Heinrich Heine Universität Düsseldorf

JÜLICH Forschungszentrum

Indolderivate in der Synthese von naturstoffinspirierten Wirkstoffen

Marcel Schatton



Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften
IBOC – Bioorganische Chemie

Indolderivate in der Synthese von naturstoffinspirierten Wirkstoffen

Marcel Schatton

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität im Forschungszentrum Jülich

Band 55

ISSN 3054-2197

ISBN 978-3-95806-931-2

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität im Forschungszentrum Jülich

Band 55

Herausgegeben von Jörg Pietruszka

Heinrich Heine
Universität
Düsseldorf

Indolderivate in der Synthese von naturstoffinspirierten Wirkstoffen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marcel Schatton
aus Wickede (Ruhr)

Düsseldorf, Februar 2026

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:	Prof. Dr. Jörg Pietruszka
Korreferent:	Prof. Dr. Thomas J.J. Müller
Tag der mdl. Prüfung:	05.02.2026
Herausgeber:	Prof. Jörg Pietruszka
Umschlaggestaltung:	Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH
Titelbild:	Das Titelbild dieser Dissertation wurde unter Verwendung von Künstlicher Intelligenz erstellt. Die initiale Bildgenerierung erfolgte mithilfe von ChatGPT (OpenAI, Modell GPT-5). Anschließend wurde das Bild unter Einsatz KI-gestützter Funktionen in Photoshop (Adobe Inc., Photoshop on the Web) nachbearbeitet.
Druck:	Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH
Copyright:	Forschungszentrum Jülich 2026

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
im Forschungszentrum Jülich, Band 55

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2026)

ISSN 3054-2197
ISBN 978-3-95806-930-5 (Print)
ISBN 978-3-95806-931-2 (E-Book)

Vollständig frei verfügbar über das Publikationsportal des Forschungszentrums Jülich (JuSER)
unter www.fz-juelich.de/zb/openaccess.



This is an Open Access publication distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Teile dieser Arbeit wurde schon in den folgenden Forschungsartikeln veröffentlicht und auf den folgenden Konferenzen präsentiert. Durch Unterstreichung sind die entsprechenden Erstautoren hervorgehoben. Ebenfalls wurden einige Ergebnisse schon in der nachfolgend angegebenen Abschlussarbeit gezeigt, die vom Autor betreut wurde.

Bereits veröffentlichte Inhalte sowie der Einfluss Dritter auf die hier dargestellten Ergebnisse sind zu Beginn des jeweiligen Kapitels in dieser Dissertation kenntlich gemacht.

Publikationen:

P. Schneider, B. Henßen, B. Paschold, B. P. Chapple, M. Schatton, F. P. Seebeck, T. Classen, J. Pietruszka, *Angew. Chem.* **2021**, 133 (43), 23600-23606;' Biokatalytische C3-Indol-Methylierung – ein nützliches Werkzeug für die naturstoffinspirierte stereoselektive Synthese von Pyrroloindolen'; (Angew. Chem. 2021, 133, 23600 – 23606).

M. Schatton, M. Haase, J. Tenhaef, C. Gronkowsky, S. Noack, J. Pietruszka, *Chem. Eur. J.* **2025**, e202500740; 'Chemoenzymatic Total Synthesis of Lansai B'.

Konferenzen:

M. Schatton, B. Chapple, M. Haase, D. Amariei, P. Schneider, *CLIB International Conference* **2022** (Düsseldorf, Deutschland): 'Enzymkatalysierte Methylierung; Pitch-Talk innerhalb der Global Biobased Businessplan Competition (G-BiB) (ausgezeichnet mit dem zweiten Platz).

M. Schatton, A. Loeschcke, R. Weihmann, A. Reiter, K.-E. Jaeger, M. Oldiges, J. Pietruszka, *9. BioSC Forum* **2023** (Jülich, Deutschland): 'Towards violaceines – a mutasynthesis platform for tryptophan-derived alkaloids'; Poster und Vortrag.

M. Schatton, M. Haase, B. P. Chapple, D. Amariei, P. Schneider, J. Pietruszka, *22nd European Symposium on Organic Chemistry* **2023** (Ghent, Belgien): 'Functionalization of Pyrroloindoles for Application in Methyltransferase Reactions'; Poster.

M. Schatton, M. Haase, C. Gronkowsky, L. Meerkatz, J. Pietruszka, *Florida Heterocyclic and Synthetic Conference* **2024** (Gainesville, Florida, USA): 'Studies towards the Total Synthesis of Lansai B'; Poster.

M. Haase, B. David, M. Schatton, J. Tenheaf, O. Weiergräber, H. Gohlke, J. Pietruszka, *Nord Bio II: Nordic midsummer symposium* **2024** (Stockholm, Schweden): 'Investigations of the methyltransferase SgMT as a tool for the chemoenzymatic total synthesis of Lansai B'; Poster.

M. Haase, B. David, M. Schatton, O. Weiergräber, H. Gohlke, J. Pietruszka, *DECHEMA FORUM* **2024** (Friedrichshafen, Deutschland): ‚Application of *C3*-methyl transferases for natural product synthesis'; Poster und Vortrag.

M. Schatton, M. Haase, C. Gronkowsky, L. Meerkatz, J. Pietruszka, *23. Lecture Conference Orchem* **2024** (Regensburg, Deutschland), 'Chemoenzymatic Total Synthesis of Lansai B'; Poster (ausgezeichnet mit dem Thieme Posterpreis).

Abschlussarbeiten:

T. Bartz (Fachhochschule Aachen), **2023**: „Untersuchungen zur Synthese von Physostigminderivaten mittels Methyltransferase PsmD", Bachelorthesis.

Es kommt nicht darauf an wie viel Zeit man hat,
sondern wie man sie nutzt.

- Ekko aus League of Legends -

INHALTSVERZEICHNIS

I. VORWORT – BURGEN AUS ROTER ASCHE **VII**

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **X**

III. ZUSAMMENFASSUNG **XIII**

IV. ABSTRACT **XV**

1. EINLEITUNG **1**

1.1. Die Entdeckung von Naturstoffen und dessen Nutzen 1

1.2. Unterteilung der sekundären Naturstoffe 3

1.3. Indolhaltige Alkaloide 5

1.4. Allgemeine Zielsetzung 8

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN **11**

2.1. Indol **11**

2.2. Strategien zur Funktionalisierung von Indolen **12**

2.2.1. Iridium-katalysierte CH-Aktivierung 12

2.2.2. Kreuzkupplungen 14

2.2.3. Prenylierung mittels Suzuki-Kreuzkupplungen 15

2.3. Tryptophan-Biosynthese **16**

2.3.1. Optimierung der Tryptophan-Synthase 17

3. DEOXYVIOLACEIN **21**

3.1. Kenntnisstand **21**

3.1.1. Entdeckung und Eigenschaften 21

3.1.2. Biosynthese 23

3.1.3. Totalsynthese 25

3.1.4. Produktion von Vioacein-Analoga 27

3.2. Spezielle Zielsetzung **32**

3.3. Ergebnisse und Diskussion **34**

3.3.1. Totalsynthese von Referenzprodukten 34

3.3.2. Metall-katalysierte Synthese von Tryptophan-Analoga 38

3.3.3. Enzymatische Synthese von Tryptophan-Analoga 42
3.3.4. Konstruktion von *P. putida* Stämmen zur Mutasynthese 44
3.3.4.1. Integration des vio-Gencluster mithilfe der yTREX-Toolbox 44
3.3.4.2. Deletion des *TrpDC* Operon 46
3.3.4.3. Austausch von *VioA* durch *RebO* 47
3.3.4.4. Austausch von *vioAB* durch *rebOD* mithilfe von Meganuklase I-SceI 48
3.3.5. Mutasynthese von dVio-Derivaten 49
3.3.5.1. Mutasynthese in LB-Medium 49
3.3.5.2. Mutasynthese in Minimal-Medium (MSM) 52
3.4. Zusammenfassung und Ausblick 57
4. PHYSOSTIGMIN 61
4.1. Kenntnisstand 61
4.1.1. Entdeckung und physiologische Eigenschaften 61
4.1.2. Totalsynthesen 64
4.1.3. Biosynthese 67
4.1.4. Physostigmin-Analoga mithilfe von Methyltransferase PsmD 68
4.2. Spezielle Zielsetzung 74
4.3. Ergebnisse und Diskussion 75
4.3.1. Synthese von derivatisierten Indolcarbamaten 75
4.3.1.1. Halogenierte Indolcarbamate 75
4.3.1.2. Hydroxy-Indolcarbamat 77
4.3.1.3. Methoxy-Indolcarbamat 81
4.3.2. Umsetzung der Indolcarbamate zum Hexahydropyrroloindol 82
4.3.2.1. Expression der Methyltransferase *PsmD_Sg* 82
4.3.2.2. Bestimmung der PsmD-Aktivität bei Indolcarbamat-Derivaten 83
4.3.2.3. Präparative enzymatische Zyklisierung mithilfe von PsmD 86
4.3.2.4. Chemische Zyklisierung über den biomimetischen Ansatz 89
4.3.4. Biologische Aktivität der neuen Hexahydropyrroloindolcarbamate 91
4.4. Zusammenfassung und Ausblick 98
5. LANSAI-B 101
5.1. Kenntnisstand 101
5.1.1. Entdeckung und Eigenschaften 101
5.1.2. Totalsynthesen 102

5.1.3. Biosynthese 108
5.2. Spezielle Zielsetzung 114
5.3. Ergebnisse und Diskussion 116
5.3.1. Retrosynthetische Herangehensweise 116
5.3.2. Untersuchung des Substratspektrums der *C3*-Methyltransferase 118
5.3.2.1. Synthese der Diketopiperazine-Substrate 118
5.3.2.2. Bestimmung der SgMT-Aktivität bei funktionalisierten DKPs 122
5.3.3. Anwendung der Methyltransferase in der Totalsynthese 124
5.3.3.1. Enantiomerenreine Synthese zum Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol 124
5.3.3.2. *Screening* von Bedingungen zur *N*-Methylierung 126
5.3.3.3. Umsetzung des bromierten Hexahydropyrrol zu Lansai-B 128
5.3.4. Synthese von Lansai-B-Derivaten 131
5.3.4.1. Synthese von einfach- und doppelt halogenierten Diketopiperazinen 131
5.3.4.2. Bestimmung der SgMT-Aktivität bei weiteren halogenierten DKP 135
5.3.4.3. Präparative Methylierung und Prenylierung von DKP-Derivaten 138
5.3.5. Aktivität der hergestellen DKPs gegen verschiedene Zelllinien 140
5.4. Zusammenfassung und Ausblick 146
6. ABSCHLUSS 151
7. EXPERIMENTELLER TEIL 157
7.1. Allgemeines 157
7.2. Mikrobiologische und proteinbiochemische Methoden 160
7.2.1. Vorbereitete Medien und Stammlösungen 160
7.2.2. Herstellung chemisch kompetenter Zellen 162
7.2.3. Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Zellen 163
7.2.4. Heterologe Expression von Enzymen 163
7.2.5. Reinigung von PsmD zur Nutzung im MTase-Glo-Assay 164
7.2.6. Vorbereitung von PsmD für präparative Reaktionen 165
7.2.7. Reinigung von TrpB zur Nutzung in präparativen Reaktionen 165
7.2.8. Immobilisation von SgMT für präparative Reakionen 166
7.2.9. Protein-Nachweis mittels SDS-PAGE 167
7.2.10. Glo-Assay zur Bestimmung der Methyltransferase-Aktivität 168
7.2.11. Ellmans-Assay zur Bestimmung der IC_{50} 169

7.2.12. dVio Mutasynthese in LB-Medium 171
7.2.13. dVio Mutasynthese in MSM 171
7.2.14. Protein- und Gensequenzen 173
7.3. Chemische Methoden 176
7.3.1. Synthese von Tryptophan-Analoga 176
7.3.1.1. Anfügen der *N*-Schutzgruppe 176
7.3.1.2. 7-Borylierung von geschützten Tryptophanen 178
7.3.1.3. 7-Funktionalisierung von geschützten Tryptophanen 181
7.3.1.4. Entfernung der *N*- und *O*-Schutzgruppe der Tryptophane 187
7.3.1.5. Enzymatische Tryptophan-Synthese ausgehend von Indolen 194
7.3.1.6. CH-Aktivierung und Funktionalisierung von Indol 197
7.3.2. Synthesen des Deoxyviolacein-Projekts 201
7.3.2.1. Elektrophile Addition 201
7.3.2.2. Boc-Schützungen der Indolpyrrolidinone 203
7.3.2.3. Boc-Schützung der Isatine 205
7.3.2.4. Aldol-Kondensationen zum dVio 207
7.3.3. Synthesen des Physostigmin-Projekts 213
7.3.3.1. Nitril-Reduktion zum Benzyl-geschützten Indolamid 213
7.3.3.2. 7-CH-Aktivierung mittels Ir-katalysierter Borylierung 214
7.3.3.3. Funktionalisierung der Indolamide 216
7.3.3.4. Entschützungen zum 5-Phenol 222
7.3.3.5. Carbamoylierungen zum Indolcarbamat 225
7.3.3.6. *C3*-Methylierung und Pyrroloindolformation 228
7.3.3.7. 7-Prenylierung über Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung 232
7.3.4. Synthesen des Lansai-B-Projekts 234
7.3.4.1. Synthese von Diketopiperazin-Substraten 234
7.3.4.2. C3-Methylierung und Pyrroloindolformation 251
7.3.4.3. Prenylierung über Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung 257
7.3.4.4. *N*-Methylierung 266
8. ANHANG 271
8.1. Quellenangaben 271
8.2. Zusätzliche Abbildungen und Tabellen 289
8.2.1. Ellmans-Assay 289
8.2.2. Vergleich der physikalischen Parameter verschiedener DKP 291

8.2.3. Zytotoxizitäts Assay mittels PrestoBlue 291
8.3. NMR-Spektren 293
8.4. Molekülverzeichnis 413
9. ERKLÄRUNG 419
10. DANKSAGUNG 421

I. VORWORT – BURGEN AUS ROTER ASCHE

Schemenhaft kann ich mich noch an mein erstes Fußballspiel erinnern. Es war ein heißer Sommertag, Matchday der Bambinis. Zwei Gruppen sechsjähriger Jungs heizen einem Ball hinterher. Die knielangen Trikots sind so groß, dass man nur bei wenigen, vereinzelten Kindern die Anwesenheit einer Hose darunter erahnen kann. Keine Hooligans, sondern stolze Eltern die am Rande undeutliche und unverbindliche Handlungsempfehlungen vorschlagen. Unter lautem Gebrüll werden die Kids wie Hühner von rechts nach links über den Platz gejagt. Der Ball fliegt wendig und unvorhersehbar hin und her, man könnte meinen den Ball zu fangen würde 50 Punkte für Gryffindor einbringen. Während bei einem Spielstand von 13 zu 5 das Spiel noch lange nicht entschieden ist, sitzt ein Junge mitten auf dem Platz und kratzt die rote Asche zu kleinen Haufen zusammen. Es war mir einfach zu warm, ich hatte Durst und meine Mutter hatte nichts zu Trinken für mich dabei. Vielleicht hatte ich aber auch selbst meine Trinkflasche vergessen. Jedenfalls habe ich mich daher anderweitig beschäftigt. Mittlerweile baue ich während eines Fußballspiels zwar keine Burgen aus roter Asche mehr, allerdings finden zugegebenermaßen Fußballspiele heutzutage auch ausschließlich auf Kunstrasen statt…

Diese Geschichte wurde mir als Kind und Jugendlicher noch oft nachgesagt. Nicht nur von meiner, sondern auch von den Müttern meiner Freunde. Und im weiteren Laufe meines Lebens ist mir aufgefallen: Ich trage das Kind noch immer in mir. Ich habe noch immer keinen Bock, Dingen nachzulaufen, die mir keinen Spaß machen oder für mich sinnlos sind. Ich will noch immer meinen eigenen Weg gehen und möchte nicht diktiert bekommen, welche Richtung ich einschlagen sollte.

Es ist ein schöner Gedanke lediglich die Dinge zu tun, hinter denen man vollkommen steht. Man empfindet Freude, man ist mit Leidenschaft und Begeisterung, man fühlt sich richtig. Doch leider ist es auch nicht wirklich realistisch, denn unweigerlich wird man immer an einen Punkt kommen, wo man auf etwas weder Lust hat noch einen Sinn darin sieht. Es ist die eigene Disziplin, die einen weitermachen lässt, obwohl es wehtut, obwohl es anstrengend ist, obwohl es sinnlos erscheint. Ich würde lügen, wenn ich behaupten würde, ich hätte nie an meinem Weg in der Naturwissenschaft gezweifelt. Den Spruch „Jetzt zieh's durch!" habe ich bestimmt schon im dritten Bachelorsemester von meiner Mutter zu hören bekommen. Ich denke man kann sehr leicht verstehen, dass es für mich genauso hilfreich war, wie wenn man einem depressiven Menschen sagt „Ach das wird schon wieder". Klar, sie meinte es nur gut und wollte mich motivieren, aber auf so einen äußeren Reiz spreche ich nicht an. Letztendlich ist Zweifeln normal, denn dadurch wird reflektiert, was man da eigentlich gerade macht, und nur so kommt man zu dem Ergebnis, wie es weitergehen soll. Wenn man jedoch dauerhaft in diesem Zustand des Hinterfragens verbleibt, dann ist das ziemlich anstrengend. Vielleicht fielen mir gerade deswegen die ersten zwei Jahre meiner Promotion so schwer. Nicht nur, dass ich mit meinem eigenen Kopf beschäftigt war, sondern, dass die Forschung selbst nichts anderes als Zweifeln und Hinterfragen ist. Zu oft klappen die trivialsten Dinge nicht, zu oft macht man Fehler und verliert womöglich seinen Fortschritt, zu oft geht man am Ende eines Tages nach Hause und denkt sich: „Wenn ich heute nicht gearbeitet hätte, wäre ich jetzt weiter". Zudem erscheint der Berg an ungelösten Aufgaben und unbeantworteten Fragen endlos. Man fühlt sich davon

erschlagen und fragt sich, wie man das alles bewältigen soll. Zumindest habe ich mich so gefühlt. Und ich kann bei Weitem nicht behaupten, dass ich zu jedem Zeitpunkt den Sinn darin gesehen habe, oder dass ich Lust hatte, zum 6ten Mal das gleiche Molekül aufzureinigen. Gewiss hätte ich an so manchem Punkt lieber Burgen aus roter Asche gebaut.

Doch was heißt das, wenn ich jetzt offensichtlich hier sitze, und diese Arbeit schreibe? Habe ich das Kind in mir aufgegeben, und jage ich nun doch wie alle anderen dem sinnlosen Ball nach? Habe ich so viel Disziplin, dass ich trotz meiner Differenzen all dies hinter mich bringen konnte? Oder stand ich vielleicht doch die ganze Zeit hinter meinen Entscheidungen und bin damit auf dem genau richtigen Weg?

Sowohl das Studium selbst als auch die Promotion haben mich geformt. Ich habe insbesondere in den letzten vier Jahren einiges gelernt, nicht nur Wissenschaftliches, sondern auch über mich persönlich. Denn Promovieren bedeutet natürlich, dass man neue wissenschaftliche Erkenntnisse liefert, allerdings gibt es noch viele weitere Facetten. Unterrichten von Studierenden und Auszubildenden, Managen von Projekten, Präsentieren von Ergebnissen, Kommunizieren mit Projektpartnern, Recherchieren von Literatur, Reparieren von Geräten, Bewältigen von Konflikten und obendrein ist man bei allem auf sich allein gestellt! Man lernt auf diese Weise eine Menge an Soft Skills und schärft seinen Charakter, was vielen eventuell nicht bewusst ist und deswegen vielleicht auch zu kurz kommt. Während diese Arbeit mit all den wissenschaftlichen Ergebnissen gewiss einen wesentlichen Teil meiner Promotion enthält, so ist meine persönliche Entwicklung verständlicherweise darin nicht enthalten.

Doch die Erkenntnis, dass die Promotion mich auch menschlich wachsen lässt, hat mir einen weiteren Sinn gegeben und war mein Ansporn in jeder noch so schwierigen Phase. Denn egal wie sehr man keinen Bock hat oder aus wissenschaftlicher Sicht auf der Stelle tritt, so ist die Arbeit niemals sinnlos, wenn man dabei weiter an sich selbst arbeiten kann. Denn gerade wenn einem Steine im Weg liegen, kann man umso mehr an sich selbst wachsen. Es sind schließlich die Ecken und Kanten, die uns eine einzigartige Form geben.

Um damit noch ein letztes Mal auf die Metapher zurückzukommen: Es spielt keine Rolle, ob man dem Ball nachjagt oder in der Asche Burgen baut. Für einen Sportler ist das Eine gewiss sinnlos, einem Künstler wird das Andere jedoch keine Freude bereiten. Die Frage, was davon gerade das Richtige ist, muss letztlich jeder für sich selbst beantworten. Jedoch finde ich den Gedanken schön, dass es kein Schwarz und Weiß gibt, sondern lediglich Grau.

I'm not just some sad dude
You can see my life, how I grew, I want serenity

- aus ‚Tequila Shots' von Kid Cudi -

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACh	Acetylcholin
ATCh	Acetylthiocholin
AChE	Acetylcholinesterase
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
APS	Ammoniumpersulfat
BCh	Butyrylcholin
BTCh	Butyrylthiocholin
BChE	Butyrylcholinesterase
BINOL	1,1′-Bi-2-naphthol
Boc	*tert*-Butoxycarbonyl
Eoc	Ethyloxycarbonyl
BOP-Cl	Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)-phosphinsäurechlorid
cW_SW_S-DKP	zyklisiertes Tryptophan-Tryptophan-Diketopiperazin
cW_SH_S-DKP	zyklisiertes Tryptophan-Hexahydropyrrol-Diketopiperazin
cH_SH_S-DKP	zyklisiertes Hexahydropyrrol-Hexahydropyrrol-Diketopiperazin

→ anhand der Indizes wird die Konfiguration (*S* oder *R*) des C_α-Stereozentrums angegeben

d	Tage
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan
DC	Dünnschicht-chromatographie
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
DIBAl-H	Di-*iso*-butylaluminiumhydrid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DKP	Diketopiperazin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMBA	1,3-Dimethylbarbitursäure
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPA	Diphenylphosphorylazid
dppb	1,4-Bis(diphenylphosphino)-butan
DTNB	5,5′-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
dVio	Deoxyviolacein
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylamino propyl)carbodiimid
EE	Essigsäureethylester
Eoc	Ethyloxycarbonyl
h	Stunden
HATU	2-(7-Aza-1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl uroniumhexafluorophosphat
HB_{pin}	4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan
HG-II	Hoveyda-Grubbs-Katalysator der 2. Generation
HHP	Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol
His / H	Histidin
HOAT	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HPLC	*high performance liquid chromatography*
HRMS	hochaufgelösten Massenspektrometrie
HS1-5	Homologe Sequenz 1-5
5-HT	5-Hydroxytryptamin-Rezeptor
IC_{50}	mittlere, inhibitorische Konzentration
LB-Medium	*lysogeny-broth* Medium
LC-MS	*liquid chromatography-mass spectrometry*
LP-L	*landing pad*-Sequenz links

LP-R	*landing pad*-Sequenz rechts
MDR	*multidrug resistance*
Meerw.	Meerwein-Salz Trimethyloxonium-tetrafluoroborat
min	Minuten
Moc	Methyloxycarbonyl
MOM	Methoxymethyl
MSM	*mineral salt medium*
NAD^+/NADH	Nicotinamidadenin-dinukleotid
$NADP^+$/NADPH	Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat
NBS	*N*-Bromsuccinimid
NCS	*N*-Chlorsuccinimid
Ni-NTA-IMAC	*Nickel-nitrilotriacetic acid immobilized metal ion affinity chromatography*
NomPhos	Dicyclohexyl(2-(2-methoxynaphthalen-1-yl)phenyl)phosphan
n.d.	nicht determiniert
OD_{700}	Optische Dichte bei 700 nm
O/N	*over night* / Über Nacht (Zeitangabe: ca. 16 – 20 h)
PCR	*polymerase chain reaction*
PE	Petrolether
PG	*protecting group*/ Schutzgruppe
P-gp	P-Glykoprotein
PHOX	Phosphinooxazolin
PPTS	Pyridinium-*para*-toluolsulfonat
Prot. Sp.	*proton sponge* 1,8-Bis(*N,N*-dimethylamino)-naphthalin
Rückfluss	Erhitzen auf Siedetemperatur
ROS	reaktive Sauerstoff Spezies
RP	*reverse phase*
RT	Raumtemperatur
SAH	*S*-Adenosylhomocystein
SAM	*S*-Adenosylmethionin
SDS-PAGE	*sodium dodecylsulfat-polyacrylamid gel electrophoresis*
SgMT	Methyltransferase aus *Streptomyces griseoviridis*
SPhos	Dicyclohexyl(2′,6′-dimethoxy-[1,1′-biphenyl]-2-yl)phosphan
TB-Medium	*terrific-broth* Medium
TBS	*tert*-Butylsilyl
TCh	Thiocholin
TEMED	*N,N,N′,N′*-Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
TMSI	Trimethylsilyliodid
TNB	Thionitrobenzoesäure
TREX	Transfer und Expressions System
Trp / W	Tryptophan
TrpB	optimierte Tryptophan-Synthase β-Untereinheit
TrpS	Tryptophan-Synthase
Tyr / Y	Tyrosin
UHP	*urea-hydrogen peroxid*, Carbamidperoxid
UV-VIS	*ultraviolet-visible spectroscopy*
XPhos	Dicyclohexyl[2′,4′,6′-tris(propan-2-yl)[1,1′-biphenyl]-2-yl]phosphan

III. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund ihrer vielseitigen biologischen Eigenschaften spielen Naturstoffe eine wichtige Rolle bei der Identifizierung neuer Wirkstoffkandidaten. Ein bewährtes Mittel, um die pharmakokinetischen Eigenschaften und biologischen Aktivitäten dieser Verbindungen zu modulieren, ist ihre Derivatisierung. Die Indolalkaloide Deoxyviolacein, Physostigmin und Lansai-B sind bekannte Naturstoffe, wobei nur wenige Derivate dieser Verbindungen beschrieben wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl mutasynthetische, chemoenzymatische als auch Übergangsmetall-katalytische Methoden angewandt, um einen Zugang zu neuen Derivaten dieser drei Naturstoffe zu etablieren.

In Kooperation mit Dr. Anita Loeschcke und Dr. Robin Weihmann wurden neue *Pseudomonas putida* KT2440 Stämme entwickelt, welche in einer Mutasynthese 7-chlorierte Deoxyviolacein-Derivate produzieren sollen. Zu diesem Zweck wurde die Tryptophan-Produktion der Bakterien aufgehoben sowie ein modifizierter Gencluster genomisch integriert, um eine selektive Produktion und eine langfristig stabile Mutasyntheseplattform zu generieren. Begleitend wurden die angestrebten Naturstoff-Derivate totalsynthetisch als Referenz hergestellt sowie die Mutasynthese-Synthons bereitgestellt.

Des Weiteren wurde zusammen mit M. Sc. Diana Amariei die Methyltransferase PsmD aus *Streptomyces albulus* präparativ genutzt, um in einer enantioselektiven Synthese einen biologisch aktiven Vorläufer des Physostigmins herzustellen. Mittels Iridium-katalysierter Borylierung wurden verschiedene funktionelle Gruppen angefügt, wodurch einerseits weitere Erkenntnisse über das Substratspektrum der Methyltransferase gewonnen und andererseits neue physiologisch aktive Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-Verbindungen beschrieben wurden. Durch den eingebrachten 7-Brom-Substituent wurde die Möglichkeit geschaffen, zu einem späten Zeitpunkt in der Synthese zu derivatisieren und dadurch zahlreiche weitere funktionelle Gruppen zugänglich zu machen.

Zusätzlich konnte der synthetische Mehrwert einer Methyltransferase in Zusammenarbeit mit M. Sc. Mona Haase unterstrichen werden, indem eine neue chemoenzymatische Totalsynthese von Lansai-B etabliert wurde. Dazu wurde eine Methyltransferase aus *Streptomyces griseoviridis* präparativ eingesetzt, um das zentrale Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-Strukturmotiv enantioselektiv aufzubauen. Die erforderlichen Diketopiperazin-Substrate wurden enantioselektiv mithilfe einer optimierten Tryptophan-Synthase aus *Pyrococcus furiosus* bereitgestellt und die Synthese des Naturstoffs wurde durch eine Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung sowie eine chemische *N*-Methylierung vervollständigt. Darüber hinaus wurde eine Vielzahl weiterer Derivate des Enzymsubstrats hergestellt und nach Möglichkeit in der fortführenden Synthese zu Lansai-B-Derivaten umgesetzt. Die produzierte Substanzbibliothek wurde von den Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe um Dr. Nicole Teusch hinsichtlich ihrer zytotoxischen Eigenschaften gegenüber mehreren Zelllinien untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass einige der neu etablierten Verbindungen eine höhere Aktivität aufweisen als die natürlichen Verbindungen. Zudem können einige der produzierten Verbindungen in fortführenden Untersuchungen genutzt werden, um weitere Erkenntnisse über die Biosynthese von Lansai-B zu erhalten.

IV. ABSTRACT

The potential of natural products as a source of new drug candidates is attributable to their versatile biological properties. A proven means of modulating the pharmacokinetic properties and biological activities of these compounds is their derivatisation. Notable natural products in this regard include the indole alkaloids deoxyviolacein, physostigmine and lansai-B, though the number of derivatives of these compounds that have been described remains limited. In this study, mutasynthetic, chemoenzymatic, and transition metal-based strategies were applied to gain access to new derivatives of these three natural products.

In collaboration with Dr. Anita Loeschcke and Dr. Robin Weihmann, new *Pseudomonas putida* KT2440 strains were developed to produce 7-chlorinated deoxyviolacein derivatives by mutasynthesis. To this end, the bacteria's tryptophan production was disrupted and a modified gene cluster was genomically integrated to generate a selective production and a long-term stable mutasynthesis platform. Furthermore, the targeted natural product derivatives were produced by total synthesis as a reference, and the mutasynthesis synthons were provided chemically and enzymatically.

In addition, the methyltransferase PsmD from *Streptomyces albulus* was used on a preparative scale in collaboration with M. Sc. Diana Amariei to synthesise a biologically active precursor of physostigmine in an enantioselective manner. The attachment of various functional groups by iridium-catalysed borylation provided further insights into the substrate spectrum of the methyltransferase and resulted in the characterisation of new biologically active hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole compounds. The introduction of a 7-bromo substituent has been shown to enable the possibility of further derivatisation at a late stage in the synthesis, thereby rendering numerous other functional groups accessible.

The synthetic value of a methyltransferase was further emphasised through a collaboration with M. Sc. Mona Haase, establishing a new chemoenzymatic total synthesis of lansai-B. For this purpose, a methyltransferase from *Streptomyces griseoviridis* was employed in a preparative manner to obtain the central hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole structural motif enantioselectively. The required diketopiperazine substrates were provided enantioselectively using an optimised tryptophan-synthase from *Pyrococcus furiosus*, and the synthesis of the natural product was completed by a Suzuki-Miyaura cross-coupling and a chemical *N*-methylation. Furthermore, a substantial number of additional derivatives of the enzyme substrate were produced and, where applicable, utilised in the ensuing synthesis towards lansai-B derivatives. The produced substance library was also screened for its cytotoxic properties against various cell lines by the collaborators of Dr. Nicole Teusch's research group. The study revealed that certain of these novel molecules exhibited higher activities than the naturally occurring compounds. In addition, some of the compounds produced can be used in further studies to gain insights into the biosynthesis of lansai-B.

1. EINLEITUNG

1.1. Die Entdeckung von Naturstoffen und dessen Nutzen

Die heutige Medizin spielt eine zentrale Rolle für das Wohlergehen unserer Gesellschaft. Die Corona-Pandemie hat zuletzt – und damit auch noch im zeitlichen Rahmen dieser Doktorarbeit – gezeigt, wie schnell sich eine neue, unbekannte Krankheit verbreiten und dadurch unzählige Leben sowie das fragile Gefüge unserer Gesellschaft bedrohen kann.[1] Während mit dem heutigen Wissen die Corona-Pandemie durch die schnelle Entwicklung von Impfstoffen bekämpft werden konnte, haben viele andere Pandemien zuvor die damaligen Bevölkerungen deutlich stärker dezimiert. So forderte die von Influenza-Viren ausgelöste Spanische Grippe mit schätzungsweise über 50 Millionen Todesfällen mehr Leben als der fast zeitgleich stattfindende Erste Weltkrieg.[2-4]

Das moderne Verständnis der Medizin und die Entwicklung von Medikamenten hat somit dazu geführt, dass viele Infektionskrankheiten leicht behandelt werden können. Die Anfänge der Medizin lagen dabei in der antiken Heilkunde. Schon im 2. Jahrtausend v. Chr. wurden Rezepturen auf Tonträgern festgehalten, bei denen Samen, Blätter, Wurzeln und Früchte genutzt wurden, um Arzneimittel herzustellen.[5, 6] Die älteste und vermutlich auch prominenteste beschriebene Pflanze in diesem Zusammenhang ist der Schlafmohn (*Papaver somniferum*), welcher schon im 5. Jahrhundert v. Chr. weit verbreitet genutzt wurde. Erste Hinweise auf dessen Nutzung finden sich allerdings schon um 5200 v. Chr.[7-9] Zu diesem Zeitpunkt war jedoch noch längst nicht bekannt, was dem zugrunde lag und warum diese Heilmittel überhaupt zum Erfolg führten.

Diese Frage konnte erst im 18. Jahrhundert beantwortet werden, nachdem Morphin aus Mohnsaft extrahiert werden konnte und damit einhergehend Begriffe wie Alkaloide und Naturstoffe definiert wurden.[10-14] Ein weiterer Vertreter von medizinisch genutzten Naturstoffen mit hoher Bekanntheit ist das im Jahr 1928 gefundene Penicillin (*Penicillium chrysogenum*).[15] Seit der Entdeckung dieses ersten Antibiotikums und vielen weiteren Wirkstoffen danach, konnten Infektionskrankheiten gut therapiert werden und sind seitdem nicht mehr die führende Todesursache.[16]

Auch in der heutigen Zeit beruhen knapp 25 % aller neu zugelassenen Wirkstoffe auf Naturstoffen. Betrachtet man die Anwendungsgebiete dieser Medikamente genauer, so wird deutlich, dass Naturstoffe mehr als 50 % der zugelassenen Wirkstoffe mit antibakteriellen Eigenschaften ausmachen und damit auch heute für die Entwicklung von Antibiotika unerlässlich sind (Abbildung 1).[17]

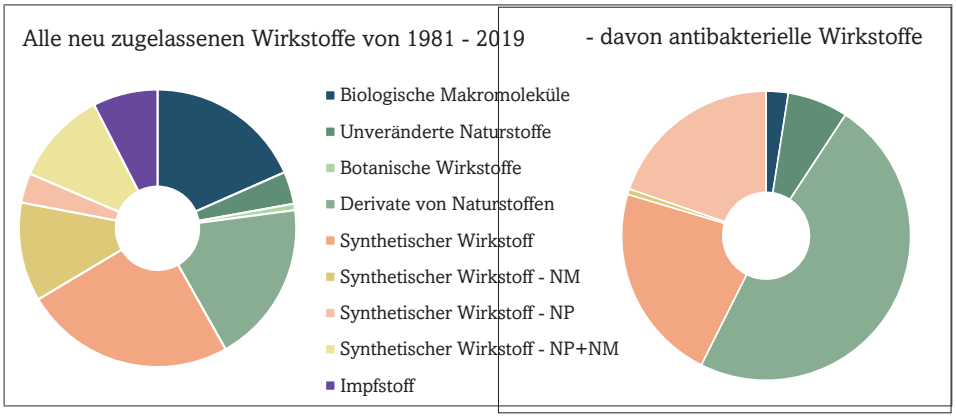


Abbildung 1: Kreisdiagramm von Wirkstoffen in Abhängigkeit von dessen Ursprung entsprechend Cragg und Newman.[17] In grün-markiert sind Wirkstoffe, welche aus unveränderten, botanischen und derivatisierten Naturstoffen bestehen. In gelb/orange sind synthetische Wirkstoffe dargestellt, wobei diese in vier Untergruppen unterteilt sind. Wirkstoffe, welche einen Naturstoff imitieren, indem mit dem natürlichen Substrat (z. B. ATP) um die Substratbindestelle eines Enzyms konkurriert wird, wurden daher als *natural product mimic* (NM) kategorisiert. Wirkstoffe, welche ein Naturstoff-Pharmakophor (NP) besitzen, wurden ebenfalls diesbezüglich eingeordnet.

In den meisten Fällen ist es jedoch nicht der isolierte Naturstoff selbst, der medizinisch genutzt wird, sondern ein Derivat des Naturstoffs. Ob durch gezielte oder ungerichtete Veränderung, ermöglicht die Derivatisierung der Substanzen die Modulation der pharmakokinetischen Eigenschaften eines Moleküls. So ist beispielsweise die natürlich vorkommende Salicylsäure zwar ebenfalls entzündungshemmend, die anschließend daraus entwickelte Acetylsalicylsäure ist jedoch mit der fiebersenkenden und schmerzstillenden Wirkung weitaus aktiver und zeigt zudem weniger Nebenwirkungen.[10, 18-21] Darüber hinaus stellen Naturstoffe oft sogenannte Leitstrukturen (*lead compounds*) dar, die als Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Arzneistoff-Kandidaten dienen.[22, 23]

Während zu Anfang die Definition von Naturstoffen sich lediglich auf organische Moleküle pflanzlicher Natur beschränkte, weitete sich der Begriff schließlich auch auf Moleküle tierischen und mikrobiellen Ursprungs aus.[24] Kossel führte dabei die Unterteilung in primäre und sekundäre Naturstoffe ein.[25]

Primäre Naturstoffe sind zum direkten Lebenserhalt des Organismus notwendig und sind damit Teil des Metabolismus. Da viele Vorgänge im Anabolismus und Katabolismus hochkonserviert sind, weisen die primären Naturstoffe keine sonderlich breite Vielfalt auf. Zwar beinhaltet diese Gruppe zwar die Lipide und Biopolymere (wie z. B. Proteine und Kohlenhydrate sowie jegliche derer Aufbau- und Abbauprodukte), wodurch die Gesamtheit an Verbindungen durchaus groß und auch divers ist, jedoch finden sich sehr viele dieser Verbindungen in nahezu allen Lebewesen wieder.[26] So ist der Stoffwechsel eines komplexen Säugetieres deutlich komplizierter und vernetzter als der eines Bakteriums, jedoch beruht die Biosynthese von Proteinen auf exakt denselben Aminosäuren. Primäre Naturstoffe erfüllen daher meist einen biologischen Nutzen innerhalb der Zelle oder des Organismus, in dem sie produziert wurden, wie z. B. zum Zellwachstum.[27]

Sekundäre Naturstoffe hingegen sind nicht überlebensnotwendig, verschaffen dem Organismus allerdings einen Selektionsvorteil in indirekter Form, beispielsweise als Schutz vor Fressfeinden oder als Pheromon zur Fortpflanzung.[28, 29] Einhergehend mit ihren vielfältigen Funktionen, sind diese Verbindungen oft deutlich komplexer und diverser in ihrer chemischen Struktur. Die Biosynthese ist demnach auch sehr vielfältig und basiert auf Enzymen, die im

Verlauf der evolutionären Entwicklung erst kürzlich entstanden sind. Daher kann ein solcher Naturstoff auch einen Wirkmechanismus bedienen, der für andere Organismen bisher unbekannt ist, und eignet sich somit, um sich gegen einen ökologischen Konkurrenten durchzusetzen. Folglich zeichnen sich zahlreiche Sekundärmetabolite in erster Linie dadurch aus, dass sie einen Effekt in anderen Organismen induzieren.[26] Die Komplexität der Interaktionen von Organismen führt jedoch dazu, dass die biologische Bedeutung vieler Naturstoffe über einen längeren Zeitraum hinweg unbekannt bleibt.

Da viele primäre Naturstoffe auch eine sekundäre Funktion haben können, ist diese Unterteilung mittlerweile jedoch nicht mehr eindeutig, dennoch ist diese zur allgemeinen Kategorisierung der Verbindungen sehr hilfreich.[30]

1.2. Unterteilung der sekundären Naturstoffe

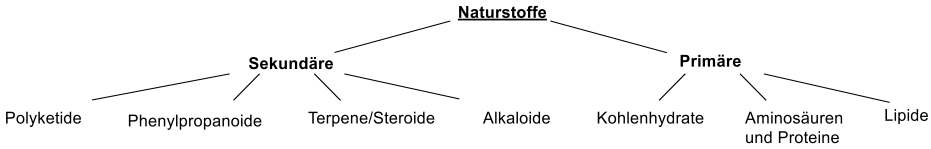


Abbildung 2: Schematische Unterteilung der Naturstoffe in primäre und sekundäre Naturstoffe, sowie dessen Klassifizierung.

Zu den Sekundärmetaboliten gehören die Klassen der Polyketide, der Terpene, der Phenylpropanoide sowie der Alkaloide, wobei die genaue Abgrenzung dieser Klassen voneinander nicht immer eindeutig möglich ist (Abbildung 2). In der Biosynthese werden Terpene aus dem einfachen Grundbaustein Dimethylallylpyrophosphat (**1**) aufgebaut, während die Acetyl-Gruppen der Polyketide dem Acetyl-Coenzym A (**2**) (bzw. dem Malonyl-Coenzym A (**3**)) entsprechen (ähnlich wie in der Fettsäure-Biosynthese) (3).

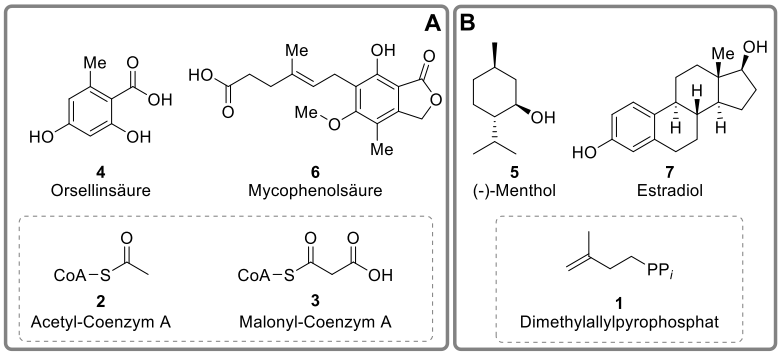


Abbildung 3: **A** – Chemische Struktur der Polyketide Orsellinsäure (**4**), welches ein Intermediat zu vielen weiteren Orsellinsäure-abgeleiteten Meroterpenoiden ist,[31] und Mycophenolsäure (**6**), welches antibakterielle, antimykotische und immunosuppressive Eigenschaften aufweist.[32] Beide Polyketide werden, ähnlich wie in der Fettsäure-Synthese, aus Acetyl- und Malonyl-Coenzym A (**2** und **3**) Bausteinen produziert. **B** – Chemische Struktur des Monoterpens (-)-Menthol (**5**), welches industriell für ätherische Öle verwendet wird,[33] und des Steroids Estradiol (**7**), welches ein natürliches Sexualhormon im Menschen ist und dabei zahlreiche Funktionen in der Entwicklung weiblicher Geschlechtsmerkmale ausführt.[34, 35] Terpene und Steroide gehen biosynthetisch aus Dimethylallylpyrophosphat (**1**) hervor.

Die teils große Anzahl dieser *building blocks* ermöglicht dann den Aufbau komplexer Kohlenstoffgerüste. Auch durch Zyklisierung, wie z. B. bei Orsellinsäure (**4**) oder Menthol (**5**), werden die Verbindungen diversifiziert.[31, 33] Einige Vertreter dieser beiden Molekülklassen weisen eine Reihe biologischer Aktivitäten auf. So zählt Mycophenolsäure (**6**) ebenfalls zu den ersten entdeckten Antibiotika und wirkt zudem auch antimykotisch sowie immunsuppressiv.[32] Estradiol (**7**) hingegen ist eines der wirksamsten, natürlich vorkommenden Steroide und erfüllt zahlreiche physiologische Funktionen, sowohl bei der Bildung weiblicher Geschlechtsmerkmale als auch im weiblichen Zyklus.[34, 35]

Die Gruppe der Phenylpropanoide und Alkaloide werden dagegen aus Aminosäuren aufgebaut (Abbildung 4). Die Phenylpropanoide, zu denen beispielsweise die Zimtsäure (**8**) oder das Umbelliferon (**9**) gehören, leiten sich von den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (**10**) und Tyrosin (**11**) ab.[36, 37] Die Biosynthese der Alkaloide hingegen beruht neben Phenylalanin und Tyrosin auch auf weiteren Aminosäuren wie Ornithin (**12**) oder Tryptophan (**13**). Damit sind beide Gruppen abhängig vom Shikimisäureweg, über den die aromatischen Aminosäuren (Trp, Phe, Tyr) gebildet werden.[38]

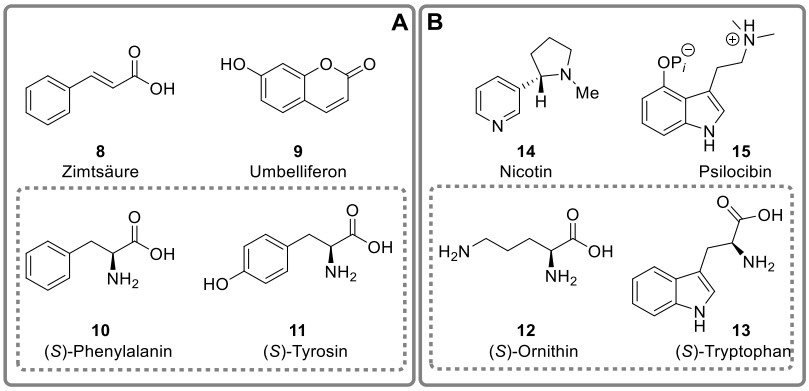


Abbildung 4: **A** – Chemische Struktur der Phenylpropanoide Zimtsäure (**8**) und Umbelliferon (**9**), welche in der Biosynthese auf die Aminosäuren Phenylalanin (**10**) und Tyrosin (**11**) zurückzuführen sind. **B** – Chemische Struktur der Alkaloide Nicotin (**14**) und Psilocibin (**15**), welche in der Biosynthese auf die nichtproteinogene Aminosäure Ornithin (**12**) und Tryptophan (**13**) zurückzuführen sind.[39-41]

Charakteristisch ist für die Alkaloide der eingebrachte Stickstoff, welcher oft in heterozyklische Ringstrukturen integriert ist wie z. B. beim Nicotin (**14**).[42] Außerdem ermöglichen Heteroatome wie Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Je nach Substitutionsmuster können diese sowohl als Akzeptor als auch als Donor agieren. Dies ermöglicht, dass viele Alkaloide unter sauren Bedingungen wasserlöslich sind, während sie unter basischen Bedingungen fettlöslich sind, wodurch diese Verbindungen besonders leicht resorbiert werden können.[43] Die daraus resultierenden Verbindungen sind medizinisch äußerst relevant, da sie zusätzlich ein breites Spektrum verschiedener Wirkungen vorweisen, und werden daher z. B. als Analgetikum, Antiarrhythmikum, Antibiotikum, Antihistaminikum, Cholinergikum oder Vasodilatanz genutzt.[42] Besonders interessant sind auch die Eigenschaften von halluzinogenen Wirkstoffen wie Psilocibin (**15**), welches aus einigen Pilzen (*magic mushrooms*) extrahiert werden kann.[44] Dabei wird erst im Körper durch Hydrolyse des 4-ständigen Phosphats die biologisch aktive Komponente Psilocin freigesetzt, welche neben anderen Effekten eine neuroplastische Wirkung im Hippocampus und Cortex induziert.[45] In Anbetracht ihrer starken Wirkung

werden Psilocibin und andere bekannte Vertreter der Alkaloide wie Kokain und Morphin als Rauschmittel missbraucht und fallen daher unter das Betäubungsmittelgesetz.[46]

1.3. Indolhaltige Alkaloide

Wie schon Psilocibin (siehe Abbildung 4), enthalten viele Alkaloide einen Indolring und leiten sich daher vom natürlich auftretenden L-Tryptophan bzw. (*S*)-Tryptophan ab. Mit etwa 1500 bekannten Vertretern sind die Indolalkaloide damit die größte Gruppe innerhalb der Alkaloide (Abbildung 5).[47]

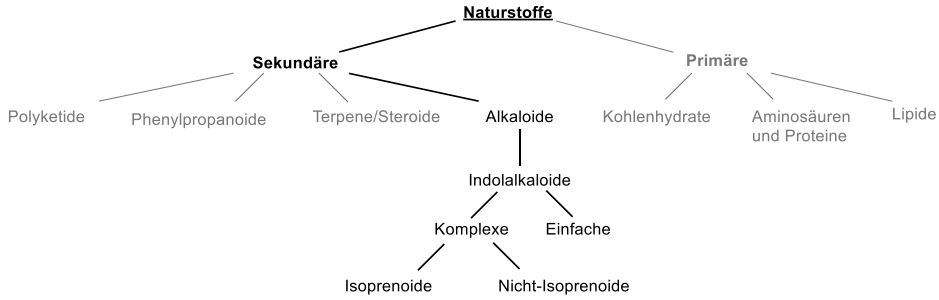


Abbildung 5: Schematische Unterteilung der Naturstoffe sowie deren Klassifizierung. Neben weiteren Gruppen innerhalb der Alkaloide (hier nicht berücksichtigt) bilden die Indolalkaloide die größte Gruppe, welche in weitere Untergruppen aufgeschlüsselt werden kann.

Der biogenetische Vorläufer Tryptophan (**13**) wird biosynthetisch in zahlreichen Fällen zunächst zum Tryptamin (**16**) decarboxyliert, ehe weitere Modifikationen eingebracht werden. Einfache Indolalkaloide wie *N,N*-Dimethyltryptamin (**17**), Gramin (**18**) oder Serotonin (**19**) sind in vielen Pflanzenarten weit verbreitet (Abbildung 6). Letzteres fungiert in Säugetieren als Neurotransmitter im peripheren und zentralen Nervensystem sowie als Gewebshormon im Herz-Kreislauf-System und Magen-Darm-Trakt.[39] Neben Serotonin binden viele weitere Tryptamin-artige Alkaloide aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit ebenfalls an die 5-Hydroxytryptamin-Rezeptoren (5-HT) und bewirken damit starke Effekte im menschlichen Körper. Das Hormon Melatonin (**20**) wirkt hingegen über eine eigene Klasse von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Melatoninrezeptor Typ 1 und Typ 2 – MT1 und MT2) und unterscheidet sich dadurch im Wirkmechanismus vom Serotonin (**19**).

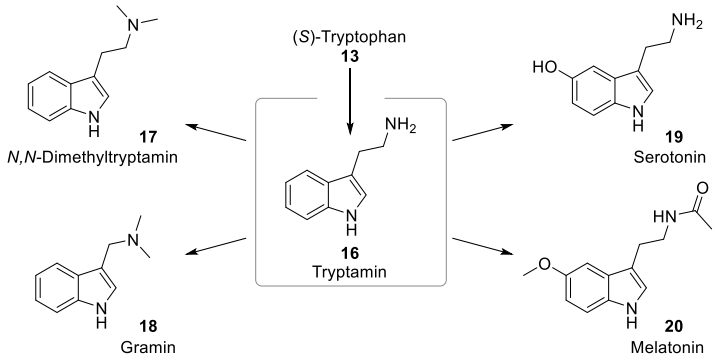


Abbildung 6: Chemische Struktur Tryptamin-artiger Alkaloide wie *N,N*-Dimethyltryptamin (**17**), Gramin (**18**), Serotonin (**19**) und Melatonin (**20**).

Innerhalb der komplexeren Indolalkaloide können die Naturstoffe noch einmal in Nicht-Isoprenoide und Isoprenoide unterschieden werden. Letztere bestehen aus dem Tryptophan/Tryptamin-*building block* und werden, wie auch die Terpene bzw. Steroide, biosynthetisch mit weiteren Dimethylallylresten modifiziert. Oft werden dadurch weitere Ringsysteme mit dem Indolring anelliert.

Die Ergot-Alkaloide bilden eine Untergruppe von hemiterpenoiden Indolen, welche dem Lysergsäureamid (**21**) ähneln und sich durch unterschiedliche Substituenten an den Stickstoffen voneinander kennzeichnen. Der bekannteste Vertreter ist das (+)-Lysergsäurediethylamid, welches aufgrund seiner besonders starken halluzinogenen Wirkung ebenfalls als Rauschmittel missbraucht wurde, jedoch auch lange hinsichtlich einer psychotherapeutischen Nutzung erforscht wurde.[48-50] Unter den monoterpenoiden Indolalkaloiden gibt es weitere Untergruppen, welche sich maßgeblich durch das angehängte Kohlenstoffskelett und die daraus gebildeten zyklisch-verzweigten Reste unterscheiden. Der Ibogain- und Aspidosperma-Typ sind an dieser Stelle beispielsweise gezeigt, jedoch gibt es noch weitere Unterteilungen (Abbildung 7).[47, 51]

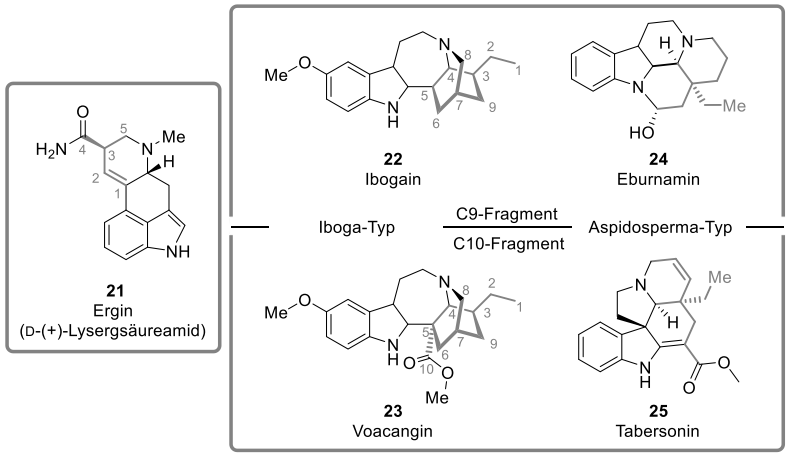


Abbildung 7: Chemische Struktur verschiedener isoprenoider Indolalkaloide. Das Terpengerüst ist grau markiert und nummeriert.

Biosynthetisch gehen diese Verbindungen aus Tryptophan (**13**) und Secologanin hervor, wobei Letzteres ausgehend von Geranylphosphat produziert wird.[47, 52, 53] Trotz ihrer strukturellen Diversität, können sowohl Verbindungen des Iboga-Typs (wie Ibogain (**22**) oder Voacangin (**23**)) als auch des Aspidosperma-Typs (wie Eburnamin (**24**) oder Tabersonin (**25**)) aus demselben biogenetischen Vorläufer erhalten werden. Lediglich die räumliche Orientierung des Geranylrestes während der Cycloaddition determiniert, welches Kohlenstoffgerüst erhalten wird.[54] Es wird darüber hinaus vermutet, dass die *C9*-Varianten der monoterpenen Indolalkaloide durch eine enzymatische Decarboxylierung erst spät in der Biosynthese aus den *C10*-Naturstoffen erhalten werden, wie z. B. vom Voacangin (**23**) zum Ibogain (**22**). Jedoch ist dieser Biosynthese-Pfad bisher noch nicht vollständig geklärt.[55]

Unter den nicht-isoprenoiden Indolalkaloiden finden sich neben weiteren Untergruppen die β-Carboline sowie die Pyrroloindole (Abbildung 8). Die β-Carboline bilden eine Gruppe von natürlich weit verbreiteten Verbindungen, die sowohl in vielen Prokaryoten, Pflanzen, Insekten und auch Säugetieren gefunden werden können. Strukturell sind diese Verbindungen aus

einem trizyklischen Gerüst aufgebaut, bestehend aus dem Indol und einem anellierten Pyridinring. Der Stickstoff des Pyridinrings befindet sich dabei in namensgebender β-Position. Diese Gruppe von Verbindungen unterscheidet sich, wie hier am Harmin (**26**) und Nostocarbolin (**27**) gezeigt, durch unterschiedliche Substituenten am Indol-Stickstoff und in α-Position, wobei auch der Sättigungsgrad des Pyridinrings stark variieren kann.[56] Biosynthetisch gehen die β-Carboline neben Tryptophan/Tryptamin aus Pyruvat hervor. [57]

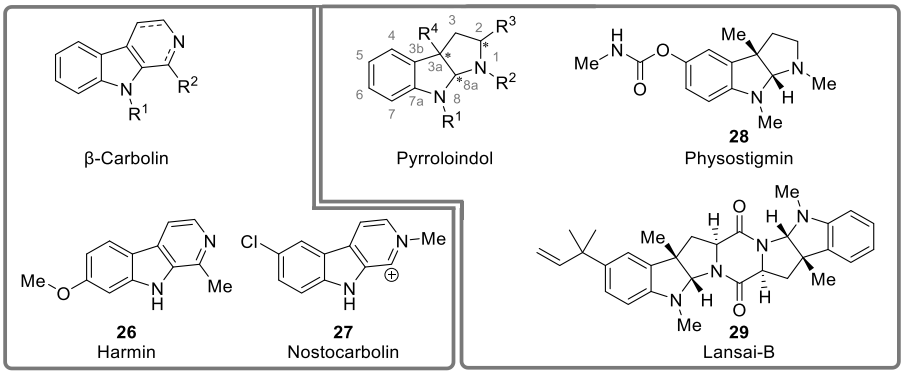


Abbildung 8: Grundstruktur der β-Carboline und Pyrroloindole, sowie die chemische Struktur von Harmin (**26**), Nostocarbolin (**27**), Physostigmin (**28**) und Lansai-B (**29**).

Die Pyrroloindole hingegen sind eine kleinere Gruppe mit nur wenigen bekannten Vertretern. Die Verbindungen enthalten einen am Indol anellierten, meist vollständig gesättigten Pyrrolring, wodurch die Naturstoffe direkt mehrere Stereozentren erhalten. Einige dieser Strukturen, wie z. B. Physostigmin (**28**) und Lansai-B (**29**), werden in ihrer Biosynthese durch *C3*-Methylierung des Indols mit anschließendem nukleophilem Angriff des Ethylamin-Restes in *C2*-Position gebildet.[58, 59] Neben der Methylgruppe decken die Pyrroloindole jedoch ein weites Spektrum hinsichtlich an Substituenten in der 3a-Position ab (Rest 4 in Abbildung 8). Dabei lassen sich sowohl unsubstituierte als auch hydroxylierte, alkylierte, arylierte und dimerisierte Verbindungen finden.

Dimerverbindungen sind zudem Teil einer weiteren, charakteristischen Untergruppe der Indolalkaloide: die Bis-Indole (Abbildung 9). Diese bestehen aus zwei Tryptophan-Einheiten und können entweder direkt oder über einen Linker miteinander verknüpft sein. Die ehemaligen α-Carboxy- und α-Aminofunktionen bilden oft einen neuen Heterozyklus, beispielsweise ein Diketopiperazin (Lansai-B (**29**)), ein Carbazol (Arcyriaflavin-A (**30**)) oder ein Pyrrolidon (Deoxyviolacein (**31**)).

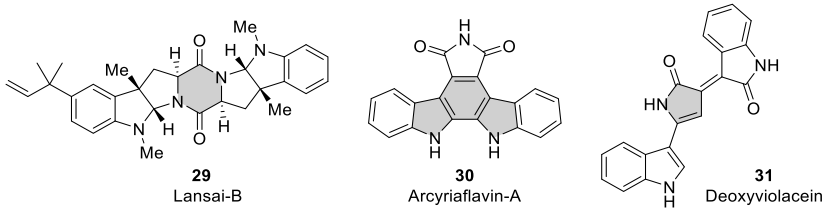


Abbildung 9: Chemische Struktur der verschiedenen Bis-Indolalkaloide Lansai-B (**29**), Arcyriaflavin-A (**30**) und Deoxyviolacein (**31**) mit grau-markiertem Heterozyklus der ehemaligen α-Carboxy- und α-Aminofunktion.[60-62]

1.4. Allgemeine Zielsetzung

Aufgrund ihrer mannigfaltigen Eigenschaften und ihres Nutzen in der Medizin, ist die Erforschung von Naturstoffen unentbehrlich. Die daraus entsprungene Naturstoffchemie ist heutzutage ein großer Bestandteil der organischen Chemie, obwohl diese in vielerlei Hinsicht eine Herausforderung darstellt. Aus der biologischen Perspektive sind Naturstoffe nicht leicht direkt aus den Pflanzen, Bakterien oder Pilzen zu extrahieren, da sie meist nur in geringfügigen Konzentrationen in den entsprechenden Organismen vorliegen. Aufgrund vieler ähnlicher Intermediate, welche ebenfalls extrahiert werden, oder infolge von Löslichkeitsproblemen, die eine chromatographische Reinigung erschweren, stellt die Isolation der Verbindungen oft eine Schwierigkeit dar.[63, 64] Daher werden bei einer klassischen Extraktion oft große Mengen Lösungsmittel benötigt, um nur geringe Mengen eines Naturstoffs zu erhalten. Diese geringe Effizienz wirft auch ethische Fragen auf, die Parallelen zur *feed vs. food*-Debatte erkennen lassen: Angesichts begrenzter landwirtschaftlicher Ressourcen konkurriert die direkte Produktion von Lebensmitteln für den Menschen mit weniger effizienten Prozessen wie der Tierfutterproduktion oder, wie in diesem Fall, der Extraktion von Naturstoffen.[65-67] Demnach stehen mit den ökologischen, ökonomischen und moralischen Maßstäben der heutigen Zeit viele Probleme der *green extraction* gegenüber.[68]

Andererseits ist auch die chemische Totalsynthese solcher Verbindungen angesichts der teils komplexen Molekülstrukturen nicht leicht zu bewerkstelligen.[69] Viele Naturstoffe beinhalten oft nicht nur ein komplexes und zyklisches Kohlenstoffgerüst, sondern auch eine hohe Anzahl an sp^3-hybridisierten Kohlenstoffen und damit viele aufwendig zu synthetisierende Stereozentren.[70] Die dazu notwendigen Reagenzien und stetig komplexeren Katalysatoren sind oft eine Belastung für die Umwelt und erfordern folglich eine sorgfältige und gewissenhafte Abfallwirtschaft. Ebenso liegen in den Naturstoffen oft viele verschiedene funktionelle Gruppen vor, so dass der Einsatz von chemischen Schutzgruppen (*protecting group,* PG) in der Synthese in vielen Fällen unumgänglich ist. Dessen Einführung ist zudem stets mit einer verringerten Atomeffizienz verbunden und widerspricht damit den Ansprüchen der *green chemistry*. Doch vielleicht ist auch genau deswegen, aufgrund der vielen Herausforderungen, die Naturstoffchemie ein so spannendes und nicht mehr wegzudenkendes Feld.[71]

Diese Arbeit soll sich daher auf die Synthese von Naturstoff-Derivaten fokussieren. Die dafür anvisierten Verbindungen sind die Indolalkaloide Physostigmin (**28**), Deoxyviolacein (**31**) und Lansai-B (**29**) (Abbildung 10).

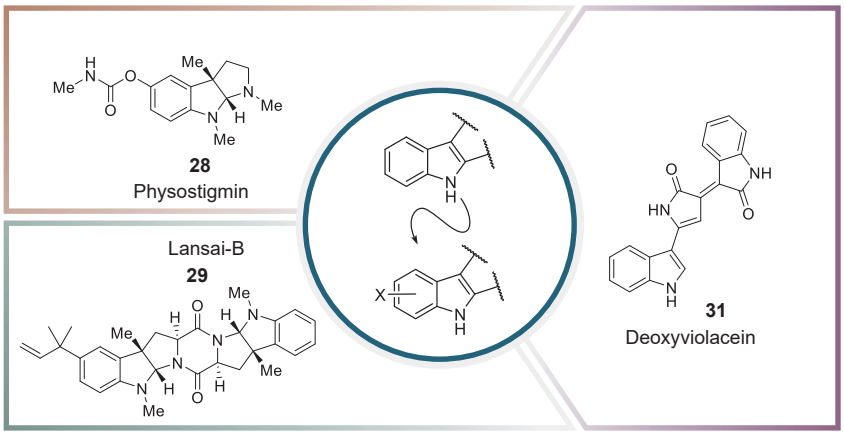


Abbildung 10: Die Derivatisierung der indolhaltigen Naturstoffe Physostimin (**28**), Deoxyviolacein (**31**) und Lansai-B (**29**) als Ziel dieser Arbeit.

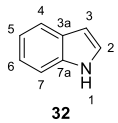
Zwar sind zu diesen Molekülen schon Totalsynthesen bekannt und zum Teil auch die Biosynthesen hinreichend beschrieben, allerdings wurden bisher nur wenige Derivate von diesen Verbindungen hergestellt. Deswegen soll vor allem die Derivatisierung dieser Moleküle im Vordergrund stehen und damit neue Naturstoff-Derivate zugänglich gemacht werden. Dazu wird teilweise auf bekannte Synthesewege zurückgegriffen, falls diese die Möglichkeit bieten auch Molekülanaloga bis zum finalen Produkt umzusetzen, es sollen aber auch neue Syntheserouten und Methoden ergründet werden. Aufgrund der interdisziplinären Stellung der Naturstoffchemie, sollen im Zuge dessen nicht nur rein chemische Methoden implementiert werden, sondern verschiedene Ansätze aus Chemie, Biotechnologie und Biochemie verfolgt werden. Der Vergleich der angewandten Methoden dient zudem der Illustration der jeweiligen Vor- und Nachteile, wobei in dieser Betrachtung die individuellen Eigenschaften des Naturstoffs berücksichtigt werden müssen. Die hergestellten Derivate sollen zusätzlich hinsichtlich ihrer physiologischen Anwendungen untersucht werden.

Aufgrund der verschiedenen Naturstoffe und der unterschiedlichen Herangehensweisen, ist die Arbeit daher strukturell in drei Hauptkapitel unterteilt. Innerhalb von diesen befindet sich nach dem spezifischen Kenntnisstand eine separate Zielsetzung, welche einen Überblick über die nachfolgenden Ergebnisse gibt.

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1. Indol

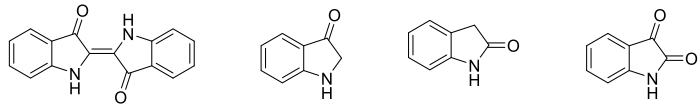
Indol (**32**) ist eine organische Verbindung aus der Klasse der aromatischen Heterozyklen. Die bizyklische Struktur setzt sich aus einem Benzolring und einem anellierten Pyrrolring zusammen, wobei das freie Elektronenpaar des Stickstoffs mit dem π-System des Aromaten konjugiert ist (Abbildung 11).[72] Daraus resultiert einerseits eine planare Struktur, andererseits ist der Stickstoff im Gegensatz zu herkömmlichen Aminen damit nicht basisch und steht nicht zur Protonierung zur Verfügung, da dies mit dem Verlust des aromatischen Charakters einhergehen würde. Unter Verwendung von starken Säuren kann Indol zwar protoniert werden, jedoch nicht am Stickstoff, sondern in *C3*-Position aufgrund der Enamin-artigen Reaktivität. Da der Stickstoff dem Indol eine hohe Elektronendichte verleiht, ist der Pyrrolring deutlich reaktiver als der Benzolring. So weist der *C3*-Kohlenstoff die höchste Reaktivität auf und wird somit sehr schnell in elektrophilen, aromatischen Substitutionen umgesetzt. Außerdem ist die *C2*-Position sowie auch der Indolstickstoff vergleichsweise azide (pKs von 21 in DMSO[73]), wodurch ebenfalls in diesen Positionen leicht Elektrophile angelagert werden können.



32
1*H*-Indol

Abbildung 11: Chemische Struktur von 1*H*- Indol (**32**).

Frühe Bekanntheit erlangte das Strukturmotiv schon im 19. Jahrhundert, da der Indolbaustein Teil vieler Farbstoffe ist, darunter Indigo (**33**), welches aus zwei oxidierten Indoxyleinheiten besteht. Indoxyl (**34**), Oxindol (**35**) und Isatin (**36**) sind oxidierte Indolverbindungen, die aus der Reduktion von Indigo (**33**) erhalten wurden (Abbildung 12).[74] Ausgehend von diesen Verbindungen wurde über die Reduktion mit Zinkstaub Indol erstmalig beschrieben.[75, 76]



33 Indigo | **34** Indoxyl | **35** Oxindol | **36** Isatin

Abbildung 12: Chemische Struktur von Isatin (**36**), Oxindol (**35**), Indoxyl (**34**) und Indigo (**33**).

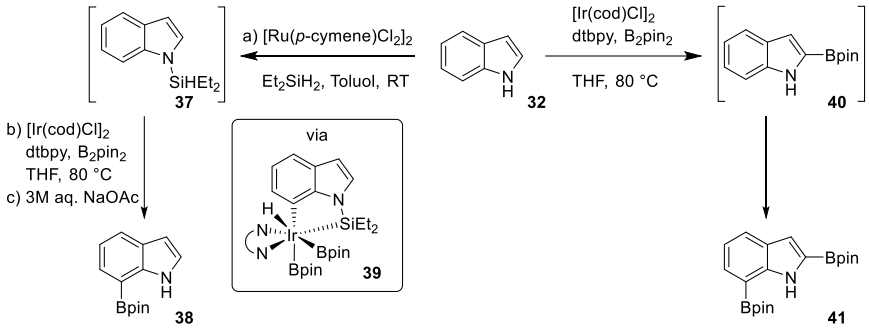
Synthetisch kann Indol (**32**) über die Fischer-Indol-Synthese erhalten werden, welche 1883 von Fischer beschrieben wurde, indem Hydrazine mit Ketonen oder Aldehyden zur Reaktion gebracht werden.[77] Da Indol (**32**) auch in vielen Naturstoffen vertreten ist, hat sich das chemische Interesse an dieser Struktur im 20. Jahrhundert ausgeweitet, sodass Indolverbindungen auch heute noch ein wichtiger Bestandteil der Forschung sind. Dies bestätigt auch die Anzahl der Publikationen mit Bezug zum Indolring, welche im Laufe des 20. Jahrhunderts exponentiell auf mehr als 80 000 entsprechende Einträge anstieg.[78] Die privilegierte Struktur (*privileged structure*) findet somit in vielen Bereichen eine Anwendung, beispielsweise in den Materialwissenschaften und der Pharmazie sowie auch als Duftstoff, Agrochemikalie oder Pigment.[79]

2.2. Strategien zur Funktionalisierung von Indolen

In den vielen indolhaltigen Naturstoffen bildet der Indolring das zentrale Gerüst, wobei oft an mehreren Positionen Alkyl- und/oder Arylreste verknüpft sind. Bedingt durch die hohe Anzahl der C-H-Bindungen, stellt die selektive Synthese solcher Verbindungen eine Herausforderung dar. Mit Ausnahme der *C3*- und *C2*-Position, welche durch die hohe Elektronendichte des Stickstoffs aktiviert sind, weisen die übrigen Positionen des Benzolrings nur geringfügige Unterschiede in ihrer Reaktivität auf und sind somit deutlich schwieriger zu adressieren.[78] Während die *C3*-Position über Friedel-Crafts-artige Reaktionen leicht funktionalisiert werden kann, wurden durch die Entdeckung der Übergangsmetallkatalyse viele weitere Methoden und Reaktionsbedingungen gefunden, welche auch die Funktionalisierung der übrigen Positionen ermöglichen.[80, 81] In vielen Fällen wird dazu dennoch eine dirigierende Gruppe (*directing group*) benötigt, welche die Reaktivität der gewünschten Positionen erhöht und somit die bevorzugte Selektivität gewährleistet. Die Entwicklung von komplexen Katalysatorsystemen oder die sterische Blockierung (z. B. der *C3*-Position) wurden jedoch ebenfalls genutzt, um das Ziel der selektiven Funktionalisierung zu erreichen.[82]

2.2.1. Iridium-katalysierte CH-Aktivierung

So erweist sich auch die Adressierung der 5- bzw. 7-Position des Indolrings als anspruchsvoll, da diese Positionen nicht sonderlich reaktiv sind. Um eine CH-Aktivierung selektiv am Benzolring durchzuführen, können *directing groups* eingeführt werden, wodurch die Indol-Reaktivität moduliert werden kann.

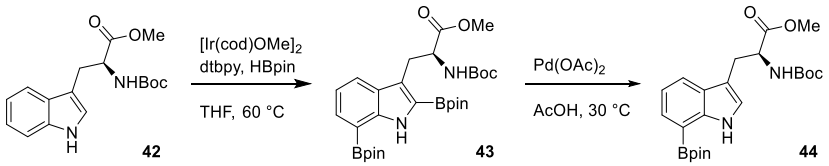


Schema 1: Hydrosilyl-dirigierte Borylierung in 7-Position im Vergleich zu einer ungerichteten Borylierung, welche zunächst in 2-Position und dann in 7-Position erfolgt, nach Hartwig *et al.*[83]

Beispielsweise konnten Hartwig *et al.* zeigen, dass Indole nach erfolgter Hydrosilylierung (Verbindung **37**) selektiv in 7-Position boryliert werden können (Verbindung **38**) (Schema 1). Die dirigierende Wirkung der Silylgruppe wird damit begründet, dass sich der verwendete Iridium-Katalysator zunächst an das Silan anlagert. Die anschließende Borylierung erfolgt in 7-Position, da in diesem Fall der fünfgliedrige Übergangszustand des Metallkomplexes **39** sterisch günstiger ist als ein viergliedriger Metallzyklus über die 2-Position. Auf diese Weise kann somit die Indolreaktivität umgekehrt werden, da bei Zugabe von zwei Äquivalenten Bispinakolboran die Borylierung zunächst in 2-Position (ortho zum Stickstoff – Verbindung **40**)

erfolgt und erst danach auch die 7-Position boryliert wird (pseudo-ortho zum Stickstoff – Verbindung **41**).

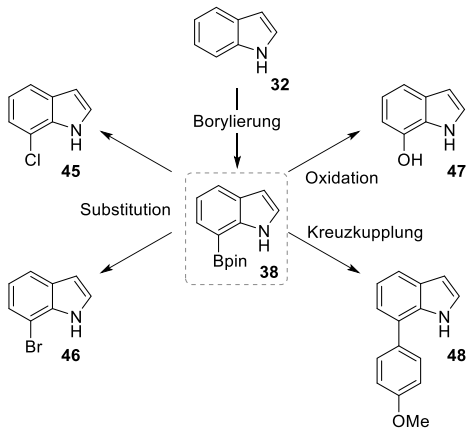
Allerdings scheint die 2-Position nicht nur bei der Borylierung reaktiver zu sein, sondern auch bei der Protodeborylierung unter sauren Bedingungen. Dies konnte von Movassaghi *et al.* genutzt werden, um eine weitere Sequenz zur selektiven Borylierung in 7-Position zu entwickeln (Schema 2). Dabei wurde der Boc-geschützte Tryptophanmethylester **42** zunächst ungerichtet diboryliert (Verbindung **43**), ehe der Pinakolboronsäureester in 2-Position wieder entfernt wurde.[84]



Schema 2: Selektive Borylierung in 7-Position des Indols durch sequenzielle 2,7-Diborylierung mit anschließender Protodeborylierung in 2-Position nach Movassaghi *et al.*[84]

Mithilfe dieser Sequenz konnte unter anderem der 7-borylierte N_{α}-*tert*-Butoxycarbonyl(Boc)-geschützte Tryptophanmethylester (**44**) in einem 2-Gramm-Maßstab mit einer Ausbeute von 73 % über beide Schritte erhalten werden.

Die somit erhaltenen borylierten Verbindungen stellen in der Synthese einen strategisch günstigen Knotenpunkt dar, da diese durch eine Vielzahl an Kreuzkupplungen oder Substitutionen in andere Funktionalitäten umgewandelt werden können und auf diese Weise viele verschiedene funktionelle Gruppen (Verbindung **45**-**48**) zugänglich sind (Schema 3).



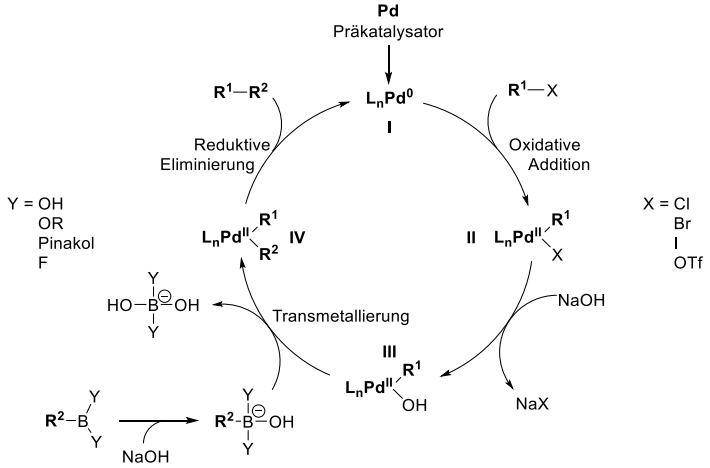
Schema 3: Schematische Darstellung der Möglichkeiten zur Derivatisierung von Indol (**32**) durch Borylierung.[84]

Loach *et al*. konnten zeigen, dass die Borverbindung **38** unter Verwendung von Kupferdichlorid respektive Kupferdibromid in das entsprechende Halogenid (**45** und **46**) umgesetzt werden kann. Weiterhin kann durch Zugabe von Wasserstoffperoxid die Borspezies zur Hydroxygruppe oxidiert werden (Verbindung **47**). Außerdem stellen Borverbindungen wichtige Ausgangsstoffe für die Suzuki-Kreuzkupplung dar (Verbindung **48**), welche im Folgenden genauer beschrieben werden.[84] Die CH-Aktivierung ist als ein entscheidender Beitrag zu betrachten, da das Spalten der (eher unreaktiven) C-H-Bindung eine initiale

Herausforderung in der Synthese komplexer Moleküle repräsentiert und im Anschluss die Möglichkeit für viele weitere Funktionalisierungen bietet.

2.2.2. Kreuzkupplungen

Übergangsmetall-katalysierte Reaktionen dienen nicht nur der Funktionalisierung von Indolen (wie zuvor bei der Borylierung von Indol beschrieben), sondern sind auch ein wesentlicher Bestandteil in der Totalsynthese von Naturstoffen. Die häufig verwendeten Kreuzkupplungen bieten eine effiziente Möglichkeit zur Bildung von C-C-Bindungen und sind somit von hohem strategischem Nutzen. Auf diesem Weg können isoliert-präparierte Moleküldomänen miteinander verknüpft werden und gewähren damit die Möglichkeit einer konvergenten Syntheseroute. So können z. B. mit der Stille-, Negishi- oder Suzuki-Miyaura-Kupplung ausgehend von Arylhalogeniden (R^1-X) viele verschiedene Kohlenstoffreste angefügt werden. Je nach Namensreaktion werden dazu Organozinn-, Organozink- oder Organoborverbindungen eingesetzt, welche sich meist ebenfalls aus dem entsprechenden Organohalogenid herstellen lassen. In Schema 4 ist der Mechanismus einer Suzuki-Miyaura-Kupplung vereinfacht dargestellt.[85]



Schema 4: Katalysezyklus einer allgemeinen Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung mithilfe eines Palladium-Katalysators und Natriumhydroxid als Base.[85, 86]

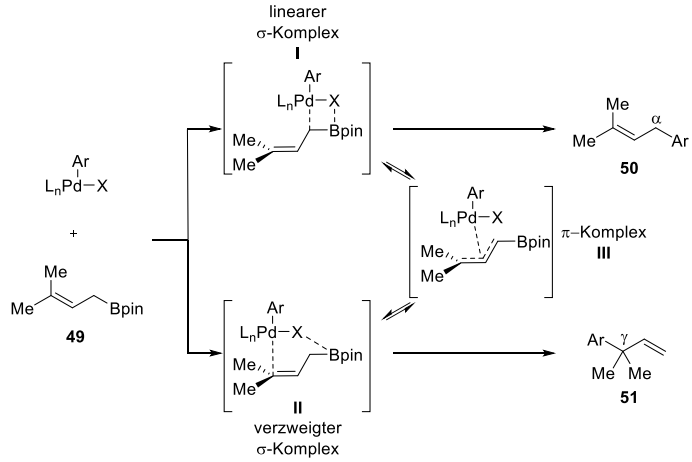
Da sowohl die oxidative Addition als auch die reduktive Eliminierung vom Oxidationszustand des Übergangsmetalls abhängt, sind inerte Reaktionsbedingungen unverzichtlich. Die verwendeten Katalysatoren werden daher oft zunächst als Präkatalysator eingesetzt und erst *in situ* in die reaktive Spezies **I** überführt, um eine Oxidation durch Luftsauerstoff und damit eine Inaktivierung des Katalysators zu verhindern. Weiterhin ist bei Suzuki-Kreuzkupplungen die Verwendung einer Base notwendig. Die genaue Rolle der Base konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden, es gibt jedoch zwei verbreitete Vermutungen. Einerseits vermag die Base die Organoborverbindung zu aktivieren, andererseits kann die Base Palladium koordinieren und damit das addierte Halogenid substituieren. Die somit gebildete Pd-O-Bindung (Intermediat **III**) ist polarer als die Pd-X-Bindung (Intermediat **II**) und entzieht dem Palladium die Elektronendichte.[86] In beiden Ansätzen begünstigt der Einsatz der Base eine schnellere Transmetallierung, bei welcher der Organylrest vom Bor auf das Übergangsmetall

übertragen wird. Im letzten Schritt des Katalysezyklus werden die zwei Organylreste reduktiv eliminiert (ausgehend von Intermediat **IV**), wodurch der Ausgangs-Oxidationszustand des Übergangsmetalls wiederhergestellt wird und eine neue C-C-Bindung gebildet wird.

Durch Kreuzkupplungen können unterschiedlichste Kohlenstoffreste angefügt werden, wobei das Spektrum der gebildeten Bindungen stark vom verwendeten Katalysatorsystem und den Reaktionsbedingungen abhängt. Unter bestimmten Bedingungen ist jedoch nicht nur die Bildung neuer sp^2-sp^2-Bindungen möglich, sondern können auch sp^2-sp^3- oder sp^3-sp^3-Bindungen generiert werden.[87, 88] Aufgrund der Tatsache, dass bei einer Vielzahl von Kupplungen primär Organohalogenide als Ausgangsverbindung fungieren, eröffnen sich für diese eine Vielzahl unterschiedlicher Einsatzmöglichkeiten. Des Weiteren sind Halogensubstituenten unter vielen Reaktionsbedingungen stabil, sodass die Einführung von Halogenen in der Synthese schon an einem frühen Punkt realisiert werden kann, die tatsächliche Kreuzkupplung jedoch erst zu einem späten Zeitpunkt in der Synthese (*late-stage*) stattfindet. Dies macht Halogensubstituenten sehr vorteilhaft in der Totalsynthese von Naturstoffen sowie bei deren Derivatisierung.

2.2.3. Prenylierung mittels Suzuki-Kreuzkupplungen

Viele Indolalkaloide bestehen nicht nur aus dem namensgebenden Heterozyklus, sondern enthalten durch angefügte Prenylgruppen noch weitere Kohlenstoffzyklen (siehe Isoprenoide Indolalkaloide in Kapitel 1.3 - Abbildung 7). Während die Prenylierung biosynthetisch über viele verschiedene Prenyltransferasen realisiert wird, können Prenylgruppen chemisch über Kreuzkupplungen angefügt werden. Bei diesen Reaktionen stellt sich jedoch eine weitere Hürde, da sich ausgehend von Allylboronsäureester **49** (oder anderen Allylboraten) eine Prenylgruppe sowohl linear/normal (Produkt **50**) als auch verzweigt/revers (Produkt **51**) anfügen lässt (Schema 5).

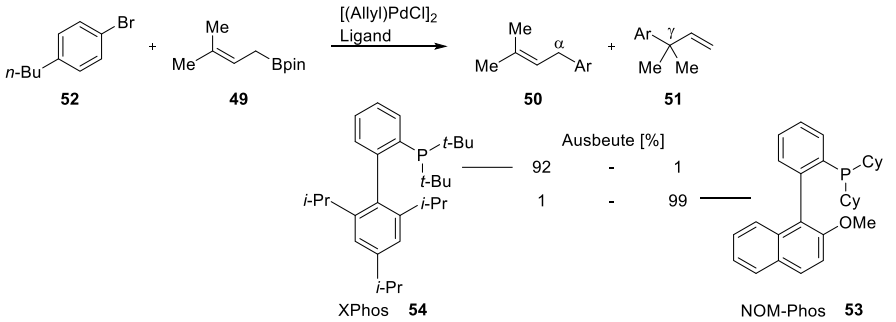


Schema 5: Reaktionsschema einer linear/normalen und verzweigten/reversen Prenylierung über eine Kreuzkupplung mit vermuteten Übergangszuständen. Die zwei möglichen σ-Komplexe (**I** und **II**) könnten zudem über einen π-Komplex (**III**) isomerisieren.[89]

Die Regioselektivität wird nicht allein durch die Isomerisierung zwischen den zwei verschiedenen σ-Allylpalladiumverbindungen beeinflusst, sondern auch durch zwei mögliche

Reaktionsmechanismen bedingt. Je nachdem, in welcher Position das Übergangsmetall während der Transmetallierung angelagert wird, können somit der lineare (**I**) als auch der verzweigte σ-Komplex (**II**) gebildet werden. Die Isomerisierung könnte über einen vermuteten π-Komplex (**III**) stattfinden.[89]

Glasspoole *et al.* konnten feststellen, dass die Regioselektivität sehr stark durch das Substitutionsmuster der allylischen Borverbindungen beeinflusst werden kann, wobei sterisch anspruchsvolle Substituenten die Bildung des linearen Reaktionsproduktes begünstigten.[90] Yang und Buchwald konnten jedoch anhand der Reaktion von Arylbromid **52** und Prenylpinakolester **49** zeigen, dass auch der verwendete Ligand das Reaktionsergebnis stark beeinflusst (Schema 6).[89]

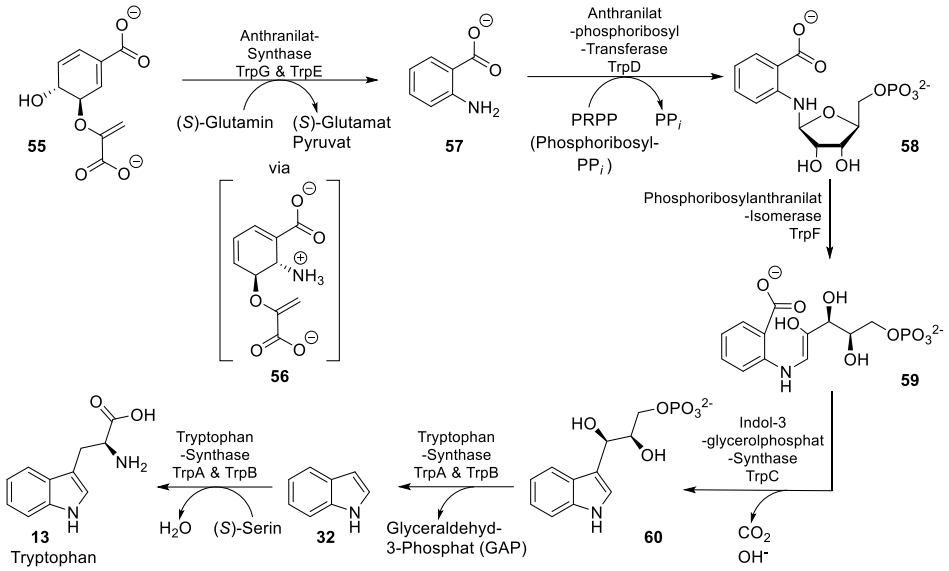


Schema 6: Reaktionsschema der ligandenkontrollierten, regiodivergenten Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplungen nach Yang und Buchwald.[89]

Schon mit gewöhnlich genutzten Liganden wie SPhos konnte eine hohe Selektivität zugunsten des γ-Produktes erhalten werden. Bei Verwendung des Napthyl-Phosphin-Liganden **53** (NOMPhos) konnten jedoch noch höhere Ausbeuten von bis zu 99 % beobachtet werden. Um jedoch auch das α-Produkt selektiv zu erhalten, wurden sterisch anspruchsvolle Liganden getestet. Der *tert*-Butyl substituierte Ligand **54** (XPhos) konnte dabei eine Ausbeute von bis zu 92 % erzielen, wobei auch leicht erhöhte Temperaturen (70 °C) verwendet wurden, während für das verzweigte Produkt mildere Temperaturen (40 °C) vorlagen.

2.3. Tryptophan-Biosynthese

Die vielen Naturstoffe, welche Indol oder Indol-ähnliche Strukturen enthalten, werden meist ausgehend von Tryptophan (**13**), oder einem Tryptophan-Vorläufer produziert, dessen charakteristische Funktion der Indolring ist. Tryptophan (**13**) gilt für den Menschen als essentielle Aminosäure und kann demnach nicht von menschlichen Zellen selbst gebildet werden. Pflanzen und Mikroorganismen sind jedoch in der Lage, Tryptophan über den Shikimisäureweg zu synthetisieren. Da dieser Stoffwechselpfad viele weitere lebenswichtige Verbindungen bereitstellt, sind die entsprechenden Gene der Biosynthese Teil des *trp*-Operons und damit stark reguliert (Schema 7).[38, 91] Zudem konnte festgestellt werden, dass das *trp*-Operon zwischen verschiedenen Organismen unterschiedlich organisiert ist, wobei die Reihenfolge sowie auch der Locus einzelner Gene stark variiert.[92, 93]



Schema 7: Schematische Darstellung der Biosynthese von Tryptophan (**13**) ausgehend von Chorismat (**55**) aus dem Shikimisäure-Biosyntheseweg katalysiert durch entsprechenden Enzyme codiert von *trpEGDCFBA*[94]

Die entsprechenden Genabschnitte (*trpEGDCFBA*) werden in *Escherichia coli* (*E. coli)* als gemeinsame polycistronische mRNA transkribiert und führen zusammengelagert in homomeren und heteromeren Polypeptiden ihre Funktion aus.[95] So wird die Anthranilat-Synthase durch die Gene *trpG* und *trpE* gebildet. Die Glutamin-Amidotransferase TrpG bewirkt zunächst die Aminierung des Chorismats (**55**), ein Zwischenprodukt des Shikimisäurewegs, bei gleichzeitiger Eliminierung der Hydroxygruppe. Anschließend wird durch die TrpE-Einheit Pyruvat abgespalten und Anthranilat (**57**) freigesetzt.[96, 97] Dieses kondensiert mit Phosphoribosylpyrophosphat, katalysiert von TrpD, zu Verbindung **58** und wird danach durch TrpF isomerisiert (Verbindung **59**). Schließlich wird durch die Katalyse von TrpC unter Decarboxylierung und gleichzeitiger Eliminierung der Indolring geschlossen. Das somit erhaltene Indol-3-glycerinphosphat (**60**) wird dann von der Tryptophan-Synthase (TrpS) umgesetzt, wobei die α-Untereinheit (TrpA – codiert durch *trpA*) zunächst die Aldolspaltung zu Glycerinaldehyd-3-phosphat und Indol (**32**) katalysiert und erst dann die β-Untereinheit (TrpB - codiert durch *trpB*) die irreversible Kondensation von Indol mit (*S*)-Serin ermöglicht.[94]

2.3.1. Optimierung der Tryptophan-Synthase

Bestehend aus der α- und β-Untereinheit ist die TrpS damit ein bifunktioneller, tetramerer (αββα) Enzymkomplex. Dabei wurde gezeigt, dass es durch Bindung von Liganden zu einer allosterischen Wechselwirkung zwischen den zwei Untereinheiten kommt. Diese Konformationsänderung bewirkt ein kooperatives Verhalten der Untereinheiten und sorgt dafür, dass das Substrat Indol-3-glycerinphosphat (**60**), bzw. die entsprechenden Intermediate, den Enzymkomplex nicht verlassen können und bietet gleichzeitig die benötigte Umgebung zur Katalyse.[98] Allosterisch-regulierte Enzyme büßen daher oft einen gewissen Anteil ihrer Aktivität ein, wenn die Untereinheiten separiert werden, da die aktivierende Wirkung durch die Interaktion mit dem Proteinpartner entfällt. So wurde auch für die TrpS gefunden, dass die

isolierte β-Untereinheit nur noch einen geringen Anteil ihrer natürlichen Aktivität vorweist (bis zu 5 %).[99, 100]

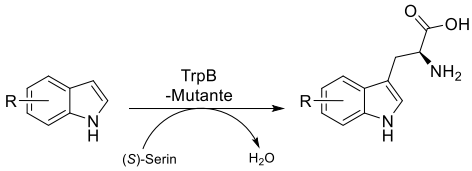
In der Arbeitsgruppe von F. Arnold wurde die Tryptophan-Synthase tiefgründig untersucht und mittels gerichteter Evolution (*directed evolution*) hinsichtlich des Substratspektrums optimiert. Als *parental gene* wurde dafür eine Tryptophan-Synthase aus dem thermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* verwendet, da

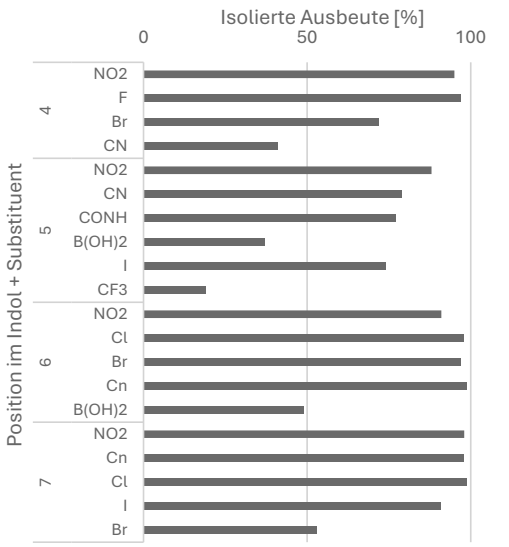
1) die Thermostabilität des Enzyms praktische Vorteile in der Reinigung und damit beim *screening* beinhaltet (Hitzedenaturierung von unerwünschten Proteinen).
2) hohe Temperaturen bei der Aktivitätsbestimmung des Enzyms ermöglichen, dass mehr vom hydrophilen Substrat (Indol) im wässrigen Medium gelöst werden kann.
3) thermostabile Enzyme toleranter gegenüber Mutationen sind, die aktivierende, aber potenziell auch destabilisierende Effekte zugleich haben.

Die Mutagenese wurde mithilfe einer *error-prone* PCR durchgeführt, die Mutanten dann heterolog in *E. coli* exprimiert, die erhaltenen Lysate durch Hitzedenaturierung gereinigt und die Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} (bei gesättigter Indol und Serin-Konzentration) gemessen. Schließlich wurden nach drei Runden der *directed evolution* bestimmte Mutationen in der β-Untereinheit des Enzyms gefunden, welche die Komplexierung mit der α-Untereinheit imitieren. Dadurch konnte die β-Untereinheit zu einem eigenständigen Enzym entwickelt werden, wobei die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) mit 330 $mM^{-1}s^{-1}$ der neuen $TrpB^{0B2}$-Variante deutlich höher ist als bei der ursprünglichen TrpS mit 50 $mM^{-1}s^{-1}$.[100] Das alleinstehende Enzym ist damit in der Lage, Indol und Serin zu Tryptophan umzusetzen.

In weiteren Publikationen wurden die Erkenntnisse dann auf homologe Tryptophan-Synthasen übertragen, darunter die TrpB aus *Archaeoglobus fulgidus*, *E. coli* und *Thermotoga maritima*. Insbesondere Letztere ($TrpB^{Tm2F3}$) stellte einen großen synthetischen Mehrwert dar, weil diese Mutante auch deutlich höhere Umsatzraten für 5-funktionalisierte Indole zeigte, und somit auch nicht-kanonische Aminosäuren mit dem Enzym gut zugänglich sind.[101] Die beiden Enzymvarianten aus *P. furiosus* und *T. maritima* wurden daher in wiederholten Durchgängen der *directed evolution* weiterentwickelt, unter anderem auch zur Umsetzung von 3-Methyloxindolen.[102] Auf diese Weise wurde eine Reihe von Enzym-Mutanten generiert, welche ein umfangreiches Substratspektrum abdecken, einschließlich Halogen-, Cyanid- und Nitrosubstituenten in 4-,5-,6- oder 7-Position (Abbildung 13).[103]

Dabei scheinen die eingeführten Mutationen über verschiedene Mechanismen die Katalyse zu begünstigen. Die Mutation N166A scheint z. B. die konformative Änderung des Enzyms vom offenen Zustand (*open state*) in den teilweise geschlossenen Zustand (*partially closed state*) zu beeinflussen. Anhand von Kristallstrukturen wurde die Vermutung aufgestellt, dass $Asparagin^{166}$ nur im *closed state* eine Wasserstoffbrücke zu $Histidin^{275}$ bildet. Der Austausch zum deutlich basischeren Aspartat vermag diese Interaktion zu verstärken, und damit den *closed state* zu stabilisieren. Andere Mutationen (z. B. I183F oder V186A) hingegen liegen im aktiven Zentrum, aber scheinen dort nur subtile Änderungen des Enzyms zu bewirken, wie beispielsweise mehr Platz für die Indolderivate zu schaffen, indem das aktive Zentrum leicht anders ausgerichtet ist.





Position	R	Mutante	Ausbeute [%]
4-	NO_2	*Pf*2A6	95
	F	*Tm*2F3	97
	Br	*Tm*2F3	72
	CN	*Tm*2F3[1]	41
5-	NO_2	*Tm*2F3[1]	88
	CN	*Tm*2F3	79
	CONH	*Tm*2F3	77
	$B(OH)_2$	*Pf*0A9	37
	I	*Pf*0A9	74
	CF_3	*Pf*2A6	19
6-	NO_2	*Pf*0A9[2]	91
	Cl	*Pf*0A9	98
	Br	*Pf*0A9	97
	Cn	*Pf*0A9	99
	$B(OH)_2$	*Pf*0A9	49
7-	NO_2	*Pf*2A6	98
	Cn	*Pf*2A6	98
	Cl	*Pf*0A9	99
	I	*Pf*0A9	91
	Br	*Pf*5G8	53

Abbildung 13: Umgesetze Indolderivate in Abhängigkeit von der benutzten TrpB-Mutante, generiert von F. Arnold *et al.*[103] [1] zuzügliche Mutation I184F; [2] abweichende, zuzügliche Mutation: E104G

Letztlich konnten selbst größere funktionelle Gruppen, wie z. B. eine Boronsäure, in 5- bzw. 6-Position mit Ausbeuten von 37 bzw. 49 % erfolgreich umgesetzt werden. Sogar nahezu quantitative Ausbeuten konnten für Halogen-substituierte Verbindungen in 6- und 7-Position detektiert werden. Zusätzlich wurden einige zweifach-substituierte Indole getestet, wobei nur das 5-,6-Dichlorindol mit 87 % hohe Ausbeuten erreichte. Allerdings konnten für die vielen Enzymvarianten keine kinetischen Parameter zum Vergleich bestimmt werden, da nur geringe Mengen des Indols (Substrat) im Reaktionsmedium löslich sind (ca. 3.5 g/L in Wasser bei 25 °C). Das Reaktionsprodukt Tryptophan (**13**) weist als Aminosäure zwar eine höhere Polarität auf, doch führt der aromatische Molekülteil noch immer zu einer geringen Löslichkeit (ca. 13.5 g/L in Wasser bei 25 °C, 10 g/L bei 20 °C). Dies konnte jedoch für die synthetische Anwendung genutzt werden, da die Reaktionsprodukte nach erfolgter Umsetzung bei nahezu 0 °C auskristallisieren und die Reaktionslösung dann abfiltriert werden kann. Im Zusammenhang mit der leichten Handhabung des Enzyms aufgrund der Hitzebeständigkeit, bieten die optimierten Tryptophan-Synthasen damit ein nützliches Werkzeug zur Synthese nicht-kanonischer Aminosäuren.

3. DEOXYVIOLACEIN

3.1. Kenntnisstand

3.1.1. Entdeckung und Eigenschaften

Das bereits in der Einleitung erwähnte Deoxyviolacein (**31**) ist eine kongenere Verbindung des Violaceins (**52**), welches eine zusätzliche Hydroxylgruppe enthält (Abbildung 14). Von den zwei strukturell sehr ähnlichen Bis-Indolalkaloiden wurde insbesondere Violacein (**61**) bereits umfassend untersucht. Ein ungesättigter 2-Pyrrolidonring bildet die Brücke zwischen den zwei Indoleinheiten, wodurch sich ein großes, konjugiertes π-System ergibt. Daher sind die Verbindungen stark färbende Pigmente mit einer blau-violetten Farbe. Die UV/VIS-Absorptionsmaxima zwischen den Molekülen unterscheiden sich leicht aufgrund des zusätzlichen Hydroxylrests: 208, 235, 364 und 547 nm mit eher bläulicher Farbe für Deoxyviolacein (**31**), und 208, 361 und 553 nm für das eher violette Violacein (**61**).[104, 105]

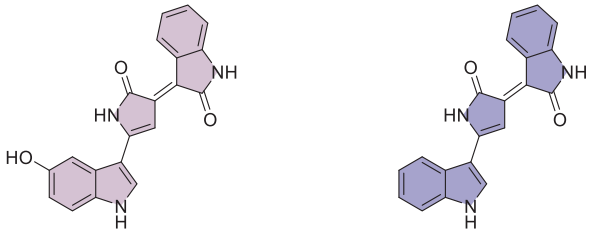


Abbildung 14: Chemische Struktur von Violacein (**61**) und Deoxyviolacein (**31**).

