

## Tumortheraeutika

**Mutasynthese von Aureonitril, einem Aureothin-Derivat mit signifikant verbesserter zytostatischer Aktivität\*\***

Martina Ziehl, Jing He, Hans-Martin Dahse und Christian Hertweck\*

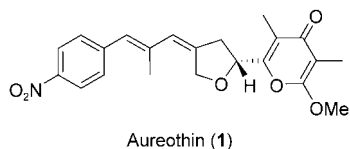
Polyketide bilden eine hoch diverse Gruppe von Naturstoffen, die eine wichtige Rolle in der Wirkstoff-Forschung spielt.<sup>[1]</sup> Alle Polyketide werden in Analogie zur Fettsäurebiosynthese über repetitive Claisen-Kondensationen von einer Acyl-Startereinheit mit Verlängerungseinheiten aufgebaut, die von Malonyl-Coenzym A (CoA) abgeleitet sind.<sup>[2]</sup> Während die meisten Polyketide mit Acetat initiiert werden, verwenden zahlreiche Polyketidsynthasen (PKSs) andere Startereinheiten, die die Diversität von Polyketiden erhöhen und dem Molekül wichtige strukturelle und biologische Eigenschaften verleihen können.<sup>[3]</sup> Demzufolge kann die Variation der Startereinheiten ein wirksamer Ansatz sein, um komplexe Naturstoffanaloga mit möglicherweise verbesserter Aktivität, Selektivität und Verfügbarkeit bei weniger unerwünschten Nebeneffekten zu erhalten. Eine Strategie hierfür ist die Zugabe von nichtnatürlichen Primern zu einer Mutante, in der bestimmte Gene, die für die Biosynthese der Startereinheit codieren, deletiert sind. Diese Technik, bei der man die Bildung der natürlichen Metabolite unterdrückt, wird auch als „Mutasynthese“ bezeichnet.<sup>[4–7]</sup> Bei Polyketidsynthasen wurde dieser Ansatz bereits erfolgreich angewendet, um Analoga von Erythromycin,<sup>[3,8,9]</sup> Rifamycin,<sup>[10]</sup> und Enterocin<sup>[11]</sup> herzustellen. Das bislang eindrucksvollste Beispiel für die Mutasynthese eines Polyketid-Derivats ist die

[\*] M. Ziehl, J. He, Dr. H.-M. Dahse, Dr. C. Hertweck  
Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung  
Beutenbergstraße 11a, 07745 Jena (Deutschland)  
Fax: (+49) 3641-656-705  
E-mail: christian.hertweck@hki-jena.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Schwerpunktprogramms SPP1152, „Evolution metabolischer Diversität“ (HE3469/2), unterstützt. Wir danken Dr. U. Möllmann und Dr. A. Härtl für biologische Testungen sowie K.-D. Menzel und M. Steinacker für Assistenz bei Fermentationsexperimenten. Für die Überlassung von Bakterienstämmen danken wir Prof. Xiufen Zhou, Shanghai Jiaotong University (*S. lividans* ZX1), sowie Prof. Jose Salas und Dr. Carmen Mendez, University of Oviedo (*S. albus*).

maßgeschneiderte Biosynthese des anthelmintischen Wirkstoffs Doramectin durch Austausch des Isobutyrat-Starters von Avermectin durch Cyclohexanoat.<sup>[12-14]</sup>

