



Synthese membranaktiver Lipopeptid- und Indolalkaloid-Varianten zur Entwicklung neuer Antibiotika und Zytostatika

Sebastian Johannes Bieringer

Vollständiger Abdruck der vom TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit der Technischen Universität München zur Erlangung eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Bastian Blombach
Prüfer*innen der Dissertation: 1. Prof. Dr. rer. nat. Herbert Riepl
2. Prof. Dr. rer. nat. Volker Sieber

Die Dissertation wurde am 03.05.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und von der promotionsführenden Einrichtung TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit am 27.11.2023 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit zwischen Juli 2017 bis September 2020 an der Professur für Organisch-Analytische Chemie (OAC) des TUM Campus Straubing.

Mein Dank gilt all jenen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützten. Als Erstes möchte ich mich bei meinem Betreuer **Prof. Dr. Herbert Riepl** bedanken, dass ich die Möglichkeit hatte, dieses interessante Thema an seinem Lehrstuhl bearbeiten zu dürfen. Die ausführliche Erfahrung auf dem Bereich der organischen Synthese sowie die tatkräftige Unterstützung bei praktischen Arbeiten im Labor waren stets eine große Hilfe für das Weiterkommen.

Großer Dank geht an die Mitarbeiter des Laboratory of Algal Biotechnology am Centre Algatech, Kumar Saurav, Jan Hájek und Pavel Hrouzek für die Bereitstellung der Minutissamide und die Unterstützung bei den Experimenten. Vielen Dank auch an die Leitung des Centre Algatech, Ondřej Prášil, für den dreiwöchigen Forschungsaufenthalt in Třeboň.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Stefanie Ritter für die Durchführung verschiedener Zelltests und die Hilfe bei der Aufreinigung größerer Mengen von Substanz 12e.

Ferner gilt mein Dank Dr. Corinna Urmann für die Unterstützung bei den massenspektrometrischen Analysen, sowie den anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls Rainer Herzog, Dr. Veronika Huber, Tobias Burger, Dr. Michael Kirchinger und Theresa Able für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Zuletzt möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken, für ihre Unterstützung in dieser arbeitsintensiven Zeit.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	4
1 Einleitung	5
2 Grundlagen	8
2.1 Teleocidine	8
2.1.1 Teleocidin und Lyngbyatoxin	8
2.1.2 Biosynthese der Teleocidine	10
2.1.3 Teleocidine als PKC-Aktivatoren	13
2.1.4 Totalsynthetische Ansätze zu Indolactam und den Teleocidinen	15
2.1.5 Teleocidine: Zielsetzung dieser Arbeit	21
2.2 Cyclische Lipopeptide aus Blaualgen	22
2.2.1 Nichtribosomale Peptide - Lipopeptide	22
2.2.2 Biosynthese und Lipoinitiation	24
2.2.3 Membranaktivität der Lipopeptide	26
2.2.4 Bedeutung von cyclischen Lipopeptiden für die Medizin	26
2.2.5 Strukturelle Vielfalt der cyclischen Lipopeptide	27
2.2.6 Cyclische Lipopeptide: Zielsetzung dieser Arbeit	37
2.3 Indigoide Farbstoffe	39
2.3.1 Traditionelle Nutzung als Farbstoff	39
2.3.2 Pharmazeutische Anwendungen von indigoiden Farbstoffen	40
2.3.3 Indigoide Farbstoffe als CDK-Inhibitoren	41
2.3.4 Synthetische Methoden für indigoide Farbstoffe	42
2.3.5 Indigoide Farbstoffe: Zielsetzung dieser Arbeit	46
3 Ergebnisse	47
3.1 Teleocidine	47
3.1.1 Totalsynthese von (-)-Indolactam V	47
3.1.2 Isolierung von Teleocidinen	52
3.1.3 Versuche zur synthetischen Modifikation von Teleocidinen	55
3.1.4 Teildiskussion Teleocidine	56
3.2 Herstellung von Minutissamid Varianten	57
3.2.1 Verlängerung der aliphatischen Kette von Minutissamid C	57
3.2.2 Strukturdiskussion: Minutissamid C Varianten	62
3.2.3 Veresterung von Serin und Threoninresten bei Minutissamid A	63

3.2.4	Strukturdiskussion: Minutissamid A Varianten	66
3.2.5	Olefinmetathese von Minutissamid A	71
3.2.6	Cytotoxizität und antifungale Aktivitäten der semisynthetischen Minutissamid Varianten	73
3.2.7	Teildiskussion Minutissamide	76
3.3	Herstellung von Qingdainon- und Thioindirubinderivaten	79
3.3.1	Synthese von Dihydroxyqingdainon	79
3.3.2	Antiproliferative- und Apoptose auslösende Effekte von Dihydroxyqingdainon	84
3.3.3	Herstellung von Thioindirubinen	87
3.3.4	Antiproliferative- und apoptoseauslösende Effekte von 5'-Methylthioindirubin	88
3.3.5	Differenzierungsauslösende Wirkung der Thioindirubine auf neuronale Stammzellen	90
3.3.6	Teildiskussion indigoide Farbstoffe	91
4	Diskussion und Ausblick	93
5	Experimenteller Teil	96
5.1	Geräte und Methoden	96
5.2	Isolierung von Teleocidinen	98
5.2.1	Kultivierung von <i>Streptomyces olivoreticuli</i>	98
5.2.2	Kultivierung von <i>Streptomyces blastmyceticum</i>	99
5.2.3	Isolierung und Aufreinigung von Teleocidin B aus <i>Streptomyces olivoreticuli</i>	99
5.2.4	Isolierung und Aufreinigung von Lyngbyatoxin A aus <i>Streptomyces blastmyceticum</i>	100
5.3	Präparative Vorschriften	101
5.3.1	Thioindirubinsynthesen	101
5.3.2	Qingdainonsynthesen	115
5.3.3	Synthese von (-)-Indolactam V	119
5.3.4	Modifikation von Lipopeptiden aus Blaualgen	125
6	Literaturverzeichnis	132
7	Anhang	145
7.1	NMR-Spektren der synthetischen Minutissamide	145
7.2	NMR-Spektren ausgewählter Thioindirubine	152
7.3	Abbildungsverzeichnis	157
7.4	Tabellenverzeichnis	161
7.5	Abkürzungsverzeichnis	162
7.6	Veröffentlichungen	164

Zusammenfassung

Die synthetische Modifikation bekannter Naturstoffe ist eine interessante Möglichkeit, um eine Veränderung des pharmakologischen Wirkungsprofils dieser Substanzen zu erreichen. Hierbei können sich neue Wege zur Therapie komplexer Krankheitsbilder ergeben. Bei der Behandlung von Patienten geht es um ein geeignetes „therapeutisches Fenster“ das einen Anwendungsbereich angibt, bei dem eine minimale Beeinträchtigung unbeteiligter Zellen des Körpers gegenüber maximaler Aktivität an den Zielzellen stattfindet. Wirkstoffe, die in der Natur aufgefunden werden, haben hier oft Defizite.

Im Rahmen des Projekts Interreg - Blaualgen standen verschiedene von Blaualgen produzierte Teleocidine und Minutissamide zur Verfügung, die interessante Ausgangsaktivitäten zeigen. Teleocidine werden aufgrund ihrer Fähigkeit Protein Kinase C (PKC) zu aktivieren als Tumorpromotoren klassifiziert, weswegen Anwendungspotential in der Krebstherapie als PKC-Hemmer besteht. Jedoch sollte die Aktivität und das Wirkungsprofil dieser Substanzen für den Einsatz genau angepasst werden. Die Teleocidine Lyngbyatoxin und Teleocidin B konnten aus Zellkulturen isoliert und für Bioaktivitätstests zur Verfügung gestellt werden. Der biologische Teleocidin Precursor Indolactam konnte durch eine literaturbekannte Synthese mit geringfügigen Verbesserungen bereitgestellt werden.

Des Weiteren wurden im Rahmen des Projekts vom Institut Algatech in Třeboň Minutissamide aus *Cylindrospermum alatosporum* gewonnen und zur Derivatisierung zur Verfügung gestellt. Minutissamide sind cyclische Lipopeptide, welche aufgrund ihres Aufbaus aus einem Peptidring und einem Fettsäurerest oftmals cyto- und fungotoxische Eigenschaften besitzen. Ein Einsatzgebiet dieser Substanzen ist somit die Behandlung von Pilz- und bakteriellen Infektionen. Der Mechanismus der Bioaktivität beruht auf einer Einlagerung des aliphatischen Rests in die Lipid-Doppelschicht der Membran, wodurch es zu einer Permeabilisierung der Membran kommt. Es bestand die Vermutung, dass bei einer Verlängerung des aliphatischen Rests deutlich geringere EC_{50} beobachtet werden könnten. Für die chemische Modifikation wurde Minutissamid C zunächst als besonders vielversprechend ausgewählt, da es mit einer isolierten Ketogruppe am Fettsäurerest leicht derivatisiert werden kann. Mittels Grignard-Reaktion wurde die Einführung einer aliphatischen Kette angestrebt. Eine anschließende Wassereliminierung mit p-TsOH lieferte Minutissamid C Varianten mit erhöhter Kettenlänge von jeweils 4 und 8 Kohlenstoffatomen. Im Fall von Minutissamid A wurden über eine Steglich-Veresterung mit Carbonsäureanhydriden der Struktur weitere aliphatische Ketten hinzugefügt. Eine Wittig-Olefinierung wurde bei Minutissamid C versucht, jedoch konnten die gewünschten Produkte nicht nachgewiesen werden. Bei Zelltests konnten die

Minutissamid C Derivate zwischen $0.3\ \mu\text{M}$ – $2.5\ \mu\text{M}$ höhere Cytotoxizitäten als die ursprüngliche Substanz aufweisen. Die Minutissamid A Varianten zeigten eine Auslöschung ihrer natürlichen Cytotoxizität, dafür allerdings ein spontanes Entstehen einer starken Fungotoxizität bei *A. alternata*.

Die Inhibition von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) führt zur Proliferationshemmung bei Zellen. Der indigoide Farbstoff Indirubin ist in der Lage CDKs zu inhibieren, weshalb Indirubin und dessen Derivate als weitere Substanzklasse untersucht wurden. Durch eine neuartige Totalsynthese, die sich für die Herstellung substituierter Indirubine eignet, konnten Thioindirubine sowie weitere substituierte Derivate wie z.B. ein aktives Dihydroxyqingdainon erhalten werden. Bei dieser Vorgehensweise können Substituenten auf Basis einer α -Phenylaminoacrylsäure-Methode eingeführt werden. Der Indoxylteil wird von Ylidenoxindolen aus Tryptanthrinen oder Isatinen durch ein sequenzielles Hinzufügen von Anilinen, gefolgt von einem Ringschluss, aufgebaut. Bei den Zelltests konnte für Dihydroxyqingdainon und 5'-Methylthioindirubin eine antiproliferative Wirkung auf Nalm-6 Leukämiezellen festgestellt werden. Bei 5'-Methylthioindirubin konnte eine differenzierungsauslösende Aktivität auf pluripotente, adulte, neuronale Stammzellen beobachtet werden.

Abstract

The synthetic modification of known natural products gives interesting opportunities to change the pharmacological profile of these substances. In this manner, new ways to treat complex pathologies can be found. In the treatment of patients, it is a matter of an appropriate „therapeutic window“ that indicates a range of application where there is minimal interference with uninvolved cells of the body versus maximum activity on the target cells. Pharmaceutical agents found in nature often have deficiencies in this regard.

Within the project Interreg - Blue-green Algae, various Teleocidins and Minutissamides produced by blue-green algae were available, which show interesting initial activities. Teleocidins are classified as tumor promoters due to their ability to activate PKC and therefore offer potential applications in the treatment of cancer as PKC-Inhibitor. However, the activity and effect profile of these substances should be precisely adjusted for the application. The Teleocidins Lyngbyatoxin A and Teleocidin B were isolated from cell cultures and have been provided for bioactivity testing. The biological Teleocidin precursor Indolactam was prepared by a synthesis known from literature with minor improvements.

Furthermore, Minutissamides obtained from *Cylindrospermum alatosporum* were provided for chemical modification by the Algatech Institute in Třeboň as part of the project. Minutissamides are cyclic lipopeptides which, due to their structure consisting of a peptide ring and a fatty acid rest, possess strong cytotoxic and antifungal activities. The mechanism of bioactivity is based on the incorporation of the aliphatic residue into the lipid bilayer of the membrane, which leads to membrane permeabilization. A suitable application for these substances is thus the treatment of fungal and bacterial infections. It was suspected that significantly lower EC₅₀ would be observed if the aliphatic residue was extended. For the chemical modification, Minutissamide C was initially selected as particularly promising because it can be readily derivatized with an isolated keto group on the fatty acid residue. The introduction of an aliphatic chain was targeted here by means of a Grignard reaction. Subsequent water elimination with p-TsOH yielded Minutissamide C variants with increased chain length of 4 and 8 carbon atoms, respectively. In the case of Minutissamide A, additional aliphatic chains were added to the structure via carboxylic acid anhydrides by a *Steglich*-esterification. Wittig olefination of Minutissamide C was attempted, but the desired products were not found. In cell tests, the minutissamide C derivatives were able to exhibit higher cytotoxicities between 0.3 μM–2.5 μM than the original compound. The Minutissamide A variants showed extinction of their natural cytotoxicity, but spontaneous emergence of strong antifungal activity on *A. alternata*.

Inhibition of cyclin-dependent Kinases (CDK) leads to proliferation inhibition in cells. The indigoid dye Indirubin is able to inhibit CDKs. Hence, Indirubin and its derivatives were investigated as a further substance class. By a novel total synthesis suitable for the preparation of substituted Indirubins, Thioindirubins as well as other substituted derivatives such as an active Dihydroxyqingdainone were obtained. The method reported within this work shows a way to introduce different substituents based on a α -phenylaminoacrylic acid methodology. The indoxyl part is built up using ylidenoxindoles in our case, from Tryptanthrines or Isatins, by means of the sequential introduction of anilines followed by ring-closing. In cell tests, Dihydroxyqingdainone and 5'-Methylthioindirubin showed an antiproliferative effect on Nalm-6 leukemia cells. For 5'-Methylthioindirubin, a differentiation inducing activity on pluripotent adult neural stem cells was observed.

1 Einleitung

Die Natur bietet einen Reichtum an biologisch aktiven Substanzen und Metaboliten, deren Vorbild als stetige Inspirationsquelle zur Entwicklung neuer potenter Arzneistoffe dient. In vielen Zivilisationen finden sich Zusammenstellungen über die Nutzung pharmazeutisch wertvoller Stoffe aus pflanzlichen Quellen. In China gibt es beispielsweise eine große Anzahl beschriebener Drogen und Heilverfahren, aus denen die traditionelle chinesische Medizin (TCM) unabhängig von der modernen westlichen Medizin hervorging. Aus heutiger Sicht ist es wichtig, die frühzeitliche Gesundheitslehre zu untersuchen und kritisch zu hinterfragen. Auf diese Weise ist es möglich, die Erfahrung altertümlicher Quellen zu nutzen und neue Wirkstoffe für die moderne Forschung zu gewinnen. Mit der Entstehung der organischen Chemie Anfang des 18. Jahrhunderts ergaben sich im Laufe der Zeit wiederum Möglichkeiten, die bereits bekannten Wirkstoffe totalsynthetisch herzustellen und gegebenenfalls zu modifizieren. Ein prominentes Beispiel für die Totalsynthese eines Arzneistoffes wäre die Herstellung des Zytostatikums Taxol, welches mit über 50 Schritten eines der komplexesten Herstellungsverfahren der Chemie ist. Krebs stellt nach wie vor eines der größten Gesundheitsprobleme der Menschheit dar. Ein Ziel dieser Arbeit ist es daher, durch die genannten Möglichkeiten neue Wirkstoffe zu entwickeln, welche als Zytostatika für die Krebstherapie eingesetzt werden können.

Die heutige chemische Industrie produziert weiterhin einen Großteil ihrer Basischemikalien aus Rohöl. Mit der Umstellung vieler Staaten auf regenerative Energien und nachwachsende Rohstoffe besteht vermehrt Interesse an „grüner Chemie“, sprich an der Nutzung von nachhaltigen Stoffströmen bei der Erzeugung chemischer Produkte. In diesem Zusammenhang wird mittlerweile ebenfalls der Zucht verschiedener Algenstämme in spezialisierten Einrichtungen Beachtung geschenkt. Im Gegensatz zu landwirtschaftlichen Erträgen bieten Algen in vielen Fällen einen höheren Anteil an nutzbaren Rohstoffen. Beispielsweise konnte durch eine auf Lipidproduktion optimierte Kultivierung von *Chlamydomonas reinhardtii* ein Fettanteil von 65 % erreicht werden [1]. Die aus Raps gewonnenen Ölsaaten beinhalten hierbei einen vergleichsweise niedrigeren Lipidanteil von 40 %. Für die Kultivierung von Algen wird des Weiteren keine landwirtschaftlich nutzbare Fläche verbraucht. Ein solcher Prozess steht somit nicht in Konkurrenz zur Erzeugung von Nahrungsmitteln. Allerdings scheinen Algen nicht nur bei der energetischen Nutzung vielversprechend zu sein. Ein ebenso interessanter Faktor ist die Produktion biologisch aktiver Substanzen in Form von Toxinen oder anderen Naturstoffen. Auch bei Blaualgen (Cyanobakterien) besteht eine besondere Vielfalt solcher Sekundärmetabolite. Eine ganzheitliche Nutzung von Algen würde somit bedeuten, neben den Hauptbestandteilen (Fette, Proteine, Glycoside), auch Stoffe mit komplexer Struktur für spezialisierte Anwendungen zu nutzen. Diese Arbeit entstand im Rahmen des Interreg-Projekts „Naturstoffe aus Blaualgen“, welches sich genau mit

dieser Thematik beschäftigte. Im Zuge dieses Projekts wurde eine bestimmte Art von cyclischen Lipopeptiden, die Minutissamide, durch den Lehrstuhl „Algal Biotechnology“ am Centre Algatech in Třeboň isoliert, aufgereinigt und für weitere Experimente innerhalb dieser Doktorarbeit zur Verfügung gestellt. Hierzu sollten Methoden zur chemischen Derivatisierung, insbesondere die Benutzung der Olefinmetathese, aber auch andere synthetische Möglichkeiten, evaluiert werden. Die erzeugten Naturstoffvarianten sollten wiederum für biologische Untersuchungen an Projektpartner weitergegeben werden. Hintergrund hierzu ist die Fähigkeit der Lipopeptide eine Membranpermeabilisierung bei Bakterien, Schimmelpilzen und Zellen auszulösen. Durch diese Eigenschaft kommen Lipopeptide als Antibiotika, Antimykotika oder auch als Zytostatika in Frage.

Aufgrund der Häufigkeit von Krebserkrankungen kommt der Entwicklung von Zytostatika heutzutage viel Aufmerksamkeit zu. Bestehende Probleme von Zytostatika sind unter anderem, dass neben neoplastischen Zellen auch gesunde Zellen angegriffen werden. Das Auftreten resistenter Krebszellen kann ebenso eine Herausforderung darstellen. Weitere Toxine aus Blaualgen, die für die Entwicklung neuer Zytostatika in Frage kommen, sind die Teleocidine. Besonderes Interesse kam den Teleocidinen zu, als deren Wirkung als PKC-Aktivator und Tumorpromotor beschrieben wurde [2]. In der Struktur der Teleocidine befindet sich ein aliphatischer Rest, der über Isopreneinheiten aufgebaut wird und somit Doppelbindungen besitzt. Bei diesen Doppelbindungen ist folglich eine Derivatisierung über die Olefinmetathese denkbar.

Neben den Blaualgentoxinen sollen innerhalb dieser Arbeit die indigoiden Farbstoffe als weitere Substanzklasse membranaktiver Naturstoffe untersucht werden. Bei Derivaten des Indirubins konnte bereits eine hemmende Wirkung auf die Proliferation von Leukämiezellen festgestellt werden [3]. Indigoide Farbstoffe sind Bisindolalkaloide und besitzen daher ähnliche Strukturmerkmale wie die Teleocidine. Ein gemeinsamer Pharmacophor wäre somit denkbar. Dies kann beispielsweise an den Strukturen von (-)-Indolactam V, dem Grundgerüst der Teleocidine und Indirubin verdeutlicht werden.

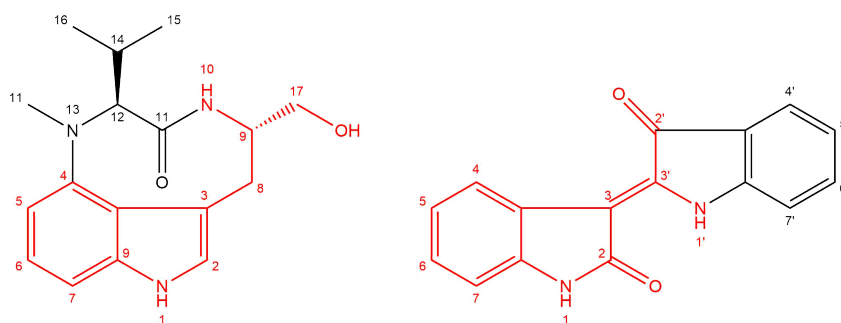


Abbildung 1.1: Strukturen von (-)-Indolactam V und Indirubin. In rot eingezeichnet ist der mutmaßlich gemeinsame Pharmacophor

Beide Moleküle sind am C3 des Indols substituiert, wobei Indirubin eine zusätzliche Oxogruppe am C2 besitzt. Indolactam hat am Substituenten ein Amid sowie eine Hydroxygruppe. Zudem ist die Kohlenstoffkette am Substituenten um ein C-Atom länger. Außerdem besitzt es eine weitere Oxogruppe und ein heterozyklisches Amin. In dieser Arbeit sollen speziell Derivate der indigoiden Farbstoffe Thioindirubin und Qingdainon erzeugt werden. Die meisten indigoiden Farbstoffe sind fast komplett unlöslich in Wasser, was ein grundlegendes Problem hinsichtlich der Bioverfügbarkeit darstellt. Aus diesem Grund sollte eine Derivatisierungsstrategie mit dem Ziel der Verbesserung der Wasserlöslichkeit angestrebt werden.

Innerhalb dieser Arbeit sollen einerseits polare Gruppen, welche die Wasserlöslichkeit und somit Bioverfügbarkeit verbessern und andererseits unpolare Kohlenwasserstoffketten, die eine stärkere Wechselwirkung mit Membranen erlauben, in bestehende Strukturen eingeführt werden. Obwohl es sich um unterschiedliche Herangehensweisen handelt, kann dennoch bei beiden eine Optimierung der pharmakologischen Wirksamkeit erreicht werden. Um eine Derivatisierung zu ermöglichen, kann entweder ein total- oder ein semisynthetischer Ansatz gewählt werden. Besonders bei Naturstoffen mit komplexen Strukturen kann ein semisynthetischer Weg deutlich praktikabler sein. Durch eine Totalsynthese wiederum können Substituenten über den Einsatz verschiedener Ausgangsstoffe gesteuert werden. Zusammengefasst ist das Ziel dieser Arbeit, Varianten natürlicher Wirkstoffe zu gewinnen, mithilfe derer sich neue Therapiemöglichkeiten für komplexe Erkrankungen ergeben. Zudem soll ein besseres Verständnis für die Mechanismen der einzelnen Bioaktivitäten gewährleistet werden.

2 Grundlagen

2.1 Teleocidine

2.1.1 Teleocidin und Lyngbyatoxin

Bei Schwimmern in tropischen Gewässern, z.B. in Okinawa oder auf Hawaii, wurde des Öfteren eine Hautentzündung beobachtet, die im Allgemeinen als „Swimmer’s Itch“ bezeichnet wird. Als Auslöser für diese Hautreaktion wurde der direkte Kontakt mit der Blaualge *Moorea producens* (früher als *Lynbya majuscula* klassifiziert [4]) festgestellt [5, 6]. Der Wirkungsmechanismus beruht nicht auf einer allergischen Reaktion, sondern auf Toxinen, die vom Cyanobakterium hergestellt werden und als primäre Reizerreger fungieren [6, 7]. Die aktiven Spezies sind hierbei Lyngbyatoxin A, Aplysiatoxin und einige Derivate dieser Substanzen [8–10].

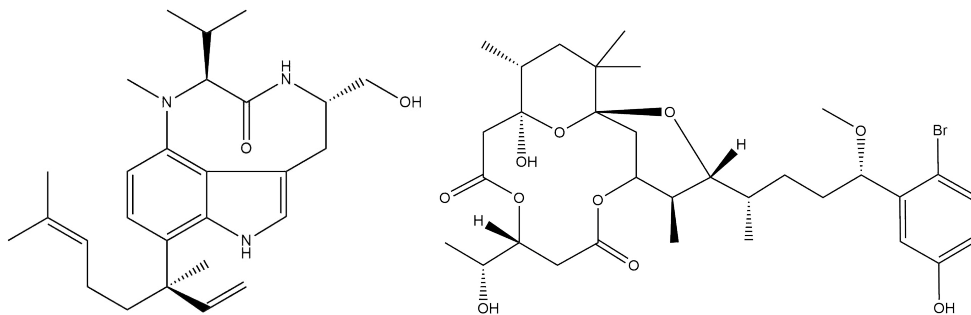


Abbildung 2.1: Strukturen von Lyngbyatoxin A (links) und Aplysiatoxin (rechts). Beide Toxine werden von *Moorea producens* hergestellt und sind verantwortlich für die „Swimmer’s Itch“-Krankheit bei Badegästen auf Hawaii und Okinawa

Die Strukturaufklärung von Lyngbyatoxin konnte 1979 von Cardellina et al. durchgeführt werden, indem die Substanz aus gesammelter Biomasse von *Moorea producens* isoliert wurde [10]. Durch den Vergleich von spektroskopischen Daten und der Bioaktivität konnte festgestellt werden, dass Lyngbyatoxin strukturell mit einem Isomer von Teleocidin A identisch ist, welches als Teil des Substanzgemisches „Teleocidin“ zum ersten Mal 1960 durch Takashima et al. aus *Streptomyces mediocidius* isoliert wurde [11]. Hierbei fiel auf, dass es sich bei Teleocidin A um zwei Stereoisomere handelt.

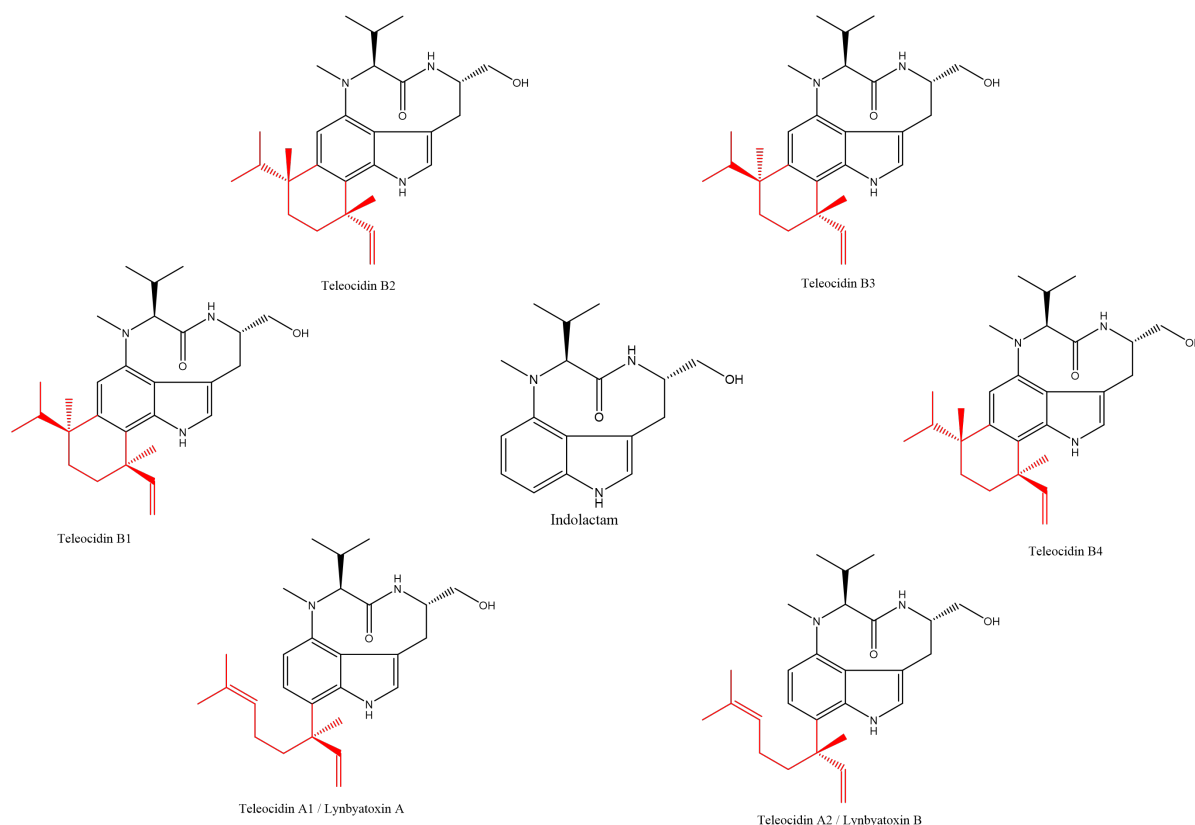


Abbildung 2.2: Darstellung aller Teleocidin A und B Isomere. Der biologische Precursor Indolactam ist in der Mitte abgebildet

Die Struktur der Teleocidine wird aufgebaut durch die Aminosäuren Valin und Tryptophan, die zum einen durch eine Peptidbindung, zum anderen durch den N-Terminus des Valins mit dem C4 des Indolrings am Tryptophan verknüpft sind. Der Unterschied zwischen den einzelnen Teleocidinen liegt hierbei am lipophilen Rest des C7 bzw. C6 am Indolring. Dieser lipophile Rest besteht bei Teleocidin A und B wiederum aus zwei Isopreneinheiten. Bei Teleocidin B liegen die Isopreneinheiten des Weiteren als cyclische Verbindung vor. Eine Substanz mit einer Teleocidin Grundstruktur, die nur eine Isopreneinheit als Rest besitzt, wäre beispielsweise Pendolmycin [12]. Fehlt der lipophile Rest, handelt es sich um Indolactam, dem biologischen Precursor der Teleocidine. Der Name Indolactam leitet sich davon ab, da die Struktur aus einer Indoleinheit und einem neungliedrigen Lactamring besteht. Diese Substanz wurde zum ersten Mal aus *Streptomyces blastomyces* durch Irie et al. isoliert [13]. Neben den zwei genannten Teleocidin A Isomeren beinhaltet „Teleocidin“ aus *Streptomyces mediocidius* noch vier weitere Teleocidin B Isomere.

2.1.2 Biosynthese der Teleocidine

Aus den Teleocidin produzierenden Actinomyceten konnte des Weiteren die Substanz (-)-Indolactam V isoliert werden [13]. Dieser Fund deutete darauf hin, dass Indolactam als biologischer Precursor der Teleocidine betrachtet werden kann. Die Struktur von Indolactam kann wiederum in L-Tryptophan und N-methyl-L-Valin zerlegt werden. Bei der Frage, woher die Methylgruppe des Valins stammt, konnte durch Irie et al. bewiesen werden, dass L-Methionin hierbei die Methylierung bewirkt und somit als dritte Aminosäure an der Biosynthese beteiligt ist [14]. Außerdem konnte N-methyl-L-valyl-L-tryptophanol als Zwischenstufe nachgewiesen werden.

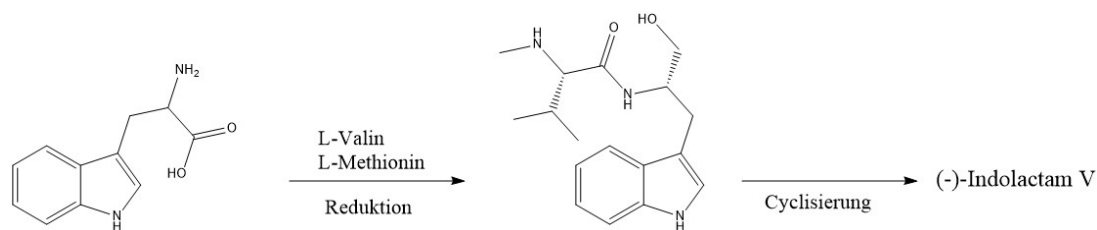


Abbildung 2.3: Biosynthetische Überlegungen und bestätigte Vorstufen von Indolactam durch Irie et al. [14]

Einen detaillierteren Einblick konnte Edwards et al. 2004 ermöglichen, indem das Gen-Cluster (LtxABC) aus *Moorea producens* kloniert wurde, welches für die Produktion von Lyngbyatoxin verantwortlich ist [15].

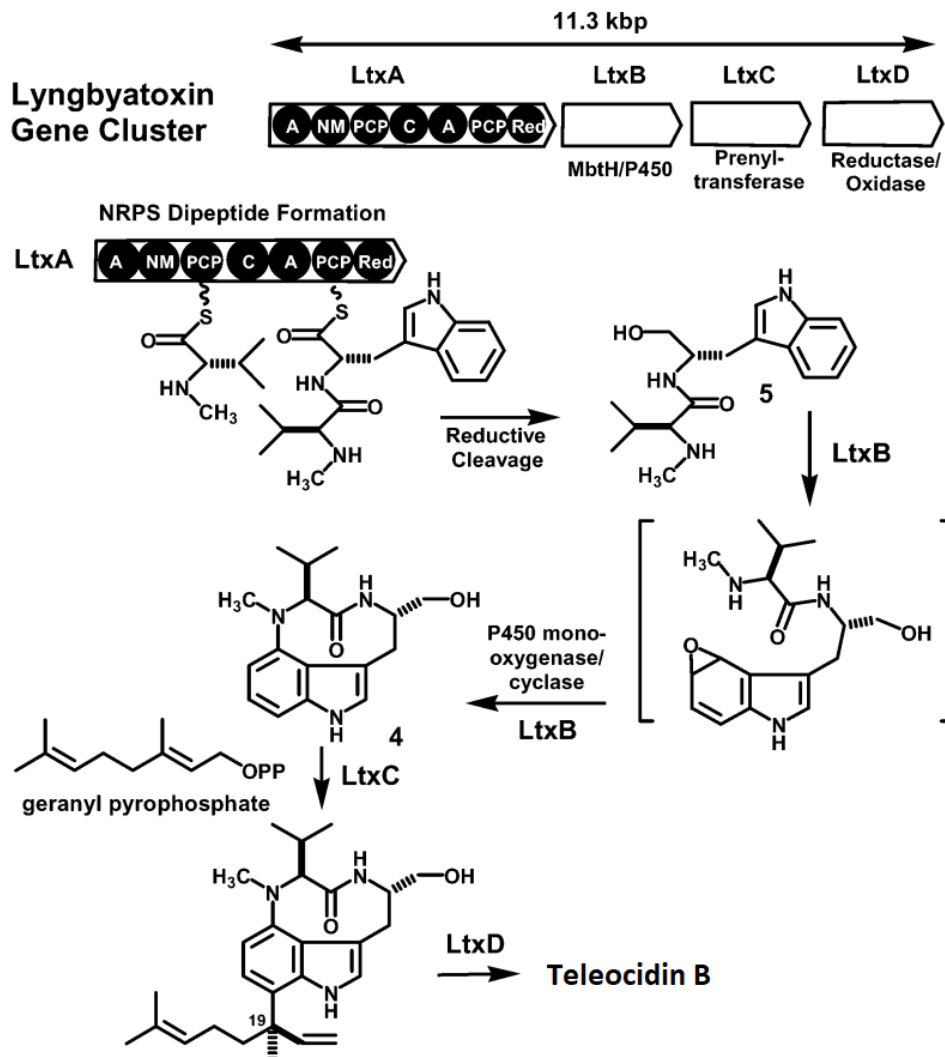


Abbildung 2.4: Gen-Cluster in der Biosynthese der Teleocidine nach Edwards et al. [15]. Der letzte Schritt zu Teleocidin B wurde, in Anlehnung an die von Awakawa et al. vorgeschlagene Biosynthese, ergänzt [16]

In diesem Gen-Cluster wird für drei Proteine codiert. Der erste Schritt wird durchgeführt durch LtxA, welches eine nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) ist. L-Tryptophan und L-Valin werden zunächst als Thioester an eine Peptidyl Träger-Protein-Domäne (PCP-Domäne) kovalent gebunden. L-Valin wird von einer S-Adenosyl-methionine (SAM) abhängigen Methyltransferase methyliert und mithilfe der Kondensations-Domäne (C) mit L-Tryptophan gekuppelt. Das gebildete Dipeptid wird mit einer Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat (NADPH) abhängigen Reduktase wieder abgespalten. Durch den letzten Schritt ergibt sich die für Indolactam typische Tryptophanol Umgebung. Als Nächstes wird durch das Protein LtxB über eine P450 Monooxygenase der aromatische Ring des Tryptophanolrests zum Epoxid oxidiert. Durch eine Cyclase erfolgt im Folgenden die Cyclisierung zu (-)-Indolactam V. Um von diesem Punkt aus zu

Lyngbyatoxin zu gelangen, ist das Protein LtxC notwendig, welches den Terpenrest durch eine Geranyltransferase mit Geranylpyrophosphat aufbaut. Der genaue Mechanismus hierzu konnte vorerst nicht geklärt werden.

Für die weitere Umsetzung zu Teleocidin B kommt das Protein LtxD zum Einsatz.

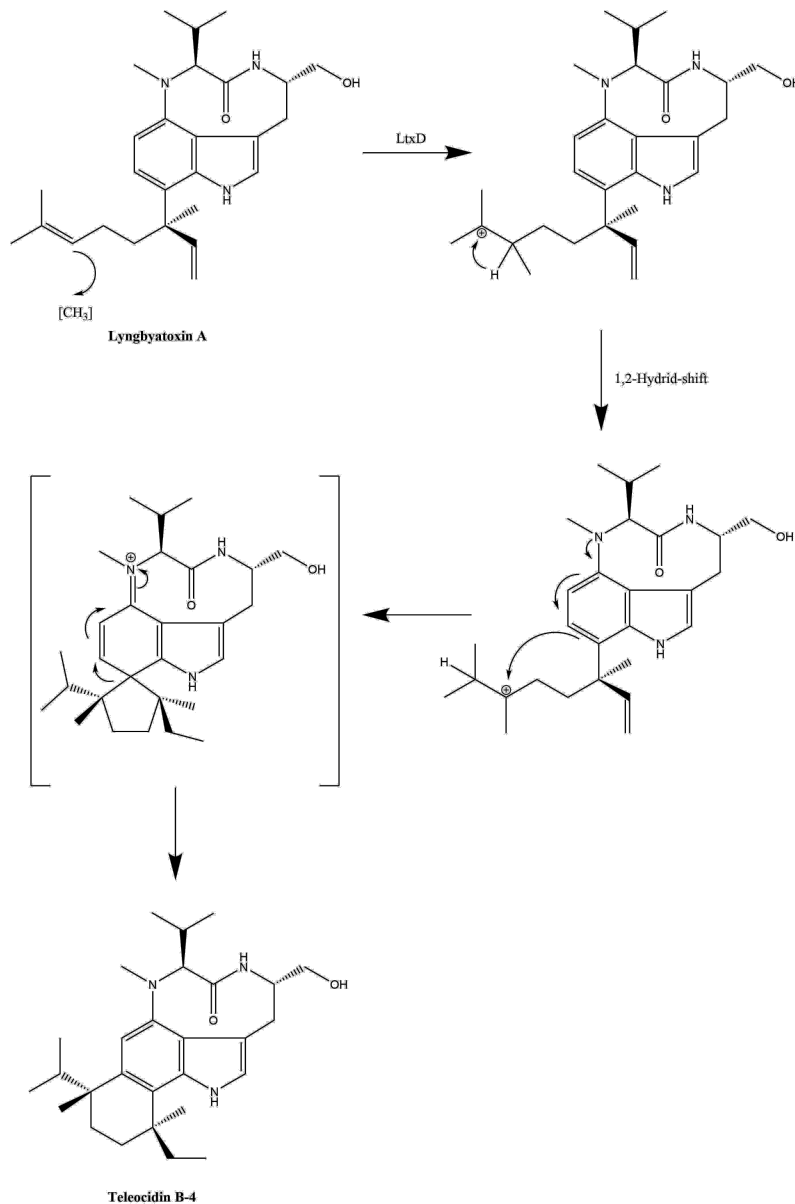


Abbildung 2.5: Von Awakawa et al. vorgeschlagener Mechanismus zur Umsetzung von Lyngbyatoxin A zu Teleocidin B-4 durch das Protein LtxD [16]

Dieses befindet sich außerhalb des LtxABC Gen-Clusters und wurde zum ersten Mal von Awakawa et al., im Zusammenhang mit der Teleocidin B Biosynthese, beschrieben [16]. Das LtxD Protein fügt über eine Methyltransferase eine Methylgruppe an den Geranylrest hinzu, welcher für

die Teleocidin B Struktur benötigt wird. Durch diese Transformation entsteht außerdem eine kationische Zwischenstufe, die den nucleophilen Angriff und somit Ringschluss stark begünstigt.

2.1.3 Teleocidine als PKC-Aktivatoren

Größeres Aufsehen erregten die Teleocidine erstmals, als ihre Wirkung als Tumorpromotor von Fujiki et al. 1981 präsentiert wurde [17]. Tumorpromotoren sind Substanzen, die nicht von sich aus übermäßige Proliferation fördern, aber bei bereits vorhandenen neoplastischen Zellen das Wachstum begünstigen [18].

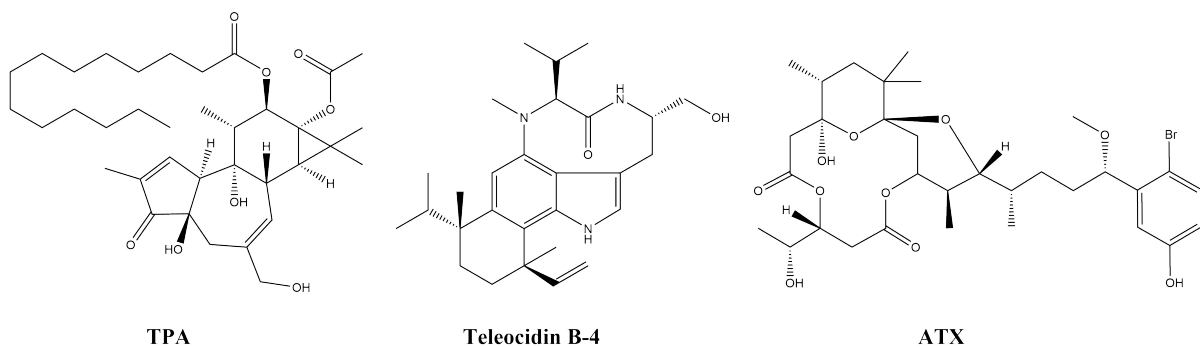


Abbildung 2.6: Strukturen bekannter natürlich vorkommender Tumorpromotoren TPA, Teleocidin B-4 und ATX. Alle besitzen die Fähigkeit an Protein Kinase C (PKC) zu binden und diese zu aktivieren

Das in Abbildung 2.6 gezeigte Phorbol-12-myristat-13-acetat (TPA) wurde in den späten 1960er Jahren als aktiver Bestandteil des tumorfördernden Crotonöls identifiziert [19, 20]. 1982 wurde durch Nishizuka et al. festgestellt, dass der Hauptrezeptor für TPA im Organismus die Ca^{2+} -aktivierte, Phospholipid-abhängige Protein Kinase (Protein Kinase C, kurz: PKC) ist [21]. TPA fungierte bei Enzymaktivitätsmessungen in Anwesenheit von CaCl_2 gleichermaßen wie das natürliche 1,3-Diacylglycerol als sekundärer Botenstoff für die PKC-Aktivierung. Auf Basis dieser Funde ergab sich schließlich die Theorie, dass PKC als Onkoprotein agiert und die Aktivierung von PKC die charakteristische Eigenschaft von Tumorpromotoren ist.

Protein Kinase C

Protein Kinase C ist eine Enzymfamilie, die bei Wirbeltieren aus 9 Isoenzymen besteht und eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielt [22, 23]. Bei der Einteilung in die Isotypen kann zwischen den konventionellen PKC (PKC α , β , γ), den neuen PKC (PKC η , ϵ , δ , θ) und den atypischen PKC (PKC ι , ζ) unterschieden werden. Konventionelle und neue PKC besitzen in den regulatorischen Regionen C1A- und C1B-Domänen, die an Diacylglycerole gebunden werden

können. Bei konventionellen PKC muss außerdem Ca^{2+} zur Aktivierung anwesend sein. Atypische PKC werden weder durch Diacylglycerole noch durch Ca^{2+} aktiviert.

Diacylglycerole metabolisieren schnell, wodurch eine natürliche Aktivierung der PKC nur von kurzer Dauer ist. Typische Tumorpromotoren sind persistenter und aktivieren die PKC deutlich länger, weswegen hierbei ein Tumorwachstum gefördert werden kann [24]. Versuche zur Therapie von Krebserkrankungen durch Inhibition der PKC lieferten in bisherigen Studien eher wenig aussichtsreiche Ergebnisse. Neuere Ansätze konzentrieren sich daher mehr auf die gezielte Steuerung der PKC-Aktivität [25]. Die Regulierung der PKC-Aktivität kann außerdem interessant sein für die Induzierung einer Neurogenese nach Verletzungen. Beispielsweise konnte von Geribaldi-Doldán et al. durch Aktivierung der PKC mit verschiedenen 12-Deoxyphorbolderivaten eine Förderung der Proliferation von neuronalen Progenitorzellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Das Differenzierungspotential der neuronalen Progenitorzellen wurde hierbei nicht beeinträchtigt [26]. Progenitorzellen besitzen ähnliche Eigenschaften wie Stammzellen, sind als Vorläuferzellen aber bereits auf den jeweiligen Zelltyp festgelegt [27].

Wie bereits erwähnt, konnten die Teleocidine, ähnlich wie TPA, als Tumorpromotor sowie als PKC-Aktivator identifiziert werden [17, 28]. Protein Kinase C kann somit als das wesentliche biologische Target der Teleocidine betrachtet werden. Das zu Teleocidin B sehr ähnliche Olivoretin, bei dem anstatt der OH-Gruppe am Lactamring eine Methoxygruppe vorliegt, zeigt hingegen keinerlei tumorpromovierende Wirkung. Die freie OH-Gruppe ist folglich für den Effekt zwingend notwendig [29].

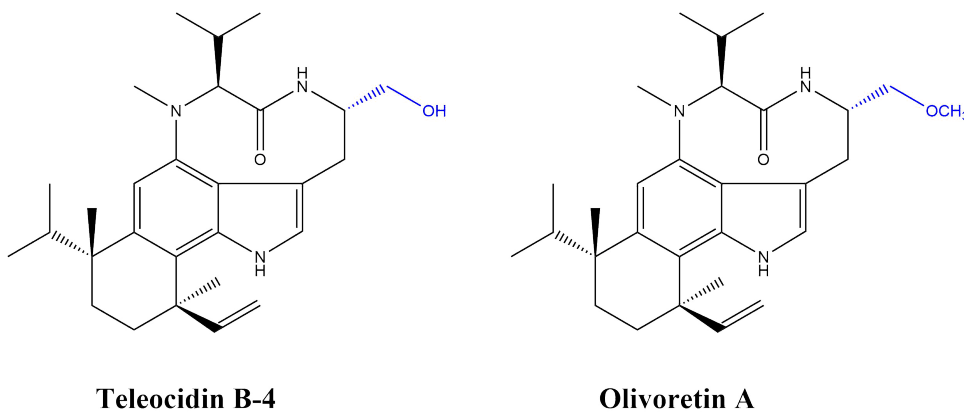


Abbildung 2.7: Strukturen von Teleocidin B-4 und Olivoretin A. Die Methylierung der OH-Gruppe bewirkt bei Olivoretin eine Aufhebung der Aktivität als Tumorpromotor

2.1.4 Totalsynthetische Ansätze zu Indolactam und den Teleocidinen

(-)-Indolactam V

(-)-Indolactam V wurde erstmals aus *Streptomyces blastmyceticum* 1984 von Irie et al. isoliert und ist, wie bereits erwähnt, der biosynthetische Precursor der Teleocidine [13]. Aus diesem Grund kann es oftmals aus Kulturen von Actinomyceten gewonnen werden. Wie auch die anderen Teleocidine ist (-)-Indolactam V in der Lage PKC zu aktivieren und als Tumorpromotor im Organismus zu fungieren [2]. Indolactam und die Teleocidine besitzen somit vermutlich denselben Phamacophor. Durch die Synthese verschiedener (-)-Indolactam V Epimere konnte von Endo et al. gezeigt werden, dass nur die natürlich vorkommende (S)-Konfiguration an beiden Stereozentren eine Bioaktivität aufweist [30].

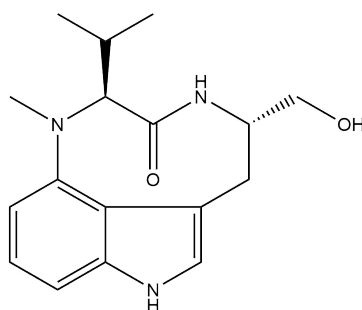


Abbildung 2.8: Struktur von (-)-Indolactam V. Die Substanz kann als biosynthetische Vorstufe der Teleocidine betrachtet werden

Für (-)-Indolactam V wurden im Laufe der Zeit mehrere Ansätze für eine totalsynthetische Herstellung beschrieben. Das erste Beispiel wurde durch Endo et al. im Jahr 1982 vorgestellt, bei dem als Ausgangsmaterial 4-Nitrogramine eingesetzt wurde und durch eine nicht enantioselektive Synthese ein racemisches Gemisch erhalten wurde [31]. In einer späteren Veröffentlichung gelang es der Arbeitsgruppe die verschiedenen Stereoisomere voneinander zu trennen und somit (-)-Indolactam V als Reinstoff zu isolieren [30].

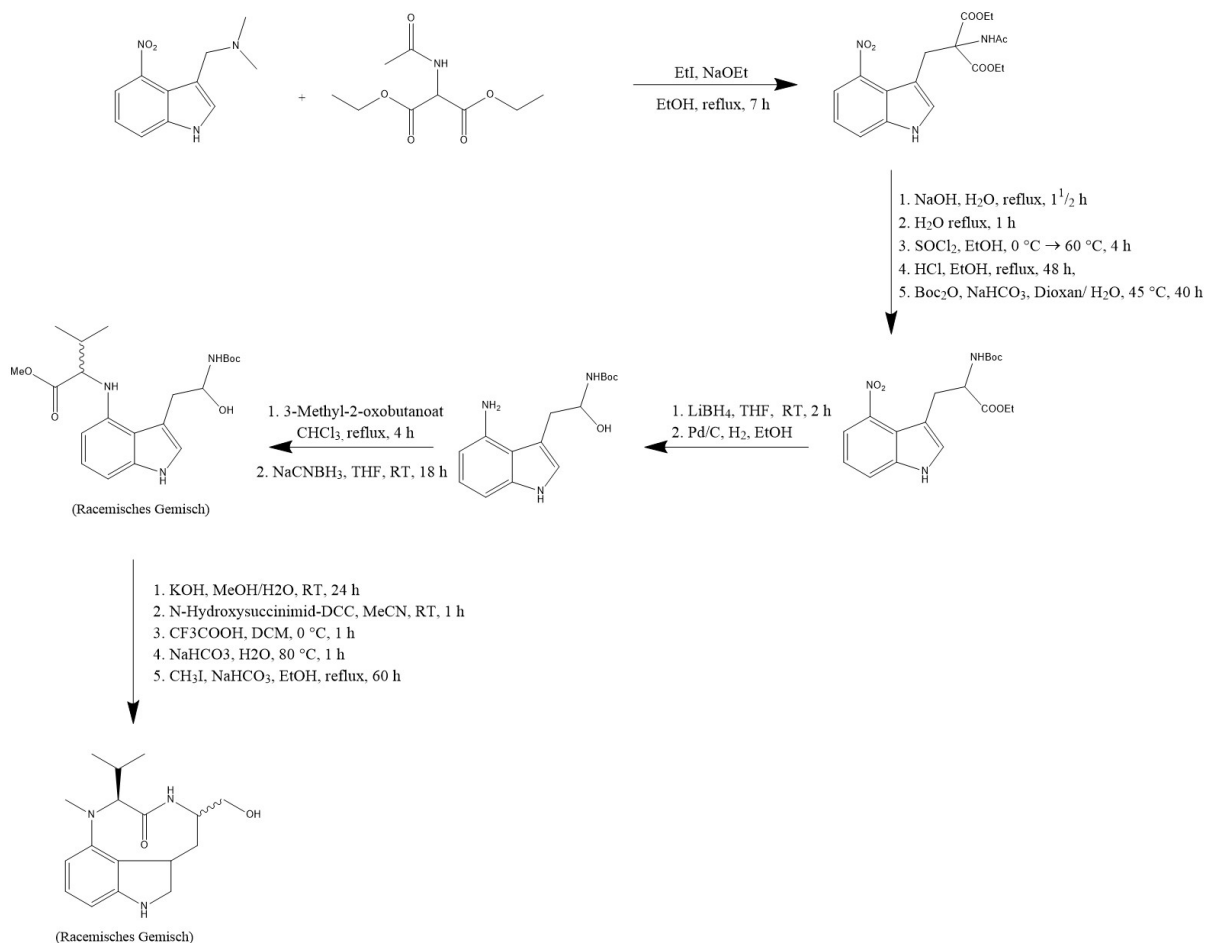


Abbildung 2.9: Totalsynthese von Indolactam nach Endo et al. Das racemische Gemisch wurde mit einer Gesamtausbeute von 2.2 % über 11 Stufen erhalten

Einen ähnlichen Weg wie in der Biosynthese zu gehen, ist bei (-)-Indolactam V nur bedingt möglich. Eine Peptidkupplung aus Tryptophan und Valin wäre noch leicht durchzuführen. Gleiches gilt für die Methylierung der Aminogruppe des Valins. Der Ringschluss mit dem aromatischen Tryptophanrest ist allerdings auf chemischem Weg nur erschwert, z.B. mit einer nucleophilen aromatischen Substitution oder Addition, möglich. Letztere wäre über eine Aryn- bzw. Indolyn-Zwischenstufe denkbar. Bei den meisten dieser Umsetzungen sind jedoch die Regioselektivitäten nicht kontrollierbar, woraus sich wiederum schlechte Ausbeuten ergeben. Bei einem von Bronner et al. vorgestellten Indolsilyltriflat kann die Regioselektivität, durch Anwesenheit eines Bromsubstituenten am C6 des Indols, gesteuert werden [32]. Auf Basis dieser Erkenntnis konnte von der Arbeitsgruppe eine Indolactam-Synthese mit 12 Stufen und einer Gesamtausbeute von 0.6 % erarbeitet werden. Nach Addition eines Val-Ser-Peptids mit dem Indolsilyltriflat konnte die Indolactam Ringstruktur durch Dehydratisierung der Serin Hydroxygruppe und anschließender Cyclisierung mit ZrCl₄ erreicht werden. Interessanterweise bildete sich hierbei kein racemisches Gemisch, sondern ausschließlich das unnatürliche Diastereomer. Aus diesem Grund wurde eine C9-Epimerisierung mit NaHCO₃ als Base nach Nakatsuka et al. durchgeführt, um das gewünschte

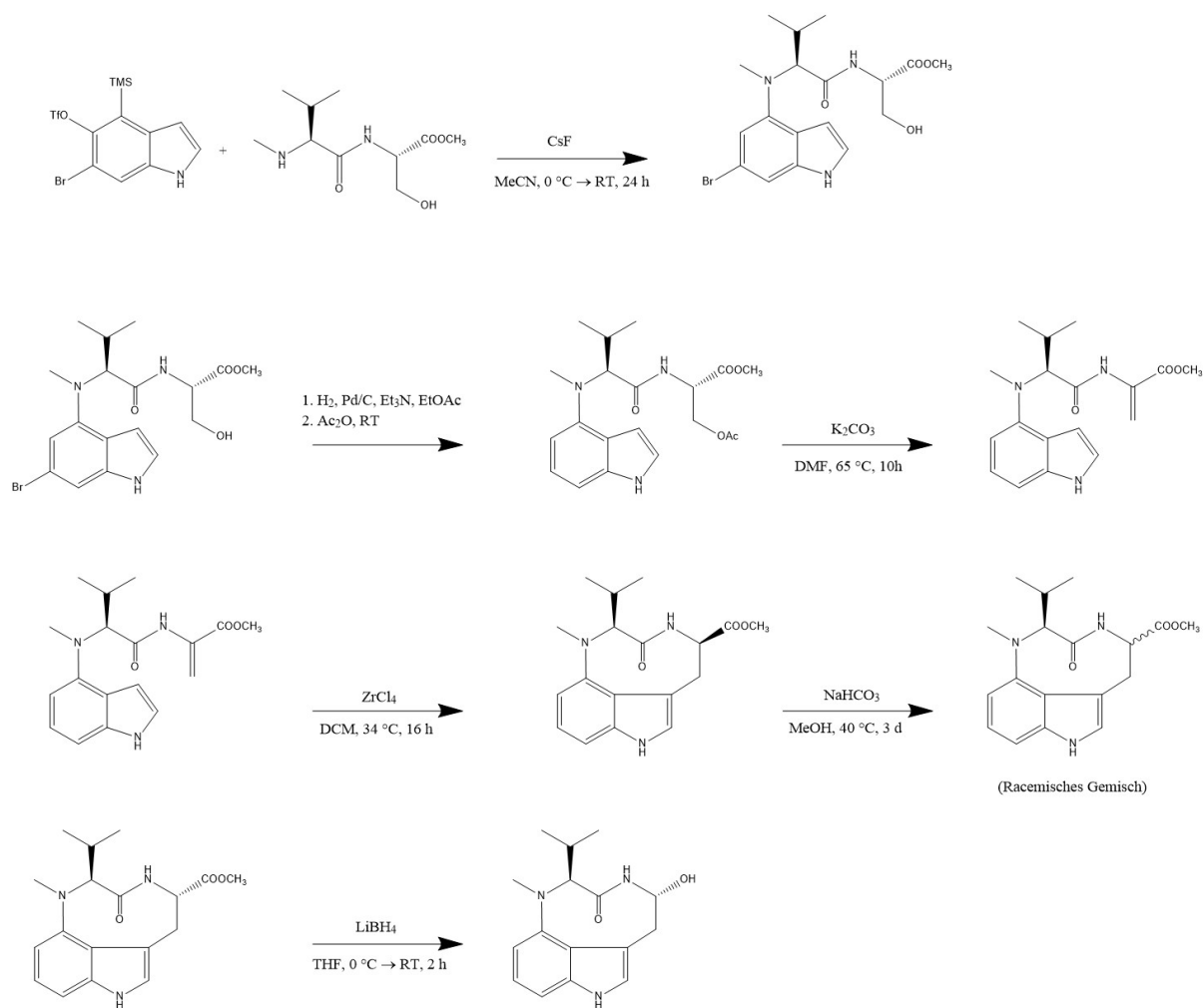


Abbildung 2.10: Ausschnitt aus der Totalsynthese von (-)-Indolactam V nach Bronner et al. Beide Ausgangsstoffe können über mehrstufige Synthesen hergestellt werden [32]

Produkt zu erhalten [33]. Durch die Acidität des Protons am chiralen Zentrum kommt es unter basischen Bedingungen zu einer Mutarotation über eine Esterenolat-Zwischenstufe. Es stellt sich somit ein Gleichgewicht aus beiden Diastereomeren ein. Eine ähnliche Reaktion wurde von McKenzie et al. beobachtet, indem L-Menthyl-D-Phenylbromoacetat in Ethanol mit katalytischen Mengen KOH in ethanolischer Lösung versetzt wurde [34]. Die racemische Mischung aus den Indolactam-Vorstufen wurde von Bronner et al. anschließend über eine Säulenchromatographie mit EtOAc/Hexan aufgetrennt. Im letzten Schritt wurde der Ester mit LiBH_4 zum Alkohol reduziert, wodurch (-)-Indolactam V entstand.

Eine Totalsynthese mit einer relativ hohen Gesamtausbeute (18 %) wurde von Xu et al. beschrieben [35]. Bei dieser Route wird das Indolgerüst mit verschiedenen Substituenten, durch eine Palladium-katalysierte Heck-Kupplung, aufgebaut. Mit insgesamt 12 Schritten und einigen Bausteinen, die wiederum über mehrstufige Synthesen hergestellt werden müssen, ist diese Totalsynthese vergleichsweise aufwendig.

Ein weiteres Beispiel, welches einen guten Kompromiss aus Anzahl der Stufen und Gesamtausbeute bietet, ist die Totalsynthese von Haynes-Smith aus dem Jahr 2016 [36]. Eine Verknüpfung zwischen Indolring und Valin wird hierbei durch eine Ullmann-Kupplung, ausgehend von 4-Bromindol, hergestellt. Die weiteren Schritte sind eine Eschweiler-Clarke-Methylierung, eine Peptidkupplung mit L-Serinmethylester sowie eine „one-pot“ Detosylierung und Reduktion durch Magnesiumspäne. Das somit entstandene Zwischenprodukt konnte analog zur oben beschriebenen Prozedur durch Bronner et al. weiter zu (-)-Indolactam V umgesetzt werden.

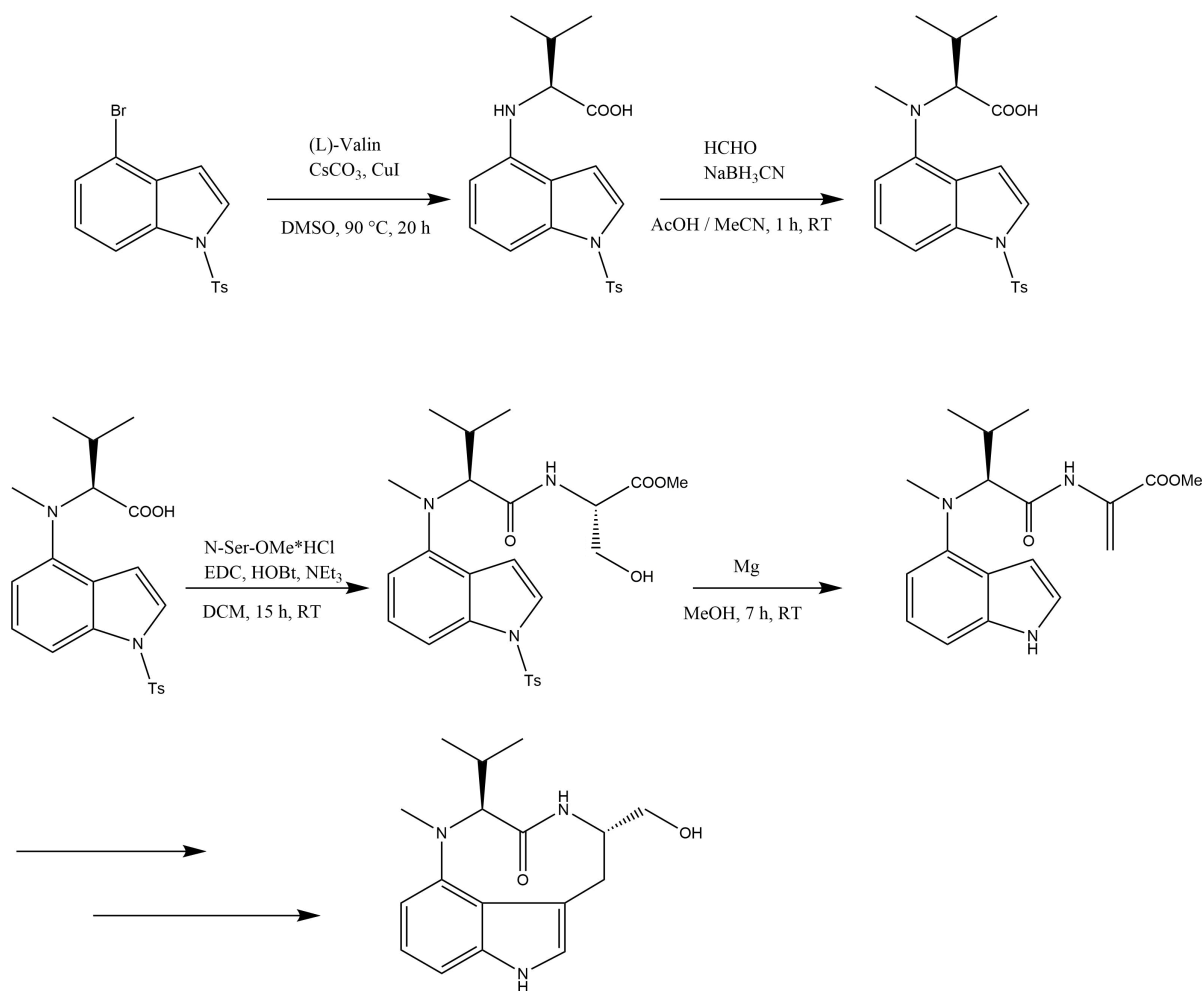


Abbildung 2.11: Ausschnitt aus der Totalsynthese von (-)-Indolactam V nach Haynes-Smith [36]

Teleocidin A und B

Neben Indolactam gibt es auch totalsynthetische Ansätze für die einzelnen Teleocidine. Wie bereits erwähnt, ist Indolactam der Precursor in der Biosynthese der Teleocidine. Es ist somit naheliegend für die Totalsynthese der Teleocidine von Indolactam auszugehen. Der nächste Schritt wäre die Funktionalisierung der C7 Position des Indolrings, gefolgt vom Aufbau des

entsprechenden aliphatischen Rests. Ein Literaturbeispiel für diese Herangehensweise wäre die von Nathel et al. veröffentlichte Totalsynthese von Pendolmycin, Lyngbyatoxin A sowie Teleocidin A-2 [37]. Um zu den genannten Substanzen zu gelangen, wurde hierbei zunächst eine Bromierung an der C7 Position des Indolrings durchgeführt, welche zuvor von Kishi et al. bei der Synthese von Cytoblastin aus Indolactam beschrieben wurde [38]. Anschließend wird das bromierte Indol in einer Kreuzkupplungsreaktion mit einem Morpholinderivat, welches den aliphatischen Rest des Teleocidines trägt, verbunden. Die weiteren Schritte sind die Abspaltung der Morpholingruppe, die Umwandlung eines Aldehyds in ein Olefin durch eine Wittig-Reaktion und die Abspaltung der TBS-Schutzgruppe des Serinrests.

