

5.2. Zusammenfassung und Ausblick (German)

Proteasominhibitoren sind in den vergangenen Jahren in den Fokus des Interesses getreten, da sie großes therapeutisches Potential in der Krebstherapie zeigen. Der erste, von der FDA für den Menschen als Medikament zugelassene Proteasominhibitor ist Bortezomib, welcher Anwendung in der Therapie von Plasmozytomen (multiples Myelom) findet. Die Behandlung mit Bortezomib ist allerdings durch eine Reihe an Nebenwirkungen und aufkommenden Resistenzen gekennzeichnet. Infolgedessen wird weiterhin nach neuen biologisch aktiven Substanzen gesucht, welche als verträglichere Medikamente in der Chemotherapie eingesetzt werden können. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, besitzt Syringolin A (SylA), ein zwölfgliedriges makrozyklisches Lactam, welches aus dem Phytopatogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) isoliert wurde, eine vielversprechende Leitstruktur.

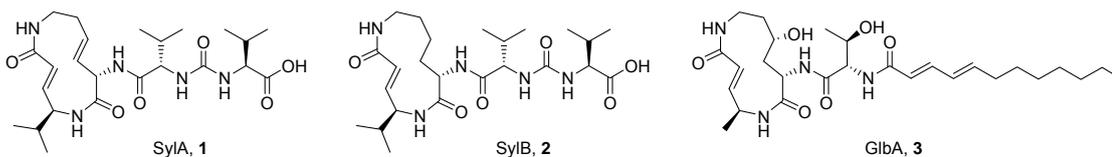
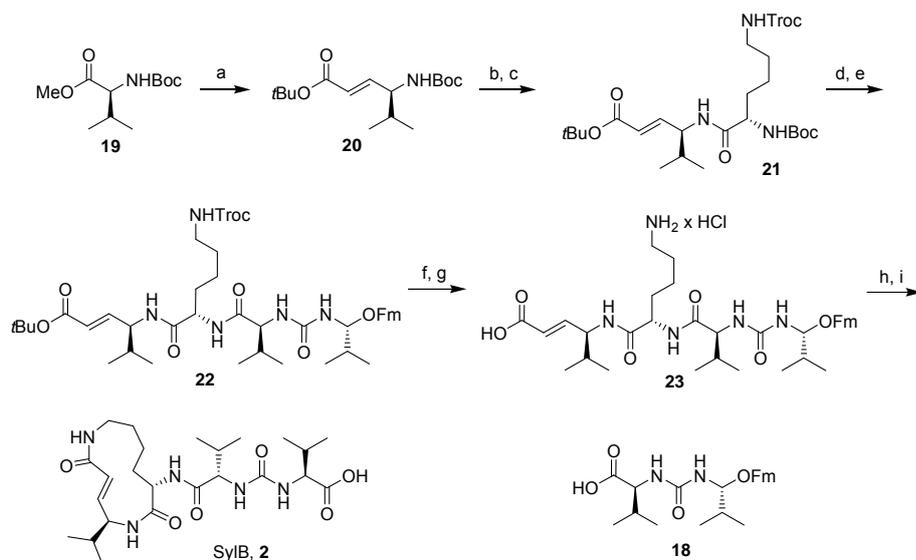


Abbildung 24. Die chemischen Strukturen dreier Mitglieder der Syrbactin-Naturwirkstofffamilie: Syringolin A (SylA, 1), Syringolin B (SylB, 2) und Glidobactin (GlbA, 3). Alle drei Verbindungen sind potente Proteasominhibitoren.

Während dieser Arbeit wurden Syntheserouten für verschiedene Mitglieder der Syrbactin-Familie und Derivate dieser entwickelt. Anhand dieser Verbindungen wurden Struktur-Aktivitätsbeziehungen für die Hemmung des eukaryotischen Proteasoms durch Syringoline aufgezeigt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Syringoline auch in komplexen Proteomen hochselektiv das Proteasom adressieren.