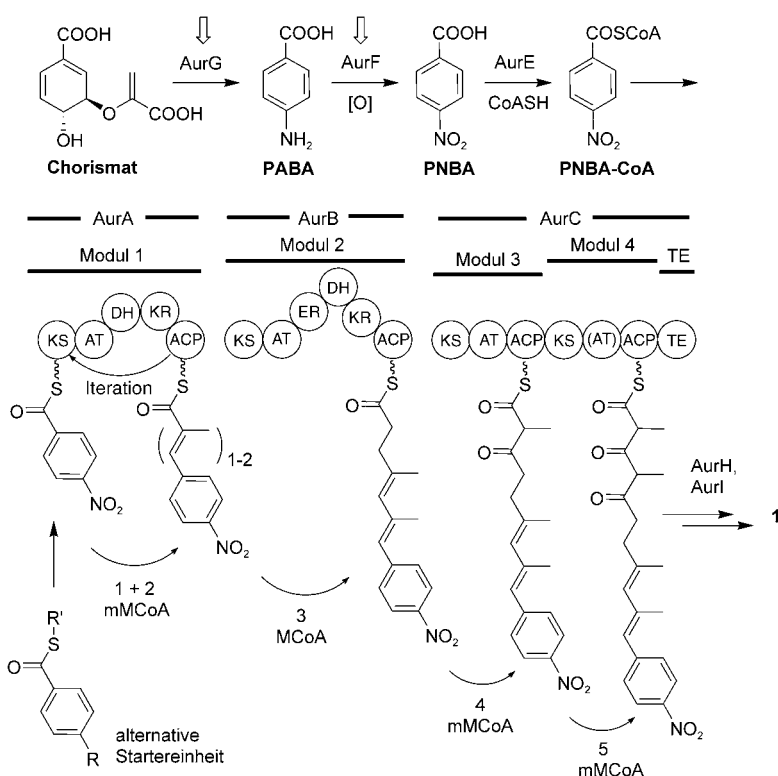
Eine höchst ungewöhnliche Polyketid-Startereinheit, *p*-Nitrobenzoat (PNBA), wird bei der Biosynthese von Aureothin (**1**), einem Polyketid-Shikimat-Hybridmeta-



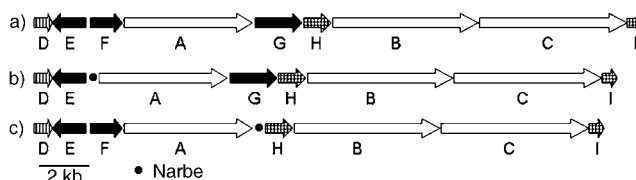
boliten des Bodenbakteriums *Streptomyces thioluteus*, verwendet.<sup>[15,16]</sup> Aureothin hat eine Vielzahl pharmakologischer Eigenschaften, darunter schwache zytotoxische, antifungale und antivirale Aktivitäten.<sup>[17]</sup> Um die Grundlage für das Pathway-Engineering von Aureothin-Derivaten mit verändertem Bioaktivitätsprofil zu schaffen, haben wir vor kurzem den gesamten Gencluster für die Aureothin-Biosynthese (*aur*) kloniert und analysiert.<sup>[18]</sup>

Neben der Verwendung der raren PNBA-Startereinheit weist der multifunktionale PKS-Enzym-Komplex einige weitere Besonderheiten auf. Erstens hat die Aureothin-PKS keine offensichtliche Ladedomäne wie konventionelle bakterielle Typ-I-PKS,<sup>[3]</sup> weshalb der Lademechanismus unklar ist. Möglicherweise wird der Primer direkt auf die KS1-Domäne nach Aktivierung durch die putative Acyl-CoA-Ligase AurE geladen. Zweitens wird das erste Modul (AurA) entgegen dem Colinearitätsprinzip iterativ genutzt.<sup>[18]</sup> Demnach spielt die KS von AurA eine doppelt editierende Rolle, da sie die alternative PKS-Startereinheit vor und nach dem ersten Elongationszyklus tolerieren muss (Abbildung 1). Eine vorläuferdirigierte Biosynthese mit der Aureothin-PKS ist aus diesem Grund besonders interessant.

