

Proximicin A, B und C – antitumoraktive Furanaloga des Netropsins aus dem marinen Actinomyceten *Verrucosiscpora* induzieren die Hochregulation von p53 und des Cyclinkinase-Inhibitors p21**

Kathrin Schneider, Simone Keller, Falko E. Wolter, Lars Röglin, Winfried Beil, Oliver Seitz, Graeme Nicholson, Christina Bruntner, Julia Riedlinger, Hans-Peter Fiedler* und Roderich D. Süssmuth*

Professor François Diederich gewidmet

Netropsin (**1**) und Distamycin (**2**) sind natürlich vorkommende γ -Peptide mit antiviraler und antibakterieller Aktivität (Abbildung 1).^[1] Netropsin, das früher unter dem Namen Congocidin bekannt war, wurde 1951 aus *S. netropsis*^[2] und Distamycin 1964 aus *S. distallicus* isoliert.^[3,4] Beide Verbindungen binden in die kleine Furche der DNA und waren wohl die ersten Verbindungen, für die eine AT-selektive DNA-Bindung gezeigt werden konnte.^[5–8] Man nahm an, dass synthetische Derivate, die eine spezifische Sequenz der DNA adressieren können, eine selektive Inhibition der Genexpression erlauben und diese Verbindungen dadurch möglicherweise als Antitumorwirkstoffe dienen können.^[5] Basierend auf der Grundstruktur von Netropsin und Distamycin wurde eine Vielzahl von Analoga synthetisiert, um deren Bindung in die kleine Furche der DNA zu untersuchen und zu modulieren. Dazu wurden auch kombinatorische Ansätze herangezogen.^[5–11] Eine besondere Herausforderung war es,

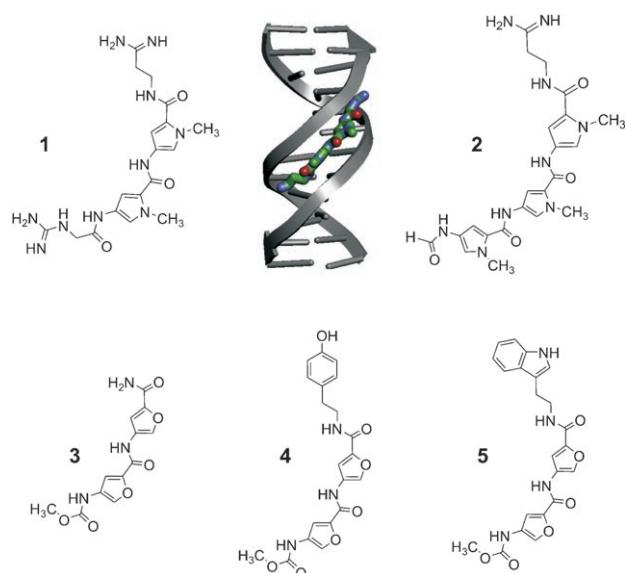


Abbildung 1. Strukturen von Netropsin (**1**), Distamycin (**2**) und der Verbindungen aus dem marinen *Verrucosiscpora*-Stamm Proximicin A (**3**), Proximicin B (**4**) und Proximicin C (**5**). Die Doppelhelix veranschaulicht die Bindung von Netropsin (**1**) in die kleine Furche der DNA in Form eines 1:1-Komplexes.^[13]

[*] K. Schneider, S. Keller, F. E. Wolter, Prof. Dr. R. D. Süssmuth
Institut für Chemie, Technische Universität Berlin
Straße des 17. Juni 124, 10623 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-314-24783
E-Mail: suessmuth@chem.tu-berlin.de
Homepage: <http://www2.tu-berlin.de/fb5/Suessmuth/>

C. Bruntner, J. Riedlinger, Prof. Dr. H.-P. Fiedler
Mikrobiologisches Institut, Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 28, 72076 Tübingen (Deutschland)
Fax: (+49) 7071-29-5999

G. Nicholson
Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen
Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen (Deutschland)