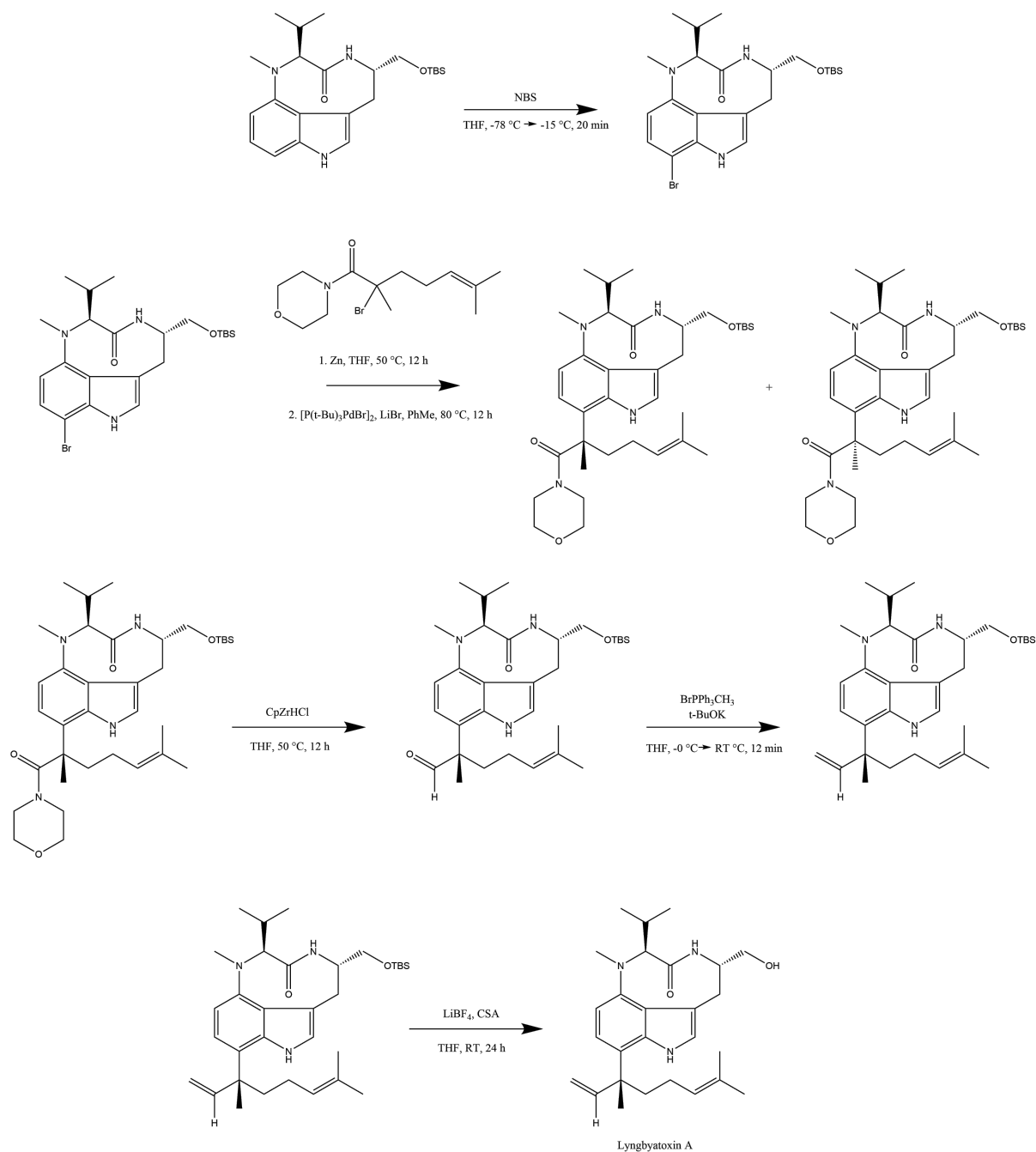


Abbildung 2.12: Synthese von Lyngbyatoxin A nach Nathel et al., ausgehend von O-TBS-(-)-Indolactam V

Durch eine ähnliche Reaktionsführung gelang es Stein et al. unnatürliche Teleocidine herzustellen [39]. Analog zur vorherigen Methodik, wurde zunächst eine Halogenierung am C7 des Indolrings, mittels einer durch Irie et al. beschriebenen Iodierungsreaktion, durchgeführt [40]. Anschließend wurde ein aliphatischer Rest durch eine Sonogashira-Reaktion eingeführt. Außerdem konnte von Stein et al. die Derivatisierung der Aminogruppe am Indolring realisiert werden.

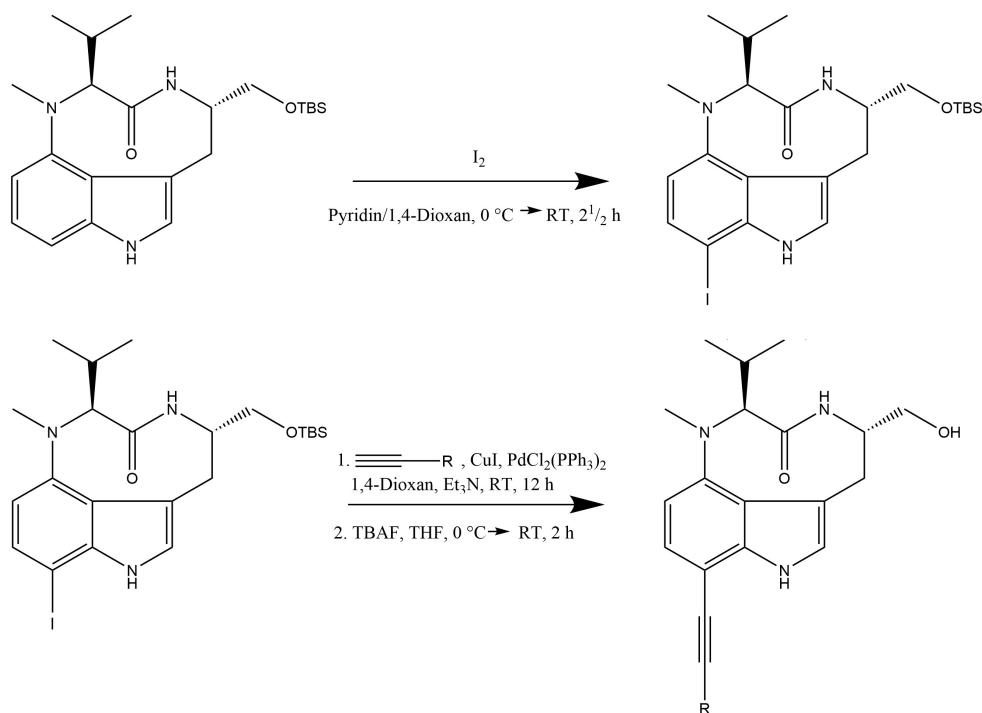


Abbildung 2.13: Schema zur Darstellung synthetischer Teleocidine nach Stein et al. [39]

Weitere Totalsynthesen, bei denen Indolactam nicht als Zwischen bzw. Ausgangsprodukt gewählt wurde, sind in der Literatur ebenso beschrieben [41].

2.1.5 Teleocidine: Zielsetzung dieser Arbeit

Teleocidine sind als Tumorpromotoren bzw. PKC-Aktivatoren nicht nur interessant für die Krebstherapie, sondern auch für deren Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von neuronalen Stammzellen. Durch die isolierte Doppelbindung am aliphatischen Rest, besteht die Möglichkeit, Teleocidine mittels Olefinmetathese zu verändern. Teleocidine können aus Algen und Bakterien gewonnen werden. Ein Ziel dieser Arbeit war es, Teleocidine aus Bakterienkulturen

zu gewinnen und anschließend zu modifizieren. Aufgrund ähnlicher struktureller Merkmale und gleicher biologischer Targets mit anderen Substanzen aus dieser Arbeit, sollten die Teleocidine als Referenzsubstanzen für Zelltests zur Verfügung gestellt werden, um Cytotoxizitäten und neuro-differenzierende Aktivitäten zu untersuchen.

2.2 Cyclische Lipopeptide aus Blaualgen

2.2.1 Nichtribosomale Peptide - Lipopeptide

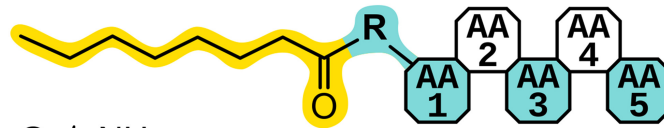
Nichtribosomale Peptide (NRP) werden im Gegensatz zu den höhermolekularen Proteinen nicht direkt im Ribosom, sondern außerhalb durch spezielle Enzyme, den nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), hergestellt. Die Auswahl an Bausteinen beschränkt sich hierbei nicht nur auf die 20 proteinogenen Aminosäuren. Als Bestandteil können auch D-konfigurierte Aminosäuren, β -Aminosäuren, methylierte-, phosphorylierte- und glykosylierte Elemente sowie Fettsäurereste und Heterozyklen vorkommen [42]. NRP können hierbei als lineare, verzweigte und häufig auch als cyclische Strukturen auftreten. Eines der ersten gefundenen NRP war das cyclische Decapeptid Gramicidin S [43], welches durch seine Wirkung als Antibiotikum bereits im zweiten Weltkrieg zur Behandlung von Infektionen bei sowjetischen Soldaten eingesetzt wurde [44]. Bis heute hat sich die Zahl bekannter NRP deutlich erhöht. In der Datenbank „Norine“, welche speziell zur Erfassung bereits beschriebener NRP angelegt wurde, gibt es mittlerweile ca. 700 Einträge zu nichtribosomalen Peptiden [45]. NRP, die wie Gramicidin S aus einem Peptid und einem Fettsäurerest bestehen, nennt man Lipopeptide. Die meisten dieser Lipopeptide stammen aus bakteriellen Quellen. Allerdings gibt es auch verschiedene Algengattungen, die Lipopeptide als Teil ihres Metabolismus produzieren. In Tabelle 2.1 ist eine Übersicht über die Mengenverteilung von produzierten Lipopeptiden nach mikrobieller Gattung aufgeführt [46].

Tabelle 2.1: Übersicht über die Mengenverteilung produzierter Lipopeptide und Lipopeptidfamilien verschiedener mikrobieller Gattungen. Die meisten Lipopeptide werden von Bakterien produziert, aber auch Algen besitzen einen gewissen Anteil [46]

Mikrobielle Gattung	Anzahl verschiedener Lipopeptide	Anzahl verschiedener Lipopeptidfamilien
<i>Pseudomonas</i>	70	11
<i>Bacillus</i>	90	5
<i>Streptomyces</i>	40	6
<i>Vibrio</i>	8	1
<i>Lyngbya</i>	9	2
<i>Halomonas</i>	4	1
<i>Beauveria</i>	25	1
<i>Marinobacter</i>	6	1
<i>Actinoplanes</i>	3	1
<i>Serratia</i>	2	1
<i>Lysobacter</i>	6	1
<i>Summe</i>	263	31

Die Verknüpfung zwischen Peptid und Fettsäurerest wurde in den bisherigen Lipopeptiden als linear, intracyclisch oder exocyclisch beobachtet. Die genaue Unterscheidung zwischen diesen Typen kann Abbildung 2.14 entnommen werden.

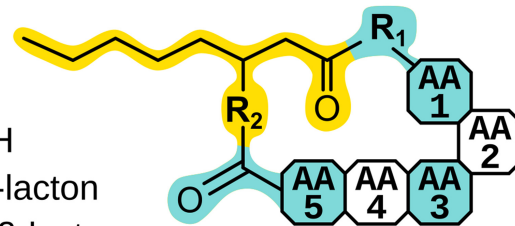
Linear



$R = O / NH$

Cyclisch

intracyclisch



$R_1 = O / NH$

$R_2 = O \Rightarrow \beta\text{-lacton}$

$R_2 = NH \Rightarrow \beta\text{-lactam}$

Cyclisch

exocyclisch

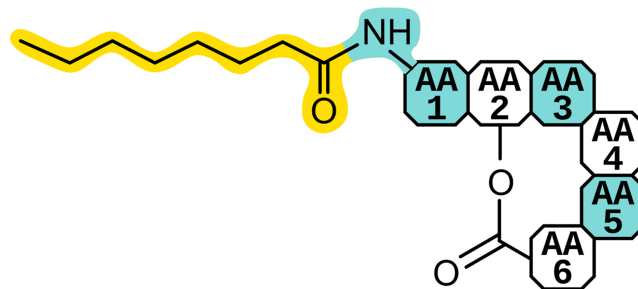


Abbildung 2.14: Unterschiedliche Formen von Lipopeptiden: Linear, intracyclisch und exocyclisch. Für die Cyclisierung beim intracyclischen Typ wird ein Substituent, wie z.B. eine Amino- oder Alkoholgruppe, am Fettsäurerest benötigt. Dieser Substituent muss sich nicht zwingend, wie in der Abbildung dargestellt, in β -Position befinden [47]

2.2.2 Biosynthese und Lipoinitiation

Die Biosynthese der Lipopeptide kann man grob in zwei Schritte unterteilen. Zunächst kommt es zur **Lipoinitiation**, bei der die Fettsäure synthetisiert wird, die später im vollständigen Molekül den Lipidrest ausmacht. Anschließend erfolgt ein schrittweiser Aufbau des Peptidgerüsts durch Hinzufügen verschiedener proteinogener und nichtproteinogener Aminosäuren. Die beteiligten Enzyme sind nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) oder ein Mix aus hybriden Polyketide Synthetasen und NRPSs (PKS/NRPS) [48]. Weiterhin sind für die Biosynthese vier Protein-Domänen notwendig. Die Adenylierungs-Domäne (A-Domäne) kann Monomere selektiv erkennen, aktivieren und auf eine Peptidyl-Carrier-Protein(PCP)-Domäne übertragen. Dort wird das jeweilige Reaktionsintermediat kovalent über eine 4'-Phosphopantethein-Gruppe als Thioester

gebunden. Die Kondensations-Domäne (C-Domäne) bewirkt nun, dass Aminosäuren durch Kondensationsreaktionen zur bestehenden Struktur hinzugefügt und somit das Peptidgerüst aufgebaut werden kann. Die Abspaltung des Produkts erfolgt anschließend in vielen Fällen durch eine Thioesterase-Domäne (TE-Domäne) im Terminationsmodul [49]. Durch die Vielzahl verschiedener Lipopeptide läuft die Lipoinitiation sehr individuell ab und ist nur bei bestimmten Vertretern erforscht und beschrieben. Bei der Lipoinitiation von Surfactin wird beispielsweise 3-Hydroxy-Myristinsäure von den Fettsäure-Acyl-CoA-Ligasen (FACL) LcfA oder YhfL zum 3-Hydroxy-Myristoyl-CoA aktiviert [50]. Dieses kann anschließend, durch das Enzym SrFA, zum 3-Hydroxy-Myristoyl-Glutamat überführt werden [51]. Im Zuge der Lipoinitiation kann es aber nicht nur zur Aktivierung der Fettsäure, sondern auch zur Modifikation von dessen Struktur kommen. Ein häufig vorkommendes Merkmal bei intracyclischen Lipopeptiden ist eine Aminogruppe in β -Position des Fettsäurerests, welche am Ende der Biosynthese die Cyclisierung des Moleküls ausführt. β -Amino-Fettsäuren kommen nicht natürlich vor und werden daher im Zuge der Lipoinitiation hergestellt, wie z.B. bei Mycosubtilin. Palmitinsäure wird hierbei durch eine Acyl-Ligase an das Acyl-Träger-Protein 1 (ACP₁) und Malonyl-CoA an ACP₂ gebunden. Anschließend werden die Substrate durch das Protein FenF transferiert und durch eine Ketosynthese zum β -Ketothioester kondensiert. Die Reduktion zum Amin erfolgt über eine Aminotransferase [52]. Eine Visualisierung der genannten und einiger weiterer Beispiele kann Abbildung 2.15 entnommen werden. Die Lipoinitiation ist ein vielfältiger und komplexer Prozess, der für jeden Fall separat betrachtet werden muss und daher nicht weiter ausgeführt werden soll.

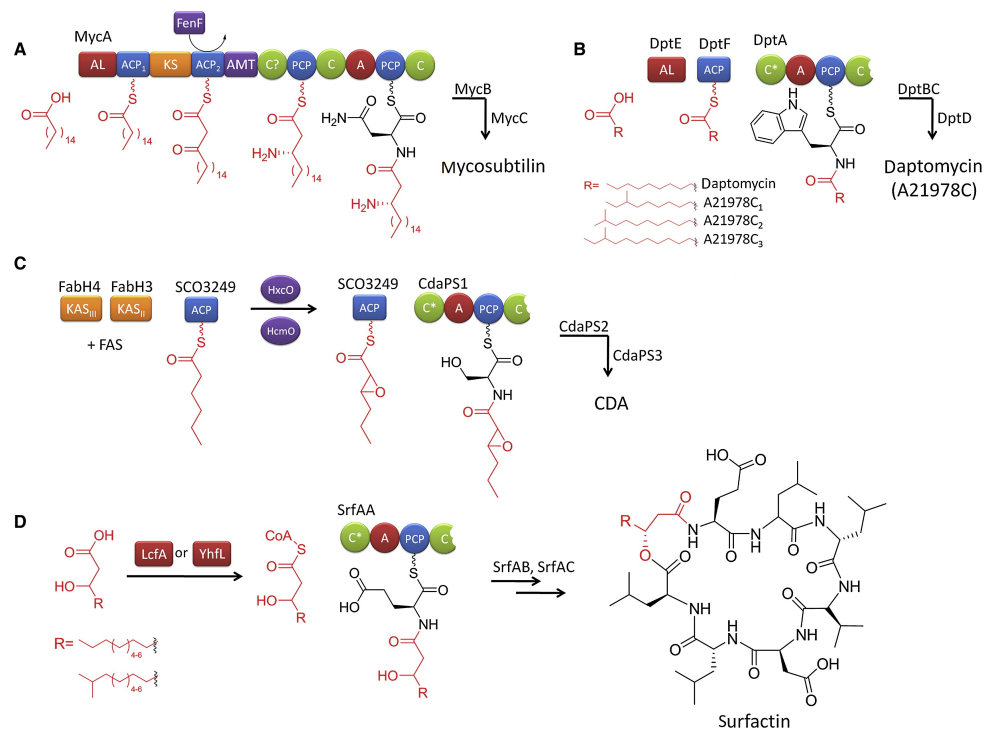


Abbildung 2.15: Zusammenfassung der Lipoinitiation einiger bekannter Lipopeptide durch Chooi et al. [53]

2.2.3 Membranaktivität der Lipopeptide

Das Interesse an Lipopeptiden basiert häufig auf deren antifungalen, antibakteriellen und cytotoxischen Eigenschaften. So wurden in der Literatur bereits zahlreiche Experimente beschrieben, die ein besseres Verständnis für die zugrundeliegenden Mechanismen gewährleisten sollen. Die meisten Theorien gehen davon aus, dass es sich hauptsächlich um eine Insertion des Fettsäurerests der Lipopeptide in die Zellmembran handelt. Eine Anlagerung des Fettsäurerests in die Lipid-Doppelschicht einer biologischen Membran basiert auf Van-der-Waals-Wechselwirkungen und ist daher Enthalpie getrieben [54]. Besonders bei Lipopeptiden aus der Iturin-Familie und bei Daptomycin wurde diese Wirkungsweise erforscht. Man geht davon aus, dass die Bioaktivität von anderen cyclischen Lipopeptiden auf einem ähnlichen Mechanismus beruhen. Der erste Schritt ist eine Insertion des Fettsäurerests in die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran. Als Nächstes geschieht eine Agglomeration von Lipopeptiden, was auf der Tendenz der Lipopeptide zur Mizellbildung beruht. Es entstehen somit Poren in der Membran, die zu einem Austritt von Ionen, insbesondere K^+ , sowie zu einer Membrandepolarisierung führen. Dieser Schaden an der Zellmembran ist irreversibel und führt anschließend zum Zelltod [55, 56]. Bei bestimmten cyclischen Lipopeptiden wurden nach Auflösung der äußeren Zellmembran noch intakte Mitochondrien gefunden. Diese Beobachtung wurde von Humisto et al. durch geringe Mengen von Cholesterol in der Membran der Mitochondrien erklärt [57]. Die Membranaktivität der cyclischen Lipopeptide unterliegt somit möglicherweise einer Cholesterol-Abhängigkeit. Es gibt jedoch auch Untersuchungen, in denen die Bioaktivität auf einer Enzyminhibition basiert. Ein Beispiel wäre hierfür die antifungale Wirkung von Caspofungin durch Inhibition der Glucansynthase [58].

2.2.4 Bedeutung von cyclischen Lipopeptiden für die Medizin

Die Entdeckung von Penicillin durch Alexander Fleming stellt bis heute eine der größten Errungenschaften in der medizinischen Forschung dar [59]. Durch den Einsatz von Penicillin und anderen Antibiotika für die breite Bevölkerung, ergaben sich effektive Therapiemöglichkeiten für bakterielle Infektionskrankheiten, allerdings wurde gleichermaßen die Entstehung von resistenten Stämmen immer mehr zum Problem [60]. Penicillin-resistente Staphylokokken traten beispielsweise bereits kurz nach dessen Markteinführung auf [61]. Cyclische Lipopeptide stellen eine relativ neue Substanzklasse der Antibiotika dar, weswegen sie bei vielen resistenten Bakterien oder Schimmelpilzen effektiv eingesetzt werden können. Der Mechanismus für die Bioaktivität beruht hierbei auf der in 2.2.3 beschriebenen Permeabilisierung der Zellmembran.

Allerdings können cyclische Lipopeptide nicht nur Zellmembranen, sondern auch die Membran von Mitochondrien permeabilisieren [62], was in diesem Fall zur Einleitung der Apoptose führt. Dieser Umstand ermöglicht es wiederum, das Wachstum von Krebszellen durch cyclische Lipopeptide

zu bekämpfen. Beispielsweise konnte von Zhao et al. die Proliferation von K562-Leukämiezellen durch die cyclischen Lipopeptide von *Bacillus subtilis* (hauptsächlich Iturine) inhibiert werden. Dadurch ließe sich eine Ausbreitung von chronischer myeloischer Leukämie (CML) in einem Organismus möglicherweise verhindern [62].

2.2.5 Strukturelle Vielfalt der cyclischen Lipopeptide

Cyclische Lipopeptide sind von zahlreichen Mikroorganismen produzierte Sekundärmetabolite, die sich besonders durch ihre toxische Wirkung auf Bakterien, Pilze und lebende Zellen auszeichnen [63, 64]. Cyclische Lipopeptide zählen zu den, unter 2.2.1 erläuterten, nichtribosomalen Peptiden. Die Struktur lässt sich beschreiben als ein polarer, cyclischer „Peptidkopf“ und einen aliphatischen Fettsäurerest (Lipid). Aufgrund dieser Ähnlichkeit zu herkömmlichen Tensiden, besitzen cyclische Lipopeptide nicht nur Anwendungspotential im Pharmaziebereich, sondern auch als Biotenside [65]. Besonders gegen grampositive Mikroorganismen weisen Lipopeptide eine toxische Wirkung auf. Der Unterschied zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien ist die Beschaffenheit der Membran. Bei gramnegativen Bakterien gibt es zusätzlich eine äußere Membran, auf der nach außen hin Lipopolysaccharide gebunden sind. Einige bekannte Vertreter der cyclischen Lipopeptide werden im Folgenden vorgestellt.

Daptomycin

Daptomycin (Handelsname: Cubicin[®]) ist ein kommerzieller Arzneistoff und eines der bisher am meisten pharmazeutisch genutzten cyclischen Lipopeptide [66]. Es wird häufig als Antibiotikum bei Infektionen mit grampositiven Mikroorganismen eingesetzt. Speziell bei Vancomycin-resistenten Staphylokokken, z. B. *Staphylococcus aureus*, ist es möglich, auf eine Therapie mit Daptomycin auszuweichen [67]. Aufgrund seiner starken bakteriziden Eigenschaften wird es vor allem bei Haut- und Weichteilinfektionen eingesetzt [68]. Die Gewinnung der Substanz im größeren Maßstab erfolgt aus der Fermentation von *Streptomyces roseosporus* [69]. Damit die Produktion von Daptomycin hierbei bevorzugt wird, kann Decansäure zur Kultur zugegeben werden [70]. Decansäure kann von den Mikroorganismen zum Aufbau der Lipid-Seitenkette verwendet werden. Wenn zu viel Decansäure zugegeben wird und diese sich akkumuliert, wirkt sie sich allerdings toxisch auf die Mikroorganismen aus [70]. Der Wirkungsmechanismus der Bioaktivität von Daptomycin beruht auf einer Ca^{2+} -abhängigen Insertion des Fettsäurerests in die Lipid-Doppelschicht der Membran [71]. Der Peptidkopf bewirkt anschließend eine Aufweitung der Membran, was zu einem schnellen Austritt von Kaliumionen, einer Depolarisierung der Membran und einer Störung der Produktion von Makromolekülen wie RNA und DNA führt [72, 73].

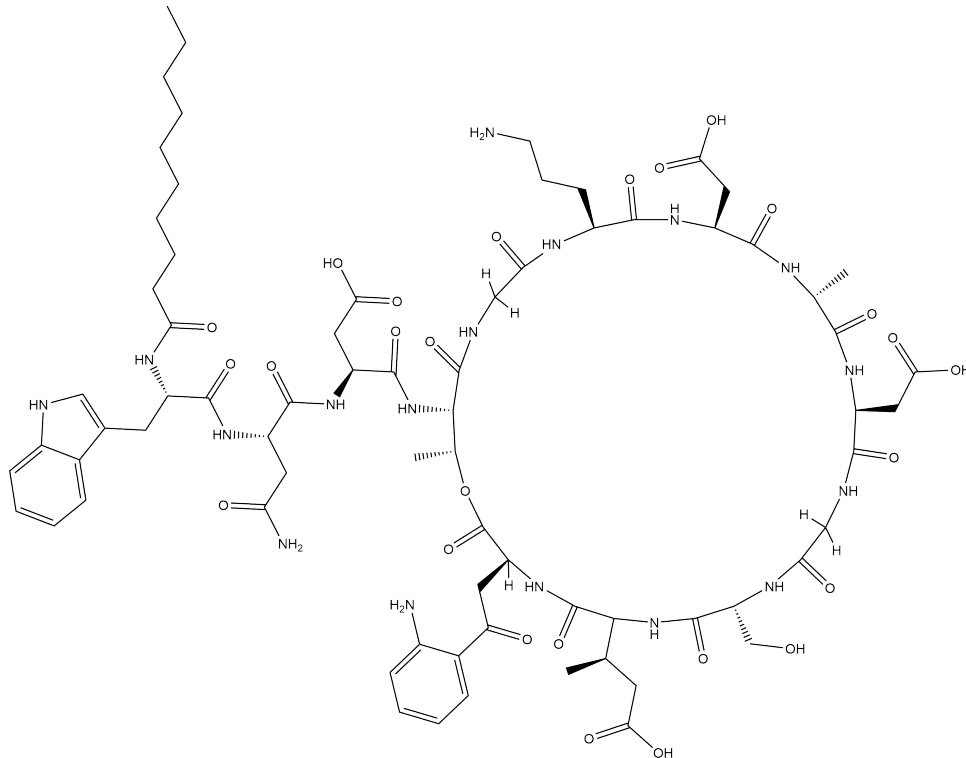


Abbildung 2.16: Struktur des cyclischen Lipopeptids Daptomycin

Iturin- und Fengycin-Familie

Die Struktur der Iturine besteht aus einem Peptidring mit 7 Aminosäuren und einer Kohlenstoffseitenkette. Iturin ist hierbei der Name eines Gemisches von Iturin A, B und C, welches aus dem Bodenbakterium *Bacillus subtilis* isoliert werden kann [74]. Weitere Vertreter aus dieser Familie, wie z.B. Mycosubtilin und Surfactin, können ebenso aus Kulturen von *Bacillus subtilis* gewonnen werden [75, 76]. Die Makrostruktur von Surfactin ist dem eines Tensids sehr ähnlich. Dies äußert sich dadurch, dass bei beiden die Oberflächenspannung wässriger Lösungen herabgesetzt wird. In der Literatur wird eine Änderung von 72 zu $27 \frac{\text{mN}}{\text{m}}$ bei einer kritischen Mizellkonzentration (CMC) von $10 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$ für Surfactin beschrieben [77]. Es ist leicht erkennbar, dass der Name der Substanz von dieser Eigenschaft abgeleitet wird (Englisch: Surface = Oberfläche). Viele konventionelle Tenside müssen in Kläranlagen aus der wässrigen Matrix entfernt werden, da sie ansonsten eine Gefährdung für Wasserorganismen darstellen würden. Surfactin könnte hierbei aufgrund seiner guten Bioabbaubarkeit und niedrigen Toxizität eine umweltverträglichere Alternative sein [78]. Fengycin, ein weiteres Lipopeptid aus *Bacillus subtilis*, welches als Dcapeptid der Struktur der Iturine sehr ähnlich ist, konnte besonders durch seine fungotoxischen Eigenschaften Interesse auf sich ziehen [79]. In einer Studie wurden die IC_{50} -Werte von Fengycin, Surfactin und Mycosubtilin mit Tebuconazol, einem in der Landwirtschaft benutzten Fungizid aus der Gruppe der Triazole, auf zwei verschiedene Stämme von *Venturia inaequalis* verglichen. Die beiden

Stämme des Pilzes unterschieden sich hierbei in ihrer Sensitivität für Tebuconazol. Beim Stamm mit hoher Sensitivität für Tebuconazol konnte Fengycin alleine die gleichen IC_{50} -Werte erreichen wie Tebuconazol. Beim Stamm mit niedriger Sensitivität für Tebuconazol wiesen eine Mischung aus Fengycin und Surfactin sowie eine Mischung aus Fengycin, Surfactin und Mycosubtilin ähnliche IC_{50} -Werte wie Tebuconazol auf [80]. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Lipopeptide aus der Iturin- und Fengycin-Familie nicht nur Anwendungspotential als Biotenside, sondern auch als Fungizide für die Landwirtschaft haben. Die genannten Vorteile, wie die Bioabbaubarkeit, die bessere Umweltverträglichkeit sowie die Herstellung aus nachwachsenden Rohstoffen treffen selbstverständlich auf beide Anwendungsbereiche zu.

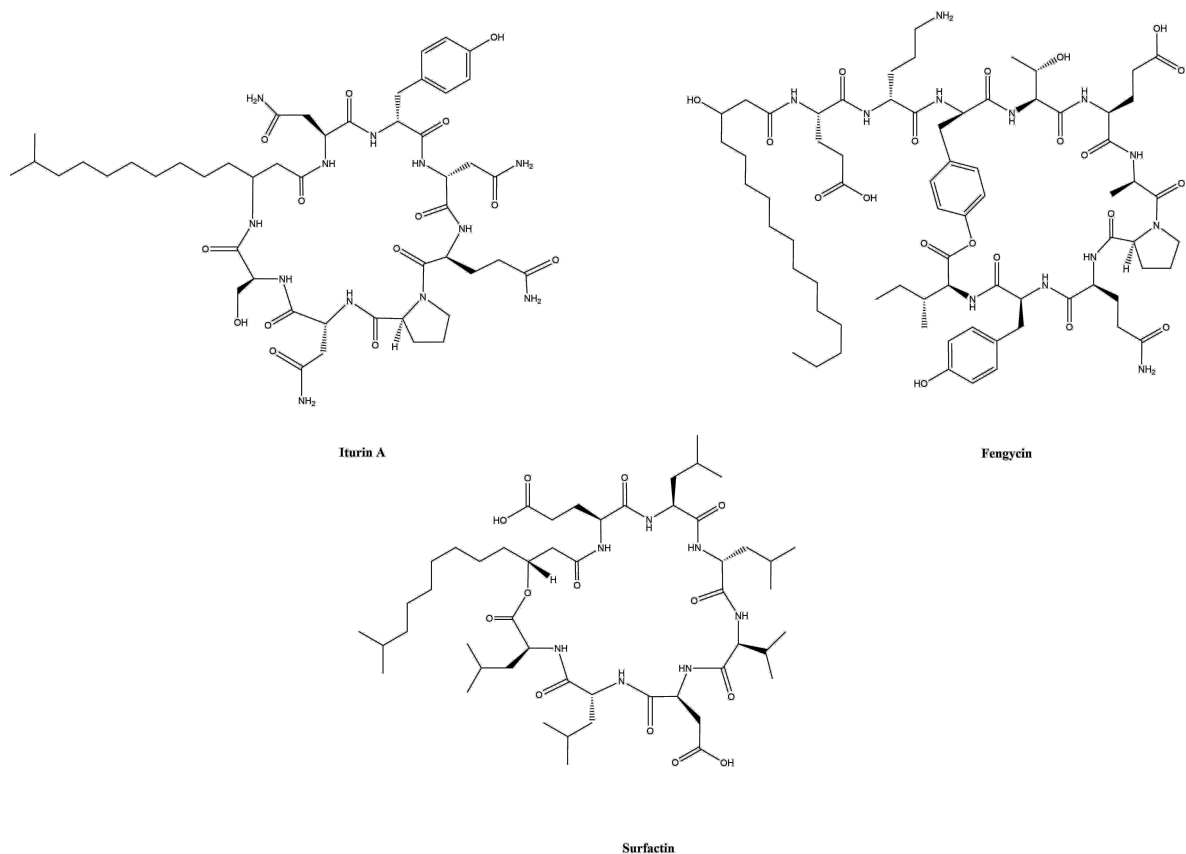


Abbildung 2.17: Strukturen von Iturin, Fengycin und Surfactin. Fengycin ist im Gegensatz zu den intracyclischen Strukturen von Iturin A und Surfactin ein exocyclisches Lipopeptid

Hassalidine und Balticide

Hassalidine A-E sind cyclische Lipopeptide, die von Algen produziert werden und wegen ihrer fungotoxischen Eigenschaften Interesse auf sich gezogen haben. Die Struktur der Hassalidine zeichnet sich dadurch aus, dass an einigen Stellen im Molekül eine Glykosylierung stattgefunden hat. Aufgrund stark variierender Kettenlängen und mehrerer möglicher Positionen der Glykosylierung kann es innerhalb dieser Lipopeptidfamilie zu erheblichen strukturellen Unterschieden kommen.

Hassalidin A wurde erstmals aus der Alge *Hassalia sp.* isoliert [81]. Weitere Hassalidine wurden folgend in Kulturen der Gattungen *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nostoc*, *Planktothrix* und *Tolypothrix* gefunden [81–83]. Balticidine A-D sind den Hassalidinen strukturell ähnlich und können zu deren Lipopeptidfamilie gezählt werden. Die Balticidine wurden aus *Anabaena cylindrica* Bio33 isoliert, einer Alge aus der Ostsee, was zur Namensgebung dieser Lipopeptide führte [84]. Eine weitere Besonderheit bei der Struktur der Hassalidine ist, dass sie bis heute die einzigen von Algen produzierten exocyclischen Lipopeptide sind [47]. Diese Gemeinsamkeit mit dem bakteriellen Lipopeptid Fengycin könnte möglicherweise ein Hinweis auf den Ursprung der potenten fungotoxischen Wirkung der Hassalidine sein. Die minimale Hemm-Konzentration (MHK) auf verschiedene Stämme der Gattung *Candida* wurde bei den Hassalidinen zwischen 0.29 μmol –8.0 μmol festgestellt, was als sehr vielversprechend eingestuft werden kann [85–87]. Des Weiteren wurde bei Hassalidin D beobachtet, dass es bei Säugerzellen den Zelltod durch Lyse der Membran herbeiführt. Bei Untersuchungen fand man heraus, dass die Mitochondrien der getöteten Zellen unbeschädigt waren. Da die Membranen der Mitochondrien einen niedrigen Gehalt an Cholesterol haben, kam man zu der Schlussfolgerung, dass Hassalidine vor allem bei Cholesterol-haltigen Membranen einen Zelltod herbeiführen [57].

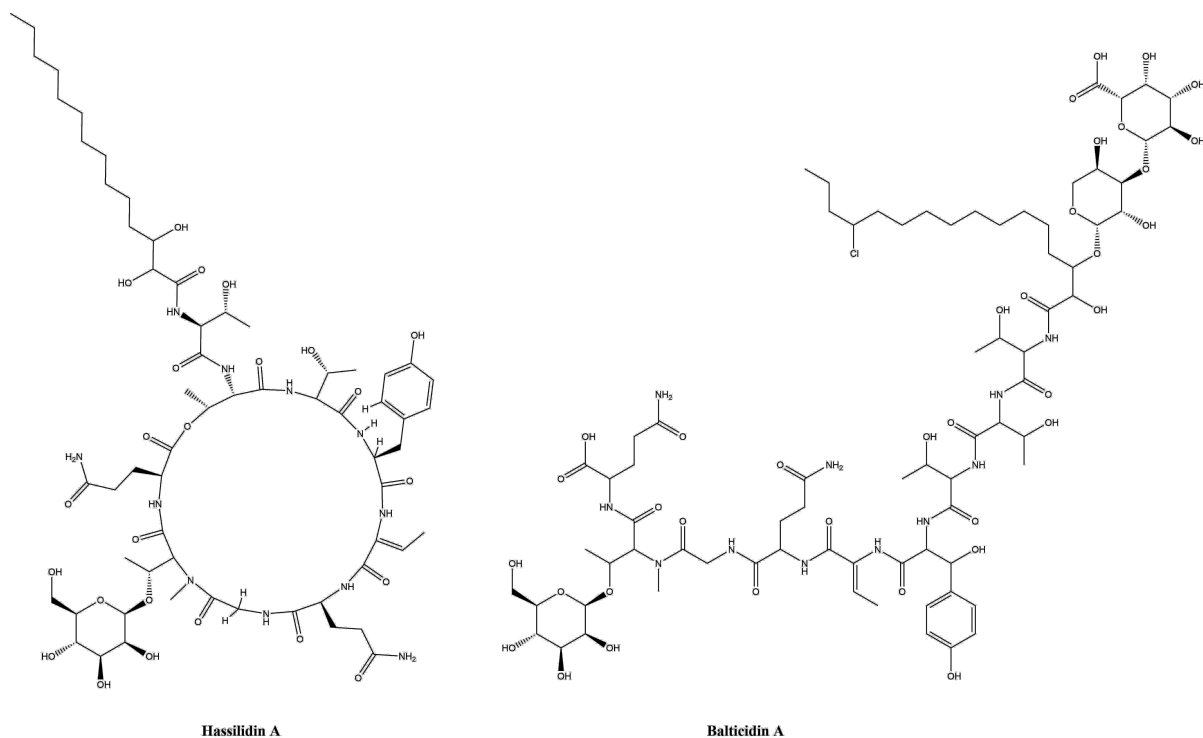


Abbildung 2.18: Strukturen von Hassalidin A und Balticidin A

Laxaphycine

Die Lipopeptidfamilie der Laxaphycine zeichnet sich dadurch aus, dass die Kettenlänge des Fettsäurerests mit C8-C10 vergleichsweise kurz ist. Eine Aminogruppe in β -Position ermöglicht hierbei wiederum eine intracyclische Struktur. Die Kohlenstoffkette ist ansonsten gesättigt. Es wurden bereits 33 Varianten von Laxaphycinen beschrieben, weswegen es sich hierbei um eine relativ große Lipopeptidfamilie handelt [88]. Innerhalb der Laxaphycine kann des Weiteren unterschieden werden zwischen A-Typ Laxaphycinen, die aus 10 Aminosäuren bestehen und B-Typ Laxaphycinen, welche aus 11 Aminosäuren bestehen [89]. Laxaphycine wurden bisher als Sekundärmetaboliten von Cyanobakterien der Gattungen *Cytonema*, *Anabaena*, *Hormothamnion*, *Trichormus*, *Lyngbya*, und *Oscillatoria* beschrieben [88]. Einzelne Laxaphycine unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Aminosäuresequenz, wobei zusätzlich einige nichtproteinogene Aminosäuren zu finden sind. Darunter zählen beispielsweise 4-Hydroxyprolin, Dehydrobutyrin (Dhb), 3-Hydroxyleucin, Hydroxythreonin, und Hydroxyasparagin. Es wurden ebenfalls acyclische Laxaphycine beschrieben, in denen keine Peptidbindung in β -Position der Fettsäure vorliegt [90]. Bei Laxaphycin B4 konnte eine antiproliferative Wirkung auf menschliche Darmkrebszellen HCT116 mit einer IC_{50} von 1.7 μ M gefunden werden. Bei einer Mischung von Laxaphycin B4 mit Laxaphycin A wurde zusätzlich das Wachstum der HCT116 Zellen durch synergistische Effekte inhibiert [91].

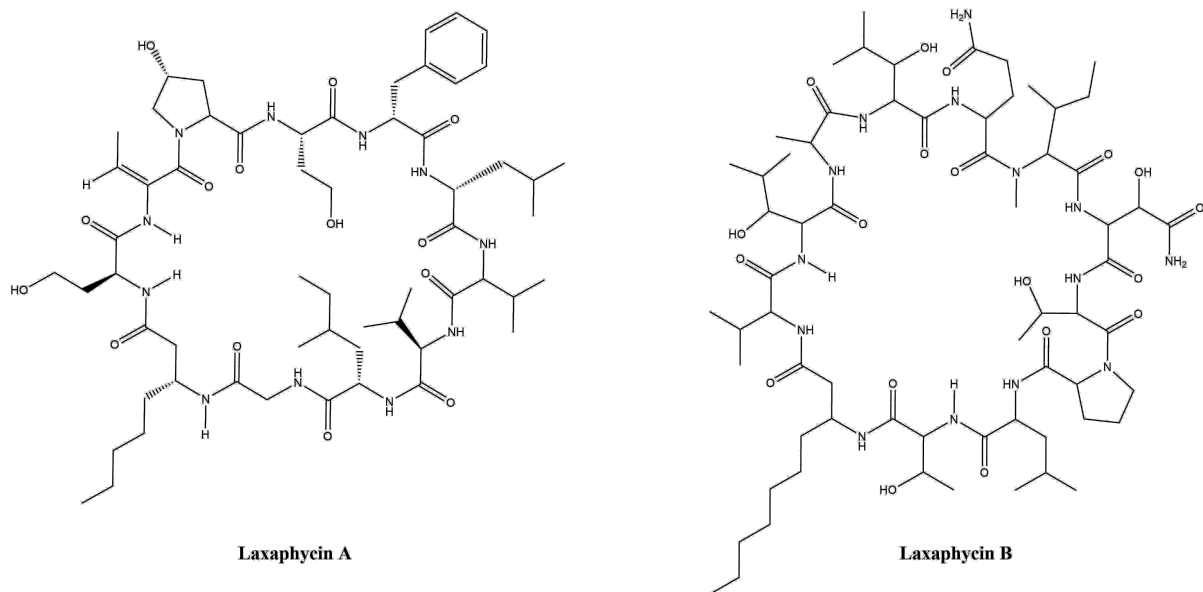


Abbildung 2.19: Strukturen von Laxaphycin A und B. Laxaphycin A besteht aus 10 Aminosäuren und einem Fettsäurerest mit 8 Kohlenstoffatomen. Laxaphycin B besteht aus 11 Aminosäuren und einem Fettsäurerest mit 10 Kohlenstoffatomen

Anabaenolysine

Die Fettsäurereste der meisten Lipopeptide bestehen in der Regel aus einer gesättigten Kohlenwasserstoffkette. Anabaenolysine haben im Gegensatz hierzu einen seltenen ungesättigten Fettsäurerest mit einer Aminogruppe in β -Position und eine ausgedehnte konjugierte Trien-Struktur. Der Peptidkopf besteht aus einer 4-gliedrigen Lactamstruktur mit zwei proteinogenen Aminosäuren und der unnatürlichen 2-(3-amino-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)-2-hydroxyacetic-Einheit. Anabaenolysine können aus Algen der Gattung *Anabaena* isoliert werden [92], welche mehrere Varianten aus dieser Familie produzieren. Diese unterscheiden sich in der Länge der Fettsäurekette (C16-C19) und der Stellung des Triensystems. Im Vergleich zu den anderen cyanobakteriellen Lipopeptiden, besitzen Anabaenolysine eher moderate antifungale Eigenschaften, welche aber durch die Zugabe von Cyclodextrin verstärkt werden können. Interessanterweise sind alle Produzenten von Anabaenolysinen auch gleichzeitig Cyclodextrin-Produzenten [93]. Der genaue Mechanismus dieses synergistischen Effekts ist nicht bekannt. Es wäre denkbar, dass Einschlussverbindungen der Cyclodextrine den Transport der Anabaenolysine durch die polare Zellwand der Schimmelpilze verbessern [47]. Bei Säugerzellen führen Anabaenolysine, ähnlich wie

Hassalidine, zur Permeabilisation der Membran, d.h. zu einem lytischen Zelltod. Im Rahmen von Studien fand man heraus, dass die Mitochondrien der getöteten Zellen unbeschädigt waren. Bei Anabaenolysinen liegt daher möglicherweise eine ähnliche Cholesterol-Abhängigkeit wie bei den Hassalidinen vor [94]. Das Lipopeptid Surfactin hat beispielsweise eine genau gegensätzliche Cholesterol-Abhängigkeit und zeigt somit eine größere Aktivität bei Cholesterol-haltigen Membranen [95].

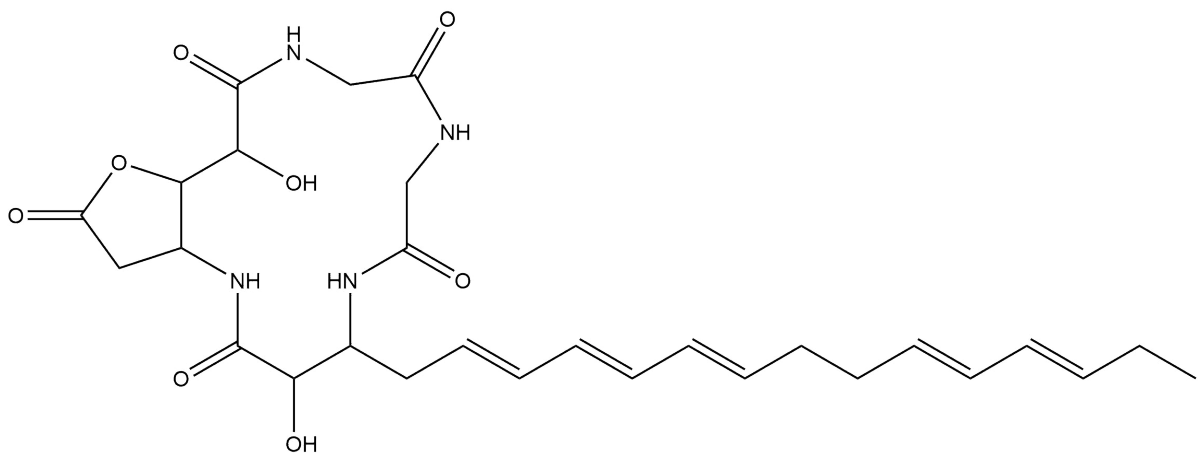


Abbildung 2.20: Struktur des cyclischen Lipopeptids Anabaenolysin, welches aus Algen der Gattung *Anabaena* isoliert werden kann. Die konjugierte Trienstruktur am Fettsäurerest kommt unter den Lipopeptiden selten vor

Muscotoxine

Muscotoxine A-C sind cyclische Undecapeptide und können aus dem Cyanobakterium *Desmonostoc muscorum* isoliert werden [96, 97]. Sie bestehen aus 10 Aminosäuren und der seltenen 3-Amino-2,5-dihydroxydecansäure. Die Cyclisierung wird hierbei, ähnlich wie bei den meisten Lipopeptiden, von der Aminogruppe in β -Position vollzogen, sodass zwei freie OH-Gruppen beim Fettsäurerest des Lipopeptids verbleiben. Muscotoxin A ist cytotoxisch auf YAC-1, Sp/2, und HeLa Krebszelllinien. Die LC_{50} -Werte liegen hierbei nach 24 h zwischen $9.9 \mu\text{M}$ – $13.2 \mu\text{M}$. Bei der Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus wurde erkannt, dass Muscotoxin A Liposome permeabilisiert, die ausschließlich aus Phospholipiden bestehen. Diese Membran Permeabilisation geht überraschenderweise einher mit einer Erniedrigung der Membranoberflächenfluidität (Stiffening) [96]. Muscotoxin A zeigte außerdem eine moderate bis starke antifungale Wirkung gegen *Alternaria alternata*, *Monographella cucumerina*, und *Aspergillus fumigatus*, mit MIC Werten von jeweils 0.58, 2.34 und $2.34 \mu\text{g/mL}$ und minimalen fungiziden Konzentrationen (MFC) von 75, 75, und $37.5 \mu\text{g/mL}$ [97].

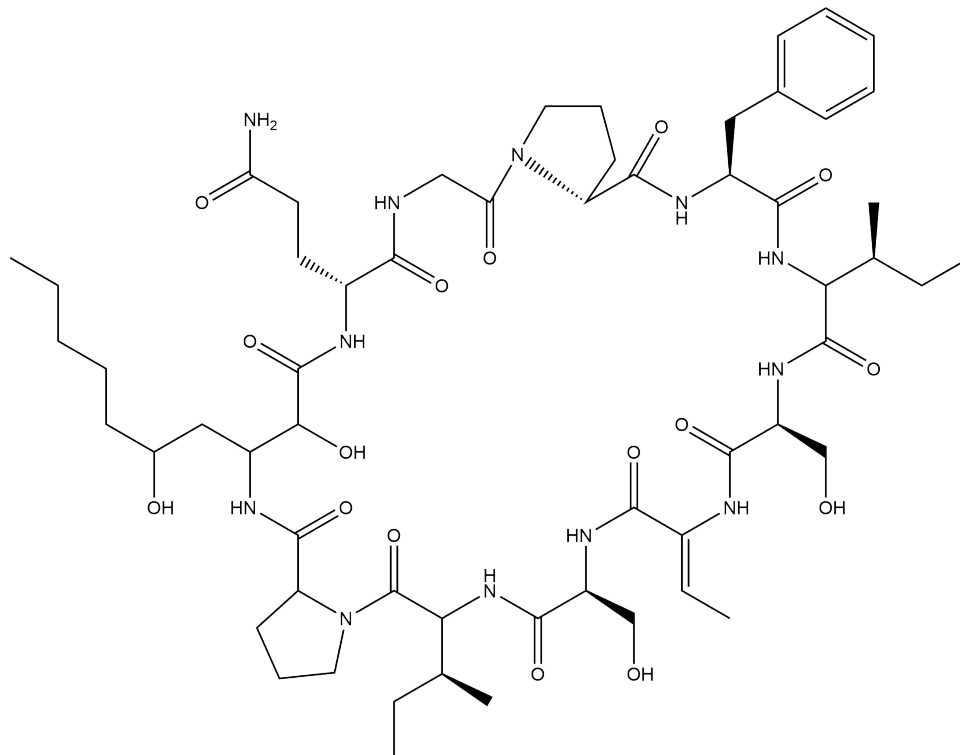


Abbildung 2.21: Struktur des cyclischen Lipopeptids Muscotoxin. Der Fettsäurerest besitzt nahe am Peptidkopf zwei freie Hydroxygruppen

Minutissamide und Puwainaphycine

Puwainaphycine A-G und Minutissamide A-L gehören zu einer Klasse von intracyclischen Dcapeptiden, die aus einer β -Amino-Fettsäure und 10 üblichen Aminosäuren bestehen [98, 99]. Als unnatürliche Aminosäuren kommen hierbei N-methyl-Asparagin und Dehydrobutyryl (Dhb) vor. Varianten in dieser Lipopeptidfamilie gibt es durch Unterschiede bei den Kettenlängen der Fettsäure und deren Substituenten oder auch Veränderungen in der Aminosäuresequenz des Peptidrings. Neben Vertretern mit einem gesättigten Fettsäurerest kommen als Substituenten außerdem Chlor-, Hydroxy- oder Ketofunktionen vor. Minutissamide und Puwainaphycine können aus Cyanobakterien der Gattungen *Cylindrospermum*, *Symplocastrum*, und *Anabaena* isoliert werden [100]. Die Bioaktivitäten der einzelnen Varianten können je nach Struktur variieren. Puwainaphycin F und G beispielsweise besitzen eine moderate cytotoxische Wirkung auf Säugerzellen. Bei der Untersuchung des für den Zelltod verantwortlichen Mechanismus wurde beobachtet, dass die Konzentration an Ca^{2+} -Ionen, nach Zugabe von Puwainaphycin F bzw. G, schnell anstieg [101]. Durch die erhöhte Konzentration an Ca^{2+} -Ionen wurde die Apoptose eingeleitet, was anschließend zum Zelltod führte [102]. Eine Substanz mit einer vergleichbaren Wirkungsweise wäre das Antibiotikum Ionomycin, welches durch das Binden von Ca^{2+} einen Transport durch die Zellmembran ermöglicht [103]. Der Effekt konnte sowohl bei primären Zellen

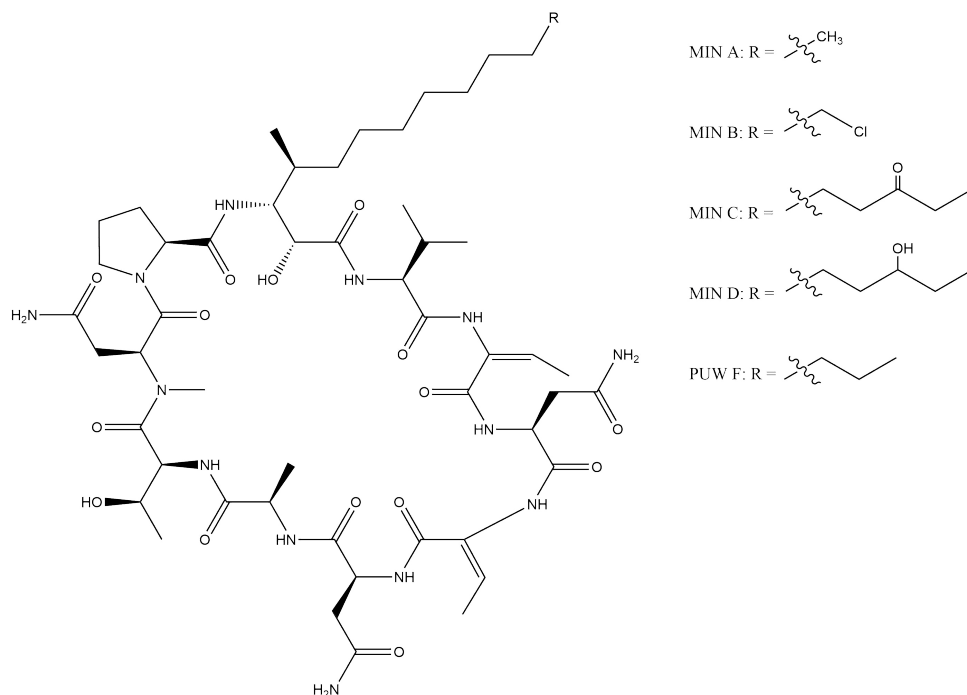


Abbildung 2.22: Struktur der Minutissamide A-D. Puwainaphycin F besitzt den gleichen Peptidring wie die Minutissamide A-D und unterscheidet sich von Minutissamid A nur in der Länge der aliphatischen Kette. Die Aminosäuresequenz bei diesem Typ lautet: Fettsäure (FA), Val, Dhb, Asn, Dhb, Asn, Ala, Thr, N-Me-Asn, Pro

als auch bei Krebszellen (HeLa) nachgewiesen werden. Puwainaphycin F und G besitzen allerdings eine unterschiedliche Aminosäuresequenz am Peptidring und können folglich nicht direkt miteinander verglichen werden. Minutissamid A hingegen besitzt fast die gleiche Struktur wie Puwainaphycin F, lediglich der Fettsäurerest ist um 2 Kohlenstoffatome kürzer. Beide Substanzen eignen sich somit dafür, den Einfluss der Länge der Fettsäure auf die Cytotoxizität zu bestimmen. Bei der Messung der Zellviabilität durch einen MTT-Assay auf HeLa-Zellen stellte sich heraus, dass im Konzentrationsbereich bis $5 \mu\text{M}$ beinahe identische IC_{50} -Werte für beide Komponenten erreicht werden. Minutissamid A lag hierbei bei $2.8 \pm 0.5 \mu\text{M}$ und Puwainaphycin F bei $3.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$. Im Konzentrationsbereich zwischen $5 \mu\text{M}$ – $20 \mu\text{M}$ konnte Puwainaphycin F allerdings die Zellviabilität um 90 %–95 % reduzieren, während Minutissamid A einen Wert von 70 % nicht überschreiten konnte [104]. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass längere Kohlenstoffketten bei der Fettsäure mit einer höheren Cytotoxizität der Lipopeptide auf tierische Zellen, zumindest im höheren Konzentrationsbereich, einhergehen. Die Länge der Fettsäurekette und somit die Wechselwirkung zwischen Membran und Lipopeptid, spielt demzufolge eine zentrale Rolle bei der Bioaktivität. Dieser Trend kann außerdem bei den antifungalen Eigenschaften beobachtet werden. Die MHK von Puwainaphycin F auf *Aspergillus fumigatus* liegt mit $2.34 \mu\text{M}$ wesentlich niedriger als Minutissamid A mit $37.5 \mu\text{M}$. Ein solches Verhältnis beider Substanzen ist auch bei anderen Schimmelpilzen wie *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma harzianum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Monographella cucumerina*, *Chaetomium globosum* und *Alternaria alternata* messbar.

Puwainaphycin F ist somit auch ein deutlich potenteres Antimykotikum als Minutissamid A [104]. Im nicht cytotoxischen Bereich ($<5 \mu\text{M}$) konnte nachgewiesen werden, dass Puwainaphycin F die Produktion des Entzündungsmediators Interleukin 8 stimuliert [105]. Es wurde allerdings nicht abschließend geklärt, ob dieser Effekt als sekundäre Folge des Schadens an der Zellmembran hervorgerufen wird oder ob es hierfür ein zelluläres Target gibt. Minutissamide A-D besitzen des Weiteren interessante antiproliferative Eigenschaften. In der Literatur werden für Minutissamide A-D IC_{50} -Werte gegen menschliche HT-29 Darmkrebszellen von 2.0, 20.0, 11.8, und $22.7 \mu\text{M}$ für die jeweiligen Varianten beschrieben.

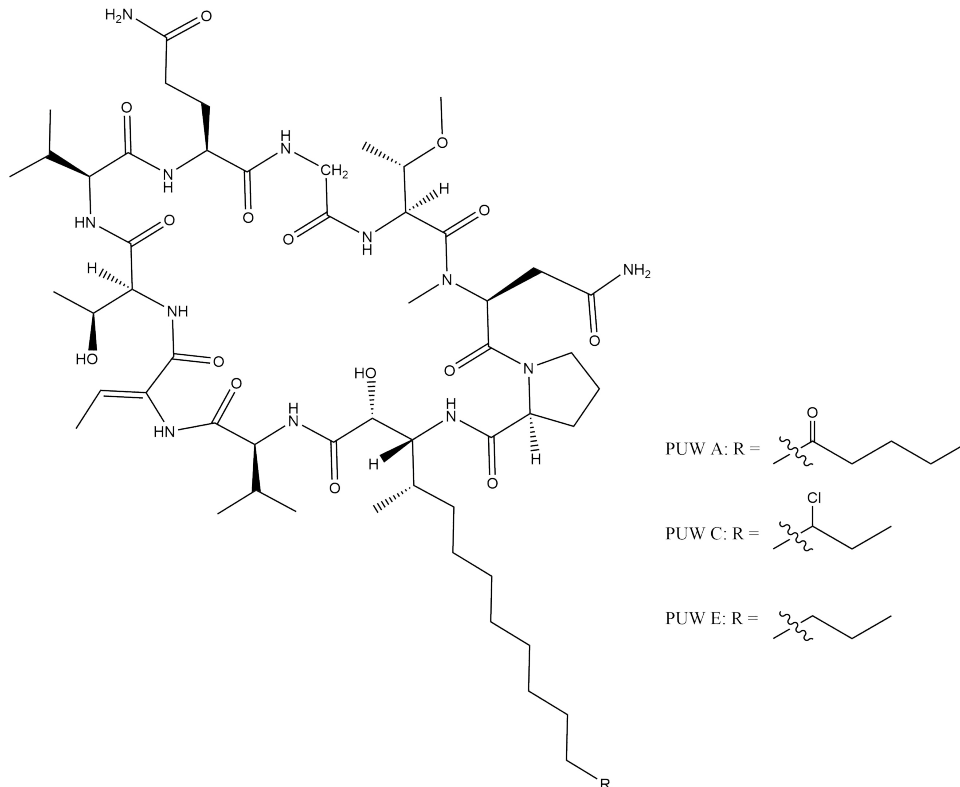


Abbildung 2.23: Strukturen der Puwainaphycine A, C und D. Die Aminosäuresequenz bei diesem Typ lautet: Fettsäure (FA), Val, Dhb, Thr, Thr, Gln, Gly, O-Me-Thr, N-Me-Asn, Pro. Puwainaphycin B hat in der Aminosäuresequenz Alanin anstelle von Glutamin und ist ansonsten strukturell analog zu Puwainaphycin A

Die Biosynthese von Puwainaphycinen und Minutissamiden erfolgt durch eine nichtribosomale hybrid Peptid/Polyketide Synthetase (NRPS/PKS). Wie bei den meisten anderen Lipopeptiden beginnt die Biosynthese bei der Fettsäure. Hierfür kommt bei Puwainaphycinen und Minutissamiden eine spezielle „Fatty Acyl AMP“-Ligase (FAAL) als Startereinheit zum Einsatz [106]. Von dieser Ligase gibt es die zwei verschiedenen Varianten PuwC und PuwI, welche für die unterschiedlich langen Fettsäurereste in dieser Lipopeptidfamilie verantwortlich sind [100]. Ein Fettsäure-Acyl wird durch die FAAL adenyliert und kann folgend als Substrat von den Polyketide Synthetasen benutzt werden. Nach Ligation des aktivierten Fettsäure-Acyls an das erste Acyl-Carrier-Protein

(ACP), welches von puwD codiert wird, beginnt der nächste Schritt der Biosynthese. Die erste PKS, codiert von PuwB, besitzt eine kanonische Sequenz von Acyltransferase-, Dehydratase-, Methyltransferase-, Enoylreductase- und Ketoreductase-Domänen, was zu einem α -methylierten Produkt führt. Das nächste Enzym, PuwE, besitzt ein PKS-Modul, eine Aminotransferase- und Monooxygenase-Domäne sowie ein NRPS-Modul. Das PKS-Modul ist lediglich für die Verlängerung der Kohlenstoffkette zuständig. Die Aminotransferase- und Monooxygenase-Domäne erzeugen die für den Fettsäurerest charakteristische 3-amino-2-hydroxy-4-methyl-acyl Struktur. Anschließend wird, durch das NRPS-Modul, vermutlich Valin als erste Aminosäureeinheit für den Aufbau des Peptidrings aktiviert. Als Nächstes wird das Intermediat in ein weiteres NRPS-Enzym (PuwF) transferiert. Dieses besteht aus zwei Modulen, welche die Aminosäuren Dehydrothreonin und entweder Asparagin oder Glutamin zur Struktur hinzufügen. Die folgende Biosynthese wird durch das Protein PuwG durchgeführt, welches drei NRPS-Module beinhaltet. Diese können jeweils die Aminosäuren Dehydrothreonin, Asparagin und Alanin in die Struktur einbauen. Das letzte Modul von PuwG besitzt außerdem eine Epimerisations-Domäne, weswegen bei diesen Lipopeptiden D- und L-Alanin vorgefunden werden können. Das Hinzufügen der nächsten Aminosäure Threonin an das Oligopeptid wird durch das Protein PuwH katalysiert. Das letzte an der Biosynthese beteiligte Enzym ist PuwA, welches aus zwei NRPS-Modulen besteht. Das erste Modul aktiviert über eine Adenyl-Domäne zunächst die Aminosäure Asparagin. Anschließend erfolgt durch eine Methyltransferase-Domäne die N-Methylierung von Asparagin. Das zweite Modul ist verantwortlich für den Einbau der letzten Aminosäure Prolin. Außerdem wird durch eine Thioesterase-Domäne die Abspaltung des Lipopeptides vom Peptid-Träger-Protein katalysiert, was schlussendlich zur Cyclisierung sowie zur finalen Struktur des Moleküls führt [106].