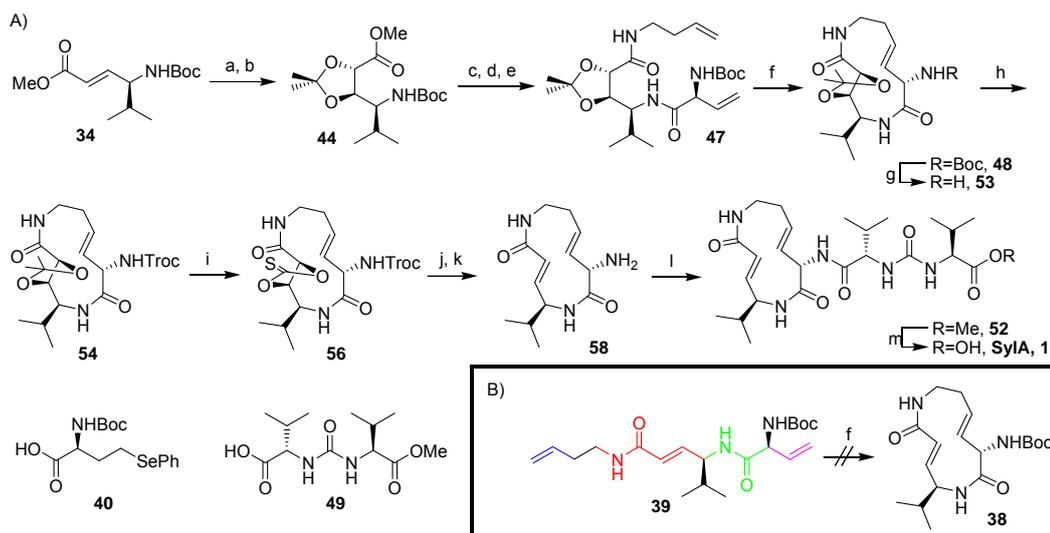
Zu Beginn wurde eine Totalsynthese von SylB, mit Substanzen aus dem natürlichen chiralem Pool (Valin und Lysin) entwickelt, welche als Schlüsselschritt eine Makrolactamisierung enthält. Um die erfolgreiche Synthese von SylB zu gewährleisten, wurden orthogonale Schutzgruppenstrategien etabliert, welche es erlaubten, SylB in neun Stufen ausgehend von Boc-(L)-Valinmethylester mit einer Gesamtausbeute von 7,8% darzustellen (Schema 36). Mit Hilfe dieser Syntheseroute war eine erstmalige Bestimmung aller Stereozentren von SylB möglich. Die Adaption dieser Synthesestrategie sollte dann den Zugang zu Syringolin A und weiteren wichtigen Syringolinderivaten ermöglichen.



Schema 36. Synthese von Syringolin B (SylB). Reagenzien und Bedingungen: (a) (i) 1 M DIBAL-H/Toluol (2 eq.), Toluol, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 h; (ii) $\text{Ph}_3\text{PCHCO}_2t\text{Bu}$ (1,5 eq.), DCM, RT, 12 h, 84% (zwei Stufen); (b) 4 M HCl/Dioxan, $t\text{BuOAc}$, 4 Å MS, $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, über Nacht, 84%; (c) Boc-Lys(Troc)-OH (1,7 eq.), PyBop (3 eq.), HOAt (3 eq.), DIEA (6 eq.), DCM, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis RT, über Nacht, 85%; (d) 4 M HCl/Dioxan, $t\text{BuOAc}$, 4 Å MS, $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, über Nacht, 83%; (e) **18** (1,2 eq.), PyBop (1,5 eq.), HOAt (1,5 eq.), DIEA (3 eq.), DCM, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis RT, über Nacht, 75%; (f) Zn (150 eq.), THF/AcOH (1:1), 3 h, 97%; (g) (i) wässrige Ameisensäure, über Nacht; (ii) aq. HCl, >98% (zwei Stufen); (h) PyBop (3 eq.), HOAt (3 eq.), DIEA (6 eq.), DMF, RT, 32 h, 30%; (i) Piperidin/DMF (1:4), 73%.

Trotz der gelungenen Synthese von SylB führte die Makrolactamisierungsstrategie entgegen aller Erwartungen im Fall der Totalsynthese von SylA jedoch nicht zum Ziel. Daher wurde ein alternativer Weg für diese Synthese entwickelt. Die Schlüsselreaktion dieser alternativen verbesserten Route war eine Ringschlussmetathese mit einem konformationell-vororganisiertem, linearem Vorläufer (Schema 37).

Dementsprechend wurde das Ausgangsmaterial **34** zunächst durch Dihydroxylierung und anschließende Acetalisierung mit Aceton in ein fünfgliedriges, zyklisches Acetal transformiert. Zusätzliche iterative Peptidkupplungen führten zu einem linearen Intermediat, welches unter Verwendung des Grubbs-Katalysators (2. Generation) zyklisiert werden konnte.