Prof. Dr. W. Beil
Institut für Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover
Carl-Neuberg-Straße 1, 30625 Hannover (Deutschland)

L. Röglin, Prof. Dr. O. Seitz
Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)

[**] Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG SU 239-5/1) und die Europäische Kommission (Projekt ACTINOGEN, 6th framework, LSHM-CT-2004-005224) gefördert. Die Autoren danken G. Grewe (Universität Tübingen) für die technische Unterstützung bei der Fermentation und Dr. Peter Schmieder (FMP, Berlin-Buch) für die Aufnahme von ^{15}N -NMR-Spektren.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

selektive Binder für GC-Basenpaare zu entwerfen.^[5–8] Ein Ansatz basierte auf der Annahme, dass die Einführung eines Wasserstoffbrückenakzeptors in den Pyrrolringen des Netropsins eine Bindung eines Wirkstoffs an GC-reiche Sequenzen zulassen könnte.^[5–8] Dieser Strategie folgend wurde eine beachtliche Zahl an Molekülen synthetisiert, in denen das *N*-Methylpyrrol des Netropsins durch andere Heterocyclen wie Imidazol, Thiazol, Triazol, Pyrazol oder Furan ersetzt ist.^[5,8] Mit Ausnahme einer topischen Anwendung als antiviraler Wirkstoff^[12] verhinderte die mangelnde Selektivität und Toxizität von Netropsin bzw. Distamycin^[8,9] bisher deren Verwendung als Wirkstoff in Medikamenten. Neuere Ansätze sind darauf gerichtet, diese Nachteile zu beseitigen.^[9] Eine weitere interessante biologische Aktivität von Netropsin und Distamycin ist die wachstumshemmende Wirkung gegen den Malaria verursachenden Parasiten *Plasmodium falciparum*.^[7]

Wir stellen hier die Strukturaufklärung neuartiger Netropsin-Analoga aus marinen Actinomyceten der Gattung

Verrucosispora mit dem Namen Proximicin A (**3**), B (**4**) und C (**5**) vor (Abbildung 1). Die Proximicine tragen die bisher unbekannte γ -Aminosäure 4-Aminofuran-2-carbonsäure, die ein neues Element innerhalb der strukturellen Diversität bisher beschriebener heterocyclischer Antibiotika ist. Darüber hinaus wurden die Antitumoraktivitäten von Netropsin und Distamycin mit denen der Proximicine und synthetischer Netropsin-Proximicin-Hybride (**6**, **7**, **8**; Abbildung 2) verglichen. Es zeigte sich, dass die letzteren bei den untersuchten Zelllinien deutlich stärker cytotoxisch sind.

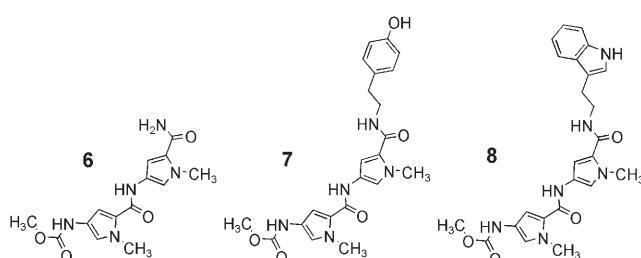


Abbildung 2. Strukturen der synthetischen Netropsin-Proximicin-Hybride A (**6**), B (**7**) und C (**8**).