2.2.6 Cyclische Lipopeptide: Zielsetzung dieser Arbeit

Wie bereits gezeigt, hat die Kettenlänge einen erheblichen Einfluss auf die Bioaktivität. Um diesen Einfluss weiter zu untersuchen, wurde für diese Arbeit die Familie der Minutissamide/Puwainaphycine zur chemischen Modifikation ausgewählt. Hierzu wurde Minutissamid C, aufgrund dessen Ketofunktion am Fettsäurerest, als besonders geeignet betrachtet. Carbonylgruppen besitzen eine gute Reaktivität gegenüber Nucleophilen und besitzen daher ein umfassendes Spektrum an Möglichkeiten zur Derivatisierung. Die Wittig-Reaktion wäre eine komfortable Ein-Schritt-Methode, um das Keton durch eine frei wählbare Kohlenstoffkette zu substituieren. Die Länge wäre hierbei einstellbar über das jeweils verwendete Phosphonium-Ylid. Eine weitere Möglichkeit, um aliphatische Ketten in bestehende Strukturen einzuführen, ist die Olefinmetathese. Bei dieser Methode werden die Substituenten einer Kohlenstoff-Doppelbindung getauscht. Durch den Einsatz verschiedener Alkene können somit aliphatischer Ketten an ein Molekül hinzugefügt werden. Aus diesem Grund soll untersucht werden, ob die Olefinmetathese bei Minutissamiden/Puwainaphycinen angewandt werden kann. Die Bereitstellung der

Puwainaphycine/Minutissamide erfolgte durch das „Laboratory of Algal Biotechnology“ im Zuge des Interreg-Projekts. Die ausgedehnte Erfahrung dieser Arbeitsgruppe mit cyanobakteriellen Lipopeptiden ermöglichte eine Versorgung mit den jeweiligen Substanzen in einem vertretbaren zeitlichen Rahmen. Für die Synthese-Experimente wurden in etwa die folgenden Mengen erhalten: 800 mg Minutissamid A, 400 mg Minutissamid C, 15 mg Minutissamid D. Die Mengen von Minutissamid A und C waren für die beabsichtigten Experimente genügend. Nur bei Minutissamid D war eine zu geringe Menge erhalten worden, weswegen mit dieser Substanz keine Synthese-Experimente durchgeführt wurden.

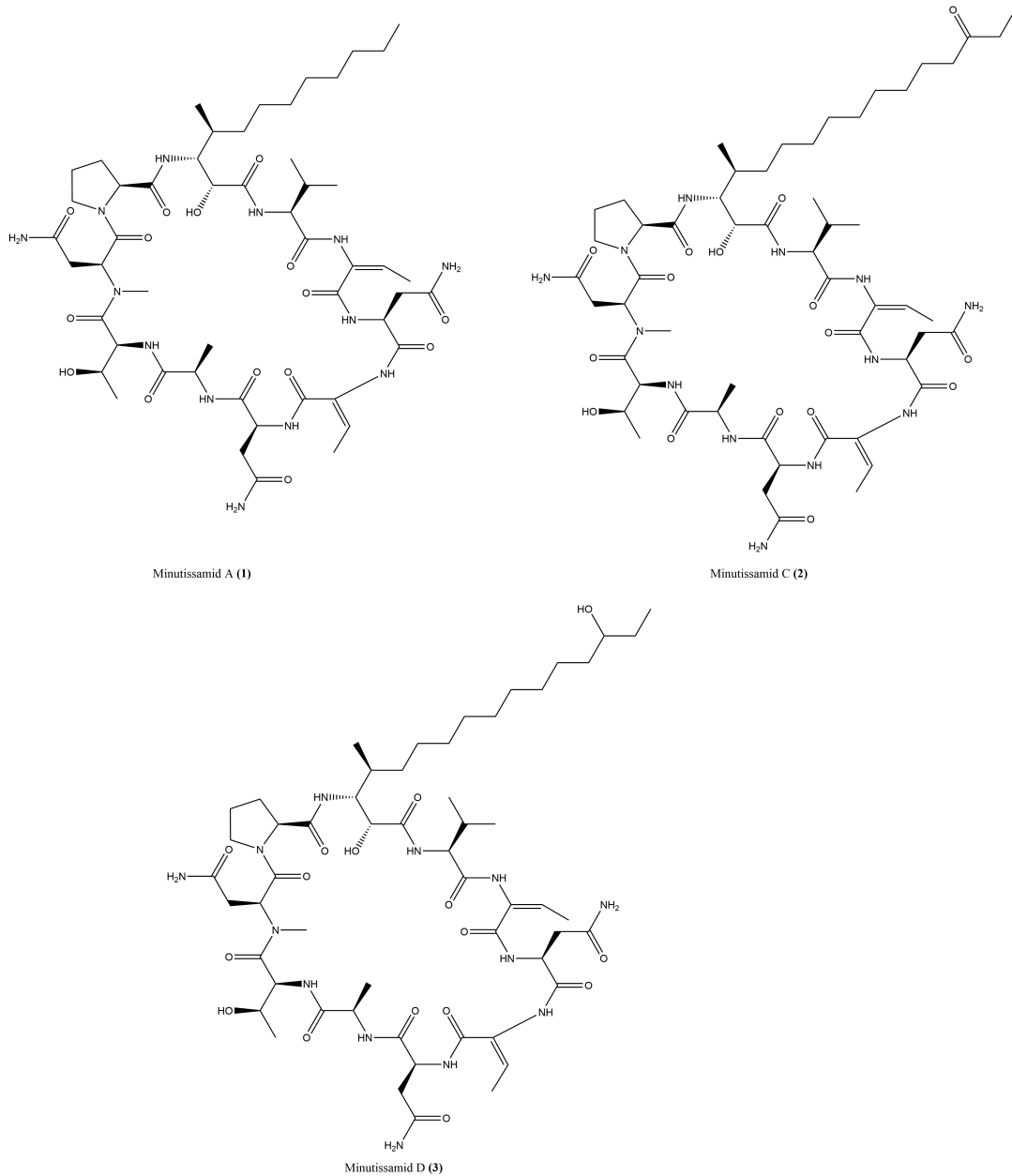


Abbildung 2.24: Strukturen der für diese Arbeit erhaltenen Minutissamide A, C und D

2.3 Indigoide Farbstoffe

2.3.1 Traditionelle Nutzung als Farbstoff

Indigo wird bereits seit der Antike, aufgrund seines intensiven Blautons, in vielen Kulturen als Färbemittel geschätzt. Ursprünglich wurde Indigo aus verschiedenen Pflanzen wie *Isatis tinctoria*, *Polygonum tinctorium* und *Indigofera tinctoria* gewonnen, bis die Synthese diese ablöste. In den Blättern dieser Pflanzen befinden sich die Vorläuferverbindungen Indikan oder Isatan B, welche durch Oxidation an der Luft zu Indigo umgewandelt werden können. Die Gewinnung von Indigo aus pflanzlichen Quellen wurde im Mittelalter als Küpenfärberei bezeichnet. Aus Indikan können außerdem die zwei Strukturisomere Indirubin und Isoindigo entstehen. Indirubin unterscheidet sich strukturell von Indigo dadurch, dass eine Indoxyl-Einheit durch eine Oxindol-Einheit ausgetauscht ist. Bei Isoindigo sind zwei Oxindol-Einheiten miteinander verknüpft. Indirubin besitzt im Gegensatz zu Indigo eine eher rotviolette Farbe und wurde in kleineren Mengen oftmals zu Indigo beigemischt, um verschiedene Blautöne zu erhalten. Indirubin selbst wurde, aufgrund seiner geringen Farbestabilität (Witterungsbeständigkeit), nie als Färbemittel verwendet [107].

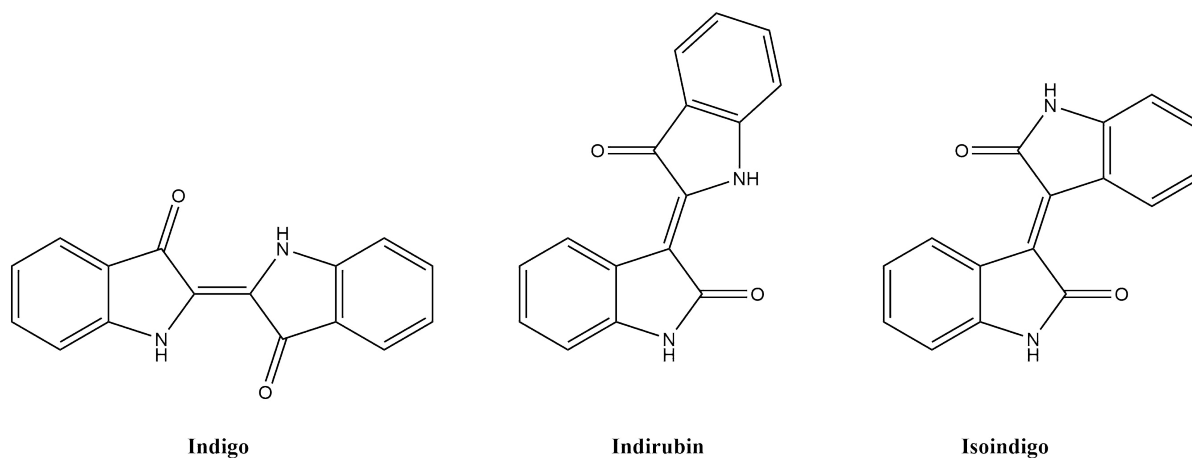


Abbildung 2.25: Strukturen von Indigo, Indirubin und Isoindigo

Obwohl die indigoide Farbstoffe über ein ausgedehntes π -Elektronensystem verfügen, ist deren Farbe für Moleküle dieser Größe ungewöhnlich tief [108]. Klessinger und Lüttke konnten durch spektroskopische Untersuchungen ermitteln, dass die Farbtiefe durch eine Elektronendonator-Elektronenakzeptor-Wechselwirkung zustande kommt. Diese findet zwischen der Aminogruppe (oder anderes Heteroatom) und der C=O- sowie C=C-Bindung statt [109].

2.3.2 Pharmazeutische Anwendungen von indigoiden Farbstoffen

Mit einer über Jahrtausende andauernde Entstehungsgeschichte bietet die traditionelle chinesische Medizin (TCM) eine beträchtliche Zusammenstellung pflanzlicher Heilstoffe. Die *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines* aus dem Jahr 1977 besitzt 5767 Einträge, von denen 4773 über Arzneistoffe aus pflanzlichen Quellen berichten [110]. Das Präparat *Danggui Longhui Wan* aus der TCM erregte besondere Aufmerksamkeit, nachdem damit Therapieerfolge bei der Behandlung von chronischer myeloischer Leukämie (CML) erzielt werden konnten [111]. Bei einer Untersuchung der einzelnen Bestandteile von *Danggui Longhui Wan* durch das „Institute of Haematology“ der „Chinese Academy of Medical Sciences“ konnte festgestellt werden, dass es sich bei der aktiven Zutat um Qing Dai (*Indigo naturalis*) handelt [112]. Qing dai selbst ist ein blau bis violett Pulver, welches aus den Blättern der Indigopflanzen *Baphicacanthus cusia*, *Polygonum tinctorium*, *Isatis indigotica*, *Indigofera suffruticosa* und *Indigofera tinctoria* gewonnen werden kann. Anschließend konnte die Bioaktivität hauptsächlich auf das in der Mischung enthaltene Indirubin zurückgeführt werden [112]. Indigo gehört auch zu den Bestandteilen des Qing dai, besitzt aber selbst keine Bioaktivität. Weitere pharmazeutisch interessante Substanzen im Qing dai sind Tryptanthrin und Qingdainon [113].

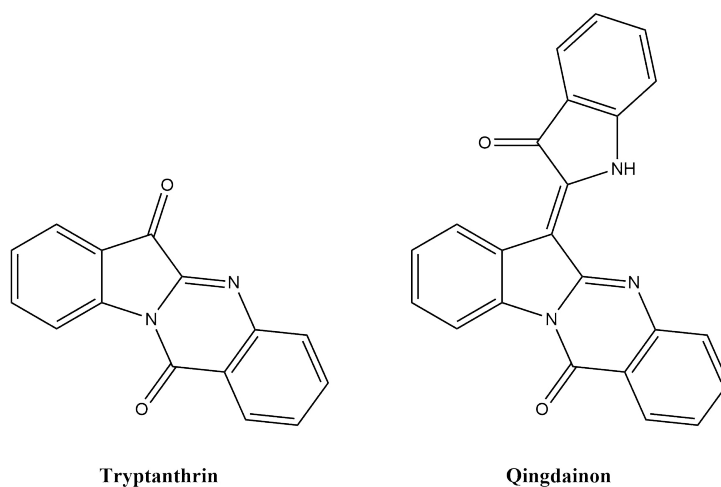


Abbildung 2.26: Strukturen von Tryptanthrin und Qingdainon. Beide Substanzen können im Qing dai gefunden werden. Qingdainon besitzt an der C=C-Doppelbindung eine Z-Anordnung [114]

Indirubin

Indirubin und einige seiner Derivate sind seit der Entdeckung ihrer pharmazeutischen Eigenschaften hinsichtlich ihrer Bioaktivität ausführlich erforscht worden. Indirubin ist, wie fast alle anderen indigoiden Farbstoffe, nahezu unlöslich in Wasser. Dies kann eine Aufnahme der Substanz vom Organismus drastisch reduzieren. Synthetische Derivate wurden daher unter anderem mit der Motivation hergestellt, die Wasserlöslichkeit zu verbessern. Am meisten im Fokus steht bei

Indirubin die Behandlung von CML, für die es seine Bekanntheit erlangt hat. Aber auch bei anderen neoplastischen Erkrankungen kann Indirubin eingesetzt werden. Das Derivat 6-Bromoindirubin-3'-oxime (6BIO) konnte das Entstehen von Lungenmetastasen im 4T1 Mausmodell von aggressivem Brustkrebs hemmen [115]. Bei Indirubin-3'-monoxime (I3M) wurde ein therapeutischer Effekt gegen das Auftreten eines Mundhöhlenkarzinoms durch Verminderung der Expression des Proteins Survivin beobachtet [116]. Bei Schuppenflechte wird in der TCM ebenfalls eine Qing dai Salbe eingesetzt. Indirubin ist bei dieser Anwendung wiederum der aktive Wirkstoff, indem es die Proliferation und Differenzierung von Keratinocyten reguliert [117]. Leclerc et al. konnten außerdem zeigen, dass Indirubine die Enzyme Glycogensynthase Kinase-3 β und CDK5/p25 inhibieren, die eine wichtige Rolle in der tau-Phosphorylierung bei neurodegenerativen Erkrankungen spielen. Auf Basis dieser Ergebnisse, wäre zudem der Einsatz von Indirubinen bei der Behandlung von Alzheimer und anderen neurodegenerativen Erkrankungen denkbar [118].

Tryptanthrin

Tryptanthrin besitzt diverse Bioaktivitäten, die für pharmazeutische Anwendungen interessant sein können. Möglichkeiten für die Therapie von Leukämie [119], Brustkrebs [120] und von Lewis-Lungenkarzinomen [121] wurden beschrieben. Tryptanthrin kann außerdem als Entzündungshemmer [122] sowie zur Behandlung von Malaria eingesetzt werden [123].

Qingdainon

Die Namensgebung von Qingdainon erfolgte durch Huang et al. bei der Analyse der Bestandteile des Qing dai. Neben einigen bereits beschriebenen Substanzen wurde hierbei ein violetter Feststoff gefunden, der vorerst keinem bekannten indigoideen Farbstoff zugeordnet werden konnte. 10 Jahre zuvor wurde von H.P. Fiedler ebenfalls eine violette Substanz aus der Hefe *Candida lipolytica*, bei dem Versuch Tryptanthrin aus Tryptophan und Anthranilsäure herzustellen, isoliert [124, 125]. Die violette Substanz erhielt von H.P. Fiedler den Namen Candidin. Bei einem Vergleich von Candidin und Qingdainon durch J. Bergman, wurden für beide Substanzen identische ^{13}C - und IR-Spektren beobachtet. Damit stand fest, dass es sich hierbei um die gleiche Substanz handelte [126]. Qingdainon erhielt, im Gegensatz zu Indirubin, bisher eher wenig wissenschaftliche Aufmerksamkeit. Dennoch besitzt Qingdainon antikanzerogene Eigenschaften. Beispielsweise wurde eine Inhibition des Wachstums von B16-Melanomzellen sowie Möglichkeiten zur Therapie von Lewis-Lungenkarzinomen, ähnlich wie bei Tryptanthrin, nachgewiesen [127].

2.3.3 Indigoide Farbstoffe als CDK-Inhibitoren

Die therapeutische Wirkung von Indirubin bei der Behandlung von CML wird unter anderem auf dessen Eigenschaft, Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) zu inhibieren, zurückgeführt [3]. CDKs

besitzen eine wichtige Rolle bei der Steuerung der einzelnen Phasen des Zellzyklus. Die Aktivität der CDKs wird hierbei maßgeblich durch die Konzentration des zugehörigen Cyclins bestimmt [128]. CDKs und Cycline können Enzym-Cyclin Komplexe bilden, welche anschließend in der Lage sind einzelne Phasen wie die DNA-Transkription und die Zellteilung (Mitose) auszulösen. Wenn das Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelltod gestört ist, kann es zu einem unkontrollierten Wachstum der Zellen führen, wie dies bei Krebszellen der Fall ist. Aufgrund dessen konnten CDK-Inhibitoren bereits erfolgreich in der Krebstherapie eingesetzt werden. Indirubin und seine Derivate besitzen die Eigenschaft CDKs zu inhibieren, indem sie mit ATP um die katalytische Untereinheit der Kinase konkurrieren. Besonders bei CDK2-Cyclin A konnte eine starke Tendenz zur Komplexbildung beobachtet werden. Indirubin-5-sulfonat konnte als stärkster Inhibitor identifiziert werden, was möglicherweise auf eine ionische Wechselwirkung zwischen der Sulfonatgruppe und der Lys33-Einheit des Enzyms zurückzuführen ist. Ein ähnliches Verhalten konnte auch bei Indirubin-3'-monoxim in der Röntgenkristallstrukturanalyse gefunden werden. Polare Substituenten verbessern folglich nicht nur die Wasserlöslichkeit der Indigoide, sondern auch deren Fähigkeit mit Enzymen wie den CDKs zu wechselwirken.

Als weiterer Mechanismus zur Inhibition des Krebswachstums wurde eine Interaktion von Indirubin mit den Phosphatgruppen der DNA genannt, wodurch die Replikation der fehlerhaften Tumor-DNA gestört werden kann [129].

2.3.4 Synthetische Methoden für indigoide Farbstoffe

Kondensationen mit Indoxyl

Erste Versuche zur Synthese von Indigo gab es 1870 von A. Baeyer [130]. Durch das Erhitzen von Isatin, PCl_3 , Essigsäurechlorid und Phosphor in einem Glasrohr konnte Indigo, sowie Indirubin als Verunreinigung, erhalten werden. Eine gezielte Synthese von Indirubin entstand 1881 durch die Umsetzung von Isatin mit Indoxyl in Ethanol [131]. Aufgrund der Einfachheit wurde diese Synthese ebenso zur Herstellung von Indirubinderivaten verwendet, was durch den Einsatz substituierter Isatine möglich ist [3]. Substituierte Isatine können über die Synthese nach Sandmeyer aus Anilinen hergestellt werden [132]. Die Wasserlöslichkeit konnte bis jetzt durch Hinzufügen von Zuckern und/oder Sulfonatgruppen verbessert werden. Es besteht außerdem die Möglichkeit, die Carbonylgruppe des Indoxylteils durch Hydroxylaminhydrochlorid in Pyridin zu einem Oxim umzusetzen, dessen Ester ebenfalls eine bessere Löslichkeit zeigen [133].

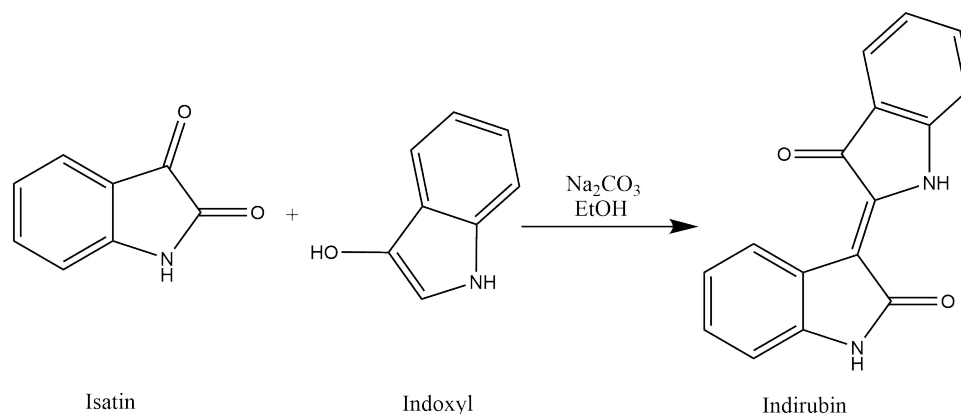


Abbildung 2.27: Reaktionsschema zur Totalsynthese von Indirubin nach A. Baeyer

Ein Problem bei der Herstellung substituierter Indirubine durch die Synthese nach A. Baeyer ist allerdings die schlechte Zugänglichkeit des Indoxylteils. Der Einsatz substituierter Indoxyle gestaltet sich schwierig, da diese nur mit massivem Aufwand bereitgestellt werden können. Durch die Heumann-Pfleger-Synthese können Indoxyle ausgehend von Anthranilsäure hergestellt werden. Substituierte Anthranilsäuren sind wiederum ebenfalls nur schwer erhältlich. Diese Problematik führte schließlich dazu, dass bis heute kaum Indirubinderivate mit Substituenten am Indoxylteil über die Totalsynthese nach Baeyer beschrieben wurden.

Für Qingdainon konnte eine ähnliche Totalsynthese wie für Indirubin entwickelt werden [134]. Hierzu muss Isatin durch Tryptanthrin als Ausgangsprodukt ersetzt werden. Tryptanthrin kann synthetisch, durch die Kondensation von Isatin mit Isatosäureanhydrid, erhalten werden [135].

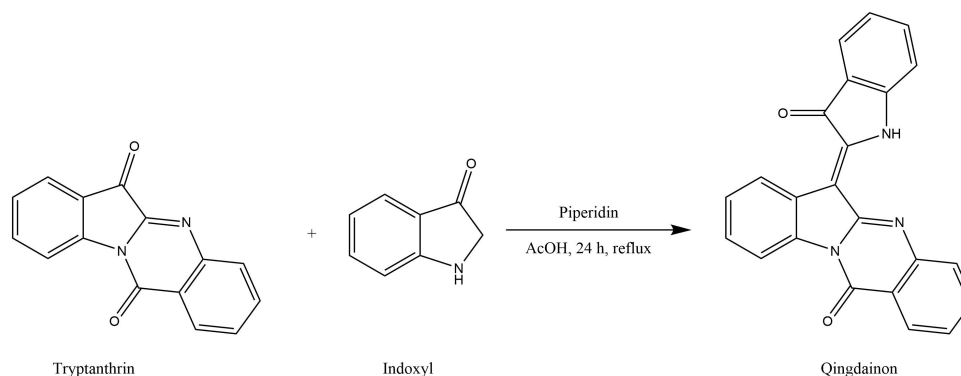


Abbildung 2.28: Reaktionsschema zur Totalsynthese von Qingdainon nach J. Bergman

Totalsynthese nach Riepl et al.

Bei der Totalsynthese von Indirubin nach Riepl et al. wird der Indoxylteil des Moleküls über mehrere Stufen aus substituierten Anilinen aufgebaut [136]. Indoxyl als Ausgangsprodukt ist somit bei dieser Variante nicht notwendig. Obwohl die Totalsynthese mit 5 Stufen deutlich

aufwendiger ist als andere 1-stufige Verfahren, können allerdings eine Vielzahl von Substituenten am Indoxylteil eingeführt werden. Aniline mit unterschiedlichen Substituenten sind hierzu leicht erhältlich.

Der erste Schritt ist eine Pyridin-katalysierte Kondensationsreaktion von Isatin mit 2-Thioxo-4-thiazolidinon (Rhodanin). Dieses Rhodaninaddukt kann, wie von Gränacher et al. beschrieben, durch Kalilauge in eine Oxindol-Sulphydrylsäure gespalten werden [137]. Des Weiteren bemerkte Gränacher, dass sich durch eine lösungsmittelfreie Umsetzung der Oxindol-Sulphydrylsäure mit Anilin ein gelbes Produkt unter Eliminierung von Schwefelwasserstoff bildete [138]. Eine solche Reaktion konnte von Riepl et al. durch Refluxieren für 8 h in DME mit katalytischen Mengen ZnCl_2 und TFA realisiert werden. Die NMR-Analyse der Produkte lieferte die Bestätigung, dass das Anilin die Thiolgruppe substituiert. Der letzte Schritt zum Indirubin wurde durch Cyclisierung in Polyphosphorsäure (PPA) durchgeführt und widerlegt den alternativen Strukturvorschlag einer 3-Aminochinolin-4-carbonsäure als Produkt. Durch Rühren für 1 h bei 135°C konnte das Entstehen einer tiefroten Farbe in der Reaktionsmischung bemerkt werden. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte das rot bis violette Produkt als Indirubinderivat identifiziert werden. Durch eine leicht abgewandelte Reaktionsführung konnte außerdem von Riepl et al. eine Totalsynthese für Thioindirubinderivate beschrieben werden. Wenn eine Oxindol-Sulphydrylsäure mit einem aromatischen Diazoniumsalz durch langsames Zutropfen zur Reaktion gebracht wird, ergibt sich ebenfalls ein gelber Feststoff als Produkt, allerdings ohne Bildung von Schwefelwasserstoff. Die Diazogruppe ist eine sehr gute Abgangsgruppe und somit ein leichter Angriffspunkt für Nucleophile wie z.B. das Thiol. Nach Cyclisierung in PPA ergaben sich substituierte Thioindirubine.

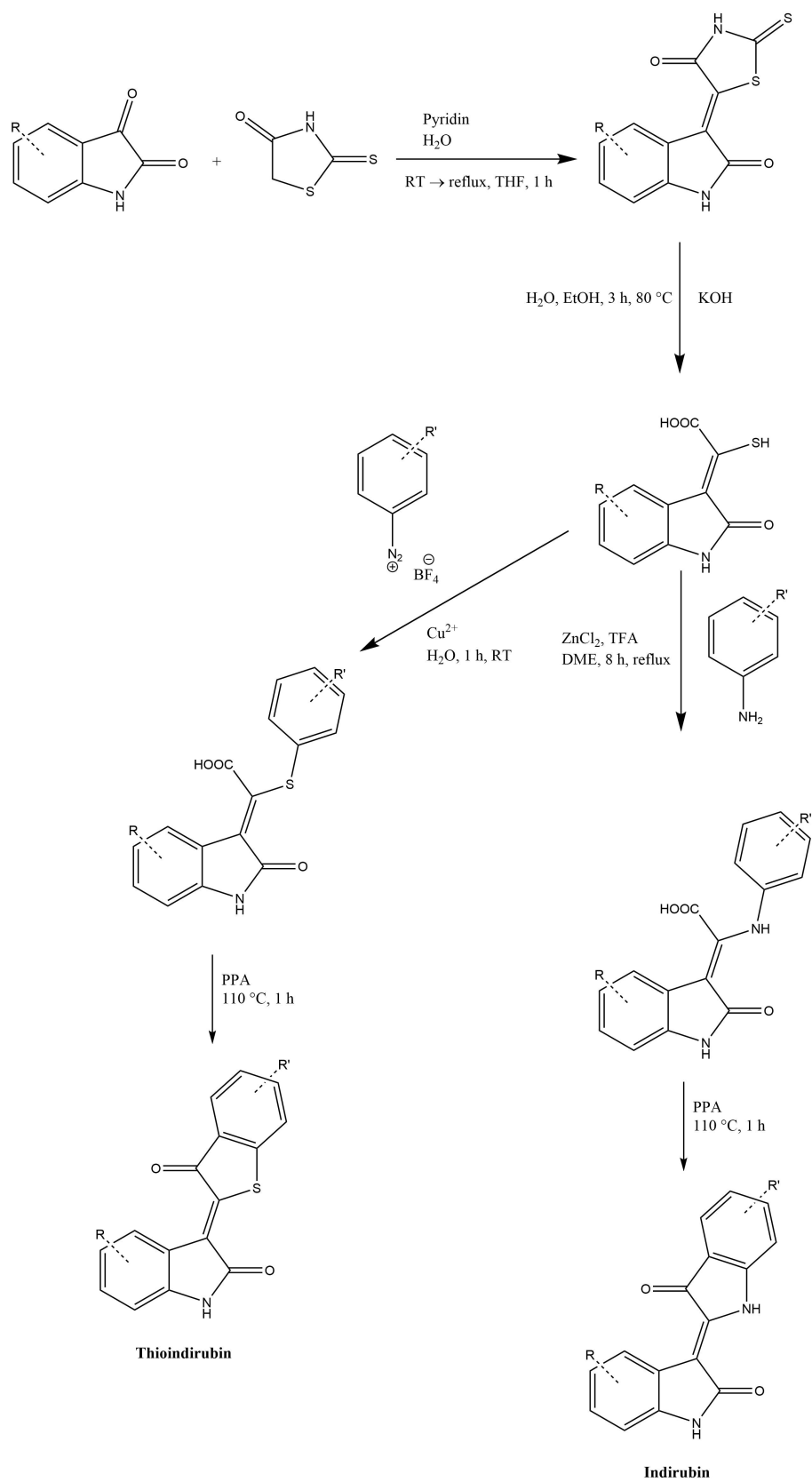


Abbildung 2.29: Reaktionsschema zur Totalsynthese von Indirubin- und Thioindirubinderivaten nach Riepl et al. [136]. Es besteht die Möglichkeit durch den Einsatz von Diazoniumsalzen Thioindirubinderivate zu erhalten

2.3.5 Indigoide Farbstoffe: Zielsetzung dieser Arbeit

Die bereits vorgestellten Teleocidine aus Blaualgen sind PKC-Aktivatoren und können somit in der Krebstherapie eingesetzt werden. Die indigoide Farbstoffe Indirubin und Qingdainon besitzen die Fähigkeit CDKs zu inhibieren, welche wie auch die PKC zu den Kinasen zählen. Die katalytischen Domänen verschiedener Kinaseklassen wie PKC und CDK weisen häufig Homologien auf [139]. Inhibitoren der CDKs sind daher möglicherweise auch Inhibitoren der PKC und umgekehrt. Die indigoide Farbstoffe innerhalb dieser Arbeit sollen dazu dienen einen Vergleich zu den Teleocidinen, hinsichtlich ihrer Bioaktivitäten, herzustellen. Bei Betrachtung der Strukturen beider Substanzklassen lässt sich ein ähnlicher Indolalkaloid-Pharmacophor vermuten. Wie von Hoessel et al. gezeigt, kann die Enzyminhibition stark durch den Einsatz substituierter Indirubine ansteigen. Eine weitere Möglichkeit wäre, durch Substituenten die Löslichkeit in Wasser und somit die Aufnahme durch den Organismus zu verbessern. 1-Schritt Totalsynthesen bieten jedoch nicht die Möglichkeit Substituenten am Indoxylteil des Moleküls einzuführen, weswegen die Prozedur nach Riepl et al. benutzt werden soll. Bei dieser Methode können Qingdainone erhalten werden, wenn Isatin als Ausgangsprodukt durch Tryptanthrin ersetzt wird. Es sollen Qingdainone mit polaren Substituenten synthetisiert werden, sodass eine möglichst hohe Bioaktivität erreicht werden kann. Wenn im Zuge der Totalsynthese Diazoniumsalze anstelle von Anilinen verwendet werden, ist es möglich, Thioindirubine herzustellen. Hierbei soll eine hohe Diversität an Substituenten erreicht werden. Die synthetischen Thioindirubine und Qingdainone sollen im Anschluss an kooperierende Arbeitsgruppen weitergegeben werden, um deren Bioaktivität im Vergleich zur Originalsubstanz zu untersuchen.

3 Ergebnisse

3.1 Teleocidine

3.1.1 Totalsynthese von (-)-Indolactam V

Für die Verwendung als Referenzsubstanz wurde Indolactam im Rahmen dieser Arbeit durch eine Totalsynthese bereitgestellt. Hierzu wurde aus den unter 2.1.4 vorgestellten Methoden die Indolactamsynthese nach Haynes-Smith ausgewählt. Mit insgesamt 8 Stufen und einer beschriebenen Gesamtausbeute von 9.2 % kann hierbei, verglichen mit einer Isolierung aus Bakterienkulturen, relativ einfach eine bestimmte Menge Indolactam erhalten werden.

Tosylierung von 4-Bromindol

Im ersten Schritt wurde der Stickstoff von 4-Bromindol über eine Tosylierung geschützt. Die Reaktion konnte mithilfe einer Phasentransferkatalyse nach Krogsgaard-Larsen et al. [140] problemlos durchgeführt werden. Als wässrige Phase wurde 16 %ige NaOH und als organische Phase Toluol benutzt. Das quartäre Ammoniumsalz war hierbei $n\text{-Bu}_4\text{NHSO}_4$. Nach Kristallisation des Produkts ergab sich ein beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 76 %. Dabei ist davon auszugehen, dass sich durch den elektronenziehenden Charakter der Tosylgruppe die Reaktivität und Oxidationsempfindlichkeit am C3 des Indol drastisch verringern.

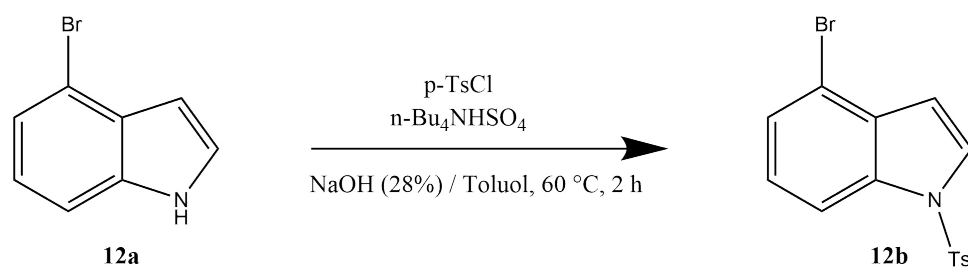


Abbildung 3.1: Reaktionsschema zur Tosylierung von 4-Bromindol

Ullmann-Kupplung mit L-Valin

Die Bindung zwischen der Aminogruppe des Valins und dem Indolring wird bei der Methode nach Haynes-Smith durch eine Ullmann-Kupplung aufgebaut. Als Katalysator dient bei dieser Reaktion Kupfer(I)-iodid und als Base CsCO₃. Das Problem, dass der Aromat des Indol als Nucleophil in der Kupplung auftritt, kann durch die Tosylierung im vorherigen Schritt vermieden

werden. Im Zuge der säulenchromatographischen Aufreinigung des Rohprodukts konnten durch Ansäuerung der Eluenten mit Ameisensäure deutlich bessere Auftrennungen erzielt werden. Ansonsten wurde durch die freie Carboxygruppe des Produkts eine starke Verbreiterung der Peaks im Chromatogramm beobachtet.

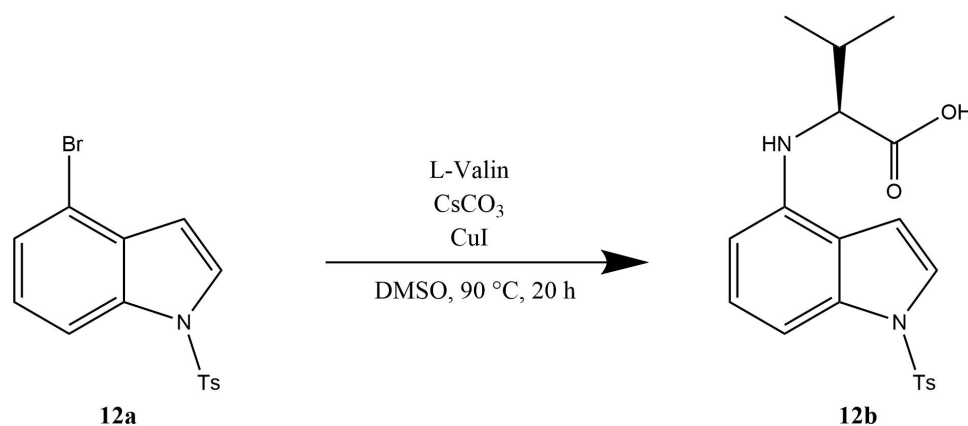


Abbildung 3.2: Reaktionsschema zur Ullmann-Kupplung von N-Tosyl-4-Bromindol mit L-Valin

Methylierung zum tertiären Amin und Peptidkupplung

Als Nächstes wurde im Literaturbeispiel ohne weitere Aufreinigung eine Eschweiler-Clarke-Methylierung und im Anschluss eine Peptidkupplung mit L-Serinmethylester Hydrochlorid durchgeführt. Die Methylierung wird in anderen Totalsynthesen erst als letzter Schritt vollzogen. Aus strategischen Gründen ist eine Methylierung vor der Peptidkupplung sinnvoll, da somit durch die entstandene tertiäre Aminogruppe keine unerwünschten Nebenreaktionen auftreten können. Die beschriebene Prozedur zur Herstellung von Substanz 12c, wie in Abbildung 3.3 gezeigt, konnte allerdings nicht reproduziert werden. Eine Isolierung und Aufreinigung des methylierten Zwischenprodukts 12c ergab durch NMR-spektroskopische Analyse ebenso keinen Hinweis auf eine erfolgreiche Reaktion.

Aus diesem Grund wurde für die Methylierung eine alternative Synthese gewählt. Für die Methylierung von Aminogruppen mit Aromaten als Substituenten eignet sich eine von Popp et al. veröffentlichte Methode, bei der eine Methylierung mit dem TTT-System (1,3,5-Trioxan-Triethylsilan-Trifluoressigsäure) erfolgt [141]. Die Reaktion zu Struktur 12c konnte unter diesen Bedingungen problemlos durchgeführt und das Produkt mit einer Ausbeute von 68 % isoliert werden. Hierbei wurde Substanz 12c erstmals per LC/MS und NMR charakterisiert. Die Peptidkupplung mit L-Serinmethylester Hydrochlorid lieferte, wie in der Literatur beschrieben, Substanz 12d. Die Gesamtausbeute beider Umsetzungen belief sich auf 46 %.

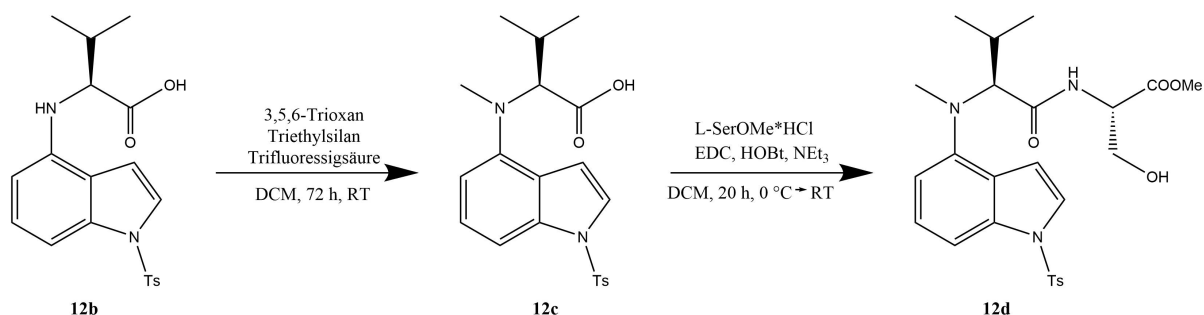


Abbildung 3.3: Reaktionsschema zur Methylierung der Valin-Aminogruppe von Struktur (12b) und anschließende Peptidkupplung mit L-Serinmethylester Hydrochlorid

One-pot Detosylierung und Dehydratisierung

Beim nächsten Schritt handelt es sich um eine one-pot Reaktion zum Entfernen der Tosyl-Schutzgruppe und zur Abspaltung des OH-Rests an der Serin-Teilstruktur mit Magnesiumspänen als Reagenz. Die kritischen Faktoren bei dieser Umsetzung sind Reaktionszeit sowie die eingesetzten Magnesiumspäne-Äquivalente, da es im Verlauf vermehrt zur Bildung unerwünschter Nebenprodukte kommen kann. In der Literatur wurden hierzu 7 h und 20 eq. als Optimum genannt. Mit einer Ausbeute von 26 % ist es fragwürdig, ob ein mehrstufiger Prozess, ähnlich wie bei Bronner et al., nicht eine bessere Gesamtausbeute erzielen würde und somit insgesamt sinnvoller wäre.

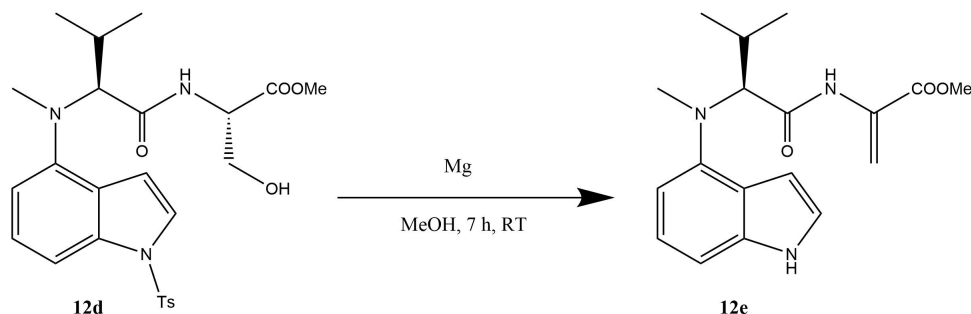


Abbildung 3.4: Reaktionsschema zur one-pot Detosylierung und Wasserabspaltung mit Magnesium

Cyclisierung mit $ZrCl_4$

Eine regioselektive, elektrophile, aromatische Substitution am C3 des Indol mit einem α,β -Dehydroaminoester kann beispielsweise mithilfe von $ZrCl_4$ durchgeführt werden [142]. Dies würde einer Friedel-Crafts-Alkylierung entsprechen. Auf eine absolute Wasserfreiheit war hierbei unbedingt zu achten, weswegen Vorbereitung und Umsetzung der Reaktion in einer Glovebox durchgeführt wurden. Dabei verlief die Reaktion erst mit einem $ZrCl_4$ erfolgreich, welches bereits bei der Auslieferung ständig unter Argon gelagert wurde.

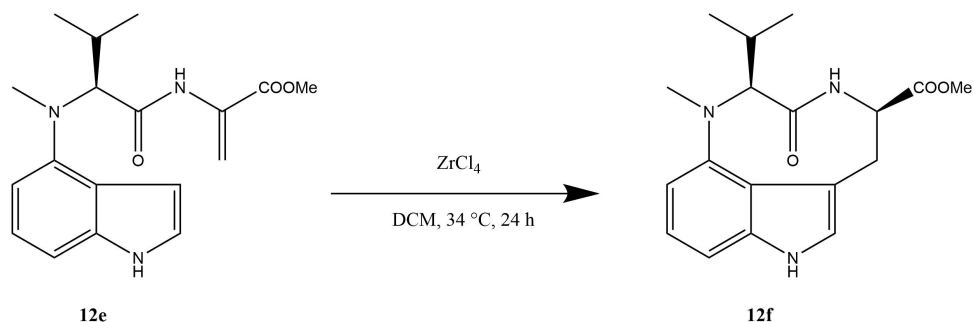


Abbildung 3.5: Reaktionsschema zur Cyclisierung von Struktur 12e mit ZrCl_4

Epimerisierung und Reduktion zu (-)-Indolactam V

Die Epimerisierung erfolgte anhand der Methode von Nakatsuka [33]. Die Epimere konnten nach säulenchromatographischer Trennung mit Toluol/ACN durch NMR-Analyse unterschieden werden. Durch den vorherigen Schritt war bereits ein Referenz-NMR-Spektrum für das unnatürliche Epimer vorhanden, welches mit aufgetrennten Fraktionen abgeglichen werden konnte. Das NMR-Spektrum des natürlichen Epimers zeigte deutliche Unterschiede. Dies liegt unter anderem daran, dass das natürliche Epimer, ähnlich wie (-)-Indolactam V, in zwei Konformeren vorliegen kann.

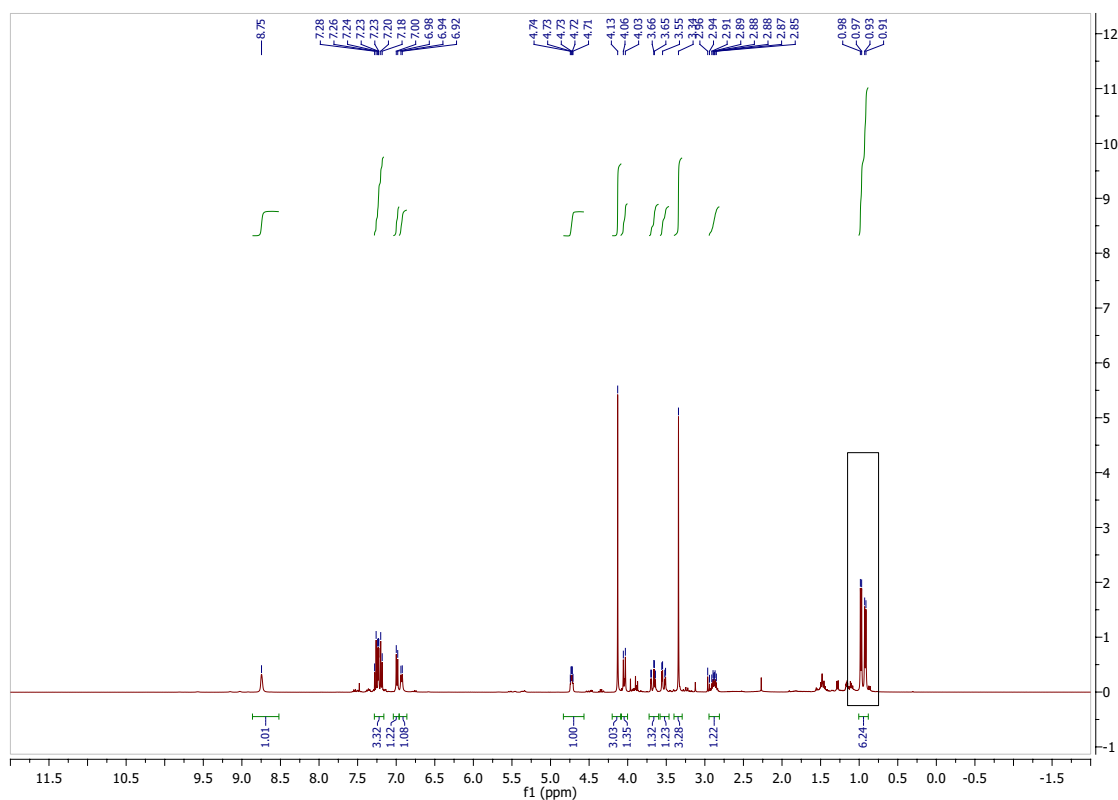


Abbildung 3.6: NMR-Spektrum des Produkts 12f von der Cyclisierung mit ZrCl_4 . Rechteckig eingerahmt wurden die Valin-Signale des Moleküls

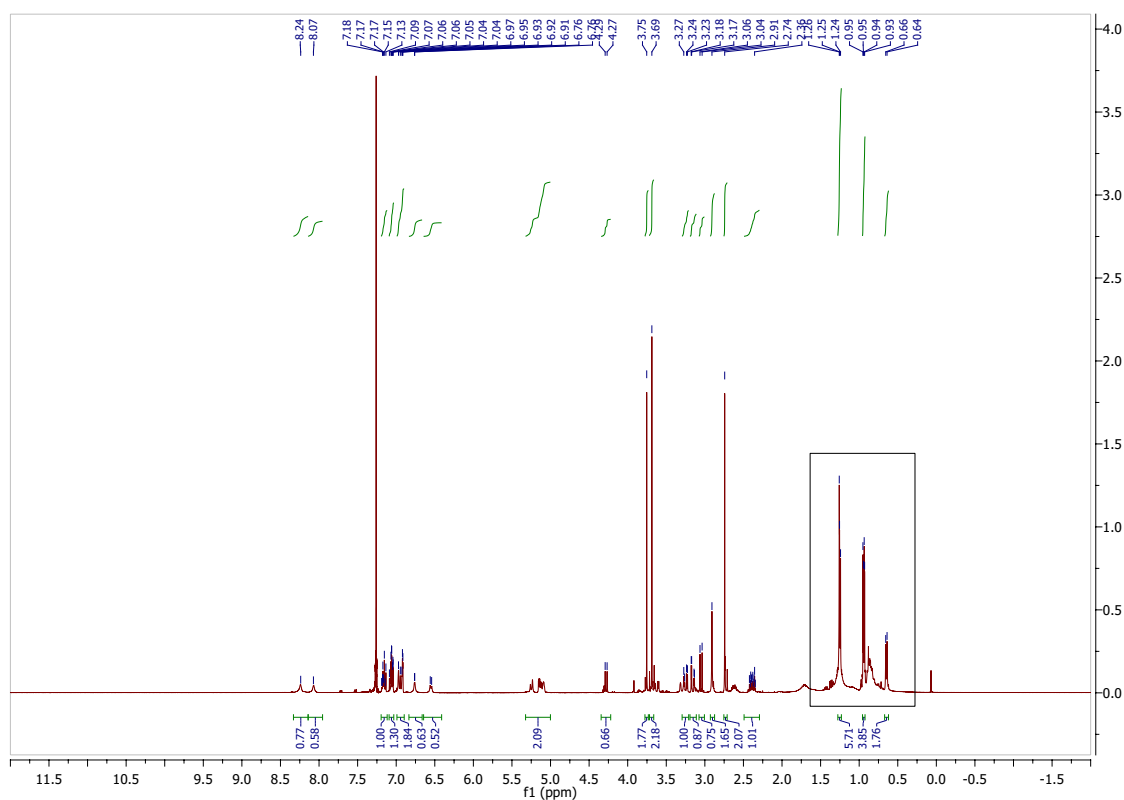


Abbildung 3.7: NMR-Spektrum des Produkts nach Epimerisierung mit NHCO_3 und säulenchromatographischer Auftrennung beider Produkte. Wie auch (-)-Indolactam V kann Substanz 12g in zwei unterschiedlichen Konformeren vorliegen. Rechteckig eingrahmt wurden die Valin-Signale beider Konformere

Beispielsweise sind die beiden Methylgruppen des Valinrests bei Substanz 12f zu ca. 1 ppm und bei Substanz 12g zu ca. 1.25 ppm im Fall des Hauptkonformers verschoben. Auch bei den anderen Signalen lassen sich Änderungen der chemischen Verschiebung sowie ein Auftreten von Konformersignalen beobachten.

Das unnatürliche Epimer konnte zusätzlich gesammelt und erneut für die Reaktion eingesetzt werden. Im letzten Schritt wurde (-)-Indolactam V durch Reduktion mit LiBH_4 hergestellt.

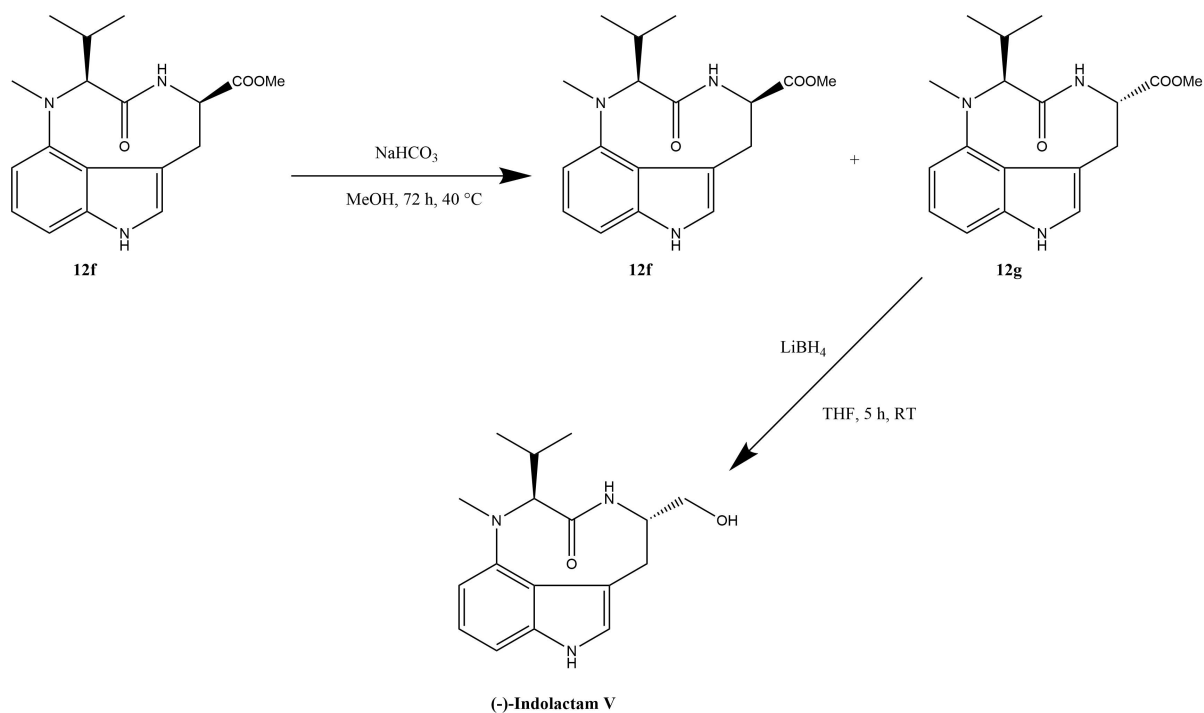


Abbildung 3.8: Reaktionsschema zur Epimerisierung von Struktur 12f. Anschließend wird (-)-Indolactam V durch Reduktion mit LiBH₄ hergestellt

3.1.2 Isolierung von Teleocidinen

Teleocidine sind im Allgemeinen nicht kommerziell erhältlich, weshalb sie in der Literatur meist aus tropischen Algen oder aus Bakterienkulturen isoliert werden. Da Ersteres mit weitaus größerem Aufwand verbunden wäre, wurde für diese Arbeit die Kultivierung von Bakterien ausgewählt. Das Vorgehen dazu wurde im experimentellen Teil unter den Abschnitten 5.2.1 und 5.2.2 beschrieben. Die Kultivierung von *Streptomyces blastmyceticum* wurde zunächst mit dem Ziel der Gewinnung substanzieller Mengen von (-)-Indolactam V für weitere Experimente zur chemischen Derivatisierung ausgeführt. In diesem Zusammenhang war es erstrebenswert, die Produktion von Teleocidin-Komponenten durch geeignete Bedingungen möglichst zu fördern. Aus diesem Grund wurde ein Nährmedium mit hohem Peptidanteil in Kombination mit langen Kultivierungszeiträumen gewählt. Hintergrund hierzu ist zum einen, dass das Grundgerüst von Teleocidinen aus den Aminosäuren Valin und Tryptophan in der Biosynthese aufgebaut wird. Zum anderen sollte die Zellernte dann geschehen, wenn die Population der Mikroorganismen den Punkt erreicht, an dem Nährstoffe knapp werden und vermehrt auf die Produktion von Toxinen zum Abtöten von Nahrungsmittelkonkurrenten gesetzt wird. Der richtige Zeitpunkt wurde dabei mithilfe einer täglichen Messung der optischen Dichte bestimmt. Nach 5-7 Tagen wurde die Kultivierung gestoppt, indem der Kolben eine Stunde in ein Ultraschallbad gestellt wurde. Durch das Aufplatzen der Zellwände sollten die produzierten Teleocidine in die wässrige Lösung

übergehen. Je mehr Isopreneinheiten in der Struktur eingebaut sind, desto höher ist die Lipophilie der Moleküle. Es ist somit fraglich, ob sich Teleocidine überhaupt in nennenswerten Mengen in einer wässrigen Lösung anreichern können. Die Separation von Biomasse und überstehender Lösung wurde mittels Zentrifugation (15 min, $600 \times g$) und anschließendem Abdekantieren durchgeführt. Der entstehende Zellpellet wurde lyophilisiert und im Gefrierschrank bei -30°C gelagert. Zur Extraktion der überstehenden Lösung wurden verschiedene Ansätze untersucht und verglichen. Neben klassischer flüssig-flüssig Extraktion mit Ethylacetat wurde außerdem ein Teil der Lösung über eine Festphasenkartusche mit C_8 - bzw. C_{18} -Kieselgel filtriert. Die festgehaltenen Substanzen wurden anschließend mit Methanol eluiert. Des Weiteren wurde die Lösung mit Amberlite XAD1180N über Nacht gerührt, filtriert und mit Methanol ausgewaschen. Aus Gründen der Effizienz wurde die Extraktionsmethode mit dem Ionentauscher Amberlite XAD1180N gewählt, da die hohen Mengen Medium (10 L–40 L) innerhalb eines Tages extrahiert werden konnten. Mit den C_8 - und C_{18} -Kartuschen konnte eine ähnliche Effizienz erreicht werden, allerdings stellen die Kartuschen einen wesentlich höheren Kostenfaktor dar. Eine Probe des MeOH-Extraktes wurde mittels LC/MS analysiert.

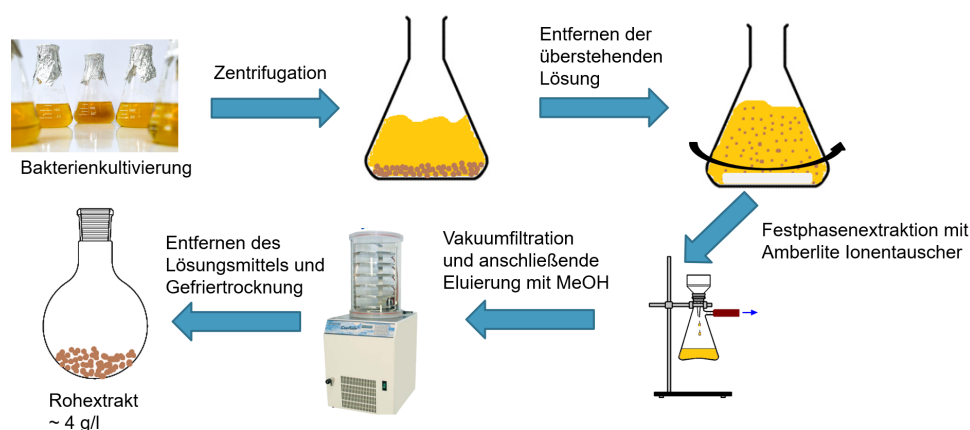


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte bei der Erstellung des Rohextrakts zur Isolierung von Teleocidinen aus Streptomyces-Kulturen

Hierbei fiel auf, dass neben den einzelnen Teleocidinen hauptsächlich Lyngbyatoxin A, welches in der bisherigen Literatur hauptsächlich aus Algen von tropischen Gewässern isoliert wurde, von den Mikroorganismen produziert wurde. Lyngbyatoxin wurde als Teil des Gemischs „Teleocidin“ aus *Streptomyces mediocidicus* in der Literatur bereits beschrieben, aber als Reinsubstanz bisher nur aus der Alge *Moorea producens* isoliert. Die weitere Aufreinigung der Substanzen erfolgte über Normalphasenchromatographie und anschließend mit präparativer HPLC über eine C_{18} -Säule. Durch diese Prozedur war es möglich 0.7 mg Lyngbyatoxin zu erhalten. Mit dieser Menge konnten einige Zelltests durchgeführt werden. Chemische Experimente zur weiteren Derivatisierung, beispielsweise mit Olefinmetathese, wären allerdings nur im Testmaßstab möglich. Dennoch war

es möglich, eine Alternative zum in der Literatur beschriebenen Sammeln von Algenbiomasse in tropischen Gewässern zu finden.

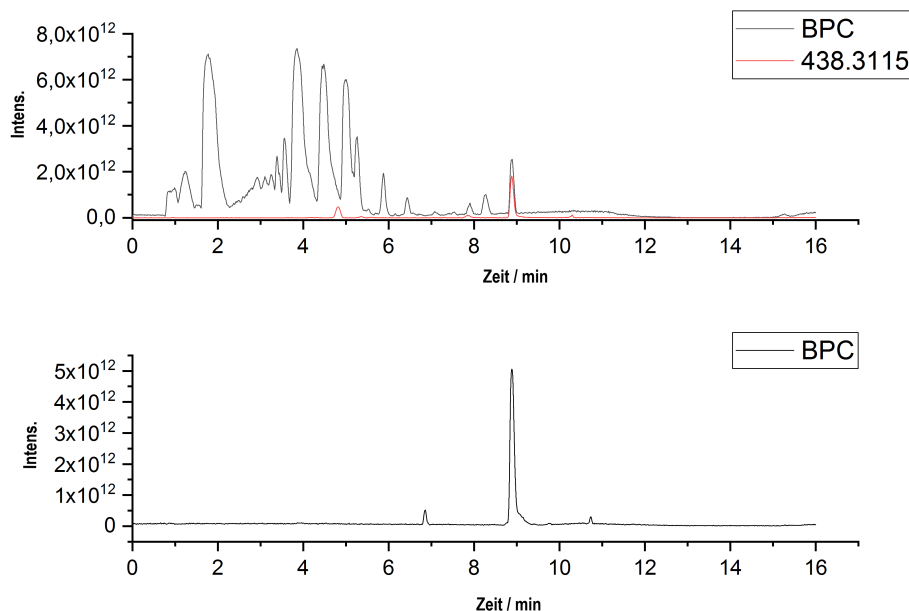


Abbildung 3.10: LC/MS Analyse des Rohextraktes von *Streptomyces blastmyceticum* (oben) und des aufgereinigten Lyngbyatoxin A (unten). Dargestellt wird jeweils das Base Peak Chromatogram (BPC) sowie im oberen Diagramm zusätzlich das extrahierte Ionenchromatogramm der Massenspur 438.3115. Dieser m/z-Wert würde dem $[M+H]^+$ -Ion von Lyngbyatoxin A entsprechen. Bei einem BPC wird zum Zeichnen des Chromatogramms in jedem Datenpunkt die jeweils intensivste Massenspur benutzt

Neben *Streptomyces blastmyceticum* wurde zudem die Kultivierung von *Streptomyces olivoreticuli* auf die Produktion von Teleocidinen untersucht. Der Name dieses Bakteriums leitet sich davon ab, da in diesem erstmals Olivoretin, ein zu Teleocidin B strukturell verwandtes Molekül, gefunden wurde [143]. Olivoretin ist ein Stereoisomer von Teleocidin B, welches zusätzlich an der freien OH-Gruppe methyliert ist. Es wurde somit versucht, substanzielle Mengen von Olivoretin aus dieser Bakterienkultur zu erlangen. Olivoretin besitzt im Gegensatz zu Teleocidin B, aufgrund der methylierten OH-Gruppe, keinerlei Bioaktivität [29]. Olivoretin könnte, wie bereits beschrieben, mithilfe einer Etherspaltung wieder in eine biologische aktive Struktur umgewandelt werden [144]. Das Ziel war es somit, substanzielle Mengen an Olivoretin durch Kultivierung von *Streptomyces olivoreticuli* zu erlangen, diese chemisch zu derivatisieren und anschließend die OH-Gruppe zu demethylieren. Anders als in der Literatur beschrieben, wurde jedoch Teleocidin B als Hauptkomponente der Kultivierung durch LC/MS-Analyse gefunden. Dieser Umstand ist einerseits entgegenkommend, da bereits ohne chemische Modifikationen eine biologisch aktive Substanz erhalten werden konnte.

