

Zusammenfassung
der Dissertation von
Catherine P. Katzka
aus Mountain View, Californien

„Synthesis of Tetramic Acids and Investigation of their Biological Properties“

Auf der Struktur der Tetramsäuren basierende Naturstoffe zeigen vielfältige biologische Aktivitäten.^[1] Dies macht Pyrrolidin-2,4-dione (**1**, Abb.1) zu geeigneten Molekülen für die Synthese einer kleinen Substanzbibliothek und zur Untersuchung ihrer aktivierenden bzw. inhibierenden Eigenschaften in pharmazeutisch relevanten zellulären Signalwegen.

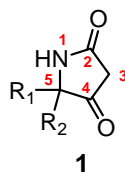


Abb. 1: Struktur der Pyrrolidin-2,4-dione (Tetramsäure) Einheit.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde eine kurze und effiziente Festphasensynthese zum Aufbau einer Tetramsäuren-Bibliothek entwickelt (Abb. 2). Der erste Schritt der Synthese ist die Beladung von Wang-Harz mit einer Fmoc-geschützten Aminosäure. Im Folgenden wird die Aminofunktion entschützt und das resultierende primäre Amin durch reduktive Alkylierung mit verschiedenen Aldehyden und Natriumtriacetoxyborhydrid alkyliert. Nach Acylierung mit einem β -Ketoäquivalent und Abspaltung unter basischen Bedingungen erhält man die gewünschte Tetramsäure.

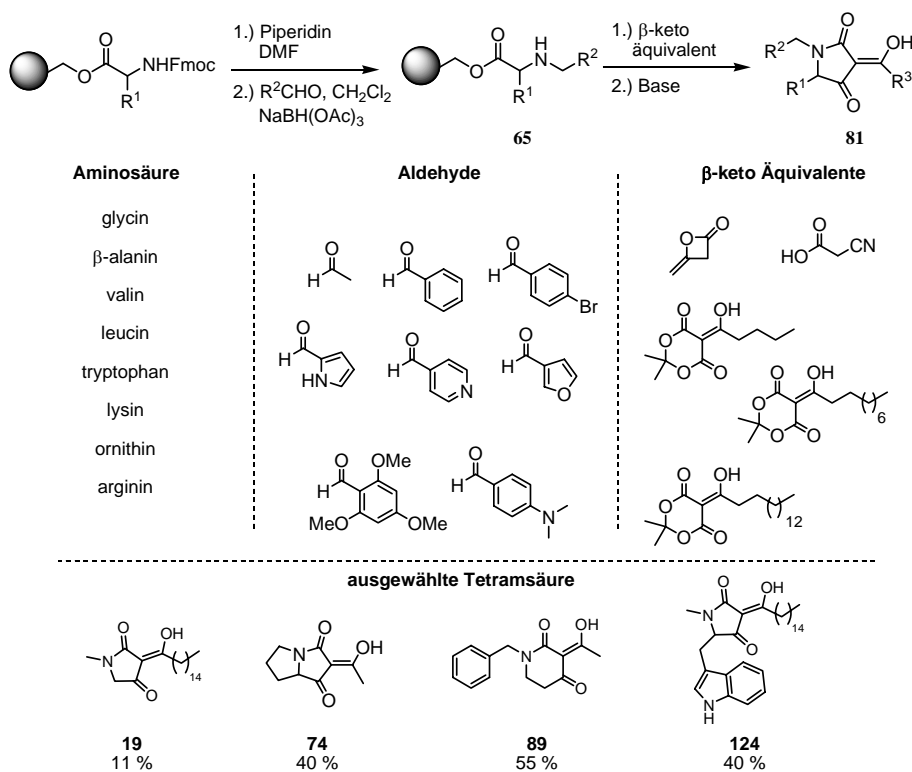


Abb. 2: Exemplarische Festphasen-Synthese zur Darstellung von Tetramsäuren.

In der Synthese wurden verschiedene Aminosäuren sowie Aldehyde und β -Ketoäquivalente eingesetzt. Die Synthesesequenz ermöglicht nicht nur die Darstellung von Pyrrolidin-2,4-dionen, sondern durch Einsatz von β -Alanin als Aminosäure auch die von Piperidin-2,4-dionen (**89**).

Des Weiteren ermöglicht der Einsatz von festphasengebundener Anthranilsäure den Zugang zu Quinolin-3-carboxamiden.

Weiterhin wurde die Synthesestrategie zur Darstellung des Naturstoffes Laccarin eingesetzt.

Um den Zugang zu Indol-basierten Tetramsäuren zu ermöglichen wurde eine Strategie zur Synthese von in Position sieben substituierten Tryptophanen aus Indol-Derivaten und Serin entwickelt. Die Indole wurden mittels einer Bartoli-Indolsynthese aus *o*-Nitroarenen und Vinyl-Grignardverbindungen hergestellt (Abb.3). Auf diesem Wege wurden insgesamt acht verschiedene Derivate mit Ausbeuten zwischen sechs und 61% erzeugt.

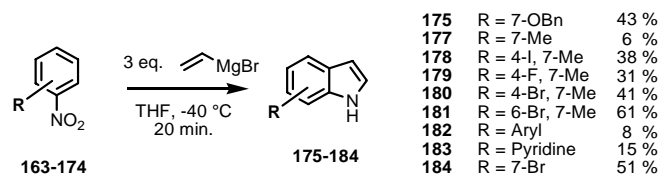


Abb. 3: Schematische Darstellung der Bartoli-Indolsynthese.

Die Synthese der Tryptophan-Analoga wurde durch eine biomimetische Reaktion aus Indol und Serin in Essigsäure mittels Essigsäureanhydrid realisiert (Abb. 4). So konnten sechs verschiedene Tryptophanderivate mit Ausbeuten zwischen sechs und 42% dargestellt werden.