Schema 37. A) Synthese von Syringolin A (SylA). Reagenzien und Bedingungen: (a) OsO_4 (0,05 eq.), NMO (1,5 eq.), $\text{Ac}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (2:1), RT, 48 h, 85%; (b) 2,2-DMP (30 eq.), PPTS (0,05 eq.), DCM, 60 °C, 5 h, >98%; (c) (i) 1 M aq. LiOH (3 eq.), MeOH/ H_2O (1:1), 0 °C to RT über 30 min; (ii) 3-Butenylamin Hydrochlorid (1,2 eq.), PyBop (1,5 eq.), HOAt (1,5 eq.), DIEA (2 eq.), DCM, 0 °C bis RT, über Nacht, 80% (zwei Stufen); (d) (i) 2,6-Lutidin (2 eq.), TMSOTf (1,5 eq.), DCM, RT, 15 min; (ii) **40** (1,3 eq.), PyBop (1,5 eq.), HOAt (1,5 eq.), DIEA (2 eq.), DCM, 0 °C bis RT, über Nacht, 87% (zwei Stufen); (e) 30% aq. H_2O_2 /DIEA (1:1), DCM, 50 °C, 3 h, 93%; (f) Grubbs II Katalysator (0,15 eq.), Toluol, 90 °C, 18 h, 49%; (g) 2,6-Lutidin (2 eq.), TMSOTf (1,5 eq.), DCM, RT, 15 min; (h) 2,2,2-Trichloroethylchloroformiat (1,1 eq.), NaHCO_3 (2 eq.), THF, 0 °C bis RT, 90 min, 81% (zwei Stufen); (i) (i) MW, 150 W, 140 °C, 30 min, $p\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1 eq.), MeOH/ H_2O /THF 2:2:1; (ii) $(\text{Im})_2\text{CS}$ (10 eq.), DMAP (10 eq.), THF, 80 °C, über Nacht, 86% (zwei Stufen); (j) $\text{P}(\text{OMe})_3$, 130 °C, 2,5 h, 88%; (k) Zn (150 eq.), THF/ AcOH (1:1), 3 h, >98%; (l) **49** (1,1 eq.), PyBop (1,2 eq.), HOAt (1,2 eq.), DIEA (2 eq.), DMF, 0 °C bis RT, 40 min, 95%; (m) AlCl_3 (8 eq.), Methylethylsulfid, RT, 1 h, 92%. B) Versuchte Synthese des Makrozyklus **38** unter Verwendung der Ringschlussmetathese. Die einzelnen planaren Strukturelemente des nicht vororganisierten, linearen Vorläufers sind farblich hervorgehoben.

In einem ersten linearen, synthetischen Ansatz zur Darstellung von SylA wurde die exozyklische Seitenkette direkt an dem Boc-geschützte Derivat **48** aufgebaut. Dieser Weg wurde dann mit einer modifizierten Strategie, welche eine konvergentere und somit leichtere Synthese von SylA-Derivaten ermöglichte, ergänzt. Dies ist von Interesse, da erste biologische Studien zeigten, dass Modifikationen an der exozyklischen Seitenkette entscheidenden Einfluss auf die Gesamtkativität der Syringoline haben. Folglich wurde zur Derivatisierung ein Schutzgruppenaustausch auf der Stufe des acetalgeschützten Makrozyklus vorgenommen. Aus diesem so erhaltenem Vorläufer wurde durch Entschützung des Diols und anschließender Corey-Winter Eliminierung ein vollständig funktionalisierter SylA-Makrozyklus erhalten. Das entsprechende freie Amin **58** wurde im Weiteren mit verschiedenen Seitenketten

gekuppelt, um eine kleine Auswahl an Derivaten zu erhalten (Abbildung 25). Mit diesen wurden weitere Einblicke in die Struktur-Aktivitätsbeziehungen der Syringolin-vermittelten Proteasominhibierung erhalten. Auf diese Weise wurde z. B. ein lipophiles SylA-Derivat entwickelt, welcher bis heute der potenteste Inhibitor der Syringolinfamilie ist. Die Inhibierung des Proteasoms durch dieses hydrophobe SylA-Derivat ist dabei um das 100-fache stärker als die durch das natürliche SylA.