Andererseits müssen alle Syntheseschritte auf das Vorhandensein einer OH-Gruppe angepasst werden. Von Horuichi et al. wurde Teleocidin B-4 als das von *Streptomyces olivoreticuli* produzierte Teleocidin B Isomer beschrieben [29]. Bei der Aufarbeitung wurde zunächst die Biomasse von der überstehenden Lösung durch Zentrifugieren (15 min, $600 \times g$) und anschließendem Abdekantieren getrennt. Die überstehende Lösung wurde mithilfe eines Ionenaustauscherharzes und die Biomasse durch Rühren in MeOH extrahiert. Beim Vergleich der erhaltenen Rohextrakte fiel auf, dass sich der größte Teil von Teleocidin B im Extrakt der Biomasse befand. Aus diesem Grund wurde der Biomasseextrakt zur weiteren Aufreinigung ausgewählt. Diese wurde mit einer Normalphasen Flash-Chromatography und einer präparativen HPLC mit MeOH/H₂O und reversed Phase durchgeführt. Die Ausbeute betrug 4 mg.

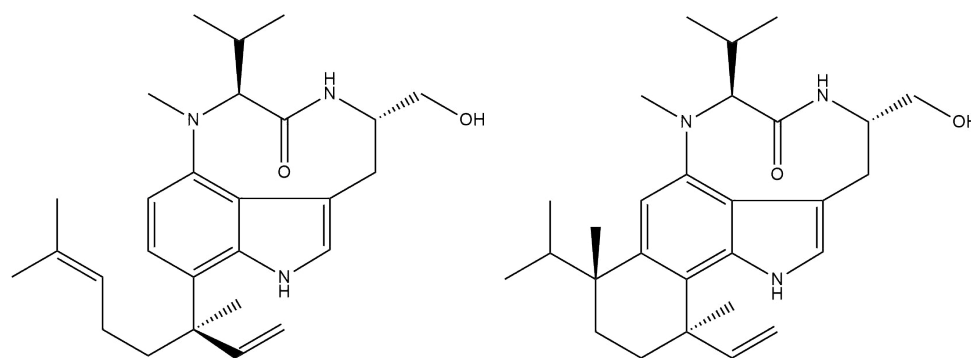


Abbildung 3.11: Strukturen von Lyngbyatoxin A und Teleocidin B-4

3.1.3 Versuche zur synthetischen Modifikation von Teleocidinen

Bei der Isolierung von Teleocidin B aus *Streptomyces olivoreticuli* konnte die vergleichsweise größte Ausbeute von ca. 4 mg erzielt werden. Aus diesem Grund wurden die meisten synthetischen Versuche mit dieser Substanz durchgeführt. Ein Beispiel für einen dieser Versuche war die Olefinmetathese. Als Olefin sollte hierbei die endständige Doppelbindung des Isoprenrests dienen, sodass eine Verlängerung der aliphatischen Kette möglich wäre. Metathese-Katalysatoren auf Basis von Ruthenium bieten zudem eine hohe Toleranz gegenüber freien Alkoholgruppen [145]. Jedoch konnte bei keiner Reaktion nach der Aufarbeitung die gewünschten Produkte mittels LC/MS nachgewiesen werden. Unter Umständen bewirkt die unmittelbare Nähe zum Amin des Indolrings eine Inhibierung der Reaktion. Es wäre somit denkbar, die Aminogruppe zunächst zu schützen und anschließend eine Olefinmetathese durchzuführen. Allerdings wurden derartige Experimente aufgrund eines Mangels an Ausgangsmaterial im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

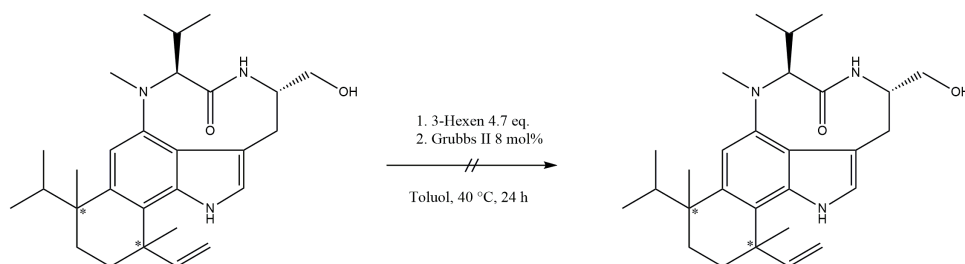


Abbildung 3.12: Reaktionsschema für einen beispielhaften Versuch zur Metathese von Teleocidin B. Das gewünschte Produkt konnte bei der anschließenden LC/MS-Analyse nicht gefunden werden

3.1.4 Teildiskussion Teleocidine

Dieses Kapitel behandelt die Isolierung und Aufreinigung der Tumorpromotoren Teleocidin B und Lyngbyatoxin A aus Kulturen der Gattung *Streptomyces*. Interessanterweise konnte als Teleocidin-Hauptkomponente hierbei Lyngbyatoxin A und nicht, wie in der Literatur häufig beschrieben, (-)-Indolactam V im Anschluss an die Kultivierung gefunden werden. Es wäre möglich, dass dies auf die lange Kultivierungsdauer und das Tryptophan-reiche Medium zurückzuführen ist. Die längeren Kultivierungszeiten könnten dazu führen, dass die Produktion von Toxinen, zu denen die Teleocidine zählen, erhöht ist. Wenn Nährstoffe knapp werden, versuchen die Actinomyceten durch Toxine Nahrungsmittelkonkurrenz auszuschalten. Außerdem wird für die Produktion von Teleocidinen Tryptophan benötigt, weswegen das Tryptophan-reiche Medium ebenso förderlich ist. Teleocidin B konnte auf ähnliche Weise aus *Streptomyces olivoreticuli* isoliert werden. Um den aliphatischen Rest von Teleocidin B zu modifizieren, wurde eine Olefinmetathese angestrebt. Jedoch konnten bei dieser keine Produkte nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung wäre eine inhibierende Wirkung durch den Indol-Stickstoff in der Nähe der Seitenkette. Der biologische Teleocidin-Precursor (-)-Indolactam V wurde durch eine Totalsynthese bereitgestellt. Die erhaltenen Substanzen wurden für weitere Zellexperimente übergeben.

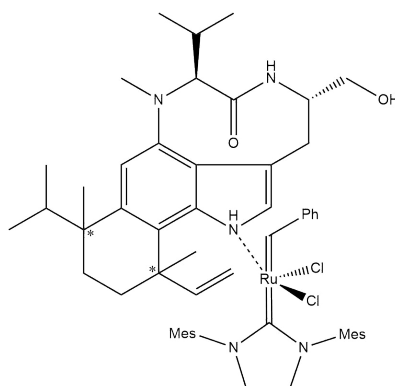


Abbildung 3.13: Strukturvorschlag für ein Chelatmodell für die Koordinierung des Indol-Stickstoff an das Metallatom des Grubbs-II-Katalysators

3.2 Herstellung von Minutissamid Varianten

3.2.1 Verlängerung der aliphatischen Kette von Minutissamid C

Der Vergleich der Bioaktivitäten von natürlichen Minutissamiden lässt vermuten, dass die Länge der aliphatischen Kette des Lipopeptids eine tragende Rolle für die Cytotoxizität spielt. Mögliche Erklärungsversuche hierzu wären beispielsweise eine Einlagerung der Kohlenstoffkette in die Lipid-Doppelschicht einer Membran, sodass es zur Porenbildung kommt. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde versucht eine Reihe von Minutissamiden mit verschiedener Kettenlänge synthetisch herzustellen. Minutissamid A wurde jedoch als ungeeignet eingeschätzt, da bei diesem Molekül der Fettsäurerest lediglich aus einer gesättigten Kohlenstoffkette bestand. Da herkömmliche chemische Umsetzungen eine funktionelle Gruppe benötigen, wurden eher andere Minutissamide in Betracht gezogen. Als besonders vielversprechend wurde Minutissamid C eingeschätzt, bei dem sich ein Keton am Fettsäurerest befindet. Carbonyle sind im Allgemeinen sehr reaktiv und besitzen eine große Vielzahl an Reaktionsmöglichkeiten. Als erste Überlegung zur Kettenverlängerung kam eine Wittig-Reaktion in Frage. Bei dieser Methode wird zunächst

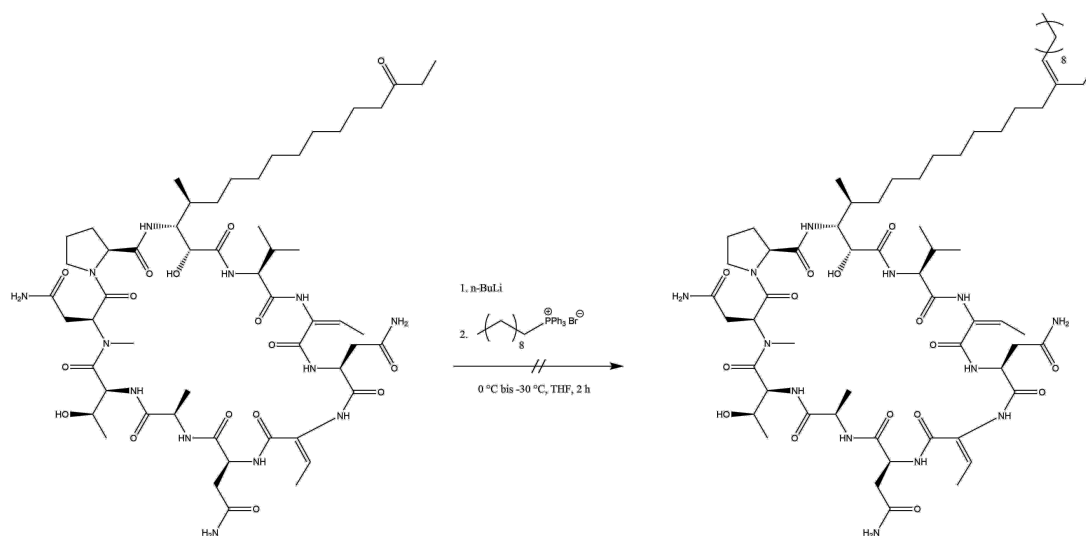


Abbildung 3.14: Reaktionsschema für einen beispielhaften Versuch zur Wittig-Reaktion von Minutissamid C. Das gewünschte Produkt konnte bei der anschließenden LC/MS-Analyse nicht gefunden werden

ein Phosphorylid *in situ* durch den Einsatz einer Base erzeugt. Innerhalb dieser Arbeit wurde

n-BuLi als Base verwendet. Anschließend kann das Phosphorylid mit einem Keton zu einer Olefinverbindung weiterreagieren. Der Rest des Olefins kann hierbei durch den Rest des eingesetzten Phosphorylids gesteuert werden. Somit wäre die Wittig-Reaktion eine bequeme 1-Schritt Reaktion für die Verlängerung der Fettsäurekette von Minutissamid C. Allerdings lieferten zahlreiche Versuche diese Reaktion durchzuführen in keinem Fall das gewünschte Produkt. Es wurde vermutet, dass Restfeuchte des eingesetzten Minutissamid C die Reaktion möglicherweise inhibiert. Aus diesem Grund wurde die Menge des verwendeten n-BuLi sukzessive erhöht, was allerdings nicht zum Erfolg der Reaktion führte. Auch durch verschiedene Temperaturen oder Reaktionszeiten konnte in keinem Fall Produkt bei der Aufarbeitung nachgewiesen werden.

Bei höheren n-BuLi Mengen wurde ein Nebenprodukt mit einem m/z-Wert von 1246.7206 beobachtet, welches höchstwahrscheinlich aus der Reaktion des n-BuLi mit dem freien Keton der Fettsäurekette entstanden war.

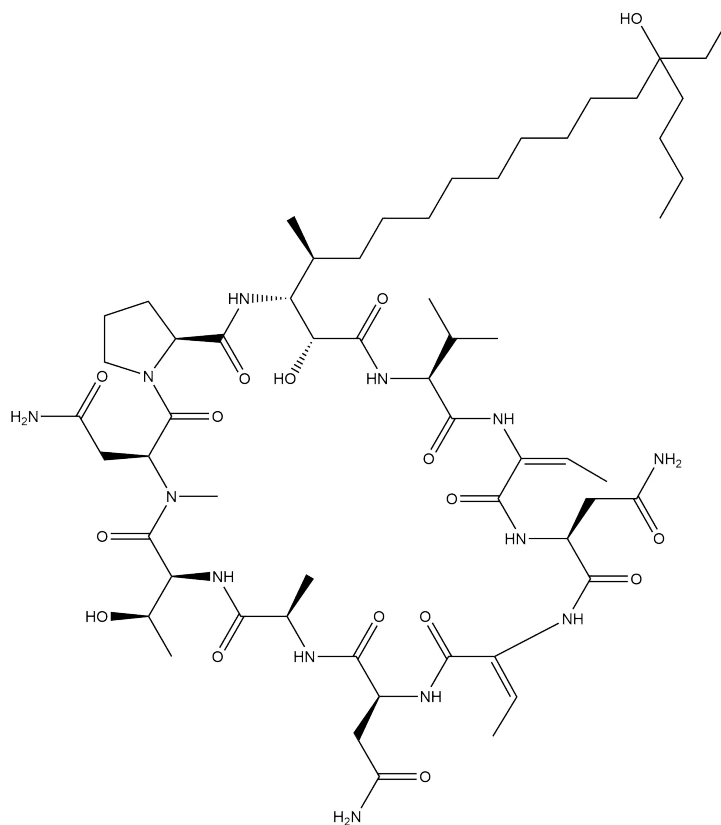


Abbildung 3.15: Mögliches Nebenprodukt bei der Durchführung der Wittig-Reaktion mit n-BuLi. Das einfach positive Ion der gezeigten Struktur hätte einen m/z-Wert von 1246.7411

Anhand der geringen Intensitäten in der LC/MS-Analyse war jedoch erkennbar, dass eine weitere Aufreinigung und Isolierung des Nebenprodukts kaum lohnenswert sein konnte. Aufgrund dieser Beobachtung wurde anschließend versucht, mit ähnlichen Carbanionen eine Verlängerung des Fettsäurerests zu erreichen. Hierzu wurde die Grignard-Reaktion als geeignet erachtet, welche

Carbanionen aus Alkylmagnesiumhalogeniden (Grignard-Reagenz) erzeugt und mit elektrophilen Zentren zur Reaktion bringt. Der Vorteil bei dieser Reaktion besteht darin, dass das Grignard Reagenz aus prinzipiell jedem beliebigen Alkylhalogenid, durch die Reaktion mit Magnesiumspänen, erzeugt werden kann. Dies ermöglicht eine breite Auswahl an verschiedenen Kettenlängen, da die meisten Alkylhalogenide eine gute kommerzielle Verfügbarkeit besitzen. Bei dieser Herangehensweise entsteht zunächst aus dem Keton eine OH-Gruppe, welche im Anschluss eliminiert werden muss. Ansonsten wäre die Cytotoxizität, wie bei Minutissamid D, vermutlich stark vermindert.

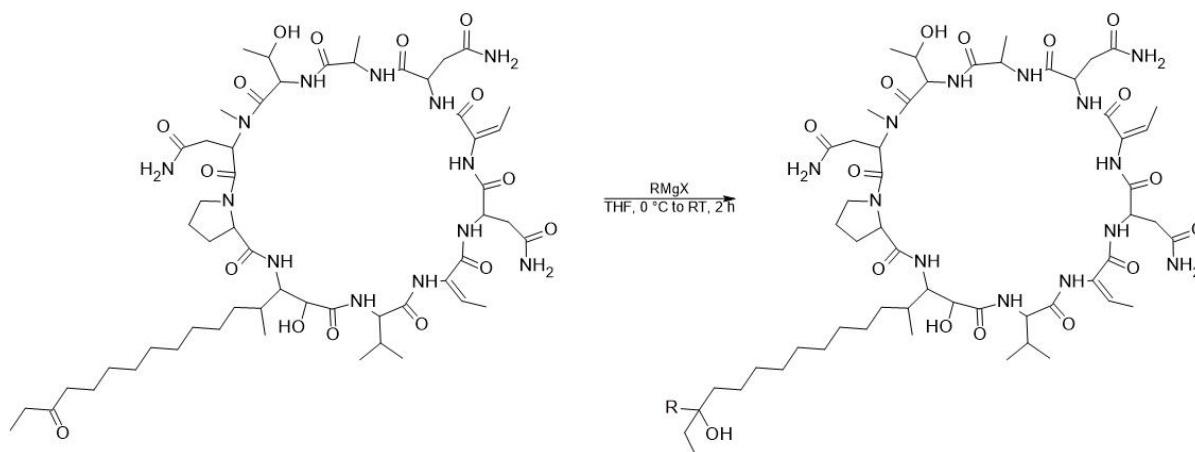


Abbildung 3.16: Reaktionsschema für die Grignard-Reaktion von Minutissamid C. R steht hierbei jeweils für einen Butyl- oder Octylrest. Es wurde auch mit anderen Kettenlängen experimentiert, allerdings konnten hierbei nur sehr geringe oder gar keine Ausbeuten beobachtet werden

Bei der Durchführung der Grignard-Reaktion wurde darauf geachtet, dass möglichst keine lokalen Überhitzungen in der Mischung entstanden. Speziell beim Quenchen mit ges. NH_4Cl war die Kühlung im Eisbad und eine gute Durchmischung der Lösung wichtig. Die weitere Aufarbeitung erfolgte über eine SPE-Kartusche mit C_{18} -Kieselgel, bei der zunächst gelöste Salze mit jeweils 100 % H_2O und 20 % $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ ausgewaschen wurden. Anschließend wurde eine Fraktion mit dem Rohprodukt durch 90 % $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ eluiert und per LC/MS analysiert.

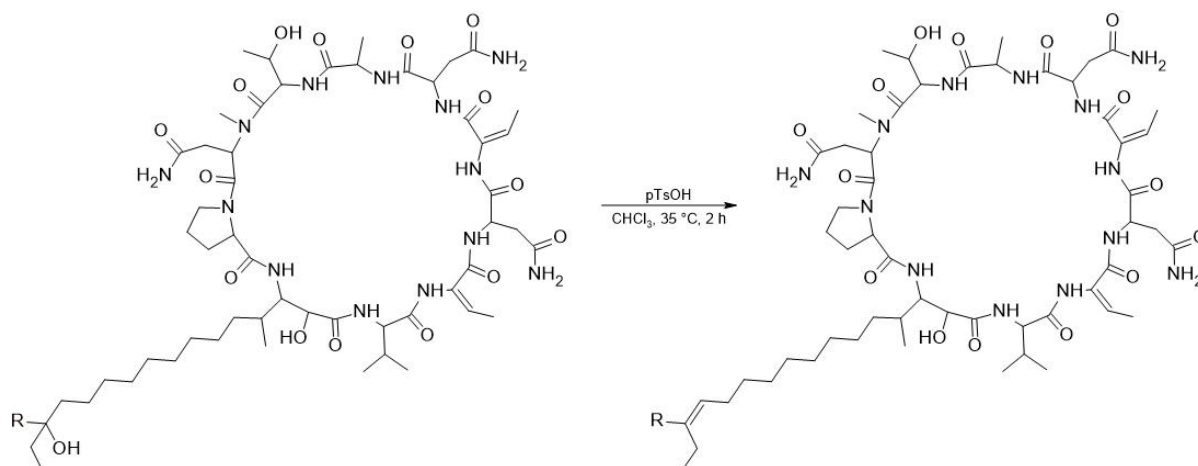


Abbildung 3.17: Reaktionsschema für die Wassereliminierung im Anschluss an die Grignard-Reaktion bei Minutissamid C. R steht hierbei jeweils für einen Butyl- oder Octylrest

Tabelle 3.1: Eingesetzte Volumina bei der SPE-Aufarbeitung der Reaktionsmischungen

Ansatzgröße	(v/v) MeCN / H ₂ O			
	0 : 100	20 : 80	90 : 10	100 : 0
5 mg	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
50 mg	40 mL	40 mL	40 mL	60 mL

Tabelle 3.2: Darstellung der Fraktionen, in denen Minutissamid-Derivate je nach Ansatzgröße gefunden wurden. Bei größeren Ansätzen wurden zusätzlich in der 100 % MeCN Fraktion Produkte gefunden. Des Weiteren war es auffällig, dass je nach hinzugefügter Kettenlänge mehr oder weniger Produkt in der 100 % MeCN Fraktion durch LC/MS nachgewiesen werden konnte

Ansatzgröße	(v/v) MeCN / H ₂ O			
	0 : 100	20 : 80	90 : 10	100 : 0
5 mg	-	-	Produkt	-
50 mg	-	-	Produkt	Produkt

Bei Verlängerungen von 4 bis 8 C-Atomen waren besonders hohe Intensitäten an Produkt sichtbar. Die Produkte wurden ohne weitere Aufreinigung für die Eliminierung der neuen OH-Gruppe eingesetzt. Für diese Reaktion gibt es zahlreiche Methoden. Bei den meisten sind jedoch erhöhte

Temperaturen notwendig, welche für Minutissamide nicht anwendbar sind. Aufgrund der Einfachheit der Durchführung wurde eine Standardprozedur mit *p*-TsOH in wasserfreiem Chloroform gewählt. CHCl_3 ist im Gegensatz zu DCM etwas polarer und somit ein besseres Lösungsmittel für die Minutissamide. Für die Reaktion wurde 2 h bei 35°C erwärmt, wobei noch keine Zersetzung der Minutissamide beobachtet werden konnte. Erst ab ca. 40°C konnte eine sichtbare Abnahme der Intensitäten in der LC/MS-Analyse nachgewiesen werden. Die Aufarbeitung erfolgte wie im vorherigen Schritt zunächst durch Eluierung über eine SPE-Kartusche mit C_{18} -Kieselgel. Die Analyse der Rohproduktmischung zeigte, dass neben unreaktiertem Minutissamid C und dem Zwischenprodukt auch zwei weitere Nebenprodukte entstanden waren mit derselben Masse und fast gleichen Retentionszeit wie das Hauptprodukt. Es wurde vermutet, dass es sich um Eliminierungsprodukte handelte, bei denen die Doppelbindung an einer anderen Position entstanden war. Die Produkte wurden anschließend durch präparative und semipräparative HPLC über eine C_{18} -Phase mit $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ isoliert.

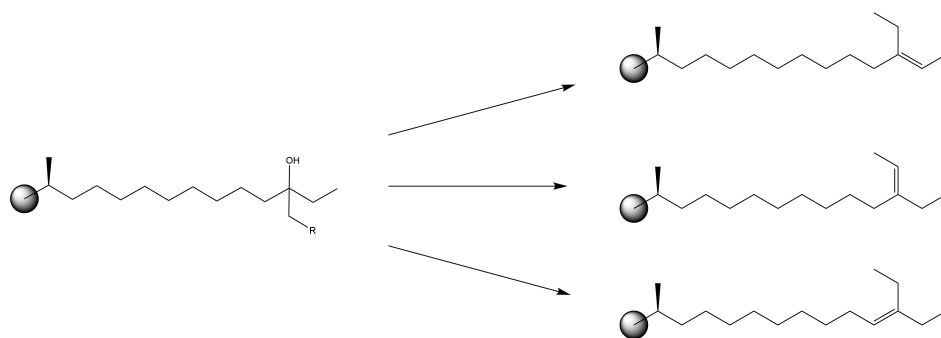


Abbildung 3.18: Mögliche Regioselektivitäten der in Abbildung 3.17 beschriebenen Eliminierungsreaktion

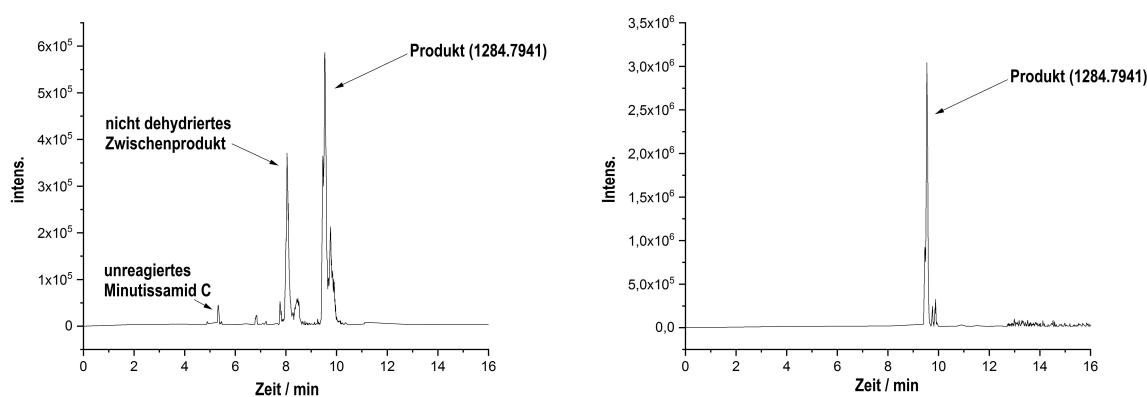


Abbildung 3.19: LC/MS-Analyse im Anschluss an die zweistufige Kettenverlängerung von Minutissamid C. Der Produktpeak weist zwei Schultern mit gleicher Masse auf, die vermutlich von weiteren Eliminierungsprodukten aus der Reaktion stammen. Links ist das BPC vor Aufreinigung und rechts das BPC nach Aufreinigung per HPLC dargestellt

Die Eliminierungsprodukte konnten allerdings, aufgrund zu ähnlicher Retentionszeiten, nicht voneinander getrennt werden. Die Cytotoxizitätsassays unter 3.2.6 wurden daher mit der erhaltenen Mischung durchgeführt. Bei der finalen Aufreinigung konnte weiterhin unreaktiertes Minutissamid C rückgewonnen und das Zwischenprodukt isoliert werden. Die Ausbeuten der Endprodukte lagen bei 1-2 %, was jeweils ca. 1 mg Masse ergab. Für erste Zelltests war diese Menge ausreichend, für weitere Untersuchungen wäre eine Verbesserung der Ausbeute erstrebenswert.

3.2.2 Strukturdiskussion: Minutissamid C Varianten

Bei der Betrachtung des Massenspektrums von Substanz 4a kann neben den einfach und zweifach positiv geladenen Molekülionenpeaks außerdem ein Signal mit der Masse 814.5556 beobachtet werden. Diese Masse kann einem Fragment zugeordnet werden, bei dem die Aminosäuren N-Me-Asn, Thr, Ala und Asn bereits abgespalten wurden. Die verbleibende Sequenz wäre somit Pro-Fettsäure-Val-Dhb-Asn-Dhb. Da die Masse der hinzugefügten Alkylkette bei diesem Fragment noch vorhanden ist, unterstreicht dieser Fund, dass die Reaktion am Fettsäurerest des Lipopeptids stattfand. Abbildung 3.21 zeigt den Strukturvorschlag eines b-Ions, welches zum gefundenen m/z-Wert passen würde. Durch Pilo et al. wurde beschrieben, dass bei Dehydroalanin oftmals auch ein neutrales z-Ion mit einer Dreifachbindung am Rest gebildet wird [146]. Obwohl Dehydrobutyrin strukturell ähnlich zu Dehydroalanin ist, konnte die Masse einem solchen Ion nicht passend zugeordnet werden. Die Fragmentierung verläuft daher mutmaßlich über das gezeigte b-Ion. Bei fast allen analysierten Lipopeptiden war das zweifach positiv geladene Ion intensiver als das einfach positiv geladene.

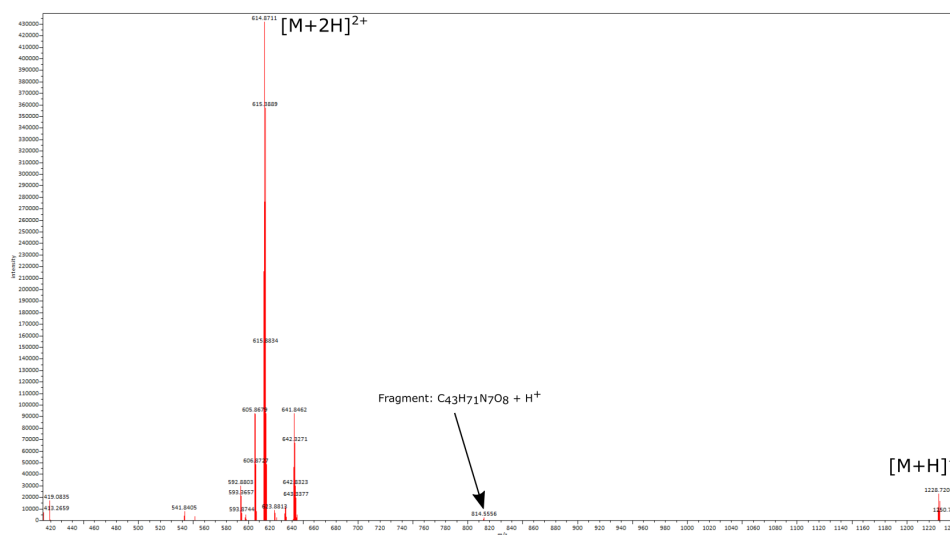


Abbildung 3.20: Massenspektrum von Substanz 4a

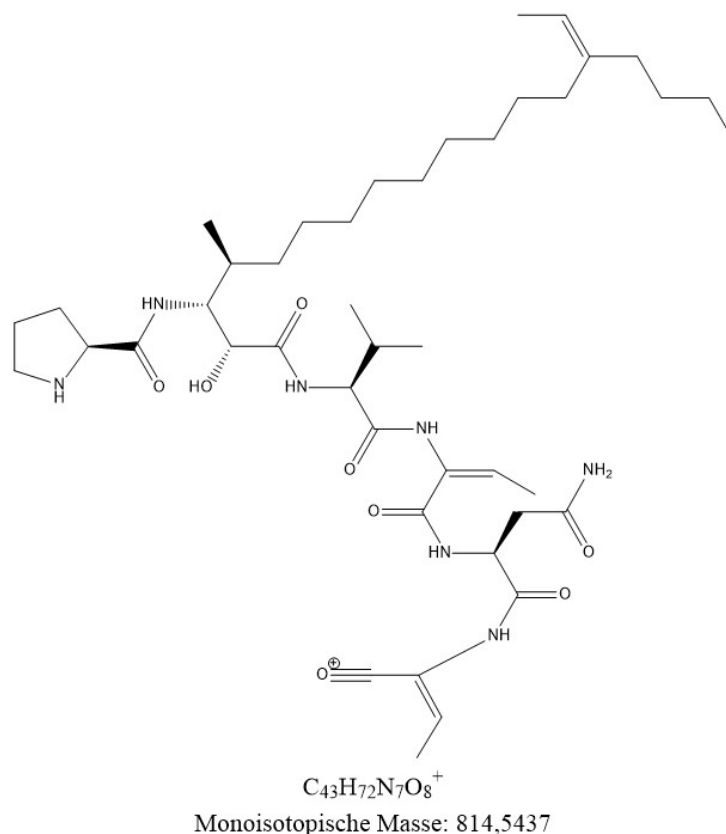


Abbildung 3.21: Mögliche Struktur des Fragments für die gemessene Masse 814.5556 im Massenspektrum von Substanz 4a. Das Molekül besitzt die Struktur eines b-Ions, welches besonders häufig bei der Fragmentierung von Peptiden zu beobachten ist [147]. Die Stabilität des b-Ions kann durch die Nachbarschaft des Dhb-Rests mittels Mesomerie gesteigert werden.

3.2.3 Veresterung von Serin und Threoninresten bei Minutissamid A

Minutissamid A war das am besten verfügbare Lipopeptid aus den Kulturen von *Cylindrospermum alatosporum*. Jedoch ist der Fettsäurerest bei diesem Molekül nur eine gesättigte aliphatische Kette und besitzt daher keinerlei Funktionalitäten, die für chemische Modifikationen genutzt werden können. Somit blieben die verschiedenen Aminosäurereste des Peptides übrig. Speziell die OH-Gruppen des Serin- und Threoninteils können als Nucleophile für mögliche Umsetzungen genutzt werden. Die Steglich-Veresterung ist eine Methode, die besonders gut geeignet für sterisch anspruchsvolle Alkohole ist [148]. Hierbei wird die Carbonsäure durch Reaktion mit DMAP aktiviert und kann anschließend leicht mit Alkoholen umgesetzt werden. Durch diese Vorgehensweise konnten die OH-Gruppen des Threonin und Serin von Minutissamid A mit diversen Fettsäureanhydriden verestert werden. In der LC/MS-Analyse im Anschluss an die Reaktion weist der größte Peak jeweils eine Masse auf, die einer zweifachen Veresterung des Moleküls entsprechen würde.

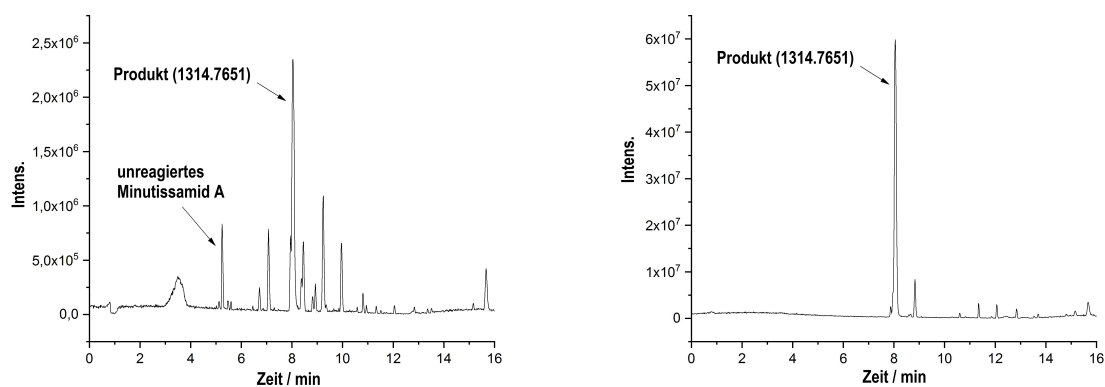


Abbildung 3.22: LC/MS-Analyse der Steglich Veresterung von Minutissamid A mit Hexansäureanhydrid. Die linke Abbildung zeigt das Rohprodukt. Rechts ist das Produkt nach Aufreinigung durch präparative HPLC zu sehen. In beiden Abbildungen ist das BPC dargestellt

Um größere Mengen an Produkten zu erhalten, wurden zunächst 50 mg Minutissamid A für die Reaktion eingesetzt. Die Ausbeute bei diesem Ansatz war allerdings aus unbekanntem Gründen deutlich schlechter als bei der Testreaktion mit 5 mg. Bei einer Menge von 20 mg Minutissamid A konnte eine vergleichbare Ausbeute zur Testreaktion erzielt und außerdem eine ausreichende Menge für weitere Experimente erhalten werden. Die Kettenlänge der eingesetzten Säuren spielte für die erfolgreiche Umsetzung keine Rolle. In jedem Fall konnten zufriedenstellende Ausbeuten erreicht werden.

Tabelle 3.3: Eingesetzte Volumina bei der SPE-Aufarbeitung der Reaktionsmischungen

Ansatzgröße	(v/v) MeCN / H ₂ O			
	0 : 100	20 : 80	90 : 10	100 : 0
5 mg	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
20 mg	20 mL	20 mL	30 mL	30 mL

Tabelle 3.4: Darstellung der Fraktionen, in denen Minutissamid-Derivate je nach Ansatzgröße gefunden wurden. Bei größeren Ansätzen wurden zusätzlich in der 100 % MeCN Fraktion Produkt gefunden. Der einzige Spezialfall besteht bei der Umsetzung von Minutissamid A mit Bernsteinsäureanhydrid bei dem das Produkt in der 20 % MeCN Fraktion nachgewiesen wurde

Ansatzgröße	(v/v) MeCN / H ₂ O			
	0 : 100	20 : 80	90 : 10	100 : 0
5 mg	-	-	Produkt	-
20 mg	-	-	Produkt	Produkt

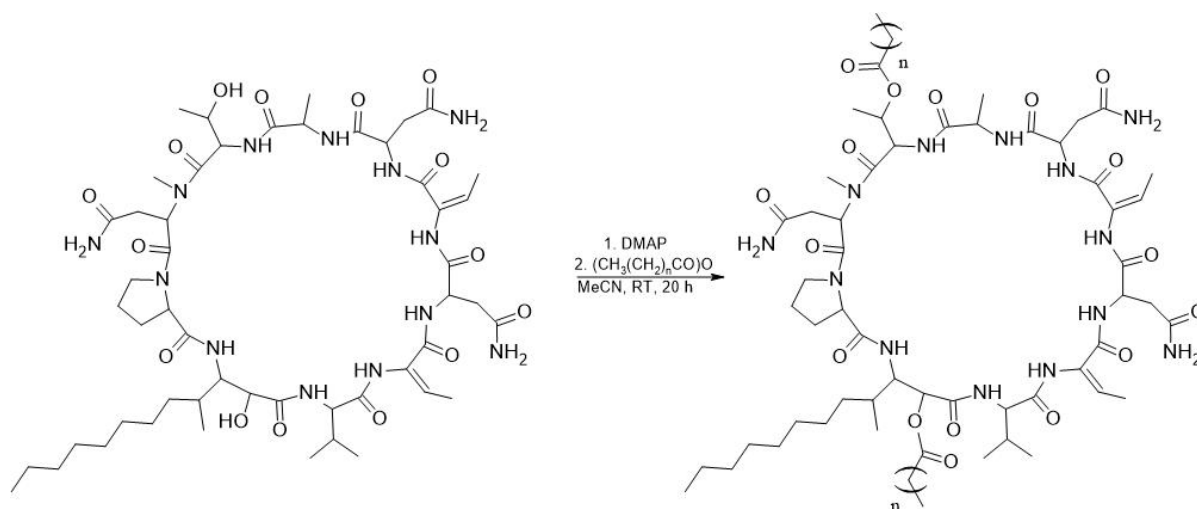


Abbildung 3.23: Stiglich Veresterung von Minutissamid A. Anstatt einer aliphatischen Kette wären ungesättigte Fettsäuren und Reste mit funktionellen Gruppen denkbar

Tabelle 3.5: Erhaltene synthetische Minutissamide durch die Umsetzung von Minutissamid A mit verschiedenen Carbonsäureanhydriden in Gegenwart von DMAP

Substanz	eingesetztes Anhydrid	Ausbeute / mg	Ausbeute / %
5a	Essigsäureanhydrid	2.6	12
5b	Buttersäureanhydrid	10	44
5c	Hexansäureanhydrid	13	55
5d	Oktansäureanhydrid	11	45
5e	Decansäureanhydrid	6	23
5f	Bernsteinsäureanhydrid	6	23
5g	4-Pentensäureanhydrid	10	41

Mithilfe der Veresterung wurde des Weiteren versucht, neue funktionelle Gruppen der Struktur hinzuzufügen. Hierzu wurde beispielsweise Bernsteinsäureanhydrid benutzt, wodurch eine weitere Säuregruppe im Zuge der Umsetzung entstand. Das resultierende synthetische Minutissamid war das einzige Produkt, welches im LC-Programm eine geringere Retentionszeit und somit höhere Polarität als das Ausgangsmaterial besaß. Durch die Verwendung von 4-Pentensäureanhydrid konnten außerdem zwei endständige Olefine hinzugefügt werden.

3.2.4 Strukturdiskussion: Minutissamid A Varianten

Es bleibt zu klären, ob die Acylierung wirklich an den beiden freien OH-Gruppen im Molekül und nicht an anderer Stelle erfolgt ist. Theoretisch betrachtet wäre die OH-Funktion als einzige nucleophil genug für die Reaktion. Die Addition von genau zwei Carboxyl-Einheiten spricht für die vorgeschlagene Umsetzung. Eine experimentelle Bestätigung kann zudem durch die Analyse der Fragmentierung im Massenspektrometer gegeben werden. Peptide spalten bei der Ionisierung in der Regel zunächst an den Peptidbindungen. Es können somit Fragmente erhalten werden, bei denen einzelne Aminosäuren der Sequenz fehlen. Das erste Signal nach dem Molekülionenpeak von Substanz 5c liegt bei 1070.6190. Diese Masse würde für einen Verlust der Estergruppe am Threonin und einer Abspaltung von N-Methyl-Asparagin sprechen. Als Nächstes werden die Aminosäuren Dehydrobutyrin, Alanin und Asparagin abgespalten. Das Signal bei 802.4914 im Massenspektrum hätte eine für dieses Fragment passende Masse. Es folgt die Abspaltung einer weiteren Einheit

Dehydrobutyrin und Asparagin, was vermutlich das Signal bei 605.4220 verursacht. Schlussendlich werden die Aminosäuren Valin und eine weitere Einheit Dehydrobutyrin abgespalten. Im letzten Fragment bleiben somit noch Prolin und die Fettsäure mit der Estergruppe am α -C-Atom. Das Signal des letzten Fragments ($m/z = 423.3273$) hat allerdings eine deutlich niedrigere Intensität als die vorherigen. Betrachtet man die einzelnen Schritte, fällt auf, dass besonders bei Dhb-Einheiten Fragmentierungen im Massenspektrum sichtbar sind. Dies muss folglich mit einer erhöhten Stabilität dieser Ionen zusammenhängen. Die Ringöffnung geschieht, wie von Kang et al. vorgeschlagen, zwischen Prolin und N-Methyl-Asparagin [99]. Eine Zusammenfassung der Fragmente, Massen und Massenabweichungen von Substanz 5c ist in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Tabelle 3.6: Beobachtete Fragmente im Massenspektrum von Substanz 5c mit zugehöriger Summenformel, dem m/z -Wert und die Messabweichung vom theoretisch berechneten m/z -Wert. FA steht hierbei für O-hexyl-3-amino-2-hydroxy-4-methyl-dodecansäure

Sequenz	Summenformel	m/z	Abweichung
Pro-FA-Val-Dhb-Asn-Dhb-Asn-Ala-(O-Hexyl-Thr)-(N-Me-Asn)	$C_{63}H_{103}N_{13}O_{17}+H^+$	1314.7570	-7.45
Pro-FA-Val-Dhb-Asn-Dhb-Asn-Ala-Dhb	$C_{52}H_{83}N_{11}O_{13}+H^+$	1070.6190	-5.14 ppm
Pro-FA-Val-Dhb-Asn-Dhb	$C_{41}H_{67}N_7O_9+H^+$	802.4914	-19.81 ppm
Pro-FA-Val-Dhb	$C_{33}H_{56}N_4O_6+H^+$	605.4220	8.75 ppm
Pro-FA	$C_{24}H_{42}N_2O_4+H^+$	423.3273	13.23 ppm

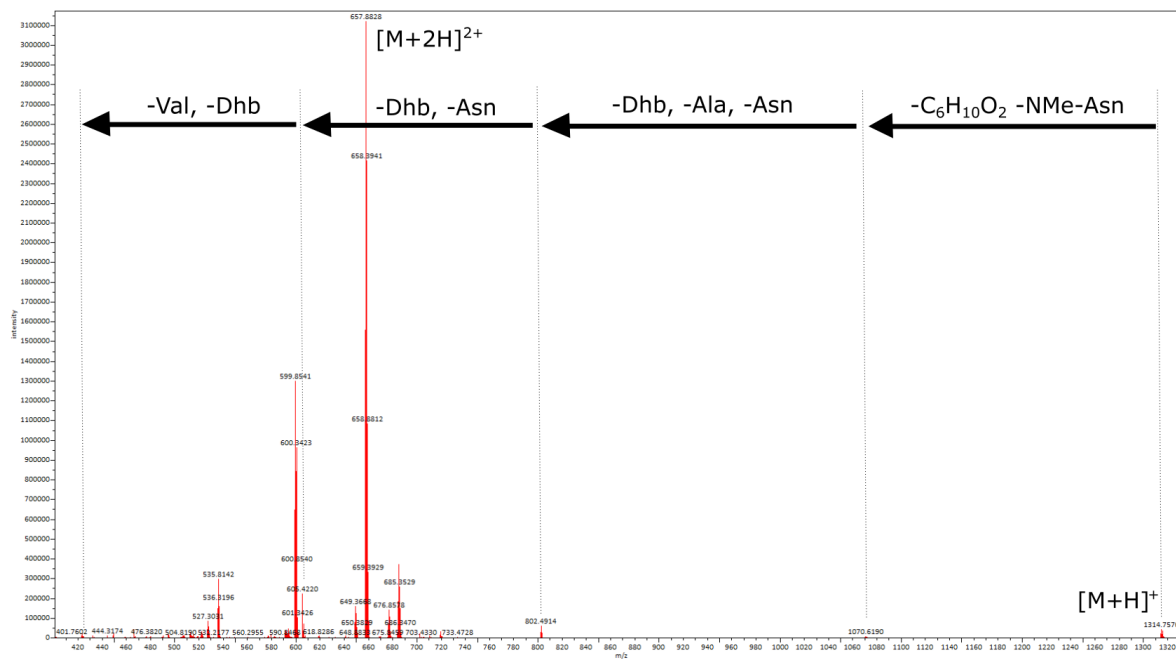


Abbildung 3.24: Massenspektrum von Substanz 5c. Das intensivste Signal bei 657.8828 ist das doppelt geladene Ion des untersuchten Moleküls. Oberhalb der eingezeichneten Pfeile sind die jeweiligen Verluste im Zuge der Fragmentierung genannt

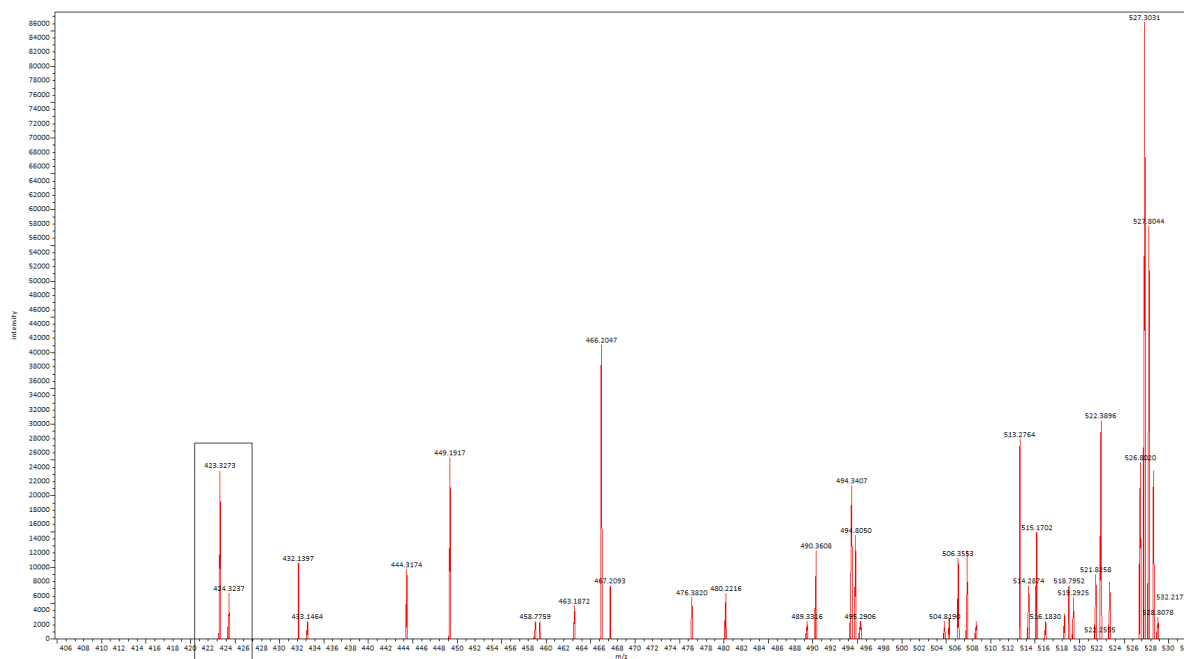


Abbildung 3.25: Vergrößerung des Bereichs zwischen 400 und 500 m/z des Massenspektrums von Substanz 5c. Der markierte Peak entspricht vermutlich dem Pro-FA-Fragment von Substanz 5c. Es ist somit das letzte im Massenspektrum beobachtete Fragment

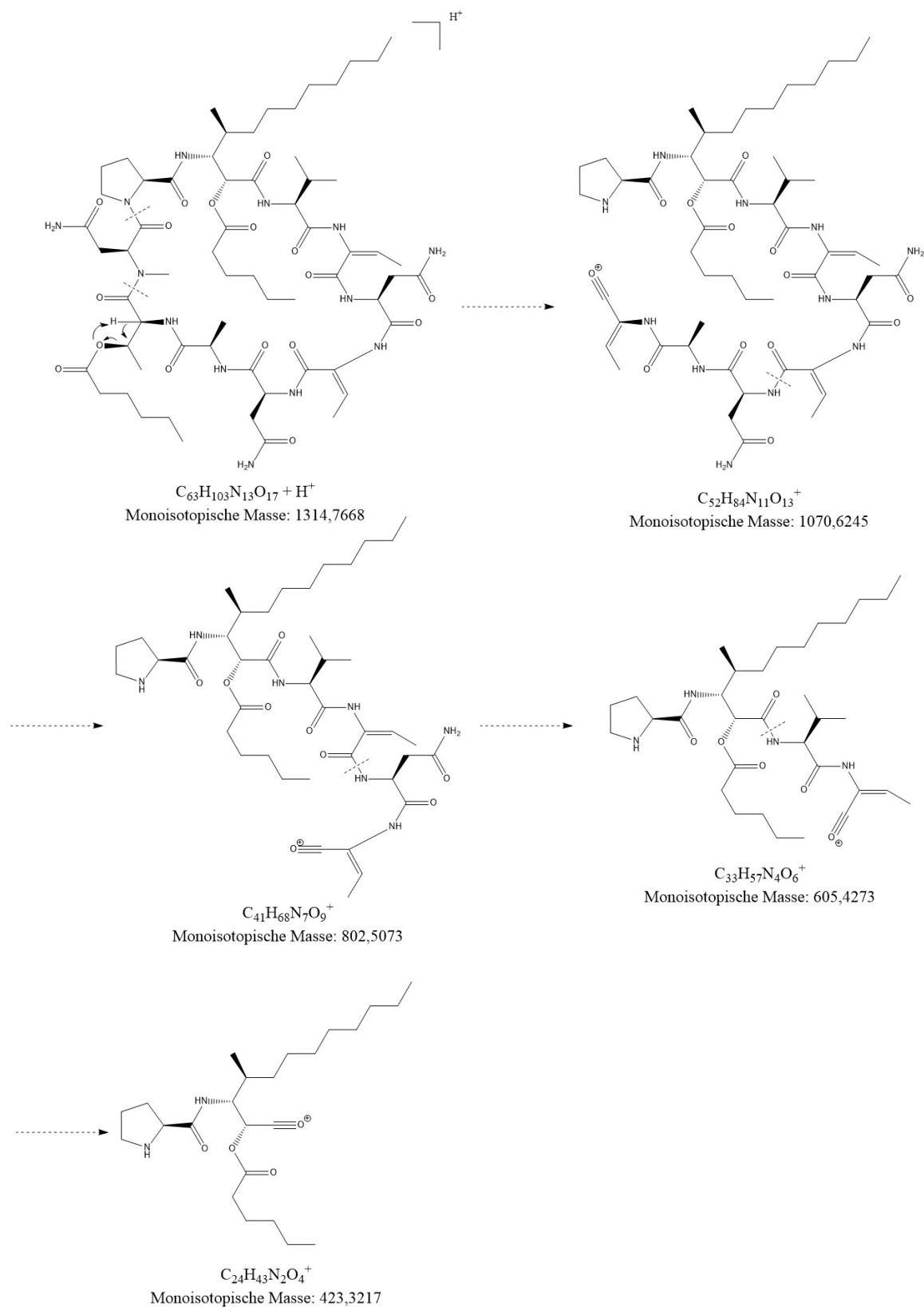


Abbildung 3.26: Mögliche Fragmentierung von Minutissamid A Derivat 5c. Es entstehen hierbei b-Ionen, welche häufig bei der Fragmentierung von Peptiden beobachtet werden. Durch die Nachbarschaft zur Doppelbindung des Dhb-Rests können die b-Ionen mesomeriestabilisiert werden. Dies könnte ein Grund dafür sein, warum besonders diese Fragmente im Massenspektrum gefunden werden

Die Masse von Substanz 5g konnte per LC/MS bestätigt werden. Außerdem wurden bei der NMR-Analyse im ^{13}C -Spektrum von Substanz 5g Signale bei 137 ppm und 116 ppm beobachtet, die wahrscheinlich von den neuen Olefin-Kohlenstoffatomen stammen. In Abbildung 3.28 sind die ^{13}C -Spektren von Substanz 5g und 5c im Bereich zwischen 190 ppm und 90 ppm dargestellt. Es ist klar erkennbar, dass die Signale bei 137 ppm und 116 ppm bei Substanz 5c nicht vorhanden sind, da bei Substanz 5c nur gesättigte Fettsäurereste hinzugefügt wurden.

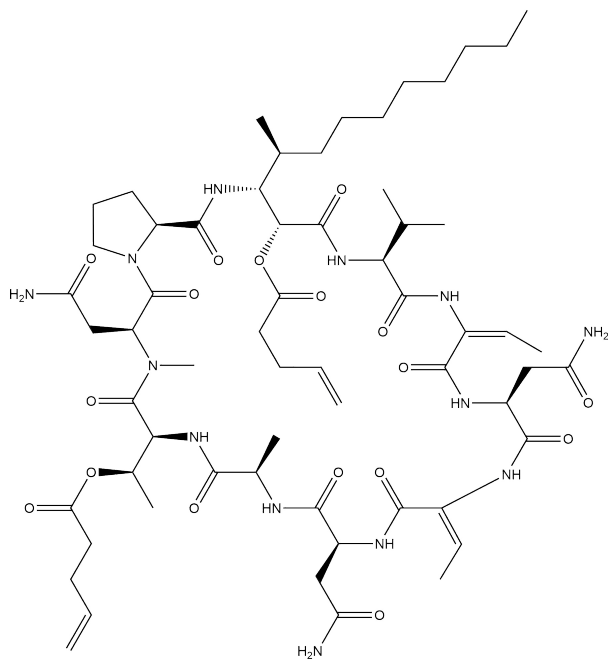


Abbildung 3.27: Struktur von Substanz 5g

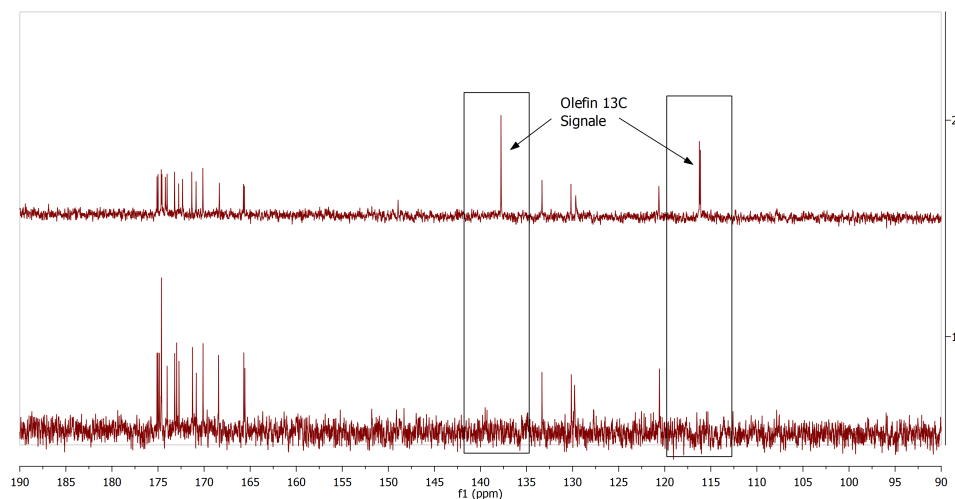


Abbildung 3.28: Vergleich der ^{13}C -Spektren von Substanz 5g (oben) und Substanz 5c (unten). Die vollständigen ^{13}C -Spektren sind unter Kapitel 7 im Anhang aufgeführt

3.2.5 Olefinmetathese von Minutissamid A

Eines der Projektziele war es, mithilfe einer Olefinmetathese aliphatische Ketten bei den Minutissamiden einzuführen. Minutissamid A und C besitzen am Peptidring jeweils zwei C=C Doppelbindungen bei den Dehydrothreoninresten. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit wurden Versuche zur Metathese bei Minutissamid A unternommen. Bei der Reaktion von Minutissamid A mit Hex-3-en in Anwesenheit des Grubbs-II Katalysators konnten allerdings keinerlei Produkte nachgewiesen werden.

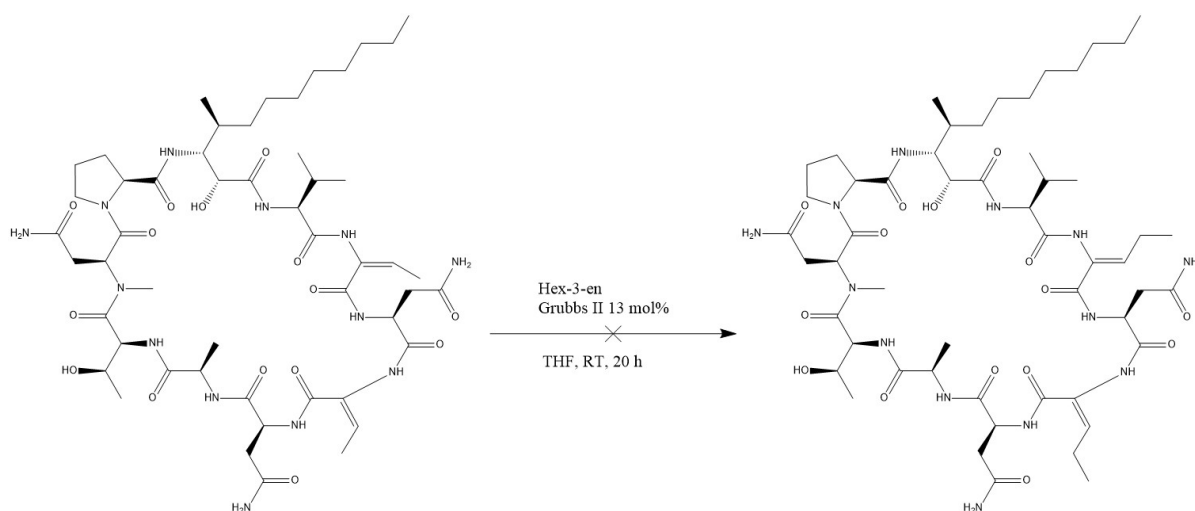


Abbildung 3.29: Versuch zur Metathese von Minutissamid A und Hex-3-en bei den Dehydrothreoninresten

Weitere Versuche zur Metathese wurden mit Substanz 5g aus dem vorherigen Abschnitt durchgeführt. Bei dieser wurden durch 4-Pentensäureanhydrid zwei weitere Doppelbindungen der Struktur hinzugefügt. Die Reaktion schlug allerdings zunächst fehl. Durch den Wechsel des Katalysators von Grubbs II auf Grubbs-Hoveyda II konnten schließlich Produkte nachgewiesen werden. Neben dem erwarteten Metathese-Produkt, konnte zusätzlich ein Peak mit einem dreifachgeladenen Ion mit einem m/z -Wert von 836.7891 detektiert werden. Dieses Ergebnis würde für das Entstehen eines doppelt verknüpften Dimers sprechen. Für das Fehlschlagen der Metathesereaktion an den Dehydrothreoninresten können verschiedene Gründe vermutet werden. Durch die Nähe zum Peptidring kann es möglicherweise zu einer Hinderung des sterisch anspruchsvollen Katalysators kommen. Auch eine Deaktivierung durch Koordination der benachbarten NH- und C=O-Gruppen an den Katalysator wäre denkbar. Unter Umständen wäre es sinnvoll, diese Gruppen vor der Reaktion zu schützen, was allerdings eine weitere sterische Hinderung zur Folge haben könnte. Außerdem kann es zu einer verminderten Reaktivität der Doppelbindung aufgrund der Konjugation mit den benachbarten NH- und C=O-Gruppen kommen. Die Ergebnisse dieses Abschnitts zeigen, dass für das Gelingen der Reaktion eine vom Peptidring isolierte C=C-Doppelbindung

notwendig ist. Abbildung 3.30 zeigt eine mögliche Struktur des Dimerisationsprodukts. In diesem Fall hätten die 4-Pentenreste von 5g eine zweifache Selbstmetathese durchgeführt. Der m/z Wert eines dreifach positiv geladenen Ions dieses Moleküls hat rechnerisch eine monoisotopische Masse von 836.7849. Die Abweichung zum Messwert von 836.7891 liegt somit bei 5.02 ppm.

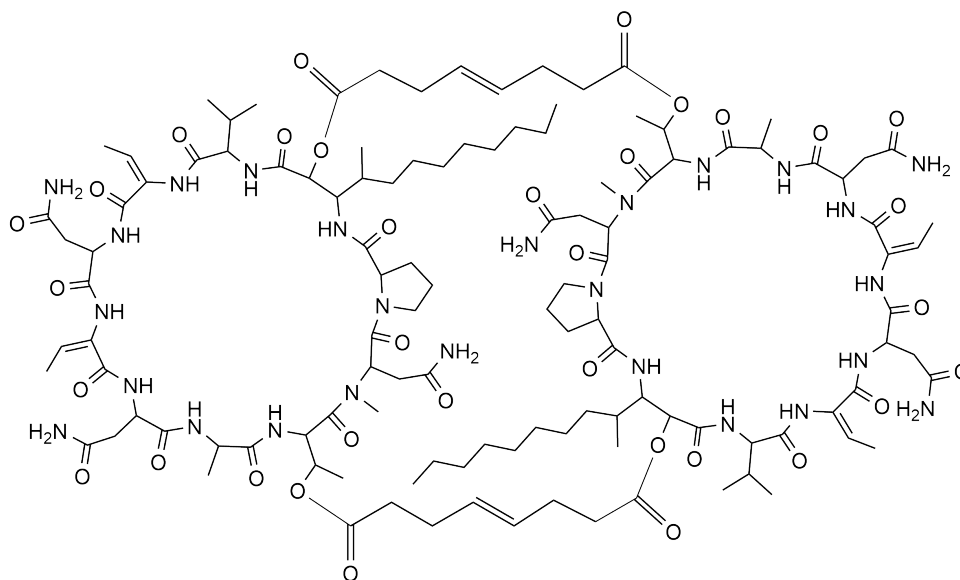


Abbildung 3.30: Mögliche Struktur des Dimerisationsprodukts aus der Selbstmetathese von Minutissamid A Derivat 5g

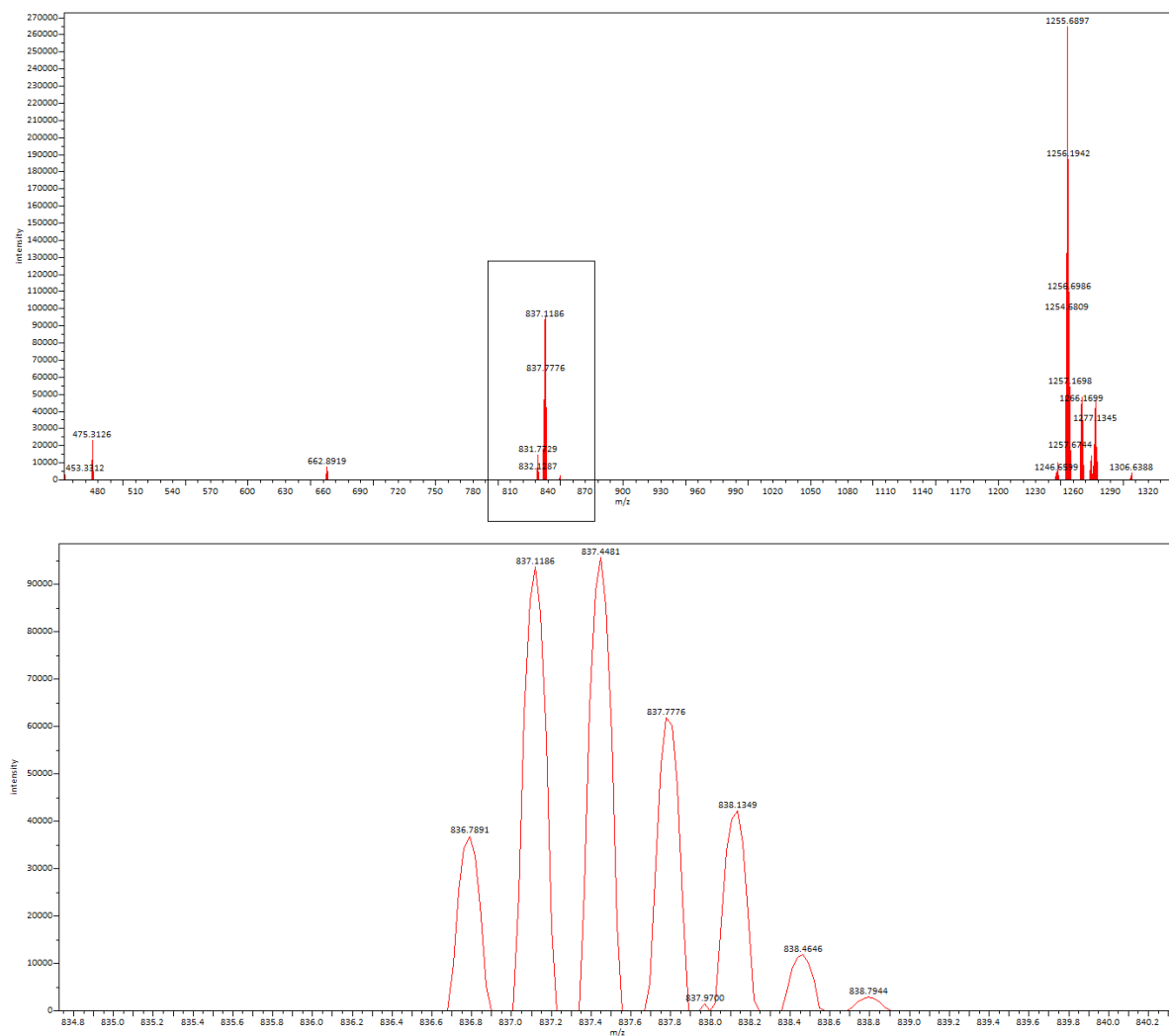


Abbildung 3.31: Oben: Massenspektrum des Methylierungsprodukts von Minutissamid A Derivat 5g. Unten: Vergrößerung des markierten Bereichs. Der erste Peak des Isotopenmusters mit der Masse 836.7891 wurde als dreifach positiv geladenes Ion erkannt

3.2.6 Cytotoxizität und antifungale Aktivitäten der semisynthetischen Minutissamid Varianten

Die synthetisierten Minutissamid Derivate wurden dem „Laboratory of Algal Biotechnology“ in Třeboň zur Verfügung gestellt. Die Bioaktivitätstests zur Cyto- und Fungotoxizität wurden von Jan Hájek und Kumar Saurav durchgeführt. Die Ergebnisse wurden anschließend in einer gemeinsamen Publikation veröffentlicht [104]. Getestet wurden die Minutissamid C Varianten 4a-b und die Minutissamid A Varianten 5a-c und 5e. Die anderen Minutissamid A Varianten wurden erst zu einem späteren Zeitpunkt hergestellt und konnten nicht mehr getestet werden. Cytotoxizitäten wurden auf Gebärmutterhalskrebszellen (HeLa) bestimmt, welche in 96er Well-Platten ausgesät

wurden. 48 h nach Zugabe der Lipopeptid-Lösungen mit der jeweiligen Konzentration wurde die Zellviabilität per MTT-Assay gemessen. Die Ergebnisse können Abbildung 3.32 entnommen werden. Bei der Vorstellung der Minutissamide/Puwainaphycine unter Abschnitt 2.2.5 wurde bereits ausgeführt, dass eine längere Kette im Fall von Puwainaphycin F und Minutissamid A eine Erhöhung der Cytotoxizität zur Folge hat. Die synthetischen Varianten 4a und 4b wurden speziell hergestellt, um diesen Effekt weiter zu untersuchen. Als Referenz wurde Puwainaphycin F benutzt, da bei den synthetischen Minutissamid C Varianten im Gegensatz zum natürlichen Minutissamid C kein Heterotatom am Fettsäurerest vorhanden ist. Im Bereich zwischen $0.3\ \mu\text{M}$ – $2.5\ \mu\text{M}$ konnte eine niedrigere Zellviabilität als bei den Referenzsubstanzen festgestellt werden. Im Konzentrationsbereich über $2.5\ \mu\text{M}$ war die Zellviabilität wiederum höher. Eine vollständige Inhibition des Zellwachstums wurde bei Substanz 4b bei $20\ \mu\text{M}$ erreicht, während Substanz 4a ein Maximum von 50 % auch bei höheren Konzentrationen nicht überschritt. Weiterhin ist interessant, dass die Cytotoxizitäten bei den veresterten Minutissamid A Varianten 5a-c und 5e fast komplett ausgelöscht wurde. Selbst bei höheren Konzentrationen wurde keine niedrigere Zellviabilität als 80 % gemessen. Ein Erklärungsversuch für diese Beobachtung wäre, dass die freien OH-Gruppen für die cytotoxische Wirkung notwendig sind. Eine der beiden OH-Gruppen befindet sich in direkter Nachbarschaft zum Fettsäurerest und könnte somit bei der Anlagerung an die Zellmembran eine Rolle spielen. Möglicherweise stehen die zusätzlichen Fettsäurereste auch einer Agglomeration der Lipopeptide im Weg, wobei man hierzu eventuell einen Einfluss der substituierten Kettenlänge beobachten müsste.

