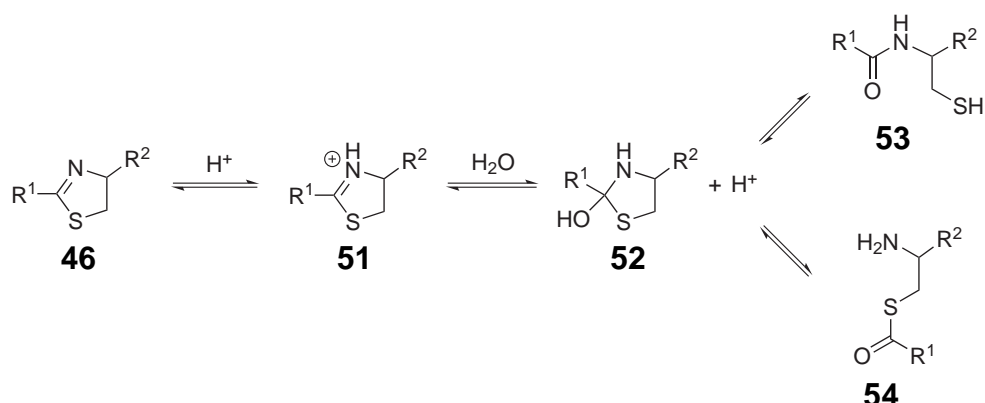
### Telomestatin

Telomestatin **50** ist ein selektiver Inhibitor des Enzyms Telomerase und wurde aus Bakterien der Gattung *Streptomyces anulatus* isoliert (Abbildung 2.13 rechts).<sup>[93]</sup> Durch Binden an G-Quadruplex DNA stabilisiert Telomestatin **50** diese Strukturen, wodurch die Zelle schließlich Apoptose einleitet. Der ungewöhnliche Makrozyklus besteht aus sieben Oxazolringen und einem Thiazolinring.

#### 2.3.2. Hydrolysestabilität der Thiazoline

Thiazoline können durch saure Hydrolyse leicht geöffnet werden, wobei entweder ein *N*-Acylcysteamin- oder ein *S*-Acylcysteamin-ähnliches Produkt entsteht. Ein möglicher Mechanismus ist in Schema 2.12 dargestellt.<sup>[94,95]</sup> Durch Protonierung des Imin-Stickstoffs des Thiazolins **46** entsteht das Thiazolinsalz **51**, dessen C=N-Kohlenstoffatom eine höhere Elektrophilie aufweist und leicht von einem Molekül Wasser angegriffen wird. Hierdurch entsteht 2-Hydroxythiazolidin **52**, das sich anschließend in *N*-Acylcysteamin **53** oder *S*-Acylcysteamin **54** spaltet.

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons



Schema 2.12 Saure Hydrolyse des Thiazolinrings.

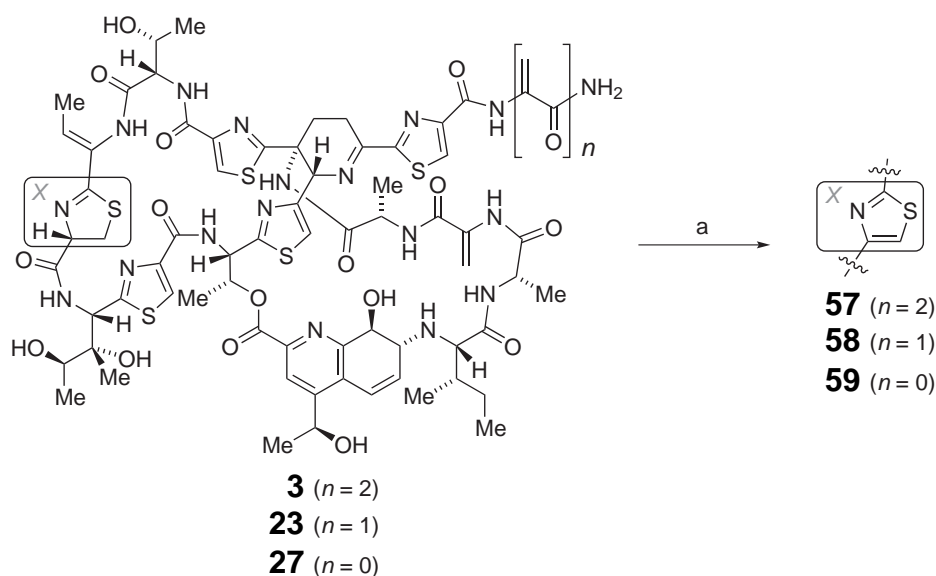
### 2.3.3. Oxidation des Thiazolins zum Thiazol innerhalb der Thiostreptonstruktur

Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit der Thiazoline (Kapitel 2.3.2) suchten wir nach Methoden, um das Thiazolin innerhalb der Thiostreptonstruktur selektiv in das entsprechende stabilere Thiazol zu überführen. Neben der zu erwartenden höheren Stabilität des Thiazol-Derivats sollte der Einfluss des im Gegensatz zum Thiazolin planaren Thiazols auf die Konformation des A-Rings von Thiostrepton **3** und des Gesamtmoleküls untersucht werden. Von Interesse war in diesem Zusammenhang besonders der Einfluss dieser Modifizierung auf die biologische Aktivität der Moleküle.

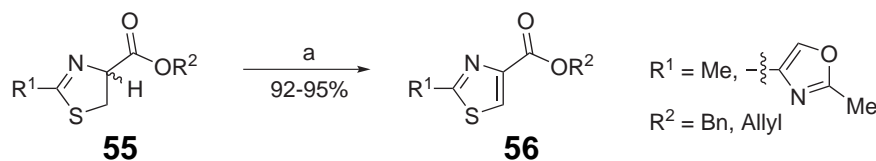
#### Allgemeine Oxidationsreaktionen der Thiazoline zu Thiazol

Thiazoline lassen sich unter Anwendung verschiedener Oxidationsmethoden in die entsprechenden Thiazole überführen.<sup>[96]</sup> Neben den Oxidationen mit *tert*-Butylperoxybenzoat/Cu-Salzen<sup>[97]</sup> oder MnO<sub>2</sub>/Benzol<sup>[98]</sup> wurde die Umwandlung zum Thiazol mit Hilfe des Systems 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU)/BrCCl<sub>3</sub><sup>[99]</sup> beschrieben. Diese Reaktion stellt eine sehr milde und selektive Methode dar, bei der beispielsweise Allyl- und Benzylester-Funktionalitäten erhalten bleiben (Schema 2.13).





**Schema 2.14** Oxidation des Thiazolins zum Thiazol. Ausgehend von Thiostrepton **3**, einfach (**23**) bzw. zweifach verkürztem (**27**) Thiostreptonderivat. Bedingungen: a)  $\text{BrCCl}_3$ , DBU,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 70–91 %.



**Schema 2.13** Thiazolsynthese durch Oxidation von Thiazolin.<sup>[99]</sup> Bedingungen: a)  $\text{BrCCl}_3$ , 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ .

### Oxidation innerhalb der Thiostreptonstruktur

Ermutigt durch den erfolgreichen Einsatz des Systems DBU/ $\text{BrCCl}_3$  in peptidischer Umgebung<sup>[100]</sup> testeten wir die Methode am Naturstoff Thiostrepton **3**. Tatsächlich konnte in ersten Testreaktionen oxidiertes Thiostrepton mittels LCMS und nachfolgend durch NMR-Analytik nachgewiesen werden. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt ein zusätzliches Singulett-Signal des neuen Thiazols (Thz-neu-5) im charakteristischen Bereich der Thiazol-Protonen bei  $\delta = 7.87$  ppm (Abbildung 2.14). Außerdem fehlen die Signale der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Protonen des Thiazolins (Bezeichnung Cys4 bzw. Cys5/Cys5') im oxidierten Thiostrepton **57**.

Es zeigte sich, dass nicht nur das Thiazolin des Thiostreptons **3** selektiv zum Thiazol

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons

**Tab. 2.4.** Oxidation des Thiazolins verschiedener Thiostreptonderivate zum Thiazol.

Ausgangsverbindung (Thiazolin)	Produkt (Thiazol)	Ausbeute [%] <sup>a</sup>
Thiostrepton <b>3</b>	<b>57</b>	70
einfach verkürztes Thiostrepton <b>23</b>	<b>58</b>	91
zweifach verkürztes Thiostrepton <b>27</b>	<b>59</b>	79

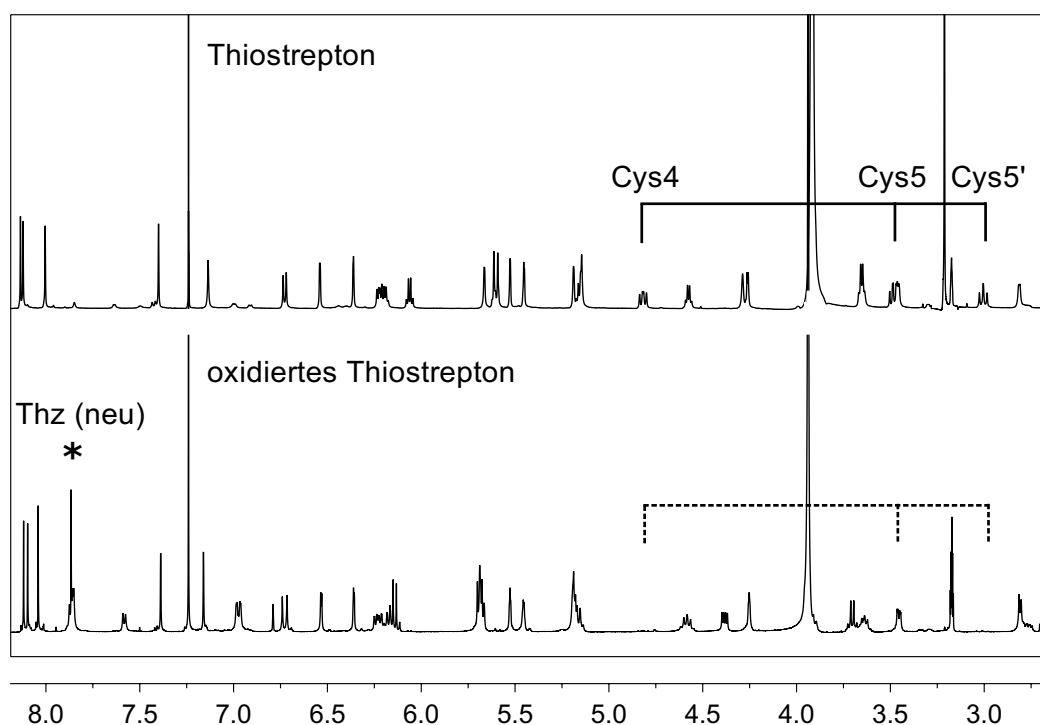
<sup>a</sup> Ausbeute nach präparativer HPLC-Aufreinigung.

oxidiert werden kann, sondern dass dies auch mit den Seitenketten-verkürzten Derivaten **23** und **27** in guten Ausbeuten durchführbar ist (Schema 2.14, Tabelle 2.4). Die Reaktionen verliefen nahezu quantitativ in 2–3 h. Wie bereits in Kapitel 2.2.5 gezeigt, kann durch das Thiazol keine veränderte Reaktivität in Michael-Additionsreaktionen mit Thiolen an die Dehydroalanine festgestellt werden.

In NMR-Titrationsexperimente fiel auf, dass das  $\alpha$ -Proton des Thiazolins im Thiostrepton **3** relativ leicht zu deprotonieren ist (Kapitel 5). Dies hat Konsequenzen für die Leichtigkeit, mit der das Thiazolin zum Thiazol mittels des Systems DBU / BrCCl<sub>3</sub> oxidiert werden kann. Wahrscheinlich ist das der Grund, dass die beschriebenen Oxidationsreaktionen derart problemlos bei dem komplexen Molekül Thiostrepton **3** verlaufen kann. Die relativ hohe Azidität des Thiazolinprotons spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Ausbildung der D-Konfiguration während der Thiostrepton-Biosynthese (Kapitel 5).

### 2.4. Transformation des Dehydropiperidins

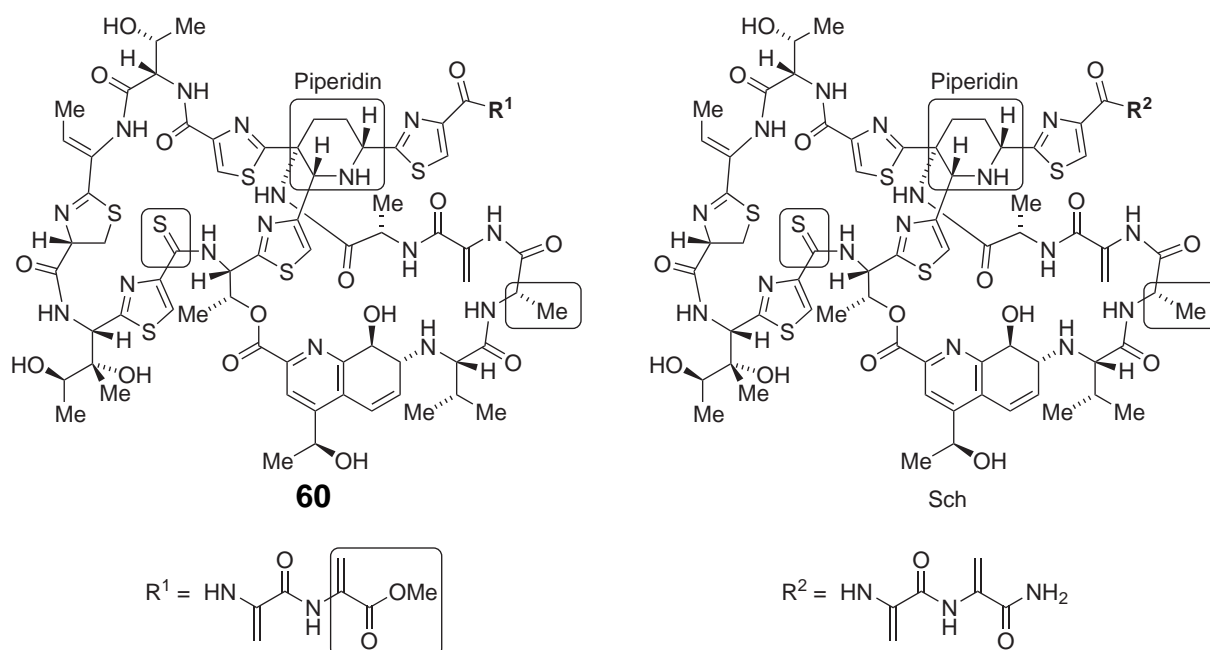
Neben Thiostrepton **3** wurden bisher zwei weitere Thiopeptide beschrieben, die anstelle des Dehydropiperidins als zentralen Heterozyklus ein komplett reduziertes Piperidin besitzen (Abbildung 2.15).<sup>[26]</sup> In ihrer Gesamtstruktur sind diese Thiopeptide dem Thiostrepton **3** sehr ähnlich. Zur Gruppe der sogenannten Thiopeptide (Abbildung 2.15, links) gehören Vertreter, die entweder ein Piperidin (»Serie a«) bzw. ein Dehydropiperidin (»Serie b«) als zentralen Heterozyklus aufweisen. Im Vergleich zu Thiostrepton **3** besitzen sie darüber hinaus anstelle des Isoleucins im B-Ring ein Valin, tragen im A-Ring an einer



**Abb. 2.14.** Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren des oxidierten Thiostreptons **57** mit Thiostrepton **3**. Die Signale des Cys (Thiazolin) verschwinden, während ein neues Signal-Singulett des neuen Thiazols hinzutritt (\*). Bei etwa 7.0 und 7.6 ppm treten NH-Signale (Dubletts) unterschiedlicher Intensitäten auf, die mit dem Lösungsmittel austauschen.

Position ein Thioamid und weisen eine leicht veränderte Seitenkette gegenüber Thiostrepton **3** auf, wobei das terminale Dehydroalanin entweder als freie Säure (–COOH) oder als Methylester (–COOMe) vorliegt (ein um ein Deala-Rest verkürztes Amid wurde ebenfalls beschrieben).<sup>[101,102]</sup> Das Thiopeptid Sch-18640 **6** (Abbildung 2.15, rechts) ist ebenfalls fast identisch mit Thiostrepton **3**, unterscheidet sich von diesem jedoch durch das vollständig reduzierte Piperidin, durch ein Valin anstelle des Isoleucins und durch eine Thioamidbindung im A-Ring.<sup>[103]</sup>

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons



**Abb. 2.15.** Bisher bekannte Thiopeptide mit Piperidin als zentralem Heterozyklus. Gezeigt sind die Strukturen von Thiopeptin A<sub>1a</sub> **60** (links) und Sch-18640 **6** (rechts). Die strukturellen Unterschiede gegenüber Thiostrepton **3** sind jeweils durch einen Kasten gekennzeichnet.

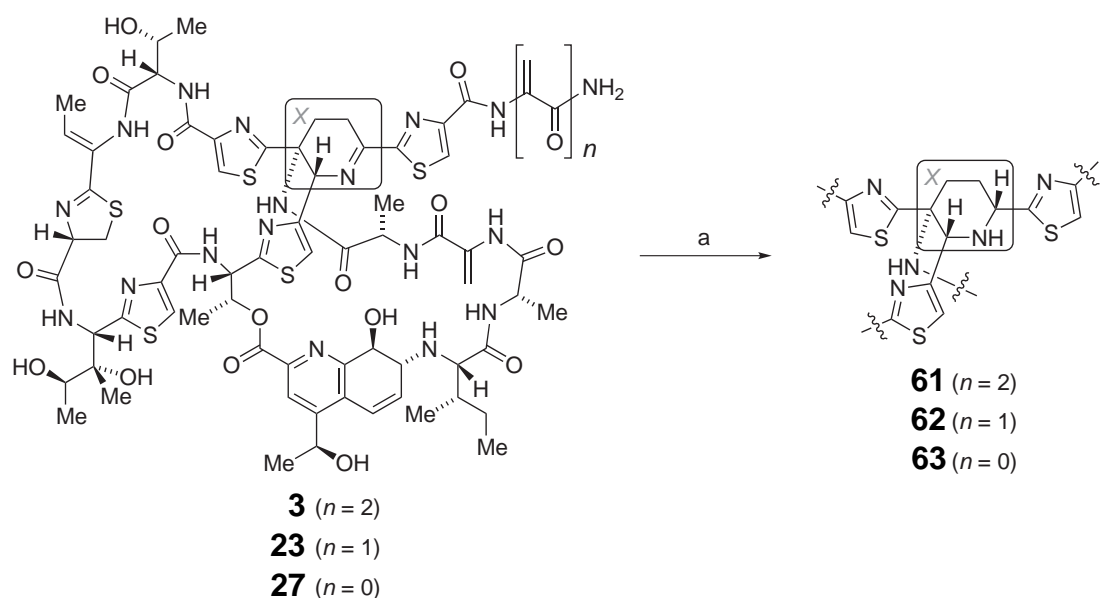
### 2.4.1. Reduktion des Dehydropiperidins der Thiostreptonderivate

Das Imin-haltige Dehydropiperidin ist im Vergleich zum vollständig reduzierten Piperidin weitaus weniger stabil. Wir suchten deshalb nach Methoden, um das Dehydropiperidin des Thiostreptons **3** selektiv zum Piperidin zu reduzieren. Dies gelang mit NaBH<sub>3</sub>CN in wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF). Ausgehend von den Thiostreptonderivaten **3**, **23** und **27** mit verschieden langen Seitenketten konnten wir die entsprechenden Derivate **61**, **62** und **63** mit reduziertem zentralem Piperidinring in guten Ausbeuten nach präparativer HPLC erhalten (Abbildung 2.15, Tabelle 2.5).

#### NMR-Analytik des reduzierten Thiostreptons **61**

Die Auswertung der NMR-Spektren des reduzierten Thiostreptons **61** ergab insgesamt eine große Ähnlichkeit mit den Spektren der Ausgangssubstanz Thiostrepton **3**. Allerdings waren deutliche Unterschiede in den Signalen des zentralen Piperidins auszumachen (Abbildung 2.16). Mithilfe von 2D-NMR (gCOSY, gHSQC, HMBC) konnten alle Pipe-

## 2.4. Transformation des Dehydropiperidins



**Schema 2.15** Reduktion des Dehydropiperidins zum Piperidin. Ausgehend von Thiostrepton **3**, einfach- (**23**) und zweifach verkürztem (**27**) Thiostrepton. Bedingungen: a)  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , THF, RT, 15 h, 29–69%.

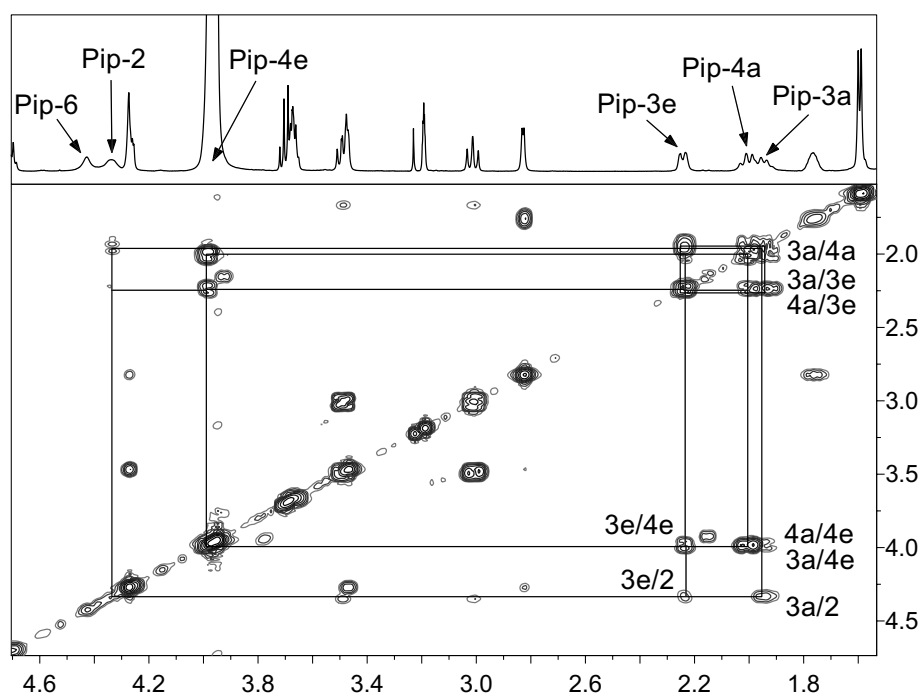
**Tab. 2.5.** Reduktion des zentralen Dehydropiperidins zum Piperidin.

Ausgangsverbindung (Dehydropiperidin)	Produkt (Piperidin)	Ausbeute [%] <sup>a</sup>
Thiostrepton <b>3</b>	<b>61</b>	69
einfach verkürztes Thiostrepton <b>23</b>	<b>62</b>	30
zweifach verkürztes Thiostrepton <b>27</b>	<b>63</b>	29

<sup>a</sup> Ausbeute nach präparativer HPLC-Aufreinigung.

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons

ridinprotonen den Signalen zugeordnet werden (Tabelle 2.6). Das durch die Reduktion des Dehydropiperidins neu hinzu kommende Proton Pip-2 trat als breites Singulett (br s) bei 4.34 ppm auf, während Pip-6 um fast 1 ppm von 5.35 ppm nach 4.43 ppm Hochfeld verschoben wurde. Die Verschiebungen der Protonen an C4 (Pip-4) verringerte sich nur geringfügig um 0.1–0.3 ppm, während die beiden Protonen an C3 (Pip-3) eine Verschiebungsänderung von 1.1–1.3 ppm (Hochfeld) erfuhren. Im Vergleich zu den Piperidin-Thiopeptiden Sch-18640 **6** und Thiopeptin A<sub>1a</sub> **60** erhielten wir speziell für den Piperidinring sehr ähnliche Verschiebungen für das reduzierte Thiostrepton **61** (Tabelle 2.6).<sup>[102,103]</sup> Dies spricht für die strukturelle Gleichheit des Piperidinring des reduzierten Thiostreptons **61** mit den zuvor beschriebenen Piperidin-Thiopeptiden.



**Abb. 2.16.** <sup>1</sup>H-gCOSY-NMR-Spektrum des reduzierten Thiostreptons **61**. Angegeben ist das Spinsystem des vollständig gesättigten Piperidinrings. »a« bezeichnet axiale Protonen, »e« steht für äquatoriale Protonen.

Die Identität des Piperidinrings erfuh durch die Auswertung der <sup>13</sup>C-Spektren weitere Bestätigung. Während das charakteristische Signal des Imin-C2-Atoms des Thiostreptons **3** (161.0 ppm) verschwindet, kommt beim reduzierten Thiostrepton **61** als neues <sup>13</sup>C-Signal das C2-Atom des gesättigten Piperidinrings hinzu (58.2 ppm, gHSQC). Diese <sup>13</sup>C-Verschiebungen sind mit den veröffentlichten Daten des Thiopeptins A<sub>1a</sub> **60**

## 2.4. Transformation des Dehydropiperidins

**Tab. 2.6.**  $^1\text{H-NMR}$  Zuordnung der Protonen des zentralen (Dehydro-)Piperidinzyklus. Die Verschiebung  $\delta$  ist in ppm, die Kopplungskonstante in Hz angegeben (in Klammern).

	<i>Dehydropiperidin</i>		<i>Piperidin</i>	
	Thiostrepton <b>3</b> <sup>[104]</sup> <sup>a</sup>	Sch-18640 <b>6</b> <sup>[103]</sup> <sup>b</sup>	Thiopeptin A <sub>1a</sub> <b>60</b> <sup>[102]</sup> <sup>c</sup>	red. Thiostrepton <b>61</b> <sup>d</sup>
Pip-2a	—	4.14 dd (2, 7)	4.46 obsc	4.34 brs
Pip-4a	2.35 dt	1.58 m	2.13 m	1.99 m
Pip-3a	~3.00 obsc	2.11 m	2.13 m	1.91 m
Pip-3e	3.53 dd (6, 19)	2.11 m	2.37 m	2.22 d (10)
Pip-4e	4.12 obsc	2.35 m	4.16 dd (3, 8)	3.99 obsc
Pip-6a	5.35 brs	4.46 brs	4.47 s	4.43 brs

<sup>a</sup> aufgenommen in MeOD/CDCl<sub>3</sub> 1:4 (25 °C).

<sup>b</sup> aufgenommen in CDCl<sub>3</sub>.

<sup>c</sup> aufgenommen in CDCl<sub>3</sub> (25 °C).

<sup>d</sup> aufgenommen in MeOD/CDCl<sub>3</sub> 1:4 (27 °C).

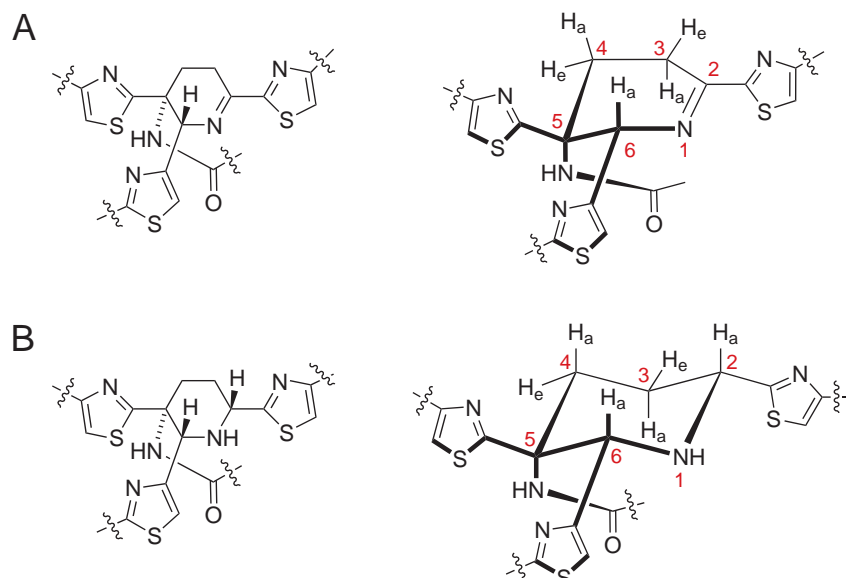
(56.8 ppm)<sup>[102]</sup> bzw. des Sch-18640 **6** (61.8 ppm)<sup>[103]</sup> vergleichbar.

Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  der Protonen des Dehydropiperidins des Thiostreptons **3** können aufgrund der benachbarten aromatischen Thiazole, deren Ringströme das effektive Magnetfeld lokal stark beeinflussen, unübliche Werte annehmen. Die Verschiebungen sind stark von der genauen Position des Protons relativ zu den benachbarten Thiazolen abhängig. Deshalb werden die Verschiebungen von der Gesamtkonformation des zentralen Heterozyklus beeinflusst. Ähnliche Verschiebungen sind umgekehrt ein wichtiger Hinweis auf die gleiche Konformation des Rings.

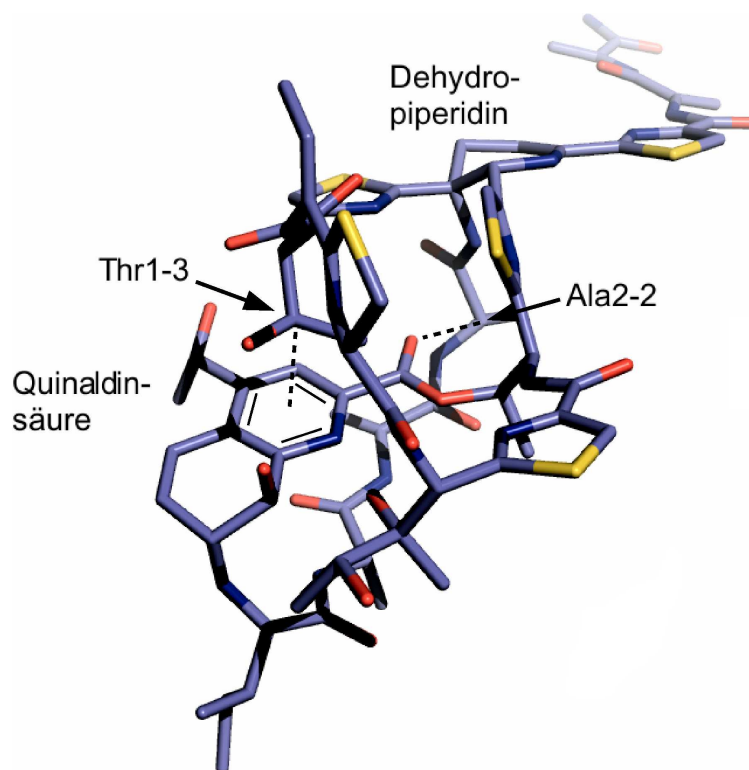
Das Dehydropiperidin des Thiostreptons **3** besitzt mit dem C2-Atom und dem N-Atom zwei  $sp^2$ -hybridisierte Atome. Ähnlich dem Cyclohexen mit ebenfalls zwei  $sp^2$ -hybridisierten Atomen nimmt das Dehydropiperidin eine Halbsesselkonformation ein, in der die Substituenten energetisch günstige äquatoriale Positionen besetzen (vgl. Abbildungen 2.17, 2.18).<sup>[104]</sup>

Die Protonen Pip2 und Pip6 besitzen sowohl bei Thiostrepton **3** als auch beim reduzierten Thiostrepton **61** jeweils fast identische Verschiebungen, so dass von der gleichen Orientierung der Thiazolsubstituenten an C2 und C6 des (Dehydro-)Piperidins ausgegangen werden kann. Hierdurch wird die Konformation und die relative Stereochemie

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons



**Abb. 2.17.** Darstellung der unterschiedlichen Konformationen des zentralen Heterozyklus. A) Halb-Sesselkonformation des Dehydropiperidins (z. B. Thiostrepton **3**, vgl. Abbildung 2.18). B) Sesselkonformation des Piperidins (z. B. reduziertes Thiostrepton **61**; Thiopeptin A<sub>1a</sub> **60**).



**Abb. 2.18.** Röntgenkristallstruktur des Thiostreptons **3** (PDB-Code: 1E9W).<sup>[105]</sup> Gut zu erkennen ist die Halbsesselkonformation des zentralen Dehydropiperidins.



des Piperidinrings definiert. Die Sesselkonformation maximiert die Zahl der äquatorialen Substituenten. Hierdurch ist die relative Stereochemie an den Positionen C5 und C6 die gleiche wie beim Dehydropiperidin des Thiostreptons **3**. Die absolute Konfiguration des Piperidinring kann in Übereinstimmung mit den bisher bekannten Piperidin-Thiopeptiden zu *2R*, *5R*, *6R* benannt werden.

Die Positionen C5 und C6 besitzen sowohl im Dehydro-, als auch im Piperidinring die gleiche Konfiguration. Durch den Übergang von der Halbsessel zur Sesselkonformation, der durch die Reduktion des Imins des Dehydropiperidins verursacht wird, kann davon ausgegangen werden, dass es nur zu geringfügigen Änderungen in der Konformation an diesen Positionen kommt. Da sowohl C5 als auch C6 in der Ausbildung des Rückgrats der bizyklischen Struktur beteiligt sind, sind nur geringe Änderungen durch die Reduktion des Dehydropiperidins an der Gesamtkonformation des Moleküls zu erwarten.

Die NMR-Spektren des Thiostreptons **3** beinhalten einige charakteristische Verschiebungen, die der rigiden Konformation und der räumlichen Nähe einiger Reste zueinander geschuldet sind. Die ungewöhnlich niedrige Verschiebung des Thr1- $\beta$ -Protons (Thr1-3) bei 1.35 ppm ist mit seiner zentralen Position oberhalb des aromatischen Pyridinrings der Chinaldinsäure (Q), d. h. in dessen abschirmenden Bereich, zu erklären (vgl. Abbildung 2.18).<sup>[104]</sup> Der Abstand zwischen dem Thr1- $\beta$ -Proton und dem Pyridinring beträgt nur 2.36 Å. Eine ähnliche Erklärung kann für die relativ hohe Verschiebung des  $\alpha$ -Protons des Alanins 2 (Ala2-2) bei 4.58 ppm gefunden werden. Sie kommt dadurch zustande, dass das Proton im entschirmenden Bereich des Carbonyls des Chinaldinsäureesters (Q) liegt (vgl. Abbildung 2.18). Wäre die Konformation des reduzierten Thiostreptons **61** sehr stark von Thiostrepton **3** abweichend, sollten sich diese strukturellen Unterschiede besonders in den Verschiebungen dieser beiden »Indikatorprotonen« niederschlagen. Jedoch liegt die Verschiebung des Thr1-3 des reduzierten Thiostreptons **61** bei 1.37 ppm bzw. des Ala2-2 bei 4.70 ppm, so wie auch die Verschiebungen aller anderer Protonen nur wenig von denen des Naturstoffs Thiostrepton **3** abweichen. Zusammengenommen sind dies starke Hinweise darauf, dass die Gesamtkonformation des reduzierten Thiostreptons **3** sich nur unwesentlich von Thiostrepton **3** unterscheidet. In NMR-Strukturberechnungen konnten wir diesen Sachverhalt später bestätigen (vgl. 3.4.1).

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons

**Tab. 2.7.** Reduktion des zentralen Dehydropiperidins zum Piperidin ausgehend von oxidierten Thiostreptonderivaten.

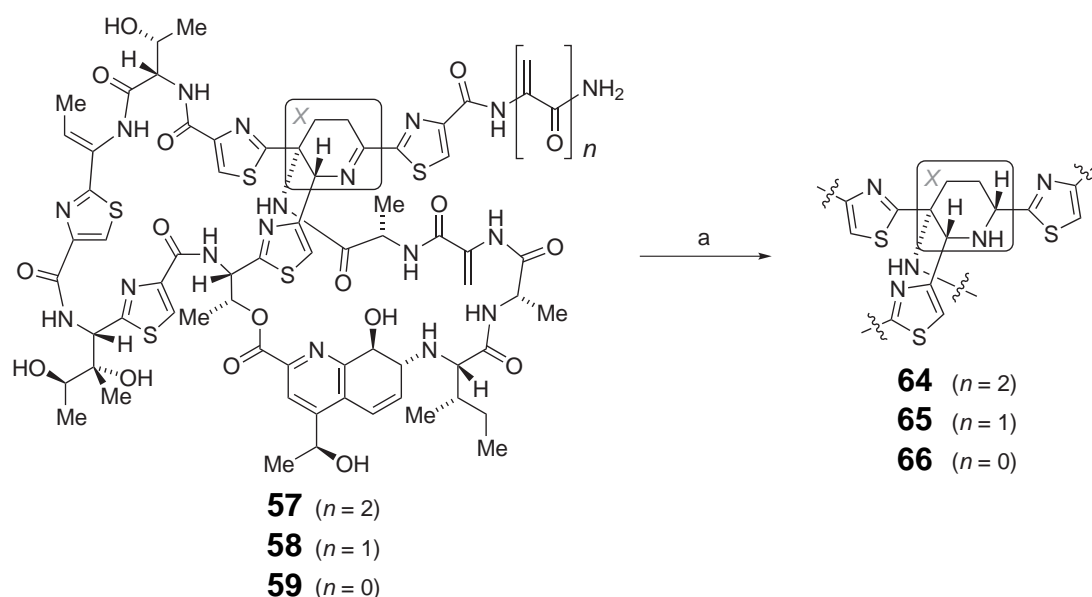
Ausgangsverbindung (Dehydropiperidin)	Produkt (Piperidin)	Ausbeute [%] <sup>a</sup>
oxidiertes Thiostrepton <b>57</b>	<b>64</b>	32
einfach verkürztes ox. Thiostrepton <b>58</b>	<b>65</b>	30
zweifach verkürztes ox. Thiostrepton <b>59</b>	<b>66</b>	29

<sup>a</sup> Ausbeute nach präparativer HPLC-Aufreinigung.

In anfänglichen Studien zur Strukturbestimmung des Thiostreptons **3** in den 1960er und 70er Jahren wurde die Reduktion der Dehydroaminosäuren des Thiostreptons mittels Natriumborhydrid beschrieben. Hierbei konnten die Dehydroalanine nach Reduktion als Alanine<sup>[106]</sup> und das Dehydrobutyrin als  $\alpha$ -Aminobuttersäure<sup>[107]</sup> nachgewiesen werden. Unter den von uns eingesetzten Reaktionsbedingungen war das jeweilige Hauptprodukt der Reduktionsreaktion jedoch das reduzierte Piperidin. Eine Ausnahme stellt allerdings das zweifach verkürzte oxidierte Thiostrepton **63** dar. Es stellte sich im Nachhinein heraus, dass auch die olefinische Funktion des Dehydrobutyrins reduziert worden war. Es wird davon ausgegangen, dass die zweifache Reduktion durch Verwenden von 2.1 Äquivalenten des Reduktionsmittels Natriumcyanoborhydrid (NaBH<sub>3</sub>CN) verursacht wurde. Weitere Untersuchungen in diese Richtung wurden bisher noch nicht verfolgt.

### 2.4.2. Reduktion des Dehydropiperidins der oxidierten Thiostreptonderivate

Die Oxidation zum Thiazol und Reduktion zum Piperidin konnte leicht kombiniert werden, um die Piperidin-Derivate **64–66** zu erhalten (Schema 2.16, Tabelle 2.7).



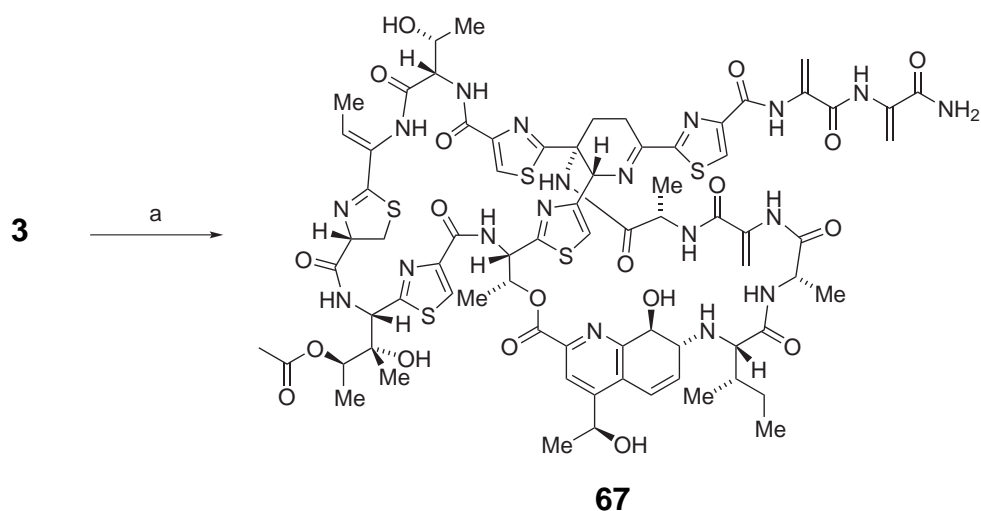
**Schema 2.16** Kombination von Oxidation und Reduktion: Reduktion des Dehydropiperidins zum Piperidin ausgehend von oxidiertem Thiostrepton **57**, oxidiertem einfach verkürztem (**58**) und oxidiertem zweifach verkürztem (**59**) Thiostrepton. Bedingungen: a)  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , THF, RT, 15 h, 29–32 %.

## 2.5. Regioselektive Acylierung

Um weitere Möglichkeiten der semisynthetischen Funktionalisierung des Thiostreptons **3** auszuloten, wendeten wir uns den Hydroxygruppen des Moleküls zu. Thiostrepton **3** besitzt vier sekundäre Hydroxygruppen (Thstn-4-OH, Thr1-3-OH, Q-11-OH, Q-8-OH) und eine tertiäre Hydroxygruppe (Thstn-3-OH), die für Acylierungsreaktionen in Frage kämen. Bisher wurden keine Untersuchungen zur Reaktivität der Hydroxygruppen des Thiostreptons **3** beschrieben.

Erste Vorversuche mit Essigsäureanhydrid verliefen viel versprechend, und mittels LCMS konnte eine monoacetylierte Hauptkomponente in der Reaktionsmischung identifiziert werden. Die anschließende Optimierung der Reaktion von Thiostrepton **3** mit Essigsäureanhydrid ergab, dass die besten Ergebnisse in trockenem Tetrahydrofuran (THF) als Lösungsmittel unter Dimethylaminopyridin-(DMAP)-Katalyse und unter Zusatz von Triethylamin ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) erhalten werden konnten. Die Reaktion führte nach Reinigung durch präparative HPLC in 33%-iger Ausbeute zum einfach acetylierten Produkt **67** (Schema 2.17). NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass die sekundäre  $\gamma$ -

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons



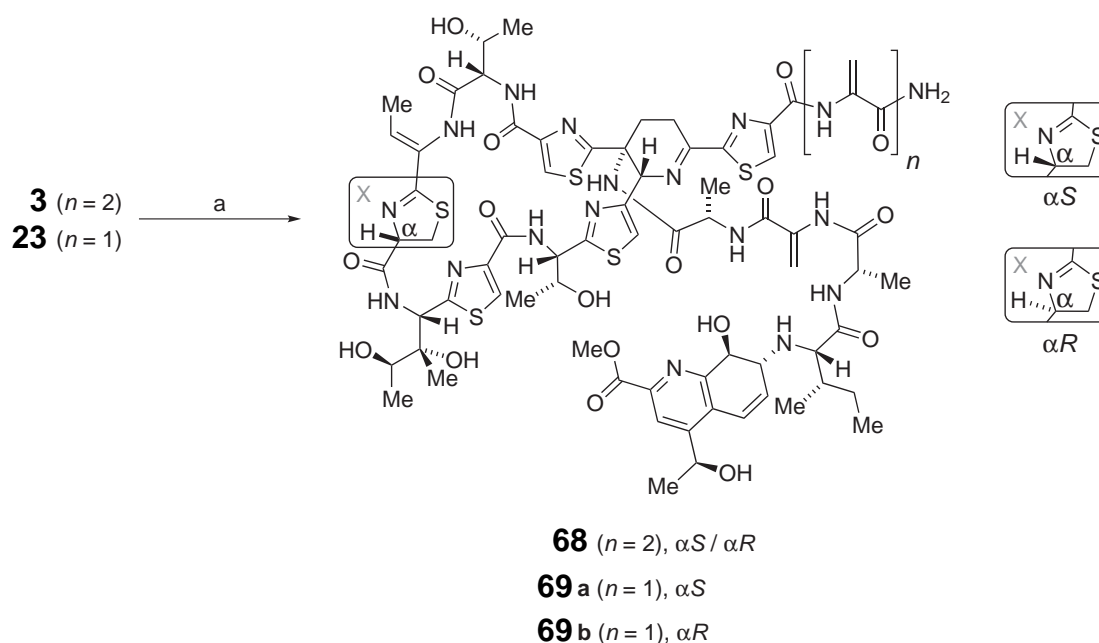
**Schema 2.17** Acetylierung der  $\gamma$ -Hydroxygruppe des Thiostreptinrests des Thiostreptons (Thstn-4-OH). Es wird das monoacetylierte Produkt **67** erhalten. Bedingungen: a) Essigsäureanhydrid, DMAP, Triethylamin, THF, RT, 33 %.

Hydroxygruppe des Thiostreptinrests (Thstn-4-OH) selektiv acetyliert wird. Es wurden keine Hinweis dafür gefunden, dass andere Hydroxygruppen mit Essigsäureanhydrid unter diesen Bedingungen in größerem Maßstab reagierten.

Die  $\gamma$ -Hydroxygruppe des Thiostreptinrests ist in der dreidimensionalen Struktur des Thiostreptons **3** relativ gut zugänglich und erscheint wenig sterisch anspruchsvoll. Vermutlich sind so auch Derivatisierungen mit anderen Säureresten leicht möglich. Interessanterweise besitzen manche Thiopeptide wie beispielsweise die dem Nosiheptid verwandten Nocathiacine genau an dieser Aminosäureposition im A-Ring glykosidische Modifizierungen der  $\gamma$ -Hydroxygruppe (vgl. Kapitel 1). In Hinblick auf die biologische Aktivität der acylierten Derivate stellt diese Position deshalb eine sehr interessante Position dar, um weitere SAR-Untersuchungen (*structure-activity relationship*) durchführen zu können.

### 2.6. Hydrolyse des B-Ring-Lactons

Thiopeptide der Serien *a*, *b* und *c* (Thiopeptide mit zentralem Piperidin-/Dehydropiperidinring)<sup>[26]</sup> zeichnen sich durch das Vorhandensein eines B-Ring-Lactons aus, das den Thr2-Rest des A-Rings mit dem zentralen Piperidinring verknüpft (Abbildung 2.1). Das

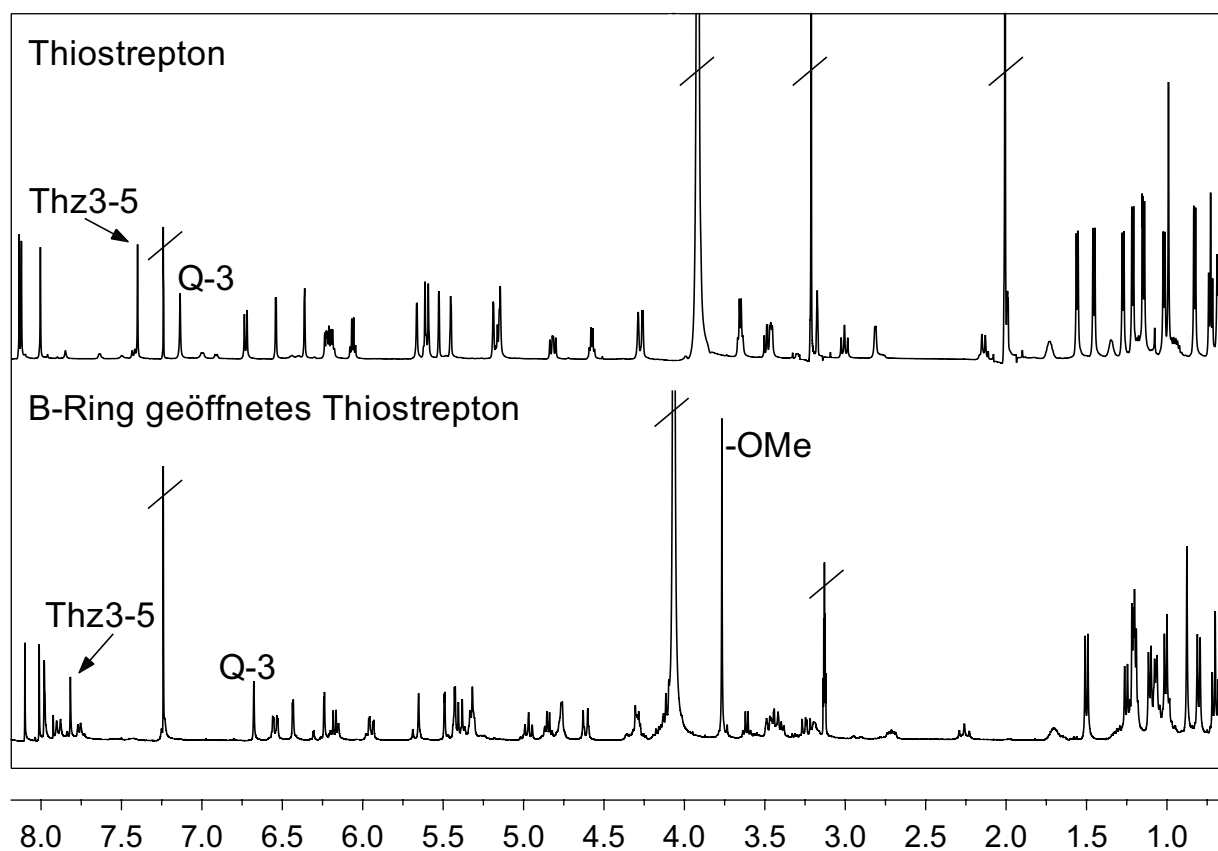


**Schema 2.18** Hydrolyse des B-Ring-Lactons ausgehend von ThioStrepton **3** bzw. einfach verkürztem ThioStrepton **23**. Für ThioStrepton **3** wurde das Epimergemisch **68** erhalten, während für das einfach verkürzte ThioStrepton **23** die beiden Epimere getrennt werden konnten (**69a** und **69b**). Bedingungen: a) NaOMe, MeOH/CHCl<sub>3</sub> (2:1) [MeOH/THF (8:3) für **23**], 0 °C → RT, 6–8 h, 11 % **68**, 4 % **69a**, 4 % **69b**.

Thr2 ist hierbei über die  $\beta$ -Hydroxygruppe mit der Chinaldinsäure (Q) verestert. Um ein eingehenderes Verständnis über den Einfluss des B-Rings auf die Gesamtkonformation des ThioStreptons **3** und davon abhängig auf die biologische Wirkung zu erlangen, suchten wir nach Methoden das B-Ring-Lacton selektiv zu hydrolysieren. Dazu wurde die aus der Kohlenhydratchemie bekannte Hydrolyse von Actetylschutzgruppen unter Zemplén-Bedingungen<sup>[108]</sup> eingesetzt.

Die Hydrolyse des B-Ring-Lactons bei ThioStrepton **3** konnte mit Natriummethanolat in 11 % Ausbeute nach 6 h realisiert werden (Schema 2.18). Die geringe Ausbeute ist auf unvollständigen Umsatz zurückzuführen. Durch Zugabe von mehr Natriummethanolat wurden jedoch vermehrt Abbauprodukte beobachtet. Das zugehörige <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zeigte das Auftreten eines charakteristischen Methylester-Singulets bei  $\delta = 3.77$  ppm. Manche Protonen, die räumlich in der Nähe des hydrolysierten Lactons liegen, erfuhren teilweise deutliche Verschiebungsänderungen: Das Proton 3 der Chinaldinsäure (Q-3) wird beispielsweise um 0.46 ppm Tieffeld verschoben, während das Proton 5

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons



**Abb. 2.19.** Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren des B-Ring-Lacton hydrolysierten Thiostreptons **68** mit Thiostrepton **3**. Deutlich ist das Singulettsignal bei 3.77 ppm des entstandenen Methylesters (-OMe) zu erkennen. Umliegende Protonen erfahren teilweise deutliche Verschiebungsänderungen. Das Proton Q-3 wird z. B. um 0.46 ppm Tieffeld, das Proton Thz4-5 um 0.42 ppm Hochfeld verschoben.

des Thiazolins 4 (Thz4-5) um 0.42 ppm Hochfeld verschoben auftritt (Abbildung 2.19). Für das einfach verkürzte Thiostrepton **23** konnte sogar eine Trennung der beiden Thiazolin-Epimere durch präparative HPLC zu jeweils 4% Ausbeute (1:1) erreicht werden. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration des Thiazolins der beiden Epimere wird in Kapitel 5 beschrieben.

## 2.7. Synthese funktionstragender Derivate des Thiostreptons

In der Chemischen Biologie sind funktionstragende Derivate eines Naturstoffs sehr nützlich, um die biologischen Eigenschaften des Ausgangs-Naturstoffs näher zu untersuchen. Beispielsweise können Naturstoffe mit fluoreszenten Reportergruppen ausgestattet werden, die mikroskopische oder auch biophysikalische Untersuchungen ermöglichen.<sup>[25,109]</sup> Weiterhin können Naturstoffe mit Gruppen versehen werden, die hohe spezifische Bindungsaffinität für ein bestimmtes Makromolekül (z.B. Antikörper) vermitteln. Diese Strategie kann zur Anreicherung eines Bindungspartners des Naturstoffs genutzt werden, bzw. zur erleichterten Detektion des Naturstoffs in komplexer Matrix. Strukturell setzt sich ein solches Naturstoffkonjugat üblicherweise aus dem Naturstoff selbst, einer funktionalen Reportergruppe (*Label*), und einer Verbindungseinheit (*Linker*) zusammen, die beide miteinander verknüpft. Die Reportergruppe und die Verbindungseinheit müssen in der Art gewählt werden, dass sie nur einen geringen Einfluss auf die nativen biochemischen Eigenschaften des Naturstoffs haben.

### 2.7.1. Fluoreszente Thiostreptonsonden

Der Zugang zu fluoreszente Thiostrepton würde beispielsweise Mikroskopieuntersuchungen zur subzellulären Lokalisierung des Thiostreptons **3** ermöglichen, um Aussagen über den zellulären Wirkort treffen zu können. Darüberhinaus könnten mittels Fluoreszenzpolarisation biochemische Bindungsstudien an Makromolekülen durchgeführt werden und der Einfluss von Modifikationen des Thiostreptongerüsts auf die Bindungseigenschaften untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene fluoreszente Thiostreptonsonden synthetisiert, die sich in der Art und Größe der Verbindungseinheit unterscheiden. Der Polyethylenglykol-*Linker* wurde zunächst gewählt, da er eine höhere Wasserlöslichkeit vermittelt und durch seine Flexibilität genügend Distanz zum Bindemolekül ermöglichen sollte. Beide Thiostreptonsonden enthalten Fluorescein als Reportergruppe. Die Anwendung der fluoreszenten Thiostreptonsonden in biochemischen und biophysikalischen

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons

---

Untersuchungen wird in den Kapiteln 3 und 4 beschrieben.

### **Synthese der PEG-Fluorescein-Thiostreptonsonde (74)**

S-Tr-1-Mercaptopropionsäure **70** wurde mit Polyethylenglykoldiamin **71** (4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin) gekuppelt und das Amid **72** mittels 5(6)-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) in den Thioharnstoff **73** überführt (Schema 2.19). Die Michael-Addition dieses Fluorescein-Konjugats **73** an einfach verkürztes Thiostrepton **23** erfolgte unter den üblichen Bedingungen (vgl. Kapitel 2.2.5) nach *in situ* S-Tr-Entschützung mittels Trifluoressigsäure (TFA). Die PEG-Fluorescein-Thiostreptonsonde **74** wurde in 32%iger Ausbeute erhalten.

### **Synthese der kurzen Fluorescein-Thiostreptonsonde (78)**

Cysteamin **75** wurde S-trityliert und mit Fluoresceinisothiocyanat zu Thioharnstoff **77** umgesetzt (Schema 2.20). Die Michael-Addition dieses Fluorescein-Konjugats **77** an einfach verkürztes Thiostrepton **23** erfolgte anschließend unter den üblichen Bedingungen (vgl. Kapitel 2.2.5) nach *in situ* S-Tr-Entschützung mittels Trifluoressigsäure (TFA). Die kurze Fluorescein-Thiostreptonsonde **78** wurde in 22%iger Ausbeute erhalten.

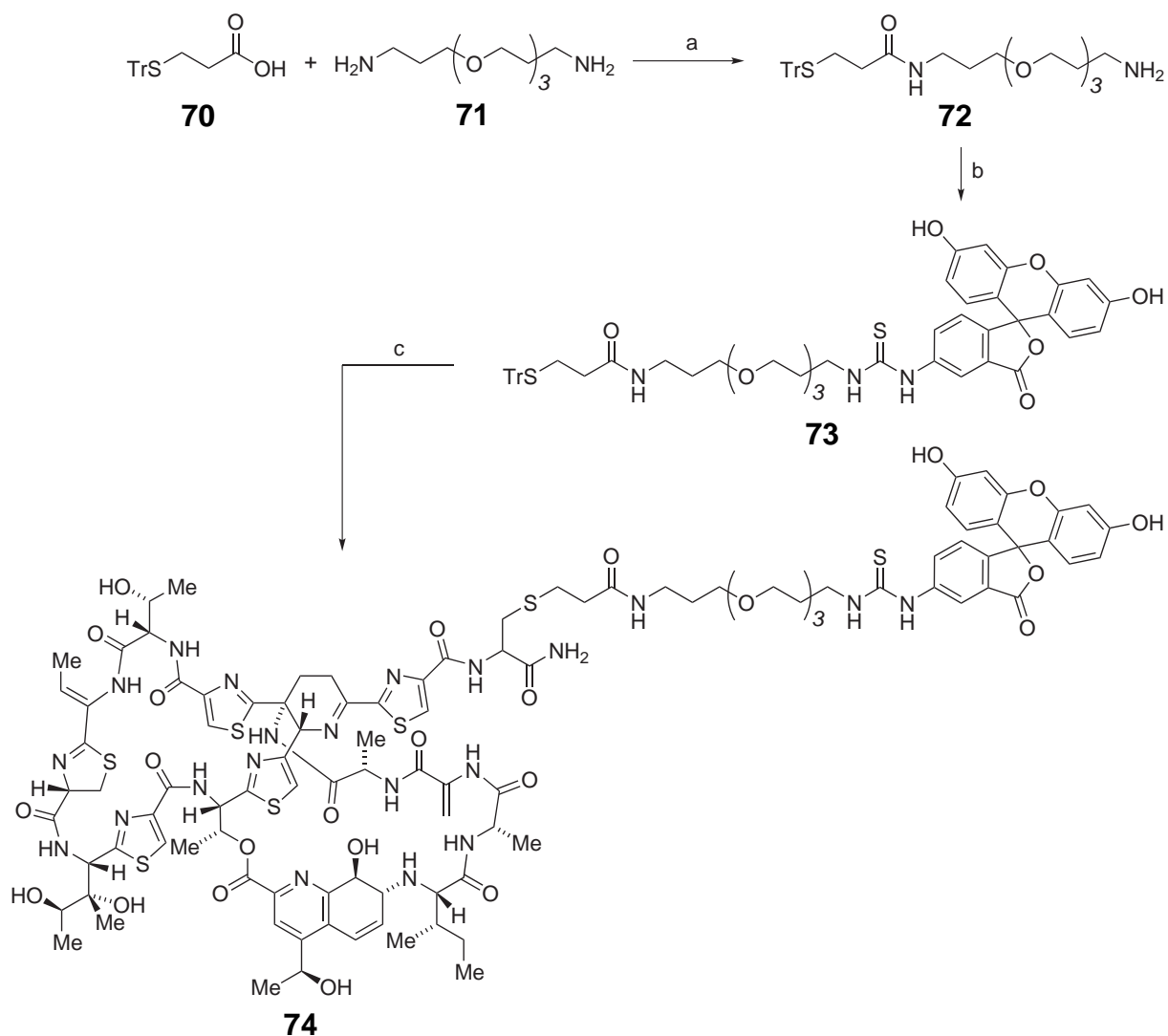
### **2.7.2. Biotin-Thiostreptonsonde**

Ein Biotin-Konjugat des Thiostreptons würde es ermöglichen, Thiostrepton **3** auf stationärem Träger zu immobilisieren und die Bindungspartner des Naturstoffs anzureichern und zu identifizieren (*pull-down* Experimente, Kapitel 2.7.2).<sup>[24]</sup> Hierbei könnte die starke Affinität des Proteins Streptavidin an das Biotin genutzt werden. Darüber hinaus ließe sich mittels Biotin-spezifischer Antikörper mikroskopische Anfärbungen von Zellen realisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Thiostreptonsonde synthetisiert, die anstelle einer fluoreszenten Reportergruppe ein Biotin am PEG-Linker trägt. Der Linker wurde bewusst gewählt, um ausreichend räumlichen Abstand zwischen dem Biotin-bindenden Makromolekül und den Bindungspartnern des Thiostreptons zu ermöglichen. Außerdem

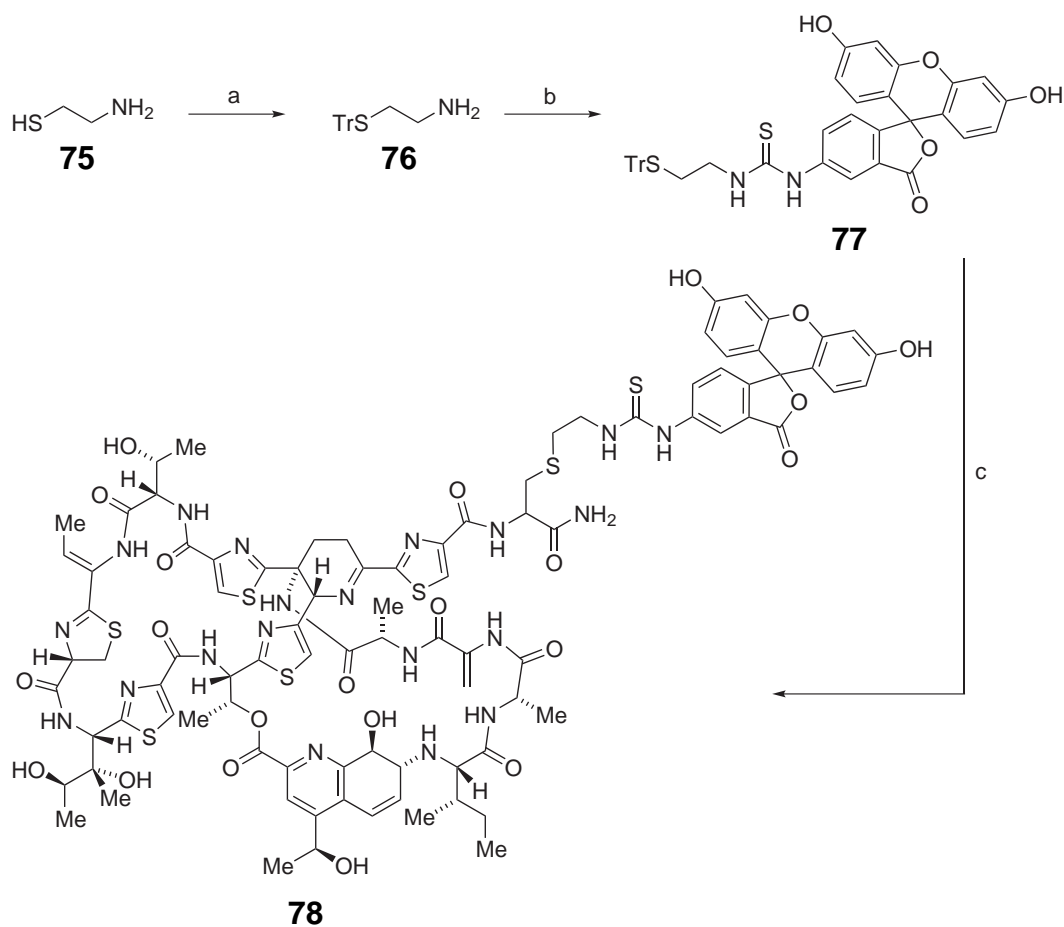


## 2.7. Synthese funktionstragender Derivate des Thiostreptons



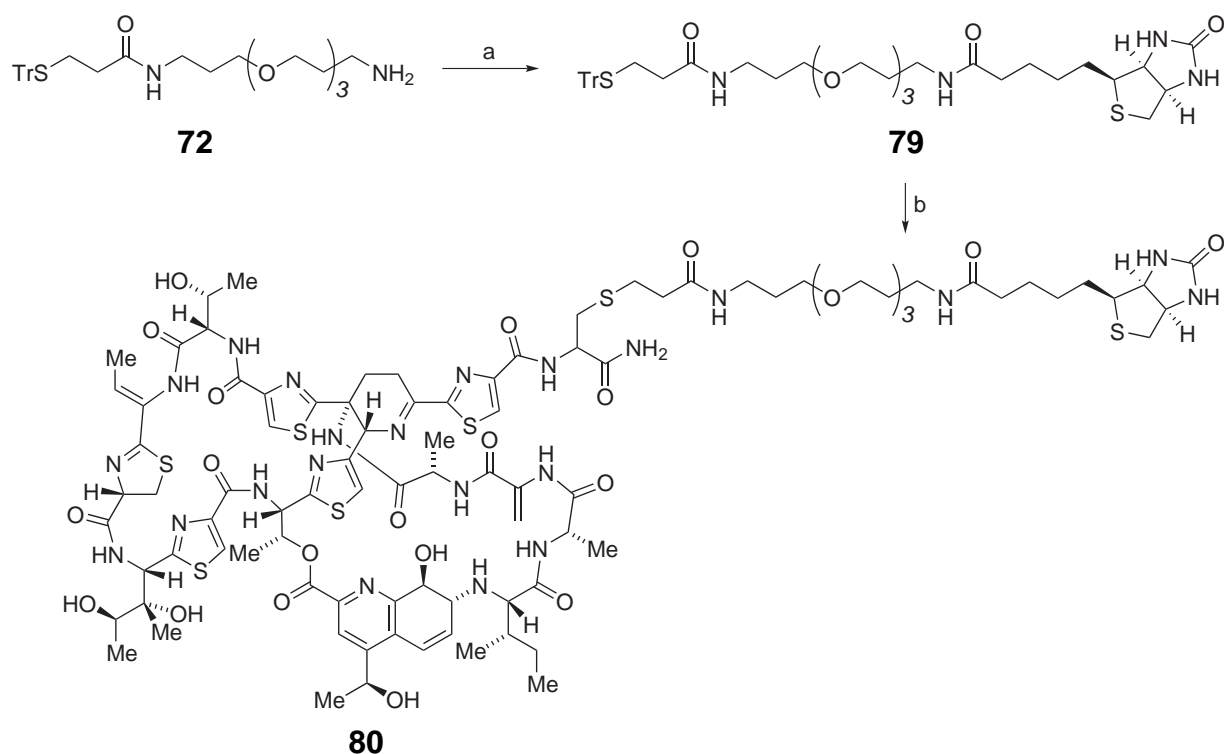
**Schema 2.19** Synthese der PEG-Fluorescein-Thiostreptonsonde **74**. Bedingungen: a) HBTU, DIPEA, DMF, 0 °C → RT, 14 h, 54 %. b) 5(6)-Fluoresceinisothiocyanat (FITC), DIPEA, Aceton/CHCl<sub>3</sub> (2:1), RT, 16 h, 45 %. c) i. 7 % TFA/CHCl<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>SiH, RT, 20 min, quant.; ii. **23**, TFE/H<sub>2</sub>O (3:1) pH 9, Et<sub>3</sub>N, RT, 16 h, 32 %.

## 2. Semisynthetische Derivatisierung des Thiostreptons



**Schema 2.20** Synthese der kurzen Fluorescein-Thiostreptonsonde **78**. Bedingungen: a) Tr-Cl, TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 20 h, 30%. b) 5(6)-Fluoresceinisothiocyanat (FITC), DIPEA, Aceton/CHCl<sub>3</sub> (9:5), RT, 42 h, 70%. c) i. TFA, Et<sub>3</sub>SiH, RT, 20 min, quant.; ii. **23**, TFE/H<sub>2</sub>O (4:1) pH 9, Et<sub>3</sub>N, RT, 16 h, 22%.

## 2.7. Synthese funktionstragender Derivate des Thiostreptons



**Schema 2.21** Synthese der Biotin-Thiostreptonsonde **80**. Bedingungen: a) Biotin-4-Nitrophenylester, HOBT, DIPEA, DMF, RT, 8 h, 81 %. b) i. TFA, Et<sub>3</sub>SiH, RT, 20 min, quant.; ii. **23**, TFE/H<sub>2</sub>O (4:1) pH9, Et<sub>3</sub>N, RT, 16 h, 24 %.

erleichtert die Flexibilität des PEG-Linkers die Einstellung der optimalen Bindegeometrie sowohl des Thiostreptons als auch des Biotins relativ zu den Makromolekülen. Die Anwendung der Biotin-Thiostreptonsonde **80** wird in Kapitel 4 beschrieben.

### Synthese der Biotin-Thiostreptonsonde (**80**)

Amin **72** wurde mit (+)-Biotin-4-Nitrophenylester zum Biotin-PEG-Konjugat **79** acyliert (Schema 2.21). Die Michael-Addition an einfach verkürztes Thiostrepton **23** erfolgte anschließend unter den üblichen Bedingungen (vgl. Kapitel 2.2.5) nach *in situ* S-Tr-Entschützung mittels Trifluoressigsäure (TFA). Die Biotin-Thiostreptonsonde **80** wurde in 24%iger Ausbeute erhalten.



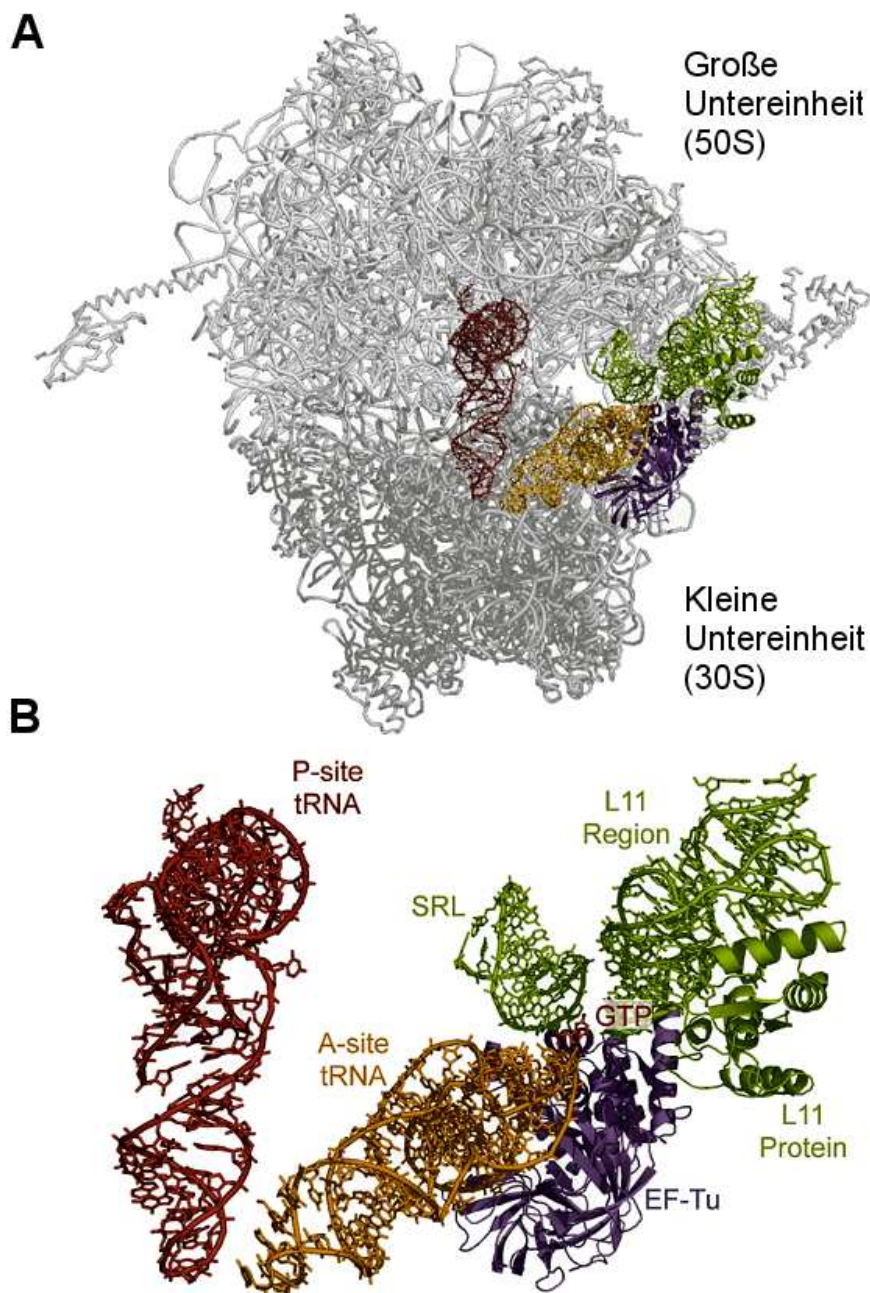
### **3. Wirkort: Ribosom**

## 3.1. Einleitung

Das Ribosom als Protein-synthetisierende Einheit stellt einen der wichtigsten Angriffspunkte der Antibiotika innerhalb der Zelle dar. Durch die großen Fortschritte der Strukturbio­logie in den letzten Jahren, die die Untersuchung von großen ribosomalen Kom­ponenten erst ermöglichten, sind heute die molekularen Details der Bindung wichtiger Antibiotika an das prokaryotische Ribosom bekannt.<sup>[110]</sup> Neben ihrer Anwendung in der Therapie werden Antibiotika häufig eingesetzt, um die Arbeitsweise des Ribosoms näher zu verstehen, beispielsweise um das Ribosom für Strukturuntersuchungen in einem bestimmt Zustand zu verriegeln.<sup>[111,112]</sup> Überraschend ist die Erkenntnis, dass die meisten Antibiotika vorrangig mit rRNA-Komponenten des Ribosoms interagieren.<sup>[40]</sup> Trotz der strukturellen Komplexität und Größe des Ribosoms können einige wenige *Hotspots* ausgemacht werden, die bevorzugt als Bindestelle einer Vielzahl von Antibiotika verschiedener Klassen dienen. Am häufigsten wird das «aktive Zentrum» des Ribosoms mit seiner Deokodierstelle (*decoding site*) in der 30 S-Untereinheit und des Peptidyltransferase-Zentrums der 50 S-Untereinheit adressiert.

### Die GTPase-assoziierte Region des Ribosoms

Eine weitere wichtige Region für die Funktionsfähigkeit des Ribosoms stellt die Faktoren-Bindestelle dar, die auch als GTPase-assoziierte Region bezeichnet wird (Abbildung 3.1).<sup>[113,114]</sup> An dieser Stelle binden verschiedene Translationsfaktoren während der unterschiedlichen Phasen des Translationszyklus. Die meisten Faktoren besitzen GTPase-Aktivität, die durch die Wechselwirkung mit der Bindestelle am Ribosom stimuliert wird. Durch die GTP-Hydrolyse werden globale konformationelle Änderungen der Ribosomenstruktur eingeleitet und der Translationszyklus synchronisiert. Interessanterweise zeichnet sich die GTPase-assoziierte Region des Ribosoms durch einen besonders hohen Anteil an ribosomalen Proteinen aus. Eine wichtige funktionale Einheit des Zentrums ist die sog. *Stalk Base*, die die 23 S rRNA mit den Helices H43/H44 und das daran gebundene ribosomale Protein L11 umfasst.



**Abb. 3.1.** Strukturmodell des Ribosoms. A) Ansicht des Gesamt-70S-Ribosoms mit Position der GTPase-assoziierten Region. Hellgrau: große Untereinheit (50 S), dunkelgrau: kleine Untereinheit (30 S), grün: GTPase-assoziierte Region, rot: P-site RNA, gold: A-site RNA, violett: EF-Tu. B) Vergrößerte Ansicht der GTPase-assoziierten Region. Die Positionierung des L11-Proteins in Komplex mit der 23S rRNA und einem gebundenen EF-Tu/tRNA-Komplex ist angegeben. Adaptiert nach Chu *et al.*<sup>[113]</sup>.

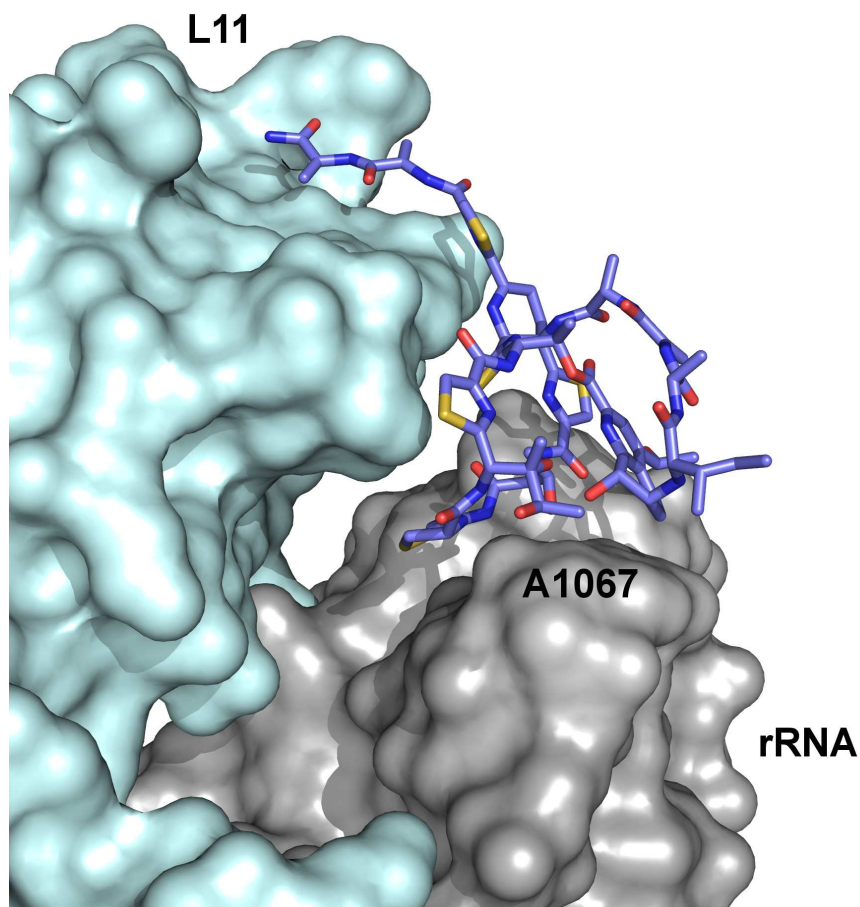
#### **Die Bindung des Thiostreptons an das Ribosom**

Einige Vertreter der Gruppe der Thiopeptide nutzen die *Stalk Base* des Ribosoms als Bindestelle, wobei sie – für ribosomal bindende Antibiotika eher unüblich – sowohl mit rRNA-, als auch mit Protein-Komponenten interagieren.<sup>[110]</sup> Am besten charakterisiert ist die Bindung des Thiostreptons **3** an die ribosomale Bindestelle (Abbildung 3.2). Der Komplex aus L11-Protein/rRNA zeigt eine kooperative Bindung, die sich dadurch auszeichnet, dass Thiostrepton weder freies L11-Protein<sup>[115]</sup>, noch 23S rRNA bindet.<sup>[116]</sup> Beide zusammen bilden jedoch eine Binderegion für Thiostrepton, an die das Thiopeptid mit Dissoziationskonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich bindet. Resistenzen gegen Thiostrepton und verwandte Thiopeptide sind vor allem für die Nukleotide A1067 und A1095 (*E. coli*-Nummerierung) der 23S rRNA beschrieben, mit denen Thiostrepton in gebundenem Zustand besonders stark interagiert (Kapitel 3.5.1).<sup>[117]</sup> Die Region um das Nukleotid A1067 der *Stalk Base* ist allgemein sehr wichtig für Bindungs- und Erkennungsaktivitäten des Ribosoms.<sup>[114]</sup> Hier binden beispielsweise die Translationfaktoren EF-G oder EF-Tu, die komplexe dynamische Konformationsänderungen bewirken und den Translationszyklus aufrecht erhalten. Eine Besonderheit der Thiopeptidbindung verglichen mit üblichen Antibiotika besteht in der Größe und Komplexität der Moleküle. Hieraus resultiert, dass die Bindung des Moleküls nicht in einer engen Kavität des Makromoleküls stattfindet, sondern dass sie vielmehr als ein «Abtasten» einer makromolekularen Oberfläche verstanden werden kann. Hinzu kommt die bereits erwähnte Besonderheit, dass die Thiopeptide sowohl mit der rRNA, als auch mit Proteinkomponenten wechselwirken.

#### **Unterschiede zwischen Thiostrepton und Micrococcin in der Bindung ans Ribosom**

Zwischen den beiden Thiopeptiden Thiostrepton **3** und Micrococcin **7** wurden Unterschiede in den biochemischen Effekten, die eine Inhibierung des Ribosoms mit den beiden Molekülen nach sich ziehen, beschrieben: Thiostrepton **3** vermindert die Translationfaktor EF-G-katalysierte GTP-Hydrolyse und verhindert die Bewegung der tRNAs an den A- und P-Stellen (*PRE-state*) zu den P- und E-Stellen (*POST-state*).<sup>[113,118]</sup> Im Unter-





**Abb. 3.2.** Kristallstruktur des Thiostreptons **3** gebunden an die GTPase-assoziierte Region des *Deinococcus radiodurans* Ribosoms bei 3–4 Å Auflösung (pdb:3df5).<sup>[30]</sup> L11-Protein (cyan), 23 S rRNA (grau), Thiostrepton (blau). Die Position des wichtigen Nukleotids A1067 ist angegeben.

### 3. Wirkort: Ribosom

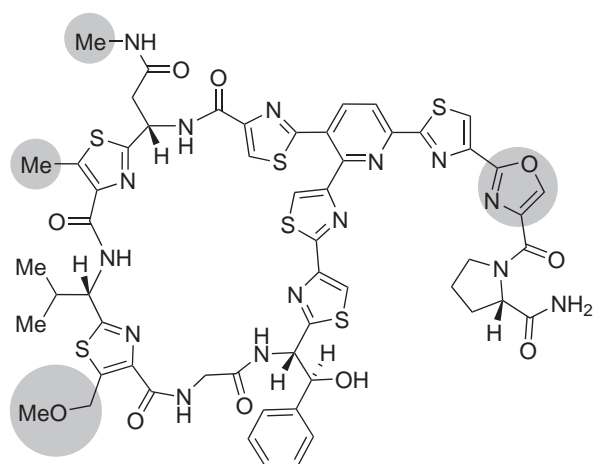
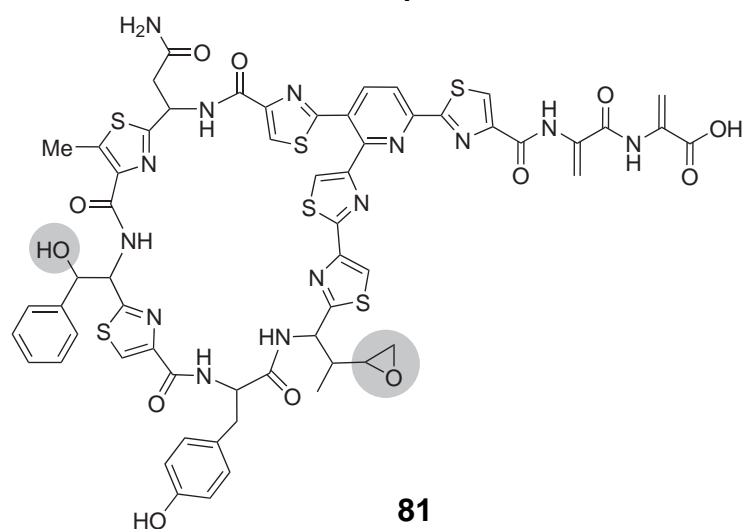
---

schied hierzu stimuliert Micrococcin die GTPase-Aktivität des EF-G.<sup>[119]</sup> Die Diskrepanz in der Wirkung bei gleicher Bindestelle ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. In den letzten Jahren kristallisiert sich jedoch ein Grund für das unterschiedliche Verhalten heraus. Es werden (mindestens) zwei verschiedene Bindemodi der Thiopeptide an die Thiopeptid-Bindestelle postuliert, die Konsequenzen für die weitere Dynamik des Ribosoms haben.<sup>[30]</sup> Im Verlauf dieser Arbeit wurden von Fucini *et al.* Kristallstrukturen der Bindung der Thiopeptide Thiostrepton **3**, Nosiheptid **5** und Micrococcin **7** an die große Untereinheit des *Deinococcus radiodurans* Ribosoms veröffentlicht (Abbildung 3.2).<sup>[30]</sup> Sie lieferten neben einer groben Auflösung der Thiopeptidbindung einige strukturelle Erklärungsansätze für die beiden Bindemodi der Thiopeptide und deren Auswirkungen auf das Ribosom.

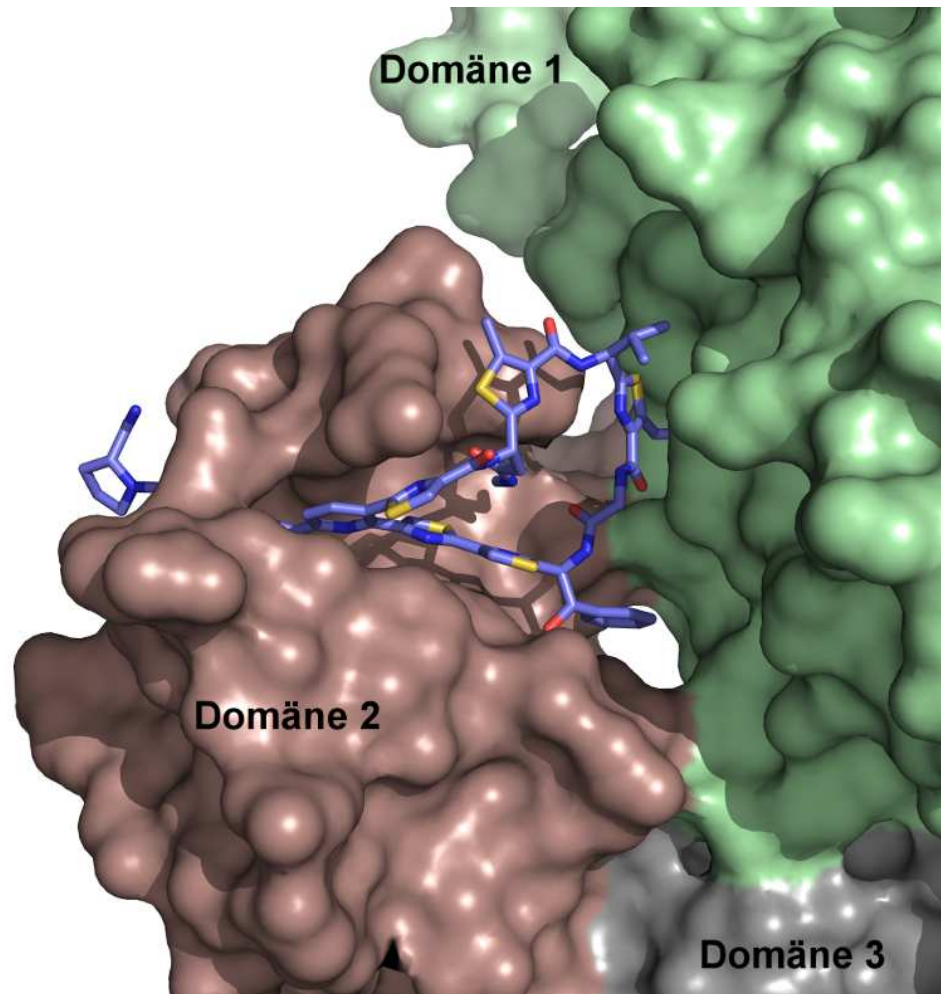
#### **EF-Tu als Zielkomponente des Thiopeptids GE2270**

Während die «gängigen» Thiopeptide Thiostrepton **3**, Nosiheptid **5**, Micrococcin **7** und Nocathiacin **8** an die GTPase-assoziierte Region des Ribosoms binden, gibt es eine zweite Klasse Thiopeptide, die mit dem Elongationsfaktor EF-Tu wechselwirken.<sup>[26]</sup> Hierzu gehören beispielsweise die Moleküle GE2270A **4** und Vertreter der Gruppe der Thiomuracine.<sup>[120,121]</sup> Beide bestehen aus einem 29-Atomigen großen Makrozyklus (Thiostrepton **3**: 26 Atome (A-Ring)), der von einem zentralen Pyridinring (Serie *d*) geschlossen wird (Abbildung 3.3). Der Elongationsfaktor EF-Tu ist eine essentielle Komponente der bakteriellen Proteinbiosynthese. EF-Tu besitzt GTPase-Aktivität und liefert im GTP-gebundenen Zustand eine Aminosäure-tRNA zum Ribosom.

GE2270 **4** bindet hauptsächlich an die Domäne 2 des Proteins EF-Tu, wobei die Seitenkette des Thiopeptids in einer Kavität-ähnlichen Region der Domäne 2 zu liegen kommt (Abbildung 3.4).<sup>[120]</sup> Der Makrozyklus des Moleküls hingegen bindet an der Kontaktfläche zwischen den Domänen 1 und 2 des Proteins. Diese Region erfährt während des Katalysezyklus der GTPase große strukturelle Umordnungen zwischen den Domänen. GE2270A besetzt teilweise die Bindestelle der 3'-Aminoacylgruppe der tRNA am Protein, so dass die Assoziation des Faktors mit der tRNA unterbunden wird. Darüber hinaus beeinträchtigt GE2270A durch Binden in der Kontaktregion der Domänen die für den

**4****81**

**Abb. 3.3.** Strukturen der Pyridin-Thiopeptide (Serie *d*)<sup>[26]</sup> GE2270A **4** und Thiomuracin A **81**. Für Thiomuracin wurde bisher keine stereochemische Zuordnung veröffentlicht.<sup>[121]</sup> Die für die strukturelle Variabilität innerhalb der Familie verantwortlichen Positionen sind gekennzeichnet.



**Abb. 3.4.** Kristallstruktur des *Thermus thermophilus* GE2270A-EF-Tu-GDPNP-Komplexes bei 1.6 Å Auflösung (pdb:2c77).<sup>[120]</sup>

Katalysezyklus essentiellen Domänen-Bewegungen des Enzyms.

Das Molekül GE2270A knüpft 4–5 Wasserstoffbrückenbindungen zu EF-Tu, hierunter fallen z. B. das Oxazolin der Seitenkette und die  $\beta$ -Hydroxylgruppe des Phenylserins. Insgesamt bestehen enge Kontakte zwischen GE2270A und dem Protein, so dass die durch das Binden des GE2270A für Wassermoleküle nicht mehr zugängliche Fläche (*buried space*) 1493–1935 Å<sup>2</sup> beträgt (je nachdem, ob als Substrat GDP bzw. GDPNP gebunden ist).<sup>[120]</sup> Im Vergleich hierzu wechselwirkt beim Thiostrepton vor allem der A-Ring und die Seitenkette mit der rRNA bzw. dem Protein, während große Partien des B-Rings wahrscheinlich nicht mit dem makromolekularen Komplex interagieren (Abbildung 3.2).<sup>[30]</sup> Darüber hinaus scheint die Seitenkette des Thiostreptons eine relativ große Oberfläche

auf dem L11-Protein abzutasten. Die für Wassermoleküle nicht mehr zugängliche Fläche beträgt durch Binden des Thiostreptons nur  $620 \text{ \AA}^2$ .<sup>[30]</sup> Allerdings muss beachtet werden, dass die zum heutigen Zeitpunkt vorhandenen Kristallstrukturen der Thiostreptonbindung keine detaillierten Aussagen über die atomaren Interaktionen erlauben, so dass ein Vergleich der Bindungsparameter beider Moleküle sehr schwierig ist.

### 3.2. PICC: Proximity Induced Covalent Capture

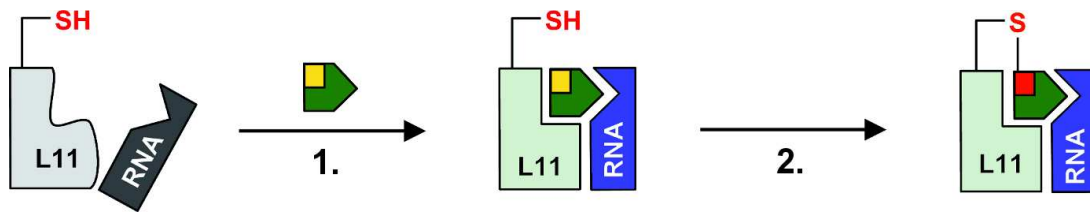
Um nähere Informationen bezüglich der Bindungsgeometrie der Thiopeptide an das ribosomale *Target* zu erhalten, wurde in der Arbeitsgruppe eine Variante des *Covalent Capture*<sup>[122]</sup> entwickelt, die wir PICC (*Proximity Induced Covalent Capture*) nannten.<sup>[123]</sup> Die Thiopeptide eignen sich aufgrund ihrer inherenten Michael-Additions-Reaktivität in Form ihrer Dehydroalanine besonders für diese Methode. Wie in der Semisynthese der Thiostrepton-Derivate ausgiebig ausgenutzt, reagieren die elektrophilen Dehydroalanine besonders leicht mit freien Thiolen (Kapitel 2). Die Bindung der Thiopeptide an ihre ribosomale Bindungsstelle wird durch besonders hohe Affinitäten der kleinen Moleküle an den dimeren Komplex charakterisiert, so dass wir die Methode des *Covalent Capture* erfolgreich einsetzen konnten, obwohl zur erfolgreichen Bindung insgesamt ein ternärer Komplex gebildet werden muss.

#### 3.2.1. Konzept des PICC

Abbildung 3.5 zeigt das generelle Konzept des PICC am ternären Komplex aus L11-Protein/23S-rRNA/Thiopeptid. In einem ersten Schritt bindet das kleine Molekül an die Bindestelle des von Protein und RNA gebildeten dimeren Komplexes. Auf dieser Stufe finden eventuelle strukturelle Anpassungen bzw. Umordnungen statt, die eine höhere Affinität des kleinen Moleküls zum Komplex bedingen (*Induced Fit*).<sup>[124,125]</sup> Ein bereits vorhandenes bzw. künstlich durch Mutagenese eingebrachtes Thiol einer Cys-Seitenkette, das sich in räumlicher Nähe zu einem elektrophilen Dehydroalanin des kleinen Moleküls befindet, könnte im nächsten Schritt mit einem Dehydroalanin in einer Michael-Additionsreaktion reagieren. Anschließend kann das kovalente Additionsprodukt mittels proteinchemi-

### 3. Wirkort: Ribosom

scher Methoden identifiziert werden (z. B. MALDI-MS, SDS-Gelelektrophorese).

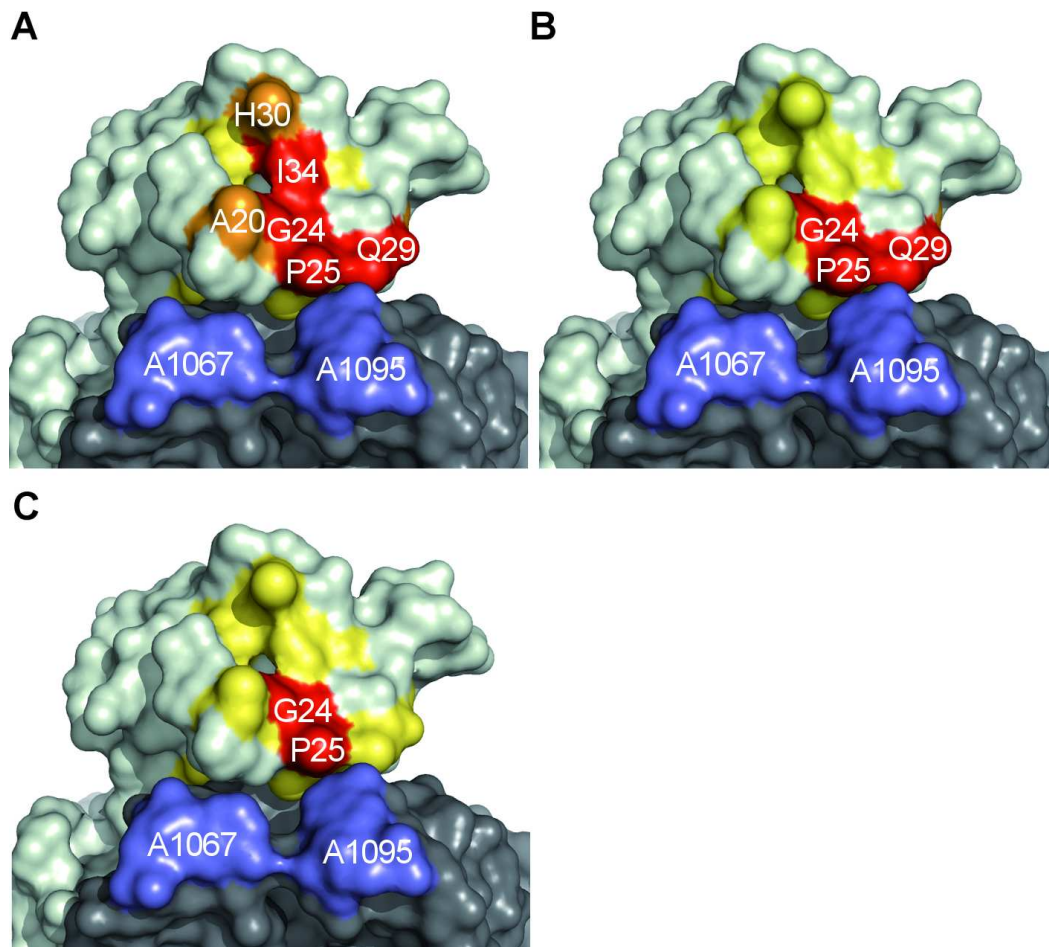


**Abb. 3.5.** Konzept des PICC (*proximity induced covalent capture*). 1. Das Thiopeptid bindet an den dimeren Komplex aus L11-Protein/RNA. 2. Kovalente Reaktion zwischen einem Thiol des Proteins und dem Thiopeptid.

Durch Austausch einzelner Aminosäuren des L11-Proteins von *Thermus thermophilus* gegen Cysteine mittels ortsspezifischer Mutagenese konnten die Reaktivitäten der Cystein-Thiole in Abhängigkeit von der räumlichen Position auf der Proteinoberfläche kartiert werden (Dr. Sascha Baumann).<sup>[126]</sup> Bei der Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren wurden Positionen in der Nähe der Thiopeptid-Bindungsregion ausgewählt, die im Vergleich mit L11-Proteinen anderer Organismen nicht konserviert sind und deren Mutation keine Resistenzen gegenüber Thiostrepton **3** vermittelt. Der Vergleich der CD-Spektren der mutierten Proteine mit dem nativen Protein ergab, dass die globale Gesamtkonformation der Proteine durch den Austausch der untersuchten Aminosäuren mit Cystein nicht veränderte.

#### 3.2.2. Ergebnisse des PICC an der ribosomalen Bindestelle

Während Cysteinreste, die weit von der Thiopeptid-Bindungsstelle in der dreidimensionalen Struktur des L11-Proteins entfernt positioniert sind, keine Reaktivitäten in der PICC-Reaktion zeigten, erhielten wir für die untersuchten Thiopeptide charakteristische Reaktivitätsmuster an einigen Aminosäurepositionen. Generell war die Reaktivität auf Positionen beschränkt, die in räumlicher Nähe zu der vorgeschlagenen Bindestelle der Thiopeptide liegen. Diese zeichnet sich durch ihre Nachbarschaft zu den rRNA-Basen A1067 und A1095 aus. Thiostrepton **3** reagierte deutlich mit L11-Proteinmutanten, die Cysteine an den Positionen G24, P25, Q29 und I34 aufwiesen (Abbildung 3.6, A: rot), während schwache Reaktivität für die Positionen A20 und H30 bestimmt wurde (Abbildung 3.6, A: orange). Die PICC-Reaktionen des Nosiheptids **5** waren im Vergleich zu



**Abb. 3.6.** Darstellung der PICC-Reaktivitäten auf der Oberfläche des Protein/RNA-Komplexes. pdb: 2jq7<sup>[125]</sup> (Farbcode: rot = sehr reaktive Cys-Mutante, orange = schwach reaktiv, gelb = unreaktiv, hellgrau = nicht getestet (Protein), dunkelgrau = rRNA, blau = wichtige rRNA-Basen. A) Reaktivität des Thiostreptons **3**; B) Reaktivität des einfach verkürzten Thiostreptons **23**; C) Reaktivität des Nosiheptids **5**.