Der Naturstoff Violacein (**61**) wurde, gemäß deMoss, erstmalig im Jahr 1882 von Boisbaudran beschrieben und aus einem Bakterium extrahiert. Es sollte sich später herausstellen, dass es sich dabei um *Chromobacterium violaceum* handelte.[105] Abgesehen von Violacein (**61**), produziert dieses Bakterium noch weitere Antibiotika, weshalb diese Stämme auch eine erhöhte Resistenz gegen entsprechende Verbindungen zu haben scheinen. Infektionen mit dem Bakterium sind selten, führen jedoch in den wenigen Fällen zu ernsthaften, oft tödlichen Erkrankungen.[106, 107] Darüber hinaus wird Violacein (**61**) auch von weiteren Bakterien produziert, unter anderem von *Janthinobacterium lividum* und *Alteromonas luteoviolacea*.[108, 109] Allerdings ist *C. violaceum* in dieser Hinsicht am häufigsten untersucht worden.[109]

Schon 1945 konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass Violacein (**61**) das Wachstum vieler Gram-positiver Stämme inhibiert, während Gram-negative Stämme nur leicht beeinflusst werden.[110] Die antibakteriellen Eigenschaften des Naturstoffs wirken sich bei höheren Konzentrationen noch stärker aus, sodass Konzentrationen von über 15 mg/L bei Bakterienstämmen wie *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* nicht nur zu eingeschränktem Wachstum, sondern zum Zelltod führen.[111] Stämme wie *Serratia marcescens* oder *E. coli* wurden jedoch ebenfalls beeinträchtigt, wobei eine synergistische Wirkung zusammen mit Penicillin

beobachtet wurde.[112] Außerdem zeigten Souza *et al.*, dass Violacein (**61**) einen vergleichbaren antimykobakteriellen Effekt auf *Mycobacterium tuberculosis* (Erreger von Tuberkulose) hat.[113]

Aruldass *et al.* konnten schließlich einen Wirkmechanismus des Violaceins (**61**) aufzeigen, indem Extrakte des Naturstoffs die Zellmembran schädigten, was letztlich zur Bildung von Mesosomen (Einstülpungen der Plasmamembran) und zum Verlust der Membranintegrität führte (Austritt von K^+-Ionen, Proteinen und ATP).[114] Vergleichbare Ergebnisse lieferten auch die Experimente von Gueiros-Filho *et al.*, welche zu dem Schluss kamen, dass sich Violacein (**61**) in der Lipid-Doppelschicht anlagert und dadurch Defekte und Diskontinuitäten (Ausdünnung, transiente Löcher oder Phasentrennung) in der Membran hervorgerufen werden.[115] Jedoch wird dieser Effekt vermutlich nicht durch Membran-Solubilisierung verursacht, wie es bei Detergenzien der Fall ist, sondern möglicherweise aufgrund von Disturbation der Phospholipide, indem Violacein (**61**) die Abstände und die Anordnung der Lipide verändert.

Auch gegen einige eukaryotische, einzellige Parasiten wie *Spumella* sp.*, Ochromonas* sp., *Trypanosoma cruzi* und *Leishmania amazonensis* zeigte Violacein eine hohe Wirksamkeit. Es konnten darüber hinaus auch antivirale Eigenschaften belegt werden, indem sowohl *Herpes simplex*-Viren als auch *Polio*-Viren, welche HeLa-Zellen infiziert hatten, inhibiert wurden. Allerdings wurden diese Ergebnisse später teilweise widerlegt.[109, 116] Mit dem Aufkommen der Covid-19-Pandemie wurde Deoxyviolacein (**31**) und Violacein (**61**) hinsichtlich ihrer Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren untersucht. Es konnte durch *in silico* Messungen belegt werden, dass die zwei Indolalkaloide eine hohe Bindungsaffinität mit dem Angiotensin-Konversionsenzym 2 (ACE2), der HIV-1 Reverse Transkriptase und dem Spike Protein von SARS-CoV-2 aufweisen und sich damit für weitere Untersuchungen als Wirkstoffkandidaten profilierten.[117]

In besonderem Maße wurde darüber hinaus auch die Nutzbarkeit Violaceins (**61**) als Tumor-Therapeutikum untersucht.[108] In vielen dieser Publikationen wurde eine hohe Zytotoxizität gegen verschiedene Krebs-Zelllinien mit IC_{50}-Werten im sub-mikromolaren Konzentrationsbereich beschrieben.[116, 118] Außerdem konnte gezeigt werden, dass verschiedene Dickdarm-Krebszelllinien, namentlich Caco-2 und HT-29, unterschiedlich auf die Violacein-Behandlung reagierten und es damit spezifische, Zelltyp-abhängige Wirkmechanismen geben kann. In dieser Hinsicht scheint vor allem oxidativer Stress, also die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS), eine entscheidende Rolle zu spielen.[119] In einer weiteren Versuchsreihe von Peppelenbosch *et al.* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Violacein (**62**) bei HL60-Zellen, einer myeloiden Leukämie-Zelllinie, Apoptose induzierte, während bei der gleichen Konzentration normale Lymphozyten nicht beeinträchtigt wurden.[120] Damit ist eine wichtige Bedingung für Tumor-Therapeutika erfüllt, spezifisch gegen Krebszelllinien zu agieren und gesunde Zellen unberührt zu lassen. Diese *in vitro* Ergebnisse ließen sich auch auf *in vivo* Experimente transferieren: In einer 35-Tage Studie wurden Mäuse, welche unter Ehrlich-Ascites-Karzinomen litten, intraperitoneal mit Violacein-Konzentrationen von 0.1 bis 1.0 µg/kg behandelt.[121] Die Behandlung erhöhte die Überlebensrate der Mäuse dabei signifikant, wobei gleichzeitig keine Nebenwirkungen durch die Violacein-Belastung festgestellt wurden. In einer nachfolgenden Toxizitätsstudie konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Konzentrationen von bis zu 1000 µg/kg weder die hämatologischen Parameter veränderten noch histologische Unterschiede in Niere oder Leber

herbeiführten. Auch in dieser Publikation weisen weitere Ergebnisse darauf hin, dass Violacein (**61**) zu oxidativem Stress führt und gleichzeitig die Abwehrmechanismen gegen ROS aus dem Gleichgewicht bringt, was letztlich zu einer erhöhten Apoptose-Rate führt.

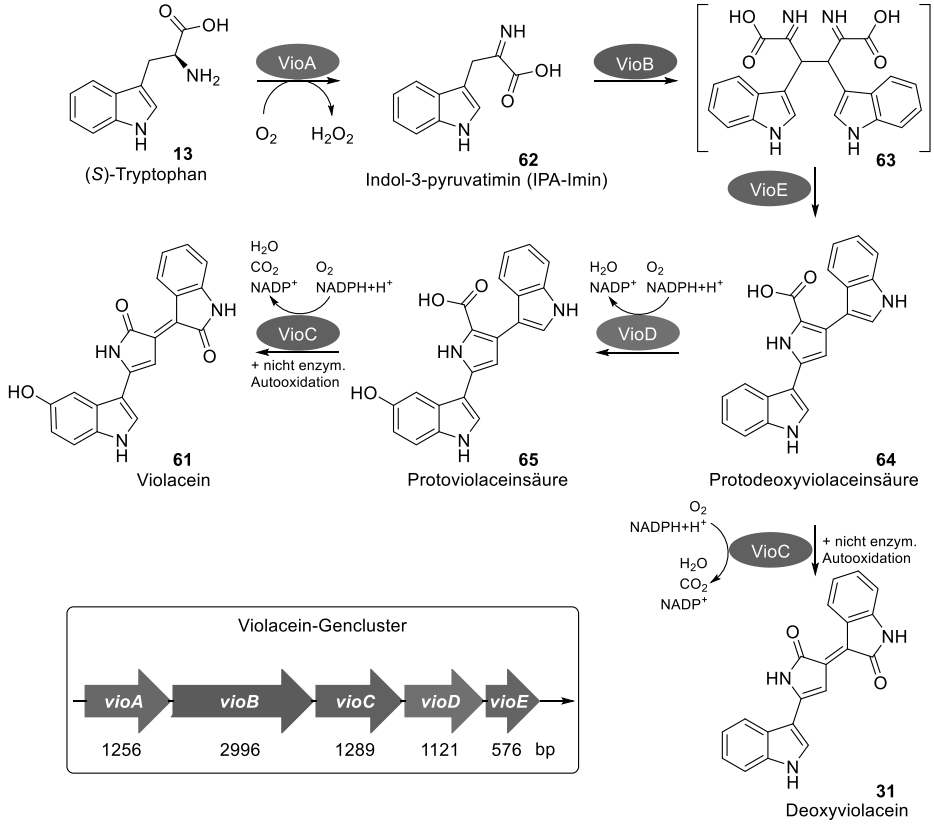
Abgesehen von den schon aufgezeigten Anhaltspunkten sind trotz der zahlreichen Untersuchungen von (Deoxy-)Violacein (**31** und **61**) noch immer nicht die genauen Wirkmechanismen bekannt, die zu den physiologischen Effekten führen. Gleichzeitig ist auch nur wenig über den praktischen Nutzen des Naturstoffs in den Ursprungsorganismen bekannt. Aufgrund der antibakteriellen, antiprotozoischen, antimykotischen und antiviralen Wirkung wird vermutet, dass das Alkaloid als Schutz vor Prädatoren gebildet wird. Da die Produzenten von (Deoxy-)Violacein eher festsitzende Bakterien sind, wird vermutet, dass diese Zellen in Biofilmen organisiert sind und dass Violacein als ein effektives Mittel zum Schutz vor eukaryotischen Angreifern dient.[108, 122] Eine genaue Unterscheidung hinsichtlich der biologischen Eigenschaften zwischen Violacein (**61**) und Deoxyviolacein (**31**) kann dabei nicht eindeutig gezogen werden, da in den vielen physiologischen Studien die Naturstoffe biotechnologisch produziert wurden und als Rohextrakt (sog. *crude violacein*) eingesetzt wurden. Das verwendete *crude violacein* enthält allerdings nicht nur Violacein (**61**), sondern ist ein nicht exakt definiertes Gemisch verschiedener Pigmente, darunter Violacein (**61**), aber auch verwandte Verbindungen wie Deoxyviolacein (**31**), Oxoviolacein und entsprechende Intermediate der Biosynthese.[123]

3.1.2. Biosynthese

Für die vielen Untersuchungen wurde das verwendete *crude violacein* in den natürlichen Host-Stämmen oft nur in geringen Mengen erhalten, wenngleich die Kultivierungsbedingungen stetig verbessert wurden. Bruns *et al.* konnten so schließlich mit *C. violaceum*-Kulturen ein Zelltrockengewicht von 21 g/L und einen Violaceingehalt von 0.43 g/L erzielen.[124] Diese Werte müssen jedoch relativiert werden unter der Berücksichtigung, dass der Violaceingehalt oft mittels Absorption gemessen wurde, der dazu verwendete Extinktionskoeffizient in den verschiedenen Publikationen allerdings von den Autoren neu bestimmt wurde und mit Werten von 11.0 bis 74.3 L/(g*cm) sehr stark voneinander abweicht.[108] Um einerseits die Effizienz der Bioproduktion zu erhöhen und andererseits die im Extrakt enthaltenen Komponenten sowie deren biosynthetischen Ursprung genau zu beleuchten, wurde der Biosynthesepfad vielfach untersucht.[125]

Im Jahr 2000 wurde aus Sequenz-Analysen der entsprechende Gencluster aus *C. violaceum* identifiziert, sodass in den folgenden Jahren auch viele Versuche unternommen wurden, den Naturstoff in heterologen Expressionsstämmen zu produzieren.[126] Der dazugehörige Biosynthesepfad konnte jedoch erst im weiteren Verlauf genaustens beleuchtet werden (Schema 8).[127, 128] Ausgehend von (*S*)-Tryptophan (**13**) agiert zunächst VioA, eine Flavin-abhängige L-Aminosäure Oxidase, und bildet das Imin des Indol-3-pyruvat (IPA) **62**. Anschließend bildet VioB eine dimere Struktur **63** aus zwei IPA-Imin-Einheiten, jedoch konnte diese Verbindung bisher nicht isoliert und damit belegt werden. Allerdings konnte die nachfolgende Struktur von Proto(deoxy)violaceinsäure (**64**) aus Experimenten isoliert werden, bei denen Tryptophan (**13**) den Enzymen VioABE ausgesetzt war. Bei VioE handelt es sich somit um eine Proto(deoxy)violaceinsäure-Synthase, welche einen 1,2-Shift des Indolrings mit gleichzeitiger Decarboxylierung katalysiert. Anschließend entzweit sich die Syntheseroute

an dieser Stelle zum Deoxyviolacein (**31**) respektive Violacein (**61**), je nachdem ob die Flavin-abhängige Hydroxylase VioD vorhanden ist, welche den Hydroxylrest in 5-Position der Protoviolaceinsäure (**65**) einführt. Für beide Naturstoffe findet in den letzten Schritten die Sauerstoff- und NADPH-abhängige Hydroxylierung in 2-Position statt, katalysiert durch die ebenfalls Flavin-abhängige Monoxygenase VioC. Dabei wird nicht direkt das Oxindol aufgebaut, sondern lediglich eine 2-Hydroxygruppe eingeführt, um Deoxyviolaceinsäure bzw. Violaceinsäure zu erhalten. Nachfolgend finden drei nicht-enzymatische Schritte statt, bestehend aus einer Addition von Sauerstoff am Pyrrolring, einer Decarboxylierung und Kondensation.[129] Interessanterweise ist nur am Hämprotein VioB ein Metall-Ion (Fe^{2+}) zu finden. Zusätzlich sind viele Intermediate wie z. B. das IPA-Dimer (**63**) sehr sauerstoff-empfindlich, sodass einerseits die entsprechende Verbindung noch nicht isoliert werden konnte, und andererseits eine Reihe weiterer Intermediate gefunden wurde, deren Verwendung in der Biosynthese bislang nicht belegt werden konnte.



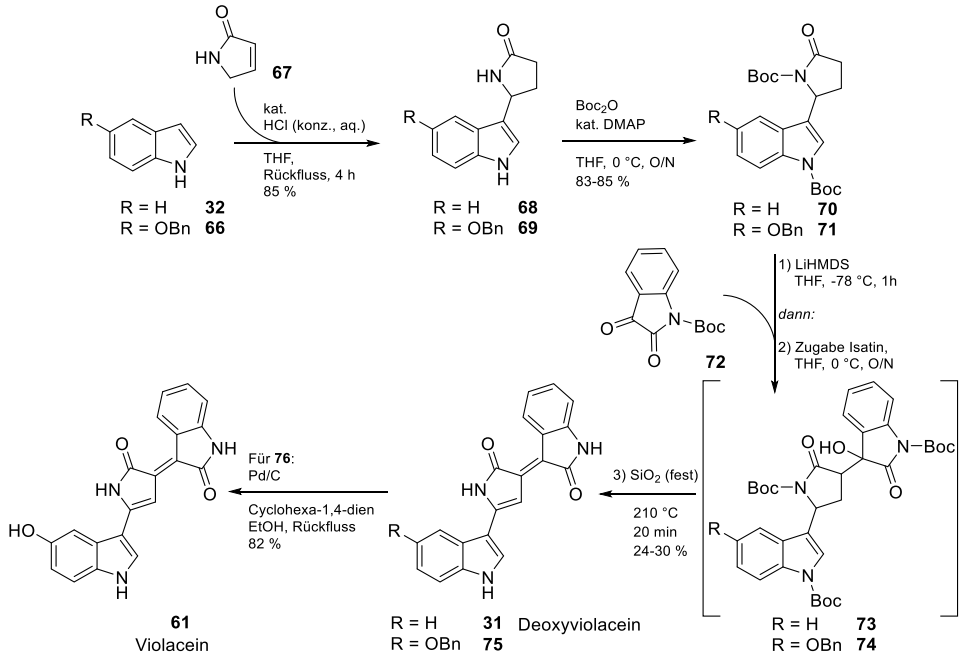
Schema 8: Aus *C. violaceum* identifizierter Gencluster und die daraus entwickelte Biosyntheseroute zum Violacein (**61**) und Deoxyviolacein (**31**) von August *et al.* und Balibar.[126, 128]

Nachdem die Biosynthese bekannt war und damit wichtige Erkenntnisse zu optimierten Kultivierungsbedingungen gefunden wurden, konnte der Naturstoff auch vermehrt in verschiedenen heterologen Bakterienstämmen produziert werden. Hierbei gilt zu beachten, dass lediglich das Einbringen des entsprechenden Gencluster in das Bakterium nicht direkt zu einer erfolgreichen Biosynthese des Naturstoffs führt. Für die Faltung der Enzyme in eine

aktive Form werden ebenfalls bestimmte Bedingungen benötigt, wie z. B. eine geeignete Translationsgeschwindigkeit, eine ausreichende Cofaktor-Konzentration sowie eine adäquate Temperatur. Ebenso muss das Plasmid, welches die Sequenz für den Gencluster enthält, über mehrere Generationen stabil bleiben, was bei einem so großen Cluster nicht immer gegeben ist. So entwickelten Pemberton und Ahmetagic z. B. einen *E. coli* K12 DH5α Stamm, welcher das pPSX-*vioABCDE* Plasmid über 100 Generationen stabil hielt, allerdings nur geringe Mengen Violacein produzierte. Nachdem weitere Stämme getestet wurden, konnten sie einen stabilen, Violacein-überproduzierenden Stamm beschreiben (*E. coli* K12 JM109), welcher mit einem pPSX-*vioABCDE opv-1* Plasmid transformiert wurde.[130] Jiang *et al.* zeigten darüber hinaus, dass die Expression des Genclusters und die dazugehörige Biosynthese unter Verwendung verschiedener Vektorsysteme und Promotoren (T7 und PalkB) auch in *Citrobacter freundii* und *Enterobacter aerogens* möglich ist.[131] Anstelle von Plasmid-basierten Systemen wurden in weiteren Publikationen rekombinante Methoden verwendet, wodurch der *vio*-Gencluster in die genomische DNA von *Pseudomonas putida* integriert wurde.[132, 133]

3.1.3. Totalsynthese

Zeitgleich mit der Erkundung der Biosynthese von Violacein (**61**) wurden auch einige Versuche zur Totalsynthese des trizyklischen Naturstoffs unternommen. Steglich *et al.* zeigten, dass das Alkaloid in wenigen Schritten aus Indol (**32**) und Isatin (**36**) erhalten werden kann (Schema 9).[104]

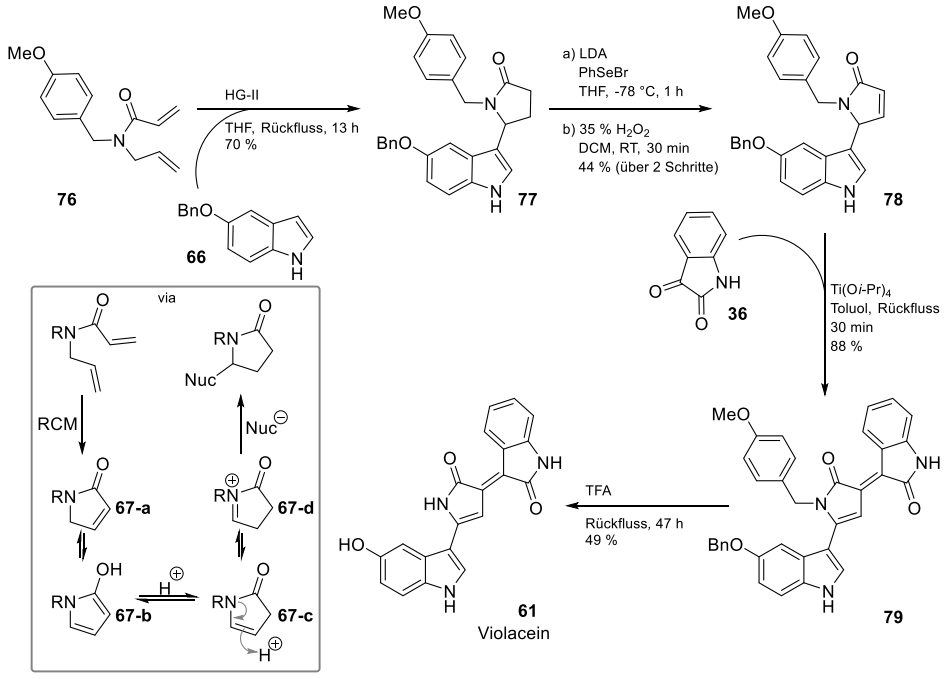


Schema 9: Totalsynthese von Violacein (**61**) und Deoxyviolacein (**31**) nach Wille und Steglich über eine Aldol-Kondensation ausgehend von Indol (**32**).[104]

Die Synthese wurde beim Indol (**32**) (zum Deoxyviolacein) bzw. beim 5-Benzloxyindol (**66**) (zum Violacein) begonnen, welche unter leicht sauren Bedingungen in guten Ausbeuten an

Pyrrolidon **67** addierten. Die erhaltenen Produkte **68** bzw. **69** wurden anschließend an beiden Stickstoffen unter Standardbedingungen mit Boc-PG geschützt (**70** und **71**), um in der nachfolgenden Reaktion selektiv nur den α-ständigen Kohlenstoff zu deprotonieren. Gleichermaßen wurde auch das im nächsten Schritt benötigte Isatin (**36**) mit einer Boc-Gruppe versehen (Verbindung **72**). Die C-C-Knüpfung wurde dann anschließend in einer Aldol-Kondensation bewerkstelligt. Die Sequenz verläuft über ein Enol, indem die Indol-Pyrrolidone **70** und **71** mithilfe einer starken Base deprotoniert werden, sodass diese nach Zugabe des Isatins **72** nukleophil am 3-Carbonyl angreifen können. Die bei der wässrigen Aufarbeitung entstehenden Aldol-Produkte **73** und **74** wurden dann ohne weitere Aufreinigung an Silica (SiO_2) adsorbiert und ohne Zugabe eines Lösungsmittels erhitzt. Dabei finden unter diesen endothermen Bedingungen gleichzeitig die Dehydratisierung (Abspaltung von Wasser), Dehydrierung (Abspaltung von Wasserstoff) und Abspaltung der drei Boc-PG statt. Der Verlauf dieser letzten Reaktion wird durch die Farbentwicklung des Reaktionsgemisches von weiß zu tiefblau begleitet. Im Falle der Synthese von Violacein (**61**) muss in einem letzten Schritt der 5-Hydroxyrest von Verbindung **75** noch von der angefügten Benzylgruppe unter hydrogenolytischen Bedingungen befreit werden. Die Synthese erfolgt insgesamt in wenigen Schritten, wobei drei der vier Reaktionen sehr gute Ausbeuten vorweisen. Allerdings wurde für den Schlüsselschritt dieser Route mit 24 bzw. 30 % nur eine geringe Ausbeute beobachtet.

Eine weitere Synthese wurde 2013 von Nielsen und Petersen veröffentlicht, welche den Pyrrolidon-Ring über eine Sequenz von Ringschluss-Metathese, Isomerisierung und nukleophiler Addition aufbaut (Schema 10).[134]



Schema 10: Totalsynthese von Violacein (**61**) nach Petersen und Nielsen über eine Aldolkondensation und eine Metathese ausgehend vom substituierten *N*-Allylacrylamid **76**.[134]

Dieser Schlüsselschritt wird direkt zu Beginn der Synthese durchgeführt und generiert aus dem eingesetzten *N*-Allylacrylamid **76** zunächst den Pyrrolidinonring **67**, welcher mit mehreren mesomeren Grenzstrukturen bzw. Tautomeren im Gleichgewicht steht. Unter Anlagerung eines Protons kann der Ring somit über das Enol **67-b** bis zum Imin **67-d** überführt werden, womit der nukleophile Angriff in 5-Position begünstigt wird (Schema 10, links unten). In der zugehörigen Publikation wurden einige Parameter des Schlüsselschritts sorgfältig untersucht, wie z. B. der benutzte Grubbs-Katalysator, die Temperatur sowie das hinzugefügte Nukleophil und der angefügte, elektronenziehende Rest am Stickstoff. Für die Totalsynthese erwies sich letztlich ein *p*-Methoxybenzylrest am Dien als förderlich. Nach erfolgter Domino-Reaktion mit 5-Benzyloxyindol (**66**) zum 3-Pyrrolidon **77** wurde die Doppelbindung wiederhergestellt (Verbindung **78**) – durch eine konsekutive Phenylselenierung in 3-Position, Oxidation in 4-Position und anschließende Eliminierung des Selenids. Durch eine Titan-katalysierte Tautomerisierung und ebenfalls eine Aldolkondensation wurde der Oxindolteil angefügt, um Verbindung **79** zu erhalten. Nach finaler Entschützung der 5-Hydroxygruppe und Entfernung des *p*-Methoxybenzylrestes mithilfe von Trifluoressigsäure wurde Violacein (**61**) nach Isolation durch Umkristallisation erhalten.[134]

Die Autoren beschrieben hier außerdem, dass das finale Produkt aufgrund der geringen Löslichkeit in herkömmlichen Lösungsmitteln nur schwierig handzuhaben war und dass die Rohausbeute im finalen Schritt sogar höher war, als nach der Isolation mittels Umkristallisation (ermittelt mittels LC/MS). Demnach sind Ausbeuteverluste im letzten Schritt zu vermerken. Die schwierige Handhabung bzw. Isolation von Violacein (**61**) und Deoxyviolacein (**31**) wurde ebenfalls von weiteren Autoren beschrieben. So wurde z. B. von Koubaa *et al.* eine Vielzahl an Lösungsmittelverhältnissen getestet, um schließlich Bedingungen zu finden, bei denen nur Deoxyviolacein (**31**) eluiert wird, jedoch nicht Violacein (**61**). Trotzdem waren für eine erfolgreiche Isolation der beiden Naturstoffe große Mengen an Lösungsmittel notwendig.[123]

Vermutlich aufgrund der Komplexität der chemischen Synthese und der Verfügbarkeit vieler heterologer Expressionssysteme, die eine erfolgreiche Bioproduktion des Naturstoffs ermöglichten, wurden seither keine weiteren totalsynthetischen Ansätze publiziert.[135]

3.1.4. Produktion von Vioacein-Analoga

Um auch nicht-natürliche Violacein-Derivate zu erhalten, wurde in bisherigen Studien ebenfalls auf die chemoenzymatische oder biosynthetische Produktion des Naturstoffs zurückgegriffen. Bei einer *in vitro* Studie von Ellis *et al.* wurde der Umsatz von verschiedenen Tryptophan-Analoga durch die Enzyme des Violacein-Biosynthesewegs untersucht (Abbildung 15).[136]

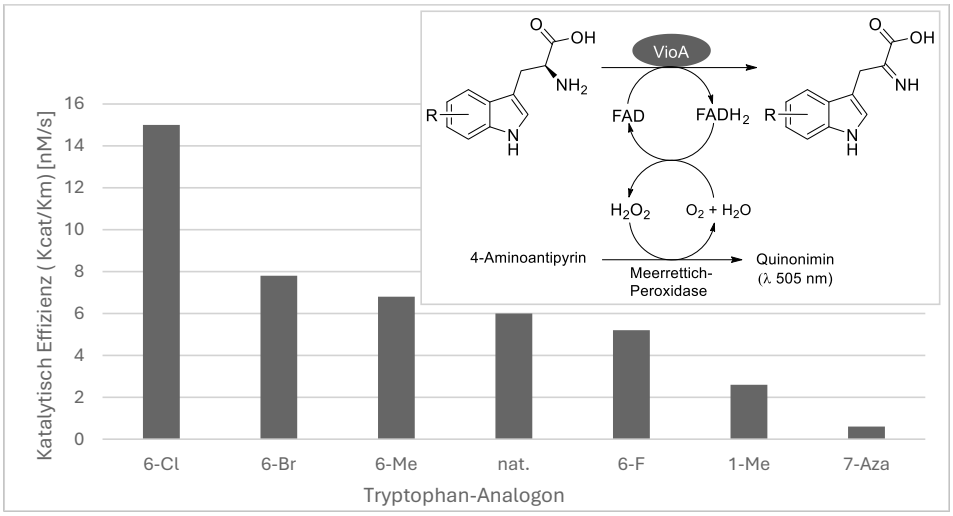


Abbildung 15: Gemessene Enzymaktivität beim VioA-Assay von Ellis *et al.* anhand des freigesetzten Wasserstoffperoxids. Letzteres wird durch eine Meerrettichperoxidase umgesetzt, sodass Quinonimin freigesetzt wird, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 505 nm gemessen werden kann.

Dazu wurden die entsprechenden Enzyme mit angefügtem Histidin-Tag heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert und anschließend gereinigt (Ni-NTA-Immobilisations-Chromatographie und Größenaustausch-Chromatagraphie). In einem ersten Assay konnte gezeigt werden, dass VioA ein recht breites Spektrum an Tryptophan-Substraten umsetzt. Bei dem verwendeten Assay wird anfallendes $FADH_2$ indirekt nachgewiesen, indem die Regeneration dessen mit einer Peroxidase gekoppelt wird. Das dadurch freigesetzte Quinonimin kann anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 505 nm quantifiziert werden.

Das Enzym zeigte bezüglich vieler Substrate, welche in 6-Position variiert wurden, eine höhere katalytische Effizienz, als beim natürlichen, unsubstituierten Tryptophan (**13**). Lediglich in 2-Position und 4-Position scheint ein Substituent sterisch oder elektronisch die enzymatische Umsetzung stark herabzusetzen (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

In einem weiteren Experiment wurden anhand der Ergebnisse aus dem VioA-Assay die entsprechenden Tryptophan-Analoga mit allen Enzymen des Violacein-Biosynthesewegs versetzt und mittels LC-MS/UV-VIS die Umsetzung zu den Derivaten des Naturstoffs bzw. zu den Intermediaten der Biosynthese verfolgt (Abbildung 16). Zwar liefert diese Analysemethode keine quantitativen Ergebnisse, dennoch können qualitative Schlüsse daraus gezogen werden. Zudem kann aufgrund desselben Masse/Ladungs-Verhältnisses und überschneidenden UV-VIS-Absorptionsspektren zwischen Deoxyviolacein (**31**) und dem Autooxidationsprodukt Proviolacein (**66**) nicht unterschieden werden, weshalb für alle Substrate, bei denen die entsprechende Masse gefunden wurde, beide Verbindungen als ‚detektiert' notiert wurden.

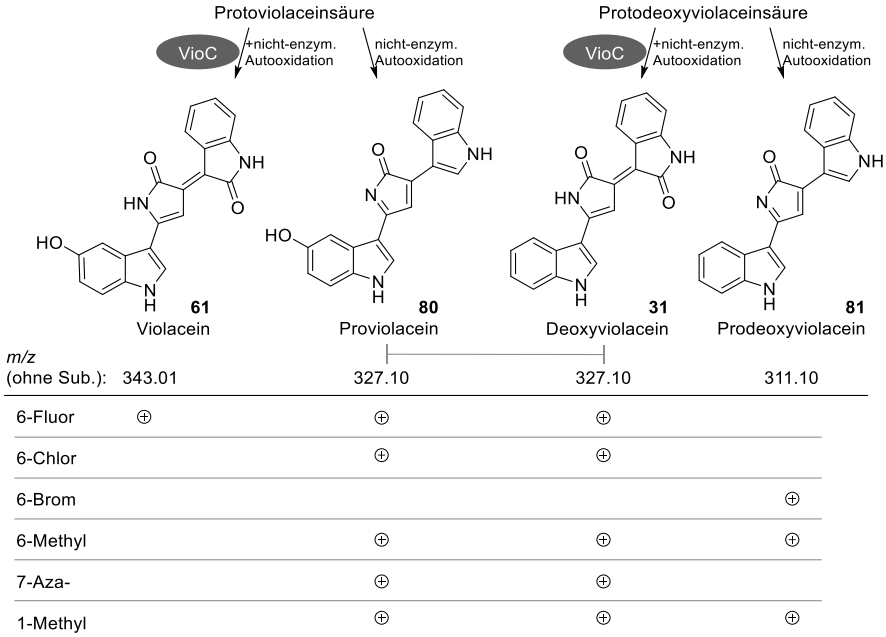


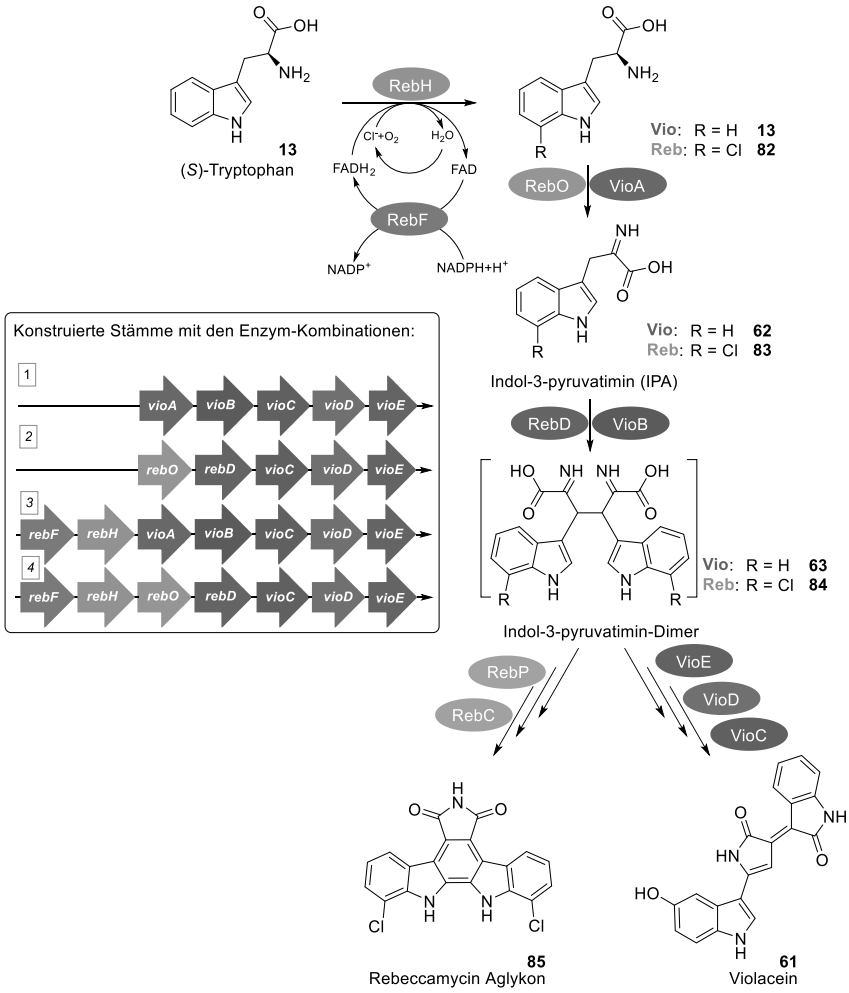
Abbildung 16: Ergebnisse der chemoenzymatischen Umsetzung von Tryptophan-Analoga mit den Enzymen des Violacein-Biosynthesewegs nach Ellis *et al.*[136] Dazu ist der Biosynthese-Pfad zum Violacein (**62**) mit weiteren Autooxidationsprodukten gezeigt sowie die dazugehörigen Masse/Ladungs-Verhältnisse der Endprodukte ohne den jeweiligen Substituenten. Wurden die entsprechenden Massen detektiert, sind diese mit einem + markiert.

Aus dem chemoenzymatischen Ansatz konnte nur für 6-Fluor-Tryptophan das finale Violacein-Äquivalent gefunden werden. Für die Substituenten 6-Chlor, 7-Aza und 7-Methyl wurden Analoga des Proviolaceins (**80**) bzw. Deoxyviolaceins (**31**) detektiert, während für 6-Brom nur das Prodeoxyviolacein-Analogon (**81**) gefunden wurde. Zusätzlich wurden für alle Substituenten außer 7-Aza die Massen der Protoviolaceinsäure (**65**) und des IPA-Imin-Dimers (**63**) gefunden (hier nicht gezeigt, siehe Schema 8). In der Publikation wurde außerdem noch differenziert, ob der Substituent nur auf einer Seite des Moleküls erscheint oder ob beide Indole entsprechend substituiert sind. In den meisten Fällen wurden jedoch sowohl das einfach-substituierte als auch das doppelt-substituierte Produkt gefunden (Abbildung 16). Lediglich bei der 6-Chlor-Reihe wurde das doppelt-substituierte Deoxyviolacein/Proviolacein detektiert, das einfach-substituierte allerdings nicht.

Die Untersuchung konnte demnach zeigen, dass für die Enzyme VioA, VioB und VioE eine hohe Toleranz gegenüber anderen Tryptophan-Derivaten besteht. Auch VioC und VioD konnten teilweise einige Intermediat-Analoga umsetzen, wodurch die Möglichkeit für weiteres e*nzyme-engineering* geboten ist. Hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass vor allem 6-Fluor-Tryptophan bis zum Violacein (**61**) umgesetzt werden konnte. Aufgrund der Tatsache, dass Fluor im Vergleich zu den anderen getesteten Substituenten den geringsten sterischen Anspruch aufweist, könnten die größeren Substituenten die Anlagerung der Substrate in den entsprechenden Enzymkavitäten einschränken.[136]

Anschließend wurde von Freemont *et al.* versucht, auch mithilfe von *in vivo* Ansätzen Violacein-Derivate zu generieren.[137] Dazu wurden *E. coli* Stämme mit verschiedenen neu generierten Plasmiden transformiert, welche nicht nur den natürlichen Violacein-Gencluster

codierten, sondern auch Sequenzen für die Enzyme RebO, RebD, RebH und RebF (Schema 11). Diese Enzyme gehören zum Biosynthese-Pfad vom eng verwandten Naturstoff Rebeccamycin, welcher strukturell auch aus einem Bis-Indol besteht.[138] Dessen Enzyme RebO und RebD sind Homologe von VioA und VioB und katalysieren demnach die gleiche Reaktion, allerdings wird in der Biosynthese zum Rebeccamycin Tryptophan (**13**) zuvor durch die Enzyme RebH und RebF zum 7-Chlortryptophan (**82**) umgesetzt. Daher haben die Enzyme des nachfolgenden Rebeccamycin-Pfads auch eine höhere Affinität zu den chlorierten Verbindungen **83** und **84** im Vergleich zu den unsubstituierten Intermediaten (IPA (**62**) und IPA-Dimer (**63**)).[139] Anschließend spaltet sich die Biosynthese der zwei Naturstoffe auf, da für den Aufbau des Carbazolringsystems des Rebeccamycins zunächst Chromopyrrolsäure generiert wird. Aus dem hier gezeigten Rebeccamycin-Aglykon (**85**) wird Rebeccamycin durch Glukosylierung am Carbazol-Stickstoff sowie Methylierung am Sauerstoff durch RebG und RebM erhalten.[138, 140]



Schema 11: Von Freemont *et al.* konstruierte Plasmide 1-4, welche in *E. coli* eingebracht wurden.[137] Die Enzyme RebFHOD stammen aus der Biosynthese von Rebeccamycin Aglykon (**85**), welche ebenfalls dargestellt ist und zum Teil mit der Biosynthese des Violaceins übereinstimmt.

Aus der Kultivierung der verschiedenen *E. coli* Stämme (transformiert mit den Plasmiden 1-4) konnten mittels LC/HRMS-Nachweis verschiedene Ergebnisse gezeigt werden: Zum einen konnte mit Stamm 2 gezeigt werden, dass die Enzyme RebO und RebD VioA und VioB erfolgreich ersetzen konnten, da zwar kein halogeniertes Violacein erhalten wurde, jedoch aber die natürliche Verbindung. Dies entsprach den Erwartungen, da den Bakterien kein halogeniertes Tryptophan zugefüttert wurde und diese selbst kein chloriertes Tryptophan produzieren können. Die Stämme 3 und 4 hingegen waren dazu in der Lage, da RebFH die Chlorierung von natürlichem Tryptophan (**13**) zum 7-Chlortrypophan **82** katalysieren. Zum anderen konnte über den Vergleich der beiden Stämme 3 und 4 gezeigt werden, dass durch den Austausch von VioAB mit RebOD ein höherer Gehalt an halogenierten Verbindungen erzielt werden kann (6 % bei Stamm 3 zu 33 % bei Stamm 4). Dabei ist anzumerken, dass der Chlor-Substituent in gleichen Anteilen sowohl an der Indol als auch an der Oxindol-Hälfte des Deoxyviolaceins angefügt wurde. Ein chloriertes Violacein-Analogon wurde nur in geringen Spuren detektiert (bei Stamm 4). Außerdem wurde nahezu kein doppelt chloriertes Deoxyviolacein nachgewiesen. In der Publikation wurden weiterhin noch verschiedene Promotoren vor den entsprechenden Genclustern getestet, um damit die Anzahl an Transkripten und damit letztlich die Menge an chlorierten Intermediaten zu erhöhen.

Um noch weitere Violacein-Derivate mittels Kreuz-Kupplung zugänglich zu machen, wurden anschließend noch Kultivierungen mit *vioABCDE* exprimierenden *E. coli* Stämmen durchgeführt, welchen racemisches 5-Bromtryptophan zugefüttert wurde. Auch an dieser Stelle wurde kein doppelt bromiertes, sondern lediglich einfach-substituiertes (Deoxy-)Violacein nachgewiesen. In *small-scale* Ansätzen wurden anschließend Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplungen durchgeführt, um verschiedene elektronenziehende wie auch und elektronenschiebende Arylresten anzufügen. Die entsprechenden Naturstoff-Derivate wurden mittels LC und HMRS nachgewiesen. Die Isolation der generierten Derivate konnte allerdings nicht durchgeführt werden, einerseits aufgrund der geringen Titer der Zielverbindung und andererseits aufgrund der Tatsache, dass die chromatographische Auftrennung vermutlich durch π-*stacking* fehlschlägt und damit immer zur Co-Elution mehrerer Verbindungen führte.

Über eine zweischrittige Synthese wurden geringe Mengen des 5-Bromdeoxyviolaceins synthetisch hergestellt, welches unter den beschriebenen Kreuzkupplungs-Bedingungen in das 5‘-(*p*-Carboxyphenyl)-deoxyviolacein umgesetzt wurde. Während die mittels LC-MS abgeschätzte Ausbeute der Suzuki-Reaktion bei mehr als 70 % lag, wurde nach der chromatographischen Aufreinigung lediglich eine Ausbeute von 41 % erhalten, was erneut die Schwierigkeiten in der Handhabung dieses Naturstoffs belegt. Die synthetisch hergestellte Verbindung diente als Referenz und bestätigte mittels LC-MS, dass auch aus dem biosynthetisch produziertem Deoxyviolacein dasselbe Naturstoff-Derivat erhalten wurde.

3.2. Spezielle Zielsetzung

Die Naturstoffe Violacein (**61**) und Deoxyviolacein (**31**) wurden in vielerlei Hinsicht schon genau untersucht, was im Hinblick auf die vielfältigen physiologischen Eigenschaften nicht verwunderlich scheint. Die publizierten Totalsynthesen machen die Verbindungen zudem in wenigen und technisch simplen Schritten zugänglich. Dennoch ist die Gesamtausbeute der meisten Synthesen nicht sonderlich hoch, was durch die geringe Löslichkeit und das hohe Oxidationspotential des Naturstoffs begründet werden kann. Langwierige Reinigungsschritte und harsche (oxidative) Reaktionsbedingungen sind daher nachteilig.

In einer Vielzahl der Untersuchungen von (Deoxy-)Violacein wurde der Naturstoff folglich aus der Kultivierung entsprechender Expressionswirte generiert, wie z. B. *E. coli*. Dazu wurden die Bakterien meist mit Plasmiden transformiert, welche den *vio*-Gencluster enthalten. Auf diese Weise können schnell viele Violacein-produzierende Stämme generiert werden, jedoch beinhaltet dieser Ansatz auch einige Nachteile. So wirkt sich die Anzahl der vorliegenden Plasmide im Expressionswirt direkt auf die Enzymexpression des *vio*-Genclusters und damit auf die Violacein-Produktion aus. Eine hohe Replikationszahl des Plasmids muss daher zu jedem Zeitpunkt gewährleistet sein. Außerdem enthalten die eingebrachten Plasmide gewöhnlich ein Antibiotika-Resistenzgen, womit durch dauerhaften Selektionsdruck garantiert wird, dass das Plasmid sich noch im Organismus befindet. Sowohl die Expression der Resistenzgene als auch die Replikation des Plasmids führt zu einem erhöhten Energieverbrauch des Expressionswirts und kann dadurch die Violacein-Produktion verringern. Diese Problematik kann umgangen werden, indem der Gencluster in die genomische DNA integriert wird. Dies beinhaltet einen größeren Aufwand bei der Konstruktion eines Stammes im Vergleich zur Plasmid-basierten Expression, allerdings kann so garantiert werden, dass die erhaltenen Stämme langfristig stabil bleiben und einen höheren Produkttiter generieren.

Das Ziel dieses Projekts war daher die mutasynthetische Produktion von Deoxyviolacein-Derivaten durch *Pseudomonas putida* KT2440 (im Folgenden *P. putida*) Stämme, indem der *vio*-Gencluster genomisch integriert wird. Damit nicht ein Gemisch aus Violacein und Deoxyviolacein erhalten wird, sollte dabei eine Mutation in *vioD* eingefügt werden, sodass ein fehlgefaltetes und damit inaktives Enzym entsteht. Zusätzlich sollten die *P. putida* Stämme durch *knock-out* der entsprechenden Gene kein eigenes Tryptophan mehr produzieren können und somit auf die externe Zufuhr von Tryptophan angewiesen sein, damit die Reinheit des produzierten Naturstoff-Derivats durch entsprechende Zugabe von Tryptophan-Analoga weiterhin erhöht wird. Die Mutasynthese-Kultivierung soll zusätzlich nicht nur im *Batch* durchgeführt werden, sondern unter genauer Beobachtung und Kontrolle der biologischen Parameter im Bioreaktor optimiert werden. Die benötigten Tryptophan-Analoga sollen synthetisch bereitgestellt werden sowie die möglichen Naturstoff-Derivate zur Referenz totalsynthetisch hergestellt werden (Abbildung 17).

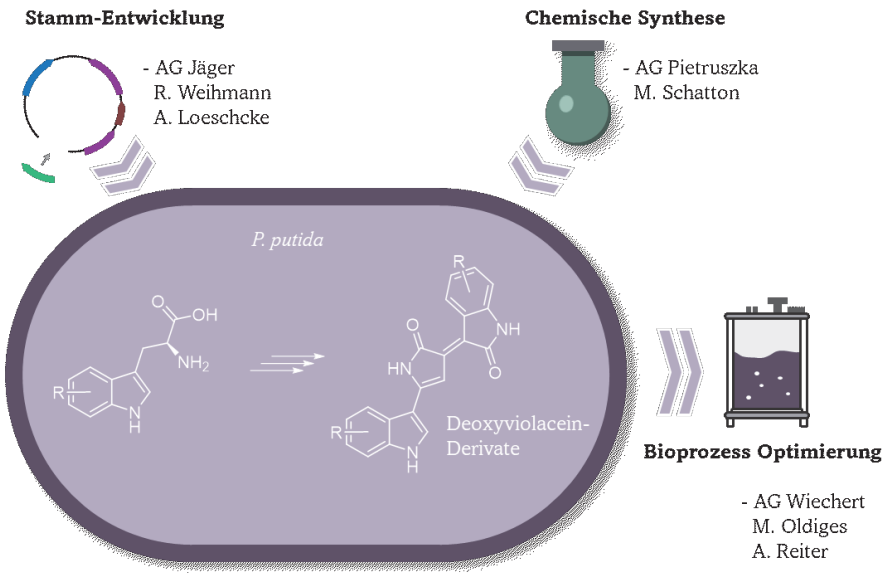


Abbildung 17: Schematische Zielsetzung hinsichtlich der mutasynthetischen Produktion von Deoxyviolacein-Derivaten durch *P. putida* KT2440 in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen (AG) Jäger und Wiechert im Rahmen des *Viola*-BioSC-Projekts.

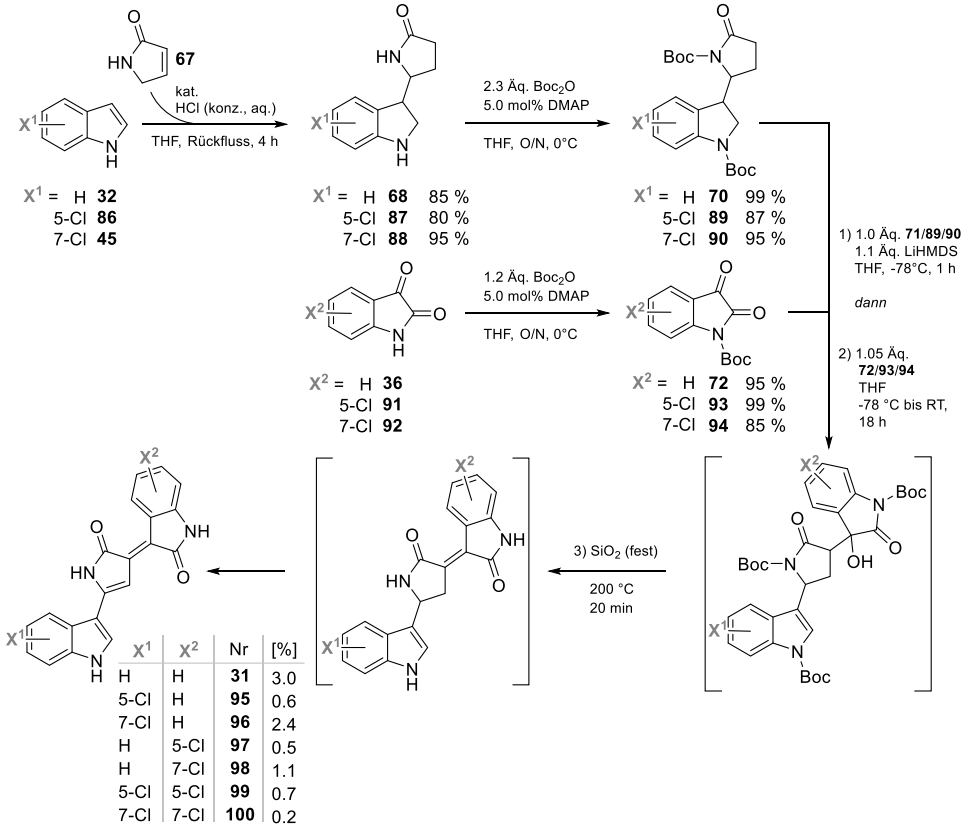
Initial sollen 5- und 7-chlorierte Derivate des Deoxyviolaceins anvisiert werden, da mit diesem Substitutionsmuster die Produktion der Naturstoffderivate besonders aussichtsreich ist. Dies wird dadurch begründet, dass Chlor einen geringen sterischen Anspruch darstellt, während es gleichzeitig nicht zu stark elektronenziehend ist (wie z. B. Fluor). Die 5- und 7-Position wurden in diesem Kontext ausgewählt, da für diese Verbindungen ebenfalls eine geringe sterische Hinderung zu erwarten ist. Einerseits, da beim Violacein ohnehin am Indol ein 5-Hydroxysubstituent angefügt ist und die entsprechenden Enzyme somit dort ausreichend Platz innerhalb des aktiven Zentrums haben sollten, und andererseits, da auch in diesem Fall nicht nur der native v*io*-Gencluster sondern ebenfalls ein adaptierter Gencluster mit den homologen Genen *rebOD* verwendet werden soll (wie schon bei Freemont *et al.* gezeigt, siehe Schema 10[137]). Bei einer erfolgreichen Produktion von Deoxyviolaceinderivaten sollen anschließend auch weitere Tryptophan-Analoga bereitgestellt und mithilfe der etablierten Kultivierungsbedingungen umgesetzt werden.

3.3. Ergebnisse und Diskussion

Das folgende Kapitel enthält Ergebnisse, die im Rahmen des BioSC-geförderten Projekts ‚Viola' in Kooperation mit A. Reiter, A. Loeschcke und R. Weihmann generiert wurden. Insbesondere die biologischen Arbeiten bezüglich der Entwicklung der *P. putida* KT2440 Stämme in Kapitel 3.3.4 wurden ausschließlich von R. Weihmann und A. Loeschcke durchgeführt. Die Mutasynthese-Kultivierungen in Kapitel 3.3.5 wurden in Zusammenarbeit mit A. Reiter und A. Loeschcke durchgeführt. Einige der Deoxyviolacein-Verbindungen wurden zudem im Rahmen eines Praktikums von T. Scholz, C. Pawlowsky und L. Meerkatz synthetisiert.

3.3.1. Totalsynthese von Referenzprodukten

Zunächst wurden die anvisierten Deoxyviolacein-Derivate totalsynthetisch hergestellt, um die späteren mutasynthetischen Ansätze vereinfacht mithilfe von HPLC-Proben analysieren zu können. Auf diese Weise könnten selbst geringe Mengen eines potenziellen Derivats anhand der Retentionszeit und des Absorptionsspektrums identifiziert werden. Dafür wurde die Violacein-Synthese nach Steglich verfolgt, da sie in nur wenigen Schritten den Naturstoff bereitstellt (Schema 12).[104]



Schema 12: Durchgeführte Totalsynthese von Deoxyviolaceinderivaten ausgehend von 5-chloriertem, 7-chloriertem und unsubstituiertem Indol (**86**, **45** und **32**) und 5-chloriertem, 7-chloriertem und unsubstituiertem Isatin (**92**, **91** und **36**) nach Steglich *et al.*[104]

Da in der Biosynthese nicht determiniert werden kann, ob das zugefütterte, substituierte Tryptophan in den späteren Indol- und/oder Oxindolring des Deoxyviolaceins (dVio) eingebracht wird, ergeben sich bei der Zugabe von einem Tryptophan-Analogon direkt drei potenzielle dVio-Derivate, deren chromatographische und physikalische Eigenschaften sich stark unterscheiden können. Da zunächst 5-Chlor- und 7-Chlor-substituierte Varianten in den Fokus gerückt wurden, ergeben sich daher sechs dVio-Derivate, die synthetisiert wurden.

Die Synthese beginnt auf der Stufe des Indols **32**, **45** und **86**, welches unter sauren Bedingungen das Pyrrolidinon **67** nukleophil angreift, wobei das Addukt in sehr guten Ausbeuten für alle drei Beispiele **68**, **87** und **88** entsteht. Die nachfolgende Boc-Schützung verlief für alle drei Verbindungen **70**, **89** und **90** in nahezu quantitativer Ausbeute. Gleichermaßen konnten auch die Boc-Isatine **93**, **94** und **72** in exzellenten Ausbeuten erhalten werden. Der finale Schritt der Synthese beinhaltet die α-Deprotonierung von Verbindung **70**, **89** und **90** zum Enol, welche anschließend in einer Aldol-Kondensation mit dem jeweiligen Boc-geschützten Isatin zum dVio reagieren. Dabei wird das Produkt der Aldoladdition in einem Zwischenschritt wässrig aufgearbeitet, ehe die Kondensation, Dehydratisierung und Boc-Abspaltung in einer Festkörperreaktion mit Silica unter endothermen Bedingungen stattfinden.

Gemäß Steglich *et al.* wurde für diesen Schritt zum dVio (**31**) eine Ausbeute von 20 % publiziert, dies konnte jedoch weder für die unsubstituierte Verbindung **31**, noch für die mono- oder die disubstituierten dVios **95-100** reproduziert werden. In allen Fällen wurden nur Spuren im einstelligen Prozentbereich (0.2-2 %) des Naturstoffs erhalten. Dafür gibt es mehrere mögliche Gründe:

1. Überoxidation: Im letzten Schritt der Synthese wird das Rohprodukt der Aldoladdition auf Silica addiert und das Lösungsmittel vollständig entfernt. Das resultierende, rötlich-weiße Silica wird dann stark erhitzt, wobei sich einerseits drei Äquivalente *tert*-Butyloxycarbonyl sowie je ein Äquivalent Wasser und Wasserstoff vom Molekül abspalten. Zusätzlich wird potenziell noch nicht vollständig entferntes Lösungsmittel ebenfalls freigesetzt. Aus Sicherheitsgründen wurde diese Reaktion daher immer in nicht-geschlossener Atmosphäre durchgeführt, wodurch Sauerstoff (sowohl aus der Luft, als auch aus dem Silica selbst) das Molekül überoxidieren könnte. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass eine sorgfältig präparierte Intertgasatmosphäre die Überoxidation einschränken könnte.
2. Überwachung des Reaktionsfortschritts: Da der letzte Schritt ohne Lösungsmittel in einer 20-minütigen Festkörperreaktion stattfindet, kann nicht wie gewöhnlicherweise der Reaktionserfolg mithilfe von Dünnschichtchromatographie (DC) überwacht werden. Die Entnahme einer Probe unter diesen Bedingungen sowie die Durchführung einer DC, gepaart mit den problematischen Chromatographie-Eigenschaften des dVio, dauert im Vergleich zur Reaktionszeit zu lang, um eine Echtzeit-Überwachung der Reaktion zu ermöglichen. Stattdessen wurde die Bildung der Farbpigmente als ausschlaggebendes Indiz hinzugezogen, da sich das Silica blau-violett färbt, sobald das konjugierte π-System des dVio entstanden ist. Demnach musste abgeschätzt werden, ab welchem Zeitpunkt die Reaktion gestoppt wird, um einerseits keine Überoxidation zu riskieren, aber andererseits vollen Umsatz des Eduktes zu garantieren.
3. Nebenprodukt: Für alle Reaktionen wurde nicht nur ein violettes Reaktionsprodukt erhalten, sondern ein weiteres blaues Nebenprodukt.

4. Isolation des Reaktionsproduktes: In der Publikation von Steglich *et al.* wurde das dVio erfolgreich über eine chromatographische Reinigung in PE/EE über Silica isoliert. Auch dies konnte nicht reproduziert werden, da in Abhängigkeit vom Laufmittel, entweder das Produkt mit deutlichen Verunreinigungen erhalten wurde, oder schlichtweg kaum eluiert wurde (trotz der optischen Trennung der farbigen Produkte – Abbildung 18). In vielen weiteren Publikationen wurden ähnliche Beobachtungen geschildert, welche die problematische Reinigung des (Deoxy-)Violaceins beschreiben. In erster Linie ist vor allem die geringe Löslichkeit des dVio ausschlaggebend, wodurch unverhältnismäßige Mengen des Elutionsmittels benötigt werden. Daher wurde in diesem Fall die Reinigung nicht in Normalphase (NP) mit Silica als polarer, stationärer Phase durchgeführt, sondern eine *reversed-phase* (RP) Reinigung mit einer unpolaren, stationären Phase (C18-alkyliertes Silica) am Chromatographie-Automaten (Äkta) präferiert. In diesem Fall sind keine Löslichkeitsprobleme aufgefallen, welche die Reinigungseffizienz verringert haben.



Abbildung 18: Foto der chromatographischen Reinigung des Rohprodukts nach der Aldol-Kondensation in Normalphase.

Demnach wurde für alle sechs Derivate nach der Aldol-Kondensation das Silica abfiltriert und das braune Rohprodukt nach Entfernung des Lösungsmittels direkt auf die RP-Phase Säule injiziert. Aus der chromatographischen Reinigung ergab sich für fast alle Derivate eine violette und eine blaue Fraktion. In einigen Fällen gab es zusätzlich eine rote Fraktion, welche das noch nicht dehydrierte Intermediat nach erfolgter Aldol-Kondensation enthielt (und somit noch nicht vollständig umgesetzt wurde). In Abbildung 19 sind alle drei Fraktionen (rot, lila und blau) von 5-Chlor-dVio **95** gegen die Elutionszeit mit ihrem jeweiligen Absorptionsspektrum beispielhaft dargestellt. Aus den Absorptionsspektren der drei Produktfraktionen lässt sich schließen, dass es sich bei der violetten Fraktion vermutlich um das gewünschte dVio **95** (gemessen: 554 nm, publizierter Wert für dVio (**31**): 553 nm) handelt. Das Absorptionsmaximum des bläulichen Produkts liegt bei einer Wellenlänge von 636 nm, während es für das rotfarbene Produkt bei 371 nm liegt. Die Molekülmassen der drei Produkte wurden zudem mittels hochaufgelöster Massenspektrometrie (HRMS) untersucht und ergaben eine Molekülmasse von 364.0850 g/mol für das rote, 362.0693 für das violette und 362.0684 für das blaue Produkt. Daher handelt es sich bei dem rot gefärbten Produkt vermutlich um ein Intermediat, bei dem die Dehydration und damit die Konjugation der zwei aromatischen Systeme noch nicht stattgefunden hat, was die starke Blauverschiebung des Absorptionsmaximums erklärt.

Der Unterschied zwischen dem blauen und dem violetten Produkt scheint hingegen nur marginal zu sein, da auch die NMR-Spektren der zwei Verbindungen sehr ähnlich aussehen. Möglich wäre eine unterschiedliche Ausrichtung des Isatinrings an der Doppelbindung zum Pyrrolidon. Da im Zuge der Aldol-Addition zwei sp^3-hybridisierte Stereozentren an *C3*‘ und *C3*‘‘ entstehen, welche anschließend bei der nachfolgenden Kondensation wieder zu einem planaren System umgesetzt werden, wäre an dieser Stelle somit die Bildung einer *E*- oder einer *Z*-konfigurierten Verbindung möglich. In ROESY-NMR-Spektren konnten jedoch keine entsprechenden Signale detektiert werden, welche diese Vermutung stützen.

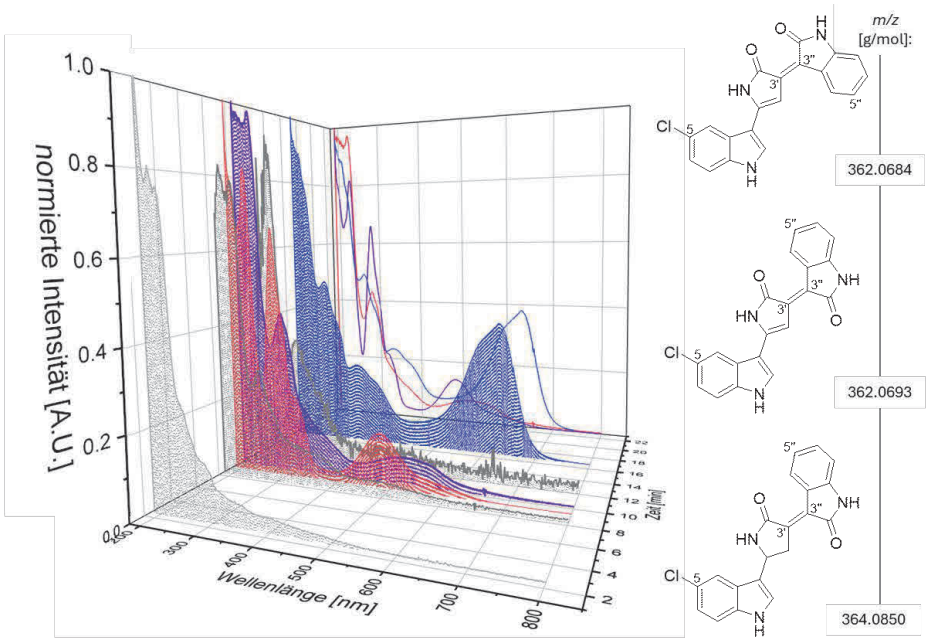


Abbildung 19: Auftragung des normierten Absorptionsspektrums (Intensität gegen Wellenlänge) gegen die Elutionszeit der drei gesammelten Fraktionen von 5-Chlor-dVio **95** mit überlappender Darstellung im Hintergrund. Minute ~9: Elution der roten Fraktion; Minute ~10: Elution der violetten Fraktion; Minute ~16: Elution der blauen Fraktion

Nach der RP-Reinigung wurde anschließend eine analytische HPLC-Methode etabliert, bei der sowohl alle sechs Derivate, als auch das native dVio voneinander getrennt werden können. Dabei erwies sich ebenfalls eine RP-Phase HPLC als vorteilhaft. In Abbildung 20 sind die daraus generierten Chromatogramme überlappend dargestellt, wobei für jede Verbindung die Wellenlänge des charakteristischen Absorptionsmaximums verwendet wurde.

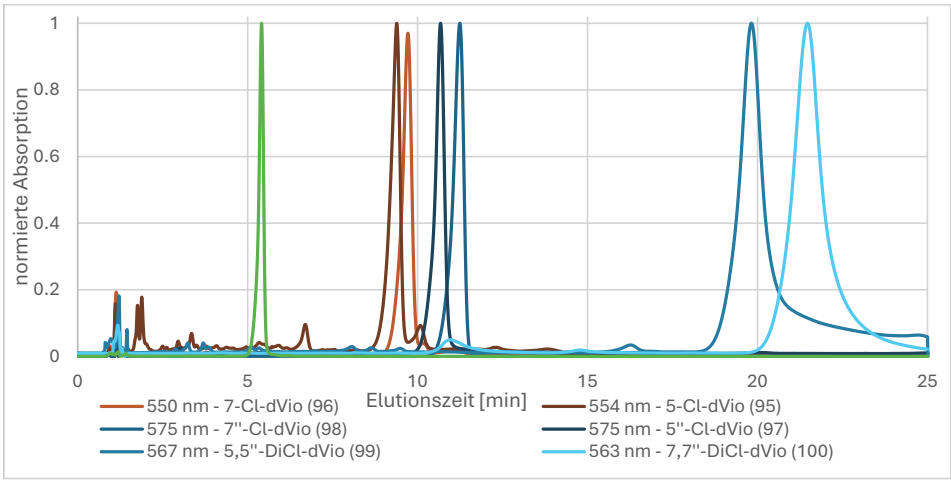


Abbildung 20: Überlagertes Chromatogramm aller sechs verschiedenen dVio-Derivate und des natürlichen dVio bei gleichbleibender HPLC-Methode (Isaspher C18-Säule mit Wasser/Acetonitril: 55/45). Aufgetragen ist die Absorption (normiert auf den höchsten Absorptionswert) bei der maximalen Absorptionswellenlänge gegen die Elutionszeit.

Unter der verwendeten HPLC-Methode wurde für alle Verbindungen eine unterschiedliche Retentionszeit festgestellt. Sowohl die Retentionszeit als auch das Absorptionsmaximum scheinen sich je nach Substitution systematisch zu verändern. Durch das Anfügen eines Chlor-Substituenten wird der Naturstoff später eluiert und interagiert demnach stärker mit der unpolaren, stationären Phase. Eine doppelte Substitution verstärkt diesen Effekt deutlich. Außerdem führte die Substitution am Indolring zu einer leichten Blauverschiebung des Absorptionsmaximus (5-Cl-dVio **95**: -9 nm / 7-Cl-dVio **96**: -13 nm) im Vergleich zu dem hier gemessenen Wert des nativen dVio **31**. Wird jedoch der Oxindolring substituiert, kommt es zu einer leichten Rotverschiebung des Absorptionsmaximums (5''-Cl-dVio **97**: +12 nm / 7''-Cl-dVio **98**: +12 nm). Bei der doppelten Substitution scheinen sich diese Effekte wieder auszugleichen (5,5''-DiCl-dVio **99**: +4 nm / 7,7''-DiCl-dVio **100**: ±0 nm).

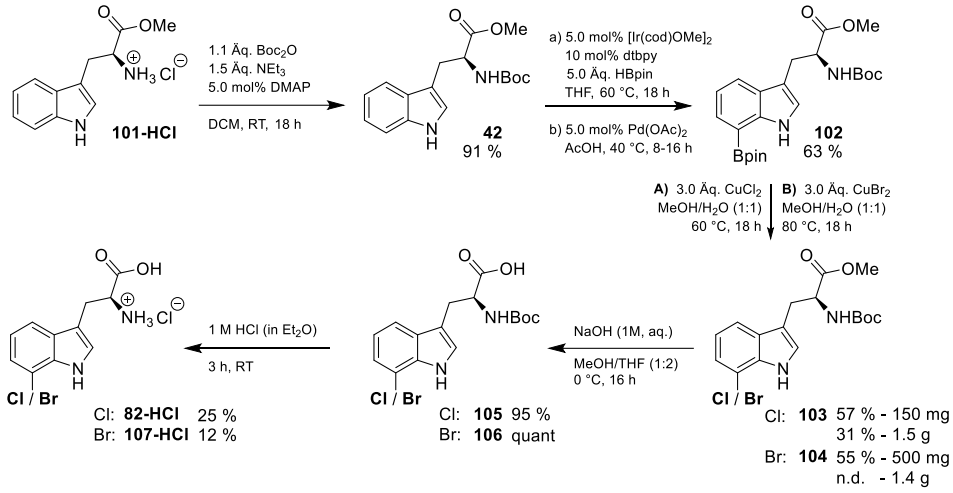
Anhand der Retentionszeit und des Absorptionsspektrums sollte somit mit dieser HPLC-Methode eine Unterscheidung der verschiedenen Derivate zur Detektion nach erfolgter Mutasynthese möglich sein. Die Totalsynthese konnte somit dem Zweck dienen, dVio-Derivate als Referenzen bereitzustellen, aufgrund der aufgeführten Gründe ist die Ausbeute jedoch nur sehr gering. Dies begründet allerdings auch die Herangehensweise über die Mutasynthese, da sie die aufwendige und ineffiziente Totalsynthese umgeht. Darüber hinaus unterstreichen die Erkenntnisse aus der herausfordernden Reinigung der dVio-Derivate, dass die Produktion des Naturstoffs in einer hohen Reinheit von entscheidender Bedeutung ist.

3.3.2. Metall-katalysierte Synthese von Tryptophan-Analoga

Für die Durchführung der Mutasynthese-Versuche wurden neben Referenzen der anvisierten Derivate auch die Tryptophan-Analoga selbst benötigt, um die *P. putida* Stämme damit füttern zu können. Da dieser Gesamtprozess später auf den Maßstab eines Bioreaktors erweitert werden soll (ca. 3-5 L), werden große Mengen der Analoga benötigt. Es sind zwar einige funktionalisierte Tryptophane kommerziell erhältlich, jedoch sind insbesondere die enantiomerenreinen Verbindungen nicht kostengünstig. Aufgrund der Tatsache, dass (*R*)-Tryptophan in zahlreichen Fällen von Enzymen nicht als Substrat akzeptiert wird und potenziell als kompetitiver Inhibitor die Mutasynthese beeinträchtigen könnte, sollten die Tryptophan-Analoga enantiomerenrein (in (*S*)-Form) in ausreichender Menge zugänglich gemacht werden.

Dafür wurden zunächst chemische Methoden berücksichtigt, welche ausgehend vom günstigen Tryptophan mithilfe von CH-Aktivierung entsprechende Trp-Analoga hervorbringen können. Da die Borylierungssequenz nach Movassaghi *et al.* (Kapitel 2.2.1 – Schema 2) schon bei geschützten Tryptophanverbindungen im größeren Maßstab angewandt wurde, konnte diese Methode als Startpunkt verwendet werden (Schema 13). Das benötigte Boc- sowie Methyl-geschützte Tryptophan **42** wurde dafür ausgehend vom Tryptophanmethylester **101-HCl** in guten Ausbeuten erhalten. Die nachfolgende Borylierungssequenz konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden, wobei die Ausbeute von Verbindung **102** mit 63 % leicht unter der publizierten Ausbeute liegt (Lit. 73 %). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass während der Protoborylierung zunächst die 2-Borylgruppe abgespalten wird, jedoch auch die 7-Borylgruppe unter diesen Bedingungen nicht langfristig stabil ist. Der Zeitpunkt, an dem die Reaktion gestoppt wird, ist somit entscheidend, um eine hohe Ausbeute zu ermöglichen. Anschließend wurde der Boronsäureester **102** mithilfe von Kupferdichlorid bzw.

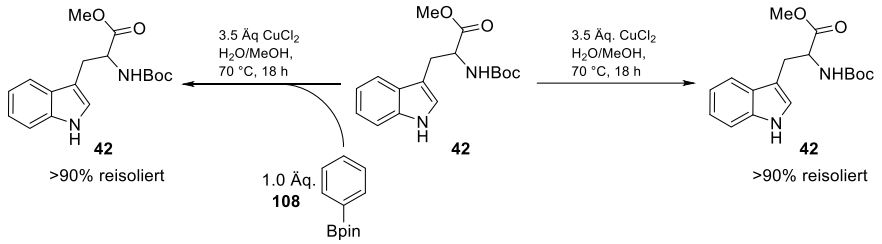
Kupferdibromid durch Chlor bzw. Brom substituiert. Während für diese Reaktion in kleineren Ansätzen 50-500 mg moderate Ausbeuten erhalten wurden (Verbindung **103** und **104**), wurde in größeren Ansätzen (1.4-1.5 g) ein starker Ausbeuteverlust (<31 %) verzeichnet. Gleichzeitig konnte in dieser Reaktion weder ein Nebenprodukt noch das unveränderte Edukt reisoliert werden. Abschließend wurden die angefügten PGs entfernt, wobei der Ester unter basischen Bedingungen hydrolysiert (Verbindung **105** und **106)** und die Boc-Gruppe unter sauren Bedingungen entfernt wurde. Durch den Einsatz von Chlorwasserstoff in Diethylether wurde Verbindung **105** bzw. **106** nicht nur zum Amin, sondern direkt zum entsprechenden Hydrochlorid umgesetzt, wodurch das Salz im organischen Lösungsmittel ausfällt. Die Ausbeute von 25 % für Verbindung **82-HCl** respektive 12 % für Verbindung **107-HCl** kann durch eine zu kurze Reaktionszeit (und damit unvollständige Reaktion) sowie durch eine unvollständige Produktextraktion begründet werden, da die Filtration des ausgefallenen Hydrochlorids sich eher bei großen Ansätzen eignet, während bei kleinen Ansätzen größere Mengen des Produkts beim Waschen in der organischen Fraktion als freies Amin verbleiben. Jedoch kann dieses ohne Schwierigkeiten erneut mit Chlorwasserstoff versetzt werden und so sukzessive zum Hydrochlorid umgesetzt werden.



Schema 13: Synthese von 7-Chlor und 7-Bromtryptophan **82** und **107** über die Borylierungs/Protodeborylierungs-Sequenz nach Movassaghi *et al.* mit anschließender Chlorierung bzw. Bromierung und Entfernung der PGs.

Die sechsschrittige Synthese zum funktionalisierten Tryptophan ist somit konzeptionell erfolgreich durchgeführt worden, jedoch ist die Gesamtausbeute mit nur 4 % (bzw. 17 % ohne die Boc-Entschützung) deutlich zu gering, um große Mengen damit herzustellen. Dabei ist vor allem die Chlorsubstitution kritisch zu betrachten, da mit nur ca. 30 % Ausbeute ein großer Anteil des eingesetzten Materials verloren geht. Da in diesem Schritt kein Edukt oder Nebenprodukt reisoliert werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass die hohen Ausbeuteverluste durch Oxidation/Polymerisation hervorgerufen werden, deren Produkte sich nicht mehr extrahieren oder isolieren lassen. Die Chlorierung wurde dazu sowohl unter atmosphärischem Sauerstoff als auch unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt (unter Verwendung der Schlenk-Technik und in entgastem Lösungsmittel, siehe Kapitel 7.1), was das Reaktionsergebnis jedoch nicht beeinflusst hat.

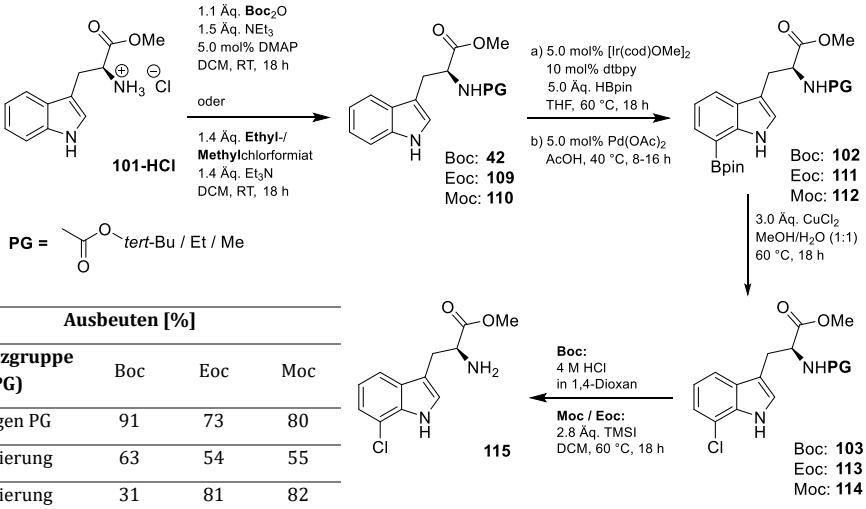
Um den Grund der Ausbeuteverluste zu erforschen, wurde nachfolgend die Stabilität des Boc-geschützten Tryptophanmethylesters untersucht. Dazu wurde die Verbindung **42** den Chlorierungsbedingungen ausgesetzt, da jedoch keine Borfunktion im Molekül enthalten ist, sollte somit lediglich das Startmaterial isoliert werden (Schema 14 – rechts). Um ebenfalls zu untersuchen, ob aus der Substitution freigesetzte Borspezies potenziell eine Nebenreaktion induzieren, wurde einem weiteren Ansatz zusätzlich Benzylpinakolboronsäureester (**108**) der Reaktion hinzugefügt.



Schema 14: Untersuchung der Stabilität des Boc-geschützen Tryptophanmethylesters **42** unter Chlorierungsbedingungen unter Ausschluss/Zugabe eines Boronsäureesters.

In beiden Fällen blieb ein Großteil der Verbindung **42** (>90 %) jedoch unverändert. Somit konnte nicht genauer beleuchtet werden, wodurch die Ausbeuteverluste in der Chlorierung hervorgerufen werden.

Anschließend wurde untersucht, inwiefern die Boc-PG bei dieser Reaktion problematisch ist. Dazu wurde statt des *tert*-Butylrestes nun ein Ethyl- (Eoc) oder Methylrest (Moc) verwendet, welche keinen tertiären Kohlenstoff am Carbamat-Sauerstoff enthalten und damit einen schwächeren +I-Effekt vorweisen (Schema 15).



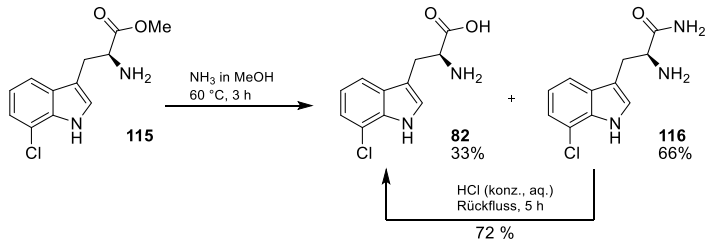
Ausbeuten [%]			
Schutzgruppe (PG)	Boc	Eoc	Moc
Anfügen PG	91	73	80
Borylierung	63	54	55
Chlorierung	31	81	82
Entfernung PG	95	87	73
Gesamt	**17**	**28**	**27**

Schema 15: Vergleich der verschiedenen PG in der Synthese von funktionalisierten Tryptophanen ausgehend von (*S*)-Tryptophanmethylester **101-HCl**.

Um die Eoc- und Moc-PG anzufügen, wurde Ethyl- bzw. Methylchlorformiat verwendet. Mit 73 bzw. 80 % Ausbeute konnten die geschützten Tryptophanverbindungen **109** und **110** in einem vergleichbaren Rahmen erhalten werden, wie bei der Verwendung von Boc-Anhydrid für

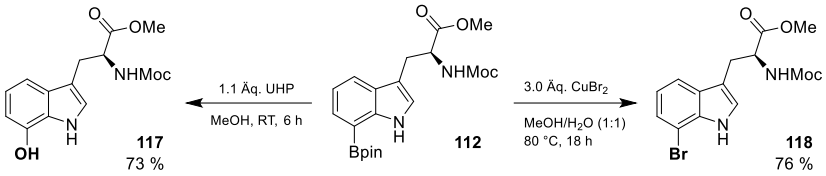
Verbindung **42**. Ebenso konnte die Borylierung mit einer vergleichbaren Ausbeute durchgeführt werden (54 bzw. 55 % für Verbindung **111-112**). Ein deutlicher Unterschied zeigt sich jedoch in der nachfolgenden Chlorierung, die mit über 80 % eine deutlich höhere Ausbeute aufweist. In Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Boc-Gruppe bei der Umsetzung des Boronsäureesters zum Chlorid nicht stabil ist und es zu einer Nebenreaktion kommt. Somit kann angenommen werden, dass die erhöhte Stabilität der Eoc- und Moc-PG das Auftreten der entsprechenden Nebenreaktion verhindert. Infolgedessen werden für die Spaltung der stabileren Eoc/Moc-Gruppe der Verbindungen **113-114** jedoch auch harschere Reagenzien benötigt, um das Amin **115** zu erhalten. Während die Boc-PG noch mit Salzsäure entfernt werden konnte, wird für die Eoc/Moc-PG Trimethylsilyliodid (TMSI) benötigt, dessen Handhabung aufgrund der Bildung von Iodwasserstoff (stark ätzend, pKs = -10[141]) bei Anwesenheit von Wasser deutlich gefährlicher ist. Die Ausbeuten der Entschützung von Verbindung **113-114** mit TMSI erreichen mit 87 bzw. 73 % jedoch ausreichende Werte.

Abschließend wurde die Carbonsäurefunktion durch Abspaltung der Methylgruppe wiederhergestellt. Entgegen der in Schema 13 dargestellten Entschützung von Verbindung **103** und **104** wurde an dieser Stelle jedoch keine Natronlauge verwendet, um sicherzustellen, dass es bei diesem letzten Schritt nicht zur Racemisierung des α-Stereozentrums kommt. Unter Verwendung von Ammoniak in Methanol wurde jedoch nicht nur die entsprechende Säure **82** generiert, sondern ebenfalls das Amid **116** erhalten (Schema 16). In einer Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure konnte jedoch das Amid **116** protoniert und dadurch zur gewünschten Aminosäure **82** umgesetzt werden.



Schema 16: Hydrolyse des Esters **115** mithilfe von Ammoniak in Methanol zum Amid **116** und nachfolgend durchgeführte Umwandlung zur Carbonsäure **82**.

Das anvisierte (*S*)-7-Chlortryptophan **82** (7-Cl-Trp) konnte somit über sechs Reaktionen enantiomerenrein und mit einer Gesamtausbeute von etwa 20 % hergestellt werden. Anhand der etablierten Route über die borylierten Intermediate (hier für **112** gezeigt) sind zudem auch weitere Tryptophan-Analoga zugänglich, wie z. B. das 7-Phenol **117** oder das 7-Bromid **118** (Schema 17) zugänglich.



Schema 17: Synthese eines 7-Phenols **117** und 7-Bromids **118**, welche nach der Borylierung des Moc-geschützen Tryptophanmethylesters **112** zugänglich sind.

Aufgrund der Anzahl der Schritte ist diese Synthese jedoch zeitaufwändig und weist zudem eine geringe Atomeffizienz auf, da für die Einführung und Abspaltung der zwei PGs sowie des Boronsäuresters an 2-Position stöchiometrische Mengen an Atomen verbraucht werden, die im Endprodukt nicht enthalten sind.

3.3.3. Enzymatische Synthese von Tryptophan-Analoga

Eine deutlich atomeffizientere Methode, um funktionalisierte Tryptophane zu erhalten, ist die chemoenzymatische Synthese der Aminosäure durch die Tryptophan-Synthase. Wie schon im Kapitel 2.3.1 (Abbildung 13) beschrieben, werden dafür funktionalisierte Indole eingesetzt und mit (*S*)-Serin zum entsprechenden Tryptophan umgesetzt. Für die Umsetzung zum (*S*)-7-Chlortryptophan wurde die Enzymmutante *Pf*0A9 verwendet, welche entsprechend Abbildung 13 aus dem Organismus *P. furiosus* stammt und mithilfe von *directed evolution* hinsichtlich des Umsatzes von Indolderivaten optimiert wurde.[103] Das Enzym wurde heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) unter Standardbedingungen exprimiert und das Lysat anschließend mithilfe einer Hitzedenaturierung von unerwünschten Proteinen befreit. In Abbildung 21 ist das Gel der SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) dargestellt, bei der eine deutliche Bande bei ca. 45 kDa erkennbar ist, welche der überexprimierten Tryptophan-Synthase entspricht (Molekulargewicht des Enzyms: 43.318 kDa) und nach der Hitzedenaturierung im Überstand löslich verblieben ist. Der Überstand des Lysats enthielt dabei noch viele weitere Proteine, welche nach der Hitzebehandlung denaturiert sind und mittels Zentrifugation sedimentiert wurden. Die ausgefallenen Proteine sind demnach im Pellet nach der Hitzedenaturierung enthalten, aufgrund der irreversiblen Ausfällung jedoch im SDS-Gel nicht sichtbar (Abbildung 21). Das somit gereinigte Lysat wurde dann für die chemoenzymatische Synthese von (*S*)-7-Chlortryptophan (**82**) genutzt (Schema 18).

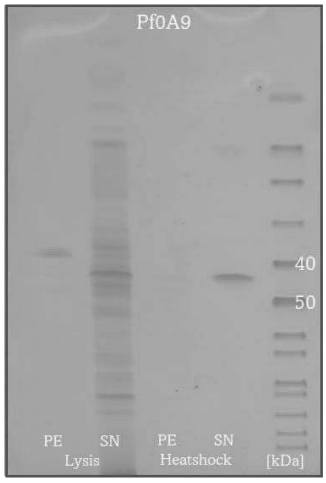
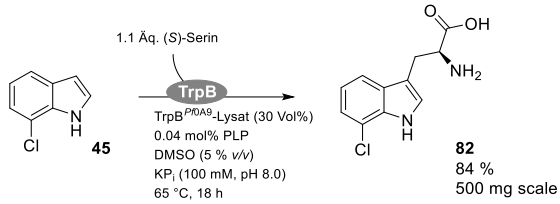
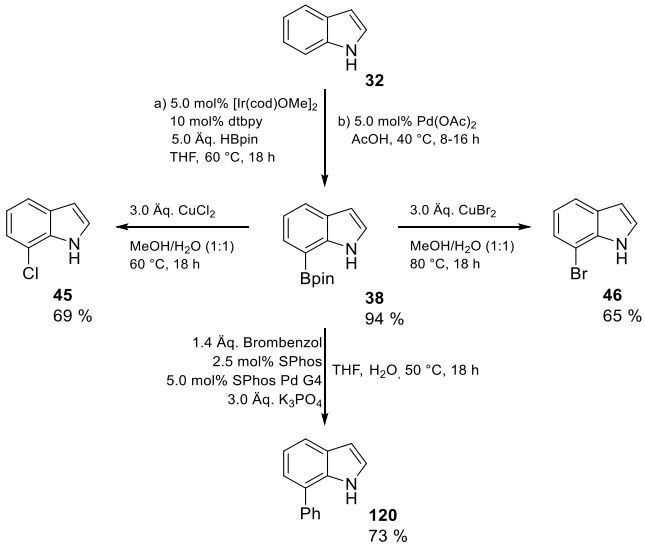


Abbildung 21: SDS-PAGE der verschiedenen Fraktionen nach der Expression von $TrpB^{Pf0A9}$. Pellet (PE) und Überstand (SN) bei Lyse, sowie Pellet (PE) und Überstand (SN) nach der Hitzedenaturierung.



Schema 18: Chemoenzymatische Synthese von (*S*)-7-Chlortryptophan (**82**) mithilfe der Tryptophan-Synthase TrpB^{Pf0A9}.[103]

Mit 84 % liegt die isolierte Ausbeute etwas unterhalb der publizierten Ausbeute von 99 %, allerdings kann dies mit einer unvollständigen Isolierung des Produkts begründet werden. Das Tryptophan **82** fällt nach der Reaktion im Eisbad aus der Reaktionslösung aus und kann dann abfiltriert werden. Um jedoch auch Salze sowie verbleibende Enzymverunreinigungen zu entfernen, wurde das Produkt mit kaltem Wasser gewaschen, wobei jedoch auch geringe Anteile des Produkts in den Durchfluss gelangen können. Der Durchfluss wurde in diesem Fall nicht weiterverwendet, wodurch sich geringe Ausbeuteverluste ergeben können. Das an dieser Stelle verwendete 7-Chlorindol (**45**) ist kommerziell günstig erhältlich. Möchte man jedoch von kleineren Bausteinen ausgehen, so würde auch an dieser Stelle durch den Einsatz der Borylierungssequenz (Kapitel 2.2.1) das 7-Chlorindol (**45**) zugänglich sein (Schema 19).



Schema 19: Synthese von 7-Chlor-, 7-Brom- und 7-Phenyl-Indol (**45**, **46** und **120**) über die Borylierung nach Movassaghi *et al.*[84]

Da in diesem Fall keine PGs angefügt werden müssen, ist die Synthese deutlich verkürzt und interferiert nicht mit den weiteren, vorliegenden funktionellen Gruppen. Ausgehend von Indol (**32**), wurde das 7-Chlorindol (**45**) und das 7-Bromindol (**46**) so beispielhaft hergestellt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das 7-borylierte Indol **38** als Baustein in Suzuki-Kreuzkupplungen dienen kann. Auf diese Weise wurde das 7-Phenyl-Indol (**120**) in 73 % Ausbeute erhalten.

Im Vergleich zur sechsschrittigen Synthese der Tryptophan-Analoga mithilfe der metallkatalysierten Borylierung konnte das chlorierte Tryptophan **82** somit in einem einzelnen

chemoenzymatischen Schritt ausgehend von 7-Chlorindol (**45**) erhalten werden. Zwar muss das Enzym zunächst exprimiert werden, jedoch kann auf diese Weise auf den Einsatz vieler giftiger, gefährlicher oder umweltgefährdender Reagenzien verzichtet werden, ebenso wird eine deutlich geringere Menge Lösungsmittel benötigt. Allerdings ergibt sich auch für die chemoenzymatische Synthese ein großer Nachteil, da die Substratspezifität des Enzyms die Zugänglichkeit der Derivate limitieren kann. Während kleine Substituenten wie Chlor oder Brom bis hin zu Cyanid oder Boronsäuren noch zugänglich sind, würden größere Substituenten wie Alkylketten oder Arylreste nur schwer vom Enzym umgesetzt werden, da sterisch anspruchsvolle Moleküle oft nicht in das aktive Zentrum des Enzyms gelangen.

3.3.4. Konstruktion von *P. putida* Stämmen zur Mutasynthese

Nachdem ausreichende Mengen des (*S*)-konfigurierten 7-Chlortryptophans (**82**) hergestellt wurden, sollte anhand dessen in Mutasynthese-Experimenten die Umsetzbarkeit zum Naturstoff untersucht werden. Dazu wurden von R. Weihmann und A. Loeschcke ausgehend von *P. putida* KT2440 verschiedene Stämme generiert. Mithilfe der yTREX-Toolbox wurde der *vio* Gencluster, bestehend aus v*ioABC(ΔD)E* in die ribosomale RNA integriert, wobei in weiteren Stämmen *vioA* bzw. v*ioAB* durch die homologen Gene *rebO* bzw. *rebOD* des Rebeccamycin-Biosynthesepfads ausgetauscht wurden. Außerdem wurde die zelleigene Tryptophan Produktion durch Deletion der entsprechenden Gene *trpDC* (siehe Schema 7) inhibiert. Sowohl die Deletion von *trpDC* sowie der Austausch der Gene *vioAB* durch *rebOD* und die Integration des Biosyntheseclusters wurde mittels homologer Rekombination durchgeführt.

3.3.4.1. Integration des vio-Gencluster mithilfe der yTREX-Toolbox

Das TREX (Transfer and Expression) System ist eine Methode zur genomischen Integration von großen Sequenzabschnitten, wie z. B. einem Gencluster.[142] Die entsprechende Sequenz wird ausgehend von einem gewöhnlichen Plasmid, Cosmid oder BAC (*bacterial artificial chromosome*) von den zwei TREX-Kassetten umgeben (*labeled*). Diese enthalten Gene sowohl für die chromosomale Integration mithilfe der Tn5-Transposase (*tnp*), als auch für die Konjugation von großen DNA-Molekülen (*oriT*), womit ein breites Spektrum an Gram-negativen und Gram-positiven Expressionswirten erreicht werden kann. Die Integration von DNA-Abschnitten bietet dabei viele Vorteile gegenüber Plasmid-basierten Systemen, da die Sequenzen deutlich stabiler im Organismus verbleiben und durch geringeren metabolischen Stress des Organismus auch meist zu einer höheren Ausbeute an Genprodukten führen.[142] Aufgrund dieser Vorteile wurde das TREX-System durch ergänzende Methoden weiterentwickelt (yTREX-*Toolbox*[133, 143-145]). In nachfolgenden Studien konnte gezeigt werden, dass die Integration in das *rrn* Operon aufgrund der hochfrequentierten Transkription von großem Vorteil ist und damit einen besonders geeigneten Locus zur genomischen Integration darstellt.[143] Da die Tn5-Transposase jedoch nur eine randomisierte Integration ermöglicht, wurde von R. Weihmann eine neue Methode entwickelt, welche die gezielte Integration von Genabschnitten in das *rrn*-Operon ermöglicht (Abbildung 22).

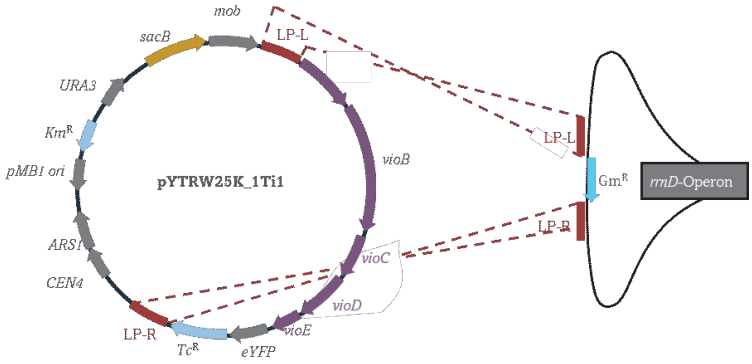


Abbildung 22: Schematische Darstellung des von R. Weihmann produzierten Plasmids pYTRW25K_1Ti1 zur Integration des *vio*-Genclusters in das *rrnD*-Operon.[146] Die LP (LP-L und LP-R: *landing pad*-Sequenz links und rechts) wurden zuvor in das *rrnD*-Operon integriert und dienen dabei der homologen Rekombination, sodass im Falle eines *double-crossover* (wie hier durch die gestrichelten Linien dargestellt) nur der *vio*-Gencluster sowie das *eYFP* (*enhanced yellow fluorescent* protein) und *tc*^{R} (Tetracyclin-Resistenz) in die rDNA von *P. putida* integriert wird. Der Vektor enthält zudem noch eine Kanamycin-Resistenz (*km*^{R}) sowie *sacB*, welche als (Kontra-)Selektionsmarker dienen. Zudem enthält das Vektorbackbone noch weitere charakteristische Gene: *CEN4/ARS1* (Centromer des IV Chromosoms und autonom replizierende Sequenz I, *mob* (*plasmid mobilisation protein*), *pMB1 ori* (*origin of replication* aus *E. coli*) und *URA3* (Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase, ebenfalls nutzbar als Markerprotein).

Dazu wurden mithilfe von artifiziellen Sequenzen (*landing pads*, LP) für jedes der sieben *rrn*-Operons (A-G) individuelle Integrationsmarker entwickelt und mittels homologer Rekombination in *P. putida* an den entsprechenden Positionen im *rrn*-Operon eingebracht. Anhand der zwei *landing pad*-Sequenzen LP-L und LP-R (*landing pad*-Sequenz links und rechts) wird somit eine direktionale Integration von DNA-Segmenten gewährleistet und somit ebenfalls anhand von homologer Rekombination die gezielte Integration in die verschiedenen *rrn*-Operons ermöglicht.[146] Als Selektionsmarker wurde ein Gentamycin-Resistenzgen genutzt, welches zwischen den zwei LP in den *rrn*-Operons integriert wurde und somit bei erfolgreicher Integration neuer Genabschnitte in diese *landing site* inaktiviert wird.

Auf dem Integrationsvektor wird der zu inserierende Genabschnitt, welcher in diesem Fall *vioABCDE* enthält, ebenfalls von den LP-L und LP-R umgeben. Zusätzlich enthält das Plasmid eine Tetracyclin-Resistenz als weiteren Selektionsmarker bei erfolgreicher Integration. Gleichzeitig wurde *sacB* als Kontraselektionsmarker auf dem Plasmid genutzt, welcher nur im Falle eines *single-crossover*-Events im Organismus verbleibt. *sacB* codiert für eine Levansukrase, welche die Hydrolyse von zugefügter Saccharose zum verzweigten Polymer Levan katalysiert, welches wiederum für Gram-negative Bakterien letal ist.[147-149] Somit führt die Kultivierung auf Saccharose bei allen Zellen (insbesondere Gram-negativer Bakterien), welche noch *sacB* exprimieren, zum Zelltod.[150]

Auf diese Weise wurden von R. Weihmann sechs Stämme erzeugt (RW25-A bis RW25-F), welche den aktiven Violacein-Gencluster (*vioABCDE*) in den entsprechenden *rrn*-Operons A-F integriert haben.[146] In fast allen Stämmen lag zudem eine Mutation innerhalb von *vioD* vor, wodurch ein funktionsunfähiges Enzym produziert wird und die Biosynthese von Violacein somit nicht ermöglicht wird. Um die Mutationen genauer zu beleuchten, wurde der gesamte Violacein-Gencluster aus der genomischen DNA amplifiziert und sequenziert. Dadurch konnte bestätigt werden, dass *vioD* in vielen Fällen durch eine Deletion an unterschiedlichen Positionen verändert wurde. Teilweise lagen diese innerhalb und außerhalb des Leserasters, was in manchen Fällen zu *non-sense* Mutationen geführt hat. Aufgrund der beeinträchtigten

VioD-Funktion produzierten die *P. putida* Stämme daher hauptsächlich Deoxyviolacein. Im Sinne dieses Projekts mussten daher keine weiteren Bemühungen unternommen werden, um einen alternativen *vioABCE*-Gencluster in *P. putida* zu integrieren.

Innerhalb der initialen Kultivierungen der generierten Stämme konnte gezeigt werden, dass insbesondere der Stamm RW25-D (Gencluster in *rrnD*-Operon integriert, auftretende Mutation in *vioD* ab AS 277, 4 deletierte AS) einen hohen dVio-Titer aufweist. Es wurde daher im weiteren Verlauf mit diesem Stamm weitergearbeitet.

3.3.4.2. Deletion des *TrpDC* Operon

Zur Deletion der Tryptophan Produktion wurden die zwei Gene *trpDC* des Tryptophan-Biosyntheseclusters ausgewählt, da diese nah beieinander in einem gemeinsamen *open reading frame* liegen.[93] Durch die Deletion der Phosphoribosylanthranilat Isomerase (TrpD) und der Indol-3-glycerolphosphat Synthase (TrpC) wird die Tryptophan Produktion ultimativ gestoppt, wodurch Anthranilat aus dem Biosynthesepfad akkumuliert (Kapitel 2.3 – Schema 7) und zu dessen Produktion von Kuepper *et al.* genutzt wurde.[151]

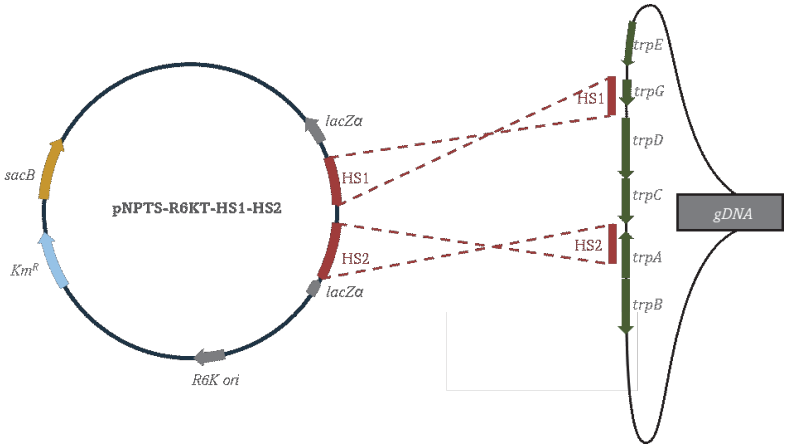


Abbildung 23: Schematische Darstellung des von R. Weihmann produzierten Plasmids pNPTS-R6KT-HS1-HS2 zur Deletion von *trpDC*. Die 800 bp langen Sequenzen HS1 und HS2 ober- und unterhalb der *trpDC*-Region wurden dazu mittels PCR amplifiziert und über *In-Fusion cloning* im *suicide vektor* pNPTS138-R6KT assembliert.[152] Im Falle eines *double-crossover* (wie hier durch die gestrichelten Linien dargestellt) wird die *trpDC* Region aus der genomischen DNA entfernt. Das Plasmid enthält außerdem noch den *R6K ori* (*origion of replication*) sowie Km^R und *sacB*, welche als (Kontra-)Selektionsmarker dienen.

Zu diesem Zweck wurden 800 bp lange Regionen ober- und unterhalb der *trpDC* Region (TS1 und TS2) aus der genomischen DNA von *P. putida* mithilfe einer PCR vervielfältigt. Diese homologen Sequenzen ermöglichen damit die homologe Rekombination (Abbildung 23), wobei bei einem *double-crossover* die codierende *trpDC* Region entfernt wird. Die amplifizierten HS1 und HS2 Sequenzen wurden in einem linearisierten Vektor (pNPTS138-R6KT[152], verdaut mit EcoRI) mittels *In-Fusion cloning* zusammengesetzt. Die verschiedenen *P. putida* Stämme wurden dann mit dem so erhaltenen *suicide* Plasmid (pNPTS-R6KT-HS1-HS2) transformiert (entweder direkt über Elektroporation oder indirekt über Konjugation durch *E. coli* DH5α λpir) und in mehreren Schritten auf LB-Agarose-Platten kultiviert. Im ersten Schritt werden Platten verwendet, welche Irgasan und Kanamycin enthielten, um nur Stämme beizubehalten, die auch das *suicide* Plasmid enthalten. Dabei kann es in diesem Schritt zur homologen Rekombination

kommen, wobei entweder einfach oder doppelte Überkreuzungen (*single* oder *double cross-over events*) stattfinden können. Bei einem *single-crossover* kommt es nur an einer der zwei homologen Sequenzen zur Rekombination, wodurch auch der restliche Abschnitt des *suicide* Plasmids in die rDNA integriert wird. Somit wird in diesem Fall die Kanamycin-Resistenz sowie auch der *sacB*.Abschnitt, welcher die Levansukrase codiert, genomisch integriert. Im Gegensatz dazu kommt es bei einem *double-crossover* an beiden homologen Sequenzen zur Rekombination, wodurch letztlich nur der *trpDC*-Abschnitt aus der genomischen DNA verdrängt wird. Da die homologe Rekombination nicht gerichtet stattfindet, wird aus der ersten Kultivierung mit einer möglichst großen Anzahl an isolierten Kolonien fortgefahren. Im zweiten Schritt werden die Zellen ausgewählt, die das *suicide* Plasmid nicht mehr enthalten, indem diese auf LB-Platten kultiviert werden, welche mit Irgasan, Kanamycin und Saccharose versetzt sind. Dadurch werden nur Stämme selektiert, bei denen es zu einem *double-crossover* gekommen ist. Enthalten die Zellen noch das Plasmid oder haben *sacB* im Falle eines *single-crossover* genomisch integriert, können sie aufgrund der Levanbildung nicht wachsen. Herangewachsene Kolonien werden dann in einem dritten Schritt gleichzeitig auf zwei verschiedene Platten übertragen, um die Deletion von *trpDC* zu überprüfen: Einerseits auf Platten mit Irgasan, Kanamycin und Saccharose und andererseits auf Platten mit Irgasan, Tryptophan und Saccharose. Nur bei denjenigen Kolonien, welche bei Tryptophan Zugabe wachsen, jedoch nicht bei Kanamycin Zugabe, kann von einem *double-crossover* ausgegangen werden, wodurch die Kanamycin-Resistenz sowie die Tryptophan-Produktion erliegen.