Eine Analyse der *aur*-Gene ließ darauf schließen, dass in der Biosynthese von PNBA eine *p*-Aminobenzoat(PABA)-Synthase, AurG, die Chorismat in PABA umwandelt, und eine neuartige N-Oxygenase, AurF, zur N-Oxygenierung von PABA, beteiligt sind.<sup>[16]</sup> Die Targets für die Konstruktion geeigneter Nullmutanten für die Mutasyntese von Aureothin-Derivaten waren daher die Gene *aurF* und *aurG* (Abbildung 1). Das PABA-Synthase-Gen *aurG* wurde erfolgreich aus dem *aur*-Gencluster auf dem Expressionsplasmid pHJ48 mit der  $\lambda$ -Red-Methode entfernt.<sup>[19,20]</sup> Das resultierende Plasmid, pHJ97 (Abbildung 2), wurde in die heterologen Expressionswirte *S. lividans* ZX1 und *S. albus* durch Polyethylenglycol(PEG)-induzierte Protoplastentransformation bzw. intergenerische Konjugation eingeführt.<sup>[21]</sup> Die rekombinanten Stämme wurden fermentiert und ihre metabolischen Profile dünnenschichtchromatographisch und mit HPLC/MS verfolgt. Bemerkenswerterweise war die Transkonjugante *S. albus*::pHJ97 noch in der Lage, Aureothin zu biosynthetisieren, wenngleich in viel geringeren Mengen. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass nicht nur eines, sondern mehrere PABA-Synthase-Gene in einem *Streptomyces*-Genom vor-



**Abbildung 1.** Modell der Aureothin-Biosynthese, beginnend bei Chorismat, und Strategie zum Beladen der Typ-I-PKS mit alternativen aktivierten Benzoaten (R': NAC, CoA). Schlüsselenzyme (AurF, AurG), die an der Biosynthese der Startereinheit (PNBA) beteiligt sind und somit Ziele für Mutasyntese darstellen, sind mit Pfeilen markiert.



**Abbildung 2.** Organisation a) des gesamten *aur*-Genclusters, wie in pHJ48, b) der *aurF*-Nullmutante (pHJ79) und c) der *aurG*-Nullmutante (pHJ97). *aurABC*: PKS-Gene, *aurD*: Regulator-Gen, *aurE*: Acyl-CoA-Ligase-Gen, *aurF*: N-Oxygenase-Gen, *aurG*: PABA-Synthase-Gen, *aurH*: P-450-Monooxygenase-Gen, *aurI*: O-Methyltransferase-Gen.

kommen können, einschließlich der essentiellen PABA-Synthase-Gene, die für den Folsäuremetabolismus notwendig sind.<sup>[22,23]</sup> Entgegen den Ergebnissen, die mit *S. albus* erhalten wurden, war die Aureothin-Biosynthese in *S. lividans* ZX1::pHJ97 vollständig unterdrückt, und nur nach Zugabe von synthetischem PABA zu der Mutante konnte die Aureothin-Produktion wiederhergestellt werden. Demnach scheint der PABA-Titer stammabhängig zu sein und PABA, das in die Folat-Biosynthese eingeht, scheint nicht mit dem Aureothin-Biosyntheseweg zu interferieren. Eine andere Nullmutante, der das N-Oxygenase-Gen fehlt, wurde in Analogie zur *aurG*-Nullmutante generiert (Abbildung 2). Der Transfer des manipulierten Genclusters in *S. lividans* ZX1 ergab einen Stamm (*S. lividans* ZX1::pHJ79), der in Abwesenheit von syntheti-

schem PNBA nicht in der Lage ist, Aureothin zu bilden.<sup>[16]</sup> Dies bestätigt unsere frühere Feststellung, dass PNBA, und nicht PABA, als Startereinheit fungiert und lässt den Schluss zu, dass die Aureothin-Synthese eine relativ hohe Primer-Spezifität hat.

Die Expression der mutierten Gencluster im Wirt *S. lividans* erschien für die Mutasynthese geeignet, da der *aur*-Biosyntheseweg nur über exogen zugefügtes PABA oder PNBA wiederhergestellt werden kann. Um die Substratspezifität der *aur*-PKS zu ermitteln, wurde eine wachsende Kultur von *S. lividans* ZX1::pHJ79 zunächst mit *p*-, *m*- und *o*-PNBA versetzt. Es war dabei nicht überraschend, dass nur die *p*-substituierte Säure als Substrat verwendet wurde, während die Regioisomere nicht eingebaut wurden. In einer Reihe von weiteren Fütterungsexperimenten wurden zahlreiche *p*-substituierte PNBA-Surrogate getestet, entweder in Form der freien Säuren oder der entsprechenden *N*-Acetylcysteamin(NAC)-Thioester, die über die DCC/DMAP-Methode synthetisiert wurden.<sup>[24,25]</sup> Diese NAC-Addukte dienen als aktivierte Acyl-CoA-Mimetika,<sup>[26]</sup> die in die Bakterienzelle diffundieren und ein potentiell Nadelöhr, die putative Acyl-CoA-Ligase, *AurE*, umgehen können.