Thiostrepton **3** auf die beiden Positionen G24 und P25 begrenzt (Abbildung 3.6, C). Auch die in der Seitenkette verkürzten Thiostreptonderivate **23** und **27** zeigten verminderte PICC-Reaktivitäten. Während das einfach verkürzte Thiostrepton **23** an den Positionen G24, P25 und Q29 reagierte (Abbildung 3.6, B), zeigte sich für das zweifach verkürzte Thiostrepton **27**, das keine Deala-Seitenkette aufweist, keine Reaktivität (nicht gezeigt). Das Thiopeptid Micrococcin **7** war ebenfalls in unseren PICC-Experimenten nicht aktiv.

Wenn man annimmt, dass der sehr ähnliche Grundkörper (A-Ring) der untersuchten Thiopeptide Thiostrepton **3** und Nosiheptid **5** in gleicher Position an den dimeren Komplex bindet, spiegelt sich in der unterschiedlichen Reaktivität der Moleküle die Länge und

### 3. Wirkort: Ribosom

---

Anzahl der Dehydroalanine in der Seitenkette wieder. Die längere Seitenkette des Thiostreptons **3** kann im Vergleich zu Nosiheptid und den verkürzten Thiostrepton-Varianten **23** und **27** eine größere Proteinoberfläche «abtasten», so dass eine PICC-Reaktion zusätzlich an den Positionen Q29 und I34 auftritt. Auffällig ist, dass das Dehydroalanin des B-Rings der Thiostreptonstruktur keine Reaktivität aufweist, da das zweifach verkürzte Thiostrepton **27** überhaupt keine PICC-Reaktion einging. Dies spricht für die hohe strukturelle Selektivität der PICC-Reaktion.

Der Grund für die fehlende Reaktivität des Micrococcins **7** könnte einerseits mit dem Vorhandensein eines Dehydrobutyrinrests anstelle der Dehydroalanine in der Seitenkette erklärt werden, da das Dehydrobutyrin deutlich weniger reaktiv gegenüber Thiolen ist (Kapitel 2). Allerdings scheint Micrococcin einen von Thiostrepton und Nosiheptid abweichenden Bindemodus zu haben, so dass die Seitenkette nicht in räumliche Nähe zu den mutierten Positionen des L11-Proteins kommt (Kapitel 3.1). Die bisher einzige Kristallstruktur der Bindung des Micrococcins an das Ribosom besitzt eine relativ geringe Auflösung (6–7 Å), die eine genaue Zuordnung der Elektronendichte zu den Atomen des Micrococcins erschwert.<sup>[30]</sup> Es wird jedoch vermutet, dass Micrococcin in der Art an das Ribosom bindet, dass die Seitenkette am ehesten mit den Basen der RNA interagiert.

Bemerkenswert ist, dass für keines der getesteten Moleküle eine Reaktion an Position V38C des L11-Proteins zu erkennen war. Ein Cys in dieser Position scheint also nicht reaktiv zu sein. Bei den meisten Organismen liegt an dieser Position des L11-Proteins ein Cystein vor. Das Ergebnis der PICC-Reaktion ist demnach als weitere Bestätigung zu sehen, dass bei der Bindung der Thiopeptide am Ribosom keine kovalente Reaktion stattfindet, wie dies beispielsweise bei dem Regulatorprotein TipAL der Fall ist (vgl. Kapitel 2). Die hohe Spezifität der kovalenten Reaktivität allgemein spricht für eine sehr definierte und kompakte Bindung der Thiopeptide in der Bindungsregion des L11-Protein/23S-rRNA-Komplexes.

#### 3.2.3. Diskussion

Zur detaillierten Interpretation der unterschiedlichen Reaktivitäten der PICC-Reaktionen auf der Oberfläche des Proteins ist das Vorhandensein einer dreidimensionalen Struk-



tur der Bindestelle notwendig. Die GTPase-assoziierte Region des Ribosoms mit dem L11/23S-rRNA-Komplex scheint in Abhängigkeit von der jeweiligen Stufe innerhalb des Elongationszyklus einer starken konformationellen Dynamik unterworfen zu sein. Sowohl Strukturen aus NMR-Studien als auch Kristallstrukturen bilden jeweils nicht die gesamte dynamische Geometrie der Bindungsregion wieder. Wahrscheinlich interagieren die Thiopeptide bevorzugt mit bestimmten Konformationen und verhindern durch ihre Bindung in der Schalterregion (*Switch*) die für den katalytischen Zyklus wichtigen konformationellen Umordnungen innerhalb der Proteine / rRNA-Komplexe.

Zu dem Zeitpunkt unserer PICC-Untersuchungen war keine Kristallstruktur des ternären Komplexes aus L11/23S-rRNA/Thiopeptid bekannt. Daher bedienten wir uns einer Kristallstruktur des dimeren L11/23S-rRNA-Komplexes ohne Thiostrepton<sup>[127]</sup> bzw. einer NMR-Struktur des ternären Komplexes<sup>[125]</sup>. Aufgrund der relativ geschlossenen Geometrie des Spalts zwischen dem Protein und der rRNA dieser beiden Strukturen kamen wir aufgrund der PICC-Ergebnisse zu dem Schluss, dass die Thiopeptide weit über die rRNA-Basen hinaus (in Abbildung 3.6 nach unten) Kontakte ausbilden würden. Eine leicht abweichende Aussage erhält man, wenn man die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur des ternären Komplexes von Fucini *et al.* zur Interpretation der PICC-Daten hinzuzieht, die eine weitere Öffnung des Spalts zwischen dem Protein und der rRNA aufweist. In diesem Fall würden die Thiopeptide vor allem innerhalb der Spalte zwischen dem Protein und der rRNA binden, wobei die Seitenkette Kontakte vor allem zur Proteinoberfläche ausbildet (in Abbildung 3.6 nach oben). Diese revidierte Interpretation der Bindung der Thiopeptide innerhalb der Spalte deckt sich weitgehend mit unseren Ergebnissen der *Docking*-Studien (Kapitel 3.4). Auch frühere Untersuchungen von Lentzen *et al.* wiesen auf Bindung in der Spalte zwischen Protein und rRNA hin.<sup>[118]</sup> In diesem Fall kann es noch immer zu Kontakten zwischen dem gebundenen Thiostrepton 3 und den rRNA-Basen A1067 und A1095 kommen, wie in biochemischen Experimenten gezeigt werden konnte.<sup>[128]</sup>

In Kombination mit Strukturinformationen aus NMR-Studien bzw. Kristallstrukturen erlaubt die PICC-Methode Experimente in Lösung, die unter physiologisch relevanten Bedingungen durchgeführt werden können. Der Dynamik der Makromoleküle und einer

sich strukturell ändernden Bindungsregion wird dabei Rechnung getragen. Nur wenn unter diesen physiologischen Bedingungen eine Bindung zustande kommt, wird man Reaktivität in der PICC-Untersuchung feststellen. Die Methode des PICC kann deshalb als ergänzende Methode betrachtet werden, die wichtige funktionale Informationen eines Bindungsvorgangs liefert. Wir konnten so zeigen, dass sich das Konzept des *Covalent Capture* auch auf ternäre Komplexe und auf Komplexe, die aus Protein/RNA-Makromolekülen bestehen, anwenden lässt.

## 3.3. Modifizierungen der Thiostrepton-Seitenkette

Die Ergebnisse der PICC-Studien weisen darauf hin, dass die Bindung des Thiostreptons **3** und des Nosiheptids **5** an den Protein/RNA-Komplex vor allem über Kontakte der makrozyklischen A-Ring-Struktur vermittelt wird. Für diese Annahme spricht, dass die unterschiedlichen Reaktivitätsmuster auf der Proteinoberfläche mit der relativen Länge der jeweiligen Seitenkette der untersuchten Moleküle in Einklang zu bringen sind, wenn für den A-Ring eine ähnliche Positionierung angenommen wird.

Dies würde bedeuten, dass Modifizierungen der Seitenkette einen relativ geringen Einfluss auf die Bindungsaffinität des Moleküls an die ribosomale Zielstruktur haben sollten. In Kapitel 2 wurden Michael-Additionen von unterschiedlichen Thiolen an Thiostreptomoleküle beschrieben. Wir stellten die Frage, welche Konsequenzen die jeweilige Modifizierung auf die Bindungseigenschaften der Derivate am Ribosom ausüben würde und welchen Einfluss die Modifizierungen auf die antibiotische Wirkung der Moleküle haben würden.

### 3.3.1. Quantifizierung der Bindungsaffinitäten mittels fluoreszenter Thiostreptonsonde

Wie bereits in Kapitel 2.7.1 beschrieben, konnten wir mittels Michael-Addition an das Dehydroalanin der Seitenkette des einfach verkürzten Thiostreptons **23** die PEG-Fluorescein-Thiostreptonsonde **74** synthetisieren. Mithilfe dieser fluoreszenten Sonde gelang es uns mittels Fluoreszenz-Anisotropiemessungen die Bindungsaffinität verschiede-

### 3.3. Modifizierungen der Thiostrepton-Seitenkette

---

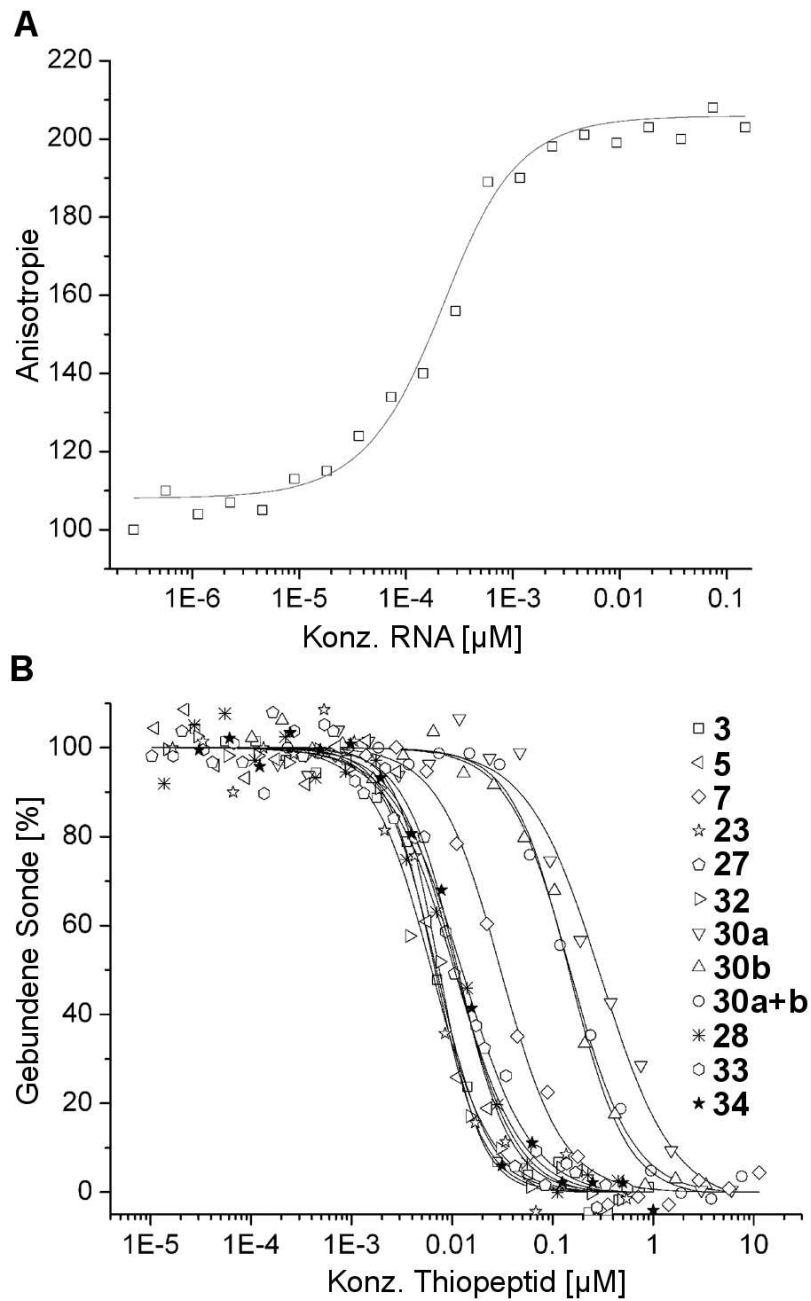
ner Thiostreptonderivate an die ribosomale Bindungsstelle zu quantifizieren (Dr. Sascha Baumann). Als rRNA wurde ein 58 nt langes rRNA-Fragment verwendet (*E. coli* Positionen 1051–1109), das als Bindestelle der Thiopeptide die Helices H43/H44 der 23S rRNA umfasst, während als L11-Protein das Wildtyp-Protein von *Thermus thermophilus* verwendet wurde.<sup>[126]</sup>

In ersten Versuchen untersuchten wir die Bindungsaffinität der PEG-Fluorescein-Thiostreptonsonde **74** an den dimeren L11/23S-rRNA-Komplex mittels Fluoreszenz-Anisotropiemessungen. Es zeigte sich, dass die Sonde **74** nur in äußerst geringem Umfang an die einzelnen Komponenten (L11 bzw. 23S rRNA) bindet ( $K_D > 10 \mu\text{M}$ ). Erst bei Vorhandensein des dimere L11/23S-rRNA-Komplexes zeigte sie unter Ausbildung des ternären Komplexes L11/23S-rRNA/**74** starke Bindung mit einer Dissoziationskonstante von  $K_D = 140 \pm 80 \text{ pM}$  (Abbildung 3.7, A).

Die PEG-Fluorescein-Thiostreptonsonde **74** setzten wir anschließend dazu ein, die Bindungsaffinität einiger Thiopeptide bzw. Thiostreptonderivate an den dimeren L11/23S-rRNA-Komplex mittels Verdrängungstitrationen zu bestimmen (Abbildung 3.7, B). Hierbei verwendeten wir Fluoreszenzpolarisationsassays im 384-well-Format. Die erhaltenen  $K_D$ -Werte sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Thiostrepton **3** zeigte sehr starke Bindungsaffinität zu dem L11/rRNA-Komplex und wir bestimmten einen  $K_D$ -Wert von 0.2 nM. Nosiheptid **5** bindet mit einem Faktor 2 stärker, während Micrococcin **7** ungefähr 8-fach schlechter an den dimeren Komplex bindet. Die Auswertung der Ergebnisse der Thiostreptonderivate ergab, dass die Modifikation der Seitenkette in den meisten Fällen fast keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften der Moleküle ausübten. Sowohl sterisch anspruchsvolle Reste wie Thioglucose (**32**), als auch bei physiologischem pH negativ (**33**) bzw. positiv (**34**) geladene Reste wurden bestens toleriert und zeigten Verschlechterungen der Bindungsaffinität maximal um den Faktor 2. Im Gegensatz dazu zeigte die lipophile Modifizierung mit der C<sub>8</sub>-Alkylkette (**30**) eine geringfügig schlechtere Bindung um den Faktor 20. Auffällig war, dass das Diastereomerenpaar **30 a/b** gleiche Affinität zeigte. Demzufolge nimmt also die Stereochemie des durch die Michael-Addition entstehenden stereogenen Zentrums keinen Einfluss auf die Bindung.

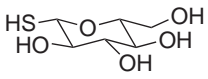
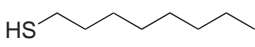
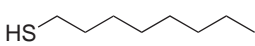
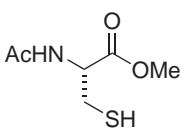
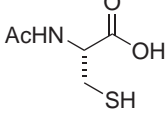
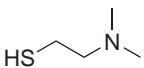
### 3. Wirkort: Ribosom



**Abb. 3.7.** A) Fluoreszenz-Anisotropie-Titration der PEG-Fluorescein-Thiostreptonsonde **74** (5 nm) und L11-Protein (0.6  $\mu\text{M}$ ). B) Verdrängungstitrationen der PEG-Fluorescein-Thiostreptonsonde **74** vom Protein-RNA-Komplex (5 nm RNA, 0.6  $\mu\text{M}$  Protein) durch verschiedene Thiostreptonderivate.

### 3.3. Modifizierungen der Thiostrepton-Seitenkette

**Tab. 3.1.** Bindungsaffinitäten einiger Thiopeptide und semisynthetischer Thiostreptonderivate an den L11/23S-rRNA-Komplex und ihre Wachstumsinhibierung bei *S. aureus*.

Verbindung	Thiol	$K_D$ [nM]	MIC <sup>a</sup> [ $\mu$ M]	MIC <sup>b</sup> [ $\mu$ M]	Löslichkeit <sup>c</sup> [ $\mu$ M]
Thiostrepton <b>3</b>	–	$0.20 \pm 0.05$	0.0065	0.013	n. b.
Nosiheptid <b>5</b>	–	$0.11 \pm 0.02$	0.00063	0.00063	n. b.
Micrococцин <b>7</b>	–	$1.73 \pm 0.90$	0.34	0.42	n. b.
<b>23</b>	–	$0.19 \pm 0.01$	0.063	0.063	5
<b>27</b>	–	$0.32 \pm 0.05$	0.013	0.013	2
<b>32</b>		$0.22 \pm 0.06$	2.0	2.0	110
<b>30 a</b>		$3.59 \pm 1.20$	0.30	0.30	1
<b>30 b</b>		$5.41 \pm 2.03$	3.2	3.2	1
<b>28</b>		$0.32 \pm 0.08$	0.67	0.41	n. b.
<b>33</b>		$0.32 \pm 0.04$	3.2	1.6	n. b.
<b>34</b>		$0.44 \pm 0.11$	0.37	0.37	17

<sup>a</sup> MSSA-Stamm ATCC 25923.

<sup>b</sup> MRSA-Stamm ATCC 43300.

<sup>c</sup> Löslichkeit in Puffer: 50 mM Natriumphosphat, pH 7.

#### 3.3.2. Untersuchungen zur antibiotischen Wirksamkeit

Um zu untersuchen welchen Einfluss die Modifikationen der Seitenkette des Thiostrepton-Grundgerüsts auf die antibakterielle Aktivität ausübt, testeten wir die Substanzen auf ihre Wachstumsinhibierung gegenüber Methicillin-empfindlichen *Staphylococcus aureus* (MSSA) und Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) Stämmen und bestimmten die jeweiligen MIC-Werte (*minimum inhibitory concentration*) (Tabelle 3.1). Für alle getesteten Substanzen wurden nur kleine Abweichungen in der Wachstumshemmung zwischen den beiden *S. aureus*-Stämmen beobachtet. Die Wachstumsinhibierung der drei Naturstoffe Thiostrepton **3**, Nosiheptid **5** und Micrococcin **7** spiegelte auffällig gut die zuvor bestimmte Bindungsaffinität der jeweiligen Substanz an die ribosomale Zielstruktur wieder. Während Thiostrepton **3** das Wachstum in nanomolaren Konzentrationen (6.5–13 nM) hemmte, bestimmten wir für Nosiheptid **5** eine Wachstumsinhibierung schon bei 0.63 nM. Micrococcin **7** zeigte hingegen, in Korrelation mit der relativ schwachen Bindungsaffinität, einen MIC-Wert bei 340–420 nM.

Die Verkürzung der Seitenkette des Thiostreptons (**23** bzw. **27**) hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Potential der Substanzen, das Wachstum von *S. aureus* zu hemmen. Auch dieses Ergebnis steht in Korrelation mit den gemessenen Bindungsaffinitäten der jeweiligen Substanzen. Dies bestätigte die bisherige Vermutung, dass die Seitenkette nicht zwingend notwendig für eine starke Bindung des Thiostreptons **3** an die ribosomale Zielstruktur zu sein scheint.

Für die Thiostreptonderivate ergab sich ein uneinheitliches Bild zwischen Bindungsaffinität und antibiotischer Wachstumshemmung. Die Addukte der Thioglucose (**32**) bzw. des *N*-Acetylcysteins (**33**) verloren gegenüber dem einfach verkürzten Thiostrepton **23** deutlich an Wirkung (Faktor 30), obwohl die *in vitro* Bindungsaffinität beider Moleküle fast keinen Unterschied zeigte. Weniger stark ausgeprägt war der Rückgang der antibiotischen Effekte bei dem Addukt des *N*-Acetylcysteinmethylesters (**28**). Die stärkste Hemmwirkung wurde von dem unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen tertiären Amins **34** erhalten. Die Addition eines lipophilen C<sub>8</sub>-Thiols (**30**) resultierte ebenfalls in einer Verschlechterung der Hemmwirkung. In diesem Fall schien die Stereochemie einen Einfluss auf die Hemmwirkung zu haben (**30a/30b**).

Bei allen getesteten Seitenkettenderivaten verzeichneten wir eine niedrigere antibiotische Wirkung als bei der Ausgangsverbindung. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass sich die Hemmwirkung der Thiostreptonderivate ( $0.7\text{--}5\text{ mgL}^{-1}$ ) in vergleichbarer Größenordnung mit gängigen Antibiotika wie z. B. Linezolid oder Vancomycin ( $1\text{--}2\text{ mgL}^{-1}$ )<sup>[129]</sup> befinden.

Die geringe Wasserlöslichkeit des Thiostreptons **3** stellt einen wesentlichen Grund dafür dar, dass es bisher nicht in der antibiotischen Therapie eingesetzt wird. Durch Derivatisierung der Grundstruktur sollte es möglich sein, die Wasserlöslichkeit von Thiostreptonderivaten zu erhöhen. Wir bestimmten die Wasserlöslichkeit einiger Thiostreptonderivate mittels HPLC. Erwartungsgemäß wurde die Löslichkeit durch lipophile C<sub>8</sub>-Addukte (**30**) reduziert, während für das bei physiologischem pH positiv geladene tertiäre Amin **34** eine 3–4 mal höhere Löslichkeit als bei der Ausgangsverbindung einfach verkürztes Thiostrepton **23** bestimmt wurde. Die Addition eines Glucosederivats (**32**) erhöhte die Löslichkeit sogar um den Faktor 20.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass eine erfolgreiche Quantifizierung der Bindungsaffinitäten einiger Thiopeptidnaturstoffe und semisynthetischer Derivate mit Hilfe der fluoreszenten PEG-Thiostreptonsonde **74** durchführbar ist. Unsere ersten antibiotischen Untersuchungen zeigten, dass semisynthetische Thiostreptonderivate synthetisiert werden können, die sowohl hohe Wirksamkeit als auch hohe Wasserlöslichkeit aufweisen.

## 3.4. Modifizierungen des Thiostrepton-A-Rings

Bislang sind die atomaren Details der Bindung des Thiostreptons **3** an die ribosomale Bindestelle nur unzureichend charakterisiert. Die vorhandene Kristallstruktur<sup>[30]</sup> des trimeren Komplexes L11/rRNA/Thiostrepton besitzt eine Auflösung von 3–4 Å und klärt daher nicht darüber auf, welche Hauptinteraktionen des Thiostreptons **3** mit der rRNA bzw. dem L11-Protein auf atomarer Ebene bestehen. Die Untersuchung der Interaktionen zwischen dem Thiopeptid und dem L11/rRNA-Komplex wird durch die Größe der Moleküle und der strukturellen Dynamik, die diese Region innerhalb der Ribosomstruktur

### 3. Wirkort: Ribosom

---

aufweist, erheblich erschwert. Die Kenntnis der atomaren Wechselwirkungen ist jedoch für die Entwicklung eines SAR-Profiles (*structure activity relationship*) bzw. für die Formulierung eines Pharmacophormodells der Thiopeptide von großer Bedeutung, um zu optimierten Liganden zu gelangen.

Um die Interaktionen zwischen Thiostrepton **3** und seiner Bindestelle näher charakterisieren zu können suchten wir nach semisynthetischen Transformationen, die selektive Modifikationen des Thiostrepton-Grundgerüsts ermöglichten. Der A-Ring des Thiostreptons scheint für die Ausbildung der Kontakte zum dimeren L11/rRNA-Komplex eine besonders wichtige Rolle zu spielen. Neben den Ergebnissen der Kristallstruktur wurden in NMR-Untersuchungen NOE-Kontakte v. a. zwischen den Resten Thz1, Thr1, But, Cys und Thstn des A-Rings der Thiostreptonstruktur und dem L11/rRNA-Komplex beobachtet.<sup>[118,125]</sup>

Wie bereits in Kapitel 2 beschrieben, gelangen uns mehrere semisynthetische Transformationen der A-Ringstruktur des Thiostreptons **3**. So verfolgten wir erfolgreich die Oxidation des Thiazolins zum Thiazol, die Acylierung des Thiostreptin-4-OH, die Reduktion des zentralen Dehydropiperidins zum Piperidin und die Isolierung des Thiazolin-Epimers des Thiostreptons. In einer Kooperation mit der Gruppe um Prof. Dr. H. Schwalbe an der Universität Frankfurt und Dr. Karl Kirschner am Fraunhofer-Institut für Algorithmen und Wissenschaftliches Rechnen in Sankt Augustin untersuchten wir die Auswirkungen dieser A-Ring Modifikationen auf die Struktur und Bindeeigenschaften der Derivate.

#### 3.4.1. Konformationsbestimmung mittels NMR

Zunächst wurde die Konformation der Derivate in freier ungebundener Form mittels NOESY-NMR-Spektroskopie ermittelt (Dr. Hendrik Jonker). Für jede Verbindung konnten ca. 150–200 NOE-Signale als Distanzbeschränkungen (*distance restraints*) in die Strukturberechnung mittels Molekulardynamik-Simulation einfließen.

Die Überlagerung der 20 energieärmsten Strukturen jeder Verbindung zeigte für jedes Ensemble eine sehr rigide Struktur, deren Flexibilität bis auf diejenige der Seitenkette eher beschränkt war (Abbildung 3.8). Die Abweichungen der Ensembles der einzelnen



Verbindungen untereinander und gegenüber der Kristallstruktur des Thiostreptons **3** waren nicht sonderlich stark. Die größten Unterschiede zeigten sich auf die Reste des A-Rings beschränkt (Thr1, But, Cys und Thstn).

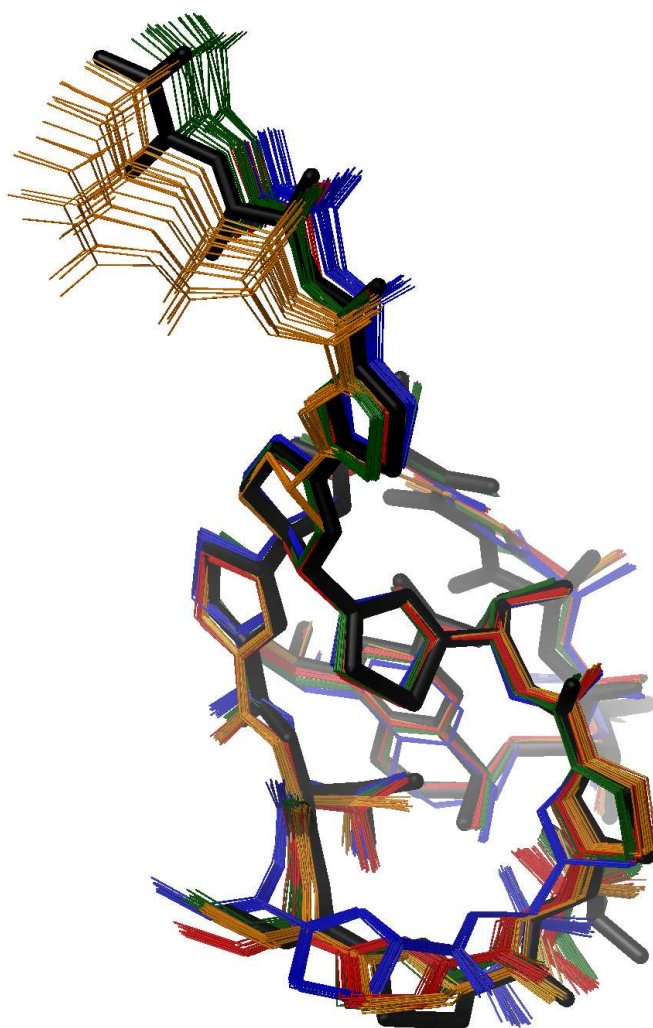
Beim Thiazolin-Epimer **23b** des einfach verkürzten Thiostreptons **23a** zeigte sich bei genauer Betrachtung, dass die Reste Cys und Thstn besonders starke strukturelle Abweichungen gegenüber der Kristallstruktur<sup>[105]</sup> des Thiostreptons **3** und den übrigen Verbindungen aufwiesen. Als Folge dieser strukturellen Veränderung des Thiazolins erfährt das benachbarte Thiazolin 2 (Thz2) eine Neigung von 22°.

Die Oxidation des Thiazolins zum Thiazol (**58**) resultiert in einem flachen aromatischen Ring. Die Auswirkung auf die Struktur des A-Rings ist in diesem Fall geringer als für das Epimer **23b**, aber deutlich vorhanden. Durch die Reduktion des Dehydropiperidins zum Piperidin (**61**) erfährt der A-Ring nur sehr geringe Veränderungen, während größere Unterschiede in der Positionierung des Thiazols 4 (Thz4) im Übergang zur Seitenkette des Thiostreptons zu erkennen sind.

Aufgrund fehlender NOE-Kontakte in der Seitenkette der Thiostreptonderivate konnte die Struktur dieser Region nur unzureichend mittels NMR-Strukturbestimmung definiert werden. Quantenmechanische Berechnungen konnten die Torsionspotentiale der Dehydroalanine annähern (Dr. Karl Kirschner). Mit einer errechneten Energiebarriere von 7–8 kcal/mol in der Gasphase für die Rotation um die Enamin C–N-Bindung scheint die Seitenkette sehr flexibel zu sein. Diese Beobachtung kann mit den Ergebnissen der PICC-Untersuchung (s. o.) in Einklang gebracht werden. Die Seitenkette scheint durch ihre Flexibilität eine größere Fläche des L11-Proteins bei der Bildung des ternären Komplexes (Protein/rRNA/Thiostrepton) «abtasten» zu können.

#### 3.4.2. Molekulare *Docking*-Studien

Um ein besseres Verständnis der Bindung des Thiostreptons **3** an den dimeren L11-Protein/rRNA-Komplex zu erhalten wurden alle NMR-Strukturen eines Ensembles molekularer *Docking*-Berechnungen unterworfen (Dr. Karl Kirschner). Als Bindestelle wurde die Kristallstruktur des trimeren L11/rRNA/Thiostrepton-Komplexes (3cf5)<sup>[30]</sup> herangezogen. Bei den Berechnungen war es wichtig, den Liganden einen gewissen Grad an



**Abb. 3.8.** Überlagerung der 20 energieärmsten Strukturen der Molekulardynamik-Simulationen der Verbindungen Thiostrepton **3** (grün), einfach verkürztes oxidiertes Thiostrepton **58** (rot), Epimer des einfach verkürzten Thiostreptons **23b** (blau) und des reduzierten Thiostreptons **61** (orange). Die Kristallstruktur des Thiostreptons **3** ist in schwarz dargestellt (pdb: 1e9w).<sup>[105]</sup>

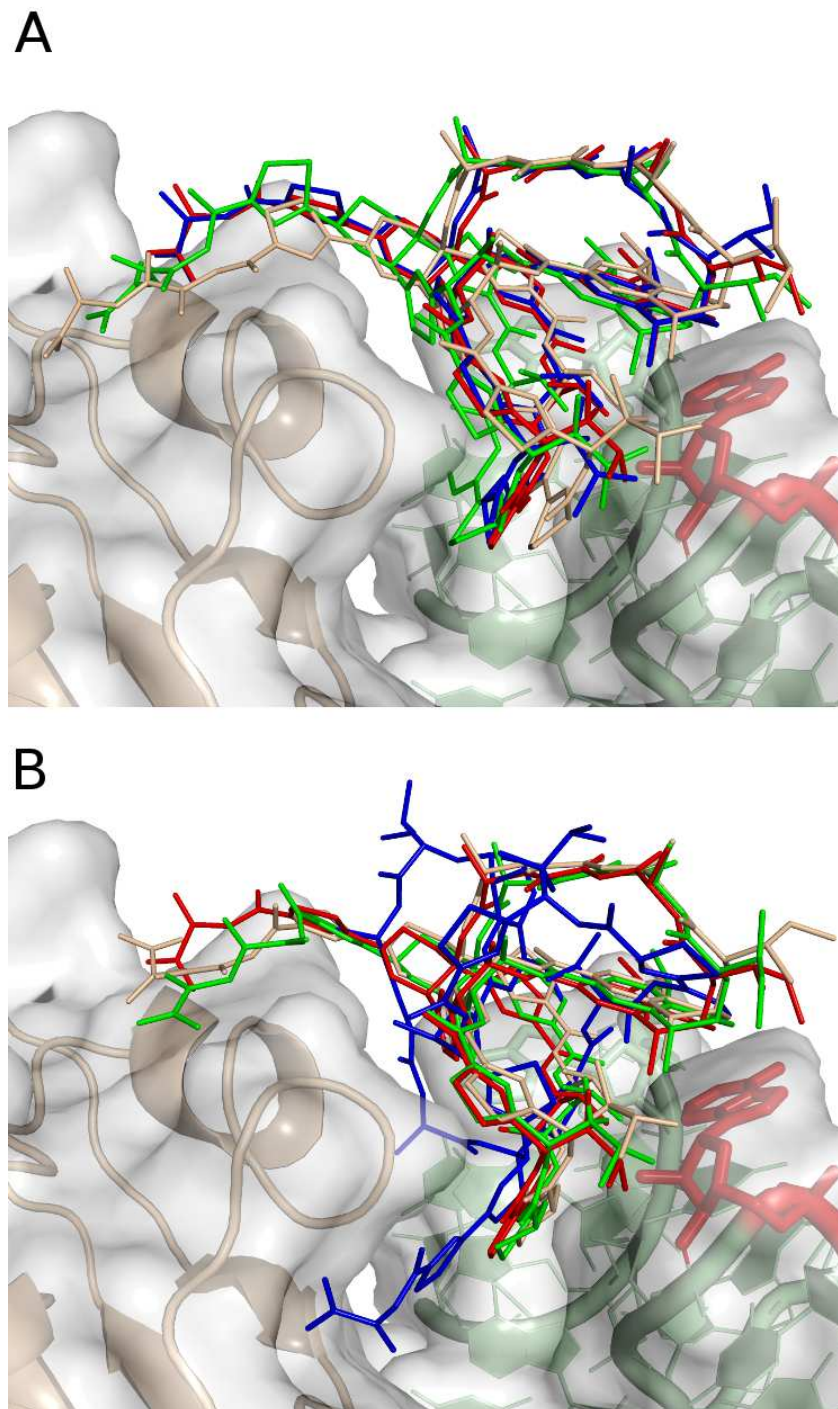
struktureller Flexibilität während des *Dockings* zu erlauben, in dem sich die Reste und die Seitenketten der Moleküle der Bindeumgebung anpassen konnten. Die besten Ergebnisse erhielten wir bemerkenswerterweise mit *Scoring functions*, die nicht speziell für RNA-Bindungen ausgelegt waren. Dies deutete daraufhin, dass die Charakteristika der Thiostreptonbindestelle eher »konventionellen« nicht-polaren Proteinrezeptoren ähneln als polaren Ligand-RNA-Wechselwirkungen mit ionischen Wechselwirkungen.

Für jede Verbindung erhielten wir eine Struktur mit höchstem *Score*, die der Kristallstruktur<sup>[30]</sup> des gebundenen Thiostreptons **3** sehr ähnlich war (Abbildung 3.9A). Das Epimer **23b** besaß in den Berechnungen den geringsten *Score*. Durch Analyse der größten *Cluster* zeigte sich, dass das Epimer **23b** in einigen Strukturergebnissen mit der Seitenkette in den Spalt zwischen L11 und rRNA ragte, d. h. um ca. 180° gegenüber den anderen Lösungen gedreht war. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass das Epimer **23b** deutlich schwächer an die Bindestelle zu binden scheint.

Die *Dockings* der restlichen drei Verbindungen **3**, **58** und **61** zeigten weitgehend übereinstimmende Anordnungen. Die Hydroxylgruppen der Reste Thstn und Thr1 bildeten drei Wasserstoffbrücken zu A1067 aus, während Thz1 in einer Stapel-Wechselwirkung (*stacking*) mit A1095 eingebunden war. Das höchste *Score* wurde für das reduzierte Thiostrepton **61** erhalten, für Thiostrepton **3** und das einfach verkürzte oxidierte Thiostrepton **58** wurden sehr ähnliche *Score*-Werte erhalten.

#### 3.4.3. Biochemische Evaluierungen

Um die erhaltenen Ergebnisse der *Docking*-Studien mit biochemischen Werten korrelieren zu können, unterzogen wir alle A-Ring-modifizierte Verbindungen in gleicher Art und Weise den bereits beschriebenen Fluoreszenz-Anisotropiemessungen (Dr. Sascha Baumann, Kapitel 3.3.1). Die erhaltenen Dissoziationskonstanten  $K_D$  dieser Verbindungen sind in Tabelle 3.2 angegeben. Zusätzlich wurde von Dr. Sascha Baumann ein *in vitro* Transkriptions-Translationsassay zur Quantifizierung der Translationshemmung der verschiedenen Verbindungen entwickelt. Durch Transkription und Translation eines GFP-Reportergens in *E. coli*-Lysaten wurde in Abhängigkeit von der Stärke der Translationshemmung durch die zu untersuchende Verbindung eine bestimmte Menge



**Abb. 3.9.** Ergebnisse der *Docking*-Berechnungen der Verbindungen Thiostrepton **3** (grün), einfach verkürztes oxidiertes Thiostrepton **58** (rot), Epimer des einfach verkürzten Thiostreptons **23b** (blau) und des reduzierten Thiostreptons **61** (orange). L11-Protein (grau), 23S rRNA (grün), Nucleobase A1067 (rot). A) Strukturen mit den jeweils besten *Docking Scores*. B) Repräsentative Strukturen der jeweils größten *Cluster*. Das Epimer **23b** (blau) zeigt in B) eine abweichende Bindegeometrie.

### 3.4. Modifizierungen des Thiostrepton-A-Rings

**Tab. 3.2.** Vergleich der *Docking Scores* und der biochemischen Daten der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) und der Translationshemmung ( $IC_{50}$ ).

Verbindung	Score <sup>a</sup>	Score <sup>b</sup>	$K_D$ (L11/rRNA) [nM]	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]
<b>3</b> (Thiostrepton)	-8.41	-8.35	$0.20 \pm 0.05$	$0.69 \pm 0.03$
<b>23</b> (einfach verk. Thio.)	<i>n. b.</i>	<i>n. b.</i>	$0.20 \pm 0.05$	$0.80 \pm 0.18$
<b>58</b> (ox. einfach verk. Thio.)	-8.54	-8.54	$0.23 \pm 0.14$	$0.88 \pm 0.06$
<b>23b</b> (Epimer einfach verk. Thio.)	-8.30	-7.92	$5.6 \pm 1.1$	$(0.63 \pm 0.08)$ <sup>c</sup>
<b>61</b> (reduziertes Thio.)	-9.15	-8.71	$0.10 \pm 0.05$	<i>n. b.</i>
<b>5</b> (Nosiheptid)	<i>n. b.</i>	<i>n. b.</i>	$0.11 \pm 0.06$	<i>n. b.</i> <sup>d</sup>
<b>7</b> (Micrococcin)	<i>n. b.</i>	<i>n. b.</i>	$1.7 \pm 0.9$	$1.69 \pm 0.12$
<b>68</b> (B-Ring geöffnetes Thio.)	<i>n. b.</i>	<i>n. b.</i>	$670 \pm 46$	$8.01 \pm 2.8$
<b>67</b> (Acetyliertes Thio.)	<i>n. b.</i>	<i>n. b.</i>	$1.8 \pm 0.21$	$1.67 \pm 0.42$

<sup>a</sup> Bester *Docking-Score*.

<sup>b</sup> *Docking-Score* des größten *Clusters*.

<sup>c</sup> Epimerisiert zurück in **23**.

<sup>d</sup> Autofluoreszenz der Verbindung.

GFP-Protein produziert, dessen Konzentration anschließend fluoreszenzspektroskopisch bestimmt werden konnte. Die erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte der Translationsinhibition sind ebenfalls in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Die biochemischen Daten zeigen, dass nur geringe Unterschiede in der Bindungsaffinität des Thiostreptons **3**, des einfach verkürzten Thiostreptons **23** und des oxidierten einfach verkürzten Thiostreptons **58** vorhanden sind (Tabelle 3.2). Dies spiegelt sich auch in sehr ähnlichen  $IC_{50}$ -Werten der *in vitro* Translationsinhibition wieder. Wie bereits in den Konformationsbestimmungen mittels NMR gezeigt (Kapitel 3.4.1), unterscheidet sich die Konformation des A-Rings innerhalb der Gruppe dieser Verbindungen nur marginal. Die berechneten *Docking Scores* des Thiostreptons **3** und des oxidierten einfach verkürzten Thiostreptons **58** zeigen ebenfalls nur geringe Unterschiede auf (das einfach verkürzte Thiostrepton **23** wurde in den *Docking*-Studien nicht untersucht).

Die vergleichsweise schlechten *Docking Scores* des L-Epimers des einfach verkürzten

### 3. Wirkort: Ribosom

---

Thiostreptons (**23b**) korrelieren mit der relativ niedrigen Bindungsaffinität des Moleküls an den dimeren L11/rRNA-Komplex. Der  $K_D$ -Wert verschlechtert sich etwa um den Faktor 30 gegenüber dem *D*-Epimer (**23**). In dem gekoppelten Transkriptions-Translationsassay erhielten wir allerdings einen  $IC_{50}$ -Wert, der mit dem *D*-Epimer **23** vergleichbar war. In unabhängigen Experimenten untersuchten wir deshalb die Stabilität des *D*-Epimers **23** in *E. coli*-Lysaten. Mittels HPLC beobachteten wir, dass sich das *L*-Epimer **23b** unter den Bedingungen des Translationsassays zurück in das *D*-Epimer **23** verwandelte (vgl. Kapitel 5.2). Daher konnte die Translationsinhibierung durch das *L*-Epimer **23b** nicht mit Hilfe dieses Assays bestimmt werden. Nichtsdestotrotz erhielten wir durch die *Docking Scores* und den  $K_D$ -Wert genug Hinweise dafür, dass der A-Ring bei der Epimerisierung des Thiazolins eine für die Bindung an den dimeren L11/rRNA-Komplex ungünstige Konformation annimmt.

Mit dem reduzierten Thiostrepton **61** erhielten wir die besten *Scoring*-Werte in den *Docking*-Berechnungen. Damit einhergehend bestimmten wir für diese Verbindung aus den Fluoreszenz-Anisotropiemessungen eine Dissoziationskonstante  $K_D$ , die mit der starken Bindung des Nosiheptids **5** vergleichbar war. Gegenüber der Ausgangsverbindung Thiostrepton **3** ergab sich demnach eine Verbesserung des  $K_D$ -Werts um den Faktor 2.

Aus den *Docking*-Studien folgte, dass die Hydroxylgruppen des Thstn-Rests der Thiostrepton-Grundstruktur eine besonders wichtige Rolle in der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Ribose des Nukleotids A1067 spielten. Um ihren Einfluss auf die Bindungsaffinität zu untersuchen, synthetisierten wir acetyliertes Thiostrepton **61**, das einen Acetylrest an der sekundären Hydroxylgruppe des Thstn-Rests aufwies (Kapitel 2.5). Die Verbindung zeigte einen Anstieg der Dissoziationskonstante  $K_D$  um den Faktor 9 und eine Verdopplung des  $IC_{50}$ -Werts der Translationsinhibierung (Tabelle 3.2). Dies deutet darauf hin, dass im Fall von Thiostrepton **3** das Vorhandensein der Wasserstoffbrückenbindung zwischen Thstn-Rest und Nukleotid A1067 einen wichtigen Beitrag für die hohe Bindungsaffinität darstellt. Bemerkenswerterweise ist die *O*-Methylierung der 2'-Hydroxylgruppe des Nukleotids A1067 ein bekannter Resistenzmechanismus des Thiostrepton-Produzentenstamms *Streptomyces azureus*.<sup>[130]</sup> Hierbei kommt es zu einer Verminderung der Bindungsaffinität um den Faktor 3000 (Kapitel 3.5).<sup>[117]</sup>

Aus den *Docking*-Berechnungen folgte in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus NMR-Untersuchungen<sup>[125]</sup> und der Kristallstruktur<sup>[30]</sup>, dass der Chinaldinsäurerest (Q) des Thiostreptons **3** von der Protein/RNA-Bindestelle weg nach außen weist und keine substantiellen Interaktionen mit den Bindepartnern ausbildet. Durch strukturellen Vergleich mit Nosiheptid **5**, das anstelle der B-Ring-Verknüpfung des Thiostreptons eine Indolverknüpfung aufweist, ansonsten aber einen sehr ähnlichen A-Ring besitzt, könnte die Vermutung aufgestellt werden, dass der B-Ring (bzw. die Indolverbrückung des Nosiheptids) v. a. zur Stabilisierung der korrekten Konformation des A-Rings beiträgt, der für die Bindeinteraktionen maßgeblich verantwortlich zeichnet.

Um zu überprüfen welchen Einfluss der B-Ring des Thiostreptons **3** auf die Affinität hat, untersuchten wir B-Ring-geöffnetes Thiostrepton **68**, dessen Lacton hydrolysiert worden war (Kapitel 2.6). Im Fluoreszenz-Polarisationsassay bestimmten wir eine Dissoziationskonstante  $K_D$  von 670 nM, d. h. eine Verschlechterung der Bindungsaffinität um einen Faktor  $> 3\,000$  gegenüber Thiostrepton **3** selbst (Tabelle 3.2).

#### 3.4.4. Diskussion

Durch den integrierten Ansatz von Semisynthese, NMR-Strukturbestimmung, *in vitro* *Docking*-Studien und biochemischer Evaluierung konnten wir wichtige Strukturparameter, die die Bindeeigenschaften des Thiostreptons **3** an die GTPase-Region des Ribosoms beeinflussen, identifizieren. Die *in silico*-Vorhersagen der Bindungsaffinität korrelierten sehr gut mit den experimentellen biochemischen Daten. Dies ist umso erstaunlicher, da für die Strukturberechnungen nur eine Kristallstruktur mit relativ niedriger Auflösung zur Verfügung stand, die NMR-Strukturberechnung in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden musste und eine *Scoring*-Funktion für Proteinwechselwirkungen verwendet wurde. Die treffende Vorhersage der biochemischen Bindeeigenschaften bedeutet im Umkehrschluss, dass das berechnete Grundgerüst bei der Bindung keine grundlegende Anpassung an die Bindungsumgebung erfährt.

Übereinstimmend mit vorherigen Untersuchungen wurde so die allgemeine Bindegeometrie mit Insertion des Dehydrobutyrinrests in die Spalte zwischen L11-Protein und 23S rRNA bestätigt.<sup>[30,125]</sup> An der relativ starken Bindung mit dem Protein/RNA-Komplex

### 3. Wirkort: Ribosom

---

sind v. a. die Reste des A-Rings der Thiostreptonstruktur beteiligt. Hierbei scheint die korrekte Konformation des A-Rings eine sehr wichtige Rolle zu spielen. Selbst kleine strukturelle Veränderungen wie die Umwandlung des zentralen Dehydropiperidins in ein Piperidin, oder die Epimerisierung des Thiazolins vom D- in das L-Epimer haben starken Einfluss auf die Bindefähigkeit der entsprechenden Derivate.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen decken sich mit unseren vorherigen Ergebnissen zur Seitenkettenmodifikation (Kapitel 3.3). Die *Docking*-Studien ergaben, dass die Seitenkette des Thiostreptons **3** nur in begrenztem Umfang zur starken Bindung des Thiostreptons **3** an den dimeren Protein/RNA-Komplex beiträgt. Deshalb ist es möglich, die Seitenkette zu verkürzen, ohne signifikant an Affinität einzubüßen. Darüber hinaus wird hierdurch verständlich, dass weitere Modifizierungen der Seitenkette, beispielsweise durch Michael-Additionen, scheinbar leicht toleriert werden können.

#### Die Rolle des Thstn-Restes

Die Wasserstoffbrücke zwischen dem Thiostrepton-Rest Thstn und der Ribose des Nucleotids A1067 scheint eine wichtige Rolle in der Bindung des Thiostreptons zum Protein/RNA-Komplex zu haben. Neben Thiostrepton **3** besitzen alle anderen bis heute bekannten Thiopeptide mit zentralem Dehydropiperidin bzw. Piperidin (Serien *a* und *b*: Siomycin, Thiopeptin und Sch18640)<sup>[26]</sup> einen Thstn-Rest mit  $\beta$ -/ $\gamma$ -Hydroxylgruppe an genau dieser Stelle der Thiostrepton-Grundstruktur. Es ist auffällig, dass ebenso alle zu diesem Zeitpunkt beschriebenen Thiopeptide mit zentralem Hydroxypyridin (Serie *e*, Abbildung 3.10) an vergleichbarer Position im A-Ring einen Rest tragen, der eine  $\gamma$ -Hydroxylgruppe aufweist (falls ein  $\beta$ -OH besteht, ist dieses mit einer Indolgruppe verethert). Die A-Ringe der beiden Serien *a/b* und *e* sind in ihrer Struktur sehr ähnlich, so dass man eine vergleichbare Bindegeometrie am L11/rRNA-Komplex vermuten könnte. Die Kristallstruktur zeigt für Thiostrepton und Nosiheptid **5** ähnliche Bindegeometrien, auch wenn Nosiheptid eine gegenüber dem Thiostrepton um ca. 15° gedrehte Struktur an der gleichen Bindestelle aufweist.<sup>[30]</sup> Durch die geringe Auflösung der Struktur bleiben jedoch genaue Details der atomaren Wechselwirkungen unsicher und die leicht gedrehte Positionierung des Nosiheptids könnte ein Artefakt darstellen. Daher könnte vermutet

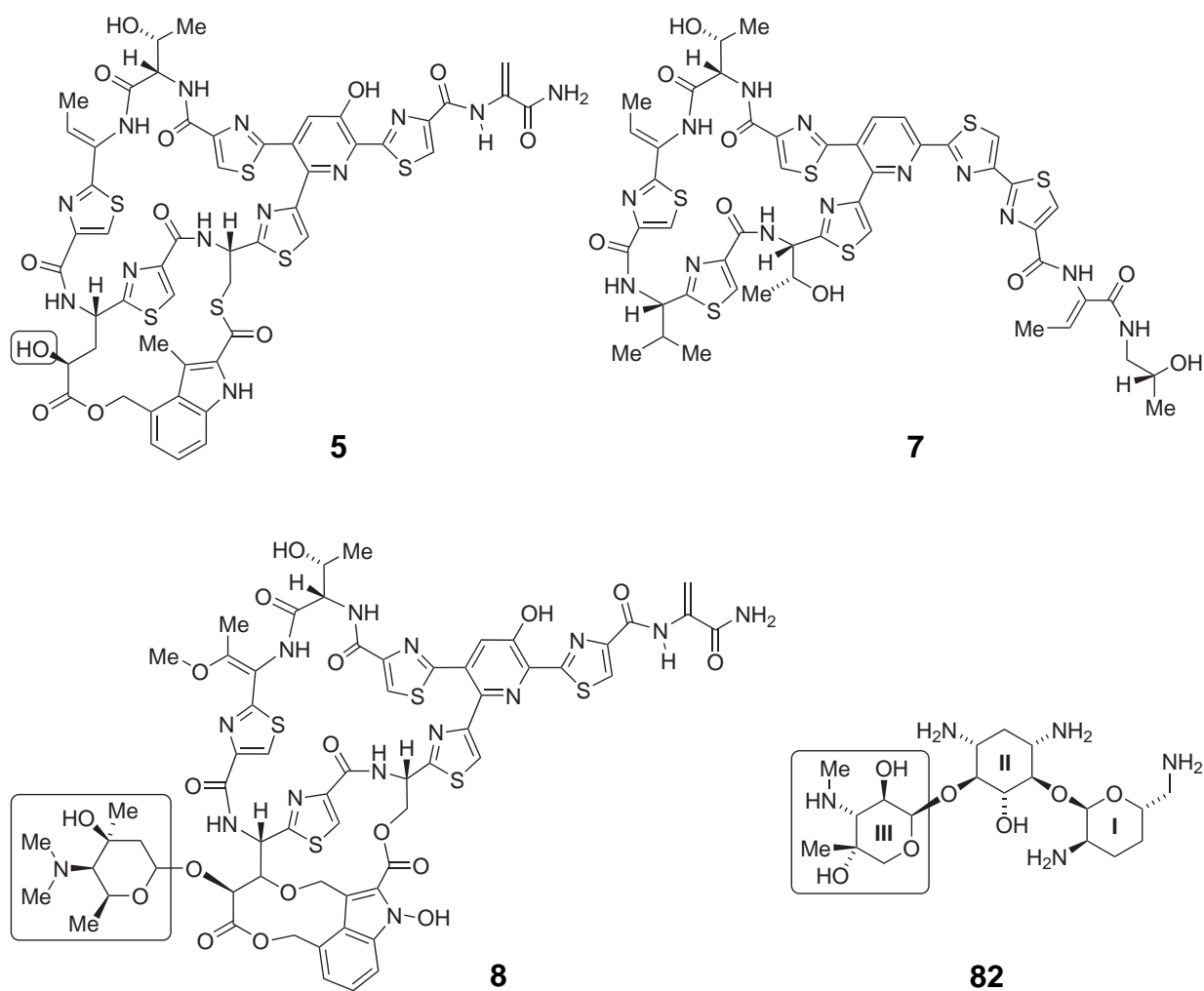


werden, dass Nosiheptid in gleicher Art und Weise wie Thiostrepton eine Wasserstoffbrücke zwischen der  $\gamma$ -Hydroxylgruppe und dem Nukleotid A1067 ausbildet.

Die anderen Thiopeptide aus der Serie *e* mit zentralem Hydroxypyridin sind über dieselbe  $\gamma$ -Hydroxylgruppe glykosidisch mit einem Dimethylaminosuckerrest verbunden (z. B. Nocathiacin I **8**, Abbildung 3.10).<sup>[26]</sup> Besonders interessant ist diese Tatsache im Zusammenhang mit den Ergebnissen unserer *Docking*-Studien, die «unterhalb» des Thstn-Rests im gebundenen Thiostrepton **3** noch verfügbaren Raum vermuten lassen. Die Aminozucker der Aminoglykosid-Antibiotika sind dafür bekannt, RNA sehr spezifisch zu binden und vielfältige Interaktionen mit der RNA auszubilden.<sup>[131–133]</sup> Bemerkenswerterweise besitzt das Aminoglykosid Gentamicin C1A **82** einen Methylaminosucker, der dem Dimethylaminosucker des Nocathiacins I **8** ähnelt (Abbildung 3.10, III). Mittels Kristallstrukturen wurde gezeigt, dass dieser Zuckerrest bei Gentamicin C1A **82** Wasserstoffbrückenbindungen u. a. zu Phosphatresten des RNA-Rückgrats ausbildet.<sup>[134,135]</sup> Nimmt man an, dass Nocathiacin I **8** in vergleichbarer Geometrie wie Nosiheptid **5** an den L11/rRNA-Komplex bindet (was durch die strukturelle Ähnlichkeit legitim erscheint), so könnte vermutet werden, dass der Zuckerrest des Nocathiacins tatsächlich mit weiteren Komponenten der RNA, z. B. mit dem Phosphatrest des Nukleotids A1067 wechselwirkt. Ergänzende Studien sind nötig, um die Bedeutung des Zuckerrests für die Bindung des Nocathiacins **8** experimentell nachzuvollziehen. Vor kurzem konnte die Biosynthese des Nocathiacins aufgeklärt und die für die Synthese des Zuckers verantwortlichen Gene identifiziert werden.<sup>[136]</sup> Durch Deletionsmutationen wäre demnach die Biosynthese des Nocathiacin-Aglykons möglich, um den Einfluss des Zuckers auf die biologische Wirkung genauer zu untersuchen.

Das zur Serie *d* gehörige Pyridin-Thiopeptid Micrococcin **7** weist ebenfalls einen sehr ähnlichen A-Ring auf, jedoch fehlt diesem Molekül an der Position des Thstn-Restes des Thiostreptons ein Rest mit Hydroxylgruppe(n). Stattdessen befindet sich hier ein Valin. Außerdem fehlt Micrococcin ein B-Ring oder eine vergleichbare Indolbrücke. Nach unseren Erkenntnissen müsste der A-Ring durch diese fehlende Stabilisierung eine Konformation einnehmen, die ungünstig für die Bindung an den L11/rRNA-Komplex wäre. Außerdem kann bei gleicher Bindegeometrie keine stabilisierende Wasserstoffbrücke zwi-

### 3. Wirkort: Ribosom



**Abb. 3.10.** Strukturen der Hydroxypyridin-Thiopeptide (Serie e)<sup>[26]</sup> Nosiheptid **5** und Nocathiacin I **8**, des Aminoglykosids Gentamicins C1A **82** und des Pyridin-Thiopeptids Micrococin **7** (Serie d). Die Position der  $\gamma$ -Hydroxylgruppe des Nosiheptids **5**, die beiden Methylaminozucker des Nocathiacins I **8** und des Gentamicins C1A **82** sind hervorgehoben. Nummerierung der Zuckerreste I–III.

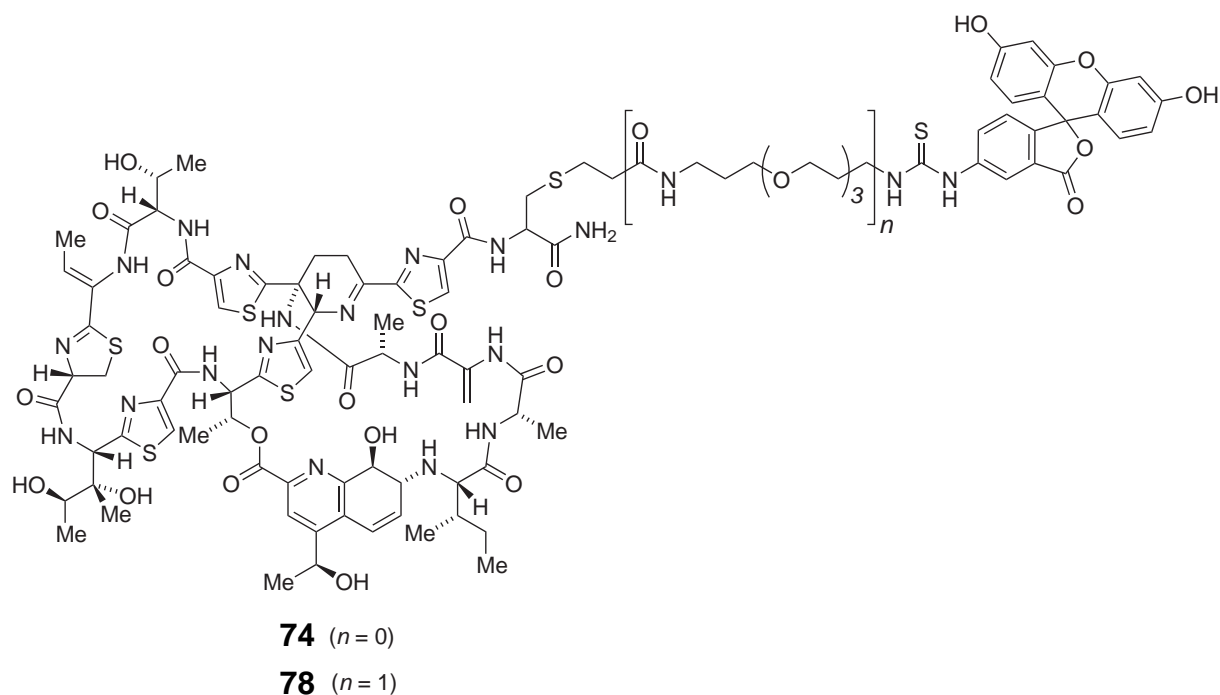
schen dem Valin-Rest (Thstn-Position) und der rRNA ausgebildet werden. Zusammengekommen müsste Micrococcin demnach relativ schlechte Bindeeigenschaften besitzen. Tatsächlich zeigte Micrococcin 7 in unseren biochemischen Assays Werte, die mit acetyliertem Thiostrepton 61 vergleichbar sind. Andere Studien legen nahe, dass Micrococcin zwar an die gleiche Stelle wie Thiostrepton und Nosiheptid bindet, aber eine deutlich abweichende Bindegeometrie aufweist, wobei das Molekül gegenüber Thiostrepton um ca. 180° gedreht zu sein scheint und vermutlich mit der Seitenkette in den Spalt zwischen Protein und rRNA hineinragt.<sup>[30]</sup> Dies könnte die ungewöhnlichen biochemischen Eigenschaften von Micrococcin erklären.

## 3.5. Anwendungen der fluoreszenten Thiostrepton-Sonde

Wie in vorhergehenden Kapiteln bereits beschrieben, setzten wir die PEG-Fluorescein-Thiostreptonsonde 74 (Abbildung 3.11) erfolgreich in Untersuchungen zur Bindungsaffinität der Thiostreptonderivate an die ribosomale GTPase-assoziierte Region (Kapitel 3.3.1) und in der Fluoreszenzmikroskopie zur Lokalisierung zellulärer Zielstrukturen ein (Kapitel 4.2.2).

Neben der Polyethylenglykol-*Linker* verbrückten Fluorescein-Sonde 74 synthetisierten wir zusätzlich Fluorescein-Thiostreptonsonde 78, die nur über eine Ethaneinheit als *Linker* verfügte (Abbildung 3.11). Sie zeichnete sich durch einen kürzeren Syntheseweg, eine leichtere Reinigung und durch eine verbesserte Lagerfähigkeit aus. In Verdrängungstitrationen erhielten wir bei Verwendung der PEG-Fluorescein-Sonde 74 oder der Fluorescein-Sonde 78 vergleichbare Ergebnisse. Für die kürzere Fluorescein-Sonde 78 bestimmten wir eine Dissoziationskonstante  $K_D$  von 0.33 nM an den dimeren L11/23S rRNA-Komplex ((0.14 nM für PEG-Fluorescein-Sonde 74). Dies bedeutete eine Verringerung der Affinität um ungefähr die Hälfte, jedoch lag der  $K_D$  noch immer im Bereich der Ausgangsverbindung Thiostreptons 3 (0.20 nM).

### 3. Wirkort: Ribosom



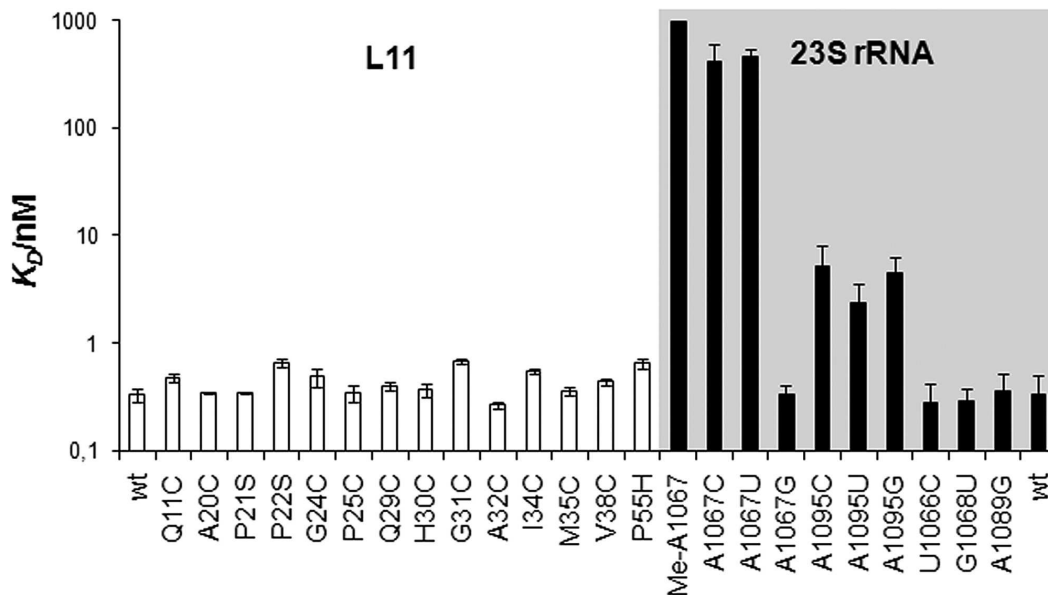
**Abb. 3.11.** Strukturen der beiden fluoreszenten Thiostreptonsonden **74** und **78**.

#### 3.5.1. Untersuchungen von Thiopeptid-Resistenzmutationen

Mit Hilfe der Fluorescein-Sonde **78** wurden unter Anwendung des Fluoreszenz-Anisotropie-Assays verschiedene Resistenz-Mutationen des L11-Proteins bzw. der 23S rRNA untersucht (vgl. Kapitel 3.3.1). Hierbei konnte der Einfluss jeder einzelnen Mutation auf die Bindungseigenschaften der Thiopeptide quantifiziert werden. Die Untersuchungen wurden von Dr. Sascha Baumann durchgeführt und sind in seiner Dissertation ausführlich beschrieben und werden an dieser Stelle nur kurz zusammengefasst.<sup>[117,126]</sup>

Die bisher beschriebenen Resistenzmutationen gegen Thiopeptide umfassen das L11-Protein und die rRNA (Nukleotide A1067 und A1095). Der Thiostrepton-Produzentenstamm verfügt darüber hinaus über eine spezifische Methyltransferase, die die 2'-O-Methylierung des Nukleotids A1067 katalysiert, und den Stamm resistent gegenüber Thiostrepton macht (vgl. Kapitel 3.4.3).<sup>[130]</sup> Bisher waren die Beiträge der einzelnen Mutationen zur Resistenzwirkung und die molekulare Grundlage nicht detailliert bekannt.

Eine graphische Zusammenfassung der quantitativen Bindedaten, die mit Hilfe der



**Abb. 3.12.** Bindedaten der Fluorescein-Sonde **78** an L11-Protein- und rRNA-Mutanten. Die  $K_D$ -Werte [nM] sind logarithmisch aufgetragen.

Fluorescein-Sonde **78** für die verschiedenen Mutationen erhalten werden konnten, ist in Abbildung 3.12 dargestellt. Die 2'-O-methylierte RNA (A1067) zeigte einen drastischen Rückgang der Bindeaffinität, wodurch die hohe Wirksamkeit der Methylierung *in vitro* bestätigt wurde. Hohe Rückgänge der Affinität wurden ebenfalls für die Mutanten A1067C und A1067U verzeichnet, während A1067G fast keinen Einfluss auf die Affinität hatte. Auch Mutationen des Nukleotids A1095 resultierten in einem Rückgang der Affinität, allerdings weitaus geringerer als bei A1067. Mutationen der rRNA in direkter Nachbarschaft zu den Nukleotiden A1067/A1095 hatten keine starken Effekte. Die Ergebnisse spiegeln die postulierten Hauptinteraktionspartner des Thiostreptons **3** auf rRNA-Ebene wider.

Die Analyse von 14 verschiedenen Punktmutationen des L11-Proteins kam zu dem überraschenden Ergebnis, dass keine der Proteinmutationen signifikanten Einfluss auf die Bindeeigenschaften von Thiostrepton oder Nosiheptid zeigte (Abbildung 3.12). Dies konnte sowohl an dem isolierten L11/rRNA-Komplex als auch an 70 S Gesamt-Ribosomen gezeigt werden. Nichtsdestotrotz konnte die Resistenzwirkung dieser L11-Mutationen für Thiostrepton und Nosiheptid *in vivo* bei *Bacillus subtilis* beobachtet werden. Das bedeutet, dass im Fall der Proteinmutationen die Resistenzwirkung nicht durch eine redu-

### 3. Wirkort: Ribosom

---

zierte Bindungsaffinität verursacht werden kann, sondern dass andere Effekte eine Rolle spielen.

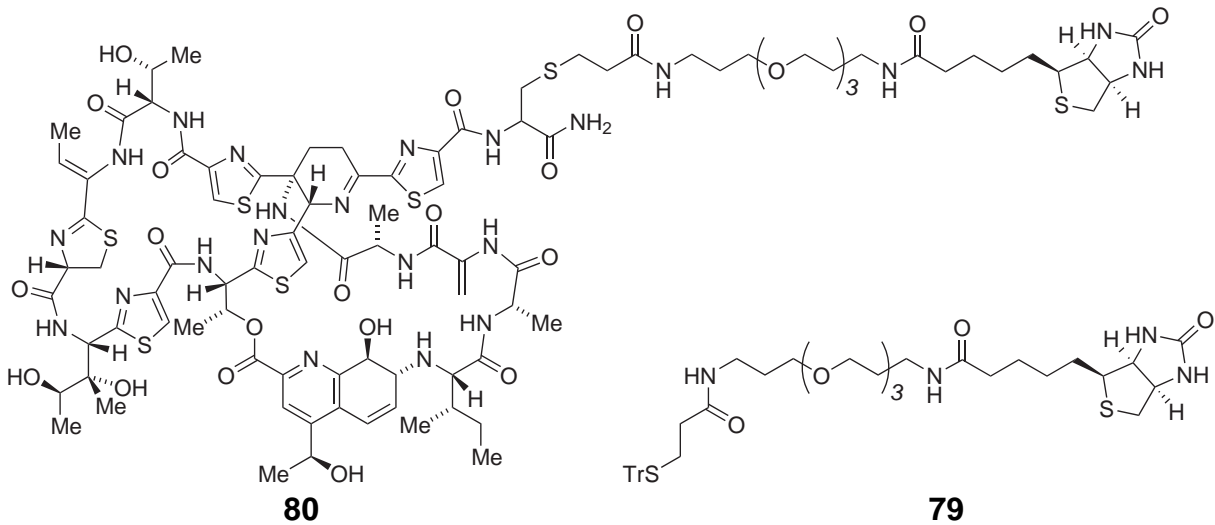
Die bityklischen Thiopeptide Thiostrepton und Nosiheptid bewirken eine funktionale Blockade der GTPase-assoziierten Region des Ribosoms, indem sie durch Binden an den L11/rRNA-Komplex dessen Flexibilität einschränken und die korrekte Wechselwirkung mit den Translationsfaktoren unterbinden. Der Grund für die beobachtete Resistenzwirkung der Proteinmutationen bei uneingeschränkter Bindungsaffinität könnte vermutlich darin liegen, dass die Mutationen eine erhöhte strukturelle Flexibilität des L11-Proteins bewirken. Mit dessen Hilfe könnte die Blockade, die ansonsten durch das Binden der bityklischen Thiopeptide ausgelöst wird, umgangen werden. Die Mutationen des L11-Proteins würden nach diesem Modell die Bindung der bityklischen Thiopeptide Thiostrepton und Nosiheptid nicht *a priori* verhindern, sondern zusätzliche strukturelle Flexibilität des L11-Proteins erzeugen, die das Ribosom »immun« gegen die Auswirkungen der Thiopeptidbindung werden lässt.

Für das monozyklische Thiopeptid Micrococcin 7 wurden hiervon abweichende Ergebnisse erhalten. Die L11-Proteinmutation P25C konnte die Bindung des Micrococcins an den L11/rRNA-Komplex verhindern, was durch Titrationsexperimente mit der Fluorescein-Sonde 78 untersucht wurde. Interessanterweise ist eben diese Mutation bei dem Micrococcin-Produzentenstamm *Bacillus cereus* anzutreffen. Die unterschiedliche Wirkung der Proteinmutation P25C auf die Bindungsaffinität der bityklischen Thiopeptide auf der einen und des monozyklischen Micrococcins auf der anderen Seite sprechen für die unterschiedlichen Bindemodi der Thiopeptide, wie bereits mehrfach postuliert (Kapitel 3.1).

## 3.6. Anwendungen der Biotinylierten

### Thiostrepton-Sonde

Wie bereits im Kapitel 2.7.2 beschrieben, gelang uns die Semisynthese des PEG-biotinylierten Thiostreptons 80 (Abbildung 3.13). Biotin bindet sehr stark an die Proteine Avidin bzw. Streptavidin mit Dissoziationskonstanten  $K_D$  von ungefähr  $10^{-14}$ –



**Abb. 3.13.** Struktur der Thiostrepton-PEG-Biotinsonde **80** und der «Negativkontrolle» S-trityliertes Biotin-PEG-Konjugat **79**.

$10^{-16}$  M.<sup>[137]</sup> Anwendung findet das System beispielsweise in der Affinitätschromatographie<sup>[137]</sup> und in der Identifizierung von Bindungspartnern im zellulären Kontext durch Affinitätsanreicherung (*Pull-down-Assays*).<sup>[138–140]</sup>

#### 3.6.1. Präparativer Ribosomen-*Pull-down*

In mehreren Experimenten wurde versucht, die PEG-Biotin-Thiostreptonsonde **80** an Streptavidin-funktionalisierte «*Magnetic Beads*» (Dynabeads, Invitrogen) zu immobilisieren, um die zellulären Bindepartner des Thiostreptons in einer Affinitätsanreicherung zu erhalten (*Pull-down-Ansatz*). Die Versuche wurden von Dr. Sascha Baumann durchgeführt und sind in seiner Dissertation beschrieben.<sup>[126]</sup> An dieser Stelle werden deshalb nur die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst.

In den SDS-Gelen der verschiedenen *Pull-downs* mit *E. coli*-Lysaten konnten die Komponenten des prokaryotischen Ribosoms fast vollständig durch Vergleich mit isolierten Ribosomen identifiziert werden. Für analytische Zwecke, d. h. für die massenspektroskopische Identifizierung der Bindeproteine hätten die Ergebnisse ausgereicht. Allerdings war die Bindung für eine präparative Nutzung der *Pull-downs* nicht spezifisch genug.<sup>[24]</sup> An dieser Stelle hätten Optimierungsschritte folgen müssen, z. B. die Änderung der PEG-Verbindungseinheit (*Linker*). Die affinitätschromatographische Isolierung von funk-

### 3. Wirkort: Ribosom

---

tionalen Ribosomen konnte jedoch zur gleichen Zeit durch die Verwendung von Cystein-modifizierten Affinitätssäulen gelöst werden, so dass die Strategie der *Biotin-Pull-downs* zur präparativen Isolierung nicht weiter verfolgt wurde.<sup>[126]</sup>

#### **3.6.2. Analytischer Ribosomen-*Pull-down***

Darüber hinaus wurde versucht, mit Hilfe der Biotin-Thiostreptonsonde **80** bisher unbekannte zelluläre Zielkomponenten (*targets*) des Thiostreptons zu finden (Dr. Sascha Baumann). Zu diesem Zweck wurden *Pull-down*-Experimente mit eukaryotischen Zelllysaten (Hela-Zellen) durchführt.<sup>[126]</sup> In den SDS-Gelen konnten jedoch keine Proteinbanden ausfindig gemacht werden, die eine Identifizierung ermöglicht hätten. Aufgrund unserer heutigen Kenntnis, dass Thiostrepton **3** auch das eukaryotische Proteasom bindet (Kapitel 4), hätte man die Identifizierung von Proteasomuntereinheiten erwarten können. Für die negativen Ergebnisse des *Pull-down*-Experiments könnten mehrere Gründe verantwortlich sein. Evtl. ist die Bindungsaffinität der Biotin-Thiostreptonsonde **80** an die Proteasomuntereinheiten zu gering (mikromolar, vgl. Kapitel 4), so dass keine spezifische Bindung entdeckt werden konnte. Ebenso könnte die Biotinylierung der Seitenkette des Thiostreptons die Bindeeigenschaften der Sonde an das Proteasom negativ beeinflussen.

#### **3.6.3. Affinitäts-Elektronenmikroskopie**

Ein weiterer Verwendungszweck beinhaltet den Einsatz der Sonde in der Elektronenmikroskopie. Spezifische Binderegionen des Thiostreptons innerhalb von Zellen oder Geweben können visualisiert werden, indem die gebundene Biotin-Sonde mit (Strept)Avidinmarkierten Goldpartikeln zur Elektronenmikroskopie kenntlich gemacht wird. Als Negativkontrolle dient jeweils das S-Trityl-geschützte PEG-Biotin **79** (Abbildung 3.13). Erste Untersuchungen wurden bereits in der Gruppe um Priv.-Doz. Dr. Gabriele Pradel (Universität Würzburg) an Plasmodien-Präparaten durchgeführt.



## **4. Wirkort: Proteasom**

«*One sometimes finds what one is not looking for.*»

---

(Sir Alexander Fleming, 1881–1955)

## 4.1. Einleitung

### 4.1.1. Malaria

Mit geschätzten 240 Mio. Malariaerkrankungen<sup>a</sup> und 860 000 Todesfällen jährlich stellt Malaria noch immer eine der bedrohlichsten Infektionserkrankungen weltweit dar. Insgesamt leben mehr als 3 Mrd. Menschen in Malaria gefährdeten Gebieten, die meisten hiervon in ärmeren Ländern. 85 % der Todesfälle sind bei Kindern unter 5 Jahren zu vermeiden. Malaria wird durch intrazelluläre einzellige Parasiten der Gattung *Plasmodia* verursacht. Von den über 100 bekannten Arten sind vier als humanpathogen einzustufen: *P. falciparum*, als gefährlichster Erreger der *Malaria tropica*, *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae*. Die meisten Malaria Erkrankungen (~ 95 %) gehen auf das Konto der Erreger *P. falciparum* und *P. vivax*. Von einer fünfte Art, der *P. knowlesi*, die vorrangig Affen befällt, ist bekannt, dass sie ebenfalls Menschen infizieren kann.

### Resistenzentwicklung

Mit dem vermehrten Einsatz von Antimalariamedikamenten ist es in der Vergangenheit unablässig zu Resistenzentwicklungen bei den Erregern gegen jegliche Art von Antimalariamittel gekommen.<sup>[141]</sup> Die Artemisinine stellen zur Zeit die effektivste Waffe im Kampf gegen Malaria dar (Kapitel 4.1.2). Von der WHO wird gegenwärtig die sogenannte Kombinationstherapie<sup>b</sup> empfohlen, um einer Resistenzentwicklung vorzubeugen (Kapitel 4.1.5). Diese Therapie kombiniert einen Artemisinin-basierten Wirkstoff mit einem anderen Wirkstoff, der einen gänzlich abweichenden Wirkmechanismus besitzt. Trotz

---

<sup>a</sup> World Health Organization: World Malaria Report 2009.

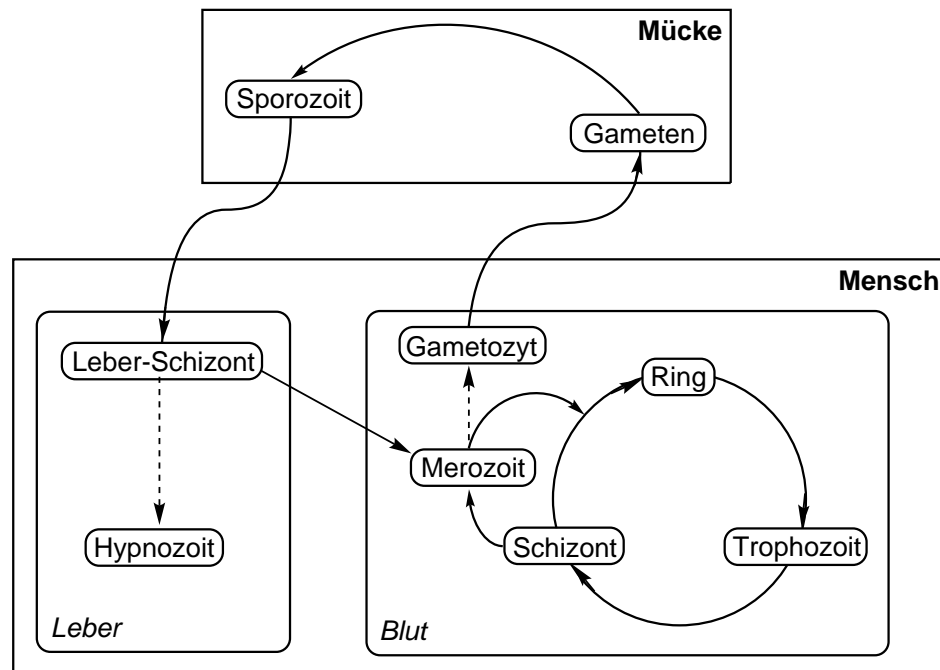
<sup>b</sup> World Health Organization: Guidelines for the Treatment of Malaria, 2nd ed., 2010.

der Gefahr der Resistenzentwicklung werden in einigen Ländern Monotherapien mit Artemisininen verabreicht. Erste Anzeichen von verminderter Empfindlichkeit gegenüber dieser neuesten und zur Zeit effektivsten Klasse an Antimalariamitteln wurde vor kurzem beobachtet.<sup>[142]</sup> Seit dem Jahr 1996 ist keine neue Klasse von Antimalariamitteln in die klinische Anwendung gekommen.<sup>[141]</sup> Diese Tatsachen unterstreichen die Wichtigkeit, weiter neue Antimalariawirkstoffe zu entwickeln.

### Lebenszyklus der Plasmodien

Malaria wird durch die weiblichen Mücken der Gattung *Anopheles* übertragen. Der Lebenszyklus der Plasmodien beinhaltet einen Wirtswechsel, wobei der Mensch den Zwischenwirt darstellt (Abbildung 4.1). Durch den Stich einer infizierten Mücke werden die Plasmodien im Stadium der Sporozoiten (15–20) in die Blutbahn des Menschen übertragen. Sie gelangen in die Leber und befallen hier zuerst Hepatozyten, in denen sie zu Leberschizonten ausdifferenzieren und sich vermehren. Es entstehen 10 000–30 000 Merozoiten, die nach ein bis zwei Wochen durch Aufplatzen des Schizonten in die Blutbahn abgegeben werden. Bei *P. vivax* und *P. ovale* entstehen als Ruhestadien sog. Hypnozoiten in der Leber, die auch noch nach Monaten bzw. Jahren Rückfälle verursachen können. Die Schizonten dringen in Erythrozyten ein und reifen über das Ringstadium zu Trophozoiten heran. Diese vermehren sich durch Teilung in (Blut-) Schizonten, die durch Aufplatzen des Erythrozyten wieder 16–32 Merozoiten in die Blutbahn freisetzen können. Die Schizonten befallen weitere Erythrozyten, wodurch ein neuer Erythrozyten-Zyklus beginnt. Vom Befallen des Erythrozyten bis zum Freisetzen der Merozoiten vergehen bei *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. ovale* etwa zwei Tage (48 h). Einige wenige Merozoiten verwandeln sich in Gametozyten, die im Blut zirkulieren, dann von einer Mücke während ihrer Blutmahlzeit aufgenommen werden und sich im Darm der Mücke geschlechtlich fortpflanzen. Es entstehen mehrere Tausend Sporozoiten, die in die Speicheldrüsen der Mücke wandern, um von dort beim nächsten Stich in das Blut des Menschen zu gelangen.

#### 4. Wirkort: Proteasom

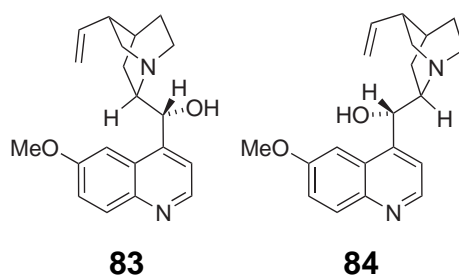


**Abb. 4.1.** Schematische Darstellung des Lebenszyklus der Plasmodien. Es findet ein Wirtswechsel zwischen Mücke und Mensch statt. Die geschlechtliche Vermehrung geschieht ausschließlich in der Mücke. Modifiziert nach Schlitzer<sup>[143]</sup>.

#### 4.1.2. Klinisch relevante Antimalariaverbindungen

Obwohl Malaria eine der ersten beschriebenen Infektionskrankheiten ist und für große Teile der Welt noch immer ein großes Gesundheitsproblem darstellt, gibt es nur wenige Antimalariawirkstoffe, die sich zur Therapie und Prophylaxe eignen. Malaria war die erste Krankheit, die mit einer isolierten Reinsubstanz behandelt wurde (Chinin). Sowohl die Wirkmechanismen als auch die Resistenzmechanismen sind für viele Substanzen noch nicht eingehend bekannt. Die heute eingesetzten Wirkstoffe können folgenden Substanzklassen zugeordnet werden:

- 4-Aminochinoline
- Arylaminoalkohole
- 8-Aminochinoline
- Artemisinine
- Antifolate
- Hemmstoffe der Atmungskette



**Abb. 4.2.** Struktur der Naturstoffe Chinin **83** und des diastereomeren Chinidins **84** aus der Rinde des Chinarindenbaums.

- Antibiotika

### Der Naturstoff Chinin als Ausgangspunkt

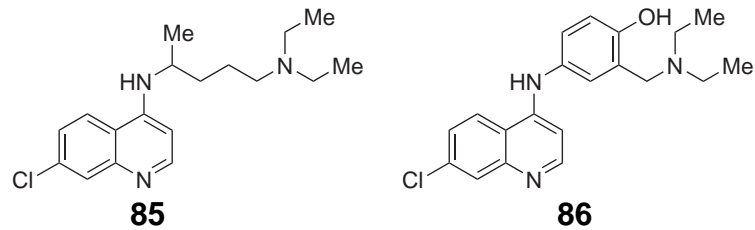
Die Antimalariaeigenschaften der Rinde des südamerikanischen Chinarindenbaums (*Cinchona*) waren lange Zeit bekannt. Anfang des 19. Jahrhunderts wurde das Alkaloid Chinin **83** erstmals durch Alkoholextraktion aus der Rinde isoliert (Abbildung 4.2). Neben Chinin **83** enthält die Rinde das Diastereomer Chinidin **84**. Bis in die 1940er Jahre war Chinin der wichtigste und effektivste Antimalariawirkstoff, bis es durch synthetische Substanzen abgelöst wurde. Auch heute wird Chinin **83** noch häufig bei unkritischen Malariaerkrankungen eingesetzt. Anfang des 20. Jahrhunderts wurden zahlreiche Versuche unternommen, synthetischen Zugang zu aktiven Substanzen zu finden, die sich von der Grundstruktur des Chinins **83** ableiteten. Die Wirkweise des Chinins ist bisher nicht im Detail verstanden. Man geht davon aus, dass Chinin einen sehr ähnlichen Wirkmechanismus aufweist wie die verwandte Verbindung Chloroquin **85** (*vide infra*).

### 4-Aminochinoline

Gemeinsames Strukturmerkmal der Wirkstoffe innerhalb der Gruppe der 4-Aminochinoline ist neben der Aminogruppe in der 4-Position, die durch eine basische Seitenkette funktionalisiert ist, der Chlorsubstituent in der 7-Position des Chinolinrings. Der wichtigste Vertreter der Aminochinoline ist das Chloroquin **85** (Abbildung 4.3), das in großem Umfang eingesetzt wurde, da es sehr effektiv gegen Malariaerreger wirkte und kostengünstig zu synthetisieren war. Erst mit Aufkommen erster Resistenzen bei *P. falciparum*

#### 4. Wirkort: Proteasom

---

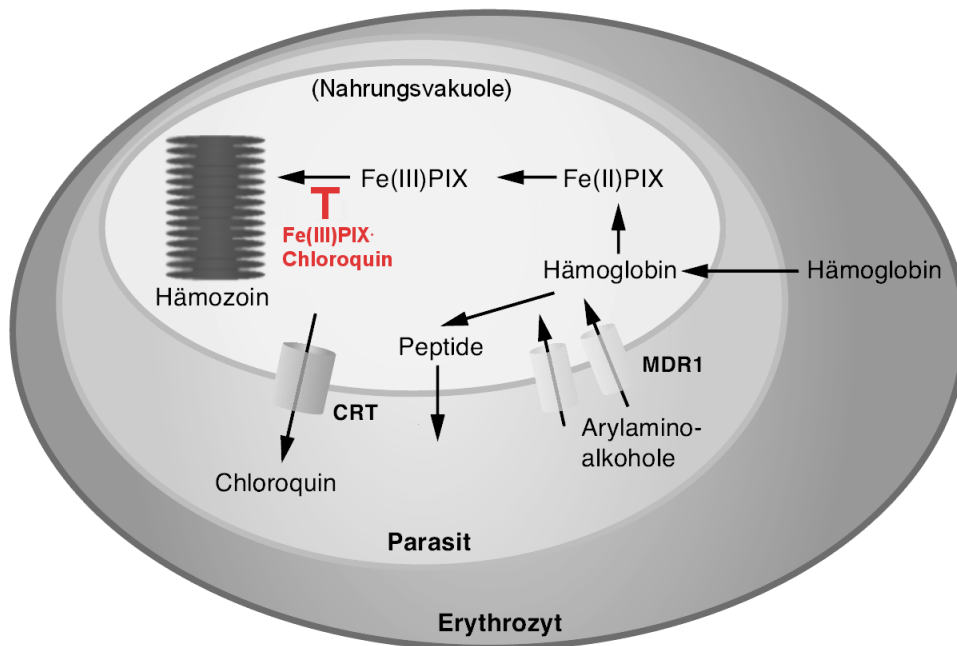


**Abb. 4.3.** Struktur der 4-Aminochinoline Chloroquin **85** und Amodiaquin **86**.

in den 1960er Jahren sank der therapeutische Wert dieser Substanz.

Trotz seiner großen Bedeutung und der schon langen Bekanntheit des Chloroquins **85** herrscht keine vollständige Klarheit über den Wirkmechanismus dieser Antimalariasubstanz. Einig ist man sich darüber, dass die Verbindung den Stoffwechsel des Hämoglobins innerhalb des Parasiten stört. Die Erreger nehmen Hämoglobin aus dem Cytosol des Wirts-Erythrozyten auf und schleusen es in eine spezielle Vakuole, die sogenannte Nahrungsvakuole (*digestive vacuole*, Abbildung 4.4). Dort angekommen wird die Proteinkomponente des Hämoglobins abgebaut, wobei die Aminosäuren bzw. Peptide zur Wiederverwertung im Parasitenstoffwechsel aus der Vakuole transportiert werden, während das Eisenatom des Häms zu Fe(III) oxidiert wird, so dass Ferriprotoporphyrin IX (FPIX) entsteht. FPIX stellt für den Parasiten in seiner freien Form eine toxische Verbindung dar, die unter normalen Umständen aggregiert und die sichtbaren Malariapigmente (Hämozoin) bildet.<sup>[144]</sup> Der Grund für die Toxizität ist bislang unklar. Der pH-Wert der Nahrungsvakuole liegt bei etwa pH 5, so dass Chloroquin **85** als Dikation vorliegt und die Vakuole nicht mehr verlässt. Es akkumuliert deshalb in der Vakuole und weist hier eine erhöhte Konzentration gegenüber dem Cytosol auf. Chloroquin **85** bildet einen Komplex mit FPIX und verhindert auf diese Weise seine Aggregation zum Hämozoin. Der Chloroquin-FPIX-Komplex seinerseits interagiert wahrscheinlich mit einer noch zu identifizierenden Membranstruktur und löst dadurch die Ausschüttung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus, so dass Transportvesikel, die Hämoglobin zur Nahrungsvakuole transportieren, vorzeitig fusionieren.<sup>[145]</sup> Abweichende Theorien gehen davon aus, dass der Chloroquin-FPIX-Komplex in das Cytosol gelangen kann, und dort die Aktivität verschiedener Enzyme inhibiert.<sup>[146]</sup>

Durch den übermäßigen Einsatz des Chloroquins **85** als Antimalariawirkstoff sind bei



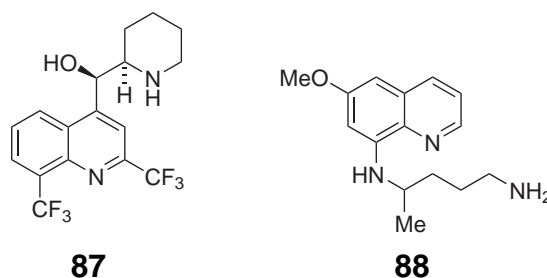
**Abb. 4.4.** Vorgeschlagener Wirkmechanismus des Chloroquins **85**. Adaptiert nach Schlitzer<sup>[143]</sup>

*P. falciparum* Resistenzen gegen 4-Aminochinoline in vier unterschiedlichen Regionen der Welt unabhängig voneinander entstanden. Die Verbreitungsgebiete resistenter Stämme erstrecken sich heute beinahe auf das gesamte Verbreitungsgebiet der Malaria. Die Resistenz wird von einer Punktmutation (K76T) des Chloroquin-Resistenz-Transporters (CRT) bedingt, der sich in der Membran der Nahrungsvakuole befindet.<sup>[147]</sup> Seine eigentliche physiologische Bedeutung ist noch unbekannt. Durch den Austausch des in der Seitenkette positiv geladenen Lysins gegen ein Threonin wird scheinbar die Abstoßung des dikationischen Chloroquins **85** aufgehoben und der Transport der Substanz über die Membran der Nahrungsvakuole hinaus ermöglicht.<sup>[148]</sup>

Ein weiteres wichtiges der 4-Aminochinolin ist das Amodiaquin **86** (Abbildung 4.3). Diese vom Chloroquin abgeleitete Verbindung besitzt einen Phenylsubstituenten an der 4-Aminogruppe. Amodiaquin zeigt gegenüber leicht Chloroquin-resistenten Stämmen noch Wirkung, kann jedoch ebenfalls nicht mehr gegen hochgradig Chloroquin-resistente Erreger eingesetzt werden. Bei präventiver Applikation über mehrere Wochen können gefährliche Leberschäden als Nebeneffekt auftreten. Als preisgünstige Antimalariaverbindung wird Amodiaquin **86** heute noch in Entwicklungsländern, v. a. in der Kombina-

#### 4. Wirkort: Proteasom

---



**Abb. 4.5.** Struktur des Arylaminoalkohols Mefloquin **87** und des 8-Aminochinolins Primaquin **88**.

tionstherapie, eingesetzt (Kapitel 4.1.5).

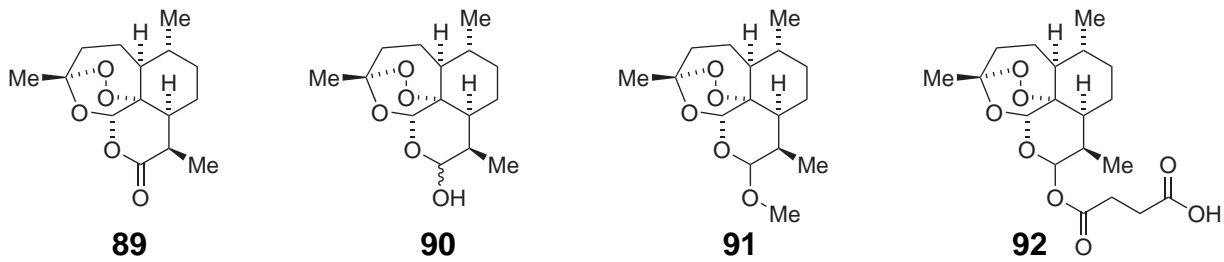
#### Arylaminoalkohole

Wichtigster Vertreter der Arylaminoalkohole ist das Mefloquin **87**, welches sich strukturell vom Chinin **83** ableitet. Es wird als *erythro*-Racemat eingesetzt und zeigt Aktivität im nanomolaren Bereich gegen Chloroquin-resistente Stämme. Aufgrund des weitverbreiteten Einsatzes v. a. in Asien haben sich in den letzten Jahren vermehrt Resistenzen gegen Mefloquin **87** herausgebildet. Diese beruhen auf einer Zunahme der Wildtyp-Kopien des MDR1-Transporters (MDR: *multiple drug resistance*), der sich in der Membran der Nahrungsvakuole befindet und Substanzen aus dem Cytosol in die Vakuole transportiert. Der Wirkmechanismus der Arylaminoalkohole ist nicht vollständig bekannt, wahrscheinlich interagieren die Substanzen mit der selben (noch nicht identifizierten) Membranzielstruktur der 4-Aminioquinoline. Allerdings kommt es hierbei zu einer inhibierten Ca<sup>2+</sup>-Ausschüttung, so dass die Hämoglobin-Vesikel nicht mit der Nahrungsvakuole fusionieren können. Der prophylaktische Einsatz von Mefloquin **87** zeigt in 5–29 % der Fälle psychische Nebenwirkungen, wie beispielsweise Schlafstörungen, Depression oder Panikattacken. Neuere Studien legen nahe, dass das (-)-*Erythro*-Diastereomer für diese Nebenwirkungen verantwortlich sein könnte.<sup>[149]</sup> Das stereoisomerenreine (+)-Mefloquin befindet sich deshalb z. Zt. in präklinischer Evaluierung.

#### 8-Aminochinoline

Charakteristisch für die Wirkstoffe der 8-Aminochinoline sind die Aminoalkylkette in 8-Position und die Methoxygruppe in der 6-Position. Der wichtigste Antimalariawirkstoff





**Abb. 4.6.** Struktur des Artemisinins **89** und dessen Derivate Dihydroartemisinin **90**, Artemether **91** und Artesunat **92**.

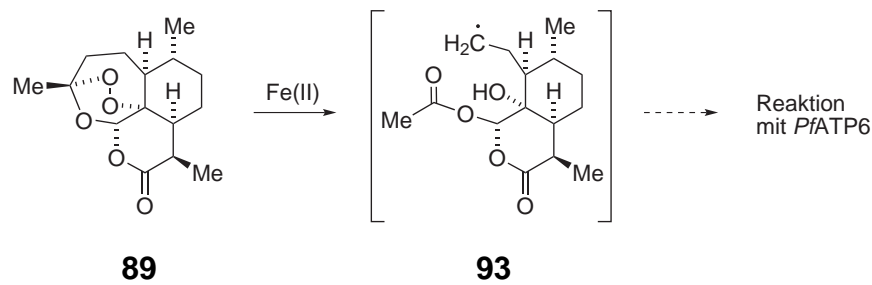
dieser Gruppe ist das Primaquin **88** (Abbildung 4.5), das 1952 eingeführt wurde. Es unterscheidet sich von anderen Wirkstoffen darin, dass es gegen alle Leberstadien der Plasmodien wirksam ist. Eingesetzt wird es zur vollständigen Eliminierung der Hypnozoiten (hepatische Dauerform) bei Infektionen mit *P. vivax* und *P. ovale*. Der Wirkmechanismus der 8-Aminoquinoline ist noch nicht vollständig geklärt.

### Artemisinine

Extrakte des einjährigen Beifußes (*Artemisia annua*) wurden schon in der traditionellen chinesischen Medizin zur Behandlung von Fieber und Malaria verwendet. Im Jahr 1971 wurde hieraus der besonders aktive Antimalariawirkstoff Artemisinin **89** isoliert (Abbildung 4.6). Strukturell handelt es sich um ein Sesquiterpenlacton, das sich durch eine auffällige 1,2,4-Trioxan-Substruktur auszeichnet. Dieses Endoperoxid ist für die Antimalaria-Aktivität des Naturstoffs essentiell. Als Antimalaria-Wirkstoffe werden aber vor allem semisynthetische Derivate des Artemisinins **89** verwendet, da der Naturstoff in wässrigen Medien schlecht löslich ist. Durch Reduktion des Laktons gelangt man zum Halbacetal Dihydroartemisinin **90**, welches durch Methylierung in das Vollacetal «Artemether» **91** überführt werden kann. Darüberhinaus erhält man durch Veresterung mit Bernsteinsäure das Artesunat **92**, welches deutlich wasserlöslicher ist als der Naturstoff Artemisinin **89** und deshalb oral bzw. intravenös verabreicht werden kann.

Artemisinine wirken vorrangig gegen die Ringstadien der Erreger und stellen die am schnellsten wirkenden und effektivsten Wirkstoffe dar, die zur Zeit bekannt sind. Der Wirkmechanismus der Artemisinine wurde kontrovers diskutiert. Es scheint sich jedoch herauszukristallisieren, dass das Endoperoxid im Cytoplasma Fe(II)-katalysiert gespalten

## 4. Wirkort: Proteasom



**Abb. 4.7.** Vorgeschlagener Wirkmechanismus der Artemisinine. Die Struktur eines möglichen reaktiven C-Radikals des Artemisinins **89** nach Fe(II)-katalysierter Reaktion ist gezeigt.