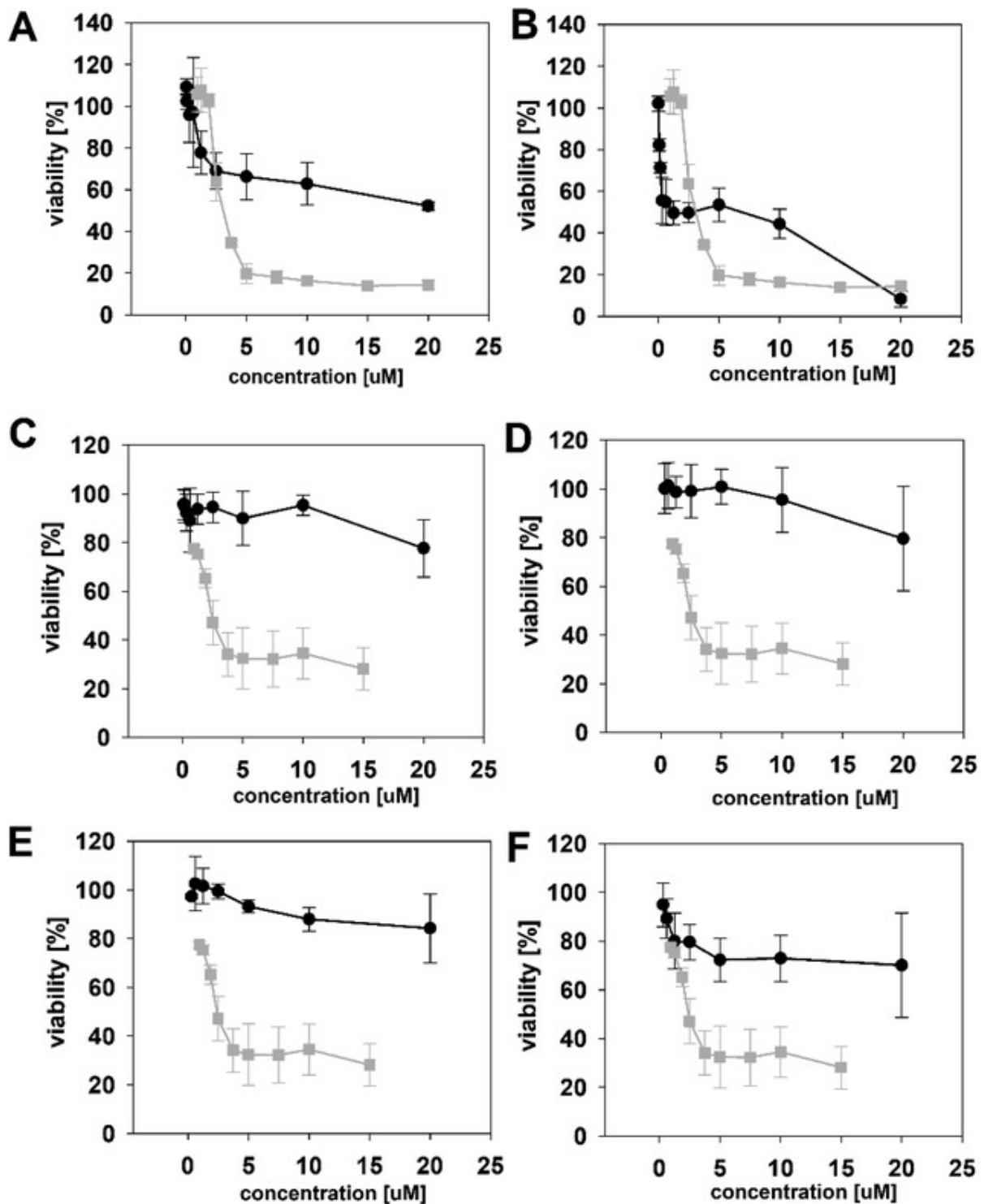


Abbildung 3.32: Dosis-Wirkungs-Kurven der einzelnen semisynthetischen Minutissamid Varianten auf HeLa-Zellen. Kurven mit Kreissymbol stellen die synthetischen Varianten dar. Kurven mit Quadratsymbol stammen von den Kontrollsubstanzen, Minutissamid A (C-F) bzw. Puwainaphycin F (A-B). Getestet wurden Substanz 4a (A), 4b (B), und 5a (C), 5b (D), 5c (E), and 5e (F)

Des Weiteren wurden die synthetischen Minutissamide auf antifungale Aktivitäten gegen die Schimmelpilze *Candida friedrichii*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma harzianum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Monographella cucumerina*, *Chaetomium globosum* und *Alternaria alternata* untersucht. Zur Bestimmung der MIC-Werte wurde die „Broth two-fold microdilution“-Methode angewandt. Hierzu wurde eine verdünnte Lösung der jeweiligen Schimmelpilzkultur zu den Substanzen gegeben und für 48 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurde das Fungizid Fluconazol verwendet. Eine Zusammenfassung der Messergebnisse wurde in Tabelle 3.7 dargestellt. Eine leichte Verbesserung der antifungalen Eigenschaften von Minutissamid C Derivat 4a konnte im Vergleich zu Puwainaphycin F erreicht werden. Besonders auffällig war allerdings, dass die veresterten Minutissamid A Varianten 5a-c und 5d bei einigen Schimmelpilzen eine viel stärker antifungale Aktivität haben als das natürliche Minutissamid A. Vor allem bei *A. alternata* war diese Tendenz bemerkbar.

Tabelle 3.7: Übersicht über die gemessenen MIC-Werte synthetischer und natürlicher Minutissamide und Puwainaphycine. NA bedeutet, dass keine Aktivität bei der höchsten Konzentration (75 μM) zu beobachten war

Schimmelpilz/Substanz	MIC / μM							
	PUW F	4a	4b	MIN A	5a	5b	5c	5e
<i>A. fumigatus</i>	2.34	0.5	3.8	37.5	4.7	9.4	75	37.5
<i>F. oxysporum</i>	75	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>T. harzianum</i>	37.5	15	NA	NA	75	NA	NA	NA
<i>A. alternata</i>	0.58	0.5	0.1	75	0.6	0.2	0.2	0.2
<i>B. sorokiniana</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>M. cucumerina</i>	6.25	7.5	30	NA	75	75	37.5	37.5
<i>C. globosum</i>	12.5	60	30	NA	75	75	75	75
<i>C. friedrichii</i>	75	7.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA

3.2.7 Teildiskussion Minutissamide

Zur chemischen Modifikation der Minutissamide wurden mehrere Herangehensweisen untersucht. Wie bereits ausgeführt, spielt die Kettenlänge des Fettsäurerests eine entscheidende Rolle bei der Bioaktivität. Hierzu wurde Minutissamid C ausgewählt, da es eine Ketogruppe am Fettsäurerest besitzt und in ausreichender Menge erhalten wurde. Zur Verlängerung der Kette wurde zunächst eine Wittig-Reaktion getestet, was allerdings nicht zum Erfolg führte. In der LC/MS-Analyse

des Reaktionsgemischs wurde eine Masse gefunden, die für eine Nebenreaktion des eingesetzten n-BuLi mit der Ketogruppe am Fettsäurerest von Minutissamid C sprechen würde. Eine mögliche Erklärung für die nicht erfolgreiche Wittig-Reaktion könnte somit sein, dass das n-BuLi schneller mit Minutissamid C reagiert anstatt mit dem jeweiligen Phosphonium-Salz. Wenn sich dadurch keine Phosphonium-Ylide bilden können, wäre auch eine Wittig-Reaktion nicht mehr möglich. Für ein Gelingen der Reaktion wäre es denkbar, zunächst das Ylid in der Reaktionsmischung entstehen zu lassen und erst dann das Minutissamid C zuzugeben. Eine derartige Vorgehensweise wurde z.B. von Schlosser et al. mit sogenannten „Instant-Yliden“ beschrieben [149].

Durch eine Grignard-Reaktion mit Alkylmagnesiumhalogeniden und anschließender Wassereliminierung mit p-TsOH konnte eine Verlängerung der Kette um C4 und C8 realisiert werden. Die entstandenen Produkte konnten in der LC/MS-Analyse durch Vergleich mit der vorhergesagten Masse bestätigt werden. Allerdings waren im Chromatogramm neben dem Signal des Produkts noch zwei kleinere Signale mit derselben Masse erkennbar. Diese Signale stammen vermutlich von weiteren Eliminierungsprodukten, die jedoch, aufgrund zu ähnlicher Retentionszeiten, in der präparativen HPLC nicht aufgetrennt werden konnten.

Bei der Derivatisierung von Minutissamid A konnten durch eine Steglich-Veresterung mit DMAP und Carbonsäureanhydriden 7 neue Substanzen (5a-g) erhalten werden. Die Strukturen der Produkte konnten jeweils durch LC/MS-Analyse bestätigt werden, indem die Massen des Moleküls und einzelner Fragmente gefunden wurden. Die Fragmentierung sprach zudem für eine Substitution an den gezeigten Stellen. Bei Substanz 5g wurde erneut eine Metathese-Reaktion durchgeführt, nachdem diese bei Minutissamid A zunächst fehlschlug. Durch LC/MS-Analyse des Produktgemischs konnte ein dreifachgeladenes Ion nachgewiesen werden, dessen Masse zu dem eines 5g-Dimers passen könnte. Es wäre somit möglich, dass es zu einer Dimerisierung des Minutissamid A Derivats gekommen ist. Eine Strukturformel eines solchen Dimers wurde bereits unter Abschnitt 3.2.5 gezeigt. Bei der dreidimensionalen Anordnung des Moleküls besteht die Möglichkeit, dass sich die aliphatischen Reste zusammenlagern. Abbildung 3.33 zeigt eine Darstellung dieses Effekts. Eine Faltung des Peptidrings wurde hierbei nicht berücksichtigt. Cyclische Lipopeptide mit mehreren Peptidring-Einheiten kommen in der Natur nicht vor. Da sich die dreidimensionale Struktur zwischen dem hergestellten Minutissamid A Dimer und den natürlichen Minutissamiden vermutlich unterscheidet, wäre ein Vergleich der Bioaktivitäten sicherlich interessant.

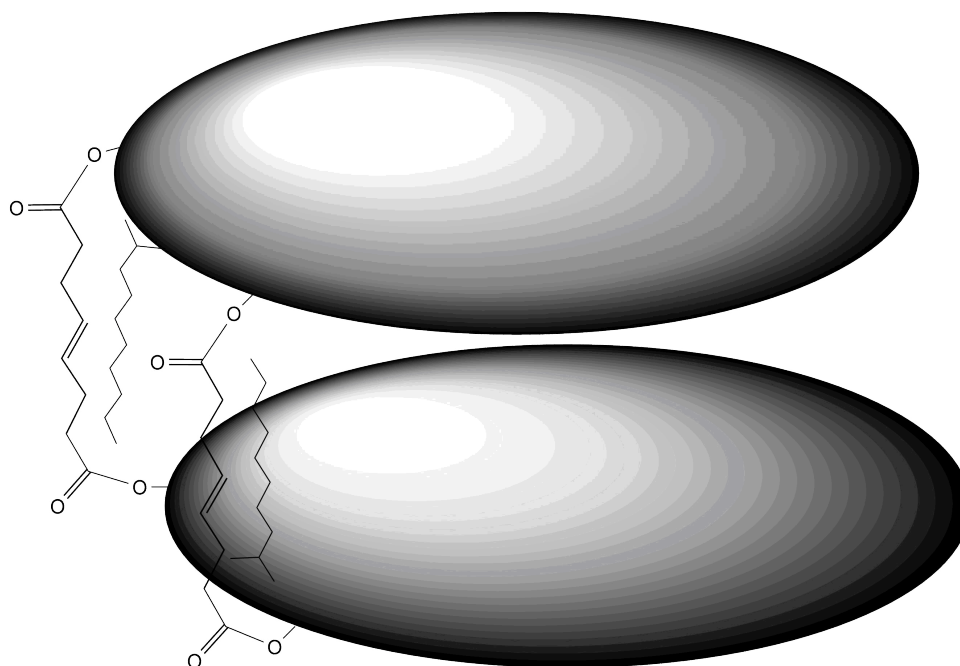


Abbildung 3.33: Mögliche dreidimensionale Anordnung der Fettsäurereste und der Peptidringe des Minutissamid A Dimers. Die Peptidringe wurden hierbei als graue Ellipsen eingezeichnet. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen wäre eine Zusammenlagerung der Fettsäurereste denkbar

Die anderen Minutissamid A und C Varianten wurden von einer kooperierenden Arbeitsgruppe hinsichtlich ihrer Cyto- und Mykotoxizitäten getestet. Hierbei ging es vor allem darum, den Einfluss der Lipidkettenlänge und der OH-Gruppen am Peptidring zu bestimmen. Bei den Minutissamid C Derivaten, bei denen die Kette um C4 und C8 erhöht wurde, konnten höhere Cytotoxizitäten im Bereich zwischen $0.3\ \mu\text{M}$ – $2.5\ \mu\text{M}$ festgestellt werden. Im höheren Konzentrationsbereich war die Kontrollsubstanz Puwainaphycin F wiederum toxischer. Es konnte somit bestätigt werden, dass die Kettenlänge des Lipidrests einen Einfluss auf die Cytotoxizität hat. Ein proportionaler Zusammenhang zwischen Kettenlänge und Cytotoxizität konnte allerdings nicht beobachtet werden. Eine Erklärung hierfür wäre vielleicht, dass es eine optimale Kettenlänge für die Insertion eines Fettsäurerests in die Zellmembran gibt. Durch die Veresterung bei den Minutissamid A Varianten 5a-f kam es hingegen zu einer Auslöschung der Cytotoxizität und gleichzeitig zu einem Anstieg der antifungalen Aktivität. Da sich die MIC-Werte nicht mit steigender Kettenlänge verändern, kann vermutet werden, dass die erhöhte Aktivität hauptsächlich auf die Maskierung der OH-Gruppen zurückzuführen ist. Bei anderen starken antifungalen Lipopeptiden, z.B. Fengycin, sind ebenfalls keine freien OH-Gruppen in der Nähe des Fettsäurerests vorhanden.

3.3 Herstellung von Qingdainon- und Thioindirubinderivaten

3.3.1 Synthese von Dihydroxyqingdainon

In einer früheren Arbeit wurde bereits eine Totalsynthese für Qingdainonderivate erarbeitet [150]. Die einzelnen dafür notwendigen Schritte wurden in Abbildung 3.34 zusammengefasst. Um die biologische Wirksamkeit von Qingdainon zu erhöhen, bestand hauptsächlich Interesse darin, die Löslichkeit in Wasser zu verbessern. Es wurde beschrieben, dass aus der Spaltung von Ethern in Polyphosphorsäure bei höheren Temperaturen Alkohole entstehen [151]. Ether sind vergleichsweise stabile Schutzgruppen, die allen vorhergehenden Reaktionsbedingungen standhalten sollten. Aus diesem Grund wurde eine Totalsynthese mit 5-Methoxyisatin als Ausgangsmaterial durchgeführt, wobei im letzten Schritt der Methylether in eine Hydroxygruppe gespalten werden sollte. Die Herstellung von 8-Methoxytryptanthrin nach Bergman et. al. erfolgte problemlos mit einer zu erwartenden moderaten Ausbeute von 56 % [152]. Die Kondensation mit Rhodanin konnte, wie bei den anderen Derivaten, mit quantitativer Ausbeute durchgeführt werden. Bei der Spaltung des Rhodaninaddukts wurden 130 mg des Rohprodukts erhalten, was im Vergleich zu anderen Derivaten wenig war. Eine Säulenchromatographie ist bei dieser Art von Substanz nur erschwert durchführbar, weil durch die schlechte Löslichkeit ein Tailing über das gesamte LC-Programm stattfindet. Daher wurde das Rohprodukt direkt im nächsten Schritt eingesetzt. Es wurde eine Schmelzreaktion in frisch destilliertem p-Anisidin durchgeführt, um dem Molekül noch eine weitere Methoxygruppe hinzuzufügen. Nach Beendigung der Reaktion wurde überschüssiges p-Anisidin durch Sublimation wieder entfernt. Das abgekühlte Produkt wurde in 10 %iger NaOH gelöst und für eine Stunde gerührt. Durch dieses Vorgehen wurden alle Verunreinigungen aus dem vorherigen Schritt, die in basischer Umgebung löslich sind, entfernt. Ein erneutes Entfernen von p-Anisidin durch Sublimation am Hochvakuum bei einer Temperatur von 135 °C ergab ein analysenreines Produkt. Die Struktur und das weitere Vorhandensein der Methoxygruppe konnten per NMR und Massenspektrometrie überprüft werden. Im letzten Schritt der Qingdainonsynthese wurde mit Polyphosphorsäure (PPA) cyclisiert.

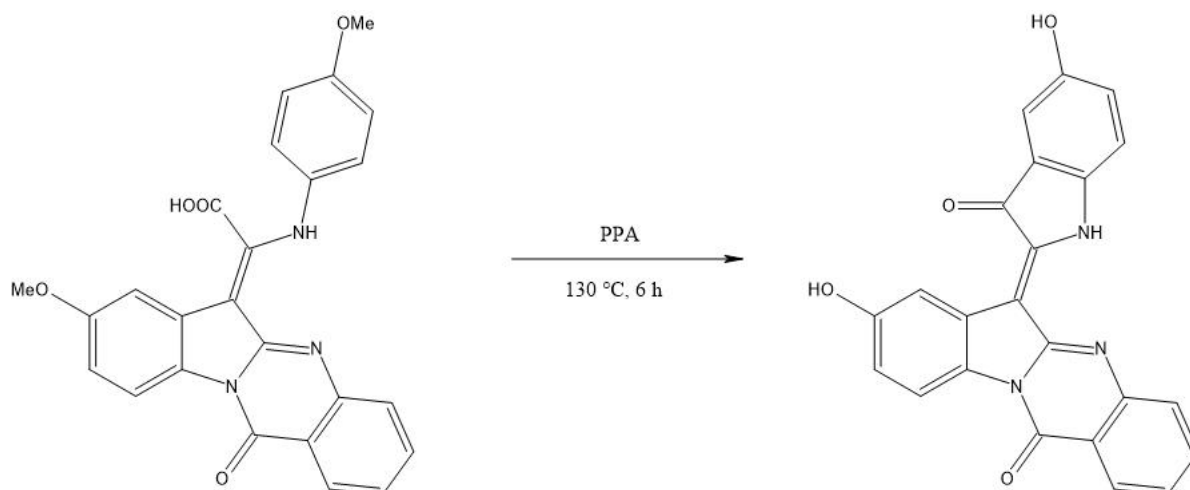


Abbildung 3.35: Umsetzung des Dihydroxyqingdainon Precursors in PPA. Im Sinne einer one-pot Reaktion finden hierbei zwei Reaktionen gleichzeitig statt. Zum einen entsteht durch Cyclisierung die Qingdainon-Grundstruktur, zum anderen werden durch die Polyphosphorsäure bei 130 °C beide Methoxygruppen zu OH-Gruppen gespalten

Für die Aufarbeitung wird die heiße Reaktionsmischung in Eis aufgefangen und für eine Stunde gerührt, sodass die komplette Polyphosphorsäure in eine Phosphorsäurelösung übergeht. Anschließend kann für gewöhnlich das wasserunlösliche Rohprodukt durch Filtration gewonnen und weiter aufgereinigt werden. In diesem Fall ergab sich allerdings eine tiefblaue Lösung und kein Niederschlag. Ein Entstehen des demethylierten Produkts konnte durch diese erste Beobachtung bereits vermutet werden. Um das Produkt zu isolieren, wurde das Ionenaustauscherharz Amberlite XAD1180N hinzugefügt und für einen Tag gerührt. Die dabei entstandene Suspension aus farbloser Flüssigkeit und blau gefärbtem Ionenaustauscherharz wurde durch Filtration separiert und mit wenig Wasser nachgewaschen. Das Rohprodukt wurde durch Eluierung mit MeOH gewonnen. Zur weiteren Aufreinigung wurde eine Flash-Chromatography über eine C₁₈-Säule (Götec, 10g) mit MeOH/H₂O durchgeführt. Das erhaltene Produkt war analysenrein und bestätigte das Entstehen der OH-Gruppen aus den Methoxygruppen durch NMR und MS. Die Cyclisierung mit PPA konnte somit zu einer effizienten one-pot Prozedur umgewandelt werden, die das gewünschte Produkt ohne weitere Umwege liefert. Durch das Anfügen der OH-Gruppen konnte ein weiteres Qingdainonderivat synthetisiert werden, welches im Gegensatz zur natürlich vorkommenden Substanz in Wasser löslich ist.

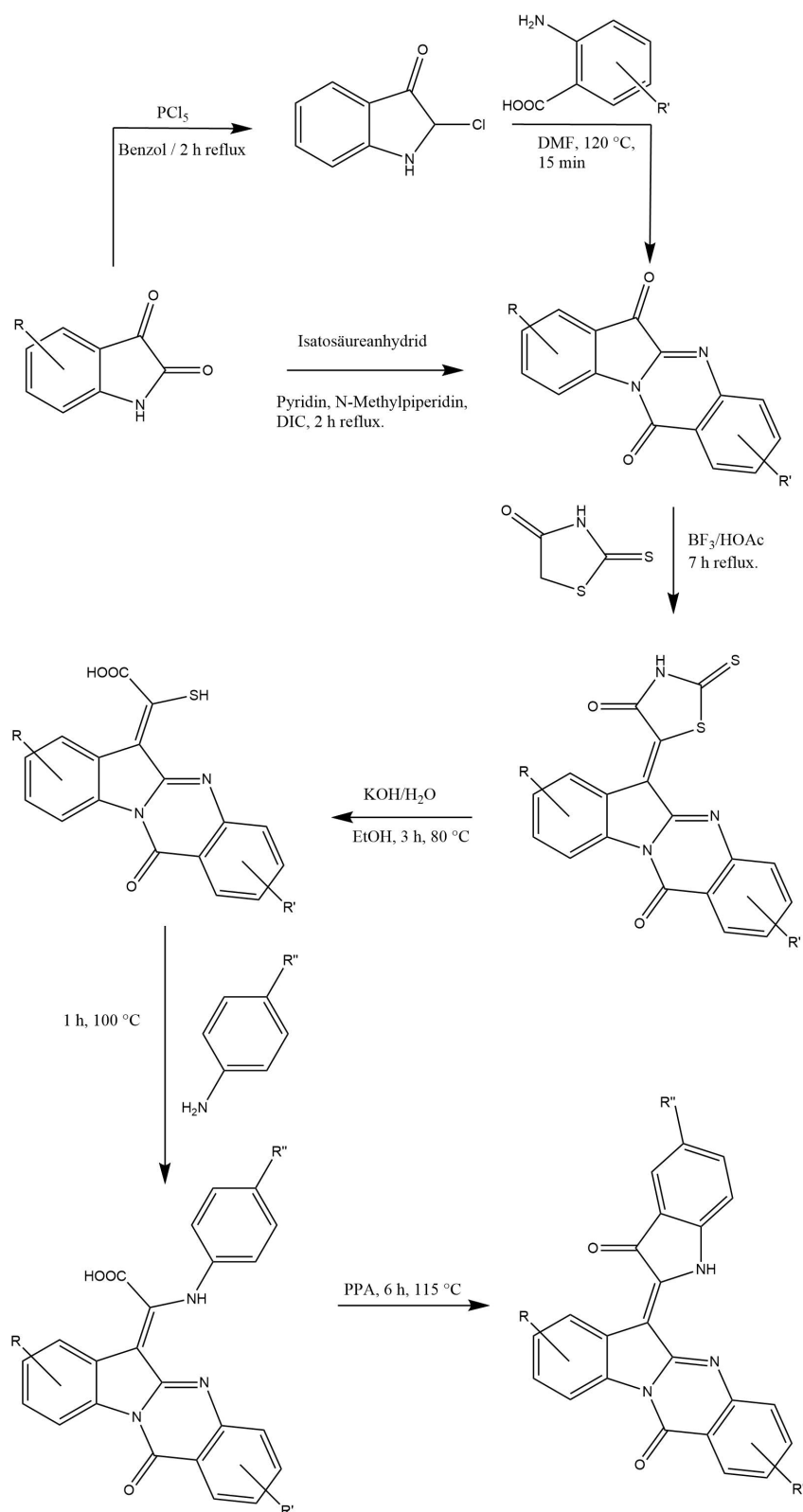


Abbildung 3.34: Zusammenfassung der einzelnen Schritte der Qingdainonsynthese.
 Frühere Arbeiten: $\text{R} = \text{H, Cl, Br, CH}_3$; $\text{R}' = \text{H, COOH}$; $\text{R}'' = \text{CH}_3, \text{Cl}$ [150]
 Diese Arbeit: $\text{R} = \text{OMe / OH}$, $\text{R}' = \text{H}$, $\text{R}'' = \text{OMe / OH}$

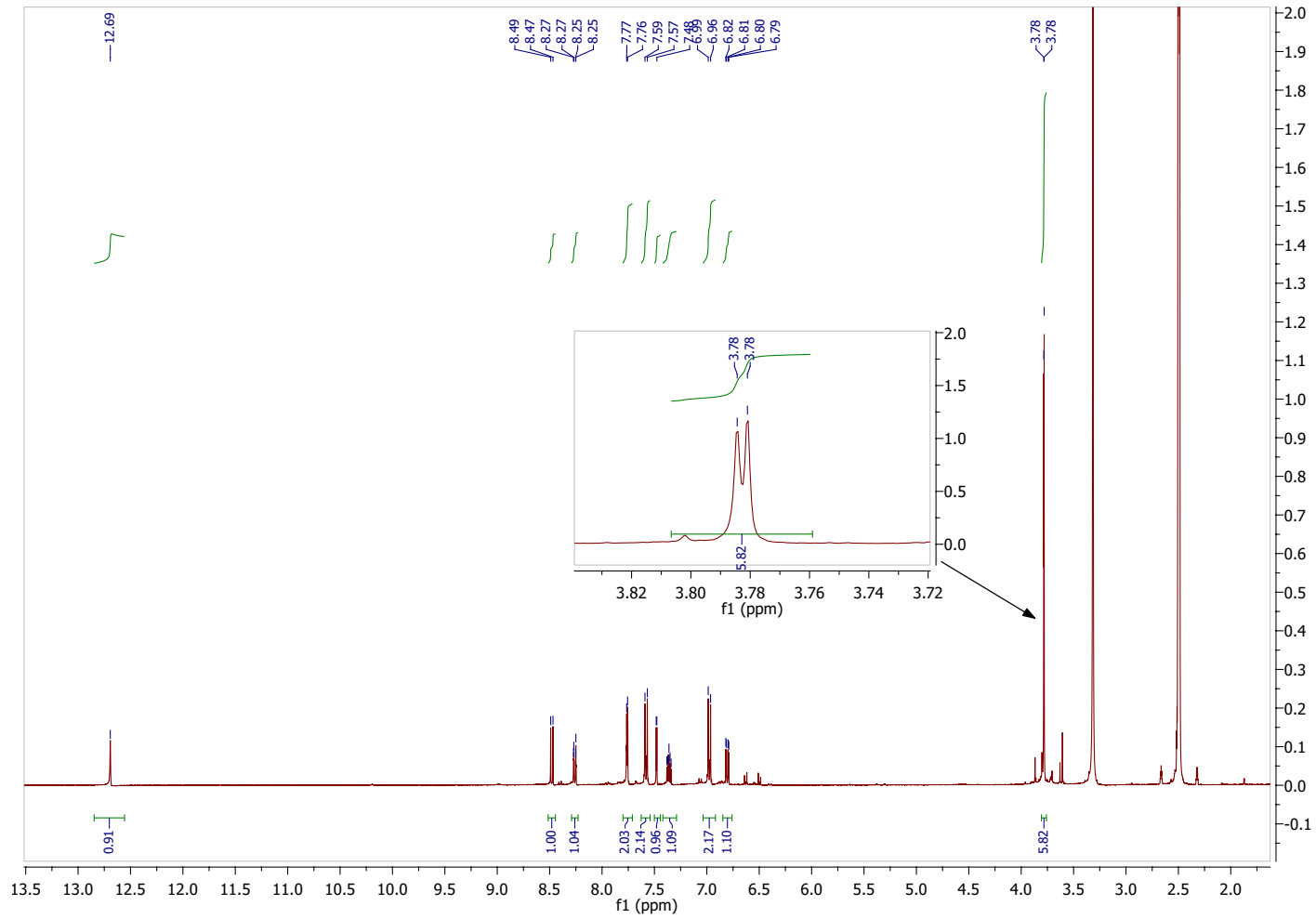


Abbildung 3.36: ^1H Spektrum des Vorprodukts der Cyclisierung zu Dimethoxyqingdainon. In der Vergrößerung ist ein doppeltes Singulett mit Integral 6 zu sehen, welches von den beiden Methoxygruppen stammt

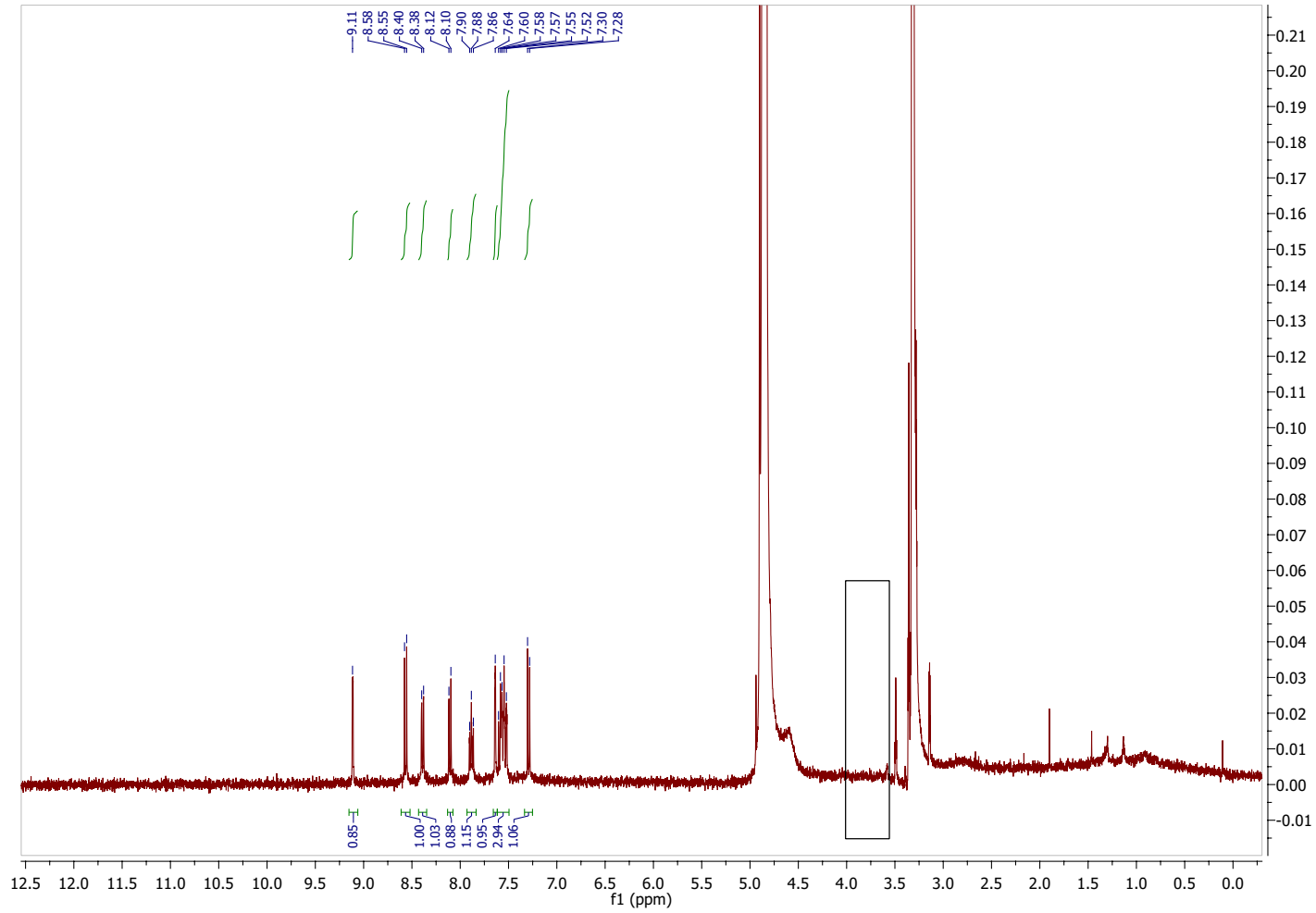


Abbildung 3.37: ^1H Spektrum von Dihydroxyqingdainon. Etwaige Methoxygruppen sollten durch Singulett-Signale im markierten Bereich sichtbar sein. Die NMR-Analyse bestätigt somit die Abspaltung beider Methoxygruppen. Das Signal rechts neben dem markierten Bereich ist ein Satellit des Lösungsmittelpeaks und hätte ein zu niedriges Integral

Bei der Herstellung größerer Mengen von Dihydroxyqingdainon ergaben sich hinsichtlich der Aufarbeitung jedoch verschiedene Probleme. Zum einen war es, wie auch bei allen anderen Qingdainonen, nur schwer möglich eine Chromatographie ohne zu starkes Tailing zu betreiben. Es konnte daher nur pro Lauf eine bestimmte Menge an Rohprodukt auf die Säule geladen werden. Das noch größere Problem bestand allerdings darin, dass unlösliche oder nur sehr schwer eluierbare Bestandteile im Rohprodukt ein schnelles Verstopfen der Säule verursachten. Der Druck nach ca. 3 Läufen war höher als die Flash-Chromatography Kartuschen es erlauben würden. HPLC-Säulen wurden für die Aufreinigung des Rohprodukts nicht in Betracht gezogen, da die Kosten des irreversiblen Verstopfens einer solchen Säule niemals den Nutzen aufwiegen würden. Es wurde schlussendlich mit 10 g C₁₈-Kieselgel gepackten, offenen Kartuschen des Herstellers Macherey & Nagel, wie unter 5.1 beschrieben, gearbeitet. Diese bieten die Möglichkeit durch eine zugehörige Glaskammer unterhalb der Säule ein Vakuum zu erzeugen und somit die Dauer der Chromatographie deutlich zu verringern. Diese Herangehensweise ist somit ähnlich zur Flash-Chromatography. Die erwähnten Kartuschen sind hinsichtlich des Preises und der Nutzungsweise eher für eine einmalige Verwendung ausgelegt. Somit ist diese Methode gut geeignet für das hier vorliegende Aufreinigungsproblem. Zur Durchführung der Trennung wurden maximal 50 mg Rohsubstanz in MeOH gelöst und auf die Säule geladen. Eluiert wurde zunächst mit 30 mL H₂O. Anschließend wurde mit jeweils 30 mL MeOH/H₂O 10 %, 20 %, usw. bis 100 % eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden per NMR auf Produkte untersucht. Als Referenz wurde eine durch Flash-Chromatography gewonnene Probe benutzt. Je nach eingesetzter Menge befand sich das Produkt in der 60 % oder 70 % Fraktion. Durch diese Herangehensweise konnte über 6 Läufe ca. 25 mg aufgereinigtes Dihydroxyqingdainon bereitgestellt werden. Diese Menge wurde einer kooperierenden Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt, um Zelltests durchzuführen. Die Ergebnisse wurden in einer gemeinsamen Publikation veröffentlicht [153].

3.3.2 Antiproliferative- und Apoptose auslösende Effekte von Dihydroxyqingdainon

Die im Folgenden beschriebenen Zelltests wurden von Jennifer Baas, tätig an der Abteilung für pädiatrische Hämatologie/Onkologie von Prof. Aram Prokop am Kinderklinikum Köln bzw. an der Helios Klinik in Schwerin, durchgeführt [153]. Dihydroxyqingdainon wurde speziell auf Leukämiezellen getestet, da bei den Indirubinen hierzu bereits interessante Wirkungen gefunden wurden. Durch Inkubation verschiedener Konzentrationen von Dihydroxyqingdainon mit Leukämie Precursor B-Zellen (Nalm-6) für 24 h konnte eine antiproliferative Wirkung beobachtet werden. Daher ist Dihydroxyqingdainon in der Lage, das Wachstum der neoplastischen Nalm-6 Zellen zu hemmen.

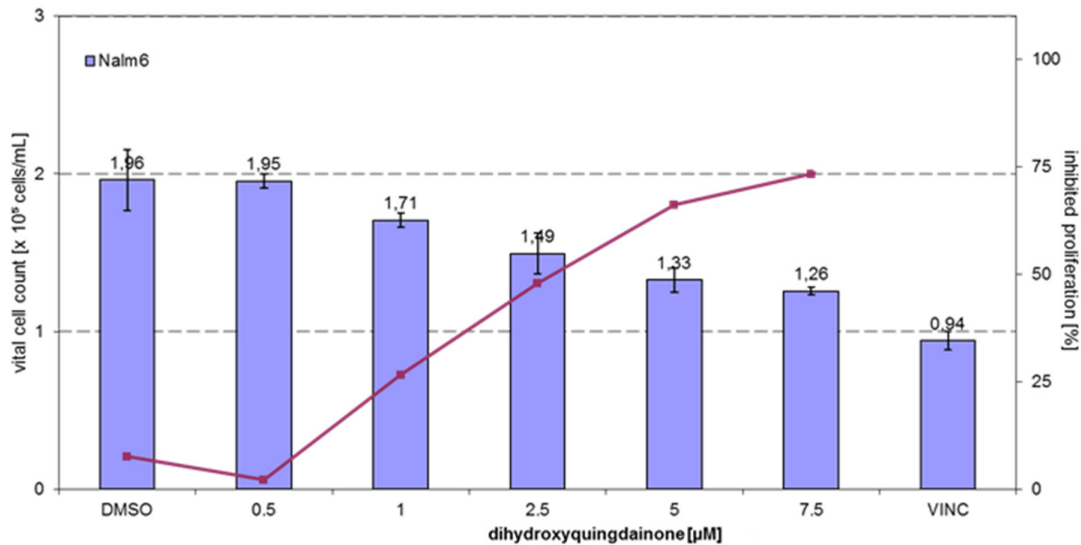


Abbildung 3.38: Antiproliferative Effekte von Dihydroxyqingdainon auf 1×10^5 Nalm-6 Zellen. Die Zellzahlen wurden über einen CASY[®]-Zellzähler bestimmt. Als Positivkontrolle wurde Vincristin (VINC) benutzt

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Dihydroxyqingdainon die Apoptose der Nalm-6 Zellen induzieren kann. Durch Inkubation der Nalm-6 Zellen mit Dihydroxyqingdainon für 48 h konnte ein Anstieg der Zellen mit vermindertem mitochondrialen äußeren Membranpotential beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass die Apoptose durch eine Permeabilisierung der mitochondrialen Membran eingeleitet wird. Diese Art der Apoptose wird auch intrinsischer Apoptoseweg genannt [154]. Durch Zugabe des Pancaspaseinhibitors zVad (50 μmol und 80 μmol) wurden keine apoptotischen Zellen mehr beobachtet, was dafür spricht, dass das Einleiten der Apoptose durch Dihydroxyqingdainon Caspase-abhängig ist. Es wurde weiterhin untersucht, wie selektiv Dihydroxyqingdainon für neoplastische Zellen ist. Hierzu wurden Nalm-6 Zellen sowie gesunde Leukozyten mit Dihydroxyqingdainon für 72 h behandelt. Anschließend wurde jeweils der Anteil der apoptotischen Zellen bestimmt, was im rechten Diagramm in Abbildung 3.39 dargestellt ist. Hierbei ist eine Selektivität für die bösartigen Nalm-6 Zellen deutlich erkennbar.

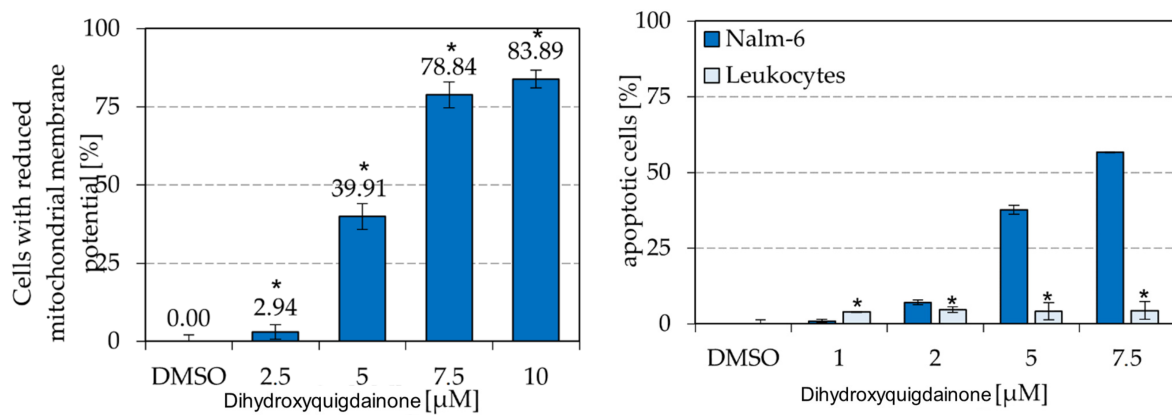


Abbildung 3.39: Links: Reduktion des Membranpotentials durch Dihydroxyquingdainon. Rechts: Selektivität von Dihydroxyquingdainon für Nalm-6 Zellen. Die Induzierung der Apoptose wurde mit durchflusszytometrischer Analyse der DNA-Fragmentierung gemessen

Ein bekanntes Problem bei der Krebstherapie sind Resistenzen von neoplastischen Zellen gegenüber gängigen Zytostatika. Aus diesem Grund wurde untersucht, wie gut Dihydroxyquingdainon derartige Resistenzen überwinden kann. Hierzu wurden Nalm-6 Zellen mit Resistenzen gegen Zytostatika mit Dihydroxyquingdainon und den jeweiligen Zytostatika für 72 h inkubiert. Als Zytostatika wurden Vincristin (VCR), Methotrexat (MTX) und Etoposid (ETO) verwendet. Es wurde beobachtet, dass Dihydroxyquingdainon in der Lage ist, die Resistenzen der Zellen zu überwinden. In manchen Fällen war der Anteil der apoptotischen Zellen bei den resistenten Zelllinien sogar höher als bei Nalm-6. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 3.40 dargestellt.

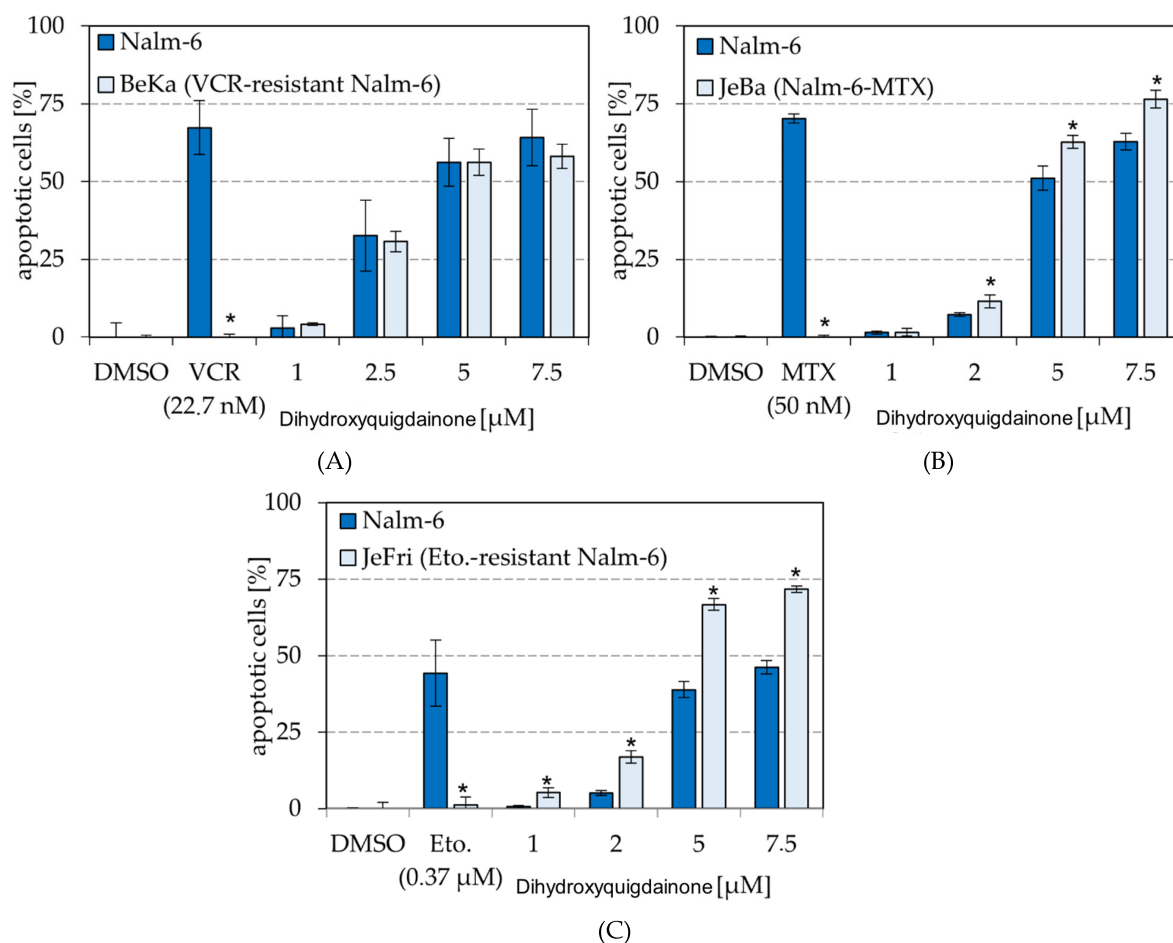
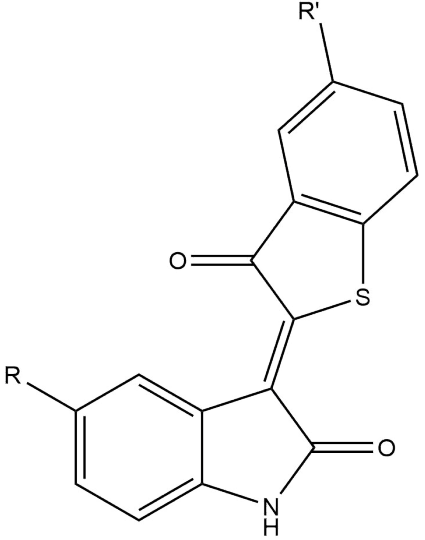


Abbildung 3.40: Überwindung von Resistenzen durch Dihydroxyquingdainon. Es wurden jeweils herkömmliche Nalm-6 sowie gegen Zytostatika resistente Nalm-6 Zellen benutzt und 72 h mit Dihydroxyquingdainon bzw. mit den jeweiligen Zytostatika inkubiert

3.3.3 Herstellung von Thioindirubinen

In Anlehnung an die von Riepl et al. publizierte Methode, konnten verschiedene Thioindirubine durch den Einsatz von Diazoniumsalzen hergestellt werden. Die Diazoniumsalze wurden vor der Verwendung für 24 h im Kühlschrank gelagert. Dadurch ergaben sich in allen Fällen bessere Ausbeuten. Für die Diazotierungsreaktion von 10b war mehr Base aufgrund der zusätzlichen Carboxylgruppe, im Vergleich zu den anderen Substanzen notwendig. Im Produktgemisch von Substanz 10f war ein wasserlöslicher Anteil vorhanden, was für eine Spaltung der Etherbindung sprechen könnte. Das Produkt mit intakter Methoxygruppe konnte dennoch isoliert werden. Längere Reaktionszeiten könnten eventuell zu einer quantitativen Spaltung der Etherbindung führen. Die hergestellten Thioindirubine wurden einer kooperierenden Arbeitsgruppe für Bioaktivitätstests zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.8: Übersicht der hergestellten Thioindirubine

	Substanz	R	R'	Ausbeute / %
	10a	H	CH ₃	24
10b	H	COOH	32	
10c	Cl	CH ₃	11	
10d	Br	CH ₃	43	
10e	F	CH ₃	47	
10f	OMe	CH ₃	20	

3.3.4 Antiproliferative- und apoptoseauslösende Effekte von 5'-Methylthioindirubin

Die nachfolgenden Zelltests wurden von der Arbeitsgruppe für pädiatrische Hämatologie/Onkologie von Prof. Aram Prokop am Kinderklinikum Köln bzw. an der Helios Klinik in Schwerin durchgeführt. Durch die Behandlung von Nalm-6 Zellen mit 5'-Methylthioindirubin (10a) konnten antiproliferative Effekte, ähnlich wie bei Dihydroxyqingdainon, nachgewiesen werden. Nach 24 h Inkubationszeit wurde die Zellzahl mit einem CASY®-Zellzähler bestimmt. Bereits bei niedrigen Konzentrationen konnte eine antiproliferative Wirkung beobachtet werden. Außerdem induzierte 10a die Apoptose mit einer höheren Selektivität für die bösartigen Nalm-6 und BJAB-Zellen als bei gesunden Leukozyten.

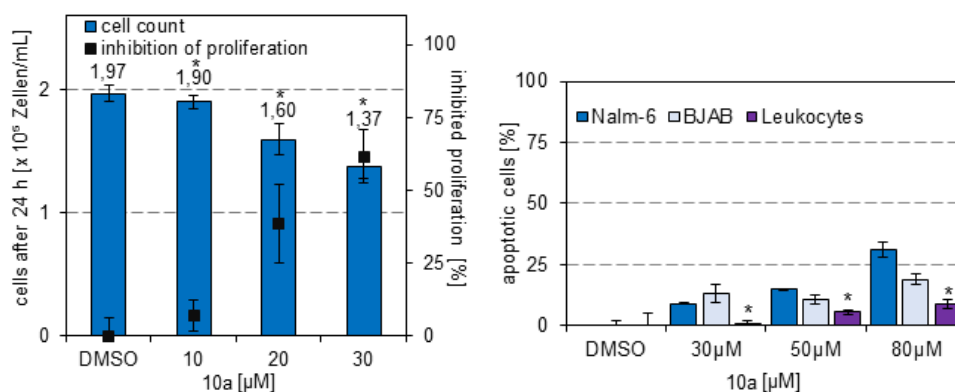


Abbildung 3.41: Links: Antiproliferative Effekte von 5'-Methylthioindirubin (10a) auf Nalm-6 Zellen. Die Zellzahlen wurden über einen CASY®-Zellzähler bestimmt. Rechts: Selektivität von 10a gegenüber Nalm-6, BJAB (Burkitt Lymphomzellen) und gesunden Leukozyten (ex vivo). Die Induzierung der Apoptose wurde mit durchflusszytometrischer Analyse der DNA-Fragmentierung bestimmt

Weiterhin konnte 10a die Resistenzen gegenüber den Zytostatika VCR, Daunorubicin und MTX überwinden. Hierzu wurden Nalm-6 und K-562 Zellen und die entsprechenden resistenten Zelllinien mit den jeweiligen Zytostatika oder mit 10a für 72 h inkubiert. Anschließend wurden die apoptotischen Zellen mit durchflusszytometrischer Analyse der DNA-Fragmentierung bestimmt. Bei BeKa-Zellen sind die Resistenzen auf eine Überexpression des Membranproteins p-gp (p-Glycoprotein) zurückzuführen [155]. Dieses Protein verringert die Anreicherung eines Wirkstoffs in der Membran und somit dessen Wirksamkeit. 10a besitzt eine höhere Aktivität bei BeKa-Zellen als bei Nalm-6 Zellen, was darauf hindeutet, dass die Aktivität von 10a nicht durch p-gp beeinflusst wird.

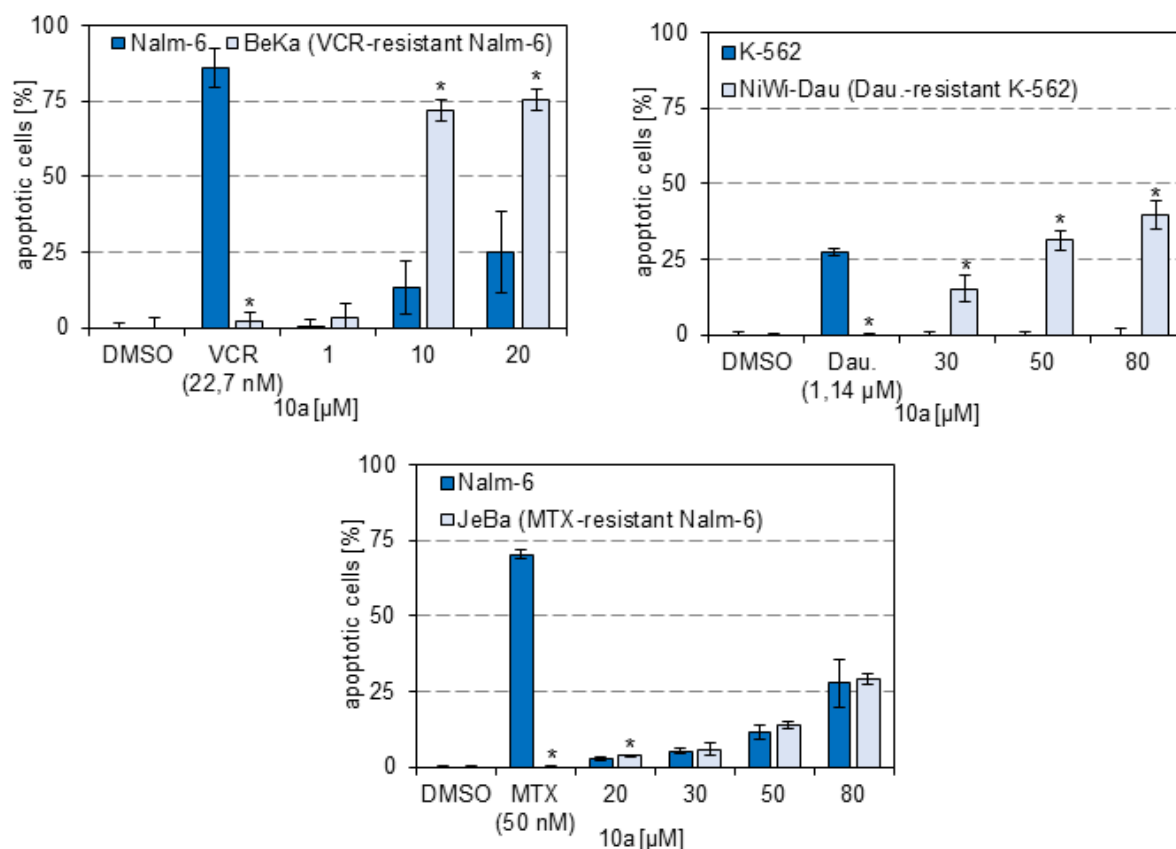


Abbildung 3.42: Überwindung der Resistenzen verschiedener Zelllinien durch 10a

3.3.5 Differenzierungsauslösende Wirkung der Thioindirubine auf neuronale Stammzellen

Die nachfolgenden Zelltests wurden von Stefanie Ritter durchgeführt [156]. Durch einen Dual-Luciferase-Assay wurde die differenzierungsauslösende Aktivität (DIA) der Thioindirubine auf pluripotente adulte neuronale Stammzellen untersucht. In Abbildung 3.43 sind die einzelnen Thioindirubinderivate und die gemessene DIA gezeigt. 5'-Methylthioindirubin (D) zeigte hierbei die höchste DIA bei 10 μmol. Auch bei der kleineren Konzentration von 1 μmol konnte eine differenzierungsauslösende Wirkung beobachtet werden.

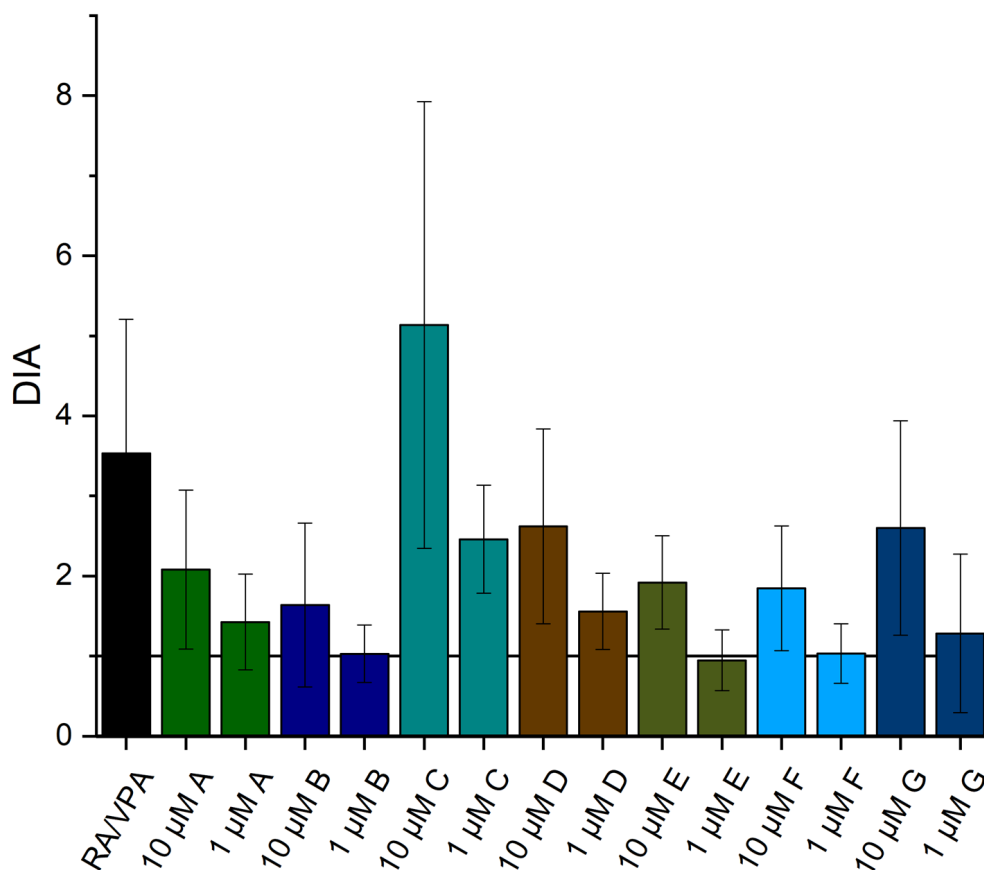


Abbildung 3.43: Differenzierungsauslösende Aktivität der Thioindirubine (A) 5'-Thioindirubincarbonsäure, (B) 5-Methyl-5'-chlorothioindirubin, (C) 5'-Methylthioindirubin, (D) 5'-Methyl-5-fluorothioindirubin, (E) 5'-Methyl-5-chlorothioindirubin, (F) 5'-Methyl-5-bromothioindirubin and (G) 5'-methyl-5-methoxythioindirubin (1 µmol und 10 µmol)

3.3.6 Teildiskussion indigoide Farbstoffe

Ausgehend von einer mehrstufigen Synthese konnten Derivate der indigoide Farbstoffe Thioindirubin und Qingdainon erhalten werden. Um bei dieser Synthese zu Qingdainon zu gelangen, muss Tryptanthrin statt Isatin als Ausgangsprodukt gewählt werden. Für die Thioindirubinsynthese wurden Diazoniumsalze anstelle von Anilinen benutzt, sodass Schwefel als Heteroatom in der Struktur vorhanden ist. Die Substituenten an den aromatischen Ringen können über substituierte Isatine und Tryptanthrine gesteuert werden. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass bestimmte Substituenten einen Einfluss auf die erfolgreiche Durchführung der Synthese haben können. Beispielsweise können elektronenziehende Substituenten am Indoxylteil die Cyclisierung mit Polyphosphorsäure beeinträchtigen. Für die angestrebte Verbesserung der Wasserlöslichkeit war es das Ziel, möglichst polare Substituenten einzuführen. Hierzu wurden für die

Qingdainonsynthese Methoxytryptanthrin und p-Anisidin als Ausgangsprodukte benutzt. Diese Methoxygruppen waren im Verlauf der Synthese stabil und konnten im letzten Schritt unter den Reaktionsbedingungen der Cyclisierung zu OH-Gruppen gespalten werden. Zur Bestätigung der erfolgten Reaktion konnten im ^1H -Spektrum im Vergleich zum Vorprodukt keine Methoxysignale mehr beobachtet werden. Außerdem war die entstandene Substanz deutlich besser wasserlöslich als das unsubstituierte Qingdainon. Dihydroxyqingdainon und 5'-Methylthioindirubin konnten in Zelltests mit Nalm-6 Leukämiezellen die Apoptose induzieren. Besonders vielversprechend war hierbei, dass Dihydroxyqingdainon und 5'-Methylthioindirubin selektiv für bösartige Zellen waren und auch bei resistenten Zelllinien aktiv sein konnten. Alle hergestellten Thioindirubine wurden zudem für Zelltests übergeben, um deren differenzierungsauslösende Aktivität zu untersuchen. Die höchste DIA wurde bei 5-Methylthioindirubin festgestellt.

