



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Zugänglichkeit von Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid“

verfasst von

Fares Albaba

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie UniStG

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Mag. pharm. Ernst Urban

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

„Im Namen Gottes des Allerbarbers, des Barmherzigen“

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich vielmals bei meiner Familie für die ständige Unterstützung und Motivation während des gesamten Studiums bedanken.

Natürlich gilt auch mein Dank Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Ernst Urban des Departments für Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien für Bereitstellung dieses interessanten Themas und Betreuung dieser Arbeit, sowie für die Aufnahme und Auswertung der NMR-Spektren.

Weiters möchte ich mich bei Dr. Bodo Lachmann und Diplom Ing. Michael Sonntagbauer des Departments für Medizinische/Pharmazeutische Chemie für die hilfreiche und kompetente Unterstützung bedanken.

Mein großer Dank gilt Priv.-Doz. Mag.rer.nat. Dr.rer.nat. Irina Druzhiniana, Mag. Dr.rer.nat. Lea Atanasova und der gesamten „Microbiology Working Group“ des Instituts für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Techn. Biowissenschaften der Technischen Universität Wien für die Bereitstellung der Mikroorganismen und der Gerätschaften zur Durchführung der praktischen Versuche sowie für die ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt hierbei Frau Mag. Dr.rer.nat Lea Atanasova für ihr großes Engagement.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp des Departments für Pharmakognosie der Universität Wien für die Bereitstellung der Testsubstanzen.

Ich möchte mich auch herzlichst bei Frau Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter des Departments für Pharmakognosie der Universität Wien für die sehr freundliche und kompetente Beratung bedanken.

Mein Dank gilt auch Frau Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn des Departments für Pharmakognosie der Universität Wien für die Hilfestellung bei meinen Recherchen.

Ich möchte mich auch bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Jürgen König und Frau Sandra Auernigg-Haselmaier des Departments für Ernährungswissenschaften der Universität Wien für die Aufnahme und Auswertung der Massenspektren bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meinen Freunden und Studienkollegen bedanken, die mir im Verlauf des Studiums stets zur Seite gestanden sind.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Steroide.....	1
1.1.1 chemische Einteilung und Terminologie.....	1
1.1.2 Biosynthese.....	3
1.1.3 Metabolismus.....	3
1.2. Pharmazeutisch relevante Steroide.....	4
1.2.1 Sterine.....	4
1.2.2 Steroidhormone.....	5
1.2.3 Herzwirksame Glykoside.....	7
1.3. Themenstellung der Diplomarbeit	18
2. Hauptteil.....	19
2.1. Gamabufotalin-3-O-α-L-rhamnosid.....	19
2.1.1 chemische Struktur	19
2.2. Gewinnung aus natürlichen Quellen	20
2.2.1 Meerzweibel	20
2.2.2 Isolierung und Charakterisierung der Bufadienolide aus pflanzlichem Material und tierischem Material.....	21
2.3. Möglichkeiten zur chemischen Synthese	21
2.3.1 chemische Totalsynthese von Rhodexin A	21
2.4. Möglichkeiten zur mikrobiologischen Partialsynthese.....	27
2.4.1 Proscillaridin A	27
2.4.2 Hydroxylierung mit Hilfe Mikroorganismen.....	28

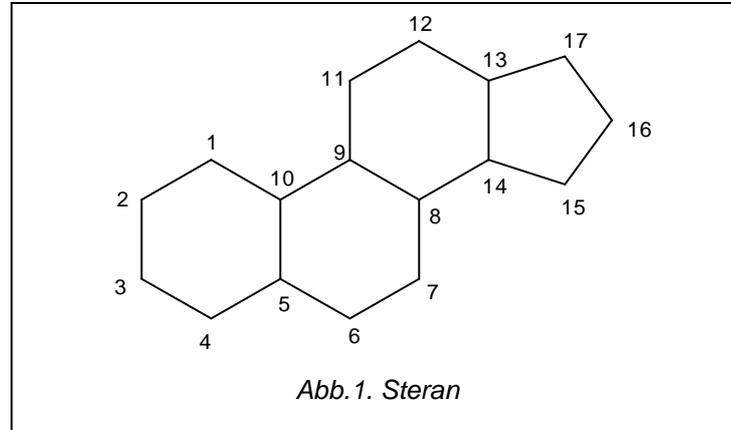
2.5. Mikrobiologische Partialsynthese	36
2.5.1 Pilzwachstum	36
2.5.2 Biotransformation von Proscillaridin A / Proscillaridin- β -epoxid	38
2.5.3 Isolierung des Produkts.....	39
2.6. Schützung der L-Rhamnose.....	39
2.6.1 Schützen der –OH – Gruppen des Zuckers durch Acetylierung	40
3. Experimenteller Teil	43
3.1. Materialien und Methoden	43
3.2. Mikrobiologische Partialsynthese	45
3.2.1 Umsetzung d. Proscillaridin- β -epoxid m. A.niger u. Medium 1 .	45
3.2.2 Umsetzung d. Proscillaridin- β -epoxid m. A.ustus u. Medium 1	48
3.2.3 Umsetzung d. Proscillaridin- β -epoxid m. A.niger u. Medium 2 .	48
3.2.4 Umsetzung d. Proscillaridin- β -epoxid m. A.ustus u. Medium 2	49
3.2.5 Umsetzung d. Proscillaridin- β -epoxid m. A.ustus u. Medium 3	49
3.2.6 Umsetzung d. Proscillaridin A m. A.ustus u. Medium 3	50
3.2.7 Übersicht der in 4.2.1. – 4.2.6. beschriebenen Versuche.....	51
3.3. Schützung der L-Rhamnose.....	52
3.3.1 Einführung der Schutzgruppe.....	52
3.3.2 Entfernen der Schutzgruppe.....	53
3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	54
3.3.4 Conclusio.....	56
4. Literaturverzeichnis	57
Curriculum vitae.....	63

1. Einleitung

1.1. Steroide

1.1.1 chemische Einteilung und Terminologie

Steroide sind formal Derivate des Sterans (Perhydro-1H-cyclo-pentano[a]phenanthren, siehe Abb. 1), ein C-17-Grundgerüst. In Abhängigkeit von den zusätzlichen Substituenten unterscheidet man dann zwischen **Sterinen** (3 β -Hydroxy-Steran-Derivate), **Gallensäuren** (besitzen zusätzlich eine Carboxylgruppe), **Steroidhormonen** (Coirticoide, Androgene, Estrogene, Gestagene, Vitamin D), **Herzwirksamen Glycoside** (Cardenolide, Bufadienolide), **Steroid-Saponine** (besitzen ein Steroid-Grundgerüst als Aglycon und eine Zuckerkomponente) und die **Steroid-Alkaloide** (sind stickstoffhaltige Steroid-Glykoside).



Die Ringe A, B, C, D können sowohl cis, als auch trans verknüpft sein. Man findet jedoch nur 3 unterschiedliche Formen:

- 5 α -Form: hier sind die Ringe A:B, B:C, C:D trans verknüpft
- 5 β -Form: die Ringe A:B sind cis, die Ringe B:C und C:D trans verknüpft
- 5 β -, 14 β -Form: die Ringe A:B und C:D sind cis, die Ringe B:C trans verknüpft

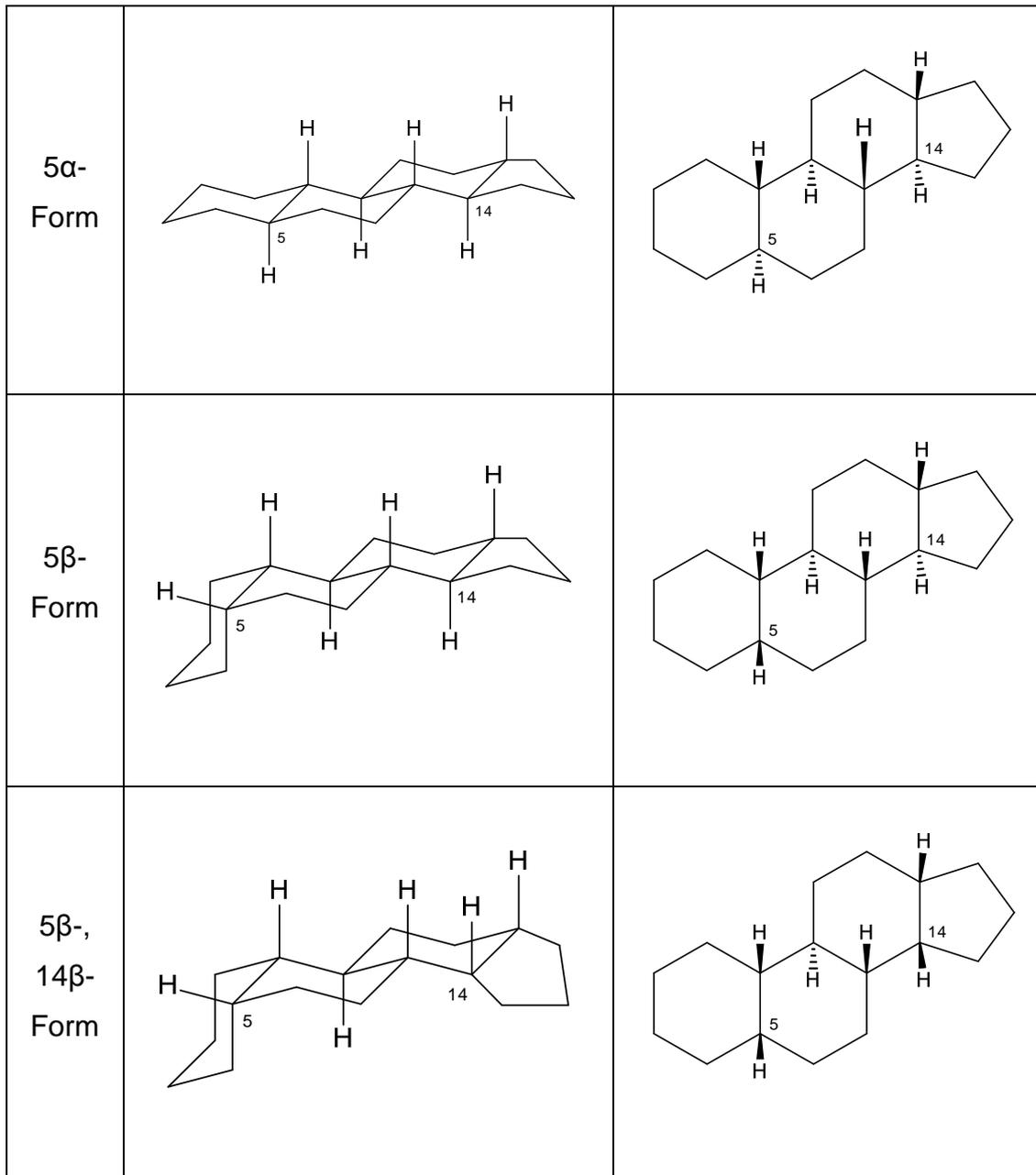


Abb. 2. Stereochemische Reihen der Steroide

Die 5 α - und 5 β -Formen kommen bei allen Steroiden vor. Die 5 β ,14 β -Form allerdings nur bei den herzwirksamen Glykosiden.

Natürliche Steroide kommen in Tieren, Pflanzen und Pilzen vor und sind an vielen unterschiedlichen biochemischen Prozessen beteiligt (Peter et al., 2008, S 455).

1.1.2 Biosynthese

Die Biosynthese erfolgt bei den meisten Tieren, Pflanzen und Pilzen über den **Acetat/Mevalonat-Weg**. Hierbei fungiert Acetyl-CoA als Ausgangsverbindung, aus der zunächst 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) gebildet wird. Durch die HMG-CoA-Reduktase wird daraus Mevalonsäure gebildet, welche dann mit Hilfe von ATP zu Isopent-3-en-1-yl-diphosphat (IPDP) umgewandelt wird.

Durch Verknüpfung mehrerer IPDP-Einheiten entstehen dann verschiedene terpenoide Strukturen. Hierzu zählt auch das Squalen, ein C-30-Gerüst, aus welchem dann Steroide wie beispielsweise Lanosterol, Cholesterol oder Sitosterol gebildet wird.

Beim Menschen ist das Cholesterol der Grundbaustein für alle weiteren Steroide.

Bei manchen Eubakterien, Algen und Pflanzen ist auch der **Glycerinaldehyd / Pyruvat-Weg** für die Bereitstellung von IPDP, zur Synthese von Isopren, Monoterpenen, Diterpenen und Tetraterpenen, relevant. Dabei wird aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat unter CO₂-Abspaltung IPDP gebildet (Fuchs and Schlegel, 2007, S. 257-258).

1.1.3 Metabolismus

Der Abbau der Steroide erfolgt beim Menschen in der Leber. Dabei werden die Steroide durch Hydroxylierungs- und Konjugierungs-Prozesse in Gallensäuren umgewandelt und über die Galle in das Duodenum ausgeschieden.

1.2. Pharmazeutisch relevante Steroide

1.2.1 Sterine

Sterine sind formal Derivate des 3β -Hydroxy-Sterans. Je nachdem in welchem Organismus sie biosynthetisiert werden unterscheidet man zwischen:

- Zoosterine: Biosynthese in tierischen Zellen (z.B.: Cholesterin, Vitamin D, Gallensäuren, Steroidhormone)
- Phytosterine: Biosynthese in pflanzlichen Zellen (z.B.: Sitosterin, Stigmasterin, Campesterin)
- Mycosterine: Biosynthese in Pilzen (z.B.: Ergosterin)

Für den menschlichen Organismus ist vor allem das Cholesterin lebenswichtig, da es für die Stabilisierung der Plasmamembranen essentiell ist und dem Körper als Ausgangsverbindung für die Synthese von weiteren Steroidhormonen dient. Die Abbauprodukte des Cholesterins, die Gallensäuren besitzen ebenfalls wichtige Aufgaben, vor allem für die Fettverdauung. Durch das lipophile Steroid-Grundgerüst und die polare Carboxyl-Gruppe besitzen sie tensidähnliche Eigenschaften und können wasserunlösliche Verbindungen emulgieren. Dadurch wird ihre Resorption im Darm erst ermöglicht (Matissek et al., 2006, S. 80).

Pharmazeutisch besonders relevant sind die Phytosterine. Sie werden therapeutisch zur Senkung des Cholesterinspiegels bei Hypercholesterinämie verwendet, aber auch beispielsweise zur Behandlung der benignen Prostatahyperplasie (BPH).

1.2.2 Steroidhormone

Bei den Steroidhormonen unterscheidet man zwischen den **Sexualhormonen** und den **Corticosteroiden** (bzw. NNR-Hormonen). Zu den Sexualhormonen zählen die Estrogene, Androgene und Gestagene. Zu den Corticosteroiden die Mineralcorticoide und die Glucocorticoide.

1.2.2.1 Sexualhormone

- Estrogene

Estrogene zählen zu den weiblichen Geschlechtshormonen und werden vor allem in den Follikeln des Ovars gebildet („Follikelhormon“). Ihr Grundgerüst ist das Estran (13 β -Methyl-gonan). Sie werden mit Hilfe der Aromatase aus Androgenen gebildet.

Der wichtigste Vertreter ist dabei das Estradiol (1,3,5(10)-Estratrien-3,17 β -diol).

Estrogene besitzen viele wichtige physiologische Wirkungen, wie beispielsweise die Prägung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale, den Aufbau und die Durchblutung der Uterusschleimhaut, die Beeinflussung des Fettstoffwechsels und von Knochen-Wachstumsprozessen.

Therapeutisch werden Estrogene und ähnliche Derivate meist bei postmenopausalen Beschwerden oder in Kombination mit Gestagenen zur Verhütung eingesetzt.

- Androgene

Androgene zählen zu den männlichen Geschlechtshormonen und werden beim Mann vor allem in den Leydig'schen Zwischenzellen des Hodens gebildet, aber auch in der Nebennierenrinde und im Ovar. Ihr Grundgerüst ist das Androstan (10 β , 13 β -Dimethyl-gonan). Der wichtigste Vertreter der Androgene ist das Testosteron (17 β -Hydroxy-androst-4-en-3-on).

Androgene sind für die Entwicklung von Hoden, Penis, Nebenhoden, Samenvesikel und Prostata während der Pubertät verantwortlich und steigern die Libido. Sie führen zur Vergrößerung des Kehlkopfes und zur Vertiefung der Stimme und besitzen eine anabole Wirkung. Außerdem führen sie zum charakteristischen Behaarungsmuster beim Mann (Körperbehaarung, Bartwuchs und androgenetische Alopezie).

Therapeutisch werden vor allem Antiandrogene zur Behandlung von Prostata-Carzinomen verwendet, aber auch zur Antriebsdämpfung bei männlicher Hypersexualität. Bei Frauen können Antiandrogene bei Virilisierungserscheinungen verwendet werden.

- Gestagene

Gestagene zählen zur zweiten wichtigen Gruppe der weiblichen Geschlechtshormone. Ihr Grundgerüst ist das Pregnan (10 β ,13 β -Dimethyl-17 β -ethyl-gonan). Der wichtigste Vertreter hierbei ist das Progesteron (4-Pregnen-3,20-dion).

Sie werden auch als „Schwangerschafts-Schutz hormone“ bezeichnet, da sie zu Beginn der Schwangerschaft vom Corpus luteum (Gelbkörper) und vor allem während der Schwangerschaft von der Plazenta gebildet werden und durch Beeinflussung des Uterus, der Uterusschleimhaut, des Zervikalsekrets und der Eileiter zu einer schwangerschaftserhaltenden Wirkung führen. Diese Eigenschaften werden für die orale Kontrazeption genutzt.

1.2.2.2 Corticosteroide

Bei den Corticosteroiden unterscheidet man zwischen den Glucocorticoiden, welche sich vom Progesteron ableiten und den Mineralcorticoiden, welche sich durch ein anderes Hydroxylierungsmuster von den Glucocorticoiden unterscheiden.

Leitsubstanz der Corticosteroide ist das Corticosteron (11 β ,21-Dihydroxyprogesteron). Die Biosynthese erfolgt in der Nebennierenrinde („NNR-Hormone“).