Die *p*-substituierten Benzoesäuren *p*-Iod-, *p*-Brom-, *p*-Chlor- und *p*-Fluorbenzoat sowie *p*-*N*-Acetamidoanthranilsäure und *p*-Dimethylaminbenzoat wurden im 100-mL-Fermentationsmaßstab getestet, es konnten allerdings keine neuen Aureothin-Derivate in den Rohextrakten dieser Fütterungsexperimente detektiert werden. Auch Toluylsäure und Terephthalsäuremonomethylester wurden nicht eingebaut. Erstaunlicherweise führte die Zugabe von *p*-Cyanbenzoesäure zur Kultur der *aurF*-Nullmutante zur Bildung eines neuen Metaboliten, der durch ESI-MS im positiven Modus detektiert wurde (*m/z* 378). Da nur eine relativ geringe Menge der neuen Verbindung gebildet wurde, untersuchten wir, ob die Zugabe von *p*-Cyanbenzoyl-SNAC, das nicht durch die Ligase in Form des Acyl-CoA-Addukts aktiviert werden muss, eine höhere Ausbeute ergeben würde (Abbildung 3). Die Produktausbeute war jedoch nicht höher als mit der freien Säure, was bedeutet, dass die Aktivierung durch die Ligase *AurE* in diesem Fall kein limitierender Faktor ist.

Um für Strukturaufklärung und biologische Testung ausreichende Mengen der neuen Verbindung zu erhalten, wurde eine Fermentation mittleren Maßstabs (50 L) durchgeführt. Die Fermentationsbrühe und das Myzel der mit Cyanbenzoat versetzten Mutante wurden erschöpfend mit Essigsäureethylester extrahiert, und die Rohextrakte einer sequenziellen Säulenchromatographie an Kieselgel und Sephadex LH-20

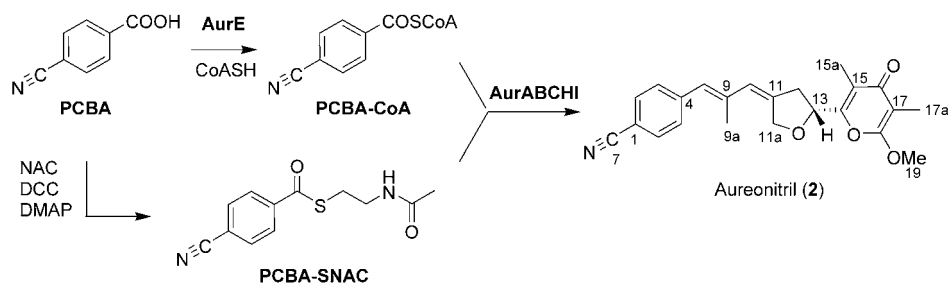
unterzogen. Die Endreinigung der neuen Verbindung gelang durch präparative HPLC.

HR-MS- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten lieferten die Summenformel C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>. Die Gegenwart einer Nitrilgruppe wurde durch das <sup>13</sup>C-NMR-Signal bei δ = 142.14 ppm und die sehr charakteristische IR-Bande (ν<sub>C≡N</sub>) bei 2223 cm<sup>-1</sup> bestätigt. Mit Ausnahme der Signale der Arenprotonen ähneln sich die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von **1** und der neuen Verbindung sehr, und HH-COSY-, HMQC- und HMBC-Daten ergaben die gleichen Konnektivitäten. Alle spektrometrischen (MS<sup>n</sup>) und spektroskopischen Daten (IR, NMR) untermauern die erwartete Struktur eines Aureothin-Derivats, das anstelle der Nitrogruppe einen Nitrilsubstituenten enthält. Die neue Verbindung wurde daher Aureonitril (**2**) genannt. NOE-Messungen ergaben, dass **2** die gleiche Konfiguration hat wie Aureothin.