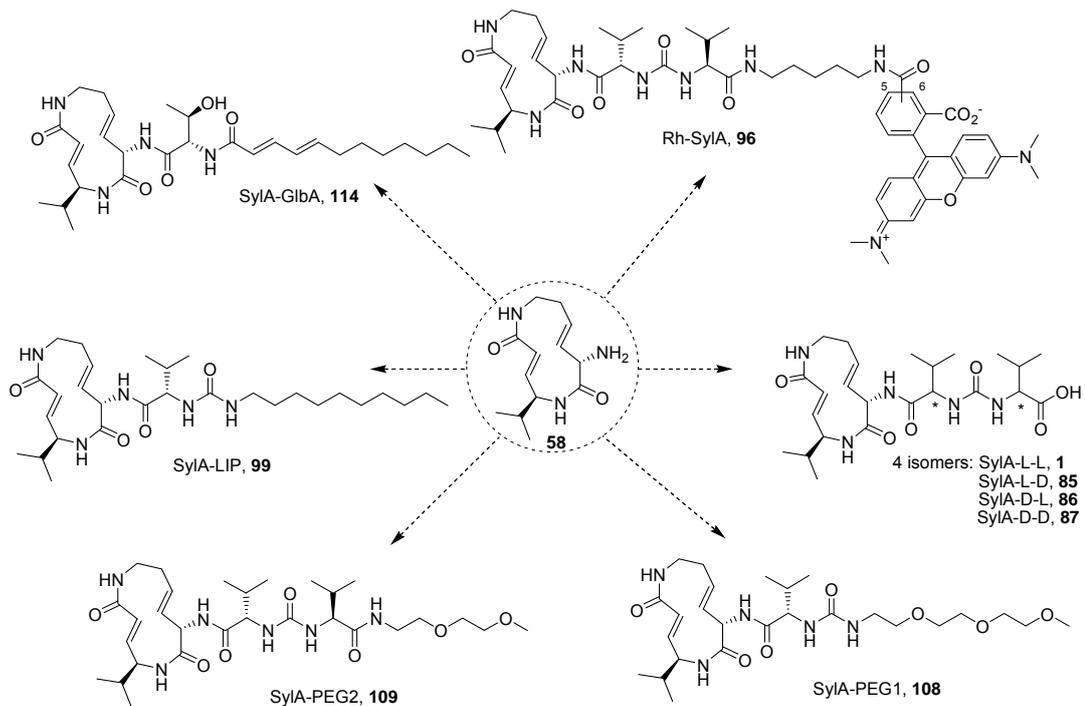


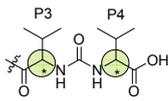
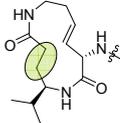
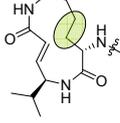
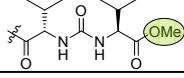
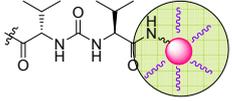
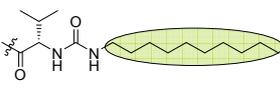
Abbildung 25. Chemische Strukturen verschiedener SylA-Analoga, dargestellt durch Kupplung verschiedener Seitenketten mit dem vollfunktionalisierten SylA-Makrozyklus.

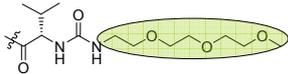
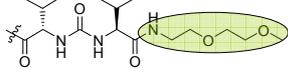
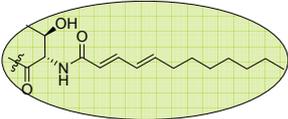
Die dargestellten Analoga wurden in verschiedenen biologischen Assays evaluiert und die erhaltenen Ergebnisse stichpunktartig in Tabelle 10 aufgeführt.

Zusammenfassend zeigten diese Studien, dass die Freisetzung der makrozyklischen Ringspannung während der kovalenten Hemmung und/oder die strukturelle Vororganisation die Triebkraft der beobachteten Proteasominhibition ist. Diese Schlussfolgerung resultiert aus dem Vergleich der Inhibierungspotenziale von SylA und SylB. Obwohl sich die Strukturen nur um eine endocyclische Doppelbindung (Dehydrolysin) unterscheiden, erhält man für den weniger gespannten Makrozyklus (SylB) eine 10-fach niedrigere Aktivität. Zusätzliche Studien mit dem lipophilen SylA-Derivat zeigten, dass eine hydrophobe Region im 20S Proteasom existiert, welche von entsprechenden, lipophilen Syringolinderivaten adressiert werden kann. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit dem beobachteten, höheren