3.3.4.3. Austausch von *VioA* durch *RebO*

Wie auch die Tryptophan-Deletion, wurde der Austausch von *vioA* durch *rebO* über homologe Rekombination realisiert (Abbildung 24).[153] Dazu wurde dasselbe pNPTS-R6KT Plasmid (ebenfalls mit EcoRI linearisiert) verwendet, in dessen *lacZα*-Operon sowohl die *rebO*-Sequenz als auch die zwei homologen Sequenzen ober- und unterhalb von *vioA* (HS3 und HS4) mittels *In-fusion cloning* integriert wurden.

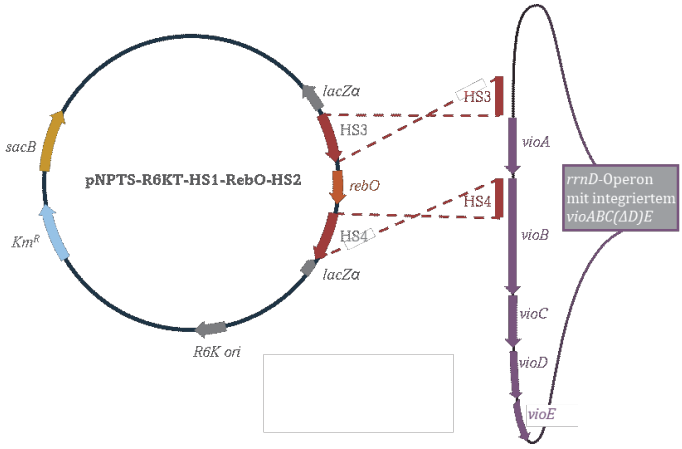


Abbildung 24: Schematische Darstellung des von R. Weihmann produzierten Plasmids pNPTS-R6KT-HS1-RebO-HS2, welches zur Integration von *rebO* in RW-D25 (*VioABC(ΔD)E ΔTrpDC*) genutzt wurde. Die Sequenzen HS3, *rebOD* und HS4 wurden dazu mittels Restriktion durch *In-Fusion cloning* im Plasmid assembliert. Im Falle eines *double-crossover* (wie hier durch die gestrichelten Linien dargestellt) wird *vioA* durch *rebO* ausgetauscht. Das Plasmid enthält außerdem noch den *R6K ori* (*origion of replication*) sowie Km^R und *sacB*, welche als (Kontra-)Selektionsmarker dienen.

HS3 und HS4 waren in diesem Fall jedoch 1000 bp lang, wobei HS3 den chromosomalen Abschnitt vor *vioA* enthält, während HS4 den Abschnitt nach *vioA* enthält und damit einen Teil des nachfolgenden *vioB*. Die drei Sequenzen wurden in einer drei-schrittigen Klonierungsstrategie zu einem Plasmid assembliert, wobei für jede Insertion das Plasmid durch den Einsatz von EcoRI linearisiert wurde. Das somit erhaltene Plasmid pNPTS-R6KT-HS1-*rebO*-HS2 wurde dann in die *P. putida* Stämme RW25-D und RW25-D_Δ*trpDC* eingebracht und ebenso mithilfe der mehrschrittigen Kultivierung hinsichtlich der erfolgreichen *double-crossover* Rekombination getestet. Die auf diese Weise erhaltenen Stämme wurden zudem mittels Isolation der genomischen DNA, analytischer PCR und anschließender Agarose Gelelektrophorese auf die erfolgreiche genomische *rebO* Integration überprüft.

3.3.4.4. Austausch von *vioAB* durch *rebOD* mithilfe von Meganuklase I-SceI

Für den Austausch von *vioAB* durch *rebOD* wurde ebenfalls dieselbe homologe Rekombination in Erwägung gezogen. Allerdings führte diese Methode in diesem Fall nicht zum Erfolg, möglicherweise aufgrund der Tatsache, dass der zu inserierende Abschnitt (*rebOD*) nun deutlich länger ist. Daher wurde eine weitere Methode verwendet, um das zirkuläre Plasmid mit den homologen Sequenzen und den zu integrierenden Genen innerhalb der Zelle zu öffnen (Abbildung 25).[154]

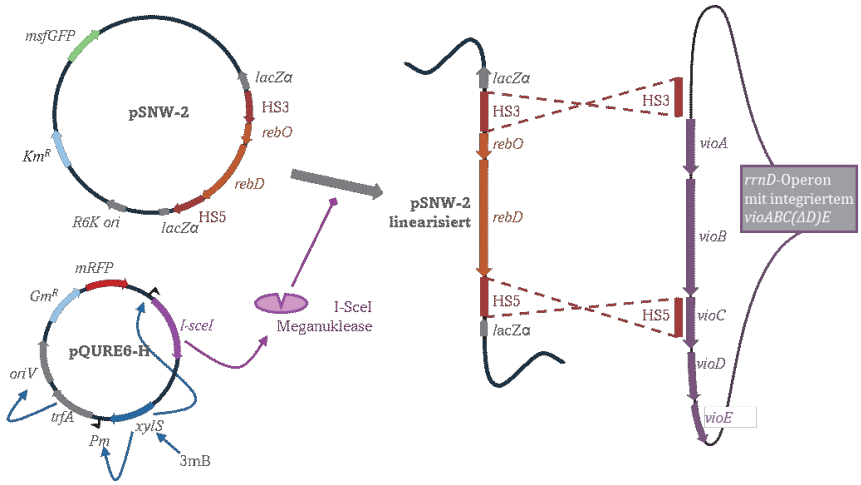


Abbildung 25: Schematische Darstellung der zwei Plasmide pSNW-2 und pQURE6-H, welche zum Austausch von *vioAB* durch *rebOD* verwendet wurden. Die Sequenzen HS3, *rebOD* und HS5 wurden dazu mittels Restriktion durch BamHI und anschließender Ligation im Plasmid pSNW-2 assembliert und in *P. putida* RW25-D (*vioABC(ΔD)E ΔtrpDC*) eingebracht. Dabei dienten *msfGFP* und *Km*^{R} als Selektionsmarker. Anschließend wurde der Hilfsplasmid pQURE6-H ebenfalls in den Stamm eingebracht, wobei *Gm*^{R} und *mRFP* (rot-fluoreszierendes Protein) als Selektionsmarker dienten. *xylS* codiert für einen *inducer*, welcher nur bei Anwesenheit von 3-Methylbenzoesäure (3mB) aktiv ist und damit sowohl die Replikation von pQURE6-H als auch die Expression der Meganuklease I-SceI reguliert. I-SceI schneidet nur an einer 18 bp-langen Sequenz, welche in pSNW-2 enthalten ist. pSNW-2 wird somit linearisiert, wodurch die homologe Rekombination mit *double-crossover* erleichtert/ermöglicht wird. Im Falle eines *double-crossover* (wie hier durch die gestrichelten Linien dargestellt) wird dadurch *vioAB* durch *rebOD* ausgetauscht.

Dazu wird ein Hilfsplasmid (pQURE6-H) genutzt, welches die Meganuklease I-SceI codiert. Diese Endonuklease zeichnet sich durch eine ausgezeichnete Selektivität aus, da diese nur bei einer determinierten, 18 bp-langen Sequenz doppelsträngige DNA schneidet. Somit kann das Plasmid durch I-SceI linearisiert werden, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit der homologen

Rekombination im Vergleich zum zirkulären Plasmid erhöht. Damit die Meganuklease zu einem späteren Zeitpunkt keinen Schaden hervorruft, ist sowohl die Expression der Meganuklease, sowie auch die Reproduktion des Hilfsplasmids über das Xyl*S/Pm*-System reguliert, wobei dies ausschließlich unter Zugabe von 3-Methylbenzoesäure (3mB) stattfindet.[155]Aus dem Tryptophan-auxotrophen Stamm RW25-D_Δ*TrpDC* wurden daher auch hier an *vioAB* angrenzende Regionen (1000 bp lang) amplifiziert und in dem pSNW2 Vektor (linearisiert mit BamHI) assembliert. Das Plasmid wurde vervielfältigt, in *P. putida* eingebracht und die Zellen auf Irgasan und Kanamycin (pSNW2) kultiviert. Über die *msfGFP*-vermittelte Fluoreszenz konnte die Anwesenheit des Vektors nachgewiesen werden. Anschließend wurde das Plasmid pQURE6-H über Elektroporation eingebracht und die Zellen auf LB-Agar mit Gentamycin und 3mB ausplattiert. Zeigten die Zellen nach entsprechender Inkubation keine grüne Fluoreszenz, jedoch rote Fluoreszenz, vermittelt durch *mRFP,* enthalten die entsprechenden Zellen das Hilfsplasmid pQURE6-H, jedoch kein intaktes pSNW-2 Plasmid mehr, welches durch die Meganuklease linearisiert und daher nicht mehr repliziert wurde. Durch Transfer auf LB-Agar Platten mit einerseits Gentamycin und 3mB sowie andererseits Irgasan und Kanamycin konnte über die Kanamycin-Sensitivität die *double-crossover* Rekombination nachgewiesen werden. Die entsprechenden Kolonien wurden in einer letzten Kultivierung auf Irgasan ohne Zugabe von 3mB vom entsprechenden Hilfsplasmid pQURE6-H befreit werden. Auf diese Weise konnte *rebOD* erfolgreich an der Position von *vioAB* eingefügt werden, jedoch wurde diese Methode nur für den Tryptophan-auxotrophen Stamm durchgeführt (neuer Stamm: RW25-D2_Δ*trpDC*).

Insgesamt wurden über daher fünf Stämme generiert, wobei insbesondere der Stamm RW25-D2_Δ*trpDC* aussichtsreich erscheint für eine effiziente dVio-Produktion.

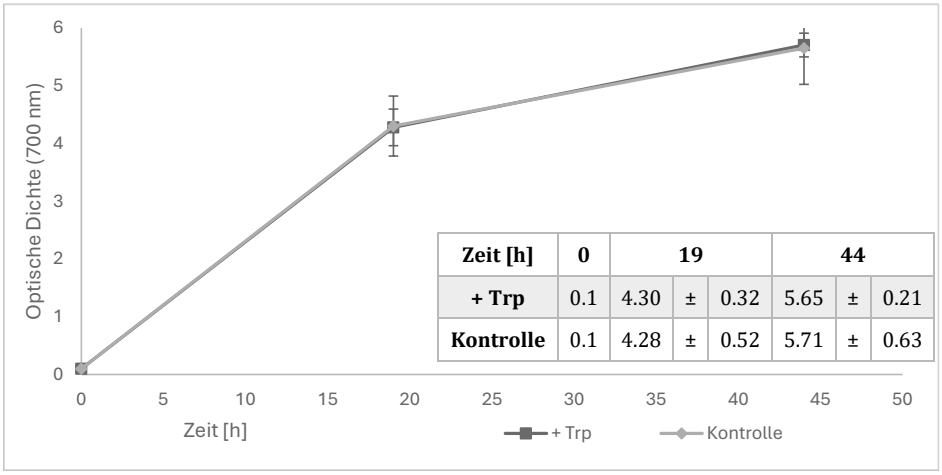
3.3.5. Mutasynthese von dVio-Derivaten

Nachdem einerseits ein kostengünstiger Zugang zum Tryptophan-Analogon geschaffen wurde und andererseits verschiedene *P. putida* Stämme generiert wurden, sollten beide Aspekte in Mutasynthese-Experimenten vereint werden, um so Derivate des dVio in großem Maßstab herzustellen. Schon während der Stamm-Optimierung sowie in initialen Experimenten konnte sowohl auf Agarose-Platten als auch in Flüssigmedium eine deutliche Violettfärbung der Zellen beobachtet werden. Dabei sollte jedoch beachtet werden, dass in diesen Fällen die Stämme auf LB-Medium kultiviert wurden, welches daher auch unsubstituiertes Tryptophan (**13**) enthält. Die violette Färbung ist somit hauptsächlich auf das natürliche, unsubstituierte dVio (**31**) zurückzuführen. Da jedoch der Stamm RW25-D2_Δ*trpDC* nun die homologen Gene *rebOD* enthält, welche aufgrund der Biosynthese zum 7-Chlor-substituierten Rebeccamycin eine höhere Affinität zum chlorierten Trp und IPA haben sollten, könnte auch die Produktion von substituierten Derivaten dem natürlichen dVio vorgezogen werden.

3.3.5.1. Mutasynthese in LB-Medium

Der entsprechende Stamm RW25-D2_Δ*trpDC* wurde zunächst in LB-Medium kultiviert, welches zusätzlich (*S*)-7-Chlortryptophan (**82**) (7-Cl-Trp) enthält. Es wurden drei 10 mL Vorkulturen (LB-Medium, versetzt mit 25 µg/mL Irgasan und 25 µg/mL Tetracyclin) mit einzelnen Kolonien des Stammes angeimpft und für einen Tag inkubiert. Anhand dessen wurden für jede Vorkultur zwei Hauptkulturen (ebenfalls in LB-Medium, versetzt mit

25 µg/mL Irgasan und 25 µg/mL Tetracyclin) auf eine optische Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge – OD_{700}) von 0.1 inokuliert. Eine der Hauptkulturen diente als Kontrollexperiment, während der anderen 1 mM 7-Cl-Trp (**82**) zugesetzt wurden. Der dazu benötigte Tryptophan-Stock wurde mit einer Konzentration von 25 mM in Wasser und DMSO vorbereitet. Aufgrund der geringen Löslichkeit wurde zuzüglich konzentrierte Natronlauge hinzugegeben. Die Kontrollgruppe wurde mit gleichen Mengen von DMSO und NaOH versetzt, wenngleich in vorherigen Kontrollexperimenten sowohl die DMSO- als auch die NaOH-Verunreinigung keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum von *P. putida* gezeigt hat (unveröffentlichte Ergebnisse von C. Gronkowsky).



Zeit [h]	0	19			44		
+ Trp	0.1	4.30	±	0.32	5.65	±	0.21
Kontrolle	0.1	4.28	±	0.52	5.71	±	0.63

Abbildung 26: Wachstumskurve der Kultivierung des Stammes RW25-D2_Δ*trpDC* in LB-Medium bei Zugabe von 1 mM 7-Cl-Trp (**82**) (viereckig) und ohne Zugabe von 7-Cl-Trp (dreieckig), gemessen in Triplikaten. Aufgetragen ist die OD_{700} gegen die Zeit [in Stunden - h].

Aus den Wachstumskurven ist erkennbar, dass die Zellen erfolgreich im LB-Medium angewachsen sind (Abbildung 26). Es zeigte sich dabei kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und dem supplementierten Ansatz. Optisch konnte bei beiden Ansätzen eine Violettfärbung des Mediums beobachtet werden, womit die Produktion von dVio (oder ähnlichen Intermediaten) indiziert wird. Sowohl nach 19 Stunden (h) als auch nach 44 h wurden Proben aus dem Medium entnommen und mittels HPLC untersucht. Da sich der Großteil des Naturstoffs innerhalb der Zellen befindet, wurden die Proben zentrifugiert und die vom Überstand separierten Zellen durch Zugabe von Ethanol aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation der Zelltrümmer wurde der jeweilige Rohextrakt direkt auf die Säule aufgetragen.

Die daraus erhaltenen Chromatogramme wurden anhand ihres höchsten Wertes und kleinsten Wertes relativiert und auf eine Absorption von 1 normiert (Abbildung 27). Da sich zwischen den Triplikaten keine Unterschiede ergeben haben, sind in Abbildung 27 beispielhaft nur je ein Chromatogramm dargestellt. Sowohl für die Kontrollgruppe als auch für die 7-Cl-Trp-zugefütterten Ansätze ist, neben weiteren kleinen Peaks im Bereich von 1-2 Minuten (min), ein isolierter und stark absorbierender Peak bei 4.6 min erkennbar. Allerdings gibt es bei den 7-Cl-Trp-Ansätzen noch einen weiteren Peak bei 8.8 min, welcher bei den Kontrollgruppen nicht existiert. Zwischen den zwei verschiedenen Chromatogrammen nach 20 h und 44 h der 7-Cl-

Feed-Gruppe unterscheidet sich zusätzlich noch die Intensität des zweiten Peaks, da nach 20 h der Peak eine höhere relative Absorption vorweist. Da die Chromatogramme auf die höchste vermessene Absorption normiert sind, kann damit nur deduziert werden, dass sich zum späteren Zeitpunkt das Absorptionsverhältnis, und damit die Menge der zugrunde liegenden Verbindungen, zugunsten des ersten Peaks verschoben hat.

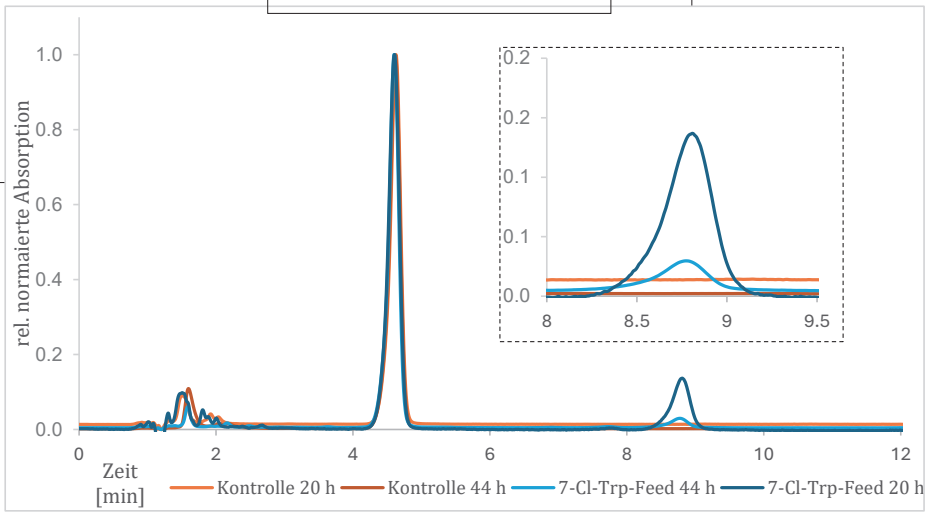


Abbildung 27: Überlagertes Chromatogramm der Mutasynthese-Ansätze in LB-Medium nach 19 h oder 44 h bei der etablierten HPLC-Methode (Isaspher C18-Säule mit Wasser/Acetonitril: 55/45). Aufgetragen ist die Absorption (normiert auf den höchsten Absorptionswert) bei der maximalen Absorptionswellenlänge gegen die Elutionszeit. In hell-/dunkelblau sind die Ansätze mit zugefüttertem 7-Chlor-Tryptophan (**82** – 1 mM) dargestellt, in orange/rot die Kontrollgruppen ohne Trp-Zusatz. Der Bereich von 8 – 9.5 min ist noch einmal vergrößert abgebildet.

Im Vergleich zu den synthetisch hergestellten dVio-Derivaten **95-100** (in Kapitel 3.3.1 – Abbildung 20) entsprechen die gemessenen Retentionszeiten zwar keinem der bisher vermessenen Naturstoffe, allerdings lässt sich dies auf eine geringere Trennleistung der verwendeten *reversed-phase* Säule zurückführen, da die zwei Messungen zeitlich mehr als 1.5 Jahre voneinander entfernt lagen. Durch die Verwendung der Säule wird somit ein gewisser Anteil der C18-Alkylketten inaktiviert, sodass die unpolare Interaktion geringer wird und kürzere Retentionszeiten gemessen werden.

Unter Zuhilfenahme der Absorptionsspektren (Abbildung 28) kann der erste Peak mit einer Retentionszeit von 4.6 min und einem Absorptionsmaximum von 563 nm dem natürlichen, unsubstituierten dVio **31** zugeordnet werden. Die Retentionszeit hat sich damit um einen Faktor von 0.85 verkürzt (4.6 min/5.4 min). Mit einem Absorptionsmaximum von 569 nm und einer Retentionszeit von 8.8 min könnte der zweite Peak, welcher nur bei Zugabe von 7-Cl-Trp (**82**) aufgetreten ist, durch ein monochloriertes Deoxyviolacein **95-100** aufgetreten sein. Da für die Indol-substituierten dVio-Derivate **95** und **96** blau-verschobene Absorptionsmaxima gefunden wurden (550 respektive 554 nm), für die die Oxindol-substituierten Derivate **97** und **98** jedoch rot-verschobene Maxima (575 nm), handelt es sich daher vermutlich um das Oxindol-chlorierte dVio **98**. Die vermessene Referenz (Abbildung 20) wurde nach 11.3 min eluiert (Faktor 0.78).

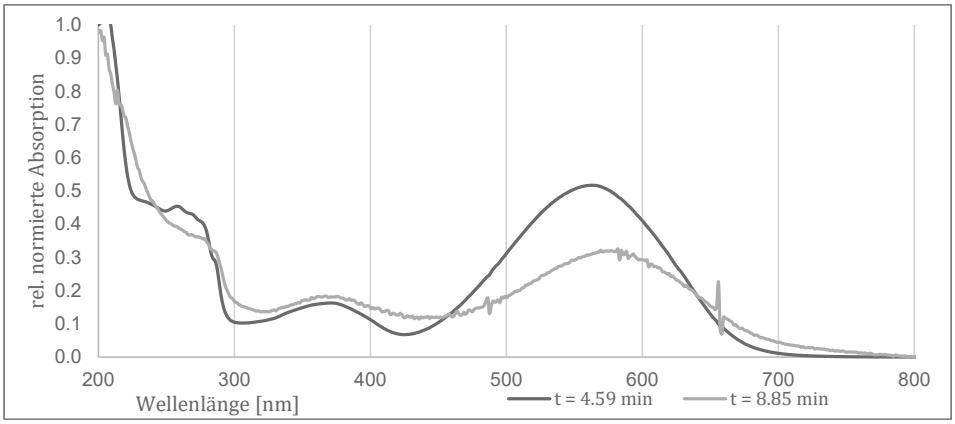


Abbildung 28: Absorptionsspektrum der zwei charakteristischen Peaks bei 4.59 min und 8.85 min aus dem Mutasynthese-Ansatz in LB-Medium (Abbildung 27). Aufgetragen ist die Absorption (normiert auf den höchsten Absorptionswert) gegen die Wellenlänge.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden alle drei Triplikate der Mutasynthese mit 7-Cl-Trp-Feed vereint und zusammen mit der etablierten RP-Äkta isoliert. Aufgrund der geringen Produktmenge (da zudem nur Hauptkulturen von 100 mL angesetzt wurden) konnte daraus jedoch kein Produkt erhalten werden. Lediglich der erste Peak konnte isoliert werden, welcher das unsubstituierte dVio **31** enthielt.

Zwar scheint die Mutasynthese damit nicht sonderlich effizient zu sein, jedoch konnte mit dem zweiten Peak in der HPLC ein Anhaltspunkt gefunden werden, welcher eine erfolgreiche Umsetzung von (*S*)-7-Chlortryptophan (**82**) zum derivatisierten dVio **98** indiziert. Durch den Einsatz von LB-Medium wird den Organismen jedoch eine große Menge des natürlichen Tryptophans zur Verfügung gestellt, wodurch ebenfalls das natürliche dVio (**31**) gebildet werden kann. Damit das substituierte Derivat in einer höheren Reinheit gebildet wird und eine eindeutige Bestimmung der isolierten Verbindung gelingen kann, wurde in einem weiteren Experiment die Kultivierung von *P. putida* nicht in LB-Medium, sondern in einem Minimal-Medium durchgeführt.

3.3.5.2. Mutasynthese in Minimal-Medium (MSM)

Um die Reinheit des gebildeten dVio-Derivats zu erhöhen, wurde statt LB-Medium ein Minimal-Medium verwendet. Das verwendete *mineral-salt-medium* (MSM) besteht aus einem Phosphat-Puffer und weiteren Spurenelementen (Magnesium, Zink, Calcium, Eisen, Molybdän, Kupfer, Cobalt, Mangan) sowie Ammonium als Stickstoffquelle und Glucose als Kohlenstoffquelle.[156] Da die generierten *P. putida* Stämme Tryptophan-auxotroph sind, wurde dem Medium noch natürliches Tryptophan (**13**) zugesetzt, da die Aminosäure nicht nur für die dVio-Produktion benötigt wird, sondern auch für die Bildung lebensnotwendiger Enzyme und Proteine notwendig ist. In vorherigen Wachstumsexperimenten von C. Gronkowsky mit RW25-D_Δ*trpDC* konnte beobachtet werden, dass für ein erfolgreiches Zellwachstum eine Tryptophan-Konzentration von 0.2 mM benötigt wird. Höhere Tryptophan-Konzentrationen (0.3-0.5 mM) führten dabei nicht zu einer höheren optischen Dichte, sondern zu einem höheren dVio-Gehalt.[153] Daher wurde eine finale Konzentration von 0.2 mM Trp angestrebt. Wie auch zuvor wurde dem Medium zusätzlich Irgasan und Kanamycin sowie das Mutasynthon 7-Cl-Trp

(**82**) (1 mM) zugesetzt. Die Vorkulturen wurden hingegen in LB-Medium (15 mL) vorbereitet, allerdings wurde vor der Inokulation das LB-Medium gegen das vorbereitete MSM ausgetauscht, indem die Zellen zentrifugiert und im finalen Medium resuspendiert wurden.

Die Mutasynthese in MSM sollte zudem für alle fünf *P. putida* Stämme durchgeführt werden, jedoch sind in den Vorkulturen nur die zwei neuesten Stämme angewachsen (RW25-D1_Δ*trpDC* und RW25-D2_Δ*trpDC*). Die Kryostocks der anderen drei Stämme waren zu diesem Zeitpunkt schon deutlich älter (über 2 Jahre). Zur Simplifizierung wurde daher in der folgenden Mutasynthese nur die ohnehin vielversprechenderen Kandidaten RW25-D1_Δ*trpDC* und RW25-D2_Δ*trpDC* verwendet.

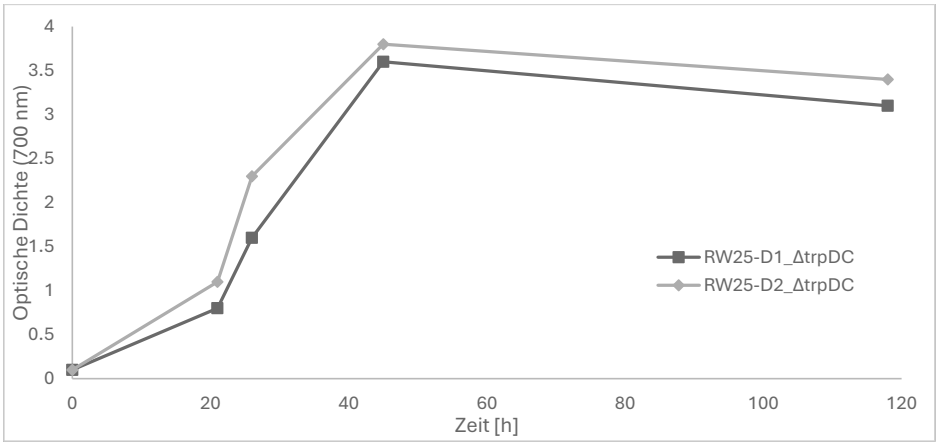


Abbildung 29: Wachstumskurve der *P. putida* Stämme RW25-D1_Δ*trpDC* und RW25-D2_Δ*trpDC*. Aufgetragen ist die OD_{700} gegen die Zeit [h].

Nachdem die Hauptkulturen auf eine OD_{700} von 0.1 inokuliert wurden, zeigte sich ein rasches Wachstum auf eine OD_{700} von ~1 nach 21 h und schließlich auf 3.8 bzw. 3.6 nach 45 h (Abbildung 29). Allerdings ergab sich an diesem Punkt schon ein entscheidender optischer Unterschied zwischen der Kultivierung in MSM und LB-Medium, da sich das Medium zwar trübte (Ansteigen der Dichte ausgelöst durch die Bakterien), jedoch kein violetter Farbwechsel beobachtet werden konnte. Daher wurde die Inkubationszeit verdoppelt auf vier Tage (98 h) bei 30 °C, zuzüglich 20 h bei 4 °C. Außerdem wurde nach 45 h Inkubation der 7-Cl-Trp-Gehalt verdoppelt. Bis zum Ende der Kultivierung wies das Medium eine gelbliche, trübe Farbe auf. Nach insgesamt 118 h konnte noch immer eine OD_{700} von 3.4 bzw. 3.1 vermessen werden. Dies belegt, dass die Bakterien erfolgreich in dem verwendeten Minimal-Medium heranwachsen konnten. Das Ausbleiben der violetten Färbung deutet jedoch darauf hin, dass kein dVio (weder **31** noch **95-100**) produziert wurde, bzw. der produzierte dVio-Gehalt besonders gering ist.

Während der Inkubation wurde nach 21, 45 und 118 h jeweils eine Probe entnommen, die Zellen sedimentiert und durch Ethanol-Behandlung aufgeschlossen. Verbleibende unlösliche Bestandteile wurden sedimentiert und der Überstand chromatographisch analysiert. In diesem Fall wurde jedoch nicht die bisher verwendete HPLC genutzt, sondern die LC-MS, um eventuelle Intermediate anhand der Masse detektieren zu können. In Abbildung 30 sind alle möglichen Zwischenprodukte sowie deren Molekulargewicht (in g/mol) dargestellt, unter Beachtung, dass diese einfach- oder doppelt-chloriert sein könnten.

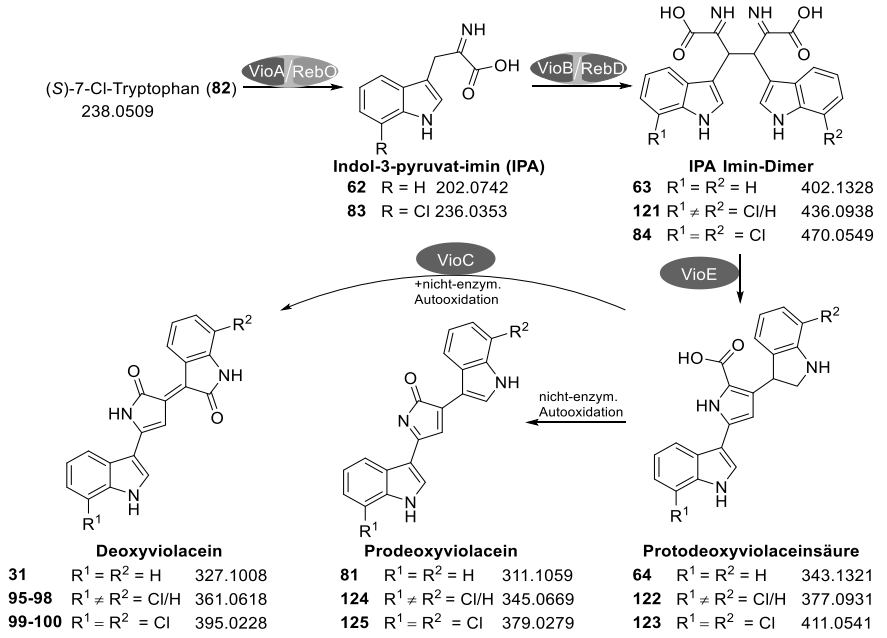


Abbildung 30: Schematische Darstellung Biosynthese von dVio **31** durch die konstruierten Stämme RW25-D1_Δ*trpDC* und RW25-D2_Δ*trpDC* mit angegebenen Molekülmassen (in g/mol) der verschiedenen Intermediate in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster.

Die genutzte LC-MS-Methode wurde zunächst hinsichtlich der Elution von gereinigtem, unsubstituiertem dVio (**31**) getestet (Abbildung 31).

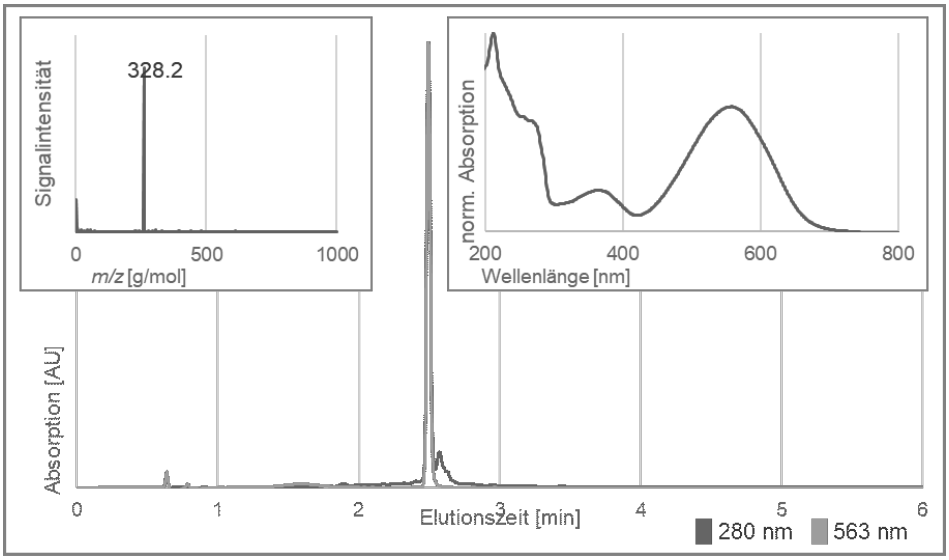


Abbildung 31: Chromatogramm des synthetisierten dVio (**31**) in der hier verwendeten LC-MS-Methode (Atlantis T3 mit Wasser/Acetonitril (5 % – 80 %) + Ameisensäure (0.1 %)). Aufgetragen ist die Absorption bei 280 nm (blau) und 563 nm (orange) gegen die Elutionszeit. Für den Peak bei ca. 2.5 min ist zusätzlich das Massenspektrum (Signalintensität gegen Molekülmasse, oben-links) sowie das Absorptionsspektrum (Absorption gegen die Wellenlänge, oben-rechts) dargestellt.

Dabei konnte für den Naturstoff **31** eine Retentionszeit von ca. 2.5 min detektiert werden. Außerdem kann über die LC-MS nicht nur das zugrunde liegende Absorptionsspektrum ermittelt werden, sondern ebenfalls die Molekülmasse. Entsprechend der Erwartungen konnte ein Absorptionsmaximum bei 563 nm sowie die erwartete Molekülmasse von 328 g/mol ($M+H^+$) beobachtet werden.

Bei der Auftragung der Proben aus den Mutasynthese-Ansätzen sind hingegen deutlich mehr Peaks sichtbar (Abbildung 32). Da sich die Chromatogramme zwischen den zwei verschiedenen Stämmen RW25-D1_Δ*trpDC* und RW25-D2_Δ*trpDC* qualitativ jedoch nicht unterscheiden, sind in diesem Fall nur die drei Chromatogramme des letzteren Kandidaten (RW25-D2_Δ*trpDC*) zu allen drei Zeitpunkten dargestellt. Es wurde das Chromatogramm der Wellenlängen 280 und 563 nm abgebildet, um zum einen die Gesamtheit aller absorbierenden aromatischen Moleküle darzustellen (280 nm – blau) und zum anderen die relevanten Peaks aufgrund der für Dexyviolacein-charakteristischen Absorption hervorzuheben (563 nm – orange). Jedoch konnte während der gesamten Elution zu allen drei Zeitpunkten bei 563 nm nahezu keine Absorption beobachtet werden. Lediglich bei ca. 0.5 min ist ein kleiner Ausschlag zu verzeichnen, sowie ein sehr breiter und daher flacher Peak bei ca. 1.4 min. Für Letzteren ist das zugehörige Absorptionsspektrum zusätzlich mit angegeben (Abbildung 32), welches jedoch nur eine sehr schwache Absorption oberhalb von 400 nm zeigt. Vermutlich ist das Absorptionsspektrum somit aufgrund der Linienbreite des Peaks sehr stark in dessen Signalintensität reduziert.

Bei 280 nm können hingegen viele weitere Molekülpeaks beobachtet werden, wobei jedoch die meisten dieser Signale eine Molekülmasse von <200 g/mol aufweisen und damit vermutlich keine relevanten Intermediate zum dVio enthalten. Im Vergleich der drei Chromatogramme zueinander können für die 24-Stunden-Probe (bei ca. 3.1 min) sowie für die 120-Stunden-Probe (bei ca. 2.0 min) jeweils ein zusätzlicher Peak verzeichnet werden. Alle übrigen Peaks konnten in leicht veränderten Signalintensitäten bei allen drei Zeitpunkten wiedergefunden werden. Zusätzlich können noch viele weitere, sehr kleine Peaks in der letzten Probe (nach 120 h) beobachtet werden (insbesondere zwischen 1.5 und 3 min), welche vermutlich auf eine große Menge einzelner Moleküle mit nur geringfügigen Unterschieden hindeuten. Diese Peaks können vermutlich auf Degradation (z. B. durch Abbau oder Oxidation) einzelner Bestandteile zurückgeführt werden. In dem Fall scheint die Kultivierung länger als 48 h nicht förderlich zu sein. In der Gesamtheit unterscheiden sich die Molekülverteilungen der drei Proben jedoch nicht großartig.

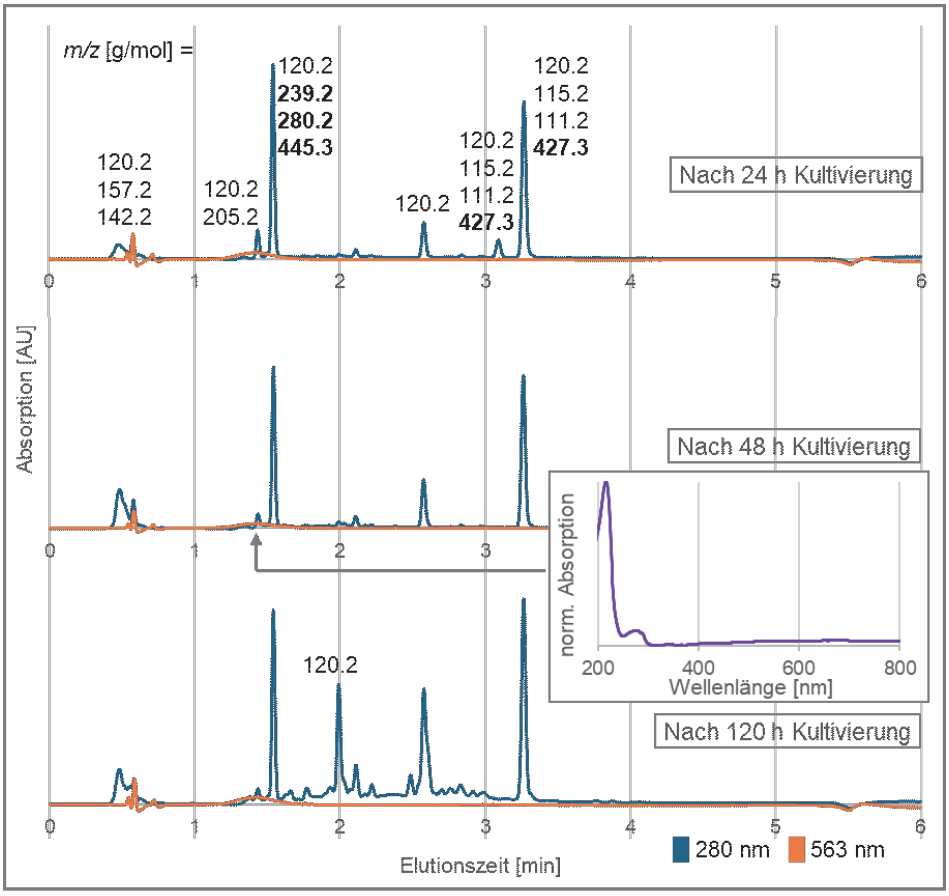


Abbildung 32: Überlagertes Chromatogramm der drei Mutasynthese Proben nach 24 h (oben), 48 h (mittig) und 120 h (unten) Kultivierung vom *P. putida* Stamm RW25-D2_Δ*trpDC* in der hier verwendeten LC-MS-Methode (Atlantis T3 mit Wasser/Acetonitril (5 %-80 %) + Ameisensäure (0.1 %)). Aufgetragen ist die Absorption bei 280 nm (blau) und 563 nm (orange) gegen die Elutionszeit. Für die Peaks sind zusätzlich die detektierten Molekülmassen [in g/mol] dargestellt. Zudem ist das Absorptionsspektrum (Absorption gegen die Wellenlänge) für den Peak bei ca. 1.4 min abgebildet.

Für drei Peaks konnten jedoch auch größere Molekülmassen von 239, 280, 427 und 445 g/mol detektiert werden (Abbildung 32 – fett hervorgehoben). Die Molekülmasse von 239.2 g/mol kann dem unveränderten 7-Chlortryptophan (**82**) zugeordnet werden, welches aufgrund der hohen zugegebenen Konzentration auch zu einem gewissen Anteil unverändert vorliegen sollte. Jedoch können die weiteren Massen keinem der in Abbildung 30 dargestellten Intermediate direkt zugeordnet werden. Da in der LC-MS-Methode keine harschen Bedingungen zur Polarisation der Eluenten verwendet wurden (sondern lediglich Ameisensäure im Lösungsmittel zur Polarisation beiträgt), kann eine Fragmentierung eher ausgeschlossen werden. Es könnten sich jedoch auch Addukte mit anderen Ionen bilden. Auf eine tiefgreifende Untersuchung hinsichtlich potenzieller Addukte wurde an dieser Stelle jedoch abgesehen.

Damit konnten innerhalb dieser Mutasynthese keine weiteren Indizien für die Bildung von dVio **31** oder dessen Derivaten **95-100** festgestellt werden. Lediglich der schwach

absorbierende Peak bei ca. 1.4 min könnte auf ein entsprechendes Molekül zurückzuführen sein, wobei jedoch weder eine entsprechende Molekülmasse noch das charakteristische Absorptionsmaximum gefunden werden konnte. Da innerhalb dieses Ansatzes ein adäquates Bakterienwachstum über die OD_{700} beobachtet werden konnte, scheint das verwendete Minimal-Medium demnach für die Organismen auszureichen. Jedoch könnte unter diesen Bedingungen die Produktion der entsprechenden Vio-Enzyme eingeschränkt sein, während in LB-Medium die Enzyme in höheren Mengen produziert wurden.

Eine weitere Problematik stellt die bakterielle Aufnahme des Tryptophan-Analogons dar, denn für die Bildung von dVio-Derivaten muss eine ausreichend hohe Aufnahme des Mutasynthesesynthons gewährleistet sein. Möglicherweise wurde das chlorierte Tryptophan somit nur unzureichend aufgenommen oder aus den Zellen heraustransportiert. Neben weiteren Publikationen, welche die Aufnahme von natürlichem Tryptophan aus dem Medium belegen,[151] demonstriert auch die erfolgreiche Produktion von dVio von den Trp-auxotrophen Stämmen in LB-Medium, dass die Aminosäure von den hier verwendeten *P. putida* Stämmen aufgenommen werden kann, jedoch muss dies nicht zwingend auch für die Derivate der Aminosäure gelten. Zudem gibt es eine Reihe an Transportersystemen, welche den Export von Tryptophan aus den entsprechenden Zellen heraus bewerkstelligen. Diese sind für *E. coli* deutlich tiefgreifender untersucht worden,[157, 158] was jedoch die Frage unbeantwortet lässt, ob diese auch in *P. putida* vorliegen. Zudem wurde in einer weiteren Publikation die Menge an Exportpumpen als Grund genannt, warum *P. putida* eine so hohe Lösungsmittel- und Antibiotika-Resistenz aufweist.[159, 160] Somit könnte nicht nur die Aufnahme des Mutasynthese-Analogons problematisch sein, sondern auch der Trp-Export der Umsetzung zum gewünschten Naturstoff im Wege stehen.

Innerhalb der hier beschriebenen Mutasynthese konnte daher keine Produktion von Biosynthese-Intermediaten nachgewiesen werden. Die hier verwendeten Enzyme (RebODVioCD) konnten jedoch schon von Freemont *et al.* genutzt werden, um dVio-Derivate zu produzieren.[137] Dies belegt, dass demnach nicht nur die Enzyme RebOD die halogenierten Verbindungen umsetzen können, sondern auch die Enzyme VioCD durchaus in der Lage sind, die 7-chlorierten Intermediate umzusetzen. In der Untersuchung von Freemont *et al.* wurde das benötigte (*S*)-7-Chlortryptophan (**82**) jedoch nicht zugefüttert, sondern die Halogenierung von Tryptophan durch die Enzyme RebFH *in vivo* durchgeführt, wodurch die halogenierte Aminosäure innerhalb der Zellen produziert und direkt zum Naturstoff umgesetzt wurde. Die Abwesenheit jeglicher chlorierter Intermediate innerhalb des hier durchgeführten Mutasynthese-Experiments verstärkt somit die Hypothese, dass die 7-Cl-Trp-Aufnahme einen kritischen Engpass darstellt und somit die dVio-Derivat-Produktion verhindert.

3.4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Zuge dieses Deoxyviolacein-Projektes sollte über die mutasynthetische Kultivierung von *P. putida* Stämmen eine neue Plattform etabliert werden, welche den Zugang zu dVio-Derivaten ermöglicht. Dazu wurden zunächst die anvisierten Verbindungen **95-100** des Naturstoffs über eine bekannte Totalsynthese als Produktreferenz hergestellt.[104] Die dafür angewandte Syntheseroute zeigt jedoch nur geringe Ausbeuten, wobei insbesondere die Schwierigkeiten in der Aufreinigung des Naturstoffs hervorzuheben sind. Dies bestätigt die Wichtigkeit, den

Naturstoff mit einer hohen Reinheit zu generieren, und hebt gleichzeitig das Potenzial biotechnologischer Methoden hervor.

Daher wurden verschiedene Stämme von *P. putida* KT2440 von den Kooperationspartnern entwickelt, indem nicht nur der natürliche *vio*-Gencluster chromosomal integriert wurde, sondern zusätzlich *vioAB* gegen *rebOD* ausgetauscht wurde. Um die selektive Produktion von dVio-Derivaten weiterhin zu optimieren, wurden durch *knock-out* der Gene *trpDC* die Stämme von der Zufütterung von Tryptophan(-Analoga) abhängig gemacht.

Zur Vorbeitung der Mutasynthese sollten außerdem verschiedene Tryptophananaloga enantioselektiv in großem Maßstab bereitgestellt werden. Über die iridiumkatalysierte CH-Aktivierung konnten verschiedene Substituenten in 7-Position des Tryptophans (**13**) angehängt werden. Aufgrund der langen Syntheseroute durch das Anfügen und Abspalten benötigter PGs ist diese Synthese jedoch sehr zeitaufwending und ineffizient. Durch die Anwendung einer Tryptophan-Synthase konnte hingegen aus (*S*)-Serin und 7-Chlorindol (**45**) innerhalb eines chemoenzymatischen Schrittes die 7-chlorierte Aminosäure in hohen Ausbeuten hergestellt werden.

In den abschließenden Mutasynthese-Experimenten konnte die Produktion von dVio-Derivaten **95-100** jedoch nicht bestätigt werden. Während in Kultivierungen in LB-Medium der unsubstituierte Naturstoff **31** produziert werden konnte, was somit die erfolgreiche Expression des Genclusters innerhalb der Organismen bestätigt, konnten in Minimal-Medium weder der finale Naturstoff noch entsprechende Intermediate gefunden werden.

Dass der verwendete Gencluster *rebODvioCE* die Produktion von dVio-Derivaten ermöglicht, konnte schon von Freemont *et al.* bestätigt werden.[137] In der zugehörigen Publikation wurden die entsprechenden Gene jedoch nur über ein Plasmid in *E. coli* eingebracht. Die chromosomale Integration erweist sich zwar als schwieriger in der Entwicklung, bietet jedoch den Vorteil der langfristigen Stabilität der Gene. Zudem ist, aufgrund der hohen Toleranz gegenüber Lösungsmitteln und Antibiotika, die Verwendung von *P. putida* förderlich, um hohe Produkttiter zu erhalten. Dies bildet den Grundstein für eine langfristig stabile Produktion des Naturstoffs. Da jedoch in den Mutasynthese-Ansätzen kein Umsatz zu einem der Intermediate beobachtet werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass die Organismen das Mutasynthon nicht in ausreichenden Mengen aufnehmen können und somit die Produktion des Naturstoffs erliegt.

In folgenden Untersuchungen sollte demnach tiefgreifend analysiert werden, ob die Biosyntheseintermediate tatsächlich nicht produziert wurden. Obgleich die LC-MS dafür eine geeignete Methode darstellt, können diese Intermediate in der Gesamtverteilung an extrahierten Verbindungen eine untergeordnete Rolle spielen und daher womöglich nicht erfasst werden. Da die verwendete LC-Methode auch hauptsächlich auf die Detektion des Endprodukts optimiert wurde, könnten weitere Informationen über vorliegende Intermediate durch veränderte Chromatographie-Bedingungen erhalten werden.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob das 7-chlorierte Tryptophan (**82**) in adäquaten Mengen resorbiert werden kann und damit zur Biosynthese von dVio-Derivaten **95-100** zur Verfügung steht. Dabei gibt es gleich mehrere Faktoren zu beachten, welche in dieser Hinsicht untersucht werden können.

1. Da das natürliche, unsubstituierte Tryptophan (**13**) resorbiert werden kann, bleibt ungeklärt, ob lediglich die Resorption der 7-Chlor-Verbindung **82** kritisch ist oder ob

diese Problematik bei anderen Tryptophan-Derivaten ebenfalls besteht. Möglicherweise sind die entsprechenden Tryptophan-Permeasen in dieser Hinsicht selektiv, so dass je nach Substitutionsmuster eine höhere Affinität bezüglich des Membran-Transports mancher Tryptophanverbindung seitens der Permease besteht.

2. Mit Hinblick auf eine höhere Affinität der Membrantransporter zu verschiedenen Tryptophan-Analoga würde folglich die Rate der Tryptophanresorption beeinflusst werden. Möglicherweise wird somit das Mutasynthon in die Zelle aufgenommen, jedoch führt eine langsame Rate nur zu geringen Konzentrationen innerhalb der Organismen, wodurch die Biosynthese von dVio-Derivaten deutlich verlangsamt wird.
3. Der Resorption von Tryptophan-Derivaten steht der Export der Verbindung gegenüber. Besonders *P. putida* zeichnet sich durch die Anwesenheit von vielen universellen Exportern aus, welche dem Organismus seine charakteristische Resistenz gegenüber Lösungsmitteln und Antibiotika verleiht. Wenngleich dies eigentlich ein Vorteil für die Produktion von dVio-Derivaten sein sollte, könnte dies ebenso problematisch bei der Aufnahme des Mutasynthons sein. So könnte dieser Mechanismus die unnatürlichen, Organismus-fremden Verbindungen erkennen und aus der Zelle transportieren. Auch hier stellt sich die Frage, ob insbesondere die 7-chlorierte Verbindung **82** in besonderem Maße davon betroffen ist und ob andere Trp-Derivate weniger oder stärker belastet wären.

Um zu untersuchen, welcher dieser Faktoren ausschlaggebend ist, könnten daher zunächst weitere Kultivierungen mit verschiedenen Mutasynthons durchgeführt werden. Sollte bei keinem der Mutasynthons der Naturstoff oder dessen Intermediate detektiert werden können, müsste die Resorption bzw. der entgegenwirkende Export der Mutasynthons tiefgreifender untersucht werden. Eine umfassende Analyse der daran beteiligten Enzyme könnte Aufschluss darüber geben, welcher dieser Prozesse entscheidend ist und wodurch diese beeinflusst werden. Zusätzlich könnte durch *labelling* der Tryptophan-Analoga gezeigt werden, ob die Verbindungen innerhalb der Zellen vorliegen oder ausschließlich extrazellulär verweilen. Für den Fall, dass bestimmte Efflux-Pumpen somit die intrazelluläre Tryptophan-Konzentration verringern, könnte eine Deletion dieser Gene vorteilhaft sein.

Nach erfolgter Optimierung der Mutasynthese zur Produktion von dVio-Derivaten könnte eine weitere Steigerung der Ausbeute durch biotechnologische Optimierung des Bioprozesses erzielt werden. Dies sollte ohnehin Teil dieses Projektes sein, konnte jedoch aus zeitlichen Gründen nicht mehr realisiert werden, da die Entwicklung der entsprechenden Stämme einen höheren Arbeitsaufwand darstellte als zunächst angenommen. Durch die genaue Beobachtung verschiedener Parameter, wie z. B. dem Sauerstoff- oder Glukosegehalt, oder der zeitlich-adaptierten Zufütterung von Tryptophan, würde ein optimiertes Zellwachstum und damit letztlich auch ein höherer Produkttiter ermöglicht werden. Die Kultivierung im Bioreaktor stellt zudem ein deutlich höheres Volumen zur Verfügung, wodurch auch kleinere Mengen der Produkte detektiert werden können. In den anfangs durchgeführten Experimenten der Kooperationspartner (M. Oldiges und A. Reiter) konnte durch diese Methoden ein deutlicher Zuwachs der Produktbildung gezeigt werden, wobei bis zu 250 mg/8 g Zelltrockengewicht erreicht wurden (unveröffentlichte Daten).

Abschließend konnte die Produktion von dVio-Derivaten somit nicht über die Mutasynthese mit *P. putida* realisiert werden. Eine detaillierte Analyse der potenziellen Engpässe könnte jedoch eine Lösung für die bestehenden Schwierigkeiten liefern. Innerhalb dieses Projektes

konnten jedoch neue dVio-Derivate **95-100** über die bekannte Totalsynthese erhalten und größtenteils erfolgreich charakterisiert werden.

P

4. PHYSOSTIGMIN

4.1. Kenntnisstand

4.1.1. Entdeckung und physiologische Eigenschaften

Physostigmin (**28**) ist ein prominenter Vertreter der Pyrroloindol-Alkaloide. Dieser Naturstoff sowie auch noch viele artverwandte Strukturen wie Physovenin (**126**) und Geneserin (**127**) (Abbildung 33), wurden aus den Samen der Kalabarbohne (*Physostigma venenosum*) isoliert.[161, 162] Nicht zuletzt wegen der starken Wirkung im menschlichen Körper wurde die Bohne von einem indigenen Volk Afrikas auch ‚Gottesurteilsbohne' genannt, indem die Samen mutmaßlichen Verbrechern verabreicht wurden, was in den meisten Fällen den zu einem schnellen Tod und damit zum ‚gerechten' Urteil Gottes führte.[163, 164]

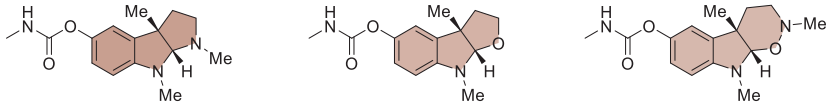


Abbildung 33: Chemische Struktur der aus der Kalabarbohne isolierten Indolalkaloide.

Seit dem 19ten Jahrhundert sind die Samen nicht nur in der Kulturgeschichte bekannt, sondern wurden auch die enthaltenen Wirkstoffe extrahiert und der potenziell tödliche Wirkmechanismus genau beschrieben.[165] Physostigmin (**28**) ist ein Inhibitor der Acetylcholinesterase (AChE) sowie Butyrylcholinesterase (BChE) und hat damit eine parasympathomimetische Wirkung (Abbildung 34).[166]

Nachdem im Zuge der Signaltransduktion zwischen Nervenzellen die Botenstoffe Acetylcholin (ACh) oder Butyrylcholin (BCh) in den synaptischen Spalt sekretiert werden, sorgen die Enzyme AChE, bzw. BChE dafür, dass die Neurotransmitter wieder abgebaut und von der präsynaptischen Zelle resorbiert werden können. Als Inhibitor dieser Esterasen bewirkt Physostigmin, dass die Botenstoffe im synaptischen Spalt akkumulieren und damit der Reiz für eine verlängerte Zeitspanne an die postsynaptische Zelle weitergeleitet wird. Die Inhibition dieser Enzyme ist somit ein *target* zur symptomatischen Behandlung von (krankheitsbedingtem) Mangel an ACh/BCh.[167, 168] Daher wurde Physostigmin (**28**) auch als Therapeutikum gegen Alzheimer untersucht, da auch bei diesem Krankheitsverlauf das Absterben der Neuronen einen Mangel der Transmitter verursacht.[169, 170] Aufgrund von nachteiligen pharmakokinetischen Eigenschaften wurde Physostigmin jedoch nicht als Medikament zugelassen. Physostigmin (**28**) wurde des Weiteren als Gegengift bei Atropin-Intoxikation untersucht, bei der die ACh-Rezeptoren durch das Toxin blockiert werden.[171] Für eben diese Zwecke wird Physostigmin (**28**) auch heute noch als Therapeutikum eingesetzt, z. B. bei Überdosierung von Anticholinergika wie Benzodiazepinen, sowie auch zur Behandlung eines Glaukoms.[167, 172]

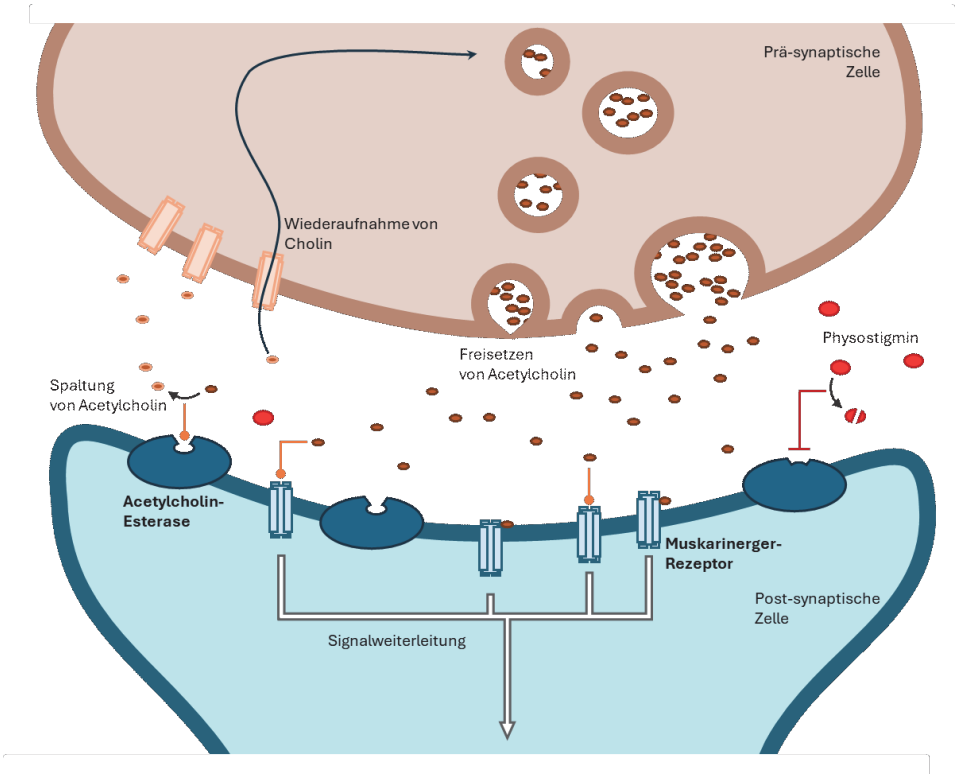
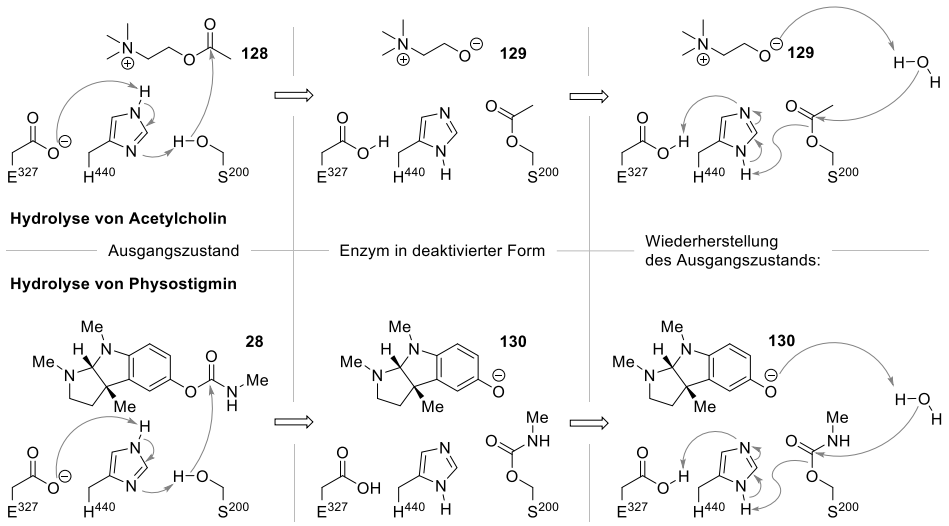


Abbildung 34: Schematische Darstellung eines synaptischen Spalts. Bei der Übertragung eines Reizes zwischen zwei Zellen werden von der präsynaptischen Zelle Transmitter wie ACh oder BCh in die Synapse freigesetzt. Diese können an muskarinerge Rezeptoren in der postsynaptischen Zelle binden, wodurch das Signal weitergeleitet wird. Freigesetztes ACh/BCh wird anschließend durch die AChE/BChE gespalten und von der präsynaptischen Zelle wieder aufgenommen. Physostigmin (**28**) kann die AChE/BChE inhibieren, wodurch die freigesetzten Transmitter im synaptischen Spalt verbleiben.

Strukturell besteht der Naturstoff aus einem Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol (HHP), welcher sowohl an den zwei zentralen Stickstoffen sowie auch in *3a*-Position methyliert ist (Abbildung 33). Die daraus resultierende Orientierung des stereogenen Zentrums spielt an diesem Punkt eine nicht zu vernachlässigende Rolle, da das (-)-Enantiomer um ein 1 000-faches potenter ist als die entsprechende (+)-Verbindung.[172] Zudem ist der Ring in 5-Position durch einen *N*-Methylcarbamat-Substituenten funktionalisiert, dessen Anwesenheit von entscheidender Bedeutung für den inhibitorischen Wirkmechanismus der AChE ist (Schema 20). Die kritischen Aminosäuren, bestehend aus Glutamat^{327}, Histidin^{440} und Serin^{200}, befinden sich im aktiven Zentrum in geringem Abstand zueinander, sodass die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Deprotonierung des Serins führen.[173] Das negativ geladene Serin kann so die Spaltung des Esters von ACh (**128**) bewirken und verbleibt selbst acetyliert zurück. Durch umgebendes Wasser wird abschließend der Serinester gespalten und der Ausgangszustand im Enzym wiederhergestellt. Im Falle des Physostigmins (**28**), führt die nukleophile Spaltung des Carbamats jedoch zur Carbamoylierung des Serins, dessen Hydrolyse deutlich langsamer abläuft. Die AChE ist somit für einen längeren Zeitraum in der deaktivierten Form, was schließlich zur Akkumulation von ACh im synaptischen Spalt führt.



Schema 20: Katalyse-Mechanismus der hydrolytischen Spaltung von ACh bzw. Physostigmin (**28**) durch die AChE.[173] Die Regeneration des Ausgangszustands ist beim carbamoylierten Ser^{200} (nach Umsetzung von Physostigmin) bedeutend langsamer als beim veresterten Ser^{200} (nach Umsetzung von ACh).

Das Pharmakophor des Physostigmins (**28**) wurde anschließend als Leitstruktur angesehen, um weitere Parasympathomimetika zu finden. Neben Phenserin (**131**), Tolserin (**132**) und Epastigmin (**133**) wurden auf diese Weise auch Verbindungen gefunden, die strukturell vom Physostigmin (**28**) weit entfernt sind, aber dennoch einen ähnlichen Wirkungsmechanismus haben (Abbildung 35).[174, 175]

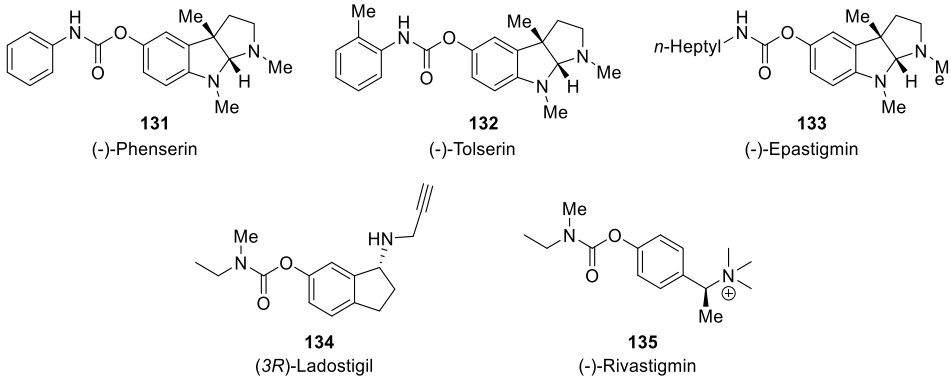
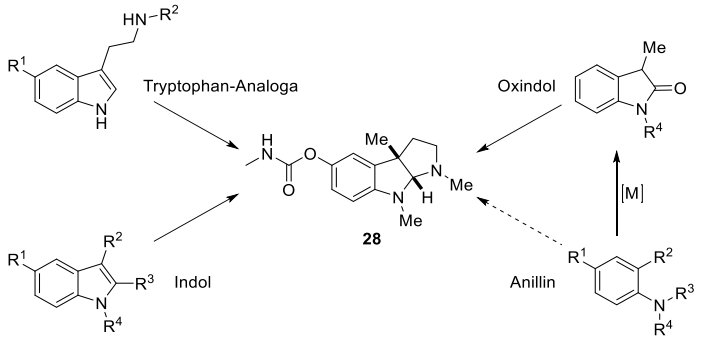


Abbildung 35: Chemische Struktur der synthetischen Physostigmin-Derivate Phenserin, Tolserin und Epastigmin sowie weitere Analoga mit parasympathomimetischer Wirkung.

Während für Epastigmin (**133**) zu viele weitere Nebenwirkungen entdeckt wurden, schien Phenserin (**131**) durch die Derivatisierung nicht mehr wirksam genug zu sein. Ebenso wurden auch für Ladogistil (**134**) die klinischen Studien als Therapeutikum der Alzheimer-Krankheit eingestellt, da das Fortschreiten der Demenz unter einer Behandlung mit Ladogistil nicht ausreichend eingeschränkt wurde.[176] Rivastigmin (**135**) hingegen ist im Jahr 2000 als Alzheimer-Medikament zugelassen worden und wird seitdem unter dem Markennamen Exelon vertrieben.[177]

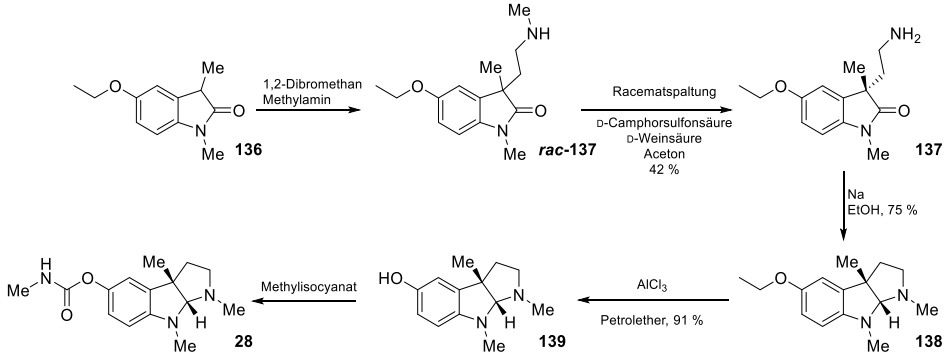
4.1.2. Totalsynthesen

Aufgrund der interessanten physiologischen Eigenschaften wurden in der Vergangenheit bereits verschiedene Totalsynthesen von Physostigmin veröffentlicht, wobei sich jedoch die enantioselektive Synthese des HHP-Gerüst als anspruchsvoll erwiesen hat. Das Kohlenstoffgerüst kann auf verschiedene Weisen aufgebaut werden, je nachdem von welchen Edukten die Synthese ausgeht. Man kann dabei grob zwischen den Indol-, Oxindol- und biomimetischen Ansätzen unterscheiden, wobei Letztere Tryptophan-ähnliche Substrate verwenden (Schema 21). In den meisten Fällen befindet sich in 5-Position (R^1) schon ein Methoxy-Substitutent, um eine Hydroxylierung zu einem späten Zeitpunkt zu umgehen.



Schema 21: Mögliche Syntheserouten zum Physostigmin (**28**) ausgehend von funktionalisierten Indolen, Oxindolen, Tryptophanen und Anilinen.

Neuere Methoden ermöglichen hinzukommend den Aufbau des Kohlenstoffskeletts ausgehend von substituierten Anilinen, in Abhängigkeit vom eingesetzten Übergangsmetall-Katalysator, wenngleich auf diese Weise oft Oxindol-ähnliche Intermediate erreicht werden. Im Folgenden sollen beispielhaft einzelne Syntheserouten gezeigt werden.

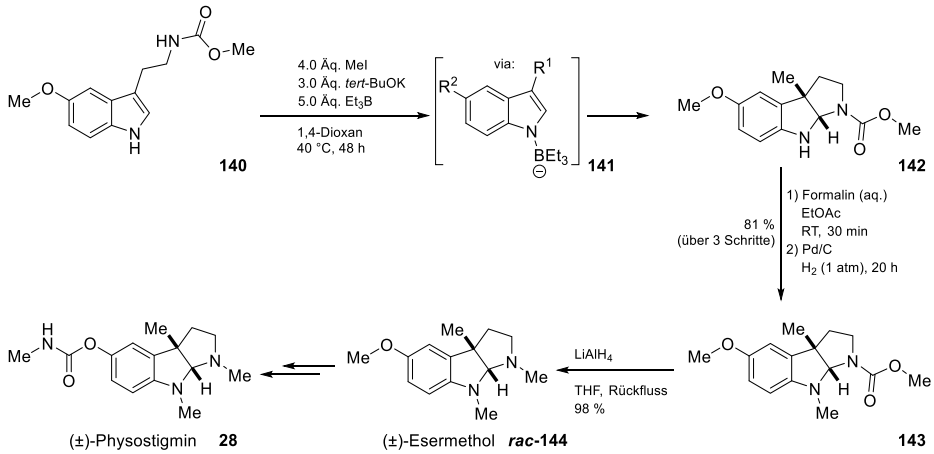


Schema 22: Erste Totalsynthese von Physostigmin, beschrieben von P. Julian und J. Pikl, ausgehend von 5-Ethoxy-2-oxoindol[178], wobei der letzte Schritt der Route schon von M. Polonovski und C. Nitzberg beschrieben wurde.[179]

Bei der ersten Synthese von Physostigmin (**28**) im Jahre 1935 konnte die Verbindung ausgehend von einem Oxindol **136** hergestellt werden. Um ausschließlich das gewünschte Enantiomer zu erhalten, wurde das racemische Gemisch des Amins ***rac*-137** durch Umkristallisation mit D-Camphersulfonsäure und D-Weinsäure vom entsprechenden Gegenstück separiert (Schema 22).[178] Unter reduktiven Bedingungen wurde anschließend die

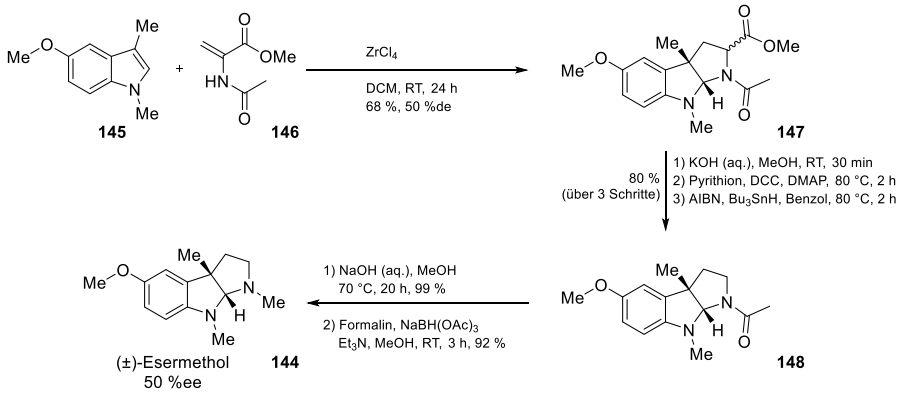
Zyklisierung zum Pyrroloindol **138** durchgeführt, ehe der 5-ständige Ether gespalten wurde und somit (-)-Eserolin (**139**) erhalten wurde. Der letzte Schritt der Synthese wurde bereits zuvor von Polonovski und Nitzberg beschrieben, welche das natürlich isolierte (-)-Eserolin (**139**) mithilfe von Methylisocyanat zu (-)-Physostigmin (**28**) umsetzen konnten.[179]

Eine weitere Synthese bedient sich des biomimetischen Ansatzes, indem Tryptophan-ähnliche Ausgangsmoleküle (wie hier Tryptamincarbamat **140**) in der Route von You *et al.* eingesetzt wurden (Schema 23).[180] Die dearomatisierende Zyklisierung erfolgt mithilfe von Triethylboran, das sich an den Indol-Stickstoff anlagert (Übergangszustand **141**). Dadurch wird zum einen eine Nebenreaktion des Stickstoffs mit dem Elektrophil (Methyliodid) verhindert, zum anderen macht die negative Ladung den Indolring deutlich nukleophiler.[181] Auf diese Weise kann in einem Schritt der HHP-Ring (Verbindung **142**) ausgehend von **140** aufgebaut werden. Durch die anschließende reduktive Aminierung sowie die Reduktion des Carbamats **143** konnte in zwei weiteren Schritten (±)-Esermethol (***rac*-144**) erhalten werden.



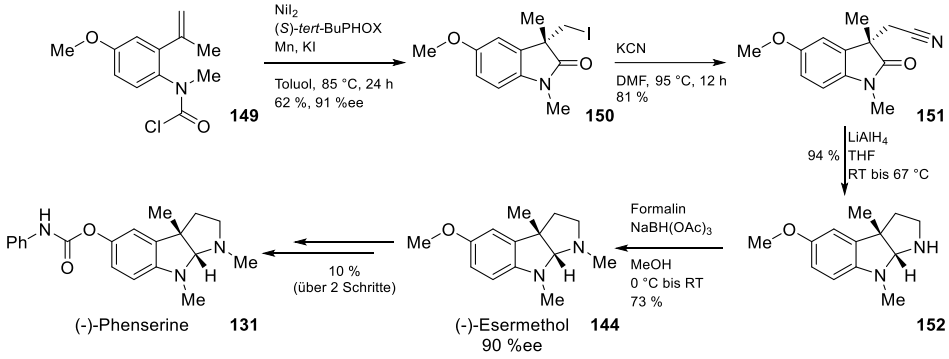
Schema 23: Biomimetischer Ansatz zur Synthese von (±)-Esermethol (***rac*-144**) ausgehend von Tryptamincarbamat **140** mithilfe einer dearomatisierenden Zyklisierung nach You *et al.*[180]

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Synthesen wurden anschließend auch enantioselektive Synthesen des Naturstoffs in den Fokus gerückt. Die von Spadoni *et al.* gewählte asymmetrische Route baut den HHP-Ring direkt zu Beginn in einer Zirconium-katalysierten [2+3]-Cycloaddition auf (Schema 24). Die dabei beobachtete Diastereoselektivität zeigte eine starke Abhängigkeit von den angefügten Substituenten.[182] Während bei einem unsubstituierten 1*H*-Indol ein *exo*/*endo*-Verhältnis von 9:1 erhalten wurde, konnte in der totalsynthetischen Anwendung (mit Dimethylmethoxyindol **145**) nur ein Verhältnis von 3:1 beobachtet werden. Als möglicher Grund für die beobachtete Selektivität wurde vermutet, dass der Ester unter sauren Bedingungen die *exo*-Position präferiert. Der erhaltene Pyrroloindolester **147** wurde anschließend verseift, bevor unter Barton-Bedingungen eine Decarboxylierung durch Überführung in den entsprechenden Thiohydroxamat-Ester durchgeführt wurde. Die Spaltung des Amids **148** und reduktive Aminierung führten letztlich zum angestrebten (±)-Esermethol (**144**). Unter der Voraussetzung, dass diese nachgeschalteten Reaktionen nicht zur Racemisierung führen, beträgt der Enantiomerenüberschuss des finalen Produkts somit lediglich 50 % (aufgrund der beobachteten Selektivität der Cycloaddition).



Schema 24: Synthese von (±)-Esermethol (**144**) ausgehend von *N*-,3-Methyl-5-Methoxyindol (**145**) über eine Lewis-Säure-vermittelte [2+3]-Cycloaddition mit Verbindung **146** nach Spadoni *et al.*[182]

Mit fortschreitenden Erkenntnissen in der Übergangsmetallkatalyse wurden auch Methoden entwickelt, um Pyrroloindole mit hohen Selektivitäten aufzubauen. Beispielhaft ist hier die Nickel-katalysierte Carbamoyl-Iodierung gezeigt, bei der ein chiraler Ligand genutzt wird, um 3,3-disubstituierte Oxindole aufzubauen (Schema 25).[183]

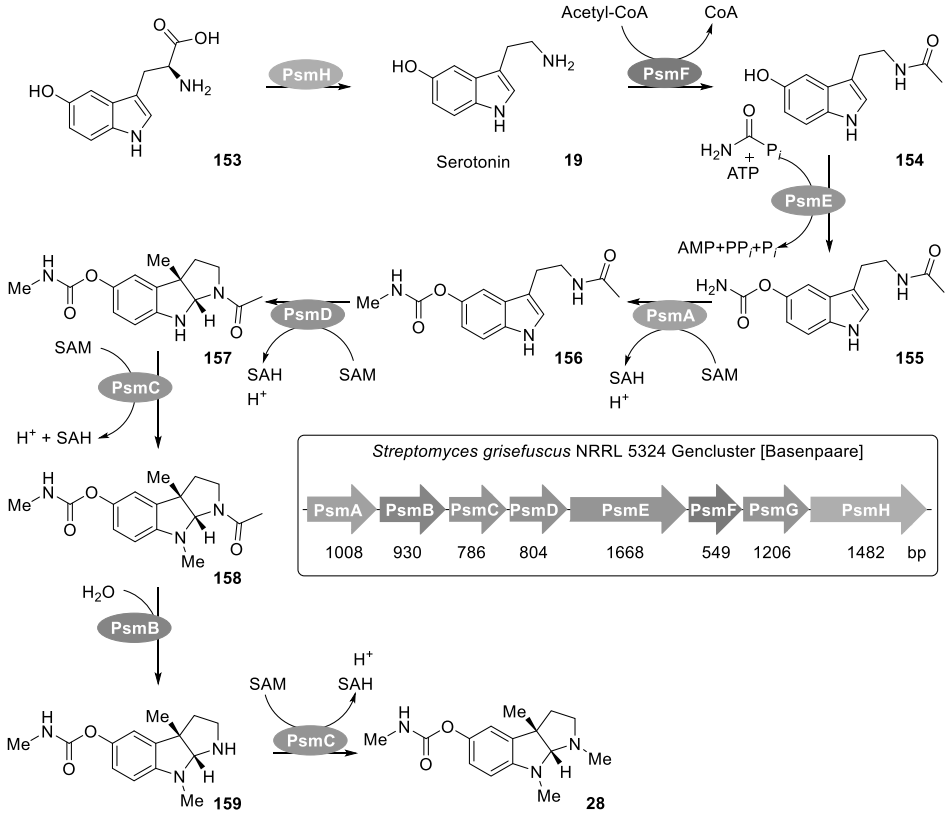


Schema 25: Nickelkatalysierte Synthese von Esermethol (**144**) und Phenserine (**131**) mittels enantioselektiver Carbamoyl-Iodierung nach Lautens *et al.*[183]

In der entsprechenden Publikation wurden – zusätzlich zu verschiedenen Substituenten am Styrol – mehrere Liganden getestet, wobei die höchsten Enantioselektivitäten bei *tert*-BuPHOX-Liganden gemessen wurden. Die Selektivität der Reaktion variierte je nach Substitutionsmuster, sowohl in der aromatischen als auch in der Vinyl-Position des Styrols. Es wurde daher vermutet, dass nicht nur der sterische Anspruch der verwendeten Liganden selektivitätsbestimmend ist, sondern auch deren Hybridisierung. In der Synthese zu Esermethol (**144**) bzw. Phenserine (**113**) konnte das Carbamoylchlorid **149** mit hoher Selektivität in Oxindoliodid **150** umgesetzt werden, das anschließend zum Cyanid **151** umgewandelt wurde. Unter reduktiven Bedingungen entstand das zugehörige Amin **152**, wobei gleichzeitig der Ringschluss zum Pyrroloindol erfolgte. Auch hier wurde zuletzt durch eine reduktive Aminierung das (-)-Esermethol (**144**) erhalten, welches nach Abspaltung der Methyl-Gruppe und anschließender Carbamoylierung zum (-)-Phenserine (**131**) (oder wahlweise auch zum (-)-Physostigmin (**28**)) umgesetzt werden kann.

4.1.3. Biosynthese

Nach der frühen Entdeckung von Physostigmin (**28**) und weiteren artverwandten Verbindungen aus den Extrakten der Kalabarbohne konnten diese später auch durch Fermentation mit *Streptomyces griseofuscus* NRRL 5324 hergestellt werden.[184, 185] Die zugrundeliegende Biosynthese wurde jedoch erst einige Zeit später von Zhang *et al.* aufgeklärt, wobei ein 8.5 kb langer Gencluster mit acht verschiedenen Genen beschrieben wurde (Schema 26). Durch systematischen *knock-out* der einzelnen Gene konnte gezeigt werden, dass sieben Enzyme direkt an der Biosynthese des Naturstoffs beteiligt sind.[186] Lediglich für PsmG konnte keine enzymatische Aktivität gemessen werden. Allerdings wurde festgestellt, dass das Protein eine Häm-Bindestelle hat und möglicherweise eine regulatorische Funktion besitzt.[187]



Schema 26: Identifizierter Gencluster aus *Streptomyces griseofuscus* NRRL 5324 und daraus abgeleitete Biosynthese von Physostigmin nach Zhang *et al.* [186]

Der Biosyntheseweg beginnt beim 5-Hydroxytryptophan (**153**), welches vermutlich mithilfe einer bisher nicht identifizierten Hydroxylase gebildet wird. Nach erfolgter Decarboxylierung durch die Pyridoxal-5'-phosphat(PLP)-abhängige Decarboxylase PsmH entsteht Serotonin (**19**), welches anschließend von der *N*-Acetyltransferase PsmF zu Normelatonin (**154**) acetyliert wird. Durch die Carbamoyltransferase PsmE wird unter Verbrauch von ATP die 5-Carbamatgruppe aufgebaut (Verbindung **155**), welche anschließend von der *N*-Methyltransferase PsmA methyliert wird (Verbindung **156**). Durch eine *C3*-Methylierung katalysiert von PsmD bei gleichzeitiger Zyklisierung wird der Pyrrolring

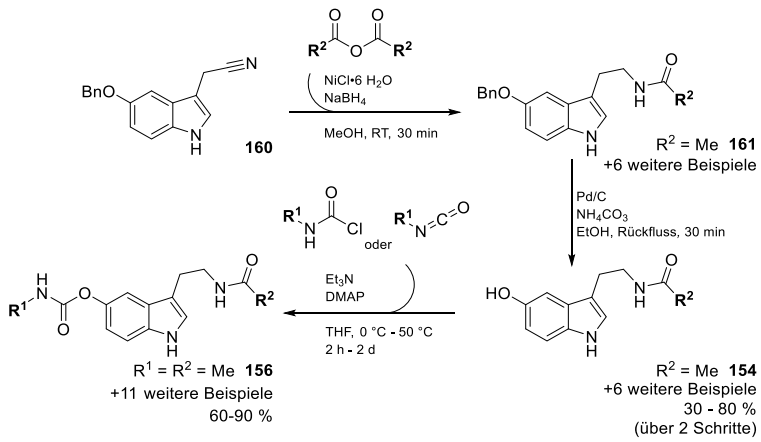
geschlossen und somit das HHP **157** erhalten. Über die Zwischenstufen **158** und **159** werden durch das aufeinanderfolgende Wirken von *N*-Methyltransferase PsmC und Esterase PsmB schließlich beide Pyrroloindol-Stickstoffe methyliert und die eingangs eingeführte Acetylgruppe entfernt. Dazu dient *S*-Adenosylmethionin sowohl den beiden *N*-Methyltransferasen (PsmA und PsmC) als auch der *C*-Methyltransferase (PsmD) als Methyldonor.

Insbesondere die durch PsmD katalysierte Reaktion gilt als Schlüsselschritt in dieser Biosynthese, da mit einem einzelnen Schritt nicht nur eine C-C-Bindung geschaffen, sondern zugleich die Zyklisierung zum HHP **157** bewerkstelligt wird. Die Stereoselektivität der *C3*-Methylierung bewirkt gleichzeitig auch die selektive Bildung des zweiten Stereozentrums, da aufgrund einer hohen Ringspannung nur das *syn*-zyklisierte Produkt gebildet werden kann. Dass für diese Transformation in einer chemischen Totalsynthese gleich mehrere Schritte notwendig sind, unterstreicht das Potenzial von SAM-abhängigen Methyltransferasen als Biokatalysatoren.

4.1.4. Physostigmin-Analoga mithilfe von Methyltransferase PsmD

Die erst kürzlich identifizierte Methyltransferase aus *Streptomyces griseofuscus* (PsmD_*Sg*) bietet damit ein weiteres Werkzeug, welches in einer chemoenzymatischen Totalsynthese von Naturstoffen eingesetzt werden kann. Wie auch bei dem biomimetischen Ansatz der Totalsynthesen (Schema 23), werden von der Methyltransferase PsmD Tryptophan-abgeleitete Verbindungen zum HHP umgesetzt. Der klare Vorteil, den der Einsatz von Methyltransferasen im Vergleich zu den herkömmlichen Methylierungsmethoden mit sich bringt, ist die hohe Selektivität des Enzyms, welche auf die einzigartige dreidimensionale Struktur des Enzyms zurückzuführen ist. Dies schließt allerdings auch die Bildung des invertierten Enantiomers aus. Darüber hinaus haben viele Enzyme eine hohe Affinität zu ihren natürlichen Substraten, jedoch wird diese durch zusätzliche Substituenten oder ausgetauschte funktionelle Gruppen stark beeinflusst. Der Einsatz von Enzymen als allgemeine Methode kann dadurch demnach stark begrenzt sein.

Die Möglichkeiten zur Anwendung von PsmD in der Synthese von Pyrroloindolen wurden schon von P. Schneider im Arbeitskreis von J. Pietruszka genauer untersucht. In dessen Publikation wurden einige Derivate des PsmD-Substrats **156** synthetisiert, welche sich durch die angefügten Reste am Carbamat oder am Amid unterscheiden (Schema 27).



Schema 27: Reaktionsschema zur Synthese von amid- und carbamatsubstituierten Indolcarbamaten zur Charakterisierung von PsmD, durchgeführt von P. Schneider.[188, 189]

Die Synthese wurde beim 5-Benzylxyindolacetonitril **160** gestartet, welches zunächst mit Natriumborhydrid zum Amin reduziert und durch Zugabe der gewünschten Anhydride zu den entsprechenden Amiden (z. B. **161** mit R^2 = Methyl) umgesetzt wurde. Anschließend wurde der Benzylether hydrogenolytisch gespalten und das erhaltene Phenol zuletzt carbamoyliert (Verbindung **156** mit $R^1 = R^2$ = Methyl). Dazu wurden, je nach gewünschtem Rest am Carbamat, entweder Carbamoylchloride oder Isocyanate verwendet. Letztere konnten aufgrund ihrer hohen Reaktivität in geringen Mengen eingesetzt werden, während das Carbamoylchlorid deutlich unreaktiver ist und schon geringfügige Kontaminationen mit Wasser die erfolgreiche Umsetzung beeinflussten. Je nach verwendetem Substituenten wurden Ausbeuten für die ersten zwei Schritte von 30-80 % publiziert, während die Ausbeute für die Carbamoylierung zwischen 60-90 % lag.[189]

Anschließend wurde mithilfe des Glo-Assays die verbleibende Metyltransferase-Aktivität gegenüber den hergestellten Derivaten in Relation zum natürlichen Substrat (Verbindung **156** mit $R^1 = R^2$ = Methyl) (Abbildung 36 – Eintrag 1) ermittelt.[190] Der Assay weist die Anwesenheit von SAH nach, indem über eine Enzymkaskade aus dem umgesetzten Cosubstrat eine quantitativ messbare Biolumineszenz generiert wird (Abbildung 36).

Kurze Zeit später wurde von D. Amariei eine homologe Methyltransferase aus *Streptomyces albulus* (PsmD_*Sa*) beschrieben. Aus biophysikalischer und biochemischer Sicht zeigte diese Variante einige Vorteile, darunter eine erhöhte Enzymstabilität sowie eine höhere Aktivität für die in Abbildung 36 gezeigten Derivate im Vergleich zu PsmD_*Sg*.[191] Dabei wurde einerseits bestätigt, dass die *N*-Methylcarbamatgruppe für die enzymatische Aktivität essentiell ist, da sowohl der Austausch zu einem Hydroxy-, Methoxy- oder Halogen-Rest als auch die vollständige Abwesenheit eines Substituenten in 5-Position die Aktivität um mindestens 90 % senkte (Eintrag 7-12). Außerdem führte auch die Vergrößerung der Substituenten am Carbamatstickstoff-angefügten zu weiteren Einbußen der Enzymaktivität (Eintrag 2-6). Lediglich für das Dimethyl-substituierte Carbamat (Eintrag 2) wurde mit 100 % (bzw. 89 %) ein Großteil der Aktivität beibehalten. Ein ähnlicher Trend wurde auch bei Verlängerung des Amid-Substituenten beobachtet. Während für PsmD_*Sg* mit 89 % und 40 % für das Ethylamid und das (*iso*-)Propylamid noch eine hohe Aktivität gemessen werden konnte (Eintrag 13-15),

wurden das *tert*-Butylamid und Phenylamid mit (weniger als) 14 % nur in geringen Mengen umgesetzt (Eintrag 16-17). PsmD_*Sa* hingegen zeigte für alle Substituenten einen Umsatz von mindestens 21 %, wobei insbesondere das *iso*-Propylamid (Eintrag 15) relativ gut umgesetzt wurde. Folglich scheint die Methyltransferase in der Amid-Position eine höhere Substrat-Promiskuität aufzuweisen als in der Carbamat-Position, wobei vor allem PsmD_*Sa* sich für den enzymatischen Umsatz von Derivaten eignet.

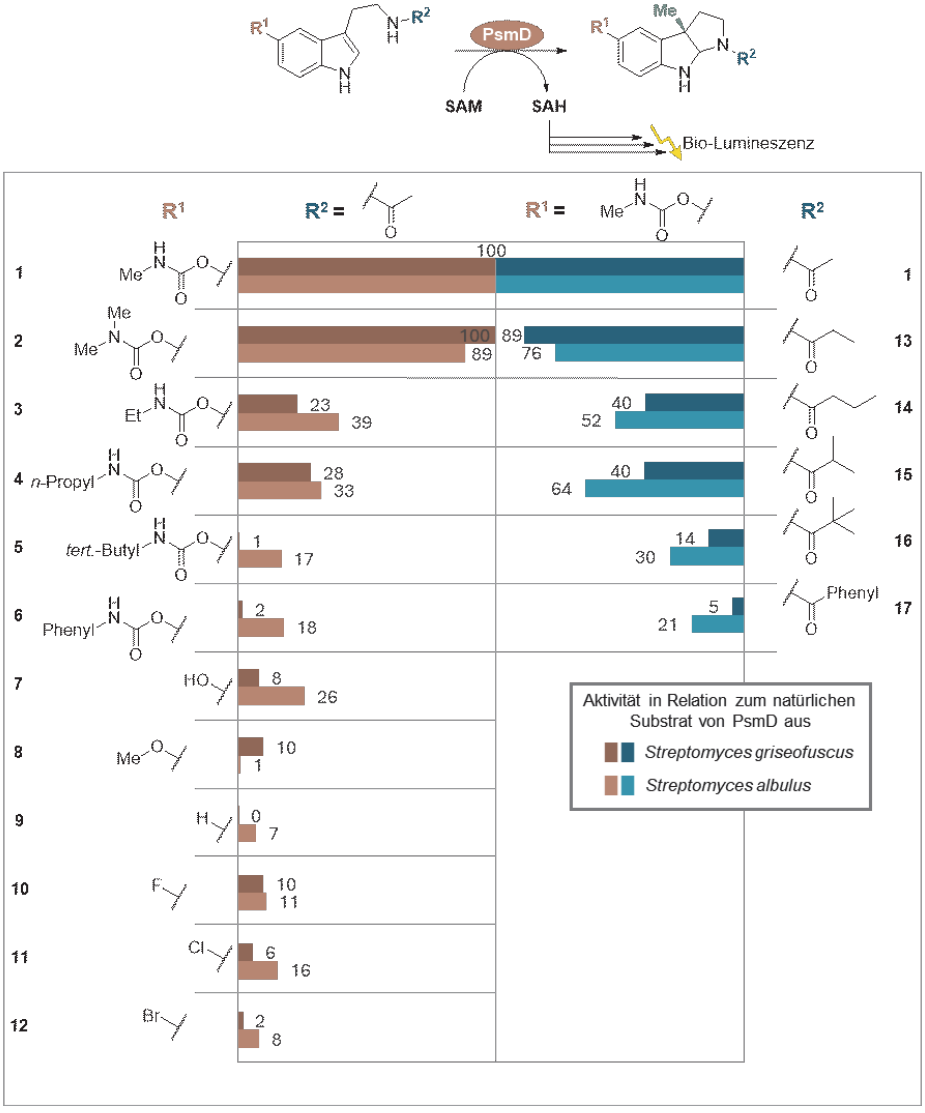
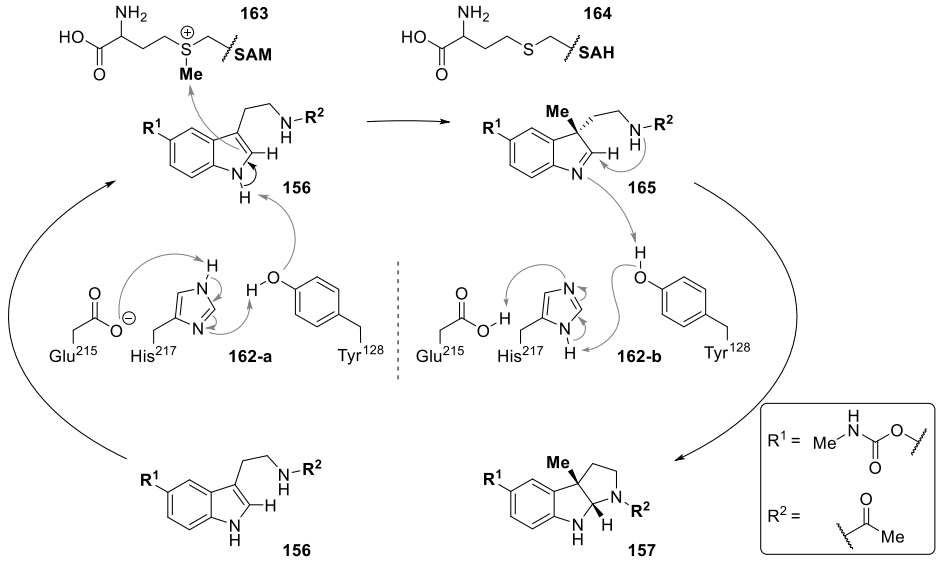


Abbildung 36: Aktivitäten der Methyltransferasen PsmD_*Sg* und PsmD_*Sa* bei der Umsetzung verschiedener Derivate des Substrats in Relation zum natürlichen Substrat **156** (1te Zeile: R¹=*N*-Methyl-Carbamat, R²=Acetyl). Links: Variierender R¹, wenn für R² die natürliche Acetylgruppe vorliegt. Rechts: Variierender R², wenn für R¹ die natürliche *N*-Methylcarbamatgruppe vorliegt.[59, 189, 191]

Zusätzlich konnte von D. Amariei eine Kristallstruktur von PsmD_*Sg* ermittelt werden, womit nach anschließendem Substrat-*docking* zwei potenzielle Wirkmechanismen der

Methyltransferase aufgezeigt werden konnten.[59] Der wahrscheinlichere Mechanismus beruht auf der elektronischen Aktivierung des Substrats durch einen Säure-Base-Mechanismus der katalytischen Triade **162** bestehend aus Glutamat[215], Histidin[217] und Tyrosin[128] (Schema 28). Dazu wird die negative Ladung des Glutamats durch einen *proton-shuttle* über das Histidin auf das Tyrosin übertragen (**162-a**). Letzteres kann dann das Substrat **156** aktivieren, indem das Proton des Indol-Stickstoffs abstrahiert wird. Die erhöhte Elektronendichte führt anschließend zu einem nukleophilen Angriff des *C3*-Kohlenstoffs auf die Methylgruppe des positiv-geladenen *S*-Adenosylmethionins (SAM) (**163**). Die Anlagerung des Substrats und des SAM in der Enzymkavität determinieren in diesem Schritt maßgeblich die Orientierung des neu aufgebauten *C3*-Stereozentrums. Das erhaltene Imin **165** wird durch einen zweiten, nukleophilen Angriff ausgehend vom Amid-Stickstoff zyklisiert, wodurch die katalytische Triade **162-b** ebenfalls regeneriert wird.

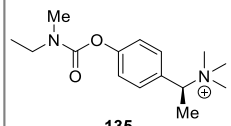


Schema 28: Anhand der Kristallstruktur vermuteter Reaktionsmechanismus der Methyltransferase PsmD mit katalytischer Triade, bestehend aus Glutamat[215], Histidin[217] und Tyrosin[128], nach D. Amariei.[59]

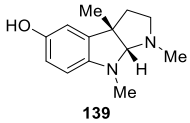
Mithilfe der Kristallstruktur konnten außerdem noch weitere kritische Aminosäuren gefunden werden, deren Austausch in einem Alanin-Scan deutliche Einbußen der enzymatischen Aktivität bewirkten. Voraussichtlich sind die entsprechenden Positionen an der konformativen Änderung des Enzyms während der Katalyse oder an der (Co-)Substrat-Bindung beteiligt. Beispielsweise verblieben für die Mutante E35A, welche anstatt des Glutamats[35] ein Alanin an dieser Stelle enthält, lediglich 5 % der Enzymaktivität (relativ zum natürlichen Substrat). Dieser Zusammenhang wurde durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Glutamat und der Carbamatgruppe des Substrats begründet. Diese Erkenntnis stützt die experimentellen Daten bezüglich des Umsatzes von nicht carbamoylierten Derivaten (Abbildung 36) und unterstreicht damit die Wichtigkeit des *N*-Methylcarbamats.[59, 189]

Einige der in Abbildung 36 gezeigten Derivate wurden zudem von P. Schneider in präparativem Maßstab umgesetzt und anschließend die mittlere inhibitorische Konzentration

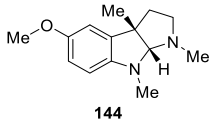
(IC_{50}) gegenüber der AChE und BChE gemessen.[188] Zum Vergleich wurden die Werte ebenfalls von den Naturstoffen Physostigmin (**28**), Eserolin (**139**), Esermethol (**144**) und vom zugelassenen Wirkstoff Rivastigmin (**135**) bestimmt (Abbildung 37).



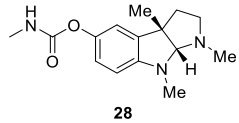
135
(-)-Rivastigmin



139
(-)-Eserolin



144
(-)-Esermethol



28
(-)-Physostigmin

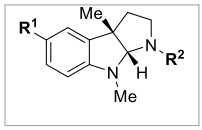
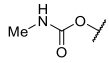
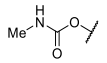
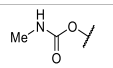
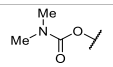
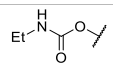
	Nr.	Verbindung	AChE-IC_{50} [µM]	BChE-IC_{50} [µM]	BChE/AChE
	135	Rivastigmin	36.1	1.0	0.03
	139	Eserolin	8.3	>1000	n.b.
	144	Esermethol	>1000	0.3	n.b.
	28	Physostigmin	0.13	0.12	0.92
		**R^1** **R^2**			
	157		0.09	0.01	0.10
	166		0.15	0.01	0.07
	167		0.19	0.02	0.10
	168		0.18	0.05	0.28
	169		0.40	0.02	0.05

Abbildung 37: Gemessene mittlere, inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von Rivastigmin (**135**), Eserolin (**139**), Esermethol (**144**) und Physostigmin (**28**) sowie von der Verbindung **157** und dessen Derivate **166-169** gegenüber der AChE und BChE, getestet von P. Schneider.[188]

Während Eserolin und Esermethol selektiv lediglich eine der zwei Esterasen (AChE oder BChE) inhibieren, stimmt die IC_{50} von Physostigmin gegenüber beiden Enzymen (0.13 und 0.12 µM) nahezu überein. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bereits die HHP-Verbindung **157** als Inhibitor agiert, welche ein Vorläufermolekül innerhalb der Biosynthese zum Physostigmin (**28**) ist. Die IC_{50} gegenüber der AChE liegt in diesem Fall in einem ähnlichen Bereich wie beim Physostigmin (**28**), allerdings wird die BChE deutlich stärker inhibiert als beim Naturstoff **28**. Dieser Trend setzt sich für die weiteren Derivate **166-169** fort, wobei größere Substituenten am Carbamat (R^1) oder am Amid (R^2) zu leicht erhöhten IC_{50}-Werten gegenüber der AChE führten.

Um weitere Derivate mithilfe der Methyltransferase PsmD in höheren Ausbeuten zugänglich machen zu können, wurden in einer *enzyme-engingeering*-Herangehensweise neue

Enzymmutanten von D. Amariei mittels iterativer Mutagenese produziert.[191] Dabei wurden Aminosäuren in kritischen Positionen ausgetauscht, um mehr Platz für die Substrat-Bindung der Derivate zu bieten und gleichzeitig die Enzymfaltung nicht negativ zu beeinflussen. Insbesondere für die Enzym-Mutante W166C konnte eine erhöhte Aktivität für das *tert*-Butylamid-Derivat beobachtet werden, wodurch ein präparativer Umsatz des Substrats mit einer isolierten Ausbeute von 60 % ermöglicht wurde. Somit kann mithilfe solcher Methoden die Aktivität eines Enzyms erhöht und damit das Substratspektrum erweitert werden.