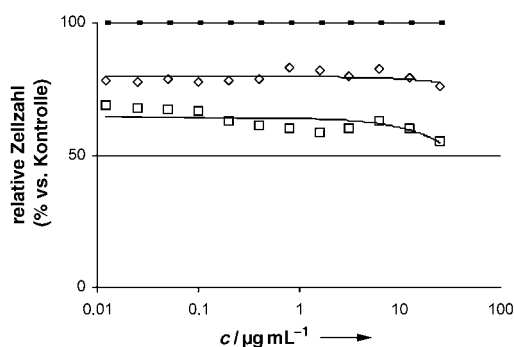
Es ist überraschend, dass von der großen Zahl *p*-substituierter Benzoate nur *p*-Cyanbenzoat von der PKS toleriert wurde, nicht dagegen verwandte Verbindungen mit Substituenten, die vergleichbare -I- und -M-Effekte hervorrufen (z. B. Methylcarboxy und *N*-Acetamido). Diese Beobachtung kann mit einer ähnlichen Ladungsverteilung in Nitro- und Nitrilgruppen erklärt werden.

Aureonitril (**2**) wurde einer breiten biologischen Testung unterzogen, mit Fokus auf antimikrobiellen und zytotoxischen Assays. Es weist zwar nur schwache antibakterielle Aktivitäten auf, hat aber eine relativ hohe Wirkung gegen fungale Pathogene wie *Candida albicans* (IC<sub>50</sub> 12.5 μM). Die beachtlichsten Resultate wurden jedoch bei zytotoxischen und antiproliferativen Assays erhalten. Von entscheidender Bedeutung ist hier der sehr flache Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve der Pyrone, der auf einen zytostatischen Effekt hinweist (Abbildung 4). Aureonitril hat in einem großen Konzentrationsbereich eine signifikant höhere Aktivität (ca. 200%) gegen Tumorzell-Linien wie HeLa und K-562 als Aureothin (**1**). Im Unterschied zu klassischen Chemotherapeutika, die neben zytostatischen oft unerwünschte zytotoxische Effekte zeigen, soll die neue Generation von Zytostatika bevorzugt zytostatisch in einem breiten therapeutischen Fenster wirken. Derartige Wirkstoffe stoppen die Zellproliferation an den Checkpoints des Zellzyklus oder interferieren mit der DNA.<sup>[27]</sup> Wegen der besonderen Eigenschaften von **2** befassen wir uns momentan mit In-vivo-Assays und der Aufklärung des molekularen Targets.

In vorliegender Studie haben wir die iterative Aureothin-PKS erfolgreich für die vorläuferdirigierte Biosynthese genutzt. Zu diesem Zweck wurden geeignete Mutanten kon-



**Abbildung 3.** Mutasynthese von Aureonitril mit PCBA und PCBA-SNAC.



**Abbildung 4.** Zytostatische Wirkung von Aureothin (◇) und Aureonitril (□) auf adhärenzte humane Cervix-Carcinom-HeLa-Zellen. Pro Kavität der Mikrotiterplatte erfolgte für die Kontrolle (■) und für Verdünnungen von **1** und **2** eine einheitliche Zelleinsaat. Dargestellt ist die relative Zellzahl der behandelten Zellen im Verhältnis zur Kontrolle nach 72 h Inkubation.

struiert, die außerdem das Biosynthesemodell von PNBA über PABA unter Beteiligung einer spezifischen PABA-Synthase unterstützen. Zur Komplementierung der Mutanten wurden zahlreiche PNBA-Analoga in Form freier Säuren und der entsprechenden synthetischen *N*-Acetylcysteaminthioester eingesetzt. Die iterative *aur*-Polyketidsynthase, die keine Ladedomäne aufweist, scheint eine relativ hohe Substratspezifität zu haben, da sie neben PNBA nur *p*-Cyanbenzoat annimmt und prozessiert. Das resultierende Nitril-Analogon von Aureothin, das vollständig charakterisiert wurde, zeigt in einem Bereich von  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  bis  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  einen signifikant höheren zytostatischen Effekt gegen HeLa- und K-562-Tumorzellen als die native Verbindung. Dieses Ergebnis unterstreicht deutlich das Potenzial der Mutagenese zur Gewinnung von Polyketid-Derivaten mit verbesserten Eigenschaften. Stammoptimierungen und komplementäre Synthesestrategien sind derzeit in Arbeit, um größere Mengen von Aureonitril zu erhalten.