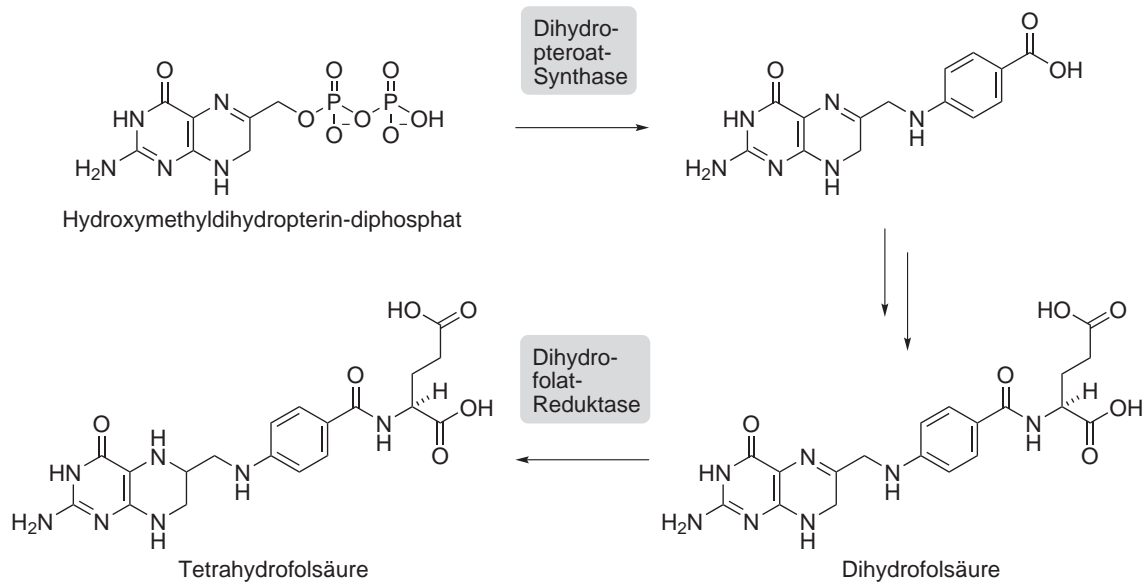
wird, und dass ein reaktives C-Radikal (z. B. **93**) selektiv die ATP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe PfATP6 des Endoplasmatischen Reticulums inhibiert (Abbildung 4.7).<sup>[150]</sup>

### Antifolate

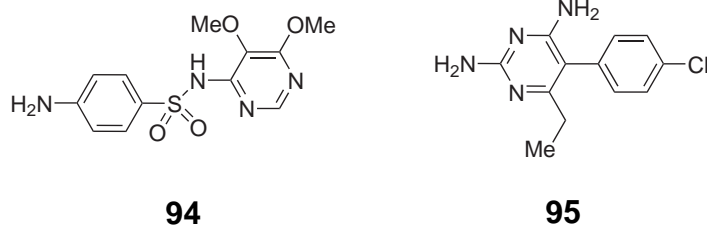
Während Folsäure (Vitamin B<sub>9</sub>) vom Menschen ständig mit der Nahrung aufgenommen werden muss, besitzen viele Mikroorganismen wie z. B. Bakterien und Plasmodien den kompletten Biosyntheseweg, um Folsäure aus einfachen Vorstufen aufzubauen. Die beiden Schlüsselenzyme dieses Stoffwechselwegs Dihydropteroatsynthase (DHPS) und Dihydrofolatreduktase (DHFR) werden schon seit langem als Zielstrukturen für verschiedene Antiinfektiva gegen Bakterien und Plasmodien genutzt (Abbildung 4.8). Die DHPS fehlt bei Menschen gänzlich, während die bakterielle bzw. plasmodiale DHFR strukturell hinreichend verschieden zur DHFR des Menschen ist. In der Therapie werden häufig Inhibitoren beider Enzyme synergistisch angewandt. Die Kombination aus dem DHPS-Inhibitor Sulfadoxin **94** und dem DHFR-Inhibitor Pyrimethamin **95** wird beispielsweise zur Behandlung von Plasmodieninfektionen herangezogen. Für beide Inhibitoren sind mittlerweile Resistenzen bekannt, die durch Punktmutationen in den jeweiligen Enzymen entstehen und eine verminderte Affinität des Enzyms zum Inhibitor bewirken.

### 4.1.3. Wirkung klassischer Antibiotika auf Plasmodien

Viele Antibiotika zeigen starke antiplasmodiale Wirkung. Diese Tatsache erscheint auf den ersten Blick verwunderlich, da Antibiotika eigentlich spezifisch auf prokaryotische (bakterielle) Strukturen einwirken. Der scheinbare Widerspruch kann dadurch erklärt



**Abb. 4.8.** Ausschnitt des Biosynthesewegs der Tetrahydrofolsäure. Die beiden Schlüsselenzyme Dihydropteroylsynthase (DHPS) und Dihydrofolatreduktase (DHFR) sind das Ziel einiger Antibiotika und Antimalaria-Mittel.



**Abb. 4.9.** Struktur der Antifolate Sulfadoxin **94** (Dihydropteroylsynthase-Inhibitor) und Pyrimethamin **95** (Dihydrofolatreduktase-Inhibitor).

#### 4. Wirkort: Proteasom

---

werden, dass Plasmodien zwei Organellen besitzen, die prokaryoten-ähnlich sind. Dies sind die Mitochondrien und die Apicoplasten. Während die Mitochondrien in nahezu jeder eukaryotischen Zelle vorhanden sind und nach der Endosymbiontentheorie prokaryotischen Ursprungs sind,<sup>[151]</sup> ist die Identität des Apicoplasten erst seit 10–15 Jahren bekannt.<sup>[152,153]</sup> Sein evolutiver Ursprung ist zur Zeit noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Obwohl die Mitochondrien als antibiotischer Wirkort bei Plasmodien diskutiert wurden, scheinen alle heute bekannten Antibiotika ihre Wirkung am Apicoplasten zu entfalten.<sup>[143,154]</sup>

#### **Der Apicoplast als Organell der *Apicomplexa***

Der Apicoplast ist ein charakteristisches Organell der Vertreter des Stamms (*Phylum*) der *Apicomplexa* (früher auch *Sporozoa*: Sporentierchen). Zu den Apicomplexa gehören mehrere tausend Arten einzelliger eukaryotischer Parasiten, unter ihnen die wichtigen humanpathogenen Parasiten *Plasmodium* und *Toxoplasma* sowie die tierpathogenen, und deshalb wirtschaftlich bedeutsamen, *Eimeria* (Erreger der Kokzidiose).<sup>[155]</sup> Das Organell enthält ein eigenständiges 35-kb zirkuläres DNA-Molekül, repliziert sich durch Teilung während der Zellteilung der Gesamtzelle und wird durch eine vierfache Membran vom Cytosol abgegrenzt. Aufgrund dieser und anderer Eigenschaften wurde eine sekundäre Endosymbiose als Ursprung der Apicoplasten postuliert, d. h. sie entstanden wahrscheinlich nach Einverleibung eines Plastid-enthaltenden einzelligen Eukaryoten durch einen zweiten Eukaryoten.<sup>[156]</sup> Bei dem Plastid-enthaltenden Eukaryoten handelte es sich wahrscheinlich um eine Rotalge.<sup>[157]</sup> Für die gesamte Gruppe der *Apicomplexa* scheint nur ein einziger endosymbiotischer Vorgang stattgefunden zu haben.<sup>[158]</sup>

Das Apicoplastengenom ist den Chloroplastengenomen heutiger Pflanzen sehr ähnlich, wobei der Apicoplast die Funktion der Photosynthese verloren hat. Im Laufe der Evolution wurden viele prokaryotische Gene in den Gast-Nukleus transferiert, ähnlich wie es auch bei den Mitochondrien der Fall ist, so dass das heutige Apicoplasten-Genom nur noch 35-kb an DNA enthält. Dieses reduzierte Genom codiert für ungefähr 30 Proteine, während bis zu 500 weitere Proteine ( $\approx 10\%$  des gesamten Proteoms) kern-codiert sind und in den Apicoplasten importiert werden (NEAT-Proteine: *nuclear-encoded apicoplast-*

*targeted*). Jede Zelle bei *P. falciparum* enthält nur einen Apicoplasten und ein Mitochondrion, die funktional und auch räumlich eng miteinander verzahnt sind. Beide Organellen werden «mütterlicherseits» weitervererbt und sind für die Parasiten essentiell.

### Die Funktionen des Apicoplasten

Die Funktionen des Apicoplasten sind Gegenstand aktueller Forschung. Es zeichnet sich ab, dass sein Metabolismus sehr eng mit dem des Cytosols und des Mitochondrions verzahnt ist. Ohne funktionierenden Apicoplasten sind die Parasiten nicht lebensfähig, ein Befund, der noch nicht vollständig erklärt werden kann. Das Organell hat die Fähigkeit zur Photosynthese verloren, behielt aber einige charakteristische prokaryotische Stoffwechselwege bei. Hierzu gehören beispielsweise die Häm-Biosynthese, die Typ II Fettsäurebiosynthese und die Isoprenoidbiosynthese (Übersichtsartikel<sup>[155,159]</sup>).

Da ein funktionierender Apicoplast für das Überleben der Parasiten essentiell ist, bietet er sich als Zielkomponente für die Entwicklung antiplasmodialer Verbindungen an.<sup>[160]</sup> Durch die große Ähnlichkeit zu Prokaryoten könnten viele der etablierten antibakteriellen Antibiotika potentiell auch für einen Einsatz gegen die Parasiten in Frage kommen. Besonders interessant in diesem Zusammenhang ist, dass viele der potentiellen Zielstrukturen (*targets*) beim Menschen nicht vorhanden sind. Die weite Verbreitung und die nahe Verwandtschaft der Apicoplasten innerhalb des *Phylums* der *Apicomplexa*, das eine große Anzahl wichtiger Parasiten umfasst, lassen hoffen, dass antiplasmodiale Verbindungen, die gegen den Apicoplasten entwickelt werden, auch gegen andere parasitäre Vertreter der *Apicomplexa* einsetzbar sind.

### Der *delayed death* Effekt

Schon in den 1950er Jahren wurde die Aktivität verschiedener Antibiotika gegen Plasmodien untersucht.<sup>[161]</sup> Das Interesse an neuen Antimalariaverbindungen war jedoch gering, weil damals noch effektive und kostengünstige Substanzen (z.B. Chloroquin 85) zur Behandlung von Malaria zur Verfügung standen.

In späteren Untersuchungen zur Aktivität der Antibiotika gegen *Apicomplexa*-Parasiten fiel auf, dass sich die Wirksamkeit mancher Substanzen gegen *Toxoplasma gondii*

#### 4. Wirkort: Proteasom

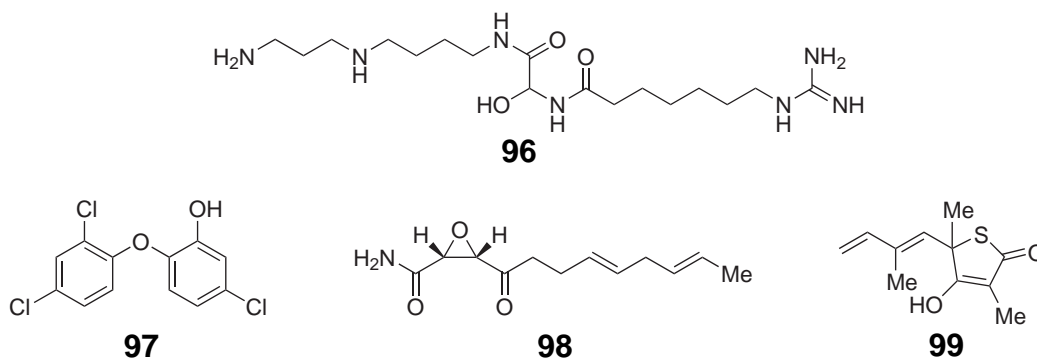
---

mit längeren Expositionszeiten drastisch erhöhte.<sup>[162,163]</sup> Dieser Effekt wird als *delayed death* Effekt bezeichnet. Er ist dadurch definiert, dass zu Beginn relativ hohe Konzentrationen des Antibiotikums nötig sind, um eine moderate Wachstumshemmung nach 48 h zu erreichen, während im darauffolgenden asexuellen Zyklus eine ungefähr 10-fach höhere Sensitivität der mit dem Antibiotikum vorbehandelten Plasmodien zu beobachten ist ( $IC_{50}(48\text{ h}) \geq 10 \times IC_{50}(96\text{ h})$ ).<sup>[154]</sup> Im ersten intrazellulären Zyklus werden typischerweise keine morphologischen Effekte der Antibiotika auf die Parasiten beobachtet. Erst mit Erreichen des zweiten Zyklus, nachdem neue Wirtszellen besiedelt wurden, bleiben die Parasiten auf der Stufe des Schizonten stehen und sterben ab. Der *delayed death* Effekt kann sogar beobachtet werden, wenn das Antibiotikum ausschließlich während des ersten Replikationszyklus (in den ersten 48 h) zugegen ist.<sup>[39]</sup> Auch in diesem Fall sterben die Parasiten im nachfolgenden Replikationszyklus ab.

#### **Wahrscheinlicher Mechanismus des *delayed death***

Es wird angenommen, dass Antibiotika, die einen charakteristischen *delayed death* Effekt zeigen, mit der Proteintranslationsmaschinerie des Apicoplasten interferieren (Tabelle 4.1).<sup>[164]</sup> Nach dieser Theorie bewirkt die Inhibierung der Ribosomen des Apicoplasten, dass das Organell die für den Import der kern-codierten Proteine notwendigen Proteine mittels eigener Translation nicht mehr in genügender Menge herstellen kann. Da die meisten der Apicoplasten-Proteine vom Zellkern codiert werden, und deshalb in das Organell importiert werden müssen, wird der Apicoplast in seiner Funktion massiv beeinträchtigt. Dies führt letztendlich dazu, dass die Parasiten nicht mehr lebensfähig sind. Der Effekt manifestiert sich jedoch nicht sofort, da die Apicoplasten vorerst durch ihre vorhandene Proteinausstattung metabolisch funktional sind. Erst nach Weitergabe der translationsgehemmten Apicoplasten an die nachfolgende Generation, die vermutlich einen erneuten Import von Proteinen verlangt, kommt es zur Ausbildung funktionsunfähiger Apicoplasten. Wahrscheinlich werden die metabolischen Fähigkeiten des Apicoplasten gerade bei der Bildung der Tochter-Zellmembranen auf der Stufe der Schizonten benötigt, da dieser für die Fettsäurebiosynthese verantwortlich ist.

Unterstützt wird diese Theorie des *delayed death* Effekts von Untersuchungen zur



**Abb. 4.10.** Struktur des NEAT-Proteininhibitors 15-Deoxyspergualin **96**, und der FAS-II-Inhibitoren Triclosan **97**, Cerulenin **98** und Thiolactomycin **99**. Alle gezeigten Inhibitoren interferieren mit essentiellen Funktionen des Apicoplasten.

Wachstumshemmung durch das Immunsuppressivum Deoxyspergualin<sup>[165]</sup> (Abb. 4.10, Tabelle 4.1). Es konnte gezeigt werden, dass das Polyamin 15-Deoxyspergualin **96** das *trafficking* von NEAT-Proteinen, d. h. von Proteinen, die im Zellkern codiert sind und in den Apicoplasten importiert werden, im niedrigen nanomolaren Bereich inhibiert.<sup>[166]</sup> In Einklang mit der Hypothese, dass der *delayed death* Effekt durch eine Störung der Importmachinerie des Apicoplasten verursacht wird, zeigt Deoxyspergualin **96** durch direkte Inhibierung des Protein-*trafficking* einen charakteristischen *delayed death* Effekt nach 96 h. Obwohl Deoxyspergualin **96** kein klassisches Antibiotikum ist, tritt ein vergleichbarer *delayed death* Effekt ein, der ausschließlich auf das Blockieren des Proteinimports in den Apicoplasten zurückzuführen ist.

Dass die anabolischen Funktionen des Apicoplasten essentiell für die Überlebensfähigkeit der Plasmodien sind, und dass die Hemmung der Fettsäurebiosynthese einen direkten Effekt auf das Plasmodien-Wachstum hat, wird durch Studien der prokaryotischen FAS-II (*fatty acid synthesis*) Inhibitoren untermauert.<sup>[167]</sup> Die typischen FAS-II-Inhibitoren Triclosan **97**, Cerulenin **98** und Thiolactomycin **99** (Abb. 4.10) zeigen keinen *delayed death* Effekt (Tabelle 4.1).

### **Bedeutung des *delayed death* Effekts für die Behandlung von Malaria**

Aufgrund ihrer langsamen Wirkungsweise sind Antibiotika nur bedingt für die Therapie von Malariaerkrankungen geeignet. Im Vergleich zu zwei Tagen bei den klassischen An-

#### 4. Wirkort: Proteasom

---

**Tab. 4.1.** Wirkung ausgewählter Antibiotika auf das Wachstum der Plasmodien. (Modifiziert und ergänzt nach<sup>[154]</sup>).

<b>Verbindung</b>	<b>Klasse / Merkmal</b>	<b>Angriffspunkt</b>	<b>Effekt</b>	<b>Literatur</b>
Ciprofloxacin	Fluorchinolon	DNA-Gyrase	<i>delayed death</i> (?) <sup>a</sup>	[39,168]
Rifampicin	Rifamycin	RNA-Polymerase	sofort (?) <sup>a</sup>	[39,168,169]
Linezolid	Oxazolidinon	Ribosom	kein Effekt	[170]
Kanamycin	Aminoglycosid	Ribosom	kein Effekt	[171]
Clindamycin <b>102</b>	Lincosamid	Ribosom	<i>delayed death</i>	[39,168,169]
Azithromycin <b>101</b>	Makrolid	Ribosom	<i>delayed death</i>	[168,172]
Doxycyclin <b>100</b>	Tetracyclin	Ribosom	<i>delayed death</i>	[168,173]
Thiostrepton <b>3</b>	Thiopeptid	Ribosom / Proteasom <sup>b</sup>	<b>sofort</b>	[38,39]
Deoxyspergualin <b>96</b>	Polyamin	Hsp70: Protein-Import	<i>delayed death</i>	[166]
Triclosan <b>97</b>	Chlorphenoxyphenol	FAS-II	sofort	[167,169]
Cerulenin <b>98</b>	Epoxid	FAS-II	sofort	[167,169]
Thiolactomycin <b>99</b>	Thiolacton	FAS-II	sofort	[167]

<sup>a</sup> abweichende Ergebnisse in verschiedenen Studien. Angegeben ist der am häufigsten beobachtete Effekt.

<sup>b</sup> vgl. Kapitel 4.2, 4.3.



timalariasubstanzen dauert die Behandlung beim Einsatz von Antibiotika ungefähr vier Tage. Dies kann insbesondere bei nicht-immunen Personen im Falle einer akuten Malariaerkrankung lethal sein. Aus diesem Grund werden Antibiotika bei akuter Indikation nur in Kombinationstherapien zusammen mit schnell wirkenden Substanzen eingesetzt (Kapitel 4.1.5). Z. B. wird das zu den Tetracyclinen gehörige Antibiotikum Doxycyclin **100** neben Mefloquin **87** als Einzelkomponente zur Prophylaxe von Malaria eingesetzt.<sup>[174]</sup>

### **Gegen Malaria inaktive Antibiotika**

Antibiotika der Gruppe der  $\beta$ -Lactame (z. B. Penicilline) sind aufgrund des fehlenden Wirkorts (Pepgidoglykanbiosynthese / Zellwandbiosynthese bei Bakterien) gegen Plasmodien unwirksam. Daneben gibt es Antibiotika, die gegen das prokaryotische 70 S-Ribosom gerichtet sind, aber dennoch keine Aktivität in Plasmodien aufweisen. Hierzu gehören die Aminoglycoside Gentamicin und Kanamycin.<sup>[171]</sup> Auch das synthetische Linzolid, das ebenfalls am prokaryotischen Ribosom angreift, ist nicht gegen Plasmodien aktiv.<sup>[170]</sup> Wahrscheinlich ist die Struktur des bakteriellen Ribosoms an den Wirkorten dieser Antibiotika von den entsprechenden Strukturen in Plasmodien deutlich verschieden, so dass keine Inhibitorwirkung auftritt.

#### **4.1.4. Aktivität der Thiopeptide gegen Plasmodien**

Apicomplexa besitzen neben dem Zellkern-Genom ein zirkulares Apicoplasten-Genom (35-kb) und ein lineares 6-kb extrachromosomales Genom, das dem Mitochondrium angehört. Durch Sequenzvergleich der GTPase-Domänen-Abschnitte (Basen 1051–1109, *E. coli*-Nummerierung) der 23 S-rRNA aller drei Genome wurde eine starke Ähnlichkeit der Apicoplasten-rRNA mit den äquivalenten eubakteriellen rRNAs festgestellt.<sup>[38,175]</sup> Insbesondere weist die Apicoplasten-rRNA an den Positionen 1067 und 1095 die Base Adenin auf, wie es auch bei Bakterien der Fall ist. Die Positionen  $A^{1067}$  und  $A^{1095}$  der bakteriellen 23 S-rRNA sind an der Bindung des Thiostreptons **3** an das Ribosom beteiligt (Kapitel 3). Aufgrund dieser Ähnlichkeit wurde postuliert, dass Thiostrepton **3** auch an die Apicoplasten-rRNA binden könnte, und infolgedessen die Apicoplasten-Translation hemmen würde. Tatsächlich konnte eine Wachstumsinhibierung von *P. falciparum* durch

#### 4. Wirkort: Proteasom

---

Thiostrepton **3** mit einem  $IC_{50}$  von  $1.8 \mu\text{M}$ <sup>[38]</sup> bzw.  $3-5 \mu\text{M}$ <sup>[175]</sup> nachgewiesen werden.

In nachfolgenden biochemischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Thiostrepton **3** mit dem entsprechenden Fragment der Apicoplasten-rRNA interagiert und an dieses bindet, während es bei der Zellkern-codierten rRNA zu keiner Bindung kommt.<sup>[175,176]</sup> Diese Ergebnisse verfestigten die Annahme, dass Thiostrepton **3** die Translation speziell des Apicoplasten inhibiert. Interessanterweise führt die Punktmutation *A1067U* der Apicoplasten-rRNA dazu, dass Thiostrepton **3** nicht mehr bindet.<sup>[176]</sup> Dies stellt einen bekannten Resistenzmechanismus bei Bakterien dar (Kapitel 3). Die Tertiärstruktur der rRNA scheint bei der Apicoplasten-rRNA und der eubakteriellen rRNA sehr ähnlich zu sein, obwohl nur ca. 60 %-Identität zwischen den Sequenzen besteht.<sup>[176]</sup> Hieraus lässt sich die Sensitivität der Apicoplasten-Translation gegenüber Thiostrepton **3** ableiten.

Über den ersten funktionalen Nachweis, dass Thiostrepton **3** auf Ebene der Apicoplasten-Translation wirkt, berichteten Habib *et al.* im Jahr 2005.<sup>[177]</sup> Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Translation des Apicoplasten bei *P. falciparum* aktiv ist. Dazu wurde das Apicoplasten-codierte Protein EF-Tu (*tufA*) als Translationsprodukt mittels spezifischer Antikörper durch Fluoreszenzmikroskopie im Apicoplasten lokalisiert und nachgewiesen. Die höchsten Konzentrationen wurden dabei im Trophozoitenstadium beobachtet. Zur Untersuchung des Einflusses von Thiostrepton **3** auf die Translation des Apicoplasten wurden die Plasmodien mit  $4 \mu\text{M}$  Thiostrepton **3** über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Es ergaben sich 45 – 50 % niedrigere Konzentrationen an EF-Tu als bei Wachstumsbedingungen ohne Thiostrepton **3**. Bezeichnenderweise wurde die Translation von kern-codierten Proteinen hierbei nicht beeinflusst.

Eine wichtige Beobachtung ist, dass Thiostrepton **3** keinen klassischen *delayed death* Effekt auf das Wachstum der Plasmodien ausübt. Beispielsweise konnte mit  $4 \mu\text{M}$  Thiostrepton **3** eine Reduktion der Parasitämie schon nach 40 h erzielt werden, zu einem Zeitpunkt wenn die Parasiten den zweiten Infektionszyklus beginnen.<sup>[177]</sup> Außerdem wurde die Entwicklung im ersten Generationszyklus vom Trophozoiten zum Schizonten verlangsamt.<sup>[177]</sup> Auch andere Studien deuten darauf hin, dass Thiostrepton **3** wichtige Entwicklungsschritte zwischen den einzelnen Parasitenstadien hemmt, beispielsweise

bei der Entwicklung der Leberstadien bei der Erstinfektion oder in der Entwicklung der geschlechtlichen Gametozyten in der Blutbahn. So konnte bemerkenswerterweise die Übertragungsrate von Parasiten durch Behandlung von mit *P. berghei* infizierten Mäusen mit Thiostrepton **3** um den Faktor 10 verringert werden.<sup>[178]</sup>

Obwohl aufgezeigt werden konnte, dass Thiostrepton **3** ähnlich wie andere gegen Malaria aktive Antibiotika die Translation des Apicoplasten inhibiert, lassen sich die Effekte des Thiostreptons **3** auf Plasmodien hiermit nicht vollständig erklären. Morphologisch ähneln mit Thiostrepton **3** behandelte Plasmodienzellen eher solchen, die mit Substanzen in Kontakt waren, die in den Hämoglobin-Verdau eingreifen. Zusammengenommen scheinen demnach neben dem Apicoplasten als Wirkort des Thiostreptons **3** noch andere Zielstrukturen eine Rolle zu spielen.

### **Antimalariaaktivität der Thiopeptide Micrococcin, GE2270 und Amythiamycin A**

Neben Thiostrepton **3** wurden auch andere Thiopeptide auf ihre Aktivität gegen den Malariaerreger *P. falciparum* hin untersucht. Für Micrococcin **7** wurde eine auffallend hohe Wachstumshemmung mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 35 nM berichtet, was einer 100-fach niedrigeren Konzentration entspricht als der gleiche Wert für Thiostrepton **3**.<sup>[179]</sup> Ähnlich wie bei Thiostrepton **3** wurde diese hohe Aktivität schon nach 48 h beobachtet (kein *delayed death*).

Die Thiopeptide GE2270 A **4** und Amythiamycin A zeigten ebenfalls sehr hohe inhibitorische Aktivität auf das Wachstum von *P. falciparum* mit IC<sub>50</sub>-Werten von 300 nM bzw. 10 nM.<sup>[180]</sup> Für GE2270 A **4** konnte eine Bindung an den rekombinanten Elongationsfaktor EF-Tu (Gen *tuf* des Apicoplasten-Genoms) von *P. falciparum* durch *mobility shift assays* biochemisch nachgewiesen werden.<sup>[180]</sup>

### **4.1.5. Kombinationstherapien**

In der Therapie von Malariaerkrankungen werden häufig zwei oder mehrere Wirkstoffe, die verschiedene Wirkmechanismen aufweisen, simultan in sogenannten Kombinationstherapien eingesetzt.<sup>[143,154]</sup> Hierfür gibt es zwei Hauptgründe: *i*) Eine Kombinationstherapie ist oftmals effektiver als die Monotherapie mit den einzelnen Komponenten. *ii*) Die

#### 4. Wirkort: Proteasom

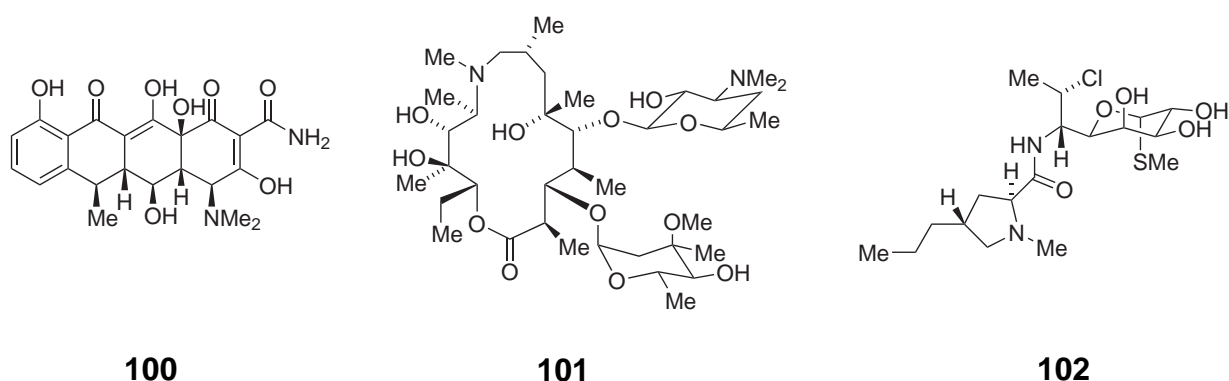


Abb. 4.11. Struktur der Antibiotika Doxycyclin **100**, Azithromycin **101** und Clindamycin **102**.

Resistenzentwicklung wird verlangsamt. Die WHO empfiehlt daher zur Behandlung unkomplizierter tropischer Malaria eine Artemisinin-basierte Kombinationstherapie (ACT: *artemisinin-based combination therapy*). Bei dieser Kombination ist ein Bestandteil das Artemisinin **89** oder eines seiner Derivate. Die Artemisinine sorgen für eine schnelle Befreiung von der Parasitämie und ihrer Symptome, wobei die Erregerzahl um den Faktor 10 000 pro asexuellem Generationszyklus (48 h) reduziert wird. Gebräuchliche Kombinationen sind beispielsweise Artesunat **92** + Amodiaquin **86**, Artesunat **92** + Mefloquin **87** oder Artesunat + Sulfadoxin **94** bzw. Pyrimethamin **95**.

Antibiotika müssen in der Malariatherapie aufgrund des *delayed death* Effekts und der daraus resultierenden verzögerten Wirkung mit schnell wirkenden Antimalariasubstanzen kombiniert werden, vor allem wenn es sich um schwerwiegende Malariaerkrankungen handelt. Eine Ausnahme stellt die Applikation von Antibiotika zur Prophylaxe gegen Malaria dar, bei der das Antibiotikum in Monotherapie eingesetzt werden kann (z.B. Doxycyclin **100**, Abbildung 4.11).

In der Kombinationstherapie wird das Antibiotikum Doxycyclin **100** beispielsweise zusammen mit Chinin **83** oder Mefloquin **87** gegen schwerwiegende akute Malariainfektionen eingesetzt. Doxycyclin **100** gehört zur Gruppe der Tetracyclin-Antibiotika und bindet an die 16S-rRNA der 30S-Untereinheit des prokaryotischen Ribosoms in der Nähe der Aminoacyl-Bindestelle (*A site*). Infolge der Bindung kommt es zur Translationshemmung. Nach 48 h zeigte Doxycyclin **100** in Wachstumsassays von *P. falciparum*-Laborstämmen einen  $IC_{50}$  von 8–15  $\mu\text{M}$ , nach 144 h einen  $IC_{50}$  von 0.5  $\mu\text{M}$ .<sup>[181]</sup>

Das Antibiotikum Azithromycin **101** (Abbildung 4.11), das zur Gruppe der Makrolid-Antiobiota zählt, befindet sich als Kombinationstherapie zusammen mit Chloroquin **85** in klinischer Entwicklung (Phase III, Pfizer). Es bindet an die große 50S-Untereinheit prokaryotischer Ribosomen und blockiert den Austrittstunnel des wachsenden Peptids. Als Monotherapie schützt es vor *P. vivax*-Infektionen, jedoch ist die Wirkung als Einzelsubstanz gegen *P. falciparum* unzureichend.

Das Lincosamid-Antibiotikum Clindamycin **102** (Abbildung 4.11) bindet an die gleiche Bindestelle am Ribosom wie auch Makrolid-Antibiotika und behindert die Substratbindung an der Aminoacyl- und der Peptid-Bindungsstelle.<sup>[182]</sup> In Wachstumsassays wurden IC<sub>50</sub>-Werte von 43–66 µM (72 h)<sup>[183]</sup> und 20 nM (120 h)<sup>[184]</sup> bestimmt. Synergistische Effekte konnten in Kombination mit Chinin **83** in klinischen Studien festgestellt werden.<sup>[185]</sup> Im Gegensatz zu Doxycyclin **100** kann Clindamycin **102** auch bei Schwangerschaft und bei kleinen Kindern eingesetzt werden. Eine weitere Kombinationstherapie besteht aus Clindamycin **102** und Artesunat **92**.

Ein großer Vorteil des Einsatzes von Antiobiota in der Malariatherapie ist, dass bisher noch kein Fall von Resistenz bei *Apicomplexa*-Parasiten bekannt geworden ist. Das Antibiotikum «schützt» in der Kombinationstherapie die andere Substanz vor Resistenzentwicklung, da durch die Kombination eine vollständige Befreiung von den Parasiten (*clearance*) erreicht wird, die durch die erste, schneller wirkende Substanz nicht getötet wurden. Malariaerkrankungen gehen zudem oftmals mit bakteriellen Infektionen einher, so dass der kombinierte Einsatz eines klassischen Antimalariamittels mit einem Antibiotikum *per se* angezeigt ist. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die gegen Plasmodien wirksamen Antibiotika häufig seit Jahrzehnten zugelassene Substanzen darstellen, deren Nebenwirkungen und Sicherheitsprofil bekannt sind.

#### 4.1.6. Antimalariawirkung von Proteasominhibitoren

Interessanterweise zeigen einige Proteasominhibitoren Wirksamkeit gegen *Plasmodium falciparum*.<sup>[186]</sup> Die genauen Wirkmechanismen sind bisher nicht vollständig aufgeklärt, jedoch scheinen die Inhibitoren die Regulation der Differenzierungsvorgänge zu beeinträchtigen, die mit dem Fortschreiten der Entwicklungsstadien einher gehen.<sup>[187]</sup> Mit

## 4. Wirkort: Proteasom

---

den Proteasominhibitoren bietet sich eine gänzlich neue Klasse von Wirkstoffen an, die Potential in der Malariatherapie haben könnten.

### 4.1.7. Das Proteasom

Zur Überlebensfähigkeit der Zellen ist es notwendig, dass sie einen ausbalancierter Proteinhaushalt aufrecht erhalten können (*Homeostase*). Hierzu zählt neben der regulierten Synthese der Proteine auch der kontrollierte Abbau von funktionsunfähigen Proteinen, die durch falsche Faltung der Proteine oder verschiedene Proteinschädigungen entstehen können. Darüber hinaus muss die Lebensdauer von speziellen Regulationsproteinen, die beispielsweise eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion oder der Genexpression spielen, für die Dauer ihrer vorgesehenen Wirkung in der Zelle begrenzt werden. Zentraler Punkt des regulierten, nicht-lysosomalen Proteinabbaus ist sowohl bei Eukaryoten als auch bei machen Prokaryoten das Proteasom.<sup>[188,189]</sup> Wichtige Prozesse wie beispielsweise Zellzykluskontrolle, Zelldifferenzierung, Apoptose, Antigenprozessierung, Proteinqualitätskontrolle oder Signaltransduktion werden durch die Funktion des Proteasoms erst ermöglicht. In Eukaryoten übernimmt das streng regulierte Ubiquitin- / Proteasom-System die Funktion des kontrollierten Proteinabbaus.<sup>[190]</sup> Die zum Abbau bestimmten Proteine werden durch Ligation mit dem kleinen Protein Ubiquitin unter Ausbildung von Ubiquitinketten (Polyubiquitinierung) zum Proteinabbau markiert, vom Proteasom erkannt, und proteolytisch abgebaut (s. u.). An die Proteinfaltungs- und Abbaumachinerie sind bei Plasmodien hohe Anforderungen gestellt, da sie mit hohen Temperaturwechseln bei den Wirten und einer hohen Mutationsrate aufgrund der Selektion durch das Wirtsimmunsystem zurechtkommen muss.<sup>[186]</sup>

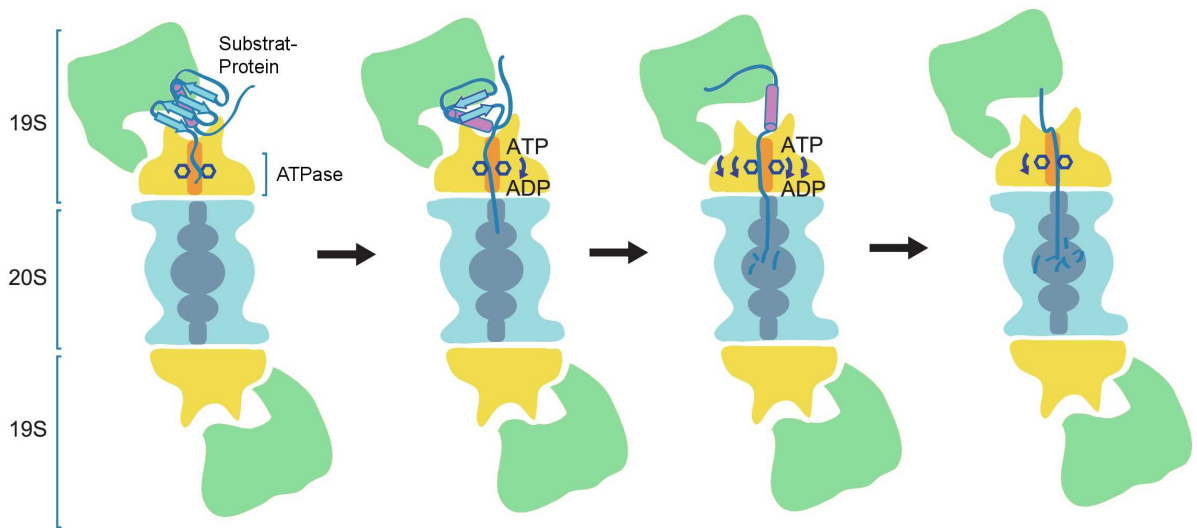
### 4.1.8. Die Proteasomarchitektur

Der Gesamtkomplex des 26 S-Proteaoms besitzt ein Molekulargewicht von 2.5 MDa (Abbildung 4.12). Die Notwendigkeit einer kontrollierten Proteaseaktivität des Proteasoms spiegelt sich in der Architektur des Proteasoms wieder. Die proteolytisch aktiven Zentren befinden sich von der Umgebung abgeschirmt an der Innenseite einer zylindrischen

Fasstruktur, deren Zugang durch weitere Proteine an den beiden Enden des Zylinders beschränkt und reguliert ist. Das eukaryotische 20 S-Proteasom steht in enger struktureller Verwandtschaft zu regulierenden Proteasen bei Prokaryoten, die teilweise als weniger komplexe, evolutive Vorläufer des 20 S-Proteasoms angesehen werden können.<sup>[188,189]</sup> Ihnen ist gemeinsam, dass durch eine zylindrische Anordnung von gleichen (*homo-*) oder leicht unterschiedlichen (*hetero-*) Untereinheiten ein Zylinder gebildet wird, dessen proteolytisch wirksamen aktiven Zentren abgeschirmt im Inneren zu liegen kommen. Diese proteolytischen Makromoleküle assoziieren in ihrer physiologisch aktiven Form mit weiteren Proteinen, die den Zugang zum Innenraum des Zylinders regulieren. Häufig sind diese Proteine ebenfalls aus einer zirkulären Zusammenlagerung von gleichen bzw. ähnlichen Untereinheiten aufgebaut. Die Regulationsproteine zeigen ATPase-Aktivität und sind evolutiv den Chaperonen verwandt, die unter ATP-Hydrolyse eine Entfaltung der Substratproteine mittels Hindurchfädeln durch ihre zentrale Kavität bewirken. Viele dieser Proteine gehören zur Familie der AAA+ ATPasen (*ATPases associated with diverse cellular activities*). Im Zusammenspiel mit den zylinderförmigen, proteolytisch wirksamen Untereinheiten erkennen die ATPasen ihre Substratproteine und entfalten diese unter ATP-Hydrolyse, wobei die resultierende ungefaltete Polypeptidkette der inneren Kavität des proteolytischen Zylinders zugeführt wird, und sequentiell hydrolytisch in kurze Peptide zerlegt wird. Bei Prokaryoten findet man beispielsweise das Protease-System HslUV (synonym auch ClpYQ genannt), das aus dem ATPase-Komplex HslU und dem Peptidase-Komplex HslV zusammengesetzt ist.<sup>[191]</sup>

Das eukaryotische Proteasom besteht strukturell aus dem 20 S-Zentralpartikel (*core particle*: CP) mit einem Molekulargewicht von etwa 700 kDa, das mit zwei regulatorischen Komplexen, den 19 S-Kappen (*caps*), assoziiert vorliegt. Das Zentralpartikel ist aus verschiedenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut, die ihrerseits in leicht abgewandelter Form ( $\alpha_{1-7}$  und  $\beta_{1-7}$ ) vorliegen. Es ergibt sich die Gesamtstöchiometrie  $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$  des 20 S-Zentralpartikels, während man bei der 19 S-Kappe zwischen einer Basis- (*base*) und einer Deckel- (*lid*) Komponente unterscheidet. Bei den eukaryotischen Proteasomen ist die 19 S-Basis durch sechs verschiedene AAA+ ATPase-Untereinheiten aufgebaut, die für die Entfaltung und Translokation der Proteinsubstrate verantwortlich sind, während

#### 4. Wirkort: Proteasom

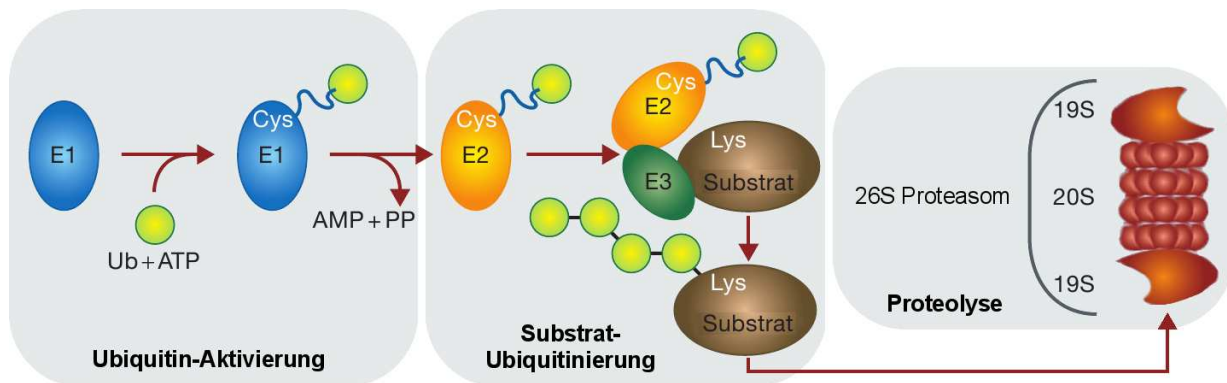


**Abb. 4.12.** Schematische Darstellung der allgemeinen Proteasomarchitektur und der proteolytischen Funktion. Das Substrat wird durch die 19S-Untereinheit des Proteasoms erkannt, unter ATP-Hydrolyse entfaltet, und der proteolytischen 20S-Untereinheit zugeführt.

der 19S-Deckel aus einem Komplex aus mindestens acht nicht-ATPase-Untereinheiten aufgebaut ist, die die Erkennung der Ubiquitin-Markierung vermitteln.

In genomweiten Sequenzvergleichen zeigte sich, dass die Proteasomen über weite Teile des evolutiven Stammbaums der Organismen hoch konservierte Proteinkomplexe darstellen.<sup>[192]</sup> Generell ist während der Entwicklungsgeschichte die Tendenz von weniger komplexen zu sehr differenzierten und hoch regulierten Proteasomkomplexen zu erkennen. Im Vergleich zu ihren homologen Verwandten sind die Proteine der Plasmodien häufig um bis zu 50 % größer, da sie Einschübe homo- oder heteropolymer Wiederholungen (meist aus den Aminosäuren Asparagin, Lysin oder Glutaminsäure) niedriger Komplexität zwischen Proteindomänen besitzen.<sup>[193]</sup> Diese als *low complexity regions* (LCR) bekannten Sequenzen bilden meist ungefaltete Bereiche und befinden sich häufig auf der Oberfläche der Proteine. In Plasmodien sind die Untereinheiten  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_7$  durch LCR-Einschübe gekennzeichnet.<sup>[194]</sup> Ihre biologische Funktion ist bisher noch unbekannt – eine mögliche Umgehung des Wirtsimmunsystems wird diskutiert.<sup>[195]</sup>





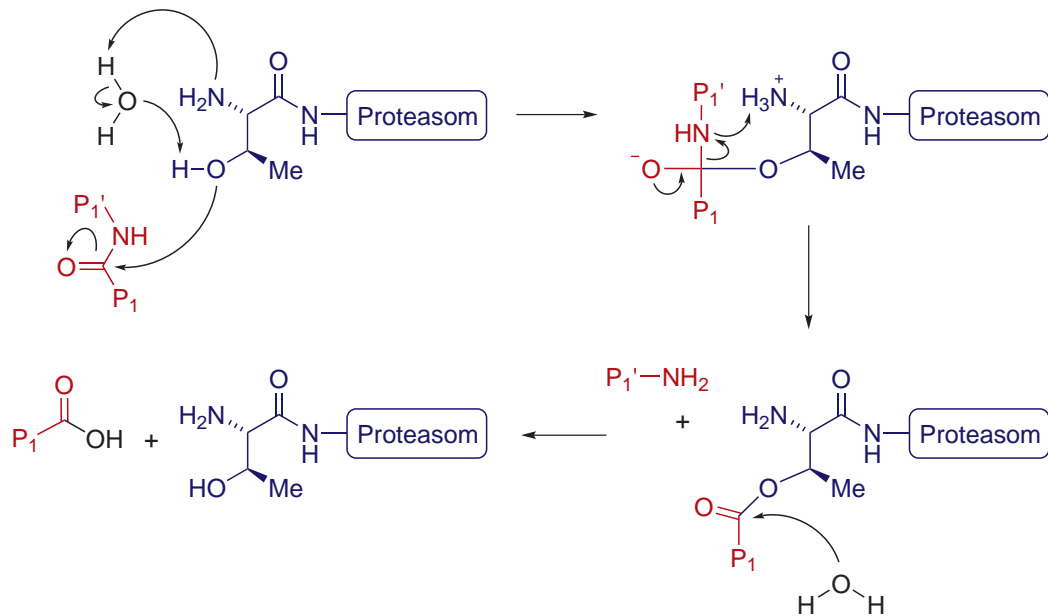
**Abb. 4.13.** Schematische Darstellung des Ubiquitin- / Proteasom-Systems. Adaptiert nach Meusser *et al.*<sup>[199]</sup>

#### 4.1.9. Das Ubiquitin-System

Das Ubiquitin-/Proteasom-System vermittelt den intrazellulären Proteinabbau falsch gefalteter oder beschädigter Proteine sowie den Abbau regulatorischer Proteine, deren Aktivität zeitlich oder räumlich begrenzt werden muss.<sup>[196,197]</sup> Hierzu werden die Zielproteine durch Konjugation mit einem oder mehreren Einheiten des kleinen Proteins Ubiquitin markiert. Als Abbausignal für das Proteasom müssen mindestens vier Ubiquitinmoleküle kettenartig mit dem Zielprotein konjugiert werden (Polyubiquitinierung). Die Konjugation ist ein regulierter Vorgang, der über eine konsekutive Kaskade von drei verschiedenen Enzymtypen (E1 – E3) vermittelt wird (Abbildung 4.13). E1 stellen Ubiquitin-aktivierende Enzyme dar, die Ubiquitin unter ATP-Hydrolyse über einen Thioester binden und damit aktivieren. In einem zweiten Schritt überträgt E1 das aktivierte Ubiquitin auf ein Cystein eines E2 Ubiquitin-konjugierenden Enzyms in einer Transthioesterifikation. E3-Enzyme transferieren schließlich das Ubiquitin auf einen Lysinrest des Zielproteins unter Ausbildung einer Isopeptidbindung.<sup>[198]</sup>

Das Ubiquitin-System wurde zuerst allein in Zusammenhang mit dem proteasomalen Abbau in Verbindung gebracht. Mit der Zeit wurden jedoch eine zunehmende Anzahl an zusätzlichen Funktionen der Ubiquitinierung entdeckt, die sich teilweise in der Art der Konjugation voneinander unterscheiden. Die Ubiquitinierung spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation des *protein trafficking*, der Assoziation von Signalkomplexen und der Aktivierung oder Inaktivierung von Enzymen.<sup>[200–202]</sup>

## 4. Wirkort: Proteasom

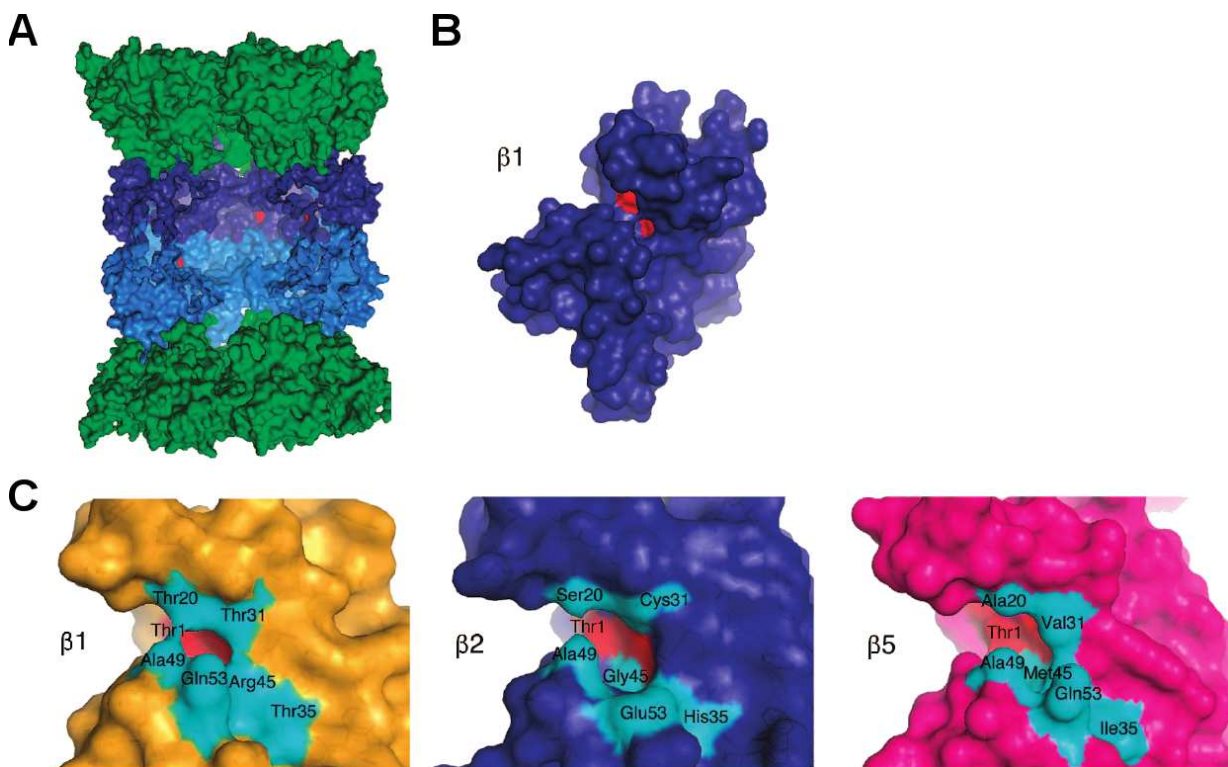


**Schema 4.1** Schematische Darstellung des Proteasemechanismus des Proteasoms. Das Thr1O $\gamma$ -Atom des N-terminalen Threonins reagiert mit der Peptidbindung des Substrats.

### 4.1.10. Die Proteaseaktivitäten der einzelnen Untereinheiten

Eukaryotische Proteasomen besitzen drei verschiedene Arten katalytisch aktiver, proteolytischer Zentren (Abbildung 4.14). Allesamt zählen sie zu den Threonin-Proteasen, wobei jeweils die  $\gamma$ -Hydroxylgruppe des N-terminalen Threonins nukleophil mit dem Substrat reagiert (Schema 4.1). Die Untereinheit  $\beta_1$  beherbergt die Caspase-ähnliche Aktivität (Spaltung nach sauren Resten),  $\beta_2$  die Trypsin-ähnliche Aktivität (Spaltung nach basischen Resten) und  $\beta_5$  die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (Spaltung nach hydrophoben Resten). Die Caspase-ähnliche Aktivität wird teilweise auch als Peptidylglutamylpeptidhydrolase-Aktivität bezeichnet (PGPH). Die Zentren wurden in Anlehnung an die bekannten Proteasen nach ihren charakteristischen Substratspezifitäten benannt.

Strukturell wird die Substratspezifität maßgeblich von der S1-Tasche der jeweiligen Untereinheit bestimmt, die den Aminosäurerest  $P_1$  des gebundenen Peptids beherbergt (Abbildung 4.14).<sup>[203]</sup>  $P_1$  bezeichnet nach allgemeiner Protease-Nomenklatur den Aminosäurerest vor (d. h. N-terminal) der zu hydrolysierenden Peptidbindung. Besonders



**Abb. 4.14.** Struktur der Substratspezifitäts-Taschen am Beispiel des *S. cerevisiae* 20S Proteasoms. A) Lokalisierung der proteolytisch aktiven Zentren (rot) im Inneren des Proteasoms (freigelegte Ansicht). Grün:  $\alpha$ -Untereinheiten, blau:  $\beta$ -Untereinheiten. B) Vergrößerte Ansicht der  $\beta_1$ -Untereinheit. Das aktive Zentrum (rot) liegt in einer Spalte. C) Spezifitäts-S1-Taschen der jeweiligen Untereinheiten. Adaptiert nach Dohmen *et al.*<sup>[189]</sup>.

wichtig für die Substratspezifität ist die Art der Aminosäure in Position 45 des Proteasoms (*Thermoplasma acidophilum* Nummerierung). Die Eigenschaft der Caspase-ähnlichen  $\beta_1$ -Untereinheit, v. a. nach sauren Resten zu schneiden, wird beispielsweise durch ein basisches Arg an Position 45 vermittelt (Abbildung 4.14).<sup>[188,189]</sup>

Obwohl die Klassifizierung der Substratspezifitäten auf experimentellen Daten mit chromogenen Substraten basiert, repräsentiert diese Einteilung nicht zwangsläufig die Spezifitäten der physiologischen Substrate. Hinzu kommt, dass die aktiven Zentren nicht besonders spezifisch für ihre Substrate sind. Insgesamt besitzt das eukaryotische Proteasom sechs proteolytisch aktive Zentren (zwei jeden Typs). In Zellen des Immunsystems werden die katalytisch aktiven Untereinheiten durch die spezielle Untereinheiten  $\beta_{1i}$ ,  $\beta_{2i}$  und  $\beta_{5i}$  ersetzt, so dass eine leicht abweichende Substratspezifität des Proteasoms resul-

## 4. Wirkort: Proteasom

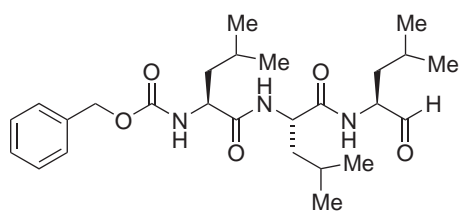
---

tiert.<sup>[204]</sup> Das sog. Immunoproteasom produziert tendenziell kürzere Peptide, die von MHC-Klasse-I-Komplexen auf der Zelloberfläche den Immunzellen präsentiert werden.

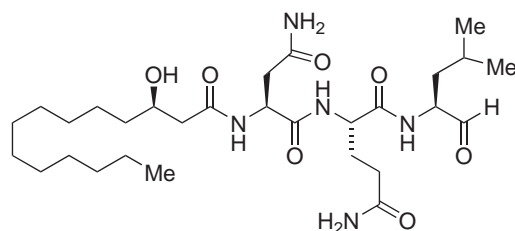
### 4.1.11. Inhibitoren des Proteasoms

Aufgrund der zentralen Stellung des Ubiquitin-/ Proteasom-Systems im Proteinhaushalt der Zelle haben Inhibitoren des Proteasoms große biologische Bedeutung.<sup>[205,206]</sup> Das Interesse an diesen Hemmstoffen begründet sich sowohl in der therapeutischen Anwendung als auch in ihrer Werkzeugfunktion, mit der das Proteasomsystem weiter erforscht werden kann. Die Einteilung erfolgt nach chemischen bzw. strukturellen Gesichtspunkten, die charakteristische Eigenschaften wie Bindemodus, Spezifität oder Reversibilität nach sich ziehen. Man unterscheidet generell zwischen kovalenten und nicht-kovalenten Inhibitoren des Proteasoms. Die meisten der bisher bekannten Inhibitoren besitzen reaktive Gruppen, mit denen sie das *N*-terminale katalytische Threonin kovalent modifizieren. Diese Inhibitoren gelten als mechanismusbasiert, da sie sich meist von Peptidsubstraten ableiten und in vergleichbarer Art und Weise wie das Substrat von der  $\gamma$ -Hydroxylgruppe des *N*-terminalen Threonins nukleophil angegriffen werden. Neben synthetischen Molekülen sind auch einige Naturstoffe als Proteasominhibitoren bekannt.

- Synthetische **Peptidaldehyde** waren die ersten literaturbekannten Proteasominhibitoren. Der Aldehyd reagiert dabei mit der  $\gamma$ -Hydroxygruppe des Thr1 unter Ausbildung eines Hemiacetals. Typischerweise gelangen die Peptidaldehyde schnell in die Zellen, zeigen aber reversible Wirkung aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit des Hemiacetals und der schnellen Metabolisierung des Aldehyds. Die Strukturen des synthetischen Inhibitors MG132 **103** (*Z*-LLL-*al*) und des Naturstoffs Fellutamide **B 104**<sup>[207]</sup> sind nachfolgend gezeigt.

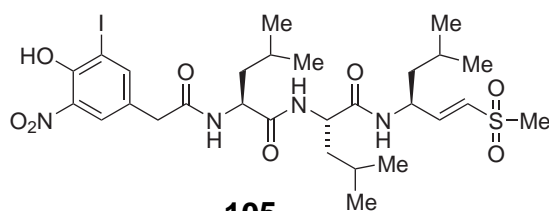


103



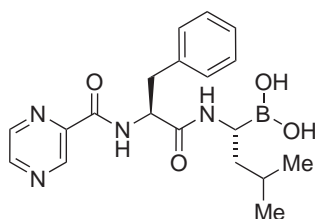
104

- Die synthetischen **Vinylsulfone** reagieren als Michael-Akzeptoren ebenfalls mit der  $\gamma$ -Hydroxygruppe des N-terminalen Threonins. Sie sind weniger reaktiv als die entsprechenden Aldehyde, binden aber irreversibel im aktiven Zentrum des Proteasoms.<sup>[208]</sup> Die Struktur des MG132-verwandten Inhibitors NLVS **105** (*Nip-LLL-vs*) ist angegeben.



105

- Die synthetischen **Peptidboronate** zeigen deutlich höhere Aktivität gegen das Proteasom als die entsprechenden Aldehyde und besitzen viel langsamere Dissoziationsraten. Nach dem HSAB-Prinzip zeigt das Boratom der Boronate hohe Affinität gegenüber harten Nukleophilen wie Sauerstoff. Das freie Elektronenpaar des Thr1O $\gamma$  bildet eine kovalente Bindung zum Boratom aus. Unter physiologischen Bedingungen sind die Boronate relativ stabil. Bortezomib **106** (Velcade<sup>®</sup>) ist zur Therapie des progressiven multiplem Myeloms zugelassen und stellt bisher den einzigen beim Menschen zugelassenen Proteasominhibitor dar.<sup>[209]</sup>

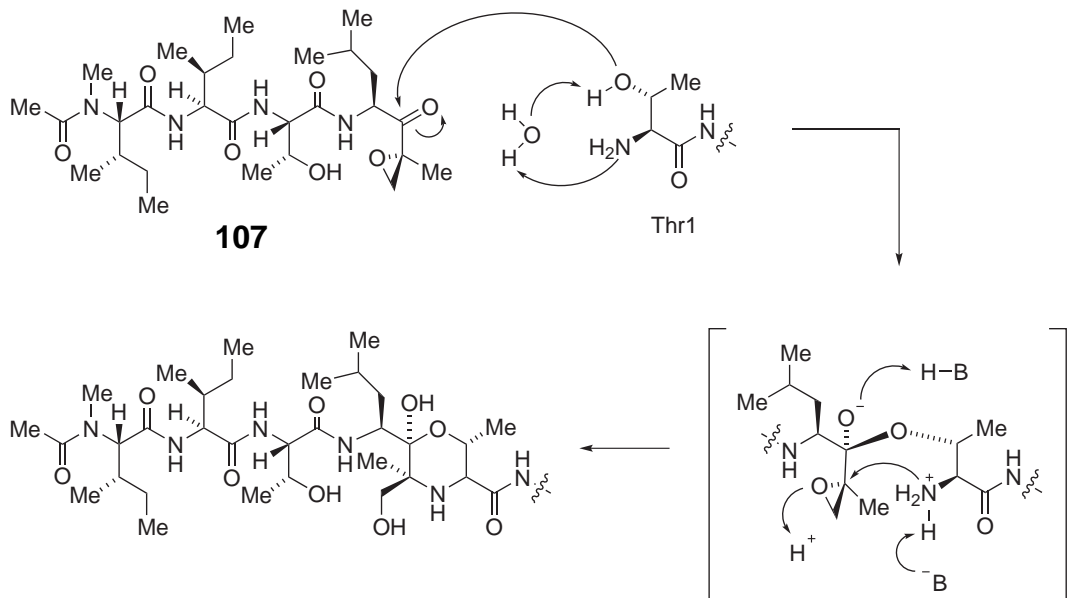


106

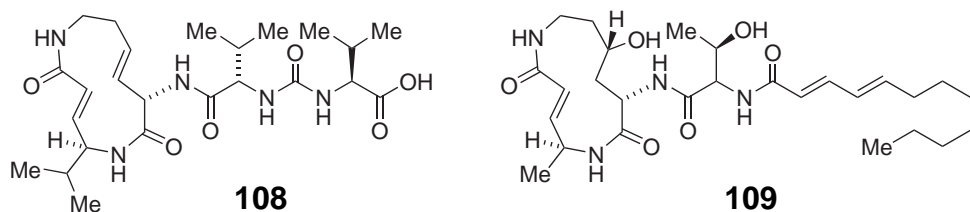
- Der zu den **Epoxyketonen** zählende Naturstoff Epoxomicin **107** wurde aus einem Aktinomyzetenstamm isoliert und bildet mit dem N-terminalen Threonin des

#### 4. Wirkort: Proteasom

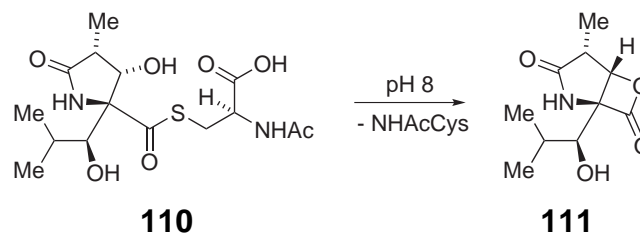
Proteasoms ein kovalentes Addukt unter Ausbildung eines Morpholinrings in einem zweistufigen Prozess. Im ersten Schritt bildet das Thr1O $\gamma$  mit dem Carbonyl des Epoxyketons ein Hemiacetal (vgl. Peptidaldehyde). Anschließend öffnet die Aminogruppe des Threonins das Epoxid, so dass ein stabiler Morpholinring entsteht.<sup>[210,211]</sup> Epoxomicin zeigt sehr hohe Selektivität bezüglich des Proteasoms gegenüber anderen Proteasen. Dies wird darauf zurückgeführt, dass zur Bildung des stabilen Morpholinrings sowohl eine Hydroxy- als auch eine Aminogruppe vorhanden sein muss, wie es nur beim N-terminalen Threonin der Proteasomuntereinheiten der Fall ist. Dieses Motiv ist bei anderen Proteasen extrem selten.



- Die Naturstoffe aus der Gruppe der makrozyklischen **Vinylketone** reagieren vergleichbar mit den Vinylsulfonen in einer Michael-Additionsreaktion mit der  $\gamma$ -Hydroxygruppe des N-terminalen Threonins. Die verwandten Naturstoffe Syringolin A **108** und Glidobactin A **109** wurden aus einem *Pseudomonas syringae*-Stamm bzw. aus einem unbekanntem Stamm der Ordnung *Burkholderiales* isoliert.<sup>[212]</sup>

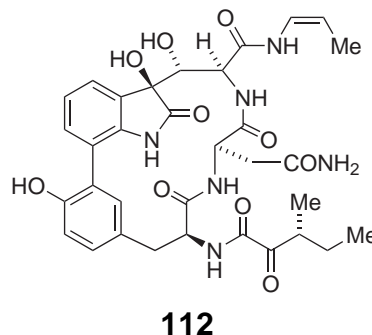


- Das zur Gruppe der  $\beta$ -Lactone gehörende Lactacystin **110** war der erste bekannte Naturstoff, der als Proteasominhibitor identifiziert wurde.<sup>[213]</sup> In wässriger Lösung bei pH 8 hydrolysiert Lactacystin **110** zur biologisch aktiven Substanz *clasto*-Lactacystin- $\beta$ -Lacton **111** (Omuralid), welche das reaktive  $\beta$ -Lacton enthält.<sup>[214]</sup> *Clasto*-Lactacystin reagiert selektiv mit der  $\gamma$ -Hydroxygruppe des N-terminalen Threonins der  $\beta_5$ -Untereinheit des Proteasoms unter Ringöffnung des  $\beta$ -Lactons.<sup>[203]</sup>



Im Gegensatz zu allen anderen zuvor beschriebenen Proteasominhibitoren zählen die nun folgenden Inhibitoren zu den nicht-kovalenten, reversiblen Inhibitoren.

- Das **zyklische Peptid** TMC-95A **112** und die verwandten Moleküle (TMC-95 B–D) wurden aus dem Pilz *Apiospora montagnei* isoliert und blockieren alle drei proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms kompetitiv.<sup>[215,216]</sup> Die Inhibitoren bilden im aktiven Zentrum des Proteasoms ein enges Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen mit konservierten Resten des Proteasoms aus.<sup>[217]</sup>



- Das **zyklische Peptid** Argyrin **22** wurde aus dem Myxobakterium *Archangium gephyra* isoliert (vgl. Kapitel 2.2.4).<sup>[88,89]</sup> Es konnten anti-Tumor Eigenschaften aufgezeigt werden, die über eine Stabilisierung des Proteins p27<sup>KIP1</sup> durch Proteasominhibition vermittelt werden.<sup>[90,218]</sup> Argyrin **22** besitzt ähnliche hohe Akti-





schiedene zelluläre Funktionen ist.<sup>[222–224]</sup> Allerdings kann die Peptidhydrolyse in Säugtierzellen erst komplett unterbunden werden, wenn  $\beta_5$  und mindestens eine weitere Untereinheit gehemmt werden.<sup>[225]</sup> Gängige Inhibitoren zeigen bisher wenig Spezifität bezüglich einer bestimmten Untereinheit.<sup>[226]</sup> Auch in der Therapie wird mit Bortezomib **106** ein Proteasominhibitor verwendet, der recht unspezifisch ist und neben der  $\beta_5$ -Untereinheit auch die  $\beta_1$ -Untereinheiten inhibiert.<sup>[225]</sup> Es stellt sich die Frage, ob Untereinheiten-spezifische Wirkstoffe eine gezieltere Therapie mit weniger Nebenwirkungen ermöglichen würden. Es besteht daher ein großer Bedarf an spezifischen Inhibitoren und spezifischen Sondenmolekülen, um die Erforschung der unterschiedlichen Aktivitäten des Proteasoms voranzutreiben.<sup>[227]</sup>

### 4.2. Ergebnisse


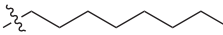
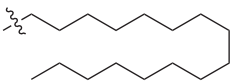
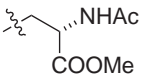

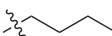
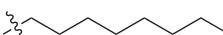
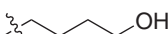
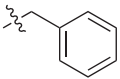
In diesem Abschnitt werden die Wirkungsuntersuchungen der Thiostreptonderivate auf das Wachstum des Malaria-Erregers *P. falciparum* und die Proteasominhibition der Verbindungen beschrieben.

#### 4.2.1. Wachstumsinhibierung

In ersten Vorversuchen wurde die hemmende Wirkung der Thiostreptonderivate auf das Wachstum von *P. falciparum* untersucht (alle biologischen Experimente mit Plasmodien wurden in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Gabriele Pradel an der Universität Würzburg durchgeführt). Hierzu wurden die Plasmodien mit den Substanzen inkubiert und ihre Überlebensrate nach 72 h mittels Malstat-Assay<sup>[228,229]</sup> bestimmt (Kapitel 8.7.6). Es zeigte sich, dass Thiostrepton **3** das Wachstum der Plasmodien im mikromolaren Bereich hemmte, und dass besonders Michael-Addukte des Thiostreptons mit lipophilen Seitenketten hohe Aktivitäten gegen die Plasmodien aufwiesen. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Oxidation des Thiazolins zum Thiazol im A-Ring des Thiostreptons in einer erhöhten Wachstumshemmung resultierte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine kleine fokussierte Bibliothek von Thiostreptonderivaten unter Anwendung der semisynthetischen Modifikationen Verkürzung der Seitenkette, Michael-Addition an Deala-Reste und Oxidation des Thiazolins, und deren Kombinationen synthetisiert (Abbildung 4.15, Tabelle 4.2, Kapitel 2). Die semisynthetischen Derivate wurden auf ihre Wachstuminhibierung gegen *P. falciparum* hin untersucht.

Bei den Untersuchungen zur Wachstumsinhibierung wurde bemerkenswerterweise kein *delayed death effect* beobachtet. Dies stimmt mit früheren Studien überein, die ebenfalls keinen *delayed death effect* Effekt für Thiostrepton **3** fanden.<sup>[38,39]</sup> Der gemessene IC<sub>50</sub>-Wert für Thiostrepton **3** mit  $10 \pm 2.0 \mu\text{M}$  lag in der gleichen Größenordnung wie die bisher veröffentlichten Werte ( $1.8 - 4 \mu\text{M}$ ). Wie in Tabelle 4.2 gezeigt, verminderte die Verkürzung der Seitenkette des Thiostreptons **3** sukzessive die Aktivität der Derivate (**23** und **27**). Im Gegensatz dazu verbesserte die Oxidation des Thiazolins zum Thiazol die inhibitorische Wirkung um den Faktor sechs (**23** und **58**). Als genereller Trend konnte be-

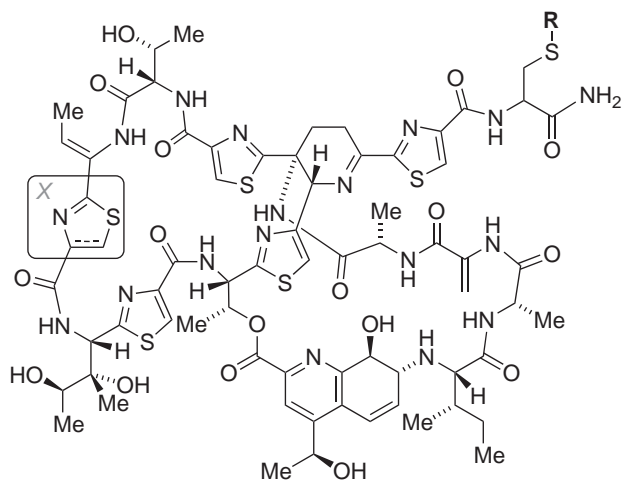
**Tab. 4.2.** Biologische Aktivität der Thiostreptonderivate: Wachstumsinhibierung des Malariaparasiten *Plasmodium falciparum*. Angegeben sind die IC<sub>50</sub>-Werte nach 72 h Inkubationszeit.

Verbindung	Struktur <sup>a</sup>	Heterozyklus X <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> [μM]
3	Thiostrepton	Thiazolin	10 ± 2.0
23	einfach-verk. Thiostrepton	Thiazolin	19 ± 4.1
27	zweifach-verk. Thiostrepton	Thiazolin	23 ± 1.1
29	R = 	Thiazolin	1.3 ± 0.5
30	R = 	Thiazolin	4.3 ± 1.2
31	R = 	Thiazolin	34 ± 10
28	R = 	Thiazolin	inaktiv
68	Thiostrepton, B-Ring hydrol.	Thiazolin	inaktiv
58	einfach-verk. Thiostrepton ox.	Thiazol	3.1 ± 0.3
44	R = 	Thiazol	3.5 ± 0.4
42	R = 	Thiazol	2.5 ± 0.4
45	R = 	Thiazol	1.2 ± 0.4
43	R = 	Thiazol	7.5 ± 1.9
41	R = 	Thiazol	2.6 ± 1.3

<sup>a</sup> Die Platzhalter X und R beziehen sich auf den Rest R bzw. den Heterozyklus X in Abbildung 4.15.

#### 4. Wirkort: Proteasom

---



**Abb. 4.15.** Erklärung der in Tabelle 4.2 verwendeten Platzhalter *R* und *X* zur Kennzeichnung der fokussierten Thiostreptonderivate-Bibliothek.

obachtet werden, dass die Modifizierung der Seitenkette des Thiostreptons mit lipophilen Alkylresten mittlerer Länge ( $C_4$ – $C_8$ ) einen verstärkenden Einfluss auf die antiplasmodiale Aktivität besitzt (**29** und **30**). Hingegen zeigten lipophile Derivatisierungen mit den sterisch anspruchsvolleren Resten Phenyl (**41**) und Isopropyl (**44**) eine Verminderung der wachstumshemmenden Wirksamkeit.

Es galt zu überprüfen, ob sich die Oxidation und die Lipophilie der Seitenkette synergistisch auf die Aktivität ausüben würden. Ein solcher positiver Effekt konnte für das Verbindungspaar **30/45** mit einer Verbesserung der Aktivität um den Faktor 2–3 gefunden werden, jedoch zeigt das Verbindungspaar **29/42** eine fast gleichbleibende bzw. leicht abnehmende Aktivität um den Faktor zwei. Ein möglicher genereller synergistischer Effekt müsste an dieser Stelle durch weitergehende Experimente validiert werden. Auffällig war, dass polare Derivatisierungen am Thiostreptongrundgerüst eine deutliche Verschlechterung bzw. Inaktivität der Substanzen (**43** bzw. **28**) bewirkten. Interessanterweise steht dieses Ergebnis im Gegensatz zu den gemessenen antibakteriellen Aktivitäten der hydrophilen Derivatisierungen (Kapitel 3). Die antibakterielle Aktivität verringerte sich eher bei Derivatierung mit lipophilen Alkylresten, während hydrophile Derivatisierungen eine höhere Aktivität aufwiesen. Es wurde weiterhin beobachtet, dass die Hydrolyse des B-Ring-Lactons (vgl. Kapitel 5) das Molekül vollständig inaktiv werden ließ (**68**). Es ist hervorzuheben, dass die Verbindungen **29** und **45** beide um den Faktor 10

aktiver waren als der Naturstoff Thiostrepton **3** selbst.

#### 4.2.2. Zellmikroskopische Untersuchungen

Die bisherigen Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass neben dem literaturbekannten Wirkort *Ribosom* des Thiostreptons **3** noch weitere Zielstrukturen in Plasmodien angesteuert werden könnten. Einerseits fehlte in den Plasmodien bei Behandlung mit Thiostrepton **3** der charakteristische *delayed death* Effekt, der typischerweise bei Substanzen auftritt, die die Funktion des Apicoplasten beeinträchtigen (Kapitel 4.1.3). Andererseits wurde ein abweichendes Wirkprofil der Derivate bei Plasmodien erhalten, das konträr zu ihrer Aktivität bei Bakterien war.

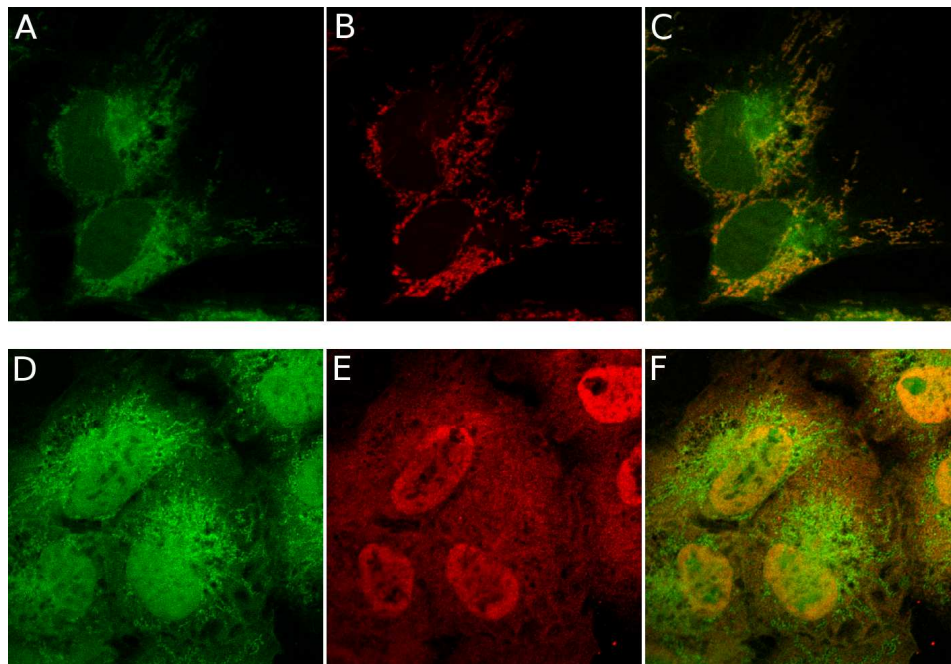
Da es sich bei Plasmodien um eukaryotische Zellen handelt, wurde spekuliert, dass die Aktivität auch in anderen eukaryotischen Systemen zu beobachten wäre. Wir entschlossen uns deshalb, die Aktivitätsuntersuchung der Thiostreptonderivate auf eukaryotische Zellen allgemein auszuweiten. Für viele Untersuchungsmethoden bietet diese Herangehensweise den Vorteil, dass biochemisches Material leichter zu beschaffen und ungefährlicher zu handhaben ist, als dies für Untersuchungen mit infektiösen Plasmodien der Fall wäre.

Die mikroskopische Untersuchung von subzellulären Strukturen gestaltet sich in Plasmodien aufgrund ihrer geringen Zellgröße (1 – 4  $\mu\text{m}$   $\emptyset$ ) als besonders schwierig. Verwendet wurden deshalb BSC-1-Zellen (Nierenepithelzellen der Äthiopischen Grünmeerkatze *Chlorocebus aethiops*), die sich durch mikroskopisch gut differenzierbare Zellstrukturen auszeichnen (Die Zellmikroskopischen Untersuchungen wurden von Dr. Bernhard Ellinger durchgeführt). Zur Aufklärung zellulärer Zielstrukturen kleiner Moleküle werden häufig fluoreszente Konjugate der zu untersuchenden Substanz in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen eingesetzt.<sup>[25,109]</sup> Zu zellmikroskopischen Untersuchungen wurde die Fluorescein-konjugierte Thiostreptonsonde **74** herangezogen (Abbildung 2.19, Kapitel 2.7.1).

Fixierte BSC-1-Zellen zeigten nach Behandlung mit der PEG-Fluorescein-Thiostreptonsonde **74** (10  $\mu\text{M}$ ) eine charakteristische Anfärbung subzellulärer Kompartimente, die nach dem Waschen erhalten blieb. Die Anfärbung konnte mit unmarkiertem Thiostrep-

#### 4. Wirkort: Proteasom

---



**Abb. 4.16.** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung eukaryotischer BSC-1-Zellen mit fluoreszenter Thioestreptonsonde **74**. A) Thioestreptonsonde **74**-markierte Zellen (grün). B) Mit *MitoTracker* markierte Zellen (rot). C) Überlagerung von A und B: Kolokalisierung der Thioestreptonsonde **74** mit Mitochondrien (gelb). D) Thioestreptonsonde **74**-markierte Zellen (grün). E) Anti-20 S-Proteasom immungefärbte Zellen (rot). F) Überlagerung von D und E: Kolokalisierung der Thioestreptonsonde **74** mit den 20 S-Proteasomen (gelb).

ton **3** kompetitiv verdrängt werden. Einsatz des Fluorescein-Linker-Konstrukts **73** allein zeigte keine spezifische Anfärbung und wurde durch Waschen entfernt. Die Färbung mit der PEG-Fluorescein-Thioestreptonsonde **74** konnte daher als spezifisch betrachtet werden.

In Verteilung und Größe konnte die Anfärbung am ehesten den Mitochondrien als Organellen zugeordnet werden. Die mitochondrialen 55 S-Ribosomen sind in ihrer Struktur den bakteriellen 70 S-Ribosomen sehr ähnlich. Tatsächlich ergab die gleichzeitige Applikation eines Mitochondrien-spezifischen Markers (Mitotracker Red, roter Kanal) zusammen mit fluoreszenter Thioestreptonsonde **74** (grüner Kanal) eine ausgeprägte Kolokalisierung der organell-spezifischen Anfärbung, die in der Übereinanderlagerung der Rot- und Grünkanäle als Gelbfärbung zu erkennen ist (Abbildung 4.16: A–C).

Neben der spezifischen Anfärbung der Mitochondrien wurden charakteristische An-

färbungen des Cytosols und der Kernregion beobachtet. Dieses Anfärbungsmuster konnte zunächst keiner subzellulären Struktur zugeordnet werden. Besonders kernnahe Regionen des Cytosols zeigten die Anfärbung, jedoch wurden endoplasmatische Strukturen ausgeschlossen. In nachfolgenden Experimenten wurden verschiedene Marker bzw. Antikörper gegen subzelluläre Strukturen auf ihre Kollokalisierung mit der fluoreszenten Thiostreptonsonde **74** hin untersucht. Mit anti-Proteasom Antikörpern (sekundärer Antikörper: anti-Kaninchen, Alexa55 markiert, Rotkanal) konnte dann eine spezifische Anfärbung erzielt werden, die mit der beobachteten zusätzlichen Anfärbung mittels der Thiostreptonsonde **74** korrelierte (Abbildung 4.16: D–F).

### 4.2.3. Fluoreszenzpolarisationsmessungen

Zur näheren Charakterisierung des Proteasoms als möglichen Interaktionspartner des Thiostreptons **3** und der semisynthetischen Thiostreptonderivate wurden Bindestudien der fluoreszenten Thiostreptonsonde **74** an isolierten 20S-Proteasomen mittels Fluoreszenzpolarisation durchgeführt (Abbildung 4.17). Es zeigte sich, dass die Thiostreptonsonde **74** mit einer Dissoziationskonstante von  $K_D = 1.75 \pm 0.35 \mu\text{M}$  an das 20S-Proteasom bindet. Dieses Ergebnis untermauerte unsere Annahme, dass das eukaryotische Proteasom möglicherweise als zusätzlicher zellulärer Wirkort des Thiostreptons **3** und seiner Derivate zu betrachten ist.

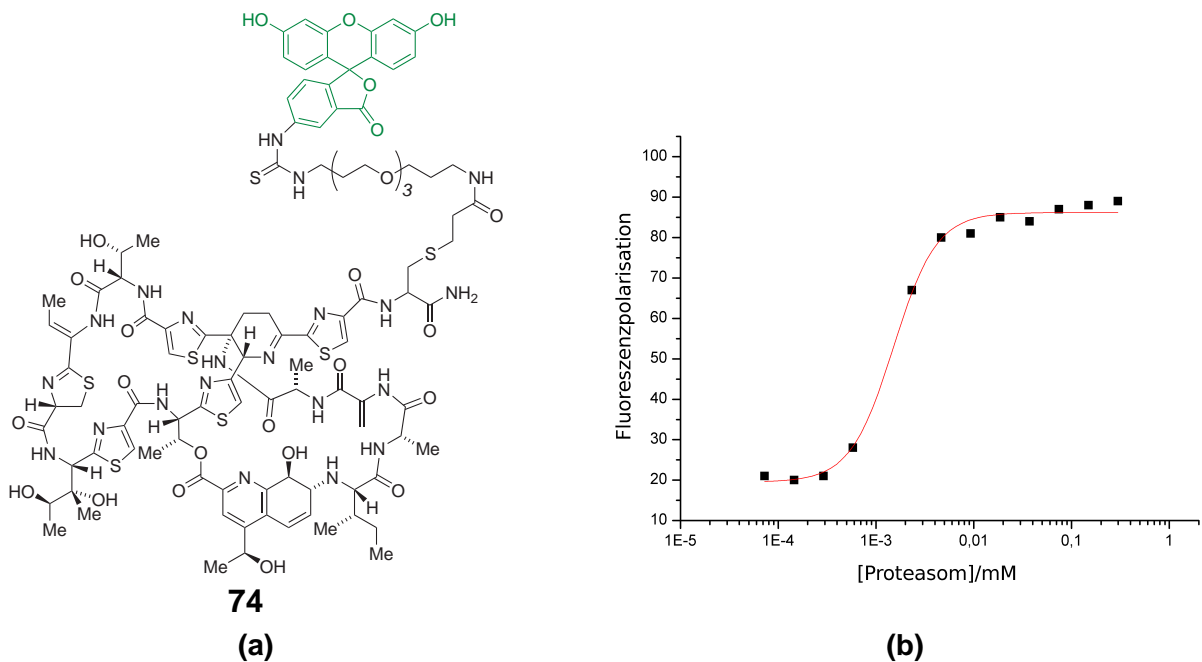
### 4.2.4. Zytotoxizitätsuntersuchungen

Die Thiostreptonderivate, die wir auf anti-Malaria-Eigenschaften testeten, wurde zusätzlich auf ihre Zytotoxizität gegenüber eukaryotischen MCF-7- und BSC-1-Zellen mit Hilfe des WST-Zytotoxizitätstests hin untersucht (Kapitel 8.7.4). Für keine der Substanzen wurde eine Zytotoxizität bis zu der getesteten Konzentration von  $20 \mu\text{M}$  beobachtet.

### 4.2.5. Proteasom-Inhibierungs-Assay

Um herauszufinden, ob das eukaryotische Proteasom funktional in seiner Eigenschaft als Protease durch Thiostrepton **3** oder seine Derivate inhibiert wird, wur-

#### 4. Wirkort: Proteasom



**Abb. 4.17. (a)** Struktur der fluoreszenten Thioesterprobe 74. **(b)** Fluoreszenzpolarisationsmessung zur Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  der Thioesterprobe 74.

de ein biochemischer Proteasom-Inhibierungs-Assay konzipiert. Hierbei wurden 20S-Proteasompräparationen aus humanen Erythrozyten verwendet, die keine regulatorische Untereinheiten (11 S bzw. 19 S) besaßen. Der Assay beruhte auf der proteolytischen Hydrolyse fluorogener, für das jeweilige aktive Zentrum spezifischer Substratpeptide.

Zur Bestimmung der Chymotrypsin- und Trypsin-ähnlichen Aktivitäten verwendeten wir die Substrate *Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC* bzw. *Boc-Leu-Arg-Arg-AMC*. Erste Ergebnisse zur Bestimmung der Caspase-ähnlichen Aktivität mittels Substrat *Z-Leu-Leu-Glu-AMC* zeigten, dass hierbei nur relativ geringe Umsatzraten bei vertretbaren Enzymmengen erzielt wurden. Dies erschwerte die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse erheblich. Wir wendeten uns deshalb dem verbesserten Substrat *Ac-Nle-Pro-Nle-Asp-AMC*<sup>[230,231]</sup> zu und konnten mit diesem ausreichend hohe Umsatzraten der Caspaseaktivität erreichen.

Weil homogene Proteasompräparationen des Gesamtkomplexes (26 S) nur sehr schwierig zu erhalten sind, wird in biochemischen Assays üblicherweise auf Fraktionen des Regulator-freien 20S-Proteasoms zurückgegriffen. Durch die (einheitliche) Aktivierung der Proteasomaktivität mittels Detergenz in den biochemischen Assays werden vergleichbare Reaktionsbedingungen geschaffen, die eine verlässliche Reproduzierbarkeit



der Umsatzraten ermöglichen.

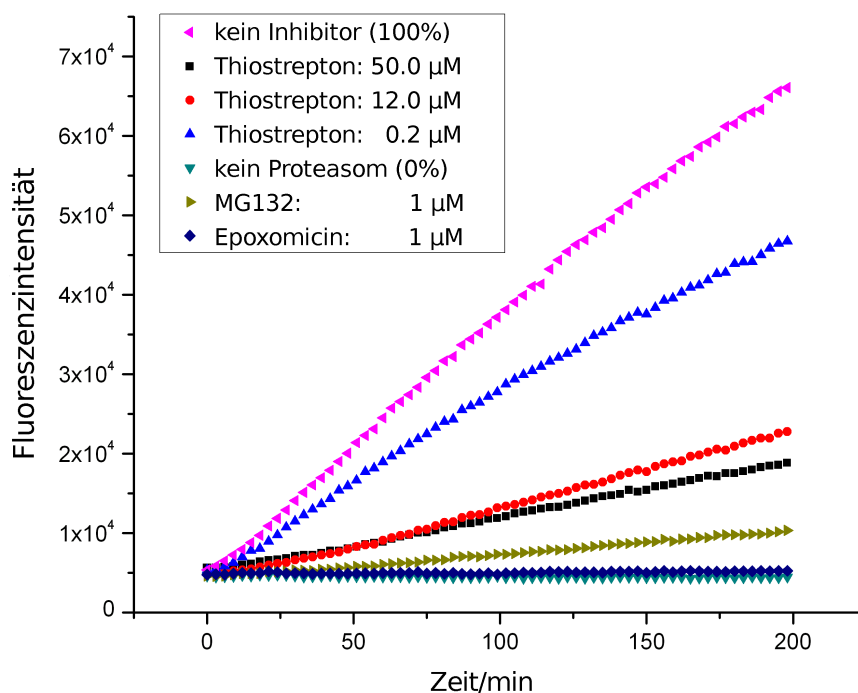
Erste Versuche ergaben, dass die Umsatzrate des 20S-Proteasoms sehr stark davon abhing, ob ein Detergenz im Reaktionspuffer zugegen war, in welcher Konzentration es vorlag und um welches Detergenz es sich handelte. In der Literatur wird häufig beschrieben, dass Natriumdodecylsulfat (SDS) als Detergenz in Proteasomassays Verwendung findet. In unserem Fall stellte sich jedoch heraus, dass für unsere Zwecke das Detergenz NP-40 in einer Endkonzentration von 0.001 % am besten geeignet war, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Zum Einfluss des Detergenz auf das Proteasom wird vermutet, dass dieses das Proteasom in eine proteolytisch aktivere Konformation überführt. Unter physiologischen Bedingungen kommt diese Rolle den Regulatoreinheiten (11 S bzw. 19 S) des Proteasoms zu.

Die Proteasomaktivität wird zusätzlich von zweiwertigen Kationen wie  $Mg^{2+}$ -Ionen beeinflusst. Wir machten die Erfahrung, dass die Reproduzierbarkeit der Umsatzrate durch Zugabe von 1 mM EDTA in den Reaktionspuffer deutlich gesteigert werden konnte. Um sicher zu stellen, dass die hydrophoben Thiostreptonderivate während der Reaktion in Lösung verblieben, verwendeten wir Dimethylsulfoxid (DMSO) zum Lösen der Substanzen in einer Endkonzentration von 10 vol-% DMSO.

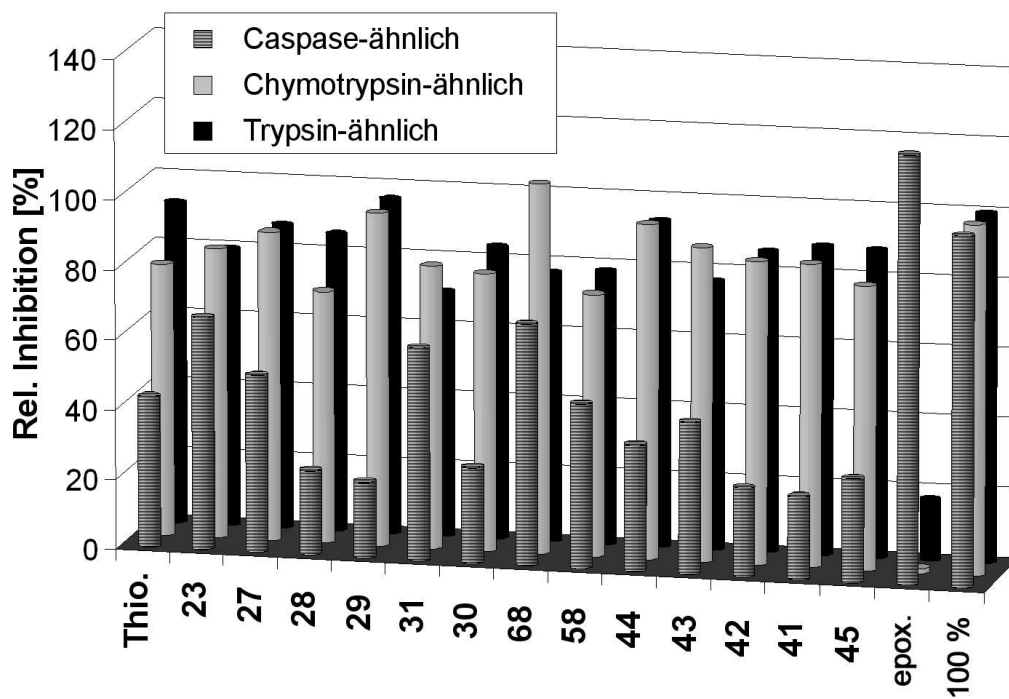
Ein exemplarisches Zeit-Umsatz-Diagramm der gehemmten und ungehemmten Reaktion des 20S-Proteasoms mit fluorogenem Substrat *Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC* zur Bestimmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität ist in Abbildung 4.18 angegeben. Erste *Screening*-Ergebnisse zeigten, dass besonders die Caspase- und die Chymotrypsinaktivität des Proteasoms durch die Thiostreptonderivate inhibiert wird (Abbildung 4.19). Deshalb konzentrierten wir uns in nachfolgenden Messungen auf diese beiden Substratspezifitäten des Proteasoms.

Basierend auf den Ergebnissen der Wachstumshemmung wurden Substanzen ausgewählt, deren inhibitorische *in vitro* Aktivität auf das Proteasom mittels Proteasomassay näher charakterisiert werden sollte. Aufgrund des relativ hohen Material- und Arbeitsaufwands zur Bestimmung der einzelnen  $IC_{50}$ -Werte beschränkten wir uns dabei auf die aussagekräftigsten Substanzen. Für jede getestete Substanz wurde durch halb-logarithmischer Auftragung der normalisierten Umsatzrate gegen die Inhibitorkonzentration

#### 4. Wirkort: Proteasom

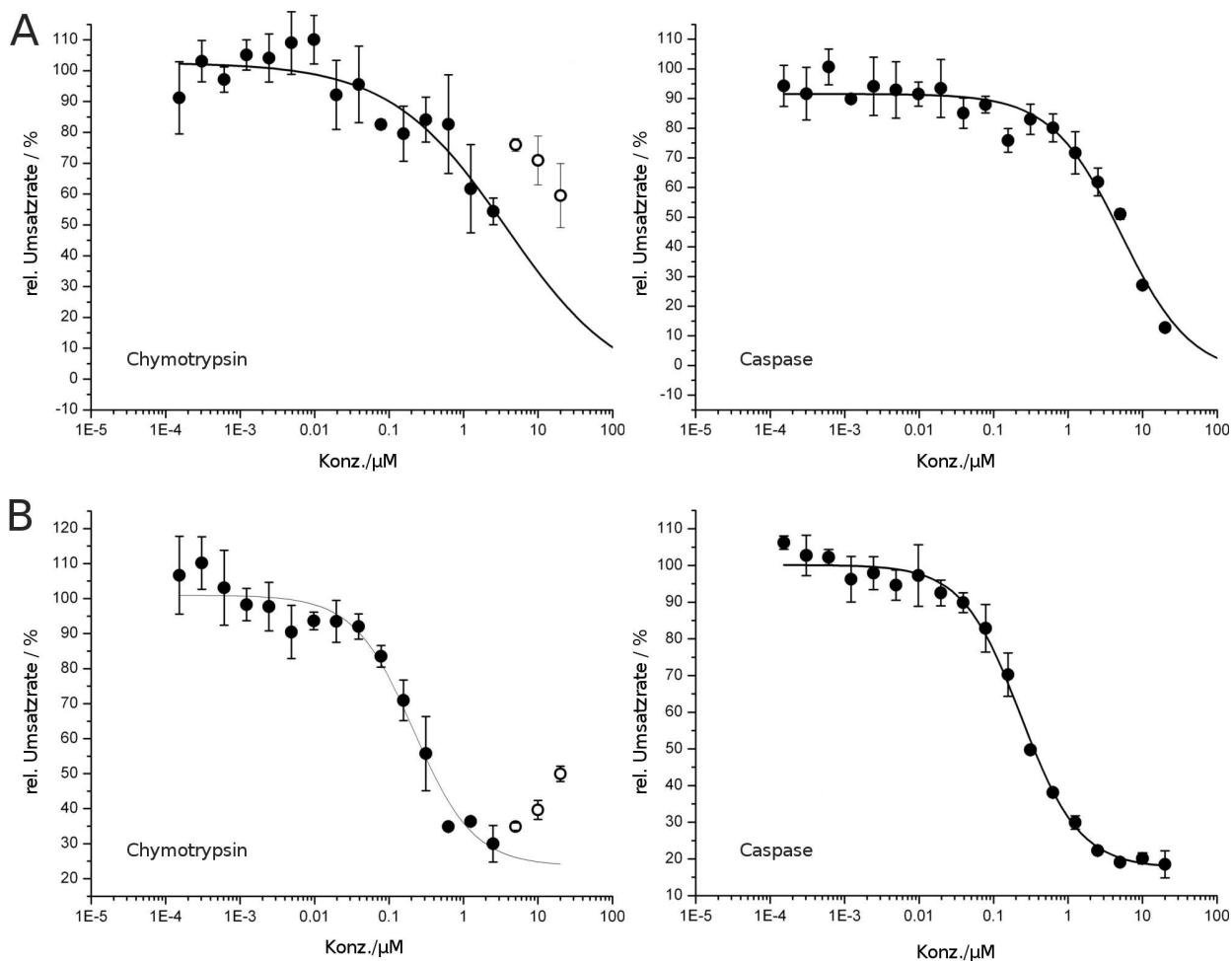


**Abb. 4.18.** Exemplarisches Zeit-Umsatz-Diagramm der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität einer Proteasomreaktion mit fluorogenem Substrat. Neben dem 0%-Wert (kein Enzym) und 100%-Wert (kein Inhibitor) sind die Reaktionsverläufe für drei verschiedene Konzentrationen des Thiostreptons **3** und für die literaturbekannten Proteasominhibitoren MG132 **103** und Epoxomicin **107** angegeben. (Experimentelle Bedingungen: Kapitel 8.7.7).



**Abb. 4.19.** Screening-Ergebnisse der Proteasominhibition. Testierung der Substanzen auf ihre Hemmwirkung der Chymotrypsin-, Caspase- und Trypsin-ähnlichen Aktivität ( $c = 1 \mu\text{M}$ )  
Thio. = Thioestrepton **3**. epox. = Epoxomicin ( $c = 0.1 \mu\text{M}$ ).

#### 4. Wirkort: Proteasom

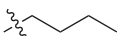
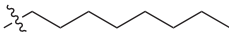
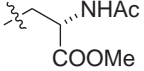
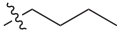
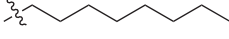


**Abb. 4.20.** Exemplarische Inhibitionskurven der Proteasomaktivität bei Zugabe von Thiostrepton **3** (A) und Derivat **45** (B). Chymotrypsin-ähnliche Aktivität: links, Caspase-ähnliche Aktivität: rechts.

tration ein Diagramm erstellt (beispielsweise Abbildung 4.20). Aus den Diagrammen wurden die inhibitorischen IC<sub>50</sub>-Werte für jede Substanz und Substrataktivität bestimmt (Tabelle 4.3).

Die Auswertung der Assay-Daten ergab, dass sich die IC<sub>50</sub>-Werte der Proteasominhibition bei beiden getesteten Aktivitäten insgesamt im niedrigen Mikro- bis Nanobereich für Thiostrepton **3** und dessen Derivate bewegten. Interessanterweise gab es bei den meisten der getesteten Verbindungen einen deutlichen Unterschied zwischen der Caspase- und der Chymotrypsinaktivität, wobei die Caspaseaktivität häufig einen um den Faktor 2–3 niedrigeren IC<sub>50</sub>-Wert besaß. Die meisten der bisher beschriebenen nichtpeptidischen Inhibitoren hemmen hingegen die Chymotrypsinaktivität.

**Tab. 4.3.** Ergebnisse des *in vitro* Proteasominhibierungs-Assays. Die ermittelten IC<sub>50</sub> der Inhibition des 20 S-Proteasoms sind jeweils für die Chymotrypsin- und die Caspaseaktivität angegeben.