4.2. Spezielle Zielsetzung

Der Naturstoff Physostigmin (**28**) inhibiert sowohl die AChE als auch die BChE und zog damit schon seit langer Zeit Interesse auf sich. In bisherigen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass nicht ausschließlich der Naturstoff, sondern auch dessen biosynthetische Vorläufer bereits biologisch aktiv sind. Insbesondere nach der Bildung des HHP-Gerüsts weisen die daraus erhaltenen Verbindungen bereits bei geringen Konzentrationen (<0.10 µM) eine inhibierende Aktivität gegenüber der AChE und BChE auf. Weiterhin wurden von P. Schneider HHP-Verbindungen mit variierenden Alkylsubstituenten in R^1 und R^2-Position (Abbildung 38) hergestellt, welche in vergleichbaren Konzentrationen die Hemmung der Cholinesterasen bewirken. Allerdings resultieren diese Modifikationen bei den entsprechenden Methyltransferase-Substraten in einer drastisch reduzierten Enzymaktivität, sodass die Synthese dieser Verbindungen mithilfe von PsmD in präparativem Maßstab beeinträchtigt ist.

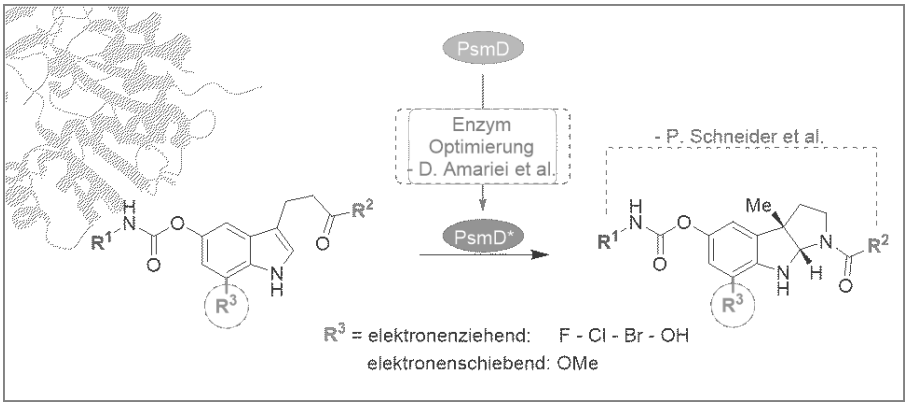


Abbildung 38: Schematische Zielsetzung hinsichtlich der Synthese von neuen Physostigmin-Vorläufern über die präparative Anwendung von Methyltranferase PsmD. Das Enzym sowie verschiedene Derivate (variierender R^1 und R^2) wurden von P. Schneider und D. Amariei bereits untersucht. Innerhalb dieser Arbeit soll R^3 variiert werden.

Infolgedessen sollen im Rahmen dieses Projektes weitere Derivate der Indolcarbamate hergestellt werden, um zum einen die Grenzen der Methyltransferase PsmD weiter zu beleuchten und zum anderen weitere potenziell aktive HHP-Derivate zu erhalten. In den bisherigen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die äußeren Positionen R^1 und R^2 entscheidend für den Erhalt der Methyltransferase-Aktivität sind. Aufgrund der räumlichen Nachbarschaft zum Carbamat wurden die 4- und 6-Position daher nicht berücksichtigt. Die Ethylkette ist ebenfalls als ungeeignete Position zu betrachten, um die Anlagerung des Cosubstrats SAM sterisch nicht zu beeinträchtigen. Daher wurde die zentrale 7-Position zur Derivatisierung anvisiert (R^3, Abbildung 38), um verschiedene Substituenten anzubringen und – im besten Fall – enzymatisch bis zum HHP umzusetzen. Als Substituenten sollten zunächst Substituenten mit geringem sterischem Anspruch in Betracht gezogen werden. Um jedoch die elektronischen Eigenschaften des Aromaten zu modifizieren, wurden sowohl elektronenziehende Reste wie Halogene oder Hydroxygruppen als auch elektronenschiebende Reste wie die Methoxygruppe ausgewählt. Nach erfolgter Methylierung und Bildung des HHP-Ringsystems sollten die neu generierten Derivate zusätzlich hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität gegenüber der AChE und BChE untersucht werden.

4.3. Ergebnisse und Diskussion

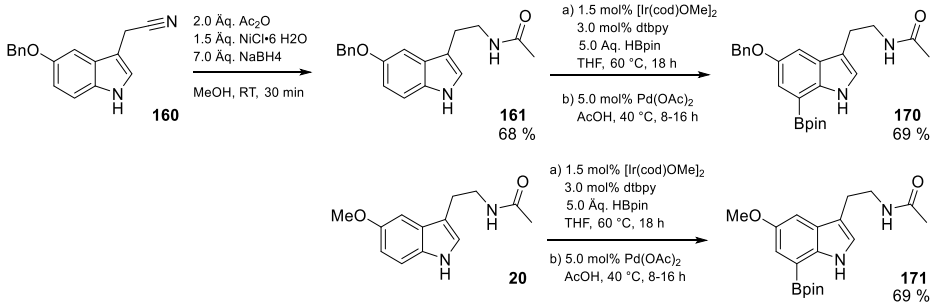
Das folgende Kapitel enthält Ergebnisse, die in Kooperation mit D. Amariei generiert wurden. Insbesondere die biologischen Arbeiten bezüglich der Methyltransferase wurden teilweise von D. Amariei durchgeführt, darunter fällt die Expression des Enzyms und die Optimierung der Reaktionsbedingungen. Außerdem wurde die Synthese der bromierten Verbindungen z. T. von T. Bartz innerhalb einer Bachelorarbeit übernommen.

4.3.1. Synthese von derivatisierten Indolcarbamaten

4.3.1.1. Halogenierte Indolcarbamate

Um einerseits das Substratspektrum der Methyltransferase PsmD tiefergreifend zu untersuchen und andererseits aus der präparativen Umsetzung weitere HHP-Verbindungen zu erhalten, wurden zunächst entsprechende Substrate benötigt. Darüber hinaus muss eine Möglichkeit zur Derivatisierung in die Synthese implementiert werden.

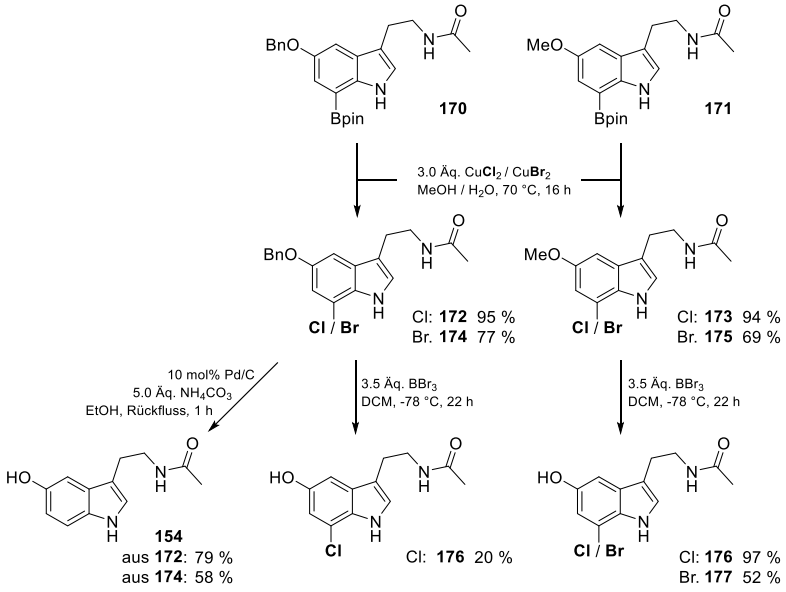
Das Indolcarbamat **156** kann über eine dreischrittige Sequenz erhalten werden, welche bereits von P. Schneider erfolgreich verwendet wurde (Kapitel 4.1.4 – Schema 27). Um die 7-Position des Indols zu modifizieren, wurde auf die Borylierungssequenz nach Movassaghi *et al.* zurückgegriffen, da das Anfügen einer Borgruppe direkt mehrere funktionelle Gruppen zugänglich macht.[84] Wie schon in Kapitel 2.2.1, bzw. Kapitel 3.3.2 gezeigt, kann unter Verwendung eines Iridium-Katalysators mit Di-*tert*-butylbipyridin der Indolring sequenziell in 2- und 7-Position boryliert werden, ehe die 2-Position wieder protodeboryliert wird. Da elektronenreiche nukleophile Gruppen zu Nebenreaktionen führen können, sollten diese möglichst durch PGs maskiert sein. Dementsprechend wurde die Funktionalisierung noch vor der Spaltung des Ethers in 5-Position in die Substratsynthese eingegliedert (Schema 29).



Schema 29: Reaktionsschema der CH-Aktivierung von Benzyloxy- und Methoxyindolamid **161** und **20** über 7-Borylierung.

Entsprechend der Synthese von P. Schneider wurde das Nitril **160** zum Amid **161** mit vergleichbaren Ausbeuten umgesetzt. Da je nach angefügter funktioneller Gruppe verschiedene PGs in 5-Position vorteilhaft sind, wurde das kommerziell erhältliche Melatonin (**20**) als ein weiteres Startmaterial für die Synthese verwendet. Letzteres enthält anstelle des Benzylrestes (beim Indolamid **161**) eine Methylgruppe am 5-ständigen Phenol. In der anschließenden CH-Aktivierung konnten beide Verbindungen **170** und **171** erfolgreich mit einer 69%-igen Ausbeute boryliert werden.

Die Umsetzung der zwei Bor-Verbindungen **170** und **171** zum Chlorid und Bromid kann – unabhängig von der PG homolog zur metallkatalysierten Tryptophan-Synthese (Kapitel 3.3.2 – Schema 13) – in guten bis sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden (Schema 30). Dabei scheint die Chlorierung jedoch in höheren Ausbeuten abzulaufen als die Bromierung. Vermutlich kommt es bei der Bildung der Brom-Spezies **174** und **175** aufgrund der höheren Polarisation leichter zu Nebenreaktionen als bei den chlorierten Analoga **172** bzw. **173**.



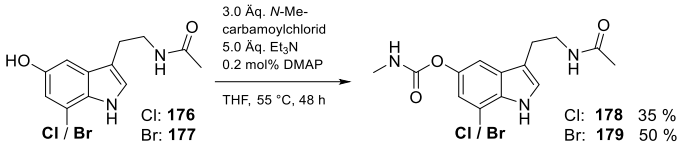
Schema 30: Reaktionsschema zur Funktionalisierung von Boronsäureester **170** bzw. **171** zum Chlorid/Bromid und anschließende Entschützung der 5-Hydroxygruppen.

Anschließend wurde der 5-Benzylether bzw. 5-Methylether gespalten, sodass die Phenolgruppe ungeschützt vorliegt. Die Verwendung der gängigen hydrogenolytischen Bedingungen führt bei den Benzyloxyhalogeniden **172** und **174** jedoch nicht nur zur Spaltung des Ethers, sondern auch zur Protodehalogenierung des angefügten Chlor-/Bromsubstituenten (Verbindung **154**). Zwar kann unter Verwendung von Lewis-Säuren wie Bortribromid die Benzylschutzgruppe ebenfalls entfernt werden, um Verbindung **176** zu generieren, jedoch wurde unter diesen Bedingungen nur eine Ausbeute von 20 % erzielt.

In einer Publikation von Ward *et al.* konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung von Bortrichloridmethylsulfid-Komplexen die Spaltung von Benzylethern ebenfalls in hohen Ausbeuten möglich ist.[192] Zusätzlich zeigte Tokuyama *et al.*, dass bei einer 5-Benzyloxy-6-Methyloxyindol-Verbindung die Entschützung des Benzylethers sogar nach kurzer Zeit vollzogen ist, während der Methylether sogar unbeeinflusst verbleibt.[193] Die publizierte Reaktionszeit von nur 20 min indiziert, dass die hier angewandten Bedingungen von 22 h bei Temperaturen von -78 °C bis 23 °C zu harsch sind und folglich nachgeschaltete Nebenreaktionen die gemessene Ausbeute reduziert haben. Es wurde jedoch nicht weiter untersucht, inwiefern die hier dargestellte, niedrige Ausbeute der BBr_3-Entschützung des Benzylethers **172** durch optimierte Reaktionsbedingungen erhöht werden kann. Stattdessen wurde die Synthese der chlorierten/bromierten Verbindungen **176** und **177** mit den

Methylethern **173** und **175** durchgeführt, wobei die Entschützung mit Bortribromid in höheren Ausbeuten (97 % und 52 %) realisiert wurde.

Abschließend wurden die zwei halogenierten Phenole **176** und **177** zu den *N*-Methylcarbamaten **178** und **179** umgesetzt (Schema 31).

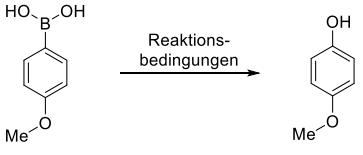


Schema 31: Carbamoylierung des chlorierten und bromierten Phenols **176** bzw **177.**

Bei dieser Reaktion scheinen schon geringe Kontaminationen mit Wasser das Reaktionsergebnis zu beeinflussen. Die Verwendung von kürzlich erworbenem *N*-Methylcarbamoylchlorid und die sorgfältige Lagerung dessen in einer trockenen Umgebung zeigten einen positiven Effekt auf dessen Reaktivität. Mit einer Ausbeute von 35 % bzw. 50 % konnte bei der bromierten Verbindung eine leicht höhere Ausbeute erhalten werden, wobei in beiden Fällen ein Großteil des Eduktes wieder reisoliert und erneut für die Reaktion eingesetzt wurde. Im Vergleich zum unsubstituierten Phenol, welches unter diesen Bedingungen mit einer Ausbeute von 90 % carbamoyliert wurde (Schema 27)[189], zeigen die halogenierten Verbindungen eine deutlich reduzierte Reaktivität. Dies lässt sich durch den elektronenziehenden Substituenten (Chlor/Brom) in *meta*-Position zum Phenol erklären, welcher die Elektronendichte am 5-Phenol reduziert. Dadurch wird die Nukleophilie des Phenols verringert und führt letztlich zu einer deutlich geringeren Ausbeute. Einhergehend mit der geringeren Atomgröße und der höheren Elektronegativität des Chlors im Vergleich zum Brom, wird der deaktivierende Effekt noch weiter verstärkt.

4.3.1.2. Hydroxy-Indolcarbamat

Die in Schema 29 borylierten Verbindungen **170** und **171** dienen jedoch nicht nur der Halogenierung, sondern können auch zur Einführung von Hydroxygruppen genutzt werden. Für die Hydroxylierung aus Bor-Spezies können neben milderen Reagenzien wie *N*-Oxiden auch Wasserstoffperoxid[84] oder Hydroxylamine[194] genutzt werden. Um ein geeignetes Oxidationsmittel zu finden, wurden am Modell-Substrat **180** verschiedene Bedingungen getestet (Schema 32).



180 **181**

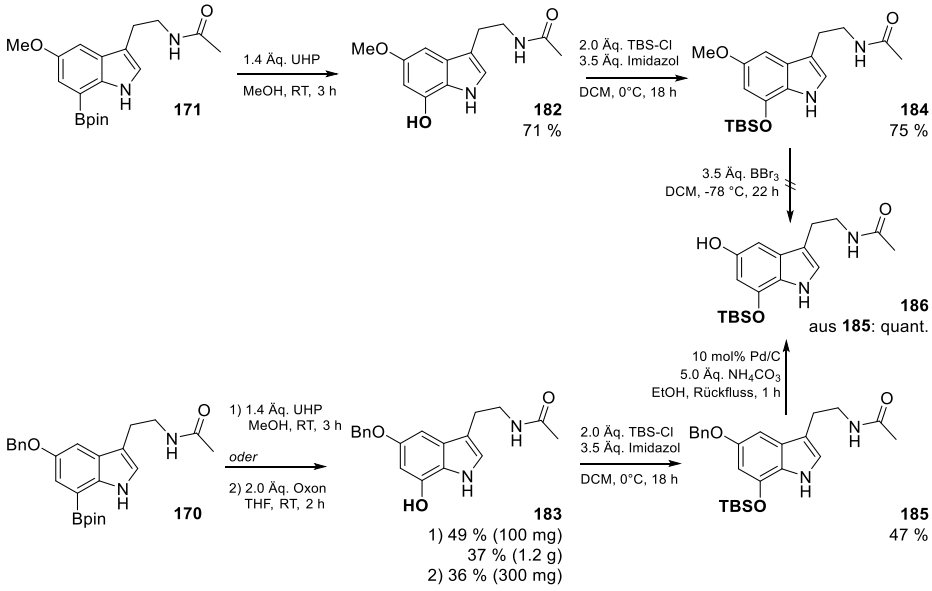
Eintrag	Bedingungen	Ergebnis
1	40 Äq. Et_2NOH MeOH, RT, 2 d	0 %
2	5.2 Äq. NaOH 5.0 Äq. H_2O_2 THF, RT, 4 h	quant.
3	1.0 Äq. UHP MeOH, RT, 1 h	89 %

Schema 32: Am Testsubstrat *p*-Methoxyphenylboronsäure (**180**) untersuchten Bedingungen zur Hydroxylierung.

Jedoch konnte in der Reaktion mit Diethylhydroxylamin in Methanol auch nach zwei Tagen Reaktionszeit kein Produkt detektiert werden.[194] Hingegen bildete sich unter Verwendung

einer basischen, wässrigen Wasserstoffperoxid-Lösung schon nach kurzer Zeit das entsprechende Phenol **181** in quantitativen Ausbeuten.[84] Zusätzlich wurde noch das Carbamidperoxid (*urea hydrogen peroxide,* UHP) getestet, welches im Gegensatz zu gewöhnlichem Wasserstoffperoxid als Feststoff vorliegt. Dadurch kann das Reagenz einerseits deutlich präziser eingesetzt werden und andererseits ist die Reaktivität des Oxidationsmittels leicht herabgesetzt.[195] Mit 89 % Ausbeute konnte für die Reaktion mit UHP ein vergleichbares Ergebnis erzielt werden (Eintrag 3) wie mit Wasserstoffperoxid (Eintrag 2). Die Tatsache, dass das genutzte Modell-Substrat **180** deutlich weniger funktionelle Gruppen beinhaltet, welche unter Umständen ebenfalls zur Reaktion gebracht werden könnten, begünstigt die Verwendung von UHP.

Die getesteten Reaktionsbedingungen wurden daher auf das Methyloxy- sowie das Benzyloxyindolamid **170** und **171** angewandt (Schema 33). Da für diese im Gegensatz zum Modellsubstrat **180** keine Boronsäure, sondern ein Boronsäureester vorlag, mussten die eingesetzten Äquivalente des Reagenz (UHP) sowie die Reaktionszeit sukzessive erhöht werden, um die zwei Indolamide vollständig umzusetzen.



Schema 33: Hydroxylierung von boryliertem Benzyloxy-/Methyloxy-indolamid **170** und **171** sowie weitere Umsetzung zum Silylether **184**/**185** und Entschützung zum 5-Phenol **186**.

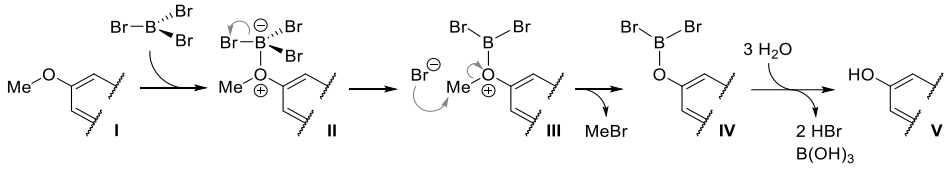
Für den 5-Methylether **182** konnte eine deutlich höhere Ausbeute erzielt werden als für die benzylierte Verbindung **183**. Weiterhin konnten für die benzylierte Verbindung **183** die Reaktionsbedingungen nicht ohne Weiteres auf einen höheren Maßstab übertragen werden. Während in einem kleinen Ansatz von 100 mg eine moderate Ausbeute von 49 % isoliert werden konnte, führte ein vergrößerter Maßstab zu Ausbeuteeinbußen (37 % bei einem 1.2 g Ansatz).

Es wurde daher noch eine weitere Methode untersucht, bei der Oxon als Oxidationsmittel verwendet wird, welches das Tripelsalz aus Kaliumperoxomonosulfat, Kaliumhydrogensulfat und Kaliumsulfat darstellt. Jedoch konnte auch in diesem Fall in der Umsetzung von Benzylether **170** nur eine Ausbeute von 36 % erzielt werden. In keinem der beiden Fälle

konnte ein isolierbares Nebenprodukt detektiert werden. Vermutlich wurden daher eine Reihe verschiedener Nebenprodukte generiert, welche durch eine Überoxidation des Reaktionsproduktes hervorgerufen wurden. Eine langsame und stetige Zugabe des Oxidationsmittels könnte dem womöglich entgegenwirken. Inwiefern das methylgeschützte Indolamid **182** unter diesen Bedingungen stabiler ist und ob es zur Bildung von Nebenprodukten bei der Umsetzung zum Benzylether **183** kommt, wurde nicht genauer untersucht.

In der nachfolgenden Synthese wurde anschließend eine Schutzgruppe am 7-Phenol benötigt, welche die orthogonale Entschützung des 5-Phenols ermöglicht, jedoch nach Bildung des 5-Carbamats wieder entfernt werden konnte. Insbesondere die finale Entschützung, wenn schon die Carbamat-Gruppe vorliegt, bildet dabei einen kritischen Punkt, da aromatische Carbamate nur eine geringe Stabilität gegenüber Nukleophilen oder extremen pH-Werten aufweisen. Daher wurde zunächst eine TBS-PG in Erwägung gezogen. In der entsprechenden Silylierung der zwei Phenole **182** und **183** konnte erneut für die methylgeschützte Verbindung **184** eine höhere Ausbeute gemessen werden als für die benzylierte Variante **185**. Da beide Phenole jedoch eine ähnliche Reaktivität haben sollten und außerdem die angewandten Bedingungen zur TBS-Schützung allgemein etabliert sind, kann vermutet werden, dass der sterische Anspruch des Benzylethers dem nukleophilen Angriff an das *tert*-Butyldimethylsilylchlorid entgegenwirkt.

Die anschließende Entschützung des 5-Phenols wurde dann unter denselben Bedingungen wie für die halogenierten Verbindungen durchgeführt. Während an dieser Stelle unter hydrogenolytischen Reaktionsbedingungen der Benzylether **185** problemlos in quantitativen Ausbeuten gespalten werden konnte, führte die Umsetzung des Methylethers **184** nicht zum gewünschten 7-TBS-5-Phenol **186**. Stattdessen wurde das Diphenol erhalten, bei dem sowohl der 5-Methylether als auch der 7-Silylether vom Molekül abgespalten wurden. Mit Hinblick auf den Reaktionsmechanismus (Schema 34) entspricht dies den Erwartungen, da innerhalb der BBr_3-Entschützung Bromwasserstoff freigesetzt wird, welcher als starke Säure die Spaltung des Silylethers katalysiert.



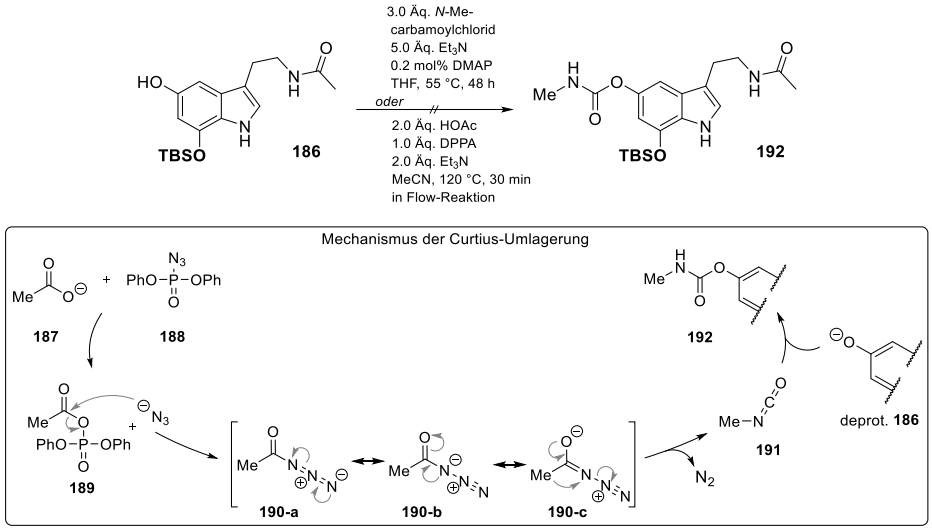
Schema 34: Vereinfachter, unimolekularer Mechanismus der BBr_3-Entschützung eines aromatischen Methylethers.[196]

Nachdem die Lewissäure an den Sauerstoff angelagert ist und sich kurzzeitig eine Ylid-ähnliche Struktur **II** gebildet hat, wird ein Bromid vom Bor abgespalten, welches anschließend die Methylgruppe angreift (Schema 34). In neueren Publikationen wird jedoch vermutet, dass dieser unimolekulare Mechanismus in organischen Lösungsmitteln nicht möglich sei, und daher ein bimolekularer Mechanismus wahrscheinlicher ist. In diesem Fall wird kein Bromid-Anion vom BBr_3-Addukt abstrahiert, stattdessen wird der nukleophile Angriff auf die Methylgruppe von einem zweiten BBr_3-Addukt vollzogen und führt damit zur Abspaltung des Methylethers.[197, 198] Zur Vereinfachung ist an dieser Stelle jedoch der unimolekulare Mechanismus dargestellt. Letztlich kommt es zur Bildung des Dibromphenoxyborans **IV**,

welches erst unter Zugabe von Wasser hydrolysiert und damit das entschützte Phenol **V** sowie Borsäure und zwei Äquivalente Bromwasserstoff freisetzt.

Zwar wurde in der wässrigen Aufarbeitung bei der Umsetzung von Verbindung **184** freigesetztes HBr direkt durch eine Natriumhydrogencarbonatlösung aufgefangen, dennoch scheint die freigesetzte Bromwasserstoffsäure auch in kurzer Zeit die Spaltung des Silylethers zu bewirken. Da die Entschützung des benzylisch geschützten 5-Phenols **185** unter hydrogenolytischen Bedingungen jedoch problemlos möglich ist, wurde die Synthese zum 7-Hydroxyindolcarbamat **186** anhand dieser Verbindung fortgeführt.

Der letzte benötigte Schritt, der Carbamoylierung, wurde zunächst unter den Bedingungen nach P. Schneider mehrmals durchgeführt, jedoch konnte in keinem Fall das gewünschte Produkt erhalten werden. Zwischen den verschiedenen Reaktionen wurden daher einige Parameter verändert, wie z. B. eine Erhöhung des katalytisch hinzugefügten Dimethylaminopyridins (bis zu 0.20 Äq.) oder des *N*-Methylcarbamoylchlorids (bis zu 5.0 Äq.). Um das Phenol **186** dennoch zur Reaktion zu bringen, wurde zusätzlich ein weiterer Reaktionsansatz innerhalb eines *flow*-Systems getestet, bei der unter Verwendung von Essigsäure und Diphenylphosphorylazid (DPPA) in einer Curtis-Umlagerung Methylisocyanat *in situ* freigesetzt wird (Schema 35). Isocyanate weisen eine deutlich höhere Reaktivität als die entsprechenden Carbamoylchloride auf. Insbesondere Methylisocyanat zeichnet sich durch explosive, toxische und fruchtschädigende Eigenschaften aus.



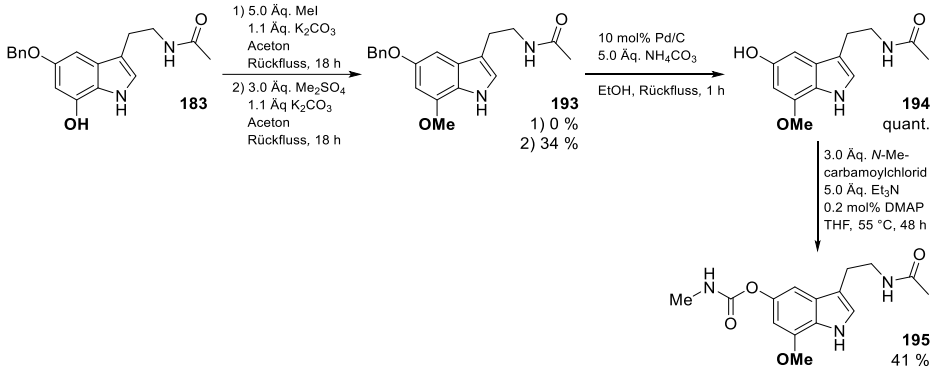
Schema 35: Carbamoylierung vom TBS-geschützten 7-Phenol **186** unter Verwendung von Carbamoylchlorid oder Isocyanat, welches über eine Curtius-Umlagerung nach Baumann *et al.* generiert wurde.[199] Für letztere Reaktion ist zusätzlich der Reaktionsmechanismus dargestellt.[200]

In der entsprechenden Reaktion addiert zunächst die deprotonierte Essigsäure (**187**) an DPPA (**188**) unter Abspaltung eines Azid-Ions, welches in einem S_N2t-Angriff das Acetat **189** angreift. Das Acetylazid **190** weist mehrere mesomere Grenzstrukturen auf, wobei aus Struktur **190-c** eine entsprechende Umlagerung unter Abspaltung von gasförmigem Stickstoff hervorgeht. Dem so generierten Isocyanat **191** wurde erst dann das deprotonierte Phenol **186** hinzugefügt, um das entsprechende Carbamat zu bilden. Trotz der erhöhten Reaktivität des Isocyanats **191** konnte das gewünschte Reaktionsprodukt **192** nicht extrahiert werden,

lediglich das unveränderte Edukt **186** wurde reisoliert. Da die 7-ständige *tert*-Butyldimethylsilylgruppe im Vergleich zum 7-Chlor- oder 7-Bromsubstituenten deutlich elektronenschiebender ist, sollte somit das 5-ständige Phenol aus elektronischer Sicht deutlich aktivierter sein. Indes ist die TBS-Gruppe deutlich raumgreifender als die Halogensubstituenten und könnte deshalb aus sterischen Gründen die Nukleophilie des 7-TBS-Phenols **186** herabsetzen. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass nicht nur bei der Carbamoylierung, sondern auch bei der Einführung der Silyl-PG (zum Silylether **186**) der sterische Anspruch kritisch zu sein scheint.

4.3.1.3. Methoxy-Indolcarbamat

Zusätzlich zum TBS-geschützten Phenol **186** können aus den 7-Hydroxy-Indolamiden **182** und **183** auch die entsprechenden Methoxy-substituierten Derivate generiert werden. Um jedoch anschließend selektiv nur die 5-ständige Hydroxygruppe zu entschützen und zum Carbamat umzusetzen, wurde diese Synthese nur mit dem benzylierten Indolamid **183** durchgeführt (Schema 36). Dazu wurde zunächst die 7-ständige Hydroxygruppe methyliert, wobei Kaliumcarbonat als Base und Methyliodid bzw. Dimethylsulfat als Methyldonor eingesetzt wurde. Die entsprechenden Reaktionsbedingungen konnten ebenso in der Synthese von Naphtylpyranon-Naturstoffen wie Pigmentosin oder Viriditoxin Anwendung finden.[201, 202] Allerdings konnte nur unter Verwendung von Dimethylsulfat das gewünschte Produkt **193** mit 34 % Ausbeute erhalten werden.



Schema 36: Methylierung des 7-Hydroxyindolamid **183** zum 7-Methylether **193** und Entschützung des 5-Phenols sowie Carbamoylierung zum 7-Methoxyindolcarbamat **195**.

Die anschließende Entschützung zum Phenol **194** konnte erneut in quantitativen Ausbeuten durchgeführt werden. In der finalen Umsetzung zum Carbamat **195** wurde jedoch, auch in diesem Fall, nur eine moderate Ausbeute von 41 % der gewünschten Zielverbindung erzielt. Wie auch bei den zuvor gezeigten Carbamoylierungen wurde die Reaktion unter sorgfältigem Wasserausschluss durchgeführt, indem das *N*-Methylcarbamoylchlorid in einer trockenen Umgebung gelagert und ein wasserfreies Lösungsmittel verwendet wurde. Da dennoch ein Anteil des eingesetzten Substrats **194** unverändert reisoliert wurde, scheint auch die Methoxygruppe die Nukleophilie geringfügig herabzusetzen – insbesondere im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung **154** (entsprechend der publizierten Werte von P. Schneider).[188, 189] Demnach scheint die Carbamoylierung hier nicht durch sterische Effekte beeinflusst zu werden, wie es beim *tert*-Butylsilylether **186** der Fall ist, sondern scheint die

elektronenziehende Wirkung des Methylethers (in Verbindung **194**) vergleichbar mit den Halogeniden (bei Verbindung **176** und **177**).

Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass die Größe des in 7-Position angefügten Substituenten einen Einfluss auf die Carbamoylierung hat. Aufgrund der Umsatzraten der Methoxyverbindung **194** und der Silyletherverbindung **186** ist es wahrscheinlich, dass sich durch den Einsatz anderer 7-Hydroxy-PGs, wie z. B. Trimethylsilylether oder Allylether, das entsprechende 7-Hydroxyindolcarbamat erhalten lässt. Diese funktionellen Gruppen könnten einen Kompromiss darstellen, indem sie einerseits möglichst elektronenschiebend wirken und andererseits nur einen geringen sterischen Anspruch besitzen. Die Synthese des entsprechenden 7-Hydroxyindolcarbamats wurde an dieser Stelle jedoch nicht weiterverfolgt. Die weiteren Untersuchungen wurden folglich mit den bisher hergestellten Verbindungen fortgeführt.

4.3.2. Umsetzung der Indolcarbamate zum Hexahydropyrroloindol

4.3.2.1. Expression der Methyltransferase *PsmD_Sg*

Die Expression der Methyltransferase PsmD_*Sg* erfolgte in *E. coli* BL21 Gold. Der entsprechende Stamm wurde von D. Amariei bereitgestellt und enthält bereits das benötigte Plasmid, sodass keine Transformation durchgeführt werden musste. Die Codon-harmonisierte Methyltransferase-Sequenz befand sich dabei auf einem pET21a-Plasmid, daher wurde bei Kultivierungen Kanamycin hinzugefügt. Die Expression der Methyltransferase wurde mithilfe von *lacI* reguliert und demnach erst durch Zugabe von IPTG induziert. Die geernteten Zellen wurden bei -20 °C aufbewahrt und erst unmittelbar vor der Verwendung mittels Ultraschall-Behandlung mechanisch aufgeschlossen. Die Isolation der Methyltransferase PsmD von weiteren Proteinbestandteilen erfolgte anhand des am Enzym angefügten His-*tag* mithilfe einer Affinitätschromatographie. Der Erfolg der Expression sowie des Zellaufschlusses und der Proteinaufreinigung wurden durch SDS-PAGE-Analyse nachvollzogen (Abbildung 39).

Mit einer Proteingröße von 275 Aminosäuren besitzt die Methyltransferase eine molekulare Masse von 30.67 kDa.[59] Während in den zwei Proben vor der Expressionsinduktion eine Bande auf der entsprechenden Höhe noch nicht erkennbar ist, kann man nach der Induktion eine Bande etwas oberhalb des 30 kDA-Markers erkennen. Das zugehörige Protein wird vermutlich die Methyltransferase sein, da diese Bande auch in den Proben der Proteinaufreinigung deutlich erkennbar ist (Abbildung 39 – Elution, Säuberung und Gereingt) und somit eine erfolgreiche Proteinreinigung indiziert. Die Tatsache, dass sowohl in der Zelltrümmer-Probe die entsprechende Bande ebenfalls erkennbar ist, lässt auf eine unvollständige Zelllyse vermuten. Ebenfalls ist in der Säuberungsfraktion die PsmD-Bande deutlich erkennbar, wodurch ebenfalls eine gewisse Menge der Methyltransferase durch eine unvollständige Elution verloren gegangen ist. Letztlich ist jedoch in der gereinigten Probe (Abbildung 39) neben wenigen unscharfen Banden eine sehr große Menge des entsprechenden Proteins erkennbar und die Proteinexpression und -reinigung damit erfolgreich.

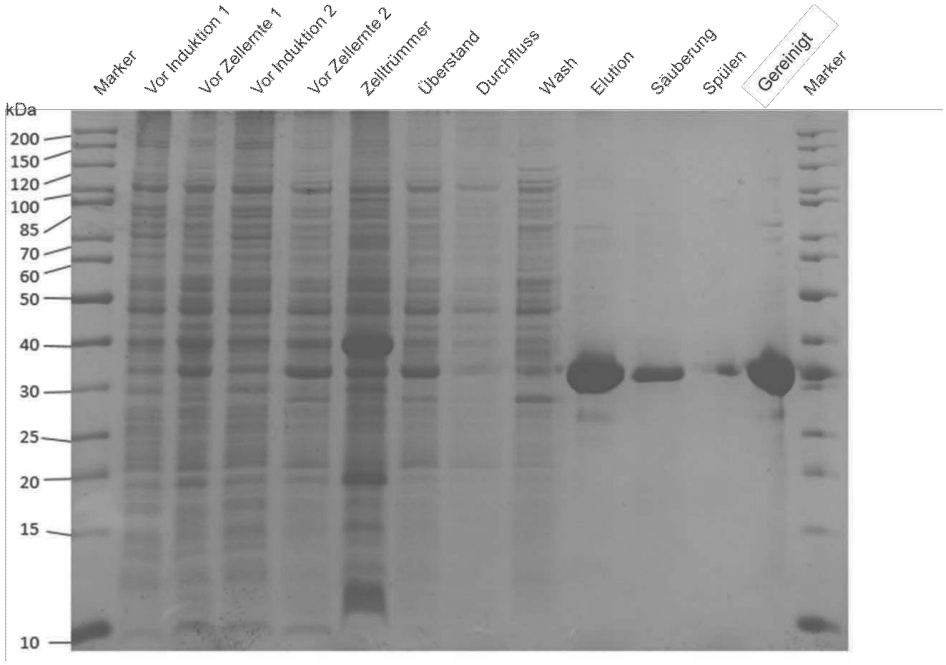


Abbildung 39: Bild der durchgeführten SDS-PAGE der verschiedenen Proben im Laufe der Expression (vor Induktion und vor Zellernte), des Zellaufschlusses (Zelltrümmer und Zellüberstand) und der Proteinaufreinigung (Durchfluss, Wash, Elution, Säuberung und Spülen) sowie die final erhaltene und aufkonzentrierte Fraktion (Gereinigt). Als Marker wurden ein *ROTI®Mark*-Proteinstandard verwendet (10-200 kDa).

Mittels Nanodrop wurde der Proteingehalt der gereinigten Proteinlösung bestimmt und es konnte bei einem Volumen von ca. 4.5 mL eine Proteinkonzentration von 11.6 mg/mL gemessen werden. Damit wurden ca. 52 mg der Methyltransferase aus einer Kultivierung in 500 mL Medium erhalten. Allerdings ist diese Angabe nicht vollständig akkurat, da die geringen Verunreinigungen mit weiteren Proteinen die Messung verfälschen, jedoch ist diese Konzentration als Richtwert für die weiteren Untersuchungen ausreichend.

4.3.2.2. Bestimmung der PsmD-Aktivität bei Indolcarbamat-Derivaten

Um die neu hergestellten Indolcarbamatderivate **178**, **179** und **195** hinsichtlich ihrer enzymatischen Umsetzbarkeit zu testen, wurde der kommerziell erhältliche Glo-Assay® von *Promega* genutzt. Der Assay wurde speziell für die Aktivitätsbestimmung von Methyltransferasen konzipiert und weist die Menge an freigesetztem SAH (**164**) nach, indem das stöchiometrisch anfallende Coprodukt durch eine Enzymkaskade zunächst in ADP umgewandelt und anschließend in eine quantifizierbare Biolumineszenz translatiert wird. Die Sensitivität des Assays für die freigesetzte SAH-Konzentration bedingt die Verwendung von gereinigtem Enzym, da ein Lysat eine undefinierte Menge SAM (**163**) sowie SAH (**164**) bereitstellen würde. Außerdem kann bei einem Lysat nicht gewährleistet werden, dass keine Verbindungen enthalten sind, welche mit dem MTase-Puffer oder dem MTase-Glo-Reagenz interagieren und damit die Sensitivität des Assays beeinflussen. Daher wurde an dieser Stelle lediglich mit gereinigten Stocks der Methyltransferase PsmD_*Sg* gearbeitet (Kapitel 4.3.2.1). Aus vorherigen Aktivitätsbestimmungen der Methyltransferase PsmD am Institut durch

P. Schneider und D. Amariei konnte anhand dessen Erfahrungen und Ergebnissen auf eine optimale Substrat- und Enzymkonzentration für den Assay zurückgegriffen werden, welche eine exakte Bestimmung der Enzymaktivität ermöglichen sollte (Abbildung 40).

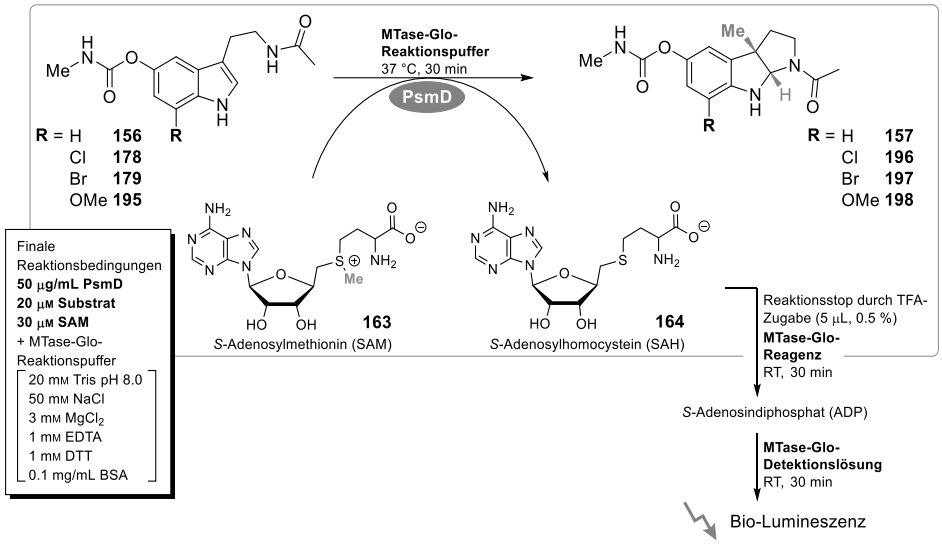


Abbildung 40: Reaktionsschema der enzymatischen Methylierung der Indolcarbamatderivate und schematische Darstellung des Glo-Assay.[190]

Es wurden daher Substratkonzentrationen von 20 µM (des jeweiligen Indolcarbamats) und 30 µM des Cosubstrats SAM (**163**) sowie eine Enzymmenge von etwa 1 µg (in 20 µL finalem Reaktionsvolumen) verwendet. Dazu wurden von den entsprechenden Indolcarbamat-Derivaten **178**, **179** und **195** sowie vom unsubstituierten, natürlichen Indolcarbamat **156** und vom Cosubstrat SAM (**164**) Stammlösungen (1 mM in DMSO) angesetzt. Die unsubstituierte Verbindung **156** wurde in diesem Zusammenhang von D. Amariei bereitgestellt. Entsprechend der Herstellerangabe (siehe Kapitel 7.2.10) wurden die Substrate ausgehend von der jeweiligen Stammlösung in Triplikaten vermessen, über die drei Messwerte gemittelt und der Blank-Wert subtrahiert, welchem keine Enzymlösung zugesetzt wurde. Um die erhaltenen Werte in eine SAH-Konzentration umrechnen zu können, wurde eine Kalibriergerade für verschiedene SAH-Konzentrationen entsprechend der Herstellerangaben erstellt (Abbildung 41). Die Durchführung erfolgte gemäß der Herstellerangaben (siehe Kapitel 7.2.10). Dazu wurde kommerziell erworbenes SAH (**164**) in DMSO gelöst und eine Verdünnungsreihe erstellt, sodass insgesamt 11 Konzentrationen von 0.010 µM bis 10 µM in exponentiellen Schritten erhalten werden. Die verschiedenen Lösungen wurden in Triplikaten in einer 96-Well-Platte mit dem MTase-Reaktionspuffer vermengt und dann entsprechend fortgefahren. Die erhaltenen Biolumineszenz-Werte wurden gegen die eingesetzte SAH-Konzentration aufgetragen und durch lineare Regression eine Kalibriergerade erstellt.

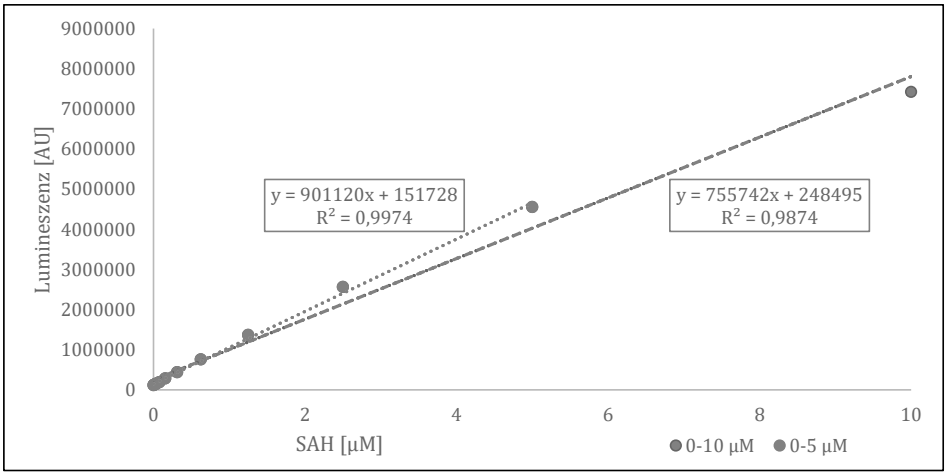


Abbildung 41: Erstellte Kalbriergeraden durch Messung der Biolumineszenz einer vorbereiteten Verdünnungsreihe von SAH (**164**) in den angegebenen Konzentrationen. Dabei wurden für die gestrichelte Gerade alle Messwerte einbezogen (0-10 µM), für die gepunktete Gerade nur die Konzentrationen von 0-5 µM.

Anhand der Kalibriergeraden konnten dann die gemessenen Lumineszenz-Werte der Indolcarbamate **178**, **179**, **195** und **156** in eine SAH-Konzentration umgerechnet werden. Da das Enzym schon in den bisherigen Publikationen ausreichend charakterisiert wurde, wurde an dieser Stelle von der Bestimmung der absoluten Enzymaktivität abgesehen. Stattdessen wurden die Messwerte in Relation zum natürlichen Substrat **156** (= 100 %) gesetzt. Abbildung 42 zeigt die somit erhaltenen relativen Aktivitäten für die neuen Indolcarbamat-Derivate **178**, **179** und **195**.

Dabei sind für die 7-Chlor- und 7-Bromverbindung **178** und **179** jeweils zwei Messwerte aufgeführt, da diese Verbindungen zuvor schon einmal von D. Amariei unter denselben Bedingungen getestet wurden (Messreihe 1 – rechte, dunklere Säule/Wert). Die 7-Methoxyverbindung **195** wurde nur in der neueren Messreihe (Messreihe 2 – linke, hellere Säule/Wert) berücksichtigt und weist deshalb nur einen Wert auf.

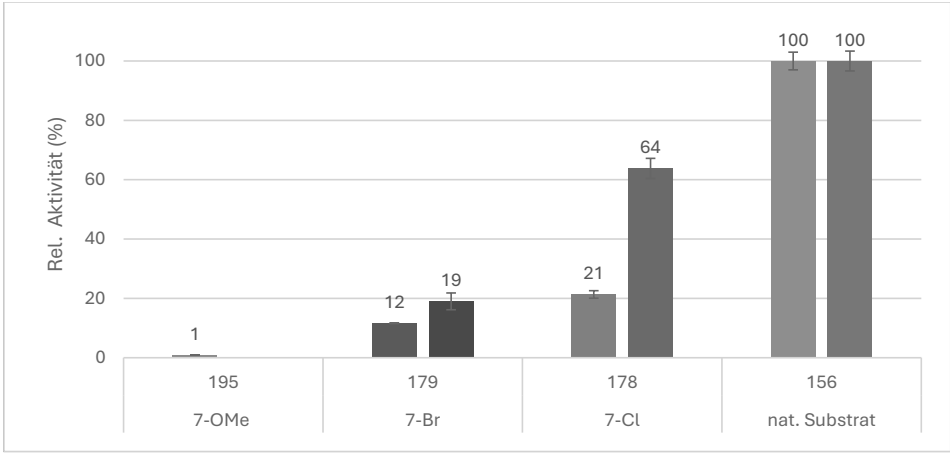


Abbildung 42: Aktivität der verschiedenen Indolcarbamat-Derivate **178**, **179** und **195** in Relation zum natürlichen, unsubstituierten Indolcarbamat **159** gemessen anhand des Glo-Assays.

Jedoch zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den zwei Messreihen. Während in Messreihe 1 die relative Enzymaktivität gegenüber dem 7-Chlorcarbamat **178** bei 64 % liegt, konnte in Messreihe 2 eine 21 %-ige Aktivität gemessen werden. Gleichermaßen wurde auch für die 7-Bromverbindung **179** eine Aktivität von 19 % in Messreihe 1 und 12 % in Messreihe 2 gemessen. Die Standardabweichungen liegen für alle Werte in einem Rahmen von 1 – 4 %, sodass ein technischer Fehler an dieser Stelle ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich wurde das natürliche Substrat **156** bei beiden Messreihen mitgemessen, sodass eine unterschiedliche Enzymaktivität zwischen den Messungen nur eine untergeordnete Rolle spielt. Somit sollte die unterschiedliche Enzymaktivität zwischen den Messreihen auf eine unterschiedliche Substratkonzentration im Assay beruhen, da nur bei erfolgter Umsetzung des Substrats das detektierte SAH freigesetzt wird. Die Substrate selbst wurden nicht in Triplikaten abgewogen, sondern aus derselben Stammlösung entnommen, wodurch ein Messfehler bei der Einwaage nicht ausgeschlossen werden kann. Zudem weisen Indolcarbamate nur eine geringe Stabilität auf, wobei schon kleine Veränderungen des Moleküls sich kritisch auf die enzymatische Umsetzung auswirken können, wie z. B. bei einer hydrolysierten Carbamatgruppe (Kapitel 4.1.4 – Abbildung 36). Ungeachtet der Unterschiede zwischen den zwei Messreihen kann eine klare qualitative Aussage hinsichtlich der Umsetzung der einzelnen Indolcarbamatderivate gezogen werden.

Die 7-Chlorverbindung **178** konnte von der Methyltransferase PsmD mit einer relativen Umsetzung von 21 bzw. 64 % am besten umgesetzt werden, während die leicht größere 7-Bromverbindung **179** mit einer reduzierten Rate von 12 bzw. 19 % umgesetzt wurde. Lediglich für die 7-Methoxyverbindung **195** konnte nur eine 1 %-ige Umsetzung detektiert werden. Da die Methoxygruppe durch den positiven mesomeren Effekt eine leicht elektronenschiebende Wirkung hat, sollte diese die Elektronendichte im Indolring vergrößern, wodurch der nukleophile Angriff auf die Methylgruppe des SAM (**163**) begünstigt würde. Da jedoch fast keine Umsetzung bei diesem Substrat erfasst wurde, lässt sich die Vermutung ableiten, dass die Anlagerung des Moleküls im aktiven Zentrum der Methyltransferase sterisch inhibiert wird. Vorherige Untersuchungen von D. Amariei belegen, dass eine elektronische Aktivierung des Indolstickstoffs essentiell für den Enzymmechanismus ist.[59] In Abhängigkeit von der räumlichen Größe des angefügten Substituenten in 7-Position könnte dieser Mechanismus demnach nur eingeschränkt stattfinden, weshalb die 7-Chlorverbindung **178** im Vergleich zur 7-Bromverbindung **179** eine höhere Umsetzung zeigte. Ob jedoch die Umsetzung der Halogenverbindungen unabhängig von der sterischen Hinderung durch den stark negativen induktiven Effekt vermindert wurde, kann an dieser Stelle nicht abgeschätzt werden.

Die Ergebnisse des Glo-Assays lassen jedoch darauf schließen, dass die Umsetzung der halogenierten Indolcarbamate **178** und **179** mit der Methyltransferase PsmD auch in einem präparativen Maßstab möglich wäre.

4.3.2.3. Präparative enzymatische Zyklisierung mithilfe von PsmD

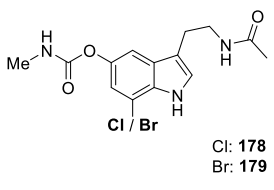
Das hier verwendete Enzym PsmD wurde schon in vorherigen Untersuchungen in der Synthese von enantiomerenreinen Verbindungen genutzt.[189] In der zugehörigen Publikation konnte mithilfe der chemisch hergestellten Referenzen nachgewiesen werden, dass PsmD ausschließlich das entsprechende 3a*S*,8a*S*-konfigurierte Diastereomer **157** generiert. Da die Derivatisierung der Substrate keinen Einfluss auf die räumliche Orientierung des Moleküls

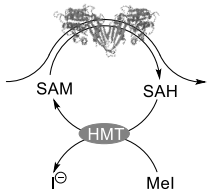
innerhalb der Enzymtasche hat, wurde angenommen, dass daher auch hier ausschließlich die *3S,8S*-konfigurierte Diastereomere produziert werden.

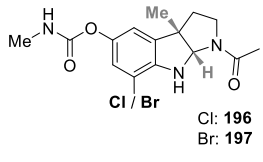
Die präparative Enzymreaktion mit PsmD wurde darüber hinaus unter Verwendung eines Cosubstrat-Recyclings durchgeführt. Da für jedes umgesetzte Substrat ein Äquivalent des Methyldonors SAM (**163**) verbraucht wird, kann mithilfe der hinzugefügten Halo-Methyltransferase (HMT) anfallendes SAH (**164**) wieder regeneriert werden. Dafür wurde Methyliodid in stöchiometrischen Mengen hinzugegeben, welches jedoch deutlich kostengünstiger ist. Das SAM (**163**) bzw. SAH (**164**) wurde in diesem Fall nur in katalytischen Mengen benötigt, wodurch die Atomeffizienz der Reaktion erhöht wird.[203] Die zwei Enzyme wurden dazu einzeln in *E. coli* exprimiert und erst für die Reaktion unter den in Schema 37 dargestellten Bedingungen zugeführt. Die Enzymreaktionen wurden in wässrigem Kaliumphosphat-Puffer (KP_i) durchgeführt, um eine funktionsfähige Proteinfaltung zu gewährleisten. Damit das hydrophobe Substrat ebenfalls gelöst vorliegt, wurde das Substrat als DMSO-Stock hinzugegeben. Die Anwesenheit des DMSO sowie der Proteinbestandteile des Lysats führen jedoch bei der Extraktion des Reaktionsprodukts mit organischem Lösungsmittel zu Schwierigkeiten, indem sich eine deutliche Interphase zwischen der hydrophoben und der wässrigen Phase bildet. Die zwei verwendeten Enzyme wurden daher über drei verschiedene Methoden zugeführt: als unverändertes Lysat, als immobilisiertes Lysat und als Ganzzellkatalyse.

Das unveränderte Lysat enthält eine große Menge weiterer Proteine, welche zur Bildung einer Interphase und damit zu Produkteinschlüssen in der Extraktion führen. Daraus resultieren Einbußen in der Ausbeute, jedoch ist beim unveränderten Lysat die Enzymaktivität am höchsten, im Vergleich zu den zwei weiteren Methoden.

Wird das Lysat anhand des angefügten His-*tags* erst auf Beads immobilisiert, anstatt es unverändert hinzuzugeben, können nicht-bindende Bestandteile durch Waschvorgänge entfernt werden. Dadurch fällt die Produktextraktion deutlich leichter, allerdings verringert die Immobilisierung der Enzyme auch die Enzymaktivität, da z. B. das aktive Zentrum für das Substrat nur bedingt zugänglich ist oder weil ein unbestimmter Anteil der Enzyme innerhalb dieses Prozesses denaturiert. Hingegen ist der Vorteil der Ganzzellkatalyse, dass nach erfolgter Reaktion die Zellen abzentrifugiert werden können, wodurch auch in diesem Fall ein Großteil der Proteinbestandteile schon vor der Extraktion entfernt werden kann. Jedoch bedingt dies, dass sowohl das Substrat als auch das Produkt membrangängig sind bzw. in die Zelle hinein und wieder heraus transportiert werden. Für die enzymatische Methylierung der zwei halogenierten Indolcarbamate **178** und **179** wurden alle drei Methoden einmalig getestet (Schema 37).





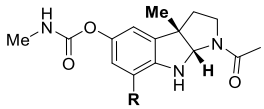


Reaktionsbedingungen:
1.0 mM Substrat (in DMSO gelöst)
0.5 mM SAH (+1 nach 20 h)
10 mM MeI (+10 nach 20 h)
14 % Zell Lysat HMT
20 % Zell Lysat PsmD
KP_i (50 mM, pH 7.5)
35 °C, 300 rpm, 1-4 d

Eintrag	Substrat	Maßstab [mg]	Methode	Umsatz [%]	Ausbeute [%]
1	7-Cl | **178**	50	Unverändertes Lysat	100[1]	38
2	7-Br | **179**	16	Immobilisiertes Lysat	57[2]	17[3]
3	7-Br | **179**	110	Ganze Zellen	n.d.	16

Schema 37: Enzymatische Methylierung mit PsmD der Indolcarbamatderivate **178** bzw. **179** zum entsprechenden HHP **196** bzw. **197** und tabellarische Angabe der verwendeten Reaktionsbedingungen sowie das Ergebnis der Umsetzung. [1] Qualitative Abschätzung, da weder bei einer Reaktionskontrolle mittels DC noch im Rohprodukt Spuren des Substrates erkennbar waren. [2] Gemessen via ^{1}H-qNMR mit Trimethoxybenzol als internem Standard nach 24 h Reaktionszeit. [3] Isoliert nach 4 Tagen Reaktionszeit.

In der enzymatischen Umsetzung konnte für beide Derivate ein Reaktionsprodukt in ausreichenden Mengen isoliert und die gewünschte Struktur erfolgreich nachgewiesen werden. Entsprechend der Ergebnisse des Glo-Assays wurde das 7-Chlorindolcarbamat **178** deutlich besser umgesetzt als das 7-Bromindolcarbamat **179**. Allerdings konnte bei vollständigem Umsatz des Substrats, nur eine Ausbeute von 38 % für die 7-Chlorverbindung **196** isoliert werden (Eintrag 1), was maßgeblich auf die zuvor genannten Extraktions-Probleme des unveränderten Lysats zurückzuführen ist. Für die 7-Bromverbindung **197** wurden die zwei weiteren Methoden untersucht. Bei der Umsetzung des Indolcarbamats **179** mit dem immobilisierten Lysat (Eintrag 2) konnte bei einer 57 %-igen Umsetzung jedoch ebenfalls nur eine Ausbeute von 17 % erhalten werden. Dabei ist anzumerken, dass die Messung der Substratumsetzung nach 24 h erfolgte. Da jedoch noch kein vollständiger Umsatz gemessen wurde, wurde die Reaktionszeit auf 4 Tage verlängert (aus organisatorischen Gründen), wobei jedoch anzumerken ist, dass die Enzymaktivität ab dem zweiten Tag stark abfällt. Demnach könnte an dieser Stelle die Ausbeute durch Degradation des Produkts **197** verfälscht sein. Im dritten Ansatz, bei dem Verbindung **179** in einem Maßstab von 110 mg eingesetzt wurde, wurden ganze Zellen zur Reaktion hinzugegeben. Nach einem Tag Reaktionszeit wurde eine Produktausbeute von 16 % isoliert. Da die Diffusion des Substrats respektive des Produkts in die Zelle hinein/aus der Zelle heraus die Umsatzrate deutlich vermindern sollte, jedoch die Ausbeute in Eintrag 2 und 3 fast identisch ist, liegt die Vermutung nahe, dass die tatsächliche Ausbeute in Eintrag 2 höher liegen müsste, und somit möglicherweise Anteile des Produkts aufgrund der erhöhten Reaktionszeit degradiert worden sind.



		$[\alpha]_D^{20}$	
H	**157**	- 80	(c = 1.0, $CHCl_3$)
R = Cl	**196**	- 127	(c = 0.075, MeOH)
Br	**197**	- 57.5	(c = 0.087, MeOH)

Abbildung 43: Gemessene Drehwerte der halogenierten HHP **196** und **197** im Vergleich zum unsubstituierten HHP **157**, publiziert von P. Schneider[189]

Im Zuge der Strukturanalyse konnten zudem Drehwerte gemessen werden, die mit denen der unsubstituierten, literaturbekannten Verbindung **157** vergleichbar sind (Abbildung 43). Dies belegt, dass auch die Methylgruppen der funktionalisierten HHP **196** und **197** dieselbe Orientierung besitzen und somit die 3a*S*,8a*S*-konfigurierten Diastereomere erhalten wurden, wie zuvor angenommen.

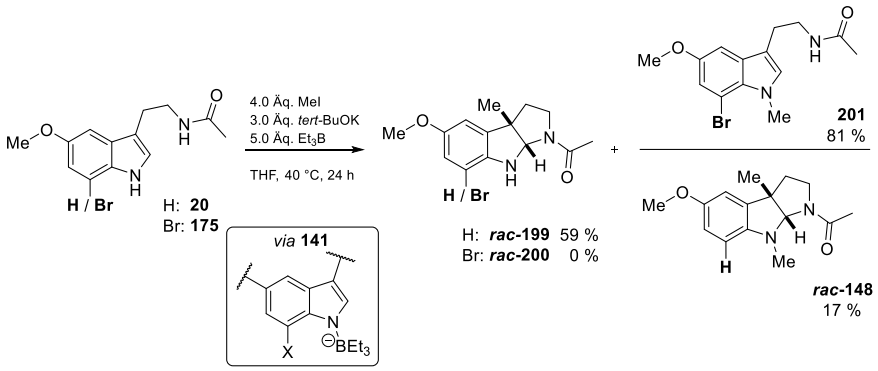
Zusammenfassend war die Umsetzung der zwei Indolcarbamatderivate **178** und **179** erfolgreich, wenngleich der Einsatz der zwei Enzyme Schwierigkeiten bei der Produktextraktion hervorgerufen hat. Die isolierten Ausbeuten gleichen dem Trend aus dem Glo-Assay, weshalb eine Umsetzung der 7-Methoxyverbindung **195** auch nachträglich nicht in Erwägung gezogen wurde. Erwähnenswert ist ebenfalls, dass für die isolierten Verbindungen **196** und **197** jeweils zwei verschiedene Rotamere beobachtet wurden, welche auf verschiedene Orientierungen des Amidrestes zurückgeführt wurden.

4.3.2.4. Chemische Zyklisierung über den biomimetischen Ansatz

Vergleichend wurde die chemische Methylierung entsprechend des biomimetischen Ansatzes von You *et al.* (Kapitel 4.1.2 - Schema 23) getestet.[180] Dabei wird der Indolstickstoff mithilfe von Kalium-*tert*-butanolat deprotoniert, damit anschließend Triethylborat als Lewis-Säure angelagert werden kann. Auf diese Weise wird die Elektronendichte am Pyrrolring des Indols erhöht, sodass ein nukleophiler Angriff der *C3*-Position an ein Elektrophil (hier Methyliodid) verstärkt stattfinden kann. Gleichzeitig verhindert das Triethylborat durch die direkte Bindung zum Stickstoff bzw. durch sterische Abschirmung, dass der Indolstickstoff oder die *C2*-Position ebenfalls alkyliert werden. Infolge der *C3*-Alkylierung kommt es zur Abspaltung des Triethylborats bei gleichzeitiger Ringformation durch einen nukleophilen Angriff des Amid-Stickstoffs an der *C2*-Position. Das *N*-Indolyltriethylborat ist damit ein nützliches Intermediat zum Aufbau von HHP, wenngleich die *C3*-Alkylierung nicht stereoselektiv ist und es damit zur Bildung zweier Diastereomere kommt (Schema 38).[181]

Da für die Reaktion eine starke Base eingesetzt wird, wurde die Reaktion nicht mit den Carbamaten, sondern mit den 5-Methoxy-Verbindungen **20** und **175** durchgeführt. Wie schon von P. Schneider und You *et al.* beschrieben,[180, 189] kann unter den dargestellten Bedingungen (Schema 38) Melatonin zum HHP ***rac*-199** umgesetzt werden. In diesem Zusammenhang konnte eine Ausbeute von 59 % reproduziert werden, wobei mit 17 % als weiteres Nebenprodukt die 3a,*N*-dimethylierte Verbindung ***rac*-148** erhalten wurde. Die Methode wurde daher auf die 7-Brom funktionalisierte Verbindung **175** übertragen, wobei es jedoch nicht zur Bildung des gewünschten HHP ***rac*-200** kam. Stattdessen wurde mit einer Ausbeute von 81 % das *N*-methylierte Nebenprodukt **201** isoliert (Schema 38). Dieses Ergebnis ist kohärent mit den publizierten Resultaten von Hashim *et al.*, welche unter ähnlichen Bedingungen 7-Methyltryptamin benzylieren wollten, allerdings ebenfalls das *N*-substituierte Produkt erhielten.[181] Die Bildung des *N*-Indolyltriethylborats **141** ist entscheidend für die

erfolgreiche *C3*-Substitution, allerdings werden diese Intermediate bei 7-substituierten Indolen aufgrund der resultierenden 1,3-Interaktion nur schwer gebildet.

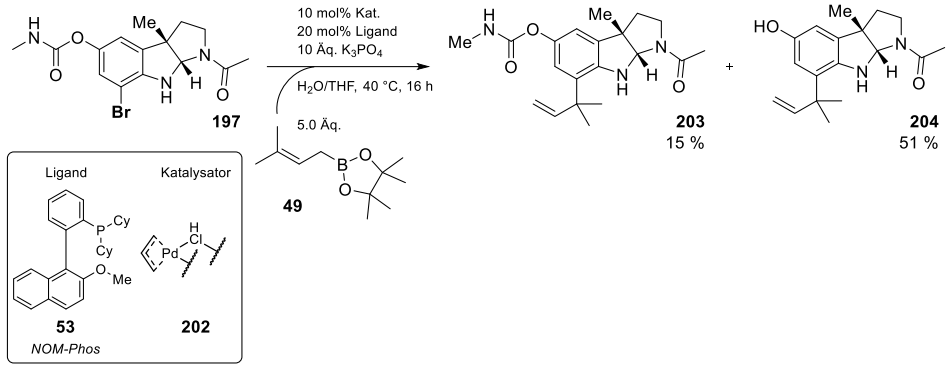


Schema 38: Dearomatisierende Zyklisierung von Melatonin **20** und 7-Brommelatonin **175** mithilfe von Triethylborat nach You *et al.*[180] und Hashim *et al.*[181]

Daher konnte über diese Methode die Methylierung der 7-funktionalisierten Indole nicht realisiert werden. Zudem weist die chemische Methylierung im Vergleich zur enzymatischen Methylierung mit PsmD aufgrund der ausbleibenden Stereoselektivität einen weiteren klaren Nachteil auf. Des Weiteren zeigt diese Reaktion, dass angefügte Substituenten in 7-Position einen starken Einfluss auf die Aktivierung des Indolstickstoffs haben. Damit steht dieses Ergebnis im Einklang mit den Resultaten aus der enzymatischen Umsetzung mit PsmD und unterstreicht die Schwierigkeit, 7-funktionalisierte Indolcarbamate zum HHP umzusetzen.

4.3.3. Kreuzkupplung als Zugangsmöglichkeit für weitere Derivate

Anhand des Glo-Assays und der präparativen Umsetzung der Indolcarbamate **178** und **179** zeigt sich, dass die angefügten Substituenten vermutlich durch sterische Hinderung die optimale Anlagerung des Moleküls im Enzym beeinträchtigen. Da bereits bei der Methoxyverbindung **195** eine minimale Enzymaktivität mithilfe des Glo-Assays gemessen wurde (Abbildung 42), ist es unwahrscheinlich, dass Substrate mit noch größeren Substituenten, wie Alkyl- oder Arylresten, von der Methyltransferase umgesetzt werden können. Allerdings können solche Verbindungen auch durch Kreuzkupplungen zugänglich gemacht werden. In Übergangsmetall-katalysierten Reaktionen werden z. B. aus halogenierten Verbindungen über Insertion metallorganische Verbindungen generiert, welche anschließend über Transmetallierung und reduktive Eliminierung mit einem weiteren organischen Alkyl- oder Arylrest verknüpft werden können (siehe Kapitel 2.2.2). Aufgrund der steigenden Reaktivität der Halogene in den höheren Perioden, eignet sich insbesondere das 7-Brom-HHP **197** für eine Kupplungsreaktion. Seit der Entdeckung der Kupplungsreaktionen ist eine breite Masse an Namensreaktionen entwickelt worden, welche unter verschiedensten Bedingungen unterschiedliche Produkte ermöglichen. Die in diesem Fall verwendete Suzuki-Reaktion ermöglicht die Kupplung mit dem allylischen Boronsäurepinakolester **49** mithilfe eines Palladium-Katalysators. Dabei kann, je nach verwendeter Katalysator/Ligand-Kombination (hier: Naphthylligand **53** und Allylpalladium(II)chlorid **202**), die Prenylierung regioselektiv durchgeführt werden, wodurch entweder das lineare oder verzweigte Reaktionsprodukt erhalten wird.[89]



Schema 39: Suzuki-Kreuzkupplung von 7-Brom-HHP **197** zur entsprechenden Prenylverbindung **203** nach Buchwald.[89]

Unter Verwendung von NOM-Phos **53** und Allylpalladiumchlorid **202** konnte das bromierte Pyrroloindol **197** erfolgreich zum 7-Prenylpyrroloindol **203** umgesetzt werden. Die für Suzuki-Reaktionen typischen Bedingungen beinhalten meist ein biphasisches System, bei dem sowohl Wasser als auch THF eingesetzt werden, sowie die Verwendung einer Base (hier Kaliumphosphat). Letzteres wird in diesem Fall die Hydrolyse des Carbamats bewirkt haben, sodass schließlich mit 51 % das Prenylphenol **204** als Nebenprodukt erhalten wurde. Mit lediglich 15 % Ausbeute ist die Prenylierung über diese Bedingungen somit nicht vorteilhaft, dennoch konnte grundsätzlich gezeigt werden, dass Kreuzkupplungen auch an diesem späten Punkt der Synthese (*late*-stage) möglich sind.

Somit konnte über eine Kreuzkupplung zwei weitere HHP-Verbindungen generiert werden. Die Verwendung einer Base in wässrigem Medium führte jedoch zu einer weitgehenden Hydrolyse des Carbamats, womit die Suzuki-Kreuzkupplung für die carbamoylierten HHP-Verbindungen nicht vorteilhaft ist. Die Verwendung von anderen Reaktionsbedingungen zur Kupplung ist daher erstrebenswert, beispielsweise sei an dieser Stelle die Negishi-Kupplung zu erwähnen, welche auf die Verwendung einer Base verzichtet und somit die Kupplung von Arylhalogeniden mit Zinkverbindungen ermöglicht.[204, 205]

4.3.4. Biologische Aktivität der neuen Hexahydropyrroloindolcarbamate

Physostigmin (**28**) sowie auch die Intermediate der Biosynthese wirken als Inhibitoren der AChE und BChE. ACh und BCh sind wichtige Botenstoffe innerhalb des menschlichen Körpers, welche nach erfolgter Ausschüttung im synaptischen Spalt durch die entsprechende Esterase abgebaut werden und dadurch wieder resorbiert werden können (Kapitel 4.1.1 – Abbildung 34). Eine Inhibition dieser Enzyme bewirkt eine verstärkte Signalweiterleitung, was bei degenerativen Nervenkrankheiten wie z. B. Alzheimer zur Linderung der charakteristischen Symptome (Ruhelosigkeit, Tremor) genutzt werden kann. Während der Naturstoff aufgrund seiner pharmakokinetischen Eigenschaften selbst nur in geringem Maße eine medizinische Anwendung fand, kann die Derivatisierung des Moleküls eine Optimierung dieser Eigenschaften ermöglichen. Beispielsweise kann durch die Modulation der Polarität die Löslichkeit oder die Membrangängigkeit beeinflusst werden, wodurch die Resorption im Körper sowie die Distribution eines Wirkstoffs verändert werden kann. Neben der Pharmakokinetik beeinflusst die Derivatisierung des Wirkstoffs auch maßgeblich die

Interaktion mit dem Enzymrezeptor. Somit sollte innerhalb dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden, inwiefern die Dekoration der 7-Position die Inhibition der AChE und BChE beeinflusst.

Dazu eignet sich der Ellmans-Assay, bei dem die Aktivität der Esterasen durch die Bildung eines Farbstoffs quantitativ nachgewiesen werden kann. Anstelle der nativen Neurotransmitter wird Acetyl-/Butyrylthiocholin (ATCh – **205**) und BTCh – **206**) als Substrat verwendet, welches durch die Enzyme zu Thiocholin (TCh – **207**) hydrolysiert wird. Letzteres kann mit der freien Thiolgruppe die Disulfidbrücke des Ellmans-Reagenz 5,5‘-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB – **208**) spalten, wodurch Thionitrobenzoesäure (TNB – **209**) gebildet wird (Abbildung 44). Dessen Freisetzung kann anhand des Absorptionsmaximums bei einer Wellenlänge von 412 nm gemessen werden und belegt damit die AChE-/BChE-Aktivität.[206]

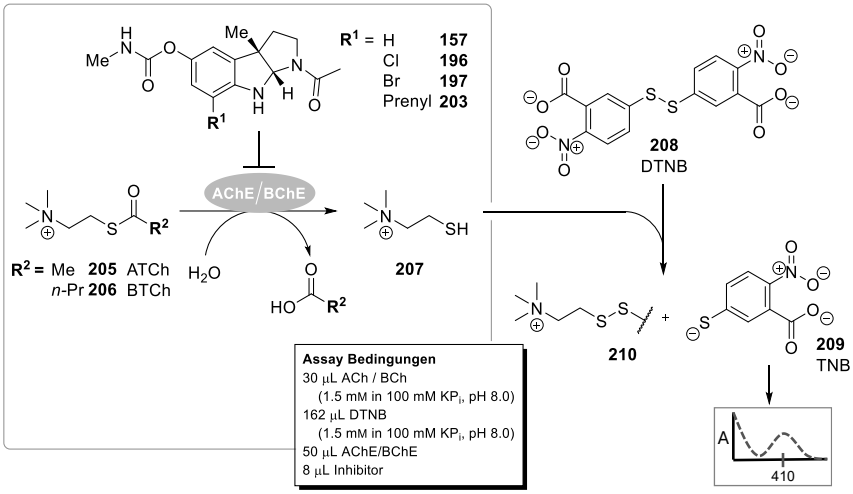


Abbildung 44: Schematische Darstellung des Ellmans-Assays, bei dem die Inhibition der AChE/BChE durch die HHP-Verbindungen **157**, **196**, **197** und **203** untersucht wird. Die Enzyme katalysieren die Hydrolyse von Acetyl- und Butyrylthiocholin (**205**/**206**) zu Thiocholin (**207**), welches die Disulfidbrücke des DTNB (**208**) spaltet. Die resultierende Freisetzung von TNB (**209**) kann anhand der Absorption bei 412 nm quantitativ gemessen werden.[206]

Zunächst wurden dazu die verwendeten Reaktionsbedingungen ohne die Zugabe eines Inhibitors untersucht. Während in der Dissertation von P. Schneider eine Endkonzentration von 0.1 U/mL der AChE bzw. 1.0 U/mL der BChE eingesetzt wurde,[188] wurde unter diesen Bedingungen schon nach kurzer Zeit bei beiden Enzymen das obere Detektionslimit erreicht (für die AChE: Abbildung 45 – links). Es wurden daher fünf 4-fach Verdünnungen der zwei Enzyme angesetzt und getestet. Dabei zeigt sich bei fast allen Enzymkonzentrationen eine lineare Zunahme der Absorption, mit Ausnahme der Enzymkonzentration von 0.1 U/mL. Zudem weist bei einer ATCh-Konzentration von 1.8 mM die Absorption schon bei Beginn der Aufzeichnung Werte von über 1 auf, weshalb die ATCh-Konzentration von 1.8 mM auf 0.18 mM verringert wurde (für die AChE: Abbildung 45 – rechts). Dies führt im Fall von 0.1 U/mL Enzymkonzentration zu einer Sättigungskurve und indiziert damit, dass das Substrat innerhalb des Assays vollständig umgesetzt wird. Für alle anderen Enzymkonzentrationen konnte jedoch noch immer eine lineare Zunahme der Absorption bei Werten zwischen 0.4 und 1.2 beobachtet werden. Damit liegt die Absorption in einem zuverlässigen Messbereich, da hohe Absorptionswerte (über 2) eine Messungenauigkeit des Geräts beinhalten.

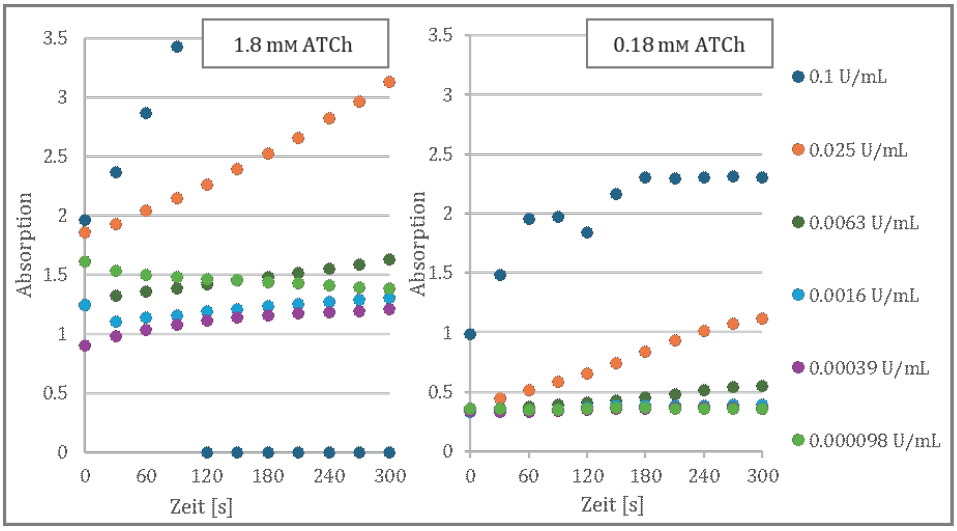


Abbildung 45: Auftragung der Absorption gegen die Reaktionszeit des Ellmans-Assays zur Untersuchung der notwendigen Enzym- und Substratkonzentration für die AChE. Links: 1.8 mM ATCh. Rechts: 0.18 mM ATCh.

Da in den weiteren Messungen die inhibitorischen Eigenschaften der entsprechenden Verbindungen untersucht werden und damit die Enzymaktivität verringert wird, sollten die nicht-inhibierten Messungen am oberen Detektionslimit liegen. Folglich wurde für die AChE die Enzymkonzentration von 0.025 U/mL und eine Substratkonzentration von 0.18 mM als optimal erachtet und für die weiteren Messungen verwendet.

Vergleichbare Messungen wurden ebenfalls für die BChE durchgeführt, wobei sich ein ähnliches Bild abzeichnete (siehe Anhang, Kapitel 8.2.1 – Abbildung 74). Somit wurde auch für die BChE die von P. Schneider angegebene Enzymkonzentration von 1.0 U/mL um einen Faktor von 4 verdünnt, sodass die finale Endkonzentration von 0.25 U/mL sowie ebenfalls 0.18 mM des BTCh im Folgenden weiterverwendet wurde.

In den folgenden Messreihen wurde der Reaktion anschließend 8 µL des jeweiligen Inhibitors zugefügt, welcher ausgehend von einer 125 mM DMSO-Stammlösung in KP_i (100 mM, pH 8.0) verdünnt wurde. Insgesamt wurden zwölf Konzentrationen in einer sukzessiven 1:4-Verdünnung entsprechend der Tabelle 1 getestet. Das unsubstituierte HHP **157** wurde dazu von D. Amariei bereitgestellt, während Eserolin (**139**) und Physostigmin (**28**) kommerziell erworben wurden.

Tabelle 1: Verdünnungsreihe der verschiedenen Inhibitor-Stammlösungen ausgehend von einer 125 mM DMSO-Stammlösung in zwölf 1:4 Verdünnungsschritten mit KP_i (100 mM, pH 8.0).

Konz.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[mM]	31	7.8	1.9	0.48	0.12							
[µM]				488	122	31	7.6	1.9	0.47			
[nM]									476	119	30	7.5
final	1.0 µM	0.25 µM	63 µM	16 µM	3.9 µM	0.98 µM	0.24 µM	61 nM	15 nM	3.8 nM	0.95 nM	0.29 nM

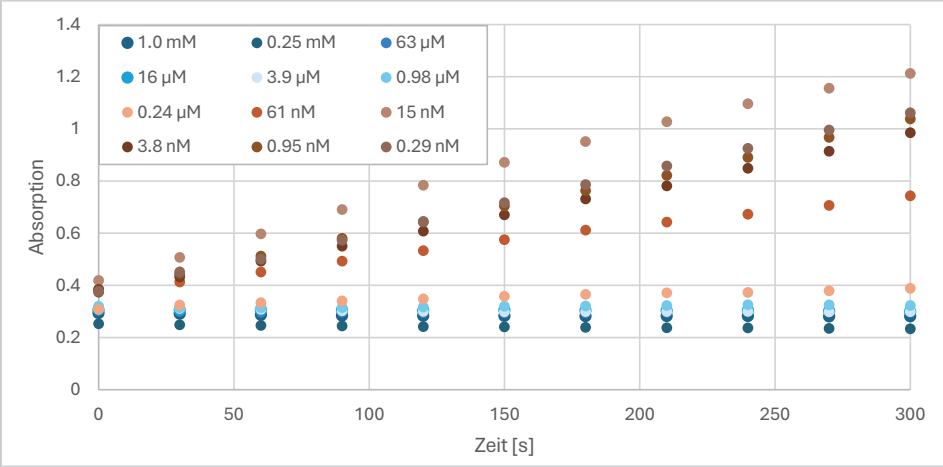


Abbildung 46: Auftragung der gemessenen Absorption gegen die Reaktionszeit zur Ermittlung der AChE-Aktivität bei Inhibition durch das unsubstituierte HHP **157** in Abhängigkeit von der zugefügten Inhibitorkonzentration (Tabelle 1).

In Abbildung 46 ist beispielhaft die gemessene Absorption für das unsubstituierte HHP **157** in Abhängigkeit von der eingesetzten Inhibitorkonzentration (Tabelle 1) zur Ermittlung der AChE-Aktivität dargestellt (für BChE siehe Anhang, Kapitel 8.2.1 – Abbildung 75). Es kann für alle Konzentrationen eine lineare Absorptionszunahme beobachtet werden, wobei eine hohe Steigung mit einer niedrigen Inhibitorkonzentration korreliert.

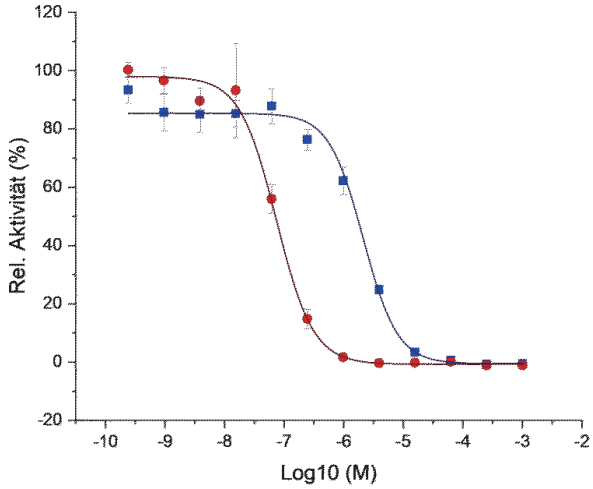


Abbildung 47: Auftragung der verbleibenden, relativen Enzymaktivität der AChE (blau, viereckig) und BChE (rot, kreisförmig) mit Standardabweichung (in Triplikaten gemessen) gegen den dekadischen Logarithmus der eingesetzten Inhibitorkonzentration bei Inhibition durch das unsubstituierte Hexahydropyrroloindol **157** mit eingefügter (Substanz-Wirkungskurve) über einen nicht-linearen *fit* (Origin: *dose-response*).

Die Messungen wurden für alle Konzentrationen und für alle getesteten Inhibitoren in Triplikaten durchgeführt. Um daraus anschließend die Inhibition der zwei Esterasen zu quantifizieren, wurde für jede Inhibitor-Konzentration die verbleibende relative Enzymaktivität ermittelt. Dazu wurde die gemessene Absorptionszunahme sowohl für die Inhibitor-Messreihe als auch für die Positivkontrolle (ohne Zugabe eines Inhibitors) einer

linearen Regression unterzogen und anschließend die durchschnittliche Steigung der inhibierten Enzymaktivität durch die Positivkontrolle relativiert. Durch die Auftragung der relativen Enzymaktivität gegen den dekadischen Logarithmus der Inhibitorkonzentration ergibt sich eine Substanz-Wirkungskurve (*dose-response curve*). Über einen nicht-linearen *fit* wurde daraus anschließend die IC_{50} kalkuliert, wobei nicht nur die durchschnittlichen Werte, sondern auch die Standardabweichung einbezogen wird. In Abbildung 47 sind die zwei Substanz-Wirkungskurven des unsubstituierten HHP **157** beispielhaft dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die Enzymaktivität der AChE bis zu einer Inhibitorkonzentrationen von $10^{-6,5}$ (ca. 0.3 µM) unverändert bleibt (bei ca. 90 % Enzymaktivität), während die BChE-Aktivität schon bei Konzentrationen von 10^{-8} (ca. 0.01 µM) zu sinken beginnt (ausgehend von ca. 100 % Enzymaktivität). Beide Kurven zeigen einen sigmoidalen Verlauf und fallen auf einen Wert von ca. 0 % ab.

Aus der graphischen Datenanalyse wurde außerdem die halbmaximale Inhibitorkonzentration berechnet, welche für alle gemessenen Verbindungen (Abbildung 48) in Tabelle 2 dargestellt ist. Alle übrigen Substanz-Wirkungskurven sind im Anhang abgebildet (Kapitel 8.2.1 – Abbildung 76 bis Abbildung 81). In Einzelfällen war es erforderlich, einzelne Werte für den *fit* zu maskieren und somit von der Berechnung auszuschließen. Dies geschah, wenn diese Werte als zu hoch oder zu niedrig angesehen wurden und somit die Anwendung des sigmoidalen Modells beeinträchtigten. Die entsprechenden Werte sind in den entsprechenden Abbildungen grau gefärbt.

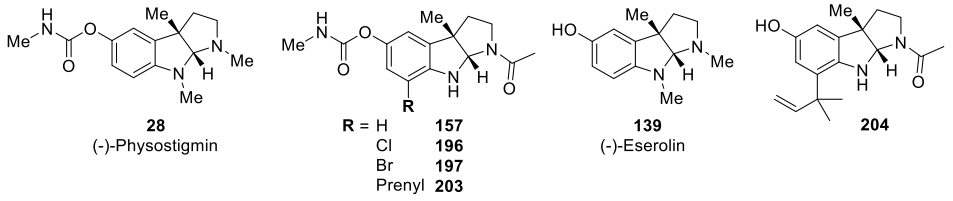


Abbildung 48: Chemische Struktur der Pyrroloindolcarbamate **157**, **196**, **197** und **204** sowie der Naturstoffe **28** und **139**, deren IC_{50} anhand des Ellmans-Assays bestimmt wurden.

Tabelle 2: Berechnete IC_{50} der neu-hergestellten Verbindungen sowie der Naturstoffe Physostigmin und Eserolin.

	Physostigmin 28	**7-H 157**	**7-Cl 196**	**7-Br 197**	**7-Prenyl 203**	**Eserolin 139**	**7-Prenyl-OH 204**
AChE [µM]	0.12 ±0.019	2.1 ± 0.16	37 ± 1.3	11 ± 0.53	n.b.	40 ±2.9	n.b.
BChE [µM]	0.43 ±0.051	0.074 ± 0.0080	0.26 ± 0.037	1.2 ± 0.17	0.90 ± 0.096	55 ± 6.4	212 ± 462
BChE / AChE	3.6	0.04	0.07	0.11	~0	1.4	~0

Die berechneten IC_{50} liegen für alle Verbindungen und für beide Enzyme in einem Bereich von 0.07-212 µM. Damit sind zwischen einzelnen Verbindungen jedoch große Unterschiede sichtbar. So weist Physostigmin (**28**) mit 0.12 und 0.425 µM besonders niedrige Werte auf, während Eserolin (**139**) mit 40.9 und 55.2 µM erst bei deutlich höheren Konzentrationen eine halbmaximale Inhibition erreicht. Mit Ausnahme des prenylierten Phenols **204** liegen die Werte der weiteren HHP **157, 196**, **197** und **203** in einem ähnlichen Bereich (2-37 µM für die AChE und 0.07 bis 1.2 µM für die BChE). Dabei fällt insbesondere auf, dass das unsubstituierte

HHP **157** im Vergleich zum Physostigmin (**28**) zwar eine geringere Inhibition gegenüber der AChE aufweist, jedoch deutlich stärker die Aktivität der BChE einschränkt. Dies ist im Einklang mit den veröffentlichten Werten von P. Schneider[188], wobei die exakten Werte jedoch teilweise abweichen (Kapitel 4.1.4 – Abbildung 37). Die Substitution in 7-Position (durch Chlor, Brom oder Prenyl – Verbindungen **196**, **197** und **203**) scheint hingegen nur einen geringfügigen Einfluss zu haben, da die berechneten IC_{50}-Werte gegenüber beiden Enzymen etwas höher ausfallen als für die unsubstituierte Verbindung **157**. Somit kann für diese Verbindungen ebenfalls eine selektive Inhibition der BChE verzeichnet werden. Dieser Effekt ist in besonderem Maße bei der 7-Prenyl-Verbindung **203** erkennbar, für welche eine IC_{50} von 0.898 µM gegenüber der BChE berechnet wurde, wobei jedoch aufgrund der geringen Inhibition keine zuverlässige IC_{50} gegenüber der AChE ermittelt werden konnte (Abbildung 49). Die prenylierte Verbindung **203** inhibiert damit ausschließlich die BChE, wobei die Interaktion mit der AChE möglicherweise durch die Prenylgruppe sterisch gehindert wird.

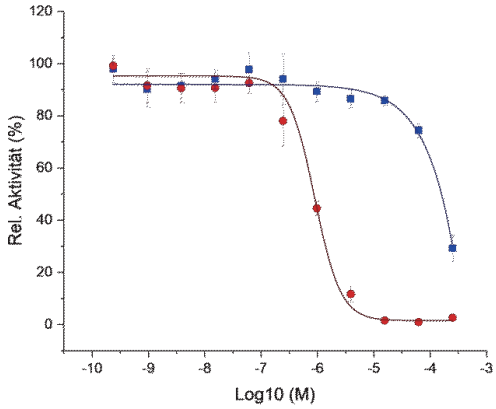


Abbildung 49: Auftragung der verbleibenden, relativen Enzymaktivität der AChE (blau, viereckig) und BChE (rot, kreisförmig) mit Standardabweichung (in Triplikaten gemessen) gegen den dekadischen Logarithmus der eingesetzten Inhibitorkonzentration bei Inhibition durch das prenylierte Hexahydropyrroloindol **203** mit eingefügter (Substanz-Wirkungskurve) über einen nicht-linearen *fit* (Origin: *dose-response*).

Da die Inhibition durch die Chlor- und Bromsubstituenten jedoch nur in geringem Maße beeinflusst wird, lässt sich eine gewisse räumliche Variabilität in dieser Hinsicht ableiten. Diese Vermutung lässt sich zudem anhand der Struktur-Wirkungsbeziehung veranschaulichen (Abbildung 50).

Die Inaktivierung der Esterase wird maßgeblich durch den Transfer der Carbamatgruppe auf das Serin^{200} im aktiven Zentrum bedingt (Kapitel 4.1.1 – Schema 20). Da die Hydrolyse des Carbamats deutlich langsamer abläuft als die Hydrolyse des Esters (wenn ACh, bzw. BCh umgesetzt wurde), handelt es sich in diesem Fall um eine pseudo-irreversible Inhibition. Die zusätzliche Prenylgruppe in *meta*-Stellung zum Carbamat wird einen nukleophilen Angriff des Serins auf das Carbamat deutlich erschweren, je nach räumlicher Orientierung der Kohlenstoff-Kette. Entsprechend der Kristallstruktur der AChE ist erkennbar, dass die katalytische Triade, bestehend aus Serin^{200}, Histidin^{440} und Glutamat^{327}, sich in einer tiefen Kavität des Enzyms befindet. Dies könnte begründen, warum die sterisch anspruchsvollen Verbindungen (wie z. B. das Prenylcarbamat) die AChE nicht inhibieren. Anhand der Kristallstruktur können jedoch keine eindeutigen Aussagen getroffen werden, wo die entsprechenden Inhibitoren angelagert werden und inwiefern die umliegenden Seitenketten mit dem Inhibitor interagieren.

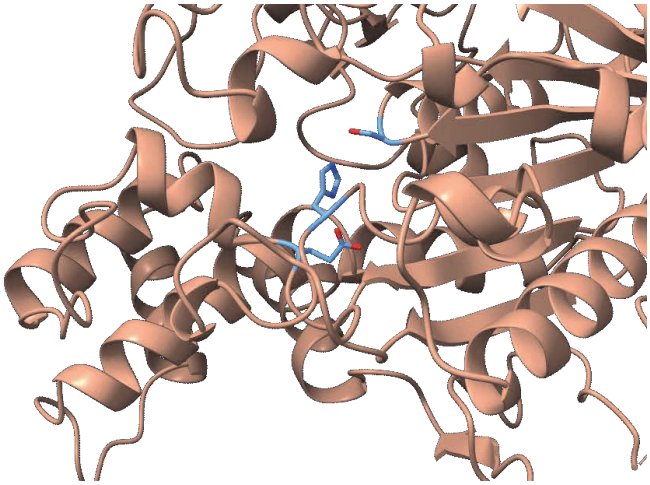


Abbildung 50: Kristallstruktur der AChE aus *Electrophorus electricus* (PDB: 1EEA) mit hervorgehobener katalytischer Triade (blau), bestehend aus S^{200}, H^{440} und E^{327}.[207]

Die Phenolverbindungen **139** und **204** müssen zudem über einen alternativen Wirkmechanismus zur Inhibition der Esterase führen, da diese keine 5-Carbamatgruppe enthalten. Viele weitere AChE/BChE-Inhibitoren beinhalten jedoch ebenfalls keine Carbamatgruppe und inhibieren die AChE auf andere Weise. Beispielsweise wirkt das Schlangengift Fasciculin durch eine Blockade der Enzymkavität und verhindert damit die Substratzufuhr.[173, 208] Außerdem wurden für den Inhibitor Donepezil weitere Bindungsmodi beschrieben, wodurch der Inhibitor sowohl einen nicht-kompetitiven als auch kompetitiven Charakter erhält.[209] Die AChE scheint damit über viele weitere Wirkmechanismen beeinflusst zu werden, welche an dieser Stelle jedoch nicht weiter beleuchtet werden. Abschließend kann für die prenylierte Phenolverbindung **204** ein ähnlicher Trend festgehalten werden, wie für das prenylierte Carbamat **203**, da auch in diesem Fall gegenüber der AChE keine IC_{50} bestimmt werden konnte. Mit einer IC_{50} von 212 µM inhibiert das prenylierte Phenol **204** jedoch auch die BChE nur in sehr geringem Maße.

Zusammenfassend konnten die hergestellten Verbindungen erfolgreich hinsichtlich ihrer inhibierenden Eigenschaften gegenüber der AChE und BChE getestet werden. Die hergestellten Hexahydropyrrol-Derivate **196** und **197** zeigten, wie auch die unsubstituierte Verbindung **157**, eine starke Selektivität zugunsten der Inhibition der BChE. Durch das Anfügen einer Prenylgruppe in 7-Position (Verbindung **203**) konnte die beobachtete Selektivität noch um ein Vielfaches erhöht werden. Ob die hergestellten Verbindungen zudem verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen, wurde an dieser Stelle nicht untersucht.

4.4. Zusammenfassung und Ausblick

Physostigmin (**28**) ist schon lange aufgrund seiner Aktivität gegenüber der AChE als Nervengift bekannt. Der Anwendung als Medikament gegen Alzheimer standen jedoch die Nebenwirkungen gegenüber, weshalb Physostigmin lediglich als Therapeutikum bei Anticholinergika-Intoxikation eingesetzt wird. Die Derivatisierung der biologisch aktiven Pyrroloindolcarbamate könnte eventuell die Nebenwirkungen reduzieren oder zu einer verstärkten inhibitorischen Aktivität führen, weshalb in diesem Projekt neue Verbindungen zugänglich gemacht werden sollten. Dabei wurde nicht der Naturstoff selbst anvisiert, da auch die Vorstufe in der Biosynthese von Physostigmin (Verbindung **157**) schon eine hohe biologische Aktivität aufweist. Die HHP-Derivate sollten zudem mithilfe der Methyltransferase PsmD synthetisiert werden, da das Enzym einen selektiven Aufbau der Stereozentren ermöglicht. Die verwendete Methyltransferase und dessen Homologe wurden ebenfalls schon in einigen Publikationen beschrieben, woraus die 7-Position als vorteilhafter Punkt zur Derivatisierung hervorgeht, um den Erhalt einer möglichst hohen Methyltransferase-Aktivität zu gewährleisten.

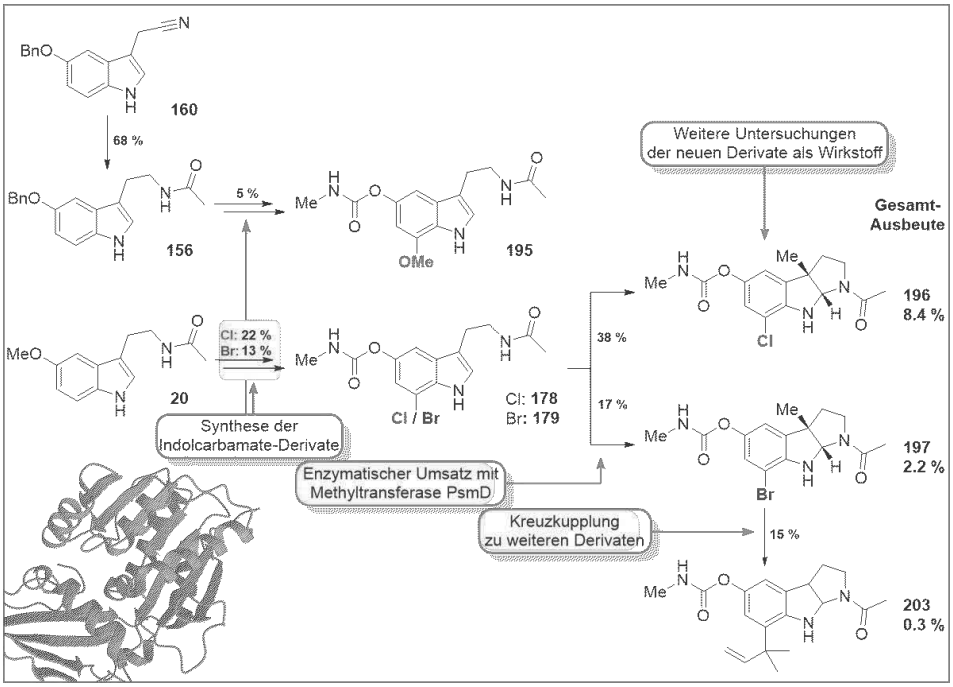


Abbildung 51: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse innerhalb des Physostigmin-Projekts sowie Anmerkungen für weitere Forschungsaspekte (orange markiert).

Die Synthese der Derivate wurde ausgehend von Melatonin (**20**) bzw. dem 5-Benzyloxyanalogon **160** gestartet, wobei die verwendete PG von der später angefügten funktionellen Gruppe abhängt. Da die hydrogenolytische Spaltung des Benzylethers zu Protodehalogenierung führt, wurde für die halogenierten Verbindungen die Methylschutzgruppe am 5-Phenol verwendet. Das chlorierte und bromierte Indolcarbamat **178** und **179** konnten über vier Schritte in einer Ausbeute von 22 % bzw. 13 % erhalten

werden. Das 7-Methoxyindolcarbamat **195** wurde ausgehend vom benzylierten Startmaterial **156** in fünf Schritten in einer Ausbeute von 5 % erhalten (Abbildung 51).

Die geringe Ausbeute der Synthese kann vorwiegend mit dem letzten Schritt, der Carbamoylierung, begründet werden, da einerseits das Methylcarbamoylchlorid ein eher unreaktives Reagenz ist und andererseits die angefügten funktionellen Gruppen durch ihren elektronenziehenden Effekt die Nukleophilie des Phenols reduzieren. Zudem zeigte sich in der Synthese des 7-TBSO-Indolcarbamats **192**, dass die Carbamoylierung durch noch größere Substituenten, wie der verwendeten TBS-PG, vollständig erliegt. Die Synthese der Indolcarbamate kann daher durch den Einsatz eines reaktiveren Methylcarbamat-Donors optimiert werden. Isocyanate eignen sich in dieser Hinsicht aufgrund ihrer hohen Reaktivität, wobei jedoch insbesondere das Methylisocyanat besonders instabil und explosiv ist und der direkte Einsatz dessen daher nicht befürwortet wird. Der *flow*-Ansatz, bei welchem über eine Curtius-Umlagerung das Methylcarbamat generiert wird, wurde jedoch nur mit dem 7-TBS-Ether **186** getestet. Da die TBS-PG das 5-Phenol vermutlich sterisch blockiert, könnte sich diese Methode für die übrigen Phenole **176**, **177** und **194** als vorteilhaft erweisen und sollte daher als eine Alternative zur herkömmlichen Carbamoylierung getestet werden. Zudem könnte die Synthese des hydroxylierten Indolcarbamats mit kleineren, jedoch elektronenschiebenden 7-PGs, wie z. B. einem Trimethylsilylether oder einem Allylether, bewerkstelligt werden.