### Experimentelles

**Konstruktion der *aurG*-Nullmutante:** *aurG* wurde aus dem *aurG*-Gencluster mit der  $\lambda$ -Red-Methode mit den Primern *aurGF* (5'-AGG ACG ACC CCG CTC GAA CCG ACA GGG AGG CTC CCG ATG ATT CCG GGG ATC CGT CGA CC-3') und *aurGR* (5'-CTT GAA GCC CGT CGA ACG ACG GGC GGA ACG GCC GTA CTA TGT AGG CTG GAG CTG CTT C-3') in Analogie zum früher beschriebenen Protokoll zur Inaktivierung von *aurF* deletiert.<sup>[16]</sup> Das Produkt der Polymerasekettenreaktion wurde in *E. coli* BW25113/pIJ790, der das Cosmid pHJ48 mit dem gesamten Aureothin-Biosynthese-Gencluster enthält, eingeschleust, wobei das *aurG*-Gen mit einer verlängerten Spectinomycin-Resistenzkassette substituiert wurde. Die inserierte Kassette wurde über Expression der FLP-Rekombinase in *E. coli* unter Bildung einer 81-bp-„Narbe“ im gewünschten Leserahmen entfernt. Das resultierende Plasmid, pHJ97, wurde anschließend in *S. albus* über intergenerische Konjugation mit *E. coli* ET12567, der das RP4-Derivat pUZ8002 enthält, oder in *S. lividans* ZX1 über PEG-vermittelte Protoplastentransformation eingeführt.

**Synthese von *p*-Nitrobenzoyl-SNAC:** Eine Lösung von 4 mmol (593 mg) *p*-Cyanbenzoesäure in 24 mL wasserfreiem Dichlormethan und 8 mL wasserfreiem THF wurde sukzessive mit 0,82 mmol (98 mg) Dimethylaminopyridin, 6,1 mmol (0,7 mL) *N*-Acetylcysteamin und

4,43 mmol Dicyclohexylcarbodiimid (4,4 mL, 1M in Dichlormethan) bei 0°C versetzt. Die Mischung wurde 10 min bei 0°C und 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration durch Celite wurde die Lösung durch eine kurze Säule mit Kupfersulfat-impregniertem Kieselgel passiert. PNBA-SNAC wurde durch Ausfällen in Petrolether gereinigt. Ausbeute: 594,4 mg (59%). <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1,95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,24 (t,  $J$  = 6,5 Hz, 2H, S-CH<sub>2</sub>), 3,51 (q,  $J$  = 6,3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N), 5,94 (br. s, 1H, NH-CO), 7,73 (d,  $J$  = 8,47 Hz, 2H), 8,01 ppm (d,  $J$  = 8,39 Hz, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 23,14 (CH<sub>3</sub>), 29,03 (S-CH<sub>2</sub>), 39,25 (CH<sub>2</sub>-N), 116,87 (C-CN), 117,65 (CN), 127,69 (2C, Ar), 132,52 (2C, Ar), 139,75 (C-CO), 170,32 (N-CO), 190,75 ppm (CO-S). IR (Film):  $\nu$  = 2231 ( $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ), 1642, 1553 ( $\nu_{\text{OCNH}}$ ,  $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ ), 919  $\text{cm}^{-1}$  ( $\gamma_{\text{CH}}$ , Ar). HR-MS ber. für C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>SN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 249,0692; gef.: 249,0696.