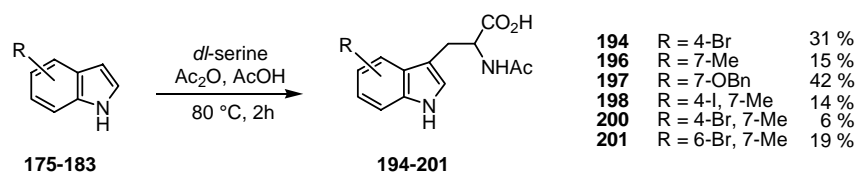


Abb. 4: Schematische Darstellung der Tryptophansynthese.

Zur Evaluierung ihrer biologischen Aktivität wurden die synthetisierten Tetramsäuren in verschiedenen biologischen Tests untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

In der ersten Studie wurden die Tetramsäuren auf ihre Cytotoxizität sowie ihre Fähigkeit zur Rücktransformation der Morphologie von Ras-transformierten MDCK Zellen untersucht. In diesem zellbasierten Assay zeigten sich zwei Verbindungen, Melophlin A (**19**) und **110** in der Lage den Phänotyp der transformierten Zellen in den des Wildtyps zu revertieren. Diese Wirkung war für Melophlin A schon bekannt, ^[2] dennoch konnte sie für keines der synthetisierten Melophlin-Derivate gefunden werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Verbindungen ab einer Konzentration von 50 μ M cytotoxisch sind.

Um die beobachteten Effekte besser verstehen zu können, wurden die Verbindungen in MAPK/PKC spezifischen Luciferase Reporter-Gen-Assays untersucht. Hier zeigte sich, dass Melophlin A einen Abfall der Luciferase-Aktivität von 75% bei Aktivierung mit PMA und 54% nach Aktivierung mit EGF induziert. Dies könnte bedeuten, dass sich das makromolekulare Ziel von Melophlin A im Ras/MAPK Signalweg befindet. Dagegen konnte keine durch **110** induzierte Änderung der Luciferase-Aktivität festgestellt werden. Dies deutet an, dass die beobachtete Änderung im Phänotyp nach Behandlung der Zellen mit **110** nicht auf einer Inhibierung eines Proteins des Ras/MAPK-Signalwegs beruht. Zur Aufklärung könnte

es helfen mittels eines biotinylierten Moleküls **110** die Zielproteine zu isolieren und deren Wirkmechanismus zu untersuchen.

Des Weiteren wurde die Aktivität der Tetramsäuren in Phosphatase-Assays untersucht. Hier zeigten sich fünf Tetramsäuren (**125**, **127**, **122**, **118** und **19**) mäßig aktiv gegen MTP1B, PTP1B und Cdc25A. Es wurde beobachtet, dass eine lange Lipidseitenkette ein wichtiges Strukturelement für die Aktivität in den Phosphatase-Assays ist. Die Tryptophan-basierten Tetramsäuren zeigen selektive Inhibierung der PTPs. Für die weitere Untersuchung wurden erste Berechnungen zur Energieminimierung der Wechselwirkungen zwischen Wirksubstanz und Kinase durchgeführt.

Als letztes wurde getestet, ob die Tetramsäuren Aktivität in antibakteriellen Assays gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien zeigen. Einige der getesteten Substanzen inhibieren das Wachstum Gram-positiver Bakterien (siehe Tabelle 1), während kein Einfluss auf Gram-negative Bakterien beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse unterstützen die vom Arbeitskreis Janda veröffentlichte Hypothese,^[3] dass Tetramsäuren Quorumsensoren sind. Vier der getesteten Verbindungen zeigten sich als mäßig aktiv gegen Gram-positive Bakterien und könnten somit für die Isolierung von Zielproteinen und die Untersuchung des Wirkmechanismus genutzt werden.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Ergebnisse der biologischen Untersuchungen von Tetramsäuren.

Struktur	Nr.	Phänotypische Assay	WST-1 Assay	Phosphatase Assay	Anti-Bakterielle Assay
	19	Rück-transformation	toxisch	Cdc25A: 60 µM PTP1B: 37 µM MptpB: 83 µM	kein Effekt
	119	kein Effekt	toxisch	n.d.	B.Subtilisis (70 mg/l)
	118	kein Effekt	toxisch	Cdc25A: 92 µM	B.Subtilisis (>250 mg/l)
	125	kein Effekt	nicht toxisch	MptpB: 93 µM	kein Effekt
	127	kein Effekt	nicht toxisch	Cdc25A: 95 µM PTP1B: 10 µM MptpB: 68 µM	kein Effekt
	122	kein Effekt	nicht toxisch	MptpB: 70 µM	kein Effekt
	111	kein Effekt	nicht toxisch	MptpB: >100 µM	B.subtilisis (>250 mg/l)
	110	Rück-transformation	nicht toxisch	MptpB: >100 µM	kein Effekt
	81	kein Effekt	nicht toxisch	Cdc25A:>100 µM	B.Subtilisis (MIC n.d.)

Referenzen

- [1.] B. Royles, *Chem.Rev.* **1996**, 95, 1981-2001.
- [2.] S. Aoki, K. Higuchi, Y. Ye, R. Satari, M. Kobayashi, *Tetrahedron.Lett.* **2000**, 56, 1833-1836.
- [3.] G. F. Kaufmann, R. Sartorio, S. H. Lee, C. Rogers, M. M. Meijler, J. A. Moss, B. Clapham, A. P. Brogan, T. J. Dickerson, K. D. Janda, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **2005**, 102, 309-314.