Unlängst stellten wir die Fermentation, die Isolierung und die Strukturaufklärung der Polyketidantibiotika Abyssomicin B–D aus dem marinen Actinomyceten *Verrucosispora* sp. AB-18-032 vor, welcher aus einer Sedimentprobe der Japanischen See isoliert wurde.^[14,15] Die sorgfältige Auswertung der HPLC-Chromatogramme von Extrakten dieses Stammes ließ deutlich eine Verbindung (**3**) erkennen, die keiner bekannten Verbindung unserer HPLC-DAD-Datenbank zugeordnet werden konnte.^[16] Bemerkenswerterweise zeigte der Extrakt eines weiteren marinen Vertreters der seltenen Gattung *Verrucosispora*, Stamm MG-37, isoliert von einer Sedimentprobe des Raune-Fjords (Norwegen) aus einer Tiefe von 250 m, ein mit Verbindung **3** identisches HPLC-DAD-Signal. Außerdem wurden zwei weitere Signale mit ähnlichen UV-Spektren wie das für **3** gefunden, was auf das Vorliegen einer Familie von strukturell verwandten Metaboliten schließen ließ, die Proximicin A (**3**), B (**4**) und C (**5**) genannt wurden.^[17] Die Verbindungen wurden nachfolgend durch Größenausschluss- und Adsorptionschromatographie sowie präparative Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt. Die Strukturaufklärung wurde mithilfe der Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS, FT-ICR-MS, GC-MS) und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie durchgeführt.

Die exakten Massen, die mit hochauflösender ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie bestimmt wurden, waren für Proximicin A, B und C: 294.0722 Da [$(M+H)^+$], 436.1116 Da [$(M+Na)^+$] bzw. 437.14566 Da [$(M+H)^+$]. Dies entspricht den Summenformeln $C_{12}H_{11}N_3O_6$ (**3**) [$(M+H)^{+}_{\text{theor}} = 294.07206$; $\Delta m = 0.477 \text{ ppm}$], $C_{20}H_{19}N_3O_7$ (**4**) [$(M+Na)^{+}_{\text{theor}} = 436.11152$; $\Delta m = 0.165 \text{ ppm}$] und $C_{22}H_{20}N_4O_6$ (**5**) [$(M+H)^{+}_{\text{theor}} = 437.14556$; $\Delta m = 0.215 \text{ ppm}$]. Durch Totalhydrolyse, nachfolgende Derivatisierung und Analyse mittels GC-MS konnten Tyramin im Falle von Proximicin B (**4**) und Tryptamin im Falle von Proximicin C (**5**) identifiziert werden.

Die Auswertung der 1D- und 2D-NMR-Spektren führte zur Identifizierung der fehlenden Strukturfragmente. Die chemischen Verschiebungen und die Kopplungskonstanten in Kombination mit den HMBC-Korrelationen ließen für alle Proximicine auf ein Furanringsystem mit einem 2,4-Substitutionsmuster schließen, wobei Position 2 des Furans der Carbonylfunktion und Position 4 der Aminofunktion zugeordnet wurde. Das HMBC-Experiment lieferte den entscheidenden Beweis für ein Dipeptid aus zwei 4-Aminofuran-2-carbonsäuren, welches das wesentliche Strukturmerkmal der Proximicine darstellt. Das $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von **4** zeigte drei Signale, wovon zwei sekundären Amiden und eines einer Carbamatfunktionalität entsprechen. Das N-terminale Methylcarbamat kommt in allen drei Proximicinen vor, der strukturelle Unterschied der Proximicine liegt in der C-terminalen Modifikation. Proximicin A (**3**) enthält ein C-terminales Amid, während Proximicin B (**4**) und Proximicin C (**5**) mit Tyramin bzw. Tryptamin modifiziert sind. Interessanterweise zeigen die Proximicine eine hohe Struktur-analogie zu Netropsin (**1**) und Distamycin (**2**). Ihr charakteristischer Baustein, das 2,4-disubstituierte *N*-Methylpyrrol, ist durch einen 2,4-disubstituierten Furanring ersetzt. Diese γ -Furanaminosäure ist bisher unbekannt. Obwohl eine beachtliche Zahl an Netropsin-Analoga synthetisiert wurde, bei denen das *N*-Methylpyrrol durch andere Heterocyclen ersetzt wurde, ist dieses strukturelle Motiv bisher nicht verwendet worden. Darüber hinaus zeigt die γ -Aminosäure 4-Aminofuran-2-carbonäure eine strukturelle Ähnlichkeit zu einem GABA-Mimetikum.^[18]