**Fermentation und Isolierung von Aureonitril:** Alle Fermentationen wurden in flüssigem, mit Apramycin ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) versetztem M10-Medium wie zuvor beschrieben durchgeführt.<sup>[18]</sup> Präkursoren wurden in Form steriler Lösungen in H<sub>2</sub>O/DMSO ( $v/v$  = 75:25,  $c$  = 1 mg/100  $\mu\text{L}$ ) zugefügt. Eine *S. lividans*::pHJ79-Impfkultur wurde verwendet, um 50 L M10(*apra*)-Medium in einem Stahlfermenter zu inokulieren. Die Kultur wurde durch Pulse-feeding mit *p*-Cyanbenzoat (1,325 g) in zwei Portionen versetzt. Nach 5 Tagen bei konstantem Rühren bei 28°C wurden Myzel und Filtrat separiert und erschöpfend mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Rohextrakt wurde an Kieselgel mit einem Chloroform/Methanol-Gradienten als Eluens und an Sephadex mit Methanol zur Elution aufgereinigt. Sämtliche das Hauptprodukt enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und durch RP-HPLC an einer Phenomenex-Luna-C18-Säule (10  $\mu$ , 250  $\times$  21,2 mm) mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten von 80:20 bis 100:0 zur Elution 10 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 20 mL  $\text{min}^{-1}$  gereinigt. Ausbeute: 5,9 mg eines dunkelgelben Feststoffs. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1,84 (s, 3H, 17a-CH<sub>3</sub>), 2,0 (s, 3H, 9a-CH<sub>3</sub>), 2,01 (s, 3H, 15a-CH<sub>3</sub>), 2,98 (m, 2H, 13-CH<sub>2</sub>), 3,92 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 4,71 (d,  $J$  = 14,2 Hz, 1H, 11a-CH<sub>2</sub>), 4,84 (d,  $J$  = 14,2 Hz, 1H, 11a-CH<sub>2</sub>), 5,12 (t,  $J$  = 6,9 Hz, 1H, 12-CH), 6,16 (s, 1H, 10-CH), 6,30 (s, 1H, 8-CH), 7,32 (d,  $J$  = 8,2 Hz, 2H, Ar-H3,H5), 7,61 ppm (d,  $J$  = 8,3 Hz, 2H, Ar-H2,H6). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6,89 (17a-CH<sub>3</sub>), 9,42 (15a-CH<sub>3</sub>), 17,65 (9a-CH<sub>3</sub>), 38,27 (13-CH<sub>2</sub>), 55,26 (O-CH<sub>3</sub>), 70,10 (11a-CH<sub>2</sub>), 73,33 (12-CH), 100,11 (17-C), 110,10 (1-C), 118,89 (4-C), 120,18 (15-C), 126,00 (10-CH), 128,72 (8-CH), 129,53 (Ar-C3,C5), 132,00 (Ar-C2,C6), 137,89 (9-C), 140,22 (11-C), 142,15 (CN), 154,72 (14-C), 162,09 (18-C), 180,60 ppm (16-C). IR (Film):  $\nu$  = 2223 ( $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$ ), 1718 ( $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ), 1662 ( $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ ), 1591, 1499, w ( $\nu_{\text{C}-\text{C}}$ ), 915  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C}-\text{O}-\text{C}}$ ). HR-MS ber. für C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>4</sub>: 378,1700; gef.: 378,1705.

**Antiproliferative und zytotoxische Assays:** Zellen von K-562 (DSM ACC 10), L-929 (DSM ACC 2) und HeLa (DSM ACC 57) wurden in RPMI-1640-Medium (GIBCO BRL), das mit  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  Gentamicinsulfat (Cambrex) versetzt war, 10% hitzeinaktiviertem fötalem Rinderserum (GIBCO BRL) und GlutaMAX-1 (GIBCO BRL) bei 37°C in Kulturflaschen (NUNC) kultiviert. Aureothin (**1**) und Aureonitril (**2**) wurden in Ethanol gelöst ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ), bevor sie mit RPMI 1640 verdünnt wurden. Die adhärenzten Zellen von L-929 und HeLa wurden in der logarithmischen Wachstumsphase unter Verwendung von 0,25% Trypsin in PBS (Phosphatsalzpuffer) mit 0,02% EDTA (Biochrom) trypsiniert. Zum Nachweis der zytotoxischen Wirkung erfolgte pro Kavität der Mikrotestplatte eine Zelleinsaat von  $1 \times 10^4$  HeLa-Zellen in 0,2 mL RPMI1640 und eine anschließende Vorinkubation ohne **1** und **2** über 48 h. Nach der Bildung einer subkonfluenten Monolage wurden die Zellen mit **1** und **2** in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und unter physiologischen Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% relative Luftfeuchte) 72 h inkubiert. Zum Nachweis der antiproliferativen Wirkung wurden jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen von L-929 und K-562 pro Mikrotestplatten-Kavität eingesät. Anschließend wurden die Zellen in Konzentrationsstufen behandelt und unter physiologischen Bedingungen 72 h inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die K-562-Zellen über den elektronischen Zellanalysator CASY1 (Schärfe, Reutlin-