4 Diskussion und Ausblick

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden Möglichkeiten zur Bereitstellung und synthetischen Modifikation bioaktiver Stoffe aus Blaualgen sowie anderen natürlichen Quellen erarbeitet.

Hierzu wurden insbesondere die Minutissamide, welche zur Substanzklasse der cyclischen Lipopeptide gezählt werden können, betrachtet. Im Zuge des Projekts Interreg - Blaualgen wurde von einer kooperierenden Forschungseinheit vom Centre Algatech in Třeboň größere Mengen von Minutissamid A und C zur Verfügung gestellt, welche anschließend für Synthese-Experimente benutzt wurden. Das Ziel innerhalb dieses Teils war es, durch strukturelle Modifikationen eine Veränderung der natürlichen Cyto- und Fungoxizität zu erreichen. Form und Länge des Fettsäurerests spielen in diesem Sinne vermutlich eine wichtige Rolle, weswegen sich hauptsächlich auf die Einführung aliphatischer Ketten in die Molekülstruktur fokussiert wurde. Minutissamid C besitzt eine Ketogruppe am Fettsäurerest und konnte somit erfolgreich, mithilfe einer Grignard-Reaktion, einer Kettenverlängerung unterzogen werden. Da Hydroxygruppen am Fettsäurerest, wie beispielsweise bei Minutissamid D, eine Auslöschung der Cytotoxizität mit sich bringen, wurde anschließend eine Eliminierung von H₂O durchgeführt. Hierbei wurden ein Hauptprodukt und zwei Nebenprodukte beobachtet, welche vermutlich durch die unterschiedlichen Regioselektivitäten der Wassereliminierung zustande kommen. Auf diese Weise wurde Minutissamid C mit Butyl- und Octylmagnesiumbromid um jeweils 4 bzw. 8 Kohlenstoffatome verlängert. Die synthetischen Minutissamide wurden dem Centre Algatech für Zelltests zur Verfügung gestellt. Für die synthetischen Minutissamid C Varianten konnten im Bereich von 0.3 µM–2.5 µM höhere Cytotoxizitäten im Vergleich zur Ausgangssubstanz festgestellt werden. Bei Minutissamid A wurden chemische Reaktionsmöglichkeiten im Bereich des Peptidrings gesucht, da der Fettsäurerest von Minutissamid A keine funktionellen Gruppen trägt. Mithilfe einer Steglich-Veresterung konnten dennoch aliphatische Ketten an den OH-Gruppen des Threonin- und Fettsäurerests eingeführt werden. Die Länge der Kette konnte über das benutzte Anhydrid eingestellt werden. Weitere funktionelle Gruppen konnten auf diese Weise ebenfalls dem Molekül hinzugefügt werden. Es wurden 7 neue Minutissamid A Varianten innerhalb dieser Arbeit synthetisiert und charakterisiert. Die Ausbeuten der Produkte waren bei dieser Methode zufriedenstellend und für weitere Experimente ausreichend. Mit Bernsteinsäureanhydrid konnten zwei weitere Carboxylgruppen und mit 4-Pentensäureanhydrid zwei Olefinfunktionen eingeführt werden. Durch Letzteres war es schließlich möglich, einen Nachweis für eine erfolgreiche Metathesereaktion, die zuvor am Dehydrothreoninrest fehlschlug, zu finden. Neben dem erwünschten Produkt wurde außerdem eine Masse, die für eine Minutissamid A Dimer sprechen würde, beobachtet. Ein solches Dimer wäre sicherlich aus pharmakologischer Sicht höchst interessant, da bei den Wirkungsmodellen der cyclischen Lipopeptide oft von einer Agglomeration der Peptidköpfe an der Membran ausgegangen wird, was zur Porenbildung und schließlich zum Zelltod führt. Durch die Veresterung der freien

OH-Gruppen konnte bei Bioaktivitätstests im Rahmen des Projekts nachgewiesen werden, dass dies eine Auslöschung der Cytotoxizität der Substanzen zur Folge hat. Andererseits tritt dadurch eine spontane toxische Wirkung auf verschiedene Schimmelpilzarten ein. Durch diese Ergebnisse steht außer Frage, dass die OH-Gruppen in der Minutissamid A Struktur eine entscheidende Rolle für dessen Bioaktivität spielen. Die OH-Gruppe des Fettsäurerests bildet möglicherweise, aufgrund ihrer Nähe zur aliphatischen Kette, eine Wechselwirkung mit der Zellmembran aus. Die hergestellten Minutissamid Varianten lieferten somit neue Erkenntnisse über die Wechselwirkung zwischen Lipopeptiden und Zellmembran. Die Ergebnisse aus den Minutissamid Experimenten wurden in einer gemeinsamen Publikation veröffentlicht.

Neben der Arbeit zu den Minutissamiden wurden die Teleocidine als eine weitere Substanzklasse von Blaualgentoxinen untersucht. Dabei sind Teleocidine hauptsächlich für ihre Eigenschaft, PKC zu aktivieren, bekannt. Aus diesem Grund werden sie zu den Tumorpromotoren gezählt und finden möglicherweise Anwendung in der Behandlung verschiedener Krebsarten. Durch die Kultivierung von *Streptomyces blastmyceticum* und *Streptomyces olivoreticuli* konnten die Teleocidine Lyngbyatoxin und Teleocidin B isoliert werden. Hierzu kam eine Aufreinigung mittels Festphasenextraktion, Normalphasenchromatographie und präparativer HPLC zum Einsatz. Der biologische Precursor Indolactam wurde über eine Totalsynthese hergestellt. Experimente zur synthetischen Modifikation wurden durchgeführt, allerdings konnten die gewünschten Produkte nicht gefunden werden. Die erhaltenen Teleocidine wurden Projektpartnern für biologische Tests zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse der Isolierung der Teleocidine aus Bakterienkulturen wurden im Rahmen eines Kongress-Posters der Öffentlichkeit präsentiert.

Für einen tieferen Einblick in das Gebiet der Kinaseinhibitoren wurden neben den Teleocidinen die indigoiden Farbstoffe Indirubin und Qingdainon untersucht. Beide Substanzen besitzen vielversprechende Eigenschaften für die Behandlung von CML und anderen Krebsarten. Indirubine mit Substituenten besitzen möglicherweise eine stärkere Bioaktivität, da die Wasserlöslichkeit und die Wechselwirkung mit Enzymen in bestimmten Fällen verbessert ist. Ziel dieser Arbeit war es daher, durch eine mehrstufige Totalsynthese der Substanzen, polare Substituenten einzuführen, indem bereits substituierte Ausgangsprodukte verwendet wurden. Hierbei konnten im Laufe der Qingdainon Totalsynthese zwei Methoxygruppen durch den Einsatz von Methoxyisatin und p-Anisidin in die Struktur eingeführt werden. Interessanterweise spalten sich beim letzten Schritt, der Cyclisierung in Polyphosphorsäure bei 130 °C, die Etherbindungen auf und es entstehen zwei Hydroxygruppen. Makroskopisch konnte dieses Resultat über einen sofortigen Anstieg der Wasserlöslichkeit des Produkts beobachtet werden. Die hinzugefügten Hydroxygruppen verbessern möglicherweise auch die Wechselwirkung zwischen Substanz und den CDKs, wie es bei verschiedenen Indirubinderivaten bereits beschrieben wurde. Des Weiteren wurden Thioindirubinderivate hergestellt, indem anstelle von Anilinen, Diazoniumsalze verwendet wurden. Alle Substanzen wurden einer kooperierenden Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Dihydroxyqingdainon und 5'-Methylthioindirubin konnten bei Leukämie- und Lymphomzellen die Apoptose auslösen und

zusätzlich die Resistenzen bestimmter Zelllinien gegen andere Zytostatika überwinden. Bei den Thioindirubinen wurde außerdem die differenzierungsauslösende Aktivität (DIA) auf neuronale Stammzellen untersucht. Die höchste DIA konnte ebenfalls bei 5'-Methylthioindirubin gefunden werden. Eines der größten Herausforderungen hierbei ist es, einen Kompromiss zu finden zwischen der (un-)kontrollierten Proliferation, dem Einleiten der Apoptose und dem Ermöglichen einer terminalen Differenzierung. Einige Ergebnisse dieses Arbeitsteils wurden bereits in einer Publikation veröffentlicht.

Wenn man alle Ergebnisse dieser Arbeit entsprechend eines Innovationsgrads aufsteigend ordnen möchte, könnte man zur folgenden Einteilung kommen. Als Erstes wären die Teleocidine zu nennen, bei denen die Bereitstellung bekannter Substanzen erfolgte und einige Versuche zur chemischen Modifikation unternommen wurden. Die Produktion von Lyngbyatoxin, durch die Kultivierung von *Streptomyces blastmyceticum* als hauptsächliche Teleocidin-Komponente, kann als neuartiges Ergebnis dieses Kapitels gesehen werden. Als Nächstes wären die Synthesen zu den Qingdainonen und Thioindirubinen aufzuzählen. Die einzelnen Syntheseschritte wurden in früheren Arbeiten bereits beschrieben, allerdings konnten neue biologisch aktive Derivate produziert und für zelltechnische Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden. Besonders interessant erscheint hierbei die Fähigkeit von Dihydroxyqingdainon (11e), die Resistenzen bestimmter Zelllinien gegen bekannte Zytostatika zu überwinden und die Apoptose selektiv in neoplastischen Zellen einzuleiten. Durch die erzeugten Ergebnisse lassen sich möglicherweise neue Therapieansätze für CML und anderen Krebserkrankungen finden. Der nächsthöhere Innovationsgrad lässt sich bei den neu hergestellten Minutissamid A und C Derivaten feststellen. Die Synthesen zu allen Substanzen wurden erstmals in dieser Arbeit entwickelt und angewandt. Mit den neuen Derivaten konnten einzelne Strukturmerkmale und deren Einfluss auf die Bioaktivität der Minutissamide untersucht werden. Beispiele hierfür wären die Bedeutung der OH-Gruppen bei der Mykotoxizität oder die Wirkung der Kettenlänge am Fettsäurerest auf die Cytotoxizität. Die Resultate ermöglichen ein besseres Verständnis für den Mechanismus der Interaktion zwischen cyclischen Lipopeptiden und Zellmembranen. Mögliche Anwendungen wären beispielsweise die Erweiterung des Spektrums an verfügbaren Antibiotika und Antimykotika. Die Überwindung von Resistenzen könnte hierbei eine Rolle spielen, da cyclische Lipopeptide bisher kaum in diesem Bereich eingesetzt werden. Das Ergebnis mit dem größten Neuheitsgrad ist allerdings die Selbstmetathese von Substanz 5g zu einem Minutissamid A Dimer. Da bei den cyclischen Lipopeptiden eine Öffnung der Membran durch Agglomeration von mehreren Peptiden stattfindet, wäre es interessant zu untersuchen, wie sich ein solches Dimer bei Zelltests verhält.

Innerhalb der Arbeit konnten zusammenfassend eine Vielzahl neuer Naturstoffvarianten synthetisiert werden, die einerseits für die Behandlung von Pilz- und bakteriellen Infektionen sowie andererseits als Krebstherapeutika Anwendung finden könnten. Die entwickelten synthetischen Methoden ermöglichen die Herstellung weiterer Derivate mit potentiell vielversprechenden pharmakologischen Profilen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Geräte und Methoden

Kernspinresonanzspektroskopie

Zur Aufnahme der NMR-Spektren wurde ein ECS-400 von Jeol (400 MHz) verwendet (400.13 MHz für ^1H und 100.62 MHz für ^{13}C). Als Lösungsmittel wurden die deuterierten Standards CDCl_3 (^1H $\delta = 7.26$ ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ $\delta = 77.0$ ppm), DMSO-d_6 (^1H $\delta = 2.49$ ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ $\delta = 39.52 \pm 0.06$ ppm) oder MeOD (^1H $\delta = 3.31$ ppm; $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ $\delta = 49.0$ ppm) verwendet. Die chemische Verschiebung (δ) ist in ppm bezüglich des Trimethylsilan-Signals (0 ppm) angegeben. In Klammern sind die Signalmultiplizität, Kopplungskonstante, Integral und gegebenenfalls die Zuordnung aufgeführt. Abkürzungen der Multiplizitäten lauten wie folgt: s: Singulett, d: Duplett, dd: Dublett von Dubletts, t: Triplet, td: Triplet von Dubletts, q: Quartett, m: Multiplet, br: breites Signal.

LC/MS-Analyse

LC/MS-Analysen wurden über eine HPLC mit gekoppelten IT-TOF Massenspektrometer von Shimadzu durchgeführt. Für die chromatographischen Auftrennungen wurde eine Kinetex C_{18} -Säule (2.1 x 100 mm, 2.6 μm , 100 \AA) von Phenomenex und eine Gradientenelution aus H_2O (A) und MeCN (B) mit jeweils 0.1 % Ameisensäure benutzt. Die Temperatur im Säulenofen lag bei 30 °C. Eluierte Substanzen wurden per Elektronensprayionisation (ESI) ionisiert. Spannung und Temperatur des Interface betragen 3.5 V und 210 °C. Die Ion-Accumulation lag bei 20 ms. Folgende LC-Methode wurde bei den HPLC/MS-Analysen benutzt:

Tabelle 5.1: Übersicht über die LC-Methode, die für HPLC/MS-Analysen benutzt wurde

Zeit / min	Anteil B / %
00.01	15
00.50	15
10.00	100
14.00	100
16.50	15
19.00	15

Säulenchromatographie

Flash-Chromatography wurde mit einer Puriflash 4250-250 von Interchim mit 40 g oder 12 g Kieselgel-Kartuschen von Interchim durchgeführt. Zur Detektion der Proben wurde ein UV-Detektor und ein ELSD-Detektor benutzt. Die jeweiligen Säulen wurden zunächst mit Laufmittel gespült und dann per Dryload geladen. Die Flussrate betrug 26 mL/min. Bei Auftrennungen über präparative HPLC wurde eine C₁₈ Säule mit H₂O/MeOH (Phenomenex, Luna C₁₈, 15 x 250 mm, 5 µm, 100 Å) mit einer Flussrate von 10 mL/min und folgendem Gradienten benutzt:

Tabelle 5.2: Übersicht über die LC-Methode, die für die präparative HPLC benutzt wurde

Zeit / min	Anteil B / %
00.01	40
00.31	40
13.12	85
51.56	100
110.18	100
110.85	40
123.88	40

Fraktionierende Festphasenextraktion (SPE)

SPE-Extraktionen wurden mit vorgepackten offenen C₁₈ Kartuschen von Macherey & Nagel (Chromabond) unter vermindertem Druck (max. 0.68 bar) durchgeführt. Für Aufarbeitungen im Testmaßstab (5 mg) wurden Kartuschen mit 500 mg Säulenmaterial und 6 mL Säulenvolumen benutzt. In allen anderen Fällen wurden Kartuschen mit 10 g Säulenmaterial und 70 mL Säulenvolumen benutzt. Die Größe der Partikel betrug 45 µm. Die Kartuschen wurden mit Methanol und Wasser konditioniert (40 mL). Anschließend folgte eine Flüssiglading der Probe. Das Elutionsprogramm wurde bei den jeweiligen Prozeduren beschrieben.

Glovebox

Besonders wasser- und luftempfindliche Synthesen wurden in einer Glovebox Unilab[®] der Firma M. Braun Inertgas Systeme GmbH durchgeführt. Diese wurde im Überdruck-Modus und Restgehalten < 1 ppm Wasser und Sauerstoff betrieben.

Gefriertrocknung

Wässrige Lösungen wurden zur Gefriertrocknung zunächst in flüssigem N₂ eingefroren und anschließend an der Gefriertrocknungsanlage (Christ Alpha 2-4 LDplus) lyophilisiert.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Reaktionsverfolgung wurden Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator (Silica gel 60 F254 Aluminium sheets) der Firma Merck verwendet. Die Auswertung erfolgte bei den Wellenlängen $\lambda = 254$ nm oder $\lambda = 360$ nm.

5.2 Isolierung von Teleocidinen

5.2.1 Kultivierung von *Streptomyces olivoreticuli*

Die verwendeten Mikroorganismen wurden als Kryostämme vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH erworben. Als Nährmedium für die

Kultivierung wurden, außer bei den Agar-Platten, 30 g Tryptische Soja-Brühe (TSB) in 1 L dest. Wasser gelöst, autoklaviert und innerhalb eines Tages verwendet. Die Kryokulturen wurden mithilfe einer Impföse unter einer Sterilbank auf zwei verschiedene Agar-Platten ausgestrichen. Nach einer Inkubation von 3 Tagen bei 30 °C wurden gut gewachsene Kolonien ausgewählt und in ein Reagenzglas mit 5 mL Nährmedium überführt. Nach einer Inkubation von 6 h bei 30 °C wurde der komplette Inhalt in einen 500 mL Kolben mit 200 mL Nährmedium überführt und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die gewachsene Kultur wurde durch Schütteln möglichst gleichmäßig suspendiert und auf 6 × 4 L Schikanekolben mit jeweils 1 L Nährmedium aufgeteilt. Es wurde bei 30 °C weiter inkubiert und ab 72 h täglich der optimale Zeitpunkt zur Zellernte durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Dieser war nach 10 Tagen erreicht woraufhin die erhaltenen Kulturen in ein Ultraschallbad für 1 h gestellt wurden. Anschließend wurde die überstehende Lösung von der Biomasse durch Zentrifugieren (15 min, 600 × g) getrennt.

5.2.2 Kultivierung von *Streptomyces blastmyceticum*

Kulturen von *Streptomyces blastmyceticum* wurden ähnlich zu 5.2.1 hergestellt und mithilfe einer Schüttelplatte für industrielle Maßstäbe und 4 L Schikanekolben mit jeweils 2 L Nährmedium kultiviert. Auf diese Weise wurde insgesamt ein Volumen von 40 L bereitgestellt. Die Kolben wurden für 1-2 Stunden in ein Ultraschallbad gestellt und anschließend die Biomasse von der überstehenden Lösung durch Zentrifugieren (15 min, 600 × g) abgetrennt.

5.2.3 Isolierung und Aufreinigung von Teleocidin B aus *Streptomyces olivoreticuli*

Die zentrifugierte Biomasse aus der Kultivierung wurde zunächst gefriergetrocknet und anschließend durch Rühren in 700 mL MeOH für 24 h bei RT extrahiert. Die Suspension wurde durch einen Faltenfilter filtriert und mit MeOH nachgewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und Trocknen des Feststoffs ergaben sich 834 mg Extrakt. Dieser wurde weiter aufgearbeitet durch Flash Chromatography (0:100 bis 100:0 MeOH/DCM, 40 g SiO₂). Hierbei wurde eine verunreinigte Teleocidin B Fraktion von 30 mg erhalten. Eine weitere Aufreinigung mit präparativer HPLC (40:60 bis 95:5 MeOH/H₂O, Luna 250 x 15 mm, C₁₈ Kieselgel) ergab 1 mg LC/MS und NMR reines Teleocidin B. In den NMR-Daten ist eine Mischung aus zwei stabilen Konformeren erkennbar.

HRMS-TOF (m/z): gemessen: 452.3290 [M+H]⁺, calcd: 452.3277 ppm.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.72 (m, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.18 (m, 1H), 5.41 (m, 1H), 5.34 – 5.16 (m, 1H), 4.32 (s, 1H), 4.18 (m, 3H), 4.04 – 3.84 (m, 2H), 3.78 – 3.64 (m, 2H), 3.68 – 3.55 (m, 2H), 3.49 (dd, J = 19.6, 8.9 Hz, 1H), 2.89 (d, J = 17.6 Hz, 3H), 2.35 (t, J = 7.6

Hz, 3H), 1.89 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 1.50 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.26 (s, 12H), 1.02 (t, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.88 – 0.80 (m, 9H), 0.69 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 0.54 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H).

5.2.4 Isolierung und Aufreinigung von Lyngbyatoxin A aus *Streptomyces blastmyceticum*

Die aus der Zentrifugierung gewonnene überstehende Lösung wurde mit 60 g Amberlite XAD 1180N für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Harz von der wässrigen Lösung durch Vakuumfiltration getrennt. Die weitere Aufreinigung erfolgte eine Normalphasenchromatographie. Hierzu wurden ca. 10 g Rohextrakt mit 30 g Kieselgel in einer Mörserschale verrieben. Der Dryload wurde Chloroform aufgeschlämmt und auf eine Säule mit 800 g Kieselgel geladen. Um stark lipophile Anteile vor der eigentlichen Chromatographie zu entfernen wurde die geladene Säule zunächst mit 600 ml Hexan gespült. Anschließend wurde das Elutionsprogramm von Tabelle 5.3 angewandt. Eine weitere Aufreinigung mit präparativer HPLC (40:60 bis 95:5 MeOH/H₂O, Luna 250 x 15 mm, C₁₈ Kieselgel) ergab 0.7 mg Lyngbyatoxin.

HRMS-TOF (m/z): gemessen: 438.3092 [M+H]⁺, calcd: 438.3121 ppm.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.26 – 6.08 (m, 1H), 5.94 (s, 1H), 5.30 (m, 3H), 5.08 – 4.81 (m, 3H), 4.24 (m, 3H), 3.77 (m, 2H), 3.57 (m, 3H), 3.10 (m, 1H), 2.87 (m, 3H), 2.78 – 2.69 (m, 1H), 2.65 – 2.28 (m, 5H), 1.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 4H), 1.33 – 1.23 (m, 6H), 1.13 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 0.94 (dd, $J = 6.4, 2.8$ Hz, 2H), 0.90 – 0.84 (m, 1H).

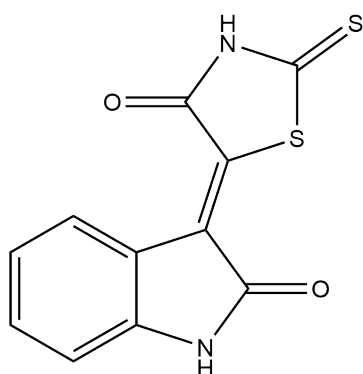
Tabelle 5.3: Programm zur Normalphasenchromatographie des Amberlite Rohextrakts aus der Kultivierung von *Streptomyces blastmyceticum*. Typischerweise wurden hierbei ca. 10 g Rohextrakt als Dryload auf die Säule geladen. Bei Fraktion 5 zeigte sich ein Auftreten von Teleocidinen, weswegen diese mithilfe von präparativer HPLC weiter aufgereinigt wurde.

Fraktion	Volumen / mL	Chloroform/MeOH	Teleocidine
1	600	100 : 0	-
2	600	99 : 1	-
3	600	80 : 20	-
4	600	80 : 20	-
5	600	80 : 20	Ja
6	600	60 : 40	-

5.3 Präparative Vorschriften

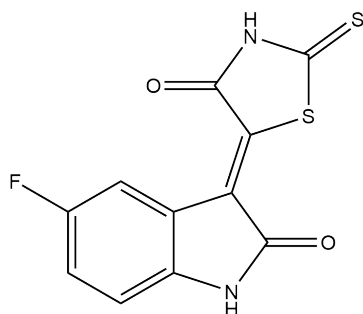
5.3.1 Thioindirubinsynthesen

5-(2-oxoindolin-3-ylidene)-2-thioxothiazolidin-4-on (6a)



In einen 250 mL Rundkolben wurden Isatin (3.83 g, 26 mmol, 1 eq.) und Rhodanin (3.33 g, 25 mmol, 0.96 eq.) in 100 mL Eisessig suspendiert. Natriumacetat (3.99 g, 48.64 mmol, 1.87 eq.) und Essigsäureanhydrid (550 μ L, 5.82 mmol) wurden anschließend dazu gegeben. Es wurde für 4.5 h unter Rückfluss erhitzt, wobei ein Farbwechsel von Orange zu Dunkelbraun beobachtet wurde. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wurde der ausgefallene Feststoff über einen Büchnertrichter filtriert und mit Wasser gewaschen bis das Filtrat neutral auf pH-Papier reagierte. Schwarzroter Feststoff. Ausbeute: 6.43 g (24.5 mmol 91 %).

5-(5-fluoro-2-oxoindolin-3-ylidene)-2-thioxothiazolidin-4-on (6b)

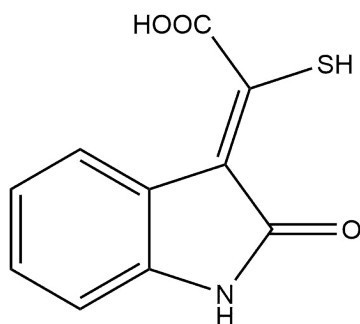


5-Fluor-Isatin (2.4 g, 14 mmol, 1 eq.) und Rhodanin (1.9 g, 14 mmol, 1 eq.) wurden in 125 mL Eisessig suspendiert. Das Gemisch wurde 28 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Das gebildete Produkt wurde nach jeweils 7 h mittels Vakuumfiltration abgetrennt und getrocknet. Nach 21 h

wurde zur Reaktionsmischung Natriumacetat (2.0 g, 24 mmol, 1.71 eq.) zugegeben, wodurch eine Verbesserung der Ausbeute erreicht werden konnte. Ausbeute: 3.72 g (13.27 mmol, 95 %).

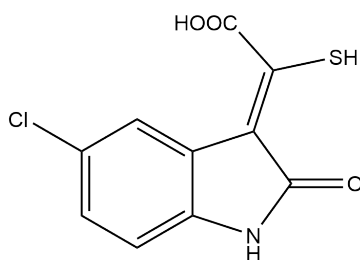
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D₆-DMSO) δ 11.23 (s, 1H), 8.56 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 7.27 (td, $J = 8.9, 2.8$ Hz, 1H), 6.94 (dd, $J = 8.6, 4.6$ Hz, 1H).

(Z)-2-mercapto-2-(2-oxoindolin-3-ylidene)essigsäure (7a)



6a (3.93 g, 15 mmol, 1 eq.) wurde in 50 mL einer 1.3 M KOH-Lösung suspendiert. Die Mischung wurde unter aufgesetztem Rückflusskühler für 1 h auf 50 °C erwärmt. Nach Abkühlen, wurde über einen Faltenfilter filtriert und mit wenig Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde unter Schwenken im Eisbad mit 17 %iger HCl angesäuert, bis pH = 1 erreicht war und sich ein Niederschlag bildete. Dieser wurde über einen Büchnertrichter abfiltriert und in eine Kristallisierschale zum Trocknen überführt. Das Produkt wurde ohne Aufreinigung weiterverwendet.

2-(5-chloro-2-oxoindolin-3-yliden)-2-mercaptoessigsäure (7b)



5-Chlor-Isatin (4.5 g, 25 mmol, 1 eq.) und Rhodanin (3.9 g, 29 mmol, 1.16 eq.) wurden in jeweils 20 ml Pyridin gelöst, in einem 500 ml Dreihalskolben mit integrierter Glasfritte zusammengegeben und mit 10 mL H₂O versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei RT gerührt. Bei fortgeschrittener Kristallisation des Zwischenprodukts wurden THF (40 mL) zugegeben und 1 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch abgekühlt und 24 h bei 8 °C zur Kristallisation gelagert. Am nächsten Tag wurde das Produkt durch die integrierte Glasfritte

abgesaugt und der im Kolben verbliebene Feststoff durch leichtes Erwärmen im Wasserbad getrocknet. Das Zwischenprodukt wurde mit einer 1.3 M KOH-Lösung (75 ml) versetzt und 1 h bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlen des Gemisches im Eisbad, wurde langsam, unter starkem Rühren bei 0 °C, 12 M Salzsäure bis pH = 1 mittels Tropftrichter zugegeben. Der ausfallende Niederschlag wurde über eine Glasfritte abgesaugt und im Luftstrom getrocknet. Es wurde ein orangenes, pulverförmiges Rohprodukt (5.39 g, 21.08 mmol, 88 %) erhalten. Die analytischen Daten stammen von einem S-Me Derivat, welches durch Reaktion mit Methyljodid erhalten werden kann [136].

IR (KBr): 3418br, 1684s, 1568vs, 1469s, 1429w, 1364s, 1300s, 1257w, 1228m, 1192m, 1174m, 1109w, 1085s, 957w, 923w, 853w, 804m, 778m, 724w, 685w, 659m, 617s, 592w, 559w cm⁻¹.

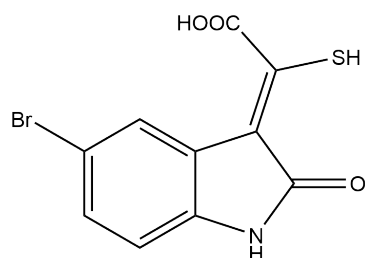
¹H-NMR (DMSO-D₆): δ = 10.23 (s, 1H), 7.49 (d, J= 1.9, 1H), 7.1 (dd, J= 1.9, 8.25, 1H), 6.75 (d, J= 8.25, 1H), 2.46 (s, 3H) ppm

¹³C-NMR (DMSO-D₆): δ = 165.6, 163.8, 163.2, 138.2, 126.2, 125.7, 124.3, 121.9, 110.9, 109.9, 14.9 ppm

FAB-HRMS (%): 270(0.83), 271(0.17), 272(0.36), 273(0.18).

CI-HRMS (%): 241(9), 240(9), 239(22), 228(18), 227(40), 226(54), 225(100), 224(3), 210(12), 206(6), 196(3), 194(11), 192(27), 180(20), 179(4), 178(34), 164(18), 163(2).

(Z)-2-(5-bromo-2-oxoindolin-3-ylidene)-2-mercaptoessigsäure (7c)

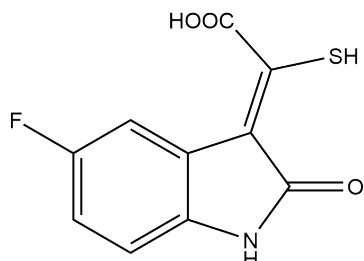


5-Brom-Isatin (6.5 g, 30 mmol, 1 eq.) und Rhodanin (4.0 g, 30 mmol, 1 eq.) wurden in 35 mL Pyridin in einem 250 mL Rundkolben gelöst und mit 2 mL Wasser versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 40 mL THF zugegeben und für 2 h zum Sieden unter Rückfluss erhitzt. Nach erfolgter Reaktion wurde das Gemisch im Eisbad abgekühlt. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Vakuumfiltration abgetrennt. Das Produkt wurde im Abzug über Nacht zum Trocknen stehen gelassen und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

Es wurden 4.8 g NaOH in 50 mL Wasser gelöst und das Zwischenprodukt zugeben. Die Suspension wurde auf 60 °C erwärmt und die Temperatur für 1 h gehalten. Das Gemisch wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 30 mL HCl (5 M) angesäuert. Es wurde mit 150 mL Wasser verdünnt, um eine bessere Homogenität der Suspension zu erhalten. Bei pH = 1 wurde der

ausgefallene Feststoff mittels Vakuumfiltration isoliert und im Abzug über Nacht zum Trocknen stehen gelassen. Ausbeute: 6.6 g (22 mmol, 74 %). Intensiv roter Feststoff.

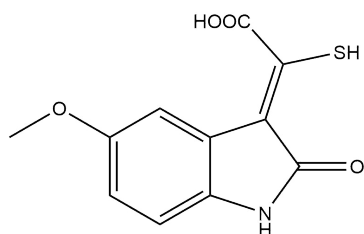
2-(5-fluoro-2-oxoindolin-3-ylidene)-2-mercaptoessigsäure (7d)



5-Fluor-Isatin (5.14 g, 30 mmol, 1 eq.) und Rhodanin (4.0 g, 30 mmol, 1 eq.) wurden in 35 mL Pyridin in einem 250 mL Rundkolben gelöst und mit 2 mL Wasser versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 40 mL THF zugegeben und für 2 h zum Sieden unter Rückfluss erhitzt. Nach erfolgter Reaktion wurde das Gemisch im Eisbad abgekühlt. Der ausgefallene Feststoff wird durch Vakuumfiltration abgetrennt. Das Produkt wurde im Abzug über Nacht zum Trocknen stehen gelassen und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

Es wurden 4.8 g NaOH in 50 mL Wasser gelöst und das Zwischenprodukt zugegeben. Die Suspension wurde auf 60 °C erwärmt und die Temperatur für 1 h gehalten. Das Gemisch wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 30 mL HCl (5 M) angesäuert. Es wurde mit 150 mL Wasser verdünnt, um eine bessere Homogenität der Suspension zu erhalten. Bei pH = 1 wurde der ausgefallene Feststoff mittels Vakuumfiltration isoliert und im Abzug über Nacht zum Trocknen stehen gelassen. Ausbeute: 5.8 g (24.25 mmol, 81 %). Roter Feststoff.

(Z)-5-(5-methoxy-2-oxoindolin-3-ylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one (7e)

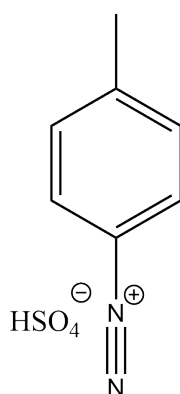


5-Methoxyisatin (5 g, 30 mmol, 1 eq.) und Rhodanin (4.0 g, 30 mmol, 1 eq.) wurden in 35 mL Pyridin in einem 250 mL Rundkolben gelöst und mit 2 mL Wasser versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 40 mL THF zugegeben und für 2 h zum

Sieden unter Rückfluss erhitzt. Nach erfolgter Reaktion wurde das Gemisch im Eisbad abgekühlt. Der ausgefallene Feststoff wurde durch Vakuumfiltration abgetrennt. Das Produkt wurde im Abzug über Nacht zum Trocknen stehen gelassen und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

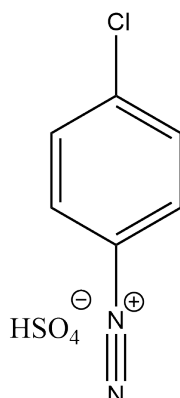
Es wurden 4.8 g NaOH in 50 mL Wasser gelöst und das Zwischenprodukt zugegeben. Die Suspension wurde auf 60 °C erwärmt und die Temperatur für 1 h gehalten. Das Gemisch wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 30 mL HCl (5 M) angesäuert. Es wurde mit 150 mL Wasser verdünnt, um eine bessere Homogenität der Suspension zu erhalten. Bei pH = 1 wurde der ausgefallene Feststoff mittels Vakuumfiltration isoliert und im Abzug über Nacht zum Trocknen stehen gelassen. Ausbeute: 5.8 g (24.25 mmol, 81 %). Roter Feststoff.

4-Methylbenzoldiazoniumhydrogensulfat (8a)



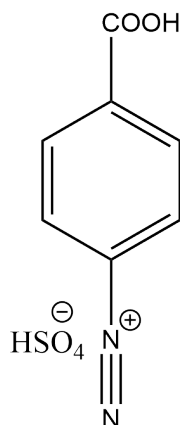
p-Toluidin (2.04 g, 19 mmol, 1 eq.) wurde in 43 mL Wasser gelöst und mit 2 mL H₂SO₄ (konz.) versetzt. Unter Eiskühlung wurde eine Lösung aus NaNO₂ (2.5 g, 36 mmol, 1.9 eq.) und 5 mL Wasser zugetropft. Die Temperatur der Lösung darf hierbei nicht über 8 °C steigen. Die Lösung wurde im Kühlschrank bei 7 °C über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag für die weiteren Umsetzungen verwendet.

4-Chlorobenzoldiazoniumhydrogensulfat (8b)



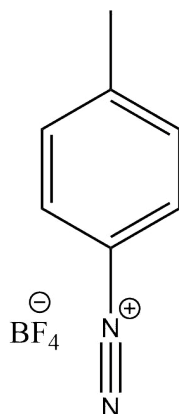
p-Chloranilin (2.42 g, 19 mmol, 1 eq.) wurde in 43 mL Wasser gelöst und mit 2 mL H₂SO₄ (konz.) versetzt. Unter Eiskühlung wurde eine Lösung aus NaNO₂ (2.5 g, 36 mmol, 1.9 eq.) und 5 mL Wasser zugetropft. Die Temperatur der Lösung darf hierbei nicht über 8 °C steigen. Die Lösung wurde im Kühlschrank bei 7 °C über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag für die weiteren Umsetzungen verwendet.

4-Carboxybenzoldiazoniumhydrogensulfat (8c)



4-Aminobenzoesäure (2.61 g, 19 mmol, 1 eq.) wurde in 43 mL Wasser gelöst und mit 2 mL H₂SO₄ (konz.) versetzt. Unter Eiskühlung wurde eine Lösung aus NaNO₂ (2.5 g, 36 mmol, 1.9 eq.) und 5 mL Wasser zugetropft. Die Temperatur der Lösung darf hierbei nicht über 8 °C steigen. Die Lösung wurde im Kühlschrank bei 7 °C über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag für die weiteren Umsetzungen verwendet.

4-Methylbenzoldiazoniumtetrafluoroborat (8d)

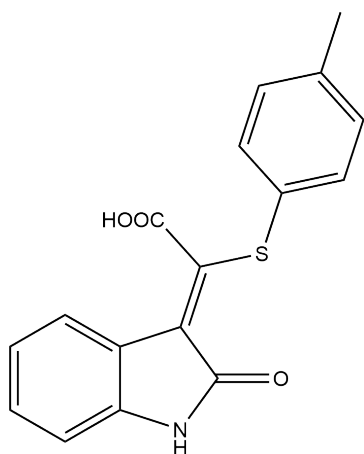


p-Toluidin (1.07 g, 10 mmol, 1 eq.) wurde in 4 mL Wasser gelöst und mit 2 mL HBF₄ versetzt. Unter Eiskühlung wurde eine Lösung aus NaNO₂ (0.69 g, 10 mmol, 1 eq.) und 5 mL Wasser zugetropft. Die Temperatur der Lösung darf hierbei nicht über 8 °C steigen. Die Lösung wurde im Kühlschrank bei 7 °C über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag für die weiteren Umsetzungen verwendet.

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von 2-(2-oxoindolin-3-ylidene)-2-(phenylthio)essigsäure Verbindungen

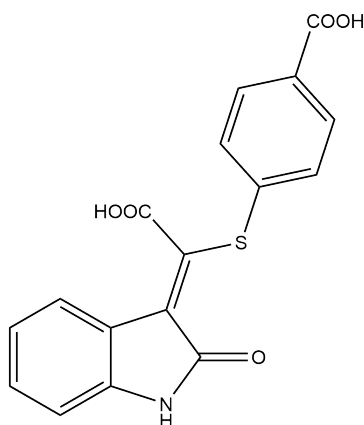
2-Mercapto-2-(2-oxoindolin-3-ylidene)essigsäuren wurden in NaOH (5 mL, 2 M) gelöst und mit 60 mL H₂O verdünnt. Anschließend wurden die jeweiligen Diazoniumsalzlösungen tropfenweise bei 60 °C zugegeben, wobei eine schnelle Gasentwicklung (N₂) einsetzte. Nach vollendeter Zugabe wurde das Gemisch 1 h bei 60 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Suspension filtriert und das Filtrat mit HCl 2 M angesäuert, bis sich ein brauner Niederschlag bildete. Dieser wurde durch Vakuumfiltration abgetrennt, mit wenig Wasser nachgewaschen und zum Trocknen über Nacht im Abzug stehen gelassen.

2-(2-Oxoindolin-3-yliden)-2-(p-tolylthio)essigsäure (9a)



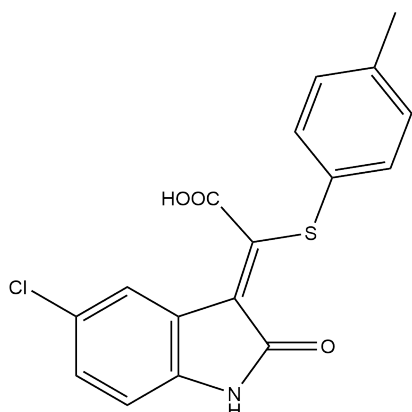
7a (243 mg, 1.1 mmol, 1 eq.) wurde mit 8a (19 mmol, 17 eq.) anhand der allgemeinen Synthesvorschrift umgesetzt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

4-((Carboxy(2-oxoindolin-3-yliden)methyl)thio)benzoesäure (9b)



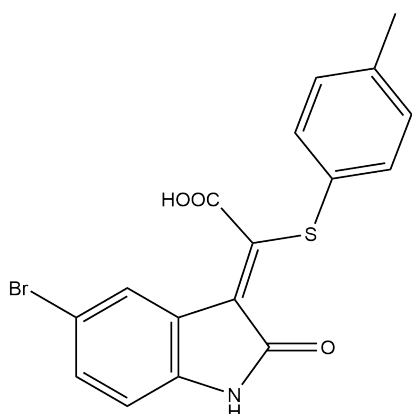
7a (243 mg, 1.1 mmol, 1 eq.) wurde mit 8c (19 mmol, 17 eq.) anhand der allgemeinen Synthesvorschrift umgesetzt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

2-(5-chloro-2-oxoindolin-3-yliden)-2-(p-tolylthio)essigsäure (9c)



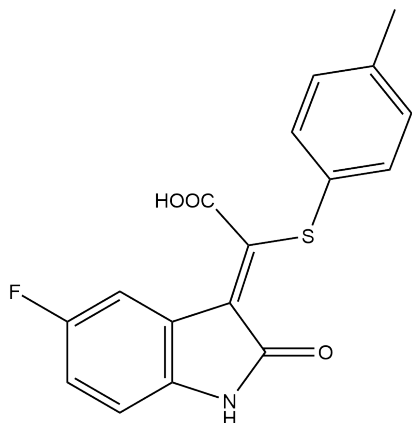
In einem Dreihalskolben wurde 7b (500 mg 2 mmol, 1 eq.) in einer Mischung aus 20 mL H₂O und 50 mL EtOH gelöst. Anschließend wurde 1 mL NaOH (2 M) zugegeben. 8d (400 mg 2 mmol, 1 eq.) in 15 mL H₂O und 0.1 mL NaOH (2 M) wurde tropfenweise bei 60 °C zugegeben. Der pH Wert wurde während der gesamten Reaktion durch die Zugabe von NaOH-Lsg. konstant über 7 gehalten. Nach beendeter Zugabe des Diazoniumsalzes wurde für 1 h bei 60 °C gerührt. Ethanol wurde unter vermindertem Druck entfernt und der pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOH-Lsg. auf 14 eingestellt. Die entstandene Suspension wurde filtriert und das Filtrat mit HCl (2 M) angesäuert, bis sich ein gelber Niederschlag bildete. Das Produkt wurde durch Vakuumfiltration abgetrennt und mit wenig Wasser nachgewaschen. Es wurde ein gelb/beiges Pulver (296 mg, 0.85 mmol, 44 %) erhalten, welches ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt wurde.

2-(5-bromo-2-oxoindolin-3-yliden)-2-(p-tolylthio)essigsäure (9d)



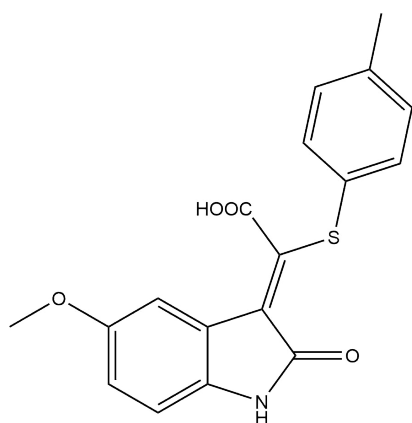
7c (1.4 g, 4.7 mmol, 1 eq.) wurde mit 8a (30 mL, 11 mmol, 2.75 eq.) anhand der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt. Das Produkt wurde als gelbes Pulver (184 mg, 0.47 mmol, 10 %) erhalten, welches ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt wurde.

2-(5-fluoro-2-oxoindolin-3-ylidene)-2-(p-tolylthio)essigsäure (9e)



7d (1.0 g, 4.2 mmol, 1 eq.) wurde mit 8a (25 mL, 9.5 mmol, 2.4 eq.) anhand der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt. Das Produkt wurde als gelbes Pulver (51 mg, 0.15 mmol, 3.7 %) erhalten, welches ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt wurde.

(Z)-2-(5-methoxy-2-oxoindolin-3-ylidene)-2-(p-tolylthio)essigsäure (9f)

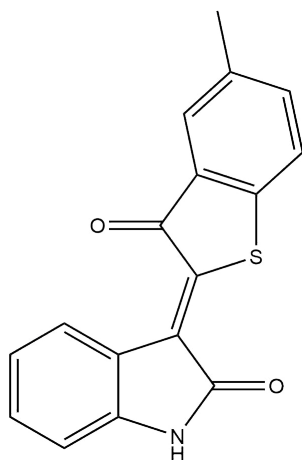


7e (1.0 g, 4 mmol, 1 eq.) wurde mit 8a (25 mL, 9.5 mmol, 2.4 eq.) anhand der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt. Das Produkt wurde als gelbes Pulver (83 mg, 0.24 mmol, 6.1 %) erhalten, welches ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt wurde.

Allgemeine Vorschrift zur Cyclisierung zu Thioindirubinen

Substanzen 9a-f wurden in einem 100 mL Rundkolben mit Polyphosphorsäure (PPA) versetzt und für 2 h bei 110°C erhitzt. Anschließend wurde die heiße Mischung auf ca. 50 g Eis gegossen, 1 h gerührt, über einen Faltenfilter filtriert und mit Wasser gewaschen. Das im Faltenfilter befindliche Produkt wurde durch eine Soxhlett-Extraktion mit Aceton aus dem Faltenfilter gewonnen. Nach Entfernen des Lösungsmittels konnten die Thioindirubine erhalten werden.

(Z)-(5-methyl-3-oxobenzo[b]thiophen-2(3H)-ylidene)indolin-2-on (10a)

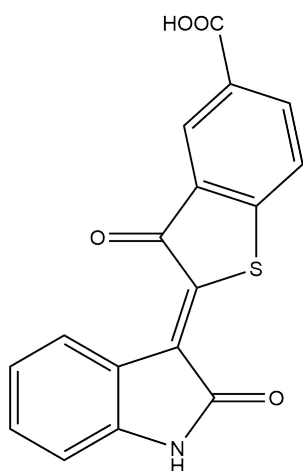


43 mg 9a wurden anhand der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie weiter aufgereinigt (SiO₂, 1:1 Toluol/Aceton). Rohausbeute: 58 mg (20 mmol, 24 %).

HRMS-TOF (m/z): gemessen: 294.0578 [M+H]⁺, calcd: 294.0583 ppm.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.11 (s, 1H), 9.02 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 1.7, 5.5 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.57 (dd, J = 8.1, 1.8 Hz, 1H), 7.41 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.08 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 2.39 (s, 3H).

(Z)-3-oxo-2-(2-oxoindolin-3-ylidene)-2,3-dihydrobenzo[b]thiophen-5-carbonsäure (10b)

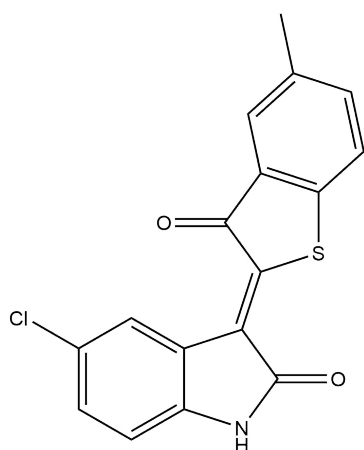


9b wurde anhand der allgemeinen Synthesevorschrift umgesetzt. Ausbeute 56 mg (0.17 mmol, 32 %).

HRMS-TOF (m/z): gemessen: 322.0172 [M-H]⁻, calcd.: 322.0180 ppm.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.05 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 7.86 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.80 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 7.8 Hz, 2H).

(Z)-5-chloro-3-(5-methyl-3-oxobenzo[b]thiophen-2(3H)-ylidene)indolin-2-on (10c)

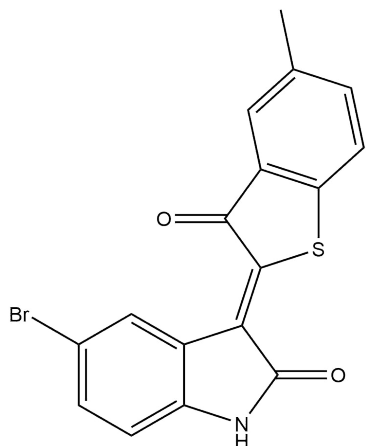


9c (106 mg, 0.31 mmol) wurde anhand der allgemeinen Synthesevorschrift mit 18 g PPA umgesetzt. Das Rohprodukt wurde weiter aufgereinigt durch Flash-Chromatography (SiO₂ 40 g, 1:9 MeOH/DCM). Ausbeute 11.3 mg (0.034 mmol, 11 %). Tiefroter Feststoff.

HRMS-TOF (m/z): gemessen 326,0041 [M-H]⁻, calcd.: 326.0048.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.25 (s, 1H), 9.06 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.71 – 7.69 (m, 1H), 7.65 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.61 – 7.57 (m, 1H), 7.47 (dd, $J = 8.3, 2.3$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 2.39 (s, 3H).

(Z)-5-bromo-3-(5-methyl-3-oxobenzo[b]thiophen-2(3H)-ylidene)indolin-2-on (10d)

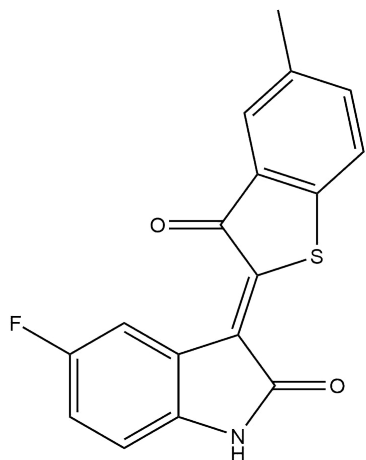


9d (92.1 mg, 0.31 mmol) wurde anhand der allgemeinen Synthesevorschrift mit 13 g PPA umgesetzt. Das Rohprodukt wurde weiter aufgereinigt durch Flash-Chromatography (SiO_2 40 g, 1:9 MeOH/DCM). Ausbeute 52.1 mg (0.14 mmol, 43 %). Tiefroter Feststoff.

HRMS-TOF (m/z): gemessen: 369.9538 $[\text{M-H}]^-$, calcd.: 369.9543 ppm.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.24 (s, 1H), 9.19 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.64 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.57 (dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz, 2H), 6.92 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 2.38 (s, 3H).

(Z)-5-fluoro-3-(5-methyl-3-oxobenzo[b]thiophen-2(3H)-ylidene)indolin-2-on (10e)

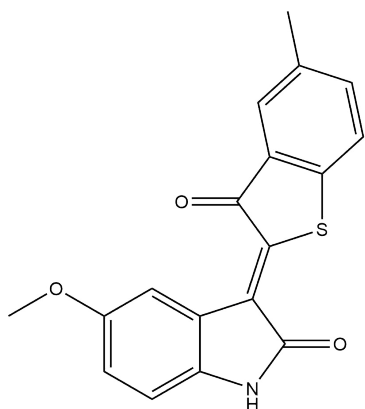


9e (25.4 mg, 0.077 mmol) wurde anhand der allgemeinen Synthesevorschrift mit 17 g PPA umgesetzt. Das Rohprodukt wurde weiter aufgereinigt durch Flash-Chromatography (SiO₂ 40 g, 1:9 MeOH/DCM). Ausbeute 11.3 mg (0.036 mmol, 47 %). Tiefroter Feststoff.

HRMS-TOF (m/z): gemessen 310.0338 [M-H]⁻, calcd.: 310.0344.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.12 (s, 1H), 8.80 (dd, J = 10.5, 2.7 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.63 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.60 – 7.54 (m, 1H), 7.27 (td, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 6.94 (dd, J = 8.6, 4.7 Hz, 1H), 2.38 (s, 3H).

(Z)-5-methoxy-3-(5-methyl-3-oxobenzo[b]thiophen-2(3H)-ylidene)indolin-2-on (10f)



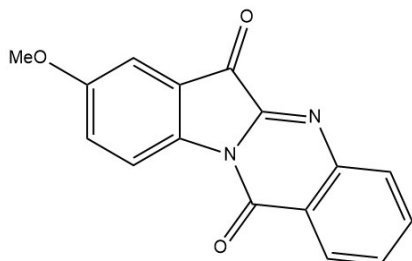
9f (40.3 mg, 0.12 mmol) wurde anhand der allgemeinen Synthesevorschrift mit 19 g PPA umgesetzt. Das Rohprodukt wurde weiter aufgereinigt durch Flash-Chromatography (SiO₂ 40 g, 1:9 MeOH/DCM). Ausbeute 7.6 mg (0.024 mmol, 20 %). Schwarzvioletter Feststoff.

HRMS-TOF (m/z): gemessen: 324.0702 [M+H]⁺, calcd.: 324.0689 ppm.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.91 (s, 1H), 8.72 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.72 – 7.65 (m, 1H), 7.61 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.55 (dd, J = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 7.01 (dd, J = 8.6, 2.7 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.37 (s, 3H).

5.3.2 Qingdainonsynthesen

8-Methoxytryptanthrin (11a)

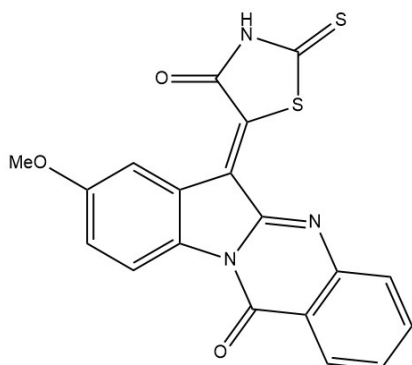


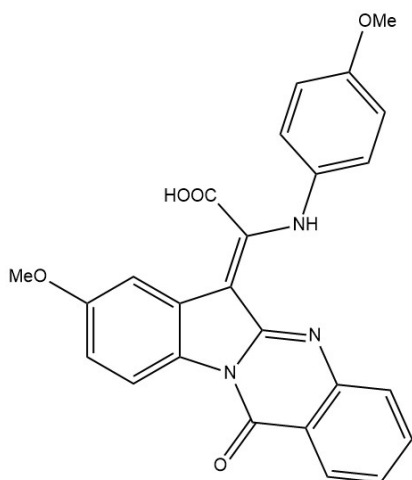
In einem Rundkolben wurde N-methylpiperidin (0.2 mL, 1.65 mmol, 0.03 eq.), N,N'-Diisopropylcarbodiimid (5 mL, 23.29 mmol, 0.65 eq.) und 35 mL Pyridin auf 65 °C vorgeheizt. Anschließend wurden 5-Methoxyisatin (8.86 g, 0.5 mol, 1 eq.) und Isatosäureanhydrid (8.15 g, 0.5 mol, 1 eq.) zugegeben. Die Mischung wurde langsam auf 120 °C erhöht und solange unter Rückfluss erhitzt, bis eine deutlich sichtbare Menge an Feststoff ausgefallen war (ca. 1 h–2 h). Es wurde weiter refluxiert für 15 min um die Reaktion zu vervollständigen. Nach Abkühlen der Mischung, wurde das Produkt durch Vakuumfiltration und Waschen mit MeOH isoliert. Ausbeute: 7.67 g (28 mmol, 56 %). Intensiv orange Nadeln.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.36 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 8.29 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 3.7$ Hz, 2H), 7.73 (dq, $J = 8.2, 4.4$ Hz, 1H), 7.45 – 7.36 (m, 2H), 3.86 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 182.35, 157.98, 157.28, 146.42, 145.37, 139.91, 134.96, 129.88, 129.81, 126.79, 123.73, 123.40, 118.23, 108.47, 99.46, 56.03.

(Z)-5-(8-methoxy-12-oxoindolo[2,1-b]quinazolin-6(12H)-yliden)-2-thioxothiazolidin-4-on (11b)

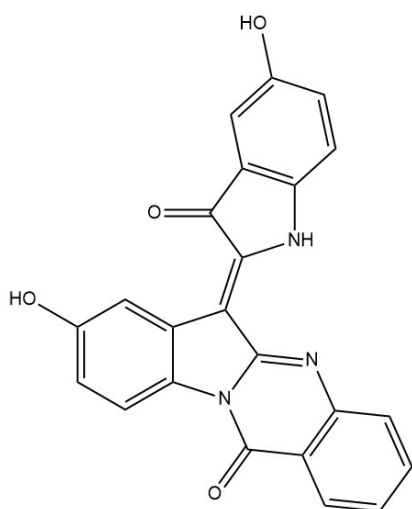


(Z)-2-(8-methoxy-12-oxoindolo[2,1-b]quinazolin-6(12H)-yliden)-2-((4-methoxyphenyl)amino)essigsäure (11d)

11c (333 mg, 0.95 mmol, 1 eq.) wurde mit frisch sublimiertem p-Anisidin (2 g, 16.24 mmol, 17.09 eq.) in einen Erlenmeyerkolben mit Schliff eingewogen und auf 100 °C unter Rühren erhitzt. Das Starten der Reaktion kann an einer entstehenden Gelbfärbung und dem Geruch von H₂S erkannt werden. p-Anisidin, welches aus der Reaktion entweicht und sich am oberen Glasrand des Kolbens abscheidet, wurde mit einem Spatel ca. alle 10 min zur Mischung zurückgeführt. Nach 1 h wurde das Ölbad auf 80 °C temperiert und eine Sublimationsapparatur mit Kühlfinger aufgesetzt um überschüssiges p-Anisidin bei 7 mbar aus der Reaktion zu entfernen. Sobald sich im Kolben anstatt der Schmelze ein gelbbrauner Feststoff bildet (ca. 1 h), wurde die Sublimation abgebrochen und 10 mL 10 %ige NaOH-Lösung hinzugegeben. An der Wand haftender Feststoff kann mit einem Spatel oder durch Behandlung im Ultraschallbad dispergiert werden. Die Suspension wurde für 1 h gerührt und anschließend filtriert. Der Feststoff im Faltenfilter wurde gesammelt und erneut bei 130 °C und 10⁻³ mbar für 6 h einer Sublimation ausgesetzt, sodass restliches p-Anisidin entweicht und das Produkt als dunkelgelbes Pulver erhalten wurde. Ausbeute: 330 mg (0.75 mmol, 79 %).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.47 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.25 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 3.2 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.47 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.41 – 7.29 (m, 1H), 6.97 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 6.80 (dd, J = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.78 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ 163.51, 158.99, 157.99, 157.30, 156.61, 153.55, 147.80, 133.85, 132.62, 128.63, 127.03, 126.49, 125.72, 123.27, 121.74, 117.44, 116.06, 114.68, 107.79, 104.80, 55.58.

(Z)-8-hydroxy-6-(5-hydroxy-3-oxoindolin-2-yliden)indolo[2,1-b]quinazolin-12(6H)-on (11e)

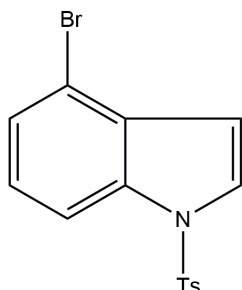
11d (52 mg, 0.13 mmol) wurde mit 18 g Polyphosphorsäure für 6 h bei 130 °C umgesetzt. Im Anschluss wurde die noch heiße Reaktionsmischung auf ca. 200 g Eis gegossen und für 2 h gerührt. Das Produkt war vollständig gelöst in der resultierenden verdünnten Phosphorsäure. Zur Extraktion wurden 15 g XAD 1880N zugegeben und für 24 h bei RT gerührt. Das Adsorptionsmaterial wurde durch Vakuumfiltration abgetrennt und mit wenig Wasser gewaschen. Das Produkt konnte mit MeOH aus der Festphase eluiert werden. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt weiter durch Flash-Chromatography aufgereinigt (Götec C₁₈ 10g, 100:0 H₂O/MeOH bis 0:100 H₂O/MeOH). Ausbeute: 1.2 mg (0.003 mmol, 2 %).

HRMS-TOF (m/z): 394.0914 [M-H]⁻, calcd.: 394.0833.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 8.29 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.06 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.80 – 6.67 (m, 3H), 6.47 (d, J = 8.7 Hz, 1H).

5.3.3 Synthese von (-)-Indolactam V

N-Tosyl-4-Bromindol (12a)

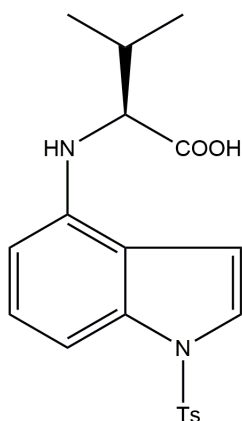


4-Bromindol (14.32 g, 73.42 mmol, 1 eq.), p-TsCl (16.64 g, 87.26 mmol, 1.2 eq.) und Tetrabutylammoniumhydrogencarbonat (1.21 g, 3.57 mmol, 0.05 eq.) wurde in 90 mL Toluol gelöst. Es wurden 90 mL 28 % NaOH-Lsg. zugegeben und für 10 min stark gerührt, sodass eine gute Durchmischung beider Phasen vorhanden war. Anschließend wurde für 2.5 h bei 60 °C unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde nach dem Abkühlen mit 250 mL Toluol und 250 mL Wasser verdünnt und in einen Scheidetrichter überführt. Die organische Phase wurde abgetrennt und mit jeweils 250 mL Wasser und ges. Kochsalzlösung gewaschen. Das Produkt konnte nach Entfernen des Lösungsmittels und Umkristallisation in 200 mL EtOAc isoliert werden. Ausbeute: 19.32 g (55.33 mmol, 76 %). Beiger kristalliner Feststoff.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.94 (dd, $J = 8.3, 0.7$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J = 7.8, 0.7$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.17 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 2.35 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, Chloroform-d) δ 145.46, 135.16, 131.52, 130.14, 127.00, 126.34, 125.65, 115.13, 112.71, 108.94, 21.73.

(1-tosylindolin-4-yl)-L-valin (12b)

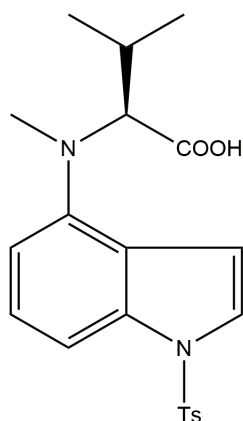


N-Tosyl-4-Bromindol (640 mg, 1.82 mmol, 1 eq.), L-Valin (256 mg, 2.18 mmol, 1.2 eq.), CsCO₃ (889 mg, 2.13 mmol, 1.17 eq.) und CuI (34.7 mg, 0.18 mmol, 0.10 eq.) wurden in einem trockenem Schlenkrohr unter Argonatmosphäre eingewogen und in 3.64 mL trockenem DMSO gelöst. Die Lösung wurde für 20 h bei 90 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Mischung über Silicagel filtriert und mit MeOH eluiert. Nach Entfernen des Methanols am Rotationsverdampfer wurde das DMSO durch einen Glasofen Kugelrohr bei ca. 10⁻² mbar und 80 °C für 2 h abgetrennt. Das Rohprodukt wurde weiter aufgereinigt durch Flash Chromatography (SiO₂, 40 g, 5:64:30:1 MeOH/Hexan/EtOAc/HCOOH). Ausbeute 540 mg (1.40 mmol, 77 %). Brauner Feststoff.

HRMS-TOF (m/z): 385.1231 [M-H]⁻, calcd.: 385.1228.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 7.76 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.48 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 8.5 Hz, 3H), 7.08 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 6.36 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 3.82 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 2.35 (s, 3H), 2.18 (dq, J = 13.5, 6.8 Hz, 1H), 1.08 (dd, J = 19.2, 6.8 Hz, 6H).
¹³C NMR (101 MHz, Methanol-d₄) δ 177.31, 146.51, 142.67, 137.16, 136.55, 130.86, 127.92, 126.85, 125.06, 120.62, 107.16, 104.95, 104.42, 63.95, 32.20, 21.45, 19.54.

N-methyl-N-(1-tosylindolin-4-yl)-L-valin (12c)



12b (532 mg, 1.38 mmol, 1 eq.), Trioxan (372 mg, 4.13 mmol, 3 eq.) und Et₃SiH (2 mL, 13.77 mmol, 10 eq.) wurde unter Argon Atmosphäre in einem trockenen Rundkolben in 3 mL DCM gelöst. Es wurde 1 mL TFA durch ein Septum hinzugegeben und die Mischung für 48 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit 20 mL H₂O gequench und 3-mal mit jeweils 20 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde weiter aufgereinigt durch Flash Chromatography (SiO₂, 40 g, 68:31:1 Hexan/EtOAc/HCOOH). Ausbeute 357 mg (0.89 mmol, 68 %). Brauner Feststoff.