Verbindung	Struktur <sup>a</sup>	Heterozyklus X <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] Chymotrypsin	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M] Caspase
<b>3</b>	Thiostrepton	Thiazolin	5.2 $\pm$ 1.0	3.8 $\pm$ 2.4
<b>23</b>	einfach-verk. Thiostrepton	Thiazolin	4.5 $\pm$ 1.1	inaktiv
<b>27</b>	zweifach-verk. Thiostrepton	Thiazolin	1.9 $\pm$ 0.1	inaktiv
<b>29</b>	R = 	Thiazolin	0.32 $\pm$ 0.05	0.1 $\pm$ 0.05
<b>30</b>	R = 	Thiazolin	0.2 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.05
<b>28</b>	R = 	Thiazolin	1.1 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1
<b>68</b>	Thiostrepton, B-Ring hydrol.	Thiazolin	15 $\pm$ 1.6	48 $\pm$ 38
<b>58</b>	einfach-verk. Thiostrepton ox.	Thiazol	3.7 $\pm$ 0.9	1.2 $\pm$ 0.1
<b>42</b>	R = 	Thiazol	1.2 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.1
<b>45</b>	R = 	Thiazol	0.2 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.1
<b>MG132</b>	—	—	0.02 $\pm$ 0.01	1.3 $\pm$ 0.2

<sup>a</sup> Die Platzhalter X und R beziehen sich auf den Rest R bzw. den Heterozyklus X in Abbildung 4.15.

#### 4. Wirkort: Proteasom

---

Einige der Derivate zeigten erfreulicherweise eine höhere inhibitorische Aktivität als der Naturstoff Thiostrepton **3** selbst. Wie bereits in den Experimenten der Wachstumsinhibierung beobachtet, zeigten sich lipophile Derivate mit mittlerer Alkylkettenlänge als besonders aktiv (**30/45** und **29/42**). Verbindung **29** war sogar bis zu 40-fach potenter als Thiostrepton **3** selbst ( $4\ \mu\text{M}/5\ \mu\text{M}$  für Thiostrepton gegenüber  $0.1\ \mu\text{M}/0.3\ \mu\text{M}$  für **29**).

Die relativ niedrige Aktivität der Verbindung **68** mit hydrolysiertem B-Ring zeigt, dass die intakte Struktur des Thiostrepton-Grundgerüsts für die inhibitorische Wirkung essentiell zu sein scheint. Gleichzeitig ist dies ein Hinweis darauf, dass die Interaktion des Thiostreptons **3** und dessen Derivate mit dem Proteasom vermutlich spezifischer Natur ist und nicht aus allgemeiner Lipophilie resultiert.

Es fiel auf, dass die Chymotrypsinaktivität bei voller Dosis auf 10–20 % reduziert werden konnte, während die Caspaseaktivität nur auf 40–50 % sank. Dieses Ergebnis lässt partiell antagonistische oder allosterische Mechanismen wahrscheinlicher werden als eine direkte Aktivität an den proteolytischen Zentren. Dafür spricht auch der enge Eingangstunnel zum 20S-Proteasom, der Makrozyklen wie Thiostrepton nur schlecht passieren lassen sollte.

Der Vergleich der *in vitro* inhibitorischen Aktivitäten der oxidierten (Thiazol-) Derivate mit den nativen (Thiazolin-) Verbindungen zeigt, dass in den meisten Fällen keine wesentlichen Unterschiede zu verzeichnen waren. Dies steht im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen der Wachstumsinhibierung (Kapitel 4.2.1), die einen Aktivitätsvorteil der oxidierten Derivate in Plasmodien auswiesen. Verantwortlich für die beobachteten Unterschiede könnte eine höhere *in vivo* Stabilität der oxidierten Verbindungen oder eine veränderte Zellaufnahme sein.

Die in dieser Arbeit ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte des literaturbekannten Proteasominhibitors MG132 **103** ( $0.02 \pm 0.01\ \mu\text{M}$  Chymotrypsin-ähnlich,  $1.3 \pm 0.2\ \mu\text{M}$  Caspase-ähnlich) sind mit veröffentlichten Werten (24 nM Chymotrypsin-ähnlich,  $2.3\ \mu\text{M}$  Caspase-ähnlich) vergleichbar.<sup>[232]</sup> Die Vergleichbarkeit der gewählten Assaybedingungen mit vorhergegangenen Arbeiten scheint daher gegeben.

Allgemein lässt sich zu den Aktivitätsunterschieden der getesteten Derivate im biochemischen Inhibierungs-Assay sagen, dass die beobachteten Trends der *in vivo* Wachstums-

inhibierung bei Plasmodien mit den *in vitro* Aktivitätsdaten des biochemischen Proteasomassays korrelieren, was stark darauf hinweist, dass der Wirkmechanismus *in vivo* tatsächlich proteasombedingt ist. Ergebnisse unserer Kooperationspartner (PD Dr. Gabriele Pradel, Universität Würzburg) zeigen deutlich, dass auch das Proteasom im Parasiten gehemmt wird. Ob hier wirklich ein kausaler Zusammenhang besteht, müssen weiterführende Arbeiten zeigen.

### 4.3. Diskussion

Die Effekte des Thiostreptons **3** auf das Wachstum von Plasmodien konnten zuvor nicht zufriedenstellend mit der alleinigen Wirkung auf die Funktionsfähigkeit des Apicoplasten erklärt werden (Kapitel 4.1.4). Gegenstand dieser Untersuchungen war deshalb, mögliche zusätzliche Zielstrukturen (*targets*) des Thiostreptons **3** in Zellen des Malariaerregers *P. falciparum* im Speziellen, sowie in eukaryotischen Zellen im Allgemeinen, zu charakterisieren.

#### **Bedeutung des Proteasoms für die eukaryotische Zelle**

Das Ubiquitin-/Proteasom-System ist für den intrazellulären Proteinabbau von fehlerhaft gefalteten bzw. geschädigten Proteinen verantwortlich, sowie für den kontrollierten Abbau regulatorischer Proteine, die wichtige Zellfunktionen wie Transkription, Zellzykluskontrolle, Zelldifferenzierung, DNA-Reparatur, Immunantwort und Stressantwort steuern. Darüberhinaus wird die Wichtigkeit der Ubiquitinierung nicht nur zur Markierung des nicht-lysosomalen Abbaus von Proteinen, sondern auch als allgemeine posttranslationale Modifikationen mit Involvierung in der Genexpression und dem Protein-*trafficking* zunehmend deutlicher. Die Wichtigkeit einer funktionierenden Protein-Homöostase wird dadurch unterstrichen, dass bei vielen pathologischen Zuständen wie beispielsweise Krebs oder den neurodegenerativen Krankheiten Alzheimer und Parkinson Störungen des Ubiquitin / Proteasom System eine große Rolle spielen. Für die therapeutische Anwendung stellt das System einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Behandlung vielfältiger Krankheiten dar. Der erste therapeutisch zugelassene Proteasominhibitor Bortezomib **106** (Velcade®) wird zur Therapie des progressiven multiplen Myeloms eingesetzt. Allerdings zeigt er teilweise toxische Eigenschaften. Der Grund, warum Proteasominhibitoren trotz ihrer inherenten Unspezifität bezüglich normaler bzw. Tumorzellen überhaupt in der Tumorthherapie eingesetzt werden, ist, dass vor allem sich schnell teilende Zellen empfindlich auf eine Proteasominhibition reagieren.

In allen untersuchten Vertretern des *Phylums* der *Apicomplexa*, zu denen auch *P. falciparum* gehört, konnte die gesamte Proteinmaschinerie identifiziert werden, die



für eine Ubiquitinierung der Proteine nötig ist (Ubiquitin, E1-, E2- und E3-Enzyme, Deubiquitinasen).<sup>[233,234]</sup> Obwohl das Ubiquitin / Proteasom System ein vielversprechendes Ziel in der Behandlung von Malaria darstellt, sind bisher nur wenige Details zur funktionalen Bedeutung dieses Systems bei Plasmodien bekannt.

### Wirkung bekannter Proteasominhibitoren auf Plasmodien

Bisher wurden einige der Proteasominhibitoren auf ihre Wirksamkeit gegen den Malariaerreger *P. falciparum* hin untersucht. Lactacystin **110** zeigt Wachstumsinhibierung im niedrigen mikromolaren Bereich, als auch eine Hemmung der Entwicklung verschiedener Stadien.<sup>[187]</sup> Der Proteasominhibitor MLN-273, der strukturell Bortezomib verwandt ist, und ebenfalls eine Boronsäure darstellt, bewirkt ebenfalls eine Störung der Plasmodienentwicklung, wobei die Erreger im frühen Erythrozyten-Ringstadium verharren.<sup>[235]</sup> Die Hemmung des Proteasoms zieht eine Akkumulierung von Polyubiquitin-markierten Proteinen nach sich, die in der Zelle nicht mehr abgebaut werden. Für Bortezomib **106** selber konnten  $IC_{50}$ -Werte der Wachstumsinhibierung im einstelligen nanomolaren Bereich bei *P. falciparum* bestimmt werden.<sup>[236]</sup> Auch hier zeigte sich, dass die Erreger im Übergang zu anderen Stadien gehemmt werden. Der kovalente Proteasominhibitor Epoxomicin **107** bewirkte eine ähnliche Wachstumshemmung wie Chloroquin und Artesunat.<sup>[186]</sup>

Die Wachstumshemmung der Plasmodien durch Proteasominhibitoren ist mit dem allgemeinen Bild vereinbar, dass das Proteasom gerade in der Regulation von Differenzierungsvorgängen bei sich entwickelnden Zellen eine essentielle Rolle spielt. Interessanterweise wirken die Proteasominhibitoren schon in Konzentrationen, die für die Wirtszellen nicht toxisch zu sein scheinen, und zeigen Wirksamkeit auch gegen Chloroquin-resistente Stämme. In allen untersuchten Fällen wurde kein *delayed death* Effekt bei der Behandlung der Plasmodien mit Thiostrepton **3** beobachtet. Neuere Ergebnisse zeigen darüberhinaus, dass auch die Entwicklung sexueller Stadien im Wirt durch Epoxomicin **107** unterbunden wird (*gametocidal*).<sup>[237]</sup> Dies ist insbesondere im Hinblick auf eine Übertragung der sexuellen Stadien in die Mücke durch das Blutmahl und der anschließenden Übertragung in einen anderen Wirt ein positiver Effekt.

##### **Das Proteasom kann fluoreszenzmikroskopisch als Wirkort identifiziert werden**

Zur Lokalisierung der Zielstrukturen (*targets*) von Thiostrepton **3** in eukaryotischen Zellen nutzten wir Fluoreszenzmikroskopie von BSC-1-Zellen mit Fluorescein-markiertem Thiostrepton **74**. In der Literatur sind mehrere erfolgreiche Untersuchungen beschrieben, in denen die Fluoreszenzmarkierung von Wirkmolekülen (*small molecules*) zur Aufklärung des zellulären Wirkorts beigetragen hat.<sup>[25,109]</sup> Tatsächlich konnten wir in fixierten BSC-1-Zellen eine charakteristische organellartige Anfärbung der mit der fluoreszenten Thiostreptonsonde **74** beobachten. Mittels simultaner Anfärbung durch den Mitochondrien-spezifischen Farbstoff *MitoTracker* konnten die angefärbten Organellen eindeutig Mitochondrien zugeordnet werden.

Zu den bekannten Wirkungen des Thiostreptons **3** in eukaryotischen Zellen zählt die Inhibierung der mitochondrialen Translation.<sup>[238]</sup> Hierbei unterscheiden sich die Hemmwirkungen auf die Translation von *E. coli*-Zellen und Rinder-Mitochondrien nur geringfügig, wie mit Hilfe eines *in vitro* Translationssystems bestimmt werden konnte (IC<sub>50</sub>-Werte: 0.48 bzw. 0.60  $\mu\text{M}$ ). Auch andere Antibiotika wie z. B. Tetracyclin zeigen vergleichbare Hemmwirkung gegen die mitochondriale Translation. Der Grund für die Empfindlichkeit der mitochondrialen Translationsmaschinerie für einige Antibiotika ist scheinbar in der engen evolutiven Verwandtschaft der prokaryotischen Ribosomen und den (hieraus hervorgegangenen) mitochondrialen Ribosomen zu suchen (Kapitel 4.1.3). Diese bedingt einen relativ hohen Grad an struktureller und funktionaler Ähnlichkeit, die von manchen Antibiotika adressiert wird.<sup>[239]</sup>

Von vorhergehenden Untersuchungen war bekannt, dass sich Thiostrepton **3** in der Seitenkette weitgehend flexibel modifizieren lässt, ohne eine starke Beeinträchtigung seiner Bindung an das prokaryotische Ribosom nach sich zu ziehen (Kapitel 3). Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass auch die fluoreszente Thiostreptonsonde **74** spezifisch an die prokaryoten-ähnlichen, mitochondrialen Ribosomen in eukaryotischen Zellen bindet. Durch Negativkontrollen konnte die Spezifität der Bindung weiter belegt werden. Der bekannte Wirkort des Thiostreptons **3** in eukaryotischen Zellen (die mitochondrialen Ribosomen) konnte demnach mit Hilfe der fluoreszenten Thiostreptonsonde **74** bestätigt werden. Dies unterstreicht die Validität der Herangehensweise, Zielstrukturen eines

Wirkstoffs mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen.

Neben der mitochondrialen Anfärbung beobachteten wir noch weitere Anfärbungen durch die fluoreszente Thiostreptonsonde **74** im Cytosol und im Zellkern. Diese zusätzlichen Anfärbungen konnten wir in Folgeuntersuchungen mit spezifischen Antikörperanfärbungen als Proteasom-spezifisch identifizieren.

Neben ihrer Lokalisierung im Cytosol ist bekannt, dass sich Proteasomenkomplexe bei Eukaryoten auch in den Zellkernen befinden.<sup>[240,241]</sup> Die Proteasomen sind hier proteolytisch aktiv<sup>[242]</sup> und scheinen in komplexer Art und Weise in der Regulation der Transkription<sup>[243]</sup> und der DNA-Reparatur<sup>[201]</sup> involviert zu sein. Mehrere Untereinheiten des Proteasoms tragen Kernlokalisierungssignale (*nuclear localization signal: NLS*), die den selektiven Import der Proteine durch die Kernporen ermöglichen.<sup>[241,244,245]</sup> Die beobachtete Anfärbung der Regionen des Zellkerns mit der fluoreszenten Thiostreptonsonde **74** ist deshalb stimmig mit der Bindung am Proteasom innerhalb des Zellkerns zu erklären.

Obwohl bisher keine Daten zur Lokalisierung der Proteasomenkomplexe im Zellkern bei Plasmodien verfügbar sind, konnte interessanterweise gezeigt werden, dass die in ihrer Funktion den Proteasomen verwandte Caseinolytische Protease (Clp) bei Plasmodien ein funktionales und notwendiges Kernlokalisierungssignal besitzt.<sup>[246]</sup> Allerdings sind die Systeme zum Kernimport bei *Apicomplexa* noch wenig erforscht, so dass die zugehörigen Kernlokalisierungssignale in den Proteasomuntereinheiten noch nicht identifiziert werden konnten. Die Modelle des allgemeinen eukaryotischen *nuclear trafficking* scheinen nicht ohne weiteres auf *Apicomplexa* übertragbar zu sein.<sup>[247]</sup>

### **Charakterisierung des Proteasoms als Wirkort**

Um die inhibitorische Wirkung des Thiostreptons **3** und der semisynthetischen Derivate auf das 20S-Proteasom näher zu untersuchen, wählten wir zwei verschiedene biochemische Herangehensweisen. Einmal konnten wir mittels Fluoreszenzpolarisationsexperimenten zeigen, dass die fluoreszente Thiostreptonsonde **74** mit einem  $K_D$  von  $1.75 \mu\text{M}$  an isolierte Hefe-Proteasomen bindet. Darüberhinaus zeigten unsere Proteasomassays mit fluorogenen Substratpeptiden an isolierten humanen Erythrozyten-Proteasomen, dass

#### 4. Wirkort: Proteasom

---

das 20S-Proteasom funktional in seiner Wirkung als Protease durch Thiostreptons **3** und die Thiostreptonderivate gehemmt wird. Bei diesen biochemischen Untersuchungen kann ebenfalls davon ausgegangen werden, dass die Aussagen zur Bindung und funktionalen Inhibition des eukaryotischen Proteasoms auf plasmodiale Proteasomen übertragen werden können.

#### **Das Proteasom als valide Zielstruktur in Plasmodien**

Als Eukaryoten besitzen Plasmodien 20S-Proteasomen mit charakteristischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten. Die Existenz der Proteasomen in *Plasmodien* wurde erstmals indirekt durch die Hemmung der Entwicklung von *P. falciparum* durch den spezifischen Proteasominhibitor Lactacystin **110** aufgezeigt.<sup>[187]</sup> Später konnte das Gen der 20S  $\beta$ -Untereinheit (PfPB)<sup>[248]</sup> und der Regulatoreinheit S4 (PfS4)<sup>[249]</sup> des *P. falciparum*-Proteasoms cloniert werden. Mit Verfügbarkeit der gesamten Genomsequenz<sup>[250]</sup> wurden bioinformatische Vergleiche der verschiedenen Proteasomsysteme gezogen und Vermutungen über ihre evolutive Verwandtschaft aufgestellt.<sup>[192]</sup> *P. falciparum* besitzt 14 Gene, die für sieben  $\alpha$ - und sieben  $\beta$ -Untereinheiten des Proteasoms codieren, so dass sich eine Proteasomarchitektur mit  $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$  aus insgesamt 28 Untereinheiten ergibt.

Für die Untereinheiten  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_7$  konnten bei *P. falciparum* jeweils eine Region niedriger Komplexität (*low complexity region*: LCR) identifiziert werden, die spezifisch für Plasmodien sind und die die Untereinheiten im Vergleich zu homologen Strukturen anderer Organismen um bis zu einem Drittel vergrößern (Kapitel 4.1.7).<sup>[194]</sup> Durch Strukturvergleich mit homologen Untereinheiten aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird vermutet, dass sich die Sequenzeinschübe in der dreidimensionalen Struktur an der Außenseite des Proteasoms zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringern befinden.

Insgesamt betrachtet ist das 20S-Proteasom ein über den Stammbaum der Arten hinweg stark konserviertes Protein, was sich in hohen Sequenzähnlichkeiten<sup>[192]</sup> und vergleichbarer Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Proteasominhibitoren manifestiert. Beispielsweise inhibiert Lactacystin **110** das Proteasom vieler verschiedener Organismen: Sowohl das Säugetier-Proteasom,<sup>[213]</sup> als auch das Proteasom der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*<sup>[251]</sup> und das des parasitären Protisten *Trypanosoma cruzi*<sup>[252]</sup> wird durch die

Wirkung von Lactacystin **110** inhibiert. Die große strukturelle Ähnlichkeit der *P. falciparum* Proteasomen verglichen mit anderen eukaryotischen Proteasomen lässt sich biochemisch auch damit verdeutlichen, dass viele anti-Proteasom-Antikörper gegen die  $\alpha$ -Einheiten auch gegen *P. falciparum* spezifische Antikörperwirkung zeigen.<sup>[194]</sup>

Obwohl die mikroskopischen Untersuchungen zunächst an BSC-1 Zellen Grüner Meerkatzen (*Chlorocebus aethiops*) durchgeführt wurden, kann aufgrund des hohen Ähnlichkeitsgrades der Proteasomen angenommen werden, dass sich die Ergebnisse der Thiostreptonsonde **74** in ähnlicher Art und Weise auch auf die 20 S-Proteasomen bei *P. falciparum* übertragen lassen. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Plasmodien selbst bergen erhebliche Schwierigkeiten, die den äußerst kleinen Abmessungen der submikroskopischen Strukturen bei den *Plasmodien* geschuldet sind, so dass in den ersten Versuchen zunächst die deutlich größeren Säugetier-Zellen herangezogen wurden.

Mittlerweile konnte im Labor von PD Dr. Gabriele Pradel (Univ. Würzburg) der funktionale Beweis geführt werden, dass Thiostrepton **3** die Funktion des Ubitquitin / Proteasom Systems in *P. falciparum* hemmt. Mittels spezifischer Antikörper gegen Polyubiquitinketten konnte in Western-Blots gezeigt werden, dass sich unter dem Einfluss des Thiostreptons **3** polyubiquitinierte Proteine unterschiedlicher Größe in den Zellen anreichern. Diese Beobachtung kann mit einer Hemmung des proteolytischen Abbaus der Polyubiquitin-markierten Proteine durch das plasmodiale Proteasom erklärt werden.

### Weitere mögliche Zielstrukturen des Thiostreptons bei Plasmodien

Neben den 20 S-Proteasomen besitzen *Plasmodien* einen weiteren Threonin-Peptidase-Komplex. Es handelt sich um ein Homolog der prokaryotischen HslV-Protease<sup>[253]</sup>, die synonym auch als ClpQ bezeichnet wird (hsl: *heat shock locus*; clp: *caseinolytic protease*).<sup>[192,194,254]</sup> Das Plasmodien-Homolog wird nachfolgend PfHslV genannt. Allgemein wird HslV/ClpQ als Vorläufer des 20 S-Proteasoms angesehen.<sup>[188,189]</sup> HslV bildet bei Prokaryoten ein Dodekamer und ist in Aufbau und katalytischer Funktion der  $\beta$ -Untereinheit des 20 S-Proteasoms sehr ähnlich. Vergleichbar mit dem eukaryotischen Proteasom, das in komplexer Art und Weise mit regulatorischen ATPase-Proteinen interagiert, sind auch für HslV Proteine bekannt, die die Erkennung und Aktivierung der Proteinsubstrate über-

#### 4. Wirkort: Proteasom

---

nehmen.<sup>[255,256]</sup> Für HslV wird diese Rolle von HslU (synonym: ClpY) übernommen, das zur Familie der AAA+ (*ATPases associated with diverse cellular activities*) Chaperone gehört.<sup>[257]</sup> Der funktionale HslUV-Komplex besteht insgesamt aus einem HslV-Dodekamer als Proteaseeinheit und zwei HslU-Hexameren als ATPase-Einheiten an jedem Ende des HslV-Zylinderkomplexes.

Obwohl für *P.falciparum* bisher keine biochemischen Strukturuntersuchungen der PfHslUV-Proteine vorliegen, wird angenommen, dass PfHslV und PfHslU zusammen einen proteasomähnlichen Komplex annehmen und eine Funktionseinheit bilden.<sup>[258]</sup> PfHslV zeigt Chymotrypsin-, Caspase- und Threonin-Protease-ähnliche Aktivität, wie durch die Hydrolyse der fluorogenen Substrate Suc-LLVY-AMC, Z-LLE-AMC und Z-GGL-AMC gezeigt werden konnte.<sup>[254]</sup> (Es sei angemerkt, dass im Gegensatz hierzu die bakterielle HslV das Substrat Z-LLE-AMC nicht hydrolysiert, d.h. keine Caspase-ähnliche Aktivität besitzt.)<sup>[255]</sup> Die katalytische Aktivität der PfHslV-Protease ist demnach den 20 S-Proteasomen, zumindest was die Hydrolyse der fluorogenen Substrate angeht, sehr ähnlich. Die Ähnlichkeit wird weiterhin dadurch untermauert, dass PfHslV durch die bekannten Proteasominhibitoren MG132 **103**<sup>[259]</sup>, NLVS **105**<sup>[260]</sup> und Lactacystin **110**<sup>[254]</sup> inhibiert wird. Während das 20 S-Proteasom in Plasmodien konstitutiv exprimiert ist, wird die PfHslV-Protease besonders stark in den Entwicklungsstadien Schizont und Trophozoit exprimiert.<sup>[194,254]</sup> PfHslV ist in diesen Stadien proteolytisch aktiv und ist vornehmlich im Cytosol lokalisiert.<sup>[254]</sup>

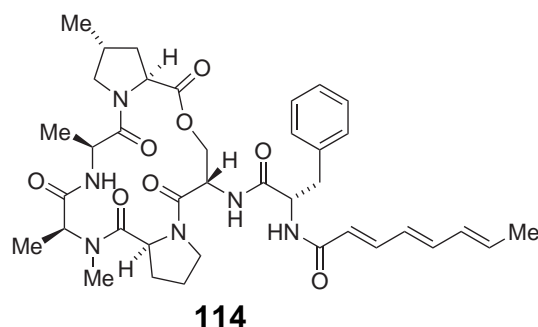
Es könnte aufgrund der Substratspezifität der Protease und der Wirkung bekannter Proteasominhibitoren vermutet werden, dass auch Thiostrepton **3** Aktivität gegenüber dem PfHslV-Komplex aufweist. Nähere biochemische Untersuchungen sind notwendig, um diesen Sachverhalt zu klären. Als Plasmodien-spezifische Zielstruktur, die beim Menschen nicht vorkommt, wäre eine selektive Hemmung durch optimierbare Thiostreptonderivate besonders interessant.

## Hemmung proteasom-ähnlicher Proteinkomplexe durch nichtkovalente Inhibitoren

Die bakteriellen Proteine der Clp-Familie stellen Prototypen ATP-abhängiger, regulierter Proteasen dar, zu denen auch das 20S-Proteasom gehört.<sup>[261]</sup> ClpP assoziiert als Serin-Protease beispielsweise mit regulierenden und aktivierenden Clp-ATPasen der AAA+-Familie (ClpX, ClpA in *E. coli*; ClpX, ClpC oder ClpE in *B. subtilis*). Der allgemeinen Architektur regulierter Proteasen folgend, wird ein zylindrisches Zentralpartikel (*core particle*) aus ClpP-Monomeren gebildet, das die proteolytische Aktivität im Innenraum abschirmt. Beim ClpP-Komplex ist dieser Zylinder aus zwei Heptamer-Ringen aufgebaut. ClpP ist bei Bakterien wichtiger Bestandteil der Proteinhomöostase.

Acyldepsipeptide (ADEP) sind wirksame Antibiotika gegen Gram-positive Bakterien, die sich vom Naturstoff ADEP1 114 ableiten, und zur Gruppe der Enopeptide gehören (Abbildung 4.21).<sup>[262]</sup> Der Wirkmechanismus dieser Klasse von Antibiotika beruht auf der Deregulierung des bakteriellen ClpP-Proteasekomplexes.<sup>[263]</sup> Die Acyldepsipeptide verhindern die Assoziation des Zentralpartikels bestehend aus ClpP-Monomeren mit den regulierenden Clp-ATPasen und aktivieren die proteolytische Funktion der ClpP-Untereinheiten. Hierdurch wird aus einer hoch regulierten Protease, die Proteine nur mit Hilfe der assoziierten ATPasen abbauen kann, eine unregulierte Protease — mit fatalen Folgen für die Physiologie der Bakterien. Es wird vermutet, dass v.a. flexible Proteine und solche, die gerade als wachsende Kette während der Translation biosynthetisiert werden, und noch ungefalted sind, von der unregulierten ClpP abgebaut werden.

ADEP1 bindet in hydrophoben Kavitäten des ClpP-Proteasekomplexes, die durch jeweils zwei benachbarte ClpP-Monomere gebildet werden, wobei in der Kristallstruktur des *Bacillus subtilis*-ClpP-Komplexes alle 14 möglichen Bindestellen von ADEP1 besetzt werden.<sup>[264]</sup> Die Kavitäten stellen die Interaktionsflächen des ClpP-Komplexes mit den ATPasen ClpX bzw. ClpA dar. Neben dieser Konkurrenz um die Bindungskavitäten zwischen ADEP1 und den ATPasen bewirkt die Bindung von ADEP1 an den ClpP-Komplex eine konzertierte Drehbewegung aller Monomere in Richtung der Peripherie des Heptamerrings. Hierdurch wird der ClpP-Komplex von einem geschlossenen in einen geöffneten Porenkomplex überführt, der ungefaltete Proteine unreguliert aufnehmen und



**Abb. 4.21.** Struktur des Acyldepsipeptid-Antibiotikums ADEP1 **114**.

abbauen kann. Das aktive Zentrum hingegen erfährt bei Bindung des ADEP1 keine nennenswerte Konformationsänderung, so dass ein allosterischer Aktivierungsmechanismus ausgeschlossen wird.

Auch vom 20S-Proteasom ist bekannt, dass es bei der Aktivierung durch die Regulatoreinheiten des 11S-Komplexes zu einer Porenöffnung des äußeren  $\alpha$ -Rings kommt, so dass der Zugang zum Inneren des proteolytisch aktiven Zylinders frei wird.<sup>[265,266]</sup> Man kann vermuten, dass, ähnlich wie bei ClpP gezeigt, auch beim Proteasom hydrophobe Kavitäten zwischen den Monomeren vorhanden sind, die für niedermolekulare Modulatoren zugänglich sind. Bisher sind jedoch keine strukturellen Details der Bindung niedermolekularer Modulatoren am eukaryotischen 20S-Proteasom bekannt. Der Einfluss der niedermolekularen Moleküle, die in solchen hydrophoben Kavitäten binden, könnte allgemein betrachtet sowohl inhibitorischer als auch aktivierender Natur sein, da vielfältige Effekte auf die Gesamtkonformation des Komplexes denkbar sind.

Für Thiostrepton **3** und seine Derivate ist allein aufgrund der bisherigen Ergebnisse noch keine Aussage darüber zu treffen, ob ihre Bindestelle im aktiven Zentrum der katalytischen Untereinheiten liegt, wie dies bei den nichtkovalenten Inhibitoren der Gruppe der zyklischen TMC-95-Peptiden der Fall ist (Kapitel 4.1.11), oder ob Thiostrepton **3** bzw. die Derivate ähnlich den Acyldepsipeptiden bei der Protease ClpP in (hydrophoben) Kavitäten zwischen den Monomeren binden. Interessant in diesem Zusammenhang ist jedoch, dass besonders die mit lipophilen Alkylketten derivatisierten Thiostrepton-derivate hohe inhibitorische Aktivität aufwiesen, denn auch ADEP1 besitzt einen sehr hydrophoben Molekülteil mit einer C<sub>8</sub>-Fettsäurekette, der von hydrophoben Seitenketten



in der Kavität aufgenommen wird. Die Modulation des ClpP-Proteasekomplexes könnte daher als Modell für die Interaktion der Thiostreptonderivate und der daraus folgenden funktionalen Modulation des 20S-Proteasoms dienen.

### Wirkstoffe mit pleiotropen Effekten

Neben der Gruppe der zyklischen TMC-95-Peptide sind bisher nur wenige nicht-kovalenten Inhibitoren des eukaryotischen Proteasoms beschrieben worden (Kapitel 4.1.11). Allerdings wurde berichtet, dass mehrere bekannte Wirksubstanzen einen Einfluss auf die Aktivität des Proteasoms ausüben, d.h. dass sie neben ihres Hauptwirkmechanismus zusätzlich das Proteasom als sekundäre Zielkomponente adressieren (pleiotrope Effekte). Es ist jedoch nicht geklärt, ob diese Medikamente auch unter physiologischen Bedingungen einen signifikanten Effekt auf das Proteasom *in vivo* ausüben. Eventuell spielt dieser Einfluss auf das Proteasom aber im Gesamtbild der therapeutischen Wirkung dieser Substanzen eine Rolle. Zu den Medikamenten, die die Aktivität des Proteasoms modulieren, zählen u.a. folgende strukturell sehr unterschiedliche Wirkstoffe: das Immunsuppressivum Cyclosporin,<sup>[267]</sup> der HIV-Proteaseinhibitor Ritonavir<sup>[268]</sup> und der HMG-CoA-Reduktaseinhibitor Lovastatin.<sup>[269]</sup>

Wirkstoffe, die mehrere Zielstrukturen adressieren, d.h. pleiotrope Effekte in ihrer Wirkung zeigen, sind besonders interessant in der Therapie von Infektionskrankheiten, da sich die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung bei den Erregern reduziert.<sup>[270]</sup> Vergleicht man die Wirkmechanismen heutiger Antibiotika, so kristallisiert sich als Bild heraus, dass alle Antibiotika, die seit Jahrzehnten erfolgreich als Monotherapien eingesetzt werden, auf Mechanismen beruhen, die sehr viel komplexer sind, als nur ein einziges Wirkziel zu besitzen.<sup>[11,271]</sup> Entweder wirken diese erfolgreichen Antibiotika parallel auf mehrere Zielstrukturen simultan, oder die Zielstruktur wird in den Zellen von mehreren Genen codiert. Das Ergebnis ist, dass sich Resistenzen gegenüber einem solchen Wirkstoff nur sehr langsam entwickeln, und dass die entsprechenden Antibiotika über mehrere Jahrzehnte erfolgreich eingesetzt werden konnten.

Das über lange Zeit als gültig betrachtete Konzept des « ein Ziel – ein Wirkstoff » ist in den letzten Jahren vermehrt hinterfragt worden. Es scheint sich die Ansicht durchzuset-

#### 4. Wirkort: Proteasom

---

zen, dass Polypharmakologie eine wichtige Eigenschaft einer großen Anzahl erfolgreicher Wirkstoffe ist, die in der Therapie eingesetzt werden. Diese Erkenntnis wirft wiederum die Frage auf, wie (und ob überhaupt) dieser Aspekt der Komplexität in der rationalen Wirkstoffsuche ausreichend berücksichtigt werden kann.<sup>[272]</sup> Naturstoffe erscheinen in diesem Zusammenhang besonders interessant, da sie Strukturen darstellen, die über lange Zeiträume im Laufe der Evolution stets der Komplexität multipler Zielstrukturen unterworfen waren.

#### **Thiostrepton als «dualer» Wirkstoff**

Es wurde gezeigt, dass der Naturstoff Thiostrepton **3** neben der scheinbar primären Zielstruktur des prokaryotischen Ribosoms, welches im nanomolaren Bereich inhibiert wird, auch das (eukaryotische) Proteasom als sekundäre Zielstruktur im mikromolaren Bereich ansteuert. Es ist bemerkenswert, dass auch für andere Naturstoffe eine sekundäre Aktivität gegen das Proteasom beobachtet wurde, etwa das Depsipeptid Cyclosporin<sup>[267]</sup> und das Polyketid Lovastatin<sup>[269]</sup>. Es drängt sich die Frage auf, ob das Proteasom aufgrund seiner Architektur für nichtspezifische Interaktionen mit kleinen lipophilen Molekülen besonders empfänglich ist, welche dann die Aktivität des Proteasoms modulieren. Wir konnten jedoch zeigen, dass die Struktur der Thiostreptonderivate sehr wohl Einfluss auf die Wirkung hat. Durch lipophile Derivatisierungen konnten wir eine höhere inhibitorische Aktivität erreichen, während die Ringöffnung des B-Rings zu einem Verlust der inhibitorischen Wirkung führte. Die Struktur des Naturstoffs Thiostrepton scheint also für seine Wirkung gegenüber dem Proteasom wichtig zu sein. Demnach sollte eine spezifische Wechselwirkung vorliegen, die über eine rein unspezifische Modulierung hinausgeht.

#### **Funktion des Thiostreptons im Produzentenstamm**

Falls die Struktur des Thiostreptons im Laufe der Evolution optimiert wurde, beide Zielstrukturen zu adressieren, stellt sich die Frage nach dem Sinn bzw. dem Vorteil für den Produzentenorganismus. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass Vertreter der Ordnung *Actinomycetales* zu den bisher einzigen bekannten Eubakteri-

en zählen, die ein eukaryoten-ähnliches Proteasom aufweisen.<sup>[273]</sup> Gerade die Aktinomyzeten (Gattung: *Actinomyces*) innerhalb dieser Ordnung sind als Produzenten eines Großteils der bisher beschriebenen natürlichen Proteasominhibitoren bekannt. Zu diesen Inhibitoren gehören beispielsweise Epoxomicin **107**<sup>[274,275]</sup>, TMC-95 **112**<sup>[215,216]</sup> und Lactacystin **110**<sup>[213,276]</sup>. Auch das peptidische  $\beta$ -Lacton Belactosin A<sup>[277]</sup> und das Polyketid Kendomycin **113**<sup>[221]</sup> werden von Streptomyzeten (*Actinomyces*) produziert und inhibieren das Proteasom.

Nach einer neueren Hypothese der allgemeinen Bedeutung der Antibiotika für den Produzentenorganismus könnten viele der uns als Antibiotika bekannten Naturstoffe auch der Kommunikation innerhalb bakterieller Konsortien zu dienen.<sup>[278,279]</sup> Zumindest den bakteriostatischen Naturstoffen kommt in dieser erweiterten Sichtweise der Antibiotika eine entscheidende Funktion als Regulatoren oder Singalmolekülen hinzu. Die Eigenschaft, die Biosynthese modulieren zu können, wird von den kleinen Molekülen in niedriger Konzentration ausgeübt. Besonders die Antibiotika, die in die Translation bzw. die Transkription eingreifen, können durch Binden an die entsprechenden Makromoleküle der Biosynthese eine Modulation ihrer Aktivität erreichen. Es erscheint plausibel, dass die Koordination des Stoffwechsels oder der Differenzierung beispielsweise innerhalb von Bakterienkonsortien eine wichtige Rolle spielt, die von kleinen Molekülen mit gesteuert wird.

Es erscheint demnach verständlich, dass verschiedene Actinomyceten Naturstoffe produzieren, die nicht nur modulierend auf die Biosynthese (Translation) wirken, sondern auch das Proteasom in seiner Funktion als Dreh- und Angelpunkt der intrazellulären Regulation adressiert. (Zur Funktion des Proteasoms in Aktinomyzeten ist noch sehr wenig bekannt). Wenn Actinomyceten Proteasominhibitoren produzieren und selber Proteasomen besitzen, lässt sich vermuten, dass diese Inhibitoren entweder *Autoinducer* darstellen, die die Regulation des eigenen Proteasoms einer Zelle bewirken, oder aber durch Abgabe in die Umgebung die Proteasomen der in Gemeinschaft lebenden Artgenossen moduliert und evtl. synchronisiert. Weiterhin könnte man eine Wirkung auf andere Bakterienarten vermuten, die über die Bindung an den Thiostrepton-«Rezeptor» Ribosom vermittelt wird. Thiostrepton **3** könnte sogar eukaryotischen Proteasomen gelten — die

#### 4. Wirkort: Proteasom

---

erforderliche Aktivität konnten wir in unseren Experimenten *in vitro* zeigen. Manche Aktinomyzeten leben in enger symbiotischer Gemeinschaft mit eukaryotischen Pilzen, die eine Interspezies-Kommunikation sinnvoll erscheinen lässt. Wie in Kapitel 2.2.4 bereits beschrieben, deutet das Vorhandensein des Thiostrepton-spezifischen Rezeptorproteins TipAL darauf hin, dass Thiostrepton **3** vielfältige biologische Funktionen wahrnimmt, die über seine Funktion als Ribosomeninhibitor hinausgehen.

#### **Zusammenfassende Bemerkungen**

Wir konnten zeigen, dass Thiostrepton **3** neben der gut untersuchten Aktivität gegen das prokaryotische Ribosom bei Eukaryoten auch das Proteasom ansteuert. Dieses Ergebnis bietet eine mögliche Erklärung für viele der beobachteten Aktivitäten des Thiostreptons, die nicht mit einer alleinigen Inhibition des Ribosoms in Einklang zu bringen sind. Die von den klassischen Antibiotika abweichende Eigenschaft, keinen *delayed death* gegen den Malariaerreger *P. falciparum* zu induzieren, kann mit der Aktivität gegen das Proteasom erklärt werden. Darüberhinaus könnten sowohl die beobachteten immunsuppressiven Eigenschaften<sup>[37]</sup> des Thiostreptons **3** und des verwandten Siomycins, als auch die Antitumoreigenschaften<sup>[280]</sup> beider Moleküle durch eine Modulation des Proteasoms erklärt werden.

Für den Einsatz in der Therapie gegen Malaria scheinen Thiostreptonderivate interessante Eigenschaften zu besitzen. Sie zeigten in unseren Versuchen keine Zytotoxizität in Säugetier-Zelllinien und haben durch ihren dualen Wirkmechanismus den Vorteil, dass sich Resistenzen wahrscheinlich nur langsam ausbilden würden. Durch ihren direkten Effekt auf das Proteasom wirken die Thiostreptonderivate im Vergleich zu anderen Antibiotika schneller, können durch ihre Wirkung gegen die Translation im Apicoplasten aber zusätzlich die Eliminierung verbliebener Plasmodien im nächsten Generationszyklus voranbringen, wie dies in der Therapie üblicherweise durch die klassischen Antibiotika erreicht wird. Die Semisyntese stellt in diesem Zusammenhang eine valide Methode dar, um die schon vorhandenen dualen Funktionen des Naturstoffs Thiostreptons zu modulieren, und beispielsweise die Eigenschaft der Proteasominhibition durch lipophile Veränderungen für den Einsatz als Antimalaria-Wirkstoff zu verstärken.

### Ausblick: Mögliche Aktivitäten gegen weitere Krankheitserreger

Die meisten humanpathogenen einzelligen Parasiten durchlaufen während ihrer Lebenszyklen mehrere morphologisch stark voneinander abweichende Stadien, die häufig Wirtswechsel beinhalten können. Bei einigen der hierbei zugrundeliegenden Zelldifferenzierungsvorgängen konnte eine Beteiligung der Proteasomen nachgewiesen werden.<sup>[281]</sup> Es verwundert daher nicht, dass Proteasominhibitoren häufig zur Hemmung des Wachstums oder der Entwicklung eingesetzt werden können.

Vertreter der *Trypanosomen* sind einzellige, geißeltragende, eukaryotische Parasiten, die verschiedene Wirbeltiere befallen. Beim Menschen kann *T. brucei* beispielsweise die Schlafkrankheit auslösen, während *T. cruzi* für die sogenannte Chagas-Krankheit verantwortlich ist. Der Proteasominhibitor Lactacystin **110** inhibiert das Wachstum von Trypanosomen mit  $IC_{50}$ -Werten im mykromolaren Bereich,<sup>[281]</sup> während Bortezomib **106** das Wachstum sogar im nanomolaren Bereich hemmt<sup>[282]</sup>. Auch die Erreger der Leishmaniose (*Leishmania spp.*) zählen zu den geißeltragenden, eukaryotischen Protozoen. Sie leben als obligat intrazelluläre Parasiten in Wirts-Makrophagen und vollziehen einen Wirtswechsel zwischen Insekt und Wirbeltier. Das Wachstum von *L. mexicana* konnte mittels des Proteasominhibitors MG132 **103** gehemmt werden.<sup>[283]</sup>

Die Zusammensetzung des Protozoen-Proteasoms gleicht der allgemeinen Architektur der eukaryotischen Proteasomen: Die charakteristischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringe sind aus jeweils unterschiedlichen  $\alpha_{1-7}$  und  $\beta_{1-7}$  Untereinheiten aufgebaut. Das Proteasom der Archaeen hingegen setzt sich aus Homomeren der beiden Untereinheiten zusammen. Obwohl die strukturellen Unterschiede zwischen dem Proteasom von *P. falciparum* und Trypanosomen bzw. Leishmanien noch nicht im Detail bekannt sind, könnte man aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit<sup>[192]</sup> der Proteasomen vermuten, dass die Thiostreptonderivate auch bei den einzelligen Parasiten eine biologische Wirkung aufweisen könnten. Die Tatsache, dass Plasmodien erfolgreich innerhalb der Wirtszelle adressiert werden können, bestärkt die Hoffnung, dass dies auch bei den intrazellulären Parasiten der Fall sein könnte. Trypanosomen und Leishmanien besitzen, ähnlich den Plasmodien, Homologe der bakteriellen Threonin-Peptidase HslV.<sup>[192]</sup> Falls die Thiostreptonderivate (zusätzliche) Aktivität gegen diese Protease bei *P. falciparum* aufweisen, sind diese zellulären

#### 4. Wirkort: Proteasom

---

Zielstrukturen auch bei den einzelligen Parasiten vorhanden.

#### **Aktivität gegen *Mycobacterium tuberculosis*?**

*Mycobacterium tuberculosis* ist ein Gram-positives Bakterium der Ordnung *Actinomycetales*, das als Erreger der Tuberkulose jährlich für ungefähr 1,8 Mio. Todesfälle<sup>c</sup> verantwortlich ist. *M. tuberculosis* verfügt über ein eukaryoten-ähnliches Ubitquitin / Proteasom System,<sup>[284,285]</sup> das eine essentielle Rolle im Schutz des Bakteriums vor dem Angriff des Wirtsimmunsystems mit Stickstoffmonoxid NO spielt.<sup>[286]</sup> Die Rolle des Ubiquitins wird bei *M. tuberculosis* vermutlich von dem verwandten Protein Pup übernommen (Pup: *prokaryotic ubiquitin-like protein*). Das Proteasom gilt bei *M. tuberculosis* als vielversprechender Ansatzpunkt, um den Tuberkuloseerreger gegen Angriffe des Immunsystems zu sensibilisieren. *M. tuberculosis* scheint auf die detoxifizierende Aktivität des Proteasoms besonders in den intrazellulären Ruhestadien angewiesen zu sein,<sup>[287]</sup> die sich durch einen niedrigen Stoffwechsel auszeichnen und deshalb mit klassischen Antibiotika nur sehr schwierig bekämpft werden können. Die Zellwand von *M. tuberculosis* zeichnet sich durch einen hohen Lipidgehalt aus und ist unter anderem aus charakteristischen langkettigen Fettsäuren (z.B. Mykolsäuren: C<sub>22</sub>–C<sub>90</sub>) aufgebaut. Die Bakterienzellen werden von Makrophagen des Wirtes aufgenommen und verbleiben in den Phagosomen. Die starke, lipophile Zellwand verleiht den Bakterien Schutz vor dem Immunsystem des Wirts.

Bei *P. falciparum* haben wir gezeigt, dass besonders die lipophilen Derivate des Thiostreptons starke *in vivo* Aktivität (Wachstumshemmung) zeigen. Bemerkenswert ist, dass die Substanzen bei *P. falciparum* erst mehrere Lipidmembranen durchdringen müssen, um zum Wirkort in den intrazellulären Plasmodien zu gelangen. Daher ließe sich spekulieren, ob die Substanzen in ähnlicher Weise zu den intrazellulären *M. tuberculosis* vordringen könnten, was durch die hohe Lipophilie der Bakterienzellwände begünstigt werden sollte. Mit einem eukaryoten-ähnlichen Proteasom, das sich durch bekannte Proteasominhibitoren hemmen lässt,<sup>[288,289]</sup> und einem prokaryotischen Translationssystem wären potentielle Zielstrukturen in der Zelle vorhanden. In der Tat wurde Thiostrepton **3** vor kurzem in einem *Screening* als potentieller Anti-Tuberkulose Wirkstoff identi-

---

<sup>c</sup> World Health Organization (2009): Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing.

fiziert.<sup>[290]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass Thiostrepton das Wachstum intrazellulärer *M. tuberculosis*-Bakterien mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0.08 µM (!) hemmt.





## **5. Biosynthese des Thiostreptons**

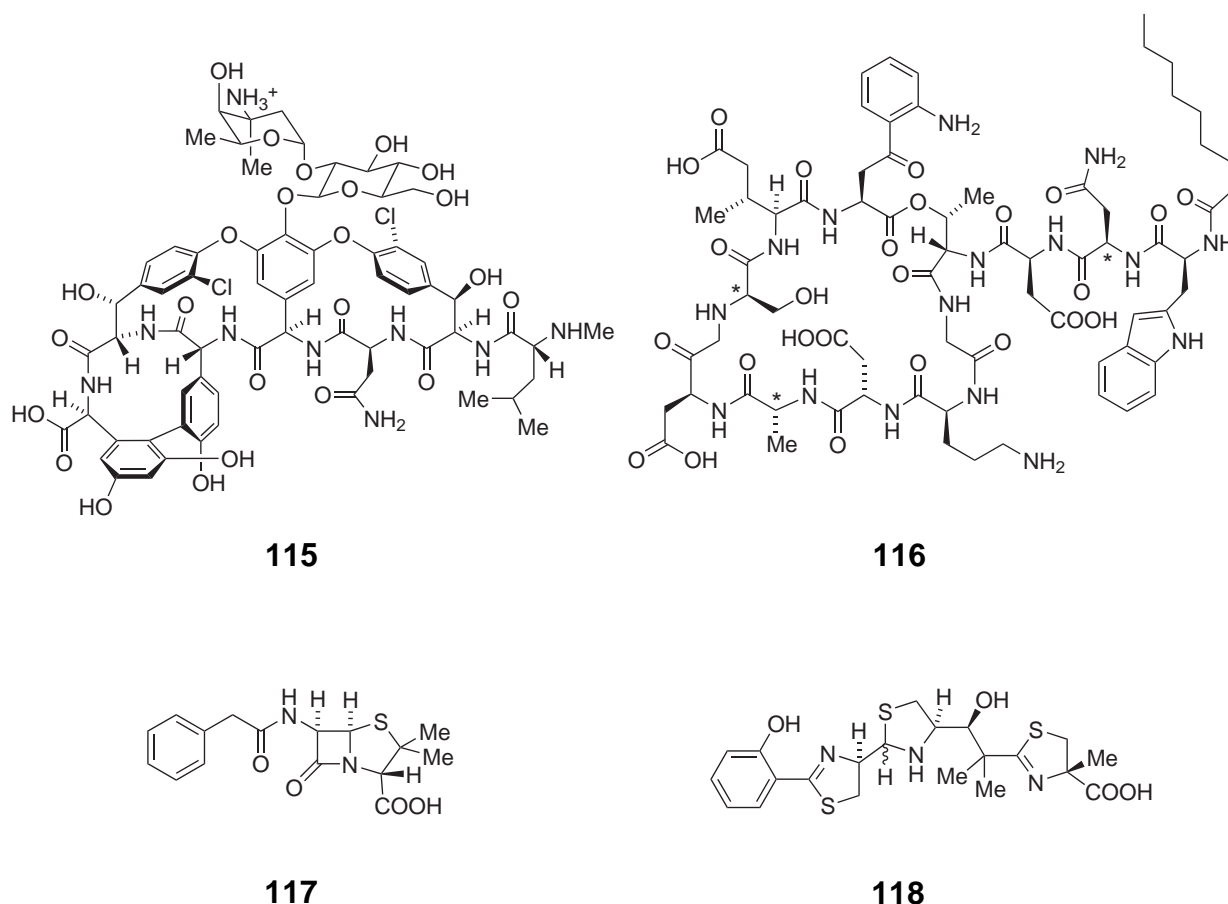
### 5.1. Einleitung

Obwohl die Familie der Thiopeptide bereits seit mehr als 60 Jahren bekannt ist, konnten die Details ihrer Biosynthese erst vor kurzem mit der Verfügbarkeit der Genomsequenzen der Produzentenstämme aufgeklärt werden (Übersichtsartikel:<sup>[291,292]</sup>). Erstaunlicherweise deckte die Identifizierung der Gencluster übereinstimmend einen **ribosomalen** Biosyntheseweg auf, während lange Zeit aufgrund der Größe und Komplexität der Thiopeptide und der Vielzahl an Modifikationen ein nicht-ribosomaler Syntheseweg<sup>[293]</sup> vermutet worden war.

Für die Biosynthese peptidischer Sekundärmetabolite existieren generell zwei unterschiedliche Stoffwechselwege — der ribosomale und der nicht-ribosomale. Für die nicht-ribosomale Biosynthese sind die sogenannten nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) verantwortlich, modulare Multienzymkomplexe von häufig über 1 Mega Dalton Molekulargewicht (*vide infra*).<sup>[294,295]</sup> In ihrem modularen Aufbau und ihrer prozessiven Logik der Monomeraktivierung und Kettenverlängerung des an einen Cofaktor gebundenen Substrats ähneln sie den großen Proteinkomplexen der Polyketidsynthetasen (PKS) und Fettsäuresynthetasen (FAS: *fatty acid synthase*).<sup>[296]</sup>

In fundamentalem Unterschied zu den nicht-ribosomalen Biosynthesen wird für die ribosomalen Stoffwechselwege der peptidischen Sekundärmetabolite die ribosomale Translationsmaschinerie zum Aufbau der Peptide genutzt. Ihre Sequenz ist genetisch codiert. Die ribosomal synthetisierten Peptide können vielfältige Modifikationen aufweisen, die erst post-translational nach Synthese des Präpeptids von unabhängigen Enzymen eingeführt werden (Kapitel 5.1.2). Modifikationen der nicht-ribosomalen Peptide werden hingegen in den meisten Fällen schon während der Kettenverlängerung der Peptide durch spezielle Enzymmodule, die in die NRPS-Komplexe strukturell und funktional eingebunden sind, in das Substrat eingefügt (Kapitel 5.1.1).

Bekanntere Beispiele für Naturstoffe, die einer nicht-ribosomalen Biosynthese entstammen, sind  $\beta$ -Lactamantibiotika wie die Penicilline, das Siderophor Yersiniabactin **118**, das Glykopeptid Vancomycin **115** und das Lipopeptid Daptomycin **116** (Abbildung 5.1).<sup>[296]</sup> Auffällig ist, dass jedes der Peptide mehrere Modifikationen besitzt, die es von normalen Peptiden unterscheidet. Hierzu gehören beispielsweise die folgenden, bereits während



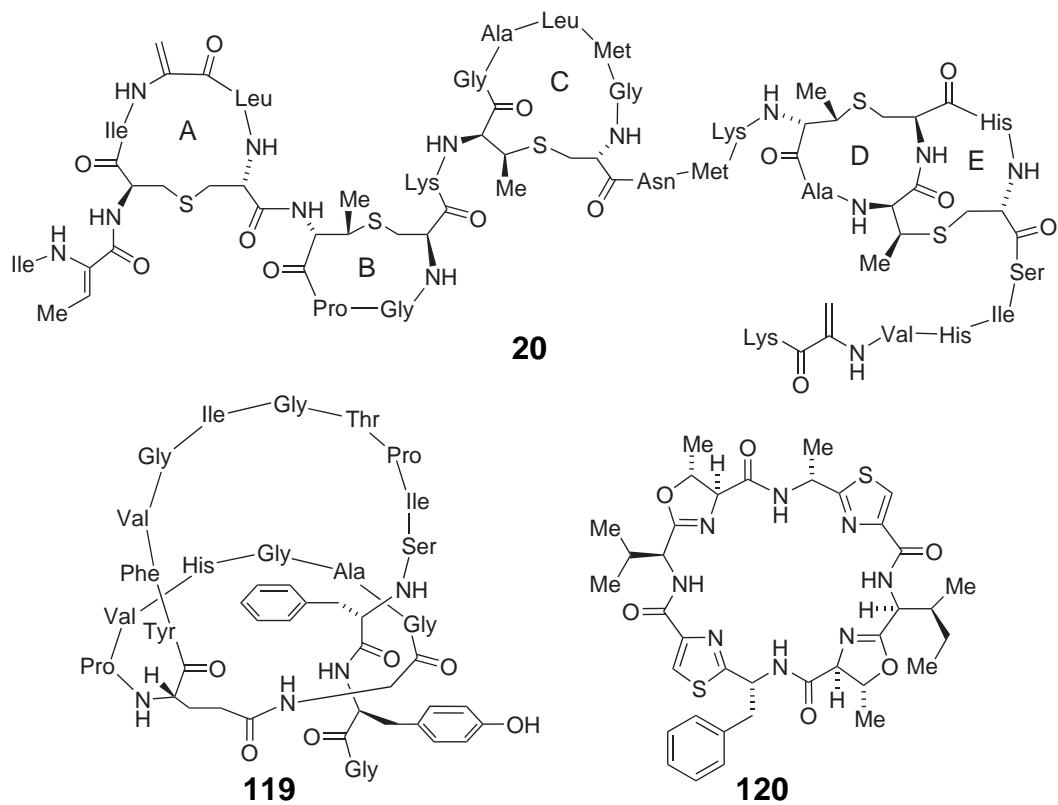
**Abb. 5.1.** Beispiele nicht-ribosomally synthetisierter Naturstoffe (NRPS). Die Strukturen des Vancomycins **115**, des Daptomycins **116**, des Penicillins G **117** und des Yersiniabactins **118** sind gezeigt.

der Kettenverlängerung durch Modulenzyme des NRPS-Komplexes eingefügten Modifikationen: Heterozyklisierung (Yersiniabactin **118**), Einbau nichtproteinogener Aminosäuren (Vancomycin **115**) und Epimerisierung (Daptomycin **116**).

Zu den ribosomal synthetisierten Peptiden zählen unter anderem die Familien der Lantibiotika<sup>[297]</sup>, der Microcine<sup>[298]</sup> und der Patellamide<sup>[299]</sup> (Abbildung 5.2). Diese Peptide enthalten beispielsweise folgende post-translationale Modifikationen: Thioetheramino-säuren und Dehydroamino-säuren (Nisin A **20**), Makrozyklisierung (Microcin J25 **119**), Heterozyklisierung (Patellamid C **120**).

Durch Kenntnis der Struktur und der Sequenzen der Thiopeptid-Gencluster können mit bioinformatischen Werkzeugen neue Biosynthese-Gencluster in sequenzierten Organismen gefunden werden. In letzter Zeit sind viele neue Gencluster identifiziert worden,

## 5. Biosynthese des Thiostreptons



**Abb. 5.2.** Beispiele ribosomal synthetisierter Naturstoffe. Die Strukturen des Lantibiotikums Nisin A **20**, des Microcins J25 **119** und des Patellamids C **120** sind gezeigt.

teilweise sogar bei Organismen die bisher nicht als Thiopeptidproduzenten bekannt waren.<sup>[136,300–302]</sup> Auch ohne genaue Kenntnis der Genomsequenzen können neue Gencluster mithilfe von «degenerierten» PCR-Primern (*degenerate primer*) ausgemacht werden.<sup>[121]</sup> Die Suche nach neuen Genclustern lässt sich auf andere Naturstofffamilien ribosomaler Peptide ausdehnen.<sup>[303]</sup> Eine interessante Frage ist, ob mithilfe dieser Techniken in Zukunft gänzlich neue Naturstoffe gefunden werden können, vielleicht sogar bei nicht kultivierbaren Mikroorganismen.

Ribosomal synthetisierte Peptide besitzen den Vorteil, dass ihre Sequenz direkt in der genomischen DNA codiert ist. Dies bedeutet, dass sich durch *site-directed mutagenesis* relativ leicht Analoga der Peptide herstellen lassen sollten und man die Spezifität bzw. die Toleranz der Enzyme, die das Peptid nachfolgend post-translational modifizieren, untersuchen kann. Nicht nur im Hinblick auf ein detaillierteres Verständnis des Biosynthesewegs ist dies von Interesse, sondern vor allem liegt großes Potential in der Anwendung dieser Technik, um zu neuen Eigenschaften und Funktionen der Naturstoffe zu gelangen. Erste Studien wurden bereits erfolgreich in diese Richtung mittels zielgerichteter Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) unternommen.<sup>[304,305]</sup> Van der Donk *et al.* konnten vor kurzem zeigen, dass Cyanobakterien der Gattung *Prochlorococcus* sehr tolerante Lantipeptid-prozessierende Enzyme besitzen (LanM Homologe), die 29 verschiedene natürliche LanA-Vorläuferpeptide akzeptieren.<sup>[306]</sup> Die zur Generierung von Substanzbibliotheken nötigen prozessierenden Enzyme scheinen also teilweise schon in der Natur vorhanden zu sein, und sind dort auch evtl. für Strukturvariabilität bei den Substratpeptiden verantwortlich. Zur Erzeugung von Bibliotheken wäre es darüber hinaus denkbar, durch den Einsatz optimierter acyl-tRNA-Synthetasen nicht-proteinogene Aminosäuren in die Naturstoffe einzuführen, um die chemische und strukturelle Vielfalt noch weiter zu erhöhen.<sup>[307]</sup>

Angesichts der Komplexität der Thiostreptonstruktur ist es erstaunlich, dass diese ausgehend von normalen ribosomalen Peptiden durch post-translationale Modifikationen aufgebaut wird. Nur drei der insgesamt 17 Aminosäuren des Thiostrepton-Vorläuferpeptids werden im Laufe der post-translationalen Prozessierung *nicht* modifiziert. Obwohl die meisten Biosyntheseenzyme der Thiopeptide mittlerweile identifiziert

## 5. Biosynthese des Thiostreptons

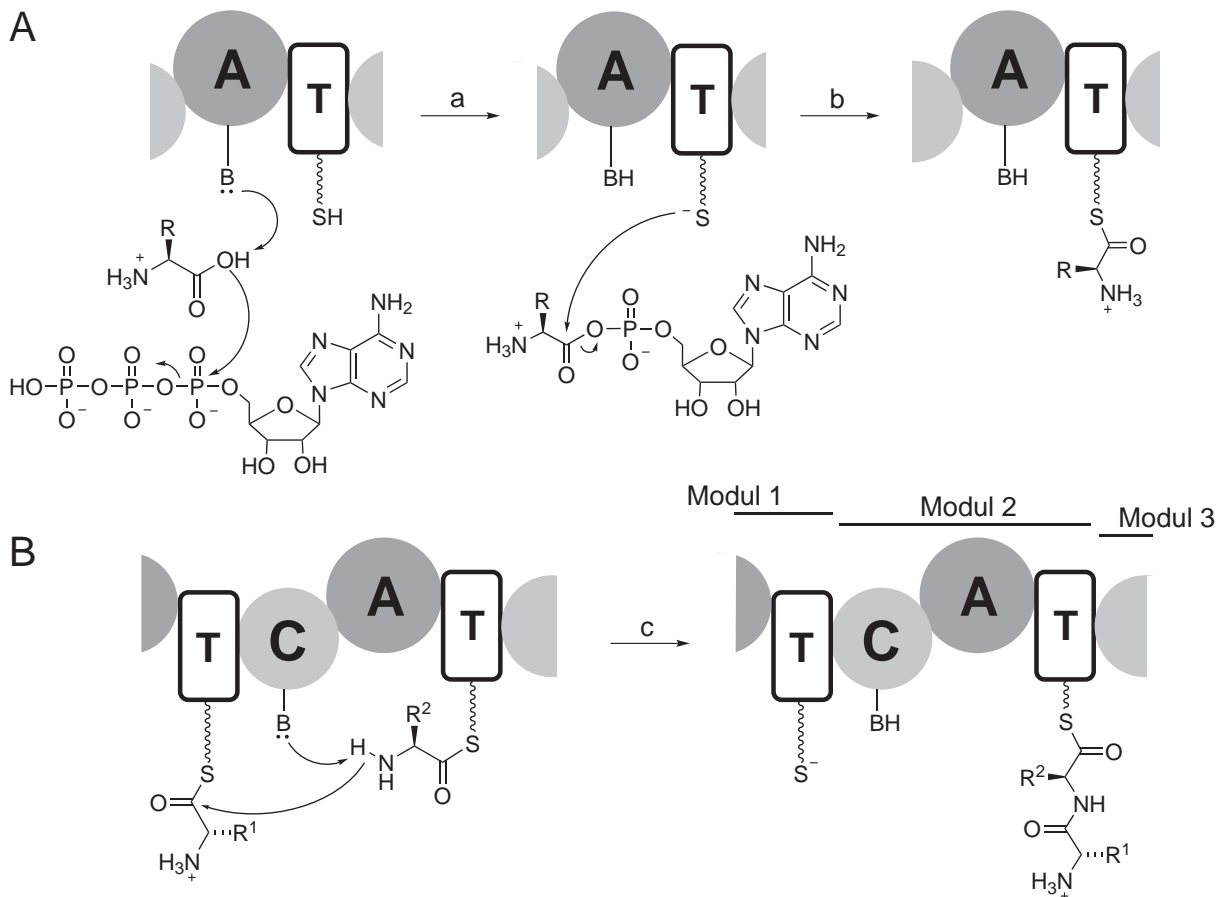
---

wurden, wissen wir bisher nur sehr wenig über die Reihenfolge der einzelnen Modifikationsschritte und ihr Zusammenspiel. Die wohl spannendste Frage hierbei bleibt, wie der zentrale Heterozyklus der Thiopeptide während der Prozessierung generiert wird (s. u.). Vor kurzem berichteten Walsh *et al.*, dass die Inaktivierung des Gens *tclM* im Biosynthesecluster des Thiocillin-Produzentenstamms *Bacillus cereus* zur ausschließlichen Produktion von azyklischen Vorläuferpeptiden führt, so dass das Enzym TcIM vermutlich für die Synthese des zentralen Heterozyklus verantwortlich ist.<sup>[308]</sup> Die genauen Details dieser enzymatischen Reaktion und der genaue Zeitpunkt innerhalb der Biosynthese bleiben jedoch weiterhin spekulativ.

### 5.1.1. Nicht-ribosomale Peptidsynthese

Die nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), die für die nicht-ribosomale Peptidsynthese zuständig sind, sind modular aufgebaute Multienzymkomplexe (Abbildung 5.1). In ihrer Funktionsweise ähneln sie enzymatischen «Fließbändern», an denen das wachsende Peptid während der Synthese kovalent gebunden bleibt und von einem Modul zum nächsten weitergereicht wird, so dass die Kette sukzessive verlängert wird. Die einzelnen Module sind jeweils für eine bestimmte Aminosäure zuständig, wobei jedes für die Erkennung und Aktivierung einer Aminosäure und anschließend deren Kondensation zur Peptidbindung verantwortlich ist.

Das minimale NRPS-Modul besteht daher aus drei Hauptdomänen: Die A-Domäne erkennt die Aminosäure und katalysiert ihre Adenylierung, wodurch diese für die Übertragung auf die Thiolgruppe des Cofaktors Phosphopanthetin der T-Domäne (auch PCP: *peptidyl carrier protein*) aktiviert wird. Anschließend katalysiert die C-Domäne die Verlängerung (Elongation) der Peptidkette durch Angriff des nukleophilen Amins der T-Domänen-gebundenen Aminosäure des benachbarten Moduls an den Thioester der wachsenden Peptidkette. Hierdurch verlängert sich die Peptidkette um eine Aminosäure und befindet sich nun als Thioester gebunden an dem benachbarten Modul. Die minimale Modulstruktur wird daher mit C-A-T bezeichnet. Das Peptid wird ähnlich der ribosomalen Synthese vom N- zum C-Terminus aufgebaut. Zur Freisetzung des Peptids vom Enzymkomplex befindet sich im letzten Modul eine Thioesterase-Domäne (Te), die



**Schema 5.1** Aktivitäten eines minimalen Moduls (C-A-T) einer nicht-ribosomalen Peptidsynthetase (NRPS). A: Erkennung und Aktivierung der Aminosäure. B: Ausbildung der Peptidbindung. a) Adenylierung einer Aminosäure unter ATP-Verbrauch zur Aminosäure-AMP (A-Domäne). b) Acylierung des Phosphopantetheinrests (–SH) der T-Domäne durch Aminosäure-AMP (A-Domäne). c) Kondensation zur Peptidbindung (C-Domäne).

das Peptid hydrolytisch abspaltet.

## Modifikationen

Viele der für die nicht-ribosomalen Peptide typischen Modifikationen werden von optionalen Enzymdomänen in *cis* eingeführt, die mit den C-A-T-Domänen zusammen ein Protein bilden, und ihre katalytische Aktivität eng mit der Funktion der anderen Domänen verbunden ist. Im Folgenden werden einige der typischen Modifikationen und die hierfür verantwortlichen Domänen aufgeführt.

## 5. Biosynthese des Thiostreptons

---

1. Charakteristisch für nicht-ribosomale Peptide ist das Vorhandensein von D-Aminosäuren. Die Substratpeptide werden während ihrer Synthese an den NRPS von spezifischen Epimerase-Domänen (E) in die D-Konfiguration umgewandelt, bevor die C-Domäne des darauf folgenden Moduls die Kondensationsreaktion zur Peptidbindung katalysiert (Modulstruktur: C-A-T-E). Es wurden auch C-Domänen beschrieben, die eine duale Funktion erfüllen, indem sie sowohl epimerisieren, als auch (stereospezifisch) kondensieren.
2. Ebenfalls häufig findet man in nicht-ribosomalen Peptiden 5-Ring Heterozyklen. Verantwortlich hierfür sind spezielle C-Domänen, die Zyklisierungsdomänen (Cy) genannt werden (Modulstruktur: Cy-A-T). Diese Domänen bilden zuerst eine Peptidbindung mit den Aminosäuren Cys, Ser oder Thr aus, die dann zum 5-Ring zyklisiert wird und unter Abspaltung von Wasser in das entsprechende Thiazolin bzw. Oxazolin überführt wird.
3. Domänen, die die Azoline (Thiazolin bzw. Oxazolin) in ihre entsprechenden Azole oxidieren, werden Oxidase-Domänen (Ox) genannt (Modulstruktur: Cy-A-Ox-T).
4. N-Methylierung der  $\alpha$ -Aminogruppen wird durch Methyltransferasedomänen (MT) auf Stufe der Aminoacyl-S-T-Intermediate katalysiert, wobei S-Adenosylmethionin (SAM) als Co-Substrat genutzt wird (Modulstruktur: C-A-MT-T).
5. Die Thioesterasedomänen (TE) sind am Ende der Synthese für die Abspaltung des fertigen Peptids von dem Enzymkomplex durch Hydrolyse des Thioesters verantwortlich. Spezielle Thioesterasen können eine Makrozyklisierung des Peptids bewirken, indem das Nukleophil der Thioesterhydrolyse ein Amin bzw. Hydroxyl des Peptids darstellt, so dass ein Lactam bzw. Lacton entsteht.
6. Die Möglichkeit, nicht-proteinogene Aminosäuren in die Peptide einzubauen, stellt im eigentlichen Sinne keine Modifikation des Peptidsubstrats dar. Es zeigt aber, dass durch die NRPS chemische und strukturelle Variabilität in Form von abweichenden Aminosäuren eingebracht werden kann, die nur durch die Spezifität der Moduldomänen bestimmt wird. Die benötigten biosynthetischen Enzyme zum Aufbau der nichtkanonischen Aminosäuren werden meist innerhalb des Genclusters



in unmittelbarer Nähe zu den NRPS-Genen codiert.

7. Ebenfalls nicht als klassische Modifikation zu werten sind Hybrid-NRPS-PKS-Systeme, die den Einbau von PKS-Monomeren (Acetyl- bzw. Propionyleinheiten) und deren Modifikationen in das Peptid ermöglichen.<sup>[296]</sup>

Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl von Enzymen, die nicht-ribosomale Peptide in *trans* modifizieren, d. h. dass sie nicht Bestandteil der eigentlichen Modulproteine der NRPS sind.<sup>[309]</sup> Die modifizierenden Enzyme assoziieren entweder mit dem NRPS-Komplex und katalysieren die Reaktionen schon während des Aufbaus der Peptidkette, oder sie üben ihre Funktion erst aus, nachdem das Peptid von der letzten T-Domäne abgespalten wurde. Zu den modifizierenden Enzymen gehören Reduktasen, die Thiazoline zu Thiazolidinen reduzieren (in *trans*), Cytochrom-P450-ähnliche Monooxygenasen, die oxidative Makrozyklisierungen katalysieren (in *trans* bei Vancomycin **115**)<sup>[310,311]</sup> und Glykosyltransferasen, die das Peptid-Aglykon mit speziellen Zuckerresten dekorieren (wahrscheinlich als letzter Schritt, nach der Abspaltung).

### Genorganisation und Größe der NRPS-Komplexe

Die Module und ihre Domänen werden häufig auf mehrere Proteine verteilt. Erst das Zusammenspiel dieser Proteine bildet die funktionale Gesamt-NRPS. Zwischen den einzelnen Proteinen wurden Verbindungsregionen (*linker*) identifiziert, die die «Kommunikation» zwischen den aufeinander folgenden Modulen sowie eine ungestörte Weitergabe der Substrate zwischen den einzelnen Proteinen ermöglichen (COM: *communication-mediating domains*).<sup>[312,313]</sup> Trotz Kenntnis der Verbindungsregionen sind bis heute nur eine begrenzte Anzahl an erfolgreichen Umprogrammierungen der NRPS-Maschinerie gelungen.<sup>[314]</sup>

Zu den größten NRPS-Komplexen zählt die Synthetase des Phytotoxinpeptids Syringopeptin, das aus 22 Aminosäuren besteht und von *Pseudomonas syringae* produziert wird.<sup>[315]</sup> Der NRPS-Komplex besitzt 22 Module, die auf drei Proteinen (SypA, SypB, SypC) mit insgesamt 68 Domänen verteilt sind ein Gesamtmolekulargewicht von etwa 2.7 MDa aufweisen. Das bakterielle 70 S Ribosom im Vergleich ist etwa 2.35 MDa groß. Die Gene *sypA–C* zeigen zusammen eine Länge von etwa 74 kb und codieren für ca. 15 700

## 5. Biosynthese des Thiostreptons

---

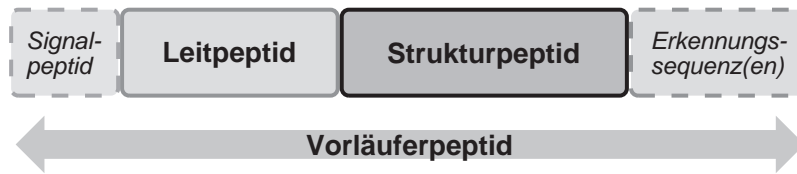
Aminosäuren, die nur einen einzigen Sekundärmetabolit als Produkt synthetisieren. Es muss davon ausgegangen werden, dass die nicht-ribosomalen Peptide eine enorme Bedeutung für den Produzentenorganismus besitzen, die einen solchen Energieaufwand für die Erstellung der NRPS-Komplexe rechtfertigt.

### 5.1.2. Ribosomale Peptidsynthese

Ribosomal synthetisierte Peptidnaturstoffe leiten sich von Vorläuferpeptiden (*precursor peptides*) ab, die etwa 100 Aminosäuren lang sind und durch das Ribosom translatiert werden (Abbildung 5.3). Nachfolgend werden sie post-translational durch mehrere Enzyme modifiziert, wobei das *N*-terminale Leitpeptid (*leader peptide*), das innerhalb einer Naturstofffamilie häufig eine konservierte Sequenz besitzt, vom Vorläuferpeptid abgeschnitten wird (Abbildung 5.3). Zurück bleibt die *C*-terminale Sequenz des reifen Strukturpeptids (*core peptide*).

Die Leitsequenz kann verschiedene Funktionen übernehmen. V. a. scheint sie als Erkennungsmotiv für die post-translational modifizierenden Enzyme bzw. für Proteine der Exportmaschinerie (z. B. ABC-Transporter) zu dienen.<sup>[316]</sup> Darüber hinaus werden Chaperon-ähnliche Funktionen der Leitsequenz diskutiert. Das Leitpeptid könnte die korrekte Faltung bzw. Stabilisierung des Peptids in *cis* unterstützen oder das Peptid bis zur Sekretion in einer inaktiven (nicht-toxischen) Struktur halten. Diese Hypothesen werden dadurch untermauert, dass die Hydrolyse der Leitsequenz vom fertigen Peptid häufig mit dem Export aus der Zelle einhergeht. Die jeweilige Funktion scheint von der Naturstofffamilie abhängig zu sein. In der Sequenz des Vorläuferpeptids können besonders bei Eukaryoten noch zusätzliche *N*-terminale Signalpeptidsequenzen (*signal sequence*) zur subzellulären Lokalisierung des Vorläuferpeptids und weitere *C*-terminale Erkennungssequenzen (*recognition sequence*) vorhanden sein.<sup>[316]</sup>

Allgemein betrachtet sind die bekannten post-translationalen Modifikationen der ribosomalen Peptide weniger divers und weniger zahlreich als diejenigen der nicht-ribosomalen Peptide (vgl. Kapitel 5.1.1). Allerdings werden noch immer neue Modifikationen entdeckt. Nachfolgend sind die wichtigsten Modifikationen der ribosomal synthetisierten Peptide aufgeführt.



**Abb. 5.3.** Nomenklatur und Aufbau des Vorläuferpeptids der ribosomalen Peptide.

1. Die Gruppe der Lantibiotika beherbergt eine Vielzahl an Modifikationen. Charakteristisch sind die Thioetheraminosäuren (Lanthioninbrücken) Lanthionin **18** und Methyllanthionin **19** (Abbildung 2.4, Kapitel 2.2.4) (Bsp. Nisin **20**). Sie gehen durch Michael-Addition eines Cysteinthiols an eine Dehydroaminosäure hervor (Schema 2.5).
2. Ebenfalls charakteristisch für die Gruppe der Lantibiotika sind die Dehydroaminosäuren Dehydroalanin **10** und Dehydrobutyrin **11**, die durch Dehydratisierung der Aminosäuren Serin bzw. Threonin entstehen (Schema 2.1, Kapitel 2.2).
3. Eine Vielzahl weiterer Modifikationen wurden bei Peptiden aus der Gruppe der Lantibiotika gefunden, jedoch ist ihre Verbreitung teilweise gering. Hierzu gehören z. B. Hydroxylierungen von Aminosäureseitenketten (z. B. Dihydroxyprolin, 3-Hydroxyaspartat) und Halogenierungen (z. B. Chlortryptophan). Eine vollständige Auflistung findet sich in einem aktuellen Übersichtsartikel: <sup>[75,297]</sup>.
4. Die 5-Ring-Heterozyklen Thiazol und Oxazol bzw. die entsprechenden reduzierten Varianten Thiazolin/Oxazolin sind weit verbreitet. Sie gehen aus Cys bzw. Ser/Thr hervor (Bsp. Patellamid C **120**).
5. Makrozyklisierung zum Lactam (Bsp. Microcin J25 **119**). Neben der Kopf-Schwanz-Zyklisierung von N-/C-Terminus sind auch Verbrückungen von Seitenketten bekannt ( $\omega$ -Amide, Bsp. Microviridin B) <sup>[317]</sup>.
6. Makrozyklisierung zum Lacton unter Verbrückungen von Seitenketten ( $\omega$ -Ester, Bsp. Microviridin B) <sup>[317]</sup>.
7. Die Lantibiotika Lactocin S und Lacticin 3147 A1/A2 weisen D-Alanine auf. Sie entstehen durch Umwandlung eines L-Serins des Vorläuferpeptids in ein Dehydroalanin, das darauf folgend stereoselektiv zum D-Alanin reduziert wird. <sup>[318,319]</sup> Diese Reaktion wird durch das Enzym LtnJ katalysiert. <sup>[320]</sup>

## 5. Biosynthese des Thiostreptons

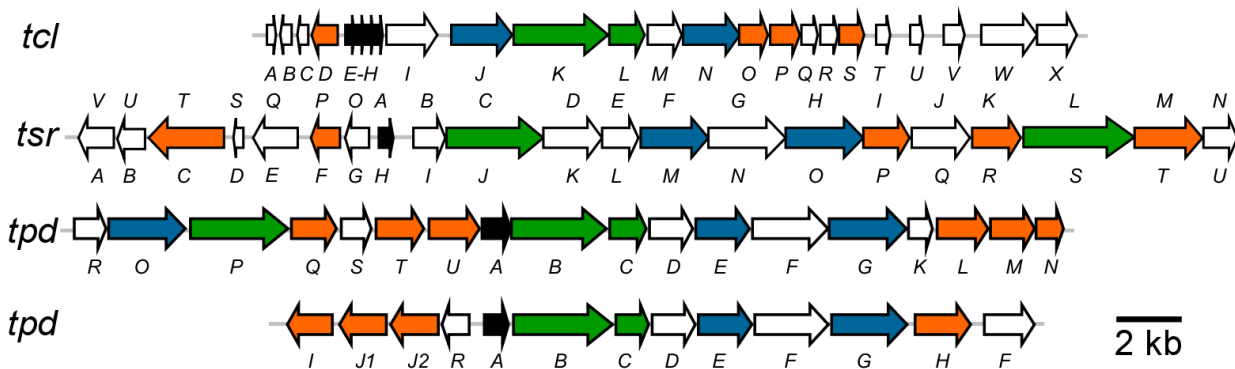
---

Durch Veränderung des Strukturpeptids unter Beibehaltung der Sequenz des Leitpeptids ist bei ausreichend toleranten post-translational modifizierenden Enzymen eine große Variabilität der Peptide möglich. Dies scheint von der Natur vielfach in der Evolution genutzt worden zu sein, wie z. B. bei den Patellamiden (synonym Cyanobactine)<sup>[321,322]</sup> (Abbildung 5.2) oder bei einer großen, bisher wenig erforschten Gruppe von Lantipeptiden<sup>[306]</sup>, die von Cyanobakterien der Gattung *Prochlorococcus* produziert werden (Lantipeptide ähneln in ihrer Struktur den Lantibiotika, zeigen aber nicht notwendigerweise antibiotische Wirkung). Vermutlich stehen wir erst am Anfang, die Vielzahl an ribosomalen Peptiden zu entdecken. Erste gezielte bioinformatische Untersuchungen von Genomsequenzen verschiedenster Mikroorganismen liefern Hinweise auf weit verbreitete Syntheseeenzyme und bisher unbekannte Vorläuferpeptide.<sup>[303,323]</sup>

### 5.1.3. Allgemeine Biosynthese der Thiopeptide

Aufgrund der komplexen Struktur der Thiopeptide und der Vielzahl an Modifikationen wurde lange Zeit ein NRPS-abhängiger Mechanismus ihrer Biosynthese als der plausibelste Biosyntheseweg angenommen. Der für Peptide ungewöhnliche sechsgliedrige zentrale Heterozyklus der Thiopeptide war schon früh Ausgangspunkt für Spekulationen über seine biosynthetische Herkunft. Eine erste Hypothese zur Biosynthese des Micrococcins wurde bereits 1978 von Bycroft und Gowland formuliert.<sup>[324]</sup> Sie vermuteten, dass der zentrale Pyridinring durch die «Interaktion von zwei Dehydroalaninen der selben Peptidkette» entstünde. Diese Hypothese sollte sich als richtig erweisen, jedoch dauerte es bis zur Aufdeckung des Genclusters noch fast drei Jahrzehnte. Floss und Mitarbeiter konnten mit Hilfe von Isotopenmarkierungen die Herkunft aller Aminosäuren der Thiopeptide Thiostrepton **3** und Nosiheptid **5** aus proteinogenen Standardamino-säuren des Primärmetabolismus aufdecken.<sup>[325–328]</sup> Die Enzyme, die für die Biosynthese verantwortlich sind, entzogen sich jedoch hartnäckig ihrer Identifizierung.

Die Suche nach den Biosyntheseezymen der Thiopeptide enthielt einen neuen Schub durch Untersuchungen zur Biosynthese der Patellamide (Cyanobactine).<sup>[299,331]</sup> Sie ergaben, dass die komplexen Heterozyklen enthaltenden Cyclopeptide aus post-translational modifizierten, ribosomalen Vorläuferpeptiden hervorgehen. Die Verfügbarkeit von Ge-



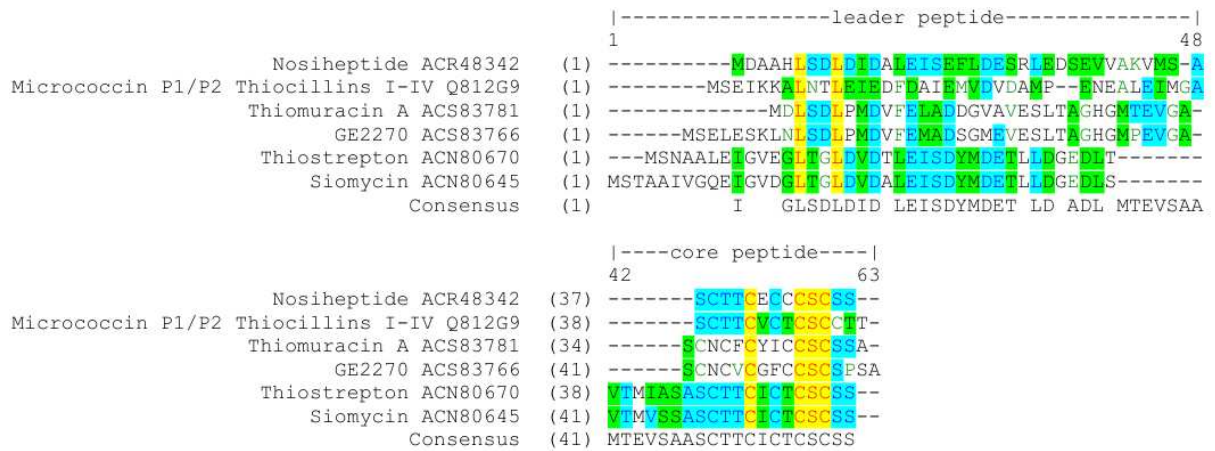
**Abb. 5.4.** Zusammenstellung verschiedener Thiopeptid-Gencluster. Die Namen der Cluster sind jeweils angegeben (von oben nach unten). *tsr*: Thiostrepton, *tcl*: Thiocilline, *tpd*: Thiomuracine, *tpd*: GE2270A. Schwarz: Strukturgen; grün: Dehydratase; blau: Cyclodehydratase oder Dehydrogenase; orange: Modifizierungsenzym (Monooxygenase, Methyltransferase, Protease, Desaminase, Amidotransferase); farblos: weiteres/unbekanntes offenes Leseraster. Für die identischen *tsr*-Gencluster wurden verschiedene Bezeichnungen und leicht voneinander abweichende Zuordnungen der Gene vorgeschlagen: Liu *et al.*<sup>[329]</sup> (unten) und Kelly *et al.*<sup>[330]</sup> (oben).

nomsequenzen der Thiopeptid-Produzenten und effizienten bioinformatischen Werkzeugen ermöglichte dann die erstaunliche Entdeckung, dass auch die Thiopeptide durch einen **ribosomalen** Mechanismus synthetisiert werden. Fast gleichzeitig veröffentlichten vier Gruppen die Identifizierung der Biosynthese-Cluster für verschiedene Thiopeptide. Die Biosynthese der Thiocilline/des Micococcins<sup>[300]</sup>, des Thiostreptons/Siomycins<sup>[329,330]</sup>, und des GE2270A/des neu entdeckten Thiomuracins<sup>[121]</sup> konnten entschlüsselt werden. Darauf aufbauend wurden die analogen Gencluster des Nosiheptids<sup>[301]</sup> und des Cyclothiazomycins<sup>[302]</sup> beschrieben.

Die Gencluster zeigen über Speziesgrenzen hinaus einen ähnlichen Aufbau, wobei das Vorläuferpeptid von den Genen der modifizierenden Enzyme umgeben wird (Abbildung 5.4).<sup>[291]</sup> Das Leitpeptid enthält 34–48 Aminosäuren, weist zwei konservierte Leu-Reste auf und ist reich an Aspartat und Glutamat (Abbildung 5.5).<sup>[316]</sup> Die Strukturpeptide enthalten die für die Ausbildung des zentralen Pyridin bzw. Dehydropiperidinrings notwendigen Ser-Reste an den entsprechenden Positionen (Ser5/Ser14 bei Thiostrepton **3**, Schema 5.2).

In bisher allen Thiopeptid-Genclustern konnten die Gene von jeweils vier Proteinen

## 5. Biosynthese des Thiostreptons



**Abb. 5.5.** Sequenzvergleich mehrerer Thiopeptid-Vorläuferpeptide. Adaptiert nach van der Donk *et al.*<sup>[316]</sup>.

ausgemacht werden, die hohe Sequenzähnlichkeit zu bereits bekannten modifizierenden Enzymen ribosomaler Peptide aufweisen (*tsrCDFH/tsrJKLMO*). Zwei dieser Enzyme codieren für LanB-homologe Dehydratasen<sup>[75]</sup>, die ähnlich ihrer Aufgabe in der Biosynthese der Lantibiotika für die Bildung der Dehydroalanine und Dehydrobutyrine aus Ser bzw. Thr verantwortlich sind.

Außerdem wurden Sequenzen gefunden, die einer PatD-homologen Cyclodehydratase (vgl. Patellamide)<sup>[332]</sup> und einer MbcC-homologen Dehydrogenase (vgl. Microcicin B17)<sup>[333]</sup> zuzuordnen sind. Diese beiden Enzyme katalysieren die Umwandlung der Cys-Reste in die entsprechenden Thiazol(in)e. Die Gencluster *nos* (Nosiheptid), *tpd* (Thiomuracin) und *tcl* (Thiocilline) beinhalten regulatorische Gene (*nosP*, *tpdR* und *tclU/O*), die bei den Thiostrepton- und Siomycin-Clustern zu fehlen scheinen. Darüber hinaus besitzt der *tcl*-Gencluster Gene, die wahrscheinlich für Efflux- und Resistenzmechanismen verantwortlich sind.

Die Entdeckung der Biosynthese-Cluster der Thiopeptide erweiterte die Anzahl und den Variantenreichtum der bisher bekannten post-translationalen Modifikationen ribosomaler Peptide beträchtlich. Neben den zuvor beschriebenen zentralen Modifikationen, die jedes Mitglied der Thiopeptide umfassen, wurden darüber hinaus weitere Enzyme identifiziert, die biosynthetische Transformationen an den ribosomalen Peptiden durchführen und die nur bei manchen Vertretern der Thiopeptide anzutreffen sind. Hierzu

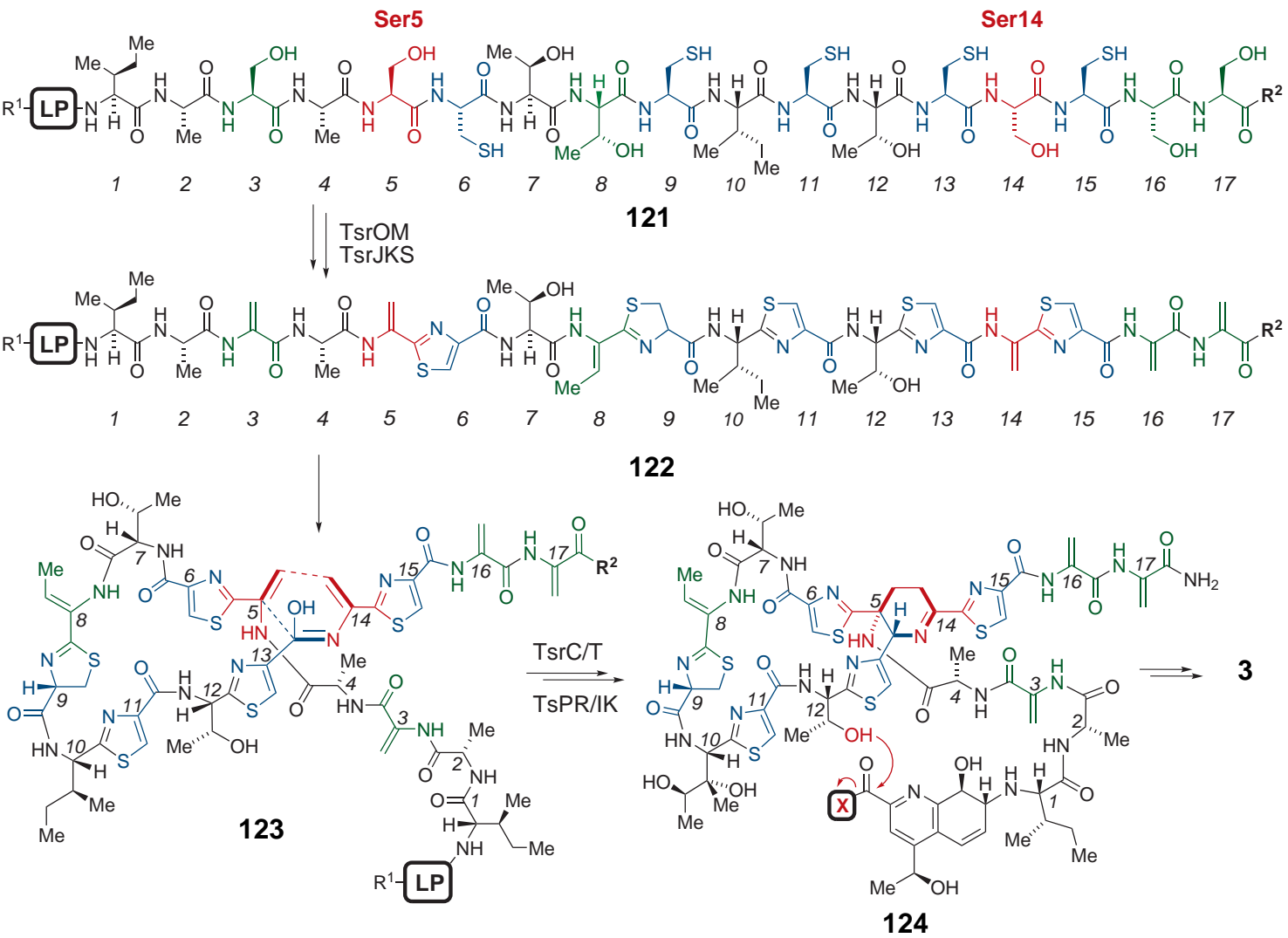
zählen beispielsweise die Glykosylierung (Nocathiacin **8**), Oxidationen von Alkylseitenketten (Thiostrepton **3**, Nosiheptid **5**), sowie *O*- und *S*-Alkylierung (GE2270A **4**).

#### 5.1.4. Biosynthese des Thiostreptons

Die Biosynthese des Thiostreptons **3** geht von der ribosomalen Synthese des Vorläuferpeptids **121** aus, das innerhalb des Genclusters *tsr* von dem Gen *tsrH* codiert wird (nachfolgend wird die Bezeichnung der Gene nach Liu *et al.* [329] verwendet) (Abbildung 5.4). Durch die Aktivität der Enzyme TsrJKS werden alle Ser- und Thr-Reste des Vorläuferpeptids **121** zu den entsprechenden Dehydroaminosäuren Dehydroalanin bzw. Dehydrobutyrin dehydratisiert, vergleichbar mit der Biosynthese der Lantibiotika [75] (Schema 5.2). Sämtliche Cys-Reste des Vorläuferpeptids **121** werden wahrscheinlich durch die Enzyme TsrMO in die entsprechenden Thiazole (Cys6, 11, 13, 15) bzw. das Thiazolin (Cys9) überführt, so dass ähnlich der Biosynthese des Microcins B17 [333] das Vorläuferpeptid **122** erhalten wird. Allerdings ist die Reihenfolge der biosynthetischen Transformationen bislang noch nicht bekannt, dargestellt wurde daher nur der plausibelste Fall.

#### Ausbilden des zentralen Heterozyklus

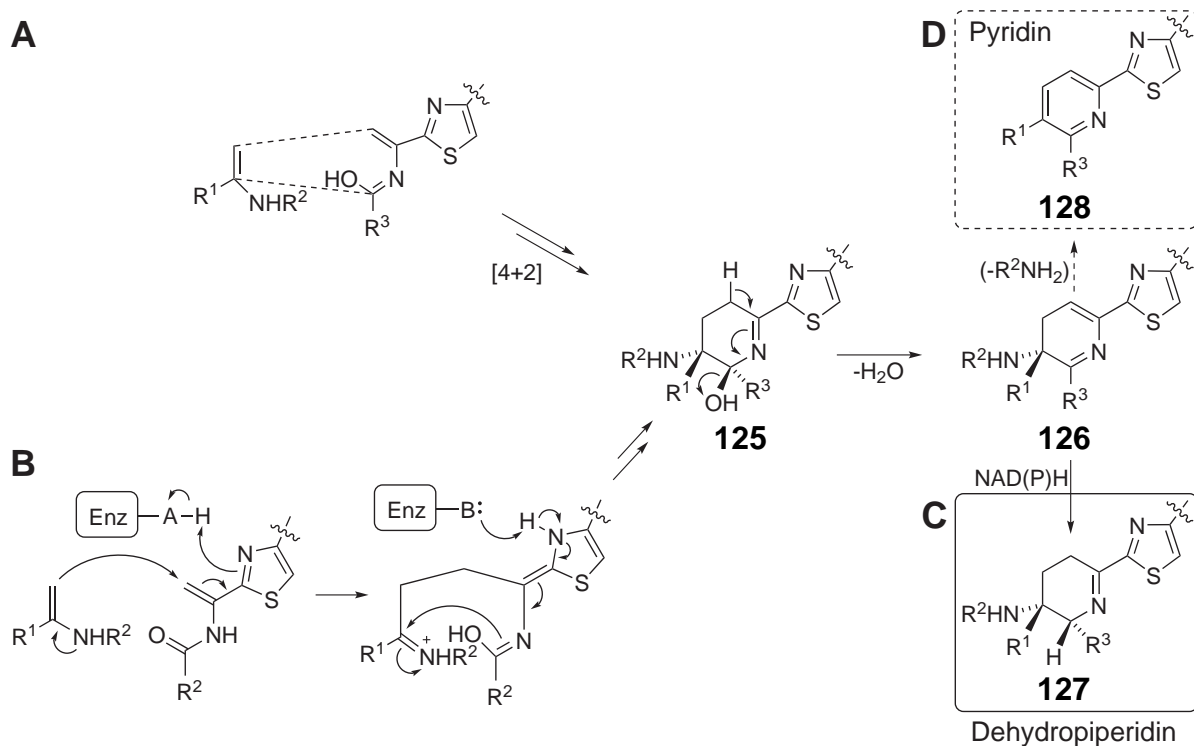
Durch Faltung des Vorläuferpeptids **122** zur Struktur **123** kommen die beiden Dehydroalanine der Positionen 5 und 14 in räumliche Nähe zueinander, so dass eine intramolekulare Reaktion stattfinden kann, die das zentrale Piperidin (bzw. Pyridin) ausbildet. Die Reaktion stellt damit den Schlüsselschritt zum Aufbau des charakteristischen makrozyklischen Grundgerüsts der Familie der Thiopeptide dar. Das Strukturmotiv des zentralen (Dehydro-)Pyridins/Piperidins ist in allen Vertretern der Thiopeptide vorhanden. Formal findet eine intramolekulare Hetero-Diels-Alder-Reaktion zwischen den beiden Dehydroalaninen und einer benachbarten Carboxylgruppe statt. Kürzlich berichteten Walsh *et al.*, dass das Genprodukt TcIM des Thiocillin-Produzenten *B. cereus* für die enzymatische Diels-Alder-Reaktion verantwortlich sein könnte. [308] Der genaue Mechanismus des beteiligten Enzyms sowie der Zeitpunkt des Ringschlusses innerhalb der Biosynthesesequenz konnten bisher nicht aufgeklärt werden.



**Schema 5.2** Biosynthetische Umwandlung des Vorläuferpeptids **121** zum Thiostrepton **3**.

LP = Leipeptid; R<sup>1</sup> = flankierende Sequenz; R<sup>2</sup> = OH; rot = Serine, die das zentrale Dehydroperidin bilden (Ser5/Ser14); grün = Ser- bzw. Thr-Reste, die zu Dehydroalanin bzw. Dehydrobutyrin umgewandelt werden; blau = Cys-Reste, die zu Thiazol- bzw. Thiazolinringen zyklisiert werden; X = Abgangsgruppe (wahrscheinlich Adenylat).





**Schema 5.3** Mögliche Mechanismen der Bildung des zentralen Heterozyklus der Thiopeptide. A) Konzertierte [4+2]-Cycloaddition; B) Enzymkatalysierte Folge von 1,2- / 1,4-Additionen; C)  $2e^-$ -Reduktion (NAD(P)H) zum Dehydropiperidin des Thiostrepsons **3**; D) Eliminierung des Leitpeptids ( $R^2NH_2$ ) führt zum Pyridin. Enz = Enzym. (Modifiziert nach Kelly *et al.*<sup>[291]</sup> und van der Donk *et al.*<sup>[306]</sup>).

## 5. Biosynthese des Thiostreptons

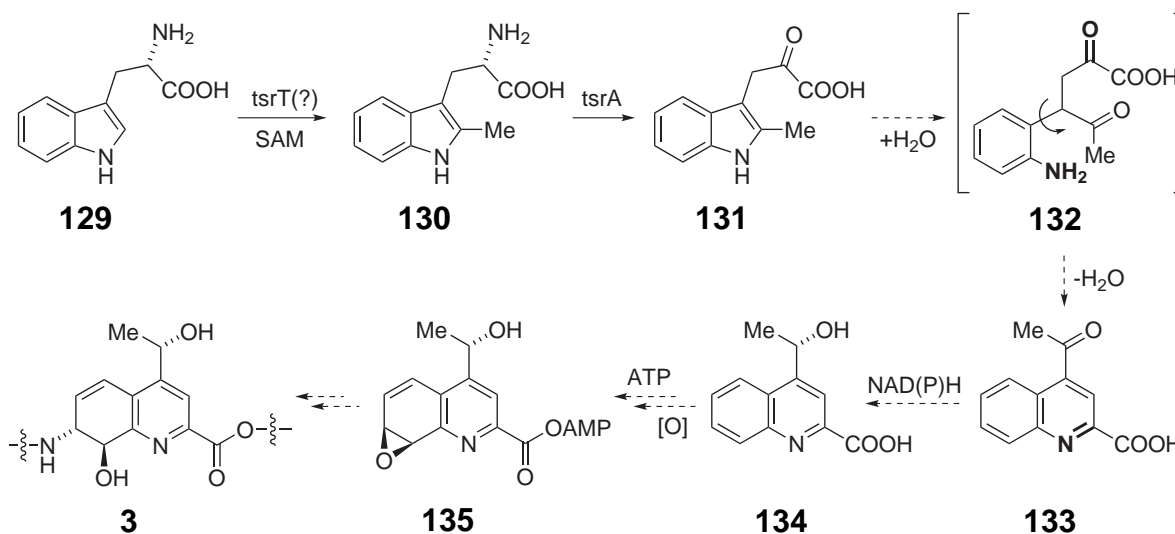
---

Man kann spekulieren, ob bereits die Faltung des Peptids zur günstigen Positionierung der Reste zueinander Enzym-vermittelt stattfinden könnte. Die eigentliche Reaktion würde entweder konzertiert als Hetero-Diels-Alder-Reaktion ([4+2]-Cycloaddition) ablaufen (Schema 5.3 A), oder schrittweise als Säure-Base katalysierte Folge von 1,2-/1,4-Additionen (Schema 5.3 B). Bei letzterem Mechanismus würde das benachbarte Thiazol als Elektronensenke fungieren können («vinyloge Umpolung»). Durch Abspaltung eines Wassermoleküls entsteht aus dem Dehydropiperidin **125** zunächst Dihydropyridin **126**, das in der Biosynthese des Thiostreptons **3** wahrscheinlich durch eine Zweielektronen-Reduktion mittels NAD(P)H in das Dehydropiperidin **127** des Thiostreptons **3** überführt wird. In der Biosynthese der Pyridin-Thiopeptide wird durch Eliminierung des Leitpeptids ( $R^2$  in Schema 5.3) das zentrale Pyridin **128** erhalten.