Inhibierungspotenzial des Syrbactins Glidobactin A, welches ebenfalls mit seiner lipophilen Seitenkette mit der hydrophoben Region des Proteasoms zu interagieren scheint. Diese Studien zeigten, dass Syrbactine an sich eine hohe Selektivität gegenüber der oben genannten proteasomalen hydrophoben Region aufweisen. Diese Selektivität beruht anscheinend auf der Konstitution und der Konformation des makrozyklischen Ringsystems. Weitere Untersuchungen sind nötig, um einen tieferen Einblick in die vorliegenden Struktur-Aktivitätsbeziehungen zu erhalten.

Tabelle 10. Struktur-Aktivitätsbeziehungen abgeleitet aus biologischen Untersuchungen auf der Basis von SylA Analoga.

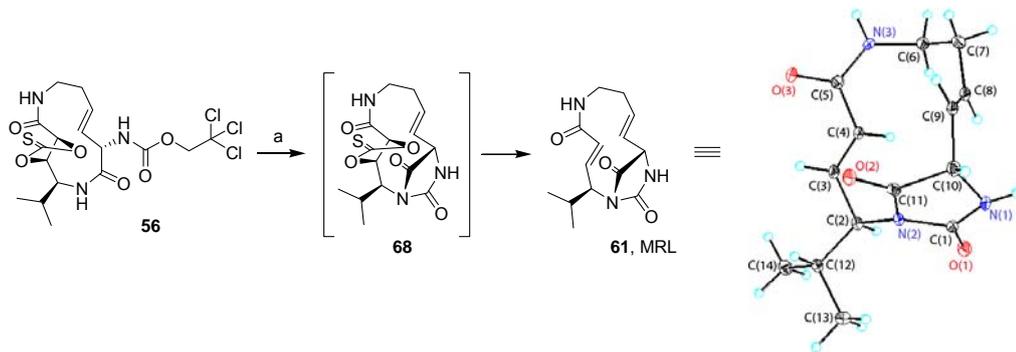
Verbindung	Untersuchte Eigenschaft ^[a]	Analyseart	K_i' für die Inhibierung der chymotryptischen Aktivität [nM] ^[b]	Schlussfolgerungen/Anwendungen
SylA: 4 Isomer		• NMR • Biochemische Analyse	L-L: $1,016 \pm 179$ L-D: $11,117 \pm 2,222$ D-L: $>100,000$ D-D: $33,962 \pm 11,317$	- Alle Stereozentren des natürlichen SylA sind (L)-konfiguriert - Deutlicher Verlust an Inhibierungspotential ist zu beobachten, wenn P3-Aminosäure inverses Stereozentrum (D) aufweist. - Konfiguration der P4-Aminosäure hat geringeren Einfluss auf das Inhibierungspotential.
SylA-Sat		• Biochemische Analyse • ABPP-Kompetitions-Analyse mit <i>Arabidopsis</i> Zelllysaten	Nicht bestimmt	- Kein Inhibierungspotential mehr vorhanden, wenn α,β -ungesättigte Doppelbindung durch $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ersetzt wird.
SylB		• Biochemische Analyse • Röntgenstrukturanalyse	$7,778 \pm 2,259$	- Der SylB Makrozyklus geht eine ähnliche Konformation wie GlbA in der Bindungstasche ein - Reduzierte Ringspannung (vgl. SylA) des Makrozyklus führt zu verringerter Aktivität.
SylA Methylester		• Biochemische Analyse	757 ± 148	- Endständige Säurefunktion ist nicht essenziell für die Inhibierung.
Rh-SylA		• ABPP-Kompetitions-Analyse mit <i>Arabidopsis</i> Zelllysaten • ABPP-Kompetitions-Analyse mit Säugetierzelllysaten	Nicht analysiert	- Kann als ABPP-Sonde für das 20S Proteasom benutzt werden. - Studien von SylA in normalen und Bortezomib-resistenten Krebszellen.
SylA-LIP		• Biochemische Analyse • Zellanalyse in Krebszelllinien	8.65 ± 1.33	- N-terminale, lipophile Seitenketten erhöhen die Proteasominhibierung signifikant - Vielversprechender Einfluss bei Zellanalysen