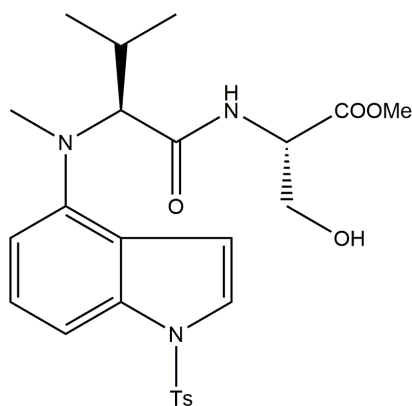
HRMS-TOF: 399.1379 [M-H]⁻, calcd.: 399.1384.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 7.82 – 7.74 (m, 2H), 7.57 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.15 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.79 (d,

$J = 7.9$ Hz, 1H), 3.79 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 2.98 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.32 – 2.24 (m, 1H), 0.95 (d, $J = 10.0$ Hz, 6H).

^{13}C NMR (101 MHz, Methanol- d_4) δ 175.11, 147.78, 146.86, 137.90, 136.70, 131.15, 128.20, 126.45, 125.81, 124.53, 112.96, 109.33, 107.87, 72.78, 34.88, 29.52, 21.67, 20.24, 20.09.

Methyl N-methyl-N-(1-tosylindolin-4-yl)-L-valyl-L-serinat (12d)



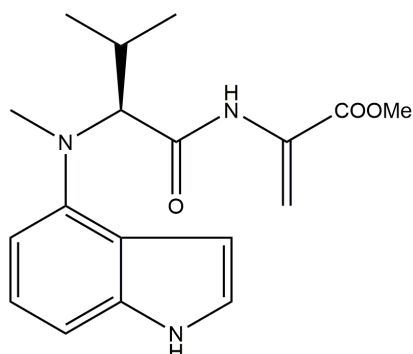
L-Ser-OMe·HCl (132 mg, 0.85 mmol, 1 eq.) wurde in einem trockenem Rundkolben unter Argonatmosphäre in 8 mL DCM gelöst. Es wurde Triethylamin (255 μL , 1.87 mmol, 2.2 eq.) zugegeben und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde bei 0 °C 12c (340 mg, 0.85 mmol, 1 eq.) in 3 mL DCM, EDC (195 mg, 1.02 mmol, 1.20 eq.) und HOBT (138 mg, 1.02 mmol, 1.2 eq.) zur Mischung hinzugefügt und 16 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit 20 mL H_2O gequench und 3-mal mit jeweils 15 mL DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde weiter aufgereinigt durch Flash Chromatography (SiO_2 , 40 g, 8:2 Hexan/EtOAc). Ausbeute 283 mg (0.58 mmol, 68 %). Farbloser Feststoff.

HRMS-TOF (m/z): 470.1759 [M-H] $^-$, calcd.: 470.1755.

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 7.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 7.21 (t, $J = 8.2$ Hz, 3H), 6.78 (dd, $J = 17.1, 5.6$ Hz, 2H), 5.87 (s, 1H), 4.53 (dt, $J = 7.4, 3.5$ Hz, 1H), 3.79 – 3.62 (m, 5H), 3.57 (s, 1H), 2.84 (s, 3H), 2.48 – 2.36 (m, 1H), 2.34 (s, 3H), 1.59 (s, 1H), 1.17 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform- d) δ 170.71, 169.63, 145.35, 136.60, 135.50, 130.26, 127.15, 125.76, 125.39, 124.10, 113.19, 108.42, 107.37, 73.11, 63.62, 54.37, 52.87, 27.33, 21.89, 20.08, 19.72.

Methyl (S)-2-(3-methyl-2-(methyl(1-tosylindolin-4-yl)amino)butanamido)acrylat (12e)



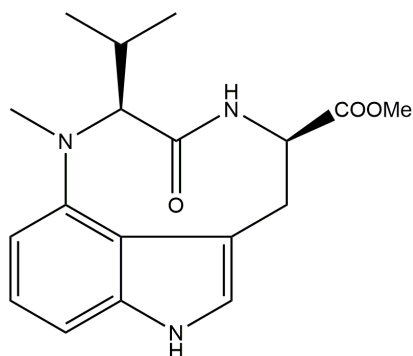
In einem trockenen Rundkolben wurde unter N₂-Atmosphäre Mg-Späne (100 mg, 4.16 mmol, 21 eq.) eingewogen. 12d (100 mg, 0.20 mmol, 1 eq.) wurde in 5 mL MeOH gelöst und zugegeben. Die Mischung wurde für 7 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit 10 mL ges. NH₄Cl gequenchet und 3-mal mit jeweils 6 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde weiter aufgereinigt durch Flash Chromatography (SiO₂, 12 g, 6:4 Hexan/EtOAc). Ausbeute: 17 mg (0.052 mmol, 26 %). Grüner Feststoff.

HRMS-TOF (m/z): 330.1823 [M+H]⁺, calcd.: 330.1812.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.31 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.18 (t, J = 2.9 Hz, 1H), 7.13 – 7.05 (m, 2H), 6.69 (s, 1H), 6.65 – 6.61 (m, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 4.13 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 2.91 (s, 3H), 2.45 (dq, J = 13.7, 6.8 Hz, 1H), 1.15 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 1.03 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 170.13, 164.11, 137.53, 130.88, 123.11, 122.82, 120.70, 109.56, 108.80, 106.11, 101.23, 72.48, 52.77, 36.27, 29.78, 27.70, 19.97.

Methyl (2S,5S)-2-isopropyl-1-methyl-3-oxo-8-tosyl-2,3,4,5,6,6a,7,8-octahydro-1H-[1,4]diazonino[7,6,5-cd]indole-5-carboxylat (12f)



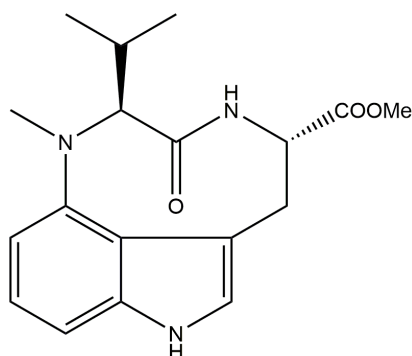
In einer Glovebox wurde unter N₂-Atmosphäre ZrCl₄ (1.107 g, 4.77 mmol, 15 eq.) eingewogen. 12e (104 mg, 0.32 mmol, 1 eq.) wurde in 3.2 mL trockenem DCM gelöst und über eine Spritze hinzugefügt. Es wurde für 16 h bei 34 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung tropfenweise zu 50 mL ges. NHCO₃ bei 0 °C gegeben. Die resultierende Suspension wurde über Celite filtriert und mit 50 mL EtOAc eluiert. Das Filtrat wurde in einen Scheidetrichter überführt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde 2-mal mit jeweils 50 mL EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Extrakte wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde weiter aufgereinigt durch Flash Chromatography (SiO₂, 12 g, 6:4 Hexan/EtOAc). Ausbeute: 31 mg (0.11 mmol, 35 %). Grüner Feststoff.

HRMS-TOF (m/z): 330.1796 [M+H]⁺, calcd.: 330.1812.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.53 (s, 1H), 7.09 – 6.90 (m, 3H), 6.74 (dd, J = 23.8, 7.3 Hz, 2H), 4.51 (dt, J = 6.9, 3.4 Hz, 1H), 3.91 (s, 4H), 3.46 (dd, J = 15.4, 3.0 Hz, 1H), 3.32 (dd, J = 15.5, 3.9 Hz, 1H), 3.12 (s, 3H), 2.74 – 2.58 (m, 1H), 0.73 (dd, J = 22.3, 6.6 Hz, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ 172.68, 172.59, 147.83, 138.52, 123.14, 122.46, 120.41, 112.96, 109.64, 105.70, 69.78, 57.44, 53.20, 35.23, 32.54, 28.51, 20.55, 20.12.

Methyl (2S,5R)-2-isopropyl-1-methyl-3-oxo-8-tosyl-2,3,4,5,6,6a,7,8-octahydro-1H-[1,4]diazonino[7,6,5-cd]indole-5-carboxylat (12g)

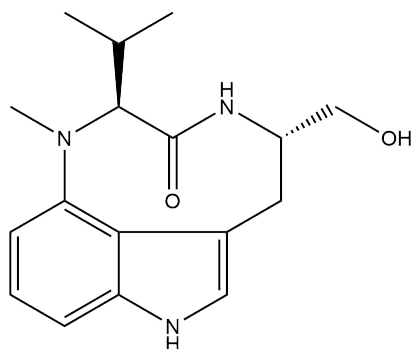


12f (19 mg, 0.058 mmol, 1 eq.) und NHCO₃ (134 mg, 1.60 mmol, 27.59 eq.) wurde unter Argon Atmosphäre in einem trockenen Rundkolben in 3.9 mL trockenem MeOH gelöst und für 3 d bei 40 °C gerührt. Die Reaktion wurde mit 10 mL H₂O gequencht und 4-mal mit jeweils 10 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde weiter aufgereinigt durch Flash Chromatography (SiO₂, 40 g, 8:2 MeCN/Toluol). Ausbeute 11 mg (0.034 mmol, 58 %). Grüner Feststoff.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 8.36 (s, 2H), 8.17 (s, 2H), 7.27 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 0.8 Hz, 2H), 7.19 – 7.11 (m, 4H), 7.09 – 7.01 (m, 5H), 6.91 (d, J = 2.4 Hz, 4H), 6.76 (s, 2H), 6.54 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 5.25 (d, J = 10.6 Hz, 2H), 5.17 – 5.07 (m, 5H), 4.28 (d, J = 10.1 Hz,

3H), 3.75 (s, 7H), 3.68 (d, $J = 7.3$ Hz, 13H), 3.28 (t, $J = 11.2$ Hz, 3H), 3.23 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H), 3.16 (dd, $J = 14.5, 2.1$ Hz, 3H), 3.05 (d, $J = 10.9$ Hz, 3H), 2.90 (s, 6H), 2.76 – 2.56 (m, 11H), 2.46 – 2.25 (m, 8H), 0.94 (d, $J = 6.5$ Hz, 16H), 0.64 (d, $J = 6.8$ Hz, 7H).

(-)-Indolactam V (12h)



In einer Glovebox wurden 12g (30 mg, 0.096 mmol, 1 eq.) und LiBH_4 4M in THF (28 μL , 0.96 mmol, 10 eq.) in einem trockenen Rundkolben in 672 μL trockenem THF gelöst. Der Kolben wurde aus der Glovebox ausgeschleust und für 5 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit 3 mL H_2O bei 0 °C gequencht und 3-mal mit jeweils 2 mL DCM extrahiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde weiter aufgereinigt durch Flash Chromatography (SiO_2 , 12 g, 3:7 Hexan/EtOAc). Ausbeute 11 mg (0.036 mmol, 38 %). Farbloser Feststoff.

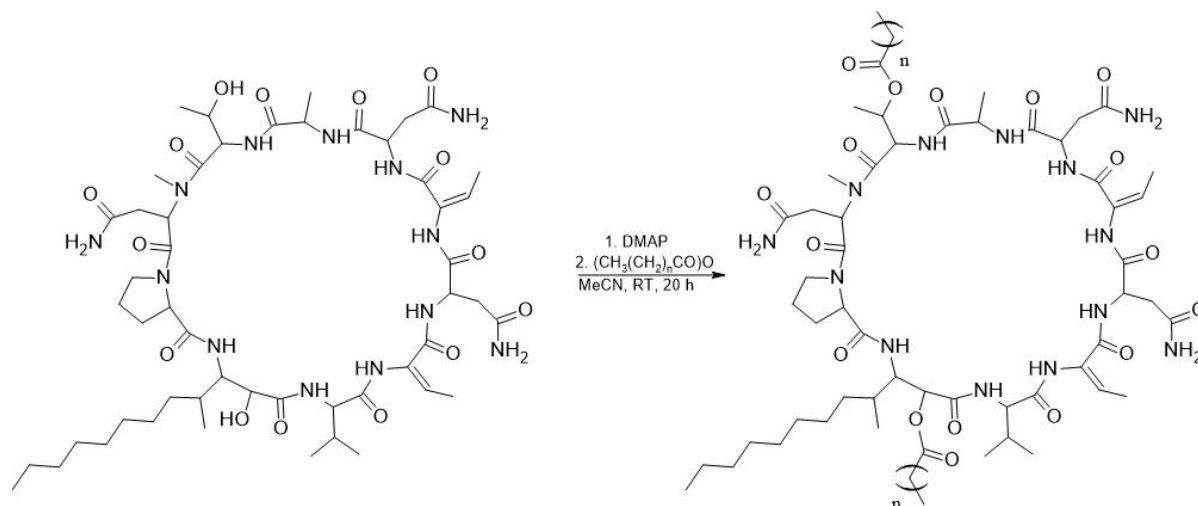
HRMS-TOF (m/z): 302.1850 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd.: 302.1863.

^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 8.08 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.34 – 7.20 (m, 1H), 7.03 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.48 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.39 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 4.27 (d, $J = 21.8$ Hz, 1H), 4.27 – 4.15 (m, 1H), 3.79 – 3.63 (m, 2H), 3.56 (dd, $J = 11.5, 8.3$ Hz, 1H), 3.15 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 3.09 – 3.01 (m, 1H), 2.90 (s, 3H), 2.73 (s, 1H), 2.63 – 2.53 (m, 1H), 2.33 – 2.23 (m, 1H), 1.67 – 1.43 (m, 2H), 1.33 – 1.20 (m, 6H), 0.95 – 0.84 (m, 7H), 0.62 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform- d) δ 174.62, 147.94, 139.55, 122.97, 121.47, 118.11, 114.72, 106.53, 104.16, 71.24, 70.68, 69.48, 65.14, 63.19, 56.06, 47.33, 34.11, 33.20, 31.85, 29.83, 29.71, 28.67, 21.73, 19.61.

5.3.4 Modifikation von Lipopeptiden aus Blaualgen

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von Minutissamide A Derivaten 5a-d



In einem trockenem 25 ml Rundkolben wurde Minutissamid A (20 mg, 0.018 mmol, 1 eq.) in 15 mL trockenem MeCN unter Argon gelöst. DMAP (240 mg, 2.13 mmol, 109 eq.) wurde im Argon Gegenstrom zugegeben. Das entsprechende Carbonsäureanhydrid (0.54 mmol, 30 eq.) wurde tropfenweise mit einer Spritze durch ein Septum hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 20 h bei RT gerührt und anschließend mit 20 mL H₂O gequenchet. Nach Entfernen des Acetonitrils unter vermindertem Druck bei 32 °C wurde die Mischung auf eine SPE-Säule (10 g C₁₈-Kieselgel) geladen und mit jeweils 30 mL H₂O, 2:8 MeCN/H₂O, 9:1 MeCN/H₂O und MeCN eluiert. Die jeweiligen Produkte konnten in der 9:1 MeCN/H₂O Fraktion mittels LC/MS-Analyse gefunden werden. Nach Entfernen des Lösungsmittels, wurden die Produkte mit präparativer HPLC weiter aufgereinigt (40:60 bis 100:0 MeOH/H₂O, Luna 250 x 15 mm, C₁₈-Kieselgel).

Minutissamid A Derivat 5a

Minutissamid A wurde anhand der allgemeinen Synthesevorschrift mit 57 µL Essigsäureanhydrid umgesetzt um Substanz 5a als weißen Feststoff zu erhalten. Ausbeute: 2.6 mg (0.002 mmol, 12 %). HRMS-TOF (m/z): 1202.6405 [M+H]⁺, calcd.: 1202.6421.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 7.72 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 5.91 (q, J = 7.6 Hz, 1H), 5.67 (d, J = 12.6 Hz, 1H), 5.53 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 5.48 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 5.38 – 5.03 (m, 4H), 4.69 – 4.43 (m, 3H), 4.34 – 4.15 (m, 3H), 3.20 – 2.72 (m, 9H), 2.65 (s, 10H), 2.21 (d, J = 15.2 Hz, 3H), 2.09 (d, J = 2.1 Hz, 3H), 2.06 – 1.92 (m, 7H), 1.79 (dd, J = 32.0, 7.4 Hz, 6H), 1.47 – 1.22 (m, 18H), 1.18 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.00 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 8.0 Hz, 6H), 0.72 (d, J = 6.7 Hz, 3H).

Minutissamid A Derivat 5b

Minutissamid A wurde anhand der allgemeinen Synthesevorschrift mit 110 μ L Buttersäureanhydrid umgesetzt um Substanz 5b als weißen Feststoff zu erhalten. Ausbeute: 10 mg (0.008 mmol, 44 %).

HRMS-TOF (m/z): 1258.7102 [M+H]⁺, calcd.: 1258.7047.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 5.91 (q, J = 7.3 Hz, 1H), 5.69 (dd, J = 12.0, 3.2 Hz, 1H), 5.54 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 5.50 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 5.25 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 5.06 (dd, J = 9.7, 5.6 Hz, 2H), 4.63 (dd, J = 8.3, 3.4 Hz, 1H), 4.54 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 4.50 – 4.46 (m, 1H), 4.29 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.21 (dd, J = 11.3, 4.7 Hz, 1H), 3.35 (s, 3H), 3.19 (s, 3H), 3.08 – 2.76 (m, 6H), 2.36 (td, J = 7.3, 1.8 Hz, 2H), 2.27 – 2.18 (m, 4H), 1.99 (d, J = 7.4 Hz, 3H), 1.76 (d, J = 7.4 Hz, 3H), 1.71 – 1.65 (m, 3H), 1.60 – 1.52 (m, 2H), 1.41 – 1.28 (m, 20H), 1.19 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.02 – 0.86 (m, 21H), 0.73 (d, J = 6.5 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, Methanol-d₄) δ 174.90, 174.78, 174.39, 173.79, 173.00, 172.51, 171.08, 170.64, 169.91, 168.24, 165.49, 165.38, 133.12, 129.67, 120.38, 73.12, 70.73, 61.48, 58.24, 55.82, 54.49, 51.94, 50.94, 50.18, 40.43, 36.88, 36.66, 35.10, 34.40, 33.89, 32.85, 31.06, 30.56, 30.21, 26.40, 24.91, 23.53, 19.45, 19.12, 19.09, 18.49, 17.31, 16.75, 16.10, 14.22, 13.82, 13.72, 13.59, 13.50.

Minutissamid A Derivat 5c

Minutissamid A wurde anhand der allgemeinen Synthesevorschrift mit 130 μ L Hexansäureanhydrid umgesetzt um Substanz 5c als weißen Feststoff zu erhalten. Ausbeute: 13 mg (0.01 mmol, 55 %).

HRMS-TOF (m/z): 1314.7570 [M+H]⁺, calcd.: 1314.7668.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 5.91 (q, J = 7.4 Hz, 1H), 5.69 (dd, J = 12.4, 3.2 Hz, 1H), 5.58 – 5.48 (m, 2H), 5.29 – 5.21 (m, 1H), 5.11 – 5.02 (m, 2H), 4.64 (dd, J = 8.4, 3.4 Hz, 1H), 4.54 (q, J = 7.3 Hz, 1H), 4.51 – 4.47 (m, 1H), 4.37 – 4.27 (m, 2H), 4.21 (dd, J = 11.3, 4.7 Hz, 1H), 3.43 – 3.33 (m, 1H), 3.19 (s, 3H), 3.10 – 2.74 (m, 6H), 2.37 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.30 – 2.00 (m, 7H), 1.99 (d, J = 7.4 Hz, 3H), 1.96 – 1.86 (m, 2H), 1.83 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 1.75 (d, J = 7.5 Hz, 3H), 1.71 – 1.48 (m, 5H), 1.48 – 1.24 (m, 30H), 1.19 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.00 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.97 – 0.85 (m, 15H), 0.73 (d, J = 6.7 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, Methanol-d₄) δ 175.11, 175.00, 174.86, 174.62, 174.01, 173.18, 172.97, 172.72, 171.25, 170.85, 170.11, 168.43, 165.69, 165.57, 133.33, 130.14, 129.79, 120.58, 73.36, 70.89, 61.68, 58.45, 56.01, 54.67, 52.58, 51.17, 50.43, 40.70, 39.17, 37.13, 35.32, 35.14, 34.98, 34.60, 34.12, 33.06, 32.44, 32.34, 31.63, 31.26, 30.77, 30.41, 26.58, 25.61, 25.57, 25.17, 23.74, 23.43, 23.38, 19.66, 18.76, 17.52, 16.98, 16.32, 14.44, 14.28, 14.25, 13.82, 13.72.

Minutissamid A Derivat 5d

Minutissamid A wurde anhand der allgemeinen Synthesevorschrift mit 162 μ L Oktansäureanhydrid umgesetzt um Substanz 5d als weißen Feststoff zu erhalten. Ausbeute: 11 mg (0.008 mmol, 45 %). HRMS-TOF (m/z): 1368.8197 [M-H]⁻, calcd.: 1368.8148.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 7.57 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 5.91 (q, J = 7.6 Hz, 1H), 5.69 (dd, J = 12.4, 3.7 Hz, 1H), 5.54 (q, J = 7.6 Hz, 1H), 5.50 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 5.25 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 5.10 – 5.03 (m, 2H), 4.65 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 4.63 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.52 (dt, J = 22.0, 7.8 Hz, 3H), 4.36 – 4.27 (m, 2H), 4.25 – 4.18 (m, 1H), 3.43 – 3.34 (m, 1H), 3.19 (s, 3H), 3.04 (s, 1H), 3.01 – 2.76 (m, 4H), 2.37 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.30 – 2.18 (m, 4H), 1.99 (d, J = 7.3 Hz, 3H), 1.95 – 1.88 (m, 1H), 1.75 (d, J = 7.3 Hz, 3H), 1.65 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 1.61 – 1.45 (m, 3H), 1.46 – 1.22 (m, 42H), 1.19 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.00 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.90 (dq, J = 6.4, 3.0 Hz, 16H), 0.73 (d, J = 6.9 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, Methanol-d₄) δ 175.32, 175.22, 175.07, 174.84, 174.23, 173.39, 173.17, 172.92, 171.45, 171.07, 170.32, 168.64, 165.89, 165.77, 133.53, 130.35, 129.99, 120.78, 73.56, 71.07, 61.90, 58.66, 56.21, 54.89, 52.80, 51.39, 50.65, 40.97, 37.35, 35.54, 35.40, 35.24, 34.81, 34.28, 33.28, 33.07, 33.03, 31.47, 30.98, 30.63, 30.44, 30.37, 30.33, 30.29, 26.78, 26.14, 26.09, 25.39, 23.89, 19.88, 19.00, 17.73, 17.22, 16.54, 14.65, 14.03, 13.93.

Minutissamid A Derivat 5e

Minutissamid A wurde anhand der allgemeinen Synthesevorschrift mit 176 μ L Decansäureanhydrid umgesetzt um Substanz 5e als weißen Feststoff zu erhalten. Ausbeute: 6 mg (0.004 mmol, 23 %). HRMS-TOF (m/z): 1424.8805 [M-H]⁻, calcd.: 1424.8774.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 7.57 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 5.91 (q, J = 7.3 Hz, 1H), 5.69 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 5.55 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 5.50 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 5.29 – 5.20 (m, 1H), 5.09 – 5.02 (m, 2H), 4.64 (dd, J = 8.5, 3.4 Hz, 1H), 4.61 – 4.45 (m, 3H), 4.36 – 4.17 (m, 4H), 3.19 (s, 3H), 3.04 – 2.80 (m, 4H), 2.37 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 2.33 – 2.19 (m, 5H), 1.99 (d, J = 7.4 Hz, 4H), 1.75 (d, J = 7.4 Hz, 6H), 1.65 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 1.41 – 1.26 (m, 58H), 1.19 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.00 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.90 (dt, J = 7.3, 3.6 Hz, 17H), 0.73 (d, J = 6.8 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, Methanol-d₄) δ 174.80, 174.41, 173.81, 172.97, 172.74, 171.04, 169.90, 168.23, 165.47, 133.10, 129.94, 120.37, 70.65, 61.48, 58.25, 54.47, 50.98, 50.02, 40.56, 34.99, 34.82, 34.40, 33.93, 32.83, 31.07, 30.56, 30.37, 30.33, 30.28, 30.21, 30.05, 29.96, 26.36, 25.73, 25.66, 24.66, 23.53, 19.46, 18.59, 17.31, 16.80, 16.11, 14.24, 13.60, 13.50.

Minutissamid A Derivat 5f

Minutissamid A wurde anhand der allgemeinen Synthesevorschrift mit 59 mg Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt um Substanz 5f als weißen Feststoff zu erhalten. Im ¹H NMR wurde Bernsteinsäure

als Verunreinigung beobachtet. Ausbeute: 6 mg (0.005 mmol, 23 %).

HRMS-TOF (m/z): 1318.6516 [M+H]⁺, calcd.: 1318.6525.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 7.71 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.61 – 7.42 (m, 1H), 6.57 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 5.88 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 5.68 (s, 1H), 5.50 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 5.43 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 5.32 – 5.27 (m, 1H), 5.23 (s, 1H), 4.58 – 4.41 (m, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.03 – 2.95 (m, 1H), 2.85 – 2.75 (m, 1H), 2.66 (s, 2H), 2.62 – 2.43 (m, 13H), 2.19 (d, J = 16.2 Hz, 2H), 2.02 (d, J = 11.2 Hz, 2H), 1.97 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 1.91 (s, 1H), 1.84 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 1.75 (dd, J = 7.4, 1.4 Hz, 3H), 1.37 (dd, J = 20.8, 13.8 Hz, 19H), 1.19 (dd, J = 6.4, 2.2 Hz, 3H), 0.98 (dd, J = 6.7, 2.0 Hz, 3H), 0.89 (dt, J = 8.9, 4.6 Hz, 6H), 0.73 (d, J = 6.7 Hz, 3H).

Minutissamid A Derivat 5g

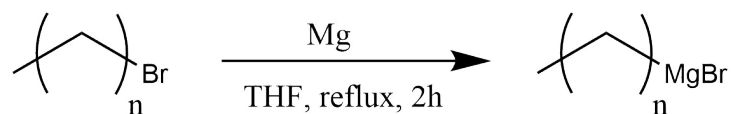
Minutissamid A wurde anhand der allgemeinen Synthesevorschrift mit 104 µL 4-Pentensäureanhydrid umgesetzt um Substanz 5g als weißen Feststoff zu erhalten. Ausbeute: 10 mg (0.008 mmol, 41 %).

HRMS-TOF (m/z): 1280.6807 [M-H]⁻, calcd.: 1280.6896.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 8.06 (s, 1H), 7.58 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 5.94 – 5.77 (m, 3H), 5.70 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 5.54 (q, J = 7.4 Hz, 1H), 5.49 (d, J = 4.7 Hz, 1H), 5.24 (p, J = 6.4 Hz, 1H), 5.15 – 4.95 (m, 7H), 4.63 (dd, J = 8.1, 3.4 Hz, 1H), 4.54 (q, J = 7.3 Hz, 1H), 4.48 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 4.31 (dd, J = 16.6, 7.8 Hz, 2H), 4.21 (dd, J = 14.9, 8.3 Hz, 1H), 3.41 (dd, J = 17.0, 9.9 Hz, 1H), 3.20 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 3.02 – 2.75 (m, 4H), 2.51 – 2.45 (m, 2H), 2.42 – 2.28 (m, 6H), 2.28 – 2.16 (m, J = 10.0, 6.8 Hz, 3H), 2.16 – 2.01 (m, J = 14.5, 6.7 Hz, 3H), 1.98 (d, J = 7.4 Hz, 3H), 1.95 – 1.89 (m, 1H), 1.86 – 1.79 (m, 1H), 1.76 (d, J = 7.5 Hz, 3H), 1.47 – 1.25 (m, J = 29.1, 10.9 Hz, 19H), 1.19 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.00 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.93 – 0.87 (m, 6H), 0.73 (d, J = 6.7 Hz, 3H).

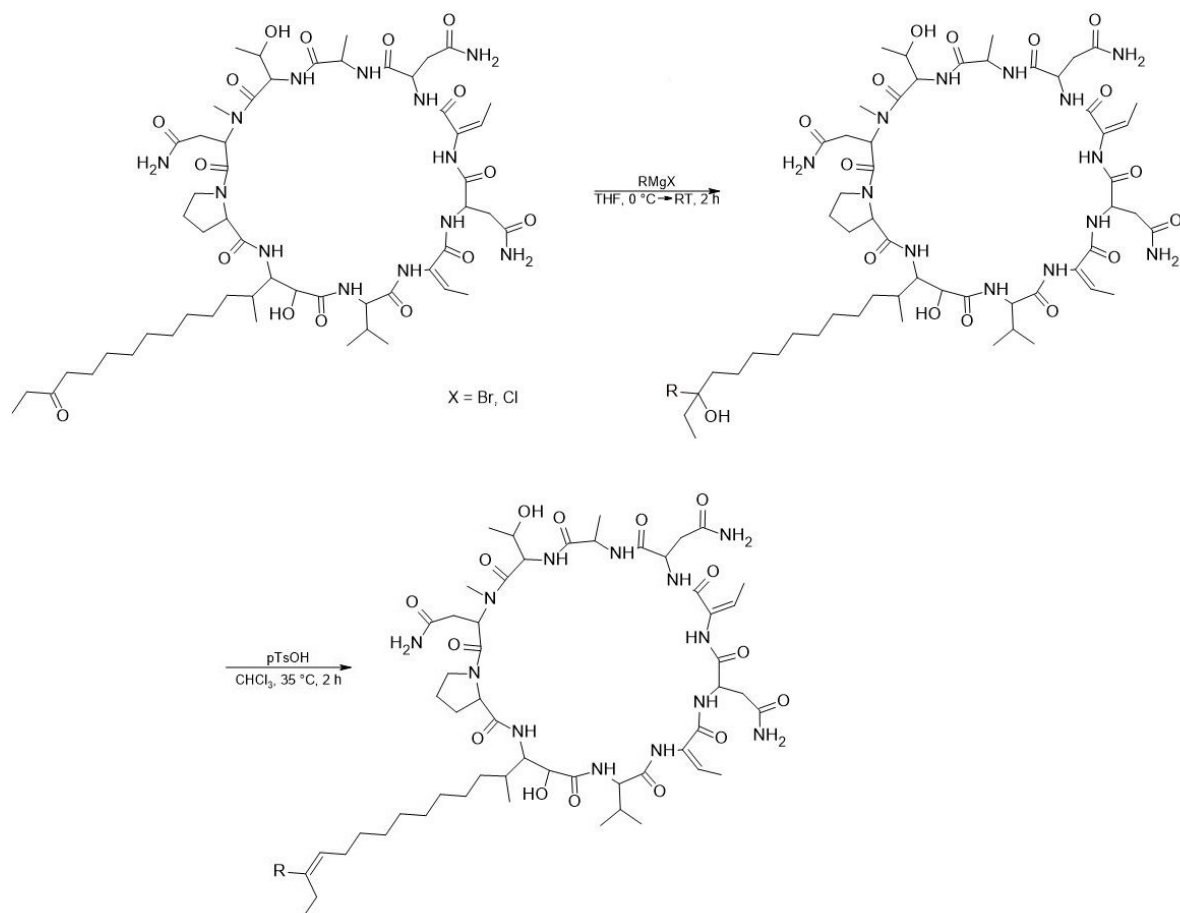
¹³C NMR (101 MHz, Methanol-d₄) δ 175.32, 175.21, 174.86, 174.23, 173.42, 172.55, 171.55, 171.08, 170.34, 168.56, 165.94, 137.98, 133.53, 130.39, 129.88, 120.85, 116.45, 116.35, 73.73, 71.45, 61.89, 58.80, 56.25, 54.96, 52.62, 51.34, 50.56, 40.66, 39.40, 37.22, 35.55, 34.81, 34.76, 34.57, 34.25, 33.28, 31.93, 31.55, 31.49, 30.99, 30.63, 30.07, 29.90, 26.79, 25.37, 23.96, 19.87, 19.04, 17.70, 17.11, 16.53, 14.65, 14.01, 13.95.

Herstellung von Grignard-Reagenzien



In einem trockenem Dreihalskolben mit Rückflusskühler und trockenem Tropftrichter wurden Magnesiumspäne nach Grignard (1.34 g, 55 mmol, 1 eq.) vorgelegt. Die ganze Apparatur wurde mit Argon für 3 min gespült. Anschließend wurden die Magnesiumspäne mit 20 mL trockenem THF überschichtet. Eine Lösung aus einem Alkylbromid (5 mmol, 0.9 eq.) in 10 mL trockenem THF wurde in den Tropftrichter gefüllt. Ungefähr $\frac{1}{10}$ der Lösung wurde zu den Magnesiumspänen ohne Rühren zugetropft. Anschließend wurde die Mischung abwechselnd im Ultraschallbad behandelt und mit einem Heißluftföhn zum Sieden unter Rückfluss erhitzt. Nach Starten der Reaktion wurde der Rest der Alkylbromidlösung unter Rühren langsam zugetropft. Es wurde weitere 30 min zum Sieden unter Rückfluss erhitzt um die Reaktion zu vervollständigen. Die Grignard-Lösung wurde in ein trockenes Schlenkrohr unter Argon überführt und innerhalb von 3-5 Tagen benutzt. Die Konzentration der Grignard-Lösung wurde durch Titration mit Ethanol überprüft. THF wurde als Lösungsmittel aufgrund der höheren Siedetemperatur gegenüber Diethylether bevorzugt.

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von Minutissamide C Derivaten 6a-b



In einem trockenen Rundkolben wurde Minutissamid C (50 mg, 0.042 mmol) unter Argon Atmosphäre in trockenem THF (20 mL) gelöst. 2 mL einer Grignardlösung wurden mit einer Spritze tropfenweise durch ein Septum zur Reaktionsmischung bei 0 °C zugegeben. Es wurde für weitere 5 min bei 0 °C gerührt und anschließend das Eisbad entfernt. Nach 2 h wurde die Reaktion gequenchet mit 15 mL gesättigter NH₄Cl-Lösung. Das THF wurde unter vermindertem Druck bei 32 °C entfernt. Die Mischung wurde anschließend auf eine SPE-Säule (10 g C₁₈-Kieselgel) geladen und mit 30 ml H₂O, 2:8 MeCN/H₂O, 9:1 MeCN/H₂O und MeCN eluiert. Die jeweiligen Produkte konnten in der 9:1 MeCN /H₂O Fraktion über LC/MS-Analyse gefunden werden. Nach Entfernen des Lösungsmittels, wurden die Produkte ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt.

Der Feststoff wurde in trockenem CHCl₃ (20 mL) gelöst und in einen trockenen Rundkolben unter Stickstoffatmosphäre überführt. Anschließend wurde p-TsOH (45 mg, 0.29 mmol) hinzugegeben und 2 h bei 35 °C gerührt. Die Reaktion wurde mit 30 ml H₂O gequenchet und das Chloroform unter vermindertem Druck bei 32 °C entfernt. Die Mischung wurde anschließend auf eine SPE-Säule (10 g C₁₈-Kieselgel) geladen und mit 30 mL H₂O, 2:8 MeCN/H₂O, 9:1 MeCN/H₂O und MeCN

eluiert. Die jeweiligen Produkte konnten in der 9:1 MeCN/H₂O Fraktion über LC/MS-Analyse gefunden werden. Nach Entfernen des Lösungsmittels, wurden die Produkte mit präparativer HPLC weiter aufgereinigt (40:60 bis 100:0 MeOH/H₂O, Luna 250 x 15 mm, C₁₈ Kieselgel).

Minutissamid C Derivat 6a

Minutissamid C wurde anhand der allgemeinen Synthesevorschrift mit Butylmagnesiumchlorid (1.5 M in THF/Toluene, 36 eq.) umgesetzt um Substanz 5a als weißen Feststoff zu erhalten. Ausbeute: 1.2 mg (0.001 mmol, 2 %).

HRMS-TOF (m/z): 1228.7206 [M+H]⁺, calcd.: 1228.7305.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 7.30 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.91 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.52 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.36 (s, 2H), 4.59 (s, 1H), 4.46 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 4.30 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 4.14 (s, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.67 – 3.61 (m, 9H), 3.50 – 3.48 (m, 1H), 3.14 (dt, J = 3.2, 1.8 Hz, 1H), 3.06 (s, 1H), 2.17 (t, J = 7.6 Hz, 4H), 1.99 (d, J = 7.8 Hz, 3H), 1.79 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 1.60 (s, 5H), 1.44 – 1.28 (m, 50H), 1.13 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 1.03 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 0.95 – 0.88 (m, 9H), 0.76 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 0.72 (s, 3H).

Minutissamid C Derivat 6b

Minutissamid C wurde anhand der allgemeinen Synthesevorschrift mit Octylmagnesiumbromid (2 M in THF, 48 eq.) umgesetzt um Substanz 5b als weißen Feststoff zu erhalten. Ausbeute: 0.7 mg (0.5 μmol, 1 %).

HRMS-TOF (m/z): 1284.7933 [M+H]⁺, calcd.: 1284.7931.

¹H NMR (400 MHz, Methanol-d₄) δ 8.64 (s, 1H), 7.72 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 5.89 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 5.70 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 5.51 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 4.55 (d, J = 16.8 Hz, 2H), 4.45 – 4.41 (m, 2H), 4.28 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 4.22 (s, 1H), 4.09 (s, 2H), 3.04 (s, 3H), 2.76 – 2.59 (m, 3H), 2.16 (s, 1H), 2.13 (s, 1H), 1.99 (dd, J = 15.2, 7.4 Hz, 9H), 1.77 (d, J = 7.5 Hz, 3H), 1.56 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 1.37 (d, J = 55.1 Hz, 42H), 1.11 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 1.01 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.96 – 0.87 (m, 10H), 0.74 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

6 Literaturverzeichnis

- [1] L. Xu, X. Cheng und Q. Wang. Enhanced Lipid Production in *Chlamydomonas reinhardtii* by Co-culturing With *Azotobacter chroococcum*. *Front. Plant Sci.* **2018**, 9.
- [2] H. Fujiki, M. Suganuma, M. Nakayasu, T. Tahira, Y. Endo, K. Shudo und T. Sugimura. Structure-Activity studies on synthetic analogues (Indolactams) of the Tumor Promotor Teleocidin. *Jpn. J. Cancer Res.* **1984**, 75, 866–870.
- [3] R. Hoessel, S. Leclerc, J. A. Endicotzt, M. E. Nobel, A. Lawrie, P. Tunnah, M. Leost, E. Damiens, D. Marie, D. Marko, E. Niederberger, W. Tang, G. Eisenbrand und L. Meijer. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat. Cell Biol.* **1999**, 1, 60–67.
- [4] N. Engene, E. Rottacker, J. Kaštovský, T. Byrum, H. Choi, M. Ellisman, J. Komárek und W. Gerwick. *Moorea producens* gen. nov., sp. nov. and *Moorea bouillonii* comb. nov., tropical marine cyanobacteria rich in bioactive secondary metabolites. *Int. J. Syst. Evol.* **2012**, 62, 1171–1178.
- [5] A. H. Banner. A Dermatitis-Producing Alga in Hawaii. Preliminary Report. *Hawaii Med. J.* **1959**, 19, 35–36.
- [6] F. H. Grauer und H. L. Arnold. Seaweed Dermatitis: First Report of a Dermatitis-Producing Marine Alga. *Arch. Dermatol.* **Nov. 1961**, 84, 720–732.
- [7] A. Banner, P. Scheuer, S. Sasaki, P. Helfrich und C. Alender. Observations on ciguatera-type toxin in fish. *Ann. of the N.Y. Acad. Sci.* **1960**, 90, 770–787.
- [8] Richard E. Moore, Adrian J. Blackman, Chad E. Cheuk, Jon S. Mynderse, Gayle K. Matsumoto, Jon Clardy, Ronald W. Woodard und J. Cymerman Craig. Absolute stereochemistries of the aplysiatoxins and oscillatoxin A. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 2484–2489.
- [9] J. S. Mynderse, R. E. Moore, M. Kashiwagi und T. R. Norton. Antileukemia activity in the Oscillatoriaceae: isolation of Debromoaplysiatoxin from *Lyngbya*.. *Science.* **1977**, 196, 538–540.
- [10] J. H. Cardellina, F. J. Marner und R. E. Moore. Seaweed Dermatitis: Structure of *Lyngbyatoxin A*. *Science.* **1979**, 204, 193–195.
- [11] M. Takashima, H. Sakai, R. Mori und K. Arima. A New Toxic Substance, Teleocidin, Produced by *Streptomyces*.. *Agr. Biol. Chem.* **1962**, 26, 660–678.

- [12] T. Yamashita, M. Imoto, K. Isshiki, T. Sawa, H. Naganawa, S. Kurasawa, B. Zhu und K. Umezawa. Isolation of a New Indole Alkaloid, Pendolmycin, from *Nocardiosis*. *J. Nat. Prod.* **1988**, 51, 1184–1187.
- [13] K. Irie, M. Hirota, N. Hagiwara, K. Koshimizu, H. Hayashi, S. Murao, H. Tokuda und Y. Ito. The Epstein-Barr Virus Early Antigen Inducing Indole Alkaloids, (-)-Indolactam V and Its Related Compounds, Produced by Actinomycetes. *Agricultural and Biological Chemistry.* **1984**, 48, 1269–1274.
- [14] K. Irie, S. Kajiyama, A. Funaki, K. Koshimizu, H. Hayashi und M. Arai. Biosynthesis of (-)-indolactam V, the basic ring-structure of tumor promotes teleogidins. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 101–104.
- [15] D. J. Edwards und W. H. Gerwick. Lyngbyatoxin Biosynthesis: Sequence of Biosynthetic Gene Cluster and Identification of a Novel Aromatic Prenyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 11432–11433.
- [16] T. Awakawa, L. Zhang, T. Wakimoto, S. Hoshino, T. Mori, T. Ito, J. Ishikawa, M. E. Tanner und I. Abe. A methyltransferase initiates terpene cyclization in teleocidin B biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 9910–9913.
- [17] H. Fujiki, M. Mori, M. Nakayasu, M. Terada, T. Sugimura und R. E. Moore. Indole alkaloids: dihydroteleocidin B, teleocidin, and lyngbyatoxin A as members of a new class of tumor promoters.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981**, 78, 3872–3876.
- [18] Y. Nakagawa. Artificial Analogs of Naturally Occurring Tumor Promoters as Biochemical Tools and Therapeutic Leads. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, 76, 1262–1274.
- [19] I. Berenblum und P. Shubik. The role of croton oil applications, associated with a single painting of a carcinogen, in tumour induction of the mouse's skin. *Br. J. Cancer.* **1947**, 1, 379–382.
- [20] E. Hecker, H. Kubinyi, H. Bresch und Ch. von Szczepanski. The Chemical Structure of a Cocarcinogen and of Phorbol Isolated from Croton Oil. *J. Med. Chem.* **1966**, 9, 246–247.
- [21] Y. Castagna, Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa und Y. Nishizuka. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 7847–7851.
- [22] H. Mellor und P. J. Parker. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* **1998**, 332, 281–292.
- [23] Y. Nishizuka. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature.* **1984**, 308, 693–698.

- [24] J. H. Hurley, A. C. Newton, P. J. Parker, P. M. Blumberg und Y. Nishizuka. Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci.* **1997**, 6, 477–480.
- [25] N. Isakov. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Semin. Cancer Biol.* **2018**, 48, 36–52.
- [26] N. Geribaldi-Doldán, E. Flores-Giubi, M. Murillo-Carretero, F. García-Bernal, M. Carrasco, A. J. Macías-Sánchez, J. Domínguez-Riscart, C. Verástegui, R. Hernández-Galán und C. Castro. 12-Deoxyphorbols promote adult neurogenesis by inducing neural progenitor cell proliferation via PKC activation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2016**, 19.
- [27] B.E. Lawrence und Horton P. *Progenitor Cells: Biology, Characterization and Potential Clinical Applications*. Nova Science Publishers, Inc, **2013**, S. 26.
- [28] T Fujiki H. and Sugimura. New Classes of Tumor Promoters: Teleocidin, Aplysiatoxin, and Palytoxin. *Adv. Cancer Res.* **1987**, 49, 223–264.
- [29] T. Horiuchi, H. Fujiki, M. Suganuma, H. Hakii, M. Nakayasu, Y. Hitotsuyanagi, N. Aimi, S. Sakai, Y. Endo und K. Shudo. Studies on olivoretins indicate a requirement for a free hydroxyl group for teleocidin B activity. *Jpn. J. Cancer Res.* **1984**, 75, 837–840.
- [30] Y. Endo, K. Shudo, A. Itai, M. Hasegawa und S. Sakai. Synthesis and stereochemistry of indolactam-v, an active fragment of teleocidins. Structural requirements for tumor-promoting activity. *Tetrahedron.* **1986**, 42, 5905–5924.
- [31] Y. Endo, K. Shudo und T. Okamoto. Molecular requirements for epigenetic modulators. Synthesis of active fragments of Teleocidins Lyngbyatoxin. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, 30, 3457–3460.
- [32] S. M. Bronner, A. E. Goetz und N. K. Garg. Overturning Indolyne Regioselectivities and Synthesis of Indolactam V. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 3832–3835.
- [33] T. Masuda, S. Nakatsuka und T. Goto. Efficient Syntheses and Chemistry of Indolactam-V and Its Analogs. *Agr. Biol. Chem.* **1989**, 53, 2257–2260.
- [34] A. McKenzie und I. A. Smith. CCVIII.-Catalytic racemisation of the diastereoisomeric 1-menthyl phenylbromoacetates. *J. Chem. Soc., Trans.* **1924**, 125, 1582–1593.
- [35] Z. Xu, F. Zhang, L. Zhang und Y. Jia. Total synthesis of (-)-indolactam V. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 2512–2517.
- [36] J. Haynes-Smith, I. Diaz und K. L. Billingsley. Modular Total Synthesis of Protein Kinase C Activator (-)-Indolactam V. *Org. Lett.* **2016**, 2008–2011.

- [37] N. F. Fine Nathel, T. K. Shah, S. M. Bronner und N. K. Garg. Total syntheses of indolactam alkaloids (-)-indolactam V, (-)-pendolmycin, (-)-lyngbyatoxin A, and (-)-teleocidin A-2. *Chem. Sci.* **2014**, 5, 2184–2190.
- [38] O. A. Moreno und Y. Kishi. Total Synthesis and Stereochemistry of Cytoblastin. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8180–8181.
- [39] J. Stein, S. Stahn, J.-M. Neudörfl, J. Sperlich, H.-G. Schmalz und N. Teusch. Synthetic Indolactam V Analogues as Inhibitors of PAR2-Induced Calcium Mobilization in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *ChemMedChem*, 13, 147–154.
- [40] K. Irie, H. Hayashi, M. Arai und K. Koshimizu. Substitution Reaction on the Indole Ring of (–)-Indolactam V, the Fundamental Structure of Teleocidins. *Agr. Biol. Chem.* **1986**, 50, 2679–2680.
- [41] H. Muratake, K. Okabe und M. Natsume. Total synthesis of dihydroteleocidin B-4 (dihydroteleocidin B). *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 6267–6270.
- [42] M.A. Marahiel. Working outside the protein-synthesis rules: insights into non-ribosomal peptide synthesis. *Journal of Peptide Science*, 1512, 799–807.
- [43] H. Kleinkauf und W. Gevers. Nonribosomal polypeptide synthesis: the biosynthesis of a cyclic peptide antibiotic, gramicidin S.. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1969**, 34, 805–813.
- [44] Y.M. Gall und M.B. Konashev. The discovery of Gramicidin S: The intellectual transformation of G.F. Gause from biologist to researcher of antibiotics and on its meaning for the fate of Russian genetic. *Hist. Philos. Life. Sci.* **2001**, 23, 137–50.
- [45] S. Caboche, M. Pupin, V. Leclère, A. Fontaine, P. Jacques und G. Kucherov. NORINE: a database of nonribosomal peptides. *Nucleic Acids Res. Spec. Publ.* **2007**, 36, D326–D331.
- [46] F. Coutte, D. Lecouturier, K. Dimitrov, J. S. Guez, F. Delvigne, P. Dhulster und P. Jacques. Microbial lipopeptide production and purification bioprocesses, current progress and future challenges. *Biotechnol. J.* **2017**, 12, 1600566.
- [47] D. P. Fewer, J. Jokela, L. Heinilä, R. Aesoy, K. Sivonen, T. Galica, P. Hrouzek und L. Herfindal. Chemical diversity and cellular effects of antifungal cyclic lipopeptides from cyanobacteria. *Physiol. Plant.* **2021**, 173, 639–650.
- [48] K. W. Navpreet und S. C. Swaranjit. Lipopeptides: Biosynthesis and Applications. *J. Microb. Biochem. Technol.* **2015**, 07, 103–107.
- [49] F. Kraas. Mechanismen der C-Domänen-vermittelten Lipoinitiation in der nichtribosomalen Peptidsynthese. Dissertation. Philipps-Universität Marburg, **2012**.

- [50] F. I. Kraas, V. Helmetag, M. Wittmann, M. Strieker und M. A. Marahiel. Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chem. Biol.* **2010**, 17, 872–880.
- [51] S. Steller, A. Sokoll, C. Wilde, F. Bernhard, P. Franke und J. Vater. Initiation of surfactin biosynthesis and the role of the SrfD-thioesterase protein. *Biochemistry.* **2004**, 43, 11331–11343.
- [52] D. B. Hansen, S. B. Bumpus, Z. D. Aron, N. L. Kelleher und C. T. Walsh. The loading module of mycosubtilin: an adenylation domain with fatty acid selectivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6366–6367.
- [53] Y.-H. Chooi und Y. Tang. Adding the Lipo to Lipopeptides: Do More with Less. *Chem. Biol.* **2010**, 17, 791–793.
- [54] A. A. Gorfe, R. Baron und J. A. McCammon. Water-membrane partition thermodynamics of an amphiphilic lipopeptide: an enthalpy-driven hydrophobic effect. *Biophys. J.* **2008**, 95, 3269–3277.
- [55] R. Maget-Dana und F. Peypoux. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology.* **1994**, 87, 151–174.
- [56] J. N. Horn, A. Cravens und A. Grossfield. Interactions between fengycin and model bilayers quantified by coarse-grained molecular dynamics. *Biophys. J.* **2013**, 105, 1612–1623.
- [57] A. Humisto, J. Jokela, K. Teigen, M. Wahlsten, P. Permi, K. Sivonen und L. Herfindal. Characterization of the interaction of the antifungal and cytotoxic cyclic glycolipopeptide hassallidin with sterol-containing lipid membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* **2019**, 1861, 1510–1521.
- [58] J. N. Kahn, M.-J. Hsu, F. Racine, R. Giacobbe und M. Motyl. Caspofungin susceptibility in *Aspergillus* and non-*Aspergillus* molds: inhibition of glucan synthase and reduction of β -d-1, 3 glucan levels in culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 2214–2216.
- [59] A. Fleming. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proc. R. Soc. Lond.* **1922**, 93, 306–317.
- [60] B. Humphrey, Y. Wang, E. Kurbatova, S. Ray und H. Blumberg. Emergence of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 Clone as the Predominant Cause of Skin and Soft-Tissue Infections. *Ann. Intern. Med.* **2006**, 144, 309–317.
- [61] C. H. Rammelkamp und Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin.. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1942**, 51, 386–389.

- [62] H. Zhao, L. Yan, X. Xu, C. Jiang, J. Shi, Y. Zhang, L. Liu, S. Lei, D. Shao und Q. Huang. Potential of *Bacillus subtilis* lipopeptides in anti-cancer I: induction of apoptosis and paraptosis and inhibition of autophagy in K562 cells. *Amb Express*. **2018**, 8, 1–16.
- [63] S. A. Cochrane und J. C. Vederas. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. *Med. Res. Rev.*, **2016**, 36, 4–31.
- [64] G. Li, S. Kusari, C. Golz, C. Strohmann und M. Spiteller. Three cyclic pentapeptides and a cyclic lipopeptide produced by endophytic *Fusarium decemcellulare* LG53. *RSC Adv*. **2016**, 6, 54092–54098.
- [65] H. Razafindralambo, P. Thonart und M. Paquox. Dynamic and equilibrium surface tensions of surfactin aqueous solutions. *J. Surfactants Deterg*. **2004**, 7, 41–46.
- [66] A. Raja, J. LaBonte, J. Lebbos und P. Kirkpatrick. Daptomycin. *Nat. Rev. Drug. Discov*. **2003**, 2, 943–944.
- [67] P. C. Fuchs, A. L. Barry und S. D. Brown. In vitro bactericidal activity of daptomycin against staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother*. **2002**, 49, 467–470.
- [68] W. V. Kern. Daptomycin: first in a new class of antibiotics for complicated skin and soft-tissue infections. *Int. J. Clin. Pract*. **2006**, 60, 370–378.
- [69] F. P. Tally und M. F. DeBruin. Development of daptomycin for Gram-positive infections. *J. Antimicrob. Chemother*. **2000**, 46, 523–526.
- [70] F. M. Huber, R. L. Pieper und A. J. Tietz. The formation of daptomycin by supplying decanoic acid to *Streptomyces roseosporus* cultures producing the antibiotic complex A21978C. *J. Biotechnol*. **1988**, 7, 283–292.
- [71] K. L. Tedesco und M. J. Rybak. Daptomycin. *Pharmacotherapy*. **2004**, 24, 41–57.
- [72] J. A. Silverman, N. G. Perlmutter und H. M. Shapiro. Correlation of Daptomycin Bactericidal Activity and Membrane Depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **2003**, 47, 2538–2544.
- [73] J. H. Lakey und M. Ptak. Fluorescence indicates a calcium-dependent interaction between the lipopeptide antibiotic LY 146032 and phospholipid membranes. *Biochemistry*. **1988**, 27, 4639–4645.
- [74] L. Delcambe und Devignat R. L'iturine, nouvel antibiotique d'origine congolaise. *Acad. Roy. SC. Coloniales*. **1957**, 6, 1–77.
- [75] K. Arima, A. Kakinuma und G. Tamura. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **1968**, 31, 488–494.

- [76] Walton R. B. und Woodruff H. B. A crystalline antifungal agent, mycosubtilin, isolated from subtilin broth. *J. Clin. Investig.* **1949**, 28, 924–926.
- [77] M. S. Yeh, Y. H. Wei und J. S. Chang. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Addition of Solid Carriers. *Biotechnol. Prog.* **2005**, 21, 1329–1334.
- [78] D. W. F. De Oliveira, A. B. Cara, M. Lechuga-Villena, M. García-Román, V. M. M. Melo, L. R. B. Gonçalves und D. A. Vaz. Aquatic toxicity and biodegradability of a surfactant produced by *Bacillus subtilis* ICA56. *J. Environ. Sci. Health - Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* **2017**, 52, 174–181.
- [79] N. Vanittanakom, W. Loeffler, U. Koch und G. Jung. Fengycin - A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiot. Res.* **1986**, 39, 888–901.
- [80] H. Desmyttere, C. Deweer, J. Muchembled, K. Sahmer, J. Jacquin, F. Coutte und P. Jacques. Antifungal Activities of *Bacillus subtilis* Lipopeptides to Two *Venturia inaequalis* Strains Possessing Different Tebuconazole Sensitivity. *Front. Microbiol.* **2019**, 10.
- [81] T. Neuhof, P. Schmieder, K. Preussel, R. Dieckmann, H. Pham, F. Bartl und H. von Döhren. Hassallidin A, a Glycosylated Lipopeptide with Antifungal Activity from the Cyanobacterium *Hassallia* sp.. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 695–700.
- [82] C. Pancrace, J. Jokela, N. Sassoon, C. Ganneau, M. Desnos-Ollivier, M. Wahlsten, A. Humisto, A. Calteau, S. Bay, D. P. Fewer, K. Sivonen und M. Gugger. Rearranged biosynthetic gene cluster and synthesis of hassallidin E in *Planktothrix* *serta* PCC 8927. *ACS Chem. Biol.* **2017**, 12, 1796–1804.
- [83] J. Vestola, T. K. Shishido, J. Jokela, D. P. Fewer, O. Aitio, P. Permi, M. Wahlsten, H. Wang, L. Rouhiainen und K. Sivonen. Hassallidins, antifungal glycolipopeptides, are widespread among cyanobacteria and are the end-product of a nonribosomal pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, 111, E1909–E1917.
- [84] T. H. Bui, V. Wray, M. Nimtz, T. Fossen, M. Preisitsch, G. Schröder, K. Wende, S. E. Heiden und S. Mundt. Baltacidins A-D, antifungal hassallidin-like lipopeptides from the Baltic Sea cyanobacterium *Anabaena cylindrica* Bio33. *J. Nat. Prod.* **2014**, 77, 1287–1296.
- [85] T. Neuhof, P. Schmieder, M. Seibold, K. Preussel und H. von Döhren. Hassallidin B-Second antifungal member of the Hassallidin family. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4220–4222.
- [86] T. Neuhof, M. Seibold, S. Thewes, M. Laue, C. O. Han, B. Hube und H. von Döhren. Comparison of susceptibility and transcription profile of the new antifungal hassallidin A with caspofungin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 349, 740–749.

- [87] T. K. Shishido, A. Humisto, J. Jokela, L. Liu, M. Wahlsten, A. Tamrakar, D. P. Fewer, P. Permi, A. P. D. Andreote, M. F. Fiore und K. Sivonen. Antifungal compounds from cyanobacteria. *Mar. Drugs*. **2015**, 13, 2124–2140.
- [88] L. M. P. Heinilä, D. P. Fewer, J. K. Jokela, M. Wahlsten, A. Jortikka und K. Sivonen. Shared PKS module in biosynthesis of synergistic laxaphycins. *Front. Microbiol.* **2020**, 1–10.
- [89] W. P. Frankmölle, G. Knübel, R. E. Moore und G. M. L. Patterson. Antifungal cyclic peptides from the terrestrial blue-green alga *Anabaena laxa* II. Structures of laxaphycins a, b, d and e. *J. Antibiot.* **1992**, 45, 1458–1466.
- [90] L. Bornancin, F. Boyaud, Z. Mahiout, I. Bonnard, S. C. Mills, B. Banaigs und N. Inguibert. Isolation and synthesis of laxaphycin b-type peptides: A case study and clues to their biosynthesis. *Mar. Drugs*. **2015**, 13, 7285–7300.
- [91] W. Cai, S. Matthew, Q.-Y. Chen, V. J. Paul und H. Luesch. Discovery of new A-and B-type laxaphycins with synergistic anticancer activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, 26, 2310–2319.
- [92] J. Jokela, L. Oftedal, L. Herfindal, P. Permi, M. Wahlsten, S. O. Døskeland und K. Sivonen. Anabaenolysins, novel cytolytic lipopeptides from benthic *Anabaena* cyanobacteria. *PLoS one*. **2012**, 7, e41222.
- [93] T. K. Shishido, J. Jokela, C.-T. Kolehmainen, D. P. Fewer, M. Wahlsten, H. Wang, L. Rouhiainen, E. Rizzi, G. De Bellis, P. Permi und K. Sivonen. Antifungal activity improved by coproduction of cyclodextrins and anabaenolysins in *Cyanobacteria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, 112, 13669–13674.
- [94] L. Oftedal, L. Myhren, J. Jokela, G. Gausdal, K. Sivonen, S. O. Døskeland und L. Herfindal. The lipopeptide toxins anabaenolysin A and B target biological membranes in a cholesterol-dependent manner. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* **2012**, 1818, 3000–3009.
- [95] C. Carrillo, J. A. Teruel, F. J. Aranda und A. Ortiz. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* **2003**, 1611, 91–97.
- [96] P. Tomek, P. Hrouzek, M. Kuzma, J. Sýkora, R. Fišer, J. Černý, P. Novák, S. Bártová, P. Šimek, M. Hof, D. Kavan und J. Kopecký. Cytotoxic lipopeptide muscotoxin A, isolated from soil cyanobacterium *Desmonostoc muscorum*, permeabilizes phospholipid membranes by reducing their fluidity. *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, 28, 216–224.
- [97] J. Cheel, J. Hájek, M. Kuzma, K. Saurav, I. Smýkalová, E. Ondráčková, P. Urajová, D. L. Vu, K. Faure, J. Kopecký und P. Hrouzek. Application of HPLC combined with

- polymeric resins and HPLC for the separation of cyclic lipopeptides muscotoxins A–C and their antimicrobial activity. *Molecules*. **2018**, 23, 2653.
- [98] J. M. Gregson, J.-L. Chen, G. M. L. Patterson und R. E. Moore. Structures of puwainaphycins A–E. *Tetrahedron*. **1992**, 48, 3727–3734.
- [99] H.-S. Kang, A. Krunić, Q. Shen, S. M. Swanson und J. Orjala. Minutissamides A–D, antiproliferative cyclic decapeptides from the cultured cyanobacterium *Anabaena minutissima*. *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, 1597–1605.
- [100] J. Mareš, J. Hájek, P. Urajová, A. Kust, J. Jokela, K. Saurav, T. Galica, K. Čapková, A. Mattila, E. Haapaniemi, P. Permi, I. Mysterud, O. M. Skulberg, J. Karlsen, D. P. Fewer, K. Sivonen, H. H. Tønnesen, P. Hrouzek und M. A. Elliot. Alternative biosynthetic starter units enhance the structural diversity of cyanobacterial lipopeptides. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, 85, e02675–18.
- [101] P. Hrouzek, M. Kuzma, J. Černý, P. Novák, R. Fišer, P. Šimek, A. Lukešová und J. Kopecký. The cyanobacterial cyclic lipopeptides puwainaphycins F/G are inducing necrosis via cell membrane permeabilization and subsequent unusual actin relocalization. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, 25, 1203–1211.
- [102] P. Pinton, C. Giorgi, R. Siviero, E. Zecchini und R. Rizzuto. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*. **2008**, 27, 6407–6418.
- [103] B. K. Toeplitz, A. I. Cohen, P. T. Funke, W. L. Parker und J. Z. Gougoutas. Structure of ionomycin - a novel diacidic polyether antibiotic having high affinity for calcium ions. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 3344–3353.
- [104] J. Hájek, S. Bieringer, K. Voráčová, M. Macho, K. Saurav, K. Delawská, P. Divoká, R. Fišer, G. Mikušová, J. Cheel, D. P. Fewer, D. L. Vu, J. Paichlová, H. Riepl und P. Hrouzek. Semi-synthetic puwainaphycin/minutesamide cyclic lipopeptides with improved antifungal activity and limited cytotoxicity. *RSC Adv.* **2021**, 11, 30873–30886.
- [105] O. Vašíček, J. Hájek, L. Bláhová, P. Hrouzek, P. Babica, L. Kubala und L. Šindlerová. Cyanobacterial lipopeptides puwainaphycins and minutesamides induce disruptive and pro-inflammatory processes in Caco-2 human intestinal barrier model. *Harmful algae*. **2020**, 96, 101849.
- [106] J. Mareš, J. Hájek, P. Urajová, J. Kopecký und P. Hrouzek. A hybrid non-ribosomal peptide/polyketide synthetase containing fatty-acyl ligase (FAAL) synthesizes the β -amino fatty acid lipopeptides puwainaphycins in the Cyanobacterium *Cylindrospermum alatosporum*. *PLoS One*. **2014**, 9, e111904.

- [107] H. R. Schweizer. *Künstliche organische Farbstoffe und ihre Zwischenprodukte*. S. 320-322. Springer Verlag, **1964**.
- [108] W. Lüttke und M. Klessinger. Infrarot- und Lichtabsorptionsspektren einfacher Indigo-farbstoffe. *Chem. Ber.* **1964**, 97, 2342–2357.
- [109] M. Klessinger und W. Lüttke. Theoretische und spektroskopische Untersuchungen an Indigo-Farbstoffen-II. *Tetrahedron*. **1963**, 19, 315–335.
- [110] Y.-P. Zhu und H. J. Woerdenbag. Traditional Chinese herbal medicine. *Pharm. World Sci.* **1995**, 17, 103–112.
- [111] State Pharmacopoeia Commission of the PRC. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China Volume 1*. People's Medical Publishing House, China, **2000**.
- [112] Institute of Haematology, Chinese Academy of Medicinal Sciences. Clinical studies of Dang Gui Lu Hui Wan in the treatment of CML. *Chinese J. Intern. Med.* **1979**, 15, 86–88.
- [113] J. C. Zou und L. Huang. Minor constituents of Qing Dai, a traditional Chinese medicine: I. Isolation, structure determination and synthesis of tryptanthrin and qingdainone. *Acta pharm. Sinica*. **1985**, 20, 45–51.
- [114] J. G. Boiteau, J. M. Arlabosse, M. Aurelly, A. L. Ghilini und I. Cardinaud. Unambiguous (Z)-geometry and complete ^1H and ^{13}C assignments of Candidine. *Magn. Reson. Chem.* **2015**, 53, 476–478.
- [115] S. Braig, C. A. Kressirer, J. Liebl, F. Bischoff, S. Zahler, L. Meijer und A. M. Vollmar. Indirubin Derivative 6BIO Suppresses Metastasis 6BIO Inhibits Cancer Metastasis. *Cancer Res.* **2013**, 73, 6004–6012.
- [116] W.-Y. Lo und N.-W. Chang. An indirubin derivative, indirubin-3'-monoxime suppresses oral cancer tumorigenesis through the downregulation of survivin. *PLoS One*. **2013**, 8, e70198.
- [117] Yin-Ku Lin, Yann-Lii Leu, Sien-Hung Yang, Hsiao-Wen Chen, Chin-Ting Wang und Jong-Hwei Su Pang. Anti-psoriatic effects of indigo naturalis on the proliferation and differentiation of keratinocytes with indirubin as the active component. *J. Dermatol. Sci.* **2009**, 54, 168–174.
- [118] S. Leclerc, M. Garnier, R. Hoessel, D. Marko, J. A. Bibb, G. L. Snyder, P. Greengard, J. Biernat, Y.-Z. Wu, E.-M. Mandelkow u. a. Indirubins Inhibit Glycogen Synthase Kinase-3 β and CDK5/P25, Two Protein Kinases Involved in Abnormal Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease: A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors?. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 251–260.