Für die enzymatische Methylierung mithilfe von PsmD wurden die produzierten Indolcarbamat-Derivate mit dem Glo-Assay hinsichtlich der enzymatischen Aktivität untersucht. Die Größe der angefügten Substituenten wirkte sich in diesem Zusammenhang kritisch auf die Enzymaktivität aus. Während für die chlorierte Verbindung **178** noch eine relative Aktivität von 64 % (bzw. 21 %) gemessen wurde, konnte für die bromierte Verbindung **179** mit 19 % (bzw. 12 %) eine deutlich geringere Aktivität beobachtet werden. Mit der Methoxyverbindung **195** als Substrat zeigte das Enzym nahezu keine Aktivität, weshalb von größeren Substituenten abgeraten werden kann. Jedoch dient der Glo-Assay nur als ein Anhaltspunkt, da in der präparativen Umsetzung mit höheren Enzymkonzentrationen für die 7-Chlorverbindung **178** trotzdem ein vollständiger Substratumsatz erzielt werden konnte (Schema 37). Dazu wurde die Methyltransferase über verschiedene Methoden in die Reaktion eingebracht, wobei der Einsatz von Enzymlysat die Produktextraktion enorm erschwert und zu einem hohen Produktverlust führt. Die Verwendung von immobilisiertem Enzymlysat war in dieser Hinsicht vorteilhaft, auch wenn die Immobilisation die Enzymaktivität teilweise reduzierte. Somit bietet auch dieser Schritt der chemoenzymatischen Synthese Raum zur Optimierung. Um zu elaborieren, welche der drei getesteten Methoden (unverändertes Enzymlysat, immobilisiertes Enzymlysat oder Ganze Zellen) die größtmögliche isolierte Ausbeute liefert, sollte zunächst ein quantitativer Fokus sowie eine eindeutige Vergleichbarkeit zwischen den Ansätzen in den Vordergrund gestellt werden. Aufgrund der langen Reaktionszeit und der daraus resultierenden Degradation des Substrats bzw. des Produkts könnte in dieser Hinsicht eine zeitliche Auflösung der Reaktion von Belang sein, um eine maximale Ausbeute zu erzielen.

Nach erfolgter Methylierung konnte das bromierte HHP **197** erfolgreich in einer Suzuki-Kupplung revers-prenyliert werden. Die in der Suzuki-Kupplung verwendete Base führte jedoch zur Hydrolyse des 5-Carbamats, weshalb sich die Suzuki-Kupplung nur in geringem Maße eignet. Andere Kreuzkupplungen wie die Negishi-Kupplung vermeiden den Einsatz einer Base, wodurch potenziell höhere Ausbeuten erzielt werden könnten. Außerdem könnten

Methoden untersucht werden, die es ebenfalls ermöglichen, das 7-Chlor-HHP **196** für Kreuzkupplungen zu nutzen. Obwohl chlorierte Verbindungen in Kreuzkupplungen typischerweise unreaktiver sind, könnte über diesen Weg dennoch eine höhere Gesamtausbeute erzielt werden, da die chlorierte Verbindung in der präparativen Umsetzung mit PsmD deutlich besser umgesetzt wird.

Die neu hergestellten HHP-Verbindungen **196**, **197**, **203** und **204** wurden abschließend hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität gegenüber der AChE und BChE untersucht. Die gemessene halbmaximale inhibitorische Konzentration war bei den neuen Derivaten **196** und **197** im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung **157** leicht erhöht. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Selektivität zugunsten der Inhibition der BChE weiterhin vorhanden ist. Insbesondere für das 7-prenylierte Carbamat **203** konnte eine nahezu ausschließliche Inhibition der BChE beobachtet werden. Eine solche Selektivität kann vorteilhaft für die Nutzung als Wirkstoff sein, wobei es jedoch noch weitere wichtige Parameter zu berücksichtigen gilt. Darunter fallen z. B. die ADME-Parameter, welche die pharmakokinetischen Eigenschaften einer Verbindung hinsichtlich der körperinternen Prozesse wie der Adsorption, der Distribution, des Metabolismus und der Elimination beschreiben. Dazu wird beispielsweise die Permeabilität der Darm-Blut-Schranke oder der Blut-Hirn-Schranke abgeschätzt, wie auch die voraussichtliche Aktivität im zentralen Nervensystem oder die Aufnahmerate des Wirkstoffs. Ebenso kann über die Regeln Lipinskis (*rule of five*) die Wahrscheinlichkeit untersucht werden, ob die Verbindungen als orales Arzneimittel genutzt werden könnten.[210, 211] Dazu werden Parameter wie z. B. die Anzahl an Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren innerhalb des Moleküls, die Größe der polaren Oberfläche oder die rotierbaren Bindungen in Betracht gezogen. Die neu hergestellten Verbindungen müssten folglich in dieser Hinsicht tiefgreifend untersucht werden, um ihre Potenz als Wirkstoff genauer zu evaluieren.

Zusammenfassend konnte mithilfe der Methyltransferase PsmD ein Zugang zu neuen HHP-Verbindungen erschlossen werden. Durch Optimierung der chemoenzymatischen Synthese könnten auf diese Weise im Rahmen einer *late-stage*-Kreuzkupplung viele weitere Derivate zugänglich gemacht werden. Dies ermöglicht eine vielseitige Modulation der final erhaltenen Verbindungen zu einem späten Zeitpunkt in der Synthese und bietet damit die Möglichkeit, die pharmakokinetischen Parameter gezielt zu beeinflussen.

5. LANSAI-B

5.1. Kenntnisstand

5.1.1. Entdeckung und Eigenschaften

Gefunden im Jahr 2008 von Tuntiwachwuttikul *et al.*, ist die kleine Gruppe der Lansai-Verbindungen (Lansai-A (**211**), Lansai-B (**29**) sowie Lansai-C und -D) erst kürzlich entdeckt worden und daher auch erst wenig erforscht. Die Sekundärmetabolite wurden aus *Streptomyces* sp. SUC1 isoliert, welche endophytisch an den Wurzeln von *Ficus benjamina* vorkommen.[62] Strukturell ähnlich sind auch die Verbindungen Nocardioazin-A (**212**) und Nocardioazin-B (**213**) (Abbildung 52), welche aus der Kultur des Tiefsee-Bakteriums *Nocardiopsis* sp. CMB-M0232 extrahiert werden konnten.[212]

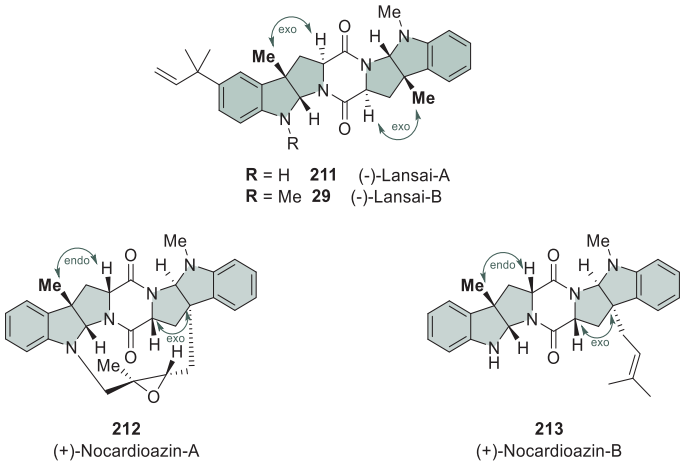


Abbildung 52: Chemische Struktur von (-)-Lansai-A und -B sowie (+)-Nocardioazin-A und -B.

Bei Nocardioazin-A (**212**) konnte eine Aktivität als P-Glykoprotein (P-gp) Inhibitor bei Dickdarm-Tumorzelllinien nachgewiesen werden. P-gp ist ein Effluxtransportprotein, welches bei resistenten Tumorzelllinien dafür sorgt, dass Zytostatika aus den Zellen gepumpt werden. Die Überexpression dieser ABC-Transporter ist eine Ursache für die Entwicklung von *multidrug resistance* (MDR) bei Tumorzelllinien oder Bakterien.[212] Auch für Lansai-B (**29**) wurde eine geringe Aktivität gegen Tumorzelllinien festgestellt. Mit einem IC_{50}-Wert von 15.03 µg/mL ist die inhibitorische Aktivität gegen B-Zellen Lymphome jedoch nur recht gering.[62]

Die chemische Struktur dieser Naturstoffe beinhaltet zwei Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-Ringe, die über einen zentralen 2,5-Diketopiperazin-Ring anelliert sind. Die Moleküle erhalten dadurch eine sehr starre und einzigartige dreidimensionale Struktur mit vielen Stereozentren, was sich in der optischen Rotation widerspiegelt. Die sterische Ausrichtung an den α-ständigen Kohlenstoffen der zwei Lansai-Verbindungen (**29** und **211**) indiziert, dass die Verbindungen aus der Kondensation zweier (*S*)-Tryptophane (**13**) hervorgegangen sind. Allerdings sind die C_α-ständigen Wasserstoffe des Nocardioazines genau gegensätzlich ausgerichtet, wodurch sich

eine *endo/cis*-Beziehung zur indirekt benachbarten Methylgruppe ergibt. Während bei Lansai-A (**211**) und Lansai-B (**29**) zudem beide *exo/trans*-konfigurierten Moleküldomänen am Kohlenstoff methyliert sind, liegt nur auf einer Molekülseite der Nocardioazine eine Methylierung vor. Im Falle von Nocardioazin-B (**213**) liegt an dem entsprechenden Kohlenstoff des zweiten HHP eine Prenylgruppe vor, welche beim Nocardioazin-A (**212**) in eine Epoxy-Gruppe umgewandelt wurde und damit eine Brücke zum Indolin-Stickstoff bildet.

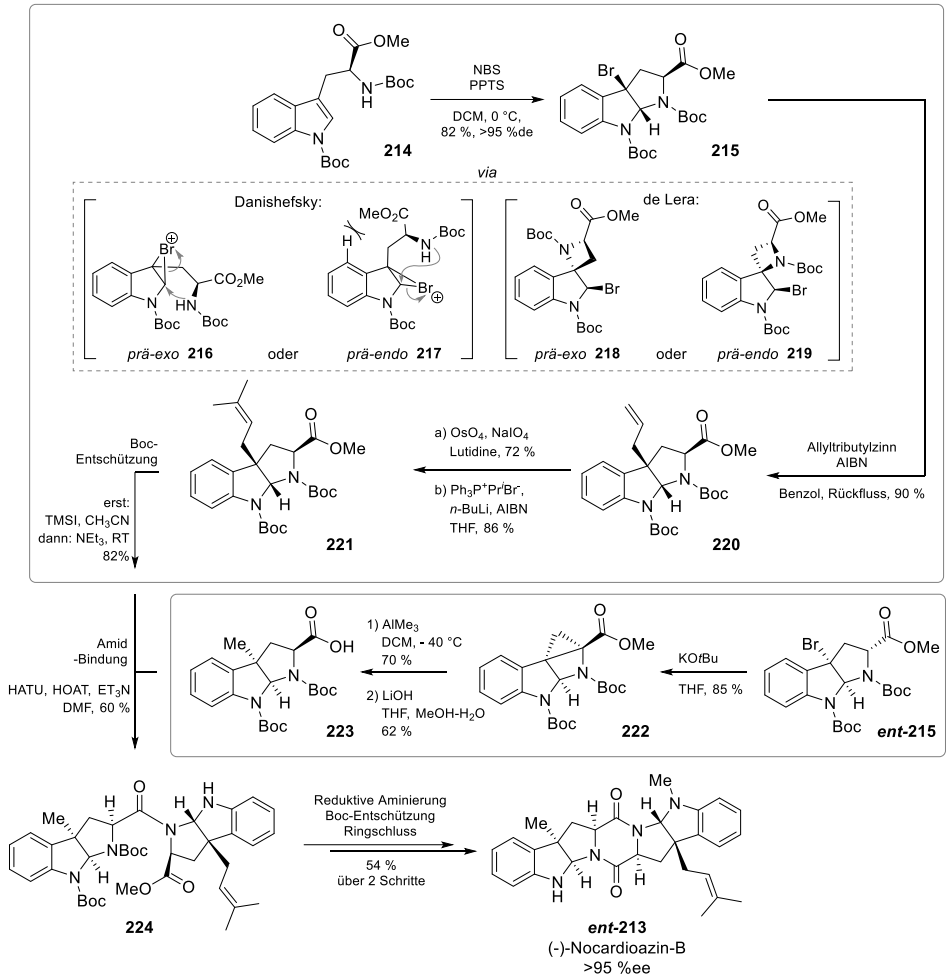
5.1.2. Totalsynthesen

Aufgrund des anspruchsvollen Kohlenstoffgerüsts dieser Naturstoffe werden sie als attraktives Ziel für Totalsynthesen betrachtet. Seit ihrer Entdeckung wurden mehrere Syntheseansätze publiziert, die alle eine konvergente Strategie verfolgen. Hierbei wurden die beiden erforderlichen HHP-Domänen separat aufgebaut und in den finalen Schritten miteinander verknüpft, um den Diketopiperazin-Ring zu generieren. Die publizierten Totalsynthesen fokussieren sich in der Regel auf Nocardioazin-A (**212**) und Nocardioazin-B (**213**), während die Synthese von Lansai-B (**29**) lediglich einmal beschrieben wurde. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit und der damit einhergehenden Anwendbarkeit der Methoden für beide Naturstoffe werden im Folgenden alle bekannten Totalsynthesen aufgegriffen.

Ye *et al.* zeigten 2012, dass (-)-Nocardioazin-B (***ent*-213**) ausgehend von (*S*)-Tryptophan bzw. (*R*)-Tryptophan zugänglich ist (Schema 40). Dabei ist zu beachten, dass das α-Stereozentrum des (*R*)-Tryptophan im Laufe der Synthese invertiert wird. Folglich wurde das komplementäre Enantiomer des extrahierten (+)-Nocardioazins (**213**) hergestellt, wodurch die absolute Konfiguration des Naturstoffs bestätigt wurde.[213]

Die Synthese wurde ausgehend vom *O*- und *N*-geschützten (*S*)-Tryptophan **214** begonnen. Unter Verwendung von NBS und PPTS wurde das HHP-Gerüst aufgebaut, wobei vorwiegend das *exo*-konfigurierte Produkt **215** erhalten wurde. Die hohe Selektivität wurde gemäß Danishefsky durch eine präferierte Ausbildung des prä-*exo*-Übergangszustands **216** hervorgerufen, da innerhalb des *prä-endo*-Bromonium-Ions **217** ein sterischer Konflikt zwischen dem Methylester und dem Indol-Gerüst vorliegt. Somit wird über den S_N2-ähnlichen Mechanismus vermehrt das *exo*-Produkt gebildet.[214, 215] In weiteren Untersuchungen auf Basis von DFT-Berechnungen entwickelten de Lera *et al.* jedoch einen abweichenden Mechanismus, indem der nukleophile Angriff des Carbamat-Stickstoffs in *C3*-Position (anstelle der *C2*-Position) stattfindet. Daraus ergeben sich ebenfalls zwei spirozyklische Indolin-Azetidin-Intermediate **218** und **219**, wobei auch in diesem Fall der *prä-exo* Übergangszustand **218** energetisch bevorzugt wird. Durch zweifache, konzertierte Umlagerung zerfällt dieser Übergangszustand und das Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol **215** wird erhalten.[216] Das experimentell bestimmte Diastereomerenverhältnis liegt für diesen Schritt in einem Bereich von 24/1 bis 30/1.[217]

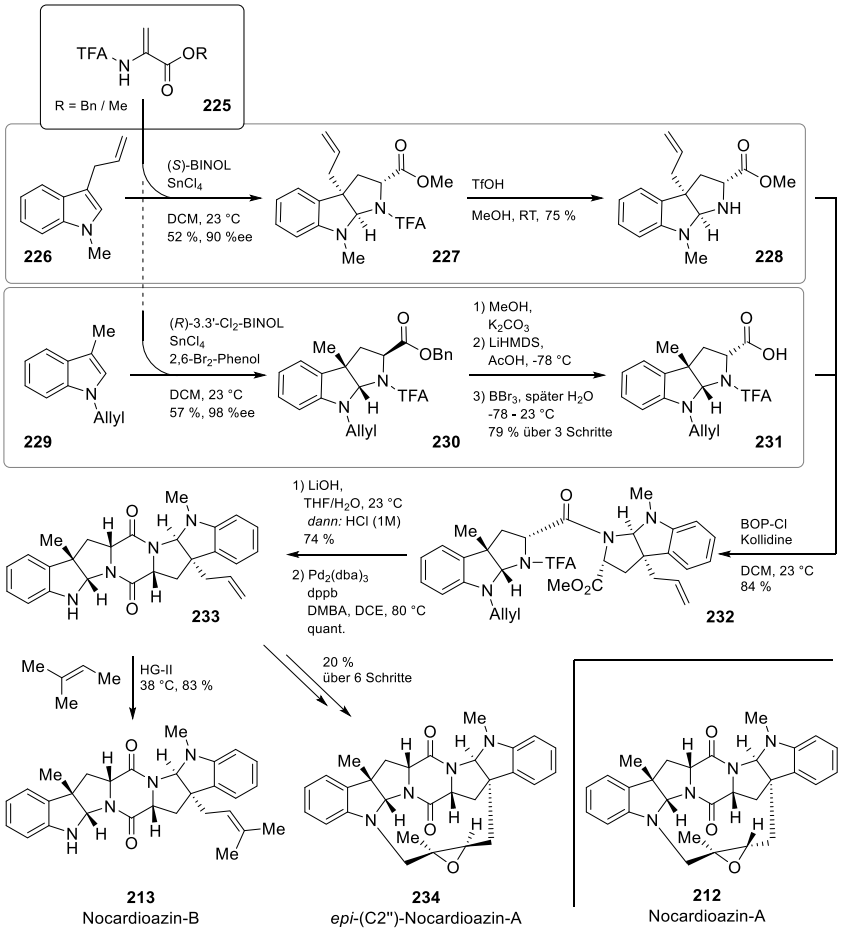
Die Synthese wurde anschließend fortgeführt, indem die 3-Prenylgruppe eingeführt wurde. Eine direkte Prenylierung mit Prenyltributylzinn scheiterte jedoch und es wurde vorrangig das revers-prenylierte Produkt erhalten. Daher wurde Verbindung **215** zunächst allyliert, ehe das endständige Alken **220** oxidativ zum Aldehyd gespalten und über eine Wittig-Reaktion mit Isopropylbromid in das entsprechende Prenyl-Produkt **221** überführt wurde.



Schema 40: Totalsynthese von (-)-Nocardioazin-B (***ent*-213**) entsprechend Ye *et al.*, wobei das Pyrroloindolmotiv über eine selektive Bromierung aufgebaut wird.[213]

Die Synthese der zweiten HHP-Domäne wurde simultan beim geschützten (*R*)-Tryptophan begonnen. Nach erfolgter Bromierung zum enantiomeren HHP ***ent*-215** wurde über eine regio- und stereoselektive Cyclopropanierung entsprechend Rainier *et al.* die Invertierung des α-Stereozentrums erreicht.[218] Hierzu wurde zunächst unter basischen Bedingungen das Bromid entfernt und das Azetoindolin **222** generiert, welches in der darauffolgenden Ringöffnung methyliert wird. Das erhaltene *endo*-konfigurierte Pyrroloindol wurde dann zur Säure **223** umgesetzt. Die Boc-PG der Prenylverbindung **221** wurden ebenfalls entfernt, um die Bildung der Peptidbindung zu ermöglichen (Verbindung **224**). In den letzten drei Schritten erfolgte unter Eschweiler-Clarke Bedingungen eine reduktive Aminierung, um den freien Stickstoff zu methylieren. Anschließend wurden die restlichen *tert*-Butoxycarbonylgruppen abgespalten und der Diketopiperazin-Ring geschlossen. Damit konnte in einer konvergenten Synthese mit einer längsten linearen Sequenz von 10 Stufen die Totalsynthese vervollständigt werden.

Eine ähnliche Synthesestrategie verfolgten auch Reisman *et al.* in ihrer Totalsynthese, welche nicht nur die Synthese von Nocardioazin-A (**212**) und Nocardioazin-B (**213**), sondern auch von Lansai-B (**29**) ermöglichte (Schema 41).[219] Dabei wurden gleichermaßen zunächst die Pyrroloindol-Ringe ausgehend von entsprechend funktionalisierten Indolen hergestellt. Unter Zugabe von Zinnchlorid und einem (*R*)- bzw. (*S*)-Binaphthol-Ligand wurden die 3-substituierten Indole für eine [3+2]-Cycloaddition mit 2-Aminoacrylat **225** eingesetzt und generierten damit in einem einzelnen Schritt die *exo*- und *endo*-konfigurierten Pyrroloindoline.[220]

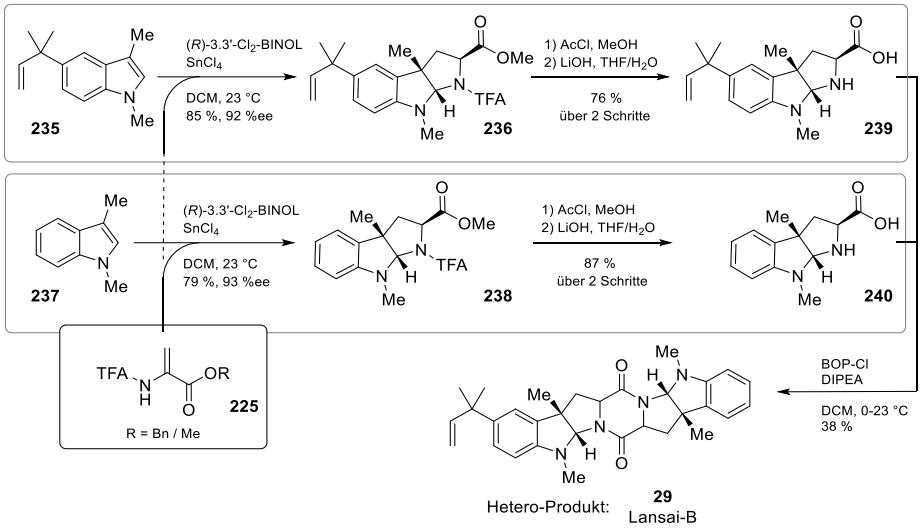


Schema 41: Totalsynthese der Naturstoffe Nocardioazin-B (**213**) und *epi*-(C2")-Nocardioazin-A (**234**) von Reisman *et al.* mittels Zinn-basiertem Aufbau des Pyrroloindolins.[219]

Anstelle der Prenylgruppe wurde auch hier zunächst ein Allyl-Rest in 3-Position verwendet (Indol **226**). Nach erfolgter Cycloaddition zum Pyrroloindol **227** und Abspaltung der TFA-Gruppe ist somit die *exo*-Molekülseite in weniger Schritten aufgebaut (Verbindung **228**). Die Vorbereitung der *endo*-konfigurierten Molekülhälfte beginnt beim 3-Methyl-*N*-allylindol (**229**), dessen *C2*-Stereozentrum nach erfolgter Cycloaddition zum Pyrroloindol **230** noch invertiert werden muss. Dazu erfolgt eine 3-schrittige Sequenz aus Umesterung zum Methylester, Epimerisierung mittels Lithiumhexamethyldisilazid und Spaltung des

Methylesters mit Bortribromid, um die Verbindung **231** zu erhalten. Die peptidische Verknüpfung der zwei Bausteine erfolgte hier mithilfe von Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinsäurechlorid (BOP-Cl) (Verbindung **232**). Anschließend wurde nach Entfernung der TFA-Gruppe der Diketopiperazinring aufgebaut und die *N*-ständige Allylgruppe entfernt. Ausgehend von der *C3*-Allyl-Verbindung **233** konnte sowohl über eine Metathese die *C3a*-ständige Prenylgruppe angefügt werden, um Nocardioazine-B (**213**) zu erhalten, als auch innerhalb von sechs weiteren Schritten *epi*-(*C2*'')-Nocardioazin-A (**234**) synthetisiert werden. Die Inversion des *C2*''-Stereozentrums konnte von diesem Punkt an nicht realisiert werden, um das natürlich vorkommende (+)-Nocardioazin-A (**212**) zugänglich zu machen. Letzteres wurde ebenfalls synthetisiert, jedoch wurde dazu zunächst die Epoxid-Brücke zwischen den zwei HHPI-Bausteinen aufgebaut, um die korrekte Orientierung der Stereozentren zu gewährleisten. Der Diketopiperazin-Ring wurde demnach erst im letzten Schritt erhalten.

Innerhalb derselben Publikation hat die Arbeitsgruppe von Reisman gleichermaßen auch eine Totalsynthese von Lansai-B (**29**) veröffentlicht (Schema 42).

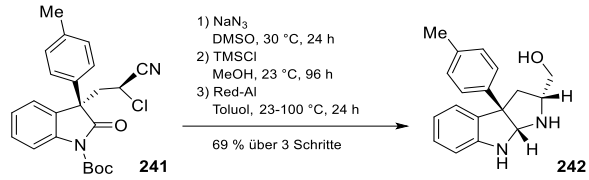


Schema 42: Totalsynthese des Naturstoffs Lansai-B (**29**) von Reisman *et al.* mittels Zinn-basiertem Aufbau des Pyrroloindolins.[219]

Die Synthese startet beim 5-Prenyl-3,*N*-dimethylindol **235**, welches ausgehend vom 5-Brom-3,*N*-dimethylindol über eine Suzuki-Kupplung erhalten wurde. Nach erfolgter [3+2]-Cycloaddition mit 2-Aminoacrylat **225** wurde so das *exo*-Pyrroloindolin **236** erhalten. Gleichermaßen wurde ausgehend von *3,N*-Dimethylindol **237** das Pyrroloindolin **238** synthetisiert. Der Versuch, wie bereits bei der Synthese von Nocardioazin-B (**213**), orthogonal geschützte Bausteine für die Peptidbindung einzusetzen, scheiterte jedoch. Offenbar ist das *exo*-Pyrroloindolin aufgrund der *N*-Substitution nicht ausreichend reaktiv für die Amidbildung und erweist sich unter den verwendeten Bedingungen zudem als instabil. Daher wurden beide Pyrroloindoline **236** und **238** von allen PGs befreit (Verbindungen **239** und **240**), wodurch der Naturstoff Lansai-B (**29**) unter Ausbeuteverlusten in einer unselektiven Kupplung erhalten werden konnte. Mit nur 38 % ist somit der letzte, konvergente Schritt dieser Synthese nicht sonderlich effizient, da mit 21 und 20 % ein beträchtlicher Anteil für die zwei Homo-Produkte

entfällt (zwei spiegelbildlich aufgebaute Diketopiperazine, entweder ohne Prenylgruppe oder mit einem Prenylrest je Seite).

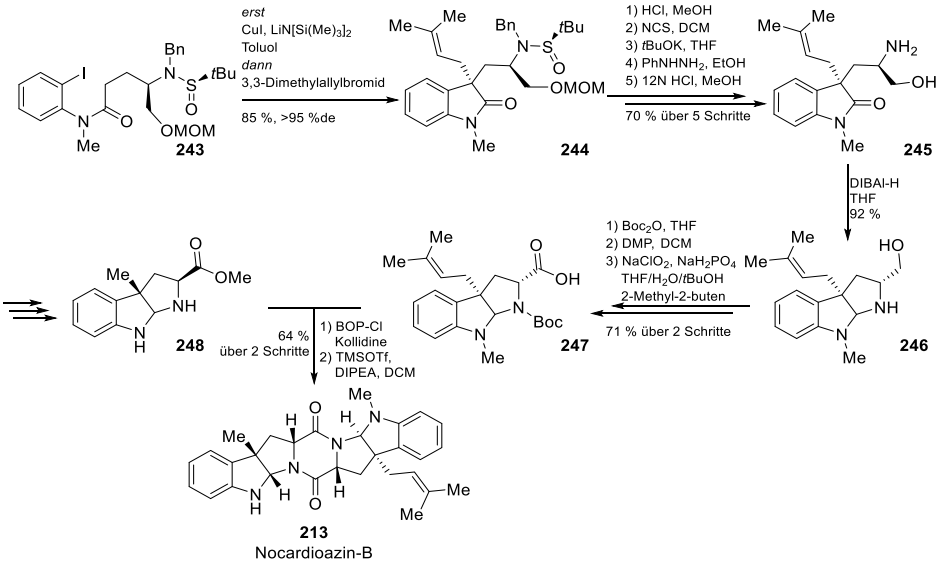
Eine andere Herangehensweise zum Aufbau der Pyrroloindolin-Ringe ist die Nutzung von 3,3-disubstituierten Oxoindolen, welches schon im Jahr 2010 von Cheng und Li gezeigt wurde (Schema 43).[220, 221]



Schema 43: Synthese von Pyrroloindolen ausgehend von 3,3-disubstituierten Oxindolen nach Cheng und Li.[221]

Dazu wird das Chlorid **241** durch eine nukleophile Substitution zum Azid umgesetzt und mithilfe von Trimethylsilylchlorid nachfolgend in einen Methylester überführt, wobei gleichzeitig die Boc-PG abgespalten wird. Im letzten Schritt der Sequenz wird in einer reduktiven Aminierung aus dem Oxindolazid das Pyrroloindol **242** aufgebaut.

In der (+)-Nocardioazin-Totalsynthese von Zhang *et al.* wurde auf ähnliche Weise der Pyrroloindol-Baustein erhalten (Schema 44).[222]

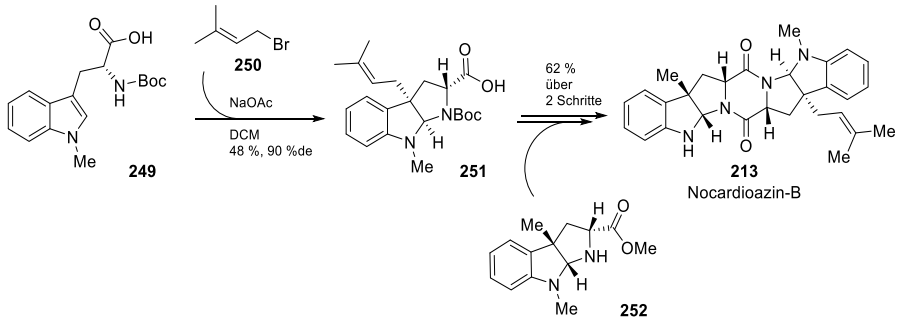


Schema 44: Totalsynthese von Nocardioazin-B (**213**) nach Zhang *et al.* über eine Kupfer-katalysierte sequenzielle Arylierung-Alkylierung ausgehend von σ-Haloaniliden.[222]

Das dazu benötigte Oxindol **244** wurde über den Schlüsselschritt einer Kupfer-katalysierten, sequenziellen Arylierung und Alkylierung von σ-Haloanilid **243** hergestellt. Das chirale Sulfinamid-Auxiliar verhilft diesem Schritt zu einer hohen Diastereoselektivität, vermutlich ausgelöst durch die Chelatisierung der zwei Carbonyl-Sauerstoffe. Die korrekte absolute Konfiguration konnte in dieser Publikation über eine Röntgenkristallstruktur nachgewiesen werden. Im Anschluss daran wurden sowohl das Auxiliar sowie der Methoxymethylether- und der Benzyl-Rest in mehreren Schritten entfernt, um Oxindol **245** zu erhalten. Durch eine

reduktive Aminierung wird dann der Pyrroloindolring geschlossen, wobei das zweite Stereozentrum aufgebaut wird. Aus sterischen Gründen kann der nukleophile Angriff des Stickstoffs jedoch nur so erfolgen, dass eine *trans*-Orientierung zum Prenylrest im Produkt **246** vorliegt (und der gebildete Fünfring mit beiden Resten *cis*-ständig am Indol verbleibt). Nachdem anschließend eine Boc-PG am Hydropyrrol-Stickstoff angefügt wurde, konnte die Methylolgruppe in 2-Position über eine Dess-Martin- sowie eine Pinnick-Oxidation stufenweise zur Carbonsäure (Verbindung **247**) oxidiert werden. Simultan wurde das orthogonal geschützte Amin **248** synthetisiert und innerhalb von zwei Schritten wurde dann der Diketopiperazin-Ring aufgebaut, um Nocardioazine-B (**213**) zu erhalten.

Die Totalsynthese von Naturstoffen wie Lansai-B (**29**) oder den Nocardioazinen ist demnach mit chemischen Methoden durchaus möglich. Jedoch bedingt der Aufbau der quaternären Kohlenstoffe ein besonderes Maß an Hinwendung, um die korrekte Konfiguration zu erhalten. Die dazu benötigten chemischen Transformationen erfordern bestimmte funktionelle Gruppen, was die Anzahl benötigter Schritte in der Synthese deutlich erhöht. 2022 wurde von Viswanathan *et al.* ein biomimetischer Ansatz gezeigt, bei dem die enzymatische Prenylierung als Vorlage zur Identifizierung von möglichen Reaktionsbedingungen dient.[223]



Schema 45: Biomimetische Totalsynthese von Nocardioazin-B nach Viswanathan *et al.* mit der *C3*-Prenylierung als Schlüsselschritt.[223]

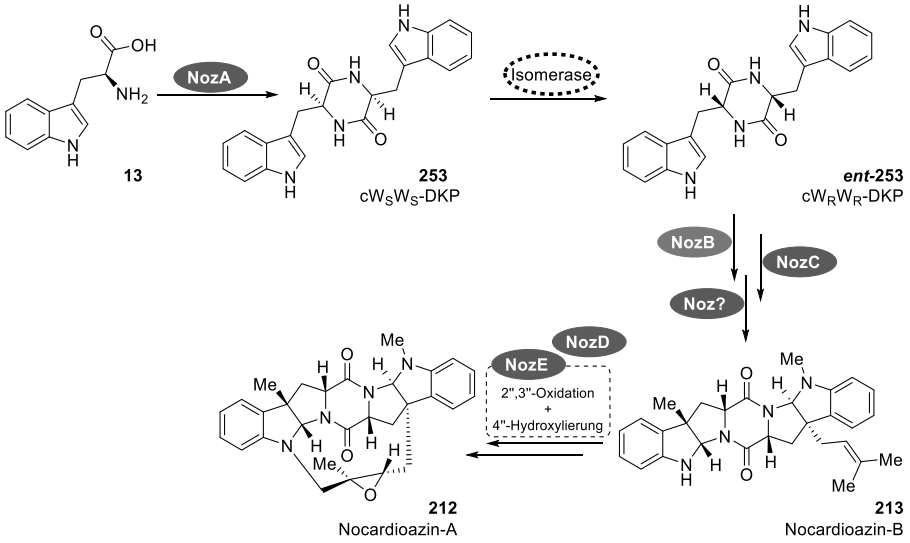
Das Prenylbromid **250** wurde dazu unter leicht basischen Bedingungen mit dem (*R*)-*N*-Methyl-N_α-Boc-Tryptophan (**249**) zur Reaktion gebracht, um das prenylierte Pyrroloindol **251** zu erhalten. Dabei wurde eine Diastereoselektivität von 19:1 beobachtet, welche mit der Koordinierung des Prenylkations durch den Sauerstoff der Carbonsäure in einem möglichen Übergangszustand begründet wurde. Gleichzeitig wurde das Bromid vom vorliegenden Natriumkation abgefangen, um den Abgang des Broms vom Prenylrest zu ermöglichen. In vielen weiteren Ansätzen, bei denen nicht die freie Carbonsäure, sondern der entsprechende Tryptophanmethylester eingesetzt wurde, konnte keine Selektivität unter Einsatz vieler verschiedener Brønstedsäuren gefunden werden.[224] In zwei weiteren Schritten konnte das so erhaltene Pyrrolodindolin **251** dann zum Nocardioazin-B (**213**) umgesetzt werden. Die dazu benötigte zweite HHP-Domäne (Verbindung **252**) konnte allerdings nicht biomimetisch erhalten werden, sondern wurde gemäß der Synthese von Rainier *et al.* hergestellt (Schema 40).[218] Die Synthese ist mit sieben linearen Schritten (davon mit fünf Schritten für die Synthese des HHP-Amines **252**) kürzer als die bisherigen Totalsynthesen, bedient sich jedoch derselben Methoden, um das methylierte *endo*-Pyrroloindol **252** zu erhalten. Wenngleich die Schlüsselreaktion in organischem, halogeniertem Lösungsmittel stattfindet und damit von aquatischen/biologischen Bedingungen noch weit entfernt ist, so

verkürzt der biomimetische Ansatz die Synthese um zahlreiche Schritte und befürwortet damit den Einsatz biologischer Verfahren zur Gewinnung des Naturstoffs.

5.1.3. Biosynthese

Die *C3*-methylierten Pyrroloindol-Diketopiperazine wurden aus verschiedenen Organismen isoliert, jedoch wurde die Biosynthese der Molekül-Familie bisher nicht vollständig erforscht.[225] Wie auch beim Physostigmin (**28**) vermutet man eine Methyltransferase in der Biosynthese des Pyrrolodinol-Motivs und eine Cyclodipeptid-Synthase für die Bildung des Diketopiperazinrings.

2015 konnten Viswanathan *et al.* einen Gencluster identifizieren, welcher mehrere relevante Enzyme enthielt, darunter eine Cyclodipeptid-Synthase (NozA), eine Prenyltransferase (NozC), eine Methyltransferase (NozB) und zwei Cytochrome P450 (NozD und NozE) (Schema 46).[226] Nach heterologer Expression dieses Genclusters ist jedoch hauptsächlich das zyklische (*S*)-Tryptophan-(*S*)-Tryptophan-Dipeptid **253** per LC-MS detektiert worden. Somit dient dieses Intermediat als Ausgangsstoff in der Biosynthese der Nocardioazine. Dies wäre im Einklang mit dem Fakt, dass zahlreiche Cyclodipeptid-Synthasen (wie auch NozA) als Substrat Aminoacyl-tRNAs des Primärmetabolismus verwenden, wodurch ausschließlich L-Aminosäuren (hier (*S*)-Tryptophan **13**) eingebracht werden. Allerdings müsste somit zu einem späteren Zeitpunkt eine noch nicht identifizierte Isomerase agieren, um das Diketopiperazin ***ent*-253** zu generieren und damit die korrekte Konfiguration der Nocardioazine bereitzustellen.[226]

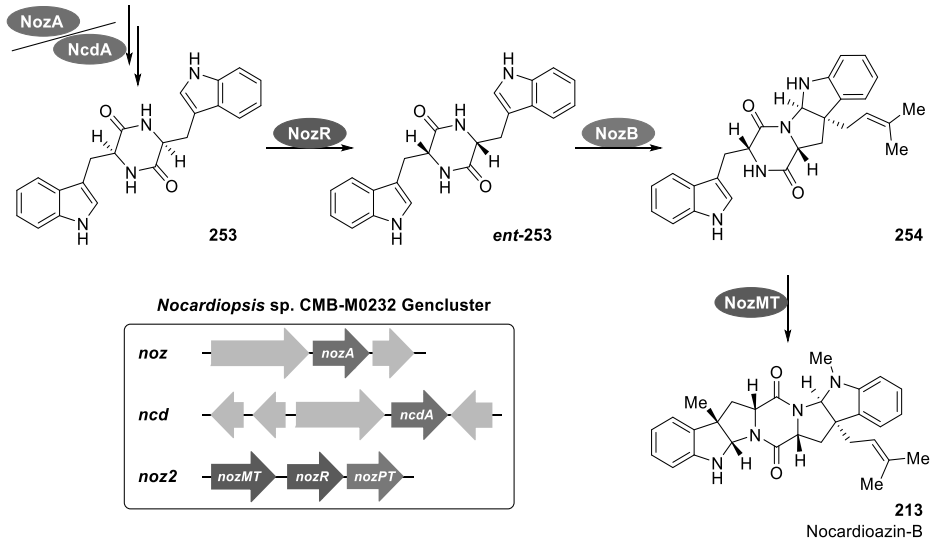


Schema 46: Vermutete Biosynthese von Nocardioazin-A und -B (**212** und **213**) nach Viswanathan *et al.* katalysiert durch den *noz*-Gencluster.[226]

In der Publikation konnte leider nicht eindeutig belegt werden, in welcher Reihenfolge die nachgeschalteten Enzyme zum Einsatz kommen. Aus HPLC und LC-MS Analysen der Kultivierung von *Nocardiopsis* sp. CMD-M0232 wurden jedoch verschiedene *in vivo* Intermediate detektiert, welche vermuten lassen, dass zunächst die *C3*-Methyltransferase agiert und im Nachgang die Prenyltransferase sowie eine nicht identifizierte

N-Methyltransferase (Noz?). Über die Cytochrome NozD und NozE wäre dann noch die Umsetzung von Nocardioazin-B (**213**) zu Nocardioazin-A (**212**) möglich.

In späteren Publikationen konnten diese Ungereimtheiten jedoch aufgelöst werden. Es wurde festgestellt, dass die betreffenden Enzyme nicht in einem einzelnen Gencluster enthalten sind. So befinden sich die Genabschnitte der zwei Cyclopeptidsynthasen *nozA* und *ncdA* an einem anderen Locus, während die Methyltransferase *nozMT* und die Prenyltransferase *nozPT* sowie die Isomerase *nozR* im *noz*-Gencluster enthalten sind (Schema 47).[227, 228]

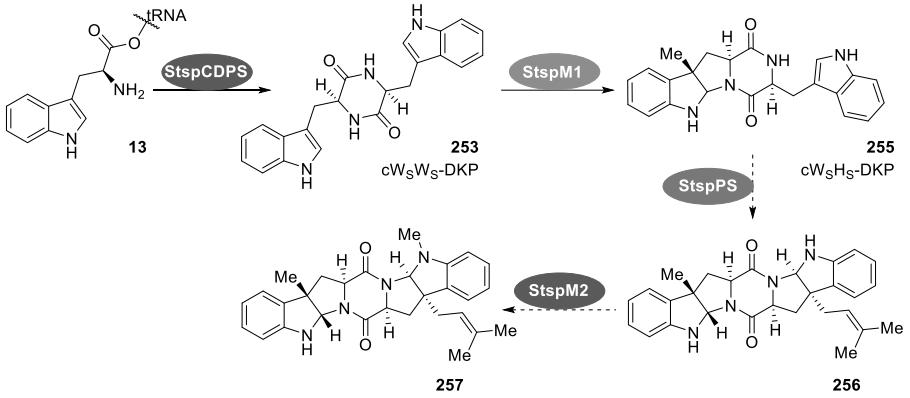


Schema 47: Biosynthese von Nocardioazin-B (**213**) nach Viswanathan und Lane, wobei die verschiedenen Cyclopeptidsynthasen an verschiedenen Loci codiert sind.[227, 228]

Die entsprechenden Enzyme sind zudem heterolog exprimiert worden, womit belegt wurde, dass die Isomerase NozR noch vor der Prenyltransferase und Methyltransferase agiert. Durch *docking*-Studien wurde zudem gezeigt, dass die Methyltransferase NozMT eine deutlich höhere Bindungsaffinität zum prenylierten DKP **254** als zum unzyklisierten DKP ***ent*-253** besitzt. Dadurch konnten die entsprechenden Enzyme eindeutig der Biosynthese der Nocardioazine zugeschrieben werden. Da die Methyltransferase *nozMT* somit erst nach Invertierung des Stereozentrums das (*R*)-konfigurierte Tryptophan-Dipeptid ***ent*-253** umsetzt, schließt dieses Ergebnis jedoch den Zugang von Lansai-B (**29**) über diese Enzyme aus.[228]

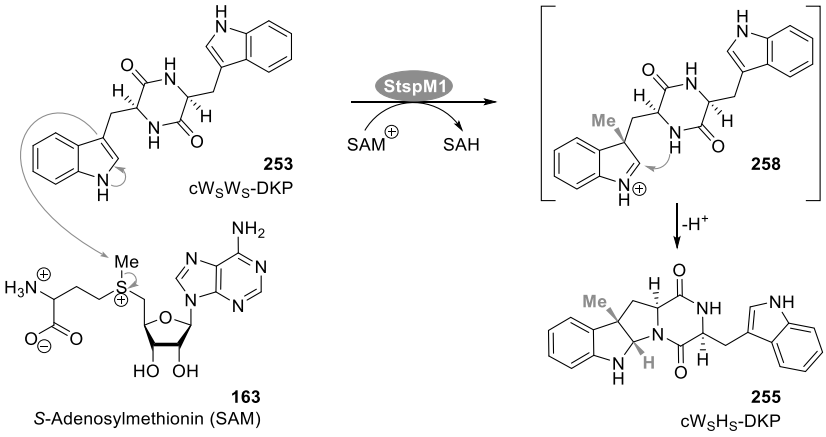
Nachdem einige weitere Cyclodipeptidsynthasen (CDPS) gefunden wurden, welche ebenfalls aus tRNA-gebundenen Tryptophanen entsprechende Diketopiperazine formten, konnte 2019 von Zhu *et al.* noch ein ähnlicher Gencluster beschrieben werden, welcher eine strukturell ähnliche CDPS enthält (Schema 48).[58, 229] In dem Genom von *Streptomyces* sp. HPH0547 wurden zwei weitere hypothetische Methyltransferasen (StspM1 und StspM2), eine Cyclodipeptid-Synthase (StspCDPS) und eine Prenyltransferase (StspPS) identifiziert. Der daraus abgeleitete Biosyntheseweg verläuft ausgehend vom (*S,S*)-konfigurierten Tryptophan-Tryptophan-Dipeptid-DKP (cW_SW_S-DKP) **253** über das einseitig-methylierte Diketopiperazin (cW_SH_S-DKP) **255.** Der Zusammenhang mit den weiteren beschriebenen Enzymen (StspPS und StspM2 – Schema 48) sowie die Relation zum Nocardioazin-B (**213**) konnte in dieser

Publikation nicht geklärt werden. Insbesondere die Tatsache, dass das cW_SW_S-DKP von der Methyltransferase umgesetzt wird, widerspricht zu einem gewissen Teil der vorgeschlagenen Biosynthese von Noacardioazine-B nach Viswanathan (Schema 47).[226] Zwar wurde auch dort das cW_SW_S-DKP **253** als Intermediat in der Biosynthese detektiert, jedoch wurde vermutet, dass die Verbindung zunächst zum cW_RW_R-DKP ***ent*-253** isomerisiert wird.



Schema 48: Vermutete Biosynthese des Nocardioazin-B-ähnlichen Isomers **257** nach Zhu *et al.* katalysiert durch den *Stsp*-Gencluster.[58]

Zur genauen Untersuchung wurden die Enzyme anschließend heterolog exprimiert. Dabei konnte jedoch nur die Methyltransferase StspM1 erfolgreich erhalten werden, während die weiteren Enzyme nur unlöslich und daher inaktiv produziert wurden. Für die isolierte Methyltransferase konnte dann im Zusammenhang mit dem (*S*)-Tryptophan-(*S*)-Tryptophan-Dipeptid **253** eine Aktivität gemessen werden und es konnte in präparativem Maßstab das vermutete *C3*-methylierte Hexahydropyrrol **255** isoliert werden (Schema 49).

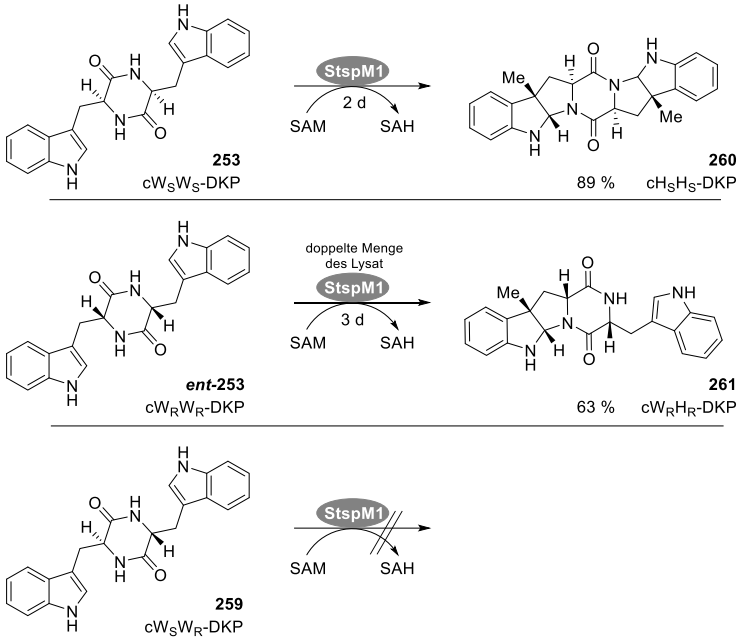


Schema 49: Katalysierte Reaktion der Methyltransferase StspM1 beschrieben von Zhu *et al.*[58]

Anhand dieser Ergebnisse konnte belegt werden, dass die Methylierung zum Ringschluss des DKP **253** führt, und es wurde ein Mannich-Typ-Reaktionsmechanismus vorgeschlagen. Demnach entspringt die hinzugefügte Methylgruppe dem natürlichen Cosubstrat SAM (**163**) welches die Reaktion als SAH (**164**) verlässt. Das Iminium-Ion **258** wird vom benachbarten

DKP-Stickstoff nukleophil angegriffen und unter Abspaltung eines Protons der Pyrroloindolin-Ring geformt.

Die beschriebene Methyltransferase StspM1 wurde deshalb von M. Haase (AG Pietruszka) tiefgreifender untersucht. Dazu wurden alle drei möglichen Tryptophan-Dipeptid-Diketopiperazine **253**, ***ent*-253** und **259** synthetisiert und der Methyltransferase zugesetzt (Schema 50).[230]



Schema 50: Von der Methyltransferase StspM1 katalysierte Reaktionen in Abhängigkeit vom eingesetzten DKP **253**, ***ent*-253** oder **259** nach M. Haase.[230] Die Methyltransferase wurde für die präparativen Ansätze (50 mg) auf Ni-NTA Agarose Beads immobilisiert.

Die Aktivität der Methyltransferase zeigte in diesem Zusammenhang eine starke Abhängigkeit vom eingesetzten DKP. So wird das cW_SW_S-DKP **253** nicht nur einfach, sondern auf beiden Molekülseiten in *C3*-Position des Indols sukzessive methyliert (Verbindung **260** – cH_SH_S-DKP), während das enantiomere cW_RW_R-DKP ***ent*-253** nur einseitig methyliert wird (Verbindung **261** – cW_RH_R-DKP). Interessanterweise wurde das cW_SW_R-DKP **259** als Substrat nicht akzeptiert. Dieses Ergebnis konnte von *docking* Studien in der zugehörigen Publikation gestützt werden. Da der Einsatz von Lysat einerseits die Stabilität des Enzyms bei verlängerten Reaktionszeiten senkte und andererseits zu starken Ausbeuteeinbußen bei der Produktextraktion führte, wurde das Enzym auf Nickel-Nitrilotriessigsäure-*Beads* immobilisiert. Unter diesen optimierten Reaktionsbedingungen konnte in präparativen Ansätzen eine isolierte Ausbeute von 89 % für Verbindung **260** erzielt werden. In Anbetracht der Tatsache, dass die doppelte Menge des Enzyms benötigt wurde, um 61 % des cW_RW_R-DKP ***ent*-253** zum einfach methylierten Produkt **261** umzusetzen, hat das Enzym somit eine deutlich höhere Affinität zur beidseitig (*S*)-konfigurierten Verbindung **253**.

Weiterhin konnten durch *molecular dynamic* (MD)-Berechnungen mehrere Tyrosin-Seitenketten (Y^{12}, Y^{19}, Y^{127} und Y^{223}) des Enzyms identifiziert werden, dessen direkte Nähe zum

(Co-)Substrat durch polare Interaktionen und/oder durch π-*Stacking* eine Stabilisierung indiziert. Diese Hypothese konnte durch den Austausch von Y^{127} durch Alanin oder Phenylalanin gestützt werden, da dies zum Aktivitätsverlust des Enzyms führte. In unmittelbarer Nähe von Y^{127} und Y^{223} befinden sich zudem ein Histidin (H^{221}) und Aspartat (D^{219}). Somit wurde für die Methyltransferase ein ähnlicher Wirkmechanismus wie auch für PsmD (Kapitel 4.1.4 – Schema 28) vermutet, wobei das (durch die Interaktion mit Histidin und Aspartat) deprotonierte Tyrosin das Substrat über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Stickstoff des reaktiven Indols aktiviert. Diese Vermutungen stützen sich jedoch nicht auf eine Kristallstruktur des Enzyms, sondern auf eine modellierte Protein-3D-Struktur. Wenngleich das Modell einen hohen *plDDT-score* von über 70 aufweist, so können dennoch, insbesondere für die Seitenketten der Aminosäuren, kleine Ungenauigkeiten in der Struktur-Berechnung auftreten.

Von M. Haase wurde daher die weitere Methyltransferase SgMT untersucht, welche mit 46 % und 80 % eine hohe Sequenzübereinstimmung mit den Methyltransferasen NozMT und StspM1 aufweist.[231] Damit ist die Methyltransferase aus *Streptomyces griseoviridis* (SgMT) imstande, ein vergleichbares Substratspektrum umzusetzen wie auch StspM1. Die höchste Enzymaktivität wurde ebenfalls für das cW_SW_S-DKP **253** gemessen, wobei auch in diesem Fall das (*S,R*)-Diastereomer **259** nicht umgesetzt werden konnte (siehe Schema 50). Zwischen den beiden Enzymen konnten geringe Unterschiede bezüglich der katalytischen Parameter identifiziert werden, wobei SgMT mit einer geringfügig reduzierten Wechselzahl von 0.0025 s^{-1} gegenüber 0.0036 s^{-1} (StspM1) unterliegt. Da allerdings das Expressionslevel von SgMT etwa 25-fach höher ist als für StspM1, eignet sich diese Methyltransferase in besonderem Maße für präparative Anwendungen. In ersten Experimenten konnte somit ebenfalls eine isolierte Ausbeute von 89 % bei der Umsetzung des cW_SW_S-DKP **253** erhalten werden. Außerdem konnte für SgMT eine Kristallstruktur ermittelt werden (PDB: 9GDJ). In Kombination mit weiteren MD-Simulationen konnten auf diese Weise weitere Erkenntnisse über das katalytische Zentrum sowie die Substratbindung gewonnen werden. Durch einen anschließenden Alanin- und Phenylalaninscan, bei dem verschiedene Enzymmutanten produziert wurden, wobei an bestimmten Positionen die native Aminosäure durch ein (Phenyl-)Alanin substituiert ist, konnten kritische Aminosäure-Reste gefunden werden, welche somit den Katalyseprozess beeinflussen (Abbildung 53).

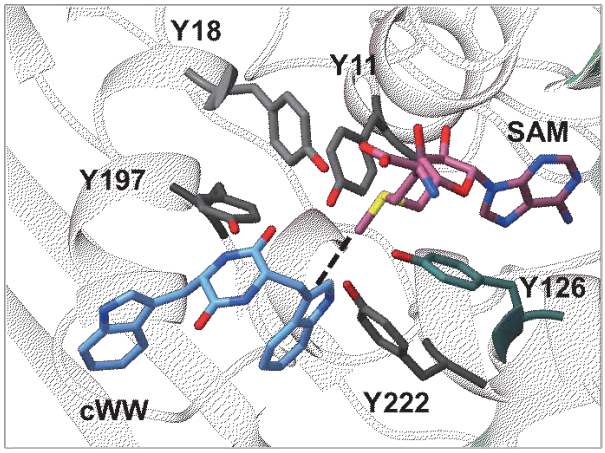


Abbildung 53: Darstellung der Methyltransferase SgMT (PDB: 9GDJ) (weiß) mit DKP-Substrat (blau) und Cosubstrat (pink) sowie charakteristischen Tyrosin-Resten (grau), wobei lediglich das Y^{126} direkt an der Substratumsetzung beteiligt ist. Die Struktur beruht auf einer Kristallstruktur und MD-Simulationen.[231]

Mit Hinblick auf die kritischen Aminosäuren in SgMT konnte festgestellt werden, dass Y^{222} (äquivalent zu Y^{223} in StspM1) zwar eine wichtige Rolle spielt, um das benachbarte Y^{126} (äquivalent zu Y^{127} in StspM1) in seine optimale Orientierung zu bringen, jedoch nicht direkt an der Katalyse beteiligt ist. Dies wurde durch eine verbleibende Enzymaktivität der Mutante Y222F begründet. Im Gegensatz dazu konnte für die Y222A-Mutante keine Aktivität mehr gemessen werden, womit die Notwendigkeit einer aromatischen Aminosäure bestätigt wird. Über *constant pH MD* Simulationen wurde weiterhin festgestellt, dass (im Vergleich zum Wildtyp) in der Y222F-Mutante die Deprotonierungsrate von Y^{126} reduziert ist. Somit scheint der Aminosäurerest Y^{222} jedoch indirekt den Katalysemechanismus zu beeinflussen. Die katalytische Triade (ähnlich dem Mechanismus für PsmD, beschrieben in Kapitel 4.1.4 – Schema 28) besteht somit aus Y^{126}, H^{220} und D^{218} (Abbildung 54).

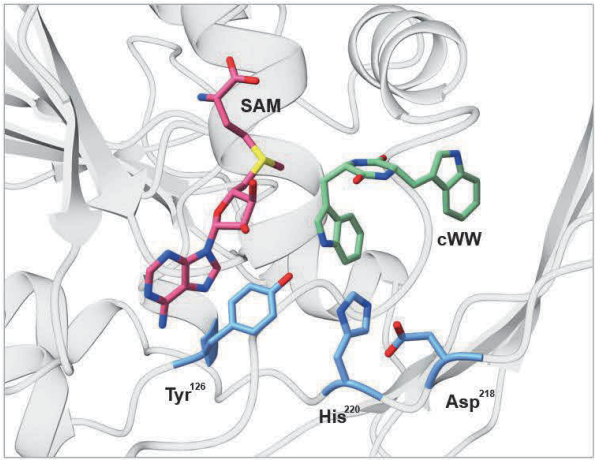


Abbildung 54: Darstellung der Methyltransferase SgMT (PDB: 9GDJ) (weiß) mit DKP-Substrat (grün), SAM-Cosubstrat (pink) sowie der katalytischen Triade, bestehend aus Y^{126}, H^{220} und D^{218} (blau). Die Struktur beruht auf einer Kristallstruktur und MD-Simulationen.[231]

5.2. Spezielle Zielsetzung

Der Naturstoff Lansai-B (**29**) enthält, wie auch die Nocardioazine oder andere Vertreter der Molekül-Familie, ein ausgesprochen komplexes Molekülgerüst. Das HHP-Strukturmotiv enthält nicht nur zwei stereogene Zentren (pro Seite), sondern die beiden HHP-Domänen sind zudem über einen zentralen, annellierten Diketopiperazinring miteinander verbunden. Die dadurch äußerst starre Molekülstruktur ist somit schwer selektiv synthetisierbar und daher wurden die entsprechenden Verbindungen bisher nur in wenigen Publikationen untersucht. Sowohl die Nocardioazin-Verbindungen **212** und **213**, als auch Lansai-B (**29**), weisen interessante biologische Eigenschaften in der Anwendung gegen Tumorzelllinien auf.

In bisherigen Untersuchungen konnten verschiedene Enzyme, insbesondere Methyltransferasen, gefunden werden, welche über die *C3*-Methylierung von Indolen den Aufbau des HHP-Ringsystems ermöglichen. Die dabei beobachtete Selektivität der Methylierung und folglich auch des Ringschlusses ist mit chemischen Methoden in diesem Maße nicht vergleichbar. Während die Biosynthese der Nocardioazine **212** und **213** in folgenden Publikationen mit weiteren Erkenntnissen beleuchtet wurde, blieb die Biosynthese von Lansai-B (**29**) weiterhin unerforscht. Zwar wurden aufschlussreiche Informationen über die Methyltransferasen (StspM1 und SgMT) geliefert, allerdings blieb die Verknüpfung des enzymatischen Schritts mit den weiteren notwendigen Transformationen, wie der 5-Prenylierung und der *N*-Methylierung, bisweilen ungeklärt.

Die Methyltransferase soll daher innerhalb dieses Projekts in einer chemoenzymatischen Totalsynthese zum (-)-Lansai-B (**29**) angewendet werden. Dadurch kann eine neue, biomimetische Syntheseroute etabliert werden, welche weitere Intermediate hervorbringt und somit auch neue Einblicke in die Biosynthese des Naturstoffs gibt. Außerdem ermöglicht eine neue Syntheseroute die Produktion verschiedener Derivate, sowohl des Naturstoffs als auch seiner Vorstufen, womit ein breites Spektrum neuer Verbindungen erhalten wird (Abbildung 55). Die potenziell veränderte biologische Aktivität dieser Moleküle kann in Zusammenarbeit mit weiteren Kooperationspartnern ebenfalls untersucht werden.

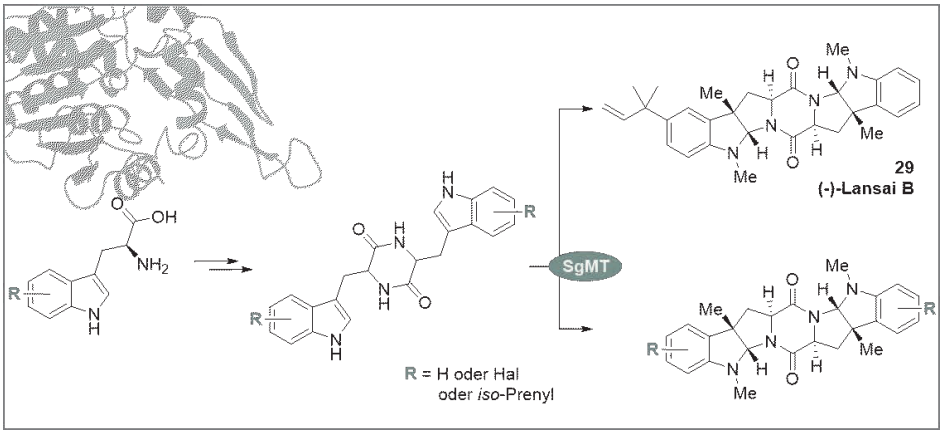


Abbildung 55: Schematische Darstellung der anvisierten neuen Synthese von Lansai-B (**29**) unter Anwendung der *C3*-Methyltransferase SgMT, ausgehend von Tryptophan.

In diesem Zusammenhang soll zunächst das Substratspektrum der Methyltransferase untersucht werden. Da noch nicht bekannt ist, ob die *C3*-Methyltransferase vor oder nach der

5-Prenylierung sowie der *N*-Methylierung wirkt, werden zunächst verschiedene Tryptophan-Tryptophan-Diketopiperazin-Dipeptide (cW_SW_S-DKP) synthetisiert, um das bevorzugte Substrat der *C3*-Methyltransferase zu identifizieren. Die dafür benötigte Prenylgruppe kann über eine Kreuzkupplung eingeführt werden, weswegen 5-halogenierte cW_SW_S-DKPs als Schlüsselverbindung hergestellt werden sollen. Darüber hinaus werden Bedingungen für die *N*-Methylierung benötigt, um die Synthese zum Naturstoff nach erfolgreicher *C3*-Methylierung abzuschließen. Nach der Etablierung einer Syntheseroute soll zusätzlich abgeschätzt werden, inwiefern auch Derivate des Naturstoffs **29** zugänglich gemacht werden können. Aufgrund der spezifischen Interaktion zwischen dem Substrat und dem Enzym könnte die Derivatisierung des Substrats zu einer verringerten Enzymaktivität führen und somit einen Engpass darstellen. Eine Optimierung des Enzyms und der dazugehörigen Reaktionsbedingungen soll daher ebenfalls in Betracht gezogen werden.

5.3. Ergebnisse und Diskussion

Das folgende Kapitel enthält Ergebnisse, die in Kooperation mit M. Haase und der AG Teusch generiert wurden. Insbesondere die biologischen Arbeiten bezüglich der Methyltransferase wurden von M. Haase durchgeführt, darunter fällen die Expression des Enzyms, die Optimierung der Reaktionsbedingungen, die Durchführung des Glo-Assays sowie das Ansetzen der Enzym-Reaktionen. Die biologischen Testungen der hergestellten Verbindungen wurden von der AG Teusch durchgeführt.

5.3.1. Retrosynthetische Herangehensweise

In bisherigen Publikationen konnte gezeigt werden, dass die aus zwei Tryptophan-Einheiten aufgebaute Diketopiperazine von der *C3*-Methyltransferase StspM1/SgMT umgesetzt werden können, wobei die Konfiguration der zwei Aminosäuren entscheidend ist.[230, 231] Die Reaktion ermöglicht neben der Methylierung gleichzeitig den Ringschluss von Indol und dem benachbarten Amid-Stickstoff, wodurch ein HHP mit annelliertem DKP-Ring gebildet wird. Während das (*S,S*)-konfigurierte DKP **253** an beiden Indolringen methyliert und somit zyklisiert wird, konnte für das (*R,R*)-konfigurierte DKP ***ent*-253** nur eine einfache Umsetzung beobachtet werden (Kapitel 5.1.3 – Schema 50). Für die (*S,R*)-konfigurierte Verbindunge **259** konnte hingegen kein Reaktionsprodukt erhalten werden. Damit scheint das Enzym eine hohe Substratspezifität aufzuweisen und eignet sich daher auch für eine selektive Synthese des doppelt methylierten (-)-Lansai-B (**29**), dessen C_α-Stereozentren ebenfalls (*S,S*)-konfiguriert sind. In der Biosynthese des Naturstoffs spielen jedoch noch weitere Enzyme eine wichtige Rolle, wie z. B. die Prenyltransferase und die *N*-Methyltransferase. In welcher Reihenfolge diese Enzyme agieren, konnte bisher nicht bewiesen werden. Zwar konnte schon gezeigt werden, dass cW_SW_S-DKP **253** als Substrat für die *C3*-Methyltransferase gut geeignet ist, jedoch könnte nach erfolgter 5-Prenylierung und/oder *N*-Methylierung die Substrataffinität noch höher sein und damit die Effizienz des chemoenzymatischen Schrittes in der Totalsynthese gesteigert werden.

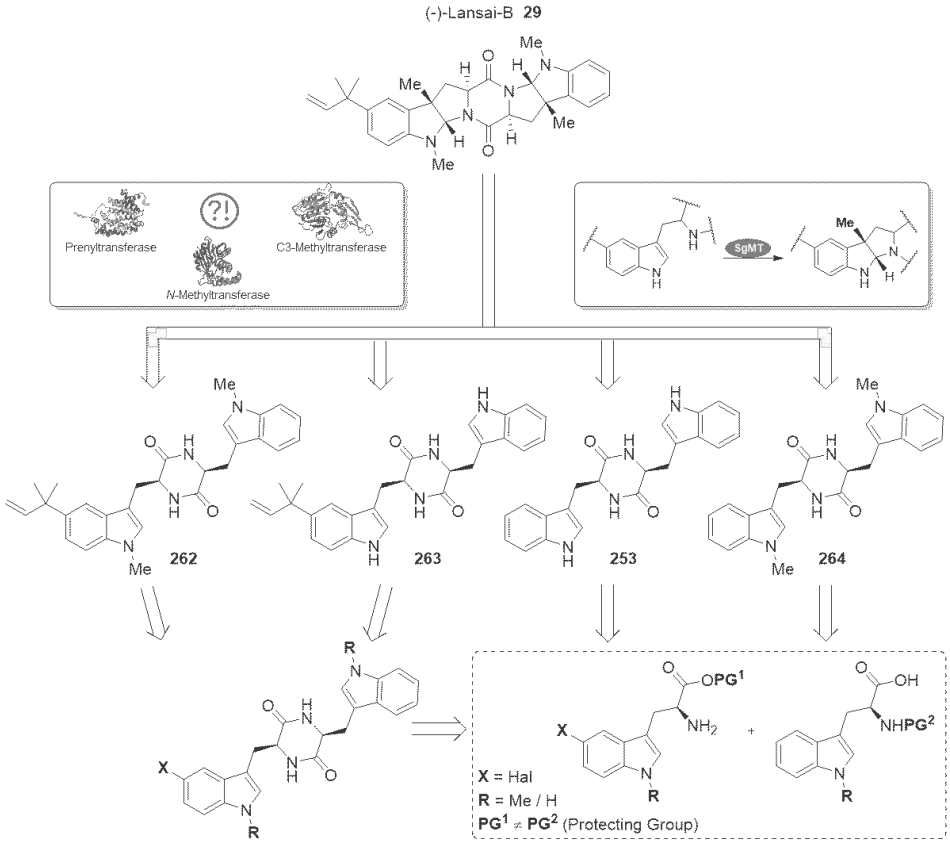


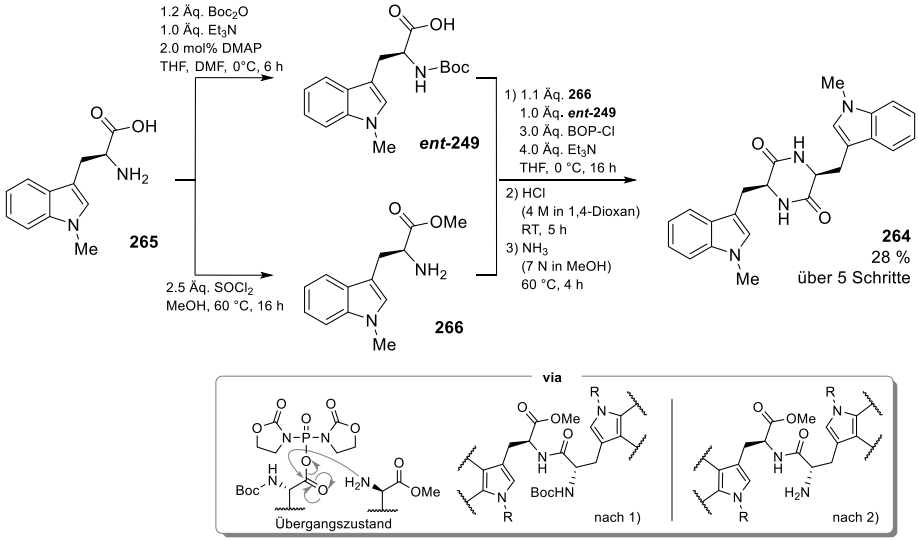
Abbildung 56: Schematische Darstellung der retrosynthetischen Herangehensweise an die neue Totalsynthese mithilfe der *C3*-Methyltransferase SgMT und des enzymatischen Schlüsselschritts (Box oben rechts). Da aus der Biosynthese nicht bekannt ist, in welcher Reihenfolge die vermuteten Enzyme (Box oben links) agieren, ergeben sich drei mögliche Diketopiperazine als Substrat für die Methyltransferase. Die entsprechenden Verbindungen sollen aus der Kopplung der zwei orthogonal-geschützten Aminosäuren hervorgehen.

Aus diesem Grund wurden in der retrosynthetischen Betrachtung mehrere Diketopiperazine (**253** sowie **262-264**) als wichtige Intermediate erachtet, welche sich lediglich durch die Anwesenheit der 5-Prenylgruppe oder der zwei *N*-Methylgruppen unterscheiden (Abbildung 56). Diese Verbindungen sollten daher zunächst hergestellt werden, um zwischen den verschiedenen Synthesepfaden differenzieren zu können. Die Prenylgruppe soll dazu mithilfe einer Suzuki-Kreuzkupplung eingeführt werden, weshalb die prenylierten DKP **262** und **263** auf eine halogenierte Vorstufe zurückgeführt werden können. Letztere sowie auch die Diketopiperazine **253** und **264** sollten aus der Kopplung von zwei entsprechend substituierten Tryptophanen hervorgehen. Um dabei die Bildung von Polymeren zu unterdrücken und ausschließlich das gewünschte Dipeptid zu erhalten, sollten die zwei verwendeten Aminosäuren zuvor orthogonal geschützt werden. Da eine breite Masse an substituierten sowie N_α- bzw. *O*-geschützten Tryptophanen kommerziell erhältlich ist, wurden diese Verbindungen als geeignete Startmaterialien angesehen.

5.3.2. Untersuchung des Substratspektrums der *C3*-Methyltransferase

5.3.2.1. Synthese der Diketopiperazine-Substrate

Da sich die *O*-Methyl sowie die N_α-Boc-PG schon bei der Synthese von 7-funktionalisiertem Tryptophan bewährt haben (Kapitel 3.3.2), wurden diese auch an dieser Stelle verwendet. Das unsubstituierte (*S*)-Tryptophan konnte mit jeweils einer der beiden PGs kommerziell erworben werden, während für die 5-halogenierten und *N*-methylierten Tryptophane lediglich ungeschützte Verbindungen erhältlich sind.

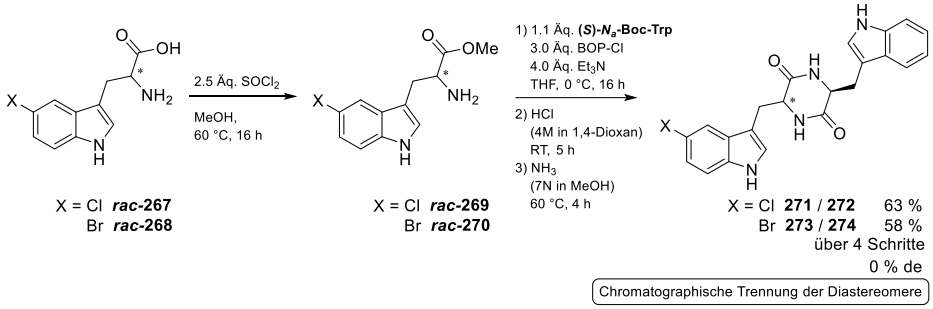


Schema 51: Synthese von *N*-Methyl-DKP **264** ausgehend von (*S*)-*N*-Methyltryptophan **265** über eine Veresterung, Boc-Schützung, Peptidknüpfung und anschließende Entschützung der verwendeten PGs.

So wurde das (*S*)-*N*-Methyltryptophan (**265**) einerseits unter Verwendung von Thionylchlorid zum entsprechenden Ester **266** umgesetzt und andererseits durch Zugabe von Di-*tert*-butyldicarbonat unter basischen Bedingungen mit einer Boc-Gruppe versehen (Carbamat ***ent*-249**) (Schema 51). Mithilfe von BOP-Cl wurden die zwei Tryptophan-Einheiten zum Dipeptid umgesetzt, wobei das BOP-Cl unter Abspaltung von Chlorid zunächst von der freien Säuregruppe angegriffen wird. Das Phosphorsäureanhydrid (Schema 51 – Übergangszustand) stellt eine gute Abgangsgruppe dar und kann damit in einem S_N2t-Angriff vom freien Amin des zweiten Tryptophans substituiert werden. Das erhaltene Dipeptid wurde dann von den zwei orthogonalen PGs befreit, indem zunächst die Boc-Gruppe unter sauren Bedingungen abgespalten wurde. Durch Verwendung von 4 M HCl in 1,4-Dioxan wurde das resultierende Amin direkt zum Hydrochlorid umgesetzt und das Produkt abfiltriert. Im letzten Schritt wurde der Diketopiperazinring gebildet, indem unter leicht basischen Bedingungen das freie Amin den Ester intramolekular angreift und der Ester dementsprechend hydrolysiert wird. Zwischen den einzelnen Reaktionen wurden die Produkte innerhalb dieser Synthese nicht isoliert, sodass sich jedoch eine Gesamtausbeute von 28 % für das *N*-Dimethylierte DKP **264** über fünf Schritte ergibt.

Unter Verwendung derselben Methode sollten auch die halogenierten DKP hergestellt werden, allerdings sind auch die 5-halogenierten Tryptophane **267** und **268** lediglich

ungeschützt und als racemische Gemische in adäquaten Mengen kommerziell verfügbar. Während die Abwesenheit einer PG keinen großen synthetischen Aufwand darstellt, bereitet die Anwesenheit des unnatürlichen, (*R*)-konfigurierten Tryptophans gewisse Schwierigkeiten, da die zwei enantiomeren Aminosäuren nur unter großem Aufwand voneinander separiert werden können. Um eine aufwendige Enantiomerentrennung zu umgehen, wurden die racemischen Gemische für die Synthesen eingesetzt und erst nach der Verknüpfung mit der zweiten (*S*)-konfigurierten Aminosäure das gewünschte Diastereomer chromatographisch isoliert (Schema 52).



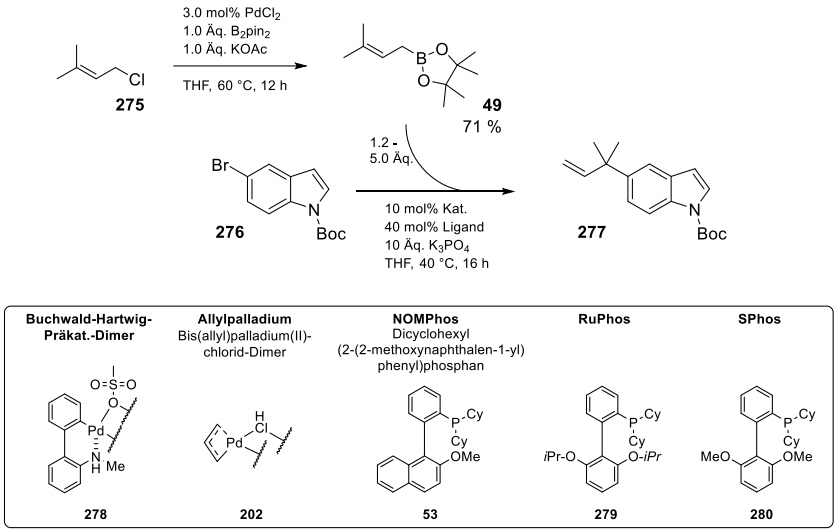
Schema 52: Synthese des (*S,S*)-konfigurierten 5-Chlor- und 5-Brom-cWW-DKP **271** und **273** ausgehend von einem racemischen Gemisch der halogenierten Tryptophane über eine Veresterung, Peptidknüpfung und anschließende Entschützung der verwendeten PGs.

Als Halogensubstituenten wurden auch an diesem Punkt Chlor und Brom in Betracht gezogen. Die zwei Halogentryptophane ***rac*-267** und ***rac*-268** wurden beide zum Methylester ***rac*-269** und ***rac*-270** umgesetzt und mit kommerziell erworbenem (*S*)-(*tert*-Butoxycarbonyl)-tryptophan zum Dipeptid umgesetzt. Anschließend wurden die PGs entfernt und die Diketopiperazine formiert. Auch an dieser Stelle erfolgte keine Auftrennung der einzelnen Zwischenstufen, sondern lediglich eine Aufreinigung der DKP am Ende der Synthese. Die chlorierten und bromierten Diketopiperazine konnten schließlich als Diastereomerengemisch mit einer Ausbeute von ca. 60% über diese vier Schritte erhalten werden. Es wurde daher für beide Halogensubstituenten sowohl das gewünschte cW_SW_S-DKP (**271/273**) als auch das nicht benötigte cW_SW_R-DKP (**272/274**) erhalten (Diastereomeren-Verhältnis 50:50). Die Separation der jeweils zwei Diastereomere konnte allerdings im Zuge der chromatographischen Aufreinigung bewerkstelligt werden, sodass nur das beidseitig (*S*)-konfigurierte Produkt in reiner Form bereitgestellt werden konnte. Die Gesamtausbeute für die enantiomerenreinen, (*S,S*)-konfigurierten Verbindungen **271** und **273** lag somit bei 30 % und 27 %.

Sowohl die NMR-Signale als auch die optische Aktivität der Verbindungen lieferten einen Nachweis, bei welchem der isolierten Verbindungen es sich um das (*S,S*)-konfigurierte DKP handelt. In einer enantiomerenreinen Synthese der unsubstituierten DKP **253** und ***ent*-253** konnte M. Haase zeigen, dass die (*S,S*)- und (*R,R*)-Verbindungen einen Drehwert von -77 bzw. +65 aufweisen, während die (*S,R*)-konfigurierte *meso*-Verbindung **259** optisch inaktiv ist.[230] Bei den hier hergestellten Verbindungen handelt es sich trotz der (*S,R*)-Konfiguration zwar nicht um *meso*-Verbindungen, jedoch hat der 5-ständige Substituent nur einen geringen Einfluss auf die optische Aktivität. Daher entspricht der gemessene Drehwert von -5 für beide Verbindungen **272** und **274** sehr stark der inaktiven *meso*-Verbindung **259** (X=H). Die physikalischen Parameter sind zum direkten Vergleich im Anhang in Kapitel 0 – Tabelle 21 dargestellt.

Anschließend sollte aus einem der halogenierten DKP **271** oder **273** das 5-Prenyl DKP **263** hergestellt werden. Wie auch in der Totalsynthese von Reisman *et al.* sollte dazu die bromierte Verbindung durch eine Suzuki-Kupplung mit dem Prenyl-Boronsäureester **49** umgesetzt werden (Kapitel 5.1.2 – Schema 42).[219] Um bestmögliche Bedingungen zu finden, wurden verschiedene Palladium-Katalysatoren sowie Phosphin-Liganden an einem Modellsubstrat getestet. Dafür wurde das Boc-geschützte 5-Bromindol **276** herangezogen. Der benötigte Boronsäureester **49** konnte durch eine Miyaura-Borylierung aus dem 2-Methyl-but-2-en-4-chlorid (**275**) innerhalb eines Schrittes mit 71 % Ausbeute erhalten werden (Schema 53).

Entsprechend der Ergebnisse von Buchwald *et al.* wurden verschiedene Katalysator- und Liganden-Kombinationen untersucht (Schema 53 und Tabelle 3), da unter bestimmten Bedingungen nicht nur die verzweigte Prenylierung, sondern auch das lineare Reaktionsprodukt erreichbar ist.[89]



Schema 53: Synthese von Prenyl-Boronsäureester **49** und anschließendes *screening* von Katalysatoren und Liganden am Modellsubstrat 5-Bromindol **276** gemäß den Bedingungen von Reisman *et al.*[219] und Buchwald *et al.*[89]

Tabelle 3: Ergebnisse des *screenings* von verschiedenen Katalysatoren und Liganden für die Suzuki-Kupplung von Prenyl-Boronsäureester **49** und 5-Bromindol **276.**

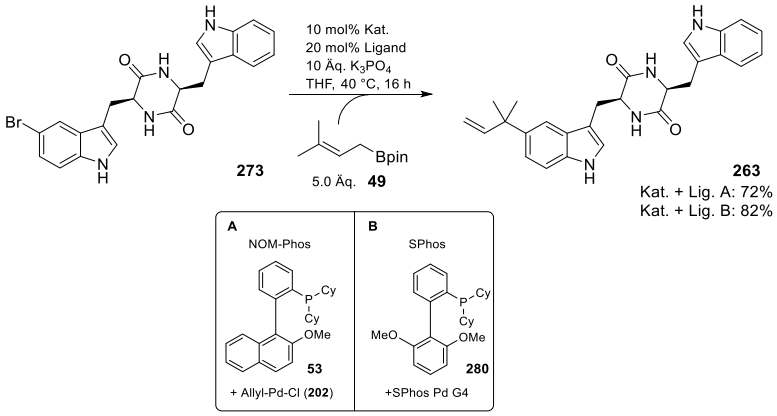
	Äquivalente Prenyl-Bpin **49**	Katalysator	Ligand	Ausbeute* [%]
1	1.2	$[Allyl\text{-}PdCl]_2$ (**202**)	NOM-Phos **53**	52.6 ± 3.9
2	1.2	RuPhos G4	RuPhos **279**	57.7 ± 4.0
3	1.2	BH-Präkat.-Dimer **278**	NOM-Phos **53**	60.9 ± 1.2
4	1.2	SPhos G4	SPhos **280**	64.4 ± 6.8
5	5.0	$[Allyl\text{-}PdCl]_2$ (**202**)	NOM-Phos **53**	59.2 ± 1.6

* Die Ausbeuten wurden über ein quantitatives NMR (qNMR) mit Trimethoxybenzol als internem Standard in Duplikaten bestimmt.

Für die an dieser Stelle eingesetzten Liganden konnte in der zugehörigen Publikation ausschließlich das verzweigte Regioisomer isoliert werden, wobei der Naphtyl-Ligand **53**

(NOMPhos) die besten Ausbeuten lieferte. Da allerdings in allen Fällen nur Allylpalladium **202** als Katalysator verwendet wurde, sollten hier verschiedene Palladium-Spezies als Katalysatorquelle eingesetzt werden. Für den NOMPhos-Ligand **53** wurde Allylpalladium **202** sowie ein von Buchwald *et al.* entwickelter Methansulfonat Präkatalysator **278** verwendet, welcher insbesondere für die Anwendung in Suzuki-Kupplungen vorteilhaft ist.[232] Für RuPhos **279** und SPhos **280** wurden die äquivalenten Palladium-Vorläufer der 4. Generation verwendet. Die Reaktionen wurden über Nacht bei 40 °C und unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt, wobei auch die Lösungsmittel von Sauerstoff befreit wurden (siehe Kapitel 7.1). Dabei konnte für den SPhos-Liganden **280** (Tabelle 3 – Eintrag 4) die höchste Ausbeute von ca. 65 % mittels qNMR detektiert werden. Die weiteren Liganden lagen mit Ausbeuten von 53, 58, und 60 % (Eintrag 1, 2 und 3) in einem vergleichbaren und ebenfalls guten Bereich. In allen Reaktionen wurde gemäß der Erwartung lediglich das verzweigte Regioisomer erhalten. Jedoch unterscheiden sich die hier erhaltenen Resultate in gewisser Weise von den publizierten Ergebnissen, da an dieser Stelle SPhos **280** eine höhere Ausbeute zeigt als der NOMPhos-Ligand **53**. Dies kann einerseits durch die verwendeten Präkatalysatoren begründet werden, womit der SPhos-Palladium-G4 Ligand aktiver sein müsste als das Allyl-Palladiumchlorid **202**, andererseits wurde in der Publikation *para*-*n*-Butylphenylbromid verwendet statt eines Indols.[89] Außerdem zeigt sich im Vergleich von Eintrag 1 und 5, dass eine erhöhte Menge des Pinakolboronsäureesters **49** ebenfalls förderlich ist für eine erfolgreiche Umsetzung.

Daher wurden die adaptierten Reaktionsbedingungen auf das bromierte DKP **273** angewandt, indem zwei verschiedene Katalysator-Ligand-Systeme getestet wurden – sowohl der SPhos-Ligand **280** mit dem entsprechenden Präkatalysator, als auch der von Reisman *et al.* verwendete NOMPhos-Ligand **53** mit Allylpalladiumchlorid **202**. Bei beiden Reaktionen wurden jeweils 5.0 Äquivalente des Boronsäureesters **49** eingesetzt (Schema 54).



Schema 54: Prenylierung des 5-Brom-DKP **273** zum 5-Prenyl-DKP **263** gemäß der Bedingungen von Reisman *et al.*[219] und Buchwald *et al.*[89]

Unter Verwendung von SPhos (**280**) konnte unter diesen Bedingungen eine Ausbeute von 82 % für das gewünschte Produkt **263** erzielt werden, jedoch zeigte der NOM-Phos Ligand **53** mit 72 % nur geringfügig schlechtere Ergebnisse. Darüber hinaus scheint das 5-Brom-Diketopiperazin **273** für die Kreuzkupplung geeigneter zu sein als das Boc-geschützte Indol **276**, was womöglich auf die geringere Elektronendichte zurückzuführen ist, aufgrund der elektronenziehenden Wirkung der *tert*-Butoxycarbonylgruppe des Indols **276**. Letztlich

konnten geeignete Bedingungen für die Kreuzkupplung gefunden werden und das entsprechende Diketopiperazin **263** synthetisiert werden.

5.3.2.2. Bestimmung der SgMT-Aktivität bei funktionalisierten DKPs

Nachdem die DKP-Derivate **263, 264, 271** und **273** hergestellt wurden, sollte die Aktivität der Methyltransferase hinsichtlich der verschiedenen Verbindungen quantifiziert werden. Je nach Substrataktivität kann die Methyltransferase somit an verschiedenen Punkten in der Totalsynthese eingesetzt werden. Außerdem liefert dies Aufschluss darüber, welches der Moleküle wohl das potenzielle natürliche Substrat in der Biosynthese des Naturstoffs ist. Wie schon in Kapitel 4.3.2.2 beschrieben, kann zur Messung der Aktivität von Methyltransferasen der Glo-Assay eingesetzt werden, welcher die Bildung des Coprodukts SAH (**164**) nachweist. Dazu wird freigesetztes SAH (**164**) über eine Enzymkaskade in eine quantitativ messbare Bio-Lumineszenz übersetzt (Kapitel 4.3.2.2 – Abbildung 40).

Da die cW_SW_S-DKP jedoch zwei Positionen besitzen, welche methyliert werden können, ergeben sich für die asymmetrischen Verbindungen **263, 271** und **273** jeweils zwei verschiedene Intermediate, welche sich darin unterscheiden, ob die Methylierung zuerst am 5-substituierten oder unsubstituierten Indolring (Intermediat-A und -B) stattgefunden hat (Abbildung 57). Für das symmetrisch substituierte DKP **264** hingegen ist nur ein Intermediat möglich. Welche der beiden Molekülhälften zunächst umgesetzt wird, kann über den Assay jedoch nicht nachgewiesen werden, da in beiden Fällen die gleiche Anzahl an SAH-Äquivalenten detektiert wird. Für die einseitig funktionalisierten Verbindungen **263**, **271** sowie **273** spielt dies eine entscheidende Rolle, da die entsprechenden Substituenten somit sowohl im aktiven Zentrum als auch außerhalb des aktiven Zentrums liegen können, je nachdem ob der substituierte oder unsubstituierte Indolring methyliert wird. Daher ist nicht nur die tatsächlich umgesetzte Trp-Domäne von Belang, sondern auch die nicht-umgesetzte Molekülhälfte, welche sich ebenfalls auf die Enzym-Substrat-Interaktion auswirken und insbesondere durch sterische Hinderung den Umsatz des Substrats inhibieren kann.

Die erhaltenen Aktivitäten wurden in Relation zum höchsten Wert dargestellt, welcher in diesem Fall das unsubstituierte DKP **253** war (Abbildung 57). Mit einer relativen Aktivität von 24 % wurde das 5-chlorierte DKP **271** am zweitbesten umgesetzt, wobei das 5-bromierte DKP **273** ebenfalls eine Aktivität von 22 % aufwies. Mit 4 % bzw. 2 % sind das 5-prenylierte DKP **263** und das *N*,*N*''-dimethylierte DKP **264** nur in geringem Maße umgesetzt worden. Somit scheinen alle Funktionalisierungen für die Umsetzung mit der Methyltransferase hinderlich zu sein. Da die gemessene Aktivität durch größere Substituenten in 5-Position stärker verringert ist, wird vermutlich die Anlagerung des Substrats im Enzym sterisch blockiert. Mit Hinblick darauf, dass die asymmetrisch funktionalisierten DKP **263**, **271** und **273** möglicherweise auf der unsubstituierten Molekülseite vom Enzym umgesetzt werden und dadurch eine erhöhte Aktivität aufweisen, sollte kein direkter Vergleich mit der *N*-methylierten Verbindung **264** gezogen werden.

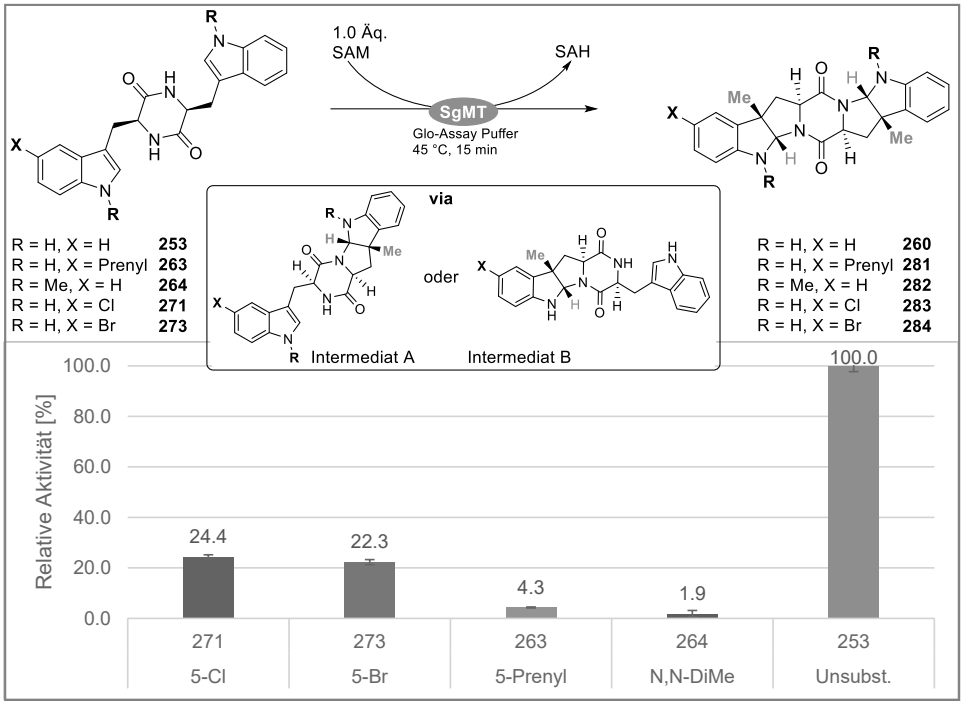


Abbildung 57: Reaktionsschema der enzymatischen Methylierung von funktionalisierten Diketopiperazinen **253**, **263**, **271** und **273** durch SgMT sowie mithilfe des Glo-Assays ermittelte relative Aktivität der Methyltransferase bei den funktionalisierten Substraten im Vergleich zum unsubstituierten DKP **253**.

Abschließend kann jedoch vermutet werden, dass sowohl die *N*-Methylierung als auch die 5-Prenylierung in der Biosynthese erst erfolgen, nachdem die *C*-Methylierung stattgefunden hat. Außerdem ergibt sich für die Anwendung in der Totalsynthese, dass in erster Linie das unsubstituierte DKP **253** von der Methyltransferase gut umgesetzt werden kann. Dies würde jedoch bedingen, dass erst im Anschluss an die enzymatische Umsetzung eine CH-Aktivierung und/oder Prenylierung durchgeführt wird. Viele der bekannten chemischen Methoden zur selektiven (reversen) Prenylierung von Indolen finden jedoch in *N*-, 1- oder 2-Position des Indols statt. Zwar wären die 1- und 2-Position bei einem HHP schon besetzt, jedoch sind noch alle vier Positionen des Benzolrings verfügbar. Ausschließlich die 5-Position selektiv zu adressieren, stellt dabei eine Schwierigkeit dar, da die 5-Position durch keinen Substituenten oder eine benachbarte dirigierende Gruppe aktiviert ist.[233] Insbesondere die direkte CH-Prenylierung von Benzolringen des Indols sind stark untererforscht.[234]

Darüber hinaus würde das unsubstituierte HHP **253** eine weitere Problematik in der Synthese bereithalten, da der anvisierte Naturstoff Lansai-B (**29**) lediglich auf einer Molekülseite prenyliert ist. Selbst wenn eine effiziente Methode zur selektiven 5-Prenylierung vorhanden wäre, würde diese vermutlich zum doppelt-prenylierten Produkt führen. Der stöchiometrische Einsatz eines Prenyldonors könnte dies zu einem gewissen Grad eingrenzen, dennoch würde ein solches Nebenprodukt die Effizienz der Synthese deutlich herabsetzen. Wie auch in der Biosynthese von Lansai-B (**29**) können Enzyme dieses Maß an Regioselektivität liefern und damit eine selektive Monoprenylierung ausschließlich auf einer Moleküldomäne in 5-Position bewirken.

Aus den zuvor genannten Gründen wurde daher die Route über das unsubstituierte DKP **253** in der Totalsynthese von Lansai-B als ungeeignet erachtet. Für die Umsetzung mit der Methyltransferase sollte stattdessen eine der halogenierten Verbindungen **271** oder **273** verwendet werden, welche in 5-Position durch den Substituenten schon aktiviert sind und trotz des Substituenten noch eine akzeptable Enzymaktivität aufweisen. Zusätzlich bietet die Verwendung einer halogenierten Verbindung in der Enzymreaktion die Möglichkeit, zu einem späteren Zeitpunkt in der Synthese auch andere Funktionalisierungen einzubringen. Die Option der *late-stage*-Modifizierung wäre hingegen bei der Verwendung von 5-Prenyl-DKP **263** als Substrat nur eingeschränkt gegeben. Zwar kann die endständige Doppelbindung des Prenylrests für bestimmte Reaktionen genutzt werden, jedoch erlaubt ein Halogensubstituent ein deutlich breiteres Spektrum an nachfolgenden Transformationen.

Die chlorierte Verbindung **271** konnte mit 24 % Enzymaktivität am zweitbesten umgesetzt werden, jedoch eignen sich chlorierte Verbindungen aufgrund der geringeren Reaktivität nur eingeschränkt für Kreuzkupplungen. Die Reaktivität könnte durch einen Finkelstein-ähnlichen Austausch des Chlorids zum Iodid erhöht werden. Um dies zu erreichen, wäre allerdings eine weitere Reaktion notwendig.[235] Da sich, wie auch bei der Synthese des prenylierten DKP **263**, der Bromsubstituent für Kreuzkupplungen sehr gut eignet und die Methyltransferase-Aktivität ebenfalls in einem moderaten Bereich liegt, wurde das bromierte DKP **273** der chlorierten Verbindung **271** vorgezogen.

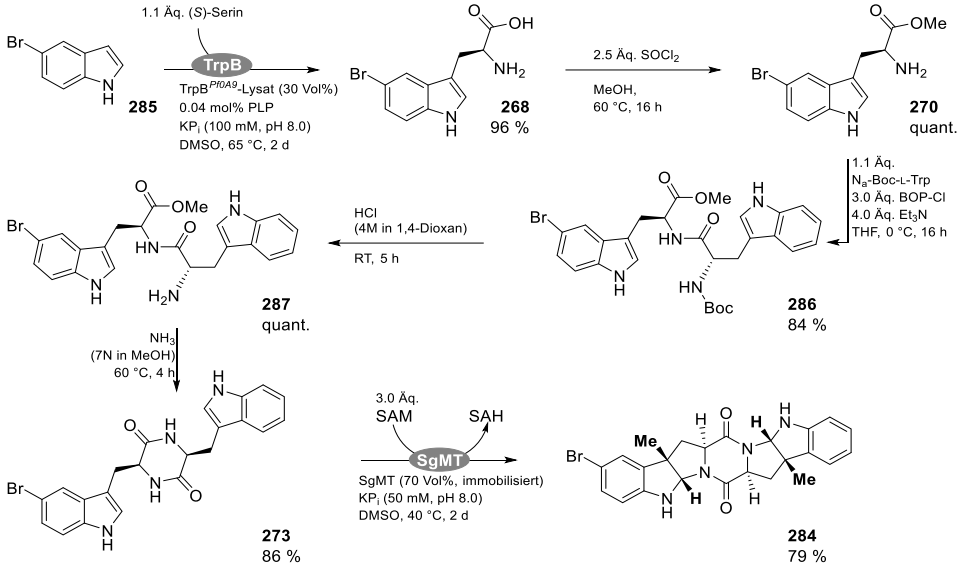
5.3.3. Anwendung der Methyltransferase in der Totalsynthese

5.3.3.1. Enantiomerenreine Synthese zum Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol

In der initialen Untersuchung der Methyltransferase wurde festgestellt, dass das Enzym für das unsubstituierte Diketopiperazin **253** die höchste Aktivität aufweist. Somit könnten bereits unter Einsatz geringer Mengen des Enzyms hohe Ausbeuten des unsubstituierten HHP-DKP **260** erwartet werden. Allerdings ist dies im Hinblick auf eine Totalsynthese von Lansai-B nicht vorteilhaft, da nach der enzymatischen Umsetzung noch die 5-Prenylgruppe angefügt werden müsste. Daher wurde das bromierte DKP **273** als Substrat für die Enzymreaktion ausgewählt, dessen Synthese außerdem enantiomerenrein erfolgen sollte, um die Effizienz der Totalsynthese zu erhöhen.

Anstatt die Synthese beim racemischen 5-Bromtryptophan ***rac*-268** zu beginnen, wurde die Synthese ausgehend von 5-Bromindol **285** gestartet. Wie schon in Kapitel 2.3.1 und 3.3.3 gezeigt, können ausgehend von Indolen verschiedene Tryptophan-Analoga durch verschiedene Mutanten der hitzestabilen Tryptophan-Synthase erhalten werden. Dadurch kann innerhalb von einem Schritt die benötigte 5-bromierte Aminosäure **268** enantiomerenrein erhalten werden (Schema 55).

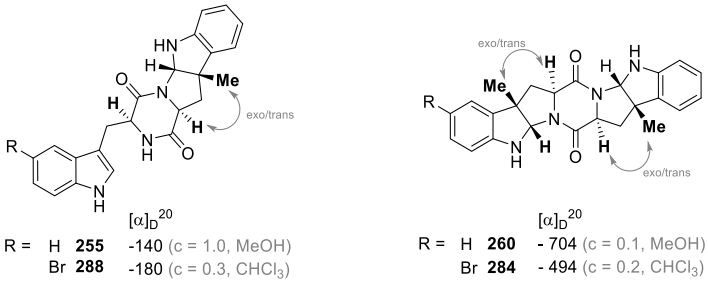
Nach einer erhöhten Reaktionszeit von zwei Tagen bei 65 °C konnte das ausgefallene 5-Bromtryptophan **268** mit einer Ausbeute von 96 % erhalten werden. Nachfolgend wurde die Synthese des Diketopiperazins fortgeführt wie schon in Kapitel 5.3.2.1 – Schema 51 beschrieben. Im Gegensatz zur racemischen Synthese wurde in diesem Fall jeweils nur ein Enantiomer bzw. Diastereomer produziert, weshalb an dieser Stelle auch die verschiedenen Reaktionsprodukte **286** und **287** isoliert wurden. Dabei konnten für alle Schritte bis zum Diketopiperazin **273** sehr gute Ausbeuten von mindestens 84 % gemessen werden.



Schema 55: Enantiomerenreine Synthese von HHP **284**, ausgehend von 5-Bromindol **285** mithilfe der Tryptophan-Synthase *Pf*0A9 und der Methyltransferase SgMT.

Anschließend wurde das 5-Brom-DKP **273** in präparativem Maßstab (50 mg) mit der Methyltransferase SgMT umgesetzt (Schema 55). Wie auch bei der Anwendung der Methyltransferase PsmD (Kapitel 4.3.2.3 – Schema 37), vereinfacht die Verwendung von immobilisierten Enzymen die Extraktion des Reaktionsproduktes deutlich, allerdings kann die Immobilisation einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität haben. Daher wurde die Menge des eingesetzten Enzyms erhöht und die Reaktionszeit angepasst, um auf diese Weise einen vollständigen Umsatz des Substrates zu gewährleisten. Durch dieses Vorgehen konnte kein verbleibendes Substrat reisoliert werden. Unter Verwendung von 70 Vol% des immobilisierten Enzymlysats konnte eine Ausbeute von 79 % des doppelt-methylierten HHP **284** erhalten werden. Als Nebenprodukt wurden lediglich 6 % des einfach-methylierten Intermediats **288** erhalten, womit ca. 15 % des Substrat-Produkt-Gemisches entweder über die Dauer der Reaktion degradiert oder bei der Extraktion in der wässrigen Phase verblieben sind. Dennoch ist mit einer Ausbeute von 79 % die Anwendung der Methyltransferase zum Aufbau des HHP-Gerüsts erfolgreich in die Synthese integriert worden.