Corticosteroide sind an vielen verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt. Sie haben verschiedene Einflüsse auf den Stoffwechsel. Sie beeinflussen das Immunsystem und Entzündungsprozesse, das Herz-Kreislauf- und Nervensystem und den Wasser- und Elektrolythaushalt (hier vor allem Mineralcorticoide).

Therapeutisch werden Glucocorticoide bei NNR-Insuffizienz verwendet oder als halbsynthetische Corticoide mit dem Ziel die antiphlogistischen, immunsuppressiven und antiallergischen Effekte dieser Stoffgruppe, für die Behandlung von beispielsweise rheumatischen Erkrankungen, allergischen Reaktionen, entzündlichen Erkrankungen oder zur Tumorthherapie, ausgenutzt.

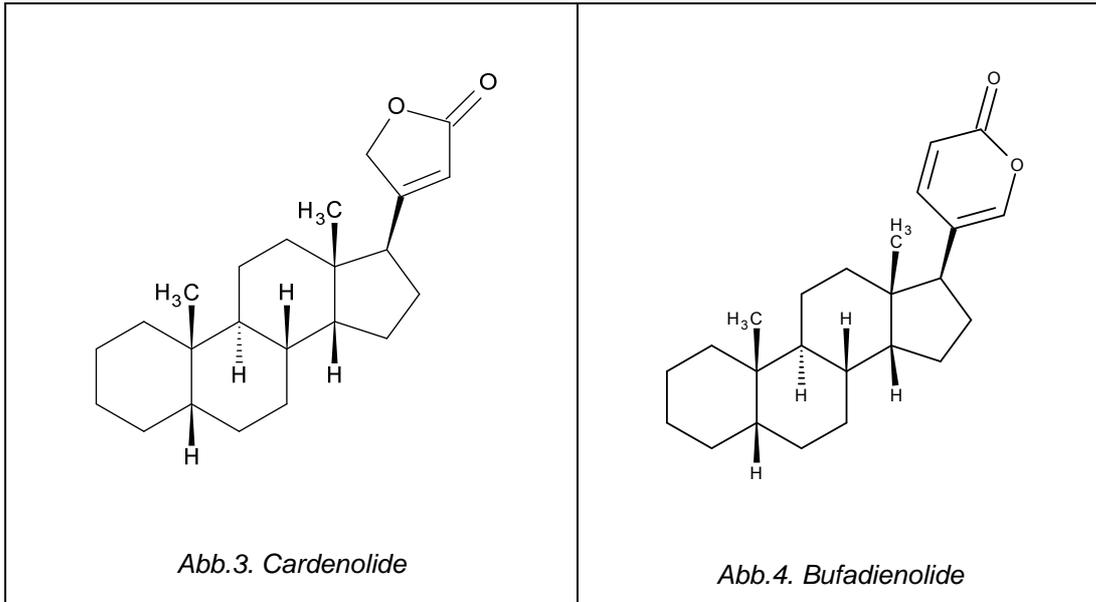
1.2.3 Herzwirksame Glykoside

1.2.3.1 chemische Struktur und Terminologie

Herzwirksame Glykoside besitzen als Aglykon ein **Steroid-Grundgerüst** (Suffix:

-genin) und zusätzlich ein bis vier **Zuckerreste** (Glykoside).

Das Steroid-Grundgerüst ist ein 10,13-Dimethyl-Sterangrundkörper. Man unterteilt die herzwirksamen Glykoside in **Cardenolide** (diese besitzen am C-17 einen β -ständigen γ -Lactonring, siehe Abb.3.) und **Bufadienolide** (diese besitzen am C-17 einen β -ständigen δ -Lactonring, siehe Abb.4.)



Die Aglyka unterscheiden sich außerdem noch in den weiteren unterschiedlichen Substituenten, häufig in Form von Hydroxyl-Gruppen an Position C-3 und C-14, sind aber auch an C-1,-5,-11,-12 und C-16 möglich. Am C-16 kann außerdem auch ein –O–Acetyl oder ein –O–Formyl Rest substituiert sein. Anstelle der Methylgruppe am C-10 kann auch beispielsweise ein Aldehyd vorliegen.

Als Zuckerkomponente fungieren unterschiedliche Monosaccharide, aber auch Oligosaccharidketten sind möglich. Meist sind diese an der C-3-Hydroxylgruppe des Aglykons gebunden, können aber auch an eine andere OH-Gruppe gebunden sein.

Die chemische Struktur ist sowohl für die Pharmakokinetik (siehe 2.3.6), als auch für die Pharmakodynamik entscheidend (siehe 2.3.7).

1.2.3.2 Vorkommen und Gewinnung

Herzwirksame Glykoside kommen als Inhaltsstoff in verschiedenen Pflanzen vor, werden aber auch von einigen Tieren gebildet. Eine Totalsynthese ist zwar machbar, doch die Isolierung der Wirkstoffe aus Pflanzen oder eine Partialsynthese sind häufig deutlich wirtschaftlicher und liefern eine bessere Ausbeute.

Verschiedene Pflanzen-Familien haben sich dabei als wichtige Lieferanten von Herzwirksamen Glykosiden bewährt, wie beispielsweise die Plantaginaceae (Digitalis-Glykoside), Asparagaceae, Asclepiadaceae, Apocyanaceae oder Ranunculaceae (Teuscher et al., 2004, S. 224-230).

1.2.3.3 Wirkmechanismus

Wie der Name der Herzwirksamen Glykoside schon andeuten will ist diese Stoffgruppe sowohl hinsichtlich ihrer Wirkung, als auch ihrer therapeutischen Anwendung, auf den Herzmuskel scharf begrenzt.

Es wird ein **positiv inotroper** Effekt (Steigerung der Kontraktionskraft), ein **positiv bathmotroper** (Verbesserung der Erregungsbildung durch Senkung der Reizschwelle) und ein **negativ chronotroper** (Verringerung der Schlagfrequenz) und **negativ dromotroper** (Verlangsamung der Erregungsleitung) Effekt erzielt.

Diese Effekte werden durch verschiedene Mechanismen ausgelöst: Primär kommt es zur Hemmung der in den Zellmembranen des Herzens befindlichen **Na⁺/K⁺-ATPase**.

Dadurch wird der Auswärtstransport des Natriums verringert. Die erhöhte intrazelluläre Natrium Konzentration im Herzmuskel führt zu einer Stimulierung der Na⁺/Ca²⁺ Austauscher. Es kommt zu einem Anstieg der Ca²⁺-Konzentration im Herzmuskel, was einen positiv inotropen Effekt zur Folge hat. Für den negativ chronotropen, negativ dromotropen und positiv bathmotropen Effekt ist die durch die Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase verringerte intrazelluläre K⁺ Konzentration im Herzmuskel verantwortlich. Dadurch sinkt vor allem das Ruhemembranpotential und es werden stärkere Schwellenspannungen für die erneute Auslösung eines Aktionspotentials benötigt, was die oben erwähnten Effekte zur Folge hat, aber auch, vor allem bei Überdosierung, zu Arrhythmien führen kann (Estler and Schmidt, 2007, S. 475-477).

1.2.3.4 therapeutische Anwendung

Herzwirksame Glykoside werden therapeutisch vor allem bei manifester und chronischer Herzinsuffizienz (NYHA III+IV) eingesetzt. Beim Vorliegen von Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern sind sie bereits bei NYHA-Stadium I und II indiziert. Desweiteren werden sie bei supraventrikulären Tachykardien und bei tachykardem Vorhofflimmern verwendet.

Großer Nachteil der Therapie mit dieser Stoffgruppe ist die geringe therapeutische Breite. Bereits bei geringer Überdosierung kann es zu Kammerflimmern und Herzrhythmusstörungen kommen. Extrakardial können sie zu gastrointestinalen Störungen und durch Einfluss auf das ZNS zu estrogenähnlichen Nebenwirkungen führen. Ein großes Problem hierbei ist, dass die Diagnose einer solchen Glykosidintoxikation schwierig festzustellen ist, da die Symptome auch bei der zu behandelnden Herzinsuffizienz vorkommen können. (Lemmer and Brune, 2007, S. 236-237).

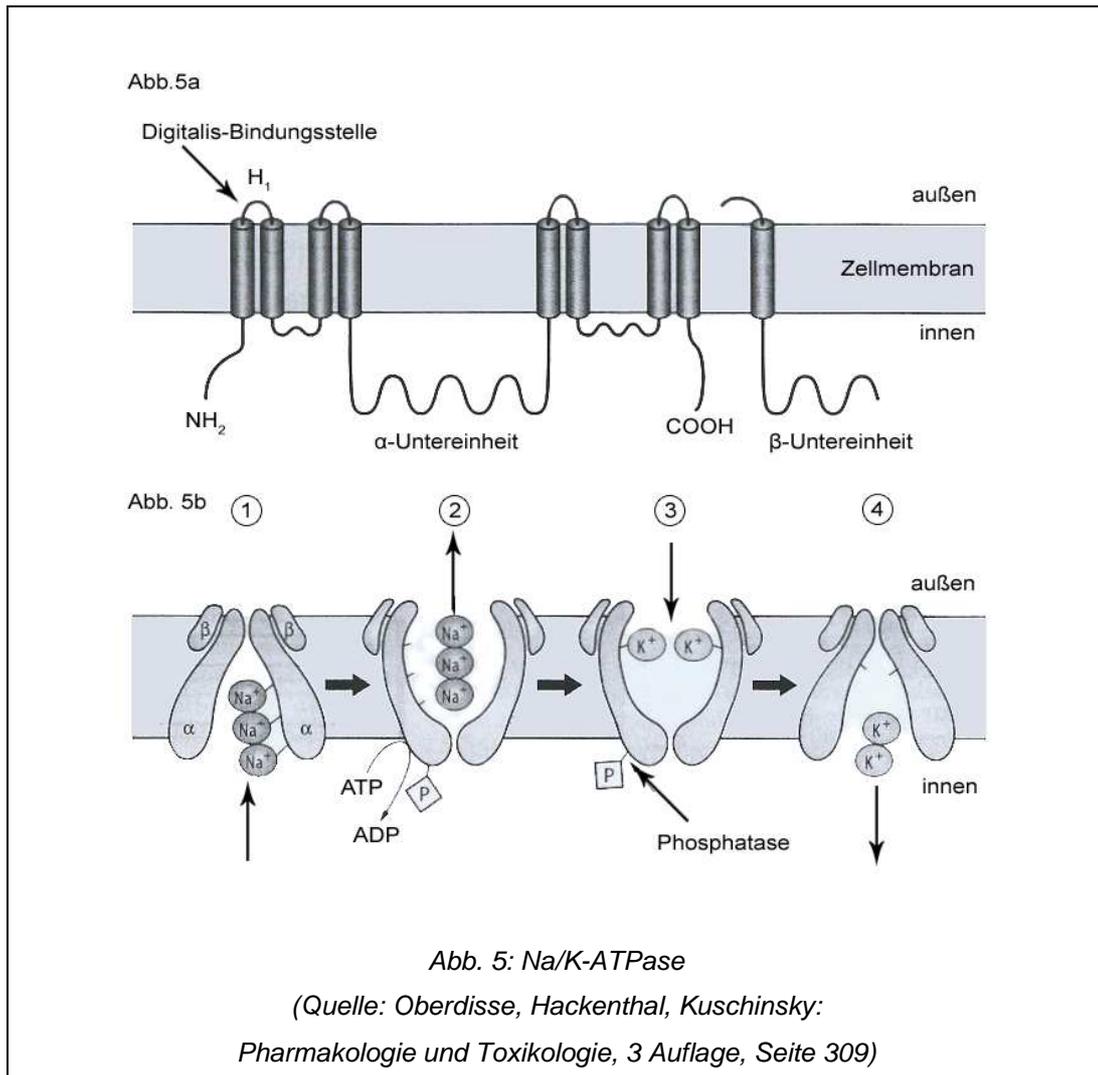
1.2.3.5 Natrium-Kalium-ATPase

Die Natrium-Kalium-ATPase ist ein in der Zellmembran verankertes, transmembranäres Protein. Es besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit (siehe Abb. 5., S. 11).

Abbildung 5a beschreibt die Struktur der Natrium-Kalium-ATPase:

Die α -Untereinheit ist dabei die katalytische Untereinheit. Sie besteht aus etwa 1000 Aminosäuren (113 kD) und besitzt 8 hydrophobe Transmembrandomänen, die zusammen den transmembranären Ionenkanal bilden. Es sind sowohl die Natrium und Kalium-Bindungsstellen, als auch die ATPase-Aktivität und Bindungsstelle von Herzwirksamen Glykosiden in der α -Untereinheit lokalisiert.

Die kleinere β -Untereinheit ist ein Glycoprotein (35 kD) und bildet eine hydrophobe Transmembrandomäne. Ihre Funktion ist noch weitgehend unbekannt, wird aber in der Translokation des Komplexes in die Plasmamembran und in der Aktivierung der α -Untereinheit vermutet.



Es kodieren vier Gene für die α -Untereinheit (ATPA1, ATPA2, ATPA3 und ATPA4) und vier für die β -Untereinheit (ATPB1, ATPB2, ATPB3 und ATPB4). Man unterteilt die α -Untereinheit somit in vier Untereinheiten (α_1 -, α_2 -, α_3 - und α_4) und die β -Untereinheit ebenfalls in vier Untereinheiten (β_1 -, β_2 -, β_3 - und β_4).

Verschiedene Herzwirksame Glykoside haben unterschiedliche Affinitäten zu den jeweiligen α -Untereinheiten. So weist beispielsweise Ouabain eine höhere Affinität zur α_2 -Untereinheit, während Digoxin eine besonders hohe Affinität zur α_1 -Untereinheit besitzt.

Abbildung 5b ist eine schematische Darstellung der Funktionsweise der Natrium-Kalium-ATPase:

Im ersten Schritt binden 3 Natrium-Ionen in dem intrazellulär geöffneten Kanal. Durch Phosphorylierung (ATPase-Aktivität) kommt es durch Umsetzung eines ATPs zu einer Konformationsänderung, die den Kanal nach innen schließt und nach außen öffnet (siehe Schritt 2). Nun verlassen die 3 Na⁺-Ionen die Bindungsstellen und im dritten Schritt binden 2 K⁺-Ionen an die α-Untereinheit. Durch Dephosphorylierung schließt sich der Kanal nach außen und öffnet sich wieder intrazellulär. Im vierten Schritt dissoziieren nun die K⁺-Ionen ins Zellinnere (Oberdisse et al., 2002, S. 309).

Der oben beschriebene Vorgang wiederholt sich etwa 100 x in der Sekunde.

1.2.3.6 Pharmakokinetik

Man unterscheidet, je nach Anzahl der Hydroxyl-Gruppen, zwischen polaren und apolaren Herzwirksamen Glykosiden:

Apolare Herzwirksame Glykoside können peroral appliziert werden (beispielsweise das Digitoxin mit nur einer OH-Gruppe). Sie werden gut resorbiert und besitzen wegen der starken Plasmaproteinbindung einen verzögerten Wirkungseintritt (etwa 5 Stunden). Es kann hier auch einfacher zur Kumulierung kommen. Durch die ZNS-Gängigkeit können extrakardiale Nebenwirkungen auftreten.

Polare Herzwirksame Glykoside müssen parenteral appliziert werden (beispielsweise das Oubain mit 5 OH-Gruppen), da sie nicht resorbiert werden. Die Wirkung tritt bereits nach einer halben Stunde ein, ist jedoch, aufgrund der hohen Abklingquote, kürzer.

Die Abklingquote ist entscheidend für die Wirkdauer. Sie setzt sich zusammen aus Exkretion und Metabolismus. Je apolarer das Herzwirksame Glykosid ist, umso mehr wird die Substanz in der Leber metabolisiert und über den enterohepatischen Kreislauf ausgeschieden (dauert 10 Stunden, es kann zur Kumulierung kommen). Je polarer der Wirkstoff, umso mehr erfolgt die Ausscheidung direkt über die Niere (dauert 5 Stunden) (Teuscher et al., 2004, S. 232).

1.2.3.7 Pharmakodynamik

Verschiedene chemische Strukturelemente sind für die Wirkung entscheidend. Die Hauptwirkgruppe an der Na^+/K^+ -ATPase bildet das Carbonyl-O des β -ständigen Lactonrings. Bufadienolide besitzen hierbei eine zehnfach höhere Wirksamkeit als Cardenolide.

Eine cis-Verknüpfung der Ringe C und D des Steroid-Gerüsts und Hydroxylgruppen in β -Stellung an Position 3 und 14 verbessert die sterischen Eigenschaften des Moleküls und erhöhen die Haftbarkeit des Herzwirksamen Glykosids an die Na^+/K^+ -ATPase. Sonstige OH-Gruppen und Doppelbindungen im Steroid-Gerüst und unterschiedliche Zucker können die Wirkung weiter modifizieren (Teuscher et al., 2004, S. 232-233).

1.2.3.8 neue Möglichkeit der Anwendung herzwirksamer Glykoside

Neben der bereits erwähnten Wirkung am Herzen findet man bei verschiedenen Bufadienoliden auch andere Wirkungen, wie beispielsweise NO-Synthese, Immunoregulation, Einfluss auf die renale Ausscheidung, aber auch antitumorale Wirkung. In den letzten Jahren hat sich der Einsatz bei der Tumor-Therapie von – gegen konventionelle Chemotherapien resistenten – Malignomen als neuer Ansatzpunkt immer mehr bewähren können (Gao et al., 2011).

Es gibt dabei verschiedene Thesen über den eigentlichen Wirkmechanismus.

Hierbei bezieht man sich auf ein neues Konzept (Pardo et al., 2012), bei dem unterschiedliche Ionenkanäle und -pumpen als Angriffspunkte dienen. Die hemmenden Eigenschaften der herzwirksamen Glykoside auf die Na/K-ATPase sind hierbei von großem Interesse.

Verschiedene Krebszellen exprimieren die α -Untereinheiten in unterschiedlichem Ausmaß. Beispielsweise ist bei Nierenkarzinomen, bei sog. „non-small-cell“ Lungen-Karzinomen (NSCLC) oder bei Glioblastomen eine Überexprimierung der α_1 -Untereinheit vorhanden. Bei Darmkrebs-Zellen oder Leber-Karzinomen ist die α_3 -Untereinheit überexprimiert. Für die Tumor-Therapie kann man sich hier (wie in Abschnitt 2.3.5. beschrieben) die unterschiedlichen Affinitäten der herzwirksamen Glykoside zu den jeweiligen α -Untereinheiten zu Nutze machen (Banulus, 2013).