- [119] T. Kimoto, K. Hino, S. Koya-Miyata, Y. Yamamoto, M. Takeuchi, Y. Nishizaki, M. J. Micallef, S. Ushio, K. Iwaki, M. Ikeda und M. Kurimoto. Cell differentiation and apoptosis of monocytic and promyelocytic leukemia cells (U-937 and HL-60) by tryptanthrin, an active ingredient of *Polygonum tinctorium* Lour.. *Pathol. Int.* **2001**, 51, 315–325.
- [120] S. T. Yu, T. M. Chen, S. Y. Tseng und Y.H. Chen. Tryptanthrin inhibits MDR1 and reverses doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 358, 79–84.
- [121] S. Yang, X. Li, F. Hu, Y. Li, Y. Yang und J. Yan. Discovery of tryptanthrin derivatives as potent inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase with therapeutic activity in Lewis lung cancer (LLC) tumor-bearing mice. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 8321–8331.
- [122] Y. Jahng. Progress in the studies on tryptanthrin, an alkaloid of history. *Arch. Pharm. Res.* **2013**, 36, 517–535.
- [123] L. A. Onambele, H. Riepl, R. Fischer, G. Pradel, A. Prokop und M. N. Aminake. Synthesis and evaluation of the antiplasmodial activity of tryptanthrin derivatives. *Int. J. Parasitol.* **2015**, 5, 48–57.
- [124] H. P. Fiedler. Tryptophanstoffwechsel und Tryptanthrinbiogenese bei *Candida lipolytica*. Dissertation. Tübingen, **1974**.
- [125] E. Fiedler, H. P. Fiedler, A. Gerhard, W. Keller-Schierlein, W. A. König und H. Zähler. Synthese und Biosynthese substituierter Tryptanthrine. *Arch. Microbiol.* **1976**, 107, 249–256.
- [126] J. Bergman. The identity of Candidine and Qingdainon. *Phytochemistry.* **1989**, 28, 3547.
- [127] J. P. Xu. *Cancer Inhibitors from Chinese Natural Medicines*. CRC Press, **2016**.
- [128] G. S. Stein und A. B. Pardee. *Cell Cycle and Growth Control: Biomolecular Regulation and Cancer*. 2. Aufl. Wiley-Liss, **2005**.
- [129] B. X. Ye, L. J. Yuan, C. Chen und J. C. Tao. Electrochemical and Spectroscopic Study of the Interaction of Indirubin with DNA. *Electroanalysis.* **2005**, 17, 1523–1527.
- [130] A. Baeyer und A. Emmerling. Reduction des Isatins zu Indigblau. *Ber. dtsh. chem. Ges.* **1870**, 3, 514–517.
- [131] A. Baeyer. Über die Verbindungen der Indigogruppe. *Ber. dtsh. chem. Ges.* **1881**, 14, 1741–1750.
- [132] T. Sandmeyer. Über isonitrosoacetanilide und deren Kondensation zu Isatinen. *Helv. Chim. Acta.* **1919**, 2, 234–242.

- [133] Farbwerke vorm. Meister Lucius & Brüning. *Verfahren zur Herstellung von Derivaten der Indirubine*. Hoechst A.M., **1913**. DRP 283726.
- [134] J. Bergman. Structure determination of Candidine, a violet indolic constituent from culture solutions of *Candida Lipolytica*. *Tetrahedron*. **1985**, 41, 2883–2884.
- [135] J. Bergman, J. O. Lindström und U. Tilstam. The structure and properties of some indolic constituents in *Couroupita guianensis* aubl. *Tetrahedron*. **1985**, 41, 2879–2881.
- [136] H. Riepl und C. Urmann. Improved Synthesis of Indirubin Derivatives by Sequential Build-Up of the Indoxyl Unit: First Preparation of Fluorescent Indirubins. *Helv. Chim. Acta*. **2012**, 95, 1461–1477.
- [137] C. Gränacher und A. Mahal. Über die Verwendung des Rhodanins zu organischen Synthesen III. Derivate des Oxindols. *Helv. Chim. Acta*. **1923**, 6, 467–482.
- [138] Ch. Gränacher und Ch. Kouniniotis. Zur Kenntnis der β -Sulfhydryl- α -chinolon- γ -carbonsäure und einiger Chinolonderivate. *Helv. Chim. Acta*. **1928**, 11, 1241–1250.
- [139] A. Kaubisch und G. K. Schwartz. Cyclin-dependent kinase and protein kinase C inhibitors: a novel class of antineoplastic agents in clinical development.. *Cancer j. (Sudbury Mass.)* **2000**, 64, 192–212.
- [140] N. Krogsgaard-Larsen, M. Begtrup, K. Frydenvang und J. Kehler. Syntheses of aza-analogous iso-ergoline scaffolds using carbene mediated C-H insertion. *Tetrahedron*. **2010**, 66, 9297–9303.
- [141] T. A. Popp und Bracher F. N-Methylation of Aromatic Amines and N-Heterocycles under Acidic Conditions with the TTT (1,3,5-Trioxane-Triethylsilane-Trifluoroacetic Acid) System. *Synthesis*. **2015**, 47, 3333–3338.
- [142] E. Angelini, C. Balsamini, F. Bartocchini, S. Lucarini und G. Piersanti. Switchable Reactivity of Acylated α,β -Dehydroamino Ester in the Friedel-Crafts Alkylation of Indoles by Changing the Lewis Acid. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 5654–5657.
- [143] S. I. Sakai, N. Aimi, K. Yamaguchi, Y. Hitotsuyanagi, C. Watanabe, K. Yokose, Y. Koyama, K. Shudo und A. Itai. Elucidation of the structure of Olivoretin A and D (Teleocidin B). *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, 32, 354–357.
- [144] Y. Hitotsuyanagi, H. Fujiki, M. Sukanuma, N. Aimi, S. Sakai, Y. Endo, Shudo K. und Sugimura T. Isolation and structure elucidation of Teleocidin B-1, B-2, B-3, and B-4. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, 32, 4233–4236.
- [145] S. T. Nguyen, L. K. Johnson, R. H. Grubbs und J. W. Ziller. Ring-opening metathesis polymerization (ROMP) of norbornene by a Group VIII carbene complex in protic media. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3974–3975.

- [146] A. L. Pilo, Z. Peng und S. A. McLuckey. The dehydroalanine effect in the fragmentation of ions derived from polypeptides. *J. Mass Spectrom.* **2016**, 51, 857–866.
- [147] T. Yalcin, C. Khouw, I. G. Csizmadia, M. R. Peterson und A. G. Harrison. Why are B ions stable species in peptide spectra?. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, 6, 1165–1174.
- [148] B. Neises und W. Steglich. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1978**, 17, 522–524.
- [149] M. Schlosser und B. Schaub. Instant-ylid: ein lagerfähiges und gebrauchsfertiges Wittig-reagenz. *Chimia.* **1982**, 36, 396–7.
- [150] Sebastian Bieringer. Übertragung einer neuartigen Indirubin-Synthese auf die Darstellung von Qingdainonen. Masterarbeit. Technische Universität München, **2017**.
- [151] C. M. Orlando, J. G. Wirth und D. R. Heath. Methyl aryl ether cleavage in benzazole syntheses in polyphosphoric acid. *J. Org. Chem.* **1970**, 35, 3147–3149.
- [152] J. Bergman, J. O. Lindström und U. Tilstam. The structure and properties of some indolic constituents in *Couroupita guianensis* aubl. *Tetrahedron.* **1985**, 41, 2879–2881.
- [153] J. Baas, S. Bieringer, C. Frias, J. Frias, C. Soehnchen, C. Urmann, S. Ritter, H. Riepl und A. Prokop. Dihydroxyqingdainone Induces Apoptosis in Leukaemia and Lymphoma Cells via the Mitochondrial Pathway in a Bcl-2- and Caspase-3-Dependent Manner and Overcomes Resistance to Cytostatic Drugs In Vitro. *Molecules.* **2022**, 27, 5038.
- [154] S. Fulda und K.-M. Debatin. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* **2006**, 25, 4798–4811.
- [155] R. Krishna und L.D. Mayer. Multidrug resistance (MDR) in cancer: mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, 11, 265–283.
- [156] Stefanie Ritter. Extraktion und Screening bioaktiver Naturstoffe als erster Schritt der Entwicklung neuroregenerativer Therapien. Dissertation. Technische Universität München, **2021**.

7 Anhang

7.1 NMR-Spektren der synthetischen Minutissamide

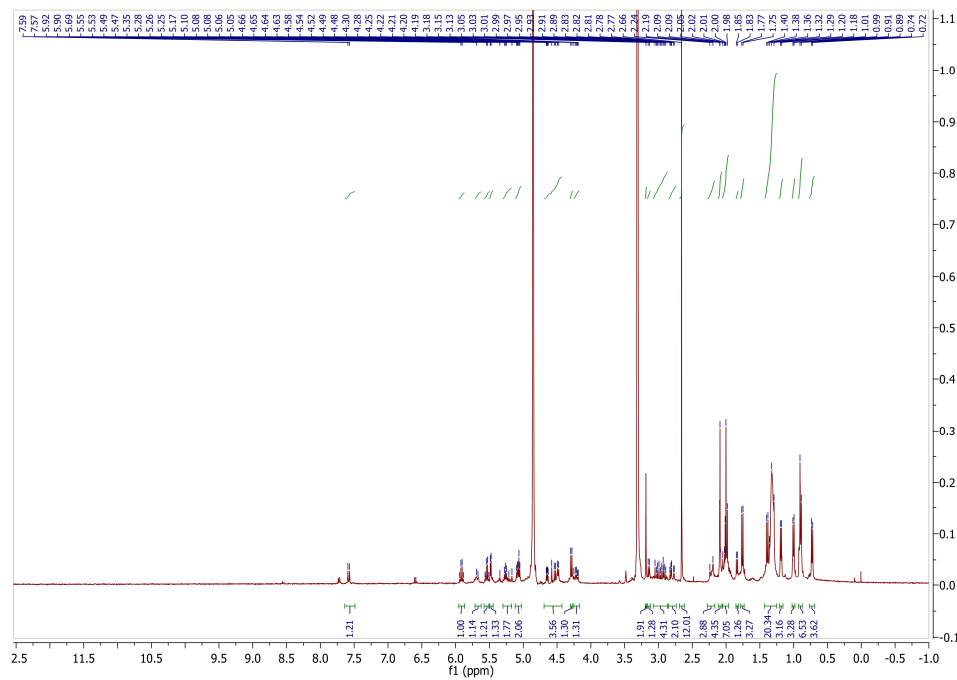


Abbildung 7.1: ^1H -Spektrum von Substanz 5a

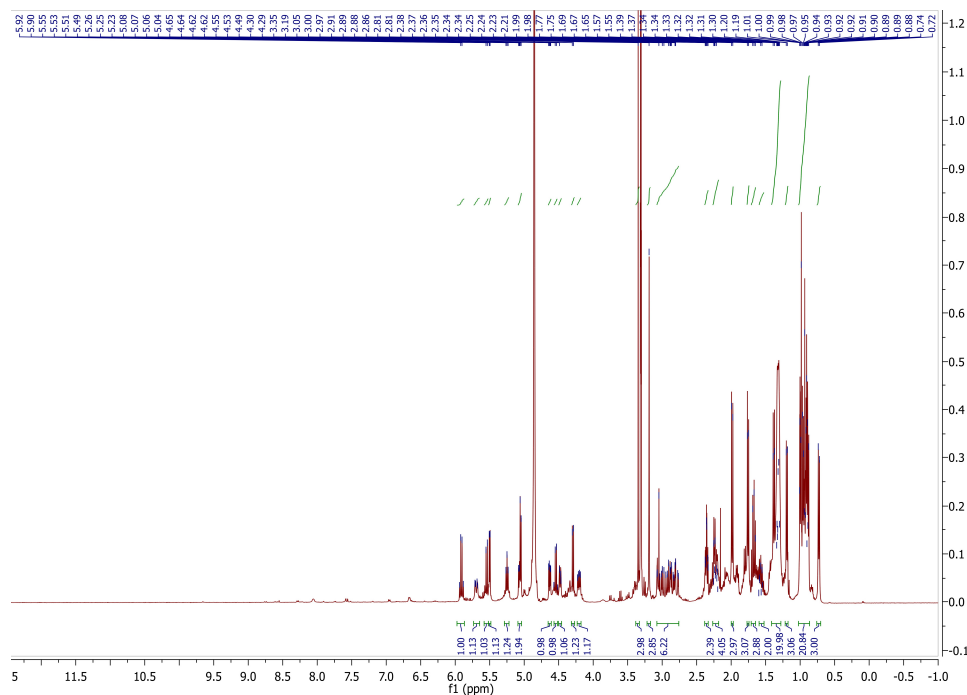


Abbildung 7.2: ^1H -Spektrum von Substanz 5b

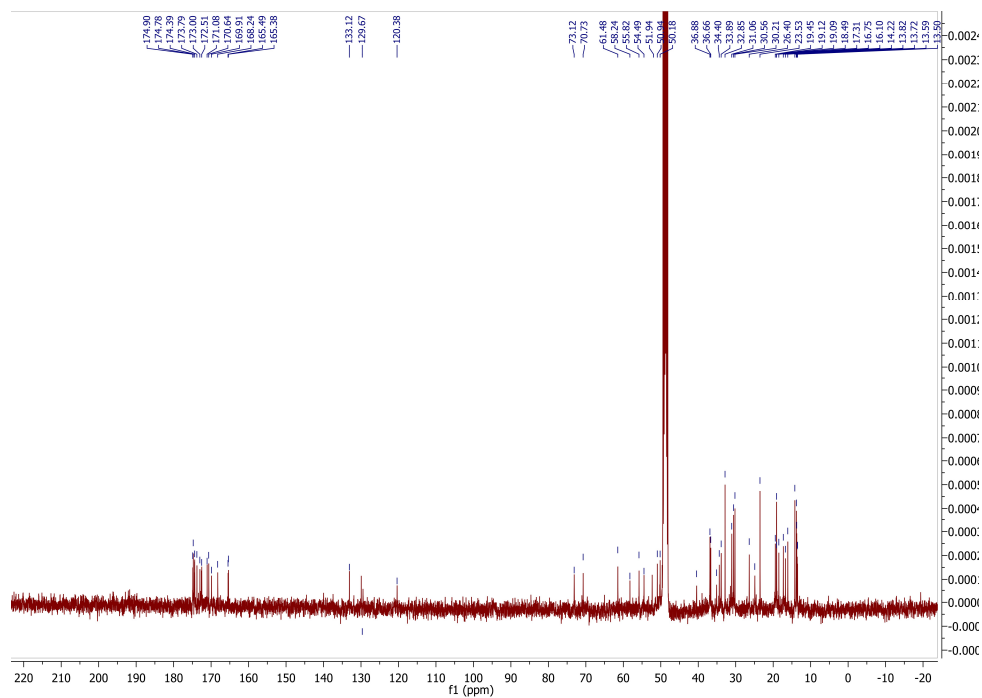


Abbildung 7.3: ^{13}C -Spektrum von Substanz 5b

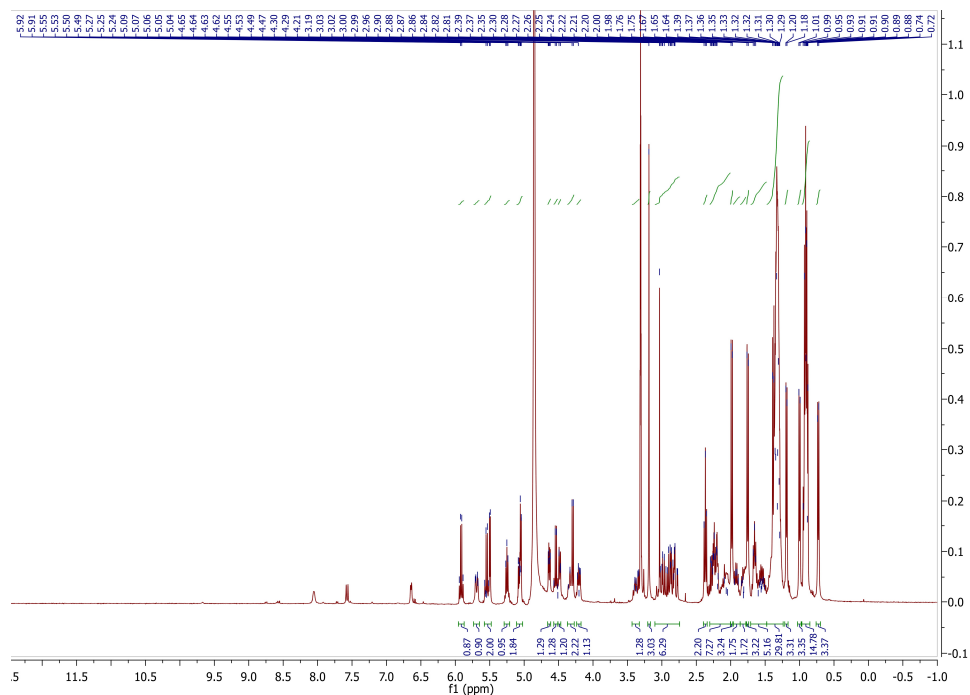


Abbildung 7.4: ^1H -Spektrum von Substanz 5c

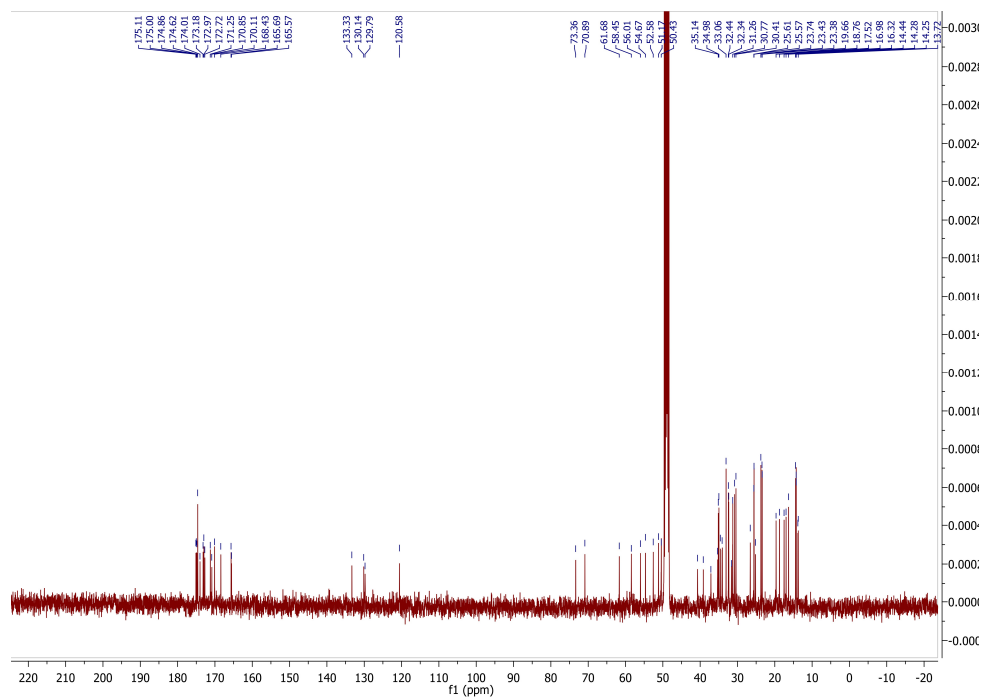


Abbildung 7.5: ^{13}C -Spektrum von Substanz 5c

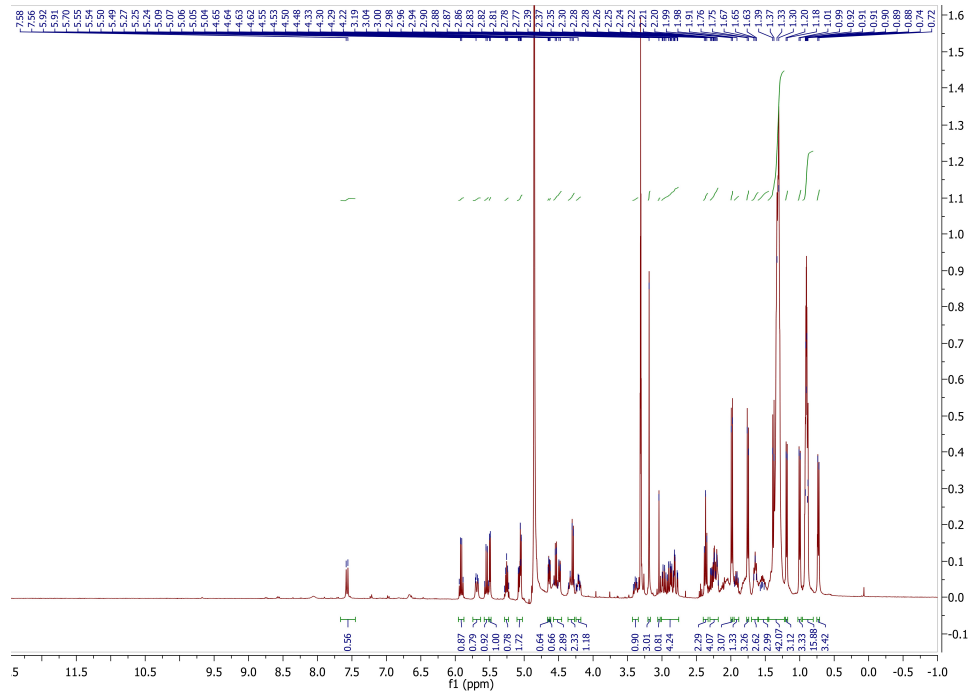


Abbildung 7.6: ^1H -Spektrum von Substanz 5d

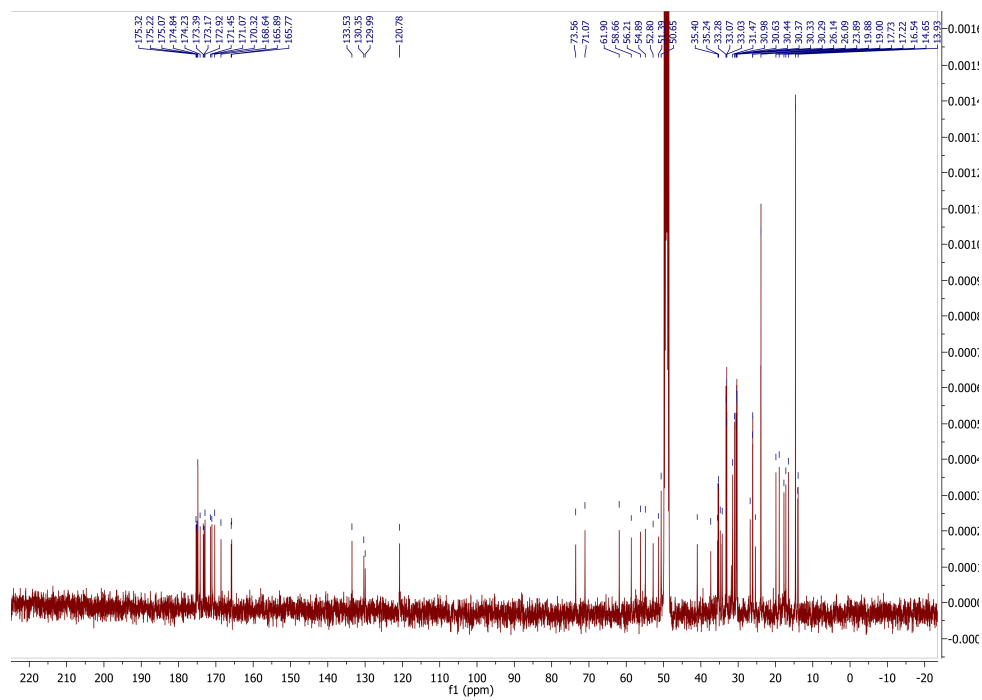


Abbildung 7.7: ^{13}C -Spektrum von Substanz 5d

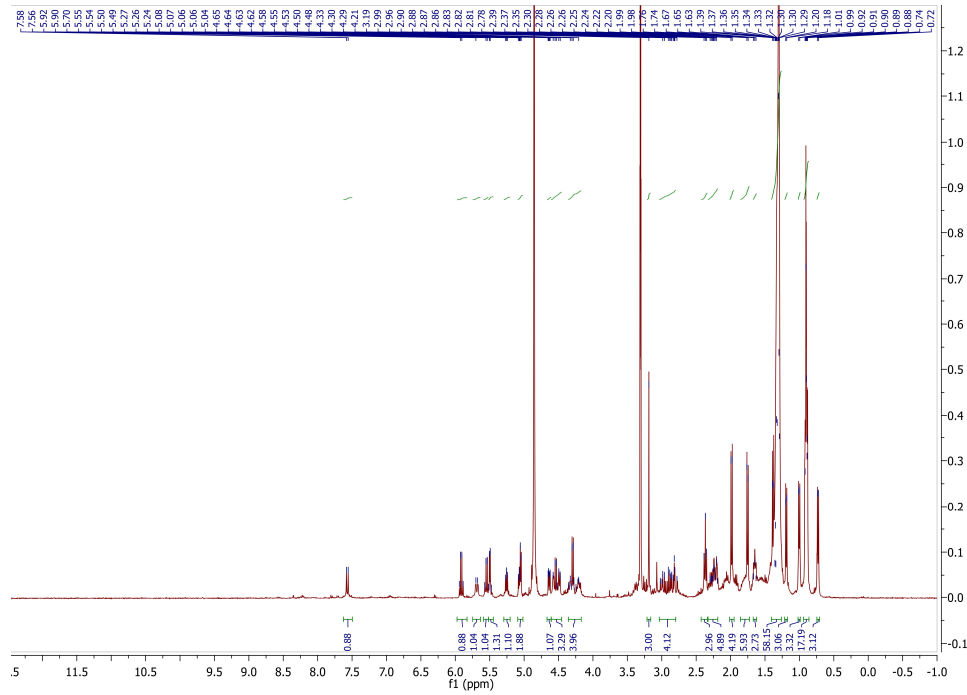


Abbildung 7.8: ^1H -Spektrum von Substanz 5e

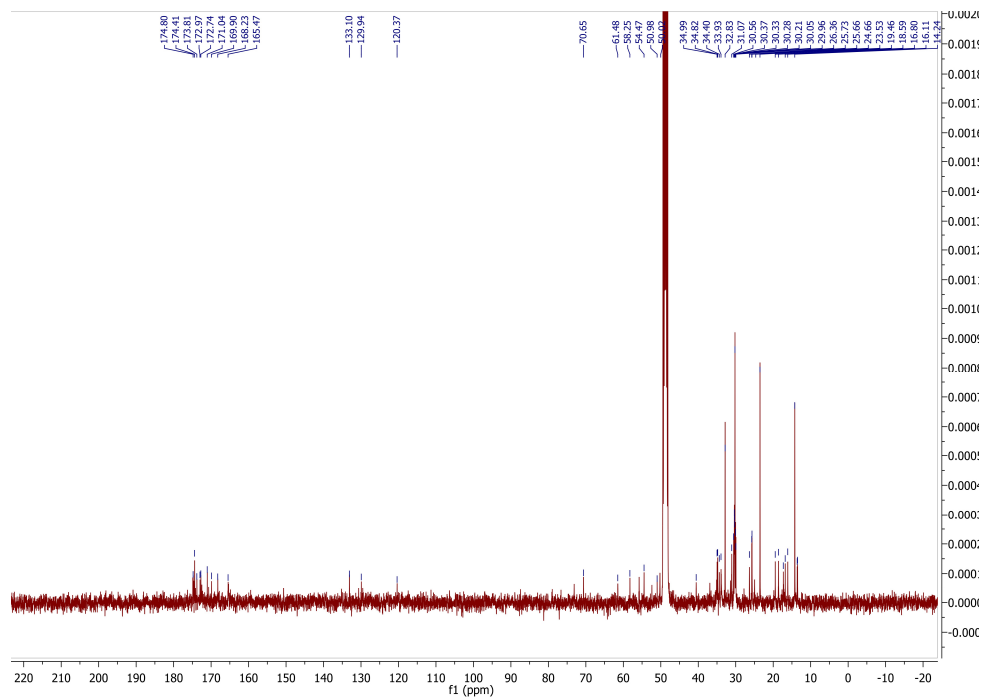


Abbildung 7.9: ^{13}C -Spektrum von Substanz 5e

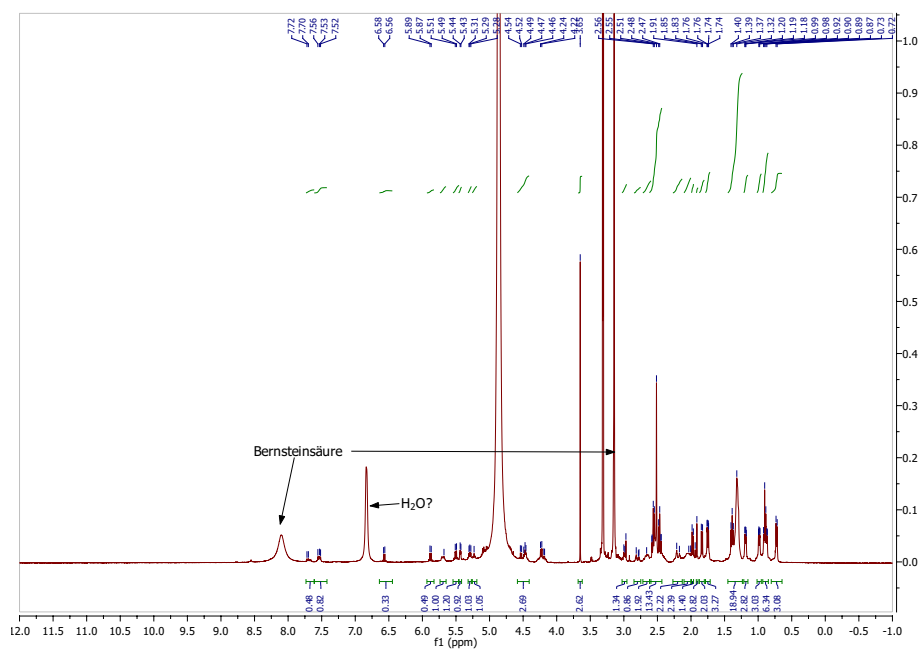


Abbildung 7.10: ^1H -Spektrum von Substanz 5f

7.2 NMR-Spektren ausgewählter Thioindirubine

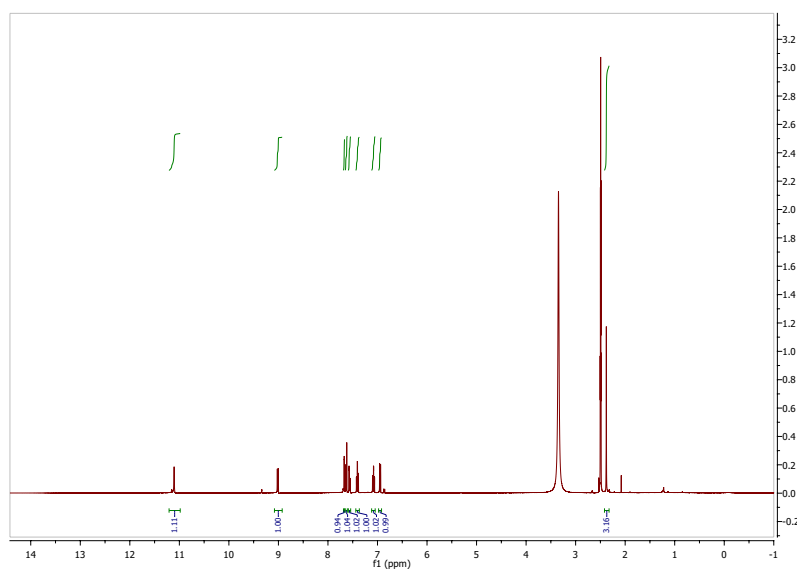


Abbildung 7.13: ^1H -Spektrum von Substanz 10a

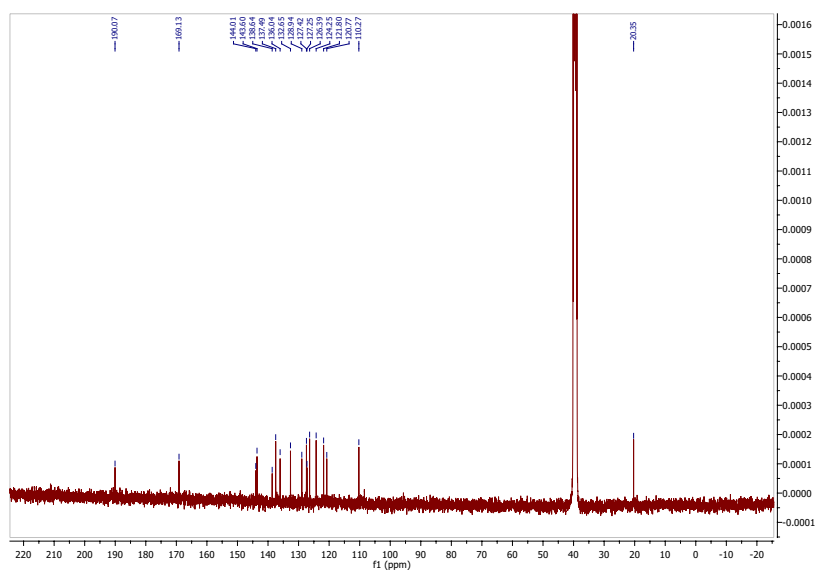


Abbildung 7.14: ^{13}C -Spektrum von Substanz 10a

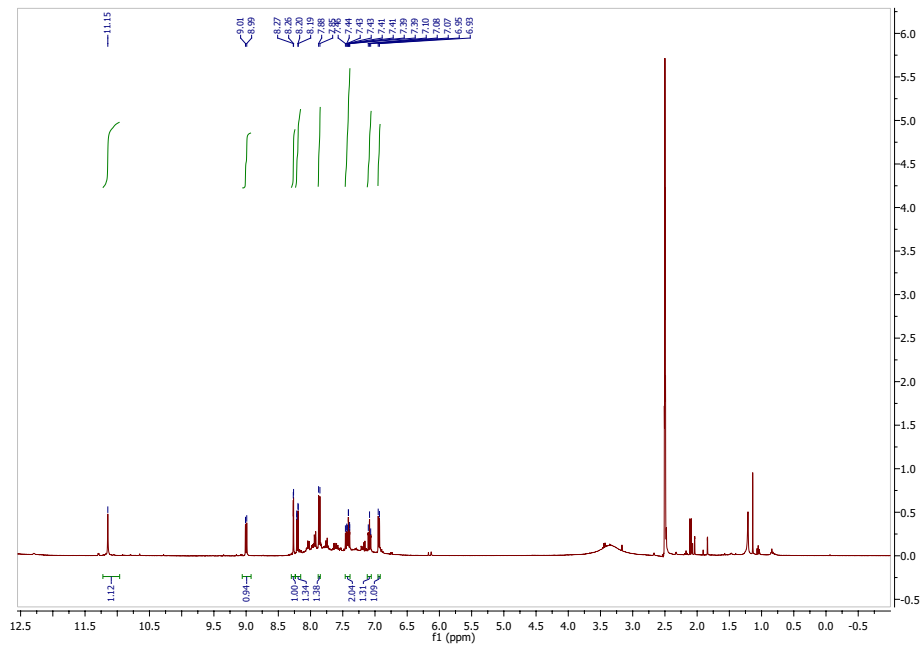


Abbildung 7.15: ^1H -Spektrum von Substanz 10b

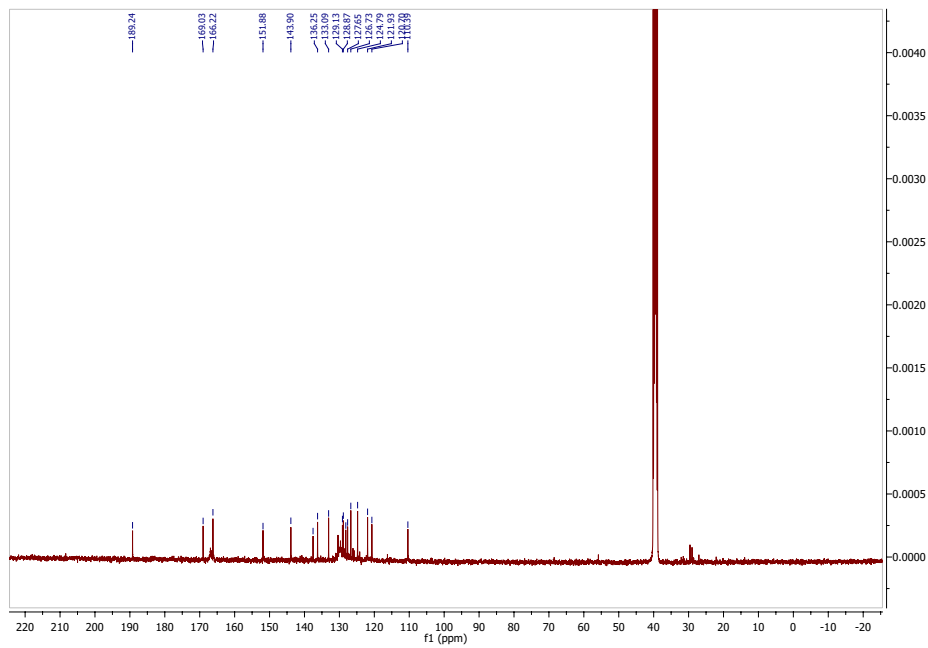


Abbildung 7.16: ^{13}C -Spektrum von Substanz 10b

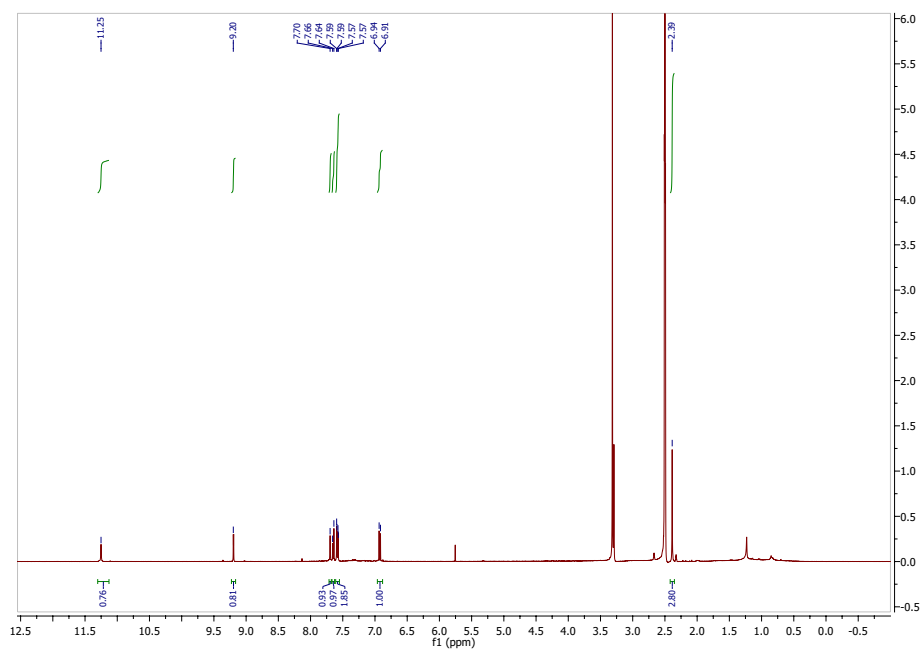


Abbildung 7.17: ^1H -Spektrum von Substanz 10d

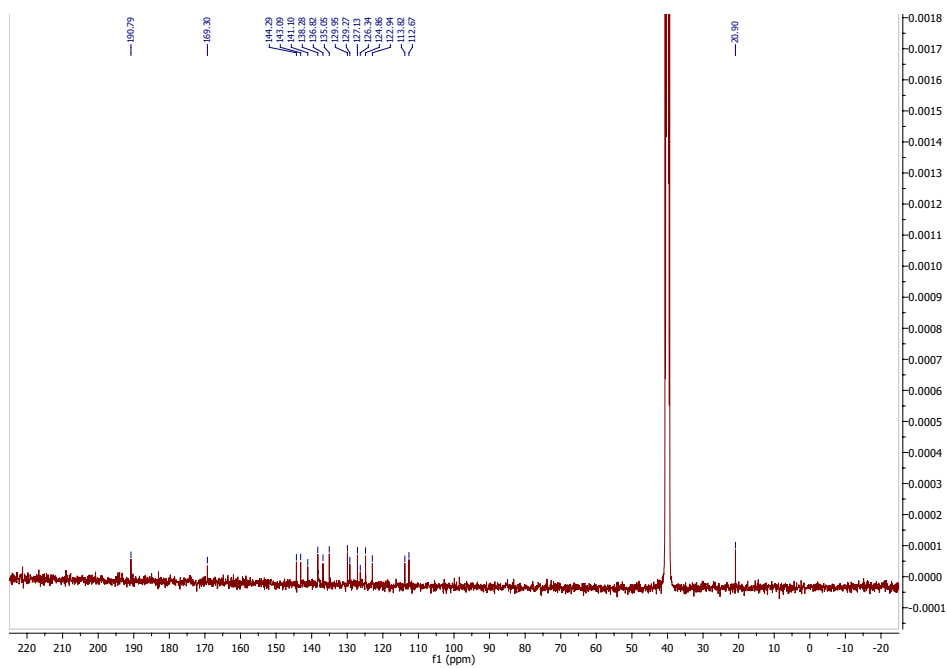


Abbildung 7.18: ^{13}C -Spektrum von Substanz 10d

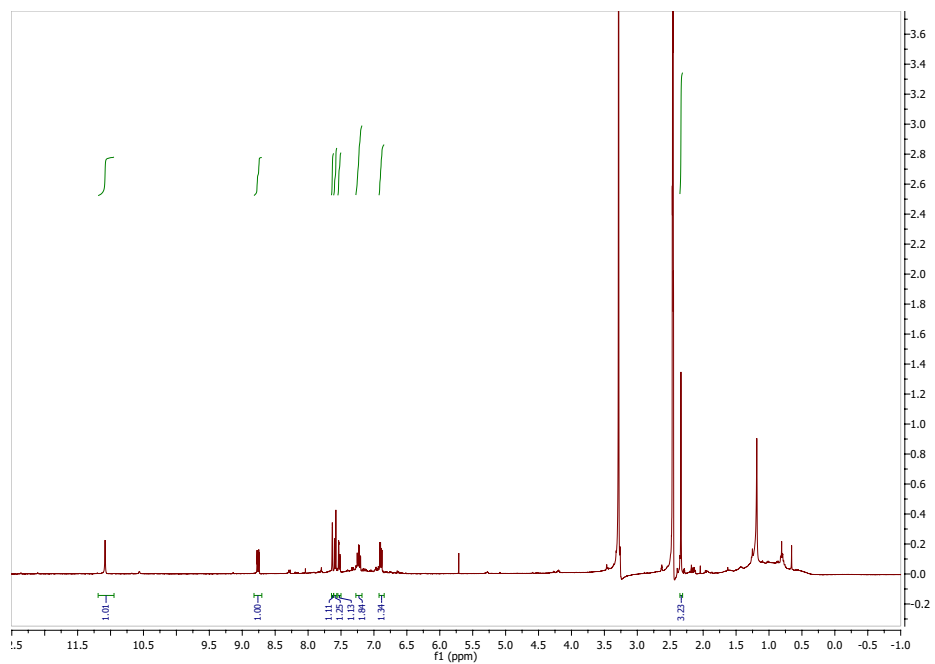


Abbildung 7.19: ^1H -Spektrum von Substanz 10e

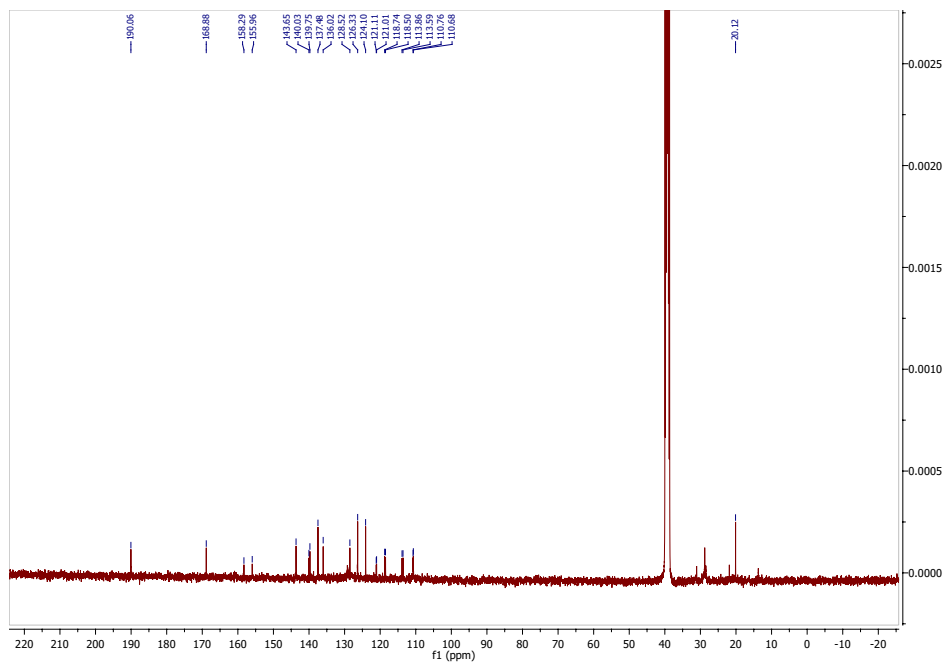


Abbildung 7.20: ^{13}C -Spektrum von Substanz 10e

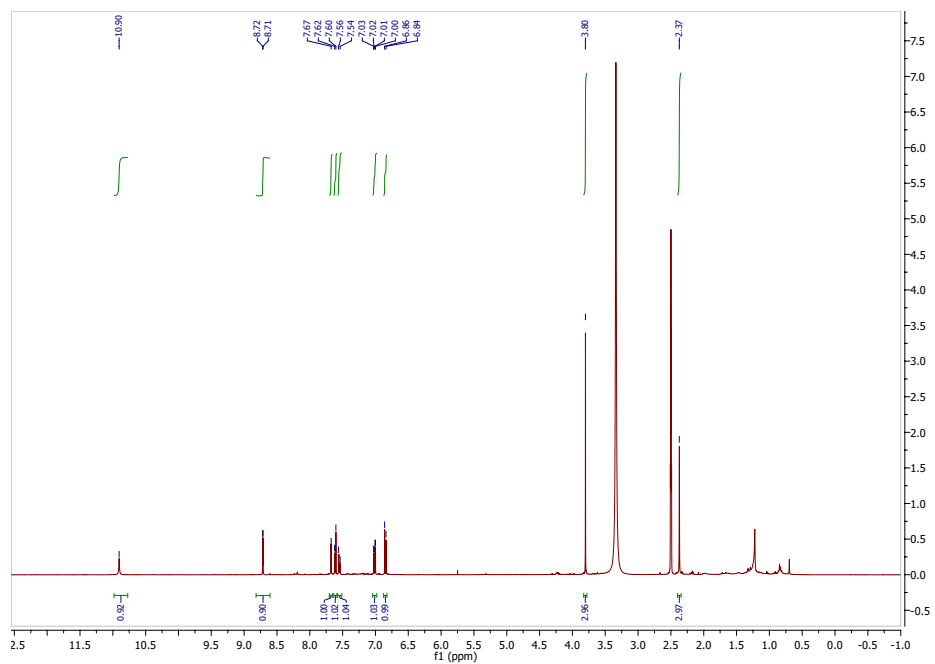


Abbildung 7.21: ^1H -Spektrum von Substanz 10f

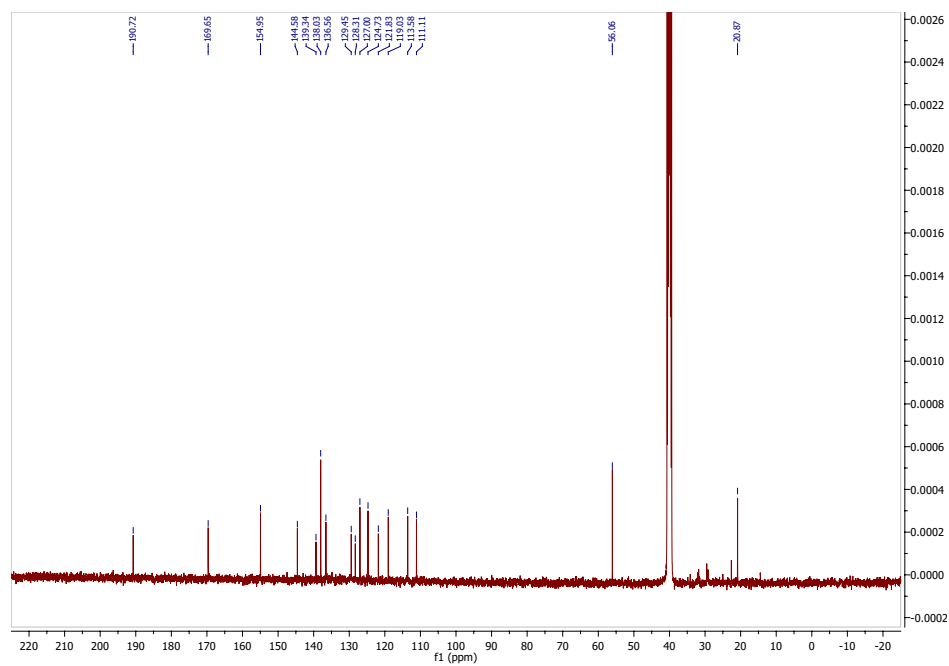


Abbildung 7.22: ^{13}C -Spektrum von Substanz 10f

7.3 Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturen von (-)-Indolactam V und Indirubin	6
2.1	Strukturen von Lyngbyatoxin A und Aplysiatoxin	8
2.2	Darstellung aller Teleocidin A und B Isomere	9
2.3	Biosynthetische Überlegungen und bestätigte Vorstufen von Indolactam durch Irie et al.	10
2.4	Gen-Cluster in der Biosynthese der Teleocidine nach Gerwick et al.	11
2.5	Von Awakawa et al. vorgeschlagener Mechanismus zur Umsetzung von Lyngbyatoxin A zu Teleocidin B-4 durch das Protein LtxD	12
2.6	Strukturen bekannter natürlich vorkommender Tumorpromotoren TPA, Teleocidin B-4 und ATX	13
2.7	Strukturen von Teleocidin B-4 und Olivoretin A	14
2.8	Struktur von (-)-Indolactam V	15
2.9	Totalsynthese von Indolactam nach Endo et al.	16
2.10	Ausschnitt aus der Totalsynthese von (-)-Indolactam V nach Bronner et al.	17
2.11	Ausschnitt aus der Totalsynthese von (-)-Indolactam V nach Haynes-Smith	18
2.12	Synthese von Lyngbyatoxin A nach Nathel et al.	20
2.13	Schema zur Darstellung synthetischer Teleocidine nach Stein et al.	21
2.14	Unterschiedliche Formen von Lipopeptiden	24
2.15	Zusammenfassung der Lipoinitiation einiger bekannter Lipopeptide durch Chooi et al.	25
2.16	Struktur des cyclischen Lipopeptids Daptomycin	28
2.17	Strukturen von Iturin, Fengycin und Surfactin	29
2.18	Strukturen von Balticidin und Hassilidin	30
2.19	Strukturen von Laxaphycin A und B	32
2.20	Struktur des cyclischen Lipopeptids Anabaenolysin, welches aus Algen der Gattung <i>Anabaena</i> isoliert werden kann	33
2.21	Struktur des cyclischen Lipopeptids Muscotoxin	34
2.22	Struktur der Minutissamide A-D	35
2.23	Strukturen der Puwainaphycine A, C und D	36
2.24	Strukturen der für diese Arbeit erhaltenen Minutissamide A, C und D	38
2.25	Strukturen von Indigo, Indirubin und Isoindigo	39
2.26	Strukturen von Tryptanthrin und Qingdainon	40
2.27	Reaktionsschema zur Totalsynthese von Indirubin nach A. Baeyer	43
2.28	Reaktionsschema zur Totalsynthese von Qingdainon nach J. Bergman	43

2.29	Reaktionsschema zur Totalsynthese von Indirubin- und Thioindirubinderivaten nach Riepl et al. [136]. Es besteht die Möglichkeit durch den Einsatz von Diazoniumsalzen Thioindirubinderivate zu erhalten	45
3.1	Reaktionsschema zur Tosylierung von 4-Bromindol	47
3.2	Reaktionsschema zur Ullmann-Kupplung von N-Tosyl-4-Bromindol mit L-Valin .	48
3.3	Reaktionsschema zur Methylierung der Valin-Aminogruppe von Struktur (12b) und anschließende Peptidkupplung mit L-Serinmethylester Hydrochlorid	49
3.4	Reaktionsschema zur one-pot Detosylierung und Wasserabspaltung mit Magnesium	49
3.5	Reaktionsschema zur Cyclisierung von Struktur 12e mit $ZrCl_4$	50
3.6	NMR-Spektrum des Produkts 12f von der Cyclisierung mit $ZrCl_4$. Rechteckig eingerahmt wurden die Valin-Signale des Moleküls	50
3.7	NMR-Spektrum des Produkts nach Epimerisierung mit $NHCO_3$ und säulenchromatographischer Auftrennung beider Produkte	51
3.8	Reaktionsschema zur Epimerisierung von Struktur 12f. Anschließend wird (-)-Indolactam V durch Reduktion mit $LiBH_4$ hergestellt	52
3.9	Schematische Darstellung der einzelnen Schritte bei der Erstellung des Rohextrakts zur Isolierung von Teleocidinen aus <i>Streptomyces</i> -Kulturen	53
3.10	LC/MS Analyse des Rohextraktes von <i>Streptomyces blastmyceticum</i> (oben) und des aufgereinigten Lyngbyatoxin A (unten)	54
3.11	Strukturen von Lyngbyatoxin A und Teleocidin B-4	55
3.12	Reaktionsschema für einen beispielhaften Versuch zur Metathese von Teleocidin B	56
3.13	Strukturvorschlag für ein Chelatmodell für die Koordinierung des Indol-Stickstoffs an das Metallatom des Grubbs-II-Katalysators	56
3.14	Reaktionsschema für einen beispielhaften Versuch zur Wittig-Reaktion von Minutissamid C	57
3.15	Mögliches Nebenprodukt bei der Durchführung der Wittig-Reaktion mit n-BuLi	58
3.16	Reaktionsschema für die Grignard-Reaktion von Minutissamid C	59
3.17	Reaktionsschema für die Wassereliminierung im Anschluss an die Grignard-Reaktion bei Minutissamid C	60
3.18	Mögliche Regioselektivitäten der in Abbildung 3.17 beschriebenen Eliminierungsreaktion	61
3.19	LC/MS-Analyse im Anschluss an die zweistufige Kettenverlängerung von Minutissamid C	61
3.20	Massenspektrum von Substanz 4a	62
3.21	Mögliche Struktur des Fragments für die gemessene Masse 814.5556 im Massenspektrum von Substanz 4a	63
3.22	LC/MS-Analyse der Steglich Veresterung von Minutissamid A mit Hexansäureanhydrid	64
3.23	Steglich-Veresterung von Minutissamid A	65

3.24	Massenspektrum von Substanz 5c	68
3.25	Vergößerung des Bereichs zwischen 400 und 500 m/z des Massenspektrums von Substanz 5c.	68
3.26	Schema zur Fragmentierung von Minutissamid A Derivat 5c im Zuge der Ionisierung	69
3.27	Struktur von Substanz 5g	70
3.28	Vergleich der ¹³ C-Spektren von Substanz 5g (oben) und Substanz 5c (unten) . .	70
3.29	Versuch zur Metathese von Minutissamid A und Hex-3-en bei den Dehydrothreoinresten	71
3.30	Mögliche Struktur des Dimerisationsprodukts aus der Selbstmetathese von Minutissamid A Derivat 5g	72
3.31	Oben: Massenspektrum des Metatheseprodukts von Minutissamid A Derivat 5g. Unten: Verößerung des markierten Bereichs. Der erste Peak des Isotopenmusters wurde als dreifach positiv geladenes Ion erkannt	73
3.32	Dosis-Wirkungs-Kurven der einzelnen semisynthetischen Minutissamid Varianten	75
3.33	Mögliche dreidimensionale Anordnung der Fettsäurereste und der Peptidringe des Minutissamid A Dimers	78
3.35	Umsetzung des Dihydroxyqingdainon Precursors in PPA	80
3.34	Zusammenfassung der einzelnen Schritte der Qingdainonsynthese	81
3.36	¹ H Spektrum des Vorprodukts der Cyclisierung zu Dimethoxyqingdainon	82
3.37	¹ H Spektrum des Vorprodukts der Cyclisierung zu Dihydroxyqingdainon	83
3.38	Antiproliferative Effekte von Dihydroxyqingdainon auf 1×10^5 Nalm-6 Zellen . .	85
3.39	Links: Reduktion des Membranpotentials durch Dihydroxyqingdainon. Rechts: Selektivität von Dihydroxyqingdainon für Nalm-6 Zellen	86
3.40	Überwindung von Resistenzen durch Dihydroxyqingdainon	87
3.41	Links: Antiproliferative Effekte von 5'-Methylthioindirubin (10a) auf Nalm-6 Zellen. Die Zellzahlen wurden über einen CASY©-Zellzähler bestimmt. Rechts: Selektivität von 10a gegenüber Nalm-6, BJAB (Burkitt Lymphomzellen) und gesunden Leukozyten (ex vivo). Die Induzierung der Apoptose wurde mit durchflusszytometrischer Analyse der DNA-Fragmentierung bestimmt	89
3.42	Überwindung der Resistenzen verschiedener Zelllinien durch 10a	90
3.43	Differenzierungsauslösende Aktivität der Thioindirubine	91
7.1	¹ H-Spektrum von Substanz 5a	145
7.2	¹ H-Spektrum von Substanz 5b	146
7.3	¹³ 13-Spektrum von Substanz 5b	146
7.4	¹ H-Spektrum von Substanz 5c	147
7.5	¹³ 13-Spektrum von Substanz 5c	147
7.6	¹ H-Spektrum von Substanz 5d	148
7.7	¹³ 13-Spektrum von Substanz 5d	148
7.8	¹ H-Spektrum von Substanz 5e	149

7.9	^{13}C -Spektrum von Substanz 5e	149
7.10	^1H -Spektrum von Substanz 5f	150
7.11	^1H -Spektrum von Substanz 5g	151
7.12	^{13}C -Spektrum von Substanz 5g	151
7.13	^1H -Spektrum von Substanz 10a	152
7.14	^{13}C -Spektrum von Substanz 10a	152
7.15	^1H -Spektrum von Substanz 10b	153
7.16	^{13}C -Spektrum von Substanz 10b	153
7.17	^1H -Spektrum von Substanz 10d	154
7.18	^{13}C -Spektrum von Substanz 10d	154
7.19	^1H -Spektrum von Substanz 10e	155
7.20	^{13}C -Spektrum von Substanz 10e	155
7.21	^1H -Spektrum von Substanz 10f	156
7.22	^{13}C -Spektrum von Substanz 10f	156

7.4 Tabellenverzeichnis

2.1	Übersicht über die Mengenverteilung produzierter Lipopeptide und Lipopeptidfamilien von verschiedenen mikrobiellen Gattungen	23
3.1	Eingesetzte Volumina bei der SPE-Aufarbeitung der Reaktionsmischungen	60
3.2	Darstellung der Fraktionen, in denen Minutissamid-Derivate je nach Ansatzgröße gefunden wurden. Bei größeren Ansätzen wurden zusätzlich in der 100 % MeCN Fraktion Produkte gefunden. Des Weiteren war es auffällig, dass je nach hinzugefügter Kettenlänge mehr oder weniger Produkt in der 100 % MeCN Fraktion durch LC/MS nachgewiesen werden konnte	60
3.3	Eingesetzte Volumina bei der SPE-Aufarbeitung der Reaktionsmischungen	64
3.4	Darstellung der Fraktionen, in denen Minutissamid-Derivate je nach Ansatzgröße gefunden wurden. Bei größeren Ansätzen wurden zusätzlich in der 100 % MeCN Fraktion Produkt gefunden. Der einzige Spezialfall besteht bei der Umsetzung von Minutissamid A mit Bernsteinsäureanhydrid bei dem das Produkt in der 20 % MeCN Fraktion nachgewiesen wurde	65
3.5	Erhaltene synthetische Minutissamide durch die Umsetzung von Minutissamid A mit verschiedenen Carbonsäureanhydriden in Gegenwart von DMAP	66
3.6	Beobachtete Fragmente im Massenspektrum von Substanz 5c mit zugehöriger Summenformel, dem m/z-Wert und die Messabweichung vom theoretisch berechneten m/z-Wert	67
3.7	Übersicht über die gemessenen MIC-Werte synthetischer und natürlicher Minutissamide und Puwainaphycine.	76
3.8	Übersicht der hergestellten Thioindirubine	88
5.1	Übersicht über die LC-Methode, die für HPLC/MS-Analysen benutzt wurde . . .	97
5.2	Übersicht über die LC-Methode, die für die präparative HPLC benutzt wurde . .	97
5.3	Programm zur Normalphasenchromatographie des Amberlite Rohextrakts aus der Kultivierung von <i>Streptomyces blastmyceticum</i>	100

7.5 Abkürzungsverzeichnis

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
TSB	Tryptische Soja-Brühe
TCM	Traditionelle chinesische Medizin
PKC	Protein Kinase C
TPA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
COSY	Homonukleare Korrelationspektroskopie
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
s	Singulett
d	Dublett
t	Triplet
dd	Dublett von Dubletts
td	Triplet von Dubletts
q	Quartett
m	Multiplet
J	Kopplungskonstante
DMSO-D6	Deutertes Dimethylsulfoxid
MEOD-D4	Deutertes Methanol
CDCL₃-D	Deutertes Chloroform
DMF	Dimethylformamid
THF	Tetrahydrofuran
DCM	Dichlormethan
EtOAc	Ethylacetat
MeOH	Methanol
MeCN	Acetonitril
EtOH	Ethanol
DMSO	Dimethylsulfoxid
PPA	Polyphosphorsäure
eq.	Äquivalent
calcd	berechnet
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
NRP	Nichtribosomale Peptide
NPRS	Nichtribosomale Peptidsynthetasen
PKS	Polyketid Synthetase
CML	Chronische myeloische Leukämie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESI	Elektrosprayionisation

MS	Massenspektrometrie
TOF	Time of Flight
IT	Ion Trap
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie
FAB	Fast Atom Bombardement
ELSD	Lichtstreuendetektor
FT IR	Fourier Transformations Infrarotspektroskopie
UV/VIS	Ultraviolett/Sichtbar
DC	Dünnschichtchromatographie
RT	Raumtemperatur
kat	katalytisch
ATP	Adenosintriphosphat
MIN	Minutissamid
PUW	Puwainaphycin
BPC	Base Peak Chromatogram

7.6 Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden durch folgende Veröffentlichungen präsentiert:

Publikationen

J. Hájek[‡], S. Bieringer[‡], K. Voráčová, M. Macho, K. Saurav, K. Delawská, P. Divoká, R. Fišer, G. Mikušová, J. Cheel, D. P. Fewer, D. L. Vu, J. Paichlová, H. Riepl und P. Hrouzek. Semi-synthetic puwainaphycin/minutesamide cyclic lipopeptides with improved antifungal activity and limited cytotoxicity. *RSC Adv.* **2021**, 11, 30873-30886.

‡: Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen

J. Baas, S. Bieringer, C. Frias, J. Frias, C. Soehnchen, C. Urmann, S. Ritter, H. Riepl, A. Prokop. Dihydroxyquingdainone Induces Apoptosis in Leukaemia and Lymphoma Cells via the Mitochondrial Pathway in a Bcl-2- and Caspase-3-Dependent Manner and Overcomes Resistance to Cytostatic Drugs In Vitro. *Molecules.* **2022**, 27, 5038.

Poster

S. Bieringer, C. Urmann, K. Saurav, P. Hrouzek und H. Riepl. Isolation of Lyngbyatoxin and other Teleocidin species from *Streptomyces Blastmyceticum* culture. 67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Innsbruck, *Planta Med.* **2019**, 85, 1571-1572.