Darüber hinaus konnte in der Strukturaufklärung des einfach-methylierten Nebenprodukts ermittelt werden, dass die angefügte *C3*-Methygruppe ausschließlich auf der nicht bromierten Seite vorliegt (Verbindung **288**). Das entsprechende Regioisomer, bei dem der substituierte Indolring methyliert wurde und die unsubstituierte Seite unangetastet vorliegt, konnte hingegen nicht isoliert werden. Dadurch konnte die Vermutung bestätigt werden, dass zunächst nur die unsubstituierte Molekülseite umgesetzt wird und die im Glo-Assay gemessene Enzymaktivität vermutlich hauptsächlich darauf zurückzuführen ist (Abbildung 57). Die dort dargestellte Enzymaktivität gibt somit nur wenig Aufschluss darüber, wie schnell die zweite Methylierung der substituierten Molekülseite abläuft. Weiterhin entsprechen die gemessenen Drehwerte des doppelt-methylierten Produkts **284** sowie des einfach-methylierten Intermediats **288** den von M. Haase beschriebenen Werten der unsubstituierten Verbindungen **260** und **255** (Abbildung 58).[230]



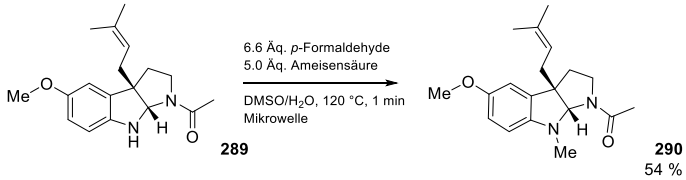
			$[\alpha]_D^{20}$				$[\alpha]_D^{20}$
R =	H	**255**	-140 (c = 1.0, MeOH)	R =	H	**260**	- 704 (c = 0.1, MeOH)
	Br	**288**	-180 (c = 0.3, $CHCl_3$)		Br	**284**	- 494 (c = 0.2, $CHCl_3$)

Abbildung 58: Gemessene Drehwerte der bromierten Verbindungen **284** und **288** im Vergleich zu den unsubstituierten Verbindungen **255** und **260**, welche von M. Haase beschrieben wurden.[230]

Da sich die Zyklisierung zum HHP deutlich auf die optischen Eigenschaften auswirkt, kann anhand der gemessenen Werte (im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung) davon ausgegangen werden, dass die Stereozentren in der gleichen Konfiguration aufgebaut wurden und somit eine *exo*-, bzw. *trans*-Orientierung der Methylgruppe und des ehemaligen C_α-Wasserstoffs vorliegt.

5.3.3.2. *Screening* von Bedingungen zur *N*-Methylierung

Um das so erhaltene HHP **284** zum finalen Naturstoff Lansai-B umzusetzen, mussten lediglich die *N*-Methylierung sowie die Prenylierung durchgeführt werden. Für Letzteres sollten die schon erprobten Reaktionsbedingungen (Kapitel 5.3.2.1 – Schema 54) angewendet werden, während die *N*-Methylierung noch nicht durchgeführt worden ist. Daher wurden zunächst einige Reagenzien an verschiedenen Modellsubstraten getestet, um geeignete Reaktionsbedingungen zu finden. Als Modell sollten anderweitig produzierte HHP dienen, deren Stickstoff ähnlich polarisiert ist. Zunächst wurde das linear prenylierte HHP **289** verwendet (Schema 56), welches von M. Haase bereitgestellt wurde.

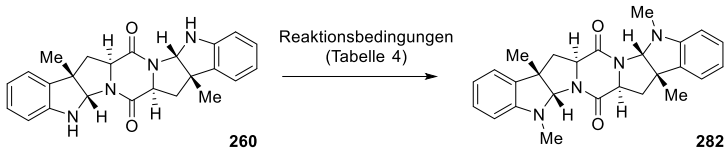


289 **290** 54 %

Schema 56: *N*-Methylierung des Modellsubstrats **289** unter Eschweiler-Clarke Bedingungen in einer reduktiven Aminierung.[236]

In einer Eschweiler-Clarke-Reaktion sollte der Pyrrol-Stickstoff unter Verwendung von Formaldehyd und Ameisensäure methyliert werden.[236] Die Reaktion verläuft über eine reduktive Aminierung, indem zunächst ein Iminium-Ion gebildet wird. Die Ameisensäure dient dabei als Hydridquelle, da die deprotonierte Säure dem Reaktionsgemisch in Form von gasförmigem Kohlenstoffdioxid entzogen werden kann. Dazu werden hohe Temperaturen benötigt, welche durch Bestrahlung in der Mikrowelle auf gleichmäßige Weise erreicht werden. Nach einer Reaktionszeit von nur einer Minute konnte das Produkt **290** mit 54 % Ausbeute erhalten werden. Die gefundenen Bedingungen wurden anschließend auf das *C*-methylierte, jedoch unsubstituierte HHP-DKP **260** übertragen, welches von M. Haase bereitgestellt wurde (Schema 57 und Tabelle 4). Wie auch der angestrebte Naturstoff Lansai-B (**29**) weist diese

Verbindung zwei HHP-Domänen auf und enthält damit auch zwei Stickstoffe, an denen die Methylierung stattfinden soll.



Schema 57: *Screening* verschiedener Reaktionsbedingungen zur *N*-Methylierung des Modellsubstrats **260**.

Tabelle 4: Reaktionsbedingungen des *screening* zur *N*-Methylierung von Modellsubstrat **260** unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel (LM), Reagenzien, Reaktionszeiten und Temperaturen. Das Ergebnis sowie die Ausbeute (isoliert oder ermittelt mittels qNMR, wenn vorhanden) sind ebenfalls dargestellt.

	LM	Reagenz 1	Reagenz 2	Zeit	Temp. [°C]	Ergebnis	Ausbeute
1	DMSO	*p*-Formaldehyd (3.0 Äq.)	Ameisensäure (3.0 Äq.)	3 min	80[1]	Startmaterial reisoliert	
2	DMSO	*p*-Formaldehyd (3.0 Äq.)	Ameisensäure (3.0 Äq.)	3 min	100[1]	Substrat-, Intermediat- und Produkt-Masse detektiert	
3	DMSO	*p*-Formaldehyd (3.0 Äq.)	Ameisensäure (3.0 Äq.)	3 min	120[1]	Degradation	
4	DSMO 1:1 H_2O	*p*-Formaldehyd (10 Äq.)	Ameisensäure (10 Äq.)	1 min	80[1]	Startmaterial reisoliert	
5	DSMO 1:1 H_2O	*p*-Formaldehyd (10 Äq.)	Ameisensäure (10 Äq.)	1 min	120[1]	Degradation + Produkt	**5%**
6	DMF	$DiMeCO_3$ (10 Äq.)	DABCO (0.1 Äq.)	2 + 16 h	90 später RT	Startmaterial reisoliert	
7	THF	MeI (10 Äq.)	KO*t*Bu (2.5 Äq)	16 + 4 h	RT später 40	Substrat-, Intermediat- und Produkt erhalten	**11%**
8	DCM	MeI (10 Äq.)	K_2CO_3 (2.5 Äq.)	16 + 4 h	RT, später 40	Startmaterial reisoliert	
9	DCM	Meerw. (4.0 Äq.)	Prot. sp. (5.0 Äq.)	3 d	RT	Substrat-, Intermediat- und Produkt erhalten	**qNMR: 36%**
10	DCM	Meerw. (8.0 Äq.)	Prot. sp. (10.0 Äq.)	3 d	RT	ausschließlich Produkt	**qNMR: 77%**
11	DCM	Meerw. (16 Äq.)	Prot. sp. (20 Äq.)	3 d	RT	ausschließlich Produkt	**qNMR: 7%**
12	DCM	Meerw. (4.0 Äq.)	Prot. sp. (5.0 Äq.)	3 d	40	Substrat-, Intermediat- und Produkt erhalten	**qNMR: 56%**
13[2]	DCM	Meerw. (8.0 Äq.)	Prot. sp. (10.0 Äq)	1.5 h	RT	ausschließlich Produkt	**72 %** [2]

[1] Diese Reaktionen wurden durch Bestrahlung in der Mikrowelle erwärmt. Alle übrigen Reaktionen wurden mit Heizplatten in einem Sandbad erwärmt. [2] Diese Reaktion wurde in einem 20 mg-Maßstab durchgeführt. Alle übrigen Reaktionen wurden im 5 mg-Maßstab durchgeführt.

In Eintrag 1-5 wurden verschiedene Bedingungen der Eschweiler-Clarke-Reaktion angewandt. Entgegen der Erwartung zeigte sich beim Diketopiperazin **260** eine deutlich verringerte Stabilität als beim HHP **289**. Während bei Temperaturen von 80 °C der Ansatz nicht ausreichend erhitzt wurde und daher lediglich Startmaterial reisoliert wurde (Eintrag 1+4), scheint die Verbindung **260** bei Temperaturen von 120 °C zu degradieren (Eintrag 3+5). Dabei scheint die Menge der zugegebenen Reagenzien unerheblich, da in Eintrag 1-3 nur 3.0 Äquivalente eingesetzt wurden, während in Eintrag 4-5 sogar 10.0 Äquivalente zugefügt wurden. Eintrag 2 zeigt, dass bei einer Temperatur von 100 °C die gewünschte Reaktion zu einem gewissen Grad stattfinden kann, weshalb sowohl das Edukt **260** sowie auch das einfach-methylierte Intermediat und das Produkt **282** im Massenspektrum detektiert wurden. Da nur bei höheren Temperaturen ein vollständiger Umsatz beobachtet wurde, in diesem Fall jedoch das Produkt nur mit 5 % Ausbeute isoliert wurde (Eintrag 5), schienen diese Bedingungen für das HHP **260** ungeeignet.

Eine weitere Methode elektronendefiziente Pyrrole zu methylieren, ist in Eintrag 6 dargestellt.[237] Dazu wird Dimethylcarbonat als Methyldonor mit katalytischen Mengen von 1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan (DABCO) genutzt. Der Mechanismus der Reaktion konnte in einer Publikation von Ferreira am Indol-Strukturmotiv beleuchtet werden.[238] Bei der Anwendung zeigte sich jedoch, dass diese Bedingungen scheinbar nicht auf das HHP-Strukturmotiv übertragbar sind, da trotz einer Reaktionszeit von bis zu 18 h lediglich Startmaterial (Verbindung **260**) reisoliert wurde (Eintrag 6).

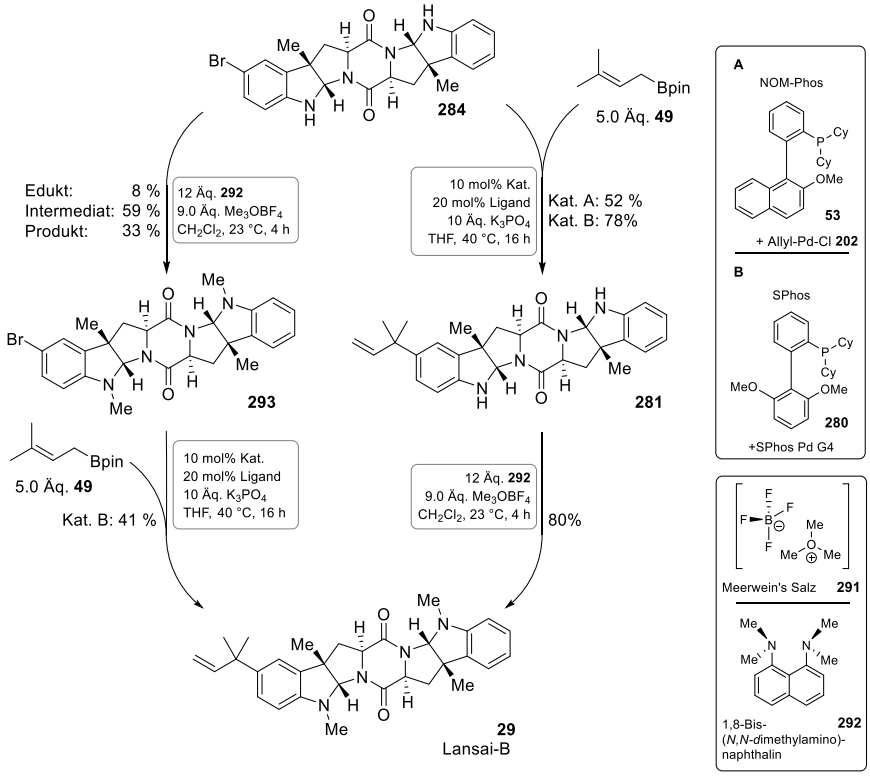
Weitere klassische nukleophile Substitutionen wurden in Eintrag 7 und 8 getestet, wobei Methyliodid als Methylquelle verwendet wurde. Selbst bei Verwendung einer starken Base wie Kalium-*tert*-butanolat konnten nur 11 % des gewünschten Produkts erhalten werden. Damit scheint auch Methyliodid als Reagenz ungeeignet, um den sterisch anspruchsvollen HHP-Stickstoff zu methylieren.

Schließlich wurde eine Kombination aus Trimethyloxoniumtetrafluoroborat (Meerwein-Salz /Meerw.) und 1,8-Bis(*N*,*N*-dimethylamino)-naphthalin (*proton sponge*/Prot. Sp.) getestet (Eintrag 9-13). Aufgrund der niedrigen Temperatur (Raumtemperatur) liegen in diesen Fällen deutlich mildere Reaktionsbedingungen verwendet als bei den zuvor untersuchten Bedingungen. Nach einer Reaktionszeit von 3 Tagen wurden in Abhängigkeit von den eingesetzten Äquivalenten bis zu 77 % des Produkts **282** mittels qNMR nachgewiesen (Eintrag 9-11). Dabei scheint bei Eintrag 11 ebenfalls ein Produktzerfall stattgefunden zu haben (7 % Ausbeute mittels qNMR). Die Erhöhung der Temperatur auf 40 °C scheint nur einen geringen Einfluss auf den Reaktionserfolg zu haben (Eintrag 12 im Vergleich zu Eintrag 9). Jedoch konnte in Eintrag 13 gezeigt werden, dass mit 8.0 bzw. 10.0 Äquivalenten die Reaktion nach 1.5 h schon abgeschlossen ist.

5.3.3.3. Umsetzung des bromierten Hexahydropyrrol zu Lansai-B

Die entwickelten Reaktionsbedingungen zur *N*-Methylierung sowie die Prenylierung wurden dann anschließend auf das *C3*-methylierte 5-Brom-DKP **284** übertragen (Schema 58). Es zeigte sich, dass die *N*-Methylierung der bromierten Verbindung **284** deutlich schlechter verläuft als bei der unsubstituierten Modellverbindung **260**. Unter den gleichen Reaktionsbedingungen schien sich ein Reaktionsgleichgewicht einzustellen, sodass die hinzugegebene Menge des Meerweinsalzes **291** und des 1,8-Bis(*N*,*N*-dimethylamino)-naphthalin **292** auf 12 bzw. 9.0

Äquivalente erhöht wurden. Zudem wurde die Reaktionszeit auf 4 h erhöht. Dies führte dennoch zu einem Gemisch aus Edukt **284** (8 %), einfach *N*-methyliertem Intermediat (59 %) und doppelt *N*-methyliertem Produkt **293** (33 %).



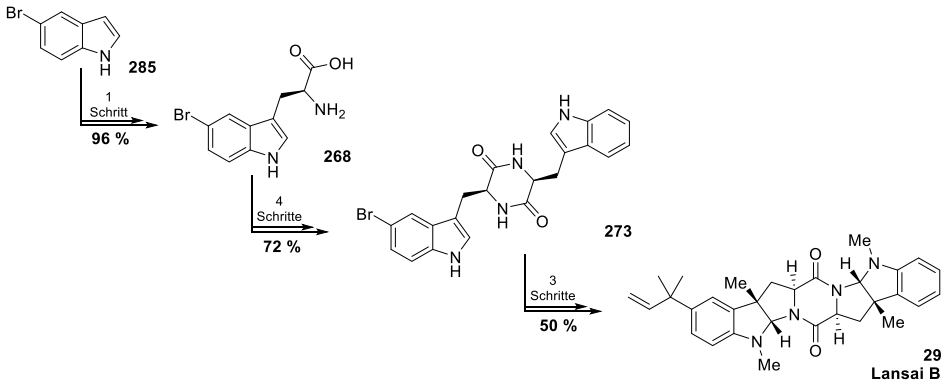
Schema 58: Prenylierung und *N*-Methylierung von HHP **284** zum finalen Naturstoff Lansai-B (**29**) in Abhängigkeit von der Reihenfolge der zwei verschiedenen Reaktionen.

Um abzuschätzen, inwiefern der elektronenziehende Effekt des Halogensubstituenten die Nukleophilie des Indolin-Stickstoffs beeinflusst, wurde die bromierte Verbindung **284** ebenfalls prenyliert. In diesem Fall konnte für das Prenyl-DKP **281** eine höhere Ausbeute (78 %) mithilfe des Naphtyl-Liganden **53** in Kombination mit Allylpalladiumchlorid **202** detektiert werden. Im Vergleich zum nicht-zyklisierten DKP **273**, dessen Prenylierung mit SPhos (**280**) und SPhos-Palladium-G4 mit 82 % Ausbeute gelang, ist der Umsatz mit dem SPhos-Liganden an dieser Stelle mit 52 % deutlich geringer. Die *N*-Methylierung des Prenyl-HHP **281** wurde zum direkten Vergleich unter denselben Reaktionsbedingungen wie für das bromierte HHP **284** durchgeführt, wobei der finale Naturstoff Lansai-B (**29**) mit einer Ausbeute von 80 % isoliert wurde. In diesem Fall wurden zudem kein zurückbleibendes Edukt **281** oder Intermediat reisoliert, sodass ein vollständiger Umsatz zum Produkt **29** verzeichnet werden kann. Dies bestätigt die Annahme, dass der Brom-Substituent Elektronendichte aus dem Benzolring entfernt und damit die Nukleophilie des Stickstoffs herabsetzt. Die Prenylgruppe hingegen scheint keinen starken bzw. einen leicht positiven Effekt auf die *N*-Methylierung zu haben, da im Gegensatz zur unsubstituierten Verbindung **260** (72 %) für die Prenylverbindung **281** die Ausbeute leicht erhöht ist (80 %). Indes wurden die Reaktionszeit

und die Menge der hinzugefügten Reagenzien leicht erhöht, sodass auch dies den Reaktionserfolg der prenylierten Verbindung **281** leicht erhöht haben könnte.

Um den Vergleich der zwei Routen zu vervollständigen, wurde die Prenylierung ebenfalls mit dem *N*-methylierten, bromierten HHP **293** unter Verwendung des Naphtyl-Liganden **53** mit Allylpalladiumchlorid **202** durchgeführt, wobei eine Ausbeute von 41 % erhalten wurde – und damit geringer ausfällt als bei der Prenylierung von Verbindung **284**. Damit scheint in beiden Fällen zuerst die Prenylierung und dann die *N*-Methylierung vorteilhaft. Zudem scheint der Benzolring stark von den zwei Substituenten (in 5-Position und am Indolin-Stickstoff) beeinflusst zu werden. Die gemessenen NMR-Signale sowie der Drehwert von Lansai-B (**29**) entsprechen zudem den publizierten Werten von Reisman und Tuntiwachwuttikul, wodurch erneut die korrekte Ausrichtung der Stereozentren und damit die *exo/trans*-Orientierung bestätigt wird.[62, 219]

Damit konnte die Totalsynthese des Naturstoffs Lansai-B (**29**) erfolgreich beendet werden. Die enantiomerenreine Synthese des 5-Bromdiketopiperazins **273** mithilfe der Tryptophan-Synthase verläuft über fünf Schritte in sehr guten Ausbeuten. Die Methyltransferase konnte an einem zentralen Punkt in der Synthese implementiert werden und bildet damit den Schlüsselschritt in der Totalsynthese. Für die verbleibenden zwei Modifikationen der Prenylierung und *N*-Methylierung konnten durch jeweils ein *screening* ebenfalls geeignete Methoden etabliert werden. Damit ergibt sich eine Gesamtausbeute von 34 % in acht linearen Schritten, ausgehend von dem kleinen Grundbaustein 5-Bromindol **285** (Schema 59).



Schema 59: Schematische Darstellung der vollständigen, neu-entwickelten Totalsynthese von Lansai-B (**29**).[239]

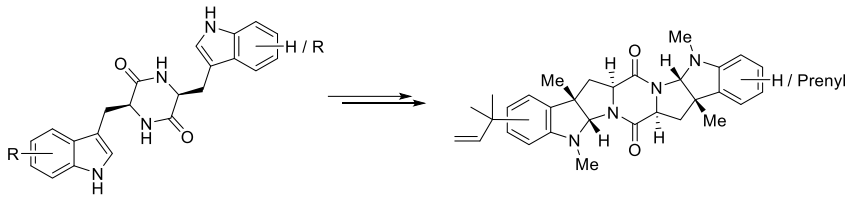
Die bisher bekannte Totalsynthese von Reisman *et al.* nutzt eine konvergente Synthesestrategie, wobei die zwei Hexahydropyrroloindol-Domänen einzeln vorbereitet und erst in einem letzten Schritt miteinander verknüpft werden (siehe Kapitel 5.1.2 – Schema 42).[219] Da insbesondere die finale Verknüpfung nicht nur zum angestrebten Heterodimer, sondern auch zu den zwei Homodimeren führt, ist über diese Synthese ein großer Ausbeuteverlust zu verzeichnen (23 % Gesamtausbeute). Zwar besteht der längste Synthesepfad nur aus fünf konsekutiven Schritten, jedoch konnte in der hier entwickelten Totalsynthese eine höhere Gesamtausbeute (34 %) erzielt werden, trotz der höheren Anzahl linearer Schritte. Zudem beginnt die neue Totalsyntheseroute bei kleineren Bausteinen (5-Br-Indol im Vergleich zu 5-Brom-3-methyl-*N*-methylindol) und ermöglicht zudem eine *late-stage* Funktionalisierung über die Suzuki-Kupplung.

5.3.4. Synthese von Lansai-B-Derivaten

5.3.4.1. Synthese von einfach- und doppelt halogenierten Diketopiperazinen

Die Synthese von vielen DKP-Derivaten wurde von der Naturstoff-Synthese Praktikantin Catharina Gronkowsky sowie von dem Auszubildenden Lars Meerkatz unter der Anleitung des Autors durchgeführt.

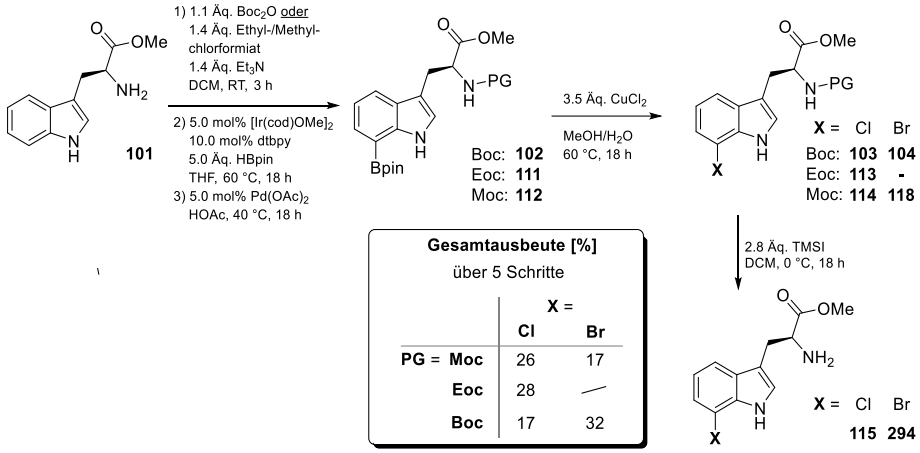
Nachdem eine neue Syntheseroute für den Naturstoff Lansai-B (**29**) etabliert wurde, sollten darüber hinaus auch Derivate des Naturstoffs zugänglich gemacht werden. Die Anwendung eines Enzyms in der Synthese könnte dabei einen Engpass darstellen, da der erhöhte sterische Anspruch von nicht-nativen Substraten die Enzymaktivität stark beeinflussen kann. Allerdings wurde in der Totalsynthese ohnehin das 5-substituierte DKP **273** erfolgreich als Substrat eingesetzt. Dies lässt darauf schließen, dass auch weitere halogenierte Analoga des DKP eingesetzt werden können, was im Folgenden untersucht werden soll. Die Substanzbibliothek sollte sich daher auf halogenierte Analoga konzentrieren, wobei die angefügten Halogensubstituenten alle vier möglichen Positionen des Benzolrings abdecken und zusätzlich nicht nur auf einer Seite des cW_SW_S-DKP, sondern an beiden Tryptophaneinheiten vorliegen (Schema 60) sollen.



Schema 60: Schematische Darstellung der anvisierten Lansai-B-Derivate, welche über die neu-etablierte Totalsynthese mittels Methyltransferase SgmT erreicht werden können.

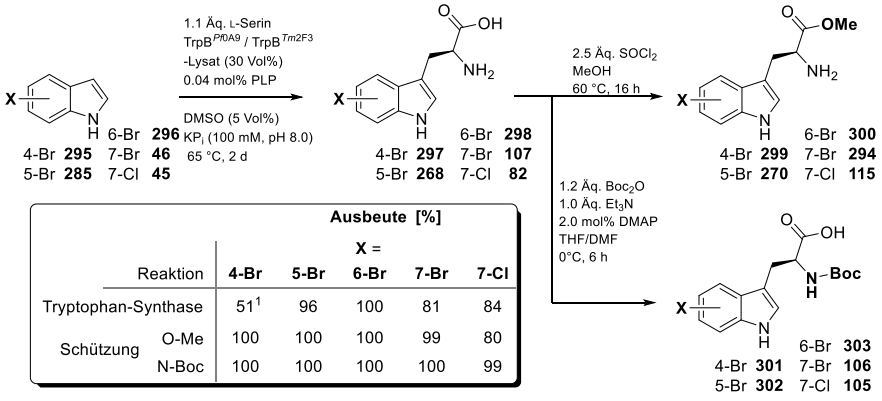
Für die Synthese der halogenierten DKP-Substrate wurden die benötigten (*S*)-Tryptophan-Analoga sowohl mithilfe der Tryptophan-Synthase ausgehend von Indol erhalten als auch über die Iridium-katalysierten CH-Aktivierung ausgehend vom (*S*)-Tryptophanmethylester **101** hergestellt (wie schon in Kapitel 3.3.2 und 3.3.3 gezeigt). Um die Unterschiede zwischen diesen beiden Methoden zu beleuchten, wurde der 7-bromierte und 7-chlorierte Tryptophanmethylester über beide Methoden zum direkten Vergleich hergestellt.

Die metallkatalysierte Tryptophan-Funktionalisierung bietet den Vorteil, dass nach der Borylierung viele weitere funktionelle Gruppen zugänglich sind. Allerdings muss für die CH-Aktivierung die α-Amino-Funktion zunächst geschützt werden und letztlich wieder entfernt werden, um Nebenreaktionen zu unterdrücken. In Abhängigkeit von der verwendeten PG an der α-Amino-Gruppe ergibt sich über die fünf notwendigen Reaktionen eine Gesamtausbeute von 17-28 % für den 7-chlorierten Methylester **115** (17 % Boc, 28 % Eoc, 26 % Moc) bzw. 17-32 % für die 7-Bromverbindung **294** (32 % Boc, 17 % Moc) (entsprechend der gezeigten Ergebnisse in Kapitel 3.3.2). Aufgrund der vielen benötigten Schritte ist bei dieser Methode der synthetische Aufwand höher als bei der enzymatischen Alternative. Zudem sind über die hier verwendete Borylierung lediglich Modifikationen in 7-Position des Indolrings zugänglich, während die Trp-Synthase auch die 4-, 5-, und 6-derivatisierten Tryptophane bereitstellen kann (siehe Kapitel 2.3.1).



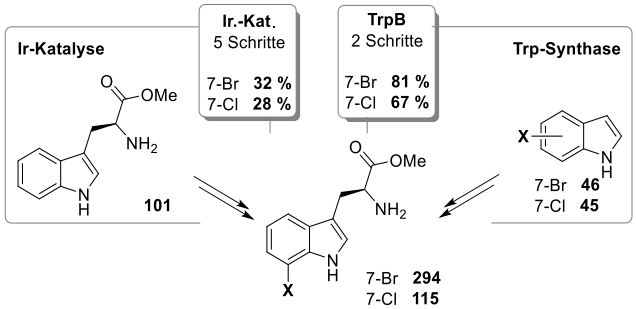
Schema 61: Synthese des 7-bromierten und 7-chlorierten Tryptophanmethylesters **294** und **115** anhand der Ir-katalysierten CH-Aktivierung ausgehend vom (*S*)-Tryptophanmethylester entsprechend der gezeigten Ausbeuten in Kapitel 3.3.2.

Mithilfe der Tryptophan-Synthase können halogenierte Indole innerhalb von nur einem Schritt zum Tryptophan umgesetzt werden (Schema 62). Dazu wurde für die 5-, 6- und 7-halogenierten Tryptophane die TrpB Variante *Pf*0A9 verwendet, welche die Indole **285**, **296** und **46** in nahezu quantitativen Ausbeuten umsetzen konnte. Nur die 7-chlorierte Verbindung **45** zeigte kleine Ausbeuteeinbußen mit 84 %. Das 4-bromierte Tryptophan **297** hingegen wurde anhand des homologen Enzyms aus *Thermotoga maritima* erhalten, welches ebenfalls von Arnold *et al.* über directed evolution optimiert wurde und 4-derivatisierte Indole (wie hier 4-Bromindol **295**) besser zu akzeptieren scheint als die *Pf*0A9-Variante.[103] Die hier gemessene Ausbeute von 51 % liegt etwa 20 % unterhalb der publizierten Ausbeute (72 %).[240] Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass die Reaktionstemperatur aufgrund des verwendeten Geräts nicht höher als 66 °C eingestellt werden konnte und damit die in der Literatur angegebene Reaktionstemperatur von 75 °C leicht unterschreitet. Da beide Enzymvarianten aus thermophilen Organismen (*P. furiosus* und *T. maritima*) stammen, ist es möglich, dass für diese Enzyme erst bei hohen Temperaturen das Aktivitätsoptimum erreicht wird.



Schema 62: Synthese der 4-, 5-, 6- und 7-halogenierten Tryptophan-Verbindungen mithilfe der Tryptophan-Synthase, ausgehend von funktionalisierten Indolen, und anschließende Schützung der Säure-/Aminfunktion. [1] Verwendung von TrpB^{Tm2F3}, alle übrigen Tryptophane wurden mit TrpB^{Pf0A9} hergestellt.

In den zwei folgenden Reaktionen wurden die entsprechenden PGs am Sauerstoff bzw. Stickstoff angefügt. Mit Ausnahme des 7-Chlor-Tryptophan **82**, welches bei der Umsetzung zum Methylester **115** nur eine Ausbeute von 80 % zeigte, konnten für alle Reaktionen quantitative Umsätze ermittelt werden. Die Gesamtausbeuten liegen somit in einem Bereich von 51 % (für den 4-bromierten Tryptophanmethylester **299**) bis 100 % (für die 6-bromierte Verbindung **300** bzw. **303**). Auch die zwei 7-halogenierten Tryptophanmethylester **115** und **294** konnten mit hohen Ausbeuten von 81 % bzw. 67 % erhalten werden.

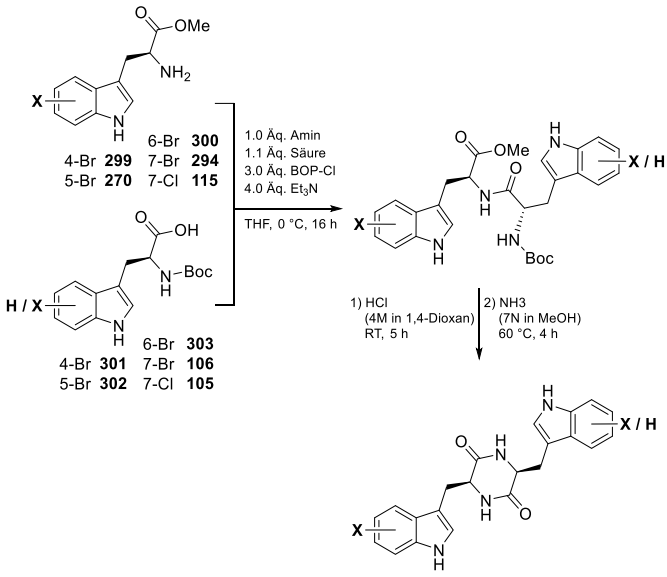


Schema 63: Vergleich der zwei Methoden zur Synthese des 7-bromierten und 7-chlorierten Tryptophanmethylesters **115** bzw. **294** über die Ir-katalysierte Tryptophan-Funktionalisierung oder die enzymatische Tryptophansynthese unter Angabe der Gesamtausbeuten.

Somit ist, im direkten Vergleich zwischen den zwei Syntheserouten, die metallkatalysierte Synthese des *O*-geschützten Tryptophans **115** bzw. **294** in beiden Fällen weniger effizient als bei der Anwendung der Tryptophan-Synthase (Schema 63). Aus diesem Grund wurden die meisten DKP-Verbindungen ausschließlich über die Tryptophan-Synthase hergestellt, lediglich das 7-Brom und 7-Chlor-DKP **318** und **320** wurden mithilfe der funktionalisierten Tryptophane **115** bzw. **294** aus der Ir-katalysierten Funktionalisierung hergestellt.

Die Kopplung der zwei Tryptophan-Einheiten zum Dimer zeigte hingegen an vielen Stellen geringere Ausbeuten (Schema 64). Dabei ist der Trend erkennbar, dass die Dimerisierung von zwei halogenierten Tryptophan-Verbindungen geringere Ausbeuten (26-49 %) liefert (**305**, **306**, **308** und **310**) als wenn nur eine halogenierte Komponente eingesetzt wird (Ausbeuten von 62-94 %, Verbindungen **286**, **304**, **307** und **309**). Lediglich bei den zwei 7-chlorierten Verbindungen **311** und **312** liegt dieser Trend nicht vor. Zudem ist zu beachten, dass für manche Reaktionen die Peptidbindung nicht nur über die schon beschriebene Reaktion mit BOP-Cl (Kapitel 5.3.2.1 – Schema 52) gebildet wurde, sondern ebenfalls mithilfe von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und *N*-Methylmorpholin katalysiert wurde. EDC ist ebenfalls ein breit-angewandtes Kopplungsreagenz von Aminosäuren, welches die Reaktion durch die Umwandlung des Carbodiimids zum Harnstoff-Nebenprodukt vorantreibt. Doch auch die Verwendung dieses Reagenzes zeigte keine deutliche Ausbeuteverbesserung. Einige Reaktionen wurden nach 16 h bei 0-23 °C noch für 2-3 h auf 50-60 °C erhitzt, wodurch höhere Ausbeuten erhalten wurden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass viele der Reaktionen noch nicht vollständig abgelaufen waren und eine Erhöhung der Reaktionstemperatur notwendig ist. Ein weiterer Grund für die eher geringen Ausbeuten könnte die Tatsache sein, dass die Reaktionsprodukte aus der Boc-Schützung (Verbindung **301**, **302**, **303**, **106** und **105**) sowie aus der Veresterung (Verbindung **299**, **270**, **300**, **294** und **115**) nicht isoliert wurden und damit noch potenzielle Verunreinigungen enthalten, welche die Dimerisierung beeinträchtigt

haben. Dies würde ebenfalls erklären, warum die Reaktionen zum doppelt halogenierten Dimer stärker betroffen waren, da bei den einfach-halogenierten Reaktionen das kommerziell erworbene, unsubstituierte Tryptophan eingesetzt wurde.



Dimerisierung

Substutition

X =	- einfach Nr.	[%]	- doppelt Nr.	[%]
4-Br	**304**	78	**305**	32
5-Br	**286**	84	**306**	43[1]
6-Br	**307**	62	**308**	49[1]
7-Br	**309**	94	**310**	26[1]
7-Cl	**311**	67	**312**	79

Entschützung und Zyklisierung

Substutition

X =	- einfach Nr.	[%]	- doppelt Nr.	[%]
4-Br	**313**	62	**314**	77
5-Br	**273**	86	**315**	87
6-Br	**316**	65	**317**	84
7-Br	**318**	56	**319**	93
7-Cl	**320**	22[2]	**321**	58

Schema 64: Synthese der einfach und doppelt halogenierten cW$_S$W$_S$-DKP **313-321** sowie **273**, wobei die Halogensubstituenten in 4-, 5-, 6- und 7-Position angefügt sind. Für die 7-Brom- und 7-Chlor-Verbindungen **318** und **320** wurde die Iridium-katalysierte Tryptophan-Funktionalisierung verwendet, alle übrigen Verbindungen wurden mithilfe der Tryptophan-Synthase erhalten. [1] Reaktion wurde anstelle von BOP-Cl mit 1.1 Äq. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 2.0 Äq. *N*-Methylmorpholin in Dimethylformamid (DMF) durchgeführt. [2] Statt der Boc-PG lag die *Moc*-PG aus der Ir-katalysierten Synthese vor. Infolgedessen wurde die *N*-Entschützung mit 3.0 Äq. TMSI in DCM für 18 h im Rückflusskühler durchgeführt.

Die anschließende Entfernung der zwei orthogonalen PGs sowie die Zyklisierung zum Diketopiperazin konnte für alle Verbindungen (**273** sowie **313-321**) in guten bis sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden (56-93 %). Lediglich für die 7-Chlor-einfach-halogenierte Verbindung **320** wurde eine Ausbeute von nur 22 % erhalten. Dies kann jedoch dadurch begründet werden, dass der Amin-Rest nicht mit einer Boc-PG sondern mit einer Moc-PG aus der Iridium-katalysierten Synthese versehen war. Dadurch musste die PG unter deutlich harscheren Bedingungen (TMSI) entfernt werden. Das TMSI katalysiert die Entschützung über dessen starke Eigenschaften als Lewis-Säure, wobei diese auch die Peptidbindung labilisieren kann. Vermutlich führte die Entfernung der Moc-PG somit zu Nebenprodukten/Degradation.

Die Gesamtausbeuten für die hergestellten Diketopiperazine **273** sowie **313-321** sind zusammenfassend in Abbildung 59 dargestellt. In besonderem Maße fällt dabei auf, dass das einfach 5-bromierte DKP **273** mit 72 % die höchste Ausbeute aufweist. Allerdings ist diese Reaktion im Zuge der Etablierung der Totalsynthese wesentlich öfter durchgeführt und der Umgang mit den Verbindungen optimiert worden. Außerdem sind an dieser Stelle die Produkte der Einzelreaktionen stets gereinigt worden, was die Bildung von Nebenprodukten minimiert hat. Im Gegensatz dazu sind die weiteren DKP **313-321** nur einmalig auf der letzten Stufe

isoliert worden, um den Arbeitsaufwand zu minimieren. Außerdem wurde die Synthese des 5-bromierten DKP **273** ausschließlich in Eigenarbeit durchgeführt, während an der Synthese der neuen Derivate **313**-**321** verschiedene Personen beteiligt waren, wodurch die Fehleranfälligkeit erhöht ist.

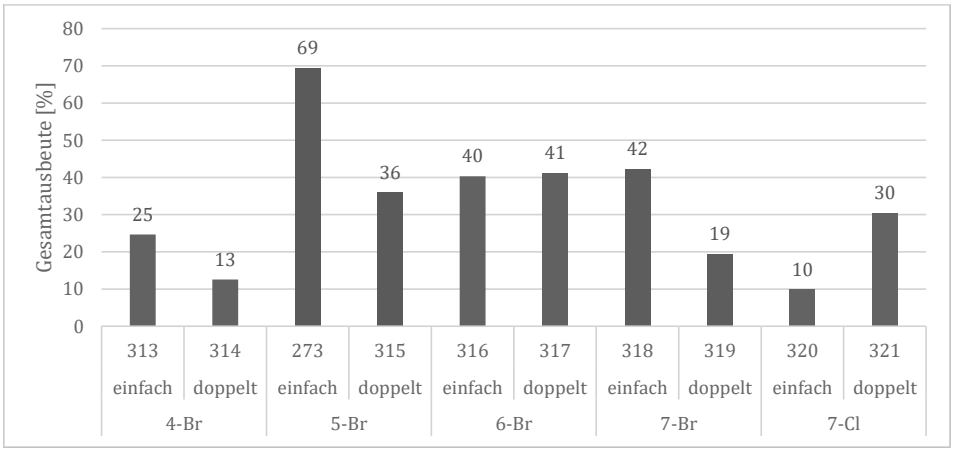


Abbildung 59: Säulendiagramm der Gesamtausbeuten der Synthese von verschieden funktionalisierten Diketopiperazin-Verbindungen **258** sowie **298**-**306**, welche jeweils in 4-, 5-, 6- oder 7-Position einfach- oder doppelt-substituiert sind.

Damit sind, abgesehen von den oben genannten Gründen, weitere Ausbeuteeinbußen aufgrund von individuellen Fehlern in der Handhabung nicht auszuschließen. Inwiefern die Substituenten am Indolring die Dimerisierung, die Entschützungsreaktionen oder die Zyklisierungen beeinflussen, wurde nicht untersucht. Jedoch kann vermutet werden, dass diese Reaktionen nicht großartig durch die Halogensubstituenten beeinträchtigt werden sollten, wenngleich die elektronischen Eigenschaften des aromatischen Indols durch die angefügten Reste modifiziert werden. Unter der Beachtung, dass die enzymatische Synthese von 4-Br-Trp **297** durch die Tryptophan-Synthase limitiert wird, sollte eine Gesamtausbeute von ca. 69 %, wie für das 5-Brom-DKP **273**, für die meisten anderen Verbindungen (**313**-**321**) bei optimaler Durchführung ebenfalls erreichbar sein.

5.3.4.2. Bestimmung der SgMT-Aktivität bei weiteren halogenierten DKP

Nach der erfolgreichen Synthese der Diketopiperazine **273** sowie **313**-**321** mit Halogensubstituenten in variierenden Positionen wurden auch diese Verbindungen mithilfe des MTase-Glo-Assays bezüglich der Umsetzung durch die Methyltransferase SgMT untersucht (Abbildung 60). Bei der initialen Untersuchung der Methyltransferase konnte festgestellt werden, dass die Substitution des cW_SW_S-DKP die Enzymaktivität herabsetzt. Damit könnten zusätzliche Substituenten die Aktivierung des Indolstickstoffs durch die katalytische Triade innerhalb des aktiven Zentrums sterisch blockieren (siehe Kapitel 5.1.3 Abbildung 53) und somit nur erschwert umgesetzt werden. Während vermutlich bei den einfach-substituierten Verbindungen zunächst nur der unsubstituierte Indolring zum HHP umgesetzt wird und sich der angefügte Substituent somit nicht im aktiven Zentrum befindet, können die doppelt-substituierten Verbindungen die sterische Hinderung des Substituenten im aktiven Zentrum nicht umgehen. Über den MTase-Glo-Assay soll daher abgeschätzt werden, welche der

weiteren Substrate auch im präparativen Maßstab umgesetzt werden können. Auch in diesem Fall wurden alle gemessenen Enzymaktivitäten in Relation zum unsubstituierten DKP **253** dargestellt. Dabei konnte für die Verbindungen mit Substituenten in 4-, 6- und 7-Position festgestellt werden, dass die einfach-substituierten Verbindungen (**313**, **316**, **318** und **320**) mit relativen Enzymaktivtäten von 54-65 % deutlich besser umgesetzt werden als die doppelt-substituierten Verbindungen (**314**, **317**, **319** und **321**) (0-13 % rel. Enzymaktivität). Dieser Trend spiegelt sich lediglich bei den 5-Bromverbindungen nicht wider, wo die Enzymaktivität mit 22 % für die einfach-halogenierte Verbindung **273** deutlich geringer ist als für die doppelt-halogenierte Verbindung **315**.

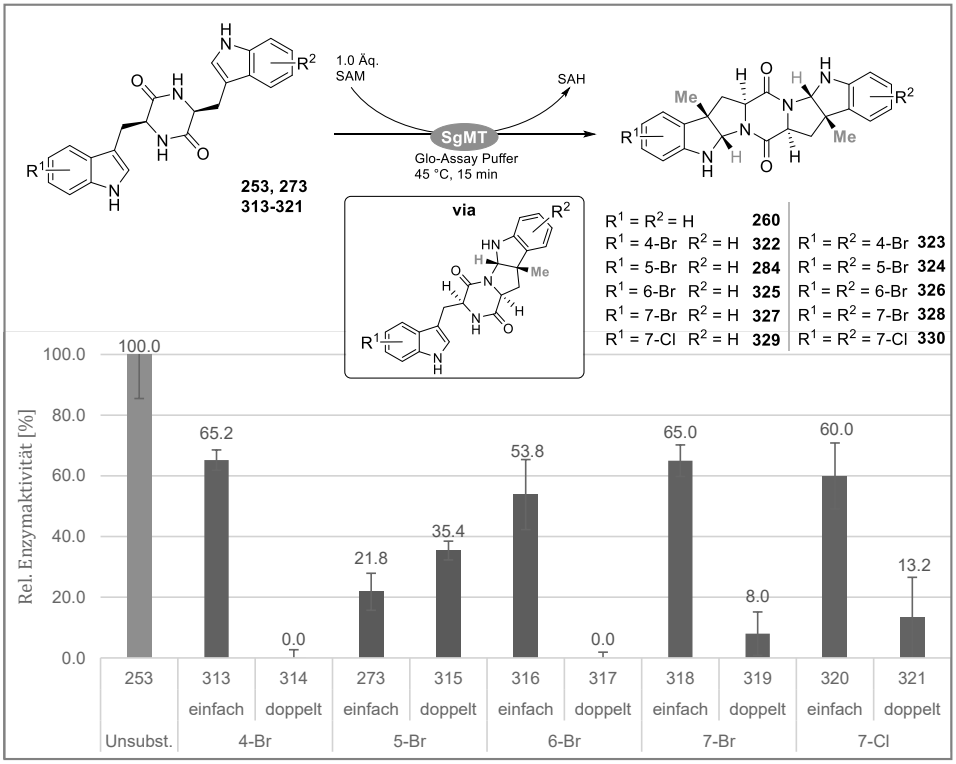


Abbildung 60: Reaktionsschema der enzymatischen Methylierung mit SgMT von einfach- oder doppelt-halogenierten DKP in 4-, 5- 6- oder 7-Position (**273** und **313**-**321**) sowie mithilfe des Glo-Assays ermittelte relative Enzymaktivität der Methyltransfase gegenüber den funktionalisierten Substraten im Vergleich zum unsubstituierten DKP **253**.

Jedoch sollte beachtet werden, dass die gemessene Enzymaktivität des Glo-Assays leicht verfälscht wird, da innerhalb des Assays nicht unterschieden werden kann, in welcher Position die Methylierung stattfindet. In den schon gezeigten Ergebnissen sowohl des initialen Glo-Assays (Kapitel 5.3.2.2 – Abbildung 57) als auch der präparativen Reaktion mit der 5-Bromverbindung **273** (Kapitel 5.3.3.1 – Schema 55) konnte festgestellt werden, dass die unsubstituierte Molekülseite zuerst methyliert wird. Eine asymmetrische Funktionalisierung (wie es bei den einfach-halogenierten Verbindungen **273**, **313**, **316**, **318** und **320** der Fall ist) führt somit dazu, dass der angefügte Substituent nicht im aktiven Zentrum vorliegt und lediglich die Substrat-Enzym-Wechselwirkung außerhalb der Enzymtasche (in zweiter Instanz) beeinträchtigt ist. Bei den doppelt-halogenierten Verbindungen **314**, **315**, **317**, **319**

und **321** hingegen muss der angefügte Substituent zwangsläufig auch im aktiven Zentrum liegen (Abbildung 61), da beide Molekülseiten funktionalisiert sind, wodurch die Substrat-Enzym-Wechselwirkung somit sowohl in erster Instanz (im aktiven Zentrum) als auch in zweiter Instanz (außerhalb des aktiven Zentrums) geschwächt wird.

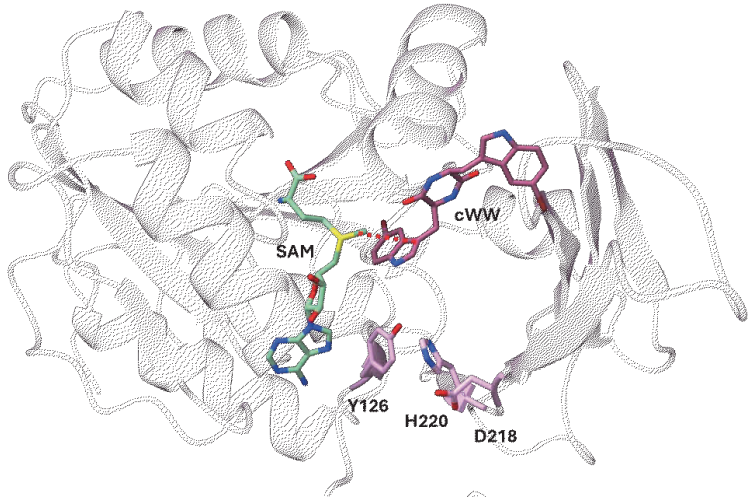
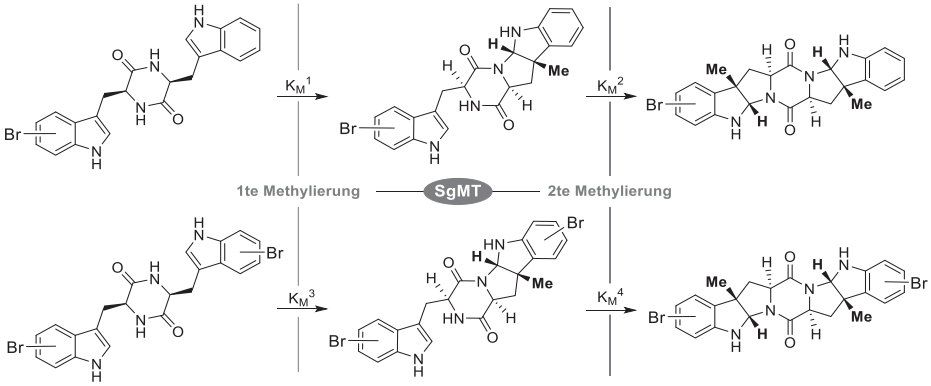


Abbildung 61: Darstellung der Methyltransferase SgMT (PDB: 9GDJ) (weiß) mit hervorgehobener katalytischer Triade, bestehend aus Y^{216}, H^{220} und D^{218} (rosa), und *docking* des 5-Dibrom-DKP **315** (pink) sowie des Cosubstrats SAM (**163**) (grün). Die Struktur beruht auf einer Kristallstruktur und MD-Simulationen.[231] Dabei ist erkennbar, dass nur ein Indol in der Enzym-Tasche vorliegt, während der zweite Indolring weiter außerhalb liegt.

Um die Verringerung der Substrat-Affinität genau beleuchten zu können, müssten die entsprechenden Intermediate, deren unsubstituierten Seiten schon methyliert und zyklisiert sind, ebenfalls als Substrate vorliegen (Schema 65), da diese durch den aufgebauten HHP-Ring eine erhöhte Rigidität haben und dies möglicherweise die Interaktion mit dem Enzym beeinflusst (*induced fit*).



Schema 65: Einzelreaktionen der enzymatischen Methylierung. Für eine genaue Betrachtung der jeweiligen Reaktionskonstanten K_M^X müssten daher auch die einfach-methylierten Moleküle im Glo-Assay untersucht werden.

Die schon einfach-methylierten Intermediate könnten daher unter Umständen eine höhere Enzymaffinität haben und damit deutlich schneller umgesetzt werden, wodurch z. B. die höhere Enzymaktivität der 5,5‘‘-Dibromverbindung **315** erklärt werden könnte. Da jedoch

einerseits die einfach-methylierten Intermediate nicht selektiv zugänglich sind und andererseits die Aufnahme der Kinetiken der Einzelreaktionen einen großen Aufwand darstellt, insbesondere da das Cosubstrat SAM (**153**) ebenfalls einen starken Einfluss haben kann, wurde davon an dieser Stelle abgesehen. Inwiefern somit die gemessenen Enzymaktivitäten der 5-bromierten Verbindungen **273** und **315** tatsächlich auf untypischen Substrataffinitäten oder auf Messungenauigkeiten im MTase-Glo-Assay beruhen, wurde daher nicht untersucht.

Da im Zuge der Totalsynthese die 5-Bromverbindung **273** schon präparativ umgesetzt werden konnte, lässt sich aus den Ergebnissen des Glo-Assays schließen, dass auch die 5-dibromierte Verbindung **315** eine ähnliche Enzymaktivität aufweist und somit ebenfalls im präparativen Maßstab umsetzbar sein sollte. Da die gemessene Enzymaktivität der einfach-substituierten Verbindungen vermutlich hauptsächlich auf die Umsetzung des nicht substituierten Indolrings zurückzuführen ist, sind die gemessenen Aktivitäten der doppelt-halogenierten Verbindungen hinsichtlich der Umsetzung des substituierten Indolrings aussagekräftiger. Somit sind auch die 7-halogenierten Verbindungen **318** und **320** aussichtsreiche Kandidaten zur Umsetzung zum doppelt-methylierten HHP. Da für die 4- und 6-dibromierten Verbindungen (**314** und **317**) keine Enzymaktivität detektiert wurde, besteht auch für die einfach-bromierten DKP **313** und **316** die Vermutung, dass diese nicht zum doppelt methylierten Produkt umgesetzt werden können. Um dies zu überprüfen, wurde die Verbindung **313** aufgrund der höheren Enzymaktivität der einfach-halogenierten Verbindung repräsentativ ausgewählt und ebenfalls im Folgenden präparativ umgesetzt.

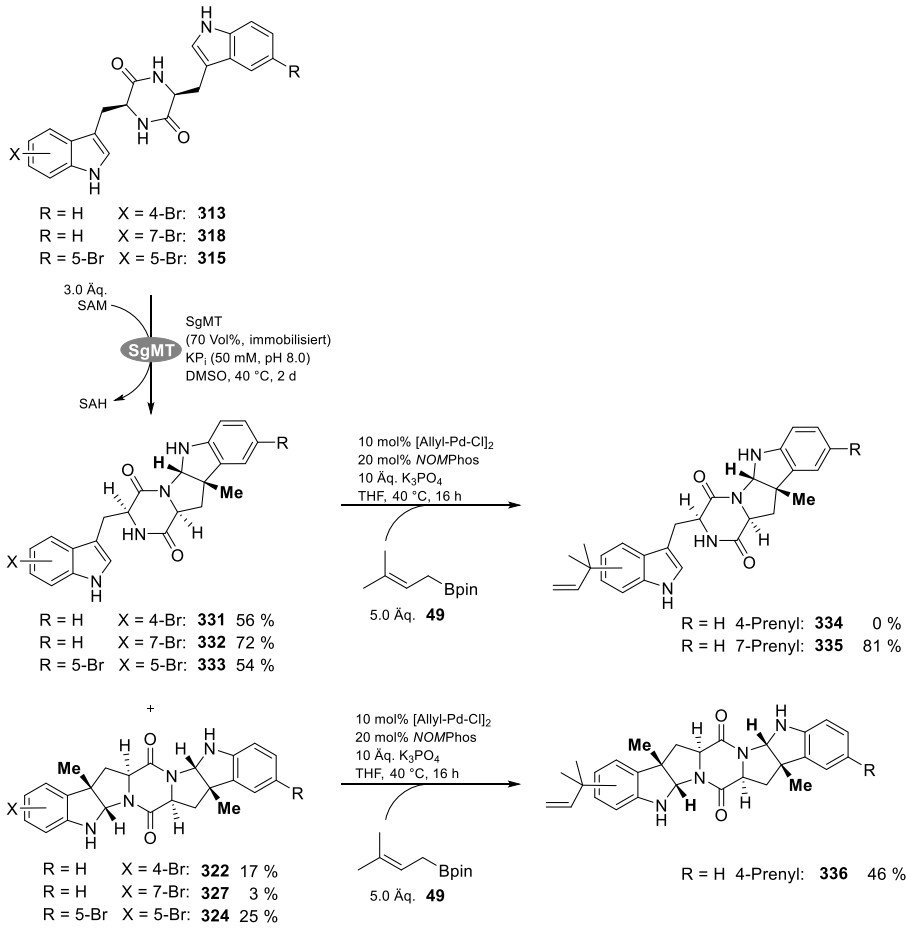
5.3.4.3. Präparative Methylierung und Prenylierung von DKP-Derivaten

Nachdem durch den MTase-Glo-Assay die Enzymaktivität für die hergestellten Diketopiperazin-Derivate ermittelt wurde, sollten aussichtsreiche Verbindungen auch im präparativen Maßstab von der Methyltransferase umgesetzt werden. Dazu wurden die einfach-bromierten Verbindungen **313** und **318** sowie die doppelt-bromierte Verbindung **315** ausgewählt (Schema 66). Um den Reaktionserfolg mit dem 5-bromierten Substrat **273** aus der Totalsynthese zu vergleichen, wurden die Reaktionen unter Verwendung derselben Bedingungen durchgeführt (Menge des eingesetzten Enzyms und Cosubstrats, sowie Temperatur und Reaktionszeit).

Dabei wurde jedoch für alle drei Verbindungen ein deutlich schlechterer Umsatz als für die einseitig 5-bromierte Verbindung **273** erhalten. Insbesondere von der 7-Brom-Verbindung **318** konnte lediglich ein Anteil von 3 % zum Endprodukt **327** umgesetzt werden, während die zwei weiteren DKP **313** und **315** in leicht höheren Ausbeuten von 17-25 % zu den doppelt-methylierten Produkten **322** und **324** überführt wurden. Für alle drei Substrate wurde somit ein Großteil des jeweiligen einfach-methylierten Intermediats **331**-**333** erhalten (52-72 %).

Damit wurde die 5-Dibromverbindung **315** in der präparativen Reaktion in ähnlichem Maße umgesetzt wie die 4-Bromverbindung **313** (4-Br-DKP: 56 + 17 % – 5-DiBr-DKP: 54 + 25 %), während sich die gemessenen Enzymaktivitäten im Glo-Assay stark voneinander unterschieden (für die 4-Br-DKP 65 % (**313**) und 0% (**314**) – für die 5-Br-DKP 22 % (**273**) und 35 % (**315**)). Auch konnten im Glo-Assay für die 7-Br-Verbindung **318** und die 4-Brom-Verbindung **313** ähnliche Aktivitäten gemessen werden, während die präparative Umsetzung der 4-Bromverbindung deutlich bessere Ausbeuten liefert. Dies könnte daran liegen, dass die

entsprechenden Intermediate der Enzymreaktion (einseitig umgesetzt) eine stark abweichende Affinität zum Enzym aufweisen als die unveränderten Substrate.



Schema 66: Enzymatische Methylierung und Palladium-katalysierte Prenylierung der 4-, 5- und 7-bromierten DKP-Derivate **313**, **315** und **318**. Die einfach- und doppelt-methylierten Produkte (**331**-**333**, bzw. **322**, **324** und **327**) wurden isoliert und einzeln für die Prenylierung eingesetzt.

Aufgrund der niedrigen Ausbeuten wurden lediglich die HHP **331**, **332** und **322** für die nachfolgende Prenylierung eingesetzt. Die 7-Brom-Verbindung **332** konnte mit einer Ausbeute von 81 % zum Produkt **335** umgesetzt werden. Bei der Prenylierung der 4-Bromverbindungen **322** und **331** konnte hingegen ein starker Kontrast zwischen dem Indol und dem HHP beobachtet werden. Die Ausbeute des 4-Brompyrroloindols **336** lag bei 46 %, während das 4-Bromindol-DKP **331** vollständig reisoliert wurde. Da unter denselben Bedingungen das 7-Bromindol-DKP **332** mit einer Ausbeute von 72 % prenyliert werden konnte (sowie auch das 5-Bromindol **273**, Kapitel 5.3.2.1–Schema 54), scheint insbesondere die 4-Position des Indols für die Suzuki-Kupplung inaktiviert zu sein. Eine mögliche Ursache dessen könnten sterische Hinderungen sein, die sich zwar für das 4-substituierte Indol **331** ergeben, jedoch nicht für das 4-bromierte HHP **322** (Abbildung 62).

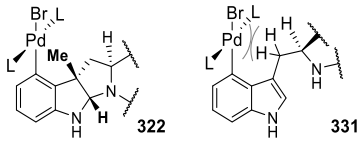


Abbildung 62: Schematische Darstellung des Übergangszustands innerhalb der Suzuki-Kupplung nach oxidativer Addition des Arylhalogenids, welche aufgrund der sterischen Hinderung beim 4-Bromindol **331** nur erschwert stattfindet, im Vergleich zum Pyrroloindol **322**.

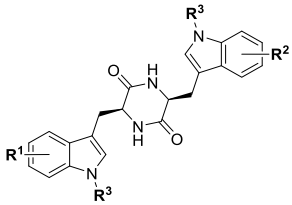
Zwar ist die HHP-Verbindung aufgrund des rigiden Molekülgerüsts deutlich starrer als die Indolverbindung, jedoch führt die Zyklisierung zum Pyrroloindol zur Bildung eines quartären *C3*-Kohlenstoffs. Aufgrund der sp^3-Hybridisierung des Stereozentrums liegt die benachbarte Methyleneinheit nicht mehr in derselben Ebene wie der Benzolring, wie es beim aromatischen und planaren Indol-System der Fall ist. Die Anlagerung des raumgreifenden Palladiumkatalysators samt Liganden in 4-Position kann daher beim HHP **322** stattfinden. Von einer Optimierung der Reaktionsbedingungen durch z. B. sterisch weniger anspruchsvolle Liganden/Katalysatoren wurde an dieser Stelle abgesehen, da bei einer erfolgreichen (doppelten) Methylierung ohnehin ausschließlich die HHP-Bromide eingesetzt würden. Aufgrund der geringen Ausbeute in der Enzymreaktion zum doppelt-methylierten Produkt **336** wurde an diesem Punkt auch auf die *N*-Methylierung verzichtet. Demnach wurde abschließend kein Derivat des Naturstoffs Lansai-B (**29**) erhalten.

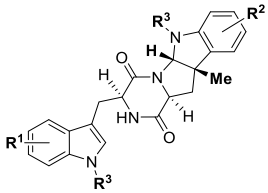
Es wurden somit einige halogenierte und prenylierte HHP-Derivate erhalten. Die enzymatische Umsetzung der derivatisierten Diketopiperazine erfolgte nur in moderaten Ausbeuten und eine mit dem 5-Brom-HHP **284** vergleichbare Ausbeute konnte nicht reproduziert werden. Die Methyltransferase SgMT scheint daher nicht universell auf die Herstellung von Lansai-B-Derivaten anwendbar zu sein. Für die Prenylierung über die Suzuki-Kupplung konnten ebenfalls Grenzen ermittelt werden, da diese nicht für 4-Bromindole (wie z. B. **331**) verwendet werden kann. Allerdings würde sich bei vollständigem Umsatz zum doppelt-methylierten DKP diese Problematik nicht ergeben.

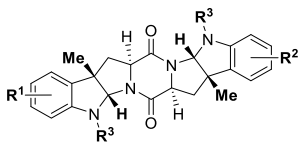
Für die erfolgreiche chemoenzymatische Totalsynthese von Lansai-B-Derivaten wird daher eine Optimierung der Reaktionsbedingungen bzw. der Methyltransferase benötigt. Durch die Vergrößerung der Enzymkavität könnte beispielsweise mehr Platz für die angefügten Substituenten bereitgestellt und somit die Affinität des Enzyms gegenüber den DKP-Derivaten erhöht werden. Dieser Ansatz wurde von M. Haase bereits verfolgt, welche über *rational design* bestimmte Aminosäuren des Enzyms mutiert und die Enzymaktivität der generierten Varianten über den Glo-Assay bestimmt hat. Es konnten zum Zeitpunkt dieser Arbeit jedoch keine signifikanten Verbesserungen ermittelt werden.

5.3.5. Aktivität der hergestellen DKPs gegen verschiedene Zelllinien

Die hergestellten Diketopiperazine (Abbildung 63) wurden von den Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe von N. Teusch (HHU - Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie) hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität untersucht. Da Lansai-B (**29**) eine schwache Aktivität gegenüber Lymphomen aufweist,[62] wurden für diese Untersuchung die Zytotoxizität gegenüber den Zelllinien Ramos (B-Lymphozyten) und HL-60 (Promyelozyten) bestimmt.[241]







R^1	R^2	R^3	Verbindung
H	H	H	**253**
4-Br	H	H	**313**
4-Br	4-Br	H	**314**
5-Br	H	H	**273**
5-Br	5-Br	H	**315**
5-Prenyl	H	H	**263**
6-Br	H	H	**316**
6-Br	6-Br	H	**317**
7-Br	H	H	**318**
7-Br	7-Br	H	**319**

R^1	R^2	R^3	Verbindung
H	H	H	**261**[1]
4-Br	H	H	**331**
5-Br	H	H	**288**
7-Br	H	H	**332**
7-Prenyl	H	H	**335**

R^1	R^2	R^3	Verbindung
H	H	H	**260**
H	H	Me	**282**
4-Br	H	H	**322**
5-Br	H	H	**284**
5-Br	H	Me	**293**
5-Br	5-Br	H	**324**
5-Prenyl	H	H	**281**
5-Prenyl	H	Me	**29**
7-Br	H	H	**327**

Abbildung 63: Im Projekt Lansai-B produzierte Substanzbibliothek, welche zur Testung der Zytotoxizität an die Kooperationspartner der Arbeitsgruppe um N. Teusch gegeben wurde. [1] Das ehemalige C_α ist auf beiden Molekülseiten invertiert. Die Verbindung wurde aus der Methylierung des (*R*)-konfigurierten DKP ***ent*-253** erhalten und von M. Haase bereitgestellt.

Dazu wurde die Zellviabilität nach Behandlung mit den entsprechenden Substanzen mithilfe des PrestoBlue™-Assays bestimmt (Abbildung 64). Ca. 54 000 Zellen der entsprechenden Zelllinie wurden auf einer Mikrotiterplatte pro Vertiefung ausgesät und nach einer vierstündigen Inkubationszeit für 3 Tage einer Konzentration von 100 µM der jeweiligen Verbindung ausgesetzt. Anschließend wurde die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt, indem Resazurin hinzugegeben wurde, welches nur von lebendigen Zellen zum rot-fluoreszierenden Farbstoff Resorufin umgesetzt wird.[242, 243]

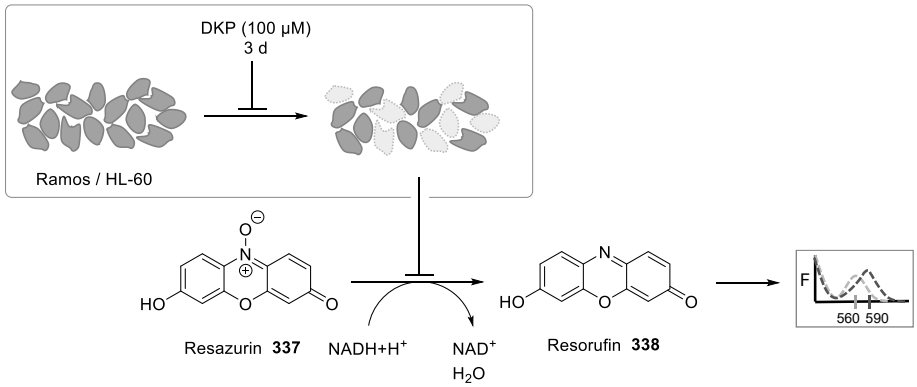


Abbildung 64: Schematische Darstellung des PrestoBlue™-Assays zur Bestimmung der Zytotoxizität der hergestellten Substanzbibliothek gegenüber den Zelllinien Ramos und HL-60 durch die Reduktion von Resazurin (**337**) (nicht-fluoreszent) zu Resorufin (**338**), welches nach Anregung (bei einer Wellenlänge von 560 nm) fluoresziert (bei einer Wellenlänge von 590 nm).[244]

Die gemessene Fluoreszenz wurde in Relation zu unbehandelten Zellen dargestellt, wobei als weitere Kontrollgruppe Zellen dienen, welche lediglich mit derselben DMSO-Konzentration behandelt wurden (Abbildung 65).

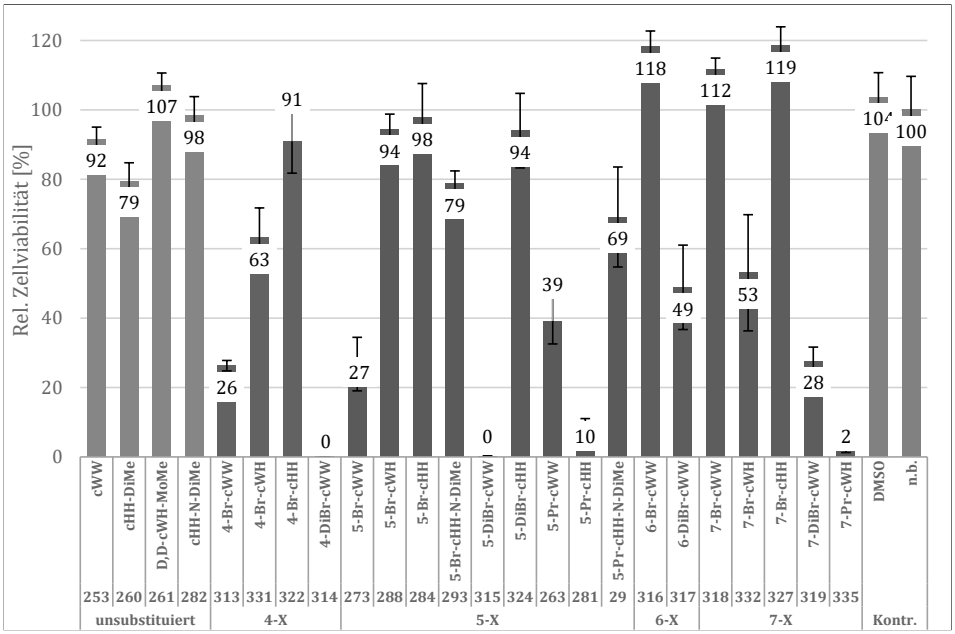


Abbildung 65: Säulendiagramm der gemessenen Zellviabilität der Ramos Zelllinie (Lymphozyten) nach Behandlung mit den hergestellten DKPs (siehe Abbildung 63), ermittelt anhand des Presto-Blue-Assays. Die Zellen wurden für 72 h einer Konzentration von 100 µM der entsprechenden Verbindung ausgesetzt. Die erhaltenen Fluoreszenz-Werte abzüglich des Blank-Wertes wurden in Relation zu den unbehandelten Zellen (n.b. – grau) gesetzt. Als weiterer Kontrollwert (Kontr.) dienen die Zellen, welche lediglich mit der gleichen Menge an DMSO behandelt wurden (DMSO – grau).

Mit einer reduzierten Zellviabilität von 69 % zeigt der Naturstoff Lansai-B **29** tatsächlich eine leichte Aktivität gegenüber der Ramos Zelllinie, jedoch wurden im Assay deutlich aktivere Verbindungen gefunden. Im Vergleich mit der Vorstufe des Naturstoffs **281** (10 %) zeigt sich, dass die *N*-Methylierung nicht förderlich zu sein scheint. Insgesamt zeichnet sich ein Trend ab, dass vor allem die bromierten Verbindungen zu einem starken Verlust der Zellviabilität führen, wobei insbesondere die doppelt-bromierten DKP (**314**, **315** und **317, 319**) einen stärkeren Effekt hervorrufen als die einfach-bromierten DKP (**313, 273**, **316**, **318**). Beispielsweise führt die Behandlung mit dem einfach-4-bromierten Indol **313** zu einer rel. Zellviab. von 26 %, während das zweifach-4-bromierte Indol **314** zum Verlust aller lebenden Zellen führt (0 %). Dieses Muster spiegelt sich mit vergleichbaren Werten bei der 5-halogenierten Reihe (**273**: 27 %, **315**: 0 %) sowie bei den 6- und 7-bromierten Verbindungen wider. Weiterhin kann beobachtet werden, dass die Methylierung und Zyklisierung nur in wenigen Fällen zu einer höheren Aktivität führt. Bei den 4-und 5-bromierten Verbindungen bewirkt die Umsetzung zum HHP in einigen Fällen den vollständigen Verlust der Aktivität (**322**, **288**, **284**, **324**). Lediglich bei den prenylierten Verbindungen **281** und **335** führt die Bildung des HHP-Systems zu einer geringeren Zellviabilität. In den folgenden Experimenten zur Messung der IC_{50} konnte die zytotoxische Wirkung des 5-prenylierten HHP **281** jedoch nicht reproduziert werden. Die Annahme, dass die Instabilität des Moleküls die Ursache ist, wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Verbindung auch bei der Aufnahme der analytischen Daten innerhalb von kurzer Zeit zu degradieren scheint. Es konnten daher keine weiteren Daten für diese Verbindung (**281**) aufgenommen werden.

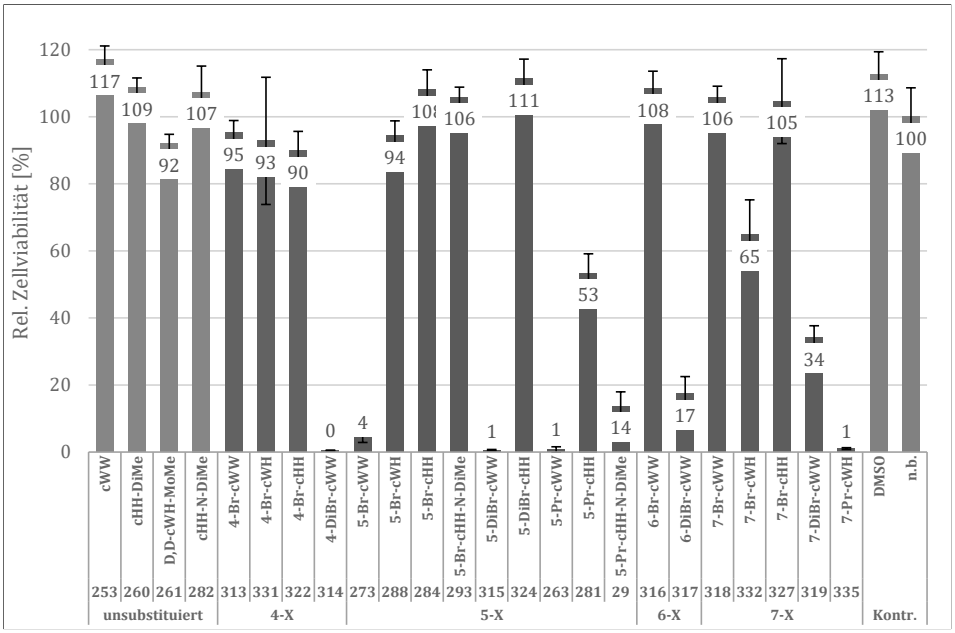


Abbildung 66: Säulendiagramm der gemessenen Zellviabilität der HL-60-Zelllinie (Promyelozyten) nach Behandlung mit den hergestellten DKPs (siehe Abbildung 63), ermittelt anhand des Presto-Blue-Assays. Die Zellen wurden für 72 h einer Konzentration von 100 µM der entsprechenden Verbindung ausgesetzt. Die erhaltenen Fluoreszenz-Werte abzüglich des Blank-Wertes wurden in Relation zu den unbehandelten Zellen (n.b. – grau) gesetzt. Als weiterer Kontrollwert (Kontr.) dienen die Zellen, welche lediglich mit der gleichen Menge an DMSO behandelt wurden (DMSO – grau).

Gegenüber der HL-60 Zelllinie setzt sich derselbe Trend fort (Abbildung 66). Mit Ausnahme von 4-Br-cWW **313** (95 %) führen viele der halogenierten Indol-DKPs zu einer geringen verbleibenden Zellviabilität mit Werten von 0-4 % (Verbindungen **263**, **273**, **314** und **315**). Das 6-dibromierte-DKP **317** mit 17 % und das 7-dibromierte DKP **319** mit 34 % weisen jedoch ebenfalls eine moderate Aktivität auf. Allerdings führte auch gegenüber der HL-60-Zelllinie die Zyklisierung zum HHP zu einer stark reduzierten Aktivität. Mit Werten von 111–65 % weisen die Verbindungen **284**, **288**, **322**, **324**, **327**, **331** und **332** somit deutlich höhere Werte auf als ihre nicht-methylierten Vertreter. Lediglich Lansai-B (**29**) und die 7-prenylierte Verbindung **335** bewirkten von den HHP-Molekülen einen starken Effekt.

Somit scheint gegenüber beiden Zelllinien die Methylierung der Diketopiperazine und die damit einhergehende Zyklisierung zum HHP nicht notwendig für die biologische Aktivität zu sein, da auch viele der nicht-zyklisierten Indole eine hohe Aktivität aufweisen. Für die entsprechenden Verbindungen, welche zu einer stark reduzierten Zellviabilität geführt haben, wurden anschließend weitere Konzentrationen getestet, um die Wirkstärke und die IC_{50} abzuschätzen. Dabei wurde für die Ramos Zelllinie allerdings nur ein Konzentrationsbereich von 100 – 30 µM mit lediglich vier Datenpunkten abgedeckt, während gegenüber der HL-60 Zelllinie sieben Datenpunkte in einem Bereich von 100 – 1 µM erhoben wurden. Im Folgenden sind die daraus berechneten IC_{50}-Werte (Tabelle 5) sowie die Substanz-Wirkungskurven (Abbildung 67 und Abbildung 68) dargestellt. Die Einzeldarstellungen der modellierten Substanz-Wirkungskurven befinden sich im Anhang (Kapitel 8.2.3 – Abbildung 82 bis Abbildung 89). Für Verbindung **273** (5-Br-cWW), welche im zuvor gezeigten Assay eine hohe

Aktivität zeigte (Abbildung 66), konnte bei der Messung der Dosis-Wirkungskurven jedoch kein reproduzierbares Ergebniss geliefert werden, weshalb für diese Verbindung auch kein IC_{50} angegeben wurde.

Tabelle 5: Berechnete IC_{50} der Verbindungen **263**, **314**, **315**, **317**, **319** und **335** gegenüber den Zelllinien Ramos (Lymphozyten) und HL-60 (Promyelozyten).

IC_{50} [µM]	**263**	**314**	**315**	**317**	**319**	**335**	**DMSO**
Ramos	n.d.	45.2	52.7	n.d.	n.d.	57.8	~200
HL-60	30.7	30.0	25.6	101.5	76.2	n.d.	~200

Die gemessenen IC_{50}-Werte gegenüber den HL-60 Zellen liegen in einem Bereich von ca. 100 bis 25 µM und es konnten für die hier gezeigten Verbindungen glaubwürdige Dosis-Wirkungskurven geplottet werden (Tabelle 5). Die Verbindungen **263**, **314** und **315** stechen mit Werten von 25 und 30 µM deutlich hervor und zeigen damit eine hohe Aktivität. Im Kurvenverlauf der Dosis-Wirkungskurve kann man jedoch erkennen, dass Verbindung **315** (12) nicht nur eine geringere IC_{50} hat, der berechnete Graph verläuft auch deutlich langsamer vom Maximal- zum Minimalwert und ist damit nicht so steil, wie die Kurve der zwei Verbindung **314** und **263** (Abbildung 67 – links). Weiterhin lässt sich anhand der Dosis-Wirkungs-Kurve der Verbindungen **317** und **319** beobachten, dass die minimale gemessene Zellviabilität nur bei etwa 20–30 % liegt (Abbildung 67 – rechts). Die daraus berechneten IC_{50}-Werte sind daher mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, da bei höheren Konzentrationen möglicherweise eine noch stärkere Wirkung erzielt werden könnte und somit auch die IC_{50} entsprechend höher ausfallen würde.

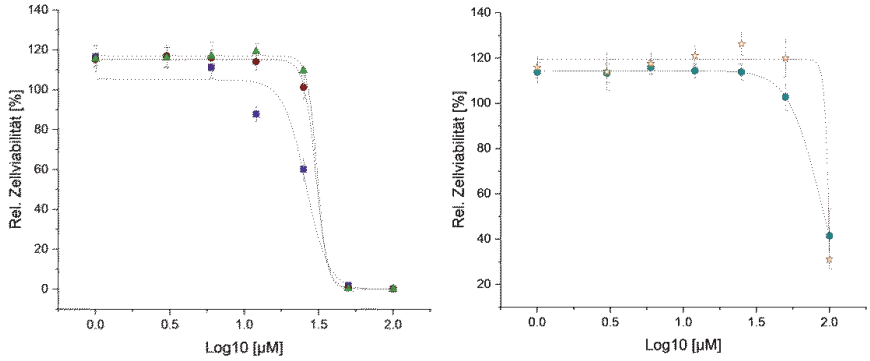


Abbildung 67: Links: Modellierte Dosis-Wirkungskurve der Verbindungen 5-DiBr-cW$_S$W$_S$-DKP **315** (blau, viereckige Punkte), 4-DiBr-cW$_S$W$_S$-DKP **314** (rot, kreisförmige Punkte) und 5-Prenyl-cW$_S$W$_S$-DKP **263** (grün, dreieckige Punkte) gegenüber der HL-60-Zelllinie. Rechts: Modellierte Dosis-Wirkungskurve der Verbindungen 7-DiBr-cW$_S$W$_S$-DKP **319** (türkis, sechseckige Punkte) und 6-DiBr-cW$_S$W$_S$-DKP **317** (orange, sternförmige Punkte) gegenüber der HL-60-Zelllinie.

Gegenüber der Ramos-Zellen wurde die IC_{50} nur für die Verbindungen **314**, **315** und **335** bestimmt, welche alle in einem Bereich von ca. 50 µM liegen. Jedoch beruht die Berechnung nur auf der Grundlage von 4 Datenpunkten, wodurch der verwendete *fit* sich stark auswirkt. Beispielsweise liegt der Messwert der Verbindung **314** bei 50 µM (Log10(50 µM)= ~1,7) deutlich außerhalb des Kurvenverlaufs. (Abbildung 68).

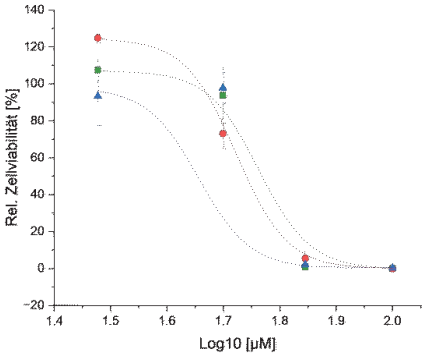


Abbildung 68: Modellierte Dosis-Wirkungskurve der Verbindungen 7-Prenyl-cW$_S$H$_S$-DKP **335** (grün-viereckige Punkte), 5-DiBr-cW$_S$W$_S$-DKP **315** (rot-kreisförmige Punkte) und 4-DiBr-cW$_S$W$_S$-DKP **314** (blau-dreickige Punkte) gegenüber der Ramos Zelllinie.

Mithilfe des PrestoBlue-Assays konnte gezeigt werden, dass die innerhalb des Projektes hergestellten Verbindungen vielversprechende Kandidaten für weitere Untersuchungen der Zytotoxizität und anderweitige physiologische Wirkungen sind. Anhand der synthetisierten Vorstufen von Lansai-B (**29**) im Zuge der Totalsynthese konnte festgestellt werden, dass nicht nur der Naturstoff selbst zytotoxische Eigenschaften gegenüber Krebszelllinien aufweist, sondern dass insbesondere die halogenierten Vorgängerverbindungen eine deutlich stärkere Wirkung hervorrufen. Dabei zeigte sich in einigen Fällen, dass die doppelt-halogenierten Verbindungen eine höhere Zytotoxizität aufweisen. Dies unterstreicht den Nutzen der Derivatisierung und legt damit einen Grundstein für weitere Untersuchungen. Die ermittelten IC_{50}-Werte liegen z. T. in einem Bereich von 25-50 µM, womit die Verbindungen in moderaten Konzentrationen die entsprechende Wirkung entfalten. Für einige Verbindungen konnten zudem keine bzw. nur unzureichende Dosis-Wirkungskurven gemessen werden, da z. B. für die enzymatisch-methylierte Verbindung **335** (7-Prenyl-cHW) keine ausreichenden Mengen produziert werden konnten.

Da die getesteten Indol-Diketopiperazine die höchste Aktivität aufwiesen und diese zudem leicht zugänglich sind, könnten auf dieser Stufe weitere Substituenten und Funktionalisierungen getestet werden. Durch die Untersuchung verschiedener weiterer Derivate könnten somit noch zusätzliche physiologisch-aktive Verbindungen gefunden werden. Da sich das Spektrum an Derivaten bisher ausschließlich auf einseitig-prenylierte sowie einseitig- und beidseitig-symmetrisch-bromierte Verbindungen beschränkt, besteht ein beträchtliches Potenzial für weitere interessante Derivatisierungsmöglichkeiten. So wurden z. B. noch keine beidseitig-prenylierten Verbindungen sowie anderweitig halogenierte Verbindungen getestet. Eine tiefgreifende Untersuchung weiterer DKPs sowie weitere Studien hinsichtlich anderer Zelllinien sind daher ratsam.

5.4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Lansai-B-Projekt konnte die Methyltransferase SgMT angewendet werden, um eine neue Syntheseroute des Naturstoffs zu etablieren. Die enzymatische Methylierung des Bis-Indol-Diketopiperazins führt zur Bildung des Pyrroloindolmotivs und ermöglicht somit den selektiven Aufbau der zwei bzw. vier Stereozentren. Damit eignet sich das Enzym in besonderem Maße, um das komplexe Kohlenstoffgerüst des Lansai-B (**29**) auf effiziente Weise aufzubauen. Im Anschluss wurde die entwickelte Totalsynthese genutzt, um weitere Derivate des Naturstoffs herzustellen und das Substratspektrum der Methyltransferase zu erweitern. Einige der neu-hergestellten Verbindungen konnten im Toxizitäts-Assay zudem aussichtsreiche Aktivitäten gegenüber verschiedenen Zelllinien zeigen (Abbildung 69).

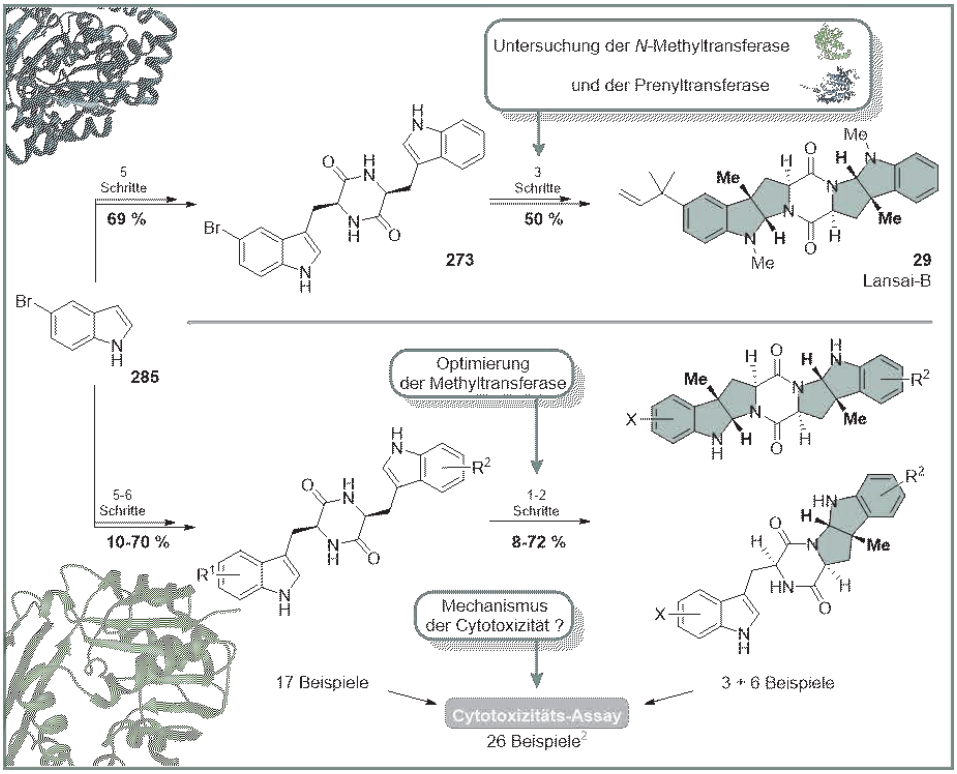


Abbildung 69: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse innerhalb des Lansai-B-Projekts sowie Anmerkungen für weitere Forschungsaspekte (grün markiert).

Die entwickelte Totalsynthese startet beim kommerziell erhältlichen Baustein 5-Bromindol **285**. In einem ersten chemoenzymatischen Schritt wird unter Einsatz der Tryptophan-Synthase die entsprechende (*S*)-Aminosäure produziert. In vier weiteren Schritten wurde anschließend das entsprechende Diketopiperazin **273** gebildet, welches als Substrat für die Methyltransferase dient. Im Anschluss an die chemoenzymatische Methylierung wurde das halogenierte Pyrroloindol durch eine Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung in 5-Position prenyliert, ehe durch *N*-Methylierung der Naturstoff **29** erhalten wurde. Mit einer Gesamtausbeute von 35 % über acht lineare Schritte konnte Lansai-B (**29**) damit in einer effizienten und kurzen Sequenz zugänglich gemacht werden. Der Brom-Substituent wurde in diesem Zusammenhang

verwendet, um die Prenylierung zu einem späten Zeitpunkt in der Synthese zu ermöglichen, wenngleich der Halogensubstituent die Methyltransferase-Aktivität deutlich herabsetzte. Für die 5-bromierte Verbindung **273** konnten zwar optimierte Reaktionsbedingungen gefunden werden, wodurch in dem enzymatischen Schritt eine Ausbeute von 79 % erzielt wurde, allerdings konnte eine solch hohe Ausbeute nicht in der Umsetzung der Substrat-Derivate erreicht werden.

In der Synthese von Lansai-B-Derivaten stellt die enzymatische Umsetzung somit einen kritischen Schritt dar. Durch Studien zur Enzym-Optimierung mithilfe von *directed evolution* oder *rational design* könnte dieser Schritt verbessert werden. Einige Positionen (N125, F184 und W182) wurden von M. Haase in Mutagenese-Studien untersucht, jedoch führte dies nur zu einer Verbesserung der ersten Methylierung, während die Enzymaktivität bei der zweiten Methylierung reduziert wurde.[239] Da die hergestellten Enzymmutanten nur hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber dem 5-Brom-DKP **273** getestet wurden, jedoch nicht gegenüber anderen Substraten, könnte eine umfassende Untersuchung die Enzymaktivität erhöhen und so das zugehörige Substratspektrum der Methyltransferase erweitern.

Trotz der eher geringen Methyltransferaseaktivität konnten drei weitere DKP-Substrate **313**, **315** und **318** auch im präparativen Maßstab vom Enzym zum Pyrroloindol umgesetzt werden. Die dadurch erhaltenen Verbindungen wie auch die vielen weiteren Diketopiperazine, welche zur Charakterisierung des Substratspektrums anhand des Glo-Assays hergestellt wurden, konnten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um N. Teusch hinsichtlich ihrer zytotoxischen Wirkung untersucht werden. Dabei stellten sich einige Verbindungen mit IC_{50}-Werten im Bereich von 25-50 µM als durchaus potente Wirkstoffkandidaten heraus, wobei insbesondere die nicht-zyklisierten Diketopiperazine hervorstechen. Inwiefern weitere Diketopiperazine somit eine noch stärkere Wirkung aufweisen, konnte innerhalb dieser Arbeit nicht beleuchtet werden, womit die Synthese weiterer Substanzen durchaus vielversprechend ist. Da bisher nur einseitig-prenylierte und einseitig- oder beidseitig-symmetrisch-bromierte Verbindungen getestet wurden, ergeben sich noch vielfältige Möglichkeiten, weitere Verbindungen zu generieren. Beispielsweise könnte sowohl das Substitutionsmuster (zweifach-asymmetrisch-bromierte oder zweifach-symmetrisch prenylierte Verbindungen) variiert oder auch die angefügten Substituenten (andere Halogensubstituenten oder diverse weitere Alkyl-/Aryl-Reste) verändert werden. Die in diesem Projekt etablierte Synthese von Diketopiperazinen über die Tryptophan-Synthase kann auf ein großes Substratspektrum erweitert werden, wodurch viele weitere Verbindungen erhalten werden können.

Ein weiterer Punkt, den es zu beleuchten gilt, ist die tiefgreifende Untersuchung über welchen Mechanismus die hier gezeigten Diketopiperazine zu ihrer zytotoxischen Wirkung gelangen. Viele weitere 2,5-Diketopiperazine sind bisher schon aus Bakterien und Pilzen isoliert worden, wobei das Spektrum der angefügten Reste vielseitig ist. Ein großer Teil der Verbindungen zeigte sehr unterschiedliche physiologische Effekte, wobei nur selten ein eindeutiger Mechanismus belegt werden konnte.[245]

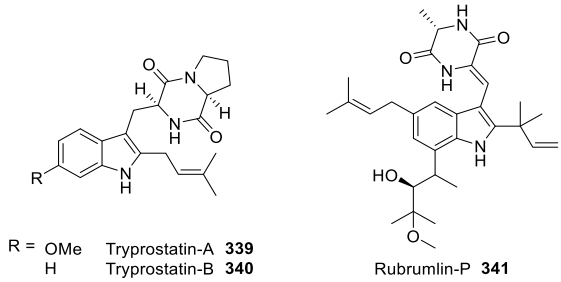


Abbildung 70: Chemische Struktur der indolhaltigen Diketopiperazine Tryprostatin-A (**339**) und -B (**340**) sowie Rubrumlin-P (**341**).

Beispielsweise konnte für Tryprostatin-A und -B (**339** und **340**) (Abbildung 70), welche neben dem charakteristischen Diketopiperazinring auch einen prenylierten Indolring sowie einen Pyrrolring enthalten, eine inhibitorische Aktivität innerhalb der G2/M-Phase belegt werden, wodurch die Progression im Zellzyklus verhindert wird.[246-249] Zudem konnte für Tryprostatin-A (**339**) eine inhibitorische Aktivität der Tubulin-Polymerisation gefunden werden.[249] Für Rubrumlin-P (**341**), ebenfalls ein 2,5-Diketopierazin bestehend aus einer prenylierten Tryptophan-Einheit, wurde vermutet, dass der zytotoxische Effekt durch Induktion von Apoptose ausgelöst wird, jedoch konnte dies bislang nicht belegt werden.[250] Zwar unterscheiden sich die chemischen Strukturen dieser Naturstoffe in einigen Belangen von den hier synthetisierten Verbindungen, jedoch könnten dies Anhaltspunkte sein, um den zytotoxischen Wirkmechanismus zu erkunden.

Im Zuge dieser Arbeit wurde zudem eine Reihe verschiedener Verbindungen synthetisiert, welche Substrate für die C-Methyltransferase sowie auch für die *N*-Methyltransferase und Prenyltransferase sein können. Im initialen *screening* der *C3*-Methyltransferase konnte gezeigt werden, dass die Methyltransferase das unsubstituierte cW_SW_S-DKP **253** als bevorzugtes Substrat am besten umsetzt. Dadurch konnte abgeleitet werden, dass die weiteren enzymatischen Modifizierungen, wie die *C5*-Prenylierung und die *N*-Methylierung, erst im Anschluss an die *C3*-Methylierung erfolgen. Zum Zeitpunkt, als diese Arbeit verfasst wird, wurden am Institut von M. Haase sowohl die Prenyltransferase als auch die *N*-Methyltransferase fortführend untersucht, um den exakten Biosyntheseweg zum Lansai-B (**29**) aufzuklären. Dazu wurden die zwei Enzyme heterolog exprimiert und mit den innerhalb dieser Arbeit hergestellten Verbindungen **260**, **282** und **281** versetzt. Vorläufige Ergebnisse zeigten, dass nach der Bildung des HHP-Gerüsts zunächst die Indolin-Stickstoffe methyliert werden und erst zuletzt die 5-Prenyleinheit angefügt wird (Abbildung 71).

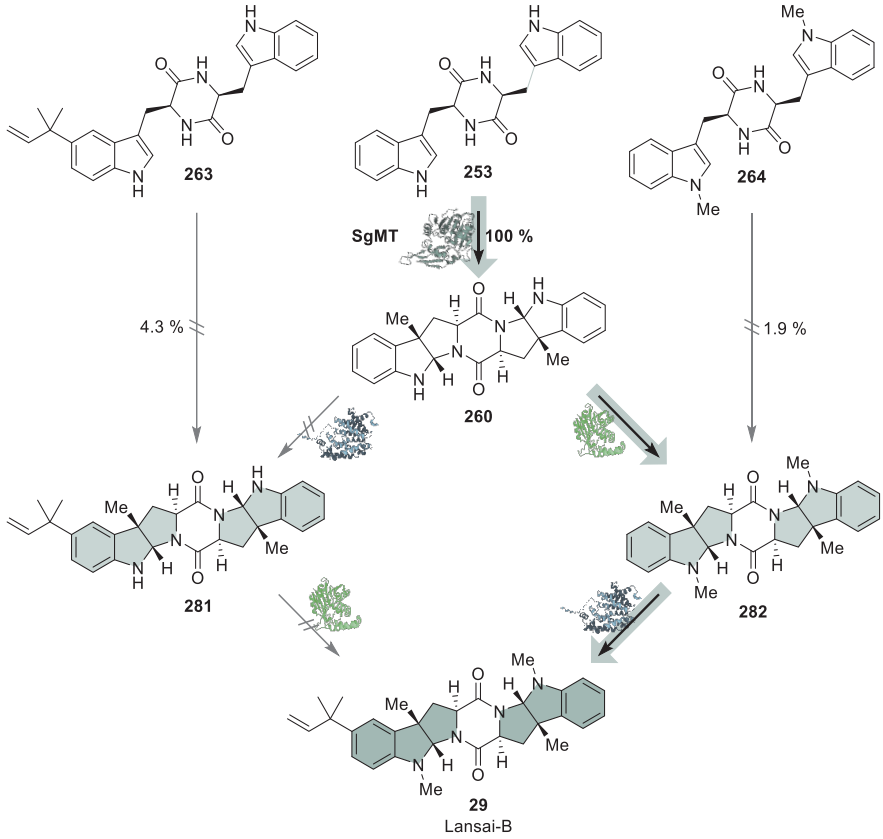


Abbildung 71: Innerhalb von dieser Arbeit synthetisierte Verbindungen, welche als Enzymsubstrate für die *C3*-Methyltransferase, *N*-Methyltransferase und 5-Prenyltransferase genutzt werden können. Im Glo-Assay (Kapitel 5.3.2.2) zeigte die *C3*-Methyltransferase die dargestellten relativen Enzymaktivitäten gegenüber den Substraten **253**, **263** und **264**. In vorläufigen Experimenten konnte für die *N*-Methyltransferase bzw. Prenyltransferase eine Enzymaktivität gegenüber HHP **260** bzw. **282** beobachtet werden. Daraus resultiert, dass Lansai-B (**29**) vermutlich über die fett-dargestellte Biosyntheseroute erreicht wird (unveröffentlichte Ergebnisse von M. Haase).

Die entsprechende Prenyltransferase und *N*-Methyltransferase stellen damit zwei ebenfalls interessante Enzyme dar. Insbesondere die Selektivität der Prenyltransferase ist an dieser Stelle bemerkenswert, da nach der *C3*- und *N*-Methylierung ein symmetrisches Molekül erhalten wird. Da Lansai-B jedoch nur auf einer Moleküldomäne prenyliert wird, enthält das Enzym einen Mechanismus, welcher die selektive, einseitige Prenylierung ermöglicht.

Aufgrund des synthetischen Nutzens werden weitere Prenyltransferasen zudem von S. Przetak untersucht. Im Gegensatz zu der Lansai-B-zugehörigen Prenyltransferase transferieren diese Enzyme den Prenylrest dabei nicht auf die *C5*-Position, sondern auf die *C3*-Position. Dadurch bewirkt die Prenylierung, ähnlich wie die *C3*-Methyltransferase, zugleich die Zyklisierung zum Pyrroloindolring. Die Anwendung einer solchen Prenyltransferase und der in diesem Projekt beschriebenen Methyltransferase könnte somit für eine Totalsynthese von Nocardioazin-B (**213**) genutzt werden.

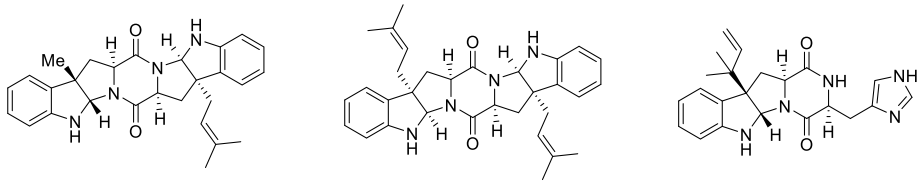


Abbildung 72: Chemische Struktur der prenylierten Pyrroloindol-Naturstoffe Nocardioazin-B (**213**), Streptoazin-C (**342**) und Roquefortin-D (**343**).[251, 252]

Weitere bekannte Naturstoffe, welche das *C3*-Prenyl-Pyrroloindolmotiv beinhalten und dadurch mithilfe einer Prenyltransferase totalsynthetisch zugänglich sein könnten, sind Streptoazin-C (**342**) oder Roquefortine-D (**343**) (Abbildung 72).[251, 252]

6. ABSCHLUSS

Innerhalb dieser Arbeit wurden für drei verschiedene Naturstoffe unterschiedliche Methoden angewandt, um Derivate der entsprechenden Verbindungen zu erhalten (Abbildung 73). Es wurden sowohl totalsynthetische, biokatalytische und biotechnologische Methoden angewandt. Natürlich ist der Erfolg der einzelnen Methoden zwischen den verschiedenen Naturstoffmotiven aufgrund der unterschiedlichen Moleküleigenschaften nur schwer vergleichbar, dennoch konnten einige positive und negative Rückschlüsse gezogen werden. Diese sollen im Folgenden noch einmal abschließend erläutert werden.