Andere Untersuchungen ergaben auch einen Einfluss auf den PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg und auf die Apoptose durch Wechselwirkung mit verschiedenen pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie und verschiedenen Caspasen.

Die Apoptose ist der sogenannte programmierte Zelltod, ein komplexer physiologischer Prozess, der dazu dient schadhafte Zellen oder Zellen die nicht gebraucht werden und auch Tumorzellen zum Absterben zu bringen (siehe Abb. 6.). Die Caspasen sind die wichtigsten Enzyme der Apoptose.

Man unterscheidet zwischen Initiator-Caspasen (z.B.: Caspase 8 und 9) und den Effektor-Caspasen (z.B.: Caspase 3, 6, 7). Bei der Signalkaskade unterscheidet man zwischen einem extrinsischen Weg (Typ I) und einem intrinsischen Weg (Typ II):

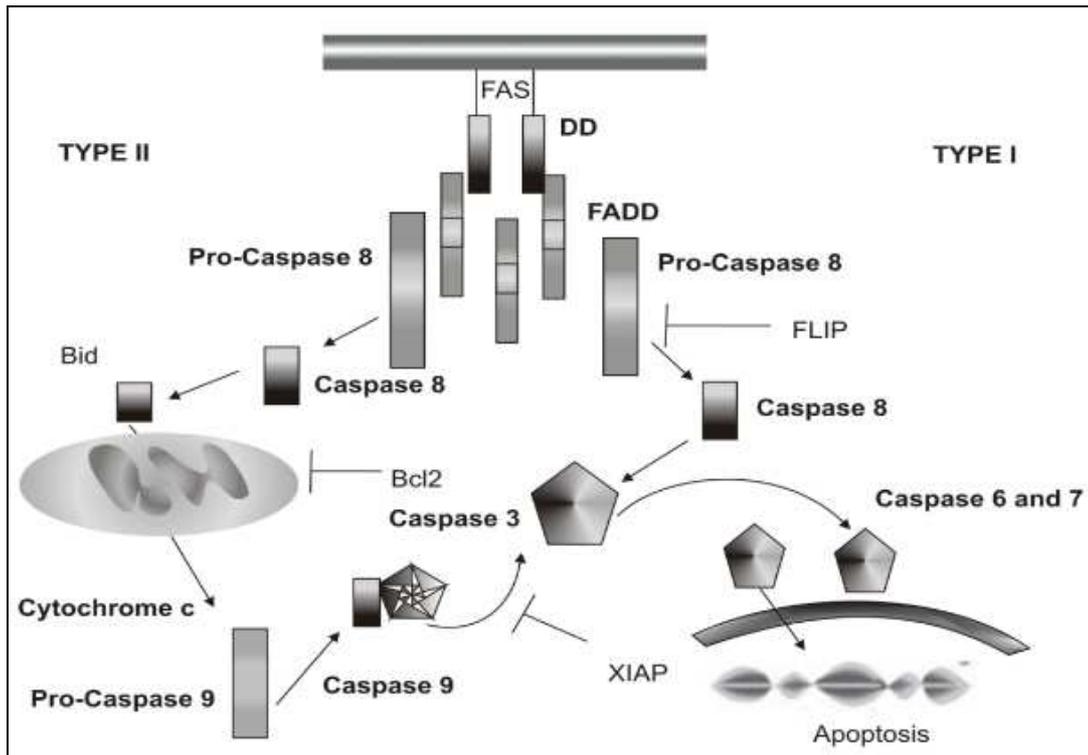


Abb. 6. Signalkaskade der Apoptose (Pei-Hao Yin et al., 2012)

Beim Typ I wird die Apoptose also erst nach Binden eines sogenannten Todesliganden (z.B.: FasL, TNF α , TRAIL-RI...) an die jeweiligen Rezeptoren der TNF-Familie (z.B.: CD95, Fas, TRAIL, RANK,...) ausgelöst. Nach der Bindung kommt es zur Trimerisierung des Rezeptors und man erhält dadurch das sogenannte FADD (Fas-Associated-protein with Death-Domain).

Über die Death-Domain (DD) kann nun die Pro-Caspase-8 mit ihrer Death-Effector-Domain (DED) binden. Somit erhält man einen sogenannten Death-Inducing-Signalling-Complex (DISC).

Nun wird eine Initiator-Caspase aus ihrer Vorläuferform gebildet (z.B.: Caspase-8 aus Pro-Caspase-8), welche ihrerseits wiederum die Effektor-Caspasen aktivieren kann (z.B.: Caspase-3 aus Pro-Caspase-3).

Beim Typ II wird die Apoptose durch verschiedene Proapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie (z.B.: BAX) ausgelöst. BAX führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Cytosol, welches sich an den Apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) bindet und ihn somit aktiviert. Mehrere aktivierte Apaf-1 bilden dann ein sogenanntes Apoptosom. Nun kann beispielsweise die Initiator-Caspase Caspase-9 an Apaf-1 des Apoptosoms binden und dadurch beispielsweise Pro-Caspase-3 in die Effektor -3 spalten und diese damit aktivieren.

Die aktivierten Effektor-Caspasen führen nun sowohl beim intrinsischen, als auch beim extrinsischen Weg im weiteren Verlauf zum Zelltod.

Der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg besitzt ebenfalls Einfluss auf die Apoptose von Tumorzellen und fängt durch die Aktivierung der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) an. Dies kann beispielsweise durch die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase durch Wachstumsfaktoren erreicht werden. Nach der Aktivierung kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung der Rezeptoren und in weiterer Folge zur direkten und indirekten (beispielsweise über IRS-1) Phosphorylierung und damit Aktivierung von PI3K. Ebenso kann die PI3K aber auch durch Ras (kleines G-Protein) aktiviert werden. Nun kann das aktivierte PI3K an PIP₂ (Phosphoinositol-diphosphat) binden, wodurch dieses phosphoryliert wird und das aktivierte PIP₃ (Phosphoinositol-triphosphat) entsteht, welches dann wiederum die Kinase Akt (Proteinkinase B) aktivieren kann. Akt ist ein Proto-onkoprotein mit vielen verschiedenen Substraten und Effekten, wobei der für die Apoptose relevante Effekt die Hemmung von Bax, einem proapoptotischen Protein der Bcl2-Familie, ist (Garbe, 2006, S. 19-22; Koolman and Röhm, 2003, S. 388-389; Silbernagl and Lang, 2009, S. 290-291)

Bei verschiedenen Krebszelllinien wurden die Einflüsse verschiedener Bufadienolide, wie beispielsweise Bufalin oder Gamabufotalin, auf die antitumorale Wirkung und den Mechanismus geprüft. Dabei fand man heraus, dass beispielsweise bei Lungenkrebszelllinien (A549) schon geringe Konzentrationen von Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid (IC_{50} etwa 3 nM) eine in vitro Wachstumshemmung nach 3 tägiger Reaktionsdauer zu bemerken war. Bei verschiedenen Untersuchungen von Bufalin fand man dabei heraus, dass es zu einer Erhöhung der Expression von Bax (Proapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie), durch Verringerung der Expression von Livin (Antiapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie) und Aktivierung der Caspase-3 kam und dadurch die Apoptose in den Krebszellen verstärkt eingeleitet wurde.

Bei Brustkrebszellen (MCF-7) waren geringe Konzentrationen von Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid für eine in-vitro Wachstumshemmung (IC_{50} etwa 17 nM) ausreichend. Dies wurde beispielsweise durch Verringerung der Expression des Antiapoptotischen Mcl-1- und Bcl-XL-Proteins aus der Bcl-2-Familie, aber auch durch die Induktion von TRIAL (TNF-related-apoptosis-inducing Ligand), einem Todesliganden, in den Krebszellen.

Aber auch bei vielen anderen Krebszelllinien, wie Glioblastomzellen (U373 und T98G), Prostata-Karzinom-Zellen (PC-3) oder Darmkrebszellen (HAT-29) waren ebenfalls geringe Konzentrationen (IC_{50} etwa 7 nM) für eine in vitro Wachstumshemmung ausreichend. Die Apoptose in diesen Zellen wurde dabei meist durch Einfluss auf die Caspasen oder auf die Proteine der Bcl-2-Familie ausgelöst.

Somit zeigt sich, dass **Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid** eine äußerst vielversprechende Substanz für die Antitumor-Therapie ist. Sie besitzt zusätzlich den Vorteil, dass im Vergleich zu anderen herzwirksamen Glykosiden nur geringe Konzentrationen für die antitumoralen Effekte ausreichend waren (siehe Tabelle 1, S. 18) (Banulus, 2013).

Substrat	A549 <i>(Lunge)</i>	U373 <i>(Glioblast.)</i>	Hs683 <i>(Gliom)</i>	MCF7 <i>(Brust)</i>	PC-3 <i>(Prostata)</i>	HAT29 <i>(Darm)</i>	Durchschnitt
Digoxin	60 nM	227 nM	51 nM	363 nM	215 nM	208 nM	202 nM
Digoxigenin	395 nM	3188 nM	794 nM	5321 nM	3880 nM	4458 nM	2902 nM
Hellebrin	6 nM	41 nM	41 nM	58 nM	11 nM	27 nM	28 nM
Hellebrigenin	3 nM	9 nM	9 nM	42 nM	18 nM	9 nM	16 nM
Gamabufotalin-rhamnosid	3 nM	6 nM	4 nM	17 nM	6 nM	8 nM	9 nM
Gamabufotalin	7 nM	34 nM	14 nM	40 nM	22 nM	37 nM	26 nM

Tabelle 1: Benötigte IC_{50} Konzentrationen für die in-vitro Wachstumshemmung (ungefähre Werte)

1.3. Themenstellung der Diplomarbeit

Für weitere Testungen der antitumoralen Wirkung von Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid und auch für eine eventuelle spätere therapeutische Anwendung dieser Substanz werden größere Mengen benötigt. Da diese schwer mittels pflanzlicher Extraktion zu decken sind, stellt sich die Frage nach weiteren Möglichkeiten zur Gewinnung dieses herzwirksamen Glykosids. In dieser Diplomarbeit sollen verschiedene Wege zur Möglichkeit der Synthese beziehungsweise Partialsynthese von Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid aus einfach zugänglichen Vorstufen, durch chemische und enzymatische Verfahren dargelegt werden und Ergebnisse von praktischen Versuchen präsentiert werden.

2. Hauptteil

2.1. Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid

2.1.1 chemische Struktur

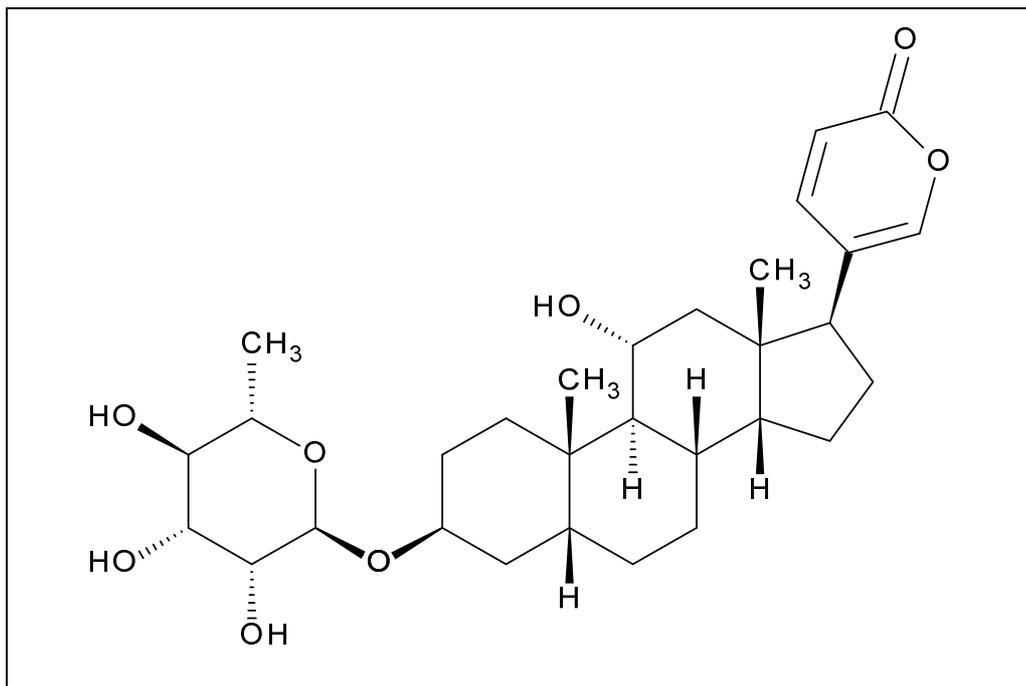


Abb.7. Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid

Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid (Abb.7.), oder (3 β , 5 β , 11 α)-3-[(6-Desoxy- α -L-mannopyranosyl)oxy]-11,14-dihydroxy-bufa-20,22-dienolid besitzt als Aglykon ein Gamabufagenin (Gamabufotalin) und als Zucker eine glykosidisch gebundene Rhamnose an Position 3 des Steroids. Die chemische Formel ist $C_{30}H_{44}O_9$ und die molare Masse beträgt 548,66 g/mol.

Es ist ein natürliches herzwirksames Glykosid vom Bufadienolid-Typ welches in geringen Mengen in der Meerzwiebel (*Charybdis martima*, *Urginea martima*) vorkommt (siehe 2.2.1.).

2.2. Gewinnung aus natürlichen Quellen

2.2.1 Meerzweibel

Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid kommt in geringen Mengen in der Meerzweibel vor. Die Meerzweibel (*Drimia maritima*, *Charybdis maritima*) ist eine Pflanze der Gattung *Charybdis*, welche der Familie der Spargelgewächse (*Asparagaceae*) zuzuordnen ist. Die Pflanze wächst vor allem im Mittelmeerraum, wie beispielsweise in Algerien, Libyen, Tunesien, Libanon, Syrien, Albanien, Griechenland oder Italien (Krenn et al., 1996; Teuscher et al., 2004, S. 240).

Die Meerzweibel wurde oft in Abhängigkeit von ihrer Farbe in zwei Rassen eingeteilt, der „roten“ und der „weißen“ Meerzweibel. Bei der Pflanze handelt es sich aber um ein Aggregat aus mindestens 6 unterschiedlichen Arten (BAKER): *Charybdis maritima*, *C. hesperia*, *C. numidica*, *C. aphylla*, *C. elata* und *C. pancration*. Diese lassen sich anhand ihres Inhaltsstoffmusters unterscheiden. Man konnte bislang schon mehr als 60 verschiedene herzwirksame Glykoside aus den verschiedenen Arten isolieren.

Den höchsten Gesamtgehalt an herzwirksamen Glykosiden findet man in *Charybdis maritima*, wobei hier vor allem das Proscillaridin A mit etwa 10% - 15% einen großen Anteil ausmacht. Das Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid kommt hier nur in geringen Mengen vor (etwa 2-3%). Proscillaridin A wird medizinisch wegen der Wirkung am Herzen oft verwendet und auch aus dieser Pflanze isoliert. Dieses könnte auch als Vorstufe für eine mikrobiologische Partialsynthese des Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid dienen (siehe 2.4.1.). In der Pflanze *Charybdis aphylla* macht das Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid den höchsten Anteil (mit etwa 20%) des Gesamtbudienolid – Gehalts aus. Der Gesamtgehalt an Bufadienoliden ist in dieser Pflanze zwar etwa drei Mal geringer als in *Charybdis maritima*, trotzdem kommt diese Pflanze, aufgrund des hohen Anteils, für eine Isolierung ebenfalls in Frage (Kopp et al., 1996; Krenn et al., 1990).

2.2.2 Isolierung und Charakterisierung der Bufadienolide aus pflanzlichem Material und tierischem Material

Bufadienolide befinden sich in verschiedene pflanzliche und tierische Quellen.

Als tierische Quellen sind beispielsweise verschiedene Kröten (Bufonidae), Nattern (Colubridae) und Glühwürmchen (Lampyridae) bekannt. Bei den Pflanzen die Familien Crassulaceae, Hyacinthaceae, Iridaceae, Melianthaceae, Ranunculaceae und beispielsweise Santalaceae.

Für die Isolierung der Inhaltsstoffe wird das entsprechende pflanzliche bzw. tierische Material gesammelt und meist mittels Lyophilisation getrocknet. Danach werden mit verschiedenen Lösungsmitteln, wie beispielsweise Wasser, Methanol, Ethanol, Chloroform oder Dichlormethan, beziehungsweise Mischungen dieser (in Abhängigkeit von der Polarität der Substanzen) zur Extrahierung der Inhaltsstoffe verwendet. Anschließend wird chromatographisch aufgetrennt (SC, GC) und mit Hilfe von Massenspektrometrie, bzw. ^{13}C -, ^1H -NMR die Strukturen aufgeklärt (Krenn et al., 2000; Krenn and Kopp, 1998).

2.3. Möglichkeiten zur chemischen Synthese

2.3.1 chemische Totalsynthese von Rhodexin A

Als Beispiel für die Möglichkeit einer Totalsynthese von einem herzwirksamen Glykosid soll hier die chemische Totalsynthese von Rhodexin A herangezogen werden (Jung and Yoo, 2011).

Rhodexin A (siehe Abb. 8., S. 22) ist im Vergleich zum Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid (siehe Abb. 7.) ein Cardenolid. Ansonsten sind beide Strukturen chemisch und sterisch äquivalent.