Um sowohl die strukturelle als auch die funktionelle Beziehung zwischen Netropsin und den Proximicinen zu untersuchen, wurden die Netropsin-Proximicin-Hybride **6**–**8** (Abbildung 2) synthetisiert.^[19] In diesen Hybriden wurde der *N*-Methylpyrrol-Grundkörper des Netropsins mit den entsprechenden N- und C-terminalen Modifikationen der Proximicine A, B und C versehen. Die Untersuchung der Proximicine **3**–**8** auf ihre Antitumoraktivität gegen drei Krebszelllinien zeigte eine deutlich höhere Antitumoraktivität der Proximicine **3**–**5** im Vergleich zu **1** und **2** (Tabelle 1) und eine moderat höhere Aktivität von **7** und **8**. Die DNA-Bindungsaktivität der Proximicine wurde mithilfe von DNA-Schmelzkurven vermessen. Im Unterschied zu Netropsin und Distamycin konnte weder für die Naturstoffe Proximicin A, B und C (**3**–**5**) noch für die synthetischen Hybride **6**–**8** eine Bindung an DNA nachgewiesen werden.

Tabelle 1: Antitumoraktivitäten der Verbindungen **1**–**8** gegen drei Krebszelllinien.

Substanz	AGS ^[a] $GI_{50}^{[b]}$ [μM]	HepG2 ^[a] $GI_{50}^{[b]}$ [μM]	MCF7 ^[a] $GI_{50}^{[b]}$ [μM]
Netropsin (1)	>116.2	60.4	74.3
Distamycin (2)	>103.8	54.0	14.3
Proximicin A (3)	2.0	2.8	24.6
Proximicin B (4)	3.6	23.0	12.1
Proximicin C (5)	0.6	1.8	20.6
6	93.9	119.0	131.5
7	28.4	34.1	41.0
8	17.7	21.6	24.9

[a] Zelllinien: AGS: Magenkarzinom; HepG2: Leberkarzinom, MCF7: Mammakarzinom. [b] GI_{50} : 50% Wachstumshemmung.

5) aus *Verrucosipora* noch für die synthetischen Hybridmoleküle (**6–8**) eine Veränderung der DNA-Schmelztemperatur T_m detektiert werden.

Zellzyklusanalysen, die an AGS-Zellen durchgeführt wurden, ergaben, dass **1** (116.2 μM) und **2** (103.8 μM) zu einer Anreicherung der Zellen in der G2/M-Phase nach Inkubation für 24 h ((**1**) + 6.9%; (**2**) + 5.4%) bzw. 40 h ((**1**) + 11.3%; (**2**) + 28.9%) führen und den Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase ((**1**) – 9.2% und – 9.5%; (**2**) – 7% und – 20.5%) verringern. Proximicin C (**5**) (1.1 μM) und Verbindung **8** (21.6 μM) führen zu einem Zellarrest in G0/G1 nach 24 h Inkubation ((**5**) + 5.6%; (**8**) + 21.4%). Nach 40 h kam es zu einer Zunahme der Zellen in der sub-G1-Phase, d.h. zu apoptotischen Zellen ((**5**) + 2.9%; (**8**) + 9.8%).

Wir haben basierend auf diesen Daten untersucht, ob **5** und **8** Zellzyklus-regulierende Proteine aktivieren, die am Übergang der Zellen von der G1- in die S-Phase beteiligt sind (p53, p21, Cyclin E). Es zeigte sich, dass Proximicin C (**5**) (Daten nicht gezeigt) und das Hybrid C (**8**) die Hochregulation von p53 und des Cyclinkinase-Inhibitors p21 in AGS-Zellen induzieren (Abbildung 3). Dagegen induzierte Dista-

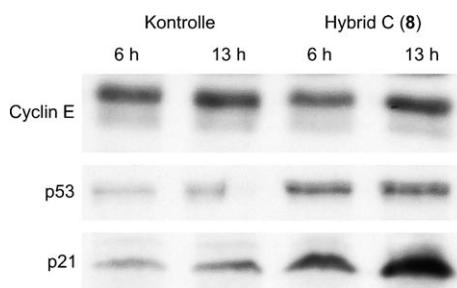


Abbildung 3. Der Western-Blot zeigt den Einfluss des Netropsin-Proximicin-Hybrids C (8) auf die Expression von p21, p53 und Cyclin E in AGS-Zellen 6 h und 13 h nach der Inkubation.