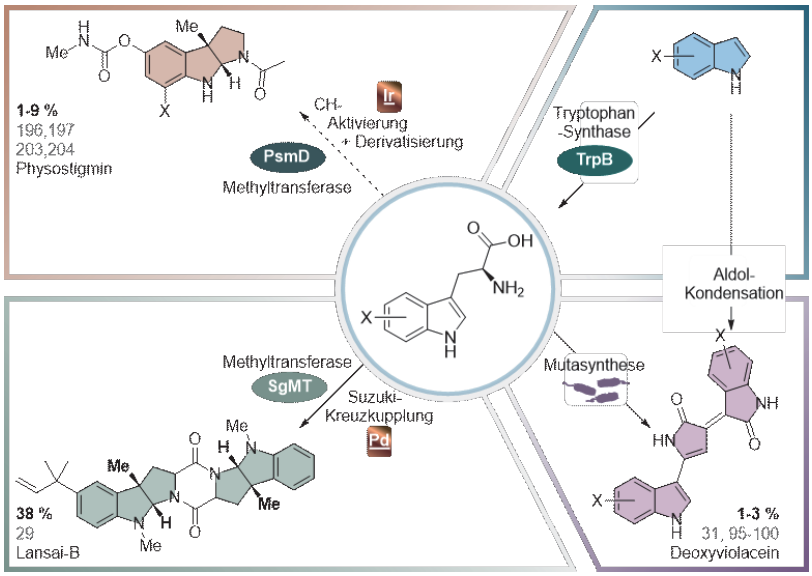


Abbildung 73: Zusammenfassung der verschiedenen, in dieser Arbeit angewandten Methoden, um neue Derivate von naturstoffinspirierten Wirkstoffen zu erhalten.

Im Deoxyviolacein-Projekt wurde die entsprechende Verbindung sowie Derivate dessen einerseits über eine publizierte Totalsynthese hergestellt und andererseits in einer (mutasynthetischen) Biosynthese in *P. putida* KT2440 produziert. Die Zielverbindung ist jedoch aufgrund ihrer geringen Löslichkeit schwer zu handhaben, was insbesondere die Produktisolation erschwert hat und damit bei beiden angewandten Methoden zu Ausbeuteeinbußen führte. Über eine Aldol-Kondensation konnten in der Totalsynthese zwar die anvisierten Verbindungen hergestellt werden, jedoch sind die Gesamtausbeuten von ca. 1-3 % sehr gering. Um dies zu umgehen, sollte eine möglichst nebenproduktfreie Produktion des Naturstoffs gewährleistet sein. Die Entwicklung einer neuen Produktions-Plattform über die genomische Integration der Biosynthese-Gene in Trp-auxotrophe *P. putida* Stämme sollte daher die Möglichkeit bieten, derivatisierte Verbindungen (**95-100**) unter Ausschluss des unsubstituierten Naturstoffs **31** zu erhalten. In Zuge dessen konnten neue *P. putida* Stämme generiert werden, die Anwendung dieser führte jedoch in LB-Medium zur ungewünschten

Zielverbindung **31**. Es konnten jedoch Hinweise auf eine erfolgreiche Produktion von Naturstoff-Derivaten gefunden werden. Um die Produktion des unsubstituierten dVio **31** einzuschränken, wurden ebenfalls Kultivierungen in Minimal-Medium durchgeführt, jedoch führte dies nicht zur Produktion des violetten Pigments.

Die Erstellung einer neuen dVio-Produktions-Plattform über die Mutasynthese bedarf folglich einer sorgfältigen Optimierung, da viele Faktoren die erfolgreiche Biosynthese des Naturstoffs beeinflussen können, wie z. B. die Optimierung der Kultivierungsbedingungen oder die Substratpromiskuität der entsprechenden Enzyme. Nach der arbeitsaufwendigen Etablierung einer solchen Methode, können damit auf einfachem Wege schnell viele Molekülderivate zugänglich gemacht werden. Dies spiegelt sich ebenfalls in der Optimierung der Tryptophan-Synthase wider, welche sowohl im Deoxyviolacein- als auch im Lansai-B-Projekt angewendet wurde.

Funktionalisierte Tryptophanverbindungen können über eine mehrschrittige Synthese aus der Aminosäure selbst durch Iridium-katalysierte CH-Aktivierung erhalten werden. Dazu müssen entsprechende funktionelle Gruppen, wie die Carboxy- und Aminofunktion, adäquat geschützt werden. Die Einführung und Abspaltung dieser PGs sowie die Funktionalisierung selbst führt leicht zu einer mehrschrittigen Synthese. Im Gegenzug dazu wurde die Tryptophan-Synthase in zahlreichen Publikationen untersucht sowie biotechnologisch optimiert und bietet dadurch die Möglichkeit innerhalb nur eines Schrittes funktionalisierte Tryptophane ausgehend von entsprechenden Indolen zu produzieren. Dies bestätigt, dass eine tiefgreifende Erkundung solcher biosynthetischen Prozesse einen großen Mehrwert bieten kann. Dabei führt dies nicht unbedingt nur zu einer Verkürzung des synthetischen Aufwands, es können auf diese Weise auch Reaktionen und Selektivitäten ermöglicht werden, welche mit chemischen Methoden in diesem Rahmen nicht erreichbar sind.

Die Methyltransferasen SgMT und PsmD sind gute Beispiele dafür, dass die dreidimensionale Struktur der Enzyme eine ausgezeichnete Selektivität hervorruft, wie sie mit Übergangsmetall-Katalysatoren nur schwer zu imitieren ist. Die von den Enzymen katalysierte Reaktion knüpft eine C-C-Bindung und ermöglicht so den Aufbau eines komplexen Molekülgerüsts in nur einem einzigen Schritt. Eine vergleichbare Methode ist mit chemischen Mitteln derzeit nicht bekannt. Allerdings konnten auch in diesen chemoenzymatischen Ansätzen Nachteile aufgezeigt werden, da die Enzyme aufgrund ihrer spezifischen Substrat- Enzym-Interaktion nur wenig Raum für die Umsetzung von derivatisierten Substraten zeigen. Durch *directed evolution* oder andere weitere biotechnologische Methoden kann das Substratspektrum jedoch erweitert werden, wobei dieser Prozess langwierig sein kann und nicht zwangsläufig zum gewünschten Resultat führt. Mit Ausbeuten von 1-9 % konnten innerhalb des Physostigmin-Projekts vier weitere derivatisierte Vorläufer des Naturstoffs hergestellt werden, welche in einem vergleichbaren Rahmen die AChE und BChE inhibieren. Besonders erfolgreich war die Anwendung der Methyltransferase im Lansai-B Projekt, indem eine neue, effiziente Totalsynthese etabliert werden konnte, welche den Naturstoff mit einer Ausbeute von 38 % in acht Schritten bereitstellt. Zwar konnten weitere Derivate über diese Route nicht bis zum finalen Endprodukt umgesetzt werden, jedoch konnte festgestellt werden, dass die Intermediate der Synthese ebenfalls schon eine physiologische Wirkung aufweisen.

Sowohl innerhalb des Lansai-B-Projekts als auch des Physostigmin-Projekts konnten somit neue Einblicke in das Substratspektrum der zwei Methyltransferasen gewährt werden sowie

durch Anwendung der Methyltransferasen im präparativen Maßstab neue HHP-Verbindung hergestellt werden. Die Kombination von sowohl biokatalytischen Methoden als auch Übergangsmetall-katalysierten Kreuzkupplungen erweist sich somit als eine herausragende Strategie, um neue Strukturmotive selektiv zugänglich zu machen. Die stetige Suche nach weiteren synthetisch-wertvollen Enzymen sowie neuen Methoden zur Derivatisierung ist somit essentiell für die Synthese von naturstoffinspirierten Wirkstoffen. Da es noch eine Vielzahl unbekannter Naturstoffe mit unerforschten Effekten und Wirkungen gibt, ist die Forschung an diesem Punkt noch lange nicht am Ende. Mit dem Abschluss dieser Arbeit überlasse ich diese Freiheit allerdings der nächsten Generation von Studierenden.

Lebe heute, weil's kein Morgen gibt,
Morgen ist auch nur ein neues Jetzt.

In jedem Glanz schlummert ein Rabenschwarz,
Scheiße, dass es enden muss, doch schön, dass ich es haben darf

- ‚Höhenangst' von Schmyt -

7. EXPERIMENTELLER TEIL

7.1. Allgemeines

Lösungsmittel und Chemikalien

Chemikalien und Lösungsmittel wurden von kommerziellen Herstellern wie *Sigma-Aldrich* (St. Louis, USA), *Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland) oder *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, USA) bezogen. Lösungsmittel wie Aceton, Dichlormethan (DCM), Diethylether, Essigsäureethylester (EE) und Petrolether (PE) wurden in technischer Reinheit bezogen, mithilfe eines Rotatiotionsverdampfers destilliert und für die Verwendung in Reaktionen anhand einer Lösungsmitteltrocknungsanlage der Firma *MBraun* (*MB SPS*-800) getrocknet. Methanol wurde mithilfe von aktiviertem Molsieb (3 Å) getrocknet. Wasserfreie Reagenzien wurden, je nach Hersteller-Angabe, unter Argon in einem Kühlschrank oder Gefrierschrank gelagert. Alle weiteren Chemikalien wurden, wenn nicht anders beschrieben, unverändert für Reaktionen verwendet.

Verbrauchsmaterialien

Diverse Verbrauchsmaterialien zur einmaligen Benutzung wurden z. T. bei unterschiedlichen Herstellern erworben. Vorwiegend wurden sterile Spritzen (1, 2, 5, 10 und 25 mL) und Kanülen von *B. Braun Melsungen* (Melsungen, Deutschland), Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße von *neoLab Migge GmbH* (Heidelberg, Deutschland) sowie Mikrotiterplatten von *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, USA) bezogen. Dünnschichtchromatographie-(DC-) Platten zur Reaktionskontrolle sowie zur Beobachtung der chromatographischen Aufreinigung wurden von *Machery-Nagel* (Düren, Deutschland) bezogen. DC-Platten wurden anschließend unter einer UV-Lampe (*Prinz Verlag GmbH*, Passau Deutschland) ausgewertet und gegebenenfalls mit einer der folgenden Färbelösungen unter Verwendung eines Heißluftföhns angefärbt:

Kaliumpermanganat-Lösung:	1.5 g $KMnO_4$, 10 g K_2CO_3, 1.25 mL NaOH (10 %), 200 mL H_2O
Molybdän-Lösung:	2.5 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$, 1 g $(NH_4)_4Ce(SO_4)_4 \cdot 2\ H_2O$, 10 mL H_2SO_4, 90 mL H_2O
Ninhydrin-Lösung:	0.1 g Ninhydrin, 0.5 mL HOAc, 100 mL Aceton
Eisen-Lösung:	5 g $FeCl_3$, 250 mL Methanol, 250 mL H_2O

Inertes Arbeiten

Reaktionen, welche in trockenem Lösungsmittel und/oder unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt wurden, wurden mithilfe der Schlenktechnik angesetzt. Dazu verwendete Schlenkrohre/-kolben wurden für mindestens 12 Stunden in einem Trockenschrank bei 110 °C gelagert. Bei Benutzung wurden diese über eine Vakuumpumpe bei gleichzeitigem Erhitzen mit einem Heißluftgebläse für mehrere Minuten evakuiert und anschließend mit Inertgas

(Stickstoff oder Argon) befüllt. Dieser Prozess wurde mehrmals wiederholt. Die Glasgeräte wurden unter Inertgas-Atmosphäre abgekühlt und für nachfolgende Reaktionen mit einem Septum verschlossen. Lösungsmittel und Chemikalien wurden ausschließlich im Gegenstrom von Inertgas hinzugegeben. Flüssigkeiten wurden dabei mit einer Spritze injiziert, wobei diese zuvor ebenfalls 3-mal mit Inertgas gespült wurde.

Entgasen von Lösungsmitteln

Für Reaktionen, welche in entgastem Lösungsmittel durchgeführt wurden, wurde das Lösungsmittel in Abhängigkeit von der benötigten Menge mithilfe von *freeze-pump-thaw* oder im Ultraschallbad entgast.

Geringe Mengen eines Lösungsmittels (< 50 mL) wurden mittels *freeze-pump-thaw* entgast. Dazu wurde das Lösungsmittel in flüssigem Stickstoff eingefroren und, wenn das gesamte Lösungsmittel gefroren ist, der Kolben für mehrere min sekuriert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum bei Raumtemperatur aufgetaut. Dieser Prozess wurde mindestens 5-mal wiederholt. Anschließend wurde das aufgetaute Lösungsmittel unter Schutzgasatmosphäre gelagert und innerhalb eines Tages verwendet.

Größere Mengen eines Lösungsmittels (> 50 mL) wurden im Ultraschallbad entgast. Dazu wurde ein leichtes Vakuum über das Lösungsmittel angesetzt und der Kolben mit Ultraschall behandelt. Gleichzeitig wurde Inertgas mithilfe einer Kanüle in das Lösungsmittel eingeführt. Dieser Prozess wurde für 10 Minuten durchgeführt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter Schutzgasatmosphäre gelagert und innerhalb eines Tages verwendet.

Analytische Geräte

^{1}H-, ^{13}C-, HSQC-, HMBC-, COSY-, DEPT-135 und ROESY-Spektren wurden entsprechend der angegebenen Frequenz an einem der folgenden NMR-Spektrometer gemessen:

700 / 176 MHz: *Bruker AVANCE III HD* (*Bruker,* Billerica, USA)

500 / 151 MHz: *Bruker Avance/DRX 600* (*Bruker,* Billerica, USA)

300 / 76 MHz: *Bruker Avance/DRX 300* (*Bruker,* Billerica, USA)

Die Signale des jeweiligen deuterierten Lösungsmittels dienten als Referenz für die ^{1}H und ^{13}C-NMR-Spektren.[253] Die Auswertung erfolgte mithilfe des Programms *MestreNova* (*Mestrelab Research,* Barcelona, Spanien) ausgewertet. Hochaufgelöste Massenspektren wurden an einem *UHR-QTOF maXis 4G* (*Bruker,* Billerica, USA) oder *Finnigan LCQ Deca* (*Thermo Fisher Scientific,* Waltham, USA) an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf aufgenommen. IR-Spektren wurden an einem *SpectrumTwo FT-IR* (*PerkinElmer, Waltham, USA*) mit abgeschwächter Totalreflexion (ATR) aufgenommen. Die Absorptionsbanden wurden als Wellenzahlen angegeben (cm^{-1}). Angegebene Schmelzpunkte wurden an einem *Schmelzpunkt B-540* (*Büchi Labortechnik GmbH,* Essen, Deutschland) bestimmt. Drehwerte wurden an einem *P800-TF* (*KRÜSS GmbH,* Hamburg, Deutschland) bestimmt. Eingesetzte Chemikalien wurden an den Waagen *PBA2241* (*Sartorius AG*, Göttingen, Deutschland) und *A 120 S* (*Sartorius AG*, Göttingen, Deutschland) abgewogen. Absorptionen wurden an einem *NanoDrop 2000c* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA) oder *Tecan Infinite® M1000* (*Tecan Group AG*, Männedorf, Schweiz) gemessen.

HPLC-PDA Messungen wurden an einer HPLC der *LC-10Ai series* (*Shimadzu GmbH*, Duisburg, Germany) durchgeführt, ausgestattet mit einem *SPD-M10Avp photodiode array detector* (PDA) (*Shimadzu GmbH*, Duisburg, Germany) und einer *ISAspher 100-5 C18 AQ* (125 x 4 mm)-Säule (*ISERA GmbH*, Düren, Deutschland). Dabei wurde der Säulenofen auf 30 °C beheizt und eine Flussrate von 1 mL/min eingestellt. Als Lösungsmittel wurde Wasser/Acetonitril (55/45) (+0.1 % Ameisensäure) verwendet.

LC-MS Messungen wurden an einer LC-MS der *UltiMate 3000 series* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA) durchgeführt, ausgestattet mit einem UV-Detektor (*DAD-3000*) und einer *Atlantis T3* (3 µm, 100 x 3 mm)-Säule (*Waters GmbH,* Eschborn, Deutschland). Dazu wurde der Säulenofen (*TCC-3000SD*) auf 30 °C beheizt und eine Flussrate von 1.2 mL/min eingestellt (*LPG-3400 SD*). Es wurden die folgenden Lösungsmittelverhältnisse verwendet:

1-0 min: Wasser/Acetonitril (95/5) (+0.1 % Ameisensäure)
0-2 min: Gradient Wasser/Acetonitril (95/5→20/80) (+0.1 % Ameisensäure)
2-4.5 min: Wasser/Acetonitril (20/80) (+0.1 % Ameisensäure)
4.5-6 min: Wasser/Acetonitril (95/5) (+0.1 % Ameisensäure)

Reversed-phase Aufreinigungen wurden an einer FPLC der *P-900 series* (*Amersham plc*, Amersham, Niederlande) durchgeführt, ausgestattet mit einem UV-Detektor (*UV-900*), einem pH/Leitfähigkeits-Detektor (*pH/C-900*) und einem Fraktionssammler (*Frac-900*) sowie einem *X-LC 3080DG* Entgaser (*JASCO Inc.*, Easton, USA) und einer *ISAspher 100-5 C18 AQ* (250 x 8 mm)-Säule (*ISERA GmbH*, Düren, Deutschland). Dazu wurde der Säulenofen auf 30 °C beheizt und eine Flussrate von 1 mL/min eingestellt. Als Lösungsmittel wurde Wasser/Acetonitril (55/45) (+0.1% Ameisensäure) verwendet.

Enzyme, Plasmide und Mikroorganismen

Die im Ellmans-Assay verwendete AChE (aus *E. electricus*) sowie die BChE (aus Pferdeserum) wurden von *Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Synthetische Gene wurden bei *GenScript Biotech* (Piscataway, USA) bestellt. Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Organismen aufgelistet, welche eigens oder von den genannten Kooperationspartnern zur Proteinexpression genutzt wurden.

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Plasmide mit Genotyp und Herkunft.

Plasmid	**Genotyp**	**Herkunft**
pET-22b(+)-TrpB^{Pf0A9}	*f1 ori*, *Amp*^{R}, *ori, lacI, rop, T7-Promotor, TrpB*^{Pf0A9}(C-His$_6$)	*GenScript Biotech* (Piscataway, USA)
pET-22b(+)-TrpB^{Tm2F3}	*f1 ori*, *Amp*^{R}, *ori, lacI, rop, T7-Promotor, TrpB*^{Tm2F3}(C-His$_6$)	*GenScript Biotech* (Piscataway, USA)
pET-28a(+)-SgMT	*f1 ori*, Km^{R}, *ori, lacI, rop, T7-Promotor, SgMT*	M. Haase[231]
pET-21a(+)-PsmD_Sa	*f1 ori*, *Amp*^{R}, *ori, lacI, rop, T7-Promotor, PsmD_Sa*	D. Amariei[191]

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Organismen mit Genotyp und Herkunft sowie dessen Verwendung.

Organismus	Genotyp	Herkunft	Verwendung
E. coli BL21 (DE3)	*F- ompT gal dcm lon hsdSB(r_{B^-} m_{B^-}) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K- 12(λS)*	*Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland)	Protein-expression von $TrpB^{Pf0A9}$, $TrpB^{Tm2F3}$, SgMT
E. coli BL21 Gold	*F- ompT hsdS(r_{B^-} m_{B^-}) dcm+ Tet^R gal endA Hte*	*Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland)	Protein-expression PsmD, HMT
E. coli DH5α	*F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*	*Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland)	Klonierung
P. putida KT2440 RW25-D	KT2440:16S-pad-D-*vioABCDE*, Tc^R	R. Weihmann[146]	Mutasynthese
P. putida KT2440 RW25-D_Δ*trpDC*	KT2440: 16S-pad-D-*vioABCDE*, *ΔtrpDC*, Tc^R	M. Spindler (nicht publiziert)	Mutasynthese
P. putida KT2440 RW25-D1	KT2440: 16S-pad-D-*vioBCDE, rebO* Tc^R	C. Gronkowsky[153]	Mutasynthese
P. putida KT2440 RW25-D1_Δ*trpDC*	KT2440: 16S-pad-D-*vioBCDE, rebO ΔtrpDC*, Tc^R	C. Gronkowsky[153]	Mutasynthese
P. putida KT2440 RW25-D2_Δ*trpDC*	KT2440: 16S-pad-D-*vioCDE, rebOD ΔtrpDC*, Tc^R	A. Loeschcke (nicht publiziert)	Mutasynthese

7.2. Mikrobiologische und proteinbiochemische Methoden

Die hier beschriebenen Methoden wurden vom Autor eigenständig durchgeführt. Einige der zuvor beschriebenen Ergebnisse beruhen jedoch auf den Methoden der Kooperationspartner M. Haase, D. Amariei, R. Weihmann, C. Gronkowsky und A. Loeschcke. Diese Methoden wurden in den entsprechenden Abschlussarbeiten beschrieben und sind somit in dieser Arbeit nicht enthalten.[146, 153, 254, 255]

7.2.1. Vorbereitete Medien und Stammlösungen

Komplexmedien zur Kultivierung von Mikroorganismen

Die Anzucht der Bakterien wurde in den folgenden Nährmedien durchgeführt. Zur Herstellung von Festmedium wurde dem Nährmedium 15 g/L Agar-Agar hinzugegeben. Die vorbereiteten LB- und TB-Medien wurden vor der Benutzung in geeigneten Gefäßen für 20 min bei 200 kPa und 121 °C in einem Autoklav (*Laboklav 135-V, SHP, Scientifique SAS*, Taverny, Frankreich) sterilisiert. Beim MSM wurden hingegen die vier Lösungen einzeln autoklaviert und erst unmittelbar vor der Benutzung entsprechend der Zusammensetzung vermengt.

Tabelle 8: Verwendete Komplexmedien und deren Zusammensetzung zur Anzucht von Bakterien

Medium	**Zusammensetzung**
LB-Medium (*Lysogeny-Broth*)	5 g/L Hefeextrakt 10 g/L Trypton 10 g/L NaCl aufgefüllt mit dest. H_2O auf ein Volumen von 1 L
TB-Medium (TB) (*Terrific-Broth*)	60 g/L kommerzielles TB-Medium Pulver (*Carl Roth GmbH & Co. KG*, Karlsruhe, Deutschland) 4 mL Gylcerol aufgefüllt mit dest. H_2O auf ein Volumen von 1 L
Mineral Salt Medium (MSM)[156]	10 mL/L 100x-KP_i-Puffer (pH 7.0, 3.6 M) 10 mL/L NH_4SO_4-Lösung (200 g/L) 12.5 mL/L Glukose-Lösung (2 M) 10 mL/L Spurenelement-Lösung: 1 g/L EDTA (als erstes in 25 mL anlösen unter Zugabe von wenigen Tropfen NaOH (10 M) 10 g/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 200 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 100 mg/L $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ 500 mg/L $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 20 mg/L $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ 20 mg/L $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ 40 mg/L $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ 100 mg/L $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ aufgefüllt mit dest. H_2O auf ein Volumen von 1 L und mit konz. HCl auf einen pH-Wert von 4 adjustiert aufgefüllt mit dest. H_2O auf ein Volumen von 1 L

Stammlösungen zur Kultivierung von Mikroorganismen

Die Anzucht von Bakterien wurde durch den Einsatz der folgenden Stammlösungen unterstützt. Alle Lösungen wurden durch Sterilfiltration (Spritzenvorsatzfilter, 0.2 µm) sterilisiert. Flüssigmedien wurden die Antibiotika erst unmittelbar vor der Verwendung zugesetzt. Bei Festmedien erfolgte die Zugabe nach dem Schmelzen des Mediums (bei einer Temperatur von unter ~50 °C), sodass anschließend das Festmedium in Petrischalen zu Platten gegossen werden konnte.

Tabelle 9: Verwendete Stammlösungen und deren Zusammensetzung zur Anzucht von Bakterien.

Stammlösung	**Zusammensetzung**	**Verwendung**
Ampicillin (Amp, 1 000x)	100 mg/mL in dest. H_2O	100 µg/mL in *E. coli*
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, 1 000x)	100 mM in dest. H_2O	100 µM in *E. coli*
Irgasan (Irg, 1 000x)	25 mg/mL in dest. H_2O /Ethanol (1/2)	25 µg/mL in *P. putida*
Tetracyclin (Tet, 1 000x)	25 mg/mL in dest. H_2O /Ethanol (1/2)	25 µg/mL in *P. putida*
(*S*)-Tryptophan (Trp)*	5 mM in H_2O/DMSO (1/1) mit wenigen Tropfen NaOH (10 %)	0.2 mM in *P. putida*
(*S*)-7-Chlortryptophan (7-Cl-Trp)*	25 mM in H_2O/DMSO (1/1) mit wenigen Tropfen NaOH (10 %)	1 mM in *P. putida*

* um die Aminosäuren zu Lösen wurde das Gemisch bei 50 °C im Ultraschallbad oder Schüttler für 2-3 h inkubiert.

7.2.2. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen liegt innerhalb des Instituts ein allgemeines Protokoll vor, sodass zu jedem Zeitpunkt genügend kompetente Zellen von hinreichender Qualität vorliegen. Dazu wurden die folgenden Lösungen vorbereitet und auf 4 °C gekühlt.

Tabelle 10: Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen vorbereiteten Lösungen.

Puffer	**Zusammensetzung**
Lösung A	100 mM $MgCl_2$
Lösung B	100 mM $CaCl_2$, 15 % (*w/v*) Glycerol

Die entsprechenden Stämme wurden als Vorkultur in LB-Medium (5 mL) kultiviert, welches gegebenenfalls mit einem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde. Die Inokulation der Vorkulturen erfolgte anhand von Kryo-Proben. Die Vorkulturen wurden über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C unter Schütteln (350 rpm) inkubiert. Die anschließende Hauptkultur wurde ebenfalls in LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) (400 mL in 5 L Fernbachkolben) kultiviert und mit 2 mL der Vorkultur inokuliert. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und 130 rpm inkubiert, bis eine OD_{600} von 0.4-0.6 erreicht wurde. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 2 500 U/m bei 4 °C für 10 min geerntet und dann vorsichtig in Lösung A (10 mL) resuspendiert. Nachdem die Zellsuspension für 20-30 min auf Eis gelagert wurde, werden die Zellen erneut durch Zentrifugation bei 2 500 U/m bei 4 °C für 10 min sedimentiert. Anschließend werden die Zellen vorsichtig in Lösung B (2 mL) resuspendiert, in 50 µL-*Aliquots* in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die weitere Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die hergestellten Zellen wurden anschließend hinsichtlich potenzieller, entwickelter Antibiotika-Resistenzen untersucht, indem ein Antibiogramm erstellt wurde. Aus den Zellen wurden Übernachtkulturen angesetzt und mit den gängigen Antibiotika (Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Streptomycin, Tetracyclin) versetzt. Nur wenn in keinem der Vorkulturen die Zellen anwachsen, wurden die Zellen weiterverwendet.

Zusätzlich wurde die Transformationseffizienz (TE) der hergestellten Zellen quantifiziert. Dazu wurde der pET21a(+)-Vektor als Positivkontrolle und H_2O als Negativkontrolle verwendet. Die Zellen wurden mittels Hitzeschock-Transformation (siehe 7.2.3) mit dem Plasmid transformiert und auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Anschließend wird die Effizienz berechnet, indem die Anzahl der erhaltenen Kolonien auf einer Platte mit der absoluten Menge an ausgestrichener DNA dividiert wird.

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{Anzahl Kolonien}}{\text{Menge ausgestrichener DNA [µg]}}$$

Für *E. coli* DH5α wurde dabei eine TE von mindestens 10^5, für *E. coli* BL21 (DE3) mindestens 10^4 angestrebt.

7.2.3. Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Zellen

Zur Insertion eines Plasmids in chemisch kompetente Zellen wurden diese mithilfe der Hitzeschock-Methode transformiert. Dazu wurden chemisch kompetente Zellen für 10 min auf Eis aufgetaut, 1 µL des gewünschten Plasmids zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 90 s bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Anschließend werden die Zellen für 2 min auf Eis gekühlt, ehe 700 µL LB-Medium hinzugegeben werden und die Zellen für 1-4 h bei 37 °C inkubiert werden. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation bei 10 000 rpm für 1 min bei 25 °C geerntet, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 50 µL des Überstands resuspendiert. Die erhaltenen Zellen werden auf LB-Agar-Platten ausplattiert, welchen in Abhängigkeit vom verwendeten Plasmid das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde.

7.2.4. Heterologe Expression von Enzymen

Die entsprechenden *E. coli* Stämme (BL21 (DE3) für TrpB^{Pf0A9}, TrpB^{Tm2F3} und SgMT / BL21 Gold für PsmD und HMT), welche mit dem entsprechenden Plasmid transformiert wurden, wurden als Vorkulturen in LB-Medium (10 mL in 100 mL Erlenmeyerkolben) kultiviert. Das Medium wurde zuvor mit 100 µg/mL Ampicillin (bei pET21a, PsmD bzw. pET22b, TrpB^{Pf0A9} und TrpB^{Tm2F3}) oder 100 µg/mL Kanamycin (pET28a, HMT oder SgMT) versetzt. Die Inokulation der Vorkulturen erfolgte anhand von Kryo-Proben, welche eigens vorbereitet wurden (TrpB^{Pf0A9}, TrpB^{Tm2F3}) oder von den Kooperationspartnerinnen D. Amariei (PsmD, HMT) oder M. Haase (SgMT) bereitgestellt wurden. Die Vorkulturen wurden über Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C unter Schütteln (130 rpm) inkubiert. Die nachfolgende Expression erfolgte in TB-Medium, welches ebenfalls mit denselben Antibiotika-Konzentrationen versetzt wurde. Die Hauptkultur (500 mL in 5 L Fernbachkolben) wurde dazu mit der Vorkultur auf eine OD_{600} von 0.01 angeimpft und bei 37 °C und 130 rpm inkubiert, bis eine OD_{600} von 0.5-0.8 erreicht war. Dann wurde die Expression durch Zugabe von IPTG induziert. Die Kulturen wurden 16-20 h bei 25 °C und 130 rpm weiter inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4 000 rpm und 4 °C für 30 min geerntet, und das Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Proteinexpression wurde durch SDS-PAGE überprüft.

7.2.5. Reinigung von PsmD zur Nutzung im MTase-Glo-Assay

Die Proteinreinigung erfolgte anhand der His-*tag* mittels Nickel(II)-nitrilotriessigsäure-Säule. Die folgenden Puffer wurden dafür angesetzt.

Tabelle 11: Für die Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA-Säule vorbereitete Puffer.

Puffer	**Zusammensetzung**
Equilibrierungspuffer	50 mM KP_i, 500 mM NaCl, pH 7.5
Waschpuffer	50 mM KP_i, 500 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH 7.5
Elutionspuffer	50 mM KP_i, 500 mM NaCl, 150 mM Imidazol, pH 7.5
Säuberungspuffer	50 mM KP_i, 500 mM NaCl, 1 M Imidazol pH 7.5

Die geernteten Zellen (5 g) wurden aufgetaut (siehe 7.2.4), in KP_i-Puffer (25 mL, 50 mM, pH 7.5) resuspendiert und zu jedem Zeitpunkt auf Eis gelagert. Bei jedem Schritt wurden 60 µL entnommen, um später mithilfe einer SDS-PAGE den Reinigungserfolg nachzuvollziehen. Die resuspendierten Zellen wurden mittels Ultraschall (*SONOPULS Ultraschall Homogenisator, Bandelin electronic GmbH & Co. KG,* Berlin, Deutschland) (3 x 10 min mit je 5 min Pause, 35 % Intensität, 5 x 10 % Zyklus) bei 4 °C aufgeschlossen und anschließend bei 10 000 rpm für 45 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend weiterverwendet. Die Ni-NTA-Säule (*Superflow Cartridge, Qiagen GmbH*, Hilden, Deutschland) wurde vorbereitet, indem 10 Säulenvolumina (*column volume,* CV) des Equilibrierungspuffers mit einer Peristaltikpumpe über die Säule gespült wurden. Anschließend wurde die Säule beladen, indem der Zellaufschluss-Überstand 20 min zirkulierend über die Säule gepumpt wurde. Danach wurden nicht-bindende Proteine von der Säule eluiert, indem die Säule mit 5 CV des Waschpuffers gewaschen wurde. Die Elution des Zielproteins erfolgte, indem die Säule mit 3 CV des Elutionspuffers gespült wurde. Um sicherzustellen, dass sowohl das Zielprotein als auch andere bindende Proteine vollständig von der Säule eluiert werden, wurden 3 CV des Säuberungspuffers über die Säule gespült. Anschließend wurden 10 CV dest. H_2O über die Säule gepumpt, um restliche Salze zu entfernen, und die Säule zur Lagerung abschließend mit 20 % Ethanol für 10 min gespült. Alle Fraktionen einer Art wurden vereinigt und der Reinigungserfolg mittels SDS-PAGE überprüft.

Um nach der Isolation des Zielproteins das im Puffer enthaltene Imidazol zu entfernen, wurden alle proteinhaltigen Fraktionen mit einem Zentrifugalkonzentrator (*Vivaspin 20*, *Sartorius AG,* Göttingen, Deutschland) mit einem *molecular weight cut-off* von 10 kDa aufkonzentriert. Dazu wurden die Proteinlösungen in den Konzentrator gegeben und zentrifugiert (4 000 rpm, 15 min, 4 °C). Anschließend wurde das Filtrat verworfen und der Konzentrator mit KP_i-Puffer (50 mM, pH 7.5) aufgefüllt (ca. 15 mL). Der Prozess des Zentrifugierens und Wiederauffüllens wurde 2-mal wiederholt. Abschließend wurde so lange zentrifugiert bis nur noch 2-3 mL im Zentrifugalkonzentrator verbleiben. Die aufkonzentrierte und umgepufferte Proteinlösung wurde anschließend abgenommen, in entsprechenden *Aliquots* in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die weitere Verwendung bei -20 °C gelagert.

7.2.6. Vorbereitung von PsmD für präparative Reaktionen

Für die Zelllyse/Immobilisation wurden folgende Puffer verwendet.

Tabelle 12: Für die Lyse und Immobilisation angesetzten Puffer.

Puffer	**Zusammensetzung**
Reaktionspuffer	50 mM KP_i, pH 7.5
Waschpuffer	50 mM KP_i, 50 mM Imidazol, pH 7.5

Die geernteten Zellen (welche Ct_Hmt und PsmD_Sa exprimieren) (5 g) wurden aufgetaut (siehe 7.2.4), in Reaktionspuffer (25 mL, 50 mM, pH 7.5) resuspendiert und zu jedem Zeitpunkt auf Eis gelagert. Die resuspendierten Zellen wurden mittels Ultraschall (SONOPULS Ultraschall Homogenisator, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) (3 x 10 min mit je 5 min Pause, 35 % Intensität, 5 x 10 % Zyklus) bei 4 °C aufgeschlossen und anschließend bei 10 000 rpm für 45 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend weiterverwendet. Die Lysate wurden entweder direkt für Reaktionen eingesetzt oder immobilisiert.

Zur Immobilisation wurde 10 % (*v/v* in Relation zum Lysat) des Ni-NTA-Agarose-*Resin* (*Protino, Macherey-Nagel*, Düren, Deutschland) hinzugegeben und das Gemisch vorsichtig mittels Rotation bei 4 °C vermischt. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert (3 000 rpm, 2 min, 4 °C) und der Überstand abgenommen. Das *Resin* wurde vorsichtig in Waschpuffer resuspendiert, für 5 min bei 4 °C inkubiert und erneut zentrifugiert (3 000 rpm, 2 min, 4 °C). Dieser Wasch-Schritt wurde erneut wiederholt. Anschließend wurde das *Resin* in Reaktionspuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das gereinigte, immobilisierte Protein wurde dann für die Reaktion eingesetzt. Die Immobilisation wurde für beide Enzyme Hmt und PsmD gleichermaßen durchgeführt.

7.2.7. Reinigung von TrpB zur Nutzung in präparativen Reaktionen

Die Proteinreinigung der Tryptophan-Synthasen erfolgte mittels Hitzedenaturierung.

Tabelle 13: Für die Reinigung der TrpB mittels Hitzedenaturierung vorbereitete Puffer.

Puffer	**Zusammensetzung**
Lyse-Puffer	50 mM KP_i, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 200 µM PLP, 2 mM $MgCl_2$, pH 8.0 (bei 23 °C)
Reaktionspuffer	100 mM KP_i, pH 8.0 (bei 65 °C)

Die geernteten Zellen (5 g) wurden aufgetaut (siehe 7.2.4), in Lyse-Puffer (25 mL) resuspendiert und zu jedem Zeitpunkt auf Eis gelagert. Bei jedem Schritt wurden 60 µL entnommen, um später mithilfe von SDS-PAGE den Aufreinigungserfolg nachzuvollziehen. Die resuspendierten Zellen wurden mittels Ultraschall-Behandlung (*SONOPULS Ultraschall Homogenisator, Bandelin electronic GmbH & Co. KG,* Berlin, Deutschland) (3 x 10 min mit je 5 min Pause, 35 % Intensität, 5 x 10 % Zyklus) bei 4 °C aufgeschlossen. Anschließend wurde das Zelllysat für 30 min auf 70 °C erhitzt (in einem Wasserbad), wodurch hitzelabile Proteine ausfallen. Die aggregierten Proteine sowie unlösliche Bestandteile des Zellaufschlusses wurden

mittels Zentrifugation (10 000 rpm, 30 min, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Proteinkonzentration bestimmt und der Reinigungserfolg mittels SDS-PAGE nachvollzogen. Zuletzt wurde die Proteinlösung in entsprechenden *Aliquots* in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die weitere Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die Verwendung in präparativen Ansätzen wurde das Lysat bei 4 °C aufgetaut und anschließend wie in Kapitel 7.3.1.5 beschrieben eingesetzt. Der beschriebene Reaktionspuffer wurde erst beim Ansetzen Reaktion verwendet.

7.2.8. Immobilisation von SgMT für präparative Reakionen

Für die Zelllyse/Immobilisation wurden folgende Puffer verwendet.

Für die Lyse und Immobilisation angesetzten Puffer.

Puffer	**Zusammensetzung**
Reaktionspuffer	50 mM KP_i, pH 8
Waschpuffer	50 mM KP_i, 50 mM Imidazol, pH 8

Die geernteten Zellen (welche SgMT exprimieren) (5 g) wurden aufgetaut (siehe 7.2.4), in Reaktionspuffer (25 mL) resuspendiert und zu jedem Zeitpunkt auf Eis gelagert. Die resuspendierten Zellen wurden mittels Ultraschall (*SONOPULS Ultraschall Homogenisator, Bandelin electronic GmbH & Co. KG,* Berlin, Deutschland) (3 x 10 min mit je 5 min Pause, 35 % Intensität, 5 x 10 % Zyklus) bei 4 °C aufgeschlossen und anschließend bei 10 000 rpm für 45 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend weiterverwendet. Zur Immobilisation wurde 10 % (*v/v* in Relation zum Lysat) des Ni-NTA-Agarose-*Resin* (*Protino, Macherey-Nagel*, Düren, Deutschland) hinzugegeben und das Gemisch vorsichtig mittels Rotation bei 4 °C vermischt. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert (3 000 rpm, 2 min, 4 °C) und der Überstand abgenommen. Das *Resin* wurde vorsichtig in Waschpuffer resuspendiert, für 5 min bei 4 °C inkubiert und erneut zentrifugiert (3 000 rpm, 2 min, 4 °C). Dieser Wasch-Schritt wurde erneut wiederholt. Anschließend wurde das *Resin* in Reaktionspuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das gereinigte, immobilisierte Protein wurde dann für die Reaktion eingesetzt.

7.2.9. Protein-Nachweis mittels SDS-PAGE

Um die erfolgreiche Expression der Zielproteine sowie den Reinigungserfolg der einzelnen Methoden nachzuweisen, wurden SDS-Polyacrylamid Gelelektrophoresen durchgeführt.

Tabelle 14: Für die SDS-PAGE angesetzte Lösungen zur Vorbereitung, Dürchführung und Färbung

Lösung	**Zusammensetzung**
Gelpuffer (3x, pH 8.45, 50 mL))	18.2 g Tris 25 mL HCl (2 M, aq.) 0.15 g SDS
Sammelgel (10 mL)	1.6 mL Acrylamid/Bis-acrylamid (37.5/1, 30% in dest. H_2O) 7.4 mL dest. H_2O 100 µL APS (10 % in dest H_2O) 10 µL TEMED 3 mL Gelpuffer (3x)
Trenngel (30 mL)	10 mL Acrylamid/Bis-acrylamid (37.5/1, 30 % in dest. H_2O) 3.0 g Glycerol 7. mL dest. H_2O 150 µL APS (10 % in dest. H_2O) 15 µL TEMED 10 mL Gelpuffer (3x)
Kathodenpuffer (10x, pH 8.25, 200 mL)	24.2 g Tris, 35.8 g Tricin, 1.0 % (w/v) SDS aufgefüllt mit dest. H_2O auf ein Volumen von 200 mL
Anodenpuffer (10x, pH 8.9, 1 L)	121 g Tris, 112.5 M HCl (2 M in H_2O) aufgefüllt mit dest. H_2O auf ein Volumen von 1 L
SDS-Probenpuffer (5x, pH 6.8, 25 mL)	2.5 g SDS, 7.5 g Saccharose 0.025 g Bromphenolblau 0.193 g DTT 0.5 M Tris/HCl aufgefüllt mit dest. H_2O auf ein Volumen von 25 mL
Coomassie-Färbelösung (1 L)	20 mL Phosphorsäure 100 mL Ethanol 50 g Aluminiumsulfat 0.2 g Coomassie Brilliant Blau G-250 aufgefüllt mit dest. H_2O auf ein Volumen von 1 L

Entsprechend der Zusammensetzungen wurden die verschiedenen Komponenten vorbereitet, wobei die Polymerisation der Sammel- und Trenngellösung jeweils erst unmittelbar vor der Verwendung gestartet wurde (durch die Zugabe von APS). Die Gele wurden in einem *Mini-Protein Tetra Cell Casting Stand* (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München, Deutschland) gegossen. Dabei wurde nach der Zugabe der Trenngellösung *iso*-Propanol hinzugegeben, um eine klare und geradlinige Oberfläche zu erzeugen. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das *iso*-Propanol entfernt und die Sammelgellösung hinzugegeben sowie ein entsprechender Probenkamm eingesetzt.

Die Protein-Proben (z. B. 1 µL) wurden in Abhängigkeit von der gemessenen Proteinkonzentration mit dest. H_2O (z. B. 23 µL) verdünnt, mit dem Probenpuffer (z. B. 6 µL) versetzt und anschließend für 10 min auf 90 °C erhitzt. Die polymerisierten SDS-Gele wurden in die Elektrophorese-Kammern eingesetzt, der Probenkamm entfernt und jeweils 10 µL der Protein-Proben in die Taschen gegeben. Ein Proteinstandard (*ROTI®Mark, Carl Roth GmbH & Co. KG*, Karlsruhe, Deutschland) wurde zusätzlich aufgetragen. Nachdem die entsprechenden Kammern mit den Anoden- und Kathodenpuffern befüllt wurden, wurde eine konstante Spannung von 250 V für 40-50 min angelegt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die Lauffront am unteren Ende des Gels angelangt ist. Die Gele wurden aus den Halterungen genommen, mit dest. H_2O gewaschen und für 16 h in Färbelösung eingefärbt sowie für 16-40 h in dest. H_2O entfärbt. Die fotographische Dokumentation und Analyse der Gele erfolgte auf einem Weißlicht-Tisch (*Edvotek Inc.,* Washington, DC, USA).

7.2.10. Glo-Assay zur Bestimmung der Methyltransferase-Aktivität

Zur Bestimmung der Methyltransferase Aktivität wurde der MTase-Glo™-Assay (*Promega*, Fitchburg, USA) verwendet. Der Assay wurde vom Autor nur für Methyltransferase PsmD durchgeführt. Aus vorherigen Untersuchtungen von D. Amariei hat sich dabei eine Enzymkonzentration von 0.05 mg/mL bewährt.

Tabelle 15: Für den MTase-Glo-Assay vorbereiteten Lösungen zur Bestimmung der Methyltransferase Aktivität.

Lösung	**Zusammensetzung**
Enzymlösung (2x, 172 µL)	86 µL MTase-Glo™-Reaktionspuffer (4x) 43 µL Enzym (0.4 mg/mL) 43 µL dest. H_2O
Substratlösung (2x, 50 µL)	Für jedes getestete Substrat einzeln angesetzt: 12.5 µL MTase-Glo™-Reaktionspuffer (4x) 3 µL SAM (1 mM Lösung in H_2O) 2 µL Substrat (1 mM Lösung in DMSO) 32.5 µL dest. H_2O
TFA-Lösung	0.5% (*v/v*) Trifluoressigsäure in dest. H_2O
MTase-Glo-Reagenzlösung (6x, 100 µL)	60 µL MTase-Glo™-Reagenz 40 µL dest. H_2O
MTase-Glo-Detektionslösung	wird unverändert aus dem MTase-Glo™-Assay-*Kit* verwendet
MTase-SAH-Lösung (10 µM, 120 µL)	80 µL MTase-Glo™-SAH-Lösung (15 µM) 10 µL dest. H_2O 30 µL MTase-Glo™-Reaktionspuffer (4x)

Die benötigten Lösungen wurden vorbereitet und bis zur Benutzung auf 4 °C gekühlt. In einer 96-Mikrotiterplatte wurden 10 µL der jeweiligen Substratlösung für jedes Substrat in Triplikaten auf einer Seite der jeweiligen Vertiefung vorgelegt. Anschließend wurden 10 µL der Enzymlösung hinzugegeben, jedoch auf der gegenüberliegenden Seite innerhalb der Vertiefung, sodass sich die Enzym- und Substratlösung nicht vermischen. Die Reaktion wurde durch kurze Zentrifugation (bis zu 1 000 rpm, < 1 min) gestartet und die Mikrotiterplatte anschließend bei 37 °C für 20 min inkubiert. Durch Zugabe von 5 µL der TFA-Lösung wurde die

Reaktion gestoppt und die Platte nach kurzem Schütteln für 5 min bei 23 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 µL der MTase-Glo-Reagenzlösung hinzugegeben, die Platte kurz zentrifugiert (bis zu 1 000 rpm, < 1 min) sowie kurz geschüttelt und anschließend für 30 min bei 23 °C inkubiert. Danach wurden 30 µL der Detektionslösung hinzugegeben, die Platte kurz geschüttelt und für 30 min bei 23 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lumineszenz in einem *Tecan Infinite® M1000* (*Tecan Group AG*, Männedorf, Schweiz) bei 23 °C gemessen, wobei ein *gain* von 100 und eine Integrationszeit von 1 000 ms verwendet wurde. Zur Auswertung wurde zudem eine Kalibriergerade erstellt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der SAH-Lösung angesetzt, um 11 Konzentrationen von 10 µM bis 10 nM abzudecken (jeweils 2-fach verdünnt) sowie eine Negativ-Kontrolle. Von allen 12 Konzentrationen wurden jeweils 20 µL in Triplikaten in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit 5 µL der TFA-Lösung versetzt. Anschließend wurden 5 µL der MTase-Glo-Reagenzlösung hinzugegeben, die Platte kurz geschüttelt und anschließend für 30 min bei 23 °C inkubiert. Danach wurden 30 µL der Detektionslösung hinzugegeben, die Platte kurz geschüttelt und für 30 min bei 23 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lumineszenz in einem *Tecan Infinite® M1000* (*Tecan Group AG*, Männedorf, Schweiz) gemessen, wobei ein *gain* von 100 und eine Integrationszeit von 1 000 ms verwendet wurde. Die daraus generierte Kalibriergerade wurde verwendet, um die gemessene Lumineszenz der Proben in eine SAH-Konzentration umzurechnen, welche unter Beachtung der Reaktionszeit von 20 min damit der Umsatzrate der untersuchten Methyltransferase entspricht.

7.2.11. Ellmans-Assay zur Bestimmung der IC_{50}

Zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der AChE und BChE von den verschiedenen Substanzen wurde der Ellmans-Assay verwendet. Dabei wird Acetyl-/Butyrylthiocholin als Substrat verwendet, dessen Thiolgruppe bei einer erfolgreichen Umsetzung von der AChE/BChE mit dem Färbereagenz DTNB reagieren kann und damit bei 410 nm mittels Absorption quantifiziert werden kann.

Tabelle 16: Für den Ellmans-Assay vorbereitete Lösungen zur Bestimmung der IC_{50} gegenüber der AChE und BChE.

Lösung	**Zusammensetzung**
DTNB-Lösung (1.5 mM)	119 mg 5,5′-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure gelöst in 200 mL KP_i (100 mM, pH 8.0 bei 37 °C)
Inhibitor-Lösung (125 mM, 50 µL)	Für jeden Inhibitor/jede Probe einzeln in DMSO
AChE-Lösung (0.125 U/mL)	0.11 mg AChE aus *E. electricus* (1047 U/mg) gelöst in 9.2 mL KP_i (100 mM, pH 8.0 bei 37 °C) und anschließend eine 1:10-Verdünnung in KP_i
BChE-Lösung (1.25 U/mL)	0.8 mg BChE aus Pferdeserum (106 U/mg) gelöst in 68 mL KP_i (100 mM, pH 8.0 bei 37 °C)
ATCh-Lösung (1.5 mM)	21.7 mg Acetylthiocholiniodid gelöst in 50 mL KP_i (100 mM, pH 8.0 bei 37 °C)
BTCh-Lösung (1.5 mM)	23.8 mg Butyrylthiocholiniodid gelöst in 50 mL KP_i (100 mM, pH 8.0 bei 37 °C)

Tabelle 17: Verdünnungsreihe der getesteten AChE/BChE-Inhibitoren.

Inhibitor	Stock	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Konz [mM]	125	31.3	7.8	2.0	0.488	0.122							
Konz [µM]					488	122	30.5	7.63	1.91	0.476			
Konz [nM]										476	119	29.8	7.46

Die jeweilige Inhibitor-Lösung wurde zunächst in 4-fach Verdünnungsschritten mit KP_i (100 mM, pH 8.0 bei 37 °C) in 12 Konzentrationen von 31.3 mM bis 7.5 nM verdünnt (siehe Tabelle 17). Jede dieser 12 Konzentrationen wurde als Triplikat gemessen. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle (8 µL DMSO statt des Inhibitors) und eine Negativkontrolle (50 µL KP_i statt der Enzymlösung) gemessen, ebenfalls beides als Triplikat, welche zur Normierung der Enzymaktivität genutzt werden.

Tabelle 18: Eingesetzten Volumina und Konzentrationen der verschiedenen Lösungen sowie die Endkonzentrationen im Ellmans-Assay.

	Konz. [mM]	Volumen [uL]	Final-Konz. [mM]
DTNB	1.5	162	0.972
Substrat	31 mM - 7.5 nM	8	1 mM - 0.24 nM
Acetylthiocholiniodid	1.5	30	0.18
Butytyrulthiocholiniodid	1.5	30	0.18
AChE	0.125	50	0.025
BChE	1.25	50	0.25
Gesamt:		250	

Entsprechend der Angaben in Tabelle 18 wurden in einer 96-Mikrotiterplatte jeweils 162 µL der DTNB-Lösung zusammen mit 8 µL des jeweiligen Inhibitors vorgelegt. Anschließend wurden 50 µL der Enzymlösung (AChE- oder BChE-Lösung) hinzugegeben und die Lösungen für 10 min bei 23 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die gleichzeitige Zugabe der Substratlösung (ATCh- oder BTCh-Lösung) mit einer Multikanalpipette gestartet. Die Multititerplatte wurde geschüttelt und für 5 min in einem *Tecan Infinite® M1000* (*Tecan Group AG*, Männedorf, Schweiz) die Absorption bei 410 nm bei 37 °C alle 30 s gemessen. Die Absorptionszunahme wurde über die Triplikate gemittelt und durch die Positivkontrolle dividiert, um eine relative Inhibition zu erhalten. Die erhaltene relative Aktivität wurde gegen den Logarithmus der Inhibitor-Konzentration (Log [c[M]) aufgetragen und durch *Plotten* einer *dose-response* Funktion (*OriginPro 2024b, OriginLab,* Northampton, Massachusetts) ausgewertet.

7.2.12. dVio Mutasynthese in LB-Medium

Der entsprechende *P. putida* KT2440 Stamm (RW25-D2) wurde zunächst auf LB-Agarplatten kultiviert, welche mit 25 µg/mL Irgasan und 25 µg/mL Tetracyclin versetzt waren (Wachstum: 1-2 Tage bei 30°C; kurzfristige Lagerung: ca. 4°C im Kühlschrank). Die Inokulation der Platten erfolgte anhand von Kryo-Proben, welche von den Kooperationspartnern A. Loeschcke und R. Weihmann bereitgestellt wurden. Drei Einzelkolonien des Stammes wurden zur Inokulation von drei Vorkulturen in 10 mL LB-Medium, das mit denselben Antibiotika ergänzt war, in 100 mL Erlenmeyerkolben verwendet. Die Vorkulturen wurden über Nacht (ca. 16 h) bei 30 °C unter Schütteln (130 rpm) inkubiert. Anschließend wurden sechs Hauptkulturen (je 100 mL in einem 1 L Erlenmeyerkolben) auf eine OD_{700} von 0.1 anhand der drei Vorkulturen angeimpft. Für die Hauptkultur wurde ebenfalls LB-Medium mit denselben Antibiotika-Konzentrationen verwendet, wobei für die Testgruppe 4 mL der 7-Cl-Trp-Lösung (Kapitel 7.2.1 – Tabelle 9) zugesetzt wurden, während der Kontrollgruppe nur 2 mL DMSO zugefügt wurden. Die Hauptkulturen wurden 44 h lang bei 30 °C und 150 U/m inkubiert, bevor die Zellen geerntet wurden. Dabei zeichnete sich ein Farbunterschied zwischen der Test- und Kontrollgruppe ab, wobei die Kontrollgruppe deutlich stärker violett gefärbt war.

Um die dVio-Produktion zu überwachen wurden 5 mL der Hauptkultur nach 20 h entnommen. Die übrige Hauptkultur wurde nach 44 h geerntet. Dazu wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 000 rpm, 5 min) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde durch *Vortexen* aufgelockert und anschließend mit 250 µL (5 mL Probe) bzw. 2 mL Ethanol (95 mL Hauptkultur) extrahiert. Nachdem das Zellpellet vollständig im Ethanol suspendiert wurde, wurden übrige Festbestandteile mittels Zentrifugation erneut sedimentiert. Das Zellpellet wurde verworfen und vom Überstand (der 5 mL Probe als auch der 95 mL Hauptkultur) wurden jeweils 10 µL mithilfe der analytischen HPLC-PDA analysiert. Der verbleibende Anteil des Überstands wurde an vermindertem Druck von Lösungsmittel befreit, in Essigsäureethylester gelöst und mit wässriger, gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mithilfe der *reverse-phase* Äkta chromatographisch gereinigt.

7.2.13. dVio Mutasynthese in MSM

Die entsprechenden *P. putida* KT2440 Stämme (RW25-D, RW25-D_Δ*trpDC*, RW25-D1, RW25-D1_*Δtrp DC* und RW25-D2_Δ*trpDC*) wurden als Vorkulturen (15 mL in 100 mL Erlenmeyerkolben) in LB-Medium kultiviert, welches mit 25 µg/mL Irgasan und 25 µg/mL Tetracyclin versetzt war (Wachstum: 2-3 Tage bei 30 °C). Die Inokulation der Platten erfolgte anhand von Kryo-Proben, welche von den Kooperationspartnern A. Loeschcke und R. Weihmann bereitgestellt wurden. Die Vorkulturen wurden über Nacht (ca. 16 h) bei 30 °C unter Schütteln (130 rpm) inkubiert. Da nach 2 Tagen nur zwei Stämme (RW25-D1__Δ*trpDC* und RW25-D2_Δ*trpDC*) angewachsen sind (auf eine OD_{700} von 7.2 und 4.9), wurden nur zwei Hauptkulturen (je eine pro Stamm) angeimpft, indem die benötigte Menge für eine OD_{700} von 0.1 zur Inokulation der Vorkultur entnommen wurde und die Zellen durch kurze Zentrifugation (400 rpm, 10 min) sedimentiert wurden. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in MSM resuspendiert und die suspendierten Zellen zur Hauptkultur hinzugegeben. Für die Hauptkultur (500 mL in 5 L Fernbachkolben) wurde MSM verwendet, welches ebenfalls mit denselben Antibiotika-Konzentrationen sowie 5 mL der Trp-Lösung und 20 mL der 7-Cl-Trp-

Lösung versetzt wurde (Kapitel 7.2.1 – Tabelle 9). Die Hauptkulturen wurden ca. 100 h lang bei 30 °C und 150 U/m inkubiert und anschließend ca. 20 h bei 4 °C gekühlt (bei 10 U/m), bevor die Zellen geerntet wurden. Während der Inkubation wurden den Hauptkulturen nach 45 h weitere 20 mL der 7-Cl-Trp-Lösung hinzugefügt.

Um die dVio-Produktion zu überwachen, wurden 5 mL der Hauptkultur nach 21 und 45 h entnommen. Die übrige Hauptkultur wurde nach 118 h geerntet. Dazu wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 000 rpm, 5 min) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde durch *Vortexen* aufgelockert und anschließend mit 250 µL (5 mL Probe) bzw. 25 mL Ethanol (490 mL Hauptkultur) extrahiert. Nachdem das Zellpellet vollständig im Ethanol resuspendiert wurde, wurden übrige Festbestandteile in der Zentrifuge (5 000 rpm, 5 min) erneut sedimentiert. Das Zellpellet wurde verworfen und vom Überstand (der 5 mL Probe als auch der 490 mL Hauptkultur) wurden jeweils 5 µL mithilfe der analytischen LC-MS analysiert. Der verbleibende Anteil des Überstands wurde an vermindertem Druck von Lösungsmittel befreit, in Essigsäureethylester gelöst und mit wässriger, gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mithilfe der *reverse-phase* Äkta chromatographisch gereinigt.

7.2.14. Protein- und Gensequenzen

Pyrococcus furiosus Tryptophan-Synthasae β-Untereinheit (TrpB^{Pf0A9})

Die Sequenz wurde adaptiert von Dick *et al.*[256], wobei eine Mutation E105G wieder entfernt wurde (fett markiert).[103]

Aminosäuresequenz:

MWFGEFGGQYVPETLVGPLKELEKAYKRFKDDEEFNRQLNYYLKTWAGRPTPLYYAKRLTEKIGGA
KVYLKREDLVHGGAHKTNNAIGQALLAKLMGKTRLIA**E**TGAGQHGVATAMAGALLGMKVDIYMGAE
DVERQKLNVFRMKLLGANVIPVNSGSRTLKDAFDEALRDWVATFEYTHYLIGSVVGPHPYPTIVRD
FQSVIGREAKAQILEAEGQLPDVIVACVGGGSNAMGIFYPFVNDKKVKLVGVEAGGKGLESGKHSA
SLNAGQVGVSHGMLYFLQDEEGQIKPSHSIAPGLDHPGVGPEHAYLKKIQRAEYVAVTDEEALKAF
HELSRTEGIIPALESAHAV AYAMKLAKEMSRDEIIIVNLSGRGDKDLDIVLKASGNVLEHHHHHH

Basensequenz:

ATGTGGTTCGGTGAATTTGGTGGTCAGTACGTGCCAGAAACGCTGGTTGGACCCCTGAAAGAGCTG
GAAAAAGCTTACAAACGTTTCAAAGATGACGAAGAATTCAATCGTCAGCTGAATTACTACCTGAAA
ACCTGGGCAGGTCGTCCAACCCCACTGTACTACGCAAAACGCCTGACTGAAAAAATCGGTGGTGCT
AAAGTCTACCTGAAACGTGAAGACCTGGTTCACGGTGGTGCACACAAGACCAACAACGCCATCGGT
CAGGCACTGCTGGCAAAGCTCATGGGTAAAACTCGTCTGATCGCT**GAG**ACCGGTGCTGGTCAGCAC
GGCGTAGCGACTGCAATGGCTGGTGCACTGCTGGGCATGAAAGTGGACATTTACATGGGTGCTGAG
GACGTAGAACGTCAGAAACTGAACGTATTCCGTATGAAGCTGCTGGGTGCAAACGTAATTCCAGTT
AACTCCGGTTCTCGCACCCTGAAAGACGCATTTGACGAGGCTCTGCGTGATTGGGTGGCTACTTTT
GAATACACCCACTACCTAATCGGTTCCGTGGTCGGTCCACATCCGTATCCGACCATCGTTCGTGAT
TTTCAGTCTGTTATCGGTCGTGAGGCTAAAGCGCAGATCCTGGAGGCTGAGGGTCAGCTGCCAGAT
GTAATCGTTGCTTGTGTTGGTGGTGGCTCTAACGCGATGGGTATCTTTTACCCGTTCGTGAACGAC
AAAAAAGTTAAGCTGGTTGGCGTTGAGGCTGGTGGTAAAGGCCTGGAATCTGGTAAGCATTCCGCT
AGCCTGAACGCAGGTCAGGTTGGTGTGTCCCATGGCATGCTGTCCTACTTTCTGCAGGACGAAGAA
GGTCAGATCAAACCAAGCCACTCCATCGCACCAGGTCTGGATCATCCAGGTGTTGGTCCAGAACAC
GCTTACCTGAAAAAAATTCAGCGTGCTGAATACGTGGCTGTAACCGATGAAGAAGCACTGAAAGCG
TTCCATGAACTGAGCCGTACCGAAGGTATCATCCCAGCTCTGGAATCTGCGCATGCTGTGGCTTAC
GCTATGAAACTGGCTAAGGAAATGTCTCGTGATGAGATCATCATCGTAAACCTGTCTGGTCGTGGT
GACAAAGACCTGGATATTGTCCTGAAAGCGTCTGGCAACGTGCTCGAGCACCACCACCACCACCAC
TGAG

Thermotoga maritima Tryptophan-Synthasae β-Untereinheit (TrpB^{Tm2F3}).[103, 257]

Aminosäuresequenz:

MKGYFGPYGGQYVPEILMPALEELEAAYEEIMKDESFWKEFNDLLRDYAGRPTPLYFARRLSEKYG
ARIYLKREDLLHTGAHKINNAIGQVLLAKKMGKTRIIAETGAGQHGVATATAAALFGMECVIYMGE
EDTIRQKPNVERMKLLGAKVVPVKSGSRTLKDAINEALRDWITNLQTTYYVIGSVVGPHPYPIIVR
NFQKVIGEETKKQILEKEGRLPDYIVACVGGGSNAAGIFYPFIDSGVKLIGVEAGGEGLETGKHAA
SLLKGKIGYLHGSKTFVLQDDWGQVQVTHSVSAGLDYSGVGPEHAYWRETGKVLYDAVTDEEALDA
FIELSRLEGIIPALESSHALAYLKKINIKGKVVVVNLSGRGDKDLESVLNHPYVRERIRLEHHHHH
H

Basensequenz:

ATGAAAGGTTACTTCGGTCCTTACGGAGGTCAGTACGTTCCCGAGATTCTCATGCCCGCACTCGAG
GAACTTGAGGCGGCTTACGAGGAAATCATGAAGGATGAATCGTTCTGGAAAGAGTTCAACGACCTT
CTAAGGGATTACGCTGGACGCCCCACTCCTCTTTACTTTGCCAGAAGGTTGAGTGAAAAGTACGGT
GCCAGGATCTATTTGAAGCGCGAAGATCTTCTTCACACAGGCGCTCACAAGATAAACAACGCCATA
GGTCAGGTGCTTCTCGCAAAAAAGATGGGAAAAACAAGAATAATAGCGGAAACAGGAGCGGGACAG
CACGGTGTTGCCACTGCAACGGCTGCCGCGCTCTTTGGAATGGAGTGCGTCATATACATGGGCGAA
GAAGACACGATCAGACAGAAACCTAACGTTGAGAGGATGAAACTTCTCGGTGCGAAAGTGGTCCCT
GTGAAGAGCGGAAGCAGAACGCTGAAAGACGCCATAAACGAAGCTCTTCGGGACTGGATCACGAAC
CTTCAGACCACCTACTACGTCATTGGATCCGTCGTGGGACCTCACCCGTATCCGATCATAGTGAGA
AACTTTCAGAAGGTGATTGGTGAGGAAACAAAAAAGCAGATCCTTGAGAAGGAAGGGAGATTGCCG
GATTACATCGTTGCGTGCGTTGGAGGAGGAAGCAACGCCGCCGGTATATTCTACCCGTTCATAGAT
TCCGGTGTGAAGCTGATCGGAGTGGAAGCCGGTGGAGAAGGCCTCGAAACCGGAAAGCACGCAGCT
TCTCTTCTCAAAGGGAAAATTGGATACCTACACGGAAGTAAGACCTTCGTTCTTCAAGATGACTGG
GGCCAGGTTCAGGTGACACACTCGGTTTCGGCGGGACTGGACTATTCCGGTGTGGGGCCTGAACAT
GCTTATTGGAGGGAGACTGGAAAAGTTCTGTACGATGCGGTGACGGATGAAGAAGCTCTCGATGCC
TTCATCGAACTTTCAAGGCTGGAAGGGATCATTCCAGCACTCGAAAGCTCTCACGCACTGGCTTAC
CTGAAGAAGATCAATATAAAGGGTAAGGTCGTCGTTGTGAACCTTTCAGGGCGCGGCGACAAGGAT
TTAGAATCAGTTTTGAACCATCCGTACGTCAGGGAGAGGATAAGACTCGAGCACCACCACCACCAC
CACTGAG

Chloracidobacterium thermophilum Halidmethyltransferase (CtHMT)[191, 203]

Aminosäuresequenz:

MGHHHHHHAENLYFQGSGLGMDADTASFWEEKYRADLTAWDRGGVSPALEHWLAEGALKPGRILIP
GCGYGHEVLALARRGFEVWGLDIALTPVRRLQEKLAQAGLTAHVVEGDVRTWQPEQPFDAVYEQTC
LCALSPEDWPRYEAQLCRWLRPGGRLFALWMQTDRPGGPPYHCGLEAMRVLFALERWRWVEPPQRT
VPHPTGFFEYAAILERLV

Streptomyces albulus PsmD Methyltransferase (PsmD_Sa)[191]

Aminosäuresequenz:

MQGQPHQDAGMPEPYAATADVYDRLVAYAIAQWGESPRPRMADFIEQAWKARGQRVRRVLELCCGT
GLMTEELVRRGYEVTAVDRSETMLALAKKRVGGAADFRQIELPAPLPGDTDAVVCTAAAFNYQSSA
HSLGETLHAVATVLPAGATFVFDIETAALLKGHWGNRMWAADEGDLAFIWNFTSQPDTTYCDVHYT
QFTRSEAGPDTYTGTREVHRLYAFDHDTVRAQARAAGFARAEVFDNYTERPATDATHYETWFLTRD
ESLEHHHHHH

Basensequenz:

ATGCAGGGACAGCCGCACCAGGATGCGGGTATGCCCGAGCCATACGCCGCGACGGCCGATGTGTAC
GACCGGCTCGTCGCGTATGCCATAGCCCAATGGGGAGAGTCTCCGCGGCCTCGGATGGCCGACTTC
ATCGAGCAGGCATGGAAGGCTCGTGGGCAGCGCGTGCGCCGGGTGCTGGAGCTGTGTTGCGGCACC
GGTCTGATGACTGAGGAACTGGTGCGGCGCGGTTACGAGGTGACAGCTGTAGACCGTTCCGAGACC
ATGTTGGCCCTCGCGAAGAAGCGGGTCGGCGGTGCAGCCGACTTCCGACAGATCGAGCTCCCCGCC
CCGCTGCCCGGCGACACGGACGCAGTGGTATGCACCGCAGCCGCGTTCAACTACCAGTCCAGTGCA
CACTCACTGGGAGAAACCCTACACGCCGTAGCCACGGTGCTGCCAGCCGGTGCAACGTTCGTCTTC
GACATCGAGACTGCAGCGCTCCTCAAGGGACATTGGGGCAATCGCATGTGGGCCGCCGACGAGGGC
GACCTGGCGTTCATCTGGAACTTCACTAGTCAGCCGGACACCACCTACTGCGACGTGCATTACACA
CAGTTCACGCGCTCTGAAGCGGGACCGGACACCTACACCGGCACCCGCGAGGTACACCGGCTGTAC
GCGTTCGACCACGACACCGTCCGCGCCCAGGCACGCGCCGCCGGATTCGCACGTGCGGAAGTGTTC
GACAACTACACCGAACGCCCCGCCACCGACGCCACCCACTACGAGACGTGGTTCCTCACCCGGGAC
GAGAGC

Streptomyces griseoviridis Methyltransferase (SgMT)[231]

Aminosäuresequenz:

MGHMSSQTVTPDPYGNLAESYDRLAQWAIDQQQESPRDRVGDFLQTFWQSQDRPVRTVLEICCGTG
LMLAELARRGYVVTGLDRSAAMLEQARARMGGKTTLIRAELPDIPAPAGEFDAVVSAAGGLNYLSE
SQISATFGAVARLLPAGGTFTFDVFGQGFYAKFFDPSAPRVMALELDDISYIWTFTKPAEAPFVDM
SYTQFSPASRAVDGEPAFIRTRDLHRYYPLPHATVLRLAAEHGFTDARAHDNYSSDPSGPHTLYDT
WTMVRTGSLEHHHHHH*

Basensequenz:

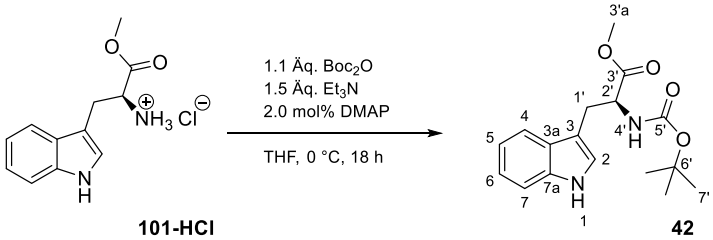
ATGGGCCATATGTCGAGCCAGACCGTTACCCCGGATCCGTATGGTAACCTGGCAGAAAGCTATGAT
CGTCTGGCACAGTGGGCAATTGATCAGCAGCAGGAGAGCCCCCGTGATCGTGTTGGGGACTTTCTG
CAGACCTTTTGGCAGAGCCAGGATCGTCCGGTTAGGACCGTTCTGGAAATTTGTTGTGGTACCGGT
CTGATGCTGGCAGAACTGGCTCGTCGTGGGTATGTTGTTACCGGGCTGGATCGTTCGGCAGCAATG
CTGGAGCAGGCTCGTGCACGTATGGGTGGAAAAACCACTCTGATTAGGGCAGAGCTGCCGGATATT
CCGGCACCGGCAGGGGAATTTGATGCAGTTGTTAGCGCAGCAGGGGGACTGAATTATCTGAGCGAA
TCGCAGATTAGCGCAACCTTTGGTGCAGTTGCAAGGCTGCTGCCGGCAGGAGGTACCTTTACCTTT
GATGTTTTTGGTCAGGGGTTTTATGCAAAATTTTTTGATCCGTCGGCACCGCGTGTTATGGCACTG
GAGCTGGATGATATTAGCTATATTTGGACCTTTACCAAACCGGCAGAAGCACCGTTTGTTGATATG
AGCTATACCCAGTTTAGCCCGGCATCGCGTGCAGTTGATGGGGAACCCGCATTTATTCGTACCAGG
GATCTGCACCGTTATTATCCGCTGCCGCATGCAACCGTTCTGCGTCTGGCAGCAGAACATGGGTTT
ACCGATGCACGTGCACATGATAATTATAGCAGCGATCCGAGCGGTCCGCATACCCTGTATGATACC
TGGACTATGGTTCGTACCGGATCGCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

7.3. Chemische Methoden

7.3.1. Synthese von Tryptophan-Analoga

7.3.1.1. Anfügen der *N*-Schutzgruppe

42 (*S*)-(*N*-*tert*-Butoxycarbonyl)tryptophanmethylester



101-HCl **42**

(*S*)-Tryptophanmethylesterhydrochlorid **101-HCl** (1.5 g, 5.9 mmol, 1.0 Äq.) und DMAP (14 mg, 0.12 mmol, 2.0 mol%) wurden in trockenem THF (60 mL) in einem Reaktionskolben gelöst und Di-*tert*-butyldicarbonat (1.4 mL, 6.5 mmol, 1.1 Äq.) sowie Triethylamin (1.3 mL, 8.9 mmol, 1.5 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h bei 0 °C gerührt, wobei die Temperatur innerhalb der Zeit auf Raumtemperatur angestiegen ist. Anschließend wurde das Gemisch mit Ethylacetat (40 mL) und wässriger, gesättigter NH_4Cl-Lösung (30 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/EE: 2/1) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1.7 g, 5.4 mmol, 91 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.56 – 7.49 (m, 1H, 4-H), 7.33 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.1 Hz, 1H, 7-H), 7.19 – 7.07 (m, 1H, 6-H), 7.06 (s, 1H, 2-H), 7.01 (t, $^3J_{5,4,6}$ = 7.5 Hz, 1H, 5-H), 4.43 (t, $^3J_{1';2'}$ = 6.8 Hz, 1H, 1'-H), 3.65 (s, 3H, 3'a-H), 3.25 (dd, $^2J_{2';2'}$ = 14.6 Hz, $^3J_{2';1'}$ = 5.8 Hz, 1H, 2'-H_a), 3.12 (dd, $^2J_{2';2'}$ = 14.6 Hz, $^3J_{2';1'}$ = 7.7 Hz, 1H, 2'-H_b), 1.39 (s, 9H, 7'-H).

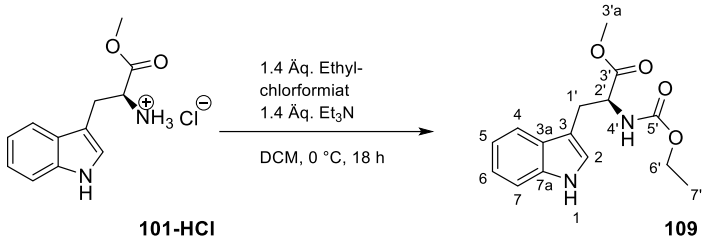
^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 174.7 (C-3'), 157.7 (C-5'), 138.0 (C-7a), 128.7 (C-3a), 124.4 (C-2), 122.4 (C-6), 119.8 (C-5), 119 .2 (C-4), 112.3 (C-7), 110.8 (C-3), 80.6 (C-6'), 56.1 (C-2'), 52.6 (C-3'a), 28.7 (C-1'), 28.6 (C-7').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{17}H_{22}N_2O_4$+H^+: 319.1653 $[M+H]^+$; gefunden: 319.1656.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3383 (m), 3311 (br), 1736 (s), 1691 (vs), 1520 (s), 1441 (m), 1293 (m), 1219 (s), 1150 (m), 1011 (m), 751 (vs).

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein, wobei kleine Abweichungen auf ein unterschiedliches Lösungsmittel zurückzuführen sind.[258, 259]

109 (*S*)-(*N*-Ethoxycarbonyl)tryptophanmethylester



101-HCl **109**

(*S*)-Tryptophanmethylesterhydrochlorid **101-HCl** (6.6 g, 26 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem DCM (200 mL) in einem Reaktionskolben gelöst und Ethylchlorformiat (3.5 mL, 37 mmol, 1.4 Äq.) sowie Triethylamin (5.1 mL, 36 mmol, 1.4 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h bei 0 °C gerührt, wobei die Temperatur innerhalb der Zeit auf Raumtemperatur angestiegen ist. Anschließend wurde das Gemisch mit DCM (100 mL) und wässriger, gesättigter NH_4Cl-Lösung (30 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit DCM extrahiert (3 x 70 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/EE: 1/1) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 5.5 g, 19.0 mmol, 73 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.49 – 8.10 (m, 1H, 1-NH), 7.55 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.33 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.1 Hz, 1H, 7-H), 7.19 (ddd, $^3J_{6,7}$ = 8.2 Hz, $^3J_{6,5}$ = 7.1 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H, 6-H), 7.14 – 7.06 (m, 1H, 5-H), 6.97 (s, 1H, 2-H), 5.25 (brs, 1H, 4'-NH), 4.71 (app. q, ^3J = 6.4 Hz, 1H, 2'-H), 4.12 (q, $^3J_{6;7'}$ = 7.1 Hz, 2H, 6'-H), 3.68 (s, 3H, 3'a-H), 3.31 (d, $^3J_{2';1'}$ = 5.6 Hz, 2H, 2'-H), 1.22 (t, $^3J_{7';6'}$ = 7.1 Hz, 3H, 7'-H).

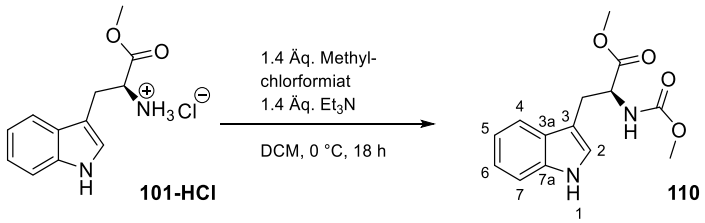
^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 172.7 (C-3'), 156.2 (C-5'), 136.3 (C-7a), 127.6 (C-3a), 123.0 (C-2), 122.3 (C-6), 119.7 (C-5), 118.7 (C-4), 111.4 (C-7), 109.9 (C-3), 61.2 (C-6'), 54.5 (C-2'), 52.4 (C-3'a), 28.1 (C-1'), 14.6 (C-7').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{15}H_{18}N_2O_4$+H$^+$: 291.1339 [M+H]$^+$; gefunden: 291.1345.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3378 (w), 3341 (w), 1730 (m), 1696 (vs), 1531 (s), 1440 (s), 1224 (s), 1076 (m), 1043 (m), 744 (vs).

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein.[260]

110 (*S*)-(*N*-Methoxycarbonyl)tryptophanmethylester



101-HCl **110**

(*S*)-Tryptophanmethylesterhydrochlorid **101-HCl** (10 g, 39 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem DCM (300 mL) in einem Reaktionskolben gelöst und Methylchlorformiat (4.2 mL,

55 mmol, 1.4 Äq.) sowie Triethylamin (7.7 mL, 55 mmol, 1.4 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h bei 0 °C gerührt, wobei die Temperatur innerhalb der Zeit auf Raumtemperatur angestiegen ist. Anschließend wurde das Gemisch mit DCM (200 mL) und wässriger, gesättigter NH_4Cl-Lösung (100 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit DCM extrahiert (3 x 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/EE: 2/1) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 8.6 g, 31 mmol, 80 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.50 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.8 Hz, 1H, 4-H), 7.32 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.0 Hz, 1H, 7-H), 7.09 (t, $^3J_{6,7.5}$ = 7.2 Hz, 1H, 6-H), 7.05 (s, 1H, 2-H), 7.00 (t, $^3J_{5,4,6}$ = 7.4 Hz, 1H, 5-H), 4.57 – 4.35 (m, 1H, 2'-H), 3.63 (s, 3H, 3'a-H), 3.58 (s, 3H, 6'-H), 3.24 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 5.7 Hz, 1'-H_a), 3.12 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.6 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 7.8 Hz, 1H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 174.5 (C-3'), 159.0 (C-5'), 138.0 (C-7a), 128.6 (C-3a), 124.4 (C-2), 122.4 (C-6), 119.8 (C-5), 119.1 (C-4), 112.3 (C-7), 110.7 (C-3), 56.4 (C-2' und C-6'), 52.6 (C-3'a), 28.7 (C-1').

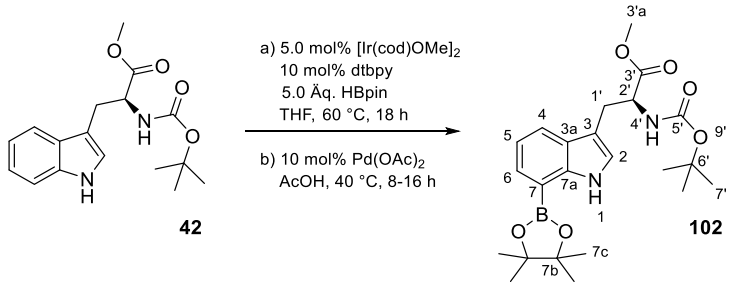
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{14}H_{16}N_2O_4$+H^+: 277.1183 [M+H]$^+$; gefunden: 277.1182.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3405 (br), 2954 (w), 2496 (w), 1699 (vs), 1516 (m), 1456 (s), 1400 (m), 1354 (m), 1198 (s), 1059 (m), 777 (w), 743 (s).

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein, wobei kleine Abweichungen auf ein unterschiedliches Lösungsmittel zurückzuführen sind.[259]

7.3.1.2. 7-Borylierung von geschützten Tryptophanen

102 (*S*)-(*N-tert*-Butoxycarbonyl)-7-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)tryptophanmethylester



(*S*)-(*N-tert*-Butoxycarbonyl)tryptophanmethylester (**42**) (2.7 g, 8.5 mmol, 1.0 Äq.) wurde zusammen mit (1,5-Cyclooctadien)(methoxy)iridium(I)-Dimer (0.15 g, 0.22 mmol, 2.5 mol%) und Di-*tert*-butylbipyridin (0.12 g, 0.43 mmol, 5.0 mol%) in einem trockenen und sekurierten Schlenkkolben unter Argon gegeben und in sauerstofffreiem THF (90 mL) gelöst. Unter Rühren wurde Pinakolboran (6.2 mL, 43 mmol, 5.0 Äq.) hinzugetropft, wodurch die Lösung eine rötliche Farbe erhielt. Die Reaktion wurde für 12 h bei 60 °C gerührt. Nachdem die Reaktion abgekühlt ist, wurden alle flüchtigen Stoffe sowie das Lösungsmittel an vermindertem Vakuum entfernt. Der erhaltene braune Rückstand wurde in Essigsäure (10 mL) gelöst und Palladium-II-acetat (95 mg, 0.42 mmol, 5.0 mol%) hinzugegeben. Die Reaktion wurde bei 40 °C für 10-

18 h gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über Celite filtriert und mit EE (50 mL) nachgespült. Das Filtrat wurde mit wässriger, gesättigter Na_2CO_3-Lösung (50 mL) versetzt und durch Zugabe von verdünnter Natronlauge (1 M) ein pH-Wert von 10 eingestellt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit EE (3 x 50 mL) extrahiert. Da die organische Phase sich nur schwer trennt, wurden oft größere Mengen EE und Na_2CO_3-Lösung hinzugegeben. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/DCM/Aceton: 8.5/1.5/0.5) und das Produkt als bräunlicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2.4 g, 5.4 mmol, 63 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.13 (s, 1H, 1-NH), 7.67 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.64 (dd, $^3J_{6,5}$ = 7.1 Hz, $^4J_{6,5}$ = 1.2 Hz, 1H, 6-H), 7.13 (t, $^3J_{5,6,4}$ = 7.5 Hz, 1H, 5-H), 7.06 (s, 1H, 2-H), 5.06 (d, $^3J_{4',2'}$ = 8.3 Hz, 1H, 4'-NH), 4.85 – 4.52 (m, 1H, 2'-H), 3.67 (s, 3H, 3'a-H), 3.31 (d, $^3J_{1',2'}$ = 5.4 Hz, 2H, 1'-H), 1.43 (s, 9H, 7'-H), 1.39 (s, 12H, 7d-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 172.9 (C-3'), 155.4 (C-5'), 141.4 (C-7a), 129.6 (C-6), 126.8 (C-3a), 122.9 (C-5), 122.5 (C-4), 119.3 (C-2), 109.7 (C-3), 84.0 (C-7b), 79.9 (C-6'), 54.4 (C-2'), 52.3 (C-3'a), 28.5 (C-7'), 28.1 (C-1'), 25.1 (C-7c).

Das ^{13}C-Signal von C-7 konnte nicht detektiert werden. Im HMBC-Spektrum konnte jedoch bei ca. 110 ppm eine Korrelation gefunden werden.

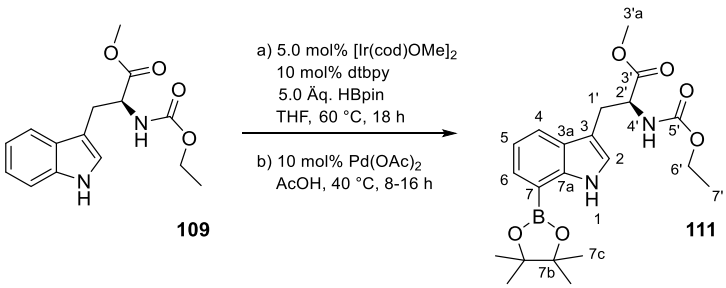
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{23}H_{33}BN_2O_6$+H^+: 444.2504 $[M+H]^+$; gefunden: 444.2512.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3384 (w), 2979 (w), 1740 (s), 1701 (vs), 1504 (s), 1439 (m), 1334 (s), 1216 (s), 1146 (vs), 1130 (vs), 1082 (m), 1052 (m), 1015 (m), 850 (m), 684 (s).

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein.[84]

---

111 (*S*)-(*N*-Ethoxycarbonyl)-7-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)tryptophanmethylester



(*S*)-(*N*-Ethoxycarbonyl)tryptophanmethylester (**109**) (5.2 g, 18 mmol, 1.0 Äq.) wurde zusammen mit (1,5-Cyclooctadien)(methoxy)iridium(I)-Dimer (0.30 g, 0.89 mmol, 2.5 mol%) und Di-*tert*-butylbipyridin (0.24 mg, 0.90 mmol, 5.0 mol%) in einem trockenen und sekurierten Schlenkkolben unter Argon gegeben und in sauerstofffreiem THF (120 mL) gelöst. Unter Rühren wurde Pinakolboran (13 mL, 90 mmol, 5.0 Äq.) hinzugetropft, wodurch die Lösung eine rötliche Farbe erhielt. Die Reaktion wurde für 12 h bei 60 °C gerührt. Nachdem die Reaktion abgekühlt ist, wurden alle flüchtigen Stoffe sowie das Lösungsmittel an vermindertem

Vakuum entfernt. Der erhaltene braune Rückstand wurde in Essigsäure (10 mL) gelöst und Palladium-II-acetat (201 mg, 0.89 mmol, 5.0 mol%) hinzugegeben. Die Reaktion wurde bei 40 °C für 10-18 h gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über Celite filtriert und mit EE (100 mL) nachgespült. Das Filtrat wurde mit wässriger, gesättigter Na_2CO_3-Lösung (100 mL) versetzt und durch Zugabe von verdünnter Natronlauge (1 M) ein pH-Wert von 10 eingestellt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit EE (3 x 80 mL) extrahiert. Da die organische Phase sich nur schwer trennt, wurden oft größere Mengen EE und Na_2CO_3-Lösung hinzugegeben. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/DCM/Aceton: 8.5/1.5/0.5) und das Produkt als bräunlicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 4.1 g, 7.7 mmol, 54 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.14 (s, 1H, 1-NH), 7.66 (dd, $^3J_{4,5}$ = 8.0 Hz, $^4J_{4,6}$ = 1.2 Hz, 1H, 4-H), 7.64 (dd, $^3J_{6,5}$ = 7.0 Hz, $^4J_{6,4}$ = 1.2 Hz, 1H, 6-H), 7.13 (dd, $^3J_{5,4}$ = 7.9 Hz, $^3J_{5,6}$ = 7.0 Hz, 1H, 5-H), 7.06 (s, 1H, 2-H), 5.17 (d, $^3J_{4',2'}$ = 8.3 Hz, 1H, 4'-NH), 4.69 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, $^3J_{2',1}$ = 5.0 Hz, 1H, 2'-H), 4.11 (q, $^3J_{6',7'}$ = 7.1 Hz, 2H, 6'-H), 3.68 (s, 3H, 3'a-H), 3.32 (d, $^3J_{1',2'}$ = 5.4 Hz, 2H, 1'-H), 1.39 (s, 12H, 7c-H), 1.22 (t, $^3J_{7',6'}$ = 7.1 Hz, 3H, 7'-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 172.7 (C-3'), 156.2 (C-5'), 141.5 (C-7a), 129.7 (C-6), 126.7 (C-3a), 122.9 (C-2), 122.3 (C-4), 119.3 (C-5), 109.5 (C-3), 84.0 (C-7b), 61.2 (C-6'), 54.6 (C-2'), 52.4 (C-3'a), 28.1 (C-1'), 25.1 (C-7c), 14.7 (C-7').

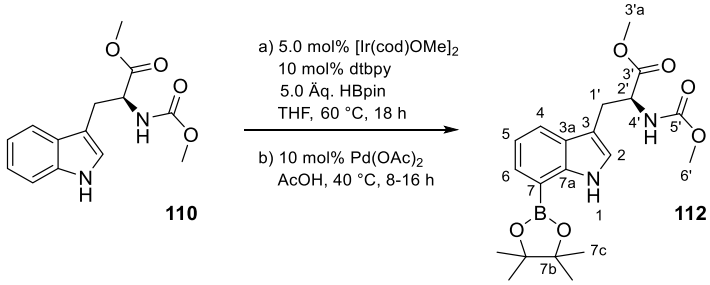
Das ^{13}C-Signal von C-7 konnte nicht detektiert werden. Im HMBC-Spektrum konnte jedoch bei ca. 110 ppm eine Korrelation gefunden werden.

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{21}H_{29}N_2O_6B+H^+$: 417.2191 [M+H]$^+$; gefunden: 417.2196.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3371 (m), 2976 (w), 1742 (s), 1709 (vs), 1531 (m), 1372 (m), 1335 (s), 1219 (s), 1131 (vs), 1050 (m).

---

112 (*S*)-(*N*-Methoxycarbonyl)-7-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)tryptophanmethylester



(*S*)-(*N*-Methoxycarbonyl)tryptophanmethylester **110** (5.0 g, 18 mmol, 1.0 Äq.) wurde zusammen mit (1,5-Cyclooctadien)(methoxy)iridium(I)-Dimer (0.18 g, 0.27 mmol, 2.0 mol%) und Di-*tert*-butylbipyridin (0.20 mg, 0.72 mmol, 4.0 mol%) in einem trockenen und sekurierten Schlenkkolben unter Argon gegeben und in sauerstofffreiem THF (120 mL) gelöst. Unter Rühren wurde Pinakolboran (13 mL, 90 mmol, 5.0 Äq.) hinzugetropft, wodurch die

Lösung eine rötliche Farbe erhielt. Die Reaktion wurde für 12 h bei 60 °C gerührt. Nachdem die Reaktion abgekühlt ist, wurden alle flüchtigen Stoffe sowie das Lösungsmittel an vermindertem Vakuum entfernt. Der erhaltene braune Rückstand wurde in Essigsäure (8 mL) gelöst und Palladium-II-acetat (0.20 g, 0.90 mmol, 5.0 mol%) hinzugegeben. Die Reaktion wurde bei 40 °C für 10-18 h gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über Celite filtriert und mit EE (80 mL) nachgespült. Das Filtrat wurde mit wässriger, gesättigter Na_2CO_3-Lösung (80 mL) versetzt und durch Zugabe von verdünnter Natronlauge (1 M) ein pH-Wert von 10 eingestellt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit EE (3 x 80 mL) extrahiert. Da die organische Phase sich nur schwer trennt, wurden oft größere Mengen EE und Na_2CO_3-Lösung hinzugegeben. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/DCM/Aceton: 8/1.5/0.5) und das Produkt als bräunlicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 4.0 g, 10 mmol, 55 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.66 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.52 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.2 Hz, 1H, 6-H), 7.14 (s, 1H, 2-H), 7.05 (t, $^3J_{5,6,4}$ = 7.4 Hz, 1H, 5-H), 4.49 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 7.8 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 5.9 Hz, 1H, 1'-H), 3.65 (s, 3H, 3'a-H), 3.60 (s, 3H, 6'-H), 3.27 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.7 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 5.9 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.15 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.6 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 7.8 Hz, 1H, 1'-H_b), 1.40 (s, 12H, 7c-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD) δ [ppm] = 174.4 (C-3'), 159.0 (C-5'), 142.4 (C-7a), 130.1 (C-6), 127.9 (C-3a), 124.8 (C-2), 122.9 (C-4), 119.6 (C-5), 111.3 (C-7) 110.7 (C-3), 85.0 (C-7b), 56.5 (C-2'), 52.6 (C-3'a, C-6'), 28.7 (C-1'), 25.3 (C-7c).

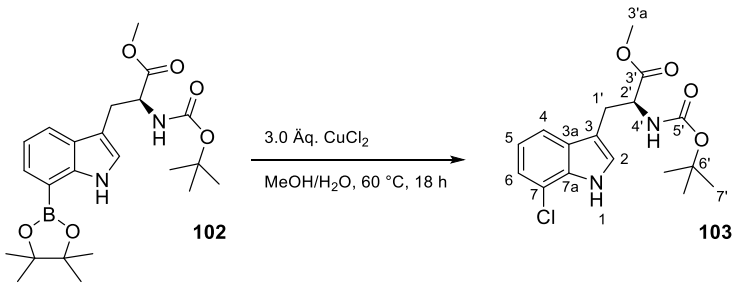
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{20}H_{27}N_2O_6B+H^+$: 403.2035 $[M+H]^+$; gefunden: 403.2059.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2977 (w), 2538 (w), 1719 (s), 1588 (w), 1463 (m), 1369 (vs), 1285 (m), 1197 (m), 1139 (s), 1061 (w), 852 (w), 753 (w), 685 (w).

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein, wobei kleine Abweichungen auf ein unterschiedliches Lösungsmittel zurückzuführen sind.[84]

7.3.1.3. 7-Funktionalisierung von geschützten Tryptophanen

103 (*S*)-(*N-tert*-Butoxycarbonyl)-7-chlortryptophanmethylester



Boc-geschützter Boronsäureester **102** (150 mg, 0.34 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (3 mL) gelöst und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Kupfer(II)-chlorid (136 mg, 1.0 mmol, 3.0 Äq.) wurde in Wasser (3 mL) gelöst und der Reaktionslösung zugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h bei 60 °C gerührt. Nachdem die Reaktion abgekühlt ist, wurde das Gemisch mit

EE (10 mL) und wässriger, gesättigter NaCl-Lösung (5 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit wässriger EDTA-Lösung (100 mM, 2 x 2 mL) sowie gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/EE: 3/1) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 68 mg, 0.19 mmol, 57 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.50 (dd, $^3J_{4,5}$ = 8.0 Hz, $^4J_{4,6}$ = 0.9 Hz, 1H, 4-H), 7.17 (s, 1H, 2-H), 7.13 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.5 Hz, 1H, 6-H), 7.01 (t, $^3J_{5,6,4}$ = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 4.45 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 6.6 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 5.8 Hz, 1H, 2'-H), 3.67 (s, 3H, 3'a-H), 3.26 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.6 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 5.8 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.12 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.6 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 7.9 Hz, 1H, 1'-H_b), 1.41 (s, 9H, 7'-H).

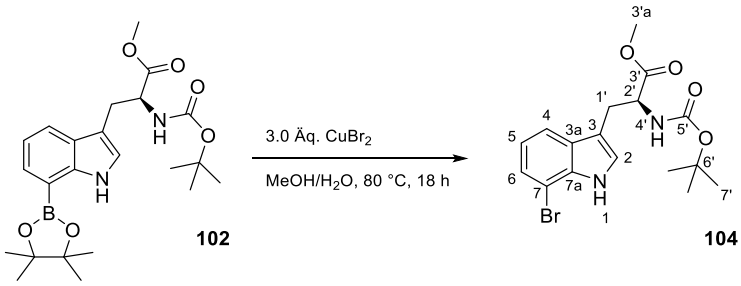
^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 174.5 (C-3'), 157.8 (C-5'), 134.9 (C-7a), 130.6 (C-3a), 125.6 (C-2), 121.9 (C-6), 120.6 (C-5), 118.2 (C-4), 117.8 (C-7), 112.3 (C-3), 80.6 (C-6'), 56.0 (C-2'), 52.6 (C-3'a), 28.8 (C-1'), 28.6 (C-7').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{17}H_{21}N_2O_4Cl+H^+$: 353.1263 [M+H]$^+$; gefunden: 353.1254.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3348 (w), 2978 (w), 1740 (s), 1697 (vs), 1495 (s), 1367 (s), 1165 (vs), 1051 (m), 779 (m).

---

104 (*S*)-(*N*-*tert*-Butoxycarbonyl)-7-bromtryptophanmethylester



Boc-geschützter Boronsäureester **102** (0.49 g, 1.1 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (10 mL) gelöst und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Kupfer(II)-bromid (0.74 g, 3.3 mmol, 3.0 Äq.) wurde in Wasser (15 mL) gelöst und der Reaktionslösung zugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h bei 80 °C gerührt. Nachdem die Reaktion abgekühlt ist, wurde das Gemisch mit EE (20 mL) und wässriger, gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit wässriger EDTA-Lösung (100 mM, 2 x 3 mL) sowie gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/EE: 3/1) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.24 g, 0.60 mmol, 55 %.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.33 (s, 1H, 1-NH), 7.49 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.34 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.6 Hz, 1H, 6-H), 7.06 (d, $^3J_{2,1}$ = 2.4 Hz, 1H, 2-H), 7.00 (t, $^3J_{5,4,6}$ = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 5.08

(d, $^{3}J_{4';2'}$ = 8.2 Hz, 1H, 4'-NH), 4.65 (dt, $^{3}J_{2';4'}$ = 8.2 Hz, $^{3}J_{2';1'}$ = 5.5 Hz, 1H, 2'-H), 3.67 (s, 3H, 3'a-H), 3.37 – 3.16 (m, 2H, 1'-H), 1.43 (s, 9H, 7'-H).

^{13}C-NMR (76 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 172.7 (C-3'), 155.3 (C-5'), 134.9 (C-7a), 129.0 (C-3a), 124.7 (C-6), 123.5 (C-2), 120.9 (C-5), 118.2 (C-4), 111.8 (C-3), 104.9 (C-7), 80.1 (C-6'), 54.2 (C-2'), 52.4 (C-3'a), 28.4 (C-7'), 28.3 (C-1').

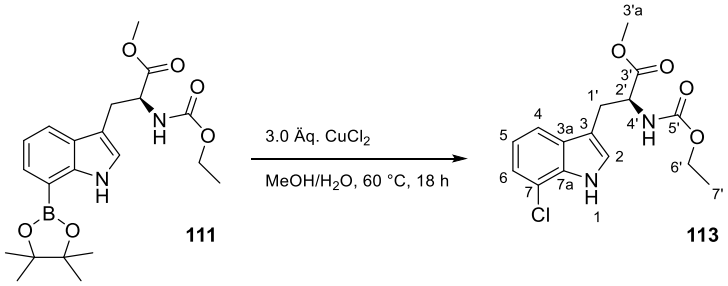
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{17}H_{21}N_2O_4Br+H^+$: 397.0757 $[M+H]^+$; gefunden: 397.0754.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3363 (w), 3302 (w), 1733 (s), 1695 (vs), 1529 (s), 1437 (m), 1367 (m), 1229 (s), 1164 (s), 1083 (m), 1016 (m), 772 (m), 728 (m).

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein, wobei kleine Abweichungen auf ein unterschiedliches Lösungsmittel zurückzuführen sind.[261]

---

113 (*S*)-(*N*-Ethoxycarbonyl)-7-chlortryptophanmethylester



Eoc-geschützter Boronsäureester **111** (1.0 g, 2.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (15 mL) gelöst und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Kupfer(II)-chlorid (1.2 g, 8.5 mmol, 3.0 Äq.) wurde in Wasser (15 mL) gelöst und der Reaktionslösung zugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h bei 60 °C gerührt. Nachdem die Reaktion abgekühlt ist, wurde das Gemisch mit EE (30 mL) und wässriger, gesättigter NaCl-Lösung (15 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 15 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit wässriger EDTA-Lösung (100 mM, 2 x 5 mL) sowie gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/EE: 3/1) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 652 mg, 2.0 mmol, 83 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.33 (s, 1H, 1-NH), 7.45 (dt, $^{3}J_{4,5}$ = 8.0 Hz, $^{4}J_{4,6}$ = 0.8 Hz, 1H, 4-H), 7.19 (dd, $^{3}J_{6,5}$ = 7.6 Hz, $^{4}J_{6,4}$ = 0.9 Hz, 1H, 4-H), 7.09 – 7.01 (m, 2H, 5-H, 2-H), 5.20 (d, $^{3}J_{4';2'}$ = 8.2 Hz, 1H, 4'-NH), 4.70 (app. q, ^{3}J = 6.0 Hz, 1H, 2'-H), 4.12 (q, $^{3}J_{6';7'}$ = 7.1 Hz, 2H, 6'-H), 3.68 (s, 3H, 3'a-H), 3.29 (d, $^{3}J_{1';2'}$ = 5.6 Hz, 2H, 1'-H), 1.22 (d, $^{3}J_{7';6'}$ = 7.3 Hz, 2H, 7'-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 172.5 (C-3'), 156.1 (C-5'), 133.5 (C-7a), 129.2 (C-3a), 123.5 (C-2), 121.8 (C-6), 120.6 (C-5), 117.5 (C-4), 116.9 (C-7), 111.5 (C-3), 61.3 (C-6'), 54.4 (C-2'), 52.5 (C-3'a), 28.3 (C-1'), 14.7 (C-7').

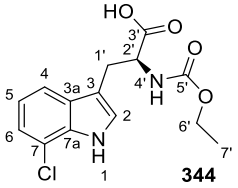
Reste der abgespaltenen Bor-Pinakol-Spezies sind noch im NMR-Spektrum erkennbar, da sich diese in der chromatographischen Aufreinigung nicht/nur in geringem Maße vom Produkt entfernt werden kann.

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{15}H_{17}N_2O_6Cl+H^+$: 325.0950 $[M+H]^+$; gefunden: 325.0956.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3322 (br), 2983 (br), 1698 (vs), 1518 (m), 1437 (s), 1340 (s), 1227 (s), 1203 (s), 1057 (s), 779 (s).

---

344 (*S*)-(*N*-Ethoxycarbonyl)-7-chlortryptophan



344

Bei der Substitution des Pinakolboronsäureester durch Chlor wurde in einem Reaktionsansatz neben dem erwarteten Reaktionsprodukt auch die oben dargestellte Säure **344** erhalten. Dabei wurden unter Beachtung derselben Reaktionsbedingungen aus dem Eoc-geschützten Boronsäureester **111** (2.6 g, 6.3 mmol, 1.0 Äq.) 67 % des zuvor beschriebenem Tryptophanmethylesters **113** erhalten sowie die freie Säure **344**.

Ausbeute Nebenprodukt**:** 491 mg, 1.6 mmol, 25 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 10.67 (s, 0H), 7.51 (dd, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, $^4J_{4,6}$ = 1.0 Hz, 1H, 4-H), 7.17 (s, 1H, 2-H), 7.10 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.5 Hz, 1H, 6-H), 6.98 (t, $^3J_{5,6,4}$ = 7.7 Hz, 1H, 5-H), 4.47 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 8.1 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 5.1 Hz, 1H, 2'-H), 4.02 (q, $^3J_{6',7'}$ = 7.0 Hz, 2H, 6'-H), 3.33 (m, 1H, 1'-H_a), 3.13 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.7 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 8.1 Hz, 1H, 1-H_b), 1.18 (t, $^3J_{7',6'}$ = 7.1 Hz, 3H, 7'-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD) δ [ppm] = 175.5 (C-3'), 158.6 (C-5), 134.9 (C-7a), 130.7 (C-3a), 125.6 (C-2), 121.8 (C-6), 120.6 (C-5), 118.2 (C-4), 117.7 (C-7), 112.5 (C-3), 62.0 (C-6'), 56.1 (C-2'), 28.7 (C-1'), 14.9 (C-7').