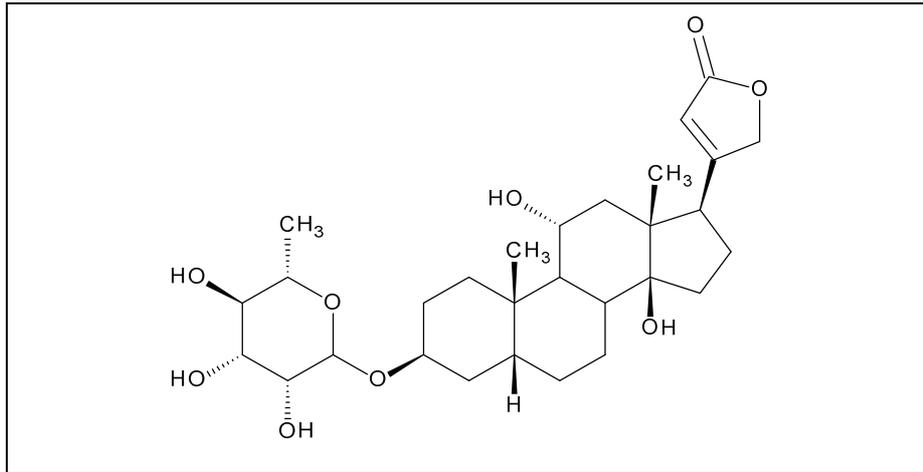
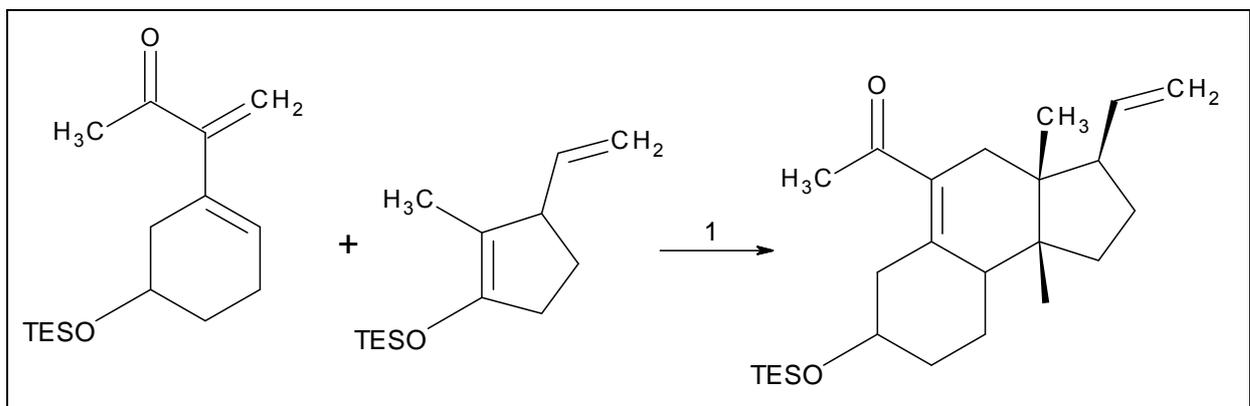


Abb. 8. Rhodexin A

Bei dieser Synthese wurden die Verbindungen 3-(5-Triethylsilyloxy-1-yl)but-3-en-2-on, welche aus der Literatur-bekannteren Verbindung 6-Triethylsilyloxy-9-en-3-in-2-on (P.K. and S., 1994) und 2-methyl-1-triethylsilyloxy-3-vinyl-cyclopentan (L. and C., 1980) als Ausgangsverbindungen verwendet. Hierbei diente 3-(5-Triethylsilyloxy-1-yl)but-3-en-2-on als Dienophil und 2-methyl-1-triethylsilyloxy-3-vinyl-cyclopentan als Dien für eine sogenannte Diels-Alder-Reaktion. Als Lösungsmittel wurde hierbei Dichlormethan verwendet und Ditriflylamin (Tf_2NH) diente dabei als Lewis-Säure zur Aktivierung des Dienophils (siehe Abb. 9). Dadurch wurden die Ringe BCD in der richtigen stereochemischen Form synthetisiert.

Abb. 9.: Diels-Alder, 1: Tf_2NH , CH_2Cl_2

Die erhaltene Struktur besaß somit die Ringe BCD des Cardenolids mit einer Doppelbindung an Position 5, einem Vinyl an Position 3, einem Acetyl an Position 5 und zwei Triethylsilyl-oxy-Verbindungen an den Positionen 7 und 9b. Der nächste Schritt war, für die spätere Bildung des Lactons, eine Dihydroxylierung des Vinyls und das Schützen der Hydroxyle als Acetal (siehe Abb. 10.). Dies war insofern wichtig, da eine spätere Oxidation dieser zwei –OH – Gruppen vermieden werden sollte.

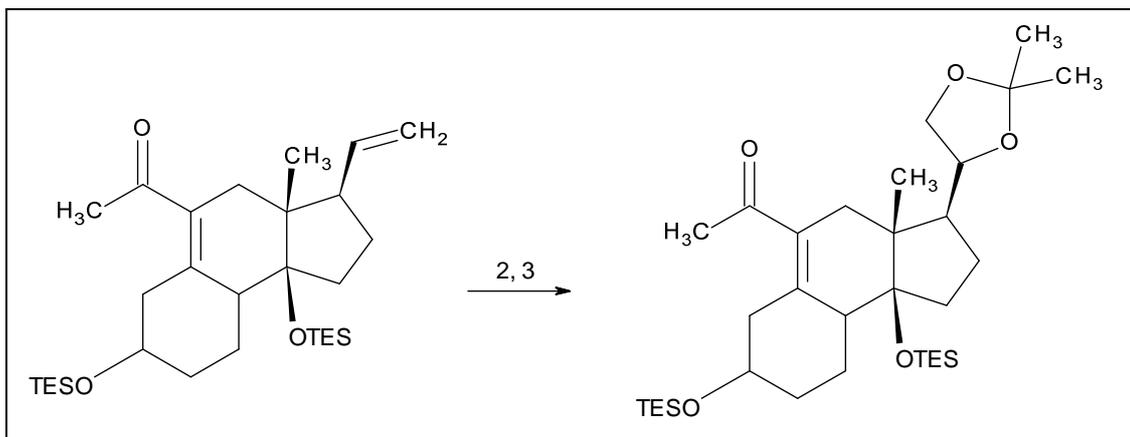


Abb. 10.: Dihydroxylierung des Ethylen, 2: *t*-BuOH/THF/H₂O und Schützen der entstandenen OH-Gruppen, 3: BuOOH, cat. CSA

Nun wurde mit Hilfe von PPTS (*p*-Pyridinium-Toluol-Salz) die Schutzgruppen TES (Triethylsilyl) der Ausgangsverbindungen an Position 7 abgespalten und im nächsten Schritt wurde mit Hilfe von DMP (Dess-Martin-Periodinase) an den Positionen 5 und 7 oxidiert. Somit erhält man zunächst an Position 5 eine zusätzliche Hydroxylgruppe und an Position 7 bildet sich ein Keton. Die Acetylgruppe an Position 5 wurde mit Hilfe von Blei(VI)-acetat abgespalten und man erhielt dadurch zwei Ketone an den Positionen 5 und 7 (siehe Abb. 11., S. 24).

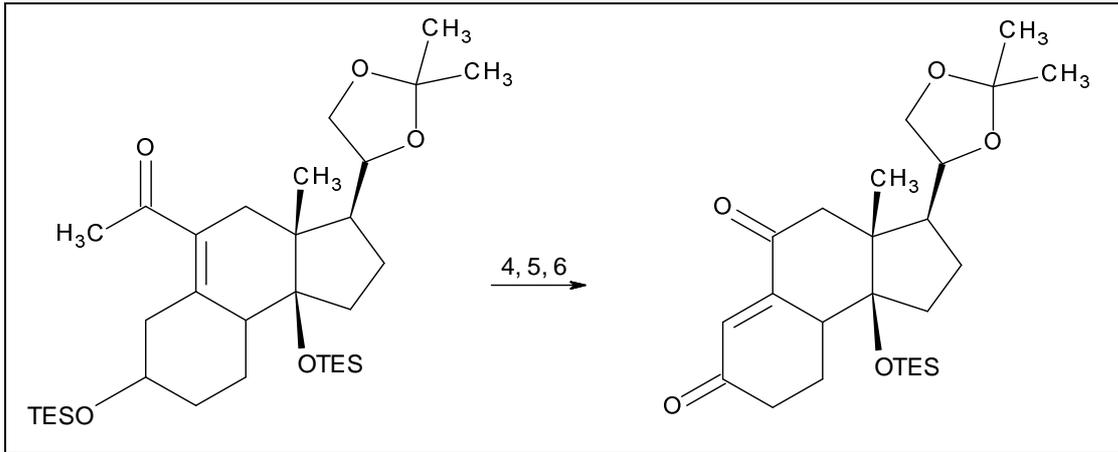


Abb. 11.: Keton-Bildung – 4: PPTS, MeOH; 5: DMP, CH₂Cl₂; 6: Pb(OAc)₄, PhH

Als nächstes galt es den Ring A des Rhodexin A zu installieren. Dazu wurde zunächst durch eine 1,3-dipolare Cycloaddition mit Hilfe von Diazomethan (CH₂N₂) ein 1-Pyrazolin-Ring an der Doppelbindung eingebracht und anschließend mit Hilfe von 1,2-Dichlorbenzol die Stickstoffe verdrängt, so dass am Ende nur mehr die Methylgruppe an Position 10 übrigbleibt. Danach wurde durch reduktive Alkylierung mit Lithium in Ammoniak und durch Allylbromid eine Propylengruppe an selbiges Methyl eingebracht so dass am Ende eine Propylengruppen übrigblieb (siehe Abb. 12.).

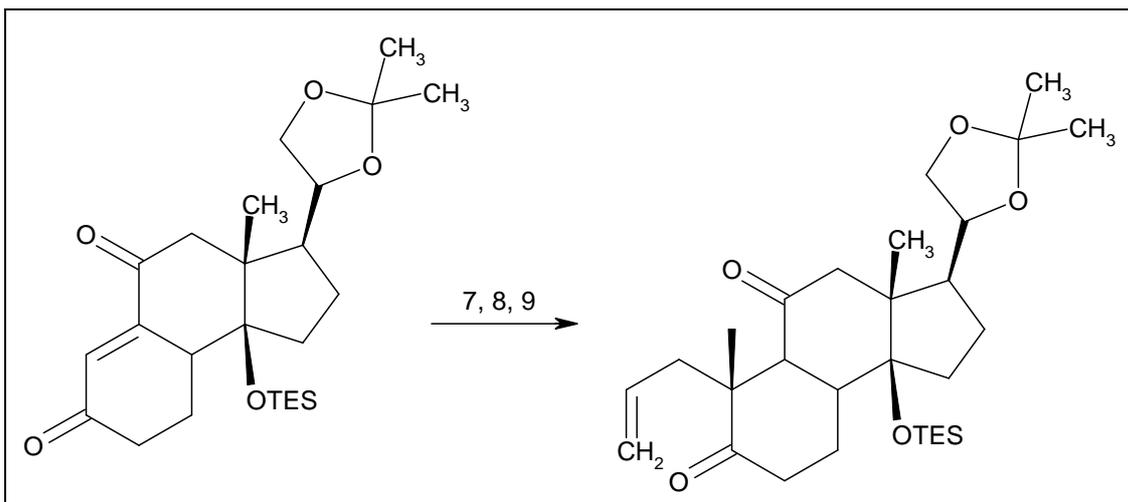


Abb. 12.: Bildung einer Propylengruppe an Position 6 –
7: CH₂N₂, CHCl₃, 1,2-C₆H₄Cl₂; 8: Li/NH₃, THF; 9: Allylbromide, THF

Die Ring-Schließung wurde anschließend durch eine Alkenmetathese mit dem Literatur-bekanntem Pinacolyl-boronat (Y.-J. and T.-P., 2008) und mit Hilfe des Grubbs-II-Katalysators (Benzyliden[1,3-bis(2,4,6-trimethylphenyl)-2-imidazolidinyliden]-dichloro-(tricyclohexylphosphin)-ruthenium) durchgeführt und anschließend die entstandene Hydroxylgruppen an Position 3 mittels Natriumperborat wieder zum Keton oxidiert (siehe Abb. 13.).

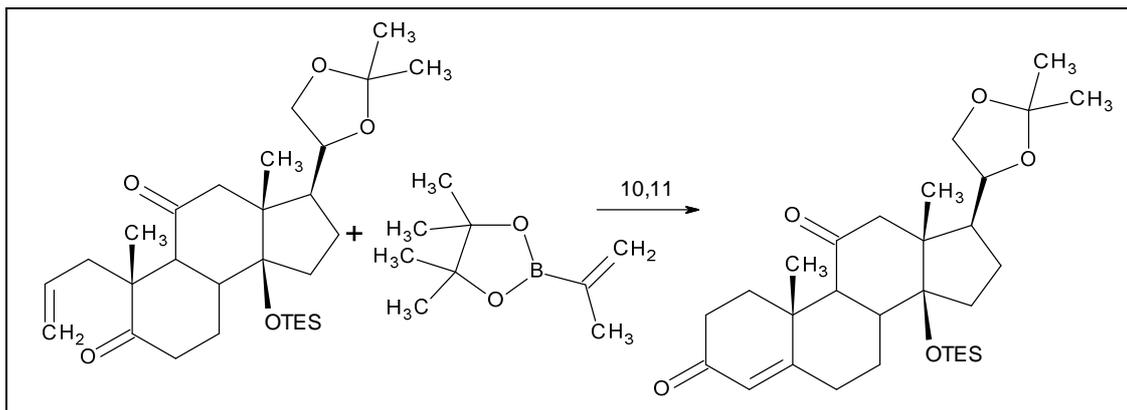


Abb. 13.: Ring-A Schließung –

10: Grubbs-Kat.-II, CH_2Cl_2 , $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 11: THF, H_2O , 10% aq KOH, MeOH

Zur Reduzierung des Ketons an Position 3 wurde L-Selektrid verwendet und durch die Birch-Reduktion wurde mit Hilfe von Li/NH_3 das Keton an Position 11 reduziert. Die zwei entstandenen Hydroxylgruppen werden nun mittels Acetylierung geschützt. Dafür wurde Acetanhydrid und DMAP als Katalysator verwendet (siehe dazu 2.6.1.). Das Acetal und die Triethylsilyl-Schutzgruppe des C-13-Hydroxyls werden mittels säurekatalytischer Umesterung mit Hilfe von p-Toluolsulfonsäure und Methanol zum Alkohol entschützt. Damit erhält man nun ein Triol (siehe Abb. 14., S. 26).

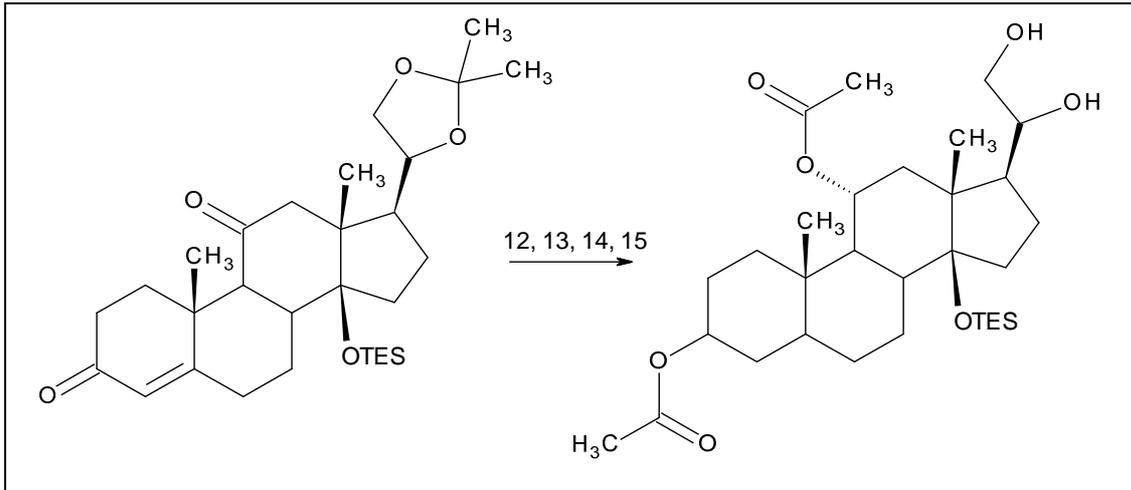


Abb. 14: Triol-Bildung, Red. der Ketone und deren Schützung –

12: H_2 , Pd/C pyr, L-Selectride; 13: THF, Li/NH₃; 14: Ac₂O, Et₃N, DMAP; 15: p-TsOH, MeOH

Im letzten Schritt wurde nun der Lactonring an Position 17 gebildet und die L-Rhamnose an Position 3 angehängt. Dafür wurde zunächst der Primäre Alkohol mit Hilfe von tert.-Butyldimethylsilylchlorid geschützt und der sekundäre Alkohol durch TPAP (Tetrapropylammoniumperruthenat) und NMO (N-Methylmorpholin-N-oxid) zum Keton oxidiert. Danach wurde die Schutzgruppe des primären Alkohols erneut abgespalten (mit Hilfe von p-Toluolsulfonsäure und Methanol) und durch die Wittig-Reaktion mittels Triphenylphosphoranylidenketon schließlich der γ -Lactonring gebildet. Für die Anbringung des Zuckers war noch die selektive Entschützung der Hydroxylgruppe an Position 3 nötig. Dies wurde durch HCl in Methanol erreicht und die L-rhamnose in Form des Tri-O-Acetyls schlussendlich durch die Literaturbekannte Trichloracetimidat-Methode angebracht.

Zum Schluss wurden die Acetyle noch mit Hilfe von Lithiumhydroxyd abgespalten und der dadurch geöffnete Lactonring mittels 2M HCl wieder geschlossen (siehe Abb. 15., S. 27).