### Besonderheit des B-Rings

Die Thiopeptide der Serien  $a/b$ <sup>[26]</sup> (Thiostrepton **3**, Siomycin, Thiopeptin, Sch 18640 **6**) besitzen als charakteristisches Strukturmerkmal den zweiten Makrozyklus (B-Ring). Er besteht aus den vier *N*-terminalen Aminosäuren des Strukturpeptids (Ile1-Ala2-Deala3-Ala4, Schema 5.2), die über den Chinaldinsäurerest (Q: *quinaldic acid*) mit dem Thr12 verestert sind, so dass sich ein Lacton ergibt.

Die Installation des B-Rings während der Biosynthese als charakteristisches Strukturmerkmal der  $a/b$ -Serie Thiopeptide besitzt gewisse Ähnlichkeit mit einem nicht-ribosomalen Biosyntheseweg. Mit der Chinaldinsäure wird eine nicht-proteinogene Vorstufe (*precursor*) in das Molekül eingebunden, die zuvor über unabhängige Enzyme synthetisiert wurde. Die Gene der hierfür notwendigen Enzyme befinden sich ebenfalls wie alle anderen modifizierenden Enzyme innerhalb des Biosynthese-Genclusters. Durch die Verknüpfung der Chinaldinsäure mit dem *N*-Terminus des Strukturpeptids und dem Schließen des B-Ring-Makrozyklus zum Lacton stellt der Einbau eine wichtige Modifikation des Rückgrats des Thiostreptons dar. Die Modifikation gleicht damit dem Einbau eines nicht-proteinogenen Vorläufers in die wachsende Peptidkette während einer NRPS-Synthese. Letztendlich wird durch diesen »Kunstgriff« eine Variation des Grundgerüsts erreicht, die für ribosomale Peptide zunächst ungewöhnlich erscheint. Auch



**Schema 5.4** Vorgeschlagene Biosynthese des Chinaldinsäurerests bei Thiostrepton **3**. SAM = S-Adenosylmethionin; AMP = Adenosinmonophosphat (= Adenylat).

mechanistisch tritt eine weitere Ähnlichkeit zu nicht-ribosomalen Peptidsynthesen auf: Die Chinaldinsäure reagiert wahrscheinlich als AMP-Derivat (s. u.) mit dem  $\gamma$ -OH des Threonins – ganz ähnlich den reaktiven AMP-Aminosäure-Vorstufen, die die Substrate der NRPS bilden.

### Synthese des Chinaldinsäure-Vorläufers

Die Biosynthese der Chinaldinsäure geht von L-Tryptophan **129** aus (Schema 5.4). In einer von S-Adenosylmethionin (SAM) abhängigen Reaktion wird Tryptophan **129** zunächst zu 2-Methyltryptophan **130** methyliert.<sup>[326]</sup> Diese Reaktion wird vermutlich von der radikalischen, SAM-abhängigen Methyltransferase TsrT katalysiert.<sup>[330]</sup> Die Pyridoxalphosphat (PLP) abhängige Aminotransferase TsrA ist anschließend für die Umwandlung des 2-Methyltryptophans **130** in die  $\alpha$ -Ketosäure **131** verantwortlich.<sup>[330]</sup> Für die nachfolgenden Schritte bis zur Chinaldinsäure **134** sind die beteiligten Enzyme noch nicht hinreichend bekannt. Ein vorgeschlagener Mechanismus für die Erweiterung des Pyrrolrings des Indols ist in Schema 5.4 dargestellt und verläuft wahrscheinlich über das Diketon **132**.<sup>[328]</sup> In einer nachfolgenden Reduktion wird das Keton **133** vermutlich mittels NAD(P)H zur Chinaldinsäure **134** reduziert.

Die Chinaldinsäure **134** konnte als frei vorkommender Vorläufermetabolit der Bio-

## 5. Biosynthese des Thiostreptons

---

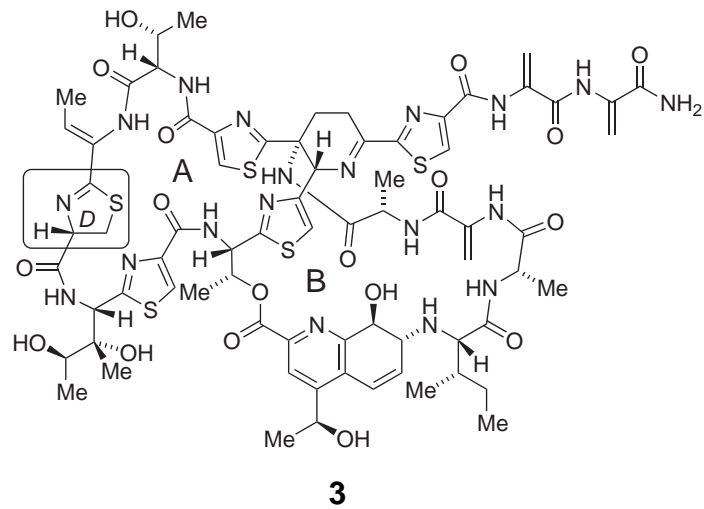
synthese im Produzentenorganismus nachgewiesen werden.<sup>[334]</sup> Zur Aktivierung der Chinaldinsäure **134** als Baustein der Biosynthese des Thiostreptons **3** wird sie vermutlich durch das Enzym TsrQ<sup>[330]</sup> zum AMP-Anhydrid adenyliert, so dass nachfolgend der Ester mit der  $\beta$ -Hydroxygruppe des Thr12 gebildet werden kann.<sup>[334]</sup> Anschließende Epoxidierung, vermutlich durch die Cytochrom P450 Enzyme TsrP oder TsrR<sup>[330]</sup>, liefert das AMP-Anhydrid **135**, welches unter Ringöffnung des Epoxids mit dem N-terminalen Amin des Ile1 reagieren kann, so dass der B-Ring geschlossen wird (Schema 5.2).<sup>[334]</sup> Die Reihenfolge der beiden letzten Schritte und des Einbaus in das Gesamtmolekül zum Thiostrepton **3** ist noch nicht bekannt.

### Weitere Modifikationen

Zwei weitere Modifikationen finden im Peptidrückgrat statt, vermutlich auf Stufe des Vorläuferpeptids **123** oder **124** (Abbildung 5.2). Zum einen wird die C-terminale Carboxylgruppe wahrscheinlich durch das Enzym Amidotransferase TsrC unter Übertragung eine Aminogruppe von Glutamin amidiert. Durch Inaktivierung des Gens konnte gezeigt werden, dass ein entsprechender Metabolit des Thiostreptons **3** mit Carboxy- anstelle des Amid-Terminus angereichert wird, wobei die Fähigkeit zur Produktion von Thiostrepton **3** verloren geht.<sup>[291]</sup> Zum anderen wird der Ile-Rests 10 dihydroxyliert, wahrscheinlich durch das Cytochrom P450 ähnliche Genprodukt TsrP.

### 5.1.5. D-Konfiguration des Thiazolins der Thiostreptonstruktur

Alle Strukturen der (Dehydro-) Piperidin-Thiopeptide (Serien a/b)<sup>[26]</sup> besitzen ein einziges Thiazolin als Bestandteil des makrozyklischen A-Rings, das ausschließlich die D-Konfiguration aufweist (Abbildung 5.6). Die anderen Thiopeptide haben ein vollständig oxidiertes Thiazol an dieser Position. Aufgrund der nicht-ribosomalen Biosynthese der Thiopeptide stammen alle Aminosäuren von proteinogenen L-Aminosäuren ab. Die vorhandenen Modifikationen an der Struktur der Thiopeptide können deshalb nur *nach* der ribosomalen Synthese eingefügt werden (Kapitel 5.1.4). Es stellte sich deshalb die Frage, wie es zu der ungewöhnlichen D-Konfiguration des Thiazolins während der Biosynthese kommt, an welcher Stelle sie während der Biosynthese eingefügt wird, bzw. welche struk-



**Abb. 5.6.** Struktur des Thiostreptons **3**. Die Position des  $\beta$ -Thiazolins ist angegeben.

turellen Bedingungen zu ihrer Bildung führen. Darüber hinaus interessierte uns, welche Konsequenzen die Konfiguration auf die dreidimensionale Struktur des Moleküls und auf seine biologische Aktivität ausübt.

### 5.2. Ergebnisse

Nachfolgend sind die im Rahmen dieser Arbeit unternommenen Untersuchungen zur *D*-Konfiguration des Thiazolins der Thiostreptonstruktur dargestellt, deren Ergebnisse Implikationen für die Biosynthese des Thiostreptons **3** haben.

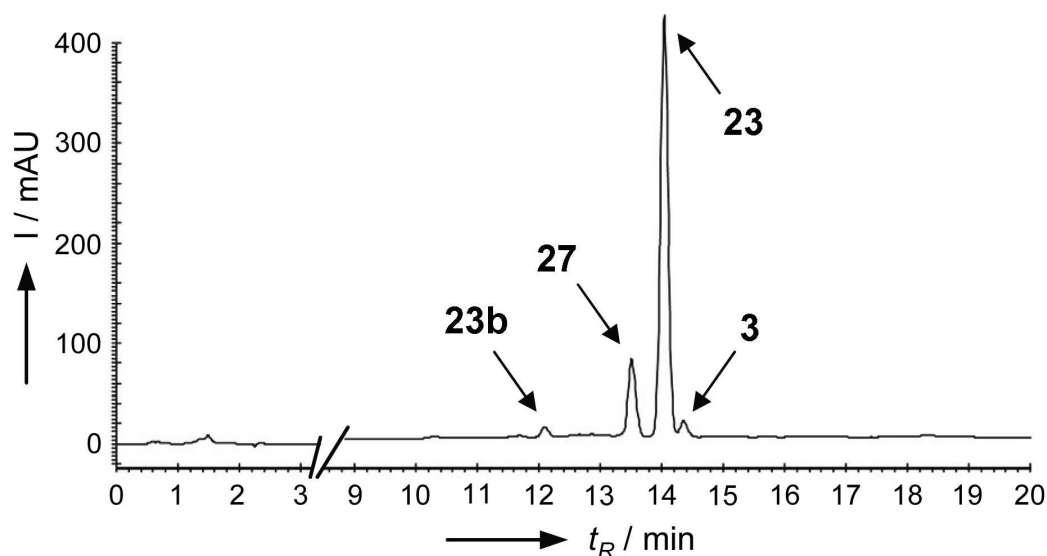
#### 5.2.1. Identifizierung eines Isomers des verkürzten Thiostreptons

In der Verkürzungsreaktion des Thiostreptons **3** zu den einfach- und zweifach-verkürzten Derivaten **23** bzw. **27** (Kapitel 2.2.5) konnte in analytischen HPLC-Läufen der Reaktionsmischung eine unbekannte Nebenkomponente (2.5 %) ausgemacht werden, die weder dem Ausgangsmaterial, noch den bekannten Produkten zugeordnet werden konnte (Abbildung 5.7). Die Verbindung zeigte eine deutlich kürzere Retentionszeit  $t_R$  von 12.1 min und konnte mittels LCMS als ein Isomer (**23b**) des einfach-verkürzten Thiostreptons **23** identifiziert werden ( $[C_{69}H_{83}N_{18}O_{17}S_5+H^+]$  ber.: 1595.48, gef.: 1595.45). Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Retentionszeiten  $t_R$  wurde eine abweichende Struktur der Verbindung vom bekannten einfach-verkürzten Thiostrepton **23** angenommen.

Zur eingehenden Charakterisierung mussten ausreichende Mengen der Verbindung isoliert werden. Durch mehrere aufeinander folgende Reinigungsschritte (Silica-Chromatographie/präparative HPLC) konnten größere Mengen (8 mg, 0.7%) in reiner Form erhalten werden, wobei die Verkürzungsreaktion im Gramm-Maßstab durchgeführt werden musste. Mittels hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS) konnte die Identität der Verbindung **23b** als Isomer des einfach-verkürzten Thiostreptons **23** bestätigt werden.

#### 5.2.2. pH-abhängige Isomerumwandlung

Zunächst untersuchten wir, ob und unter welchen Bedingungen die beiden Isomere **23/23b** ineinander überführt werden konnten. Mittels HPLC-Analytik konnte beobachtet werden, dass basische THF/H<sub>2</sub>O-Pufferlösungen die Umwandlung der beiden Isomere beschleunigte: Bei pH 12 wurde beobachtet, dass sich 63 % des Nebenisomers **23b** in 24 Stunden zurück in das Hauptisomer **23** umwandelte, während keine nennenswer-



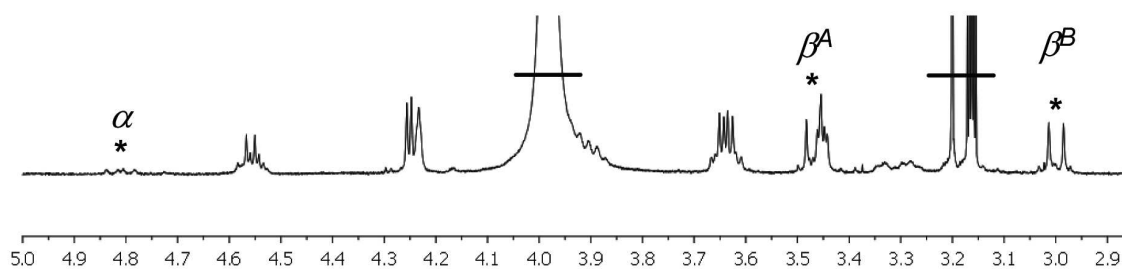
**Abb. 5.7.** Analytischer HPLC-Lauf der Reaktionsmischung der Verkürzungsreaktion (UV-Spur, 214 nm). Die Signale des Thiostreptons **3**, der einfach- und zweifach-verkürzten Derivate des Thiostreptons (**23** bzw. **27**) und des Epimers des einfach-verkürzten Thiostreptons (**23b**) sind gekennzeichnet. HPLC-Bedingungen: C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O-Gradient: 10% CH<sub>3</sub>CN für 1 min; 10–70% CH<sub>3</sub>CN in 16 min; 100% CH<sub>3</sub>CN für 2 min.

te Rücktransformation in Pufferlösungen der pH-Werte 4, 7 oder 9 festgestellt werden konnte. In nicht-wässrigen Medien (DBU-THF bzw. CHCl<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>NH) fand eine vollständige Transformation des Nebenisomers **23b** in das stabilere Hauptisomer **23** schon nach ca. 1 Stunde statt.

Interessanterweise ergab die Inkubation des Nebenisomers **23b** in einem physiologischen Puffer, der divalente Ionen enthielt (10 mM MgCl, 100 mM KCl, 10 mM MOPS), bereits 12 % Rücktransformation nach 24 Stunden bei einem fast neutralem pH-Wert von 7.5. Die Inkubation des Nebenisomers **23b** in einem bakteriellen *E. coli*-Zellextrakt ergab sogar 30 % Rücktransformation zum Hauptisomer **23** nach 24 Stunden.

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die zwei unterschiedlichen Formen des Isomerenpaares **23/b** leicht durch basische Bedingungen ineinander umzuwandeln sind, wobei das Hauptisomer **23** die stabilere Form darstellt. Unter physiologischen Bedingungen mit hohen Konzentrationen an Salzen und Makromolekülen scheint die Umwandlung trotz des fast neutralen pH-Werts relativ schnell abzulaufen.

## 5. Biosynthese des Thiostreptons



**Abb. 5.8.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Thiazolinregion des D-Isomers **23** nach Behandlung mit  $\text{HNEt}_2$  in  $\text{CDCl}_3\text{-MeOH-}d_4$ . Die Signale, die vom H-D-Austausch beeinflusst werden, sind durch ein [\*] gekennzeichnet.

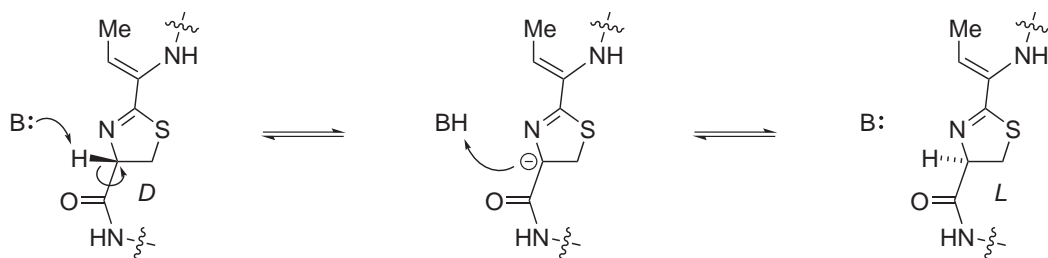
### 5.2.3. NMR-Strukturuntersuchung des Isomers

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des Nebenisomers **23b** wiesen in den meisten Regionen des Spektrums ein sehr ähnliches Signalmuster vergleichbar mit dem einfach verkürzten Thiostrepton **23** (Hauptisomer) auf. Allerdings zeigten sich deutliche Unterschiede in den chemischen Verschiebungen  $\delta$  der Signale der Thiazolinprotonen, der beiden Threonine, des Thiostreptins und des Dehydropiperidins. In den zweidimensionalen gCOSY-Spektren zeigte sich, dass die  $^3J$ -Konnektivitäten der Signale gleich blieben. Dies bedeutete, dass die beiden Isomere die gleiche Konstitution aufwiesen.

Beide Erkenntnisse zusammen genommen – die gleiche strukturelle Konstitution der beiden Isomere und die basenkatalysierte Isomerenumwandlung deuteten auf **Stereoisomerie** als Unterschied zwischen den beiden Isomeren hin. In H-D-Austauschexperimenten zeigte sich, dass unter basischen Bedingungen ( $\text{Et}_2\text{NH}$  in  $\text{CDCl}_3\text{-MeOH-}d_4$ ) neben den NH-Protonen nur das  $\alpha$ -Proton des Thiazolins (4.81 ppm) mit dem deuterierten Lösungsmittel austauscht (Abbildung 5.8). Infolge des H-D-Austauschs vereinfachte sich das Spinnmuster der  $\beta$ -Protonen zu Dubletts. Hieraus ergab sich die Annahme, dass bei der vorher beobachteten Isomerenumwandlung im Basischen genau diese Position des  $\alpha$ -Protons deprotoniert wird und bei der Reprotonierung epimerisiert (Schema 5.5). Das stereogene Zentrum der  $\alpha$ -Position des Thiazolins war demnach für die beobachtete Stereoisomerie verantwortlich.

Zweidimensionale NOESY-Experimente bestätigten diese Annahme. Die NOESY-Spektren der Thiazolin-Region ( $\alpha/\beta$ -Protonen) wiesen Unterschiede in den Intensitäten

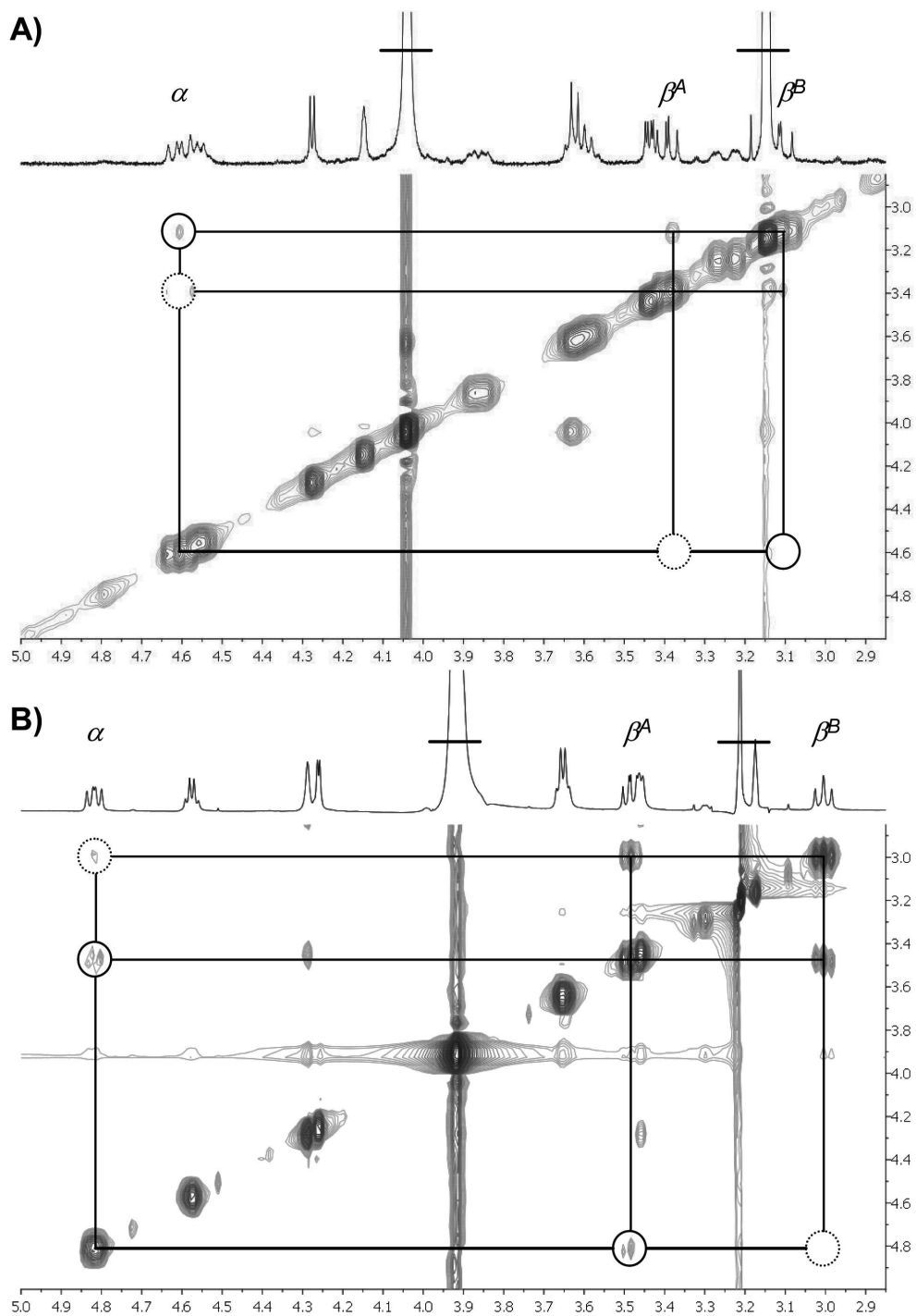




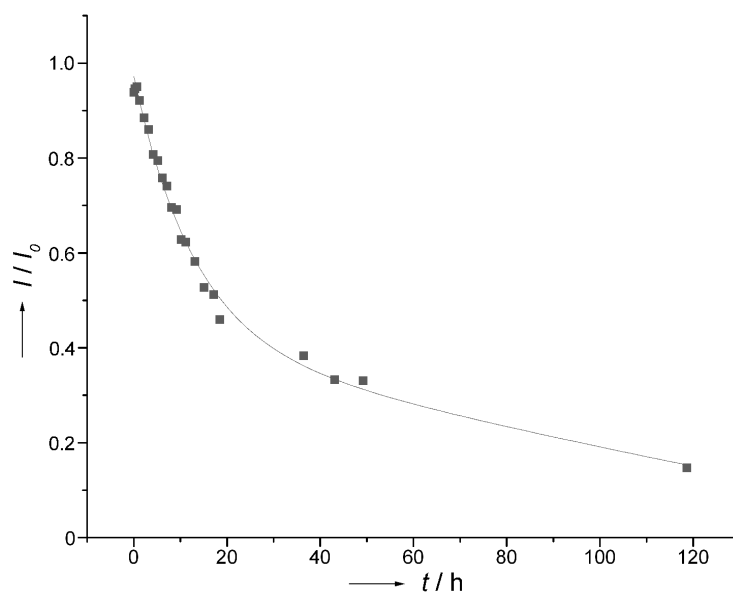
**Schema 5.5** Basenkatalysierte Epimerisierung des Thiazolins der Thiostreptonstruktur.

der Kreuzsignale auf (Abbildung 5.9). Bei jedem der beiden Isomere zeigten die Kreuzsignale des  $\alpha$ -Protons mit einem bestimmten der beiden  $\beta$ -Protonen eine besonders hohe Intensität, während die Intensität des Kreuzsignals mit dem anderen  $\beta$ -Proton deutlich geringer ausfiel. Die Intensität von Kreuzsignalen in NOESY-Spektren ist generell *invers* proportional zur räumlichen Distanz der beiden Protonen, d.h. dass Protonen, die kurze Distanzen zueinander haben, relativ intensive Kreuzsignale aufweisen. Das beobachtete Muster der Kreuzsignal-Intensitäten war bei den beiden Stereoisomeren genau gegensätzlich, was mit der unterschiedlichen Geometrie der Stereoisomere vereinbar ist. Jeweils eins der beiden  $\beta$ -Protonen besitzt eine kürzere Distanz zu dem  $\alpha$ -Proton. Bei der anderen Konfiguration handelt es sich hierbei um genau das andere  $\beta$ -Proton. Aufgrund von Vergleichen der NMR-Spektren der Isomere mit «normalem» Thiostrepton **3**, welches ein *D*-konfiguriertes Thiazolin aufweist, konnte das Hauptisomer **23** als ebenfalls *D*-konfiguriert identifiziert werden.

## 5. Biosynthese des Thiostreptons



**Abb. 5.9.**  $^1\text{H}$ -NMR- und NOESY-Spektren der Thiazolinregion beider Isomere. Das Spinsystem der Thiazolin  $\alpha$ - und  $\beta$ -Protonen ist angegeben. A: L-Isomer **23b**; B: D-Isomer **23**.



**Abb. 5.10.** H–D-Austauschkinetik des Thiostreptons **3** in  $d_8$ THF- $D_2O$  (4:1) bei pH 12.

#### 5.2.4. H-D-Austauschkinetik des Thiostreptons

Um die Epimerisierungsneigung des  $\alpha$ -Protons des Thiazolins näher zu charakterisieren, wurden H–D-Austauschkinetiken von Thiostrepton **3** in THF- $d_8$ / $D_2O$  bei pH 12 aufgenommen. Über einen Zeitraum von insgesamt 120 Stunden wurden hierfür zu verschiedenen Zeitpunkten  $^1H$ -NMR-Spektren gemessen. Der Deuteriumaustausch konnte durch langsames Verschwinden des zum  $\alpha$ -Proton gehörenden Signals (5.1 ppm) verfolgt werden (vgl. Abbildung 5.8). Die Intensität des Signals verringerte sich über die Zeit nach einem scheinbar biexponentiellen Abfall, wobei eine Halbwertszeit von ungefähr 12 h bestimmt wurde.

#### 5.2.5. Einfluss des B-Rings der Thiostreptonstruktur auf die Konfiguration des Thiazolins

Wie in Kapitel 2.6 beschrieben, konnte die selektive Hydrolyse des B-Ring-Lactons der Thiostreptonstruktur unter Zemplén-Bedingungen erreicht werden. Bei der Hydrolyse des einfach verkürzten Thiostreptons **23** wurde eine 1:1-Mischung der beiden Thiazolinepimere **69a/69b** erhalten. Versetzte man die isolierten Isomere mit DBU/THF, konnte eine Umwandlung in das jeweils andere Isomer beobachtet werden, wobei sich schon

## 5. Biosynthese des Thiostreptons

---

nach einer Stunde ein Verhältnis von ca. 4:3 ausbildete. Im Gegensatz dazu tritt bei unverändertem Grundgerüst mit geschlossenem B-Ring ein Verhältnis von ungefähr 1:39 (L-Thiazolin : D-Thiazolin) auf. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass ein intakter B-Ring maßgeblich für die D-Konfiguration des Thiazolins verantwortlich ist.

## 5.3. Diskussion

Thiostrepton **3** und verwandte Thiopeptide besitzen aufgrund der beiden Makrozyklen (A- und B-Ring) und der Vielzahl an modifizierten Aminosäuren eine rigide dreidimensionale Struktur, die in ihrer Komplexität und Ausgestaltung trotz der relativ geringen Größe des Moleküls am ehesten an kleine Proteine oder Proteindomänen erinnert. Alle bisher beschriebenen Thiopeptide mit zusätzlichem B-Ring (Thiostrepton, Siomycin, Sch18640) tragen ausnahmslos ein *D*-konfiguriertes Thiazolin im A-Ring, während andere Thiopeptide an äquivalenter Position üblicherweise ein vollständig oxidiertes Thiazol (z.B. Nosiheptid, Nocathiacin, Micrococcin, Thiocillin) oder ein Oxazolin (z.B. Berninamycin, Sulfomycin) besitzen.<sup>[26]</sup> Die *D*-Konfiguration des Thiazolins wirft die Frage nach dem biosynthetischen Ursprung auf, da die Peptide ribosomal synthetisiert werden und deshalb aus *L*-Aminosäuren hervorgehen müssen.

Das *L*-Epimer der Thiostreptonstruktur lässt sich isolieren und kann spektroskopisch charakterisiert werden. Es kann sehr leicht basenkatalysiert in die thermodynamisch bevorzugte «natürliche» *D*-Konfiguration überführt werden. Die hierzu nötige *C-H*-Acidität des  $\alpha$ -Protons des Thiazolins konnte in *H-D*-Austauschexperimenten demonstriert werden. Dieser Befund liefert auch eine eindruckliche Erklärung dafür, warum die Oxidation mittels DBU/BrCCl<sub>3</sub> (Kapitel 2.3.3), die mechanistisch über die Deprotonierung des Thiazolins in der  $\alpha$ -Position verläuft, relativ selektiv bei Thiostrepton **3** und seinen Derivaten durchführbar ist.

Liegt der B-Ring geöffnet vor (nach Hydrolyse des Lactons), fehlt die thermodynamische Präferenz der *D*-Konfiguration, denn die Epimere liegen ungefähr als 1:1-Mischung vor, wobei sie ineinander überführt werden können. Das bedeutet, dass der B-Ring offensichtlich eine konformationelle Spannung auf den A-Ring ausübt, wodurch die *D*-Konfiguration des Thiazolins bevorzugt wird.

Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass in der Biosynthese nicht notwendigerweise ein Enzym für die Umwandlung des *L*-Thiazolins in das *D*-Thiazolin verantwortlich sein muss. Es könnte sich also um eine *Produkt-gesteuerte Epimerisierung* handeln. Diese Vermutung wird weiterhin dadurch unterstützt, dass bisher kein ORF (*open reading frame*) innerhalb der untersuchten Biosynthesecluster ausgemacht werden konnte, der

## 5. Biosynthese des Thiostreptons

---

für eine postulierte Epimerase codieren könnte.<sup>[291]</sup> Es kann spekuliert werden, dass die zelluläre Umgebung, in der Thiostrepton **3** biosynthetisiert wird, dazu ausreichen könnte das Thiazolin katalytisch zu epimerisieren. Hierbei könnte auch ein Kontakt mit basischen Resten an Proteinen in spezifischer oder unspezifischer Art beteiligt sein. Nähere Untersuchungen sind nötig, um diesen Sachverhalt eindeutig zu klären.

Walsh *et al.* beschrieben vor kurzem einen ähnlichen Epimerisierungsmechanismus für Thiazoline in der NRPS-Biosynthese der Pyocheline **48** (Kapitel 2.3.1), der auf der Stufe des Thioether-gebundenen Thiazolins des Moduls PchE basenkatalysiert stattfindet.<sup>[335]</sup> Auch in diesem Fall entsteht durch die Deprotonierung ein  $\alpha$ -C Carbanion, welches sterisch zufällig durch Lösungsmittelprotonen reprotoniert wird. In dem darauf folgenden Schritt wird jedoch nur das D-Thiazolin selektiert und weiter prozessiert. Die Epimerisierungsdomäne hat hier nur die Funktion die Gleichgewichtseinstellung zu katalysieren.

Ein Fall der «spontanen» Epimerisierung wurde von Jaspars *et al.* für die Biosynthese der Patellamide postuliert (vgl. Patellamid C, Abbildung 5.2).<sup>[336]</sup> Bisher konnte kein Enzym innerhalb des Genclusters der Patellamide identifiziert werden, das als Epimerase fungieren würde. Mithilfe von *Molecular Modeling* Untersuchungen konnte die Gruppe zeigen, dass die Epimerisierung vermutlich spontan stattfindet und aus der Struktur des makrozyklisierten Peptids resultiert. Ein ähnlicher Fall der «konformationsgetriebenen» Epimerisierung wurde von Wipf *et al.* für das makrozyklische Peptid Lissoclinamid **7** beobachtet.<sup>[337]</sup>

Ein interessanter Aspekt ist die Betrachtung der Reihenfolge der biosynthetischen Schritte. Bisher ist nur wenig über die Reihenfolge der post-translationalen Modifikationen bekannt, es könnte jedoch die Vermutung aufgestellt werden, dass die Epimerisierung des A-Ring-Thiazolins im Thiostrepton **3** eine nachfolgende enzymatische Oxidation zum Thiazol verhindert. Dies würde bedeuten, dass die Oxidation erst sehr spät stattfindet, vielleicht sogar erst nach Ausbildung des B-Rings.

## 5.4. Zusammenfassung

Diesen Daten zufolge epimerisiert das A-Ring-Thiazolin des Thiostreptons durch die hohe C-H-Acidität des  $\alpha$ -Protons sehr leicht. Weiterhin ergibt die ungewöhnliche D-Konfiguration des Thiazolins offenbar eine thermodynamisch deutlich bevorzugte Konformation des Gesamtmoleküls. Diese Eigenschaft wird scheinbar strukturell durch den charakteristischen B-Ring der Thiostreptonstruktur hervorgerufen. Für die Biosynthese bedeutet die leichte Epimerisierung, dass nicht notwendigerweise eine Epimerase als Enzym involviert sein muss. Es liegt nahe anzunehmen, dass es sich um einen Fall von *Produkt-gesteuerte Epimerisierung* handelt.<sup>[338]</sup> Genaue mechanistische Fragen müssen Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein.





## **6. Sonstige wissenschaftliche Projekte**

## 6.1. Einleitung

### 6.1.1. Positronen-Emissions-Tomographie

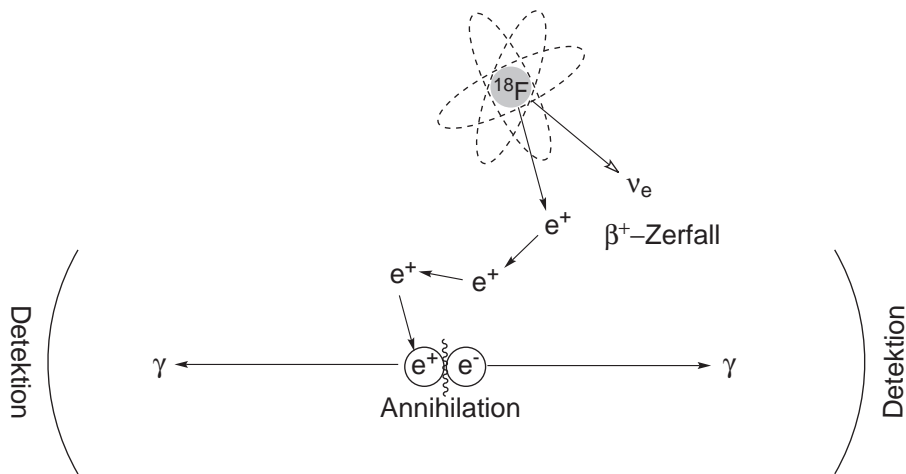
Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) gehört zu den wichtigsten bildgebenden Verfahren der Nuklearmedizin.<sup>[339]</sup> Die in der PET verwendeten Radionuklide emittieren durch  $\beta^+$ -Zerfall Positronen ( $e^+$ ), deren Zerfallsprodukte detektiert werden können. Durch Einbau der Radionuklide in biologisch aktive Substanzen erhält man sog. *Tracer*-Moleküle, die zur PET-Untersuchung in den Organismus eingebracht werden. Die Verteilung der Radionuklide im Organismus ist deshalb von der Art des *Tracer*-Moleküls abhängig.

Das durch  $\beta^+$ -Zerfall des Radionuklids emittierte Positron ( $e^+$ ) wechselwirkt nach kurzer Diffusionsstrecke mit einem Elektron ( $e^-$ ) in der Nähe und erleidet Paarvernichtung (Annihilation, Schema 6.1). Aus diesem Prozess gehen zwei  $\gamma$ -Photonen mit einer Energie von 511 keV hervor, die in einem Winkel von genau  $180^\circ$  zueinander abstrahlen und durch gleichzeitige Detektion (Koinzidenz) an gegenüberliegenden Detektoren nachgewiesen werden können. Durch die zeitliche und räumliche Verteilung der registrierten Zerfallsereignisse kann der Ort der Paarvernichtung und demnach die des ursprünglichen Radionuklids bzw. des *Tracer*-Moleküls im dreidimensionalen Raum ermittelt werden. Auf diese Weise kann im Gewebe eine räumliche Auflösung von etwa 1–5 mm erreicht werden.<sup>[340]</sup>

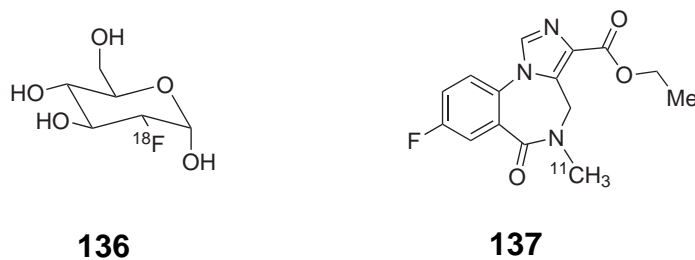
Neben  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{82}\text{Rb}$  und  $^{68}\text{Ga}$  ist ein besonders wichtiges Radionuklid in der klinischen Anwendung das radioaktive Isotop  $^{18}\text{F}$  des Fluors. Durch  $\beta^+$ -Zerfall geht das  $^{18}\text{F}$ -Atom in ein  $^{18}\text{O}$ -Atom über, wobei ein Positron ( $e^+$ ) und ein Elektron-Neutrino ( $\nu_e$ ) emittiert werden (Gleichung 6.1).



Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  des  $^{18}\text{F}$  beträgt nur etwa 110 min, so dass das radioaktive Isotop  $^{18}\text{F}$  meist direkt am Ort der Untersuchung mit Hilfe eines Zyklotrons hergestellt wird und durch chemische Synthese in ein *Tracer*-Molekül eingebracht wird. Der am meisten verwendete *Tracer* stellt die 2- $^{18}\text{F}$ -Fluor-2-desoxy-D-glucose **136** dar (FDG, Ab-



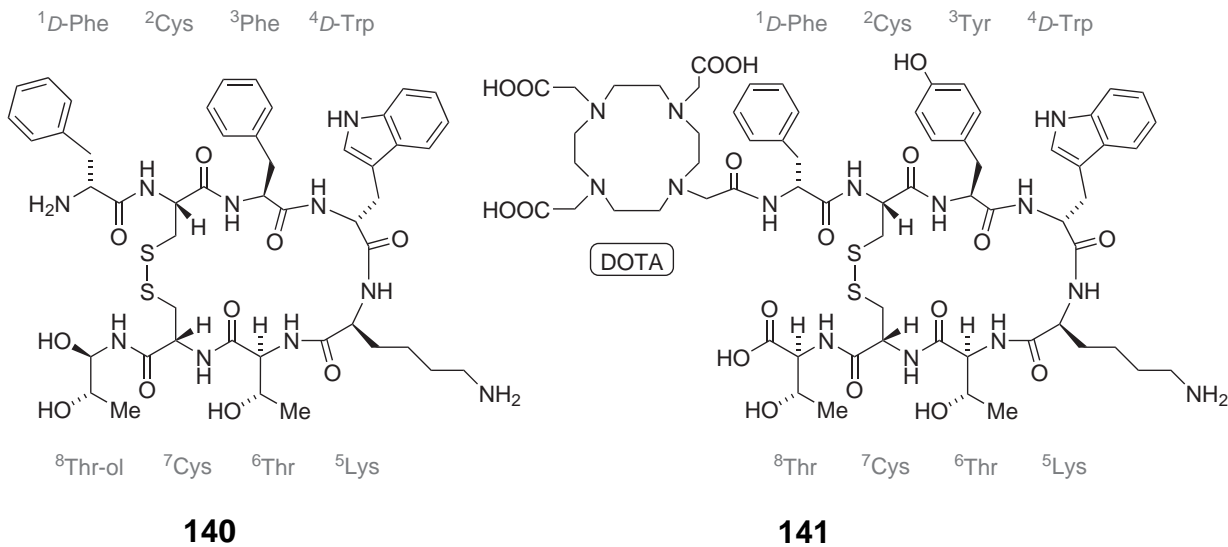
**Schema 6.1** Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Durch  $\beta^+$ -Zerfall des  $^{18}\text{F}$  entsteht ein Positron  $e^+$  und ein Elektron-Neutrino  $\nu_e$ . Nach Paarvernichtung (Annihilation) des Positrons  $e^+$  mit einem Elektron  $e^-$  werden zwei Photonen  $\gamma$  erzeugt, die gleichzeitig detektiert werden.



**Abb. 6.1.** Beispiele typischer *Tracer*-Moleküle. Gezeigt sind die Strukturen der  $[^{18}\text{F}]$ -Fluordesoxyglucose **136** (links) und des Imidazobenzodiazepin-Derivats  $[^{11}\text{C}]$ -Fumazenil **137** (rechts).

bildung 6.1), die genau wie Glukose von den Zellen aufgenommen und an  $\text{O}^6$  phosphoryliert wird.<sup>[341]</sup> Eine weitere Metabolisierung des Fluordesoxyglucose-6-Phosphats findet nicht statt, so dass sich der *Tracer* in den Zellen anreichert. Krebszellen sind für ihre hohe Glukoseaufnahme bekannt, weshalb sich die PET-Technologie unter Anwendung der  $[^{18}\text{F}]$ -Fluordesoxyglucose **136** besonders zur Früherkennung von Tumoren eignet. Darüber hinaus sind viele weitere diagnostische Anwendungen beschrieben worden.<sup>[339]</sup> Zum Beispiel wird das Imidazobenzodiazepin-Derivat  $[^{11}\text{C}]$ -Fumazenil **137** zur Visualisierung der Verteilung von  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren (GABA:  $\gamma$ -Aminobuttersäure) im Gehirn als *Tracer* verwendet.<sup>[342]</sup>





**Abb. 6.3.** Strukturen des Octreotids **140** (links) und des Octreotid-Analagon-Konjugats DOTA-<sup>1</sup>D-Phe-<sup>3</sup>Tyr-Octreotat **141** (rechts). Der Chelator DOTA komplexiert z. B. radioaktives <sup>177</sup>Lu. (DOTA: 1,4,7,10-Tetra-azacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure).

### 6.1.3. Octreotid-Analoga in Diagnostik und Therapie

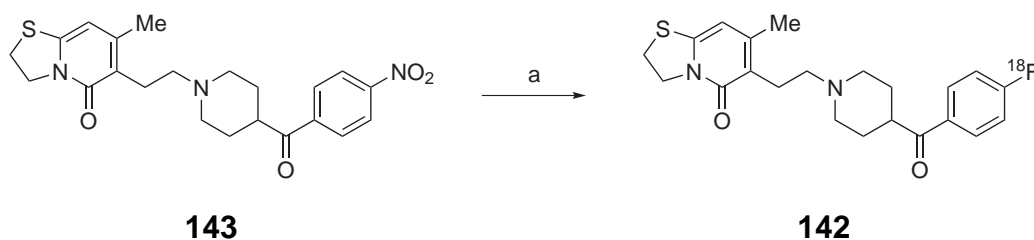
Für Diagnostik und Radiotherapie wurden bereits einige Octreotid-Analoga entwickelt, die erfolgreich eingesetzt werden.<sup>[347]</sup> Durch Konjugation mit Chelatliganden, die stabile Komplexe mit radioaktiven Metallen ausbilden, können diese Moleküle in der Radiotherapie eingesetzt werden, um Tumore selektiv zu zerstören. Ein Beispiel ist das Konjugat DOTA-D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Octreotat **141** (Abbildung 6.3), das aus dem Chelator DOTA (1,4,7,10-tetra-azacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) und dem Peptid <sup>1</sup>D-Phe-<sup>3</sup>Tyr-Octreotat besteht, welches im Vergleich zum Octreotid C-terminal eine freie Carboxyfunktion am <sup>8</sup>Thr besitzt und ein <sup>3</sup>Tyr anstelle des <sup>3</sup>Phe aufweist. Das Konjugat komplexiert <sup>177</sup>Lutetium, zeigt Spezifität vorrangig für sst<sub>2</sub>-Rezeptoren und konnte im Tiermodell erfolgreich zur Tumorbehandlung eingesetzt werden.<sup>[348]</sup>

### 6.1.4. Synthesestrategien der <sup>18</sup>F-Tracer-Moleküle

An den Gesamtprozess der Synthese, Isolierung, Analytik und Formulierung der *Tracer*-Moleküle werden aufgrund der kurzen Halbwertszeiten der Isotope, der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen und ihrer potentiellen Gefahr aufgrund der

## 6. Sonstige wissenschaftliche Projekte

---



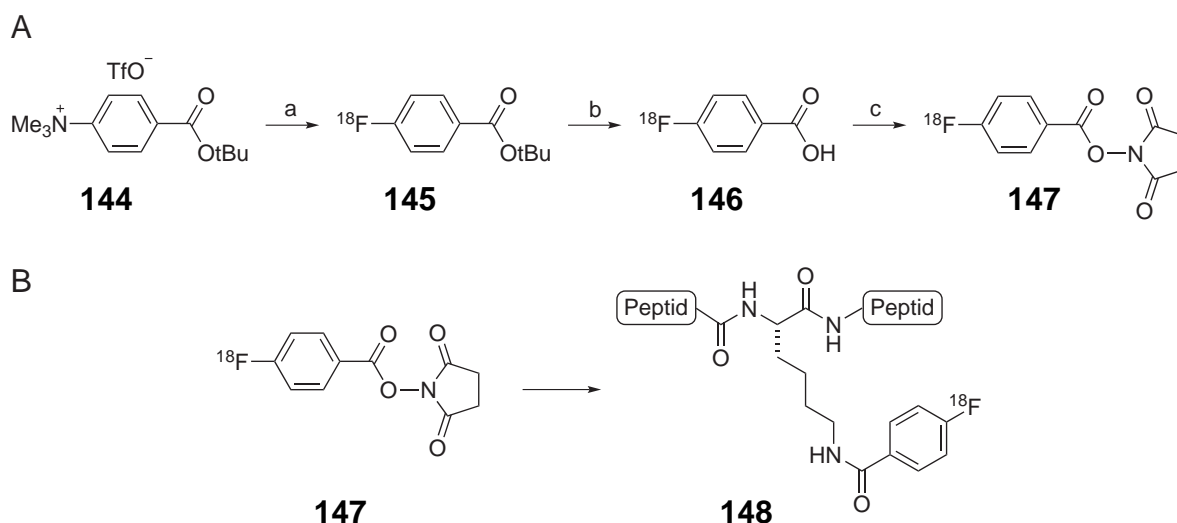
**Schema 6.2** Synthese des [ $^{18}\text{F}$ ]-Setoperons **142** durch direkte aromatische nucleophile Substitution mit  $^{18}\text{F}^-$ . Bedingungen: a)  $\text{K}_{222}/[^{18}\text{F}]\text{-KF}$ ,  $180^\circ\text{C}$ , 15 min.

Radioaktivität besondere Anforderungen gestellt.<sup>[349]</sup> Man ist bestrebt, die Prozesse weitestgehend zu automatisieren und bevorzugt deshalb zuverlässige und robuste Synthese- und Reinigungsstrategien.

Die Synthese der  $^{18}\text{F}$ -Tracer-Moleküle beginnt meist vor Ort mit der Generierung von  $^{18}\text{F}^-$ -Ionen durch Beschuss von  $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$  mit Protonen, die in einem Zyklotron generiert werden. Generell unterscheiden sich nachfolgend die Strategien der Synthese kleiner Tracer-Moleküle (*small molecules*) von denen der größeren Biomoleküle.

### Synthese kleiner $^{18}\text{F}$ -Tracer-Moleküle

Bei den kleinen Molekülen kommen am häufigsten nucleophile Substitutionsreaktionen direkt mit den  $^{18}\text{F}^-$ -Ionen zum Einsatz, die häufig unter harschen Reaktionsbedingungen durchgeführt werden müssen. Um zu verhindern, dass das Fluoridion aufgrund der Solvatisierung in wässriger Umgebung als schlechtes Nucleophil auftritt, werden die meisten Reaktionen in polaren nicht-protischen Lösungsmitteln (z. B. DMF, DMSO, Acetonitril) durchgeführt, wobei als Phasentransferreagenz Kryptofix-2.2.2 ( $\text{K}_{222}$ ) der Reaktion beigesetzt wird.<sup>[350]</sup> Dieser Azacryptand bildet einen starken Komplex mit Kaliumionen und sorgt dafür, dass das Fluoridion weniger solvatisiert vorliegt und daher eine hohe Nucleophilie aufweist. Neben aliphatischen Substitutionen mit  $^{18}\text{F}^-$  ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ) werden besonders häufig aromatische nucleophile Substitutionsreaktionen an aktivierten Aromaten durchgeführt.<sup>[339]</sup> Ein Beispiel einer aromatischen nucleophilen Substitutionsreaktion ist die Synthese des [ $^{18}\text{F}$ ]-Setoperons **142** aus dem entsprechenden Nitro-Vorläufermolekül **143** (Schema 6.2).<sup>[351]</sup>



**Schema 6.3** Mehrstufige, indirekte  $^{18}\text{F}$ -Markierung von Peptiden/Proteinen mittels *N*-Succinimidyl-4- $^{18}\text{F}$ fluorbenzoat **147** als prosthetische Gruppe. A: Synthese des *N*-Succinimidyl-4- $^{18}\text{F}$ fluorbenzoats **147**. B: Chemoselektive Ligation mit einem primären Amin einer Lys-Seitenkette des Peptids/Proteins. Bedingungen: a)  $\text{K}_{222}/[^{18}\text{F}]\text{-KF}$ ,  $90^\circ\text{C}$ , 10 min. b) 1 M HCl,  $100^\circ\text{C}$ , 5 min. c) 1.  $\text{Me}_4\text{NOH}/\text{MeOH}$ , 2. *O*-(*N*-Succinimidyl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluorborat. Gesamtausbeute 34–38 % in 68 min (automatisierte Synthese).<sup>[352]</sup>

### Synthese $^{18}\text{F}$ -markierter Biomoleküle als *Tracer*

Zur Synthese  $^{18}\text{F}$ -markierter Biomoleküle (Peptide, Proteine, Oligonucleotide) müssen andere Strategien bemüht werden, da die komplexen Moleküle die harschen Reaktionsbedingungen einer direkten nucleophilen Substitution nicht tolerieren würden.<sup>[349]</sup> Es kommen deshalb indirekte Markierungsreaktionen zum Einsatz, die eine mehrstufige Synthese verlangen. Man bedient sich meist radioaktiver Markierungsreagenzien, die chemoselektiv unter milden Bedingungen in das Biomolekül eingebracht werden können. Häufig wird der Aktivester *N*-Succinimidyl-4- $^{18}\text{F}$ fluorbenzoat **147** eingesetzt, der unter milden Reaktionsbedingungen an Lys-Seitenketten des Peptids bzw. Proteins acyliert werden kann (Schema 6.3).<sup>[349]</sup> Trotz optimierter Reaktionsbedingungen und automatisierter Synthese werden insgesamt 3 Stufen (68 min) zur Markierung und Synthese der prosthetischen Gruppe benötigt, bevor das Peptid bzw. Protein markiert werden kann.<sup>[352]</sup> Darüber hinaus erfolgt die Markierung nicht regioselektiv.

In den letzten Jahren wurde daher nach neuen radioaktiven Markierungsreagenzien

## 6. Sonstige wissenschaftliche Projekte

---

geforscht, die sich zur Markierung von Peptiden bzw. Proteinen eignen.<sup>[339,349]</sup> Ein gravierender Nachteil ist in den meisten Fällen, dass mehrere Stufen zur Synthese notwendig sind, die einen hohen Zeitaufwand und komplizierte Handhabung mit sich bringen, und dass die radioaktive Markierung sehr früh in der Reaktionssequenz eingebracht wird. Darüber hinaus kann die Konjugation mit den Biomolekülen in vielen Fällen nicht regioselektiv durchgeführt werden, weil häufig mehrere funktionelle Gruppen vorhanden sind. Ein weiterer kritischer Punkt ist, dass nicht in allen Fällen bekannt ist, wie sich die unnatürliche prosthetische Gruppe auf die biologische Funktion des Biomoleküls auswirkt.

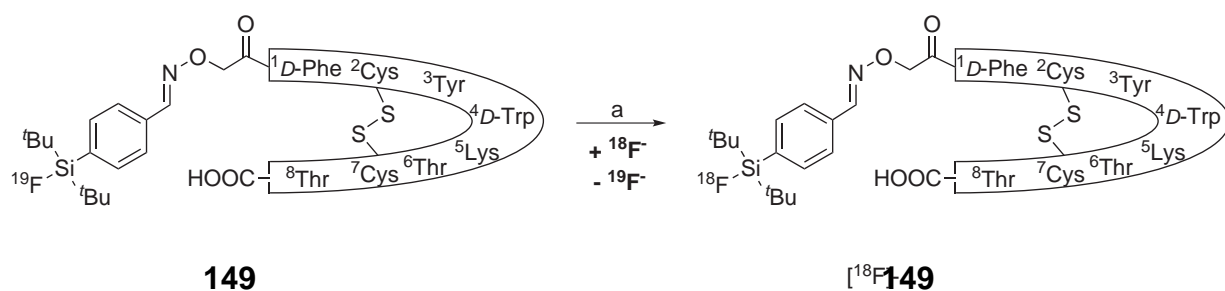
Aufgrund der wachsenden Bedeutung von biologisch aktiven Peptiden bzw. von Proteinen in bildgebenden Untersuchungen ist die Entwicklung von praktikablen und robusten Markierungsreaktionen von großem Interesse. Ideal wären Methoden, die in einem Ein-Stufen-Prozess selektiv und in hoher Ausbeute zu den markierten Biomolekülen führen würden. Die weitere Entwicklung der Positronen-Emissions-Tomographie wird vermutlich entscheidend von der Verfügbarkeit geeigneter chemischer Methoden zur radioaktiven Markierung abhängig sein.<sup>[353]</sup>

### 6.1.5. Organosilicium basierte Fluoridakzeptoren

Eine viel versprechende Methode zur  $^{18}\text{F}$ -Markierung von Biomolekülen stellt die Isotopenaustauschreaktion  $^{19}\text{F} \rightarrow ^{18}\text{F}$  an Organosilicium basierten Akzeptoren dar (SiFA: *silicon-based fluoride acceptor*).<sup>[354,355]</sup> Der Akzeptor kann bereits vor der radioaktiven Markierung an das Biomolekül gebunden werden, während die eigentliche radioaktive Markierung in einer Stufe durch eine Isotopenaustauschreaktion mit  $^{18}\text{F}^-$ -Ionen realisiert wird (Abbildung 6.4). Als besonders günstig haben sich Di-*tert*-butylphenylfluorsilan ( $t\text{Bu}_2\text{PhSiF}$ ) basierte Akzeptoren erwiesen, da sie eine hohe Hydrolyse-Stabilität unter physiologischen Bedingungen aufweisen und gute Isotopenaustauscheigenschaften besitzen.<sup>[354–356]</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass die Isotopenaustauschreaktion selektiv und unter milden Bedingungen am Akzeptor-Peptid-Konjugat des Tyr<sup>3</sup>-Octreotats **149** durchgeführt werden kann (Schema 6.4).<sup>[354]</sup> Der Organosilicium-Akzeptor wurde hierbei in ersten





**Schema 6.4** Direkte  $^{18}\text{F}$ -Markierung des SiFA-Akzeptor-Peptid-Konjugats Tyr<sup>3</sup>-Octreotat **149** durch Isotopenaustausch. Bedingungen: a)  $\text{K}_{222}/[^{18}\text{F}]\text{-KF}$ , RT, 10–15 min. [354]

Versuchsreihen als Aldehyd an das Hydroxylamin-funktionalisierte Peptid über die Ausbildung eines Oxims an das Tyr<sup>3</sup>-Octreotat gebunden.

Ein wichtiger Vorteil dieser SiFA-basierten Strategie liegt darin, dass das radioaktive  $^{18}\text{F}$  in einem Schritt selektiv und unter milden Bedingungen in das Biomolekül eingeführt werden kann. Hierbei wurden keine Nebenreaktionen beobachtet, so dass anschließend keine aufwendigen Reinigungsschritte durchgeführt werden müssen.

### 6.1.6. Syntheseziel

Zur Weiterentwicklung der SiFA-basierten Strategie sollte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Jurkschat die Akzeptorgruppe Di-*tert*-butylphenylfluorsilan in ein Phenylalaninderivat (SiFA-Phe) eingebaut werden, so dass der Akzeptor über native Peptidbindungen in biologisch relevante Peptide eingebracht werden kann (Abbildung 6.4). Es galt zu testen, ob der Isotopenaustausch zur radioaktiven Markierung mittels  $^{18}\text{F}^-$ -Ionen im Peptid möglich ist, ob eine ausreichend hohe Hydrolysestabilität der Si-F-Bindung erreicht wird und ob die biologische Aktivität des Peptids durch das Phenylalaninderivat beeinträchtigt wird. Als SiFA-Modellpeptide wurden Tyr<sup>3</sup>-Octreotatderivate gewählt, die aufgrund ihrer hohen klinischen Relevanz in der Diagnostik Somatostatin-Rezeptor-positiver Tumore direkt untersucht werden könnten.

## 6.2. Ergebnisse und Diskussion

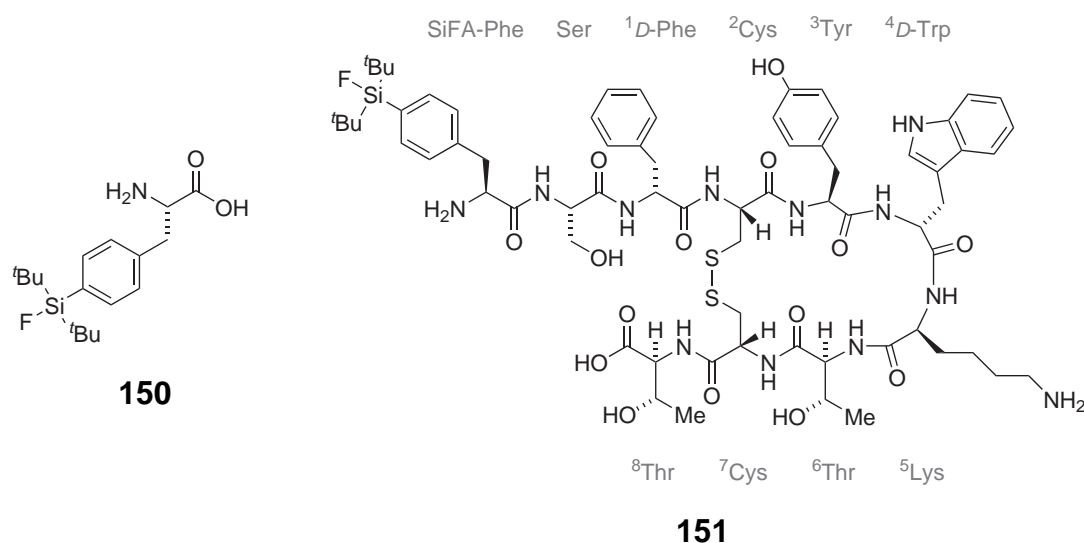
### 6.2.1. Design des SiFA-Octreotat-Peptids

Aus zahlreichen Untersuchungen der letzten 15 Jahre konnte ein allgemeines Pharmacophor-Modell des Octreotids **140** abgeleitet werden.<sup>[357,358]</sup> Das zyklische Peptid bildet eine Typ-II'  $\beta$ -Schleife aus, die für die notwendige Orientierung der Aminosäureseitenketten nach außen verantwortlich ist. Als essentielle Reste, die für eine selektive Bindung an die Somatostatinrezeptoren  $sst_{2/3/5}$  notwendig sind, wurden das  $^1D$ -Phe und die beiden Reste  $^4D$ -Trp und  $^5Lys$  identifiziert (Octreotid-Nummerierung).<sup>[358]</sup> Die besondere Konformation des Peptids wird durch die Disulfidbrücke und durch die beiden *D*-konfigurierten Aminosäuren bestimmt. Dieses Pharmacophor-Modell weist den Aminosäuren am *N*-Terminus eine untergeordnete Rolle zu. Besonders im Vergleich zum DOTA- $^1D$ -Phe- $^3Tyr$ -Octreotat-Konjugat **141** (Abbildung 6.3) zeigt sich, dass die *N*-terminale Region des Peptids auch größere sterische Gruppen (DOTA) toleriert, ohne die biologische Aktivität zu beeinträchtigen.<sup>[359]</sup>

Gegenüber dem nativen Phenylalanin besitzt SiFA-Phenylalanin **150** aufgrund der beiden *tert*-Butylgruppen einen deutlich höheren sterischen Anspruch (Abbildung 6.4, links). Wir wählten deshalb den *N*-Terminus des  $^3Tyr$ -Octreotats als Position zum Einbau des SiFA-Phenylalanins **150** (Abbildung 6.4, rechts). Um die Wasserlöslichkeit des SiFA- $^3Tyr$ -Octreotats **151** zu erhöhen platzierten wir zusätzlich einen Serinrest zwischen dem SiFA-Phe und dem *D*-Phe der Position 1.

### 6.2.2. Synthese des (S)-SiFA-Phenylalanins

Die Synthese des (S)-SiFA-*N*-Boc-Phenylalanins **157** wurde von Dr. Lyuba Iovkova Berends in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus Jurkschat (TU Dortmund) durchgeführt. Ausgehend von dem bereits beschriebenen SiFA-Benzaldehyd **152**<sup>[360]</sup> wurde das Olefin **154** in einer Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion mit Phosphonsäureester **153** erhalten (Schema 6.5). Stereoselektive Hydrierung mit  $H_2$  unter Katalyse eines chiralen Rh(I)-Komplexes ergab SiFA-(S)-*N*-Cbz-Phenylalaninmethylester **155** in 98 % *ee* und quantitativer Ausbeute. Gleichzeitige Entschützung der Amino- und Carboxyfunktion



**Abb. 6.4.** Struktur des (S)-SiFA-Phenylalanins **150** (links) und des SiFA-<sup>3</sup>Tyr-Octreotats **151** (rechts).

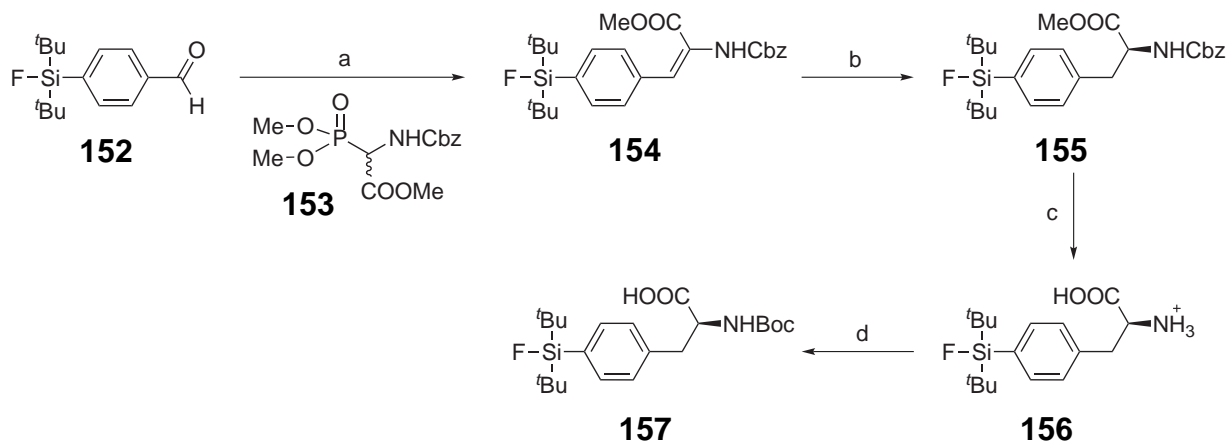
zum SiFA-(S)-Phenylalanin **156** wurde durch Erhitzen von **155** in konzentriertem HBr erreicht. Zum Einsatz des SiFA-Phenylalanins in der Festphasen-Peptidsynthese wurde die Aminosäure **156** mittels  $(t\text{-BuOCO})_2\text{O}$  in die Boc-geschützte Aminosäure **157** überführt.

### 6.2.3. Synthese des SiFA-Octreotat-Peptids

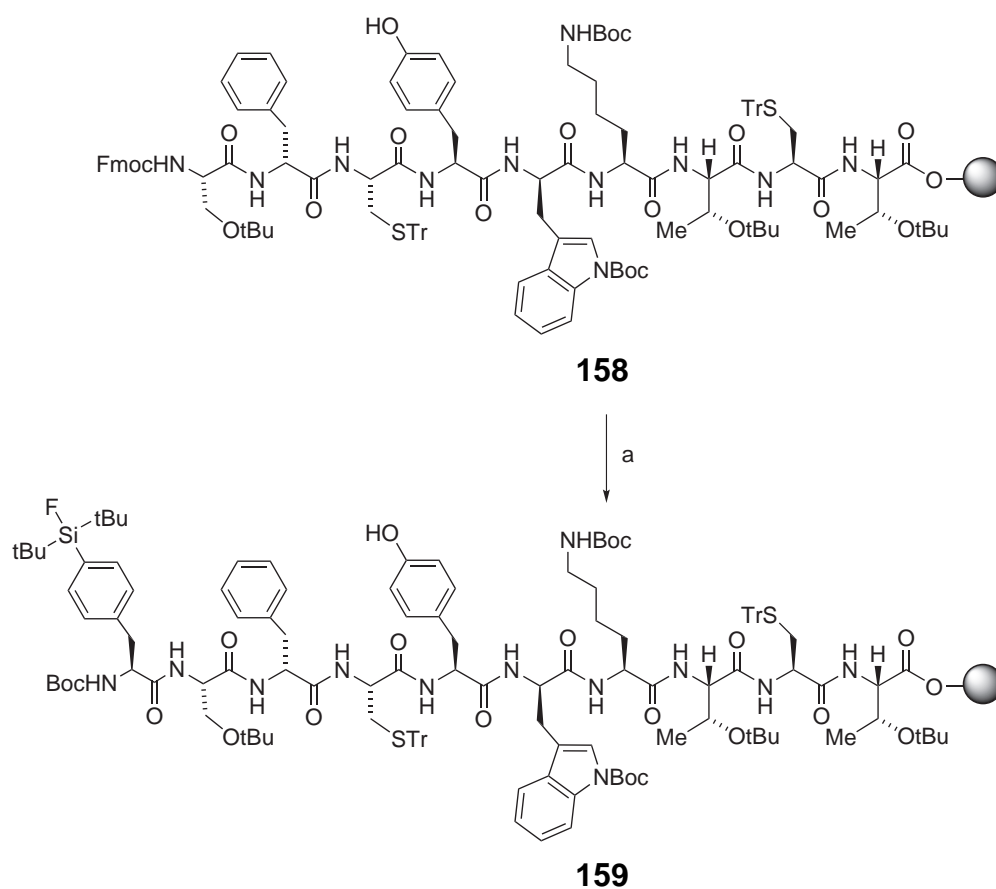
Es sollte eine flexible Synthesestrategie des Octreotat-Peptids entwickelt werden, mit der die Kupplung des (S)-SiFA-N-Boc-Phenylalanins **157** an das harzgebundene Peptid untersucht werden sollte. Die Oxidation der beiden Cystein-Thiole zum intramolekularen Disulfids sollte im Gegensatz zur literaturbekannten Synthese eines Tyr<sup>3</sup>-Octreotats<sup>[361]</sup> möglichst ohne Thallium(III)-trifluoracetat durchgeführt werden.

Das 9-mer Vorläuferpeptid **158** wurde mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese an Polystyrolharz in Fmoc-Strategie synthetisiert (Schema 6.6). Um möglichst wenig der aufwendig zu synthetisierenden SiFA-Aminosäure in der Peptidsynthese verwenden zu müssen, wurden die nachfolgenden Schritte manuell durchgeführt. Nach Entschützen der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe des Peptids **158** mit Piperidin folgte die Kupplung des SiFA-Phenylalanins **157** (1.8 Äquiv.) mittels HBTU, so dass das harzgebundene 10-mer Peptid **159** erhalten wurde.

## 6. Sonstige wissenschaftliche Projekte



**Schema 6.5** Synthese des (S)-SiFA-N-Boc-Phenylalanins **157** (Dr. Lyuba Iovkova Berends).  
 Bedingungen: a) (±)-Methyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-(dimethoxyphosphinyl)-acetat **153**, Tetramethylguanidin, THF, -78 °C, 64%. b) H<sub>2</sub>, 1,2-Bis[(2R,5R)-diethylphospholanolbenzolcyclooctadien]rhodium(I)-triflat, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, quant., RT. c) conc. HBr, 110 °C. d) (t-BuOCO)<sub>2</sub>O, NEt<sub>3</sub>.



**Schema 6.6** Synthese des SiFA-Octreotate-Peptides **151**, Teil 1: Bedingungen: a) 1. 20% Piperidin/DMF, 30 min. 2. Boc-SiFA-Phe **157**, HBTU, DIPEA, 20 h.

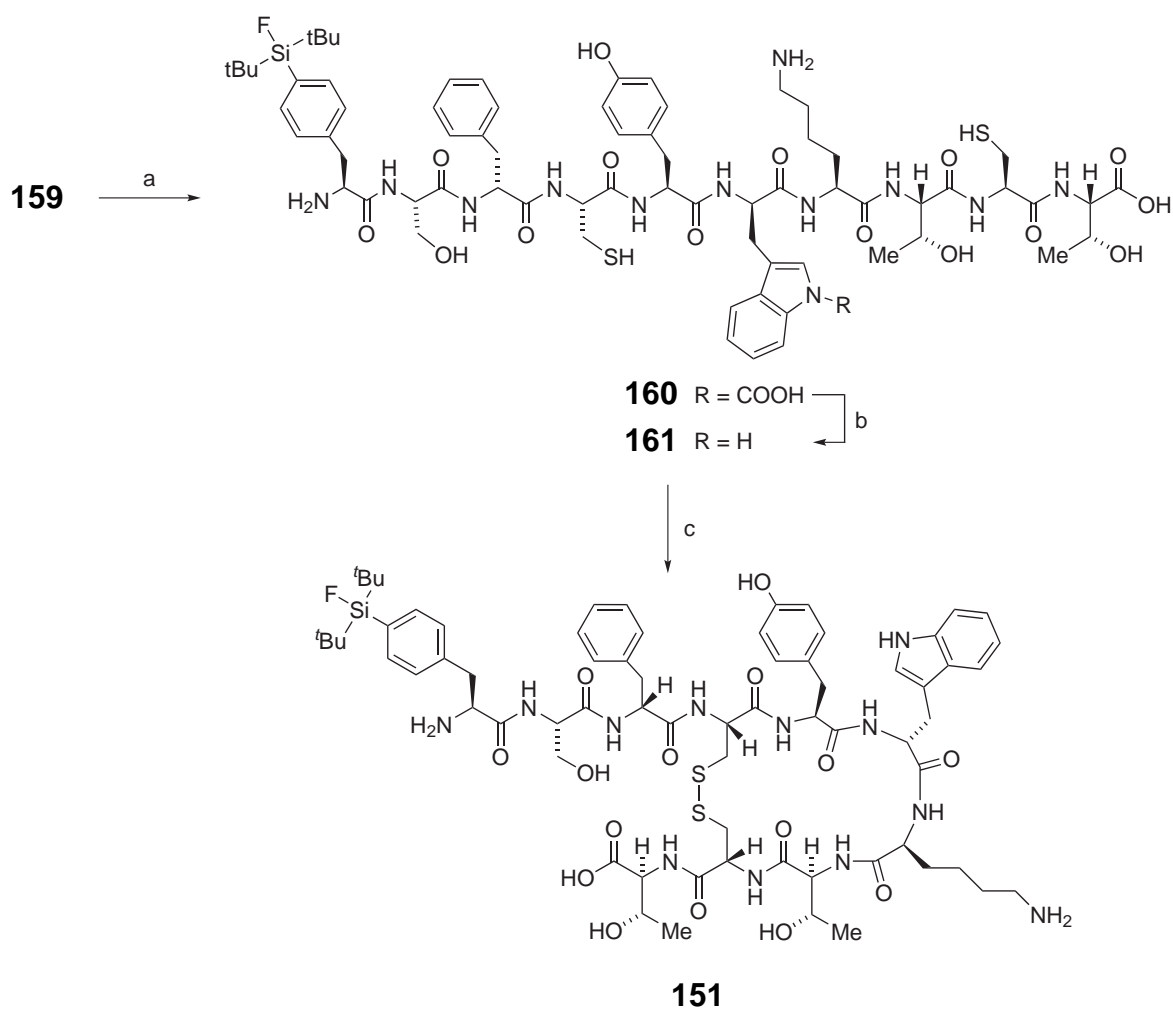
Beim Abspalten und Entschützen des harzgebundenen 10-mer Peptids **159** mit 95 % TFA wurde zunächst das Peptid **160** als Hauptprodukt erhalten, das nach Spaltung der Boc-Gruppe am Indolring des Tryptophans noch die recht stabile Carbaminsäure trug (Schema 6.7).<sup>[362]</sup> Die Carbaminsäure konnte durch Lösen des Peptids **160** in Methanol/Wasser (1:1) und Erwärmen auf 40 °C unter Zugabe einer katalytischen Menge Trifluoressigsäure vollständig hydrolysiert werden.

Die Knüpfung der intramolekularen Disulfidbrücke gelang durch Oxidation des Peptids **151** in einer leicht basischen Methanollösung unter Sauerstoffatmosphäre in 72 h. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Methanollösung ausreichend verdünnt war (0.3 M) um der Bildung intermolekularer Disulfide vorzubeugen. Insgesamt wurden 102 mg des SiFA-Octreotat-Peptids **151** in einer Gesamtausbeute von 19 % erhalten (Abbildung 6.5, vollst. Charakterisierung s. Kapitel 8.7.7).

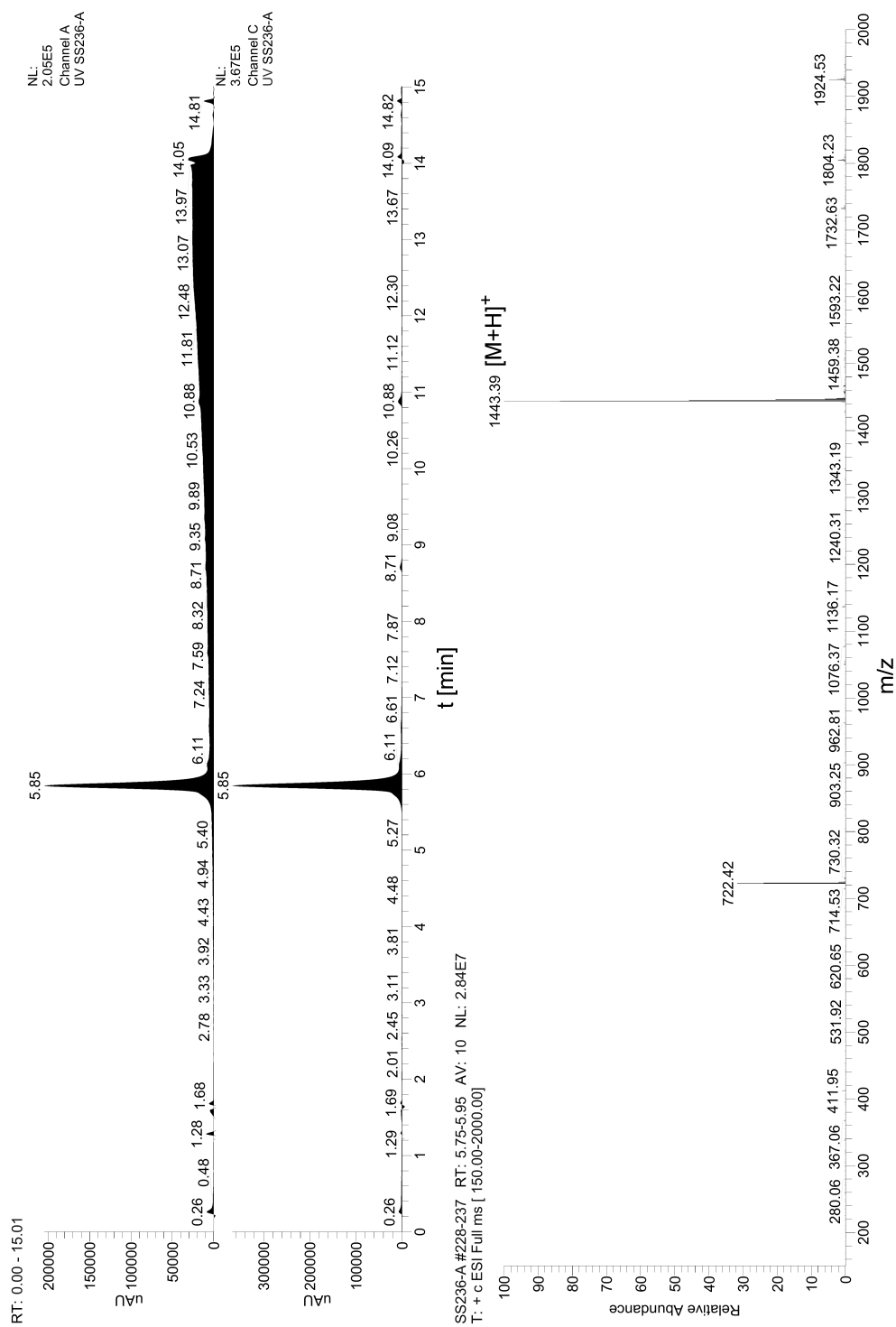
### 6.2.4. Radiochemische Evaluierung des SiFA-Octreotat-Peptids

Erste Versuche zur <sup>18</sup>F-Markierung des SiFA-Octreotat Peptids **151** ergaben eine akzeptable radiochemische Ausbeute (*radiochemical yield*, RCY) von 34 % (Dr. Björn Wängler, Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, LMU München). Zur Zeit wird das Peptid in Hinblick auf seine Eignung als Radio-*Tracer* in Tierexperimenten evaluiert. Hierbei steht die Untersuchung der Hydrolysestabilität der Si-F-Bindung *in vivo* und die Untersuchung der Spezifität des markierten Peptids für Somatostatin-Rezeptor exprimierende Tumore im Vordergrund.

## 6. Sonstige wissenschaftliche Projekte



**Schema 6.7** Synthese des SiFA-Octreotat-Peptids **151**, Teil 2. Bedingungen: a) 95 % TFA, 2.5 % H<sub>2</sub>O, 2.5 % Et<sub>3</sub>SiH, 1 h. b) katal. TFA, MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1), 40 °C 1.5 h. c) O<sub>2</sub>-Atm., DIPEA, MeOH, 72 h. Gesamtausbeute Peptid **151**: 19 %.



**Abb. 6.5.** LCMS-Analyse des SiFA-Octreotate-Peptids **151** bei 254 nm (Channel A) und 280 nm (Channel C).





## **7. Zusammenfassung**

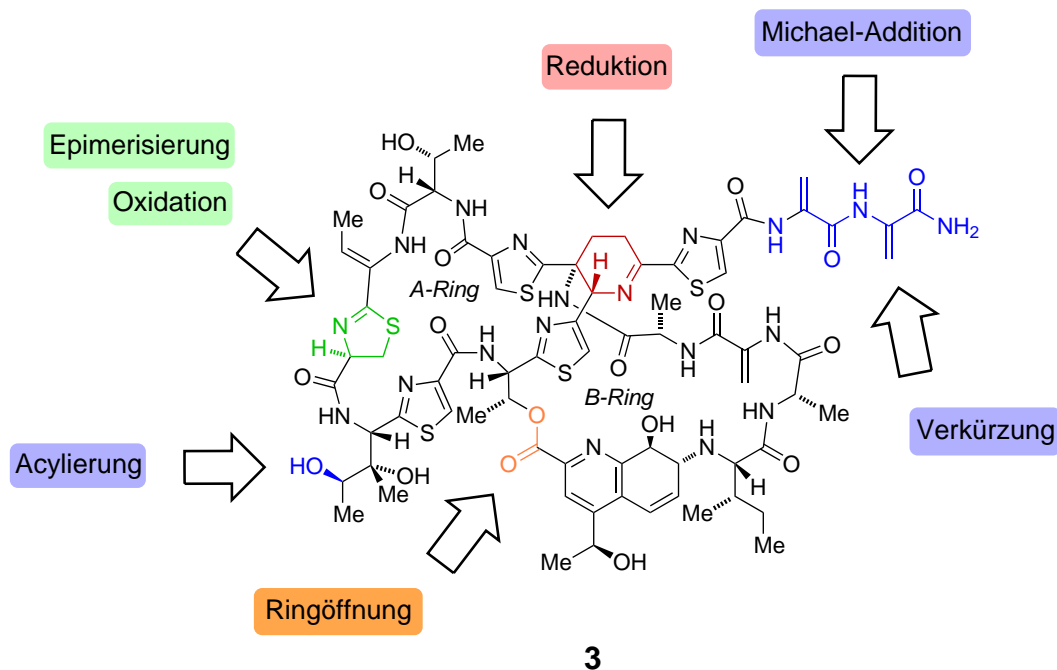
### Zusammenfassung

Die Thiopeptid-Naturstoffe sind eine Gruppe von strukturell komplexen, makrozyklischen Peptiden, die sehr hohe Wirkung gegen *Gram*-positive Bakterien aufweisen. Die potentesten Vertreter stellen sub-nanomolare Hemmstoffe der GTPase-assoziierten Region des Ribosoms dar. Diese Region ist für die dynamische Interaktion des Ribosoms mit verschiedenen Proteinfaktoren während des Translationszyklus essentiell, so dass ihre Inhibierung zum Abbruch des Translationsvorgangs und Absterben der Bakterien führt. Die Thiopeptidbindestelle der GTPase-assoziierten Region zeichnet sich strukturell und funktional durch das enge Zusammenwirken von Protein- und RNA-Komponenten aus. Die Thiopeptide wechselwirken hier kooperativ mit dem L11-Protein und mit der 23S rRNA. Mit dieser Eigenschaft stellen sie eine Besonderheit unter den antibakteriellen Hemmstoffen dar. Bislang sind nur wenige Beispiele von Inhibitoren bekannt, die gleichzeitig mit Protein- als auch mit RNA-Komponenten wechselwirken. Die Bindestelle der GTPase-assoziierten Region des Ribosoms wird bislang von keinem therapeutisch eingesetzten Antibiotikum ausgenutzt. Ein detaillierteres Verständnis der Bindeeigenschaften kann daher zur Entwicklung von neuen ribosomalen Wirkstoffen beitragen.

### Semisynthetische Modifizierungen des Thiostreptons

Semisynthetische Modifizierungen des Thiopeptid-Grundgerüsts bieten eine hervorragende Möglichkeit, die strukturellen Bindungseigenschaften der Thiopeptide näher zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden stellvertretend semisynthetische Modifizierungen des Thiostreptons **3** untersucht, die auch zum Patent angemeldet werden konnten.<sup>[363]</sup> Dabei wurden verschiedene Thiostreptonderivate synthetisiert, die durch Modifizierungen unterschiedlicher Funktionalitäten des Thiostrepton-Grundgerüsts erhalten wurden (Abbildung 7.1).

Einerseits wurden abbauende Modifizierungen durchgeführt, die die Seitenkette verkürzten, andererseits wurden dekorierende Modifizierungen bearbeitet, die die Reaktivitäten funktioneller Gruppen ausnutzten, um neue Gruppen einzufügen (Michael-Addition, Acylierung). Durch Reduktion des zentralen Heterozyklus und die Oxidation



**Abb. 7.1.** Semisynthetische Modifizierungen des Thiostrepton-Grundgerüsts.

bzw. Epimerisierung des A-Ring-Thiazolins wurde das Gerüst modifiziert. Selektive Hydrolyse des Lactons öffnete den B-Ring, so dass dessen Einfluss auf die Struktur zum ersten Mal untersucht werden konnte.

Die gewonnenen Erkenntnisse über die chemische Reaktivität des Thiostreptons wurden dann für die Synthese von funktionstragenden Thiostreptonderivaten genutzt, die teilweise patentiert wurden.<sup>[364]</sup> Neben den Fluoreszenzfarbstoff-markierten Thiostrepton-Sonden **74** und **78** wurde die biotinylierte Thiostrepton-Sonde **80** synthetisiert. Die fluoreszenten Thiostrepton-Sonden dienten in Folge einerseits der Quantifizierung von Bindungsaffinitäten der Thiopeptide bzw. der Derivate an die GTPase-assoziierte Region und zur Untersuchung der Resistenzwirkung verschiedener Mutationen des L11-Proteins bzw. der 23 S rRNA (Dr. Sascha Baumann). Andererseits waren die Thiostrepton-Sonden in Fluoreszenzmikroskopie-Untersuchungen zur Aufklärung der Zielstrukturen des Thiostreptons in Zellen besonders nützlich (Dr. Bernhard Ellinger).

### **Hemmung des Ribosoms<sup>[116,117,123]</sup>**

Durch vergleichende Untersuchungen mittels Fluoreszenz-Polarisationsassay wurden wichtige Erkenntnisse über die strukturellen Parameter der Bindung an den Protein/RNA-Komplex erhalten (Dr. Sascha Baumann). Wir konnten so finden, dass Modifizierungen der Seitenkette nur geringen Einfluss auf die *in vitro* Bindeeigenschaften der Derivate haben, so dass sich Modifizierungen dieser Position dazu eignen, die physikochemischen Eigenschaften der Moleküle zu verbessern. Neben den biochemischen *in vitro* Untersuchungen wurden die Derivate auf ihre bakterielle Wachstumshemmung hin untersucht (Dr. Bernhard Ellinger). Hieraus folgten die Erkenntnisse, dass beispielsweise Modifizierungen der Seitenkette durch positiv geladene Gruppen sehr gute antibakterielle Wirksamkeit vermitteln, während die Addition von Thioglucose scheinbar die Aufnahme des Derivats in die Zellen verhindert.

Darüber hinaus wurden NMR-Strukturen wichtiger Gerüst-Derivate bestimmt und der Einfluss der verschiedenen Modifizierungen auf die Bindungseigenschaften mittels *Docking*-Berechnungen untersucht (Dr. Hendrik Jonker, Dr. Karl Kirschner). Es konnte gezeigt werden, dass die Gerüst-Modifizierungen teilweise einen deutlichen Einfluss auf die Bindeeigenschaften der Moleküle ausüben, wobei die beobachteten Strukturveränderungen eher moderat waren. Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der A-Ring-Konformation für die hochaffine Bindung der Thiopeptide an den Protein/RNA-Komplex und die starke Formabhängigkeit der molekularen Erkennung.

### **Antimalariawirkung des Thiostreptons<sup>[365]</sup>**

Thiostrepton weist Aktivität gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* auf. Unsere neuartigen semisynthetischen Thiostreptonderivate zeigten Plasmodien-Wachstumshemmung in niedrigen mikromolaren Konzentrationen und waren bis zu 10 x aktiver als Thiostrepton selbst. Interessanterweise zeigten sich besonders lipophile Derivate als sehr aktiv, deren antibakterielle Wirksamkeit vergleichsweise gering war. Phänotypische Untersuchungen legten einen neuartigen Wirkmechanismus in Plasmodien nahe. Fluoreszenzmikroskopische Experimente mit den fluoreszenten Thiostreptonsonden und Kollokalisierung mit Antikörpern legten nahe, dass Thiostrepton im

---

Eukaryoten an das Proteasom bindet. In Folge konnte ich die inhibitorische Wirkung der Thiostreptonderivate auf die Proteaseaktivität des Proteasoms in enzymatischen Assays mit fluorogenen Substraten spezifisch nachweisen. Interessanterweise wird die Caspaseaktivität des Proteasoms um ungefähr eine Größenordnung stärker inhibiert als die Chymotrypsinaktivität. Damit konnte zum ersten Mal die Zielstruktur der Thiopeptide in Plasmodien identifiziert und das Antimalaria-Wirkprofil schlüssig erklärt werden.

### **Biosynthese des Thiostreptons<sup>[338]</sup>**

Erst seit kurzer Zeit wurde klar, dass die Biosynthese der Thiopeptide über die ribosomale Synthese eines linearen Vorläuferpeptids verläuft, gefolgt von umfangreichen post-translationalen Modifikationen. Alle Aminosäurereste des Thiostreptons stammen daher aus proteinogenen L-Aminosäuren, das einzige Thiazolin im A-Ring des Thiostreptons ist jedoch D-konfiguriert. Wir konnten zeigen, dass das  $\alpha$ -Proton des Thiazolins sehr leicht deprotoniert werden und in die D-Konfiguration überführt werden kann, die für Thiostrepton thermodynamisch bevorzugt ist. Die Umwandlung der Epimere wurde mittels NMR- und HPLC-Kinetiken charakterisiert. Meine Ergebnisse legen nahe, dass die Epimerisierung nicht auf Aminosäureebene, sondern am Gerüst erfolgen kann und keiner «klassischen» Aminosäure-Epimerase bedarf. Bisher wurde keine Epimerase im Biosynthesecluster des Thiostreptons gefunden.



## **8. Experimenteller Teil**

### 8.1. Methoden

#### 8.1.1. Geräte und Verfahren

**NMR-Spektroskopie:** Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden mit einem *Mercury 400 (Varian)*, einem *Avance DRX 500 (Bruker)* oder einem *Inova 600 (Varian)* gemessen. Für die  $^{19}\text{F}$ - und  $^{29}\text{Si}$ -Spektren wurde das *Inova 600* verwendet. Die Restprotonen der deuterierten Lösungsmittel dienen als interner Standard ( $\text{CDCl}_3$ :  $\delta_{\text{H}} = 7.26$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 77.2$  ppm;  $\text{CD}_3\text{OD}$ :  $\delta_{\text{H}} = 3.31$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 49.0$  ppm;  $\text{DMSO-}d_6$ :  $\delta_{\text{H}} = 2.50$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 39.5$  ppm). Die chemischen Verschiebungen ( $\delta$ ) sind in *parts per million* (ppm), und die Kopplungskonstanten in Hz angegeben. Die Signalmultiplizitäten wurden folgendermaßen bezeichnet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), dd (Doppeldublett), m (Multipllett) und br s (breites Singulett).

**Massenspektrometrie:** Die LCMS-Spektren wurden mit einer *LCQ Advantage ESI* Anlage (*Finnigan*) aufgenommen. Vorsäule: *VP 50/21 Nucleodur C18 Gravity* 5  $\mu\text{m}$ , Haupt säule: *125/4 Nucleodur C18 Gravity* 3  $\mu\text{m}$  bzw. *125/4 Nucleodur C4 Gravity* 5  $\mu\text{m}$ , (*Macherey & Nagel*). Es wurden zwei verschiedene Gradienten mit einer Flussrate von 1 mL/min verwendet. Die Detektion erfolgte über Messung der UV-Absorption bei 210, 254, 280 und 350 nm.

Methode I:  $\text{H}_2\text{O} / 0.1\% \text{HCO}_2\text{H}$  (A) und  $\text{MeCN} / 0.1\% \text{HCO}_2\text{H}$  (B): 10 % B für 1 min; 10 % bis 100 % B in 9 min; 100 % B für 2 min.

Methode II:  $\text{H}_2\text{O} / 0.1\% \text{HCO}_2\text{H}$  (A) und  $\text{MeOH} / 5\% \text{THF} / 0.1\% \text{HCO}_2\text{H}$  (B): 10 % B für 1 min; 10 % bis 100 % B in 9 min; 100 % B für 2 min.

**MALDI-TOF-Spektren** wurden mittels einer *Voyager DE<sup>TM</sup>Pro Biospectrometry Workstation* der Firma *PerSeptive Biosystems* aufgenommen. Als Matrix diente 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB).

Hochaufgelöste (**HRMS**)-Spektren wurden auf einer *LTQ Orbitrap (Thermo Scientific)* gemessen, gekoppelt an ein *Accela HPLC-System* (HPLC Säule *50/1 Hypersil GOLD* 1.9  $\mu\text{m}$ ). Als Ionisierungsmethode kam Elektrospray-Ionisierung (ESI) zum Einsatz.



**Schmelzpunktbestimmung:** Es wurde eine Schmelzpunktapparatur *B-450* der Firma *Büchi* verwendet. Die angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

**Peptidsyntheseroboter:** Der verwendete Mikrowellen-Peptidsyntheseroboter *Liberty* stammte von der Firma *CEM*.

**Fluoreszenz-Plattenleser:** Die biochemischen Proteasominhibitionsassays wurden auf einem *Tecan Infinite M200* Plattenleser durchgeführt. Zum Einsatz kamen 384-well Mikrotiterplatten (*Optiplate 384 T, Black Opaque*) der Firma *PerkinElmer*.

**Rotations-Vakuumkonzentrator:** Zum Einengen kleiner Flüssigkeitsmengen wurde ein Rotations-Vakuumkonzentrator ("*Speed-Vac*") *RVC-2-25* der Firma *Christ* mit Kühlfalle *CT02-50* und Membran-Vakuumpumpe *MZ2C* der Firma *Vacuubrand* verwendet.

**Thermomixer:** Zum temperierten Schütteln von Eppendorfreaktionsgefäßen wurde ein *Thermomixer comfort* der Firma *Eppendorf* eingesetzt.

### 8.1.2. Chromatographie

**Dünnschichtchromatographie:** Die Dünnschichtchromatographie wurde auf beschichteten Aluminium-Platten der Firma *Merck* (Kieselgel 60,  $F_{254}$ ) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht (254 bzw. 366 nm) oder durch Anfärben mit  $\text{KMnO}_4$ -Lösung (1.6 g  $\text{KMnO}_4$ , 10 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 2.5 mL 5 %-ige  $\text{NaOH}$ -Lösung, 200 mL Wasser) und nachfolgendem Erhitzen.

**Säulenchromatographie:** Es wurde Kieselgel der Firma *Acros* (Partikelgröße 35-70  $\mu\text{m}$ ) als stationäre Phase verwendet. In der Regel wurde ein Überdruck von 0.3-0.5 bar angelegt.

**Analytische HPLC:** Es wurde eine HPLC-Anlage der Firma *Varian* verwendet: Pumpe *ProStar 230*, Autosampler *ProStar 410*, Säulenwechsler *Reodyne LabPRO*, UV/Vis-Detektor *ProStar 335*. Als Trennsäulen kamen zum Einsatz: *CC 125/4 Nucleodur C18 Gravity 3  $\mu\text{m}$ , EC*

## 8. Experimenteller Teil

---

125/4 *Nucleodur C18 Isis* 3  $\mu\text{m}$  und CC 125/4 *Nucleodur C4 Gravity* 3  $\mu\text{m}$ . Die Lösungsmittel wurden als „HPLC gradient grade“ von *Fischer Scientific* oder *Acros* bezogen.

Methode A: C4-Säule,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ -Gradient: 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  für 1 min; 10% bis 70%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in 16 min; 100%  $\text{CH}_3\text{CN}$  für 2 min.

Methode B: C4-Säule,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ -Gradient: 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  für 1 min; 10% bis 95%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in 10 min; 95%  $\text{CH}_3\text{CN}$  für 3 min. Konstant 5% Laufmittel C: 2% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Präparative HPLC:** Die präparative HPLC-Anlage war ebenfalls von der Firma *Varian*, bestehend aus Pumpe *ProStar 215*, UV/Vis-Detektor *ProStar 340* und Fraktionssammler *ProStar 701*. Als Trennsäulen kamen zum Einsatz: *VP 250/21 Nucleodur C18 Gravity* 5  $\mu\text{m}$ , *VP 250/16 Nucleodur C18 Gravity* 5  $\mu\text{m}$ , *VP 250/21 Nucleodur C4 Gravity* 5  $\mu\text{m}$  und *VP 250/16 Nucleodur C4 Gravity* 5  $\mu\text{m}$ . Die Lösungsmittel wurden als „HPLC gradient grade“ von *Fischer Scientific* oder *Acros* bezogen.

### 8.1.3. Reagenzien, Lösungsmittel, Harze

Alle Reagenzien und Lösungsmittel wurden von den Firmen *ABCR*, *Acros*, *Biosolve*, *Fluka*, *Iris Biotech*, *Novabiochem* oder *Sigma-Aldrich* erhalten und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Wasserfreies Dichlormethan wurde durch Destillation über Calciumhydrid erhalten.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Thioestrepton stammte von *Calbiotech* bzw. *Fermentek*.

**Polystyrolharz:** Es wurde 2-Chlortritylchloridpolystyrolharz (Copolymer 1% DVB, 50–100 mesh, 1.55 mmol/g) der Firma *Iris Biotech* für die Peptidsynthesen verwendet.

### 8.1.4. Biochemische Materialien

Für die biochemischen Arbeiten wurden humane 20S Proteasom-Präparationen (aus Erythrocyten) der Firma *Biomol* verwendet. Weiterhin kamen die fluorogenen Substrate Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (*Biomol*), Ac-Nle-Pro-Nle-Asp-AMC (*Bachem*) und Boc-Leu-Arg-Arg-AMC (*Biomol*) zum Einsatz. Die Proteasominhibitoren Epoxomicin und MG132

wurden von *Calbiochem* bzw. *Sigma-Aldrich* bezogen. Hochreines Wasser wurde mittels einer *milliQ Advantage* (*Millipore*) Anlage bereitgestellt.

### 8.1.5. Pufferlösungen

**Reaktionspuffer des Proteasomassays:** 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5

**NMR-Titrationspuffer:** 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in D<sub>2</sub>O, pH 12.0

**Löslichkeitspuffer:** 50 mM Natriumphosphat, pH 7.0

**Michael-Additionspuffer:** 50 mM Natriumphosphat, pH 9.0

## 8.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften

**Sulfa-Michael-Addition (AV1):** Der Michael-Akzeptor wurde in TFE gelöst (15 mM) und mit Natriumphosphat-Puffer (50 mM, pH 9) im Verhältnis 2:1 (TFE/Puffer) versetzt. Nach Einrichten einer Ar-Schutzgasatmosphäre wurden 1.2 Äquiv. des entsprechenden Thiols bei RT hinzugegeben, gefolgt von 5.0 Äquiv. Et<sub>3</sub>N. Die Reaktionsmischung wurde bis zum vollständigen Umsatz bei RT gerührt (2–48 h).

**Thiazolinoxidation (AV2):** Die zu oxidierende Verbindung wurde in wasserfreiem THF gelöst (15 mM) und bei 0 °C langsam mit 2.0 Äquiv. CBrCl<sub>3</sub> und 1.1 Äquiv. DBU versetzt. Nach 1 h wurde das Kühlbad entfernt und die Reaktion bei RT bis zum vollständigen Umsatz gerührt (2–3 h).

**Dehydropiperidinreduktion (AV3):** Die zu reduzierende Verbindung wurde in wasserfreiem THF gelöst (15 mM) und bei -15 °C langsam mit 1.1 Äquiv. NaBH<sub>3</sub>CN versetzt. Nach 1 h wurde das Kühlbad entfernt und die Reaktion bei RT bis zum vollständigen Umsatz gerührt (10–20 h).

**Beladung der ersten Aminosäure am 2-Chlortritylharz (AV4):** Die Fmoc-geschützte, getrocknete Aminosäure (1.8 Äquiv.) wurde in wasserfreiem Dichlormethan (0.19 M) unter Zugabe von DIPEA (4.0 Äquiv.) gelöst, und zu dem vorgequollenen Harz (1.0 Äquiv.)