gen) wie beschrieben analysiert<sup>[28]</sup> und die adhärenen L-929- und HeLa-Zellen mit Glutaraldehyd (Merck) fixiert und mit Methyleneblau (SERVA) 15 min gefärbt. Nach vorsichtigem Waschen wurde der Farbstoff mit 0.2 mL 0.33 N HCl in den Kavitäten eluiert. Die optische Dichte wurde bei 660 nm in einem SUNRISE-Mikrotiterplatten-Reader (TECAN, Österreich) gemessen.

Eingegangen am 14. September 2004

Online veröffentlicht am 11. Januar 2005

**Stichwörter:** Mutasynthese · Naturstoffe · Polyketide · Tumortheraeutika

- 
- [1] D. O'Hagan, *The Polyketide Metabolites*, Ellis Horwood, Chichester, **1991**.
  - [2] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380.
  - [3] B. S. Moore, C. Hertweck, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 70.
  - [4] K. L. Rinehart, L. S. Shield, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1976**, *39*, 231.
  - [5] K. L. Rinehart, *Pure Appl. Chem.* **1977**, *49*, 1361.
  - [6] S. J. Daum, J. R. Lemke, *Annu. Rev. Microbiol.* **1979**, *33*, 241.
  - [7] W. Wohlleben, S. Pelzer, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1163.
  - [8] K. Konishita, P. G. Williard, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2495.
  - [9] R. P. Desai, T. Leaf, Z. Hu, C. R. Hutchinson, A. Hong, G. Byng, *Biotechnol. Prog.* **2004**, *14*, 38.
  - [10] D. Hunziker, T.-W. Yu, C. R. Hutchinson, H. G. Floss, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1092.
  - [11] J. A. Kalaitzis, M. Izumikawa, L. Xiang, C. Hertweck, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9290.
  - [12] C. J. Dutton, S. P. Gibson, A. C. Goudie, K. S. Holdom, M. S. Pacey, J. C. Ruddock, J. D. Bu'Lock, M. K. Richards, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 357.
  - [13] H. A. I. McArthur, *A Novel Avermectin, Doramectin – A Successful Application of Mutasynthesis*, Society for Industrial Microbiology, Fairfax, **1998**.
  - [14] T. A. Cropp, D. J. Wilson, K. A. Reynolds, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 980.
  - [15] Y. Hirata, H. Nakata, K. Yamada, K. Okuhara, T. Naito, *Tetrahedron* **1961**, *17*, 252.
  - [16] J. He, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3694.
  - [17] J. L. Schwartz, M. Tishler, B. H. Arison, H. M. Shafer, S. Omura, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 236.
  - [18] J. He, C. Hertweck, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1225.
  - [19] K. A. Datsenko, B. L. Wanner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 6640.
  - [20] K. C. Murphy, K. G. Campellone, A. R. Poteete, *Gene* **2000**, *246*, 321.
  - [21] T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, D. A. Hopwood, *Practical Streptomyces Genetics*, The John Innes Foundation, Norwich, **2000**.
  - [22] M. P. Brown, K. A. Aidoo, L. C. Vining, *Microbiology* **1996**, *142*, 1345.
  - [23] J. M. Green, B. P. Nichols, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12972.
  - [24] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 552.
  - [25] C. J. Wilkinson, E. J. Frost, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1197.
  - [26] J. Staunton, A. C. Sutkowski, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1110.
  - [27] S. N. Gardner, M. Fernandes, *J. Exp. Ther. Oncol.* **2004**, *4*, 9.
  - [28] H.-M. Dahse, B. Schlegel, U. Gräfe, *Pharmazie* **2001**, *56*, 489.