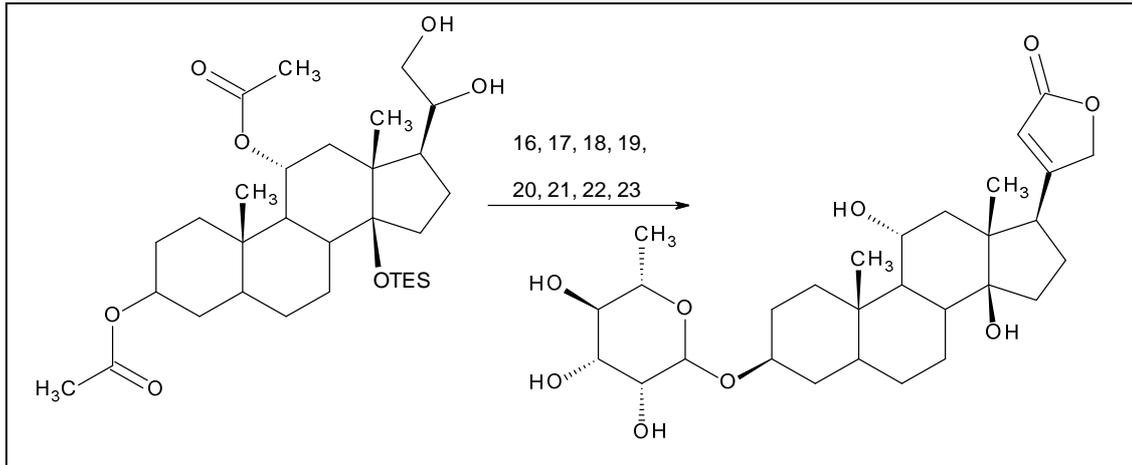


Abb. 15: Lactonring-Bildung und Zucker-Addition –

16: TBSCl; 17: TPAP, NMO; 18: *p*-TsOH, MeOH; 19: $Ph_3P=C=C=O$, PhH, Et_3N ; 20: 10% aq. HCl in MeOH; 21: tri-*O*-acetyl-*L*-rhamnose, 1-trichloroacetimidat, $ZnCl_2$, CH_2Cl_2 ; 22: LiOH, H_2O ; 23: 2M HCl

2.4. Möglichkeiten zur mikrobiologischen Partialsynthese

2.4.1 Proscillaridin A

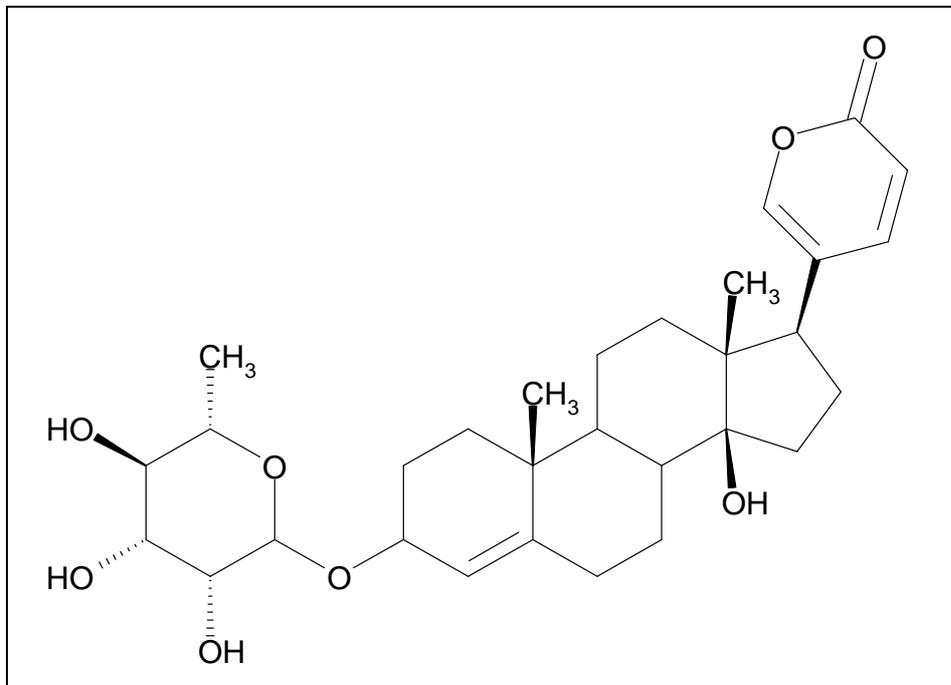


Abb. 18.: Proscillaridin A

Proscillaridin A ist ein herzwirksames Glykosid mit Scillarenin als Aglykon und einer Rhamnose als Zuckerkomponente. Dieses Aglykon unterscheidet sich hierbei zum Gamabufotalin durch eine fehlende α -ständige Hydroxyl-Gruppe an Position 11 und einer zusätzlichen Doppelbindung an Position 3 im Steroid-Grundgerüst (siehe Abb. 18., S. 27). Somit eignet es sich als Vorstufe für eine eventuelle mikrobiologische Partialsynthese. Die chemische Formel ist $C_{30}H_{42}O_8$ und die molare Masse beträgt 530,65 g/mol.

Proscillaridin kommt als Haupt-herzwirksames Glykosid vor allem in der Meerzwiebel (*Charybdis maritima*) vor, weshalb diese Pflanze auch zur Extraktion dieses Wirkstoffes verwendet wird. Proscillaridin wird dabei durch enzymatische Hydrolyse mit Hilfe der Scillarenase aus Scillaren A und Glucoscillaren, durch Abspaltung der Glucose aus der Zuckerkette, hergestellt (Hänsel et al., 1996, S. 96-98).

Aufgrund vorhandener Strukturähnlichkeit und der einfacheren Zugänglichkeit aus natürlichen Vorkommen als Vorstufe sehr interessant.

Da allerdings eine α -Hydroxylierung an Position 11 synthetisch kaum realisierbar ist, ist eine enzymatische Oxidation mit Hilfe von verschiedenen Mikroorganismen denkbar. Hierbei kommen einige Mikroorganismen in Frage, die bereits bei verschiedenen Steroiden eine α -Hydroxylierung bewirken.

2.4.2 Hydroxylierung mit Hilfe Mikroorganismen

Der genaue Mechanismus der Hydroxylierung von verschiedenen Substanzen ist noch nicht genau erforscht. Es liegen prinzipiell enzymatische Reaktionen vor, doch bleibt die Frage immernoch offen, welche Parameter genau die Funktion der Enzyme beeinflussen. Man geht davon aus, dass mehrere Faktoren, wie beispielsweise die Grundstruktur, die Stereochemie und die vorhandenen funktionellen Gruppen Einfluss auf die Enzymaktivität

haben (M. et al., 1998).

Man konnte beispielsweise bei der Hydroxylierung von Progesteron durch *A.niger* feststellen, dass chemische Modifikationen Einfluss auf die Hydroxylase-Aktivität von Progesteron hatten. Dabei fand man heraus, dass eine Carbonylgruppe am C-20 in Enol-Stellung zur Aktivierung des C-21 für eine C-21-Hydroxylierung von Progesteron beigetragen hat. Beim Fehlen des Carbonyls war eine stärkere Hydroxylierung am C-20 festzustellen (Holland and Auret, 1974).

Es könnte ebenso durchaus sein, dass ein weiterer Einflussparameter auf die mikrobiologische Hydroxylierung das Enzymmuster des Pilzes. Pilze bilden viele verschiedene Enzyme, wie beispielsweise Hydroxylasen, Lipasen, Amylasen, Transferasen, uvm. Der Ausmaß der Bildung des Enzyms und die Menge könnten durch verschiedenen Parametern, wie beispielsweise der Zusammensetzung des Nährmediums beim Pilzwachstum, der Temperatur und dem pH-Wert gezielt gesteuert werden (Lösche, 2000, S. 101).

Verschiedene Pilze konnten sich nach einigen Versuchen als äußerst nützlich für eine mikrobiologische Hydroxylierung von Steroiden beweisen. So gelten beispielsweise *Aspergillus* – oder *Cephalosporium* – Arten als vielversprechende Organismen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollen diese Pilze und Ihre Verwendung in der Umsetzung verschiedener Strukturen vorgestellt werden.

2.4.2.1 *Aspergillus*-Arten

Aspergillus ist eine weit verbreitete Gattung von Schimmelpilzen mit über 300 Arten und gehört zum Stamm der Ascomycota. Für die mikrobiologischen Umsetzungen werden entweder das Myzel oder auch die Sporen des Pilzes verwendet. In der Industrie sind Sporen dabei häufiger gebräuchlich, da sie stabiler sind und widerstandsfähiger, wodurch sie beispielsweise höhere

Konzentrationen verschiedener Lösungsmittel, wie Ethanol oder Methanol überleben.

Sporen können beispielsweise Konzentrationen von Ethanol von bis zu 5% problemlos überleben, das Myzel hingegen sollte nicht mehr als 3% Ethanol ausgesetzt werden. Die minimal effektive Konzentration zur Abtötung von *Aspergillus niger* nach einer Minute beträgt etwa 35% bei Ethanol. Methanol kann etwas höher konzentriert vorliegen (Block, 2001, S. 241-242).

Bei den Ascomycota bilden Sporen dabei meist den Anfang des Lebenszyklus der meisten Pilze. Dieser besteht aus einem asexuellen, einem parasexuellen und/oder einem sexuellen Stadium. Nach der Keimung von asexuelle Sporen (Konidien) bilden sich sogenannte Hyphen aus, welche immer mehr wachsen und sich verzweigen und allmählich eine Art Netz bilden, es entsteht das Myzel. Dies ist der sogenannte „Anamorphe Zyklus“. Auf das Asexuelle Stadium folgt das Parasexuelle Stadium, bei dem es zu einer Verschmelzung zweier Zellkerne von zwei unterschiedlichen Hyphen kommt. Durch diese Fusion der zwei haploiden Zellkerne bildet sich eine Zelle mit doppelter Chromosomenzahl. Diese wird dann mitotisch geteilt und durch „Cross over“ bilden sich zufällig zwei Zellkerne mit haploider Chromosomenzahl. Alternativ dazu verfügt der Pilz ebenso über ein sexuelles Stadium zur Teilung, der sogenannte „Telemorphe Zyklus“.

Dabei unterscheidet man artsspezifisch zwischen *Aspergillus*-Pilzen die zur Selbstbefruchtung befähigt sind (homothallisch) und welchen die einen genetisch nicht identen Partner benötigen (heterothallisch). In beiden Fällen beginnt das sexuelle Stadium mit der Ausbildung von Gametangien aus Hyphen. Man unterscheidet dabei zwischen dem Ascogonium und dem Antheridium. Beide verschmelzen zu einem Fruchtkörper, in dem jeweils zwei unterschiedliche Zellen in mehreren Schritten eine diploide Zelle bilden. Nun bildet sich eine zylinderförmige Kapsel aus und bilden den Ascus, in dem durch Meiose und Mitose 8 neue haploide Zellen entstehen, welche

wiederum als Ascosporen verbreitet werden (siehe Abb. 19, S. 31) (Machida and Gomi, 2010, S. 115-117; Rokas and G., 2013).

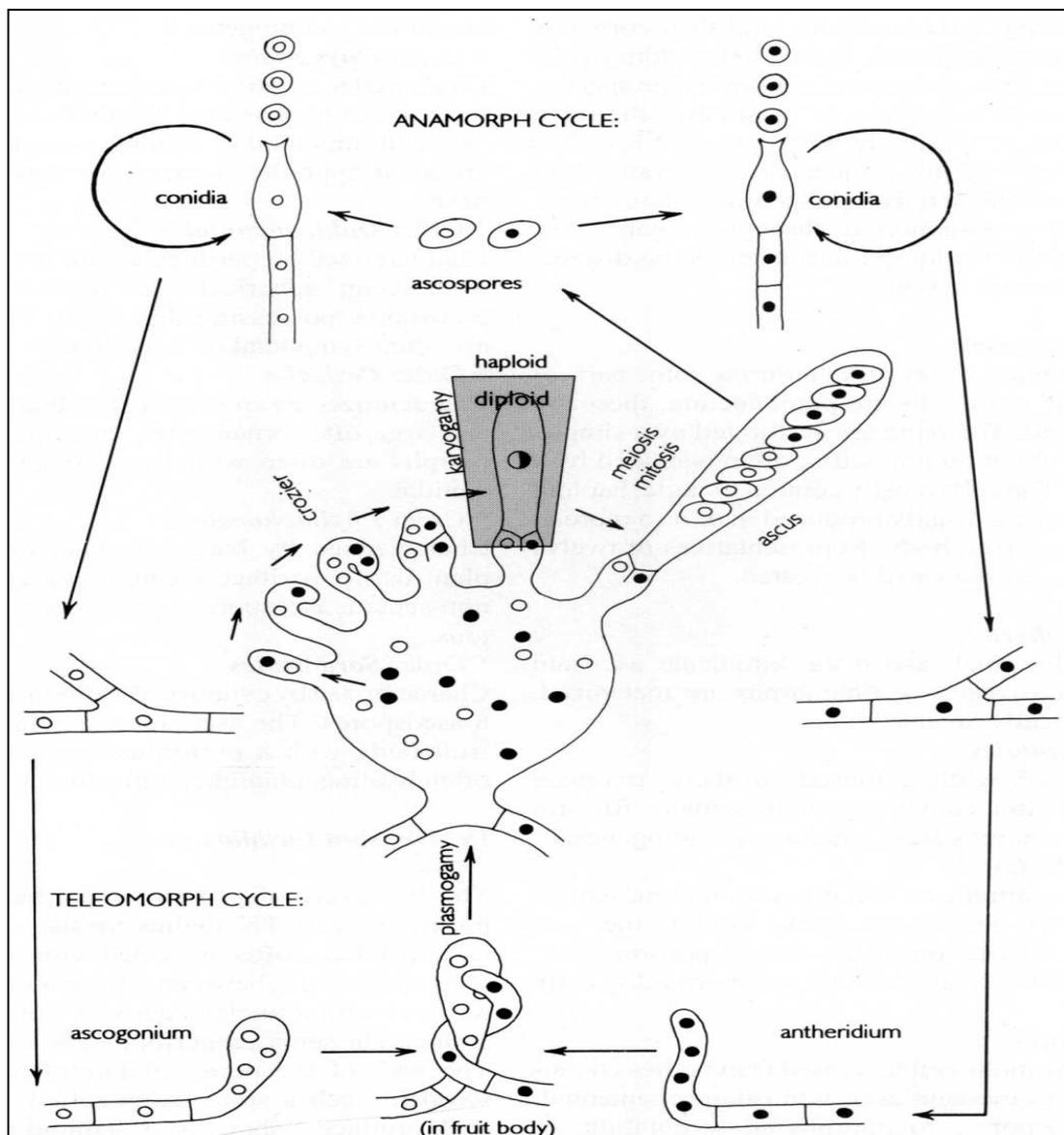


Abb. 19. Generationszyklus Aspergillus, Quelle: Yvonne Gräser : Thema: Molekulare Systematik und Evolution der Spezies der Familie Arthrodermataceae (Dermatophyten)

Die verschiedenen Arten der Aspergillus-Pilze werden bereits seit Jahrhunderten in der Industrie für fermentative Umsetzungen verschiedener Produkte verwendet. So werden beispielsweise Aspergillus niger zur Citronensäureproduktion, Aspergillus sojae zur Herstellung der Sojasauce oder Aspergillus oryzae für die Sake Produktion verwendet (Machida and Gomi, 2010, S. 8-9; Benninga, 1990, S.230-231).

Hierbei sind die verschiedenen Enzyme ausschlaggebend, wie beispielsweise Hydroxylasen, Peptidasen, Amylasen, Oxidasen, Lipasen,... (Amfep - List of Commercial Enzymes, October 2009). Die Pilze werden aber auch für die Gewinnung von Enzymen, wie zum Beispiel der α -Amylase für die Herstellung von Weizenbrot, verwendet (Lösche, 2000, S. 19).

Die Aspergillus-Arten haben sich aber auch als Alternative für eine eventuelle Partialsynthese verschiedener Substanzen in verschiedenen Studien bewiesen (Holland and Auret, 1974; Holland et al., 1998; Leon et al., 1973; Wang et al., 2009; Yildirim, 2010). Im weiteren Verlauf soll die mikrobiologische Umsetzung verschiedener Steroide, anhand von einigen Beispielen erläutert werden.

Aspergillus ochraceus konnte in verschiedenen Studien seine Fähigkeit der selektiven 11- α -Hydroxylierung an Steroiden zeigen (Holland et al., 1998).

So konnte beispielsweise bei der Umsetzung von 17- β -acetylaminoestr-4-en-3-on, 17- β -acetylaminoandrost-4-en-3-on, 17- β -acetylamino-5 α -androstan-3-on, N-methyl-3-ketoandrost-4-en-17 β -carboxamid, 20 α - und 20 β -Acetylamino-11 α -hydroxypregn-4-en-3-on und auch bei 20 α - und 20 β -Acetylamino-5 α -pregnan-3-on eine selektive 11- α -Hydroxylierung festgestellt werden. Dieser Pilz hätte somit ein großes Potential für die Umsetzung von Proscillaridin A in Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid.

Bei diesen Versuchen wurde dabei der Pilz zunächst mit dem nachstehenden Medium bei 24°C inkubiert:

Wachstums-Medium:

- 5 g Glucose
- 1 g Malzextrakt
- 1 g Rindextrakt
- 1 g Hefeextrakt
- 1 mL Maisquellwasser

Bestandteile wurden in 1 L destilliertem Wasser gelöst und der pH Wert auf 5,5 eingestellt.

Die Pilzsporen wurden dann in 200 mL des oben beschriebenen Mediums für 72 h bei 180 rpm auf dem Rotary Shaker platziert. Nach dem Wachstum wurden die entstandenen Pilzhyphen und Sporen filtriert, mit destilliertem Wasser gewaschen und in eine Lösung der Substanzen (jeweils 0,3g in 19 mL 95% Ethanol) mit 200 mL destilliertem Wasser erneut auf dem Rotary Shaker bei 180 rpm und 27°C für 48 h platziert. Danach wurde der Pilz wieder abfiltriert und die zurückgebliebene Lösung mittels ^1H – und ^{13}C – NMR untersucht.

Analog dazu wurden auch mit anderen Arten des Aspergillus ähnliche Versuche in verschiedenen Studien beschrieben (Holland and Auret, 1974). So wurde beispielsweise der Einfluss verschiedener chemischer Modifikationen von Progesteron auf die Hydroxylase-Aktivität von *A.niger* getestet. Dabei fand man heraus, dass eine Carbonylgruppe am C-20 in Enol-Stellung zur Aktivierung des C-21 für eine C-21-Hydroxylierung von Progesteron beigetragen hat.

Eine weitere Aspergillus-Art ist ebenfalls interessant für die mikrobiologische Hydroxylierung von Steroiden an 11 α -Position: *Aspergillus wentii* (Yildirim, 2010).

Dabei wurde beispielsweise bei der Umsetzung von Epiandrosteron und Pregnonolon eine 11 α -Hydroxylierung erreicht. Bei diesen Versuchen wurden nur Sporen verwendet und eine Reaktionsdauer von 120 Stunden.