## 8. Experimenteller Teil

---

im Festphasenreaktor mit Fritte gegeben. Nach 2 h Schütteln bei RT wurde das Harz 3x mit (DCM/MeOH/DIPEA 17:2:1), 3x DMF und 3x DCM gewaschen (jeweils ca. 20 mL) und im Hochvakuum getrocknet.

**Fmoc-Beladungsbestimmung des Harzes (AV5):** Eine kleine Menge des zu bestimmenden Harzes (2–3 mg) wurde in einen 10 mL-Messkolben eingewogen, mit Piperidin / DMF (4:1, 10 mL) versetzt, und für 30 min geschüttelt. Aus dem Überstand wurden 3 mL entnommen, in eine UV-Küvette überführt, und die Extinktion bei 301 nm bestimmt. Als Referenz diente die Piperidin / DMF -Lösung ohne Harz. Aus dem Lambert-Beerschen Gesetz (8.1) ( $E$  = Extinktion,  $c$  = Konzentration [mmol/ml],  $d$  = Schichtdicke [cm],  $\epsilon_{301} = 7800$  [ml/mmol\*cm]) folgt die Beladung  $B$  des Harzes aus der Formel (8.2) ( $B$  = Harzbeladung [mmol/g],  $m$  = Masse des Harzes [mg],  $V$  = Volumen [mL]).

$$E = \epsilon * c * d \quad (8.1)$$

$$B = \frac{c * V * 1000}{m} = \frac{E}{m} * 1.282 \quad (8.2)$$

**Automatisierte Peptidsynthese (AV6):** In der automatisierten Peptidsynthese mittels Mikrowellen-Peptidsyntheseroboter (*Liberty*, *CEM*) wurden folgende Lösungen verwendet:

Fmoc-Aminosäure:	0.2 M in DMF
Aktivator:	0.5 M HBTU in DMF
Base:	2.0 M DIPEA in NMP
Fmoc-Entschützung:	20 % Piperidin in DMF
Lösungsmittel:	DMF

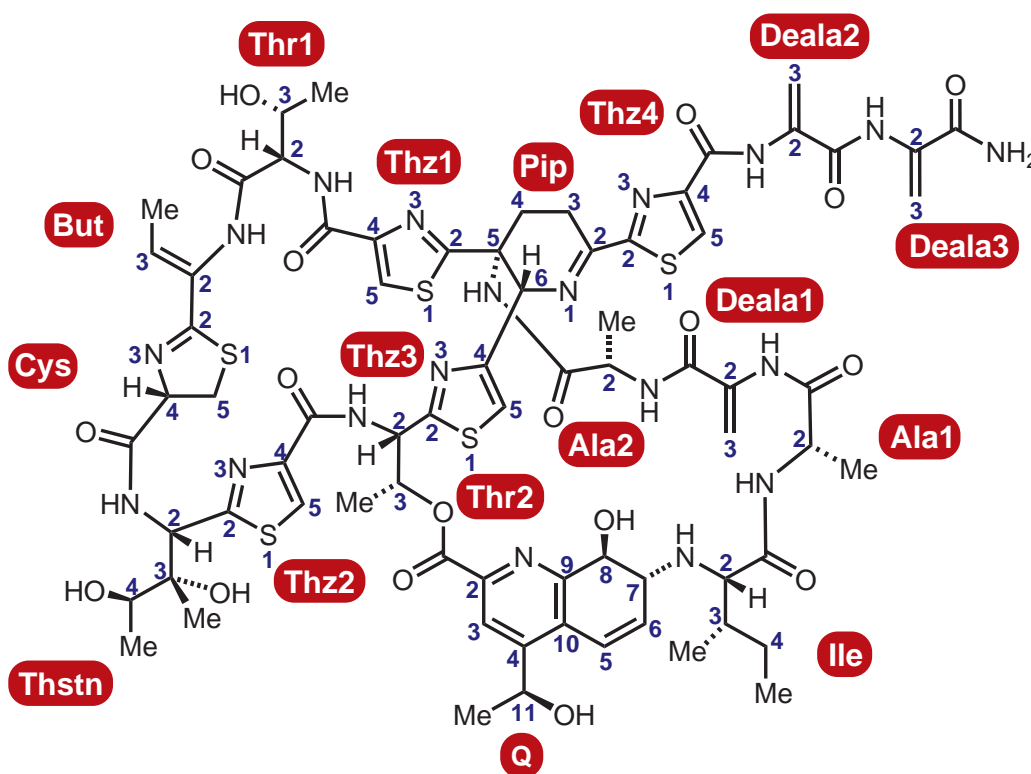
Es wurden die Standard-Geräteparameter für die Peptidsynthese verwendet. Nachfolgend ist eine Übersicht über die wichtigsten Parameter der einzelnen Schritte für eine typische Harzmenge von 0.5 mmol aufgeführt. Alle Kupplungen wurden standardmäßig als Einfachkupplungen durchgeführt, und die Peptide per Hand vom Harz abgespalten.

- Kupplung: 5.0 Äquiv. Fmoc-Aminosäure, 5.0 Äquiv. Aktivator, 5.0 Äquiv. Base, 25 W Leistung (initial), max. 75 °C, 300 s.
- Cys-Kupplung: 120 s ohne Mikrowelle, 240 s bei 25 W Leistung (initial), max. 50 °C.
- Fmoc-Abspaltung: 1) 35 W Leistung, max. 75 °C, 30 s.  
2) 35 W Leistung, max. 75 °C, 180 s.

**Testabspaltung (AV7):** Einige Harzkügelchen wurden mit 0.5 mL TFA (bzw. 0.5 mL TFA/TES/H<sub>2</sub>O 98:1:1) versetzt und für 15 min bei RT geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und im Luftstrom eingetrocknet. Der Rückstand wurde in Acetonitril aufgenommen, die Lösung filtriert und mittels LCMS analysiert.

### 8.3. Thiostreptonderivate

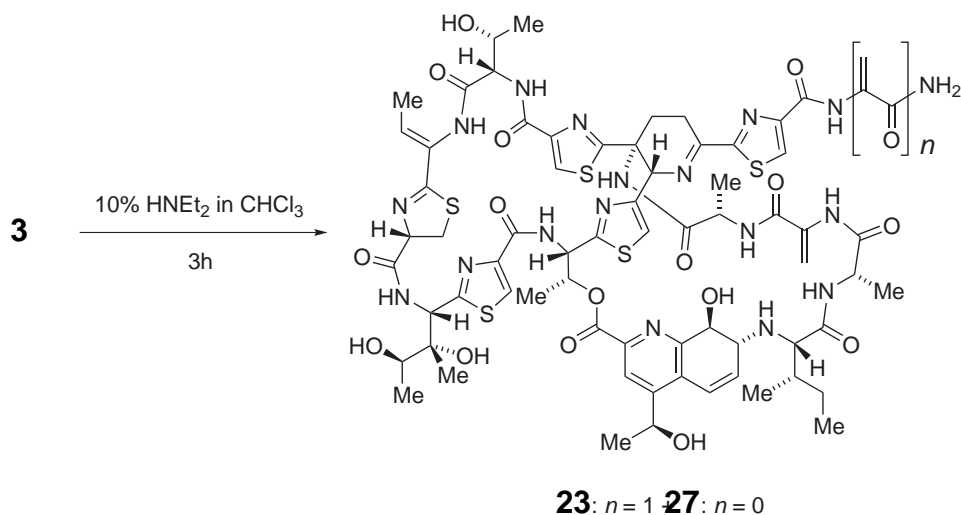
Ausgehend von der Grundstruktur des Thiostreptons **3** (Abbildung 8.1) werden im Folgenden die semisynthetischen Synthesen der Thiostreptonderivate beschrieben. Die Bezeichnungen der verschiedenen Reste innerhalb der Thiostreptonstruktur, die v.a. in den NMR-Zuordnungen Verwendungen finden, sind in der nachfolgenden Abbildung angegeben.



**Abb. 8.1.** Struktur des Thiostreptons **3** als Ausgangspunkt der semisynthetischen Modifikationen. Die verwendete Bezeichnung der Aminosäurereste und die Nummerierung der Atome ist angegeben. But: Dehydrobutyrin; Cys: Cystein (Thiazolin); Deala: Dehydroalanin; Pip: Dehydropiperidin; Q: Chinaldinsäure; Thr: Threonin; Thstn: Thiostreptin.

### 8.3.1. Verkürzungsreaktionen

#### Verkürzungsreaktion ausgehend von Thiostrepton 3



Thiostrepton 3 (1.0 g, 0.601 mmol) wurde unter Rühren in  $\text{CHCl}_3$  (50 mL) gelöst und tropfenweise mit  $\text{HNEt}_2$  (5 mL) bei  $0^\circ\text{C}$  versetzt. Nach 10 min wurde die Reaktion bei RT für 3 h weitergerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Kieselgelchromatographie (2–5 % MeOH in  $\text{CHCl}_3$ ) wurden 671 mg (0.420 mmol, 70 %) des einfach verkürzten Thiostreptons 23 als farbloser Feststoff und 138 mg (0.090 mmol, 15 %) des zweifach verkürzten Thiostreptons 27 (Analytik *vide infra*) als farbloser Feststoff erhalten.

#### Analytik des einfach verkürzten Thiostreptons (23)

**Schmp.:**  $T_m$ :  $> 240^\circ\text{C}$  (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.39$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 8.07$  min; für  $[\text{C}_{69}\text{H}_{82}\text{N}_{18}\text{O}_{17}\text{S}_5 + \text{H}^+]$  ber.: 1595.5, gef.: 1595.4.

**HPLC:** Methode A:  $t_R = 14.1$  min.

**$^1\text{H-NMR}$ :** 400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  4:1;  $\delta = 8.12$  (s, 1H, Thz4-5), 8.10 (s, 1H, Thz2-5), 8.00 (s, 1H, Thz1-5), 7.40 (s, 1H, Thz3-5), 7.14 (s, 1H, Q-3), 6.73 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H, Q-5), 6.46 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H, Deala2-3), 6.25 – 6.15 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.06 (q,  $J = 7.1$

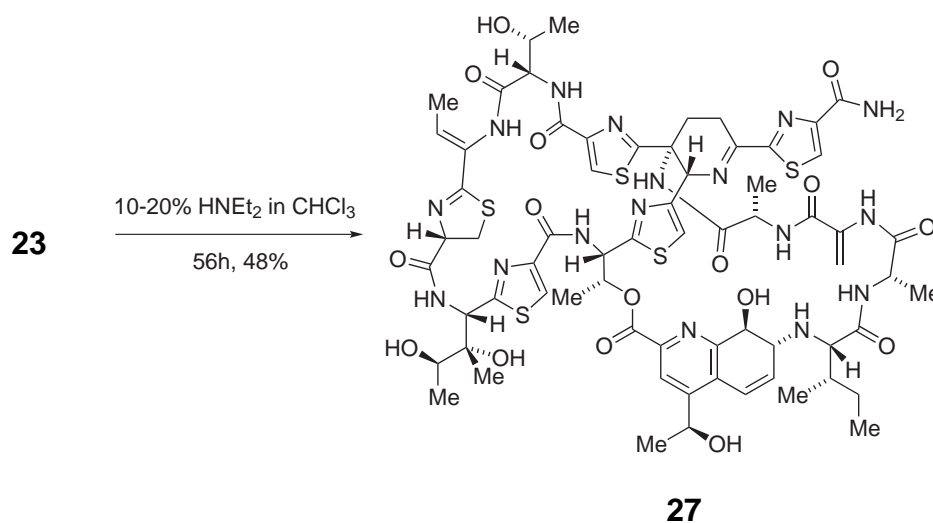
## 8. Experimenteller Teil

Hz, 1H, But-3), 5.67 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, Deala1-3), 5.61 – 5.59 (m, 1H, Thr2-2), 5.57 (s, 1H, Thstn2), 5.48 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H, Deala2-3'), 5.18 (s, 1H, Deala1-3'), 5.16 – 5.12 (m, 2H, Q-11/Pip-6), 4.81 (dd,  $J = 12.9, 8.9$  Hz, 1H, Cys-4), 4.60 – 4.52 (m, 1H, Ala2-2), 4.28 – 4.23 (m, 2H, Thr1-2/Q-8), 3.93 – 3.86 (m, 1H, Pip-4), 3.68 – 3.60 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.51 – 3.43 (m, 2H, Cys-5/Q-7), 3.36 – 3.25 (m, 1H, Pip-3), 3.00 (dd,  $J = 13.0, 11.4$  Hz, 1H, Cys-5'), 2.80 (d,  $J = 4.3$  Hz, 1H, Ile-2), 2.78 – 2.71 (m, 1H, Pip-3'), 2.13 (t,  $J = 12.9$  Hz, 1H, Pip-4'), 1.79 – 1.71 (m, 1H, Ile-3), 1.55 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Thr2-Me), 1.45 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, But-Me), 1.42 – 1.37 (m, 1H, Thr1-3), 1.26 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Ala2-Me), 1.21 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.13 (d,  $J = 6.4$  Hz, 4H, Thstn-4-Me/Ile-4), 1.03 – 0.97 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn3-Me), 0.95 – 0.86 (m, 1H, Ile-4'), 0.83 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.72 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me), 0.65 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, Thr1-Me).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** 125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  4:1;  $\delta = 173.2, 171.9, 170.0, 169.6, 168.6, 168.2, 166.2, 165.4, 162.8, 162.1, 161.9, 161.7, 160.6, 159.5, 157.1, 154.4, 153.3, 149.9, 146.2, 143.4, 133.1, 132.6, 131.0, 129.9, 128.3, 127.4, 127.1, 125.4, 124.9, 123.0, 122.1, 118.1, 103.7, 102.9, 78.8, 71.9, 67.5, 67.1, 66.3, 65.5, 64.3, 64.0, 59.0, 57.4, 55.7, 55.6, 52.9, 51.8, 51.7, 38.3, 34.7, 24.4, 22.5, 18.8, 18.7, 18.6, 17.8, 15.8, 15.5, 15.3, 11.3.$

**HRMS (ESI):** für  $[\text{C}_{69}\text{H}_{82}\text{N}_{18}\text{O}_{17}\text{S}_5 + \text{H}^+]$  ber.: 1595.478, gef.: 1595.482.

### Verkürzungsreaktion ausgehend von einfach verkürztem Thiostrepton 23





Einfach verkürztes Thiostrepton **23** (100 mg, 0.063 mmol) wurde unter Rühren in  $\text{CHCl}_3$  (4.5 mL) gelöst und tropfenweise mit  $\text{HNEt}_2$  (0.5 mL) bei  $0^\circ\text{C}$  versetzt. Nach 10 min wurde die Reaktion bei RT weitergerührt. Nach 29 h wurde nochmals  $\text{HNEt}_2$  (0.5 mL) hinzugegeben, und die Reaktionsmischung für weitere 27 h gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Kieselgelchromatographie (2–5 % MeOH in  $\text{CHCl}_3$ ) wurden 46 mg (0.030 mmol, 48 %) des zweifach verkürzten Thiostreptons **27** als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ :  $> 240^\circ\text{C}$  (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.28$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 7.86$  min; für  $[\text{C}_{66}\text{H}_{79}\text{N}_{17}\text{O}_{16}\text{S}_5 + \text{H}^+]$  ber.: 1526.46, gef.: 1526.46.

**HPLC:** Methode A:  $t_R = 13.5$  min.

**$^1\text{H-NMR}$ :** 400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  4:1;  $\delta = 8.12$  (s, 1H, Thz4-5), 8.09 (s, 1H, Thz2-5), 8.01 (s, 1H, Thz1-5), 7.40 (s, 1H, Thz3-5), 7.14 (s, 1H, Q-3), 6.72 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H, Q-5), 6.29 – 6.13 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.06 (q,  $J = 6.9$  Hz, 1H, But-3), 5.67 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, Deala1-3), 5.60 (s, 1H, Thr2-2), 5.58 (s, 1H, Thstn-2), 5.22 – 5.10 (m, 3H, Deala1-3'/Pip-6/Q-11), 4.81 (dd,  $J = 12.9, 8.8$  Hz, 1H, Cys-4), 4.56 (q,  $J = 6.6$  Hz, 1H, Ala2-2), 4.31 – 4.19 (m, 2H, Thr1-2/Q-8), 3.90 (dd,  $J = 13.0, 6.0$  Hz, 1H, Pip-4), 3.68 – 3.62 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.48 – 3.43 (m, 2H, Cys-5/Q-7), 3.24 – 3.20 (m, 1H, Pip-3), 3.00 (dd,  $J = 13.0$  Hz, 11.4, 1H, Cys-5'), 2.81 (d,  $J = 4.3$  Hz, 1H, Ile-2), 2.78 – 2.68 (m, 1H, Pip-3'), 2.19 – 2.09 (m, 1H, Pip-4'), 1.80 – 1.71 (m, 1H, Ile-3), 1.55 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Thr2-Me), 1.45 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, But-Me), 1.42 – 1.39 (m, 1H, Thr1-3), 1.26 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Ala2-Me), 1.22 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.13 (d,  $J = 6.4$  Hz, 4H, Thstn-4-Me/Ile-4), 1.03 – 0.97 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn3-Me), 0.95 – 0.88 (m, 1H, Ile-4'), 0.84 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.72 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me), 0.64 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, Thr1-Me).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** 125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  4:1;  $\delta = 173.6, 173.2, 171.9, 170.1, 169.6, 168.8, 168.2, 165.4, 163.4, 162.8, 162.1, 162.0, 161.8, 161.6, 160.6, 157.0, 154.4, 153.4, 149.9, 149.6,$

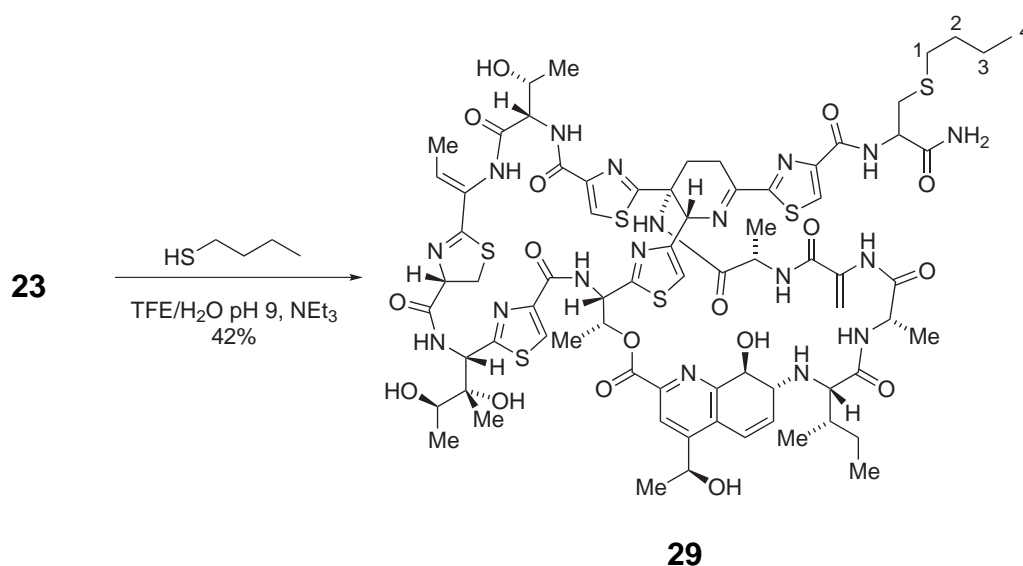
## 8. Experimenteller Teil

149.5, 146.2, 143.4, 132.6, 132.1, 130.0, 128.3, 127.6, 127.1, 125.4, 124.8, 123.0, 122.2, 118.1, 103.0, 78.8, 71.9, 67.5, 67.2, 66.3, 65.3, 64.3, 64.0, 57.4, 55.7, 55.6, 52.9, 51.8, 49.3, 49.0, 34.7, 24.2, 22.5, 18.9, 18.8, 18.7, 18.0, 15.8, 15.5, 15.2, 11.3.

**HRMS (ESI):** für  $[C_{66}H_{79}N_{17}O_{16}S_5+H^+]$  ber.: 1526.457, gef.: 1526.461.

### 8.3.2. Sulfa-Michael-Additionen an einfach verkürztes Thiostrepton **23**

#### Einfach verkürztes Thiostrepton + 1-Butanthiol (**29**)



Einfach verkürztes Thiostrepton **23** (50 mg, 0.031 mmol) wurde mit 1-Butanthiol (4.4  $\mu\text{L}$ , 0.041 mmol, 1.3 Äquiv.) nach **AV1** zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen *Michael*-Addukt **29** (22 mg, 0.013 mmol, 42 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.42$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 8.77/8.99$  min; für  $[C_{73}H_{92}N_{18}O_{17}S_6+H^+]$  ber.: 1685.5, gef.: 1685.2



## 8. Experimenteller Teil

---

(C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen *Michael*-Addukt **31** (14 mg, 0.008 mmol, 20 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

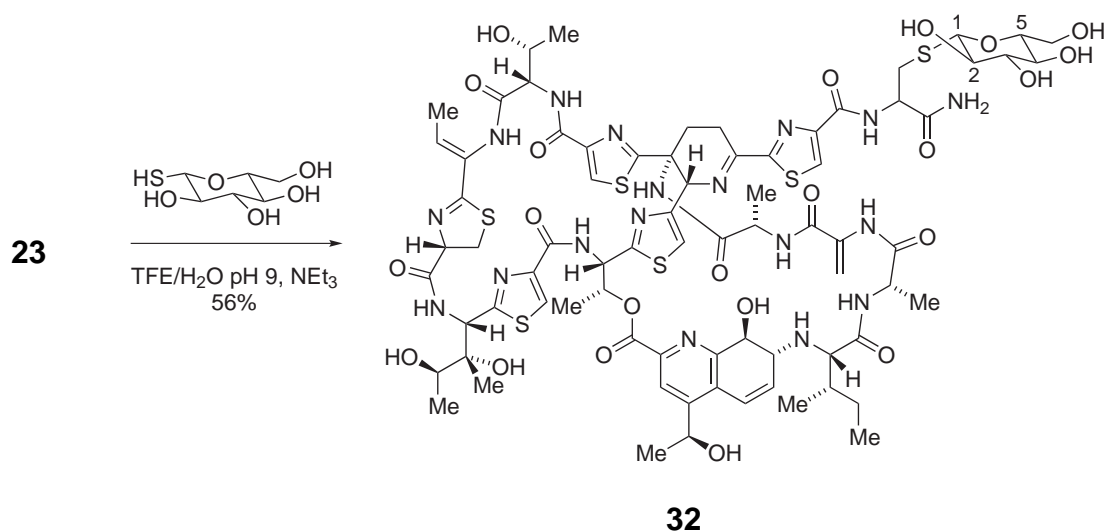
**DC:**  $R_f = 0.48$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 10.53$  min; für [C<sub>85</sub>H<sub>116</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1853.72, gef.: 1853.28.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta = 8.09$  (s, 1H, Thz4-5), 8.05 (s, 1H, Thz2-5), 7.99 (s, 1H, Thz1-5), 7.38 (s, 1H, Thz3-5), 7.12 (s, 1H, Q-3), 6.70 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H, Q-5), 6.21 (dd,  $J = 9.3, 5.5$  Hz, 1H, Q-6), 6.15 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1H, Thr2-3), 6.03 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H, But-3), 5.65 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, Deala1-3), 5.60 – 5.53 (m, 2H, Thr2-2/ Thstn2), 5.18 – 5.09 (m, 3H, Q-11/Pip-6/Deala1-3'), 4.79 (dd,  $J = 12.8, 9.1$  Hz, 1H, Cys-4), 4.58 – 4.51 (m, 2H, alpha-Cys/Ala2-2), 4.22 (dd,  $J = 7.5, 3.5$  Hz, 1H, Thr1-2), 4.19 (s, 1H, Q-8), 3.88 (dd,  $J = 13.5, 5.9$  Hz, 1H, Pip-4), 3.62 (q,  $J = 6.2$  Hz, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.47 – 3.40 (m, 2H, Cys-5/Q-7), 3.23 (d,  $J = 17.2$  Hz, 1H, Pip-3), 2.98 (dd,  $J = 12.8, 11.7$  Hz, 1H, Cys-5'), 2.86 – 2.81 (m, 2H, beta-Cys), 2.78 (d,  $J = 4.3$  Hz, 1H, Ile-2), 2.75 – 2.71 (m, 1H, Pip-3'), 2.45 – 2.38 (m, 2H, 1-H<sub>2</sub>), 2.17 – 2.06 (m, 1H, Pip-4'), 1.80 – 1.70 (m, 1H, Ile-3), 1.53 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Thr2-Me), 1.41 (d,  $J = 7.1$  Hz, 4H, But-Me/Thr1-3), 1.39 – 1.35 (m, 2H, 2-H<sub>2</sub>), 1.24 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, Ala2-Me), 1.19 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, Q-11-Me/Ile-4), 1.17 – 1.13 (m, 2H, 3-H<sub>2</sub>), 1.10 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, Thstn-4-Me), 1.04 (s, 24H, 4-H<sub>2</sub>, 5-H<sub>2</sub>, 6-H<sub>2</sub>, 7-H<sub>2</sub>, 8-H<sub>2</sub>, 9-H<sub>2</sub>, 10-H<sub>2</sub>, 11-H<sub>2</sub>, 12-H<sub>2</sub>, 13-H<sub>2</sub>, 14-H<sub>2</sub>, 15-H<sub>2</sub>), 0.99 – 0.94 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn3-Me), 0.93 – 0.84 (m, 1H, Ile-4'), 0.82 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.71 – 0.63 (m, 6H, Ile-4-Me/16-H<sub>3</sub>), 0.60 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H, Thr1-Me).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>85</sub>H<sub>116</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1853.716, gef.: 1853.716.

## Einfach verkürztes Thiostrepton + Glc-SH (32)



Einfach verkürztes Thiostrepton **23** (50 mg, 0.031 mmol) wurde mit dem Natriumsalz der 1-Thio- $\beta$ -D-Glukose (8.2 mg, 0.038 mmol, 1.2 Äquiv.) nach **AV1** zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen *Michael*-Addukt **32** (31 mg, 0.017 mmol, 56 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f$  = 0.48 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R$  = 7.81 min; für [C<sub>75</sub>H<sub>94</sub>N<sub>18</sub>O<sub>22</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1791.52, gef.: 1792.31.

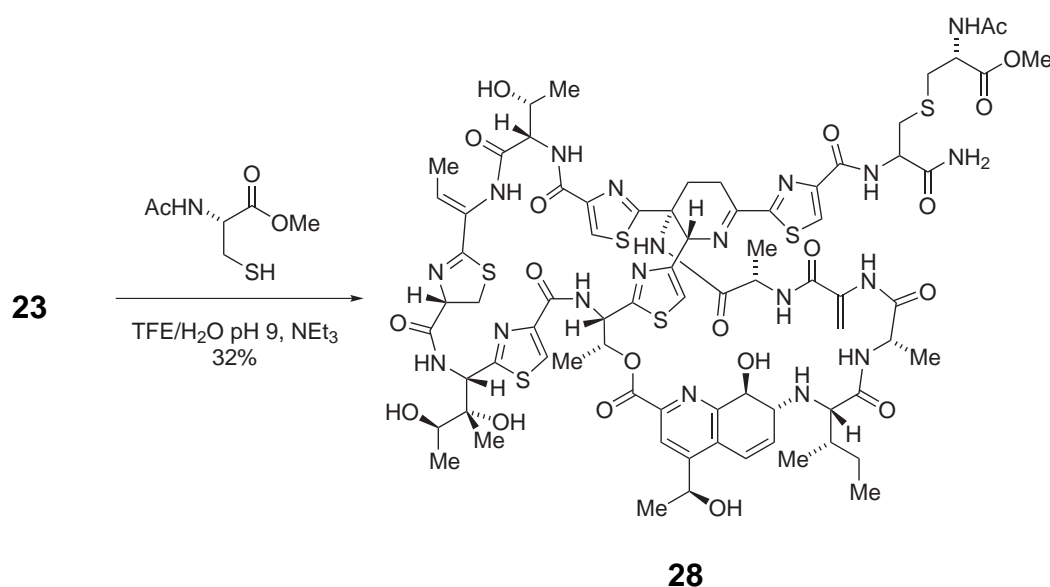
**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.13 (s, 1H, Thz4-5), 8.09 (s, 1H, Thz2-5), 8.02 (s, 1H, Thz1-5), 7.41 (s, 1H, Thz3-5), 7.16 (s, 1H, Q-3), 6.74 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H, Q-5), 6.27 – 6.15 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.07 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, But-3), 5.69 (s, 1H, Deala1-3), 5.64 – 5.56 (m, 2H, Thr2-2/Thstn2), 5.22 – 5.12 (m, 3H, Deala1-3'/Pip-6/Q-11), 4.83 (dd,  $J$  = 12.9, 8.9 Hz, 1H, Cys-4), 4.78 – 4.72 (m, 1H, alpha-Cys), 4.61 – 4.53 (m, 1H, Ala2-2), 4.37 (d,  $J$  = 9.7 Hz, 1H, Glc-1), 4.29 – 4.22 (m, 2H, Thr1-2/Q-8), 3.82 – 3.72 (m, 1H, Glc-6), 3.67 – 3.62 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.58 – 3.51 (m, 2H, Glc-4/Glc-6'),

## 8. Experimenteller Teil

3.50 – 3.44 (m, 2H, Cys-5/Q-7), 3.31 – 3.20 (m, 4H, Pip-3/Glc-2/Glc-3/Glc-5), 3.09 – 2.86 (m, 3H, Cys5'/beta-Cys), 2.82 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H, Ile-2), 2.13 (d,  $J = 13.4$  Hz, 1H, Pip-4'), 1.83 – 1.72 (m, 1H, Ile-3), 1.57 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Thr2-Me), 1.46 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, But-Me), 1.44 – 1.41 (m, 1H, Thr1-3), 1.28 (m, 3H, Ala2-Me), 1.23 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.14 (d,  $J = 6.4$  Hz, 4H, Thstn-4-Me/Ile-4), 1.05 – 0.98 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn3-Me), 0.96 – 0.89 (m, 1H, Ile-4'), 0.85 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.73 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me), 0.66 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H, Thr1-Me).

**HRMS (ESI):** für  $[C_{75}H_{94}N_{18}O_{22}S_6 + H^+]$  ber.: 1791.519, gef.: 1791.520.

### Einfach verkürztes Thiostrepton + NAcCysOMe (**28**)



Einfach verkürztes Thiostrepton **23** (17 mg, 0.011 mmol) wurde mit *N*-Acetyl-Cystein-methylester (3.8 mg, 0.021, 2.0 Äquiv.) nach **AV1** zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen *Michael*-Addukt **28** (6 mg, 0.003 mmol, 32 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.48$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

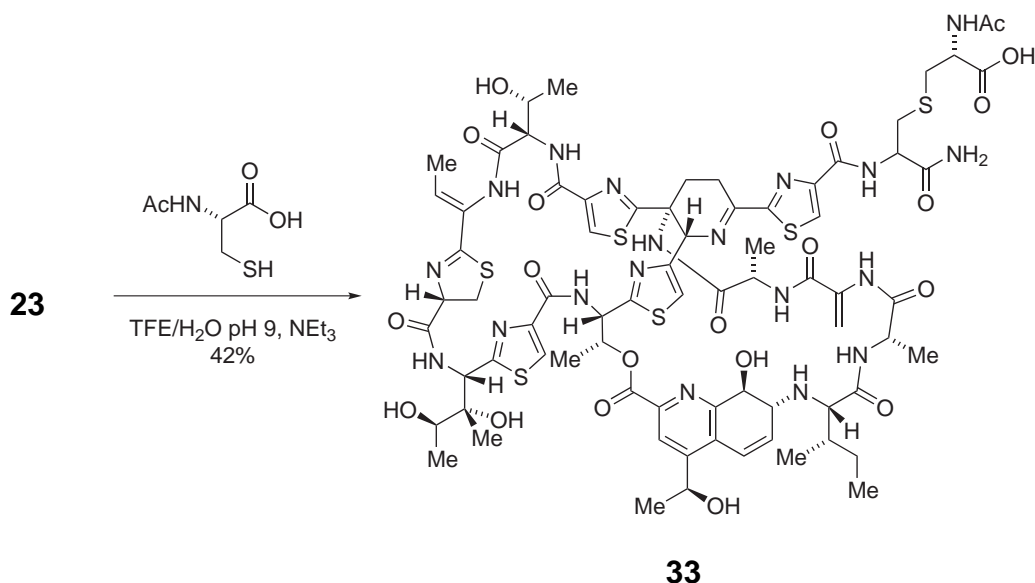
**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 8.02$  min; für  $[C_{75}H_{93}N_{19}O_{20}S_6+H^+]$  ber.: 1772.5, gef.: 1772.5.

**HPLC:** Methode A:  $t_R = 12.5$  min.

**$^1H$ -NMR:** 400 MHz,  $CDCl_3/MeOD$  4:1;  $\delta = 8.08$  (s, 1H, Thz4-5), 8.04 (s, 1H, Thz2-5), 7.98 (s, 1H, Thz1-5), 7.38 (s, 1H, Thz3-5), 7.11 (s, 1H, Q-3), 6.69 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H, Q-5), 6.23 – 6.11 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.03 (q,  $J = 7.5$  Hz, 1H, But-3), 5.64 (s, 1H, Deala1-3), 5.59 – 5.53 (m, 2H, Thr2-2/Thstn2), 5.15 (s, 1H, Deala1-3'), 5.14 – 5.08 (m, 2H, Pip-6/Q-11), 4.79 (dd,  $J = 12.3, 9.1$  Hz, 1H, Cys-4), 4.59 (q,  $J = 6.5$  Hz, 1H, alpha-Cys), 4.56 – 4.50 (m, 2H, alpha-Cys'/Ala2-2), 4.24 – 4.18 (m, 2H, Thr1-2/Q-8), 3.91 – 3.83 (m, 1H, Pip-4), 3.65 – 3.58 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.55 (s, 3H, -OMe), 3.47 – 3.39 (m, 2H, Cys-5/Q-7), 3.27 – 3.18 (m, 1H, Pip-3), 3.02 – 2.94 (m, 1H, Cys-5'), 2.93 – 2.80 (m, 4H, beta-Cys), 2.77 (d,  $J = 4.3$  Hz, 2H, Ile-2/Pip-3'), 2.17 – 2.06 (m, 1H, Pip-4'), 1.84 (s, 3H, Ac), 1.76 – 1.70 (m, 1H, Ile-3), 1.52 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Thr2-Me), 1.41 (d,  $J = 7.1$  Hz, 4H, But-Me/Thr1-3), 1.26 – 1.20 (m, 3H, Ala2-Me), 1.18 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.10 (d,  $J = 6.3$  Hz, 4H, Thstn-4-Me/Ile-4), 0.99 – 0.94 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn3-Me), 0.92 – 0.84 (m, 1H, Ile-4'), 0.81 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.68 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me), 0.60 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, Thr1-Me).

**HRMS (ESI):** für  $[C_{75}H_{93}N_{19}O_{20}S_6+H^+]$  ber.: 1772.524, gef.: 1772.525.

## Einfach verkürztes Thiostrepton + NAcCysOH (33)



Einfach verkürztes Thiostrepton **23** (50 mg, 0.031 mmol) wurde mit *N*-Acetyl-Cystein-methylester (7.7 mg, 0.047 mmol, 1.5 Äquiv.) nach **AV1** zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen *Michael*-Addukt **33** (23 mg, 0.013 mmol, 42 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f$  = 0.48 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R$  = 8.35 min; für [C<sub>74</sub>H<sub>91</sub>N<sub>19</sub>O<sub>20</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1758.5, gef.: 1758.1.

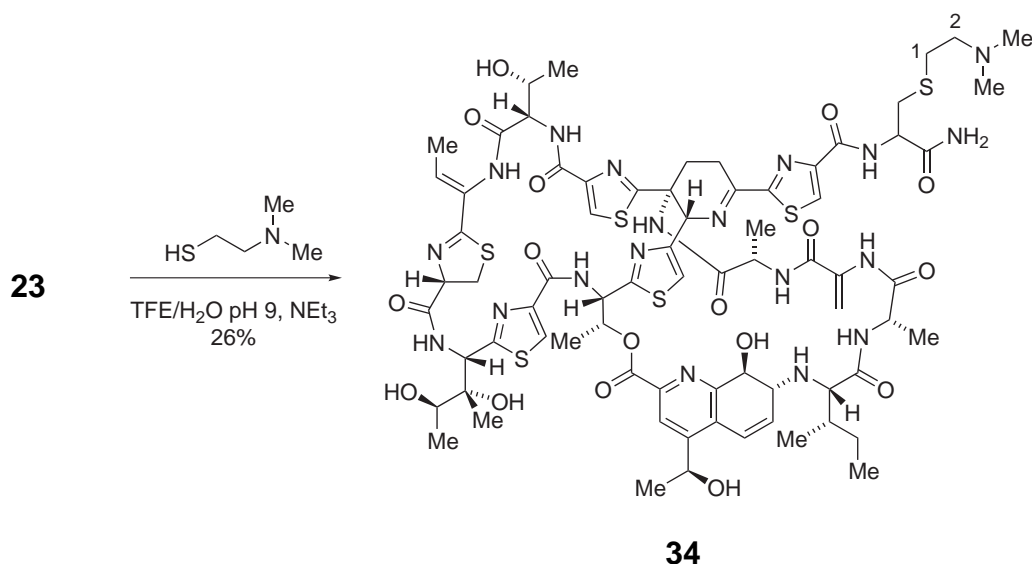
**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.12 (s, 1H, Thz4-5), 8.08 (s, 1H, Thz2-5), 8.01 (s, 1H, Thz1-5), 7.41 (s, 1H, Thz3-5), 7.15 (s, 1H, Q-3), 6.73 (d,  $J$  = 10.2 Hz, 1H, Q-5), 6.28 – 6.15 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.06 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 1H, But-3), 5.68 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, Deala1-3), 5.64 – 5.55 (m, 2H, Thr2-2/Thstn2), 5.18 (s, 1H, Deala1-3'), 5.17 – 5.13 (m, 2H, Pip-6/Q-11), 4.82 (dd,  $J$  = 13.0, 9.0 Hz, 1H, Cys-4), 4.70 – 4.61 (m, 1H, alpha-Cys), 4.61 – 4.52 (m, 2H, alpha-Cys'/Ala2-2), 4.29 – 4.22 (m, 2H, Thr1-2/Q-8), 3.92 – 3.86 (m, 1H, Pip-4), 3.68 – 3.61 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.52 – 3.44 (m, 2H, Cys-5/Q-7),



3.05 – 3.00 (m, 2H, beta-Cys), 2.93 – 2.83 (m, 3H, beta-Cys'/Cys-5'), 2.81 (d,  $J = 4.2$  Hz, 2H, Ile-2/Pip-3'), 2.16 – 2.09 (m, 1H, Pip-4'), 1.89 (s, 3H, Ac), 1.81 – 1.72 (m, 1H, Ile-3), 1.56 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Thr2-Me), 1.45 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, But-Me), 1.43 – 1.39 (m, 1H, Thr1-3), 1.31 – 1.25 (m, 3H, Ala2-Me), 1.23 (d,  $J = 5.9$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.14 (d,  $J = 6.4$  Hz, 4H, Thstn-4-Me/Ile-4), 1.03 – 0.97 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn3-Me), 0.92 (m, 1H, Ile-4'), 0.85 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.72 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me), 0.65 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H, Thr1-Me).

**HRMS (ESI):** für  $[C_{74}H_{91}N_{19}O_{20}S_6 + H^+]$  ber.: 1758.508, gef.: 1758.509.

### Einfach verkürztes Thiostrepton + 2-(Dimethylamino)ethanthiol (**34**)



Einfach verkürztes Thiostrepton **23** (50 mg, 0.031 mmol) wurde mit 2-(Dimethylamino)ethanthiol (5.3 mg, 0.038 mmol, 1.2 Äquiv.) nach **AV1** zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen *Michael*-Addukt **34** (14 mg, 0.008 mmol, 26%) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.48$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

## 8. Experimenteller Teil

---

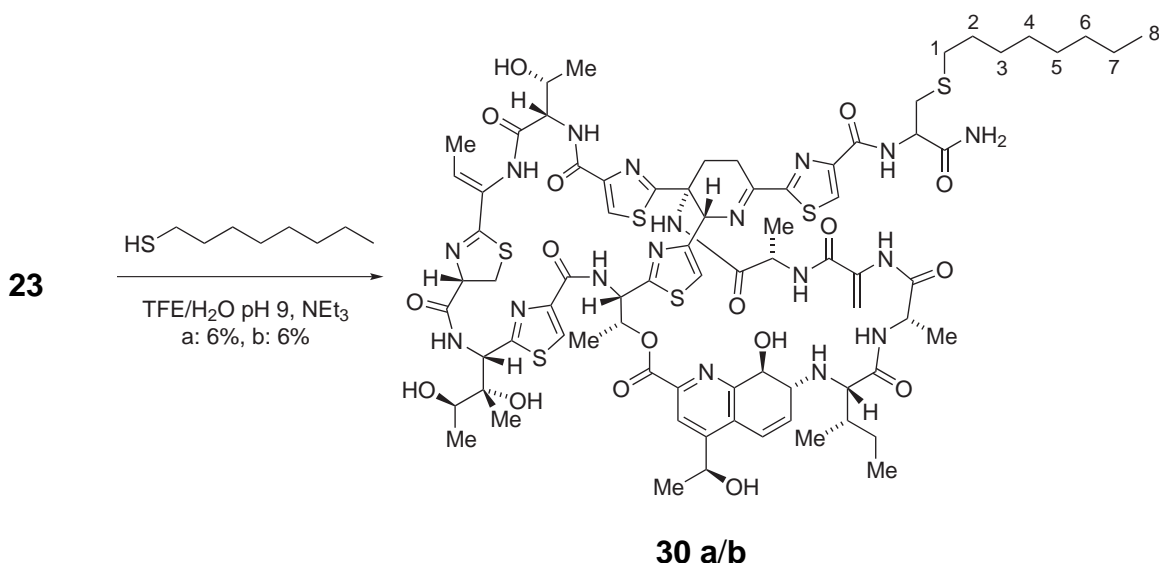
**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 7.00$  min; für  $[C_{73}H_{93}N_{19}O_{17}S_6+H^+]$  ber.: 1700.5, gef.: 1700.3.

**$^1H$ -NMR:** 400 MHz,  $CDCl_3/MeOD$  4:1;  $\delta = 8.13$  (s, 1H, Thz4-5), 8.08 (s, 1H, Thz2-5), 8.02 (s, 1H, Thz1-5), 7.42 (s, 1H, Thz3-5), 7.16 (s, 1H, Q-3), 6.74 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H, Q-5), 6.28 – 6.16 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.07 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H, But-3), 5.69 (s, 1H, Deala1-3), 5.65 – 5.57 (m, 2H, Thr2-2/Thstn2), 5.19 (s, 1H, Deala1-3'), 5.18 – 5.13 (m, 2H, Pip-6/Q-11), 4.83 (dd,  $J = 13.0$  Hz, 8.9, 1H, Cys-4), 4.68 (t,  $J = 6.6$  Hz, 1H, alpha-Cys), 4.61 – 4.52 (m, 1H, Ala2-2), 4.30 – 4.22 (m, 2H, Thr1-2/Q-8), 3.67 – 3.61 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.47 (s, 2H, Cys-5/Q-7), 3.27 (d,  $J = 17.2$  Hz, 1H, Pip-3), 3.06 – 2.98 (m, 1H, Cys-5'), 2.98 – 2.91 (m, 1H, beta-Cys), 2.88 – 2.79 (m, 4H, beta-Cys/Ile-2/1- $H_2$ ), 2.76 (d,  $J = 4.6$  Hz, 3H, Pip-3'/2- $H_2$ ), 2.42 (d,  $J = 5.5$  Hz, 6H, NMe), 2.21 – 2.08 (m, 1H, Pip4'), 1.82 – 1.73 (m, 1H, Ile-3), 1.57 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Thr2-Me), 1.46 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, But-Me), 1.43 – 1.40 (m, 1H, Thr1-3), 1.31 – 1.26 (m, 3H, Ala2-Me), 1.23 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.14 (d,  $J = 6.4$  Hz, 4H, Thstn-4-Me/Ile-4), 1.04 – 1.01 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn3-Me), 0.98 – 0.89 (m, 1H, Ile-4'), 0.85 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.73 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me), 0.65 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, Thr1-Me).

**$^{13}C$ -NMR:** 125.7 MHz,  $CDCl_3/MeOD$  4:1;  $\delta = 173.4, 173.2, 172.2, 171.9, 170.1, 169.6, 168.8, 168.7, 168.5, 166.3, 165.4, 162.8, 162.1, 162.0, 161.9, 161.7, 161.6, 161.2, 161.1, 160.6, 157.1, 154.4, 153.4, 145.0, 149.9, 149.2, 146.2, 143.4, 132.6, 132.1, 130.0, 128.3, 127.1, 123.1, 117.3, 115.0, 103.0, 78.8, 71.9, 67.6, 67.3, 66.3, 65.4, 64.4, 64.0, 58.9, 57.4, 56.7, 55.7, 55.6, 55.5, 52.9, 51.8, 51.5, 51.5, 49.3, 42.4, 38.3, 34.9, 34.7, 29.0, 25.6, 24.2, 22.5, 18.9, 18.8, 18.7, 18.1, 15.8, 15.5, 15.2, 11.3.$

**HRMS (ESI):** für  $[C_{73}H_{93}N_{19}O_{17}S_6+H^+]$  ber.: 1700.539, gef.: 1700.541.

## Einfach verkürztes Thioestrepton + 1-Octanthiol (30a/b)



Einfach verkürztes Thioestrepton **23** (108 mg, 0.068 mmol) wurde mit 1-Octanthiol (17  $\mu$ L, 0.101 mmol, 1.5 Äquiv.) nach **AV1** zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen ein Isomerengemisch des *Michael*-Addukts **30** (25 mg, 0.014 mmol, 21 %) als farbloser Feststoff erhalten. Nach wiederholter HPLC-Reinigung konnten jeweils 6% der beiden Isomere isoliert werden (**30 a/b**).

**Isomer 30a:**

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f$  = 0.48 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R$  = 10.49 min; für [C<sub>77</sub>H<sub>101</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1741.6, gef.: 1741.1.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.12 (s, 1H, Thz4-5), 8.08 (s, 1H, Thz2-5), 8.02 (s, 1H, Thz1-5), 7.41 (s, 1H, Thz3-5), 7.15 (s, 1H, Q-3), 6.73 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H, Q-5), 6.27 – 6.15 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.06 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, But-3), 5.68 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, Deala1-3), 5.61 – 5.57 (m, 2H, Thr2-2/Thstn2), 5.19 (s, 1H, Deala1-3'),

## 8. Experimenteller Teil

---

5.17 – 5.13 (m, 2H, Pip-6/Q-11), 4.82 (dd,  $J = 12.0, 8.5$  Hz, 1H, Cys-4), 4.61 – 4.54 (m, 2H, alpha-Cys/Ala2-2), 4.26 (dd,  $J = 7.5, 3.9$  Hz, 1H, Thr1-2), 4.24 – 4.21 (m, 1H, Q-8), 3.94 – 3.87 (m, 1H, Pip-4), 3.68 – 3.59 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.49 – 3.43 (m, 2H, Cys-5/Q-7), 3.36 – 3.33 (m, 1H, Pip-3), 3.04 – 2.98 (m, 1H, Cys-5'), 2.87 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H, beta-Cys), 2.85 – 2.79 (m, 1H, Ile-2), 2.79 – 2.71 (m, 1H, Pip-3'), 2.51 – 2.44 (m, 2H, 1-H<sub>2</sub>), 2.20 – 2.09 (m, 1H, Pip-4'), 1.80 – 1.74 (m, 1H, Ile-3), 1.56 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, Thr2-Me), 1.48 – 1.41 (m, 6H, But-Me/Thr1-3/2-H<sub>2</sub>), 1.31 – 1.25 (m, 5H, Ala2-Me/3-H<sub>2</sub>), 1.23 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.18 – 1.07 (m, 12H, Ile-4/Thstn-4-Me/4-H<sub>2</sub>/5-H<sub>2</sub>/6-H<sub>2</sub>/7-H<sub>2</sub>), 1.03 – 0.96 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn3-Me), 0.96 – 0.88 (m, 1H, Ile-4'), 0.85 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.71 (m, 6H, Ile-4-Me/8-H<sub>3</sub>), 0.64 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, Thr1-Me).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>77</sub>H<sub>101</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1741.591, gef.: 1741.592.

**Isomer 30b:**

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.48$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

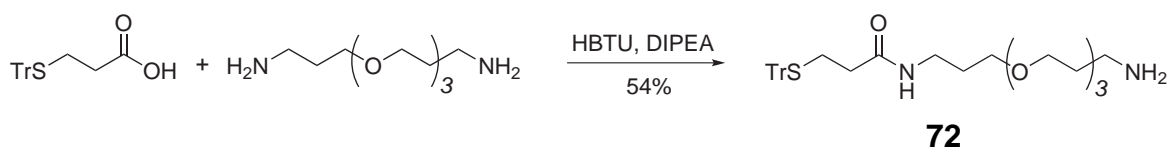
**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 10.96$  min; für [C<sub>77</sub>H<sub>101</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1741.6, gef.: 1741.1.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta = 8.12$  (s, 1H, Thz4-5), 8.08 (s, 1H, Thz2-5), 8.02 (s, 1H, Thz1-5), 7.41 (s, 1H, Thz3-5), 7.15 (s, 1H, Q-3), 6.73 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H, Q-5), 6.27 – 6.16 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.06 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H, But-3), 5.68 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H, Deala1-3), 5.64 – 5.56 (m, 2H, Thr2-2/Thstn2), 5.18 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H, Deala1-3'), 5.17 – 5.13 (m,  $J = 6.5$  Hz, 2H, Pip-6/Q-11), 4.82 (dd,  $J = 12.9$  Hz, 9.0, 1H, Cys-4), 4.61 – 4.53 (m, 2H, alpha-Cys/Ala2-2), 4.25 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, Thr1-2/Q8), 3.94 – 3.88 (m, 1H, Pip-4), 3.68 – 3.61 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.52 – 3.44 (m, 2H, Cys-5/Q-7), 3.26 (dd,  $J = 18.3, 5.1$  Hz, 1H, Pip-3), 3.05 – 2.97 (m, 1H, Cys-5'), 2.87 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H, beta-Cys), 2.81 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H, Ile-2), 2.79 – 2.71 (m, 1H, Pip-3'), 2.52 – 2.40 (m, 2H, 1-H<sub>2</sub>), 2.19 – 2.09 (m, 1H, Pip-4'), 1.81 – 1.73 (m, 1H, Ile-3), 1.56 (d,  $J =$

6.5 Hz, 3H, Thr2-Me), 1.49 – 1.39 (m, 6H, But-Me/Thr1-3/2-H<sub>2</sub>), 1.27 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, Ala2-Me), 1.23 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, Q-11-Me), 1.20 – 1.17 (m, 2H, 3-H<sub>2</sub>), 1.14 (d, *J* = 6.4 Hz, 4H, Ile-4/Thstn-4-Me), 1.11 – 1.06 (m, 8H, 4-H<sub>2</sub>/5-H<sub>2</sub>/6-H<sub>2</sub>/7-H<sub>2</sub>), 1.04 – 0.98 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn3-Me), 0.97 – 0.88 (m, 1H, Ile-4'), 0.85 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.76 – 0.67 (m, 6H, Ile-4-Me/8-H<sub>3</sub>), 0.65 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, Thr1-Me).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>77</sub>H<sub>101</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1741.591, gef.: 1741.592.

**N-3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl-β-(tritylthio)propionamid (72)**



Zu einer Lösung von S-Tr-1-Mercaptopropionsäure (697 mg, 2.0 mmol) und HBTU (1.52 g, 4.0 mmol, 2.0 Äquiv.) in DMF (20 mL) wurde DIPEA (349 µL, 2.0 mmol, 1.0 Äquiv.) bei 0°C hinzugegeben. Nach 10 min wurde die Reaktionsmischung langsam zu einer Lösung aus 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin (4.38 mL, 20 mmol, 10 Äquiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) getropft und 14 h bei RT gerührt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde der Überstand in Ethylacetat (100 mL) aufgenommen und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (60 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 x 30 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedunstet. Nach Kieselgelchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 95:5) wurde Amin **72** als farbloses Öl (601 mg, 1.09 mmol, 54 %) erhalten.

**DC:** *R<sub>f</sub>* = 0.28 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I: *t<sub>R</sub>* = 6.98 min; für [C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S+H<sup>+</sup>] ber.: 551.3, gef.: 551.1.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 7.41 – 7.37 (m, 6H, Tr), 7.31 – 7.25 (m, 6H, Tr), 7.24 – 7.18 (m, 3H, Tr), 3.73 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.66 – 3.51 (m, 8H, 2x OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.41 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.24 – 3.14 (m, 4H, CONHCH<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.44 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, SCH<sub>2</sub>), 2.11 (t, *J* = 7.1

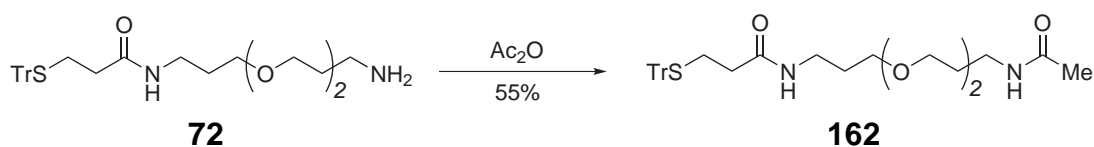
## 8. Experimenteller Teil

H<sub>z</sub>, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.93 – 1.85 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 1.69 – 1.61 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O).

**<sup>13</sup>C-NMR:** 100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>; δ = 172.8 (CONH), 144.8 (Tr), 129.7 (Tr), 128.1 (Tr), 126.9 (Tr), 71.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 70.4, 69.6, 69.5, 69.3 (2x OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 68.0 (CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 67.0 (Tr), 41.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 36.7 (CONHCH<sub>2</sub>), 35.3 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29.6 (CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 27.7 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S+H<sup>+</sup>] ber.: 551.294, gef.: 551.293.

### N-(2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azahexadecan-16-yl)-3-(tritylthio)propanamid (162)



Amin **72** (200 mg, 0.363 mmol) wurde in Dichlormethan (30 mL) gelöst und unter Rühren mit Et<sub>3</sub>N (100 µL, 0.726 mmol, 2 Äquiv.), Essigsäureanhydrid (138 µL, 1.452 mmol, 4 Äquiv.) gefolgt von Dimethylaminopyridin (13 mg, 0.109 mmol, 0.3 Äquiv.) versetzt. Nach vollständigem Reaktionsumsatz (22 h) wurde die Reaktionsmischung mit 5%-iger Zitronensäure (20 mL) gewaschen, und die wässrige Phase mit Dichlormethan zweifach extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Kieselgelchromatographie des Rückstands (5–7% MeOH in Dichlormethan) wurde das acetylierte Produkt **162** (119 mg, 0.201 mmol, 55%) als farbloses Öl erhalten.

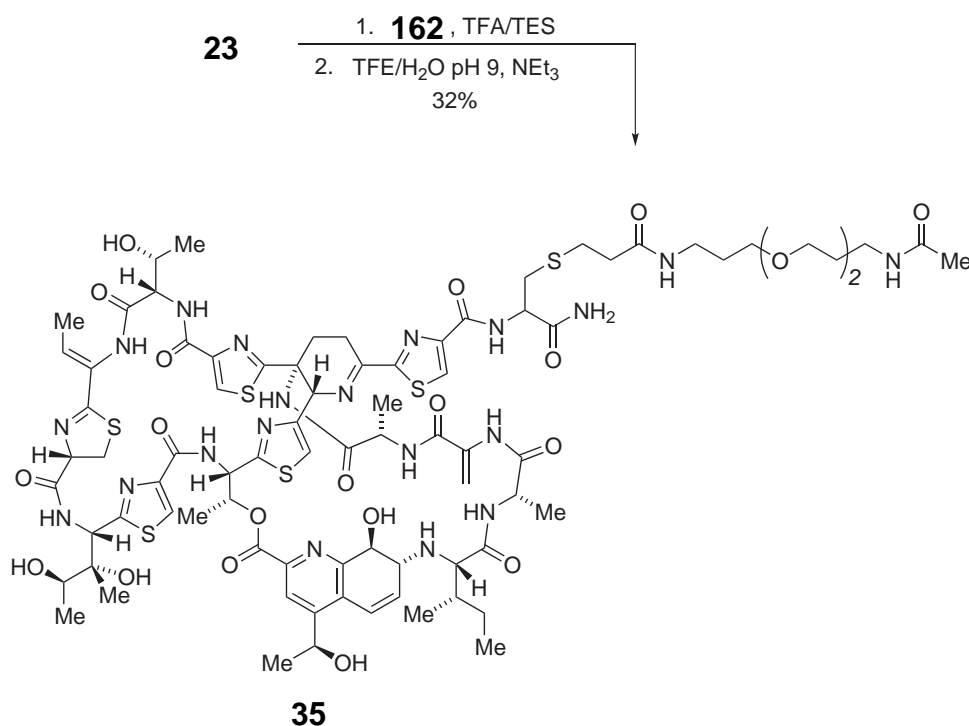
**DC:**  $R_f = 0.56$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 9.65$  min; für [C<sub>34</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S<sub>1</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 593.3, gef. 592.9.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1; δ = 7.43 – 7.38 (m, 6H, Tr), 7.30 – 7.26 (m, 4H, Tr), 7.26 – 7.23 (m, 2H, Tr), 7.23 – 7.16 (m, 3H, Tr), 6.30 (s, 1H, NH(CO)CH<sub>3</sub>), 6.05 (s, 1H, (CO)NHCH<sub>2</sub>), 3.63 – 3.49 (m, 12H, (CO)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH(CO)CH<sub>3</sub>), 3.35 – 3.25 (m, 4H, (CO)NHCH<sub>2</sub> / CH<sub>2</sub>NH(CO)CH<sub>3</sub>),

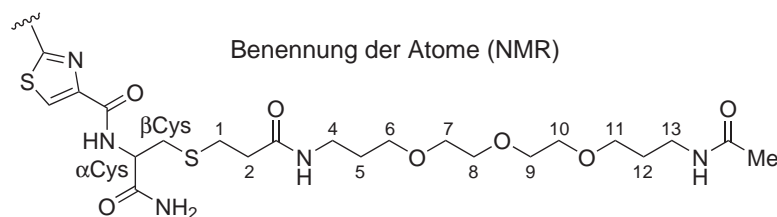
2.47 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, SCH<sub>2</sub>), 2.08 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.92 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 1.78 – 1.69 (m, 4H, (CO)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> / OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH(CO)CH<sub>3</sub>).

### Einfach verkürztes Thioestrepton + PEG-NHAc (35)



S-Trityl-geschütztes PEG-NHAc **162** (22 mg, 0.037 mmol, 1.2 Äquiv.) wurde in CHCl<sub>3</sub> (3 mL) gelöst und mit Et<sub>3</sub>SiH (6 µL, 0.037 mmol, 1.2 Äquiv.) versetzt. Nach Zugabe von TFA (240 µL) wurde die Reaktionsmischung für 20 min gerührt, die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und mit Toluol (3 x 3 mL) eingengt. Der Rückstand wurde in TFE (6 mL) und Natriumphosphatpuffer (2 mL, 50 mM, pH9) gelöst. Einfach verkürztes Thioestrepton **23** (50 mg, 0.031 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde hinzugefügt, gefolgt von Et<sub>3</sub>N (44 µL, 0.313 mmol, 10 Äquiv.). Die Reaktionsmischung wurde für 16 h bei RT in einer Ar-Atmosphäre gerührt, im Vakuum konzentriert, und mittels präparativer HPLC (C<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) gereinigt. Das PEG-Thioestreptonaddukt **35** konnte als farbloser Feststoff (23 mg, 0.010 mmol, 32 %) erhalten werden.

## 8. Experimenteller Teil



**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f$  = 0.13 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R$  = 7.16 min; für [C<sub>84</sub>H<sub>112</sub>N<sub>20</sub>O<sub>22</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1945.67, gef. 1945.03.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.11 (s, 1H, Thz4-5), 8.07 (s, 1H, Thz2-5), 8.01 (s, 1H, Thz1-5), 7.40 (s, 1H, Thz3-5), 7.14 (s, 1H, Q-3), 6.72 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H, Q-5), 6.26 – 6.14 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.05 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, But-3), 5.67 (s, 1H, Deala1-3), 5.62 – 5.55 (m, 2H, Thr2-2/Thstn-2), 5.20 – 5.11 (m, 3H, Deala1-3'/Q-11/Pip-6), 4.81 (dd,  $J$  = 12.9, 9.0 Hz, 1H, Cys-4), 4.68 – 4.61 (m, 1H, alpha-Cys), 4.56 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 1H, Ala2-2), 4.28 – 4.20 (m, 2H, Q-8/Thr1-2), 3.89 (d,  $J$  = 13.3 Hz, 1H, Pip-4), 3.67 – 3.60 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.51 – 3.40 (m, 10H, Cys-5/Q-7/7-H<sub>2</sub>/8-H<sub>2</sub>/9-H<sub>2</sub>/10-H<sub>2</sub>), 3.39 – 3.32 (m, 4H, 6-H<sub>2</sub>/11-H<sub>2</sub>), 3.14 – 3.06 (m, 4H, 4-H<sub>2</sub>/13-H<sub>2</sub>), 3.04 – 2.95 (m, 1H, Cys-5'), 2.90 – 2.66 (m, 6H, beta-Cys/Ile-2/1-H<sub>2</sub>/Pip-3'), 2.43 – 2.26 (m, 2H, 2-H<sub>2</sub>), 2.17 – 2.08 (m, 1H, Pip-4'), 1.76 (s, 4H, Ac-Me/Ile-3), 1.65 – 1.52 (m, 7H, 5-H<sub>2</sub>/12-H<sub>2</sub>/Thr2-Me), 1.44 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 4H, Thr1-3/But-Me), 1.26 (dd,  $J$  = 6.4, 3.0 Hz, 3H, Ala2-Me), 1.22 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, Q-11-Me), 1.13 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 4H, Ile-4/Thstn-4-Me), 1.03 – 0.97 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn-3-Me), 0.96 – 0.88 (m, 1H, Ile-4'), 0.84 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.71 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H, Ile-5), 0.64 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 3H, Thr1-Me).

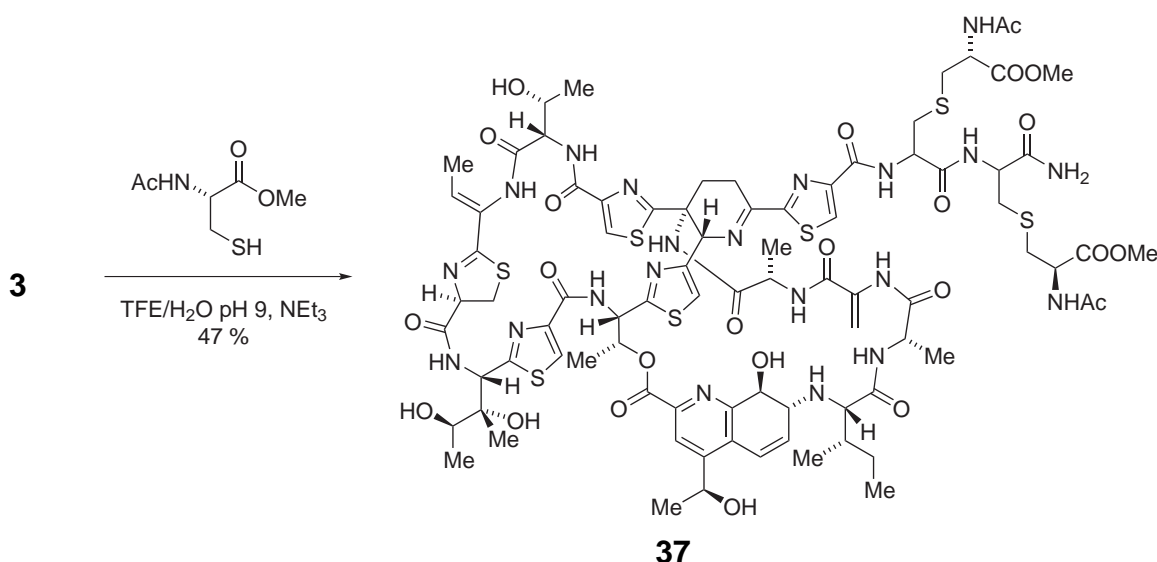
**HRMS (ESI):** für [C<sub>84</sub>H<sub>112</sub>N<sub>20</sub>O<sub>22</sub>S<sub>6</sub>+2H<sup>+</sup>] ber.: 973.336, gef. 973.338.



### 8.3.3. Mehrfach-Sulfa-Michael-Additionen an Thiostrepton

#### Thiostrepton + 2 NAcCysOMe (37)

Thiostrepton **3** (100 mg, 0.060 mmol) wurde mit *L*-*N*-Acetyl-Cysteinmethylester (53 mg, 0.300, 5.0 Äquiv.) nach AV1 zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen *Michael*-Addukt **37** (57 mg, 0.028 mmol, 47 %) als farbloser Feststoff erhalten.



**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.19$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 7.97$  min; für [C<sub>84</sub>H<sub>107</sub>N<sub>21</sub>O<sub>24</sub>S<sub>7</sub>+2H<sup>+</sup>] ber.: 1009,8, gef. 1009.8.

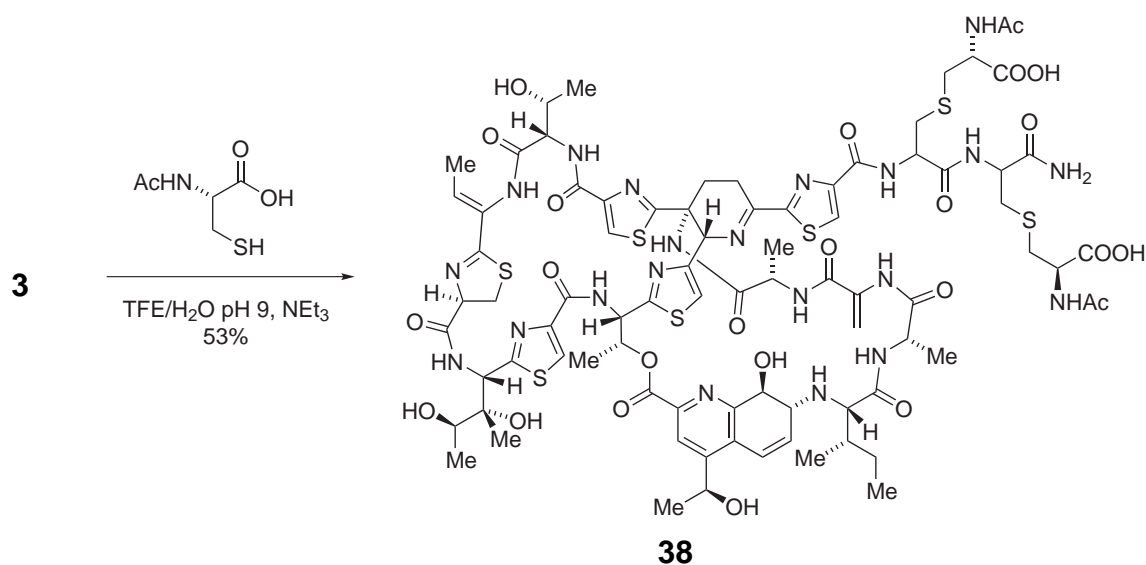
**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta = 8.15$  (s, 1H, Thz4-5), 8.12 (s, 1H, Thz2-5), 8.04 (s, 1H, Thz1-5), 7.43 (s, 1H, Thz3-5), 7.18 (s, 1H, Q-3), 6.76 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H, Q-5), 6.32 – 6.18 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.09 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H, But-3), 5.71 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, Deala1-3), 5.63 (t,  $J = 9.0$  Hz, 2H, Thr2-2/Thstn2), 5.19 (d,  $J = 9.6$  Hz, 3H, Deala1-3'/Q-11/Pip-6), 4.84 (dd,  $J = 13.0, 8.9$  Hz, 1H, Cys-4), 4.76 – 4.41 (m, 5H, Ala2-2/4x alpha-Cys), 4.29 (m, 2H, Thr1-2/Q-8), 3.71 – 3.65 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.64 – 3.59

## 8. Experimenteller Teil

(m, 6H, 2x OMe), 3.53 – 3.47 (m, 1H, Cys-5), 3.28 (d,  $J = 17.8$  Hz, 1H, Pip-3), 3.07 – 3.00 (m, 1H, Cys-5'), 2.84 (m, 10H, Ile-2/Pip-3'/4x beta-Cys), 2.17 (m, 1H, Pip-4), 1.92 (m, 6H, 2x Ac-Me), 1.83 – 1.75 (m, 1H, Ile-3), 1.59 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Thr2-Me), 1.48 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, But-Me), 1.45 – 1.41 (m, 1H, Thr1-3), 1.32 – 1.27 (m, 3H, Ala2-Me), 1.25 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.21 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, Ile-4), 1.17 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, Thstn-4-Me), 1.07 – 1.00 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn-3-Me), 0.99 – 0.91 (m, 1H, Ile-4'), 0.87 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.75 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me), 0.68 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, Thr1-Me).

**HRMS (ESI):** für  $[C_{84}H_{107}N_{21}O_{24}S_7+H^+]$  ber.: 2018.592, gef.: 2018.591.

### Thiostrepton + 2 NAcCysOH (38)



Thiostrepton **3** (50 mg, 0.030 mmol) wurde mit L-N-Acetyl-Cystein (15 mg, 0.090 mmol, 3.0 Äquiv.) nach **AV1** zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen *Michael*-Addukt **38** (32 mg, 0.016 mmol, 53 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

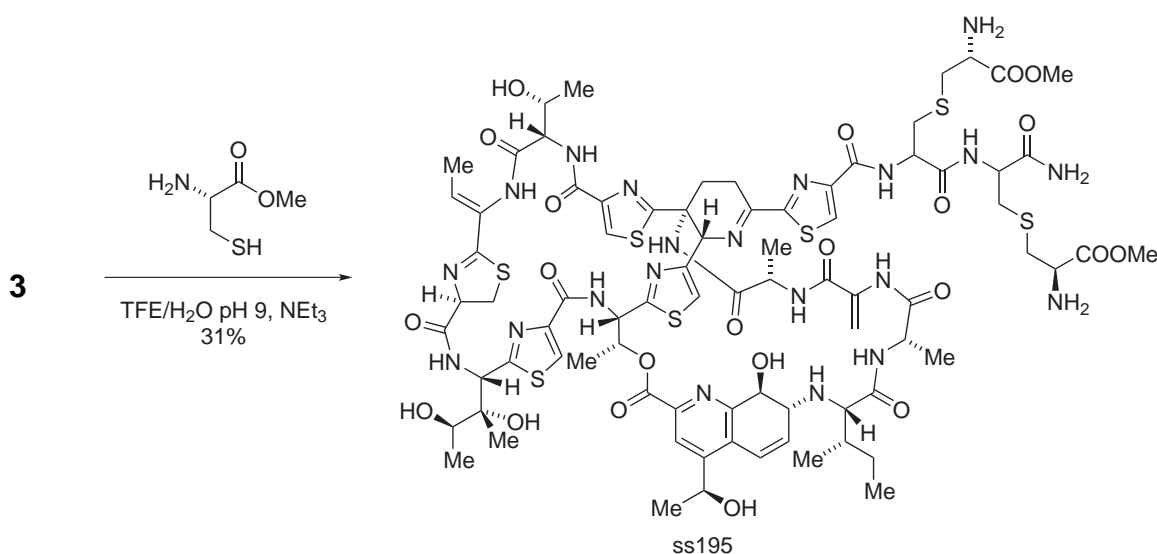
**DC:**  $R_f = 0.07$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1 + 2 % Ameisensäure).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 7.94$  min; für  $[C_{82}H_{103}N_{21}O_{24}S_7+H^+]$  ber.: 1990.6, gef.: 1990.1.

**$^1H$ -NMR:** 400 MHz,  $CDCl_3/MeOD$  4:1;  $\delta = 8.12$  (s, 1H, Thz4-5), 8.09 (dd,  $J = 5.3, 2.0$  Hz, 1H, Thz2-5), 8.01 (s, 1H, Thz1-5), 7.40 (s, 1H, Thz3-5), 7.15 (s, 1H, Q-3), 6.73 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H, Q-5), 6.26 – 6.16 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.06 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H, But-3), 5.67 (s, 1H, Deala1-3), 5.64 – 5.57 (m, 2H, Thr2-2/Thstn2), 5.21 – 5.12 (m, 3H, Deala1-3'/Q-11/Pip-6), 4.82 (dd,  $J = 12.7, 8.7$  Hz, 1H, Cys-4), 4.74 – 4.64 (m, 1H, 1x alpha-Cys), 4.57 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1H, Ala2-2), 4.51 – 4.39 (m, 3H, 3x alpha-Cys), 4.29 – 4.24 (m, 2H, Thr1-2/Q-8), 3.69 – 3.61 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.52 – 3.44 (m, 2H, Cys-5/Q-7), 3.05 – 2.83 (m, 9H, Cys-5'/4x beta-Cys), 2.81 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, Ile-2), 2.78 – 2.70 (m, 1H, Pip-3), 2.14 (t,  $J = 12.8$  Hz, 1H, Pip-4'), 1.92 – 1.84 (m, 6H, 2x Ac-Me), 1.79 – 1.69 (m, 1H, Ile-3), 1.57 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Thr2-Me), 1.46 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, But-Me), 1.39 (br s, 1H, Thr1-3), 1.28 (dd,  $J = 6.2, 3.1$  Hz, 3H, Ala2-Me), 1.22 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.18 – 1.11 (m, 4H, Thstn-4-Me/Ile-4), 1.05 – 0.97 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn-3-Me), 0.97 – 0.88 (m, 1H, Ile-4'), 0.84 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.73 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me), 0.67 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H, Thr-1-Me).

**HRMS (ESI):** für  $[C_{82}H_{103}N_{21}O_{24}S_7+H^+]$  ber.: 1990.560, gef.: 1990.560.

### Thiostrepton + 2 CysOMe (39)



## 8. Experimenteller Teil

---

Thiostrepton **3** (50 mg, 0.030 mmol) wurde mit L-Cysteinmethylester (13 mg, 0.075 mmol, 2.5 Äquiv.) nach **AV1** zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen *Michael*-Addukt **39** (18 mg, 0.009 mmol, 31 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

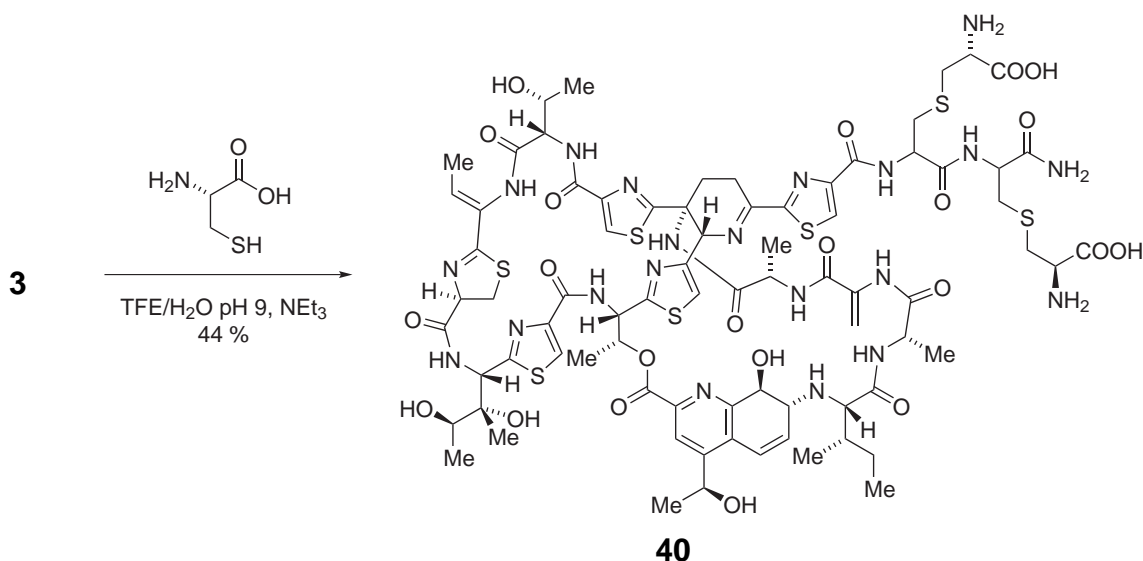
**DC:**  $R_f$  = 0.06 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R$  = 6.08 min; für [C<sub>80</sub>H<sub>103</sub>N<sub>21</sub>O<sub>22</sub>S<sub>7</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1934.6, gef.: 1934.1.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.09 (s, 1H, Thz4-5), 8.07 – 8.04 (m, 1H, Thz2-5), 7.99 (s, 1H, Thz1-5), 7.39 (s, 1H, Thz3-5), 7.12 (s, 1H, Q-3), 6.70 (d,  $J$  = 10.2 Hz, 1H, Q-5), 6.25 – 6.11 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.03 (q,  $J$  = 6.4 Hz, 1H, But-3), 5.65 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, Deala1-3), 5.60 – 5.53 (m, 2H, Thr2-2/Thstn2), 5.18 – 5.09 (m, 3H, Deala1-3'/Q-11/Pip-6), 4.79 (dd,  $J$  = 12.5, 9.1 Hz, 1H, Cys-4), 4.70 – 4.58 (m, 2H, 2x beta-Cys), 4.57 – 4.50 (m, 1H, Ala2-2), 4.47 – 4.41 (m, 2H, 2x beta-Cys), 4.25 – 4.18 (m, 2H, Thr1-2/Q-8), 3.88 (dd,  $J$  = 12.7, 5.1 Hz, 1H, Pip-4), 3.66 – 3.53 (m, 8H, Ala1-2/Thstn-4/2x OMe), 3.48 – 3.40 (m, 2H, Cys-5/Q-7), 3.22 (d,  $J$  = 18.8 Hz, 1H, Pip-3), 2.98 (dd,  $J$  = 12.6, 11.7 Hz, 1H, Cys-5'), 2.78 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 10H, Ile-2/Pip-3'/4x beta-Cys), 2.12 (dd,  $J$  = 16.6, 11.0 Hz, 1H, Pip-4'), 1.78 – 1.69 (m, 1H, Ile-3), 1.53 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, Thr2-Me), 1.42 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 4H, But-Me/Thr1-3), 1.23 (dd,  $J$  = 6.4, 2.9 Hz, 3H, Ala2-Me), 1.19 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, Q-11-Me), 1.10 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 4H, Thstn-4-Me/Ile-4), 1.00 – 0.94 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn-3-Me), 0.92 – 0.85 (m, 1H, Ile-4'), 0.81 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.69 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H, Ile-4-Me), 0.61 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, Thr1-Me).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>80</sub>H<sub>103</sub>N<sub>21</sub>O<sub>22</sub>S<sub>7</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1934.570, gef.: 1934.570.

## Thiostrepton + 2 Cys (40)



Thiostrepton **3** (100 mg, 0.060 mmol) wurde mit L-Cystein x HCl x H<sub>2</sub>O (32 mg, 0.180 mmol, 3.0 Äquiv.) nach **AV1** zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen *Michael*-Addukt **40** (51 mg, 0.027 mmol, 44 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f$  = 0.19 (EtOAc / [EtOAc/AcOH/MeOH/H<sub>2</sub>O 3/3/3/2] 9:1).

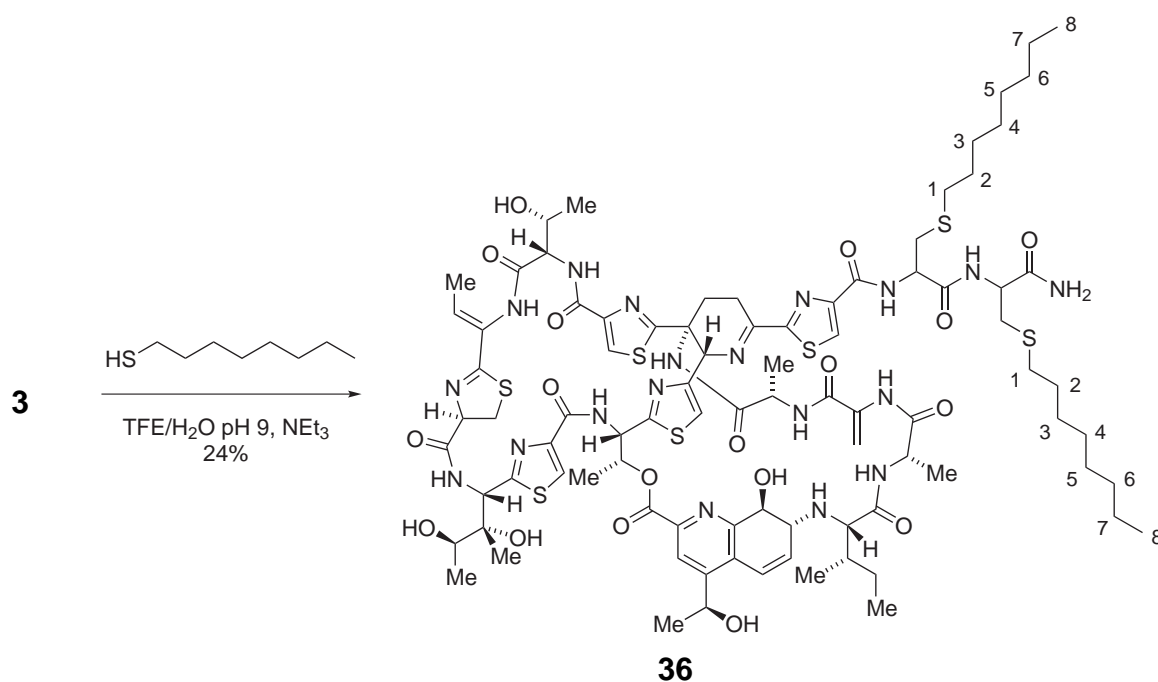
**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R$  = 6.87 min; für [C<sub>78</sub>H<sub>99</sub>N<sub>21</sub>O<sub>22</sub>S<sub>7</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1906.5, gef.: 1906.1.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.10 (s, 2H), 8.00 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.71 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H, Q-5), 6.20 (s, 2H), 6.04 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H, But-3), 5.74 – 5.53 (m, 3H), 5.13 (s, 3H), 4.80 (t,  $J$  = 10.3 Hz, 1H, Cys-4), 4.55 (s, 5H), 3.87 (s, 1H, Pip-4), 3.63 (s, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.44 (s, 2H, Q-7/Cys-5), 2.98 (s, 1H, Cys-5'), 2.84 – 2.68 (m, 10H, beta-Cys/Ile-2/Pip-3), 2.20 – 2.06 (m, 1H, Ile-3), 1.72 (s, 1H, Thr2-Me), 1.53 (s, 3H, But-Me), 1.43 (s, 3H), 1.29 – 0.88 (m, 17H), 0.81 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.74 – 0.55 (m, 6H).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>78</sub>H<sub>99</sub>N<sub>21</sub>O<sub>22</sub>S<sub>7</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1906.539, gef.: 1906.539.

## 8. Experimenteller Teil

### Thiostrepton + 2 Octanthiol (36)



Thiostrepton **3** (50 mg, 0.030 mmol) wurde mit 1-Octanthiol (11  $\mu$ L, 0.066 mmol, 2.2 Äquiv.) nach **AV1** zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen *Michael*-Addukt **36** (14 mg, 0.007 mmol, 24 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f$  = 0.19 (EtOAc / [EtOAc/AcOH/MeOH/H<sub>2</sub>O 3/3/3/2] 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R$  = 12.77/13.27 min; für [C<sub>88</sub>H<sub>121</sub>N<sub>19</sub>O<sub>18</sub>S<sub>7</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1956.7, gef.: 1956.3.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.08 (s, 1H, Thz4-5), 8.03 (s, 1H, Thz2-5), 7.98 (s, 1H, Thz1-5), 7.38 (s, 1H, Thz3-5), 7.11 (s, 1H, Q-3), 6.69 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H, Q-5), 6.20 (dd,  $J$  = 9.8, 5.7 Hz, 1H, Q-6), 6.17 – 6.11 (m, 1H, Thr2-3), 6.03 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, But-3), 5.64 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, Deala1-3), 5.59 – 5.52 (m, 2H, Thr2-2/Thstn2), 5.18 – 5.10 (m, 3H, Deala1-3'/Q-11/Pip-6), 4.78 (dd,  $J$  = 13.0, 9.3 Hz, 1H, Cys-4), 4.57

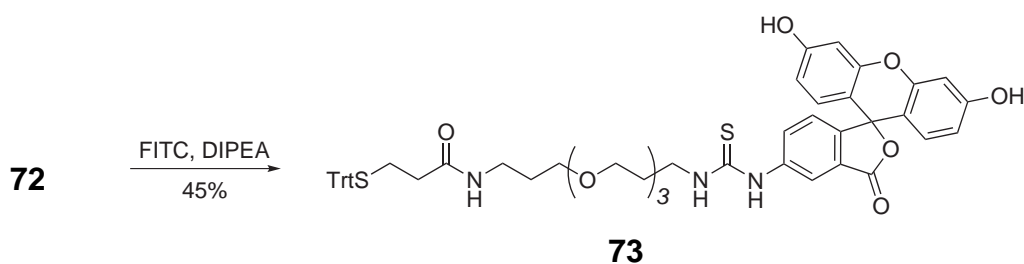
– 4.45 (m, 2H, Ala2-2/alpha-Cys), 4.40 – 4.34 (m, 1H, alpha-Cys), 4.21 (dd,  $J = 7.5$ , 3.6 Hz, 1H, Thr1-2), 4.18 (s, 1H, Q-8), 3.88 (dd,  $J = 12.9$ , 6.2 Hz, 1H, Pip-4), 3.65 – 3.58 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.47 – 3.39 (m, 2H, Q-7/Cys-5), 3.22 (d,  $J = 15.1$  Hz, 1H, Pip-3), 2.98 (t,  $J = 12.1$  Hz, 1H, Cys-5'), 2.93 – 2.79 (m, 2H, beta-Cys), 2.77 (d,  $J = 4.2$  Hz, 1H, Ile-2), 2.72 – 2.65 (m, 3H, beta-Cys/Pip-3'), 2.42 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, 1x 1-H<sub>2</sub>), 2.39 – 2.33 (m, 2H, 1x 1-H<sub>2</sub>), 2.17 – 2.05 (m, 1H, Pip-4'), 1.79 – 1.69 (m, 1H, Ile-3), 1.52 (d,  $J = 5.2$  Hz, 3H, Thr2-Me), 1.41 (d,  $J = 7.3$  Hz, 6H, But-Me/Thr1-Me/1x 2-H<sub>2</sub>), 1.38 – 1.33 (m, 2H, 1x 2-H<sub>2</sub>), 1.23 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Ala2-Me), 1.19 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.16 – 1.13 (m, 4H, 2x 3-H<sub>2</sub>), 1.11 – 1.00 (m, 20H, Thstn-4-Me/Ile-4/2x 4-H<sub>2</sub>/5-H<sub>2</sub>/6-H<sub>2</sub>/7-H<sub>2</sub>), 0.98 – 0.93 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn-3-Me), 0.92 – 0.84 (m, 1H, Ile-4'), 0.81 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.70 – 0.62 (m, 9H, Ile-4-Me/2x 8-H<sub>3</sub>), 0.59 (d,  $J = 5.9$  Hz, 3H, Thr1-Me).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>88</sub>H<sub>121</sub>N<sub>19</sub>O<sub>18</sub>S<sub>7</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1956.725, gef.: 1956.725.

### 8.3.4. Synthese der Thiostrepton-Fluoreszenzsonden

***N*-(1-(5'-fluoresceinylamino)-1-thiono-6,9,12-trioxa-2-azapentadecan-15-yl)-β-(tritylthio)propionamid**

(73)



Amin 72 (280 mg, 0.508 mmol) wurde in Aceton/CHCl<sub>3</sub> (60 mL, 2:1) gelöst, und 5(6)-Fluoresceinisothiocyanat (218 mg, 0.559 mmol, 1.1 Äquiv.) wurde, gefolgt von DIPEA (89 µL, 0.508 mmol, 1.0 Äquiv.), unter Rühren hinzugegeben. Nach 16 h wurde die Reaktionsmischung eingengt und mittels Kieselgelchromatographie (Ethylacetat, 5–10% MeOH) gereinigt. Das *S*-Trityl-geschütztes Thiol 73 konnte als orange-gelber Feststoff (214 mg, 0.228 mmol, 45 %) erhalten werden.

## 8. Experimenteller Teil

---

**Schmp.:**  $T_m$ : > 230 °C Zersetzung.

**DC:**  $R_f = 0.51$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 9.86$  min; für [C<sub>53</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 940.3, gef.: 939.8.

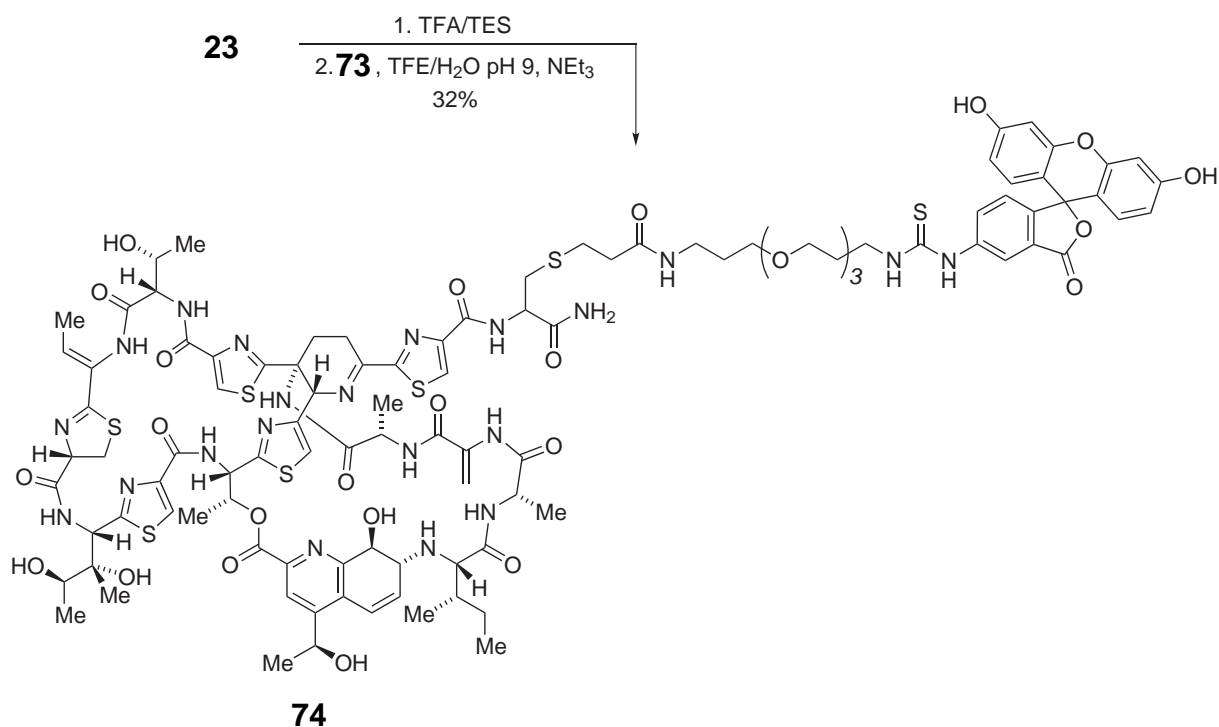
**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>;  $\delta = 7.86$  (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, Fl), 7.71 (dd,  $J = 4.4, 2.1$  Hz, 1H, Fl), 7.21 – 7.14 (m, 6H, Tr), 7.06 (t,  $J = 7.4$  Hz, 7H, Tr/Fl), 7.02 – 6.95 (m, 3H, Tr), 6.91 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, Fl), 6.52 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H, Fl), 6.49 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, Fl), 6.35 (dd,  $J = 8.6, 2.3$  Hz, 2H, Fl), 3.55 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH(CS)NH), 3.45 – 3.32 (m, 10H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH(CS)NH), 3.29 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H, (CO)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.06 – 2.98 (m, 2H, (CO)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.23 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, SCH<sub>2</sub>), 1.94 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.75 – 1.68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH(CS)NH), 1.55 – 1.48 (m, 2H, (CO)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** 100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>;  $\delta = 172.6$  (CONH), 144.9 (Tr), 129.6 (Tr), 129.3, 127.8 (Tr), 126.7 (Tr), 102.6, 78.2, 77.9, 77.6, 70.4, 70.3, 70.1, 70.0, 68.9, 66.7 (Tr), 60.6, 48.8, 48.6, 48.4, 48.2, 48.0, 47.8, 47.6, 36.8, 35.0 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29.1, 28.7, 27.9 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 13.6.

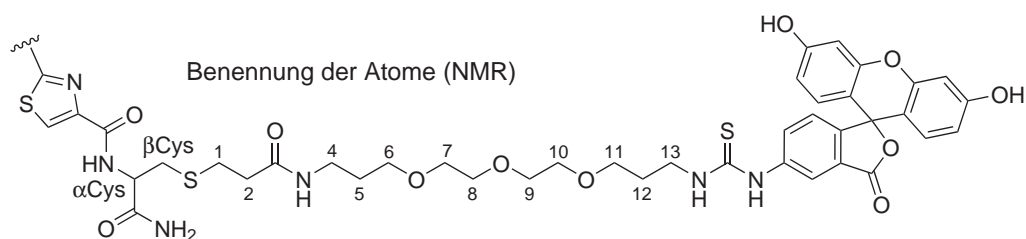
**HRMS (ESI):** für [C<sub>53</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 940.330, gef.: 940.330.



## PEG-Fluorescein-Thiostreptonsonde (74)



*S*-Trityl-geschütztes PEG-Fluoresceinkonjugat **73** (32 mg, 0.034 mmol, 1.1 Äquiv.) wurde in CHCl<sub>3</sub> (3 mL) gelöst und mit Et<sub>3</sub>SiH (5 µL, 0.034 mmol, 1.1 Äquiv.) versetzt. Nach Zugabe von TFA (240 µL) wurde die Reaktionsmischung für 20 min gerührt, die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und mehrfach mit Toluol (3 × 3 mL) eingengt. Der Rückstand wurde in TFE (6 mL) und Natriumphosphatpuffer (2 mL, 50 mM, pH9) gelöst. Einfach verkürztes Thiostrepton **23** (50 mg, 0.031 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde hinzugefügt, gefolgt von Et<sub>3</sub>N (44 µL, 0.313 mmol, 10 Äquiv.). Die Reaktionsmischung wurde für 16 h bei RT in einer Ar-Atmosphäre gerührt, im Vakuum konzentriert, und mittels präparativer HPLC (C4, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) gereinigt. Die PEG-Fluorescein-Thiostreptonsonde **74** wurde als gelber Feststoff (23 mg, 0.010 mmol, 32 %) erhalten werden.



## 8. Experimenteller Teil

---

**Schmp.:**  $T_m$ : > 230 °C Zersetzung.

**DC:**  $R_f = 0.36$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 17:3).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 8.41$  min; für [C<sub>103</sub>H<sub>121</sub>N<sub>21</sub>O<sub>26</sub>S<sub>7</sub>+2H<sup>+</sup>] ber.: 1146.9, gef.: 1147.1.

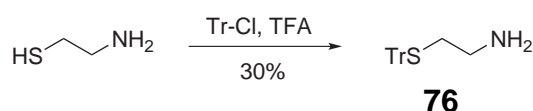
**HPLC:** Methode A:  $t_R = 7.2$  min.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta = 8.13$  (s, 1H, Thz4-5), 8.08 (s, 1H, Thz2-5), 8.02 (s, 1H, Thz1-5), 7.72 (s, 1H, Fl), 7.66 – 7.59 (m, 1H, Fl), 7.41 (s, 1H, Thz3-5), 7.15 (s, 1H, Q-3), 7.02 – 6.92 (m, 2H, Fl), 6.74 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H, Q-5), 6.48 – 6.41 (m, 5H, Fl), 6.26 – 6.17 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.07 (q,  $J = 6.7$  Hz, 1H, But-3), 5.68 (s, 1H, Deala1-3), 5.62 – 5.58 (m, 2H, Thr2-2/Thstn-2), 5.20 – 5.13 (m, 3H, Deala1-3'/Pip-6/Q-11), 4.82 (dd,  $J = 12.8, 9.0$  Hz, 1H, Cys-4), 4.66 – 4.61 (m, 1H, alpha-Cys), 4.58 – 4.54 (m, 1H, Ala2-2), 4.28 – 4.23 (m, 2H, Thr1-2/Q8), 3.69 – 3.57 (m, 4H, Ala1-2/Thstn4/11-H<sub>2</sub>), 3.46 (br s, 10H, 7-H<sub>2</sub>/8-H<sub>2</sub>/9-H<sub>2</sub>/Q-7/Cys-5), 3.42 – 3.38 (m, 2H, 13-H<sub>2</sub>'), 3.36 – 3.30 (m, 2H, 5-H<sub>2</sub>), 3.26 – 3.21 (m, 1H, Pip-3), 3.10 – 3.03 (m, 2H, 4-H<sub>2</sub>), 3.00 (t,  $J = 11.7$  Hz, 1H, Cys-5'), 2.85 – 2.78 (m, 3H, beta-Cys/Ile-2), 2.77 – 2.73 (m, 1H, Pip-3'), 2.72 – 2.66 (m, 2H, 1-H<sub>2</sub>), 2.34 – 2.26 (m, 2H, 2-H<sub>2</sub>), 2.19 – 2.09 (m, 1H, Pip-4'), 1.82 – 1.73 (m, 3H, Ile-3/12-H<sub>2</sub>'), 1.56 (d,  $J = 6.8$  Hz, 5H, Thr2-Me/6-H<sub>2</sub>), 1.46 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H, But-Me), 1.43 – 1.39 (m, 1H, Thr1-3), 1.29 – 1.25 (m, 3H, Ala2-Me), 1.23 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.14 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Thstn-4-Me), 1.10 – 1.06 (m, 1H, Ile4), 1.04 – 0.98 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn3-Me), 0.96 (d,  $J = 6.6$  Hz, 1H, Ile4'), 0.85 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile3-Me), 0.73 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H, Ile4-Me), 0.65 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, Thr1-Me).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>103</sub>H<sub>121</sub>N<sub>21</sub>O<sub>26</sub>S<sub>7</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 2292.691, gef.: 2292.688.

### 2-(Tritylthio)ethanamin (76)

[366]



Tritylchlorid (2.45 g, 8.80 mmol, 1 Äquiv.) wurde zu einer Lösung von Cystamin x HCl (1.00 g, 8.80 mmol) und TFA (1.3 mL, 17.60 mmol, 2 Äquiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde über 20 h bei RT gerührt und mit 1M-NaOH-Lösung (25 ml) vorsichtig neutralisiert. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70 mL) wurde zugegeben, die Phasen getrennt, die organische Phase mit gesättigter NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der nichtflüchtige Rückstand in Diethylether (20 mL) aufgenommen. Nach Zugabe von *n*-Pentan kristallisierte das Trityl-geschützte Amin **76** als farbloser Feststoff aus (854 mg, 2.673 mmol, 30%).

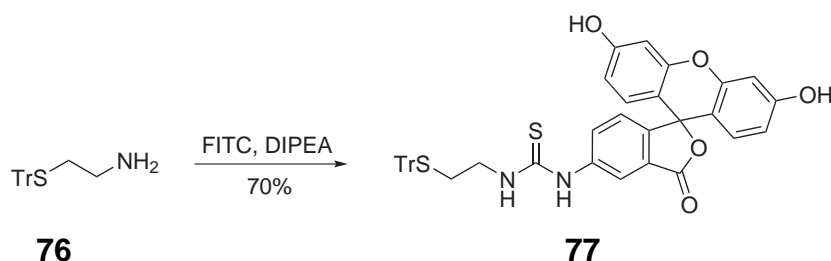
**Schmp.:**  $T_m$ : 86–91 °C.

**DC:**  $R_f = 0.19$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 7.01$  min; für [C<sub>85</sub>H<sub>116</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 320.5, gef. 319.6.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>;  $\delta = 7.38 - 7.33$  (m, 6H, Tr), 7.24 – 7.22 (m, 3H, Tr), 7.20 – 7.17 (m, 3H, Tr), 7.16 – 7.11 (m, 3H, Tr), 2.51 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.25 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N).