SylA-PEG1		<ul style="list-style-type: none"> • Biochemische Analyse • Zellanalyse in Krebszelllinien • ABPP-Kompetitions-Analyse mit <i>Arabidopsis</i> Zelllysaten 	586 ± 69	<ul style="list-style-type: none"> - Lange hydrophile Seitenketten steigern nicht das Potential des SylAs - Lipophilität ist für die gesteigerte Bindungsaffinität erforderlich - Mäßiger Einfluss in Zellanalysen. - P4 Aminosäure hat nur geringen Einfluss auf die Inhibierung.
SylA-PEG2		<ul style="list-style-type: none"> • Biochemische Analyse • Zellanalyse in Krebszelllinien 	401 ± 37	<ul style="list-style-type: none"> - Gesteigerte Bindungsaffinität zu Untereinheiten ist nur durch lange lipophile Kohlenstoffketten gegeben. - Begünstigender Einfluss auf Zellanalysen.
SylA-GlbA		<ul style="list-style-type: none"> • Biochemische Analyse • Zellanalyse in Krebszelllinien 	12.5 ± 1.6	<ul style="list-style-type: none"> - Gesteigerte Bindungsaffinität zu Untereinheiten ist nur durch lange lipophile Kohlenstoffketten gegeben. - Begünstigender Einfluss auf Zellanalysen.

[a] Der grau-grüne Kreis kennzeichnet die Unterschiede zur Struktur des Naturstoffes SylA. [b] K_i^{app} : Inhibitionskonstante der chymotrypsin-ähnlichen (C-L) Aktivität des menschlichen 20S Proteasoms, bestimmt durch biochemische Analysen (gemittelt aus drei Analysen n=3).

Ein fluoreszierendes SylA-Derivat (Rh-SylA) wurde zur Bestimmung der Bindungselektivität von SylA in komplexen Proteomen verwendet. Überraschenderweise zeigten diese Studien eine hochselektive Bindung von SylA an die das 20S-Proteasom. Zusätzlich wurde diese chemische Sonde verwendet, um den Effekt von SylA auf Bortezomib-adaptierte Zellen zu evaluieren. Hierbei ergab sich, dass das eukaryotische Proteasom in bereits Bortezomib-adaptierten Zellen weiterhin durch Syringoline inhibiert werden kann. Dieser Befund zeigt auf, dass Syringoline vielversprechende neue Therapeutika mit hohem Potential in der Krebsbekämpfung darstellen. Des Weiteren wird Rh-SylA zur Zeit von Kooperationspartnern verwendet, um die Biologie der Interaktionen von Phytopathogenen und Pflanzen weiter aufzuklären.

Ein weiteres Projekt entstand aus der biologischen Evaluierung eines im Zuge der Totalsynthese von SylA während der Corey-Winter Eliminierung (Schema 38) auftretenden Nebenproduktes. Das hierbei gebildete Hydantoin (MRL) ließ sich isolieren und im Weiteren reproduzierbar synthetisieren.



Schema. Synthese von MRL (**61**) ausgehend von **56** und Kristallstruktur von MRL. Reagenzien und Reaktionsbedingungen: (a) P(OMe)₃, 150 °C, 2 h, 47%.

Nach erfolgreicher Synthese der fluorophor- oder biotinmarkierten Derivate wurden aktivitätsbasierte Proteinprofilierungen (ABPP) durchgeführt, um potentielle biologische Zielproteine des Hydantoin zu identifizieren. Diese Studien ermittelten Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenasen (GADPHs) als molekulare Zielstrukturen, welche im komplexen Zelllysate von *Arabidopsis thaliana* selektiv von den Sonden kovalent modifiziert wurden. Des Weiteren wurde eine Inhibition der Hefe-Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenasen in biochemischen Analysen beobachtet, was auf eine klassenspezifische Inhibition hinweist. Möglicherweise ergeben sich so neue potentielle Therapeutika gegen verschiedene Krankheiten, die im Zusammenhang mit der Regulierung von GADPHs stehen, wie beispielsweise Chagas Krankheit (amerikanische Schlafkrankheit) oder der Afrikanischen Trypanosomiasis (afrikanische Schlafkrankheit). Letztendlich sind jedoch noch weitere Studien erforderlich, um das volle Potential dieser neuen Leitstruktur als GAPDH-Inhibitoren und ihre zukünftigen Anwendungsmöglichkeiten vollständig aufzuklären.