2.4.2.2 *Cephalosporium*-Arten

Die Gattung der Cephalosporium-Pilze gehört ebenfalls zum Stamm der Ascomycota und zur Familie der Hypocreaceae. Der Name Cephalosporium ist allerdings veraltet, der aktuell gebräuchliche Name dieser Gattung ist Acremonium (Fincher et al., 1991; Liu, 2011).

Diese Gattung ist vor allem wegen der endogen gebildeten Cephalosporine bekannt geworden, welche erstmals 1945 durch Giuseppe Brotzku aus Acremonium chrysogenum (*Cephalosporium acremonium*) isoliert wurden. Cephalosporine sind Breitspektrum-Antibiotika, welche zu den β -Lactam-Antibiotika gehören (Bo, 2000; Nakajima, 2003).

Diese wirken durch die Hemmung der Transpeptidasen, welche bei der Teilung der Bakterienzellen für die Quervernetzung der neu aufgebauten Mureinschichten dient. Wird dieses Enzym blockiert verlieren die Bakterienzellwände dadurch ihre mechanische Festigkeit und platzen auf (Noe, 2007).

Für die mikrobiologische Hydroxylierung ist Studien zufolge aber vor allem der Pilz *Cephalosporium aphidicola* interessant. Dieser ist ebenfalls durch die Biosynthese des Aphidicolins bekannt, ein tetrazyklisches Diterpen welches ebenfalls wie die Cephalosporine antibiotisch wirkt. Dieses wirkt allerdings durch die Hemmung der zellulären Desoxyribonukleinsäure-Synthese. Sie wirken somit sowohl antibiotisch, als auch antiviral (Bucknall et al., 1973).

In vielen unterschiedlichen Studien wurde der Pilz ebenfalls auf seine hydroxylierenden Eigenschaften untersucht. Dabei wurden verschiedene Steroide getestet. Die Ergebnisse sollen im weiteren Verlauf kurz erläutert werden.

So wurde beispielsweise in einer Studie Progesteron und Testosteron für 12 Tage mit *Cephalosporium aphidicola* fermentiert. Dabei fand man heraus, dass Progesteron vor allen 11α hydroxyliert wird und Testosteron eher an Position 6β hydroxyliert wurde (Farooq and Hanson, 1999).

In anderen Studien wurde unterschiedliche Steroide, wie beispielsweise 6β -Hydroxy- 3α - 5 -cycloandrostan- 17 -on für 7 Tage mit *Cephalosporium aphidicola* inkubiert. Dabei erhielt man unterschiedliche Produkte, wie beispielsweise eine zusätzliche Hydroxylierung an Position 14α oder an den Positionen 3β , 5α oder 7β , aber auch eine Oxidation des 6β -Hydroxids zum Keton (Bensasson et al., 1999).

Auch bei der Inkubation von 3β -Hydroxy- 5α -Androstan- 17 -on erhält man Hydroxylierung an verschiedenen Positionen, wie 5α , 11α , 14α , 17β (Bensasson et al., 1998).

2.4.2.3 Sonstige

Es gibt noch verschiedene andere Pilze, die zur Hydroxylierung an unterschiedlichen Positionen von Steroiden befähigt waren.

Darunter die Gattung der Rhizopus-Pilze, welche, anders als die *Cephalosporium*- und die *Aspergillus*-Arten, zur Familie der Mucoraceae gehören (Vitale et al., 2012). Eine 11α -Hydroxylierung konnte dabei beispielsweise bei *Rhizopus arrhizus* an 17β -Acetylamino- 5β -Androstan- 3 -on, an $20\alpha/\beta$ -Acetylamino- 5α -Pregnan- 3 -on und an $20\alpha/\beta$ -Acetylamino- 5α -Pregnan- 3 -on festgestellt werden (Holland et al., 1998). Aber auch andere

Arten dieser Gattung, wie beispielsweise *Rhizopus nigricans* zeigte eine 11 α -Hydroxylierung an Pregnan-3,20-dion (Eppstein et al., 1953) und viele weitere Pilze, wie *Cunninghamella elegans*, *Calonectria decora* oder *Fusarium oxysporum* (A. and M., 1986; A. et al., 1962; C. et al., 2011; T. et al., 1980; Teresa et al., 2011).

2.5. Mikrobiologische Partialsynthese

Für die Versuche wurden zwei Substanzen als Vorstufen verwendet. Die erste Substanz ist das Proscillaridin A (siehe Abb. 18, S. 27), die zweite das Proscillaridin- β -epoxid, welche ein Epoxid anstelle der Doppelbindung zwischen den Positionen 4 und 5 besitzt.

Die Hydroxylierung zur Partialsynthese von Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid ist an Position 11 α nötig. Dies wurde mit Hilfe der zwei Pilzstämme *Aspergillus niger* (Strain 2874) und *Aspergillus ustus* (Strain 3089) versucht. Beide Stämme wurden in allen Versuchen auf dieselbe Art behandelt. Prinzipiell ist das Arbeiten im Laminar-Air-Flow und in der Nähe einer Feuerflamme für eine aseptische Arbeitsweise notwendig. Alle verwendeten Geräte und Materialien sollten vor Verwendung keimsterilisiert werden um Kontaminationen mit anderen Pilzen und Mikroorganismen zu vermeiden (siehe 3.1. Materialien und Methoden).

2.5.1 Pilzwachstum

Beide Pilzstämme wurden zuvor für rund 3 Wochen auf einem PDA-Agar (Potato-Dextrose-Agar) gezüchtet. Für weitere Verwendung war die Überführung in ein flüssiges Nährmedium notwendig. Dazu wurden die Sporen aus den Agar-Platten mit Hilfe von 0,9% NaCl-Lösung und 0,05% Polysorbat 80 (Tween 80) als Emulgator vom Agar getrennt und die Sporensuspension in einen separaten Kolben überführt und mit dem Vortex-Mixer gut umgerührt. Die Sporenlösung wurde davor durch einen Glasfaser-Filter filtriert, um eventuell tote Hyphen und Agar-Bestandteile abzutrennen.

Ein Teil der Lösung wurde dann für die Sporenzahlbestimmung mit Hilfe des Turbidimeters bei 590 nm entnommen. Für die Sporenzahlbestimmung ist steriles Arbeiten nur dann nötig, wenn die entnommene Lösung wieder verwendet werden soll.

Nun wird ein für das Gerät vorgesehenes Glasröhrchen mit destilliertem Wasser aufgefüllt und die Transmission auf 0 eingestellt. Danach werden langsam mehrere Aliquote der Sporenlösung hinzugefügt, bis eine Transmission von 75 erreicht ist. Bei jeder Zugabe wird das Glasröhrchen vorsichtig umgerührt. Dies sollte nicht mit dem Vortex-Mixer gemacht werden, da die Lösung aufgrund des Polysorbats aufschäumen würde.

Nun berechnet man die Menge die entnommen werden muss, um eine gewünschte Sporenmenge zu erhalten. Diese Menge wird dann in einem Erlenmeyerkolben einem flüssigen Wachstumsmedium beigemischt.

Bei meinen Versuchen habe ich drei unterschiedliche Wachstumsmedien verwendet. Ziel war es den Einfluss des Mediums auf das Enzymmuster des Pilzes festzustellen und ob dadurch eine andere Umsetzung der Edukte erreicht wurde. Die Zusammensetzungen können folgender Tabelle entnommen werden (Tabelle 2.).

Medium 1	Medium 2	Medium 3
0,5% Glucose		3,0% Malzextrakt
0,1% Malzextrakt	3,0% Malzextrakt	1,0% Glucose
0,1% Rindextrakt	1,0% Glucose	0,5% Hefeextrakt
0,1% Hefeextrakt	0,5% Hefeextrakt	1,0% Saccharose
0,2% Maisquellwasser	1,0% Saccharose	1,0% Rinderextrakt
0,2% Saccharose		1,0% Maisquellwasser
ad 1000 mL H ₂ O (dest.)	ad 1000 mL H ₂ O (dest.)	ad 1000 mL H ₂ O (dest.)

Tabelle 2.: verwendete flüssige Nährmedien für den Pilzwachstum

Es sollte noch der pH-Wert bestimmt werden, dieser sollte für ein optimales Wachstum zwischen 5 und 6 liegen. Danach wird der Kolben mit einem Stofftuch abgedeckt und in einem „Rotary-Shaker“ bei 180 rpm und 24°C für 72h geschüttelt. Dies gewährleistet ein optimales Wachstum der Pilzsporen.

Bei meinen Versuchen habe ich als Substanzen Proscillaridin- β -epoxid mit *Aspergillus niger* und *Aspergillus ustus* umgesetzt und Proscillaridin A mit *Aspergillus ustus*. Für Die Umsetzung von Proscillaridin- β -epoxid habe ich in unterschiedlichen Versuchen Medium 1-3 verwendet (siehe Tabelle 2, S. 37) und bei Proscillaridin A Medium 3 verwendet.

2.5.2 Biotransformation von Proscillaridin A / Proscillaridin- β -epoxid

Für die mikrobiologische Umsetzung der Substanzen wird zunächst eine Lösung mit MeOH hergestellt. Dabei sollte eine maximale endgültige Methanolkonzentration von etwa 5% nicht überschritten werden, da dies sonst toxisch für den Pilz wäre.

Zunächst wird aber die Pilzsuspension auf dem „Rotary-Shaker“ entnommen. Nach 72h ist ein markantes Wachstum sichtbar. Aus den Sporen sind nun die Hyphen gewachsen und das Myzel hat sich gebildet. Dieses wird mit Hilfe von einem Filterpapier vom Nährmedium abfiltriert und in einen frischen Erlenmeyerkolben in destilliertem Wasser suspendiert. In diesen Kolben wird nun die zuvor bereitete Edukt-Lösung hergestellt und der Kolben erneut mit einem Tuch abgedeckt.

Der Erlenmeyerkolben wird jetzt erneut in einen „Rotary-Shaker“ gegeben und bei 180 rpm und etwa 25°C das Edukt durch den Pilz umgesetzt. Steroide werden dabei vom Pilz nicht als Kohlenstoffquelle verwendet, sondern lediglich metabolisiert.

Die Dauer der Reaktion kann unterschiedlich gewählt werden. Ich habe bei meinen Versuchen zwei unterschiedliche Reaktionsdauern gewählt, einmal 48h und 72h. Bei der Reaktionsdauer von 72h wurde dem Medium zusätzlich 1,0% Glucose hinzugefügt, um das Überleben des Pilzes für diese Dauer zu gewährleisten.

2.5.3 Isolierung des Produkts

Nach Ende der gewählten Reaktionsdauer wird die Lösung erneut filtriert (grob) und das Myzel von der Lösung abgetrennt und mit Methanol oder Wasser gründlich gewaschen. Die erhaltene Lösung wird nun erneut mit einem Membranfilter (0,4 µm Porendurchmesser) erneut filtriert, um die feinen biologischen Anteile des Pilzes von der Lösung abzutrennen. Nun wird mit Hilfe von Chloroform-Methanol 2:1 oder Dichlormethan-Methanol 2:1 die wässrige Lösung in einem Scheidetrichter ausgeschüttelt. Dadurch soll das Produkt von der wässrigen Lösung abgetrennt werden. Bei nicht eindeutiger Phasentrennung kann noch zusätzlich etwas Methanol hinzugefügt werden. Die organische Phase wird dann abgetrennt und im Rotationsverdampfer das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand kann nun mittels NMR oder MS analysiert werden.

2.6. Schützung der L-Rhamnose

Im Verlauf einer Totalsynthese oder einer Partialsynthese kann zukünftig das Schützen des Zuckers von Proscillaridin A bzw. von Proscillaridin-β-epoxid von Interesse sein. Hierbei gibt es verschiedene Möglichkeiten, wobei ich die Einführung der Schutzgruppe durch Acetylierung durchgeführt habe.

2.6.1 Schützen der –OH – Gruppen des Zuckers durch Acetylierung

Hierbei wird Acetanhydrid für die Acetylierung der Hydroxylgruppen des Zuckers verwendet. Man kann hierbei etwa 2-3 äquivalente pro Hydroxylgruppe verwenden. Dimethylaminopyridin (DMAP) dient dabei als Katalysator und erhöht die Reaktion etwa um den Faktor 10^4 . Pyridin wird als Aktivator des Acetanhydrid verwendet und hat damit ebenfalls die Funktion eines Katalysators (siehe Abb. 16.).

Das Edukt wird in Dichlormethan gelöst und Ac_2O , DMAP und Pyridin hinzugefügt. Danach wird die Reaktion bei 50°C unter Rückfluss für etwa 24 h durchgeführt (Wuts et al., 2007).

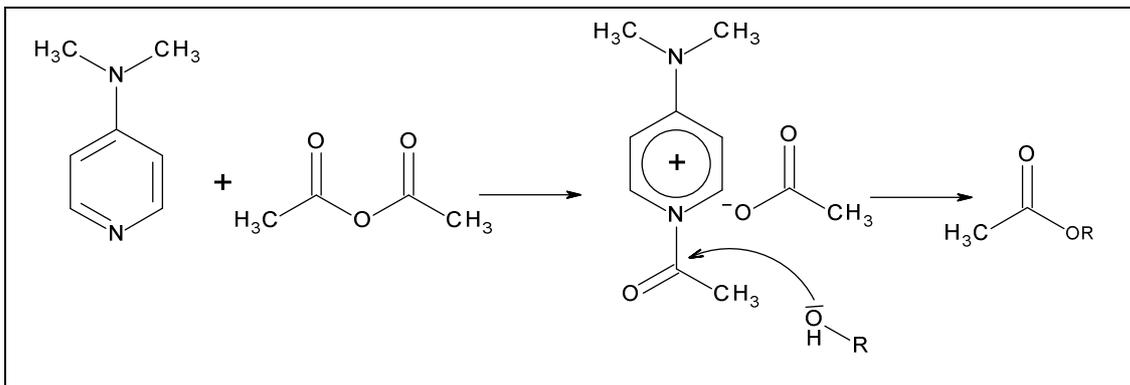


Abb. 16. Schutzgruppe einführen

Nach 24 h wird die Lösung ausgekühlt und in einen Scheidetrichter überführt. Dann wird 3 x mit 5% NaHCO_3 -Lösung ausgewaschen. Und die organischen Phasen gesammelt. Hierbei kann die Lösung durch das gebildete CO_2 etwas aufschäumen und somit eine klare Phasentrennung beeinträchtigen, um dies zu vermeiden sollte man man die Natriumbicarbonat-Lösung langsam hinzufügen und dabei den Scheidetrichter eventuell etwas schwenken, um das Entweichen des CO_2 zu erleichtern. Andernfalls kann auch einmaliges Ausschütteln mit 5% Natriumbicarbonat-Lösung und 2 maliges Ausschütteln mit destilliertem Wasser ausreichen.

Die organischen Phasen werden gesammelt und mit Natriumsulfat getrocknet und danach mit Hilfe eines Rotationsverdampfers das Lösungsmittel komplett entfernt.

2.6.1.1 Entschützen der –OH – Gruppen des Zuckers

Für die Deacetylierung der Schutzgruppen wird wasserfreies Natrium-methanolat verwendet. Um die Stabilität des Natrium-methanols zu gewährleisten ist das Arbeiten unter Argon – Schutzatmosphäre hierbei äußerst wichtig. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur so lange durchgeführt bis die Acetylgruppen abgespalten sind. Man überprüft dies mit Hilfe einer Dünnschicht-Chromatographie in regelmäßigen Zeitabständen (etwa alle 10-15 Minuten) (siehe Abb. 17.).

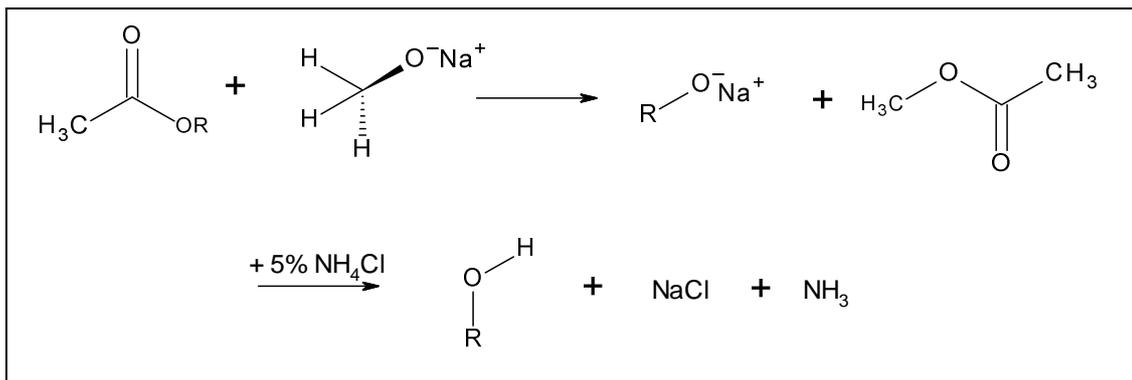


Abb. 17.: Schutzgruppe entfernen

3. Experimenteller Teil

3.1. Materialien und Methoden

Glasgeräte:

Alle Glasgeräte und Magnetstäbe wurden vor der Verwendung sorgfältig mit Wasser und Ethanol gereinigt und im Trockenschrank bei etwa 150°C getrocknet. Geräte die in direktem oder indirektem Kontakt mit biologischem Material standen wurden vorher im Autoklav bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert. Der Transfer von Reagenzien erfolgte mittels Spritzen und Nadeln.

Lösungsmittel und Reagenzien:

Alle organischen Lösungsmittel wurden immer frisch destilliert verwendet. Pyridin wurde mit Kaliumhydroxid unter Argon getrocknet und immer frisch destilliert verwendet. Dichlormethan wurde mit Siccapent unter Argon getrocknet und immer frisch destilliert verwendet.

Dünnschichtchromatographie:

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Fertigfolien, die mit Kieselgel beschichtet sind, von der Firma Merck (DC Kieselgel 60 F254) verwendet.

Es wurde unter UV-254nm detektiert.

Säulenchromatographie:

Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 verwendet. Das Kieselgel wurde mit dem Fließmittel aufgeschlemmt und durch Klopfen in die Säule gebracht.