### 2-(Tritylthio)ethanamin-Fluorescein-Konjugat (**77**)



2-(Tritylthio)ethanamin **76** (300 mg, 0.939 mmol) wurde mit Fluoresceinisothiocyanat (402 mg, 1.033 mmol, 1.1 Äquiv.) und DIPEA (327  $\mu$ L, 1.878 mmol, 2 Äquiv.) in Aceton/CHCl<sub>3</sub> (9:5) über 42 h bei RT gerührt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum konnte das Konjugat nach Kieselgelchromatographie (8% MeOH in Ethylacetat) als orangeroter Feststoff (464 mg, 0.655 mmol, 70%) isoliert werden.

**Schmp.:**  $T_m$ : 160–167 °C.

## 8. Experimenteller Teil

**DC:**  $R_f = 0.66$  (Ethylacetat/MeOH 9:1).

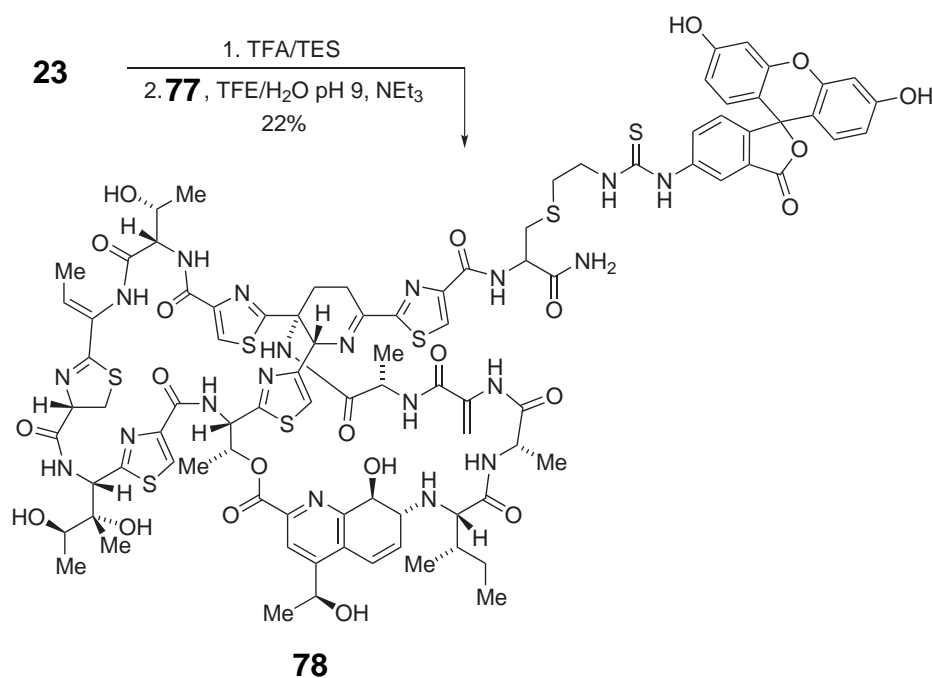
**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 10.52$  min; für  $[C_{42}H_{32}N_2O_5S_2 + H^+]$  ber.: 709.2, gef.: 708.9.

**HPLC:**  $t_R = 16.32$  min (Methode A(MP)).

**$^1H$ -NMR:** 400 MHz, MeOD;  $\delta = 8.12$  (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H, Fl), 7.73 (dd,  $J = 8.3, 2.1$  Hz, 1H, Fl), 7.45 – 7.38 (m, 6H, Tr), 7.34 – 7.17 (m, 10H, Tr/Fl), 7.12 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, Fl), 6.68 (m, 3H, Fl), 6.53 (dd,  $J = 8.7, 2.5$  Hz, 2H, Fl), 3.52 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H,  $SCH_2CH_2N$ ), 2.54 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H,  $SCH_2CH_2N$ ).

**HRMS (ESI):** für  $[C_{42}H_{32}N_2O_5S_2 + H^+]$  ber.: 709.1825, gef.: 709.1828.

### Fluorescein-Thiostreptonsonde (78)



2-(Tritylthio)ethanamin-Fluorescein-Konjugat **77** (90 mg, 0.127 mmol, 2.0 Äquiv.) wurde mit einer Mischung aus TFA (1.5 mL) und Et<sub>3</sub>SiH (30  $\mu$ L, 0.140 mmol, 2.2 Äquiv.) bei RT behandelt und bis zur vollständigen Umsetzung (DC-Kontrolle, 20 min). Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand mehrfach mit Toluol (4 x 2 mL) eingengt. Der Rückstand wurde in TFE (4 mL) und Natriumphosphatpuffer (1 mL, 50 mM, pH 9) gelöst. Einfach verkürztes Thiostrepton **23** (100 mg, 0.063 mmol, 1.0 Äquiv.)

wurde zugegeben, gefolgt von Et<sub>3</sub>N (88 µL, 0.635 mmol, 10 Äquiv.). Die Reaktionsmischung wurde für 16 h bei RT in einer Ar-Atmosphäre gerührt, dann im Vakuum konzentriert und mittels präparativer HPLC (C4, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) gereinigt. Die Fluorescein-ThioStreptonsonde **78** wurde als gelber Feststoff (29 mg, 0.014 mmol, 22 %) erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 230 °C Zersetzung.

**DC:**  $R_f = 0.10$  (Ethylacetat/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 8.19$  min; für [C<sub>92</sub>H<sub>100</sub>N<sub>20</sub>O<sub>22</sub>S<sub>7</sub>+2H<sup>+</sup>] ber.: 1031.3 gef.: 1031.9.

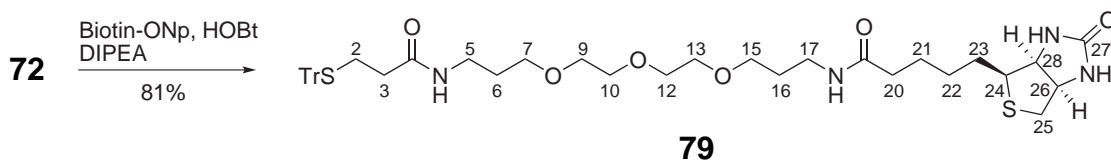
**HPLC:** Methode B: Zwei Diastereomere,  $t_R = 7.4/7.5$  min.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta = 8.12$  (s, 1H, Thz4-5), 8.05 (s, 1H, Thz2-5), 8.03 (s, 1H, Thz1-5), 7.99 (s, 1H, Fl), 7.72 – 7.62 (m, 1H, Fl), 7.38 (s, 1H, Thz3-5), 7.36 (s, 1H, Fl), 7.14 (s, 1H, Q-3), 6.96 (s, 1H, Fl), 6.72 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H, Q-5), 6.55 – 6.46 (m, 3H, Fl), 6.39 – 6.32 (m, 2H, Fl), 6.26 – 6.15 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.05 (q,  $J = 7.2$  Hz, 1H, But-3), 5.67 (s, 1H, Deala1-3), 5.63 – 5.56 (m, 2H, Thr2-2/Thstn-2), 5.19 – 5.11 (m, 3H, Deala1-3'/Pip-6/Q-11), 4.81 (dd,  $J = 12.6, 9.5$  Hz, 1H, Cys-4), 4.69 – 4.64 (m, 1H, alpha-Cys), 4.58 – 4.51 (m, 1H, Ala2-2), 4.29 – 4.20 (m, 2H, Thr1-2/Q-7), 3.90 – 3.82 (m, 1H, Pip-4), 3.76 – 3.67 (m, 2H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.67 – 3.60 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.50 – 3.42 (m, 2H, Cys-5/Q-7), 3.01 – 2.95 (m, 2H, Cys-5'/beta-Cys), 2.93 – 2.86 (m, 1H, beta-Cys'), 2.84 – 2.78 (m, 3H, Ile2/SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.76 – 2.67 (m, 1H, Pip-3'), 2.18 – 2.07 (m, 1H, Pip-4'), 1.76 (brs, 1H, Ile-3), 1.60 – 1.50 (m, 3H, Thr2-Me), 1.50 – 1.39 (m, 3H, But-Me), 1.39 – 1.33 (m, 1H, Thr1-3), 1.31 – 1.18 (m, 6H, Ala2-Me/Q-11-Me), 1.16 – 1.13 (m, 3H, Thstn-4-Me), 1.09 – 1.06 (m, 1H, Ile-4), 1.05 – 0.94 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn-3-Me), 0.94 – 0.89 (m, 1H, Ile-4'), 0.84 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.71 (d,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me), 0.64 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H, Thr1-Me).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>92</sub>H<sub>100</sub>N<sub>20</sub>O<sub>22</sub>S<sub>7</sub>+2H<sup>+</sup>] ber.: 1031.276, gef.: 1031.276.

## 8.3.5. Synthese des Biotin-Thiostrepton-Addukts

## Biotin-PEG-Konjugat (79)



PEG-Amin **72** (227 mg, 0.412 mmol) wurde in wasserfreiem DMF (10 mL) gelöst, und unter Rühren mit (+)-Biotin-4-Nitrophenylester (226 mg, 0.618 mmol, 1.5 Äquiv.), HOBT (38 mg, 0.247 mmol, 0.6 Äquiv.) und DIPEA (72  $\mu$ L, 0.412 mg, 1.0 Äquiv.) bei RT versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 8 h in einer Ar-Atmosphäre gerührt, im Vakuum konzentriert, und mittels Kieselgelchromatographie (5–10% MeOH in DCM) gereinigt. Das Biotin-PEG-Konjugat **79** konnte als gelblich gefärbtes Öl (259 mg, 0.333 mmol, 81 %) erhalten werden.

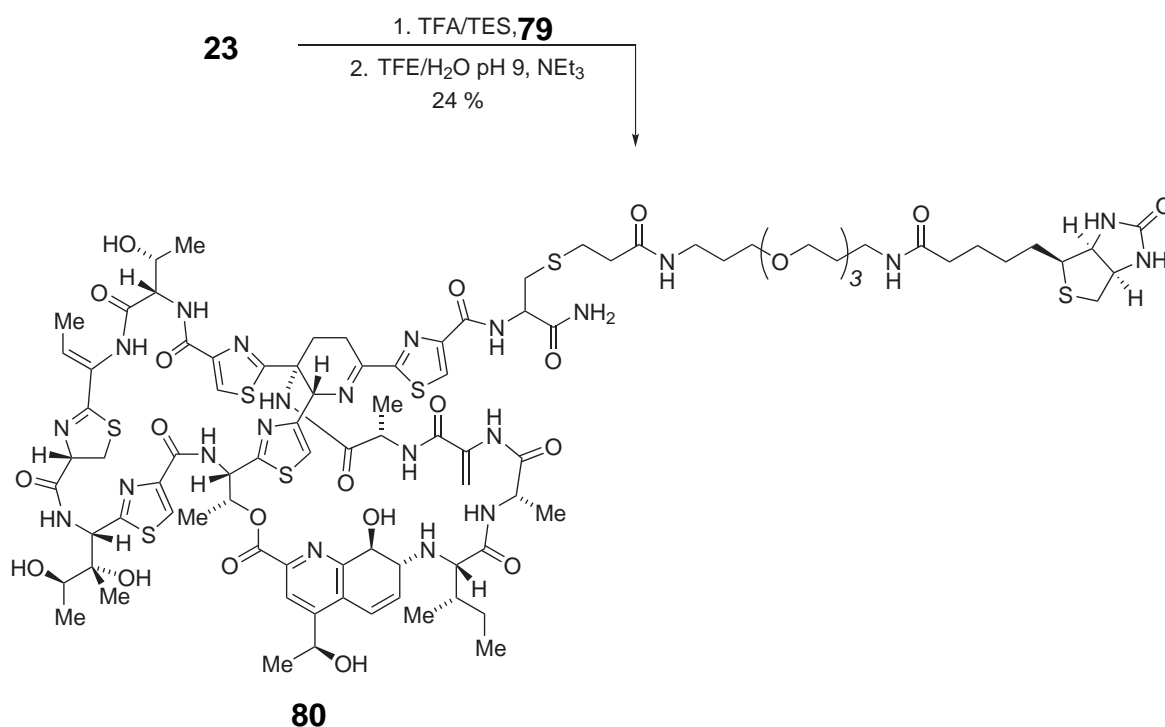
**DC:**  $R_f = 0.26$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  9:1:0.1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 9.18$  min; für  $[\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2 + \text{H}^+]$  ber.: 777.4, gef. 776.9.

**$^1\text{H-NMR}$ :** 400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  4:1;  $\delta = 7.39$  (d,  $J = 7.6$  Hz, 6H, Tr), 7.28 (d,  $J = 7.4$  Hz, 6H, Tr), 7.21 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H, Tr), 4.48 (dd,  $J = 7.2, 5.2$  Hz, 1H, 26-H), 4.29 (dd,  $J = 7.5, 4.5$  Hz, 1H, 28-H), 3.64 – 3.48 (m, 12H, 15- $\text{H}_2/9\text{-H}_2/10\text{-H}_2/12\text{-H}_2/13\text{-H}_2/7\text{-H}_2$ ), 3.30 – 3.22 (m, 4H, 5- $\text{H}_2/17\text{-H}_2$ ), 3.15 (dt,  $J = 8.8, 5.9$  Hz, 1H, 24-H), 2.93 – 2.87 (m, 1H, 25- $\text{H}_A$ ), 2.72 (d,  $J = 12.8$  Hz, 1H, 25- $\text{H}_B$ ), 2.45 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, 2- $\text{H}_2$ ), 2.20 – 2.11 (m, 4H, 3- $\text{H}_2/20\text{-H}_2$ ), 1.78 – 1.71 (m, 4H, 6- $\text{H}_2/16\text{-H}_2$ ), 1.71 – 1.57 (m, 4H, 21- $\text{H}_2/23\text{-H}_2$ ), 1.43 (dd,  $J = 15.3, 7.7$  Hz, 2H, 22- $\text{H}_2$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** 400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  4:1;  $\delta = 177.9$  (C-19), 175.8 (C-4), 168.0 (C-27), 148.6 (3x Tr), 133.4 (6x Tr), 131.9 (6x Tr), 130.6 (3x Tr), 73-74 (C-7/C-9/C-10/C-12/C-13/C-15), 70.5 (Tr), 65.8 (C-28), 64.0 (C-26), 59.4 (C-24), 44.1 (C-25), 41.1 (C-5/C-17), 39.3 (C-3/C-20), 32.8 (C-16/C-6), 32.3 (C-22), 31.6 (C-2), 29.4 (C-21/C-23).

**HRMS (ESI):** für  $[\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2 + \text{H}^+]$  ber.: 777.371, gef. 777.371.

Thioestrepton-Biotin-Konjugat (**80**)

S-Trityl-Biotin-PEG-Konjugat **79** (29 mg, 0.038 mmol, 1.2 Äquiv.) wurde in  $\text{CHCl}_3$  (3 mL) gelöst und mit  $\text{Et}_3\text{SiH}$  (7  $\mu\text{L}$ , 0.034 mmol, 1.1 Äquiv.) versetzt. Nach Zugabe von TFA (240  $\mu\text{L}$ ) wurde die Reaktionsmischung für 20 min gerührt, die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der Rückstand mehrmals mit Toluol (3 x 3 mL) eingengt. Der Rückstand wurde in TFE (4 mL) und Natriumphosphatpuffer (1 mL, 50 mM, pH 9) gelöst. Einfach verkürztes Thioestrepton **23** (50 mg, 0.031 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde hinzugefügt, gefolgt von  $\text{Et}_3\text{N}$  (22  $\mu\text{L}$ , 0.157 mmol, 5.0 Äquiv.). Die Reaktionsmischung wurde für 16 h bei RT in einer Ar-Atmosphäre gerührt, im Vakuum konzentriert, und mittels präparativer HPLC ( $\text{C}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ) gereinigt. Das Thioestrepton-Biotin-Konjugat **80** wurde als farbloser Feststoff (16 mg, 0.008 mmol, 24 %) erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.04$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 8.14$  min; für  $[\text{C}_{92}\text{H}_{125}\text{N}_{22}\text{O}_{23}\text{S}_7 + 2\text{H}^+]$  ber.: 1065,4, gef. 1065.5.

## 8. Experimenteller Teil

---

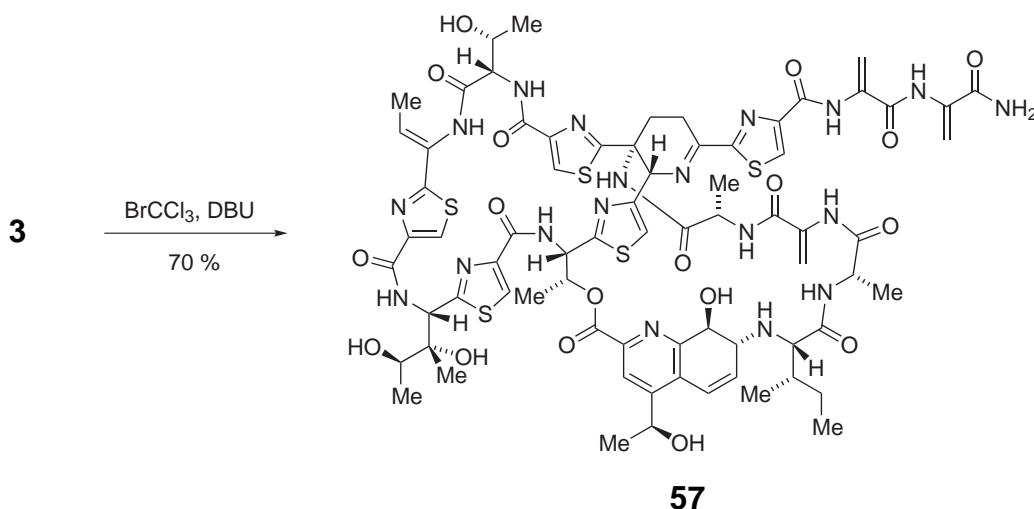
**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.12 (s, 1H, Thz4-5), 8.08 (s, 1H, Thz2-5), 8.01 (s, 1H, Thz1-5), 7.41 (s, 1H, Thz3-5), 7.15 (s, 1H, Q-3), 6.73 (d,  $J$  = 10.2 Hz, 1H, Q-5), 6.28 – 6.13 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.06 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 1H, But-3), 5.68 (s, 1H, Deala1-3), 5.64 – 5.56 (m, 2H, Thr2-2/Thstn-2), 5.19 (s, 1H, Deala1-3'), 5.15 (s, 2H, Q-11/Pip-6), 4.82 (dd,  $J$  = 12.6, 9.4 Hz, 1H, Cys-4), 4.66 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, alpha-Cys), 4.60 – 4.52 (m, 1H, Ala2-2), 4.33 (dd,  $J$  = 7.4, 4.8 Hz, 1H, 26-H), 4.29 – 4.21 (m, 2H, Thr1-2/Q-8), 4.14 (dd,  $J$  = 7.8, 4.5 Hz, 1H, 28-H), 3.90 – 3.87 (m, 1H, Pip-4), 3.69 – 3.59 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.52 – 3.34 (m, 14H, 7-H<sub>2</sub>/9-H<sub>2</sub>/10-H<sub>2</sub>/12-H<sub>2</sub>/13-H<sub>2</sub>/15-H<sub>2</sub>/Cys-5/Q-7), 3.15 – 3.07 (m, 4H, 5-H<sub>2</sub>/17-H<sub>2</sub>), 3.05 – 2.95 (m, 2H, Cys-5/24-H), 2.92 – 2.66 (m, 7H, beta-Cys/beta-Cys'/Ile-2/Pip-3/25-H<sub>A</sub>/2-H<sub>2</sub>), 2.56 (d,  $J$  = 12.7 Hz, 1H, 25-H<sub>B</sub>), 2.44 – 2.27 (m, 2H, 3-H<sub>2</sub>), 2.20 – 2.08 (m, 1H, Pip-4'), 2.01 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H, 20-H<sub>2</sub>), 1.81 – 1.70 (m, 1H, Ile-3), 1.61 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 4H, 6-H<sub>2</sub>/16-H<sub>2</sub>), 1.56 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, Thr2-Me), 1.53 – 1.47 (m, 4H, 21-H<sub>2</sub>/23-H<sub>2</sub>), 1.45 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 4H, But-Me/Thr1-3), 1.27 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 5H, Ala2-Me/22-H<sub>2</sub>), 1.22 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 4H, Q-11-Me/Ile-4), 1.14 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H, Thstn-4-Me), 1.04 – 0.97 (m, 6H, Ala-1-Me/Thstn-3-Me), 0.95 – 0.88 (m, 1H, Ile-4'), 0.84 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.72 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H, Ile-4-Me), 0.65 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 3H, Thr1-Me).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>92</sub>H<sub>124</sub>N<sub>22</sub>O<sub>23</sub>S<sub>7</sub>+2H<sup>+</sup>] ber.: 1065.371, gef. 1065.371.



## 8.3.6. Oxidation des Thiazolins von Thiostreptonderivaten

## Oxidiertes Thiostrepton (57)



Thiostrepton **3** (100 mg, 0.060 mmol) wurde mit  $\text{BrCCl}_3$  (12  $\mu\text{L}$ , 0.120 mmol, 2.0 Äquiv.) und DBU (10  $\mu\text{L}$ , 0.066 mmol, 1.1 Äquiv.) nach **AV2** in das entsprechende Thiazol-Derivat überführt. Nach Kieselgelchromatographie (4–6 % MeOH in  $\text{CHCl}_3$ ) wurden 70 mg (0.042 mmol, 70 %) des oxidierten Thiostreptons **57** erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.29$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 7.95$  min; für  $[\text{C}_{72}\text{H}_{83}\text{N}_{19}\text{O}_{18}\text{S}_5 + \text{H}^+]$  ber.: 1662.5, gef. 1662.8.

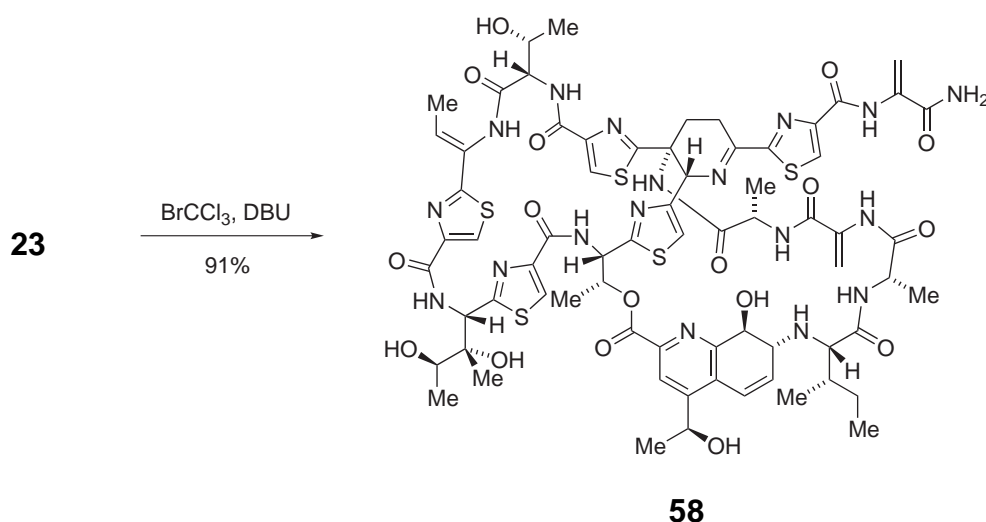
**$^1\text{H-NMR}$ :** 400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  4:1;  $\delta = 8.12$  (s, 1H, Thz4-5), 8.10 (s, 1H, Thz2-5), 8.04 (s, 1H, Thz1-5), 7.87 (s, 1H, Thz-neu-5), 7.39 (s, 1H, Thz3-5), 7.16 (s, 1H, Q-3), 6.73 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H, Q-5), 6.53 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H, Deala2-3), 6.36 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H, Deala3-3), 6.23 (dd,  $J = 9.6, 4.6$  Hz, 1H, Q-6), 6.20 – 6.10 (m, 2H, Thr2-3/But-3), 5.68 (dd,  $J = 9.7, 4.7$  Hz, 3H, Thr2-2/Thstn-2/Deala1-3), 5.53 (s, 1H, Deala3-3'), 5.46 (s, 1H, Deala2-3'), 5.17 (dd,  $J = 8.5, 5.4$  Hz, 3H, Pip-6/Q-11/Deala1-3'), 4.63 – 4.53 (m, 1H, Ala2-2), 4.38 (dd,  $J = 7.8, 3.7$  Hz, 1H, Thr1-2), 4.25 (s, 1H, Q-8), 3.74 – 3.67 (m, 1H, Thstn-4), 3.66 – 3.61 (m, 1H, Ala1-2), 3.45 (dd,  $J = 5.7, 2.0$  Hz, 1H, Q-7), 2.81 (d,  $J =$

## 8. Experimenteller Teil

4.3 Hz, 1H, Ile-2), 2.79 – 2.74 (m, 1H, Pip-3), 2.14 (t,  $J = 12.8$  Hz, 1H, Pip-4), 1.79 – 1.69 (m, 1H, Ile-3), 1.54 (d,  $J = 6.5$  Hz, 4H, Thr2-Me/Thr1-3), 1.50 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, But-Me), 1.28 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Ala2-Me), 1.23 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.20 – 1.14 (m, 1H, Ile-4), 1.12 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, Thstn-4-Me), 1.04 (s, 3H, Thstn-3-Me), 1.01 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, Ala1-Me), 0.98 – 0.88 (m, 1H, Ile-4'), 0.86 – 0.79 (m, 6H, Ile-3-Me/Thr1-Me), 0.72 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me).

**HRMS (ESI):** für  $[C_{72}H_{83}N_{19}O_{18}S_5 + 2H^+]$  ber.: 831.7456, gef.: 831.7465.

### Einfach verkürztes oxidiertes Thiostrepton (**58**)



Einfach verkürztes Thiostrepton **23** (391 mg, 0.245 mmol) wurde mit  $BrCCl_3$  (49  $\mu$ L, 0.490 mmol, 2.0 Äquiv.) und DBU (41  $\mu$ L, 0.270 mmol, 1.1 Äquiv.) nach **AV2** in das entsprechende Thiazol-Derivat überführt. Nach Kieselgelchromatographie (4–6 % MeOH in  $CHCl_3$ ) wurden 357 mg (0.224 mmol, 91 %) des einfach verkürzten, oxidierten Thiostreptons **58** erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

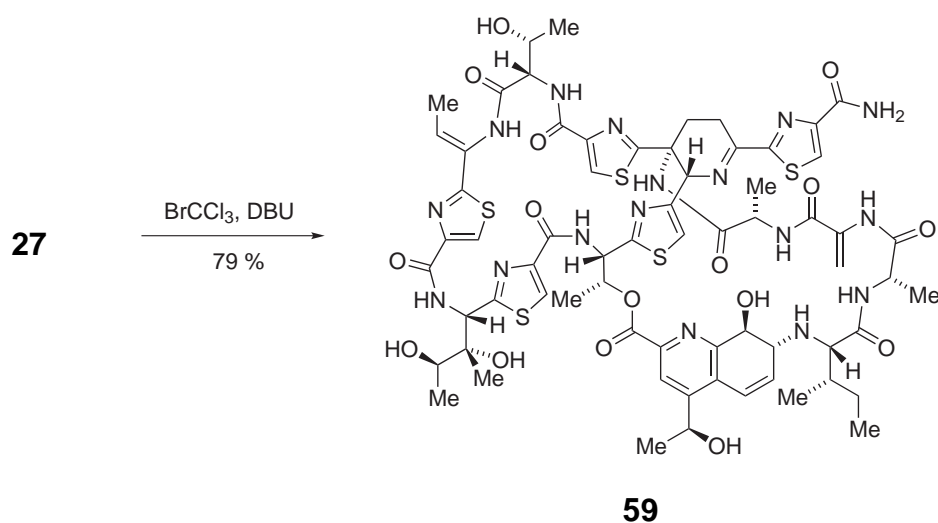
**DC:**  $R_f = 0.36$  ( $CHCl_3/MeOH$  9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 7.90$  min; für  $[C_{69}H_{80}N_{18}O_{17}S_5 + H^+]$  ber.: 1595.5, gef. 1593.1.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.11 (s, 2H, Thz4-5/Thz2-5), 8.05 (s, 1H, Thz1-5), 7.87 (s, 1H, Thz-neu-5), 7.39 (s, 1H, Thz3-5), 7.17 (s, 1H, Q-3), 6.74 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H, Q-5), 6.48 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, Deala2-3), 6.23 (dd,  $J$  = 9.9, 4.6 Hz, 1H, Q-6), 6.20 – 6.11 (m, 2H, Thr2-3/But-3), 5.70 – 5.67 (m, 3H, Deala1-3/Thr2-2/Thstn2), 5.48 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H, Deala2-3'), 5.21 – 5.14 (m, 3H, Deala1-3'/Q-11/Pip-6), 4.58 (q,  $J$  = 6.5 Hz, 1H, Ala2-2), 4.39 (d,  $J$  = 3.8 Hz, 1H, Thr1-2), 4.26 (br s, 1H, Q-8), 3.71 (q,  $J$  = 6.5 Hz, 1H, Ala1-2), 3.63 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, Thstn-4), 3.46 (dd,  $J$  = 5.8, 2.1 Hz, 1H, Q-7), 3.31 (dd,  $J$  = 19.7, 6.1 Hz, 1H, Pip-3), 2.81 (d,  $J$  = 4.4 Hz, 1H, Ile-2), 2.79 – 2.72 (m, 1H, Pip-3'), 2.19 – 2.09 (m, 1H, Pip-4'), 1.75 (br s, 1H, Ile-3), 1.55 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, Thr2-Me), 1.51 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 4H, But-Me/Thr1-3), 1.28 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, Ala2-Me), 1.24 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, Q-11-Me), 1.21 – 1.15 (m, 1H, Ile-4), 1.12 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H, Ala1-Me), 1.05 (s, 3H, Thstn-3-Me), 1.02 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, Thstn-4-Me), 0.94 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, Ile-4'), 0.87 – 0.80 (m, 6H, Ile-3-Me/Thr1-Me), 0.73 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H, Ile-4-Me).

**<sup>13</sup>C-NMR:** 125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 11.4 (Ile-5), 14.7 (But-Me), 15.7 (Ile-3-Me), 16.3 (Thstn-5), 18.1 (Thstn-3-Me), 18.7 (Thr2-Me), 18.9 (Thr1-Me), 19.0 (Ala2-Me), 19.0 (Ala1-Me), 23.0 (Q-Me), 24.6 (Pip-3), 25.1 (Ile-4), 29.4 (Pip-4), 38.6 (Ile-3), 49.3 (Ala1-2), 52.2 (Ala2-2), 53.5 (Thstn-2), 55.6 (Thr2-2), 55.7 (Thr1-2), 57.6 (Pip-5), 59.4 (Q-7), 64.2 (Pip-6), 64.4 (Q-11), 66.2 (Ile-2), 66.8 (Thr1-3), 67.1 (Q-8), 67.8 (Thstn-4), 72.4 (Thr2-3), 77.5 (Thstn-3), 102.4 (Deala1-3), 103.8 (Deala2-3), 117.6 (Thz3-5), 122.3 (Q-3), 123.3 (Q-5), 124.7 (Cys-5), 124.9 (Thz2-5), 125.2 (Thz1-5), 127.2 (Q-10), 127.3 (But-3), 127.5 (Thz4-5), 128.0 (But-2), 130.0 (Q-6), 132.3 (Deala1-2), 133.4 (Deala2-2), 146.5 (Thz1-4), 148.7 (Cys-4), 150.1 (Thz2-4), 150.3 (Thz4-4), 153.6 (Q-4), 154.5 (Q-9), 157.5 (Thz3-4), 159.7 (Thz4-CO), 160.9 (Q-CO), 161.6 (Cys-CO), 161.8 (Thz1-CO), 161.9 (Pip-2), 162.2 (Thz2-CO), 163.2 (Deala1-CO), 166.2 (Deala2-CO), 166.4 (Thz2-2), 166.7 (Thr1-CO), 167.2 (Cys-2), 168.4 (Thz4-2), 168.5 (Ala1-CO), 169.8 (Thz1-2), 170.2 (Thz3-2), 173.2 (Ala2-CO), 174.3 (Ile-CO).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>69</sub>H<sub>80</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>5</sub>+2H<sup>+</sup>] ber.: 797.2349, gef.: 797.2357.

Zweifach verkürztes oxidiertes Thiostrepton (**59**)

Zweifach verkürztes Thiostrepton **27** (42 mg, 0.028 mmol) wurde mit  $\text{BrCCl}_3$  (5  $\mu\text{L}$ , 0.055 mmol, 2.0 Äquiv.) und DBU (5  $\mu\text{L}$ , 0.030 mmol, 1.1 Äquiv.) nach **AV2** in das entsprechende Thiazol-Derivat überführt. Nach Kieselgelchromatographie (4–6 % MeOH in  $\text{CHCl}_3$ ) wurden 33 mg (0.022 mmol, 79 %) des zweifach verkürzten, oxidierten Thiostreptons **58** erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f$  = 0.36 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R$  = 8.76 min; für  $[\text{C}_{66}\text{H}_{77}\text{N}_{17}\text{O}_{16}\text{S}_5 + \text{H}^+]$  ber.: 1524.44, gef.: 1524.14.

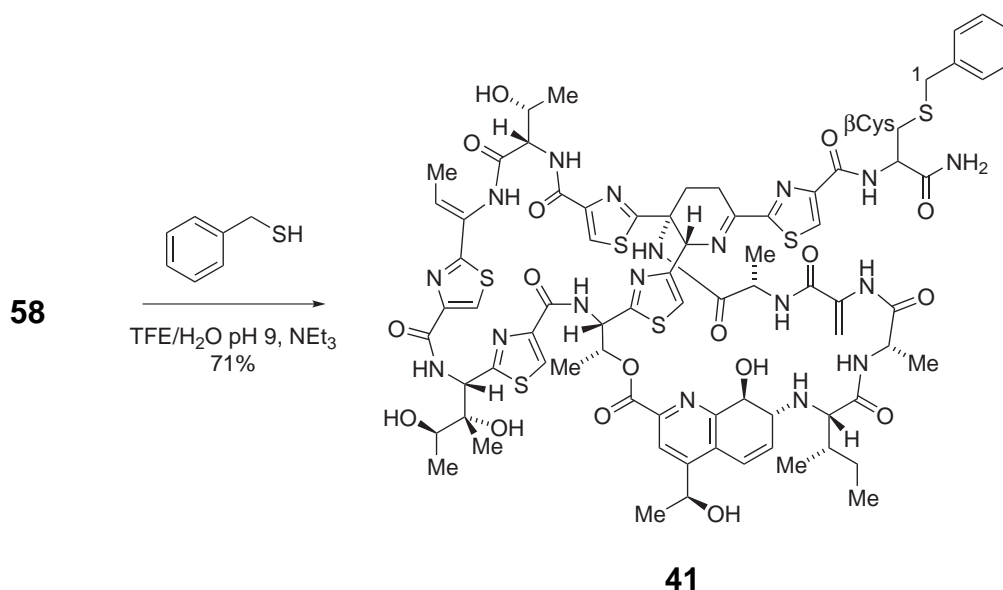
**$^1\text{H-NMR}$ :** 400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  4:1;  $\delta$  = 8.09 (s, 1H, Thz4-5), 8.07 (s, 1H, Thz2-5), 8.04 (s, 1H, Thz1-5), 7.86 (s, 1H, Thz-neu-5), 7.38 (s, 1H, Thz3-5), 7.16 (s, 1H, Q-3), 6.72 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H, Q-5), 6.23 (ddd,  $J$  = 10.0, 5.8, 0.8 Hz, 1H, Q-6), 6.20 – 6.10 (m, 2H, Thr2-3/But-3), 5.71 – 5.64 (m, 3H, Thr2-2/Thstn-2/Deala1-3), 5.20 – 5.13 (m, 3H, Pip-6/Q-11/Deala1-3'), 4.62 – 4.54 (m, 1H, Ala2-2), 4.38 (dd,  $J$  = 7.8, 3.7 Hz, 1H, Thr1-2), 4.24 (s, 1H, Q-8), 3.90 (dd,  $J$  = 13.6, 6.8 Hz, 1H, Pip-4), 3.45 (dd,  $J$  = 5.8, 2.1 Hz, 1H, Q-7), 3.24 – 3.20 (m, 1H, Pip-3), 2.80 (d,  $J$  = 4.3 Hz, 1H, Ile-2), 2.77 – 2.68 (m, 1H, Pip-3'), 2.19 – 2.09 (m, 1H, Pip-4'), 1.79 – 1.70 (m, 1H, Ile-3), 1.54 (d,  $J$  = 6.5

Hz, 3H, Thr2-Me), 1.49 (d,  $J = 7.0$  Hz, 4H, But-Me/Thr1-3), 1.27 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Ala2-Me), 1.23 – 1.21 (m, 3H, Q-11-Me), 1.21 – 1.13 (m, 1H, Thr1-3), 1.11 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, Thstn-4-Me), 1.04 (s, 3H, Thstn-3-Me), 1.01 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, Ala1-Me), 0.96 – 0.86 (m, 1H, Ile-4), 0.82 (dd,  $J = 12.4, 6.6$  Hz, 6H, Ile-3-Me/Thr1-Me), 0.75 – 0.68 (m, 3H, Ile-4-Me).

**HRMS (ESI):** für  $[C_{66}H_{77}N_{17}O_{16}S_5 + H^+]$  ber.: 1524.441, gef.: 1524.442.

### 8.3.7. Sulfa-Michael-Additionen an einfach verkürztes oxidiertes Thiostrepton

#### Einfach verkürztes oxidiertes Thiostrepton + Benzylmercaptan (41)



Einfach verkürztes oxidiertes Thiostrepton **58** (63 mg, 0.039 mmol) wurde mit Benzylmercaptan (5.6  $\mu\text{L}$ , 0.047, 1.2 Äquiv.) nach **AV1** zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ) wurde nach lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen das *Michael*-Addukts **41** (48 mg, 0.028 mmol, 71 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.57$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1).

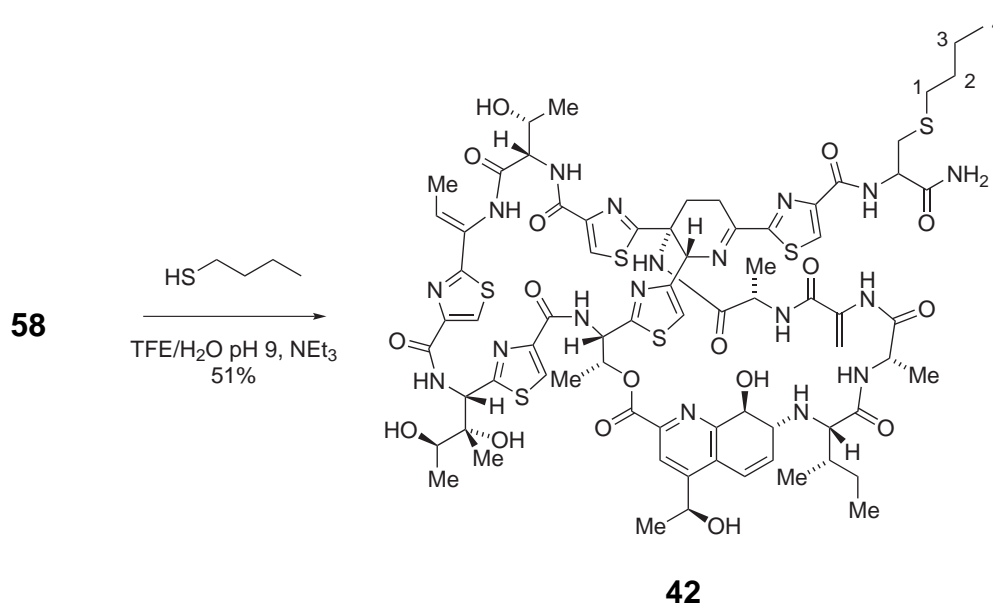
## 8. Experimenteller Teil

**LCMS (ESI):** Methode II:  $t_R = 10.47$  min; für  $[C_{76}H_{88}N_{18}O_{17}S_6+H^+]$  ber.: 1717.5, gef.: 1717.0.

**$^1H$ -NMR:** 400 MHz,  $CDCl_3/MeOD$  4:1;  $\delta = 8.10$  (s, 1H, Thz4-5), 8.09 (s, 1H, Thz2-5), 8.05 (s, 1H, Thz1-5), 7.87 (s, 1H, Thz-neu-5), 7.39 (s, 1H, Thz3-5), 7.22 – 7.04 (m, 6H, Q-3/H-arom.), 6.73 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H, Q-5), 6.23 (dd,  $J = 9.8, 5.4$  Hz, 1H, Q-6), 6.20 – 6.10 (m, 2H, Thr2-3/But-3), 5.73 – 5.65 (m, 3H, Deala1-3/Thstn2/Thr2-2), 5.22 – 5.13 (m, 3H, Deala1-3'/Pip-6/Q-11), 4.65 – 4.53 (m, 2H, alpha-Cys/Ala2-2), 4.39 (dd,  $J = 7.9, 3.7$  Hz, 1H, Thr1-2), 4.26 (s, 1H, Q-8), 3.71 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H, Ala1-2), 3.67 – 3.61 (m, 3H, Thstn-4/1-H<sub>2</sub>), 3.46 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H, Q-7), 2.84 – 2.80 (m, 1H, Ile-2), 2.78 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H, beta-Cys), 2.17 – 2.09 (m, 1H, Pip-4'), 1.74 (brs, 1H, Ile-3), 1.55 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, Thr2-Me), 1.51 (d,  $J = 7.0$  Hz, 4H, But-Me/Thr1-3), 1.28 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Ala2-Me), 1.24 (d,  $J = 6.5$  Hz, 4H, Q-11-Me/Ile-4), 1.12 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, Ala1-Me), 1.06 – 0.99 (m, 6H, Thstn-3-Me/Thstn-4-Me), 0.98 – 0.88 (m, 1H, Ile-4'), 0.83 (m, 6H, Thr1-Me/Ile-3-Me), 0.73 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me).

**HRMS (ESI):** für  $[C_{76}H_{88}N_{18}O_{17}S_6+H^+]$  ber.: 1717.497, gef.: 1717.498.

### Einfach verkürztes oxidiertes Thiostrepton + 1-Butanthiol (42)



Einfach verkürztes oxidiertes ThioStrepton **58** (63 mg, 0.039 mmol) wurde mit 1-Butanthiol (5.1  $\mu$ L, 0.047, 1.2 Äquiv.) nach **AV1** zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen das *Michael*-Addukts **42** (34 mg, 0.020 mmol, 51 %) als farbloser Feststoff erhalten.

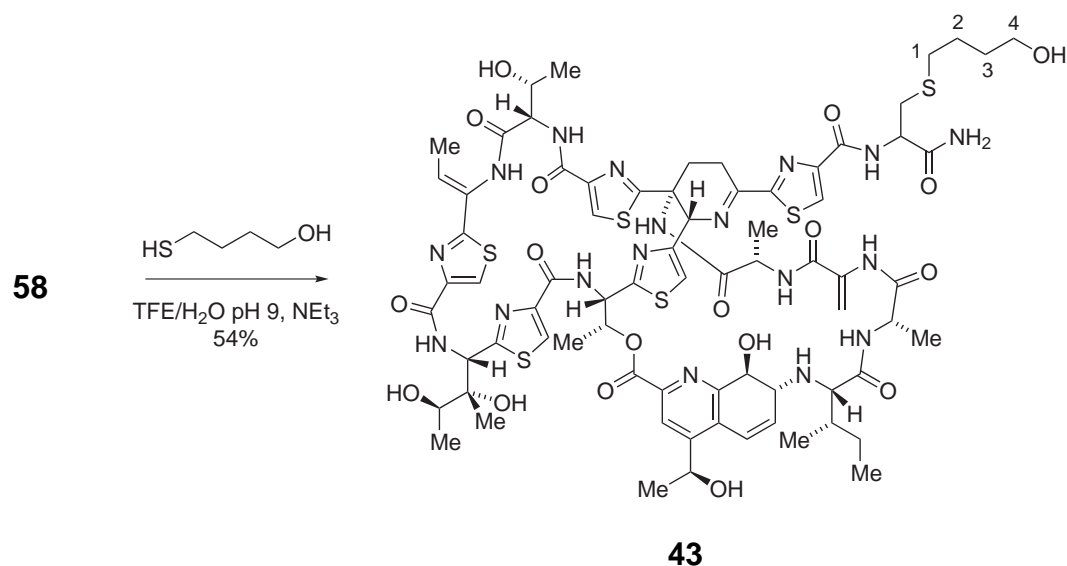
**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.36$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode II:  $t_R = 10.54$  min; für [C<sub>73</sub>H<sub>90</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1683.51, gef.: 1683.19.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta = 8.09$  (s, 1H, Thz4-5), 8.08 (s, 1H, Thz2-5), 8.04 (s, 1H, Thz1-5), 7.87 (s, 1H, Thz-neu-5), 7.39 (s, 1H, Thz3-5), 7.16 (s, 1H, Q-3), 6.73 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H, Q-5), 6.23 (dd,  $J = 10.4, 5.2$  Hz, 1H, Q-6), 6.20 – 6.11 (m, 2H, Thr2-3/But-3), 5.72 – 5.65 (m, 3H, Deala1-3/Thr2-2/Thstn2), 5.21 – 5.13 (m, 3H, Deala1-3'/Q-11/Pip-6), 4.62 – 4.54 (m, 2H, alpha-Cys/Ala2-2), 4.38 (dd,  $J = 7.9, 3.7$  Hz, 1H, Thr1-2), 4.27 (s, 1H, Q-8), 3.70 (q,  $J = 6.5$  Hz, 1H, Ala1-2), 3.67 – 3.60 (m, 1H, Thstn-4), 3.45 (dd,  $J = 5.7, 2.0$  Hz, 1H, Q-7), 3.26 – 3.21 (m, 1H, Pip-3), 2.90 – 2.85 (m, 2H, beta-Cys), 2.81 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, Ile-2), 2.76 – 2.71 (m, 1H, Pip-3'), 2.50 – 2.43 (m, 2H, 1-H<sub>2</sub>), 2.12 (d,  $J = 13.1$  Hz, 1H, Pip-4'), 1.72 (brs, 1H, Ile-3), 1.55 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Thr2-Me), 1.50 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, But-Me), 1.47 – 1.38 (m, 3H, Thr1-3/2-H<sub>2</sub>), 1.28 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Ala2-Me), 1.26 – 1.20 (m, 5H, Q-11-Me/3-H<sub>2</sub>), 1.20 – 1.15 (m, 1H, Ile-4), 1.12 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, Ala-1-Me), 1.06 – 1.00 (m, 6H, Thstn-3-Me/Thstn-4-Me), 0.99 – 0.89 (m, 1H, Ile-4'), 0.83 (d,  $J = 6.8$  Hz, 6H, Thr1-Me/Ile-3-Me), 0.77 – 0.69 (m, 6H, Ile-4-Me/4-H<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>73</sub>H<sub>90</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1683.513, gef.: 1683.514.

Einfach verkürztes oxidiertes Thiostrepton + 4-Mercapto-1-butanol (**43**)

Einfach verkürztes oxidiertes Thiostrepton **58** (63 mg, 0.039 mmol) wurde mit 4-Mercapto-1-butanol (4.9  $\mu\text{L}$ , 0.047 mmol, 1.2 Äquiv.) nach **AV1** zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen das *Michael*-Addukt **43** (36 mg, 0.021 mmol, 54 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f$  = 0.26 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1).

**LCMS (ESI):** Methode II:  $t_R$  = 9.78 min; für  $[\text{C}_{73}\text{H}_{90}\text{N}_{18}\text{O}_{18}\text{S}_6 + \text{H}^+]$  ber.: 1699.5, gef.: 1699.2.

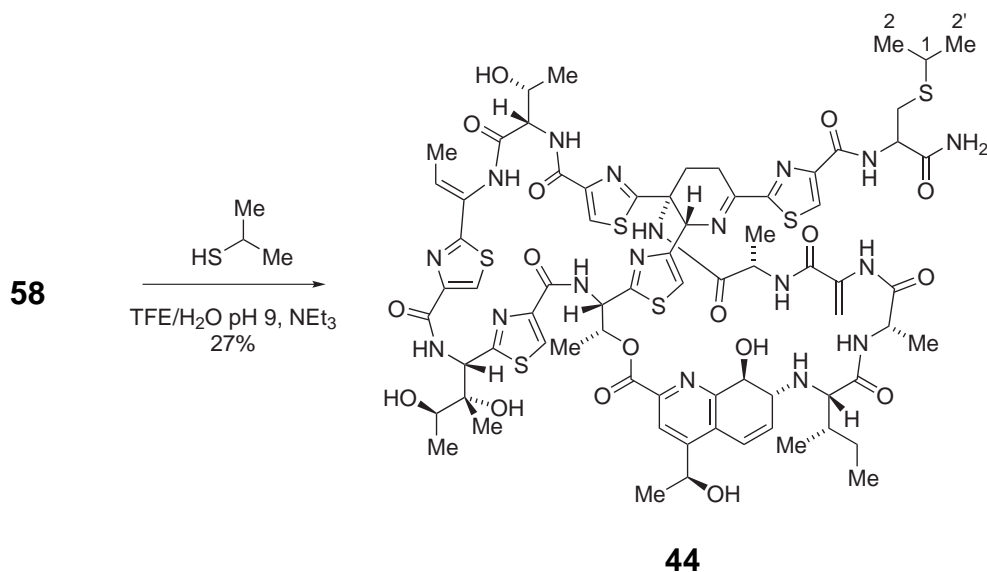
**$^1\text{H-NMR}$ :** 400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  4:1;  $\delta$  = 8.10 (s, 1H, Thz4-5), 8.07 (s, 1H, Thz2-5), 8.04 (s, 1H, Thz1-5), 7.87 (s, 1H, Thz-neu-5), 7.39 (s, 1H, Thz3-5), 7.16 (s, 1H, Q-3), 6.73 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H, Q-5), 6.23 (dd,  $J$  = 10.4, 5.1 Hz, 1H, Q-6), 6.19 – 6.10 (m, 2H, Thr2-3/But-3), 5.72 – 5.65 (m, 3H, Deala1-3/Thr2-2/Thstn2), 5.21 – 5.13 (m, 3H, Deala1-3'/Q-11/Pip-6), 4.63 – 4.56 (m, 2H, alpha-Cys/Ala2-2), 4.38 (dd,  $J$  = 7.9, 3.7 Hz, 1H, Thr1-2), 4.27 (s, 1H, Q-8), 3.70 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 1H, Ala1-2), 3.67 – 3.60 (m,



1H, Thstn-4), 3.47 – 3.40 (m, 3H, Q-7/4-H<sub>2</sub>), 3.26 – 3.22 (m, 1H, Pip-3), 2.90 – 2.85 (m, 2H, beta-Cys), 2.81 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, Ile-2), 2.76 – 2.69 (m, 1H, Pip-3'), 2.54 – 2.47 (m, 2H, 1-H<sub>2</sub>), 2.13 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H, Pip-4'), 1.72 (br s, 1H, Ile-3), 1.55 (d, *J* = 6.5 Hz, 5H, Thr2-Me/2-H<sub>2</sub>), 1.50 (d, *J* = 7.0 Hz, 5H, But-Me/3-H<sub>2</sub>), 1.48 – 1.43 (m, 1H, Thr1-3), 1.28 (dd, *J* = 6.5, 2.0 Hz, 3H, Ala2-Me), 1.23 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, Q-11-Me), 1.21 – 1.15 (m, 1H, Ile-4), 1.12 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, Ala1-Me), 1.06 – 0.99 (m, 6H, Thstn3-Me/Thstn4-Me), 0.98 – 0.89 (m, 1H, Ile-4'), 0.83 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, Ile-3-Me/Thr1-Me), 0.73 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, Ile-4-Me).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>73</sub>H<sub>90</sub>N<sub>18</sub>O<sub>18</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1699.508, gef.: 1699.508.

#### Einfach verkürztes oxidiertes ThioStrepton + 2-Propanthiol (**44**)



Einfach verkürztes, oxidiertes ThioStrepton **58** (70 mg, 0.044 mmol) wurde mit 2-Propanthiol (4.9 µL, 0.053 mmol, 1.2 Äquiv.) nach **AV1** zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen das *Michael*-Addukt **44** (20 mg, 0.012 mmol, 27 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:** *T<sub>m</sub>*: > 240 °C (Zersetzung).

## 8. Experimenteller Teil

---

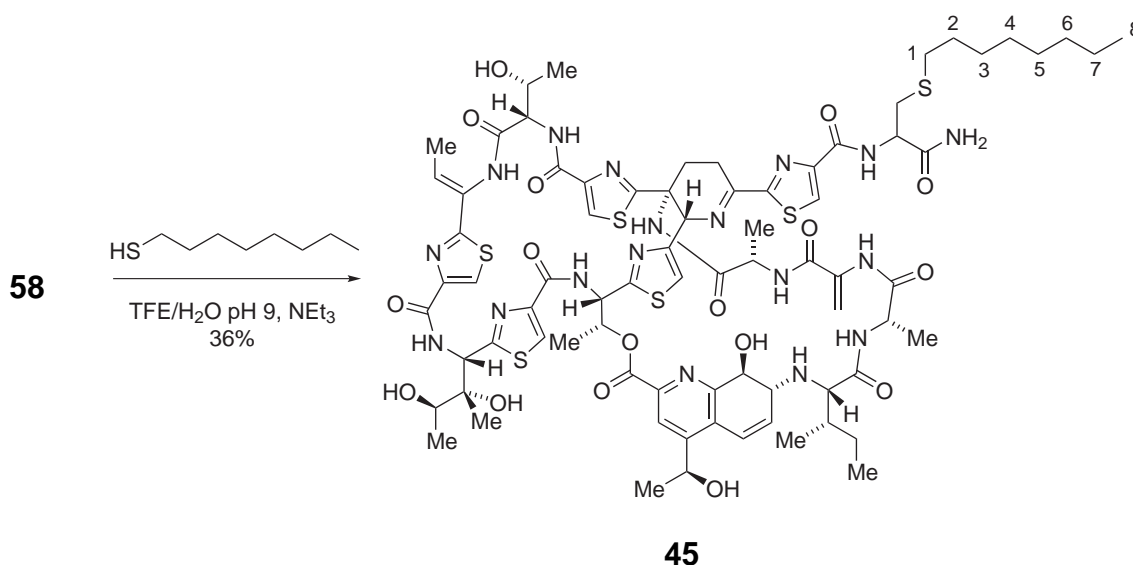
**DC:**  $R_f = 0.32$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode II:  $t_R = 10.32$  min; für [C<sub>72</sub>H<sub>88</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1669.5, gef.: 1669.2.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta = 8.06$  (s, 1H, Thz4-5), 8.05 (s, 1H, Thz2-5), 8.00 (s, 1H, Thz1-5), 7.85 (s, 1H, Thz-neu-5), 7.36 (s, 1H, Thz3-5), 7.11 (s, 1H, Q-3), 6.70 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H, Q-5), 6.19 (dd,  $J = 10.2, 5.5$  Hz, 1H, Q-6), 6.16 – 6.09 (m, 2H, Thr2-3/But-3), 5.69 (s, 1H, Deala1-3), 5.67 – 5.62 (m, 2H, Thr2-2/Thstn2), 5.19 (s, 1H, Deala1-3'), 5.17 – 5.11 (m,  $J = 6.9$  Hz, 2H, Q-11/Pip-6), 4.61 – 4.52 (m, 2H, alpha-Cys/Ala2-2), 4.35 (dd,  $J = 7.9, 3.6$  Hz, 1H, Thr1-2), 4.28 (s, 1H, Q-8), 3.88 (d,  $J = 13.5$  Hz, 1H, Pip4), 3.67 (q,  $J = 6.5$  Hz, 1H, Ala1-2), 3.65 – 3.57 (m, 1H, Thstn-4), 3.42 (dd,  $J = 5.8, 1.9$  Hz, 1H, Q-7), 3.22 – 3.18 (m, 1H, Pip-3), 2.94 – 2.80 (m, 3H, beta-Cys/1), 2.78 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1H, Ile-2), 2.74 – 2.67 (m, 1H, Pip-3'), 2.16 – 2.07 (m, 1H, Pip-4'), 1.66 (br s, 1H, Ile-3), 1.52 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Thr-2-Me), 1.47 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, But-Me), 1.44 – 1.38 (m, 1H, Thr1-3), 1.25 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Ala2-Me), 1.19 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.17 – 1.14 (m, 1H, Ile-4), 1.11 (dd,  $J = 6.7, 2.0$  Hz, 9H, 2-H<sub>3</sub>/2'-H<sub>3</sub>/beta-Cys), 1.03 – 0.96 (m, 6H, Thstn4-Me/Thstn3-Me), 0.96 – 0.88 (m, 1H, Ile-4'), 0.83 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, Thr1-Me), 0.79 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.70 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>72</sub>H<sub>88</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1669.497, gef.: 1669.498.

## Einfach verkürztes, oxidiertes Thiostrepton + 1-Octanthiol (45)



Einfach verkürztes, oxidiertes Thiostrepton **58** (100 mg, 0.063 mmol) wurde mit 1-Octanthiol (16  $\mu$ L, 0.094 mmol, 1.5 Äquiv.) nach **AV1** zum entsprechenden *Michael*-Addukt umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. und Reinigung mittels präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurde nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen das *Michael*-Addukt **45** (39 mg, 0.022 mmol, 36 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f$  = 0.38 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I: Zwei Diastereomere,  $t_R$  = 10.82/11.06 min; für [C<sub>77</sub>H<sub>98</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1739.6, gef.: 1739.3.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.09 (s, 1H, Thz4-5), 8.07 (s, 1H, Thz2-5), 8.04 (s, 1H, Thz1-5), 7.86 (s, 1H, Thz-neu-5), 7.39 (s, 1H, Thz3-5), 7.16 (s, 1H, Q-3), 6.73 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H, Q-5), 6.23 (dd,  $J$  = 9.4, 5.4 Hz, 1H, Q-6), 6.19 – 6.10 (m, 2H, Thr2-3/But-3), 5.72 – 5.63 (m, 3H, Deala1-3/Thr2-2/Thstn2), 5.22 – 5.12 (m, 3H, Deala1-3'/Q-11/Pip-6), 4.58 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H, alpha-Cys/Ala2-2), 4.38 (dd,  $J$  = 7.8, 3.7 Hz, 1H, Thr1-2), 4.25 (s, 1H, Q-8), 3.91 (d,  $J$  = 13.1 Hz, 1H, Pip4), 3.70 (q,  $J$  = 6.4 Hz, 1H, Ala1-2), 3.66 – 3.58 (m, 1H, Thstn-4), 3.45 (dd,  $J$  = 5.4, 1.9 Hz, 1H, Q-7), 2.87 (dd,  $J$  = 6.3, 2.8 Hz,

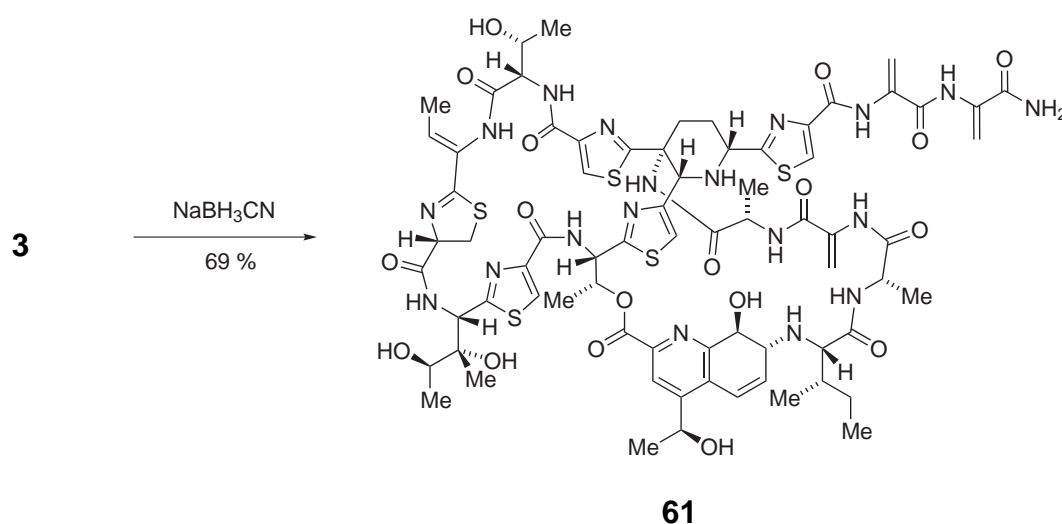
## 8. Experimenteller Teil

2H), 2.81 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H, Ile-2), 2.49 – 2.42 (m, 2H, 1-H<sub>2</sub>), 2.12 (dd,  $J = 13.2, 3.4$  Hz, 1H, Pip-4), 1.79 – 1.68 (m, 1H, Ile-3), 1.54 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Thr1-Me), 1.50 (d,  $J = 7.0$  Hz, 4H, But-Me/Thr1-Me), 1.46 – 1.37 (m, 2H, 2-H<sub>2</sub>), 1.28 (d,  $J = 5.6$  Hz, 3H, Ala2-Me), 1.23 (d,  $J = 6.6$  Hz, 5H, Q-11-Me/3-H<sub>2</sub>), 1.16 (s, 12H, Thstn4-Me/Ile-4/4-H<sub>2</sub>/5-H<sub>2</sub>/6-H<sub>2</sub>/7-H<sub>2</sub>), 1.06 – 0.98 (m, 6H, Thstn3-Me/Ala1-Me), 0.92 (m, 1H, Ile-4'), 0.87 – 0.77 (m, 6H, Ile-3-Me/Thr1-Me), 0.75 – 0.61 (m, 6H, Ile-4-Me/8-H<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>77</sub>H<sub>98</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1739.575, gef.: 1739.576.

### 8.3.8. Reduktion des Dehydro-Piperidins der Thiostreptonstruktur

#### Reduziertes Thiostrepton (61)



Thiostrepton **3** (200 mg, 0.120 mmol) wurde mit NaBH<sub>3</sub>CN (8.3 mg, 0.132 mmol, 1.1 Äquiv.) nach **AV3** in das entsprechende Piperidin-Derivat überführt. Nach präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurden 139 mg (0.083 mmol, 69 %) des reduzierten Thiostreptons **61** erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

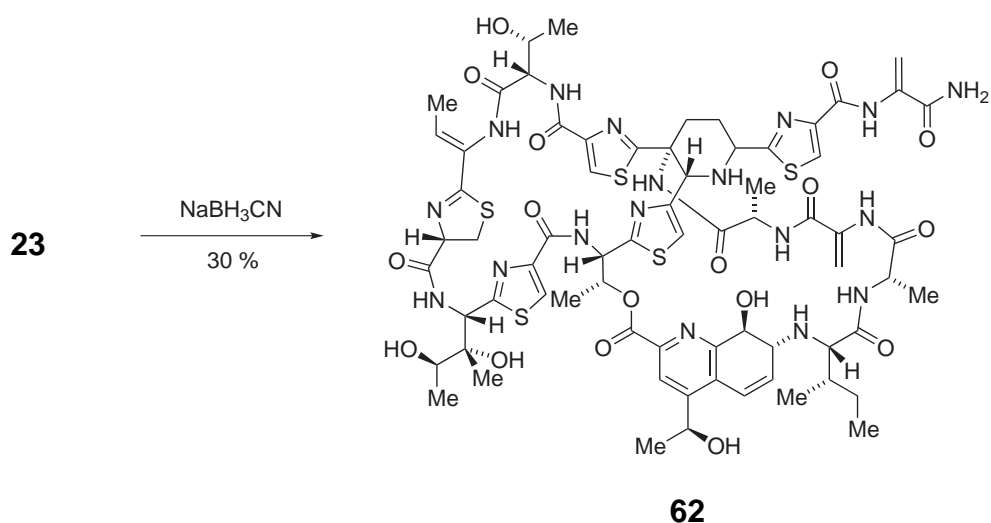
**DC:**  $R_f = 0.28$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 8.62$  min; für [C<sub>72</sub>H<sub>87</sub>N<sub>19</sub>O<sub>18</sub>S<sub>5</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1666,5, gef.: 1666.3.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.10 (s, 1H, Thz4-5), 8.01 (s, 1H, Thz2-5), 7.99 (s, 1H, Thz1-5), 7.33 (s, 1H, Thz3-5), 7.14 (s,  $J$  = 4.3 Hz, 1H, Q-3), 6.73 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H, Q-5), 6.47 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, Deala2-3), 6.30 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H, Deala3-3), 6.27 (dd,  $J$  = 13.9, 7.0 Hz, 1H, Thr2-3), 6.24 – 6.19 (m, 1H, Q-6), 6.05 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 1H, But-3), 5.67 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H, Deala1-3), 5.64 – 5.56 (m, 2H, Thr2-2/Thstn-2), 5.47 (s, 1H, Deala3-3'), 5.43 (s, 1H, Deala2-3'), 5.20 (s, 1H, Deala1-3'), 5.16 (q,  $J$  = 6.5 Hz, 1H, Q-11), 4.81 (dd,  $J$  = 12.4, 9.4 Hz, 1H, Cys-4), 4.70 (p,  $J$  = 6.6 Hz, 1H, Ala2-2), 4.36 (s, 1H, Pip-6), 4.31 – 4.22 (m, 3H, Q-8/Pip-2/Thr1-2), 3.70 – 3.62 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.51 – 3.43 (m, 2H, Cys-5/Q-7), 2.99 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 1H, Cys-5'), 2.81 (d,  $J$  = 4.4 Hz, 1H, Ile-2), 2.22 (d,  $J$  = 10.2 Hz, 1H, Pip-3), 2.03 – 1.94 (m, 1H, Pip-4'), 1.94 – 1.88 (m, 1H, Pip-3'), 1.77 – 1.69 (m, 1H, Ile-3), 1.58 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, Thr2-3), 1.46 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 3H, But-Me), 1.39 – 1.35 (m, 1H, Thr1-3), 1.33 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, Ala2-Me), 1.21 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, Q11-Me), 1.19 – 1.17 (m, 1H, Ile-4), 1.15 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H, Thstn-4-Me), 1.03 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, Ala1-Me), 0.99 (s, 3H, Thstn-3-Me), 0.97 – 0.92 (m, 1H, Ile-4'), 0.83 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.73 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H, Ile-5), 0.68 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 3H, Thr1-Me).

**<sup>13</sup>C-NMR:** 125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 125.1 (Thz1-5), 55.9 (Thr1-2), 66.8 (Thr1-3), 19.4 (Th1-Me), 15.7 (But-Me), 35.3 (Cys-5), 79.0 (Cys-4), 132.4 (But-3), 53.3 (Thstn-2), 17.5 (Thstn-3-Me), 67.6 (Thstn-4), 16.1 (Thstn-5), 125.1 (Thz2-5), 118.6 (Thz3-5), 55.9 (Thr2-2), 72.0 (Thr2-3), 18.9 (Thr2-Me), 64.4 (Q-11), 23.0 (Q-Me), 122.3 (Q-3), 123.4 (Q-5), 130.0 (Q-6), 59.5 (Q-7), 67.1 (Q-8), 66.4 (Ile-2), 38.7 (Ile-3), 11.4 (Ile-5), 15.8 (Ile-3-Me), 25.2 (Ile-4), 25.0 (Ile-4), 49.2 (Ala1-2), 19.1 (Ala1-Me), 102.2 (Deala1-3), 52.3 (Ala2-2), 19.1 (Ala2-Me), 58.2 (Pip-2), 28.4 (Pip-3), 33.5 (Pip-4), 62.1 (Pip-6), 124.6 (Thz4-5), 104.0 (Deala2-3), 104.1 (Deala3-3).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>72</sub>H<sub>87</sub>N<sub>19</sub>O<sub>18</sub>S<sub>5</sub>+2H<sup>+</sup>] ber.: 833.7613, gef.: 833.7618.

**Einfach verkürztes reduziertes Thiostrepton (62)**

Einfach verkürztes Thiostrepton **23** (100 mg, 0.063 mmol) wurde mit NaBH<sub>3</sub>CN (4.3 mg, 0.069 mmol, 1.1 Äquiv.) nach AV3 in das entsprechende Piperidin-Derivat überführt. Nach präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurden 30 mg (0.019 mmol, 30 %) des einfach verkürzten, reduzierten Thiostreptons **61** erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f$  = 0.30 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

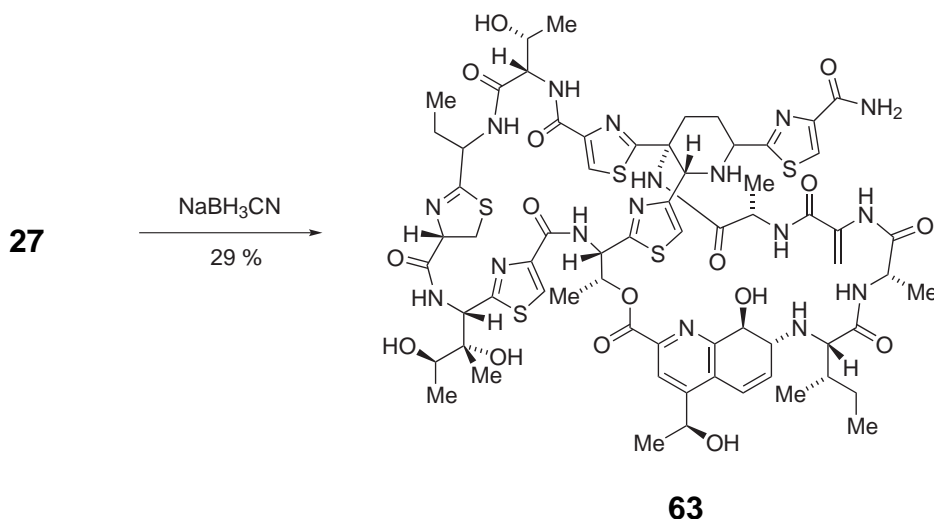
**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R$  = 8.53 min; für [C<sub>69</sub>H<sub>84</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>5</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1597.5, gef. 1597.2.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.10 (s, 1H, Thz4-5), 7.99 (s, 1H, Thz2-5), 7.96 (s, 1H, Thz1-5), 7.32 (s, 1H, Thz3-5), 7.15 (s, 1H, Q-3), 6.73 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H, Q-5), 6.39 (s, 1H, Deala1-2), 6.31 – 6.19 (m, 2H, Thr2-3/Q-6), 6.05 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 1H, But-3), 5.68 (s, 1H, Deala1-3), 5.66 – 5.55 (m, 2H, Thr2-2/Thstn-2), 5.44 (s, 1H, Deala2-3'), 5.19 (s, 1H, Deala1-3'), 5.15 (q,  $J$  = 6.2 Hz, 1H, Q-11), 4.81 (dd,  $J$  = 12.3, 9.7 Hz, 1H, Cys-4), 4.68 (q,  $J$  = 6.4 Hz, 1H, Ala2-2), 4.34 (s, 1H, Pip-6), 4.28 – 4.21 (m, 3H, Thr1-2/Pip-2/Q-8), 3.70 – 3.61 (m, 2H, Thstn-4/Ala1-2), 3.52 – 3.42 (m, 2H, Q-7/Cys-5), 3.00 (t,  $J$  = 12.1 Hz, 1H, Cys-5'), 2.81 (s, 1H, Ile-2), 2.21 (d,  $J$  = 13.7 Hz, 1H, Pip-3), 2.04 – 1.91 (m, 1H, Pip-4'), 1.90 – 1.85 (m, 1H, Pip-3'), 1.79 – 1.70 (m, 1H, Ile-3), 1.58 (d,  $J$

= 6.5 Hz, 3H, Thr2-3), 1.45 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, But-Me), 1.41 – 1.36 (m, 1H, Thr1-3), 1.31 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Ala2-Me), 1.23 – 1.19 (m, 3H, Q-11-Me), 1.14 (d,  $J = 6.4$  Hz, 4H, Thstn-4-Me/Ile-4), 1.03 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, Ala1-Me), 0.99 (s,  $J = 11.3$  Hz, 3H, Thstn-3-Me), 0.95 – 0.88 (m, 1H, Ile-4'), 0.84 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.72 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me), 0.65 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Thr1-Me).

**HRMS (ESI):** für  $[C_{69}H_{84}N_{18}O_{17}S_5+H^+]$  ber.: 1597.494, gef.: 1597.495.

### Zweifach verkürztes zweifach reduziertes Thiostrepton (63)



Einfach verkürztes Thiostrepton **27** (55 mg, 0.036 mmol) wurde mit  $NaBH_3CN$  (4.8 mg, 0.069 mmol, 2.1 Äquiv.) nach AV3 in das entsprechende Piperidin-Derivat überführt. Nach präparativer HPLC (C4 Säule,  $CH_3CN/H_2O$ ) wurden 16 mg (0.010 mmol, 29 %) des zweifach verkürzten, zweifach-reduzierten Thiostreptons **63** erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.29$  ( $CHCl_3/MeOH$  9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 7.82$  min; für  $[C_{66}H_{83}N_{17}O_{16}S_5+H^+]$  ber.: 1530.5, gef. 1530.2.

**$^1H$ -NMR:** 400 MHz,  $CDCl_3/MeOD$  4:1;  $\delta = 8.10$  (s, 1H, Thz4-5), 7.96 (d,  $J = 1.1$  Hz, 2H, Thz2-5/Thz1-5), 7.29 (s, 1H, Thz3-5), 7.13 (s, 1H, Q-3), 6.71 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H, Q-5),

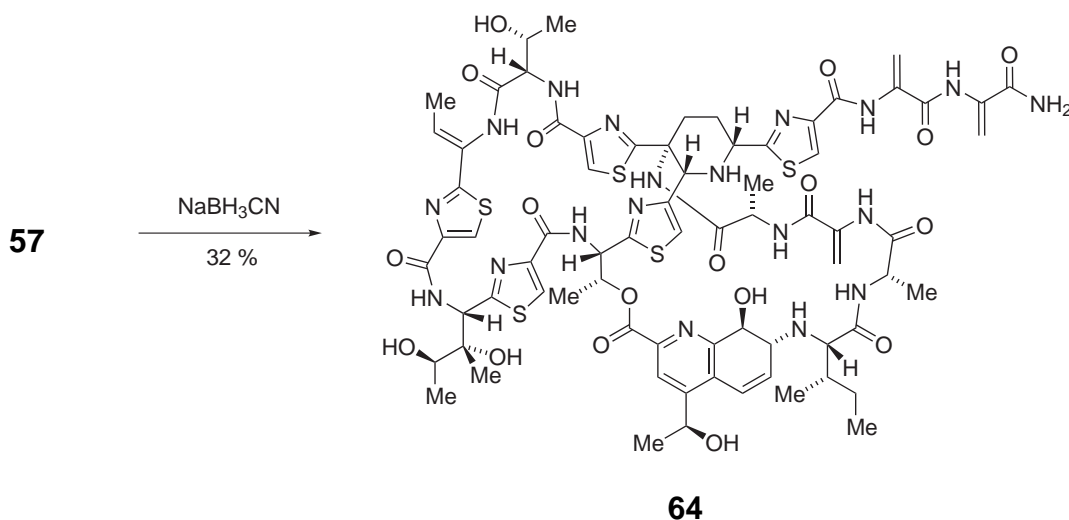
## 8. Experimenteller Teil

6.29 – 6.17 (m, 2H, Thr2-3/Q-6), 5.67 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, Deala1-3), 5.60 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, Thr2-2), 5.56 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H, Thstn2), 5.18 (s, 1H, Deala1-3'), 5.12 (q,  $J = 6.2$  Hz, 1H, Q-11), 4.80 (t,  $J = 10.6$  Hz, 1H, Cys-4), 4.77 – 4.72 (m, 1H, But-2), 4.70 – 4.61 (m, 1H, Ala2-2), 4.25 – 4.17 (m,  $J = 9.4$  Hz, 2H, Q8/Pip-6), 4.13 (dd,  $J = 7.5, 3.5$  Hz, 1H, Thr1-2), 3.96 – 3.88 (m, 1H, Pip-4), 3.69 – 3.59 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.52 (dd,  $J = 11.3, 9.4$  Hz, 1H, Cys-5), 3.44 (dd,  $J = 5.8, 2.1$  Hz, 1H, Q-7), 3.11 (t,  $J = 11.8$  Hz, 1H, Cys-5'), 2.80 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H, Ile-2), 2.16 (dd,  $J = 13.2, 3.0$  Hz, 1H, Pip-3), 2.03 – 1.92 (m, 1H, Pip-4'), 1.91 – 1.84 (m, 1H, Pip-3'), 1.80 – 1.68 (m, 1H, Ile-3), 1.66 – 1.59 (m, 1H, But-3), 1.56 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Thr2-Me), 1.46 – 1.40 (m, 1H, Thr1-3), 1.36 (dd,  $J = 14.4, 7.2$  Hz, 1H, But-3'), 1.29 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Ala2-Me), 1.20 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.12 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, Thstn-4-Me), 1.09 – 1.05 (m, 1H, Ile-4), 1.01 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, Ala1-Me), 0.99 (s, 3H, Thstn-3-Me), 0.95 – 0.87 (m, 1H, Ile-4'), 0.83 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.71 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me), 0.61 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, But-Me), 0.57 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, Thr-1-Me).

**HRMS (ESI):** für  $[C_{66}H_{83}N_{17}O_{16}S_5 + H^+]$  ber.: 1530.488, gef.: 1530.489.

### 8.3.9. Kombinierte Oxidation / Reduktion

#### Oxidiertes reduziertes Thiostrepton (64)





Oxidiertes Thiostrepton **57** (100 mg, 0.060 mmol) wurde mit NaBH<sub>3</sub>CN (4 mg, 0.066 mmol, 1.1 Äquiv.) nach **AV3** in das entsprechende Piperidin-Derivat überführt. Nach präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) wurden 35 mg (0.021 mmol, 32 %) des oxidierten, reduzierten Thiostreptons **64** erhalten.

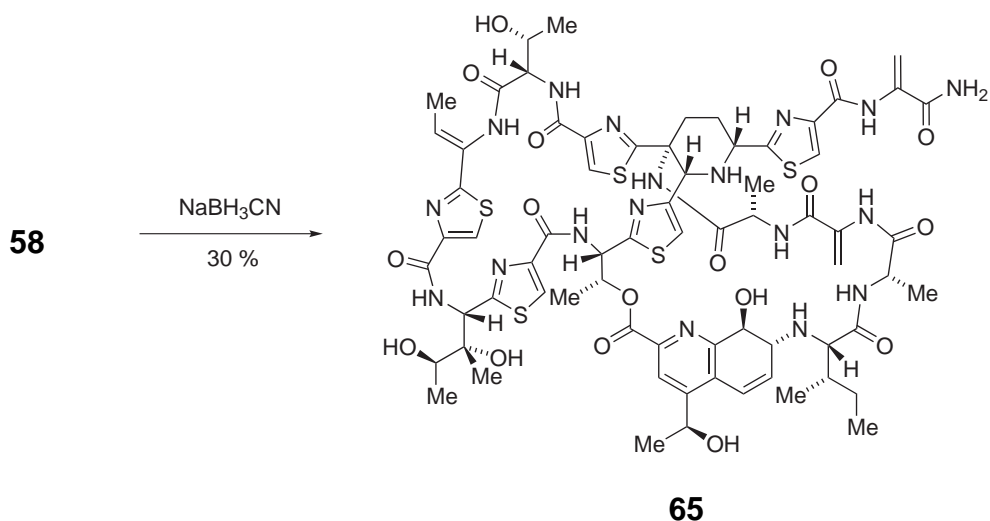
**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f$  = 0.30 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R$  = 8.29 min; für [C<sub>72</sub>H<sub>85</sub>N<sub>19</sub>O<sub>18</sub>S<sub>5</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1664.50, gef. 1664.24.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.10 (s, 1H, Thz4-5), 8.05 (s, 1H, Thz2-5), 8.03 (s, 1H, Thz1-5), 7.88 (s, 1H, Thz-neu-5), 7.34 (s, 1H, Thz3-5), 7.18 (s, 1H, Q-3), 6.75 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H, Q-5), 6.49 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, Deala3-3), 6.34 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, Deala2-3), 6.30 – 6.22 (m, 2H, Thr2-2/Thstn-2), 6.16 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, But-3), 5.73 – 5.70 (m, 2H, Deala1-3/Thr2-2), 5.69 (s, 1H Thstn-2), 5.49 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, Deala2-3'), 5.45 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, Deala3-3'), 5.22 (s, 1H, Deala1-3'), 5.18 (dd,  $J$  = 13.1, 6.5 Hz, 1H, Q-11), 4.73 (p,  $J$  = 6.4 Hz, 1H, Ala2-2), 4.42 – 4.37 (m, 2H, Pip-6/Thr1-2), 4.29 (d,  $J$  = 10.9 Hz, 2H, Q-8/Pip-2), 4.00 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, Pip-4), 3.73 (q,  $J$  = 6.3 Hz, 1H, Thstn-4), 3.69 – 3.63 (m, 1H, Ala1-2), 3.47 (dd,  $J$  = 5.7, 1.9 Hz, 1H, Q-7), 2.83 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 1H, Ile-2), 2.24 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 1H, Pip-3), 2.05 – 1.90 (m, 2H, Pip-4'/Pip-3'), 1.79 – 1.69 (m, 1H, Ile-3), 1.59 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, Thr2-3), 1.53 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H, But-Me), 1.51 – 1.46 (m, 1H, Thr1-3), 1.36 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, Ala2-Me), 1.25 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, Q-11-Me), 1.23 – 1.17 (m, 1H, Ile-4), 1.15 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H, Thstn-4-Me), 1.06 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 6H, Thstn-3-Me/Ala1-Me), 1.02 – 0.92 (m, 1H, Ile-4'), 0.89 – 0.83 (m, 6H, Ile-3-Me/Thr1-Me), 0.75 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H, Ile-4-Me).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>72</sub>H<sub>85</sub>N<sub>19</sub>O<sub>18</sub>S<sub>5</sub>+2H<sup>+</sup>] ber.: 832.7535, gef.: 832.7540.

**Oxidiertes, reduziertes, einfach verkürztes Thiostrepton (65)**

Oxidiertes, einfach verkürztes Thiostrepton **58** (100 mg, 0.063 mmol) wurde mit  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (4 mg, 0.069 mmol, 1.1 Äquiv.) nach **AV3** in das entsprechende Piperidin-Derivat überführt. Nach präparativer HPLC (C4 Säule,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ) wurden 30 mg (0.019 mmol, 30 %) des oxidierten, reduzierten Thiostreptons **65** erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.28$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1).

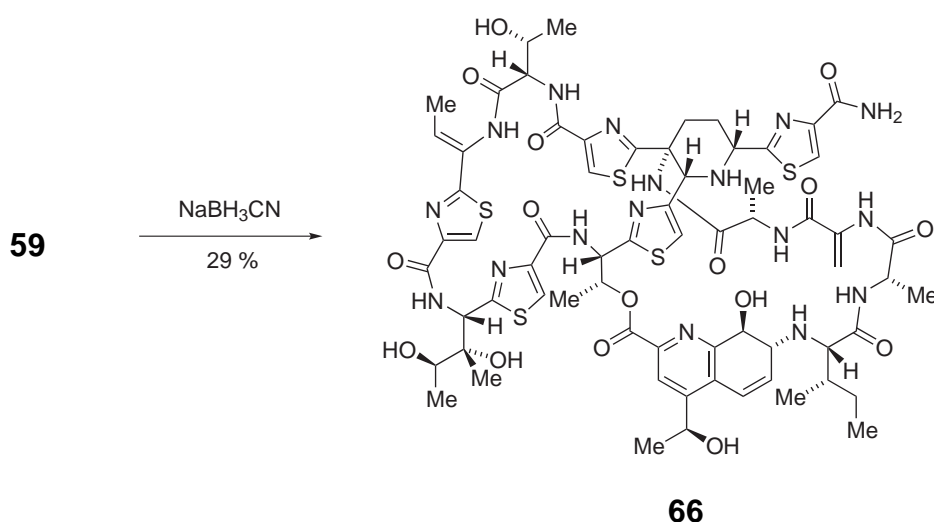
**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 8.27$  min; für  $[\text{C}_{69}\text{H}_{82}\text{N}_{18}\text{O}_{17}\text{S}_5 + \text{H}^+]$  ber.: 1595.5, gef.: 1595.3.

**$^1\text{H-NMR}$ :** 400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  4:1;  $\delta = 8.06$  (s, 1H, Thz4-5), 8.00 (s, 1H, Thz2-5), 7.95 (s, 1H, Thz1-5), 7.84 (s, 1H, Thz-neu-5), 7.29 (s, 1H, Thz3-5), 7.14 (s, 1H, Q-3), 6.71 (d,  $J = 9.9$  Hz, 1H, Q-5), 6.37 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, Deala2-3), 6.26 – 6.19 (m, 2H, Thr2-2/Thstn-2), 6.12 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H, But-3), 5.69 – 5.65 (m, 3H, Deala1-3/Thr2-2/Thstn-2), 5.44 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H, Deala2-3'), 5.19 (s, 1H, Deala1-3'), 5.14 (dd,  $J = 13.1, 6.5$  Hz, 1H, Q-11), 4.72 – 4.66 (m, 1H, Ala2-2), 4.36 – 4.33 (m, 2H, Pip-6/Thr1-2), 4.25 (s, 1H, Q-8), 4.22 (dd,  $J = 11.5, 3.1$  Hz, 1H, Pip-2), 3.93 (d,  $J = 13.2$  Hz, 1H, Pip-4), 3.68 (dd,  $J = 12.9, 6.4$  Hz, 1H, Thstn-4), 3.63 (dd,  $J = 13.5, 6.7$  Hz, 1H, Ala1-2), 3.43 (dd,  $J = 5.5, 1.6$  Hz, 1H, Q-7), 2.79 (d,  $J = 4.5$  Hz, 1H, Ile-2), 2.19 (dd,  $J = 13.2, 3.0$  Hz, 1H, Pip-3), 1.98

– 1.92 (m, 1H, Pip-4'), 1.88 – 1.79 (m, 1H, Pip-3'), 1.74 – 1.67 (m, 1H, Ile-3), 1.55 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Thr2-3), 1.48 (d,  $J = 7.0$  Hz, 4H, But-Me/Thr1-3), 1.30 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Ala2-Me), 1.21 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.19 – 1.12 (m, 1H, Ile-4), 1.10 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, Thstn-4-Me), 1.03 – 0.99 (m, 6H, Thstn-3-Me/Ala1-Me), 0.96 – 0.88 (m,  $J = 13.7, 9.2, 7.3$  Hz, 1H, Ile-4'), 0.81 (d,  $J = 6.8$  Hz, 6H, Thr1-Me/Ile-3-Me), 0.71 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me).

**HRMS (ESI):** für  $[C_{69}H_{82}N_{18}O_{17}S_5+H^+]$  ber.: 1595.478, gef.: 1595.479.

### Oxidiertes reduziertes zweifach verkürztes Thiostrepton (66)



Oxidiertes, zweifach verkürztes Thiostrepton **59** (100 mg, 0.066 mmol) wurde mit  $NaBH_3CN$  (16 mg, 0.264 mmol, 4.0 Äquiv.) nach **AV3** in das entsprechende Piperidin-Derivat überführt. Nach präparativer HPLC (C4 Säule,  $CH_3CN/H_2O$ ) wurden 29 mg (0.019 mmol, 29 %) des oxidierten, reduzierten Thiostreptons **66** erhalten.

**Schmp.:**  $T_m: > 240$  °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.31$  ( $CHCl_3/MeOH$  9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R = 8.07$  min; für  $[C_{66}H_{80}N_{17}O_{16}S_5+H^+]$  ber.: 1526.5, gef.: 1527.3.

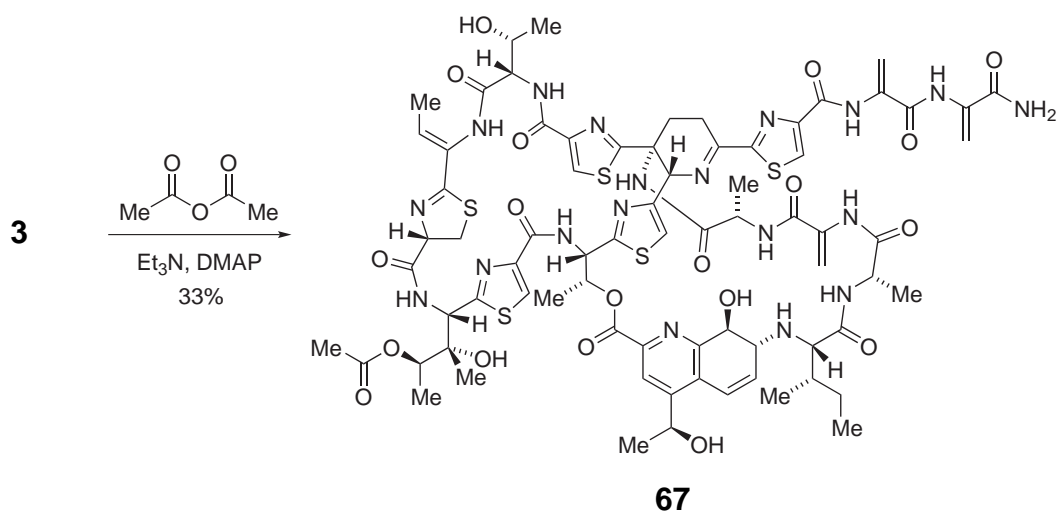
## 8. Experimenteller Teil

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.04 (s, 1H, Thz4-5), 7.99 (s, 1H, Thz2-5), 7.94 (s, 1H, Thz1-5), 7.83 (s, 1H, Thz-neu-5), 7.29 (s, 1H, Thz3-5), 7.12 (s, 1H, Q-3), 6.69 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H, Q-5), 6.22 – 6.15 (m, 2H, Thr2-3/Q-6), 6.11 (q,  $J$  = 7.0, 1H, But-3), 5.65 (d,  $J$  = 3.5 Hz, 2H, Thr2-2/Deala1-3), 5.63 (s, 1H, Thstn-2), 5.17 (s, 1H, Deala1-3'), 5.13 (dd,  $J$  = 12.9, 6.4 Hz, 1H, Q-11), 4.66 (dd,  $J$  = 13.1, 6.5 Hz, 1H, Ala2-2), 4.34 (s, 1H, Pip-6), 4.32 (d,  $J$  = 3.4 Hz, 1H, Thr1-2), 4.24 (s, 1H, Q-8), 3.94 (d,  $J$  = 13.1 Hz, 1H, Pip-4), 3.67 (dd,  $J$  = 12.9, 6.4 Hz, 1H, Thstn-4), 3.62 (dd,  $J$  = 13.5, 6.7 Hz, 1H, Ala-1-2), 3.41 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, Q-7), 2.77 (d,  $J$  = 4.3 Hz, 1H, Ile-2), 2.14 (dd,  $J$  = 12.8, 2.4 Hz, 1H, Pip-3), 1.94 (t,  $J$  = 13.2 Hz, 1H, Pip-4'), 1.88 – 1.79 (m, 1H- Pip-3'), 1.71 – 1.64 (m, 1H, Ile-3), 1.52 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H, Thr2-3), 1.47 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 4H, But-Me/Thr1-3), 1.27 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, Ala2-Me), 1.19 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H, Q-11-Me), 1.17 – 1.11 (m, 1H, Ile-4), 1.09 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 3H, Thstn-4-Me), 1.02 – 0.97 (m, 6H, Ala1-Me/Thstn-3-Me), 0.95 – 0.87 (m, 1H, Ile-4'), 0.81 – 0.76 (m, 6H, Ile-3-Me/Thr1-Me), 0.69 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H, Ile-4-Me).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>66</sub>H<sub>80</sub>N<sub>17</sub>O<sub>16</sub>S<sub>5</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1526.457, gef.: 1526.458.

### 8.3.10. Regioselektive Acylierung

#### Mono-acetyliertes Thiostrepton 67



Zu einer Lösung aus Thiostrepton **3** (50 mg, 0.030 mmol) in wasserfreiem THF (10 mL) wurde Essigsäureanhydrid (6.3  $\mu$ L, 0.066 mmol, 2.2 Äquiv.), gefolgt von Triethylamin (9.2  $\mu$ L, 0.066 mmol, 2.2 Äquiv.) und Dimethylaminopyridin (DMAP) (1.1 mg, 0.009 mmol, 0.3 Äquiv.) unter Rühren bei RT hinzugegeben. Nach 13 h wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und das Produkt mittels präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) gereinigt. Es wurden 17 mg des acetylierten Thiostreptons **67** (0.010 mmol, 33 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f$  = 0.31 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode I:  $t_R$  = 9.54 min; [C<sub>74</sub>H<sub>87</sub>N<sub>19</sub>O<sub>19</sub>S<sub>5</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1706.5, gef.: 1706.1.

**HPLC:** Methode A:  $t_R$  = 15.5 min.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.14 (s, 1H, Thz4-5), 8.13 (s, 1H, Thz2-5), 8.02 (s, 1H, Thz1-5), 7.40 (s, 1H, Thz3-5), 7.15 (s, 1H, Q-3), 6.75 (d,  $J$  = 10.1 Hz, 1H, Q-5), 6.55 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, Deala3-3), 6.38 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, Deala2-3), 6.27 – 6.19 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.07 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, But-3), 5.68 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, Deala1-3), 5.66 – 5.61 (m, 1H, Thr2-2), 5.55 – 5.50 (m, 2H, Deala2-3'/Thstn-2), 5.46 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, Deala3-3'), 5.20 (s, 1H, Deala1-3'), 5.18 – 5.13 (m, 2H, Q-11/Pip-6), 4.90 (q,  $J$  = 6.2 Hz, 1H, Thstn-4), 4.81 – 4.72 (m, 1H, Cys-4), 4.63 – 4.56 (m, 1H, Ala2-2), 4.31 – 4.25 (m, 2H, Thr1-2/Q-8), 3.66 (q,  $J$  = 6.7 Hz, 1H, Ala1-2), 3.49 – 3.40 (m, 2H, Q-7/Cys-5), 3.33 (d,  $J$  = 18.3 Hz, 1H, Pip-3), 3.06 (t,  $J$  = 12.0 Hz, 1H, Cys-5), 2.82 (d,  $J$  = 4.4 Hz, 1H, Ile-2), 2.79 – 2.75 (m, 1H, Pip-3'), 2.21 – 2.11 (m, 1H, Pip-4'), 1.96 (s, 3H, Ac-Me), 1.74 (br s, 1H, Ile-3), 1.57 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, Thr2-Me), 1.45 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 3H, But-Me), 1.41 – 1.38 (m, 1H, Thr1-3), 1.29 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, Ala2-Me), 1.23 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 4H, Q-11-Me/Ile-4), 1.20 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H, Thstn-4-Me), 1.13 (s, 3H, Thstn-3-Me), 1.03 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, Ala1-Me), 0.99 – 0.91 (m, 1H, Ile-4'), 0.85 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.74 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H, Ile-4-Me), 0.68 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 3H, Thr1-Me).

**<sup>13</sup>C-NMR:** 100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 11.6 (Ile-4-Me), 14.1 (Thstn-4-Me), 15.4 (But-Me), 15.8 (Ile-3-Me), 18.9 (Thr2-3-Me), 19.1 (Thr1-Me), 19.2 (Ala1-3), 19.4 (Ala2-3),

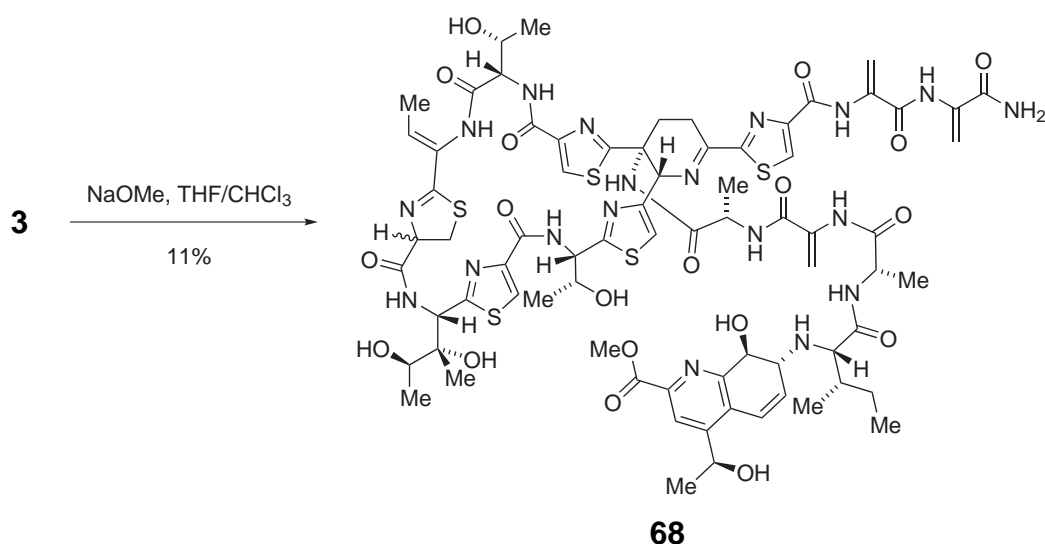
## 8. Experimenteller Teil

20.0 (Thstn-3-Me), 21.0 (Ac-Me), 22.7 (Q-11-Me), 24.5 (Ile-4), 24.9 (Pip-3), 29.2 (Pip-4), 34.1 (Cys-5), 38.5 (Ile-3), 49.4 (Ala1-2), 51.9 (Thstn-2), 51.9 (Ala2-2), 55.8 (Thr2-2) 55.8 (Thr1-2), 57.9 (Pip-5) 59.0 (Q-7), 64.2 (Pip-6), 64.3 (Q-11), 65.6 (Ile-2), 66.3 (Thr1-3), 67.6 (Q-8), 69.8 (Thstn-4), 72.2 (Thr2-3), 76.1 (Thstn-3), 79.1 (Cys-4), 103.1 (Deala1-3), 103.4 (Deala3-3), 104.5 (Deala2-3), 118.6 (Thz3-5), 122.4 (Q-3), 123.1 (Q-5), 124.9 (Thz1-5), 125.7 (Thz2-5), 127.5 (Q-2), 127.7 (Thz4-5), 130.2 (Q-6), 132.5 (Deala1-2), 132.9 (But-3), 133.0 (But-2), 133.1 (Deala2-2), 134.4 (Deala3-2), 146.5 (Thz1-4), 150.1 (Thz4-4), 154.2 (Q-4), 157.4 (Thz3-4), 161.2 (Q-CO), 162.0 (Thz1-CO), 162.4 (Deala3-CO), 162.4 (Pip-2), 164.0 (Deala1-CO), 165.7 (Thr1-CO), 166.3 (Deala2-CO), 167.0 (Thz2-2), 168.6 (Thr4-2), 169.2 (Ala1-CO), 169.2 (Cys-2), 169.3 (Q-9), 170.0 (Thz1-2), 170.4 (Thz3-2), 170.5 (Thz3-2), 171.0 (Cys-CO), 171.1 (Ac-CO), 173.6 (Ala2-CO), 174.0 (Ile-CO).

**HRMS (ESI):** für  $[C_{74}H_{87}N_{19}O_{19}S_5+2H^+]$  ber.: 853.759, gef.: 853.760.

### 8.3.11. Hydrolyse des B-Ring-Lactons

#### B-Ring-geöffnetes Thiostrepton (68)



Thiostrepton **3** (200 mg, 0.120 mmol) wurde in wasserfreiem MeOH/CHCl<sub>3</sub> (2:1, 10 mL) gelöst und bei 0 °C mit NaOMe-Lösung (1 M in MeOH, 40 µL, 0.33 Äquiv.) versetzt. Die

Reaktionsmischung wurde für 6 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Kieselgelchromatographie (5–10% MeOH in CHCl<sub>3</sub>) und anschließend mittels präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) gereinigt. Nach Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen konnte das im B-Ring geöffnete ThioStrepton **68** (Diastereomerengemisch) als farbloser Feststoff erhalten werden (23 mg, 0.014 mmol, 11 %).