mycin die Expression von p53 und p21 nicht (siehe Hintergrundinformationen). Um den Effekt von **1**, **2**, **5** und **8** zu vergleichen, wurde die Wachstumsemmung dieser Verbindungen auf Leberkrebszelllinien mit mutiertem p53 (Huh7) getestet.^[20] Die erhaltenen Daten zeigten, dass **1** und **2** ähnlich cytotoxisch waren wie in HepG2-Zellen (GI_{50} : (**1**) 57.7 μM ; (**2**) 62.3 μM), während **5** und **8** in den Zellen mit mutiertem p53 das Zellwachstum nicht hemmten.

Netropsin (**1**) (58.1 μM) arretierte die Huh7-Zellen in der G2/M-Phase (+ 4.4%), Distamycin (**2**) (51.9 μM) arretierte die Huh7-Zellen in der G2/M-Phase (+ 8.7%) und in der S-Phase (+ 10.6%). Proximicin C (**5**) (4.4 μM) und Verbindung **8** (21.6 μM) führten zu keiner Veränderung der Verteilung der Zellen innerhalb des Zellzyklus der Huh7-Zellen.

Die Experimente belegen, dass die Antitumoraktivitäten der Proximicine, die ein N-terminales Methylcarbamat tragen, bemerkenswerterweise deutlich höher sind als die von Netropsin (**1**) und Distamycin (**2**), die Guanidinylglycinyl- bzw. Formyl-Funktionen aufweisen. Die Analysen der DNA-Schmelzkurven zeigen, dass die Antitumoraktivität der Proximicine **3–5** und der Hybride **6–8** nicht auf einer Bindung an die DNA basieren kann. Die strukturellen Unterschiede der

Proximicine im Vergleich zu Netropsin sind Modifikationen am 1) N-Terminus, 2) C-Terminus sowie 3) der Furan-N-Methylpyrrol-Austausch. Die unterschiedlichen C-terminalen Amidmodifikationen der Proximicine A (**3**) und C (**5**) haben keinen großen Einfluss auf die Antitumoraktivität. Dieser Effekt wird bei den synthetischen Hybriden **6–8** deutlicher, wobei die *N*-Methylpyrrol-Derivate generell geringere Antitumoraktivität als die Furan-Analoga aufweisen. Der Austausch des Sauerstoffatoms des Furans gegen eine *N*-Methylgruppe führt zu einer 1.2- bis ca. 30-fachen Abnahme der Antitumoraktivität. Diese Abnahme könnte auf eine deutliche Veränderung der elektronischen Eigenschaften der Proximicine zurückzuführen sein, da die beiden Sauerstoffatome des Furans als zusätzliche Wasserstoffbrückenakzeptoren dienen können und darüber hinaus die Gesamtpolarität des Moleküls erhöhen. Obwohl Hybrid C (**8**) eine andere Struktur aufweist und eine geringere Antitumoraktivität zeigt, scheint es dasselbe zelluläre Target zu adressieren wie das entsprechende Proximicin C (**5**). Dies könnte vermuten lassen, dass der C-terminale Tryptaminrest einen signifikanten Einfluss auf die Hochregulation von p53 und p21 ausübt. Es scheint allerdings, als ob hauptsächlich das Methylcarbamat zur Antitumoraktivität beiträgt. Boger et al. berichteten von einem ähnlichen Effekt für Distamycin bei der Substitution der Formyl-Funktion durch einen *tert*-Butylcarbamatrest, während die positive Ladung am C-Terminus beibehalten wurde.^[11]

Insgesamt führen die hier beschriebenen Proximicine innerhalb des Zellzyklus zu einem Arrest der AGS-Zellen in der G0/G1-Phase und zu einer Zunahme der Expression von p53 und p21, während Distamycin, wie auch von Poot et al. beschrieben,^[20] die Zellen in der G2/M-Phase arretiert. Distamycin, im Unterschied zu den Proximicinen, hemmt das Zellwachstum von p53-mutierten Zellen (Huh7). Diese Daten bestärken die Annahme, dass die Proximicine beim Übergang der Zellen von der G1- in die S-Phase auf ein anderes zelluläres Target wirken.