NMR:

Als ¹H-NMR wurde ein 200- und 500 MHz-Gerät und als ¹³C-NMR ein 125 MHz-Gerät verwendet. Es wurde CDCl₃ als interner Standard für das Lösungsmittelsignal verwendet, dessen Peak im ¹H-NMR bei δ 7.26 ppm und beim ¹³C-NMR bei δ 77.00 ppm erscheint.

Für die Auswertung werden die Abkürzungen s (= Singulett), d (=Duplett), t (=Triplett), m (= Multiplett), dd (= Duplett von Duplett) und dt (= Duplett von Triplett) verwendet.

UV-Lampe

CAMAG CM3 SN: 011044

Trockenschrank

Heraeus UT6060

Ultraschallbad

BRANSON 5200

Analysenwaage

Sartorius A200S

Sartorius LE26P

Trubudimeter

Für die Sporenzahlbestimmung wurde ein BIOLOG Hayward, CA 94545 Turbudimeter verwendet.

Autoklav

Zur Autoklavierung wurde ein Autoklav verwendet.

ACIB Certoklav CA-ER 18L, Inv#1055, CV-EL 12L / 18L

Rotary Shaker

Für den Pilzwachstum und für die Reaktionen wurde ein Rotary Shaker verwendet.

Bartelt Labor - & Datentechnik, Ampere Chart Multitron II

Pilzstämme & Agar

Die Pilzstämme *Aspergillus niger* (2874) und *Aspergillus ustus* (3089) wurden von *Vienna University of Technology, Research Area Biotechnology and Microbiology, Microbiology Group* bereitgestellt. Die Sporen wurden in einem PDA-Agar bei Raumtemperatur in einem abgeschlossenen Raum bis zur Verwendung gelagert.

3.2. Mikrobiologische Partialsynthese

Bei der mikrobiologischen Partialsynthese von Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid habe ich Proscillaridin- β -epoxid und Proscillaridin A als Vorstufen verwendet. Die 11- α -Hydroxylierung sollte mit den Pilzen *Aspergillus niger* (Strain: 2874) und *Aspergillus ustus* (Strain: 3089) durchgeführt werden. Dazu wurden ebenfalls drei unterschiedliche Nährmedien verwendet, Medium 1 – 3 (siehe Tabelle 2., S. 37).

Es muss bei allen Versuchen immer steril in einem Laminar-Airflow und stets in der Nähe einer Feuerflamme gearbeitet werden, um Kontaminationen mit anderen Sporen und Mikroorganismen zu vermeiden.

3.2.1 Umsetzung des Proscillaridin- β -epoxid mit *A.niger* und Medium 1

3.2.1.1 Vorbereitung des Nährmediums und Wachstum des Pilzes

Zunächst werden 1000 mL vom flüssigen Nährmedium *Medium 1* hergestellt. Dazu werden in einer zuvor autoklavierten 1000 mL Glas-Schraubflasche (121 °C, 15 min.) 5,0 g Glucose; 1,0 g Malzextrakt; 1,0 g Fleischextrakt (Beef Extrakt); 1,0 g Hefeextrakt; 2 mL Maisquellwasser (Cornsteep Liquor); 2,0 g Saccharose in die Flasche eingewogen.

Die Flasche wird dann langsam unter ständigem Umschwenken auf 1000 mL mit destilliertem Wasser aufgefüllt und solange geschwenkt, bis die Bestandteile vollständig gelöst waren. Danach wird die Flasche ebenfalls bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Flasche werden 200 mL des Nährmediums in einen zuvor autoklavierten 1000 mL Erlenmeyerkolben eingefüllt (*steril arbeiten*).

Nun werden die Pilzsporen vom Pilz *Aspergillus niger* (Strain: 2874) aus dem PDA – Agar gelöst. Dazu werden 3 x 5 mL 0,9% NaCl & 0,05% Tween 80 – Lösung auf den Agar pipettiert und mit Hilfe eines davor sterilisierten Drigalski – Spatels die Sporen vom Agar heruntergelöst. Die Lösungen werden dann durch einen Glasfaserfilter filtriert und in einem sterilen 20 mL Röhrchen (20 mL Tube) vereinigt. Etwa 1 mL davon wird für die Sporenzahlbestimmung in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt.

Nun wird mit Hilfe des Turbidimeters die Sporenzahl bei 590 nm bestimmt. Dazu wird die Lösung zunächst mit einem Vortex-Mixer gut umgerührt. Es werden 10 mL destilliertes Wasser in ein für das Gerät vorgesehene Glasröhrchen gefüllt und die Transmission auf 0 eingestellt. Danach werden langsam mehrere Aliquote (jeweils etwa 50 – 100 µL) der Sporenlösung hinzugefügt. Bei jeder Zugabe wird das Glasröhrchen vorsichtig umgerührt. Es werden so viele Aliquote hinzugefügt bis die Transmission von 0 auf 75 steigt. Die dafür benötigte Menge Lösung entspricht einer Sporenzahl von 4×10^7 . Für diesen Versuch wurde eine Sporenzahl von 2×10^8 verwendet, dafür waren 2,75 mL der Sporenlösung nötig. Diese Menge wird nun entnommen und den zuvor vorbereiteten 200 mL des Nährmediums *Medium 1* im 1000 mL Erlenmeyerkolben beigemischt. Danach wird der ungefähre pH – Wert der Lösung mit Hilfe von pH – Papier bestimmt. Dieser sollte zwischen pH 5 und 6 liegen.

Das Gefäß wird nun mit einem Stofftuch bedeckt und in einem „Rotary-Shaker“ bei 180 rpm und 24 °C werden die Pilzsporen nun für 72 h geschüttelt.

3.2.1.2 Vorbereitung des Reaktionsgefäß und Herstellung einer Lösung von Proscillaridin- β -epoxid

Als Reaktionsgefäß wird ein weiterer 1000 mL Erlenmeyerkolben verwendet. In diesen werden 200 mL destilliertes Wasser gefüllt und das Gefäß wird autoklaviert (121°C, 15 Minuten).

Eine Lösung von 0,3 g Proscillaridin in 10 mL Ethanol (95%) wird hergestellt und dem Reaktionsgefäß beigemischt. Bei unvollständiger Auflösung sollte die Menge des Edukts herabgesetzt werden oder der Versuch mit der Suspension durchgeführt werden. Die Ethanolkonzentration im Reaktionsgefäß sollte 5% nicht überschreiten.

3.2.1.3 Mikrobiologische Umsetzung des Proscillaridin- β -epoxids

Nach einer Wachstumsdauer von 72 h wird der Erlenmeyerkolben (aus 4.2.1.1.) aus dem „Rotary-Shaker“ entnommen. Die Suspension enthält nun Sporen und das daraus gewachsene Myzel. Dieses wird nun in einem Laminar-Airflow in der Nähe einer Feuerflamme durch ein zuvor autoklaviertes Filterpapier vom Medium abfiltriert und mit autoklaviertem, destilliertem Wasser gründlich gewaschen. Der Rückstand besteht nun aus Sporen und Myzel des Pilzes. Dieser wird aus dem Filter entnommen und in das zuvor vorbereitete Reaktionsgefäß gegeben.

Das Reaktionsgefäß wird nun im „Rotary-Shaker“ bei 180 rpm und 27°C für 48 Stunden geschüttelt.

3.2.1.4 Extrahierung des Produkts und Strukturaufklärung

Nach 48 Stunden wird das Reaktionsgefäß auf dem „Rotary-Shaker“ entnommen und die Lösung wird erneut abfiltriert. Der Rückstand wird nochmal gründlich gewaschen und die abfiltrierte Lösung wird in einen Scheidetrichter geeigneter Größe überführt. Dieser wird nun mit 3 x 300 mL Chloroform/MeOH 2+1 ausgeschüttelt und die organischen Phasen werden gesammelt und mit Natriumsulfat getrocknet.

Danach wird mit Hilfe einer Nutsche das Natriumsulfat abfiltriert und die Lösung in einen Rundkolben geeigneter Größe überführt und das Lösungsmittel mit einem Rotationsverdampfer vollständig entfernt. Der Rückstand betrug 71,0 mg. 15 mg davon wurden daraufhin für eine ^1H – NMR, ^{13}C – NMR – Spektroskopische – Analyse und 1 mg für eine MS-Analyse verwendet.

3.2.2 Umsetzung des Proscillaridin- β -epoxid mit *A.ustus* und Medium 1

Bei diesem Versuch wurde anstelle von *Aspergillus niger* Sporen *Aspergillus ustus* (Strain: 3089) verwendet und es wurde eine Sporenanzahl von $1,25 \cdot 10^8$ verwendet. Ansonsten war die Durchführung dieses Versuchs exakt gleich mit dem in 4.2.1. beschriebenen Vorgang.

Der Rückstand betrug 33,8 mg. 15 mg davon wurden daraufhin für eine ^1H – NMR, ^{13}C – NMR – Spektroskopische – Analyse und 1 mg für eine MS-Analyse verwendet.

3.2.3 Umsetzung des Proscillaridin- β -epoxid mit *A.niger* und Medium 2

Bei diesem Versuch wurden Sporen des *Aspergillus niger* (Strain: 2874) für die Umsetzung von Proscillaridin- β -epoxid verwendet. Dieser Versuch unterscheidet sich von dem in 4.2.1. beschriebenen Versuch zusätzlich vom verwendeten flüssigen Wachstums – Nährmedium.

Es wurde anstelle vom in Tabelle 2 (3.1.1.) beschriebenen *Medium 1* nun *Medium 2* verwendet. Dazu wurden in einer zuvor autoklavierten 1000 mL Glas-Schraubflasche (121 °C, 15 min.) 30,0 g Malzextrakt; 10,0 g Glucose; 5,0 g Hefeextrakt; 10,0 g Saccharose in die Flasche eingewogen. Die Flasche wurde dann langsam unter ständigem Umschwenken auf 1000 mL mit destilliertem Wasser aufgefüllt und solange geschwenkt, bis die Bestandteile vollständig gelöst waren. Danach wurde die Flasche ebenfalls bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert.

Nach dem Abkühlen der Flasche werden 200 mL des Nährmediums in einen zuvor autoklavierten 1000 mL Erlenmeyerkolben eingefüllt (*steril arbeiten*).

Der Rückstand betrug 58,0 mg. 15 mg davon wurden daraufhin für eine ^1H – NMR, ^{13}C – NMR – Spektroskopische – Analyse und 1 mg für eine MS-Analyse verwendet.

3.2.4 Umsetzung des Proscillaridin- β -epoxid mit *A.ustus* und Medium 2

Bei diesem Versuch wurde anstelle von *Aspergillus niger* Sporen *Aspergillus ustus* (*Strain: 3089*) verwendet und es wurde eine Sporenanzahl von $1,25 \cdot 10^8$ verwendet. Ansonsten war die Durchführung dieses Versuchs exakt gleich mit dem in 4.2.3. beschriebenen Vorgang.

Der Rückstand betrug 47,3 mg. 15 mg davon wurden daraufhin für eine ^1H – NMR, ^{13}C – NMR – Spektroskopische – Analyse und 1 mg für eine MS-Analyse verwendet.

3.2.5 Umsetzung des Proscillaridin- β -epoxid mit *A.ustus* und Medium 3

Bei diesem Versuch wurden Sporen des *Aspergillus ustus* (*Strain: 3089*) verwendet. Das verwendete Nährmedium ist das in Tabelle 2 (3.1.1.) beschriebene Nährmedium *Medium 3*. Dieses wurde wie in den in 4.2.1. – 4.2.4. beschriebenen Versuchen hergestellt. Es wurden dazu in einer zuvor autoklavierten 1000 mL Glas-Schraubflasche (121 °C, 15 min.) 30,0 g Malzextrakt; 10,0 g Glucose; 5,0 g Hefeextrakt; 10,0 g Saccharose; 10,0 g Rinderextrakt (Beef extract); 10,0 mL Maisquellwasser (Cornsteep Liquor) in die Flasche eingewogen. Die Flasche wurde dann langsam unter ständigem Umschwenken auf 1000 mL mit destilliertem Wasser aufgefüllt und solange geschwenkt, bis die Bestandteile vollständig gelöst waren. Danach wurde die Flasche ebenfalls bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert.

Nach dem Abkühlen der Flasche werden 200 mL des Nährmediums in einen zuvor autoklavierten 1000 mL Erlenmeyerkolben eingefüllt (*steril arbeiten*).

Des Weiteren gab es Unterschiede in der Vorbereitung des Reaktionsgefäßes. Als Reaktionsgefäß wurde ebenfalls ein 1000 mL Erlenmeyerkolben verwendet. In diesen wurden 10,0 g Glucose eingewogen und 200 mL destilliertes Wasser eingefüllt. Die Glucose wurde gelöst und das Gefäß autoklaviert (121°C, 15 Minuten).

Bei der Herstellung der Proscillaridin- β -epoxid-Lösung wurde anstelle von 0,3 g, bei diesem Versuch 0,1 g eingewogen und in 10 mL Methanol (anstelle von 95% Ethanol) gelöst. Zusätzlich wurde anstelle der Reaktionsdauer von 48 h hier eine Reaktionsdauer von 72 h gewählt.

Der Rückstand betrug 245,5 mg. 15 mg davon wurden daraufhin für eine ^1H – NMR, ^{13}C – NMR – Spektroskopische – Analyse und 1 mg für eine MS-Analyse verwendet.

3.2.6 Umsetzung des Proscillaridin A mit A.ustus und Medium 3

Bei diesem Versuch wurde an Stelle von Proscillaridin- β -epoxid Proscillaridin A als Edukt verwendet. Dabei wurden 0,1 g Proscillaridin A in 10 mL Methanol gelöst. Ansonsten war der Versuchsvorgang exakt gleich dem in 4.2.5. beschriebenen Vorgangs.

Der Rückstand betrug 246,6 mg. 15 mg davon wurden daraufhin für eine ^1H – NMR, ^{13}C – NMR – Spektroskopische – Analyse und 1 mg für eine MS-Analyse verwendet.

3.2.7 Übersicht der in 4.2.1. – 4.2.6. beschriebenen Versuche

Proben-bezeichn.	Pilz	Medium	Messung	Edukt (EW)	Produkt (TG)	Dauer d. Reaktion
AF008	A.niger	M1	NMR 15mg/d-DMSO	Prosc.epoxid 0,3g/10mL EtOH	71,0 mg	48 h
AF011			MS 0,1mg/mL MeOH			
AF012	A.niger	M2	NMR 15mg/d-DMSO	Prosc.epoxid 0,3g/10mL EtOH	58,0 mg	48 h
AF013			MS 0,1mg/mL MeOH			
AF014	A.ustus	M1	NMR 15mg/d-DMSO	Prosc.epoxid 0,3g/10mL EtOH	33,8 mg	48 h
AF015			MS 0,1mg/mL MeOH			
AF010	A.ustus	M2	NMR 15mg/d-DMSO	Prosc.epoxid 0,3g/10mL EtOH	47,3 mg	48 h
AF009			MS 0,1mg/mL MeOH			
AF016	A.ustus	M3	NMR 15mg/d-DMSO	Prosc.epoxid 0,1g/10mL MeOH	245,5 mg	72 h
AF017			MS 0,1mg/mL MeOH			
AF018	Austus	M3	NMR 15mg/d-DMSO	Proscillaridin 0,1g/10mL MeOH	246,6 mg	72 h
AF019			MS 0,1mg/mL MeOH			

3.3. Schützung der L-Rhamnose

3.3.1 Einführung der Schutzgruppe

Zunächst wurden Versuche der Schützung der L-Rhamnose von Proscillaridin- β -epoxid durchgeführt, da dies eventuell im weiteren Verlauf der Synthese nötig sein könnte.

Dabei wurde zunächst 1 mM des Edukts in einen 50 mL Rundkolben eingewogen (entspricht 547 mg). Dieses wurde zunächst in etwa 10 mL Dichlormethan gelöst.

Danach wurden für die 3 OH-Gruppen des Zuckers 10 äquivalente Acetanhydrid hinzugefügt (entspricht 1,02 g) und etwa 100 mg DMAP (4-Dimethylaminopyridin) und 1 mL Pyridin als Katalysatoren hinzugefügt (Reaktionsmechanismus Abb. 16., S. 40).

Die Lösung wurde dann über Nacht am Rückflusskühler auf etwa 50°C erhitzt. Dabei wurde unter Argon-Schutzatmosphäre gearbeitet. Am darauffolgenden Tag wurde die Lösung ausgekühlt und in einen Scheidetrichter überführt. Der Rundkolben wurde nochmals mit 2 x 10 mL Dichlormethan ausgewaschen und in den Scheidetrichter überführt. Nun wurde beim ersten Versuch (AF001) mit 3 x 20 mL 5%-NaHCO₃-Lösung ausgewaschen.

Hier entstand das Problem, dass aufgrund der CO₂-Bildung die Lösung aufgeschäumt wurde, weshalb bei den weiteren Versuchen (AF002-AF005) lediglich 1 x mit 20 mL Natriumbicarbonat-Lösung und 2 x mit 20 mL destilliertem Wasser im Scheidetrichter ausgeschüttelt wurde.

Die organischen Phasen wurden gesammelt und mit Na₂SO₄ getrocknet, danach mittels Nutsche abfiltriert und das Dichlormethan mit Hilfe eines Rotationsverdampfers vollständig entfernt. Der ölige Rückstand wurde

abgewogen und etwa 15 mg in D-Chloroform für eine NMR Untersuchung eingewogen.

3.3.2 Entfernen der Schutzgruppe

Das Abspalten der Acetyl-Schutzgruppe von den Zuckerhydroxiden wurde mittels Natrium-methanolat durchgeführt. Da es sehr wasserempfindlich ist, ist Arbeiten unter Argon-Schutzatmosphäre unbedingt notwendig. Grundsätzlich gibt es bei dieser Reaktion mehrere Einflussparameter: Die Reaktionsdauer, die Menge des verwendeten Natriummethanols und die Reaktionstemperatur.

Da eine mögliche Öffnung des Lacton-Rings durch das Natriummethanolat vermieden werden sollte wurden mehrere Versuche durchgeführt um die Stabilität des Lactonrings gegenüber dem Natrium-methanolat herauszufinden durchgeführt.