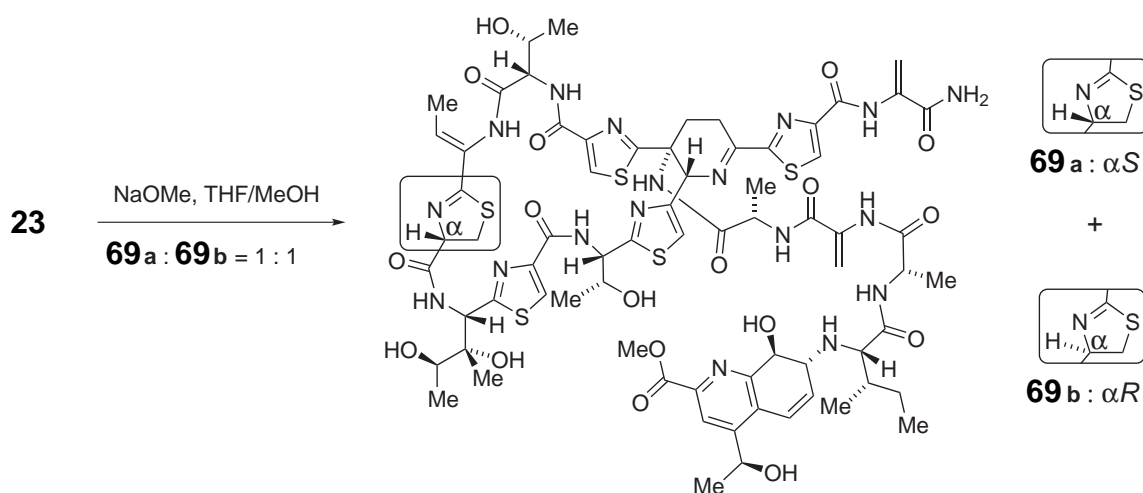
**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.28$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**HPLC:** Methode A:  $t_R = 11.3$  min.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta = 8.10$  (s, 1H, Thz4-5), 8.01 (s, 1H, Thz2-5), 7.98 (s, 1H, Thz1-5), 7.82 (s, 1H, Thz3-5), 6.68 (s, 1H, Q-3), 6.54 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H, Q-5), 6.43 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, Deala2-3), 6.24 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H, Deala3-3), 6.18 (q,  $J = 6.4$  Hz, 1H, But-3), 5.95 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H, Q-6), 5.65 (s, 1H), 5.49 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H, Deala3-3'), 5.43 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, Deala2-3'), 5.41 – 5.36 (m, 1H), 5.35 – 5.29 (m, 2H, Deala1-3), 4.97 (t,  $J = 9.0$  Hz, 1H, Cys-4), 4.89 – 4.81 (m, 1H, Ala2-2), 4.79 – 4.75 (m, 2H, Pip-6), 4.62 (d,  $J = 11.5$  Hz, 1H, Q-8), 4.32 – 4.27 (m, 2H, Thr1-2), 3.77 (s, 3H, OMe), 3.61 (q,  $J = 6.6$  Hz, 1H), 3.51 – 3.37 (m, 3H, Q-7/Cys-5/Pip-4), 3.24 (dd,  $J = 11.4$ , 8.5 Hz, 1H, Cys-5'), 3.21 – 3.15 (m, 2H, Ile-2/Pip-3), 2.75 – 2.67 (m, 1H, Pip-3'), 2.26 (t,  $J = 12.3$  Hz, 1H, Pip-4'), 1.75 – 1.66 (m, 1H, Ile-3), 1.50 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, But-Me), 1.35 – 1.28 (m, 1H, Ile-4), 1.25 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.23 – 1.17 (m, 6H, Ala2-Me), 1.11 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H), 1.07 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H), 1.00 (d,  $J = 6.5$  Hz, 4H, Ile-4'), 0.88 (s, 3H, Thstn-3-Me), 0.80 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.70 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, Ile-4-Me).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>73</sub>H<sub>89</sub>N<sub>19</sub>O<sub>19</sub>S<sub>5</sub>+2H<sup>+</sup>] ber.: 848.7671, gef.: 848.7672.

**B-Ring-geöffnetes verkürztes Thiostrepton, Epimere (69a / 69b)**

Verkürztes Thiostrepton **23** (150 mg, 0.09 mmol) wurde in wasserfreiem MeOH / THF (8:3, 11 mL) gelöst und bei 0 °C mit NaOMe-Lösung (1 M in MeOH, 60  $\mu$ L, 0.67 Äquiv.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 8 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand durch Kieselgelchromatographie (5–10% MeOH in  $\text{CHCl}_3$ ) und präparative HPLC (C4 Säule,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ) gereinigt. Nach Lyophilisieren der Reifractionen konnten die beiden Epimere des B-Ring-geöffneten, verkürzten Thiostreptons **69a** (7 mg, 0.004 mmol, 4 %) und **69b** (6 mg, 0.004 mmol, 4 %) als farblose Feststoffe erhalten werden.

**Epimer 69a.**

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.16$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1).

**LCMS (ESI):** Methode II:  $t_R = 7.96$  min; für  $[\text{C}_{70}\text{H}_{86}\text{N}_{18}\text{O}_{18}\text{S}_5 + \text{H}^+]$  ber.: 1627.5, gef.: 1627.2.

**HPLC:** Methode A:  $t_R = 10.9$  min.

**$^1\text{H-NMR}$ :** 400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  4:1;  $\delta = 8.06$  (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.66 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.07 (s, 1H), 6.03 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 5.53



(s, 1H), 5.49 (s, 2H), 5.46 – 5.41 (m, 1H), 5.29 (s, 1H), 4.98 – 4.85 (m, 3H), 4.77 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H), 4.17 – 4.11 (m,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 3.85 – 3.81 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.66 (dd,  $J = 12.5, 6.1$  Hz, 3H), 3.52 – 3.47 (m, 1H), 3.36 – 3.25 (m, 1H), 2.92 – 2.85 (m, 1H), 2.77 (s, 1H), 1.85 – 1.75 (m, 2H), 1.61 (t,  $J = 8.7$  Hz, 3H), 1.46 – 1.37 (m, 3H), 1.31 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.29 – 1.22 (m, 6H), 1.22 – 1.15 (m, 1H), 1.09 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H), 1.04 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.88 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 0.78 (s, 3H).

**HRMS (ESI):** für  $[\text{C}_{70}\text{H}_{86}\text{N}_{18}\text{O}_{18}\text{S}_5 + \text{H}^+]$  ber.: 1627.504, gef.: 1627.505.

**Epimer 69b.**

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f = 0.18$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1).

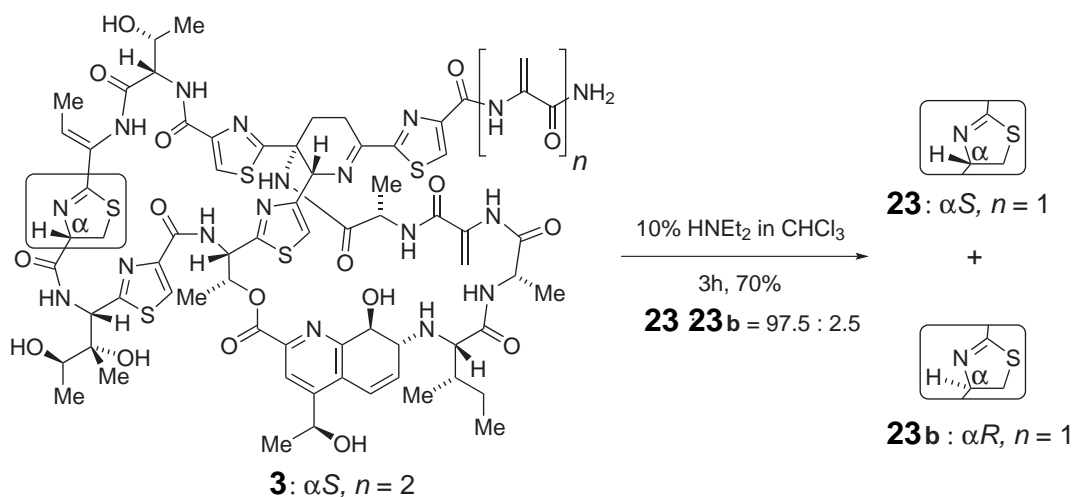
**LCMS (ESI):** Methode II:  $t_R = 8.13$  min; für  $[\text{C}_{70}\text{H}_{86}\text{N}_{18}\text{O}_{18}\text{S}_5 + \text{H}^+]$  ber.: 1627.5, gef.: 1627.2.

**HPLC:** Methode A:  $t_R = 11.2$  min.

**$^1\text{H-NMR}$ :** 400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  4:1;  $\delta = 8.07$  (s, 1H), 8.01 (s, 2H), 7.81 (s, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.67 (d,  $J = 10.2$  Hz, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.18 (s, 1H), 6.03 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 5.72 – 5.64 (m, 1H), 5.48 (d,  $J = 1.3$  Hz, 2H), 5.45 – 5.40 (m, 1H), 5.25 (s, 1H), 4.90 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 4.85 – 4.79 (m, 1H), 4.75 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H), 4.40 (s, 1H), 4.36 – 4.31 (m, 1H), 4.20 – 4.13 (m, 4H), 3.84 – 3.81 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.62 – 3.53 (m, 3H), 3.46 – 3.39 (m, 3H), 2.92 – 2.85 (m, 1H), 1.84 – 1.76 (m, 1H), 1.67 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 1.46 – 1.39 (m,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 1.29 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.27 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 1.25 – 1.21 (m, 3H), 1.20 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.12 – 1.07 (m, 3H), 1.04 (d,  $J = 5.8$  Hz, 3H), 0.86 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 0.77 (dd,  $J = 9.3, 5.4$  Hz, 3H).

**HRMS (ESI):** für  $[\text{C}_{70}\text{H}_{86}\text{N}_{18}\text{O}_{18}\text{S}_5 + \text{H}^+]$  ber.: 1627.504, gef.: 1627.505.

## 8.3.12. Epimerisierung des Thiazolins

L-Epimer des verkürzten Thiostreptons (**23b**)

Thiostrepton **3** (1.0 g, 0.601 mmol) wurde unter Rühren in CHCl<sub>3</sub> (50 mL) gelöst und bei 0 °C tropfenweise mit HNEt<sub>2</sub> (5 mL) versetzt. Nach 10 min wurde die Reaktion bei RT für 3 h weitergerührt. Nach Entfernen der Lösungsmittels und Kieselgelchromatographie (2–5 % MeOH in CHCl<sub>3</sub>) wurden 671 mg (0.420 mmol, 70 %) des einfach verkürzten Thiostreptons **23** als farbloser Feststoff erhalten (s.o.).

Das L-Epimer ( $\alpha R$ ) **23b** konnte durch präparative HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) der Mischfraktionen rein isoliert werden (8 mg, 0.005 mmol, 0.7%).

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f$  = 0.31 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1).

**LCMS (ESI):** Methode II:  $t_R$  = 7.06 min; für [C<sub>69</sub>H<sub>83</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>5</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1595.5, gef.: 1595.5.

**HPLC:**  $t_R$  = 12.1 min (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O-Gradient: 10% CH<sub>3</sub>CN für 1 min; 10% bis 70% CH<sub>3</sub>CN in 16 min; 100% CH<sub>3</sub>CN für 2 min).

**<sup>1</sup>H-NMR:** 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta$  = 8.09 (s, 2H, Thz4-5/Thz2-5), 8.06 (s, 1H, Thz1-5), 7.40 (s, 1H, Thz3-5), 7.13 (s, 1H, Q-3), 6.71 (d,  $J$  = 10.2 Hz, 1H, Q-5), 6.47 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, Deala2-3), 6.27 – 6.16 (m, 2H, Q-6/Thr2-3), 6.09 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 1H, But-3),

5.72 – 5.66 (m, 2H, Thstn-2/Deala1-3), 5.49 (d,  $J = 1.6$  Hz, 1H, Deala2-3'), 5.37 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, Thr2-2), 5.26 (s, 1H, Pip-6), 5.18 (s, 1H, Deala1-3'), 5.14 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H, Q-11), 4.64 (dd,  $J = 13.4, 8.7$  Hz, 1H, Cys-4), 4.59 – 4.55 (m, 1H, Ala2-2), 4.31 (dd,  $J = 7.7, 4.0$  Hz, 1H, Thr1-2), 4.18 (s, 1H, Q-8), 3.88 (d,  $J = 14.0$  Hz, 1H, Pip-4), 3.69 – 3.59 (m, 2H, Ala1-2/Thstn-4), 3.47 (dd,  $J = 5.6, 2.1$  Hz, 1H, Q-7), 3.42 (dd,  $J = 11.2, 8.7$  Hz, 1H, Cys-5), 3.15 – 3.09 (m, 1H, Cys-5'), 2.80 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1H, Ile-2), 2.78 – 2.71 (m, 1H, Pip-3), 2.12 (dd,  $J = 13.0, 9.0$  Hz, 1H, Pip-4'), 1.97 – 1.87 (m, 1H, Thr1-3), 1.73 – 1.63 (m, 1H, Ile-3), 1.55 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, Thr2-Me), 1.52 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, But-Me), 1.27 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Ala2-Me), 1.24 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, Q-11-Me), 1.20 – 1.13 (m, 1H, Ile-4), 1.07 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, Ala1-Me), 1.04 – 0.98 (m, 6H, Thstn-3-Me/Thstn-4-Me), 0.97 – 0.88 (m, 1H, Ile-4'), 0.83 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, Ile-3-Me), 0.72 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H, Ile-4-Me), 0.58 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, Thr1-Me).

**<sup>13</sup>C-NMR:** 125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 4:1;  $\delta = 11.6$  (Ile-5), 14.0 (But-Me), 15.8 (Ile-3-Me), 16.6 (Thstn-5), 18.5 (Thr1-Me), 18.8 (Thr2-Me), 18.9 (Ala2-Me), 19.0 (Ala1-Me), 20.1 (Thstn-3-Me), 23.0 (Q-Me), 24.8 (Pip-3), 24.9 (Ile-4), 29.8 (Pip-4), 35.5 (Cys-5), 38.6 (Ile-3), 49.3 (Ala1-2), 52.2 (Ala2-2), 54.8 (Thstn-2), 55.3 (Thr2-2), 55.5 (Thr1-2), 58.1 (Pip-5), 59.2 (Q-7), 64.2 (Pip-6), 64.6 (Q-11), 66.1 (Ile-2), 66.4 (Thr1-3), 67.4 (Q-8), 69.3 (Thstn-4), 72.8 (Thr2-3), 76.4 (Thstn-3), 79.5 (Cys-4), 102.4 (Deala1-3), 103.8 (Deala2-3), 117.6 (Thz3-5), 122.2 (Q-3), 123.3 (Q-5), 124.6 (Thz2-5), 125.3 (Thz1-5), 127.0 (Q-10), 127.6 (Thz4-5), 129.0 (But-2), 129.9 (Q-6), 132.3 (Deala1-2), 133.3 (Deala2-2), 135.4 (But-3), 146.2 (Thz1-4), 149.7 (Thz2-4), 150.2 (Thz4-4), 153.5 (Q-4), 154.4 (Q-9), 157.5 (Thz3-4), 159.6 (Thz4-CO), 160.9 (Q-CO), 161.6 (Thz1-CO), 161.8 (Pip-2), 162.0 (Thz2-CO), 163.0 (Deala1-CO), 166.1 (Deala2-CO), 167.0 (Thz2-2), 168.2 (Thz4-2), 168.5 (Ala1-CO), 168.7 (Thr1-CO), 168.8 (Cys-2), 170.0 (Thz3-2), 170.1 (Thz1-2), 171.3 (Cys-CO), 173.0 (Ala2-CO), 173.9 (Ile-CO).

**HRMS (ESI):** für [C<sub>69</sub>H<sub>83</sub>N<sub>18</sub>O<sub>17</sub>S<sub>5</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1595.478, gef.: 1595.479.

### 8.4. H/D-Austauschkinetik: Thiostrepton

10 mg Thiostrepton **3** wurden in 500  $\mu\text{L}$  THF- $d_8$  gelöst und mit 95  $\mu\text{L}$  Puffer (50 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 12) versetzt. Die  $^1\text{H}$ -Spektren wurden auf einem Varian 400 MHz Spektrometer nach vorgegebenen Zeitintervallen automatisch aufgenommen (Programmierung eines *arrays* mit *preacquisition delay*). Die Rohdaten wurden prozessiert und das jeweils zum  $\alpha$ -Proton des Thiazolins gehörige Signal (bei 5.1 ppm) für jedes aufgenommene Spektrum integriert. Die Werte wurden auf nicht-austauschende Protonen normalisiert und gegen die Zeit aufgetragen. An die Daten konnte ein Modell eines biexponentiellen Abfalls nach der Gleichung (8.3) angepasst werden.

$$y = A_1 * e^{(-x/t_1)} + A_2 * e^{(-x/t_2)} + y_0 \quad (8.3)$$

### 8.5. Löslichkeitsuntersuchungen

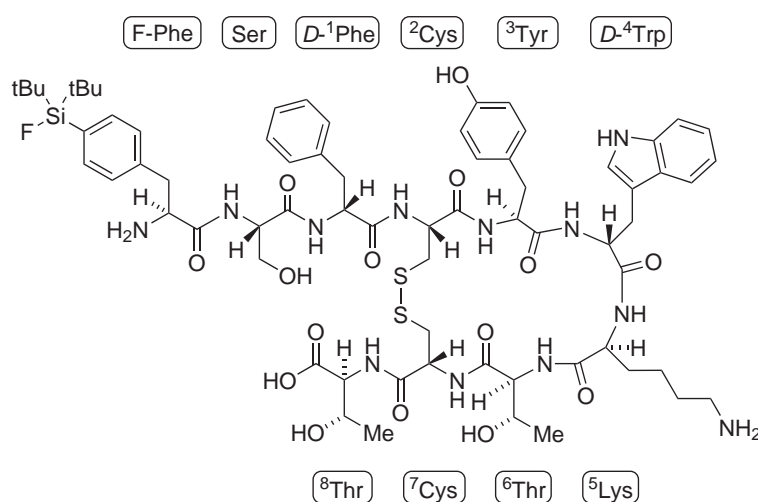
Für Löslichkeitsuntersuchungen wurden 4 mM Trifluorethanol-Lösungen der zu testenden Substanzen mit definierten Konzentrationen (4 mM) hergestellt, jeweils 20  $\mu\text{L}$  in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in der *Speed-Vac* bei RT eingedampft. Anschließend wurden 150  $\mu\text{L}$  Pufferlösung (50 mM Natriumphosphat, pH 7) hinzupipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden bei 37 °C im Thermomixer über einen Zeitraum von 15 h geschüttelt (1000 rpm) und nachfolgend zentrifugiert. Jeweils 60  $\mu\text{L}$  des Überstands wurden in HPLC-Probengefäße überführt und mit 10  $\mu\text{L}$  Trifluorethanol versetzt, welches 0.25 mg/mL 5(6)-Nitrobenzimidazol (CAS 94-52-0) als Standard enthielt. Für jeden HPLC-Lauf wurde ein Volumen von 15  $\mu\text{L}$  direkt in die analytische HPLC injiziert. Die Flächen der entsprechenden HPLC-Peaks wurden integriert und die Werte jeweils auf die Höhe des internen Standard-Peaks normiert.

Zur Bestimmung einer Eichgeraden wurde eine 1 mg/mL-Lösung von Thiostrepton **3** in Trifluorethanol hergestellt und die Konzentration UV-spektrometrisch bei 280 nm ( $\epsilon_{280} = 0.027 \text{ cm}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ) überprüft. Die Lösung wurde eingeeengt und der unlösliche Niederschlag in einem entsprechenden Volumen Trifluorethanol (mit internem Standard) wieder aufgenommen, so dass die vorgegebene Konzentration erreicht wurde. Anschlie-

ßend wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, wobei für jeden Verdünnungsschritt die selbe Standard-Lösung in TFE verwendet wurde. Insgesamt acht Verdünnungslösungen wurden auf diese Weise angesetzt, die mittels analytischer HPLC direkt analysiert wurden (15 µL pro Lauf). Die Flächen der entsprechenden HPLC-Signale wurden integriert und die Werte jeweils auf die Höhe des internen Standard-Signals normiert. Nach Auftragung der Konzentration gegen die Fläche konnte eine Eichgerade durch die Messpunkte gelegt werden, die zur Quantifizierung der Konzentrationen der Thiostreptonderivate aus der Löslichkeitsuntersuchung benutzt wurde.

## 8.6. Octreotat-Peptid

### Octreotat-Analogon (151)



**151**

2-Chlortritylharz (2.0 g, 1.55 mmol/g) wurde nach AV4 mit Fmoc-Thr(OtBu)-OH beladen. Die Beladungsbestimmung nach AV5 lieferte einen Wert von 0.650 mmol/g Harz. Das 9-mer Vorläuferpeptid wurde mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese nach AV6 an dem Fmoc-Thr(OtBu)-beladenen 2-Chlortritylharz (0.369 mmol, 568 mg) synthetisiert. Als Schutzgruppenstrategie wurde Fmoc/t-Bu gewählt und HBTU als Kupplungsreagenz verwendet. Nach manueller Entschützung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mittels 20 % Piperidin in DMF (8 + 22 min) wurde die finale

## 8. Experimenteller Teil

---

Boc-geschützte L-SiFA-Aminosäure (383 mg, 0.9 mmol, 1.8 Äquiv.) mit HBTU (455 mg, 1.2 mmol, 2.4 Äquiv.) und DIPEA (248  $\mu$ L, 1.5 mmol, 3.0 Äquiv.) an das harzgebundene Peptid gekuppelt (0.5 M HBTU in DMF, 20 h Reaktionszeit). Das Abspalten der Aminosäure-Schutzgruppen und das Abspalten des 10-mer Peptids vom Harz wurde durch Behandlung des Harzes mit 7 mL Abspalllösung (95 % TFA, 2.5 % H<sub>2</sub>O, 2.5 % Triethylsilan) über 1 h durchgeführt. Der überwiegende Teil der Trifluoressigsäure wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Peptid mit kaltem MTBE (0 °C) ausgefällt, abzentrifugiert und nach Abheben des Überstands getrocknet. Zur vollständigen Spaltung der aus der Boc-Gruppe resultierenden stabilen Carbaminsäure des Tryptophans wurde das Rohpeptid in Methanol/H<sub>2</sub>O (1:1) gelöst und mit Trifluoressigsäure (250  $\mu$ L) für 1.5 h bei 40 °C versetzt. Die flüchtigen Bestandteile wurden am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohpeptid zum farblosen Pulver (445 mg) gefriergetrocknet. Zur Oxidation der beiden Thiole des Peptids zum intramolekularen Disulfid wurde das Peptid in Methanollösung (0.3 M) mit DIPEA (10.0 Äquiv.) in einer gesättigten Sauerstoffatmosphäre über 72 h behandelt. Nach präparativer HPLC (C4 Säule, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/0.1 % TFA) und Lyophilisieren der entsprechenden Fraktionen wurden 102 mg (0.071 mmol, 19 %) des 10-mer Peptids **151** als farbloser Feststoff erhalten.

**Schmp.:**  $T_m$ : > 240 °C (Zersetzung).

**DC:**  $R_f$  = 0.03 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1 + 2 % Ameisensäure).

**LCMS (ESI):** Methode II:  $t_R$  = 7.05 min; für [C<sub>69</sub>H<sub>95</sub>N<sub>12</sub>O<sub>15</sub>S<sub>2</sub>F<sub>1</sub>Si<sub>1</sub>+H<sup>+</sup>] ber.: 1443.6, gef.: 1443.4.

**<sup>1</sup>H-NMR:** 600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>;  $\delta$  = 10.80 (s, 1H, Thr4-Ar1-NH), 8.98 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, Cys2-NH), 8.77 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H, Trp4-NH), 8.69 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 1H, Ser-NH), 8.58 – 8.52 (m, 2H, Tyr3-NH/Cys7-NH), 8.35 – 8.28 (m, 2H, Lys5-NH/Thr8-NH), 8.17 – 8.00 (m, 3H, Phe1-NH/F-Phe-NH<sub>2</sub>), 7.78 – 7.63 (m, 2H, Lys5-NH<sub>2</sub>), 7.59 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 1H, Thr6-NH), 7.47 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 2H, F-Phe-Ar2), 7.42 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, Trp4-Ar5), 7.33 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 3H, F-Phe-Ar3/Trp4-Ar8), 7.29 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, Phe1-Ar2), 7.20 – 7.15 (m, 2H, Phe1-Ar3), 7.07 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, Trp-Ar7), 7.05 (s, 1H, Trp4-Ar2), 7.00 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1H, Trp4-Ar6), 6.91 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, Tyr3-Ar2), 6.64 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H,

Tyr3-Ar3), 5.34 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H, Cys7- $\alpha$ ), 5.29 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H, Cys2- $\alpha$ ), 4.87 (dd,  $J = 10.7, 3.8$  Hz, 1H, Phe1- $\alpha$ ), 4.59 – 4.51 (m, 2H, Tyr3- $\alpha$ /Thr6- $\alpha$ ), 4.39 – 4.34 (m, 1H, Ser- $\alpha$ ), 4.34 – 4.30 (m, 1H, Thr8- $\beta$ ), 4.22 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H, Thr8- $\alpha$ ), 4.19 (dd,  $J = 9.5, 6.0$  Hz, 1H, Trp4- $\alpha$ ), 4.13 – 4.07 (m, 1H, F-Phe- $\alpha$ ), 4.00 – 3.92 (m, 2H, Lys5- $\alpha$ /Thr6- $\beta$ ), 3.34 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, Ser- $\beta$ ), 3.19 (d,  $J = 10.2$  Hz, 2H, Ser- $\beta'$ /Phe1- $\beta$ ), 3.15 (dd,  $J = 14.4, 3.0$  Hz, 2H, F-Phe- $\beta'$ /Tyr3- $\beta$ ), 3.01 (dd,  $J = 13.9, 9.9$  Hz, 1H, Trp4- $\beta$ ), 2.94 – 2.72 (m, 8H, Cys2- $\beta$ /Cys2- $\beta'$ /Cys7- $\beta$ /F-Phe- $\beta$ /F-Phe- $\beta'$ /Cys7- $\beta'$ /Tyr3- $\beta'$ /Phe1- $\beta'$ ), 2.68 (dd,  $J = 14.0, 5.4$  Hz, 1H, Trp4- $\beta'$ ), 2.58 – 2.52 (m, 2H, Lys5- $\epsilon$ /Lys5- $\epsilon'$ ), 1.73 – 1.65 (m, 1H, Lys5- $\beta$ ), 1.28 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, Lys5- $\delta$ /Lys5- $\delta'$ ), 1.24 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, Thr8-Me), 1.21 – 1.17 (m, 1H, Lys5- $\beta'$ ), 1.07 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, Thr6-Me), 1.00 (d,  $J = 8.7$  Hz, 18H, F-Phe-tBu), 0.72 – 0.56 (m, 2H, Lys5- $\gamma$ /Lys5- $\gamma'$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** 150.8 MHz, DMSO- $d_6$ ;  $\delta = 172.6$  (Trp4-CO), 172.0 (Lys5-CO), 171.3 (Thr6-CO), 169.0 (Ser-CO), 156.5 (Tyr3-Ar4), 136.6 (Trp4-Ar9), 134.5 (F-Phe-Ar2), 130.5 (Tyr3-Ar2), 130.2 (Phe1-Ar2), 130.1 (Phe1-Ar1), 129.5 (F-Phe-Ar3), 127.6 (Trp4-Ar4), 126.9 (Phe1-Ar3), 124.3 (Trp4-Ar2), 121.6 (Trp4-Ar7), 119.1 (Trp4-Ar6), 118.8 (Trp4-Ar5), 115.6 (Tyr3-Ar3), 111.9 (Trp4-Ar8), 109.6 (Trp4-Ar3), 67.9 (Thr6- $\beta$ ), 66.8 (Thr8- $\beta$ ), 62.4 (Ser- $\beta$ ), 58.9 (Thr8- $\alpha$ ), 58.8 (Thr6- $\alpha$ ), 56.3 (Ser- $\alpha$ ), 56.0 (Trp4- $\alpha$ ), 54.8 (Tyr3- $\alpha$ ), 54.0 (Phe1- $\alpha$ ), 53.7 (F-Phe- $\alpha$ ), 53.1 (Cys2- $\alpha$ ), 53.0 (Lys5- $\alpha$ ), 52.4 (Cys7- $\alpha$ ), 45.7 (Cys7- $\beta$ ), 45.6 (Cys2- $\beta$ ), 40.0 (Phe1- $\beta$ ), 39.1 (Lys5- $\epsilon$ ), 37.6 (F-Phe- $\beta$ ), 37.6 (Tyr3- $\beta$ ), 31.0 (Lys5- $\beta$ ), 27.8 (F-Phe-tBu-Me), 27.1 (Lys5- $\delta$ ), 26.5 (Trp4- $\beta$ ), 22.4 (Lys5- $\gamma$ ), 20.9 (Thr8-Me), 20.3 (F-Phe-tBu-quat.), 20.1 (Thr6-Me).

**$^{19}\text{F-NMR}$ :** 282.4 MHz, DMSO- $d_6$ ;  $\delta = -186.6$  (s,  $J(^{19}\text{F}-^{29}\text{Si}) = 297.9$  Hz).

**$^{29}\text{Si-NMR}$ :** 59.6 MHz, DMSO- $d_6$ ;  $\delta = 14.5$  (d,  $J(^{19}\text{F}-^{29}\text{Si}) = 297.6$  Hz).

**HRMS (ESI):** für  $[\text{C}_{69}\text{H}_{95}\text{N}_{12}\text{O}_{15}\text{S}_2\text{F}_1\text{Si}_1 + \text{H}^+]$  ber.: 1443.631, gef.: 1443.632.

### 8.7. Biologische Testierungen

#### 8.7.1. Bakterielle Wachstumshemmung

Die antibakterielle Aktivität der Verbindungen wurde von Dr. Bernhard Ellinger mit Hilfe der Mikrodilutionsmethode nach DIN-Norm 58940 bestimmt. Als Bakterienstämme wurden *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 und ATCC 43300 verwendet. Ein Müller/Hinton Medium (Fleischinfusion 2.0 mg/mL, Caseinhydrolysat 17.5 mg/mL, Stärke 1.5 mg/mL) mit 2 % NaCl wurde hierzu mit fünf unabhängigen Kolonien der zu testenden Bakterien beimpft. Die Bakterien wurden nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase auf  $1 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^6$  koloniebildende Einheiten pro mL verdünnt und für den Test genutzt (DIN 58940-81). Die Testierung wurde in 96-well-Platten mit zwei Antibiotika (Tetracyclin 1.0 mg/L; Ampicillin 0.26 mg/L) als Kontrollen durchgeführt, das Gesamtvolumen pro Kavität betrug 100  $\mu$ L. Die zu testenden Verbindungen wurden in Trifluorethanol gelöst zugegeben. Die Endkonzentration an Trifluorethanol betrug 1 Vol.-%; bis zu 5 Vol.-% wurden in unabhängigen Tests als tolerierbar eingestuft. Die Bakterien wurden über 24 h mit diffusionsoffenen *System Duetz* Abdeckungen bei 37 °C mit 180 U/min kultiviert. Anschließend wurde das Wachstum der Bakterien über die optische Dichte (OD) bei 543 nm bzw. 575 nm bestimmt. Als Kontrolle diente das Wachstum der Bakterien bei 1 Vol.-% Trifluorethanol. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

#### 8.7.2. Polarisations-Assays

##### Polarisations-Assay mit ribosomalem Komplex

Der Polarisations-Assay wurde von Dr. Sascha Baumann entwickelt und ist in seiner Dissertation näher beschrieben.<sup>[126]</sup> Der Assay beruht auf der Quantifizierung der Anisotropieänderung der Fluoreszenzpolarisation in Abhängigkeit von der Konzentration an gebundener / freier fluoreszenter Thiostreptonsonde **74** (bzw. **78**). In Vorversuchen konnte die Dissoziationskonstante  $K_D$  der Thiostreptonsonden vom binären Protein L11 / rRNA-Komplex zu 0.14 nM (für **74**) bestimmt werden. (Anmerkung: Die Bindung der Sonden an RNA bzw. Protein allein kann vernachlässigt werden, wie experimentell gefunden



wurde). Eine typische Verdrängungstitration zur Bestimmung der Bindekonstante eines Analyten wurde mit 5 nM RNA, 0.6  $\mu$ M L11-Protein und 5 nM Thiostreptonsonde (74 bzw. 78) durchgeführt. Durch Zugabe verschiedener Konzentrationen an (aktivem) Analyt wurde die Sonde vom ternären Komplex Sonde/RNA/L11-Protein verdrängt und die resultierende Abnahme des Polarisationsignals quantifiziert (*Tecan Safire II*, *Perkin Elmer*, Anregung: 470 nm, Emission: 520 nm, Emissionsbandbreite: 5 nm, 50 Scans pro Kavität, 22 °C). Durch Auftragen der Anisotropieänderung gegen die Analytkonzentration konnten sigmoidale Kurven erhalten werden, die mittels Hill-Gleichung gefittet und in  $IC_{50}$ -Werte (bzw. apparente  $K_D$ -Werte) umgewandelt wurden.

### **Polarisations-Assay mit 20 S-Proteasom**

In analoger Weise wurde der Polarisations-Assay zur Bestimmung der Affinität der fluoreszenten Thiostreptonsonde 74 zum 20 S-Proteasom von Dr. Sascha Baumann durchgeführt. Hierzu wurde eine konstante Konzentration der Sonde 74 (1  $\mu$ M) mit variierenden Konzentrationen an 20 S-Proteasom (aus Hefezellen; Spende von Dr. Markus Kaiser, Chemical Genomics Center der MPG, Dortmund) titriert. Der Bindepuffer besaß folgende Zusammensetzung: 10 mM MOPS, 100 mM KCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 % Glukose, pH 7.5. Nach 12-stündiger Equilibrierung bei 4 °C wurde die Fluoreszenzpolarisation wie oben beschrieben gemessen und die Dissoziationskonstante  $K_D$  bestimmt. Kontrollexperimente wurden mit dem S-Trityl-geschützten PEG-Fluoresceinkonjugat 73 (ohne Thiostreptonstruktur) durchgeführt.

### **8.7.3. Gekoppelter *in vitro***

#### **Transkriptions-Translations-Inhibitions-Assay**

Der gekoppelte *in vitro* Transkriptions-Translations-Inhibitions-Assay wurde von Dr. Sascha Baumann entwickelt und zur Testierung der Thiostreptonderivate herangezogen. Eine genaue Beschreibung des Assays findet sich in der Dissertation von Dr. Sascha Baumann.<sup>[126]</sup> Der Assay beruht auf dem kommerziellen Kit *RTS 100 E. coli HY* (Firma Roche) mit einem T7-basierten *in vitro* Transkriptions-Translationssystem. Zur De-

## 8. Experimenteller Teil

---

tektion der Proteintranslation bzw. zur Quantifizierung der Inhibierung wurde die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) gewählt, das in den Kit-eigenen T7-Promotor-kontrollierten Vektor (pIVEX2.3d) kloniert wurde. Der Assay wurde im 384-well-Plattenformat durchgeführt und durch Zugabe des GFP-Vektors zu vorgelegtem Translationspuffer / Analyt / Translationsmix gestartet. Die Inkubation der Reaktionsmischungen erfolgte für 1.5 h bei 30 °C und anschließend bei 4 °C über Nacht, um die vollständige Ausbildung des GFP-Fluorophors zu erlauben. Durch Auslesen der GFP-Fluoreszenz mittels Plattenlesegerät *Infinite M200* (Firma *Tecan*) (Anregung 395 nm, Emission 504 nm) konnten sigmoidale Kurven bei Auftragung der normierten Messwerte als Funktion der Analytkonzentration erhalten werden, die zur Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC<sub>50</sub>) herangezogen wurden.

### 8.7.4. Cytotoxizitätsuntersuchung

Die Cytotoxizitätsuntersuchungen wurden von Dr. Bernhard Ellinger durchgeführt. Hierzu wurden MCF-7 und HT-29 Zellen in einer Konzentration von 4000 Zellen pro Kavität auf 96-well-Platten (mit durchsichtigem, flachem Boden) ausgesät und über einen Zeitraum von drei Tagen in einem Gesamtvolumen von 200 µL in Gegenwart der Verbindungen (gelöst in DMSO, Kontrolle: nur DMSO) inkubiert. Zur Bestimmung der Überlebensrate wurden jeweils 10 µL WST-Reagenz (4-[3-(4-Iodphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazol]-1,3-benzoldisulfonat, Firma *Roche*) hinzugefügt, und die Absorption bei 440 nm mithilfe eines Spektrophotometers gemessen. Die Überlebensrate wurde durch Setzen der Positivkontrolle auf 100 % und der Negativkontrolle auf 0 % normalisiert.

**Zellkultur zur Cytotoxizität und zur Fluoreszenzmikroskopie:** MCF-7- (DSMZ-Nr.: ACC115) und BSC-1- Zellen (ATCC-Nr.: CCL-26) wurden in DMEM Medium (Firma *PAA*) aufgezogen, das mit 10 vol.-% *Fetal Calf Serum* (Firma *Invitrogen*), 1 Gew.-% nicht-essentieller Aminosäuren (Firma *Sigma Aldrich*), 1 Gew.-% Pyruvat (Firma *Sigma Aldrich*) und 1 Gew.-% Penicillin / Streptomycin (Firma *Sigma Aldrich*) ergänzt wurde. HT-29-Zellen (DSMZ-Nr.: ACC299) wurden in Mc Coy's Medium (Firma *Gibco*) aufgezogen, das 10 Vol.-% *Fetal Calf Serum* enthielt. Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 Vol.-% CO<sub>2</sub>-

Atmosphäre in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Firma *Nunc*) aufgezogen und zweimal pro Woche bei 80 % Konflueszenz durch Waschen mit PBS und Dissoziieren mit 1.5 mL Trypsin/EDTA-Lösung (Firma *Gibco*) gesplittet.

### 8.7.5. Fluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde von Dr. Bernhard Ellinger durchgeführt. Aufgrund ihrer gut sichtbaren intrazellulären Strukturen wurden BSC-1 Zellen verwendet. Zur Visualisierung der Mitochondrien (Rotkanal) wurden die Zellen vor der Fixierung mit 150 nM *Mitotracker Red* (Firma *Invitrogen*) über einen Zeitraum von 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.4) gewaschen und über einen Zeitraum von 20 min bei 4 °C fixiert (100 mM K-Pipes, 10 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 Vol.-% Tween20, 3.7 Gew.-% Formaldehyd, pH 6.8). Die Zellen wurden nachfolgend dreimal für jeweils 5 min mit TBS-T gewaschen (10 mM Tris-HCl, 1 Vol.-% Tween20, pH 7.4) und mit 2 % BSA in TBS-T geblockt. Die Fluorescein-markierten Thiostreptonsonden **74** bzw. **77** (Endkonzentration 10 μM) wurden im Grünkanal observiert. Polyklonaler *anti-20 S Proteasom Core Subunit* Antikörper (Kaninchen, *Calbiochem*), Endverdünnung 1:500, und die Fluorescein-Thiostrepton-Sonden **74** bzw. **77** wurden in 2 Gew.-% BSA in TBS-T verdünnt, auf die geblockten Zellen gebracht, und für 1 h in der Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für jeweils 5 min gewaschen (TBS-T) und über einen Zeitraum von 1 h in der Dunkelheit mit dem sekundären anti-Kaninchen Antikörper (Alexa555 markiert, Firma *Invitrogen*) bei einer Endkonzentration von 1:500 inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit TBS-T für jeweils 10 min gewaschen, und mit AquaPolyMoung (Firma *Polysciences*) auf Mikroskopie-Objektträgern fixiert. Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurde auf einem Leica DM IBRE Mikroskop (Firma *Leica Microsystems*) durchgeführt.

### 8.7.6. Plasmodien Wachstumshemmung

Die Untersuchungen zur Wachstumshemmung des humanen Malariaerregers *Plasmodium falciparum* wurden im Labor von PD Dr. Gabriele Pradel am Zentrum für Infektionsfor-

## 8. Experimenteller Teil

---

schung der Universität Würzburg durchgeführt. Die untersuchten Verbindungen wurden in Konzentrationen zwischen 1 nM und 100  $\mu\text{M}$  getestet. Hierzu wurden synchronisierte Ringstadien des *P. falciparum* Stammes 3D7 bei einer Parasitämie von 1 % auf 96-well-Platten in Gegenwart der Test-Verbindungen (gelöst in DMSO, Endkonzentration DMSO war 0.5 vol-%) ausplattiert. Als Negativkontrolle diente die Inkubation der Parasiten bei 0.5 Vol-% DMSO. Die Parasiten wurden in Triplikaten über einen Zeitraum von 72 h *in vitro* inkubiert,<sup>[367]</sup> und ihre Überlebensrate anschließend mittels Malstat-Assay<sup>[228,229]</sup> quantifiziert. Dieser beruht auf der Aktivitätsmessung des *Plasmodien*-spezifischen Enzyms Lactat Dehydrogenase. Jede Verbindung wurde unabhängig 3–5 mal untersucht, und die entsprechenden IC<sub>50</sub>-Werte und Standardabweichungen wurden für jede Verbindung berechnet.

### 8.7.7. Proteasom-Inhibierungs-Assay

Die enzymatische Proteaseaktivität des Proteasoms kann durch Hydrolyse spezifischer fluorogener Peptidsubstrate bestimmt werden. In dieser Arbeit wurden 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) markierte Substrate verwendet, mit denen der Reaktionsverlauf fluorenszenzspektroskopisch verfolgt werden kann.<sup>[230]</sup> Zur Bestimmung der chymotrypsin-, caspase- und trypsin-ähnlichen Aktivitäten des Proteasoms wurden die Substrate **Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC**, **Ac-Nle-Pro-Nle-Asp-AMC** bzw. **Boc-Leu-Arg-Arg-AMC** verwendet.

Die Messungen wurden in 384-Mikrotiterplatten durchgeführt, wobei das Reaktionsvolumen in jeder Kavität 50  $\mu\text{L}$  betrug. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 360 nm angeregt, und die Emission bei 460 nm detektiert. Die einzelnen Reaktionen enthielten 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  20 S Proteasom (aus humanen Erythrocyten, *Calbiochem*), 50  $\mu\text{M}$  fluorogenes Substrat, 0.001 Vol-% NP-40 (Detergenz) und 10 Vol-% DMSO in Messpuffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5).

Das Proteasom wurde in Gegenwart von Detergenz und DMSO mit den Inhibitoren (0.15 nM–20  $\mu\text{M}$ ) für 15 min bei 37 °C prä-inkubiert, und die Reaktion wurde durch Zugabe des entsprechenden fluorogenen Substrats gestartet. Über einen Zeitraum von 5 h wurden alle 5 min ein Messpunkt aufgenommen, wobei die Temperatur konstant bei

37°C gehalten wurde. Die Umsatzraten konnten durch Ermittlung der Steigung im linearen Bereich der Fluoreszenz- / Zeit-Kurve bestimmt und auf die Kontrollen (ohne Inhibitor) normalisiert werden. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden durch halb-logarithmische Auftragung der normalisierten Umsatzrate gegen die Inhibitorkonzentration mittels *Hill-Fit* bestimmt. Alle Messungen wurden mindestens in Triplikaten durchgeführt, wobei die experimentellen Fehler durch Standardabweichung angegeben wurden.



# Literaturverzeichnis

- [1] M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Science* **2009**, *325*, 1089–93.
- [2] K. K. Kumarasamy, M. A. Toleman, T. R. Walsh, J. Bagaria, F. Butt, R. Balakrishnan, U. Chaudhary, M. Doumith, C. G. Giske, S. Irfan, P. Krishnan, A. V. Kumar, S. Maharjan, S. Mushtaq, T. Noorie, D. L. Paterson, A. Pearson, C. Perry, R. Pike, B. Rao, U. Ray, J. B. Sarma, M. Sharma, E. Sheridan, M. A. Thirunarayan, J. Turton, S. Upadhyay, M. Warner, W. Welfare, D. M. Livermore, N. Woodford, *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10*, 597–602.
- [3] L. D. Högberg, A. Heddini, O. Cars, *Trends in pharmacological sciences* **2010**, doi: 10.1016/j.tips.2010.08.002.
- [4] S. Projan, *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, *6*, 427–30.
- [5] F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5072–129; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5194–5254.
- [6] M. S. Butler, A. D. Buss, *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 919–29.
- [7] L. L. Silver, *Expert. Opin. Drug Discov.* **2008**, *3*, 487–500.
- [8] D. J. Payne, M. N. Gwynn, D. J. Holmes, D. L. Pompliano, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 29–40.
- [9] C. Lipinski, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3–25.
- [10] R. O’Shea, H. E. Moser, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2871–78.
- [11] L. L. Silver, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 41–55.
- [12] M. A. Fischbach, *Curr. Opin. Microbiol.* **2009**, *12*, 520–27.
- [13] D. J. Newman, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2589–99.
- [14] R. A. Bauer, J. M. Wurst, D. S. Tan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 308–14.
- [15] A. L. Harvey, *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 894–901.
- [16] J. W.-H. Li, J. C. Vederas, *Science* **2009**, *325*, 161–65.
- [17] A. Nören-Müller, I. Reis-Corrêa, H. Prinz, C. Rosenbaum, K. Saxena, H. J. Schwalbe, D. Vestweber, G. Cagna, S. Schunk, O. Schwarz, H. Schiewe, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 10606–11.
- [18] M. Kaiser, S. Wetzels, K. Kumar, H. Waldmann, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 1186–201.

- [19] A. P. Antonchick, C. Gerding-Reimers, M. Catarinella, M. Schürmann, H. Preut, S. Ziegler, D. Rauh, H. Waldmann, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 735–40.
- [20] R. A. E. Carr, M. Congreve, C. W. Murray, D. C. Rees, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 987–92.
- [21] H.-D. Arndt, C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Chem. Unserer Zeit* **2010**, *44*, 130–37.
- [22] C. P. R. Hackenberger, H.-D. Arndt, D. Schwarzer, *Chem. Unserer Zeit* **2010**, *44*, 198–206.
- [23] E. E. Carlson, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 639–53.
- [24] F. G. Glansdorp, R. J. Spandl, J. E. Swatton, O. Loiseleur, M. Welch, D. R. Spring, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4120–24.
- [25] E. Wulf, A. Deboben, F. A. Bautz, H. Faulstich, T. Wieland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76*, 4498–502.
- [26] M. C. Bagley, J. W. Dale, E. A. Merritt, X. Xiong, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 685–714.
- [27] R. A. Hughes, C. J. Moody, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7930–54; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8076–8101.
- [28] J. F. Pagano, M. J. Weinstein, H. A. Stout, R. Donovan, *Antibiot. Ann.* **1955/56**, 554.
- [29] O. Hensens, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3649–52.
- [30] J. M. Harms, D. N. Wilson, F. Schluenzen, S. R. Connell, T. Stachelhaus, Z. Zabrowska, C. M. T. Spahn, P. Fucini, *Mol. Cell* **2008**, *30*, 26–38.
- [31] A. Parmeggiani, P. Nissen, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 4576–81.
- [32] G. H. Nesbitt, P. R. Fox, *Vet. Med. Small. Anim. Clin.* **1981**, *76*, 535–38.
- [33] F. Benazet, M. Cartier, J. Florent, C. Godard, G. Jung, J. Lunel, D. Mancy, C. Pascal, J. Renaut, P. Tarridec, J. Theilleux, R. Tissier, M. Dubost, L. Ninet, *Experientia* **1980**, *36*, 414–16.
- [34] S. B. Singh, J. Occi, H. Jayasuriya, K. Herath, M. Motyl, K. Dorso, C. Gill, E. Hickey, K. M. Overbye, J. F. Barrett, P. Masurekar, *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 565–71.
- [35] U. G. Bhat, P. A. Zipfel, D. S. Tyler, A. L. Gartel, *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1851–55.
- [36] U. G. Bhat, M. Halasi, A. L. Gartel, *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5592.
- [37] M. Ueno, S. Furukawa, F. Abe, M. Ushioda, K. Fujine, S. Johki, H. Hatori, H. Ueda, *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 590–96.
- [38] G. McConkey, M. Rogers, T. McCutchan, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2046–49.
- [39] C. D. Goodman, V. Su, G. I. McFadden, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2007**, *152*, 181–91.
- [40] D. Wilson, *Antibiotics and the inhibition of ribosome function*, K. Nierhaus, D. Wilson (Eds.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2004**.



- [41] K. C. Nicolaou, B. S. Safina, M. Zak, S. H. Lee, M. Nevalainen, M. Bella, A. A. Estrada, C. Funke, F. J. Zécree, S. Bulat, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11159–75.
- [42] K. C. Nicolaou, M. Zak, B. S. Safina, A. A. Estrada, S. H. Lee, M. Nevalainen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11176–83.
- [43] K. C. Nicolaou, B. Zou, D. H. Dethe, D. B. Li, D. Y.-K. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7786–92; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7950–7956.
- [44] H. M. Müller, O. Delgado, T. Bach, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4771–74; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4855–4858.
- [45] M. A. Ciufolini, D. Lefranc, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 330–42.
- [46] J.-Y. Lu, M. Riedrich, M. Mikyna, H.-D. Arndt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8137–40; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8281–8284.
- [47] A. Regueiro-Ren, B. N. Naidu, X. Zheng, T. W. Hudyma, T. P. Connolly, J. D. Matiskella, Y. Zhang, O. K. Kim, M. E. Sorenson, M. Pucci, J. Clark, J. J. Bronson, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 171–75.
- [48] T. P. Connolly, A. Regueiro-Ren, J. E. Leet, D. M. Springer, J. Goodrich, X. S. Huang, M. J. Pucci, J. M. Clark, J. J. Bronson, Y. Ueda, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 550–53.
- [49] B. N. Naidu, M. E. Sorenson, J. J. Bronson, M. J. Pucci, J. M. Clark, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2069–72.
- [50] B. N. Naidu, M. E. Sorenson, Y. Zhang, O. K. Kim, J. D. Matiskella, J. A. Wichtowski, T. P. Connolly, W. Li, K. S. Lam, J. J. Bronson, M. J. Pucci, J. M. Clark, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5573–77.
- [51] B. N. Naidu, M. E. Sorenson, J. D. Matiskella, W. Li, J. B. Sausker, Y. Zhang, T. P. Connolly, K. S. Lam, J. J. Bronson, M. J. Pucci, H. Yang, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3545–49.
- [52] P. Hrcnciar, Y. Ueda, S. Huang, J. E. Leet, J. J. Bronson, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8789–93.
- [53] M. J. Pucci, J. J. Bronson, J. F. Barrett, K. L. DenBleyker, L. F. Discotto, J. C. Fung-Tomc, Y. Ueda, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3697–701.
- [54] C. Chatterjee, L. M. Miller, Y. L. Leung, L. Xie, M. Yi, N. L. Kelleher, W. A. van der Donk, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15332–33.
- [55] Y. O. You, W. A. van der Donk, *Biochemistry* **2007**, *46*, 5991–6000.
- [56] J. W. Finley, M. Friedman, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1977**, *86B*, 123–30.
- [57] M. Friedman, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1295–319.
- [58] R. Bar-Or, L. T. Rael, D. Bar-Or, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 711–16.
- [59] C.-S. Cho, S. Lee, G. T. Lee, H. A. Woo, E.-J. Choi, S. G. Rhee, *Antioxid. Redox Signaling* **2010**, *12*, 1235–46.

- [60] D. E. Palmer, C. Pattaroni, K. Nunami, R. K. Chadha, M. Goodman, T. Wakamiya, K. Fukase, S. Horimoto, M. Kitazawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5634–42.
- [61] S. Dey, R. Vijayaraghavan, V. Goel, S. Kumar, P. Kumar, T. Singh, *J. Mol. Struct.* **2005**, *737*, 109–16.
- [62] P. M. T. Ferreira, H. L. S. Maia, L. S. Monteiro, J. Sacramento, *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1* **2001**, 3167–73.
- [63] D. Choi, K. Harold, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7371–74.
- [64] B. N. Naidu, M. E. Sorenson, T. P. Connolly, Y. Ueda, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 10098–102.
- [65] W. C. Chan, B. W. Bycroft, L.-Y. Lian, G. C. K. Roberts, *FEBS Lett.* **1989**, *252*, 29–36.
- [66] S. V. Ley, A. Priour, C. Heusser, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 711–14.
- [67] N. M. Okeley, Y. Zhu, W. A. van der Donk, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3603–06.
- [68] C. Drahl, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5788–809; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5936–5958.
- [69] M. E. van Apeldoorn, H. P. van Egmond, G. J. A. Speijers, G. J. I. Bakker, *Mol. Nutr. Food. Res.* **2007**, *51*, 7–60.
- [70] D. Tillett, E. Dittmann, M. Erhard, H. von Döhren, T. Börner, B. A. Neilan, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 753–64.
- [71] C. F. B. Holmes, J. T. Maynes, K. R. Perreault, J. F. Dawson, M. N. G. James, *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 1981–89.
- [72] J. Goldberg, H. B. Huang, Y. G. Kwon, P. Greengard, A. C. Nairn, J. Kuriyan, *Nature* **1995**, *376*, 745–53.
- [73] M. Runnegar, N. Berndt, S. M. Kong, E. Y. Lee, L. Zhang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *216*, 162–69.
- [74] R. W. MacKintosh, K. N. Dalby, D. G. Campbell, P. T. Cohen, P. Cohen, C. MacKintosh, *FEBS Lett.* **1995**, *371*, 236–40.
- [75] C. Chatterjee, M. Paul, L. Xie, W. A. van der Donk, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 633–84.
- [76] B. Li, J. P. J. Yu, J. S. Brunzelle, G. N. Moll, W. A. van der Donk, S. K. Nair, *Science* **2006**, *311*, 1464–67.
- [77] K. Meindl, T. Schmiederer, K. Schneider, A. Reicke, D. Butz, S. Keller, H. Gühring, L. Vértesy, J. Wink, H. Hoffmann, M. Brönstrup, G. M. Sheldrick, R. D. Süßmuth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1151–54; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1169–1173.
- [78] W. M. Müller, T. Schmiederer, P. Ensle, R. D. Süßmuth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2436–40; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2486–2490.
- [79] T. Murakami, T. G. Holt, C. J. Thompson, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 1459–66.

- [80] D. J. Holmes, J. L. Caso, C. J. Thompson, *EMBO J.* **1993**, *12*, 3183–91.
- [81] B. S. Yun, T. Hidaka, T. Kuzuyama, H. Seto, *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 375–78.
- [82] M. L. Chiu, M. Folcher, T. Katoh, A. M. Puglia, J. Vohradsky, B. S. Yun, H. Seto, C. J. Thompson, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20578–86.
- [83] S. Grkovic, M. H. Brown, R. A. Skurray, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2001**, *12*, 225–37.
- [84] J. L. Hobman, *Mol. Microbiol.* **2007**, *63*, 1275–78.
- [85] M. L. Chiu, M. Folcher, P. Griffin, T. Holt, T. Klatt, C. J. Thompson, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2332–41.
- [86] J. D. Kahmann, H.-J. Sass, M. G. Allan, H. Seto, C. J. Thompson, S. Grzesiek, *EMBO J.* **2003**, *22*, 1824–34.
- [87] M. L. Chiu, P. H. Viollier, T. Katoh, J. J. Ramsden, C. J. Thompson, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12950–58.
- [88] L. Vollbrecht, H. Steinmetz, G. Hofle, L. Oberer, G. Rihs, G. Bovermann, P. von Matt, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 715–21.
- [89] F. Sasse, H. Steinmetz, T. Schupp, F. Petersen, K. Memmert, H. Hofmann, C. Heusser, V. Brinkmann, P. von Matt, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 543–51.
- [90] I. Nিকেleit, S. Zender, F. Sasse, R. Geffers, G. Brandes, I. Sørensen, H. Steinmetz, S. Kubicka, T. Carlomagno, D. Menche, I. Gütgemann, J. Buer, A. Gossler, M. P. Manns, M. Kalesse, R. Frank, N. P. Malek, *Cancer Cell* **2008**, *14*, 23–35.
- [91] M. Sandy, A. Butler, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4580–95.
- [92] Z. A. Youard, G. L. A. Mislin, P. A. Majcherczyk, I. J. Schalk, C. Reimann, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 35546–53.
- [93] M.-Y. Kim, H. Vankayalapati, K. Shin-ya, K. Wierzba, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2098–99.
- [94] G. L. Schmir, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2743–51.
- [95] R. B. Martin, S. Lowey, E. L. Elson, J. T. Edsall, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 5089–95.
- [96] A.-C. Gaumont, M. Gulea, J. Levillain, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1371–401.
- [97] A. I. Meyers, F. X. Tavares, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8207–15.
- [98] K. S. Ramasamy, R. Bandaru, D. Averett, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5849–51.
- [99] D. R. Williams, P. D. Lowder, Y.-G. Gu, D. A. Brooks, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 331–34.
- [100] M. Riedrich, S. Harkal, H.-D. Arndt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2701–03; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2755–2758.
- [101] O. D. Hensens, G. Albers-Schönberg, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3649–52.
- [102] O. D. Hensens, G. Albers-Schönberg, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 814–31.

- [103] M. S. Puar, A. K. Ganguly, A. Afonso, R. Brambilla, P. Mangiaracina, O. Sarre, R. D. MacFarlane, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5231–33.
- [104] O. D. Hensens, G. Albers-Schönberg, B. F. Anderson, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 799–813.
- [105] C. S. Bond, M. P. Shaw, M. S. Alphey, W. N. Hunter, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2001**, *57*, 755–58.
- [106] M. Bodanszky, J. A. Scozzie, I. Muramatsu, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 9–12.
- [107] I. Muramatsu, M. Bodanszky, *J. Antibiot.* **1969**, *22*, 287–88.
- [108] G. Zemplen, E. Pascu, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1929**, *62*, 1613–14.
- [109] Y. Kotake, K. Sagane, T. Owa, Y. Mimori-Kiyosue, H. Shimizu, M. Uesugi, Y. Ishihama, M. Iwata, Y. Mizui, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 570–75.
- [110] D. N. Wilson, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *44*, 393–433.
- [111] S. C. Blanchard, B. S. Cooperman, D. N. Wilson, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 633–45.
- [112] Y.-G. Gao, M. Selmer, C. M. Dunham, A. Weixlbaumer, A. C. Kelley, V. Ramakrishnan, *Science* **2009**, *326*, 694–99.
- [113] R. L. Gonzalez, S. Chu, J. D. Puglisi, *RNA* **2007**, *13*, 2091–97.
- [114] T. M. Schmeing, V. Ramakrishnan, *Nature* **2009**, *461*, 1234–42.
- [115] B. T. Porse, I. Leviev, A. S. Mankin, R. A. Garrett, *J. Mol. Biol.* **1998**, *276*, 391–404.
- [116] S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H.-D. Arndt, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 242–45.
- [117] S. Baumann, S. Schoof, M. Bolten, C. Haering, M. Takagi, K. Shin-ya, H.-D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6973–81.
- [118] G. Lentzen, R. Klinck, N. Matassova, F. Aboul-ela, A. I. Murchie, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 769–78.
- [119] D. M. Cameron, J. Thompson, P. E. March, A. E. Dahlberg, *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 27–35.
- [120] A. Parmeggiani, I. M. Krab, S. Okamura, R. C. Nielsen, J. Nyborg, P. Nissen, *Biochemistry* **2006**, *45*, 6846–57.
- [121] R. P. Morris, J. A. Leeds, H. U. Naegeli, L. Oberer, K. Memmert, E. Weber, M. J. LaMarche, C. N. Parker, N. Burrer, S. Esterow, A. E. Hein, E. K. Schmitt, P. Krastel, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5946–55.
- [122] L. J. Prins, P. Scrimin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2288–306; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2324–2343.
- [123] S. Baumann, S. Schoof, S. D. Harkal, H.-D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5664–66.
- [124] D. Lee, J. D. Walsh, P. Yu, M. A. Markus, T. Choli-Papadopoulou, C. D. Schwieters,

- S. Krueger, D. E. Draper, Y.-X. Wang, *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 1007–22.
- [125] H. R. A. Jonker, S. Ilin, S. K. Grimm, J. Wöhnert, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 441–54.
- [126] S. Baumann, Dissertation, TU Dortmund, **2010**.
- [127] B. T. Wimberly, R. Guymon, J. P. McCutcheon, S. W. White, V. Ramakrishnan, *Cell* **1999**, *97*, 491–502.
- [128] G. Rosendahl, S. Douthwaite, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 357–63.
- [129] M. Barcia-Macay, C. Seral, M.-P. Mingeot-Leclercq, P. M. Tulkens, F. Van Bambeke, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 841–51.
- [130] E. Cundliffe, J. Thompson, *Nature* **1979**, *278*, 859–61.
- [131] D. E. Brodersen, W. M. Clemons, A. P. Carter, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *Cell* **2000**, *103*, 1143–54.
- [132] A. P. Carter, W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *Nature* **2000**, *407*, 340–48.
- [133] T. Vacas, F. Corzana, G. Jiménez-Osés, C. González, A. M. Gómez, A. Bastida, J. Revuelta, J. L. Asensio, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12074–90.
- [134] B. François, R. J. M. Russell, J. B. Murray, F. Aboul-ela, B. Masquida, Q. Vicens, E. Westhof, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5677–90.
- [135] M. A. Borovinskaya, R. D. Pai, W. Zhang, B. S. Schuwirth, J. M. Holton, G. Hirokawa, H. Kaji, A. Kaji, J. H. D. Cate, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 727–32.
- [136] Y. Ding, Y. Yu, H. Pan, H. Guo, Y. Li, W. Liu, *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 1180–85.
- [137] E. A. Bayer, M. Wilchek, *J. Chromatogr.* **1990**, *510*, 3–11.
- [138] B. H. Kwok, B. Koh, M. I. Ndubuisi, M. Elofsson, C. M. Crews, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 759–66.
- [139] B. J. Leslie, P. J. Hergenrother, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1347–60.
- [140] L. Burdine, T. Kodadek, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 593–97.
- [141] E. H. Eklund, D. A. Fidock, *Int. J. Parasitol.* **2008**, *38*, 743–47.
- [142] A. M. Dondorp, S. Yeung, L. White, C. Nguon, N. P. J. Day, D. Socheat, L. von Seidlein, *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 272–80.
- [143] M. Schlitzer, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 944–86.
- [144] N. Klonis, R. Dilanian, E. Hanssen, C. Darmanin, V. Streltsov, S. Deed, H. Quiney, L. Tilley, *Biochemistry* **2010**, *49*, 6804–11.
- [145] C. D. Fitch, *Life Sci.* **2004**, *74*, 1957–72.
- [146] N. Campanale, C. Nickel, C. A. Daubenberger, D. A. Wehlan, J. J. Gorman, N. Klonis, K. Becker, L. Tilley, *J. Biol. Chem* **2003**, *278*, 27354–61.

- [147] C. P. Sanchez, W. D. Stein, M. Lanzer, *Trends Parasitol.* **2007**, *23*, 332–39.
- [148] S. G. Valderramos, D. A. Fidock, *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 594–601.
- [149] S. M. Weiss, K. Benwell, I. A. Cliffe, R. J. Gillespie, A. R. Knight, J. Lerpiniere, A. Misra, R. M. Pratt, D. Revell, R. Upton, C. T. Dourish, *Neurology* **2003**, *61*, S101–6.
- [150] J. Golenser, J. H. Waknin, M. Krugliak, N. H. Hunt, G. E. Grau, *Int. J. Parasitol.* **2006**, *36*, 1427–41.
- [151] A. B. Vaidya, M. W. Mather, *Annu. Rev. Microbiol.* **2009**, *63*, 249–67.
- [152] I. Wilson, *Nature* **1993**, *366*, 638.
- [153] G. I. McFadden, M. E. Reith, J. Munholland, N. Lang-Unnasch, *Nature* **1996**, *381*, 482.
- [154] G. Pradel, M. Schlitzer, *Curr. Mol. Med.* **2010**, *10*, 335–49.
- [155] L. Lim, G. I. McFadden, *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **2010**, *365*, 749–63.
- [156] S. Köhler, C. F. Delwiche, P. W. Denny, L. G. Tilney, P. Webster, R. J. Wilson, J. D. Palmer, D. S. Roos, *Science* **1997**, *275*, 1485–89.
- [157] J. Janouskovec, A. Horák, M. Oborník, J. Lukes, P. J. Keeling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 10949–54.
- [158] N. Lang-Unnasch, M. E. Reith, J. Munholland, J. R. Barta, *Int. J. Parasitol.* **1998**, *28*, 1743–54.
- [159] S. A. Ralph, G. G. van Dooren, R. F. Waller, M. J. Crawford, M. J. Fraunholz, B. J. Foth, C. J. Tonkin, D. S. Roos, G. I. McFadden, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 203–16.
- [160] M. E. Fichera, D. S. Roos, *Nature* **1997**, *390*, 407–09.
- [161] C. A. Imboden, W. C. Cooper, G. R. Coatney, G. M. Jeffery, *J. Natl. Malar. Soc.* **1950**, *9*, 377–80.
- [162] E. R. Pfefferkorn, S. E. Borotz, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 31–37.
- [163] M. E. Fichera, M. K. Bhopale, D. S. Roos, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 1530–37.
- [164] E. L. Dahl, J. L. Shock, B. R. Shenai, J. Gut, J. L. DeRisi, P. J. Rosenthal, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 3124–31.
- [165] Y. Midorikawa, Q. M. Haque, S. Nakazawa, *Chemotherapy* **1998**, *44*, 409–13.
- [166] T. N. C. Ramya, K. Karmodiya, A. Surolia, N. Surolia, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 6388–97.
- [167] J. Wiesner, A. Reichenberg, S. Heinrich, M. Schlitzer, H. Jomaa, *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 855–71.
- [168] E. L. Dahl, P. J. Rosenthal, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3485–90.
- [169] T. N. C. Ramya, S. Mishra, K. Karmodiya, N. Surolia, A. Surolia, *Antimicrob. Agents*

- Chemother.* **2007**, *51*, 307–16.
- [170] D. Barthel, M. Schlitzer, G. Pradel, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 774–77.
- [171] A. A. Divo, T. G. Geary, J. B. Jensen, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 21–27.
- [172] A. B. S. Sidhu, Q. Sun, L. J. Nkrumah, M. W. Dunne, J. C. Sacchettini, D. A. Fidock, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 2494–504.
- [173] S. Briolant, L. Almeras, M. Belghazi, E. Boucomont-Chapeaublanc, N. Wurtz, A. Fontaine, S. Granjeaud, T. Fusai, C. Rogier, B. Pradines, *Malaria journal* **2010**, *9*, 141.
- [174] E. A. Ashley, N. J. White, *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2005**, *18*, 531–36.
- [175] B. Clough, M. Strath, P. Preiser, P. Denny, I. R. Wilson, *FEBS Lett.* **1997**, *406*, 123–25.
- [176] M. J. Rogers, Y. V. Bukhman, T. F. McCutchan, D. E. Draper, *RNA* **1997**, *3*, 815–20.
- [177] S. Chaubey, A. Kumar, D. Singh, S. Habib, *Mol. Microbiol.* **2005**, *56*, 81–89.
- [178] M. Sullivan, J. Li, S. Kumar, M. J. Rogers, T. F. McCutchan, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *109*, 17–23.
- [179] M. J. Rogers, E. Cundliffe, T. F. McCutchan, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 715–16.
- [180] B. Clough, K. Rangachari, M. Strath, P. R. Preiser, R. J. Wilson, *Protist* **1999**, *150*, 189–95.
- [181] B. Pradines, C. Rogier, T. Fusai, J. Mosnier, W. Daries, E. Barret, D. Parzy, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1746–50.
- [182] W. H. Tsui, G. Yim, H. H. Wang, J. E. McClure, M. G. Surette, J. Davies, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1307–16.
- [183] J. Wiesner, D. Henschker, D. B. Hutchinson, E. Beck, H. Jomaa, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2889–94.
- [184] D. Burkhardt, J. Wiesner, N. Stoesser, M. Ramharter, A. C. Uhlemann, S. Issifou, H. Jomaa, S. Krishna, P. G. Kremsner, S. Bourrmann, *Int. J. Parasitol.* **2007**, *37*, 777–85.
- [185] B. Lell, P. G. Kremsner, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2315–20.
- [186] A. Kreidenweiss, P. G. Kremsner, B. Mordmüller, *Malar. J.* **2008**, *7*, 187.
- [187] S. M. Gantt, J. M. Myung, M. R. Briones, W. D. Li, E. J. Corey, S. Omura, V. Nussen-zweig, P. Sinnis, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 2731–38.
- [188] L. Borissenko, M. Groll, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 687–717.
- [189] A. J. Marques, R. Palanimurugan, A. C. Matias, P. C. Ramos, R. J. Dohmen, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1509–36.
- [190] S. Elsassser, D. Finley, *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 742–750.
- [191] M. Groll, M. Bochtler, H. Brandstetter, T. Clausen, R. Huber, *ChemBioChem* **2005**, *6*,

- 222–56.
- [192] C. Gille, A. Goede, C. Schlöetelburg, R. Preißner, P.-M. Kloetzel, U. B. Göbel, C. Frömmel, *J. Mol. Biol.* **2003**, 326, 1437–48.
- [193] L. Aravind, L. M. Iyer, T. E. Wellems, L. H. Miller, *Cell* **2003**, 115, 771–85.
- [194] B. Mordmüller, R. Fendel, A. Kreidenweiss, C. Gille, R. Hurwitz, W. G. Metzger, J. F. J. Kun, T. Lamkemeyer, A. Nordheim, P. G. Kremsner, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2006**, 148, 79–85.
- [195] R. F. Anders, *Parasite Immunol.* **1986**, 8, 529–39.
- [196] C. M. Pickart, *Cell* **2004**, 181–90.
- [197] C. M. Pickart, D. Fushman, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 610–16.
- [198] V. Chau, J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. J. Ecker, D. K. Gonda, A. Vars-havsky, *Science* **1989**, 243, 1576–83.
- [199] B. Meusser, C. Hirsch, E. Jarosch, T. Sommer, *Nat. Cell Biol.* **2005**, 7, 766–72.
- [200] B. Skaug, X. Jiang, Z. J. Chen, *Ann. Rev. Biochem.* **2009**, 78, 769–96.
- [201] S. Ben-Aroya, N. Agmon, K. Yuen, T. Kwok, K. McManus, M. Kupiec, P. Hieter, *PLoS Genet.* **2010**, 6, e1000852.
- [202] D. Hoeller, I. Dikic, *Nature* **2009**, 458, 438–44.
- [203] M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, 386, 463–71.
- [204] J. Driscoll, M. G. Brown, D. Finley, J. J. Monaco, *Nature* **1993**, 365, 262–64.
- [205] A. F. Kisselev, A. L. Goldberg, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 739–58.
- [206] M. Groll, R. Huber, L. Moroder, *J. Pept. Sci.* **2009**, 15, 58–66.
- [207] J. Hines, M. Groll, M. Fahnstock, C. M. Crews, *Chem. Biol.* **2008**, 15, 501–12.
- [208] A. F. Kisselev, D. Kaganovich, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 22260–70.
- [209] J. Adams, M. Kauffman, *Cancer Invest.* **2004**, 22, 304–11.
- [210] K. B. Kim, J. Myung, N. Sin, C. M. Crews, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 3335–40.
- [211] M. Groll, K. B. Kim, N. Kairies, R. Huber, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 1237–38.
- [212] M. Groll, B. Schellenberg, A. S. Bachmann, C. R. Archer, R. Huber, T. K. Powell, S. Lindow, M. Kaiser, R. Dudler, *Nature* **2008**, 452, 755–58.
- [213] G. Fenteany, R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey, S. L. Schreiber, *Science* **1995**, 268, 726–31.
- [214] L. R. Dick, A. A. Cruikshank, L. Grenier, F. D. Melandri, S. L. Nunes, R. L. Stein, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 7273–76.
- [215] J. Kohno, Y. Koguchi, M. Nishio, K. Nakao, M. Kuroda, R. Shimizu, T. Ohnuki,



- S. Komatsubara, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 990–95.
- [216] Y. Koguchi, J. Kohno, M. Nishio, K. Takahashi, T. Okuda, T. Ohnuki, S. Komatsubara, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 105–09.
- [217] M. Groll, Y. Koguchi, R. Huber, J. Kohno, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 543–48.
- [218] L. Bülow, I. Nickeleit, A.-K. Girbig, T. Brodmann, A. Rentsch, U. Eggert, F. Sasse, H. Steinmetz, R. Frank, T. Carlomagno, N. P. Malek, M. Kalesse, *ChemMedChem* **2010**, *5*, 832–36.
- [219] B. Stauch, B. Simon, T. Basile, G. Schneider, N. P. Malek, M. Kalesse, T. Carlomagno, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3934–38; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 4026–4030.
- [220] H. B. Bode, A. Zeeck, *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1* **2000**, *1*, 323–328.
- [221] Y. A. Elnakady, M. Rohde, F. Sasse, C. Backes, A. Keller, H.-P. Lenhof, K. J. Weissman, R. Müller, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1261–72.
- [222] P. Chen, M. Hochstrasser, *Cell* **1996**, *86*, 961–72.
- [223] W. Heinemeyer, M. Fischer, T. Krimmer, U. Stachon, D. H. Wolf, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25200–09.
- [224] C. S. Arendt, M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 7156–61.
- [225] A. F. Kisselev, A. Callard, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8582–90.
- [226] G. de Bettignies, O. Coux, *Biochimie* **2010**, doi: 10.1016/j.biochi.2010.06.023.
- [227] M. Verdoes, L. I. Willems, W. A. van der Linden, B. A. Duivenvoorden, G. A. van der Marel, B. I. Florea, A. F. Kisselev, H. S. Overkleeft, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2719–27.
- [228] M. T. Makler, J. M. Ries, J. A. Williams, J. E. Bancroft, R. C. Piper, B. L. Gibbins, D. J. Hinrichs, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1993**, *48*, 739–41.
- [229] M. T. Makler, D. J. Hinrichs, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1993**, *48*, 205–10.
- [230] A. F. Kisselev, M. Garcia-Calvo, H. S. Overkleeft, E. Peterson, M. W. Pennington, H. L. Ploegh, N. A. Thornberry, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35869–77.
- [231] A. Kisselev, G. AL, *Methods Enzymol.* **2005**, *398*, 364.
- [232] H. A. Braun, S. Umbreen, M. Groll, U. Kuckelkorn, I. Mlynarczuk, M. E. Wigand, I. Drung, P.-M. Kloetzel, B. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28394–401.
- [233] N. Ponts, J. Yang, D.-W. D. Chung, J. Prudhomme, T. Girke, P. Horrocks, K. G. Le Roch, *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2386.
- [234] K. Artavanis-Tsakonas, W. A. Weihofen, J. M. Antos, B. I. Coleman, C. A. Comeaux, M. T. Duraisingh, R. Gaudet, H. L. Ploegh, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 6857–66.
- [235] C. Lindenthal, N. Weich, Y. S. Chia, V. Heussler, M. Q. Klinkert, *Parasitology* **2005**, *131*, 37–44.

- [236] J. M. Reynolds, K. El Bissati, J. Brandenburg, A. Günzl, C. B. Mamoun, *BMC Clin. Pharmacol.* **2007**, *7*, 13.
- [237] B. Czesny, S. Goshu, J. L. Cook, K. C. Williamson, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 4080–85.
- [238] L. Zhang, N. C. Ging, T. Komoda, T. Hanada, T. Suzuki, K. Watanabe, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6423–27.
- [239] T. Tenson, A. Mankin, *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 1664–77.
- [240] B. Hügler, J. A. Kleinschmidt, W. W. Franke, *Eur. J. Cell Biol.* **1983**, *32*, 157–63.
- [241] A. von Mikecz, *J. Cell. Sci.* **2006**, *119*, 1977–84.
- [242] T. D. Rockel, D. Stuhlmann, A. von Mikecz, *J. Cell. Sci.* **2005**, *118*, 5231–42.
- [243] K. L. Auld, C. R. Brown, J. M. Casolari, S. Komili, P. A. Silver, *Mol. Cell* **2006**, *21*, 861–71.
- [244] P. Wendler, A. Lehmann, K. Janek, S. Baumgart, C. Enenkel, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 37751–62.
- [245] D. Kalderon, B. L. Roberts, W. D. Richardson, A. E. Smith, *Cell* **1984**, *39*, 499–509.
- [246] W. Lin, M. Chan, T.-S. Sim, *Parasitol. Res.* **2009**, *105*, 1715–22.
- [247] M. B. Frankel, L. J. Knoll, *DNA Cell Biol.* **2009**, *28*, 277–84.
- [248] G. D. Li, J. L. Li, M. Mugthi, S. A. Ward, *Int. J. Parasitol.* **2000**, *30*, 729–33.
- [249] G. Certad, A. Abraham, E. Georges, *Exp. Parasitol.* **1999**, *93*, 123–31.
- [250] M. J. Gardner, N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R. W. Hyman, J. M. Carlton, A. Pain, K. E. Nelson, S. Bowman, I. T. Paulsen, K. James, J. A. Eisen, K. Rutherford, S. L. Salzberg, A. Craig, S. Kyes, M.-S. Chan, V. Nene, S. J. Shallom, B. Suh, J. Peterson, S. Angiuoli, M. Perte, J. Allen, J. Selengut, D. Haft, M. W. Mather, A. B. Vaidya, D. M. A. Martin, A. H. Fairlamb, M. J. Fraunholz, D. S. Roos, S. A. Ralph, G. I. McFadden, L. M. Cummings, G. M. Subramanian, C. Mungall, J. C. Venter, D. J. Carucci, S. L. Hoffman, C. Newbold, R. W. Davis, C. M. Fraser, B. Barrell, *Nature* **2002**, *419*, 498–511.
- [251] D. H. Lee, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 27280–84.
- [252] J. González, F. J. Ramalho-Pinto, U. Frevert, J. Ghiso, S. Tomlinson, J. Scharfstein, E. J. Corey, V. Nussenzweig, *J. Exp. Med.* **1996**, *184*, 1909–18.
- [253] S. E. Chuang, V. Burland, G. Plunkett, D. L. Daniels, F. R. Blattner, *Gene* **1993**, *134*, 1–6.
- [254] G. Ramasamy, D. Gupta, A. Mohammed, V. S. Chauhan, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2007**, *152*, 139–48.
- [255] M. Rohrwild, O. Coux, H. C. Huang, R. P. Moerschell, S. J. Yoo, J. H. Seol, C. H.

- Chung, A. L. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 5808–13.
- [256] J. H. Seol, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 14035–40.
- [257] R. Ramachandran, C. Hartmann, H. K. Song, R. Huber, M. Bochtler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 7396–401.
- [258] S. Subramaniam, A. Mohammed, D. Gupta, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2009**, *26*, 473–79.
- [259] E. Park, J. W. Lee, S. H. Eom, J. H. Seol, C. H. Chung, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 33258–66.
- [260] M. C. Sousa, B. M. Kessler, H. S. Overkleeft, D. B. McKay, *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 779–85.
- [261] A. Y. H. Yu, W. A. Houry, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3749–57.
- [262] B. Hinzen, S. Raddatz, H. Paulsen, T. Lampe, A. Schumacher, D. Häbich, V. Hellwig, J. Benet-Buchholz, R. Endermann, H. Labischinski, H. Brötz-Oesterhelt, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 689–93.
- [263] J. Kirstein, A. Hoffmann, H. Lilie, R. Schmidt, H. Rübsamen-Waigmann, H. Brötz-Oesterhelt, A. Mogk, K. Turgay, *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 37–49.
- [264] B.-G. Lee, E. Y. Park, K.-E. Lee, H. Jeon, K. H. Sung, H. Paulsen, H. Rübsamen-Schaeff, H. Brötz-Oesterhelt, H. K. Song, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 471–78.
- [265] F. G. Whitby, E. I. Masters, L. Kramer, J. R. Knowlton, Y. Yao, C. C. Wang, C. P. Hill, *Nature* **2000**, *408*, 115–20.
- [266] A. Förster, E. I. Masters, F. G. Whitby, H. Robinson, C. P. Hill, *Mol. Cell* **2005**, *18*, 589–99.
- [267] S. Meyer, N. G. Kohler, A. Joly, *FEBS Lett.* **1997**, *413*, 354–58.
- [268] G. Schmidtke, H. G. Holzhütter, M. Bogyo, N. Kairies, M. Groll, R. de Giuli, S. Emch, M. Groettrup, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 35734–40.
- [269] S. Rao, D. C. Porter, X. Chen, T. Herliczek, M. Lowe, K. Keyomarsi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 7797–802.
- [270] H. Brötz-Oesterhelt, N. A. Brunner, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2008**, *8*, 564–73.
- [271] R. P. Lange, H. H. Locher, P. C. Wyss, R. L. Then, *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 3140–54.
- [272] A. L. Hopkins, J. S. Mason, J. P. Overington, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 127–36.
- [273] I. Nagy, T. Tamura, J. Vanderleyden, W. Baumeister, R. De Mot, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 5448–53.
- [274] M. Hanada, K. Sugawara, K. Kaneta, S. Toda, Y. Nishiyama, K. Tomita, H. Yamamoto, M. Konishi, T. Oki, *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1746–52.
- [275] L. Meng, R. Mohan, B. H. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 10403–08.

- [276] S. Omura, T. Fujimoto, K. Otoguro, K. Matsuzaki, R. Moriguchi, H. Tanaka, Y. Sasaki, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 113–16.
- [277] A. Asai, T. Tsujita, S. V. Sharma, Y. Yamashita, S. Akinaga, M. Funakoshi, H. Kobayashi, T. Mizukami, *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 227–34.
- [278] G. Yim, H. H. Wang, J. Davies, *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **2007**, *362*, 1195–200.
- [279] A. Fajardo, J. L. Martínez, *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**, *11*, 161–67.
- [280] M. Halasi, H. Zhao, H. Dahari, U. G. Bhat, E. B. Gonzalez, A. V. Lyubimov, D. A. Tonetti, A. L. Gartel, *Cell Cycle* **2010**, *9*, 1214–17.
- [281] A. Paugam, A. L. Bulteau, J. Dupouy-Camet, C. Creuzet, B. Friguet, *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 55–59.
- [282] D. Steverding, X. Wang, *Parasit. Vectors* **2009**, *2*, 29.
- [283] C. D. Robertson, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1999**, *103*, 49–60.
- [284] K. H. Darwin, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 485–91.
- [285] D. Li, H. Li, T. Wang, H. Pan, G. Lin, H. Li, *EMBO J.* **2010**, *29*, 2037–47.
- [286] K. H. Darwin, S. Ehrt, J.-C. Gutierrez-Ramos, N. Weich, C. F. Nathan, *Science* **2003**, *302*, 1963–66.
- [287] S. Gandotra, D. Schnappinger, M. Monteleone, W. Hillen, S. Ehrt, *Nat. Med.* **2007**, *13*, 1515–20.
- [288] G. Hu, G. Lin, M. Wang, L. Dick, R.-M. Xu, C. Nathan, H. Li, *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 1417–28.
- [289] G. Lin, D. Li, T. Chidawanyika, C. Nathan, H. Li, *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *501*, 214–20.
- [290] K. E. A. Loughheed, D. L. Taylor, S. A. Osborne, J. S. Bryans, R. S. Buxton, *Tuberculosis* **2009**, *89*, 364–70.
- [291] C. Li, W. L. Kelly, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 153–64.
- [292] C. T. Walsh, M. G. Acker, A. A. Bowers, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 27525–31.
- [293] M. C. Carnio, T. Stachelhaus, K. P. Francis, S. Scherer, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 6390–401.
- [294] S. A. Sieber, M. A. Marahiel, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 715–38.
- [295] A. Koglin, C. T. Walsh, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 987–1000.
- [296] M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468–96.
- [297] J. M. Willey, W. A. van der Donk, *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 477–501.
- [298] S. Duquesne, D. Destoumieux-Garzón, J. Peduzzi, S. Rebuffat, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 708–34.

- [299] E. W. Schmidt, J. T. Nelson, D. A. Rasko, S. Sudek, J. A. Eisen, M. G. Haygood, J. Ravel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 7315–20.
- [300] L. C. Wieland Brown, M. G. Acker, J. Clardy, C. T. Walsh, M. A. Fischbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 2549–53.
- [301] Y. Yu, L. Duan, Q. Zhang, R. Liao, Y. Ding, H. Pan, E. Wendt-Pienkowski, G. Tang, B. Shen, W. Liu, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 855–64.
- [302] J. Wang, Y. Yu, K. Tang, W. Liu, X. He, X. Huang, Z. Deng, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2335–44.
- [303] D. H. Haft, M. K. Basu, D. A. Mitchell, *BMC Biol.* **2010**, *8*, 70.
- [304] M. G. Acker, A. A. Bowers, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17563–65.
- [305] A. A. Bowers, M. G. Acker, A. Koglin, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7519–27.
- [306] B. Li, D. Sher, L. Kelly, Y. Shi, K. Huang, P. J. Knerr, I. Joewono, D. Rusch, S. W. Chisholm, W. A. van der Donk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 10430–35.
- [307] S. W. Santoro, L. Wang, B. Herberich, D. S. King, P. G. Schultz, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1044–48.
- [308] A. A. Bowers, C. T. Walsh, M. G. Acker, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12182–84.
- [309] C. T. Walsh, H. Chen, T. A. Keating, B. K. Hubbard, H. C. Losey, L. Luo, C. G. Marshall, D. A. Miller, H. M. Patel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 525–34.
- [310] D. Bischoff, B. Bister, M. Bertazzo, V. Pfeifer, E. Stegmann, G. J. Nicholson, S. Keller, S. Pelzer, W. Wohlleben, R. D. Süßmuth, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 267–72.
- [311] K. Woithe, N. Geib, K. Zerbe, D. B. Li, M. Heck, S. Fournier-Rousset, O. Meyer, F. Vitali, N. Matoba, K. Abou-Hadeed, J. A. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6887–95.
- [312] M. Hahn, T. Stachelhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 15585–90.
- [313] M. Hahn, T. Stachelhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 275–80.
- [314] M. Strieker, A. Tanović, M. A. Marahiel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 234–40.
- [315] B. K. Scholz-Schroeder, J. D. Soule, D. C. Gross, *Mol. Plant Microbe Interact.* **2003**, *16*, 271–80.
- [316] T. J. Oman, W. A. van der Donk, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 9–18.
- [317] N. Ziemert, K. Ishida, A. Liaimer, C. Hertweck, E. Dittmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7756–59; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7870–7873.
- [318] M. Skaugen, J. Nissen-Meyer, G. Jung, S. Stevanovic, K. Sletten, C. Inger, M. Abildgaard, I. F. Nes, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 27183–85.
- [319] M. P. Ryan, R. W. Jack, M. Josten, H. G. Sahl, G. Jung, R. P. Ross, C. Hill, *J. Biol.*

- Chem.* **1999**, 274, 37544–50.
- [320] P. D. Cotter, P. M. O'Connor, L. A. Draper, E. M. Lawton, L. H. Deegan, C. Hill, R. P. Ross, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 18584–89.
- [321] M. S. Donia, B. J. Hathaway, S. Sudek, M. G. Haygood, M. J. Rosovitz, J. Ravel, E. W. Schmidt, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 729–35.
- [322] M. S. Donia, J. Ravel, E. W. Schmidt, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 341–43.
- [323] S. W. Lee, D. A. Mitchell, A. L. Markley, M. E. Hensler, D. Gonzalez, A. Wohlrab, P. C. Dorrestein, V. Nizet, J. E. Dixon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, 5879–84.
- [324] B. W. Bycroft, M. S. Gowland, *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* **1978**, 256–58.
- [325] D. R. Houck, L. C. Chen, P. J. Keller, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 5800–06.
- [326] P. Zhou, D. O'Hagan, U. Mocek, Z. Zeng, L. D. Yuen, T. Frenzel, C. J. Unkefer, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 7274–76.
- [327] U. Mocek, A. R. Knaggs, R. Tsuchiya, T. Nguyen, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7557–68.
- [328] U. Mocek, Z. Zeng, D. O'Hagan, P. Zhou, L. D. G. Fan, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7992–8001.
- [329] R. Liao, L. Duan, C. Lei, H. Pan, Y. Ding, Q. Zhang, D. Chen, B. Shen, Y. Yu, W. Liu, *Chem. Biol.* **2009**, 16, 141–47.
- [330] W. L. Kelly, L. Pan, C. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 4327–34.
- [331] P. F. Long, W. C. Dunlap, C. N. Battershill, M. Jaspars, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1760–65.
- [332] J. A. McIntosh, E. W. Schmidt, *ChemBioChem* **2010**, 11, 1413–21.
- [333] Y. M. Li, J. C. Milne, L. L. Madison, R. Kolter, C. T. Walsh, *Science* **1996**, 274, 1188–93.
- [334] N. D. Priestley, T. M. Smith, P. R. Shipley, H. G. Floss, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 1135–47.
- [335] H. M. Patel, J. Tao, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2003**, 42, 10514–27.
- [336] B. F. Milne, P. F. Long, A. Starcevic, D. Hranueli, M. Jaspars, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 631–38.
- [337] P. Wipf, P. C. Fritch, S. J. Geib, A. M. Seffler, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4105–12.
- [338] S. Schoof, H.-D. Arndt, *Chem. Commun.* **2009**, 7113–15.
- [339] S. M. Ametamey, M. Honer, P. A. Schubiger, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 1501–16.
- [340] P. McQuade, D. J. Rowland, J. S. Lewis, M. J. Welch, *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 807–18.
- [341] M. Reivich, D. Kuhl, A. Wolf, J. Greenberg, M. Phelps, T. Ido, V. Casella, J. Fowler, B. Gallagher, E. Hoffman, A. Alavi, L. Sokoloff, *Acta Neurol. Scand., Suppl.* **1977**, 64,

190–91.

- [342] A. Hammers, M. J. Koeppe, M. P. Richardson, R. Hurlemann, D. J. Brooks, J. S. Duncan, *Brain* **2003**, *126*, 1300–18.
- [343] U. Kumar, M. Grant, *Results Probl. Cell Differ.* **2010**, *50*, 137–84.
- [344] J. C. Reubi, *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 389–427.
- [345] W. Bauer, U. Briner, W. Doepfner, R. Haller, R. Huguenin, P. Marbach, T. J. Petcher, Pless, *Life Sci.* **1982**, *31*, 1133–40.
- [346] R. Maurer, B. H. Gaehwiler, H. H. Buescher, R. C. Hill, D. Roemer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, *79*, 4815–17.
- [347] R. E. Weiner, M. L. Thakur, *BioDrugs* **2005**, *19*, 145–63.
- [348] W. A. P. Breeman, A. Mearadji, A. Capello, B. F. Bernard, C. H. J. van Eijck, E. P. Krenning, M. de Jong, *Int. J. Cancer* **2003**, *104*, 376–79.
- [349] P. W. Miller, N. J. Long, R. Vilar, A. D. Gee, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8998–9033; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9136–9172.
- [350] M. J. Adam, D. S. Wilbur, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 153–63.
- [351] B. Maziere, C. Crouzel, M. Venet, O. Stulzaft, G. Sanz, M. Ottaviani, C. Sejourne, O. Pascal, J. C. Bisserbe, *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B* **1988**, *15*, 463–68.
- [352] P. Mäding, F. Füchtner, F. Wüst, *Appl. Radiat. Isot.* **2005**, *63*, 329–32.
- [353] P. Blower, *Dalton Trans.* **2006**, 1705–11.
- [354] R. Schirmacher, G. Bradtmöller, E. Schirmacher, O. Thews, J. Tillmanns, T. Siessmeier, H. G. Buchholz, P. Bartenstein, B. Wängler, C. M. Niemeyer, K. Jurkschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6047–50; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6193–6197.
- [355] L. Mu, A. Höhne, P. A. Schubiger, S. M. Ametamey, K. Graham, J. E. Cyr, L. Dinkelborg, T. Stellfeld, A. Srinivasan, U. Voigtmann, U. Klar, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4922–25; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5000–5003.
- [356] A. Höhne, L. Yu, L. Mu, M. Reiher, U. Voigtmann, U. Klar, K. Graham, P. A. Schubiger, S. M. Ametamey, *Chem.–Eur. J.* **2009**, *15*, 3736–43.
- [357] G. Melacini, Q. Zhu, M. Goodman, *Biochemistry* **1997**, *36*, 1233–41.
- [358] C. R. R. Grace, J. Erchegyi, S. C. Koerber, J. C. Reubi, J. Rivier, R. Riek, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4487–96.
- [359] A. Otte, R. Herrmann, A. Heppeler, M. Behe, E. Jermann, P. Powell, H. R. Maecke, J. Muller, *Eur. J. Nucl. Med.* **1999**, *26*, 1439–47.
- [360] L. Iovkova, B. Wängler, E. Schirmacher, R. Schirmacher, G. Quandt, G. Boening, M. Schürmann, K. Jurkschat, *Chem.–Eur. J.* **2009**, *15*, 2140–47.
- [361] K. A. N. Graham, Q. Wang, M. Eisenhut, U. Haberkorn, W. Mier, *Tetrahedron Lett.*

- 2002, 43, 5021–24.
- [362] V. J. Jasys, P. R. Kelbaugh, D. M. Nason, D. Phillips, K. J. Rosnack, N. A. Saccomano, J. G. Stroh, R. A. Volkmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6696–704.
- [363] S. Schoof, B. Ellinger, H.-D. Arndt, PCT/EP2009/001949 (TU Dortmund), **2009**.
- [364] S. Schoof, S. Baumann, H.-D. Arndt, PCT/EP2009/001948 (TU Dortmund), **2009**.
- [365] S. Schoof, G. Pradel, M. N. Aminake, B. Ellinger, S. Baumann, M. Potowski, Y. Najjreh, M. Kirschner, H.-D. Arndt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 3317–21; *Angew. Chem.* **2010**, 122, 3389–3393.
- [366] A. L. Mandel, J. J. La Clair, M. D. Burkart, *Org. Lett.* **2004**, 6, 4801–03.
- [367] T. Ifediba, J. P. Vanderberg, *Nature* **1981**, 294, 364–66.



# Abkürzungsverzeichnis

**AAA+** *ATPases associated with diverse cellular activities*

**ABC-Transporter** *ATP binding cassette - Transporter*

**Ac** Acetyl

**ACT** *Artemisinin-based combination therapy*

**ADEP** Acyldepsipeptid

**AMC** 7-Amino-4-methylcoumarin

**AMP** Adenosinmonophosphat

**Äquiv.** Äquivalent

**ATCC** *American type culture collection*

**BIOS** *Biology-oriented synthesis*

**Boc** *tert*-Butyloxycarbonyl

**BSA** *Bovine Serum Albumin*

**CDI** Carbonyldiimidazol

**Clp** Caseinolytische Protease

**COM** *Communication mediating domains*

$\delta$  Chemische Verschiebung

**DBU** 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en

**DC** Dünnschichtchromatographie

**deala** Dehydroalanin

**Dhb** Dehydrobutyrin

**DHB** 2,5-Dihydroxybenzoesäure

**DHFR** Dihydrofolatreduktase

**DHPS** Dihydropteroatsynthase

**DIPEA** Diisopropylethylamin

**DMAP** Dimethylaminopyridin

**DMEM** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**DMF** *N,N*-Dimethylformamid

**DMSO** Dimethylsulfoxid

## Abkürzungsverzeichnis

---

- DOTA** 1,4,7,10-Tetra-azacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure  
**DSMZ** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen  
**DVB** Divinylbenzol  
**EDTA** Ethylendiamintetraessigsäure  
**ee** *Enantiomeric excess*  
**EGTA** Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure  
**ESI** Elektrospray-Ionisierung  
**FAS** *Fatty acid synthase*  
**Fmoc** Fluorenylmethoxycarbonyl  
**GABA**  $\gamma$ -Aminobuttersäure  
**gCOSY** *Gradient-selected correlation spectroscopy*  
**ges.** gesättigt  
**GFP** Grün-fluoreszierendes Protein  
**GPx1** Glutathion Peroxidase 1  
**h** Stunde  
**HBTU** *N,N,N',N'*-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uroniumhexafluorophosphat  
**HMBC** *Heteronuclear multiple bond correlation*  
**HOBt** 1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol  
**HPLC** *High pressure liquid chromatography*  
**HRMS** *High resolution mass spectrometry*  
**HSA** Humanes Serumalbumin  
**HSAB** *Hard and soft acids and bases*  
**Hsl** *Heat shock locus*  
**HSQC** *Heteronuclear single quantum coherence*  
**HV** Hochvakuum  
**IC<sub>50</sub>** mittlere inhibitorische Konzentration  
**i.V.** im Vakuum  
**kb** Kilobasen  
**konz.** konzentriert  
**Lab** Labionin  
**Lan** Lanthionin  
**LCMS** Gekoppelte *liquid chromatography - mass spectrometry*  
**LCR** *Low complexity regions*  
**MALDI** *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*  
**MDR** *Multiple drug resistance*

---

**Me** Methyl  
**MIC** *Minimum inhibitory concentration*  
**min** Minute  
**Mlan** Methyllanthionin  
**MRSA** *Meticillin-resistant Staphylococcus aureus*  
**MS** Massenspektroskopie  
**MSSA** *Meticillin-sensitive Staphylococcus aureus*  
**n. b.** nicht bestimmt  
**NEAT** *Nucleus-encoded apicoplast-targeted*  
**Nle** Norleucin  
**NLS** *Nuclear localization signal*  
**NMR** *Nuclear magnetic resonance*  
**NOESY** *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*  
**NP-40** Nonoxinol 40: nichtionisches Nonylphenolethoxylat-Tensid  
**NRPS** Nichtribosomale Peptidsynthetase  
**OD** Optische Dichte  
**ORF** *Open reading frame*  
**ox.** oxidiert  
**PBS** *Phosphate buffered saline*  
**PCP** *Peptidyl carrier protein*  
**PEG** Polyethylenglykol  
**PET** Positronen-Emissions-Tomographie  
**PGPH** Peptidylglutamylpeptidhydrolase-Aktivität  
**PICC** *Proximity induced covalent capture*  
**PKS** Polyketidsynthase  
**PLP** Pyridoxalphosphat  
**PP1** Serin/Threonin Phosphatase 1  
**PP2A** Serin/Threonin Phosphatase 2A  
**ppm** *parts per million*  
**Pup** *Prokaryotic ubiquitin-like protein*  
**Q** Chinaldinsäure  
**red.** reduziert  
**R<sub>f</sub>** Retentionsfaktor  
**RNAP** RNA-Polymerase  
**R<sub>t</sub>** Retentionszeit

## Abkürzungsverzeichnis

---

- rRNA** ribosomale RNA  
**RT** Raumtemperatur  
**SAM** S-Adenosylmethionin  
**SAR** *Structure-activity relationship*  
**SDS** *Sodium dodecyl sulfate*  
**SiFA** *Silicon-based fluoride acceptor*  
**SRIF** Somatostatin  
**sst** Somatostatin-Rezeptor  
**Suc** Succinyl-  
**t** Zeit  
**T** Temperatur  
**Tip** *Thiostrepton induced proteins*  
**TBS-T** Tris-HCl + Tween  
**TFA** Trifluoressigsäure  
**THF** Tetrahydrofuran  
**TOF** *Time of flight*  
**Tr** Trityl-  
**Tris** Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  
**Tzl** Thiazol  
**U** Umdrehungen

Darüber hinaus verwendete Abkürzungen sind IUPAC- bzw. SI-konform. Die Aminosäuren wurden nach dem international üblichen Ein- bzw. Dreibuchstaben-Code abgekürzt (IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature, *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 1517 und 1525).

Meinem Doktorvater Dr. Hans-Dieter Arndt danke ich für die wertvolle und kompetente Unterstützung in jeder Phase meiner Arbeit und sein uneingeschränktes Engagement.

Bei Prof. Dr. Herbert Waldmann möchte ich mich für die Übernahme des Erstgutachtens und für die exzellenten Arbeitsbedingungen in der Abteilung bedanken. Für die freundliche Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen und für ein offenes Ohr in allen Belangen bezüglich der IMPRS danke ich Prof. Dr. Martin Engelhard.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Petra Janning, Bernhard Griewel, Evelyne Merten und Andreas Brockmeyer für die analytische Unterstützung meiner experimentellen Arbeiten.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe Arndt sei ein großes Dank ausgesprochen. Insbesondere meinen Laborkollegen Martijn Eerland, Surendra Harkal, Christian Hedberg, Bahar Kilitoglu, Patrick Loos, Jinyong Lu und Matthias Riedrich danke ich für etliche Hilfestellungen und die überaus freundschaftliche Atmosphäre. Bernhard Ellinger und vor allem natürlich Sascha Baumann sei für die kollegiale und produktive Zusammenarbeit gedankt, ohne die das Thiostreptonprojekt in dieser Form nicht hätte wachsen können.

Den ehemaligen Bachelorstudenten Marco Potowski und Christina Nöcker danke ich für wichtige Beiträge zum Thiostreptonprojekt und Eric Bond für seine tatkräftige Mitarbeit als RISE-Austauschstudent.

Ich danke allen Mitgliedern der Abteilung Waldmann für die angenehme Arbeitsatmosphäre, insbesondere meinen aktuellen und ehemaligen Bürokollegen Silke Erdmann, Daniel Gottlieb, Sebastian Koch, Torben Leßmann, Jinyong Lu, Marion Müller, Stefano Rizzo, Tobias Voigt, Kathrin Wittstein und Gunther Zimmermann.

Finanziell wurde diese Arbeit u. a. von der IMPRS *Chemical Biology* unterstützt. Den Koordinatoren der IMPRS Waltraud Goody, Christa Hornemann und (ehem.) Jutta Rötter ist an dieser Stelle für zahlreiche unbürokratische Hilfestellungen gedankt.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für die uneingeschränkte Unterstützung und ständige Ermutigung und Carmen für viel, viel Geduld.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, den 30.09.2010