Zusammenfassend haben wir die Strukturen von drei neuen Netropsin-artigen Antibiotika aus marinen Actinomyceten mit interessanten Antitumoraktivitäten vorgestellt. Derzeit richtet sich unsere Arbeit auf die Totalsynthese der Proximicine sowie auf die Synthese von Furan-basierten Proximicin-Netropsin-Hybriden, um deren Antitumoraktivitäten zu untersuchen.

Eingegangen am 18. November 2007,
veränderte Fassung am 10. Januar 2008
Online veröffentlicht am 17. März 2008

Stichwörter: Antitumoraktivität · Naturstoffe · Netropsin · Proximicin · Strukturaufklärung

- [1] J. W. Lown, *J. Mol. Recognit.* **1994**, *7*, 79–88.
- [2] A. C. Finlay, F. A. Hochstein, B. A. Sabin, F. X. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 341–343.
- [3] F. Arcamone, S. Penco, P. Orezzi, V. Nicollella, A. Pirelli, *Nature* **1964**, *203*, 1064–1065.
- [4] P. G. Baraldi, D. Preti, F. Fruttarolo, M. A. Tabrizi, R. Romagnoli, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 17–35.

- [5] C. Bailly, B. J. Chaires, *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 513–538.
- [6] P. B. Dervan, B. S. Edelson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 284–299.
- [7] B. S. P. Reddy, S. K. Sharma, J. W. Lown, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 475–508.
- [8] D. E. Wemmer, *Biopolymers* **1999**, *52*, 197–211.
- [9] C. J. Suckling, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2004**, *14*, 1693–1724.
- [10] D. L. Boger, M. A. Dechantsreiter, T. Ishii, B. E. Fink, M. P. Hedrick, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2049–2057.
- [11] D. L. Boger, B. E. Fink, M. P. Hedrick, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6382–6394.
- [12] L. De Angelis, *Drugs Today* **1977**, *13*, 319–326.
- [13] M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* **1985**, *183*, 553–563.
- [14] J. Riedlinger, A. Reicke, H. Zähner, B. Krismer, A. T. Bull, L. A. Maldonado, A. C. Ward, M. Goodfellow, B. Bister, D. Bischoff, R. D. Süßmuth, H.-P. Fiedler, *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 271–279.
- [15] B. Bister, D. Bischoff, M. Ströbele, J. Riedlinger, A. Reicke, F. Wolter, A. T. Bull, H. Zähner, H.-P. Fiedler, R. D. Süßmuth, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2628–2630; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2574–2576.
- [16] H.-P. Fiedler, *Nat. Prod. Lett.* **1993**, *2*, 119–128.
- [17] H.-P. Fiedler, C. Bruntner, J. Riedlinger, A. T. Bull, G. Knutsen, A. L. Jones, M. Goodfellow, W. Beil, K. Schneider, S. Keller, R. D. Süßmuth, *J. Antibiot.* **2008**, im Druck.
- [18] a) J. P. Burkhardt, G. W. Holbert, B. W. Metcalf, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5267–5270; b) M. Fu, R. B. Silverman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 203–206; c) Z. Wang, H. Yuan, D. Nikolic, R. B. Van Breemen, R. B. Silverman, *Biochemistry* **2006**, *45*, 14513–14522.
- [19] Zur Synthese der Netropsin-Proximicin-Hybride **6–8** siehe die Hintergrundinformationen.
- [20] M. Poot, K. H. Hiller, S. Heimpel, H. Hoehn, *Exp. Cell Res.* **1995**, *218*, 326–330.