Es wurde zunächst 50 mg Edukt eingewogen (entspricht 0,07 mM) und in etwa 2 mL Methanol gelöst. Danach wurden bei Versuch AF006 4 Äquivalente Natrium-methanolat eingewogen (entspricht 16 mg) und in 0,5 mL Methanol gelöst, beim Versuch AF007 wurden hingegen 64 Äquivalente verwendet.

Die zwei Lösungen wurden in einem 30 mL Mehrhalskolben vereinigt und unter Argonschutzatmosphäre mit einem Magnetrührer bei Raumtemperatur gerührt (siehe Abb. 17, S. 41). Dabei wurde eine Dünnschicht-chromatographische Kontrolle alle 15 Minuten durchgeführt. Die stationäre Phase hierfür war $\text{KG}_{60}\text{F}_{254}$ und als mobile Phase wurde Methanol und Dichlormethan im Verhältnis 1 + 20 verwendet.

Beim ersten Versuch (AF006) wurde nach 4 stündiger Reaktion bei Raumtemperatur immernoch keine vollständige deacetylierung erreicht, weshalb der Versuch abgebrochen wurde und beim nächsten Versuch

(AF007) 64 Äquivalente verwendet wurden. Hier war nach etwa 2 Stunden, der Dünnschichtchromatographischen Kontrolle zufolge, ein Großteil umgesetzt worden. Die Reaktion wurde dann nach zwei Stunden durch Ausschütteln mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung beendet und mit 3 x 5 mL Dichlormethan das Produkt im Scheidetrichter von der wässrigen Phase getrennt. Die organischen Phasen wurden gesammelt und mit Natriumsulfat getrocknet. Danach wurde mittels Nutsche abfiltriert und mit Hilfe von einem Rotationsverdampfer das Dichlormethan vollständig entfernt. Der Rückstand wurde in D-Chloroform für eine NMR-Vermessung gelöst.

3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei den Versuchen galt es festzustellen, ob die Pilze *Aspergillus niger* und *Aspergillus ustus* dazu in der Lage waren die Testsubstanzen Proscillaridin- β -epoxid beziehungsweise Proscillaridin A zu hydroxylieren beziehungsweise ob durch sonstige enzymatische Reaktionen eine Umsetzung dieser Testsubstanzen resultiert. Im optimalen Fall wäre eine 11 α -Hydroxylierung an den Testsubstanzen zu erzielen.

Die Versuche AF008/AF011 und AF014/AF015 wurden dabei analog zu dem in der Literatur beschriebenen Versuch (Holland, H. et al, 1998) durchgeführt (siehe S. 32-33 bzw. S. 36-39). Es gab hierbei allerdings zwei Unterschiede: anstelle von *Aspergillus ochraceus* wurden die Pilze *Aspergillus niger* (AF008/AF011) und *Aspergillus ustus* (AF014/AF015) eingesetzt und anstelle der Acetylamino-steroiden wurde Proscillaridin- β -epoxid verwendet.

Es wurden 300,0 mg des Edukts (Proscillaridin- β -epoxid) eingewogen und für die Versuche verwendet. Bei den Proben AF008/AF011 wurde eine Ausbeute von etwa 24% erreicht (71,0 mg Produkt) und bei AF014/AF015 eine Ausbeute von etwa 11% (33,8 mg Produkt). Die geringe Ausbeute dieser Versuche und auch der Versuche AF012/AF013 und AF010/AF009 lässt sich vermutlich auf die verwendete Isolierungstechnik des Produkts aus der, am Ende des Versuchs erhaltener, wässriger Lösung zurückführen.

In der Literatur (Holland, H. et al, 1998) wurde eine 72 h kontinuierliche Extraktion mit Dichlormethan durchgeführt. Bei meinen Versuchen wurde die wässrige Lösung 3 x mit Chloroform-Methanol 2:1 im Scheidetrichter ausgeschüttelt und die organische Phase abgetrennt und weiterverwendet.

Die Strukturaufklärung der Produkte wurde mittels ^1H – NMR –, ^{13}C – NMR – Spektroskopischer – und MS – Analyse durchgeführt. Bei der NMR – Analyse war keine Umsetzung erkennbar. Das Spektrum des Produkts entsprach dem Spektrum des Edukts.

Bei der MS – Analyse waren zwar Peaks sichtbar, die auf eine Hydroxylierung des Edukts hindeuteten, allerdings in einem nicht relevanten Ausmaß, da sich dies nicht mit den NMR – Spektren bestätigen ließ.

Nun galt es verschiedene Einflussparameter zu modifizieren, um eventuell bessere Ergebnisse zu erhalten. Hierzu wurde zunächst das Wachstumsmedium des Pilzes modifiziert. Ziel war es festzustellen, ob ein nährstoffreicheres Medium einen Einfluss auf das Enzymmuster des Pilzes hat. Bei den Versuchen AF012/AF013 (*A. niger*) und AF010/AF009 (*A. ustus*) wurde Medium 2 anstelle von Medium 1 verwendet (siehe Tabelle 2, S. 37). Bei den Proben AF012/AF013 wurde eine Ausbeute von etwa 19% erreicht (58,0 mg Produkt) und bei AF010/AF009 eine Ausbeute von etwa 16% (47,3 mg Produkt). Die Ergebnisse der Auswertung der NMR- und MS-Spektren dieser Proben entsprachen den im vorigen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse der Proben AF008/AF011 und AF014/AF015. Es war keine Umsetzung des Edukts festzustellen.

Der nächste modifizierbare Einflussparameter war die Reaktionsdauer. Diese wurde bei den Versuchen AF016/AF017 und AF018/AF019 von 48 h auf 72 h verlängert. Um das Überleben des Pilzes über diesen Zeitraum zu gewährleisten wurde dem Reaktionsmedium zusätzlich 1,0 % Glucose hinzugefügt. Des Weiteren wurden 100,0 mg anstelle von 300,0 mg verwendet, um eine bessere Löslichkeit der Edukte zu garantieren. Bei

AF016/AF017 wurde Proscillaridin- β -epoxid verwendet bei AF018/AF019 Proscillaridin A. Bei diesen Versuchen entstanden viele Nebenprodukte, die durch Ausschütteln im Scheidetrichter nicht abtrennbar waren. Grund hierfür wird vermutlich an der, dem Reaktionsmedium zugeführte Glucose liegen, was zur Bildung verschiedener Stoffwechselprodukte geführt haben wird, die ebenfalls in der organischen Phase löslich waren. Dies erklärt auch das erhöhte Trockengewicht der erhaltenen Produkte. Die Strukturaufklärung der verschiedenen Nebenprodukte war mit den NMR – und MS – Spektren nicht möglich.

3.3.4 Conclusio

Das Ziel der im Laufe dieser Diplomarbeit durchgeführten Versuche war es, basierend auf den in der Literatur beschriebenen Hydroxylierungen von verschiedenen Steroiden durch unterschiedliche Pilze eine eventuelle 11- α -Hydroxylierung der herzwirksamen Glykoside Proscillaridin- β -epoxid und Proscillaridin A durch *Aspergillus niger* bzw. durch *Aspergillus ustus* zu erzielen. Es wurde jedoch keine signifikante Umsetzung der herzwirksamen Glykoside erreicht. Da allerdings bereits verschiedene Steroide erfolgreich mit diesen Pilzen hydroxyliert wurden könnte vermutlich der Lacton-Ring am Steroidgrundgerüst ausschlaggebend für den Misserfolg der Versuche sein. Dieser könnte beispielsweise durch sterische Einflüsse die Bindung von Enzymen verhindert oder beeinträchtigt haben.

Abschließend lässt sich somit sagen, dass durch Verwendung von *Aspergillus niger* und *Aspergillus ustus* bei diesen Versuchen keine erfolgreiche 11- α -Hydroxylierung von Proscillaridin A zur Gewinnung von Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid erzielt wurde. Es bleibt somit die Frage offen, ob dies eventuell mit anderen Mikroorganismen möglich ist.

4. Literaturverzeichnis

- A., C. T., and R. N. M., 1986, Microbial transformations. Part 7. Microbial transformations of A-nor - and A-homo-5 α -androstane derivatives with the fungus *Cunninghamella elegans*: Journal of Chemical Research Synopses, p. 48-9.
- Amfep - Association of Manufacturers and Formulators of Enzymes, 2009, List of Enzymes October 2009. www.amfep.org, <http://amfep.drupalgardens.com/sites/amfep.drupalgardens.com/files/Amfep-List-of-Commercial-Enzymes.pdf>; Abruf am 15.05.2013
- A., S., H. K., and S. R., 1962, Microbial hydroxylation of 3 α ,6 α -dihydroxy-5 β -pregnan-20-one in the 11- α -position with *Calonectria decora*: Tetrahedron, v. 18, p. 993-9.
- Banulus, L. M. Y., 2013, Hellebrin and its aglycone form hellebrigenin display similar in vitro growth inhibitory effects in cancer cells and binding profiles to the alpha subunits of the Na/K-ATPase.
- Benninga, H., 1990, A History of Lactic Acid Making: A Chapter in the History of Biotechnology: Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
- Bensasson, C. M., J. R. Hanson, and A. C. Hunter, 1998, The Hydroxylation of Δ 5-Androstenes by *Cephalosporium aphidicola*: Pergamon.
- Bensasson, C. S., J. R. Hanson, and Y. L. Huerou, 1999, The microbiological hydroxylation of 3 α ,5-cycloandrostanes by *Cephalosporium aphidicola*: Pergamon.
- Block, S. S., 2001, Desinfection, Sterilization, and Preservation: Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

- Bo, G., 2000, Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins: Clin Microbiol Infect, v. 6 Suppl 3, p. 6-9.
- Bucknall, R. A., H. Moores, R. Simms, and B. Hesp, 1973, Antiviral effects of aphidicolin, a new antibiotic produced by *Cephalosporium aphidicola*: Antimicrob Agents Chemother, v. 4, p. 294-8.
- C., P. P., M. K. P., R. F. A., R. W. F., and R. P. B., 2011, Hydroxylation of steroids by *Fusarium oxysporum*, *Exophiala jeanselmei* and *Ceratocystis paradoxa*: Steroids, v. 76, p. 1317-1330.
- Eppstein, S. H., D. H. Peterson, H. M. Leigh, H. C. Murray, A. Weintraub, L. M. Reineke, and P. D. Meister, 1953, Microbiological Transformation of Steroids. Preparation of 11 α -Hydroxyallopregnane-3,20-dione and 11 α -Hydroxypregnane-3,20-dione: Upjohn Company.
- Estler, C.-J., and H. Schmidt, 2007, Pharmakologie und Toxikologie: Für Studium und Praxis: Stuttgart, Germany, Schattauer.
- Farooq, A., and J. R. Hanson, 1999, Oxidation of Two Pregnane Steroids Catalyzed by the Fungus *Cephalosporium aphidicola*: Biosci, Biotechnol. Biochem.
- Fincher, R. M., J. F. Fisher, R. D. Lovell, C. L. Newman, A. Espinel-Ingroff, and H. J. Shadomy, 1991, Infection due to the fungus *Acremonium* (*cephalosporium*): Medicine (Baltimore), v. 70, p. 398-409.
- Fuchs, G., and H. G. Schlegel, 2007, Allgemeine Mikrobiologie: Germany, Georg Thieme Verlag.
- Gao, H., R. Popescu, B. Kopp, and Z. Wang, 2011, Bufadienolides and their antitumor activity: Nat Prod Rep, v. 28, p. 953-69.
- Garbe, C., 2006, Management des Melanoms: Germany, Springer Medizin Verlag Heidelberg.

- Holland, H. L., and B. J. Auret, 1974, The Mechanism of Microbial Hydroxylation of Steroids. Part 1. The C-21 Hydroxylation of Progesterone by *Aspergillus niger* ATCC 9142: *Can. J. Chem.* 53, 845.
- Holland, H. L., G. Lakshmaiah, and P. L. Ruddock, 1998, Microbial hydroxylation of acetylaminosteroids: *Steroids*, v. 63, p. 484-95.
- Hänsel, R., J. Hölzl, 1996, *Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie: Germany*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Jung, M. E., and D. Yoo, 2011, First total synthesis of rhodexin A: *Org Lett*, v. 13, p. 2698-701.
- Koolman, J., and K.-H. Röhm, 2003, *Taschenatlas der Biochemie*.
- Kopp, B., L. Krenn, M. Draxler, A. Hoyer, R. Terkola, P. Vallaster, and W. Robien, 1996, Bufadienolides from *Urginea maritima* from Egypt: *Phytochemistry*, v. 42, p. 513-22.
- Krenn, L., M. Jelovina, and B. Kopp, 2000, New bufadienolides from *Urginea maritima sensu strictu*: *Fitoterapia*, v. 71, p. 126-9.
- Krenn, L., and B. Kopp, 1998, Bufadienolides from animal and plant sources: *Phytochemistry*, v. 48, p. 1-29.
- Krenn, L., B. Kopp, M. Fernandez, A. Macal, U. Machherndl, A. Steinlechner, E. A. Aboutabl, and W. Kubelka, 1996, Bufadienolidgehalt und -zusammensetzung verschiedener Arten des *Urginea maritima* Aggregates: Änderungen während der Vegetationsperiode: *Scientia Pharmaceutica*.
- Krenn, L., B. Kopp, F. Speta, and W. Kubelka, 1990, Chemotaxonomische Untersuchung der Gattung *Charybdis* Speta (Urgineoideae, Hyacinthaceae), Universität Wien, Wien.

- L., F. R., and V. K. P. C., 1980, J. Am. Chem. Soc.
- Lemmer, B., and K. Brune, 2007, Pharmakotherapie: Klinische Pharmakologie: Stuttgart, Germany, Springer Medizin Verlag.
- Leon, S., H. Adam, P. Halina, Z. Leszek, and C. Eugeniusz, 1973, Effect of substrates and products of steroid bioconversion on microorganism metabolism: Acta Microbiologica Polonica.
- Liu, D., 2011, Molecular Detection of Human Fungal Pathogenes: United States of America, Taylor & Francis Group.
- Lösche, K., 2000, Enzyme in der Lebensmitteltechnologie: Hamburg, Deutschland, B. Behr's Verlag Gmbh & Co.
- M., C., Benasson, J. R. Hanson, and A. C. Hunter, 1998, The Hydroxylation of Δ^5 -Androstenes by *Cephalosporium aphidicola*: Elsevier Science.
- Machida, M., and K. Gomi, 2010, Aspergillus: Molecular biology and Genomics: Norfolk, UK, Caister Academic Press.
- Matissek, R., G. Steiner, and M. Fischer, 2006, Lebensmittelanalytik: Germany, Springer Dirdrecht Heidelberg London New York.
- Nakajima, S., 2003, [The origin of cephalosporins]: Yakushigaku Zasshi, v. 37, p. 119-27.
- Noe, C., 2007, Pharmazeutische Chemie II
- P.K., P., and C. S., 1994, Tetrahedron.
- Pardo, L. A., D. Gómez-Varela, F. Major, K. Sansuk, R. Leurs, B. R. Downie, L. F. Tietze, and W. Stühmer, 2012, Approaches targeting K(V)10.1 open a novel window for cancer diagnosis and therapy: Curr Med Chem, v. 19, p. 675-82.

- Peter, L., K. Uli, and K. Alfons, 2008, Organische Chemie: Chemie-Basiswissen II: Leipzig, Deutschland, Springer.
- Rokas, A., and B. G., 2013, Aspergillus, CrossMark, New York, Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara.
- Silbernagl, S., and F. Lang, 2009, Taschenatlas Pathophysiologie: Stuttgart, Germany, Georg Thieme Verlag KG.
- T., B., G. C., F. P. M., J. E. R. H., and M. G. Denis, 1980, Microbiological hydroxylation Part 23. Hydroxylations of fluoro-5 α -androstanones by the fungus *Calonectria decora*, *Rhizopus nigricans* and *Aspergillus ochraceus*: Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1.
- Teresa, K., M. Natalia, S. Alina, P. Anna, and B. Agata, 2011, Hydroxylation of DHEA, androstenediol and epiandrosterone by *Mortierella isabellina* AM212: Evidence indicating that both constitutive and inducible hydroxylases catalyze 7 α - as well as 7 β -hydroxylations of 5-ene substrates.: Organic & Biomolecular Chemistry, v. 9, p. 5414-5422.
- Teuscher, E., M. F. Melzig, and U. Lindequist, 2004, Biogene Arzneimittel: Ein Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie: Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Vitale, R. G., G. S. de Hoog, P. Schwarz, E. Dannaoui, S. Deng, M. Machouart, K. Voigt, W. W. van de Sande, S. Dolatabadi, J. F. Meis, and G. Walther, 2012, Antifungal susceptibility and phylogeny of opportunistic members of the order mucorales: J Clin Microbiol, v. 50, p. 66-75.
- Wang, Y. L., H. Wang, Y. X. Lu, X. C. Cheng, L. L. Han, S. J. Yuan, D. X. Yang, Q. L. Zhang, and C. T. Wu, 2009, Microbial transformation of epothilone A by *Aspergillus niger* AS 3.739: J Asian Nat Prod Res, v. 11, p. 357-64.

Wuts, P. G. M., Greene, and T. W., 2007, *Greene's protective groups in organic synthesis*: New York, Wiley-Interscience.

Y.-J., Z., and L. T.-P., 2008, *Org. Lett.*

Yildirim, K., 2010, *Microbial Hydroxylation of some Steroids by Aspergillus wentii MRC 200316: Collect. Czech. Chem. Commun.*, v. 75.

Curriculum vitae

Wien, am 20.Juni 2013

Persönliche Daten:

Name: ALBABA Fares
Geburtsdatum: 24.August 1988
Geburtsort: Wien
Staatsbürgerschaft: Österreich
E-Mail: fares@albaba.at
Eltern: Dr. Mohamad Nizar Albaba
Ing. Fatineh Albaba

Schulische Ausbildung:

1994 – 1998 Volksschule Vorgartenstrasse 210
1998 – 2006 Bundesrealgymnasium Wohlmutstrasse 3 1020 Wien
06/2006 Matura

Akademische Ausbildung:

seit 2006 Studium der Pharmazie an der Universität Wien
WS 2008 1. Diplomprüfung
SS 2012 2. Diplomprüfung

Beruflicher Werdegang:

2008 – 2013 Teilzeitbeschäftigung in der Allerheiligen Apotheke Herbert Baldia KG