Das ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektrum enthält Essigsäure, da nur damit die Elution in der chromatographischen Aufreinigung bewirkt werden konnte.

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{14}H_{15}N_2O_4Cl+H^+$: 311.0793 $[M+H]^+$; gefunden: 311.0793

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3412 (br), 3330 (br), 3989 (br), 1733 (s), 1679 (vs), 1526 (s), 1436 (m), 1222 (s), 1202 (s), 1051 (s), 781 (s).

---

114 (*S*)-(*N*-Methoxycarbonyl)-7-chlortryptophanmethylester



112 **114**

Moc-geschützter Boronsäureester **112** (0.30 g, 0.75 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (7 mL) gelöst und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Kupfer(II)-chlorid (0.30 g, 2.2 mmol, 3.0 Äq.) wurde in Wasser (7 mL) gelöst und der Reaktionslösung zugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h bei 60 °C gerührt. Nachdem die Reaktion abgekühlt ist, wurde das Gemisch mit EE (30 mL) und wässriger, gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit wässriger EDTA-Lösung (100 mM, 2 x 5 mL) sowie gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/EE: 3/1) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 191 mg, 0.62 mmol, 82 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.47 (d, $^3J_{4,5}$ = 8.0 Hz, 1H, 4-H), 7.16 (s, 1H, 2-H), 7.11 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.5 Hz, 1H, 6-H), 7.00 (t, $^3J_{5,6,4}$ = 7.7 Hz, 1H, 5-H), 4.48 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 8.1, $^3J_{2',1'}$ = 5.8 Hz, 1H, 2'-H), 3.66 (s, 3H, 3'a-H), 3.60 (s, 3H, 6'-H), 3.26 (dd, $^2J_{1',1'}$ =14.7 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 5.8 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.13 (dd, $^3J_{1',1'}$ = 14.6 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 8.0 Hz, 1H, 1'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 174.2 (C-3'), 159.0 (C-5'), 134.9 (C-7a), 130.5 (C-3a), 125.6 (C-2), 121.9 (C-6), 120.7 (C-5), 118.1 (C-4), 117.8 (C-7), 112.2 (C-3), 56.4 (C-2'), 52.7 (C-3'a), 52.7 (C-6'), 28.7 (C-1').

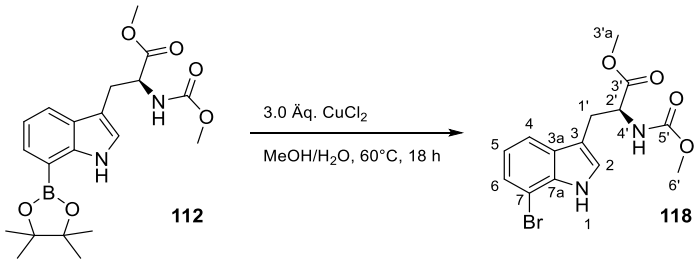
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{14}H_{15}N_2O_4Cl+H^+$: 311.0793 $[M+H]^+$; gefunden: 311.0796.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3343 (br), 2945 (w), 2925 (w), 2502 (w), 1703 (vs), 1458 (s), 1350 (m), 1202 (s), 1064 (m), 779 (m).

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein, wobei einige Abweichungen auf ein unterschiedliches Lösungsmittel zurückzuführen sind.[84]

---

118 (*S*)-(*N*-Methoxycarbonyl)-7-bromtryptophanmethylester



Moc-geschützter Boronsäureester **112** (0.70 g, 1.7 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (16 mL) gelöst und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Kupfer(II)-bromid (1.2 g, 5.2 mmol, 3.0 Äq.) wurde in Wasser (16 mL) gelöst und der Reaktionslösung zugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h bei 60 °C gerührt. Nachdem die Reaktion abgekühlt ist, wurde das Gemisch mit EE (30 mL) und wässriger, gesättigter NaCl-Lösung (15 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 15 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit wässriger EDTA-Lösung (100 mM, 2 x 5 mL) sowie gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel

an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/EE: 3/1) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.47 g, 1.3 mmol, 76 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.51 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.94 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.48 (dd, *J* = 8.0, 5.8 Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.26 (dd, *J* = 14.7, 5.8 Hz, 1H), 3.12 (dd, *J* = 14.6, 8.0 Hz, 1H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 174.2 (C-3'), 159.0 (C-5'), 136.4 (C-7a), 130.3 (C-3a), 125.6 (C-2), 125.0 (C-6), 121.1 (C-5), 118.6 (C-4), 112.3 (C-3), 105.6 (C-7), 56.4 (C-2'), 52.7 (C-3'a), 52.7 (C-6'), 28.8 (C-1').

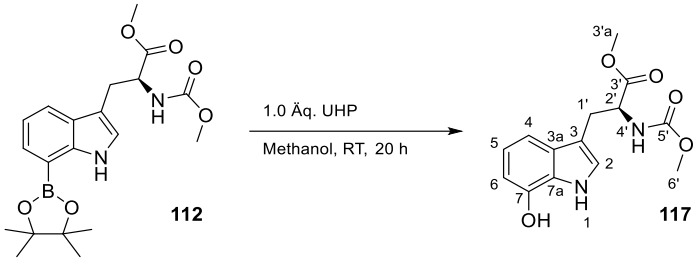
Reste der abgespaltenen Bor-Pinakol-Spezies sind noch im NMR-Spektrum erkennbar, da sich diese in der chromatographischen Aufreinigung nicht/nur in geringem Maße vom Produkt entfernt werden kann.

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{14}H_{15}N_2O_4Br+H^+$: 355.0288 $[M+H]^+$; gefunden: 305.0287.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3344 (br), 2953 (w), 2499 (w), 1700 (vs), 1454 (s), 1350 (m), 1200 (s), 1061 (m), 776 (m), 737 (m).

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein, wobei einige Abweichungen auf ein unterschiedliches Lösungsmittel zurückzuführen sind.[84]

117 (*S*)-(*N*-Methoxycarbonyl)-7-hydroxytryptophanmethylester



Entsprechend Gupta *et al.*[195] wurde Boronsäureester **112** (100 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äq.) in Methanol (5 mL) gelöst und unter Rühren Carbamidperoxid (UHP) (33 mg, 0.25 mmol, 1.4 Äq.) in mehreren Portionen zugegeben. Die Reaktion wurde für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Wasser zur Reaktionslösung hinzugegeben und die wässrige Phase mit DCM extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten, organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/MeOH: 99/1) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 58 mg, 0.20 mmol, 79 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.02 (s, 1H, 2-H), 7.01 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.3 Hz, 1H, 4-H), 6.83 (t, $^3J_{5,4,6}$ = 7.7 Hz, 1H, 5-H), 6.51 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.5 Hz, 1H, 6-H), 4.47 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 7.8 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 5.8 Hz, 1H, 2'-H), 3.66 (s, 3H, 3'a-H), 3.60 (s, 3H, 6'-H), 3.21 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.6 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 5.8 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.10 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.6 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 7.9 Hz, 1H, 1'-H_b).

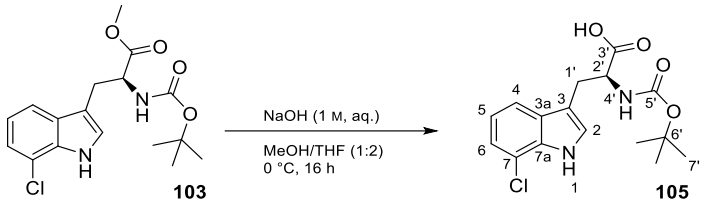
^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 174.5 (C-3'), 159.0 (C-5'), 144.7 (C-7), 130.7 (C-3a), 128.0 (C-7a), 124.0 (C-2), 120.6 (C-5), 111.1 (C-3), 110.7 (C-4), 106.8 (C-6), 56.5 (C-2'), 52.6 (C-3'a), 52.6 (C-6'), 28.9 (C-1').

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3363 (br), 2954 (w), 1698 (s), 1582 (m), 1523 (w), 1440 (s), 1365 (m), 1268 (m), 1227 (w), 1063 (s), 977 (m), 781 (w), 735 (w), 545 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{14}H_{16}N_2O_5$+H$^+$: 293.1132 [M+H]$^+$; gefunden: 293.1132.

7.3.1.4. Entfernung der *N*- und *O*-Schutzgruppe der Tryptophane

105 (*S*)-(*N*-*tert*-Butoxycarbonyl)-7-chlortryptophan



Methylester **103** (55 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF (1 mL) gelöst und anschließend wurden Methanol (0.5 mL) und Natronlauge (1 M, 0.5 mL) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 16 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von Salzsäure (0.5 M, ca. 1 mL) auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und die Reaktionslösung mit EE (5 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 3 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in ausreichender Reinheit erhalten, sodass keine weiteren Aufreinigsschritte benötigt wurden.

Ausbeute: 50 mg, 0.15 mmol, 95 %.

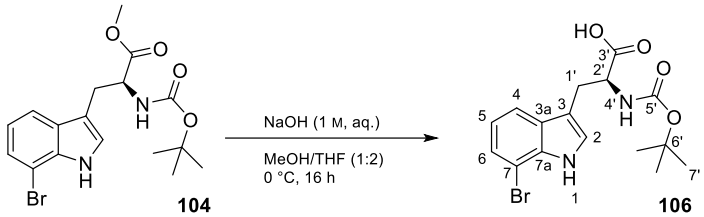
^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.52 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.17 (s, 1H, 2-H), 7.10 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.5 Hz, 1H, 6-H), 6.99 (t, $^3J_{5,6,4}$ = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 4.42 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 7.9 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 5.1 Hz, 1H, 2'-H), 3.36 – 3.27 (m, 1H, 1'-H$_a$), 3.12 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.7 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 7.9 Hz, 1H, 1'-H$_b$), 1.38 (s, 9H, 7'-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 175.7 (C-3'), 157.8 (C-5'), 134.9 (C-7a), 130.8 (C-3a), 125.6 (C-2), 121.8 (C-6), 120.6 (C-5), 118.3 (C-4), 117.7 (C-7), 112.5 (C-3), 80.5 (C-6'), 55.8 (C-2'), 28.8 (C-1'), 28.7 (C-7').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{16}H_{19}N_2O_4Cl$+H$^+$: 339.1106 [M+H]$^+$; gefunden: 339.1114.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 2927 (br), 2513 (w), 1714 (vs), 1635 (m), 1408 (vs), 1367 (s), 1256 (m), 1162 (s), 775 (s), 737 (s).

106 (*S*)-(*N*-*tert*-Butoxycarbonyl)-7-bromtryptophan



Methylester **104** (100 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF (2 mL) gelöst und anschließend wurden Methanol (1 mL) und Natronlauge (1 M, 0.5 mL) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 16 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von Salzsäure (0.5 M, ca. 1 mL) auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und die Reaktionslösung mit EE (10 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in ausreichender Reinheit erhalten, sodass keine weiteren Aufreinigsschritte benötigt wurden.

Ausbeute: 95 mg, 0.25 mmol, quant.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 10.44 (s, 1H, 3'-OH), 7.44 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.14 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.5 Hz, 1H, 6-H), 7.05 (s, 1H, 2-H), 6.81 (t, $^3J_{5,6,4}$ = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 4.31 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 7.9 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 5.1 Hz, 1H, 2'-H), 3.22 – 3.16 (m, 1H, 1'-H_a), 3.00 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.7 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 7.9 Hz, 1H, 1'-H_b), 1.25 (s, 9H, 7'-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 175.6 (C-3'), 157.7 (C-5'), 136.3 (C-7a), 130.5 (C-3a), 125.5 (C-2), 124.9 (C-6), 121.0 (C-5), 118.9 (C-4), 112.5 (C-3), 105.5 (C-7), 80.5 (C-6'), 55.7 (C-2'), 28.8 (C-1'), 28.6 (C-7').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{16}H_{19}N_2O_4Br+H^+$: 383.0601 $[M+H]^+$; gefunden: 383.0605.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3348 (br), 2984 (w), 1713 (vs), 1653 (s), 1398 (vs), 1367 (s), 1153 (s), 1134 (s), 1049 (s), 774 (vs) 736 (vs).

Die ^{1}H- and ^{13}C-NMR Signale stimmen mit den publizierten Spektren überein, wobei kleine Abweichungen auf ein unterschiedliches Lösungsmittel, bzw. auf einen unterschiedlichen pH-Wert zurückzuführen sind.[262, 263]

82-HCl (*S*)-7-Chlortryptophanhydrochlorid



Das *tert*-Butylcarbamat **105** (35 mg, 0.10 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Diethylether (1 mL) gelöst und anschließend Chlorwasserstoff (1 M, in Diethylether, 0.3 mL) vorsichtig zugetropft. Die Reaktion wurde nicht gerührt, sondern für 3 h unangetastet stehen gelassen. Das ausgefallene

Produkt wurde erhalten, indem der Überstand abpipettiert wurde. Dabei wurde der Niederschlag mit kaltem Diethylether gewaschen und erneut der Überstand abgenommen. Anschließend wurden Lösungsmittelreste an vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in ausreichender Reinheit erhalten, sodass keine weiteren Aufreinigsschritte benötigt wurden.

Ausbeute: 7.1 mg, 26 µmol, 25 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.57 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.31 (s, 1H, 2-H), 7.17 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.5 Hz, 1H, 6-H), 7.05 (t, $^3J_{5,6,4}$ = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 4.27 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 7.7 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 5.1 Hz, 1H, 2'-H), 3.50 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 15.3 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 5.1 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.36 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 15.3 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 7.7 Hz, 1H, 1'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 171.5 (C-3'), 135.3 (C-7a), 130.2 (C-3a), 126.8 (C-2), 122.4 (C-6), 121.2 (C-5), 118.1 (C-7), 118.0 (C-4), 109.2 (C-3), 54.4 (C-2'), 27.5 (C-1').

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein.[103]

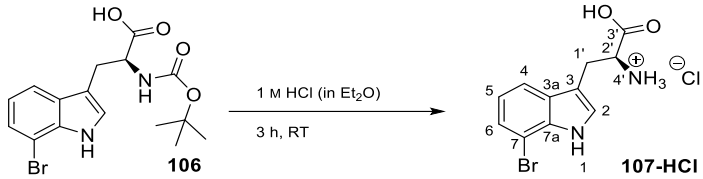
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{11}H_{11}N_2O_2Cl+H^+$: 239.0582 $[M+H]^+$; gefunden: 239.0589.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3424 (br), 3234 (br), 2924 (br), 1738 (vs), 1626 (m), 1568 (m), 1492 (vs), 1339 (s), 1204 (s), 1092 (m), 782 (m), 736 (m).

Mithilfe von Ionen-Austausch-Chromatographie wurden Salze entfernt, wodurch dass freie Amin der Verbindung erhalten wurden, wodurch sich die NMR-Signale leicht verschieben. Zum Vergleich ist das entsprechende ^{1}H-NMR-Spektrum angegeben.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.65 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.30 (s, 1H, 2-H), 7.14 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.6 Hz, 1H, 6-H), 7.03 (t, $^3J_{5,6,4}$ = 7.7 Hz, 1H, 5-H), 3.87 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 9.0, $^3J_{2',1'}$ = 4.2 Hz, 1H), 3.49 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 15.3 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 4.2 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.19 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 15.3 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 9.0 Hz, 1H, 1'-H_b).

107-HCl (*S*)-7-Bromtryptophanhydrochlorid



tert-Butylcarbamat **106** (110 mg, 0.29 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Diethylether (3 mL) gelöst und anschließend Chlorwasserstoff (1 M, in Diethylether, 1 mL) vorsichtig zugetropft. Die Reaktion wurde nicht gerührt, sondern für 3 h unangetastet stehen gelassen. Das ausgefallene Produkt wurde erhalten, indem der Überstand abpipettiert wurde. Dabei wurde der Niederschlag mit kaltem Diethylether gewaschen und erneut der Überstand abgenommen. Anschließend wurden Lösungsmittelreste an vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in ausreichender Reinheit erhalten, sodass keine weiteren Aufreinigsschritte benötigt wurden.

Ausbeute: 11 mg, 35 µmol, 12 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.62 (d, $^{3}J_{4,5}$= 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.33 (s, 1H, 2-H), 7.33-7.31 (m, 1H, 6-H), 7.00 (t, $^{3}J_{5,4,6}$= 7.8 Hz, 1H, 5-H), 4.28 (dd, $^{3}J_{2',1'}$ = 7.7 Hz, 5.1 Hz, 1H, 2'-H), 3.49 (dd, $^{2}J_{1',1'}$ = 15.3 Hz, $^{3}J_{1',2'}$ = 5.1 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.36 (dd, $^{2}J_{1',1'}$= 15.4 Hz, $^{3}J_{1',2'}$ = 7.7 Hz, 1H, 1'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 171.5 (C-3'), 136.7(C-7a), 129.9 (C-3a), 126.8 (C-2), 125.5 (C-6), 121.6 (C-5), 118.6 (C-4), 109.3 (C-3), 105.8 (C-7), 54.4 (C-2'), 27.5 (C-1').

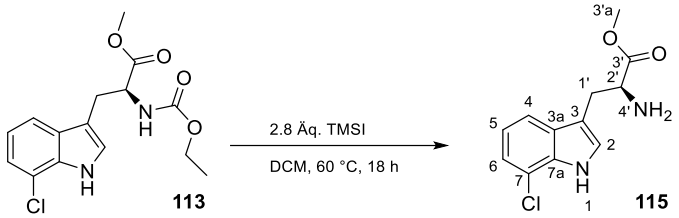
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{11}H_{11}N_2O_2Br+H^+$: 283.0077 $[M+H]^+$; gefunden: 283.0081.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3423 (w), 2914 (w), 1731 (m), 1499 (s), 1439 (s), 1334 (s), 1199 (s), 1087 (m), 772 (s), 727 (s).

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein.[103]

---

115 (*S*)-7-Chlortryptophanmethylester



TMSI (1.9 mL, 14 mmol, 2.8 Äq.) wurde in DCM (25 mL) gelöst und bei 0 °C gerührt. Ethylcarbamat **113** (1.6 g, 5.0 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem DCM gelöst (15 mL) und vorsichtig zu der rührenden Lösung hinzugetropft. Die Reaktion wurde dann auf 60 °C erhitzt und für 1 Stunde gerührt. Anschließend wurde die Reaktion auf 0 °C gekühlt und vorsichtig Methanol hinzugegeben (1 mL). Nachdem die Reaktion für weitere 15 min gerührt wurde, wurde das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Der verbleibende Rückstand wurde in EE (30 mL) und Salzsäure (1 M, 20 mL) gelöst. Die organische Phase wurde anschließend mit verdünnter Salzsäure (0.25 M, 3 x 5 mL) extrahiert und alle wässrigen Phasen vereint. Danach wurde die wässrige Phase durch Zugabe von Natronlauge (1 M, ca. 25 mL) auf einen pH-Wert von 11 eingestellt und die wässrige Phase mit EE (5 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in ausreichender Reinheit erhalten, sodass keine weiteren Aufreinigsschritte benötigt wurden.

Ausbeute: 1.1 g, 4.3 mmol, 87 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.50 (dd, $^{3}J_{4,5}$ = 8.0 Hz, $^{3}J_{4,6}$ = 1.1 Hz, 1H, 4-H), 7.19 (s, 1H, 2-H), 7.14 (dd, $^{3}J_{6,5}$ = 7.5 Hz, $^{4}J_{6,4}$ = 1.0 Hz, 1H, 6-H), 7.02 (td, $^{3}J_{5,6,4}$ = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 3.79 (t, $^{3}J_{2',1'}$ = 6.2 Hz, 1H, 2'-H), 3.66 (s, 3H, 3'a), 3.20 (dd, $^{2}J_{1',1'}$ = 14.3 Hz, $^{2}J_{1',2'}$ = 5.7 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.13 (dd, $^{2}J_{1',1'}$ = 14.3 Hz, $^{3}J_{1',2'}$ = 6.7 Hz, 1H, 1'-H_b).

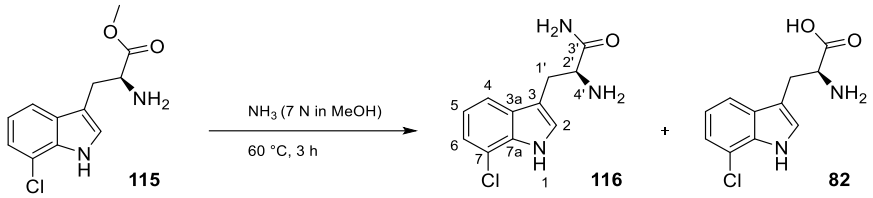
^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 176.6 (C-3'), 135.0 (C-7a), 130.6 (C-3a), 125.8 (C-2), 122.0 (C-6), 120.7 (C-5), 118.2 (C-4), 117.8 (C-7), 112.0 (C-3), 55.9 (C-2'), 52.4 (C-3'a), 31.4 (C-1').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{12}H_{13}N_2O_2Cl+H^+$: 253.0738 $[M+H]^+$; gefunden: 253.0739.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3203 (br), 1704 (s), 1663 (s), 1565 (s), 1493 (m), 1437 (s), 1354 (s), 1226 (m), 1088 (m), 781 (s), 735 (s).

---

116 (*S*)-2-Amino-3-(7-chlor-1*H*-indol-3-yl)propanamid



Methylester **115** (1.1 g, 3.7 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Ammoniak (7 N in Methanol, 5 mL) gelöst und 2.5 mL Wasser hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 3 h bei 60 °C gerührt. Nachdem die Reaktion abgekühlt ist, wurde das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt enthielt ein 1:2 Gemisch (bestimmt anhand der NMR-Integrale) des Amids **116** und der Säure **82**. Das Rohprodukt wurde im nächsten Schritt eingesetzt, um aus dem Amid **116** die Säure **82** zu erhalten.

Die Analytik des sauberen Amids stammte aus einem weiteren kleineren Ansatz, welcher für 16 h bei 60 °C gerührt wurde. Dabei wurde in quantitativen Ausbeuten das Amid **116** in hoher Reinheit ohne weitere Aufreinigungsschritte erhalten.

Ausbeute Amid 116: 576 mg, 2.4 mmol, 66%. **Ausbeute Säure 82:** 290 mg, 1.2 mmol, 33%.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.59 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.21 (s, 1H, 2-H), 7.11 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.5 Hz, 1H, 6-H), 6.99 (t, $^3J_{5,6,4}$ = 7.8 Hz, 1H, 4-H), 3.66 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 7.5 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 5.8 Hz, 1H, 2'-H), 3.19 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 5.8 Hz, 1H, 1'-H_a), 2.99 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 7.5 Hz, 1H, 1-H_b).

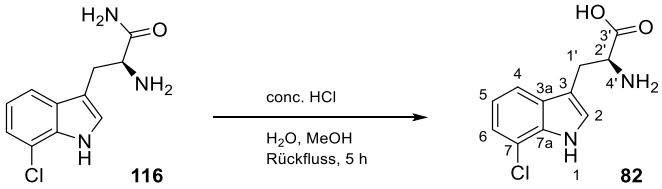
^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 179.7 (C-3), 135.0 (C-7a), 130.7 (C-3a), 125.9 (C-2), 121.9 (C-6), 120.9 (C-5), 118.4 C-4), 117.7 (C-7), 112.5 (C-3), 56.4 (C-2'), 32.1 (C-1').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{11}H_{12}N_3OCl+H^+$: 238.0742 $[M+H]^+$; gefunden: 238.0741.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3401 (m), 3355 (br), 3166 (br), 2923 (m), 2855 (m), 1686 (s), 1460 (vs), 1434 (s), 1330 (s), 1198 (s), 1082 (s), 831 (m), 780 (vs).

---

82 (*S*)-7-Chlortryptophan



Das Rohprodukt (866 mg, ~3.6 mmol, 1.0 Äq.) aus dem vorherigen Schritt, welches ein 2:1-Verhältnis des Amids **116** und der Säure **82** enthält, wurde in Wasser (5 mL) und Methanol

(0.5 mL) gelöst. Anschließend wurde Salzsäure (konz., 15 mL) hinzugeben und die Reaktion für 5 h zum Rückfluss erhitzt. Das Rohprodukt wurde anschließend mithilfe eines Kationenaustauschers (Dowex, 50 W X 8) von Verunreinigungen befreit. Nachdem das Rohprodukt aufgetragen wurde, wurde die Matrix mit Methanol/Wasser (1/1) gewaschen und das Produkt anschließend mit Ammoniakwasser (1 M) eluiert. Das Wasser wurde anschließend in der Lyophylle entfernt.

Ausbeute: 625 mg, 2.6 mmol, 72 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.66 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.29 (s, 1H, 2-H), 7.14 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.5 Hz, 1H, 6-H), 7.02 (t, $^3J_{5,6,4}$ = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 3.86 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 9.0, $^3J_{2',1'}$ = 4.2 Hz, 1H), 3.49 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 15.3 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 4.2 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.18 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 15.3 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 9.1 Hz, 1H, 1'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 174.3 (C-3'), 135.3 (C-7a), 130.4 (C-3a), 126.4 (C-2), 122.2 (C-6), 121.0 (C-5), 118.4 (C-4), 117.9 (C-7), 110.9 (C-3), 56.6 (C-2'), 28.4 (C-1').

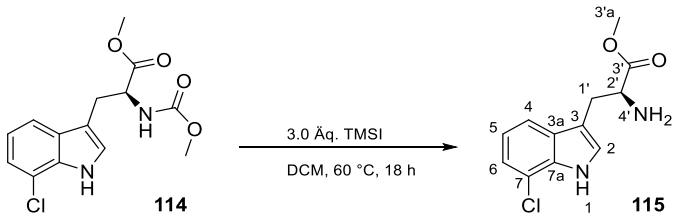
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{11}H_{11}N_2O_2Cl+H^+$: 239.0582 [M+H]$^+$; gefunden: 239.0583.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3446 (br), 3120 (m), 3035 (m), 2824 (br), 1737 (m), 1402 (vs), 1330 (m), 1199 (m), 1084 (m), 835 (m), 783 (m), 733 (m).

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein, wobei kleine Abweichungen auf ein unterschiedliches Lösungsmittel zurückzuführen sind.[103]

---

115 (*S*)-7-Chlortryptophanmethylester



TMSI (0.2 mL, 1.4 mmol, 3.0 Äq.) wurde in DCM (8 mL) gelöst und bei 0 °C gerührt. Methylcarbamat **114** (0.15 g, 0.48 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem DCM gelöst (2 mL) und vorsichtig zu der rührenden Lösung hinzugetropft. Die Reaktion wurde dann auf 60 °C erhitzt und für 1 Stunde gerührt. Anschließend wurde die Reaktion auf 0 °C gekühlt und vorsichtig Methanol hinzugegeben (1 mL). Nachdem die Reaktion für weitere 15 min gerührt wurde, wurde das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Der verbleibende Rückstand wurde in EE (15 mL) und Salzsäure (1 M, 15 mL) gelöst. Die organische Phase wurde anschließend mit verdünnter Salzsäure (0.25 M, 3 x 5 mL) extrahiert und alle wässrigen Phasen vereint. Danach wurde die wässrige Phase durch Zugabe von Natronlauge (1 M, ca. 20 mL) auf einen pH-Wert von 11 eingestellt und die wässrige Phase mit EE (5 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in ausreichender Reinheit erhalten, sodass keine weiteren Aufreinigsschritte benötigt wurden.

Ausbeute: 89 mg, 0.35 mmol, 73 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.47 (dd, $^3J_{4,5}$ = 8.0, $^4J_{4,6}$ = 0.9 Hz, 1H, 4-H), 7.16 (s, 1H, 2-H), 7.11 (dd, $^3J_{6,5}$ = 7.6 Hz, $^4J_{6,4}$ = 0.9 Hz, 1H, 4-H), 6.99 (t, $^3J_{5,6,4}$ = 7.7 Hz, 1H, 5-H), 3.77 (t, $^3J_{2',1'}$ = 6.2 Hz, 1H, 2'-H), 3.63 (s, 3H, 3'a-H), 3.20 – 3.15 (dd, $^2J_{1',1''}$ = 14.3 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 5.9 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.11 (dd, $^2J_{1',1''}$ = 14.4 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 6.5 Hz, 1H, 1'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 176.6 (C-3'), 135.0 (C-7a), 130.6 (C-3a), 125.8 (C-2), 122.0 (C-6), 120.7 (C-5), 118.2 (C-4), 117.8 (C-7), 112.0 (C-3), 55.9 (C-2'), 52.4 (C-3'a), 31.3 (C-1').

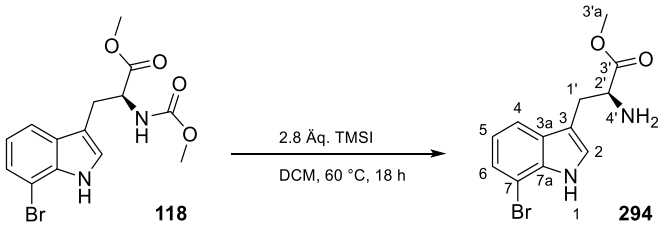
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{12}H_{13}N_2O_4Cl+H^+$: 253.0739 [M+H]$^+$; gefunden: 253.0742.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3364 (br), 3139 (br), 2919 (w), 2846 (w), 1732 (vs), 1566 (w), 1437 (m), 1342 (m), 1201 (s), 1084 (m), 780 (m), 735 (m).

Es handelt sich um das gleiche Produkt, welches ebenfalls aus der Entschützung des Ethylcarbamats **109** erhalten wurde.

---

294 (*S*)-7-Bromtryptophanmethylester



TMSI (0.45 mL, 3.3 mmol, 3.0 Äq.) wurde in DCM (15 mL) gelöst und bei 0 °C gerührt. Methylcarbamat **118** (0.40 g, 1.1 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem DCM gelöst (5 mL) und vorsichtig zu der rührenden Lösung hinzugetropft. Die Reaktion wurde dann auf 60 °C erhitzt und für 1 Stunde gerührt. Anschließend wurde die Reaktion auf 0 °C gekühlt und vorsichtig Methanol hinzugegeben (1 mL). Nachdem die Reaktion für weitere 15 min gerührt wurde, wurde das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Der verbleibende Rückstand wurde in EE (15 mL) und Salzsäure (1 M, 15 mL) gelöst. Die organische Phase wurde anschließend mit verdünnter Salzsäure (0.25 M, 3 x 5 mL) extrahiert und alle wässrigen Phasen vereint. Danach wurde die wässrige Phase durch Zugabe von Natronlauge (1 M, ca. 20 mL) auf einen pH-Wert von 11 eingestellt und die wässrige Phase mit EE (5 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde in ausreichender Reinheit erhalten, sodass keine weiteren Aufreinigsschritte benötigt wurden.

Ausbeute: 0.17 g, 0.57 mmol, 51 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.51 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.27 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.5 Hz, 1H, 6-H), 7.17 (s, 1H, 2-H), 6.94 (t, $^3J_{5,6,4}$ = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 3.82-3.76 (m, 1H, 2'-H), 3.64 (s, 3H, 3'a-H), 3.17 (dd, $^2J_{1',1''}$ = 14.5 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 5.8 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.11 (dd, $^2J_{1',1''}$ = 14.4 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 6.5 Hz, 1H, 1'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 176.4 (C-3'), 136.5 (C-7a), 130.3 (C.3a), 125.8 (C-2), 125.1 (C-6), 121.1 (C-5), 118.7 (C-4), 112.0 (C-3), 105.7 (C-7), 55.8 (C-2'), 52.5 (C-3'a), 31.3 (C-1').

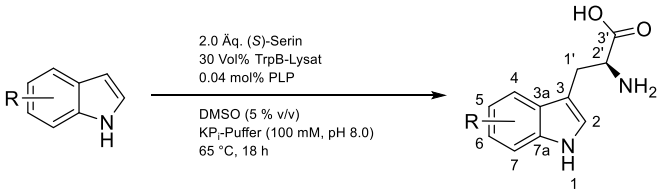
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{12}H_{13}N_2O_2Br+H^+$: 297.0234 $[M+H]^+$; gefunden: 297.0236.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3358 (br), 2950 (w), 2846 (w), 1734 (vs), 1562 (w), 1436 (m), 1201 (s), 777 (m), 736 (m).

Die gemessenen Werte entsprechen den publizierten Daten überein, wobei kleine Abweichungen auf ein unterschiedliches Lösungsmittel, bzw. auf einen unterschiedlichen pH-Wert zurückzuführen sind.[264]

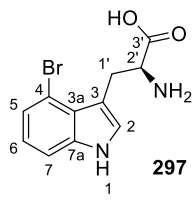
7.3.1.5. Enzymatische Tryptophan-Synthese ausgehend von Indolen

Allgemeine Synthesevorschrift SV1



Das jeweilige Indol-Derivat (1.0 Äq.) und (*S*)-Serin (2.0 Äq.) wurden in eine 50 mL Schraubdeckel-Flasche gegeben und in KP_i (1.4 mL/100 mg Edukt, 100 mM, pH 8.0 bei 65 °C) sowie DMSO (0.1 mL/100 mg Edukt) gelöst. Nach der Zugabe von Pyridoxalphosphat (0.04 mol%) und TrpB^{Pf0A9} oder TrpB^{Tm2F3}-Zelllysat (0.6 mL/100 mg Edukt,) (siehe Präparation in Kapitel 7.2.7) wurde das Reaktionsgemisch für 20 h bei 65 °C und 180 rpm geschüttelt. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt ist, wurde das Gemisch für 30 min auf Eis gelagert und anschließend das auskristallisierte Produkt abfiltriert. Das Produkt wurde dabei mit ein wenig kaltem Wasser gewaschen (2 x 2 mL). Das Produkt wurde anschließend lyophilisiert, um Wasserrückstände zu entfernen und somit als weiß-gräulicher Feststoff erhalten.

297 (*S*)-4-Bromtryptophan



297

Gemäß der Synthesevorschrift SV1 wurde 4-Bromindol **295** (1.0 g, 5.1 mmol, 1.0 Äq.) und (*S*)-Serin (1.1 g, 10 mmol, 2.0 Äq.) mithilfe der TrpB-Mutante *Tm*2F3 umgesetzt.

Ausbeute: 0.57 g, 2.0 mmol, 51 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.38 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.1 Hz, 1H, 7-H), 7.27 (s, 1H, 2-H), 7.22 (d, $^3J_{5,6}$ = 7.5 Hz, 1H, 5-H), 7.01 (t, $^3J_{6,5/6,7}$ = 7.8 Hz, 1H, 6-H), 4.22 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 10.6 Hz, 4.6 Hz, 1H,

2'-H), 3.99 (dd, $^{2}J_{1',1''}$ = 15.1 Hz, $^{3}J_{1',2'}$ = 4.7 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.13 (dd, $^{2}J_{1',1''}$ = 15.1 Hz, $^{3}J_{1',2'}$ = 10.5 Hz, 1H, 1'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.1 (C-3'), 140.0 (C-7a), 127.8 (C-2), 126.3 (C-3a), 124.6 (C-5), 123.8 (C-6), 114.3 (C-4), 112.3 (C-7), 109.9 (C-3), 56.9 (C-2'), 29.1 (C-1').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{11}H_{11}N_2O_2Br+H^+$: 283.0077 $[M+H]^+$; gefunden: 283.0077.

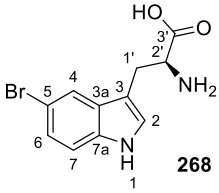
IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3386 (w), 2929 (w), 1731 (s), 1506 (m), 1356 (m), 1206 (m), 1206 (m), 1042 (s), 914 (m), 742 (s), 532 (m).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -25 (c = 0.068, MeOH). Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = -64.1 (c = 0.304, Essigsäure).[265]

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein.[103]

---

268 (*S*)-5-Bromtryptophan



268

Gemäß der Synthesevorschrift SV1 wurde 5-Bromoindol **285** (0.5 g, 2.6 mmol, 1.0 Äq.) und (*S*)-Serin (0. 54 g, 5.1 mmol, 2.0 Äq.) mithilfe der TrpB-Mutante *Pf*0A9 umgesetzt.

Ausbeute: 0.70 g, 2.5 mmol, 96 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.77 (d, $^{4}J_{4,6}$ = 1.9 Hz, 1H, 4-H), 7.32 (s, $^{3}J_{7,6}$ = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 7.27 (s, 1H, 2-H), 7.23 (dd, $^{3}J_{6,7}$ = 8.6 Hz, $^{4}J_{6,4}$ = 1.8 Hz, 1H, 6-H), 4.26 (dd, $^{3}J_{2',1''}$ = 7.3 Hz, 5.2 Hz, 1H, 2'-H), 3.44 (dd, $^{2}J_{1',1''}$ = 15.4 Hz, $^{3}J_{1',2'}$ = 5.2 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.35 (dd, $^{2}J_{1',1''}$ = 15.4 Hz, $^{3}J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 1H, 1'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 171.6 (C-3'), 136.9 (C-7a), 130.2 (C-3a), 127.2 (C-2), 125.7 (C-6), 121.7 (C-4), 114.3 (C-7), 113.5 (C-5), 107.6 (C-3), 54.4 (C-2'), 27.3 (C-1').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{11}H_{11}N_2O_2Br+H^+$: 283.0077 $[M+H]^+$; gefunden: 283.0079.

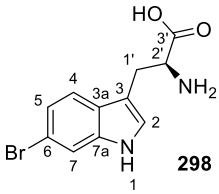
IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3453 (m), 3401 (m), 3026 (w), 1738 (s), 1663 (s), 1573 (s), 1409 (m), 1356 (s), 1094 (s), 795 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +32.5 (c = 0.040, MeOH). Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = +31.8 (c = 1.0, aq. HCl).[266]

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein, wobei kleine Abweichungen auf ein unterschiedliches Lösungsmittel zurückzuführen sind.[101]

---

298 (*S*)-6-Bromtryptophan



298

Gemäß der Synthesevorschrift SV1 wurde 6-Bromoindol **296** (0.5 g, 2.6 mmol, 1.0 Äq.) und (*S*)-Serin (0.54 g, 5.1 mmol, 2.0 Äq.) mithilfe der TrpB-Mutante *Pf*0A9 umgesetzt.

Ausbeute: 0.57 g, 2.0 mmol, 39 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.60 (d $^3J_{4,5}$ = 8.4 Hz, 1H, 4-H), 7.53 (d, $^3J_{7,5}$ = 1.8 Hz, 1H, 7-H), 7.21 (s, 1H, 2-H), 7.15 (dd, $^3J_{5,4}$ = 8.4 Hz, $^4J_{5,7}$ = 1.7 Hz, 1H, 5-H), 3.92 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 9.1 Hz, 4.2 Hz, 1H, 2'-H), 3.46 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 15.3 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 4.1 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.19 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 15.3 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 8.7 Hz, 1H, 1'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.9 (C-3'). 139.2 (C-7a), 127.5 (C-3a), 126.2 (C-2), 123.3 (C-5), 120.9 (C-4), 116.2 (C-6), 115.3 (C-7), 109.8 (C-3), 56.3 (C-2'), 28.1 (C-1').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{11}H_{11}N_2O_2Br+H^+$: 283.0077 $[M+H]^+$; gefunden: 283.0076.

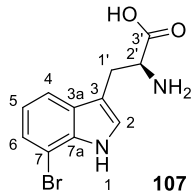
IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3416 (w), 3221 (w), 2922 (w), 1723 (m), 1603 (m), 1446 (s), 1394 (s), 1334 (s), 892 (s), 802 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +15.9 (c = 0.044, MeOH). Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = -22.4 (C = 0.73, Aceton).[267]

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein, wobei kleine Abweichungen auf ein unterschiedliches Lösungsmittel zurückzuführen sind.[103]

---

107 (*S*)-7-Bromtryptophan



107

Gemäß der Synthesevorschrift SV1 wurde 7-Bromoindol **46** (0.5 g, 2.6 mmol, 1.0 Äq.) und (*S*)-Serin (0.54 g, 5.1 mmol, 2.0 Äq.) mithilfe der TrpB-Mutante *Pf*0A9 umgesetzt.

Ausbeute: 0.59 g, 2.1 mmol, 81 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.62 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.33 (s, 1H, 2-H), 7.33-7.31 (m, 1H, 6-H), 7.00 (t, $^3J_{5,4,6}$ = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 4.28 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 7.7 Hz, 5.1 Hz, 1H, 2'-H), 3.49 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 15.3 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 5.1 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.36 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 15.4 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 7.7 Hz, 1H, 1'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 171.5 (C-3'), 136.8 (C-7a), 129.9 (C-3a), 126.8 (C-2), 125.5 (C-6), 121.6 (C-5), 118.6 (C-4), 109.3 (C-3), 105.9 (C-7), 54.4 (C-2'), 27.5 (C-1').

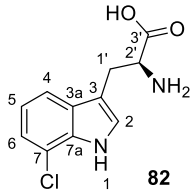
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{11}H_{11}N_2O_2Br+H^+$: 283.0077 $[M+H]^+$; gefunden: 283.0081.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3423 (w), 2914 (w), 1731 (m), 1499 (s), 1439 (s), 1334 (s), 1199 (s), 1087 (m), 772 (s), 727 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +14.1 (c = 0.064, MeOH). Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = -24.0 (c = 0.15, MeOH).[268]

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein, wobei kleine Abweichungen auf ein unterschiedliches Lösungsmittel zurückzuführen sind.[103]

82 (*S*)-7-Chlortryptophan



82

Gemäß der Synthesevorschrift SV1 wurde 7-Chlorindol **45** (0.50 g, 3.3 mmol, 1.0 Äq.) und (*S*)-Serin (0.69 g, 6.6 mmol, 2.0 Äq.) mithilfe der TrpB-Mutante *Pf*0A9 umgesetzt.

Ausbeute: 0.67 g, 2.8 mmol, 84 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.63 (d, $^{3}J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.29 (s, 1H, 2-H), 7.15 (d, $^{3}J_{6,5}$ = 7.5 Hz, 1H, 6-H), 7.04 (t, $^{3}J_{5,4/5,6}$ = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 3.99 (dt, $^{2}J_{1',1''}$ = 9.3 Hz, $^{3}J_{1',2'}$ = 4.7 Hz, 1H, 2'-H), 3.49 (dd, $^{2}J_{1',1''}$ = 15.3 Hz, $^{3}J_{1',2'}$ = 4.4 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.27-3.20 (m, 1H, 1'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173. 5 (C-3'), 135.3 (C-7a), 130.3 (C-3a), 126.5 (C-2), 122.3 (C-6), 121.0 (5-C), 117.3 (C-4), 117.9 (7-C), 110.4 (C-3), 55.9 (C-2'),28.1 (C-1').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{11}H_{11}N_2O_2Cl+H^+$: 239.0582 $[M+H]^+$; gefunden: 239.0583.

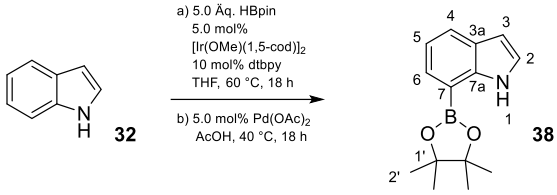
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3423 (w), 3259 (w), 1738 (s), 1611 (m), 1491 (s), 1493 (s), 1349(s), 1214 (s), 795 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -19.0 (c = 0.058, MeOH). Lit.: $[\alpha]_D^{23}$ = -29.7 (c = 0.06 in Wasser).[269]

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein, wobei kleine Abweichungen auf ein unterschiedliches Lösungsmittel zurückzuführen sind.[103]

7.3.1.6. CH-Aktivierung und Funktionalisierung von Indol

38 7-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)-1*H*-indol



Entsprechend Loach *et al.* wurden Indol **32** (1.0 mg, 8.5 mmol, 1.0 Äq.), (1,5-Cyclooctadien)(methoxy)iridium(I)-Dimer (85 mg, 0.13 mmol, 1.5 mol%) und 4,4'-Di-*tert*-butyl-2,2'-bipyridin (68 mg, 0.26 mmol, 3.0 mol%) in einen trockenen, sekurierten Reaktionskolben unter Argon gegeben und in getrocknetem THF (80 mL) gelöst. Während das dunkelbraune Reaktionsgemisch gerührt wird, wurde anschließend Pinakolboran (6.2 mL, 43 mmol, 5.0 Äq.) langsam zugegeben, wodurch die Reaktionslösung eine rötliche Farbe bekommt. Die Reaktion wurde für 18 h bei 60 °C gerührt. Nachdem die Lösung abgekühlt ist, wurde das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Essigsäure (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von Palladium-(II)-acetat (96 mg, 0.43 mmol, 5.0 mol%) wurde die Suspension für 18 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch Sand und Celite filtriert und der Kolben sowie der Filter mit EE ausgespült. Das Filtrat wurde durch Zugabe von Natronlauge (1 M) und gesättigter, wässriger $NaHCO_3$-Lösung (100 mL)

basisch eingestellt und die wässrige Phase mit EE (3 x 80 mL) extrahiert. Die vereinigte, organische Phase wurde an vermindertem Druck von Lösungsmittel befreit und das Rohprodukt säulenchromatographisch (PE/EE: 6/1) von Verunreinigungen befreit. Dazu wurde das Kieselgel durch Konditionierung (PE/Et_3N: 14/1) zunächst basisch eingestellt, ehe das Rohprodukt aufgetragen wurde. Das Reaktionsprodukt wurde als braunes Öl erhalten.

Ausbeute: 1.9 g, 8.0 mmol, 94 %.

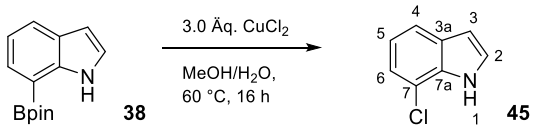
^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.25 (s, 1H, 1-NH), 7.78 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.67 (app. dd, $^3J_{6,5}$ = 7.0 Hz, $^4J_{6,4}$ =1.3 Hz, 1H), 7.27 (t, $^3J_{2,3,NH}$ = 2.8 Hz, 1H, 2-H), 7.16 – 7.13 (dd, $^3J_{5,4}$ = 8.1 Hz, $^3J_{5,6}$ = 6.9 Hz, 1H), 6.56 (dd, $^3J_{3,2}$ = 3.3 Hz, $^4J_{3,4}$ = 1.0 Hz, 1H, 3-H), 1.41 (s, 12H, 2'-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 141.1 (C-7a), 129.4 (C-6), 126.9 (C-3a), 124.4 (C-4), 124.2 (C-2), 119.4 (C-5), 102.1 (C-3), 83.9 (C-1'), 25.1 (C-2).

Die ^{1}H- and ^{13}C-NMR Signale stimmen mit den publizierten Spektren überein.[270]

---

45 7-Chlor-1*H*-indol



Entsprechend Loach *et al.* wurde Boronsäureester **38** (75 mg, 0.31 mmol, 1.0 Äq.) in Methanol (4 mL) gelöst und in einem Reaktionskolben gerührt. Kupfer(II)-chlorid (124 mg, 0.92 mmol, 3.0 Äq.) wurde in Wasser (4 mL) gelöst und zur Reaktionslösung gegeben. Die Reaktion wurde unter Rühren für 16 h auf 60 °C erhitzt. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt ist, wurde gesättigte, wässrige NaCl-Lösung hinzugegeben (4 mL) und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten, organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/EE: 4/1) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

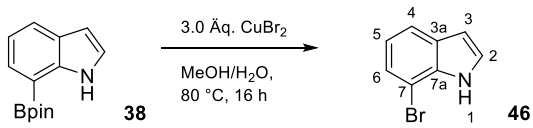
Ausbeute: 32 mg, 0.21 mmol, 69 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.38 (s, 1H, NH), 7.56 (dt, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, $^4J_{4,3,6}$ = 0.9 Hz, 1H, 4-H), 7.27 – 7.26 (m, 1H, 2-H), 7.21 (dd, $^3J_{6,5}$ = 7.6 Hz, $^4J_{6,4}$ = 1.1 Hz, 1H, 6-H), 7.09 – 7.04 (m, 1H, 5-H), 6.61 (dt, $^3J_{3,2}$ = 3.2 Hz, $^4J_{3,4}$ = 1.6 Hz, 1H, 3-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 133.3 (C-7a), 129.4 (C-3a), 124.9 (C-2), 121.5 (C-6), 120.7 (C-5), 119.5 (C-4), 116.7 (C-7), 103.8 (C-3).

Die ^{1}H- and ^{13}C-NMR Signale stimmen mit den publizierten Spektren überein.[83] Es wurden

46 7-Brom-1*H*-indol



Entsprechend Loach *et al.* wurde Boronsäureester **38** (112 mg, 0.46 mmol, 1.0 Äq.) in Methanol (5 mL) gelöst und in einem Reaktionskolben gerührt. Kupfer(II)-bromid (308 mg, 1.4 mmol, 3.0 Äq.) wurde in Wasser (5 mL) gelöst und zur Reaktionslösung gegeben. Die Reaktion wurde unter Rühren für 16 h auf 80 °C erhitzt. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt ist, wurde gesättigte, wässrige NaCl-Lösung hinzugegeben (55 mL) und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten, organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/EE: 4/1) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

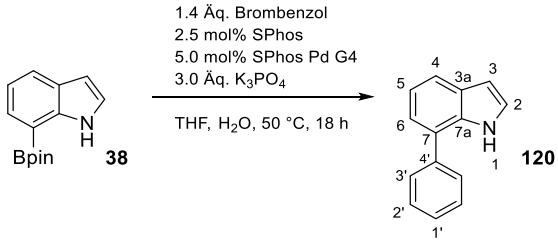
Ausbeute: 58 mg, 0.30 mmol, 65 %.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.35 (s, 1H, NH), 7.60 (dt, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, $^4J_{4,3,6}$ = 0.9 Hz, 1H, 4-H), 7.36 (dd, $^3J_{6,5}$ = 7.6, $^4J_{6,4}$ = 0.9 Hz, 1H, 6-H), 7.30 – 7.21 (m, 1H, 2-H), 7.01 (t, $^3J_{5,6,4}$ = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 6.64 (dd, $^3J_{3,2}$ = 3.2 Hz, $^4J_{3,4}$ = 2.2 Hz, 1H, 3-H).

^{13}C-NMR (76 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 134.7 (C-7a), 129.1 (C-3a), 124.8 (C-5), 124.5 (C-2), 121.1 (C-6), 120.1 (C-4), 104.8 (C-7), 104.0 (C-3).

Die ^{1}H- and ^{13}C-NMR Signale stimmen mit den publizierten Spektren überein.[271]

120 7-Phenyl-1*H*-indol



Unter Argon wurden SPhos Pd G4 (4.7 mg, 5.8 µmol, 2.5 mol%), SPhos **280** (4.8 mg, 12 µmol, 30 mol%) und Kaliumcarbonat (152 mg, 0.72 mmol, 3.0 Äq.) in ein Schlenk-Rohr gegeben. Boronsäureester **38** (57.0 mg, 0.24 mmol, 1.0 Äq.) und Brombenzol (54 mg, 0.35 mmol, 1.4 Äq.) wurden jeweils in entgastem THF (4 mL) gelöst und in den Reaktionskolben hinzugegeben. Entgastes Wasser (2 mL) wurden hinzugefügt und das Reaktionsgemisch bei 50 °C für 18 h gerührt. Anschließend wurde mit EE (10 mL) und wässriger, gesättigter NaCl-Lösung (5 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/EE: 4/1) und Reaktionsprodukt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 33 mg, 0.17 mmol, 73 %.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.39 (s, 1H, NH), 7.67 (app. ddd, *J* = 7.9, 4.2, 2.2 Hz, 3H, 4-H, 3‘-H), 7.53 (dd, *J* = 8.4, 6.9 Hz, 2H, 2‘-H), 7.46 – 7.34 (m, 1H, 5-H), 7.28 – 7.22 (m, 2H, 6-H, 1‘-H), 7.20 (t, $^{3}J_{2,3}$ = 2.9 Hz, 1H, 2-H), 6.65 (dd, $^{3}J_{3,2}$ = 3.3 Hz, $^{4}J_{3,4}$ = 2.0 Hz, 1H, 3-H).

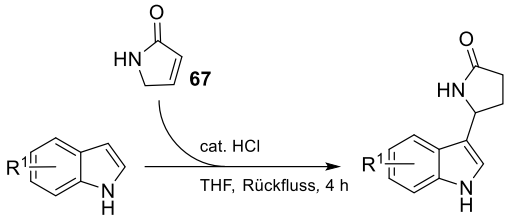
^{13}C-NMR (76 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 139.4 (C-4’), 133.8 (C-7a), 129.3 (C-2’), 128.4 (C-3a), 128.4 (C-3’), 127.5 (C-1’), 125.7 (C-7), 124.5 (C-2), 122.0 (C-5), 120.4 (C-4), 120.2 (C-6), 103.2 (C-3).

Die ^{1}H- and ^{13}C-NMR Signale stimmen mit den publizierten Spektren überein.[83]

7.3.2. Synthesen des Deoxyviolacein-Projekts

7.3.2.1. Elektrophile Addition

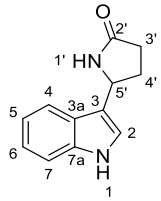
Allgemeine Synthesevorschrift SV2



Entsprechend Wille *et al.*[104] wurden Indol (1.0 Äq.) und 1,5-Dihydro-2*H*-pyrrol-2-on (**67**) (1.0 Äq.) in THF gelöst (Volumen V ca. 1 mL Lösungsmittel / 0.2 mmol Substrat) und katalytische Mengen konzentrierte Salzsäure (2-3 Tropfen, 37 %-Lösung in Wasser) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 4 h zum Rückfluss erhitzt. Nachdem die Reaktionslösung abgekühlt ist, wurde das Gemisch mit wässriger, gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und EE verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x V/2 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Die Rohprodukte wurden säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/PE: 1/1, später EE) und die Produkte als gelber Feststoff erhalten.

---

68 5-(1*H*-Indol-3-yl)pyrrolidin-2-on



68

Gemäß Synthesevorschrift SV2 wurden Indol **32** (1.0 g, 6.6 mmol, 1.0 Äq.) und 1,5-Dihydro-2*H*-pyrrol-2-on (**67**) (548 mg, 6.6 mmol, 1.0 Äq.) umgesetzt.

Ausbeute: 1.22 g, 6.27 mmol, 95 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, 1-H), 7.62 (d, $^3J_{4,5}$ = 8.0 Hz, 1H, 4-H), 7.40 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.2 Hz, 1H, 7-H), 7.24 (t, $^3J_{6,5,7}$ = 8.1 Hz, 1H, 6-), 7.17 – 7.13 (m, 2H, 5-H, 2-H), 5.85 (s, 1H, 1‘-H), 5.10 (t, $^3J_{5',4'}$ = 7.0 Hz, 1H, 5-H), 2.65 – 2.55 (m, 1H, 4‘-H), 2.55 – 2.43 (m, 2H, C-3‘), 2.37 – 2.23 (m, 1H, 4‘-H).

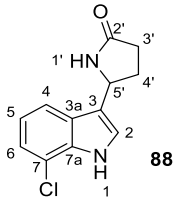
^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 178.3 (C-2‘), 137.0 (C-7a), 125.3 (C-3a), 122.8 (C-6), 121.2 (C-2), 120.0 (C-5), 119.0 (C-4), 117.5 (C-3), 111.7 (C-7), 51.7 (C-5’), 30.6 (C-3’), 29.7 (C-4’).

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3246 (br), 3052 (w), 1676 (vs), 1458 (m), 1418 (m), 1355 (m), 1263 (m), 1230 (m), 1102 (w), 742 (s), 497 (w).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{12}H_{12}N_2O$+H: 201.1022 $[M+H]^+$; gef.: 201.1023

Schmelzpunkt: 176 °C

88 5-(7-Chlor-1*H*-indol-3-yl)pyrrolidin-2-on



88

Gemäß Synthesevorschrift SV2 wurden 7-Chlorindol **45** (1.0 g, 6.6 mmol, 1.0 Äq.) und 1,5-Dihydro-2*H*-pyrrol-2-on (**67**) (548 mg, 6.6 mmol, 1.0 Äq.) umgesetzt.

Ausbeute: 1.254 g, 5.3 mmol, 81%.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.34 (s, 1H, 1-H), 7.52 (d, $^3J_{4,5}$ = 8.0 Hz, 1H, 4-H), 7.24 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.7 Hz, 1H, 6-H), 7.21 (d, $^3J_{2,1}$ = 2.5 Hz, 1H, 2-H), 7.08 (t, $^3J_{6,5,4}$ = 7.8 Hz, 1H, 6-H), 5.79 (s, 1H, 1'-H), 5.07 (t, $^3J_{5',4'}$ = 7.1 Hz, 1H, 4'-H), 2.69 – 2.56 (m, 1H, 4'-H), 2.56 – 2.42 (m, 2H, 3'-H), 2.26 (m, 1H, 4'-H).

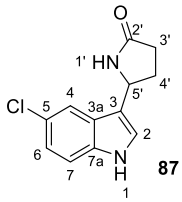
^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 178.0 (C-2'), 134.3 (C-7a), 126.7 (C-3a), 122.2 (C-2), 121.8 (C-6), 121.0 (C-5), 118.8 (C-3), 117.7 (C-4), 117.2 (C-7), 51.5 (C-5'), 30.4 (C-3'), 29.8 (C-4').

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3241 (w), 1643 (m), 1262 (s), 1098 (m), 782 (s), 734 (w), 686 (s), 633 (s), 568 (s), 498 (s).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{12}H_{11}N_2OCl$+H: 235.0627 $[M+H]^+$; gef.: 235.0633.

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 200 °C.

87 5-(5-Chlor-1*H*-indol-3-yl)pyrrolidin-2-on



87

Gemäß Synthesevorschrift SV2 wurden 5-Chlorindol **86** (1.0 g, 6.6 mmol, 1.0 Äq.) und 1,5-Dihydro-2*H*-pyrrol-2-on (**67**) (548 mg, 6.6 mmol, 1.0 Äq.) umgesetzt.

Ausbeute: 1.239 G, 5.3 mmol, 80 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.37 (s, 1H, 1-H), 7.56 (d, $^3J_{4,6}$ = 2.0 Hz, 1H, 4-H), 7.31 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 7.18 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.6 Hz, $^3J_{6,4}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 7.17 – 7.13 (m, 1H, 2-H), 6.17 (s, 1H, 1'-H), 5.04 (t, $^3J_{5',4'}$ = 7.0 Hz, 1H, 5'-H), 2.58 (dddd, $^2J_{4',4'}$ = 12.4 Hz, $^3J_{4',3'}$ = 9.5 Hz, $^3J_{4',5'}$ = 7.5 Hz, $^3J_{4',3'}$ = 4.9 Hz, 1H, 4'-H_a), 2.54 – 2.41 (m, 2H, 3'-H), 2.22 (dddd, $^2J_{4',4'}$ = 12.3 Hz, $^3J_{4',3'}$ = 9.0, $^3J_{4',5'}$ 7.9 Hz, $^3J_{4',3'}$ = 6.6 Hz, 1H, 4'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 178.3 (C-2'), 135.3 (C-7a), 126.3 (C-3a), 125.8 (C-5), 123.2 (C-2), 122.6 (C-6), 118.5 (C-4), 117.3 (C-3), 112.7 (C-7), 51.4 (C-5'), 30.5 (C-3'), 29.7 (C-4').

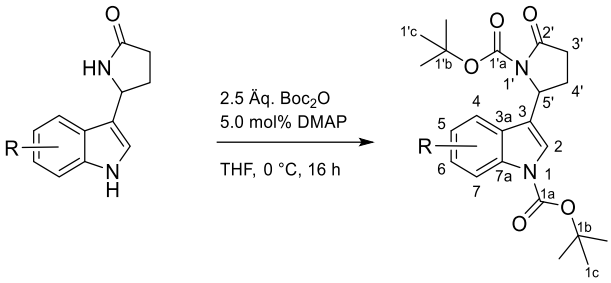
IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3246 (br), 2924 (w), 1678 (vs), 1459 (m), 1358 (m), 1263 (m), 1102 (m), 894 (m), 799 (m), 685 (w), 618 (w), 504 (w).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{12}H_{11}N_2OCl$+H: 235.0635 $[M+H]^+$; gef.: 235.0635.

Schmelzpunkt: 110 °C.

7.3.2.2. Boc-Schützungen der Indolpyrrolidinone

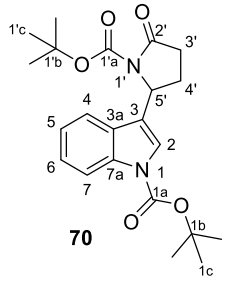
Allgemeine Synthesevorschrift SV3



Entsprechend Wille *et al.*[104] wurden Indolpyrrolidin-2-on (1.0 Äq.) in THF (Volumen V ca. 1 mL Lösungsmittel / 0.2 mmol Substrat) gelöst und bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von Di-*tert*-butydicarbonat (2.5 Äq.) sowie Dimethylaminopyridin (5 mol%) wurde die Reaktion für 16 h gerührt, wobei die Temperatur dabei bis auf Raumtemperatur angestiegen ist. Anschließend wurde die Reaktion mit wässriger, gesättigter $NaHCO_3$-Lösung (V/2) und EE verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x V/2 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Die Rohprodukte wurden säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/PE: 1/3) und die Produkte als farbloser, klebriger Schaum erhalten.

---

70 Bis(*N,N'-tert*-butoxycarbonyl)-5-(1*H*-indol-3-yl)pyrrolidin-2-on



70

Gemäß Synthesevorschrift SV3 wurde Indolpyrrolidin-2-on **68** (861 mg, 4.30 mmol, 1.0 Äq.) mit Di-*tert-b*utyldicarbonat (2.3 mL, 10.8 mmol, 2.5 Äq.) und DMAP (26 mg, 0.22 mmol, 5.0 mol%) umgesetzt.

Ausbeute: 1.636 g, 4.09 mmol, 95 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.17 (s, 1H, 7-H), 7.49 (dt, $^3J_{4,5}$ = 7.8, $^4J_{4,6}$ = 1.0 Hz, 1H, 4-H), 7.40 (s, 1H, C-2), 7.34 (ddd, $^3J_{6,5}$ = 8.3, $^3J_{6,7}$ = 7.1, $^4J_{6,4}$ = 1.2 Hz, 1H, 6-H), 7.28 – 7.20 (m, 1H), 5.54 – 5.40 (m, 1H, 5'-H), 2.70 (dt, $^2J_{4',4'}$ = 16.6, $^3J_{4',3'}$ = 9.2 Hz, 1H, 4'-H_a), 2.57 – 2.44 (m, 2H, 3'-H_b, 4'-H_b), 2.09 (ddt, $^2J_{3',3'}$ = 12.8, $^3J_{3',4'}$ = 9.3, 2.9 Hz, 1H, 3'-H_a), 1.65 (s, 9H, 1'c/1c-H), 1.34 (s, 9H, 1'c/1c-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 174.3 (C-2), 149.9 (C-1a/1'a), 149.6 (C-1a/1'a), 136.2 (C-7a), 128.0 (C-3a), 125.0 (C-6), 122.9 (C-5), 121.7 (C-2), 121.6 (C, 118.9 (C-4), 115.8 (C-7),

84.2 (C-1'b/1b), 83.2 (C-1'b/1b), 55.0 (C-5'), 31.6 (C-4'), 28.4 (C-1c/1'c), 28.0 (C-1c/1'c), 25.6 (C-3').

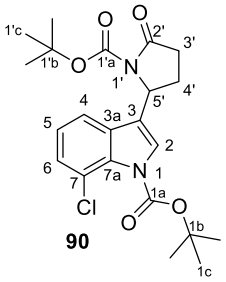
Die ^{1}H- und ^{13}C-NMR Signale stimmen mit den publizierten Spektren überein.[104]

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 2979 (br), 1783 (m), 1725 (s), 1453 (m), 1369 (s), 1335 (m), 1301 (s), 1254 (s), 1217 (m), 1150 (vs), 1119 (m), 1078 (s), 1021 (m), 945 (w), 846 (m), 766 (s), 747 (s), 583 (w), 463 (w).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{22}H_{19}N_2O_5$+H: 401.2071 $[M+H]^+$; gef.: 401.2072.

---

90 Bis(*N,N'-tert*-butoxycarbonyl)-5-(7-chlor-1*H*-indol-3-yl)pyrrolidin-2-on



Gemäß Synthesevorschrift SV3 wurde 7-Chlorindolpyrrolidin-2-on **88** (532 mg, 2.27 mmol, 1.0 Äq.) mit Di-*tert*-butyldicarbonat (1.3 mL, 6.0 mmol, 2.5 Äq.) und DMAP (14 mg, 0.11 mmol, 5.0 mol%) umgesetzt.

Ausbeute: 936 mg, 2.15 mmol, 95 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.40 (dd, $^{4}J_{4,5}$ = 7.8 Hz, $^{3}J_{4,6}$ = 1.1 Hz, 1H, 4-H), 7.36 (d, $^{3}J_{6,5}$ = 8.0 Hz, 1H, 6-H), 7.35 (s, 1H, 2-H), 7.19 (t, $^{3}J_{5,4/6}$ = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 5.65 – 5.22 (m, 1H, 5'-H), 2.69 (m, 1H, 4'-H), 2.63 – 2.44 (m, 2H, 4'-H/3'-H), 2.06 (m, 1H, 3'-H), 1.63 (s, 9H, 1'c-H/1c-H), 1.33 (s, 9H, 1'c/1c-H).

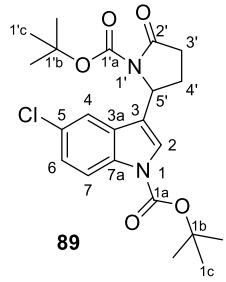
^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ174.2 (C-2'), 149.8 (C-1a/1'a), 148.6 (C-1a/1'a), 133.0 (C-7a), 131.4 (C-7), 127.2 (C-6), 125.1 (C-2), 124.0 (C-5), 121.2 (C-3a), 121.1 (C-3), 117.4 (C-4), 84.9 (C-1b/1'b), 83.3 (C-1b/1'b), 54.7 (C-5), 31.5 (C-4'), 28.1 (C-1c/1'c), 27.9 (C-1c/1'c), 25.5 (C-3').

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3107 (m), 2973 (w), 1781 (m), 1747 (m), 1340 (w), 1143 (m), 1096 (s), 851 (w), 620 (s), 566 (s).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{22}H_{31}N_3O_5Cl$+H: 435.1681 $[M+NH_4]^+$; gef.: 435.1681

---

89 Bis(*N,N'-tert*-butoxycarbonyl)-5-(5-chlor-1*H*-indol-3-yl)pyrrolidin-2-on



Gemäß Synthesevorschrift SV3 wurde 5-Chlorindolpyrrolidin-2-on **87** (1.24 g, 5.3 mmol, 1.0 Äq.) mit Di-*tert*-butyldicarbonat (2.9 mL, 13.3 mmol, 2.5 Äq.) und DMAP (32 mg, 0.27 mmol, 5.0 mol%) umgesetzt.

Ausbeute: 1.994 g, 4.78 mmol., 87 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.11 (s, 1H, 7-H), 7.47 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.0 Hz, 1H, 4-H), 7.40 (s, 1H, 2-H), 7.31 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.8 Hz, $^4J_{6,4}$ = 2.1 Hz, 1H, 6-H), 5.49 – 5.37 (m, 1H, 5-H), 2.76 – 2.63 (m, 1H, 4'-H), 2.62 – 2.45 (m, 2H, 4'-H, 3'-H), 2.24 – 1.99 (m, 1H, 3'-H), 1.65 (s, 9H, 1c-H/1'c-H), 1.37 (s, 9H, 1c-H/1'c-H).

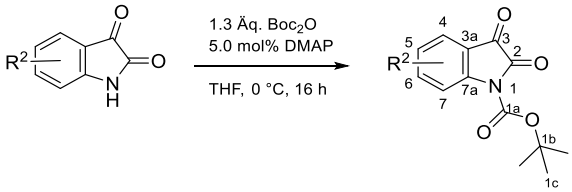
^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 174.0 (C-2'), 149.9 (C-1'a/1a), 149.2 (C-1'a/1a), 134.6 (C-7a), 129.2 (C-5), 128.7 (C-3a), 125.3 (C-6), 122.9 (C-2), 121.0 (C-3), 118.5 (C-4), 116.9 (C-7), 84.7 (C-1b/1'b), 83.4 (C1b/1'b), 54.6 (C-5'), 31.5 (C-4'), 28.3 (C-1c/1'c), 28.0 (C-1c/1'c), 25.6 (C-3').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2983 (s), 1744 (m), 1718 (m), 1452 (w), 1367 (s), 1302 (m), 1284 (s), 1147 (w), 1072 (s), 848 (s), 816 (m), 765 (s), 471 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für für $C_{22}H_{27}N_2O_5Cl$+H: 435.1681 $[M+H]^+$; gef.: 435.1681.

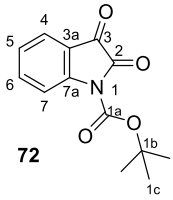
7.3.2.3. Boc-Schützung der Isatine

Allgemeine Synthesevorschrift SV4



Entsprechend Wille *et al.*[104] wurde Isatin (1.0 Äq.) in THF (Volumen V ca. 1 mL Lösungsmittel / 0.2 mmol Substrat) gelöst und bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von Di-*tert*-butydicarbonat (1.3 Äq.) sowie Dimethylaminopyridin (5 mol%) wurde die Reaktion für 16 h gerührt, wobei die Temperatur dabei bis auf Raumtemperatur angestiegen ist. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (EE/PE: 1/7 – über eine kurze Säule, da das Produkt instabil ist) von Verunreinigungen befreit. Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

72 (*N*-*tert*-Butoxycarbonyl)isatin



72

Gemäß Synthesevorschrift SV4 wurde Isatin **36** (2 g, 13.6 mmol, 1.0 Äq.) mit Di-*tert*-*b*utyldicarbonat (3.8 mL, 17.7 mmol, 1.3 Äq.) und DMAP (66 mg, 0.54 mmol, 5.0 mol%) umgesetzt.

Ausbeute: 3.5 g, 13.6 mmol., quant %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.07 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, 7-H), 7.75 – 7.65 (m, 2H, 6-H, 4-H), 7.33 – 7.22 (td, $^3J_{5,6,4}$ = 7.6 Hz, $^4J_{5,7}$ = 0.9 Hz, 1H, 5-H), 1.64 (s, 9H, 1c-H).

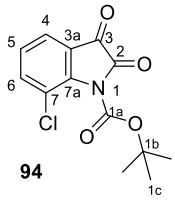
^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 180.4 (C-3), 155.8 (C-2), 155.8 (C-7a), 148.5 (C-1a), 138.9 (C-6), 125.5 (C-5), 125.4 (C-4), 118.8 (C-3a), 116.9 (C-7), 85.7 (C-1b), 28.2 (C-1c).

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 2982 (br), 1802 (m), 1779 (m), 1732 (vs), 1651 (w), 1609 (s), 1595 (m), 1526 (w), 1464 (s), 1395 (w), 1370 (m), 1338 (s), 1304 (s), 1293 (s), 1249 (vs), 1206 (w), 1138 (vs), 1093 (m), 1032 (w), 996 (m), 903 (w), 838 (m), 817 (m), 796 (m), 759 (s), 700 (m), 501 (w), 461 (m).

Schmelzpunkt: 127.5 °C (Lit. 132 °C).[104]

---

94 (*N-tert*-Butoxycarbonyl)-7-chlorisatin



94

Gemäß Synthesevorschrift SV4 wurde 7-Cl-Isatin **92** (2.0 g, 11.0 mmol, 1.0 Äq.) mit Di-*tert-b*utyldicarbonat (3.0 mL, 14.3 mmol, 1.3 Äq.) und DMAP (67 mg, 0.55 mmol, 5.0 mol%) umgesetzt.

Ausbeute: 3.09 g, 11 mmol, quant.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.69 (dd, $^{3}J_{6,5}$ = 8.1, $^{4}J_{6,4}$ = 1.2 Hz, 1H, 6-H), 7.66 (dd, $^{3}J_{4,5}$ = 7.5, $^{4}J_{4,6}$ = 1.2 Hz, 1H, 4-H), 7.26 (dd, $^{3}J_{5,6}$ = 8.0 Hz, $^{3}J_{5,4}$ = 7.6 Hz, 1H, 5-H), 1.64 (s, 9H).

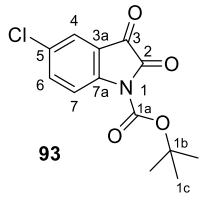
^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 180.3 (C-3), 156.2 (C-2), 146.9 (C-1a), 145.5 (C-7a), 140.2 (C-6), 126.6 (C-5), 124.0 (C-4), 121.8 (C-7), 121.6 (C-3a), 86.8 (C-1b), 27.8 (C-1c).

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 2981 (m), 1731 (m), 1458 (w), 1369 (s), 1316 (m), 1252 (m), 1146, w), 825 (s), 716 (m), 459 (s).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{13}H_{12}NO_4Cl+CH_3OH_2^+$: 314.0790 $[M+CH_3OH_2]^+$; gef.: 314.0794.

---

93 (*N-tert*-Butoxycarbonyl)-5-chlorisatin



93

Gemäß Synthesevorschrift SV4 wurde 5-Cl-Isatin **91** (2.0 g, 11.0 mmol, 1.0 Äq.) mit Di-*tert*-butyldicarbonat (3.0 mL, 14.3 mmol, 1.3 Äq.) und DMAP (67 mg, 0.55 mmol, 5.0 mol%) umgesetzt.

Ausbeute: 95 %, 2.94 g, 10.4 mmol.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.08 (d, $^{3}J_{7,6}$ = 8.8 Hz, 1H, 7-H), 7.70 (d, $^{4}J_{4,6}$ = 2.3 Hz, 1H, 4-H), 7.65 (dd, $^{3}J_{6,7}$ = 8.8, $^{4}J_{6,4}$ = 2.4 Hz, 1H), 1.64 (s, 9H, 1c-H).

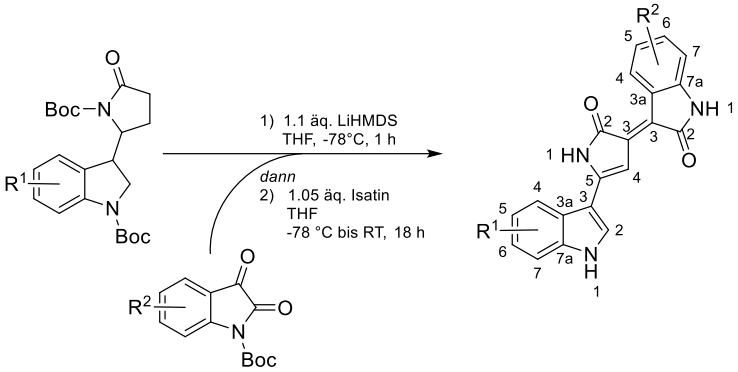
^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 179.5 (C-3), 155.0 (C-2), 148.4 (C-1a), 146.8 (C-7a), 138.4 (C-6), 131.6 (C-3a), 125.0 (C-4), 119.8 (C-5), 118.5 (C-7), 86.1 (C-1b), 28.2 (C-1c).

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 2981 (m), 1731 (m), 1458 (w), 1369 (s), 1316 (m), 1252 (m), 1146, w), 825 (s), 716 (m), 459 (s).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{13}H_{12}N_1O_4Cl+CH_3OH_2^+$: 314.0790 $[M+CH_3OH]^+$; gef.: 314.0789

7.3.2.4. Aldol-Kondensationen zum dVio

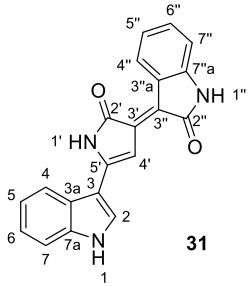
Allgemeine Synthesevorschrift SV5



Entsprechend Wille *et al.*[104] wurde Boc-geschütztes Indolpyrrolidin-2-on (1.0 Äq.) in trockenem THF (Volumen V ca. 1 mL Lösungsmittel / 0.05 mmol Substrat) gelöst und bei -78 °C gerührt. Nach Zugabe von LiHMDS (1 M in THF, 1.1 Äq.) wurde die Reaktion für 1 h bei -78 °C gerührt, ehe Boc-Isatin (1.05 Äq.) gelöst in THF (V/5 mL) hinzugegeben wurde. Die Reaktion wurde für 16 h gerührt, wobei die Temperatur dabei bis auf Raumtemperatur angestiegen ist. Anschließend wurde die Reaktion mit EE (V/4 mL) und Eiswasser (V/2 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x V/2 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit verdünnter Salzsäure (0.5 M, 2 x V/2 mL) und mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet. Der rötlichen, organischen Phase wurde Kieselgel (ca. 1 g / 0.05 mmol Substrat) hinzugegeben und Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde das Kieselgel unter Rühren auf 180-210 °C erhitzt, wobei sich eine bläulich-violette Farbe bildete. Das Kieselgel wurde abfiltriert (Elution mit EE) und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch entweder über *Flash-Column-Chromatography* in Normalphase mithilfe von Kieselgel (PE/EE 1:1, später EE) oder über eine C18 *reversed-phase* Säule (Isaspher 100-5 C18 AQ - 250 x 8 mm - Acetonitrl/Wasser: 45/55 mit 0.1 % Ameisensäure (v/v)). Es wurden meist zwei Produkte erhalten in Form von blauen oder violetten kristallinen Feststoffen mit geringer Löslichkeit.

---

31 Deoxyviolacein – violette Fraktion



31

Gemäß Synthesevorschrift SV5 wurde geschütztes Indolpyrrolidin-2-on **70** (0.20 g, 0.50 mmol, 1.0 Äq.) mit Isatin **72** (129 mg, 0.52 mmol, 1.05 Äq.) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte über eine C18 *reversed-phase* Säule. Es wurde ein blaues sowie ein violettes Produkt isoliert.

Ausbeute: 2 mg, 6 µmol, 1.2 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 12.14 (s, 1H, 1-H), 10.81 (s, 1H, 1''-H), 10.64 (s, 1H, 1'-H), 8.94 (d, $^{3}J_{4'',5''}$ = 7.8 Hz, 1H, 4''-H), 8.19 (t, $^{3}J_{2,1}$ = 2.3 Hz, 1H, 2-H), 7.93 – 7.81 (m, 1H, 4-H), 7.65 (d, $^{4}J_{4',1'}$ = 2.0 Hz, 1H, 4'-H), 7.57 (dd, $^{3}J_{7,6}$ = 7.2 Hz, $^{4}J_{7,5}$ = 2.0 Hz, 1H, 7-H), 7.32 – 7.30 (m, 2H, 5-H, 6-H), 7.22 (td, $^{3}J_{6'',5'',7''}$ = 7.6 Hz, $^{4}J_{6'',4''}$ = 1.3 Hz, 1H), 6.97 (td, $^{3}J_{5'',4'',6''}$ = 7.7, $^{4}J_{5'',7''}$ = 1.1 Hz, 1H), 6.83 (d, $^{3}J_{7'',6''}$ = 7.7 Hz, 1H, 7''-H).

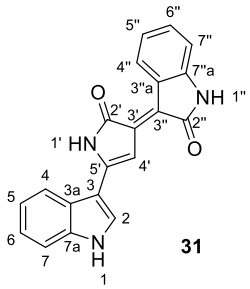
^{13}C-NMR (151 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 171.6 (C-2''), 170.2 (C-2'), 147.1 (C-3''), 142.1 (C-7''a), 137.5 (C-7a), 136.8 (C-5'), 129.8 (C-6''), 129.5 (C-2), 126.5 (C-4''), 124.5 (C-3a), 123.1 (C-5), 122.3 (C-3''a), 121.6 (C-6), 120.9 (C-5''), 119.8 (C-4), 119.6 (C-3'), 113.0 (C-7), 109.1 (C-7''), 106.3 (C-3), 97.4 (C-4').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3427 (br), 2931 (vs), 2853 (m), 1738 (s), 1691 (m), 1607 (m), 1467 (m), 1373 (m), 1216 (s), 956 (w), 763 (w).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{20}H_{13}N_3O_2$+H: 328.1081 $[M+H]^+$; gef.: 328.1078

---

31 Deoxyviolacein – blaue Fraktion



Gemäß Synthesevorschrift SV5 wurde geschütztes Indolpyrrolidin-2-on **70** (0.20 g, 0.50 mmol, 1.0 Äq.) mit Isatin **72** (129 mg, 0.52 mmol, 1.05 Äq.) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte über eine C18 *reversed-phase* Säule. Es wurde ein blaues sowie ein violettes Produkt isoliert.

Ausbeute: 3 mg, 9 µmol, 1.8 %.

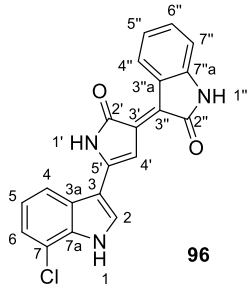
^{1}H-NMR (600 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 11.91 (s, 1H,1-H), 10.72 (d, $^{4}J_{1',4'}$ = 2.0 Hz, 1H, 1'-H), 10.45 (s, 1H, 1''-H), 8.02 (d, $^{3}J_{2,1}$ = 2.8 Hz, 1H, 2-H), 7.87 – 7.78 (m, 1H, 6-H), 7.56 (d, $^{3}J_{4,5}$ = 7.4 Hz, 1H, 4-H), 7.48 (t, $^{3}J_{6'',5'',7''}$ = 7.6 Hz, 1H), 7.32 (d, $^{3}J_{7,6}$ = 8.1 Hz, 1H, 7-H), 7.29 – 7.23 (m, 2H, 7''-H, 5-H), 7.08 (d, $^{4}J_{4',1'}$ = 2.0 Hz, 1H, 4'-H), 6.94 (t, $^{3}J_{5'',4'',6''}$ = 7.4 Hz, 1H, 5''-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 187.3 (C-2''), 171.9 (C-2'), 151.6 (C-7''a), 141.4 (C-5'), 137.3 (C-7a), 135.5 (C-6''), 129.8 (C-3''), 127.2 (C-2), 124.3 (C-3a), 123.4 (C-4), 121.3 (C-5), 121.1 (C-7''), 120.2 (C-5''), 119.7 (C-3''a) 119.6 (C-6), 114.6 (C-3'), 113.5, 113.2 (C-7), 112.7 (C-4''), 106.9 (C-3), 94.9 (C-4').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3441 (br), 3190 (s), 2938 (m), 1736 (m), 1654 (s), 1612 (vs), 1462 (s), 1214 (m), 1030 (s), 755 (w).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{20}H_{13}N_3O_2$+H: 328.1081 $[M+H]^+$; gef.: 328.1078.

96 7-Chlordeoxyviolacein – blaue Fraktion



96

Gemäß Synthesevorschrift SV5 wurde geschütztes 7-Chlorindolpyrrolidin-2-on **90** (0.20 g, 0.46 mmol, 1.0 Äq.) mit Isatin **72** (0.12 g, 0.48 mmol, 1.05 Äq.) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte über eine C18 *reversed-phase* Säule.

Ausbeute: 2 mg, 5.5 µmol, 1.2%.

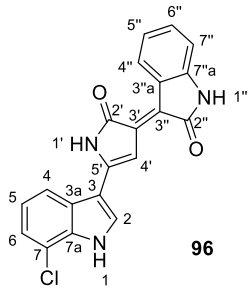
^{1}H-NMR (600 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 12.29 (s, 1H, 1-H), 10.81 (d, $^4J_{1',4'}$ = 2.1 Hz, 1H, 1'-H), 10.48 (s, 1H, 2''-H), 8.17 (d, $^3J_{2,1}$ = 4.4 Hz, 1H, 2-H), 7.79 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.56 (d, $^3J_{4'',5''}$ = 7.6 Hz, 1H, 4''-H), 7.51 – 7.47 (m, 1H, 6''-H), 7.35 (d, $^3J_{6,7,5}$ = 7.6 Hz, 1H, 6-H), 7.32 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 8.1 Hz, 1H, 7''-H), 7.27 (td, $^3J_{5,6,4}$ = 7.8, $^4J_{5,7}$ = 1.5 Hz, 1H), 7.06 (s, 1H, 4'-H), 6.94 (t, $^3J_{5'',6'',4''}$ = 7.3 Hz, 1H).

^{13}C-NMR (151 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 187.6 (C-2''), 171.7 (C-2'), 151.8 (C-7''a), 140.5 (C-5'), 135.7 (C-6''), 134.1 (C-7a), 130.2 (C-3''), 128.2 (C-2), 126.2 (C-7), 123.5 (C-4''), 122.3 (C-5/6), 122.1 (C-6/5), 120.3 (C-5''), 119.6 (C-3''a), 118.7 (C-4), 117.0 (C-3a), 114.1 (C-3'), 113.3 (C-7''), 108.0 (C-3), 95.4 (C-4').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3171 (br), 2925 (s), 2857 (m), 1701 (vs), 1618 (s), 1441 (m), 1370 (m) 1207 (s), 750 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{20}H_{12}N_3O_2Cl$+H: 362.0691 $[M+H]^+$; gef.: 362.0690.

96 7-Chlordeoxyviolacein – violette Fraktion



96

Gemäß Synthesevorschrift SV5 wurde geschütztes 7-Chlorindolpyrrolidin-2-on **90** (0.20 g, 0.46 mmol, 1.0 Äq.) mit Isatin **72** (0.12 g, 0.48 mmol, 1.05 Äq.) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte über eine C18 *reversed-phase* Säule.

Ausbeute: 2 mg, 5.5 µmol, 1.2%.

^{1}H-NMR (600 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 12.56 (s, 1H, 1-H), 10.92 (d, $^4J_{1',4'}$ = 5.2 Hz, 1H, 1'-H), 10.74 (s, 1H, 1'-H), 8.93 (d, $^3J_{4'',5''}$ = 7.9 Hz, 1H, 4''-H), 8.35 (d, $^3J_{2,1}$ = 5.6 Hz, 1H, 2-H), 7.79 (d, $^3J_{4,5}$ = 8.0 Hz, 1H, 4-H), 7.64 (t, $^4J_{4',1'}$ = 1.7 Hz, 1H, 4'-H), 7.37 (m, 1H, 6-H), 7.32 (td, $^3J_{5,6,4}$ = 7.8, $^4J_{5,7}$ = 1.2 Hz, 1H, 5-H), 7.22 (td, $^3J_{6'',5'',7''}$ = 7.7, $^4J_{6'',4''}$ = 1.3 Hz, 1H, 6''-H), 6.95 (dd, $^3J_{5'',4''}$ = 8.4 Hz, $^3J_{5'',6''}$ = 7.0 Hz, 1H, 5''-H), 6.85 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 7.7 Hz, 1H, 7''-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 171.8 (C-2'), 170.6 (C-2), 146.8 (C-3''), 142.8 (C-7''a), 136.9 (C-5'), 134.8 (C-7a), 130.9 (C-2), 130.6 (C-6''), 127.2 (C-4''), 126.9 (C-7), 123.1 (C-

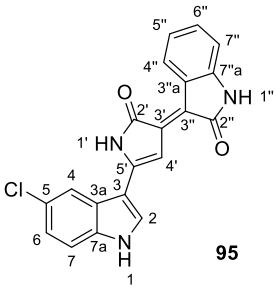
5/6), 123.1 (C-6/5), 122.6 (C-3''a) 121.5 (C-5''), 121.1 (C-3a), 119.2 (C-4), 117.7 (C-3'), 109.7 (C-7''), 107.8 (C-3), 98.2 (C-4').

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3166 (br), 2928 (s), 2855 (m), 1674 (vs), 1615 (s), 1441 (m), 1207 (s), 1024 (s), 745 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{20}H_{12}N_3O_2Cl$+H: 362.0691 $[M+H]^+$; gef.: 362.0692.

---

95 5-Chlordeoxyviolacein – blaue Fraktion



Gemäß Synthesevorschrift SV5 wurde geschütztes 5-Chlorindolpyrrolidin-2-on **89** (0.20 g, 0.46 mmol, 1.0 Äq.) mit Isatin **72** (0.12 g, 0.48 mmol, 1.05 Äq.) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte über eine C18 *reversed-phase* Säule.

Ausbeute: 1 mg, 2.7 µmol, 0.6 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 12.57 – 12.09 (m, 1H), 11.00 – 10.63 (m, 1H), 10.48 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.11 (dt, *J* = 6.6, 2.9 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 8.3, 5.7 Hz, 2H), 7.52 – 7.43 (m, 3H), 7.33 (dd, *J* = 16.8, 6.1 Hz, 5H), 7.30 – 7.20 (m, 1H), 7.00 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.95 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H).

^{13}C-NMR (151 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 187.5, 171.8, 171.4, 159.7, 154.1, 152.9, 151.8, 143.9, 135.8, 135.7, 129.4, 125.5, 125.3, 123.4, 122.7, 120.3, 119.6, 118.7, 118.6, 116.6, 115.5, 114.3, 114.3, 113.3, 110.1, 106.5, 94.9.

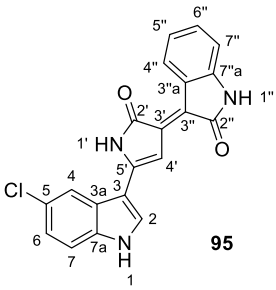
Aufgrund der geringen Menge des erhaltenen Produkts konnten die gemessenen ^{1}H und ^{13}C-Signale den entsprechenden Atomen nicht eindeutig zugeordnet werden.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3182 (br), 2926 (vs), 2853 (m), 1706 (vs), 1618 (s), 1461 (s), 1367 (m), 1216 (m), 1143 (m), 758 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{20}H_{12}N_3O_2Cl$+H: 362.0693 $[M+H]^+$; gef.: 362.0684.

---

95 5-Chlordeoxyviolacein – violette Fraktion



Gemäß Synthesevorschrift SV5 wurde geschütztes 5-Chlorindolpyrrolidin-2-on **89** (0.20 g, 0.46 mmol, 1.0 Äq.) mit Isatin **72** (0.12 g, 0.48 mmol, 1.05 Äq.) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte über eine C18 *reversed-phase* Säule.

Ausbeute: < 1 mg, < 2.7 µmol, < 1 %.

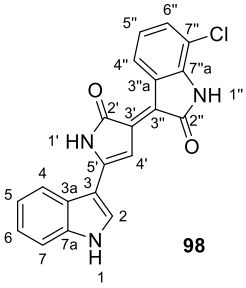
Aufgrund der geringen Menge des erhaltenen Produkts konnten keine ^{1}H und ^{13}C-NMR-Spektren aufgenommen werden.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3430 (br), 3203 (br), 2924 (s), 2861 (m), 1736 (m), 1654 (vs), 1612 (vs), 1462 (s), 1209 (s), 1120 (s), 1027 (s), 756 (w).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{20}H_{12}N_3O_2Cl$+H: 362.0691 [M+H]$^+$; gef.: 362.0693.

---

98 7‘‘-Chlordeoxyviolacein – violette Fraktion



Gemäß Synthesevorschrift SV5 wurde geschütztes Indolpyrrolidin-2-on **70** (0.20 g, 0.50 mmol, 1.0 Äq.) mit 7-Chlorisatin **94** (0.15 g, 0.52 mmol, 1.05 Äq.) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte über eine C18 *reversed-phase* Säule.

Ausbeute: 2 mg, 5.5 µmol, 1.1 %

^{1}H-NMR (900 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 12.23 (d, $^{3}J_{1,2}$ = 3.0 Hz, 1H, 1-H), 11.01 (s, 1H, 1‘‘-H), 10.92 (d, $^{3}J_{1',4'}$ = 2.1 Hz, 1H, 1‘-H), 8.92 (d, $^{3}J_{4'',5''}$ = 7.7 Hz, 1H, 4‘‘-H), 8.23 (d, $^{3}J_{2,1}$ = 3.0 Hz, 1H, 2-H), 7.86 (dd, $^{3}J_{4,5}$ = 7.0 Hz, $^{4}J_{4,6}$ = 1.8 Hz, 1H, 4-H), 7.67 (d, $^{4}J_{4',1'}$ = 2.1 Hz, 1H, 4‘-H), 7.58 (dd, $^{3}J_{7,6}$ = 7.0 Hz, $^{4}J_{7,5}$ = 1.7 Hz, 1H, 7-H), 7.32 (app. pd, *J* = 7.0, 1.4 Hz, 2H, 5-H, 4-H), 7.27 (dd, $^{3}J_{6'',5''}$ = 8.0 Hz, $^{4}J_{6'',4''}$ = 1.0 Hz, 1H, 6‘‘-H), 6.99 (t, $^{3}J_{5'',6'',7''}$ = 7.9 Hz, 1H, 5-H).

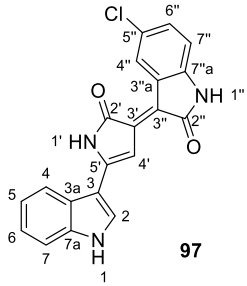
^{13}C-NMR (226 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 171.6 (C-2‘), 170.1 (C-2‘‘), 148.7 (C-3‘‘), 139.0 (C-7‘‘a), 138.1 (C-5’), 137.6 (C-7a), 130.4 (C-2), 128.9 (C-6’’), 124.7 (C-4’’), 124.6 (C-3a), 124.2 (C-3’’a), 123.4 (C-6), 122.0 (C-5’’), 121.9 (C-5), 119.9 (C-4), 118.1 (C-7’’), 113.4 (C-3’), 113.2 (C-7), 106.3 (C-3), 97.7 (C-4’).

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3200 (br), 2921 (s), 2839 (w), 1716 (vs), 1680 (s), 1465 (m), 1232 (w), 1180 (m), 751 (vs).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{20}H_{12}N_3O_2Cl$+H: 362.0690 [M+H]$^+$; gef.: 362.0690.

---

97 5’’-Chlordeoxyviolacein



Gemäß Synthesevorschrift SV5 wurde geschütztes Indolpyrrolidinon **70** (1.1 g, 2.7 mmol, 1.0 Äq.) mit 5-Chlorisatin **93** (0.82 g, 2.9 mmol, 1.05 Äq.) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte in Normalphase über Kieselgel.

Ausbeute: 5 mg, 13 µmol, 0.5 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 12.21 (s, 1H, 1-H), 10.92 (s, 1H, 1'-H), 10.78 (s, 1H, 1''-H), 8.99 (d, $^4J_{4'',6''}$ = 2.1 Hz, 1H, 4''-H), 8.24 (s, 1H, 2-H), 7.96 – 7.77 (m, 1H, 7''-H), 7.65 (d, $^4J_{4',1'}$ = 1.7 Hz, 1H, 4'-H), 7.61 – 7.55 (m, 1H, 4-H), 7.36 – 7.29 (m, 2H, 5-H, 6-H), 7.25 (dd, $^3J_{6'',7''}$ = 8.3 Hz, $^4J_{6'',4''}$ 2.2 Hz, 1H, 6''-H), 6.84 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.3 Hz, 1H, 7-H).

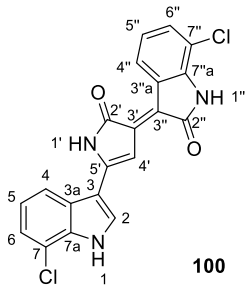
^{13}C-NMR (151 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 171.7 (C-2'), 170.0 (C-2''), 148.8 (C-3''), 140.5 (C-7''a), 137.9 (C-5'), 137.6 (C-7a), 130.4 (C-2), 128.8 (C-6''), 125.5 (C-4''), 124.8 (C-5''), 124.6 (C-3a), 123.7 (C-3''a), 123.3 (C-5), 121.9 (C-6), 119.9 (C-7''), 117.7 (C-3'), 113.1 (C-4), 110.3 (C-7), 106.3 (C-3), 97.5 (C-4').

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3209 (br), 1726 (s), 1678 (vs), 1472 (m), 1232 (w), 1185 (m), 1022 (vs), 1003 (vs), 820 (m), 743 (vs).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{20}H_{12}N_3O_2Cl$+H: 362.0691 $[M+H]^+$; gef.: 362.0698.

---

100 7,7''-Dichlordeoxyviolacein



100

Gemäß Synthesevorschrift SV5 wurde geschütztes 7-Chlorindolpyrrolidinon **90** (0.50 g, 1.1mmol, 1.0 Äq.) mit 7-Chlorisatin **94** (0.35 g, 1.2 mmol, 1.05 Äq.) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte in Normalphase über Kieselgel.

Ausbeute: 1 mg, 2.5 µmol, 0.2 %

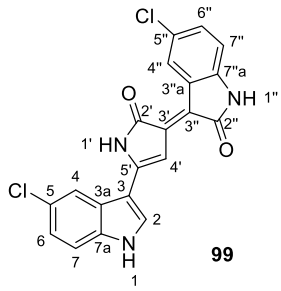
^{1}H-NMR (600 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 12.49 (s, 1H), 11.01 (s, 1H), 10.88 (s, 1H), 8.87 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.29 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.94 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H).

Aufgrund der geringen Menge des erhaltenen Produkts konnten kein ^{13}C-NMR-Spektrum aufgenommen werden sowie eine die ^{1}H-Signale eindeutig zugeordnet werden.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3435 (br), 3220 (br), 1729 (vs), 1680 (s), 1625 (w), 1469 (m), 1189 (m), 1026 (s), 1013 (vs), 819 (m), 740 (s).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{20}H_{11}N_3O_2Cl$+H: 396.0301 $[M+H]^+$; gef.: 396.0304.

99 5,5''-Dichlordeoxyviolacein



Gemäß Synthesevorschrift SV5 wurde geschütztes 5-Chlorindolpyrrolidin-2-on **89** (0.15 g, 0.34 mmol, 1.0 Äq.) mit 5-Chlorisatin **93** (0.10 g, 0.36 mmol, 1.05 Äq.) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte über eine C18 *reversed-phase* Säule.

Ausbeute: 1 mg, 2.5 µmol, 0.7 %

^{1}H-NMR (600 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 12.07 (s, 1H), 10.80 (s, 1H), 10.63 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.61 – 7.51 (m, 2H), 7.51 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.33 – 7.26 (m, 1H), 7.00 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H).

Aufgrund der geringen Menge des erhaltenen Produkts konnten kein ^{13}C-NMR-Spektrum aufgenommen werden sowie die ^{1}H-Signale eindeutig zugeordnet werden.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3431 (br), 3241 (br), 1727 (s), 1682 (s), 1619 (w), 1474 (w), 1189 (w), 1024 (vs), 1002 (vs), 823 (m), 737 (s).

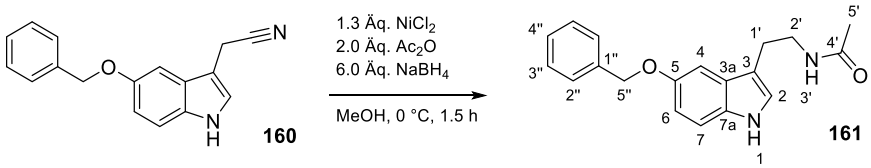
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{20}H_{13}N_3O_2Cl$+H: 398.0458 $[M+H]^+$; gef.: 398.0454.

Das korrekte Masse-/Ladungsverhältnis konnte nicht beobachtet werden (2 Protonen zu viel). Inwiefern dies das Resultat einer unvollständigen Reaktion (fehlende Dehydrierung zum Aufbau der Doppelbindung) oder einer Nebenreaktion (z. B. Oxidation des Produkts) ist, konnte nicht weiter beleuchtet werden.

7.3.3. Synthesen des Physostigmin-Projekts

7.3.3.1. Nitril-Reduktion zum Benzyl-geschützten Indolamid

161 *N*-Acetyl-*O*-benzylserotonin



Entsprechend C. Markl *et al.*[272] wurden 2-(5-(Benzyloxy)-1*H*-indol-3-yl)acetonitril (**160**) (401 mg, 1.5 mmol, 1.0 Äq.), Essigsäureanhydrid (288 µL, 3.1 mmol, 2.0 Äq.) und Nickelchlorid Hexahydrat (479 mg, 2.0 mmol, 1.3 Äq.) in einem trockenen, sekurierten Reaktionskolben in Methanol (20 mL) gelöst und unter Rühren auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde über 30 min Natriumborhydrid (340 mg, 9.0 mmol, 6.0 Äq.) in mehreren Portionen zugegeben. Nach 90 min Reaktionszeit wurde das Eisbad entfernt und das Reaktionsgemisch wurde für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend an vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in EE aufgenommen, durch Sand und Celite

filtriert und anschließend mit einer gesättigten, wässrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt. Aus der wässrigen Phase wurde das Produkt mit EE (3 x 30 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Anschluss mit gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (100 % EE) von Verunreinigungen befreit und das Produkt als orangener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.32 g, 1.0 mmol, 68 %.

(Bei größeren Ansatzen führte der ausfallende Feststoff zum Verstopfen des Trichters, wodurch beachtliche Mengen des Rohprodukts nicht extrahiert werden konnten.)

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.10 (s, 1H, 1-H), 7.48 (d, $^3J_{2'',3''}$ = 7.2 Hz, 2H, 2″-H), 7.39 (t, $^3J_{3'',2'',1''}$ = 7.5 Hz, 2H, 3″-H), 7.35 – 7.29 (m, 1H, 4″-H), 7.27 (d, $^3J_{7,6}$ = 9.0 Hz, 1H, 7-H), 7.13 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.4 Hz, 1H, 4-H), 7.00 (d, $^3J_{2,1}$ = 2.3 Hz, 1H, 2-H), 6.95 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.8 Hz, $^4J_{6,4}$ = 2.4 Hz, 1H, 6-H), 5.55 (s, 1H, 3′-H), 5.11 (s, 2H, 5''-H), 3.58 (app. q, $^3J_{2',1'}$ = 6.5 Hz, 2H, 2′-H), 2.93 (t, $^3J_{1',2'}$ = 6.7 Hz, 2H, 1′-H), 1.92 (s, 3H, 5′-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 170.2 (C-4′), 153.4 (C-5), 137.7 (C-1″), 131.9 (C-7a), 128.7 (C-3″), 128.0 (C-4″), 127.9 (C-3a), 127.7 (C-2″), 123.0 (C-2), 113.2 (C-6), 113.0 (C-3), 112.1 (C-7), 102.4 (C-4), 71.1 (C-5″), 39.8 (C-2′), 25.4 (C-1′), 23.6 (C-5′).

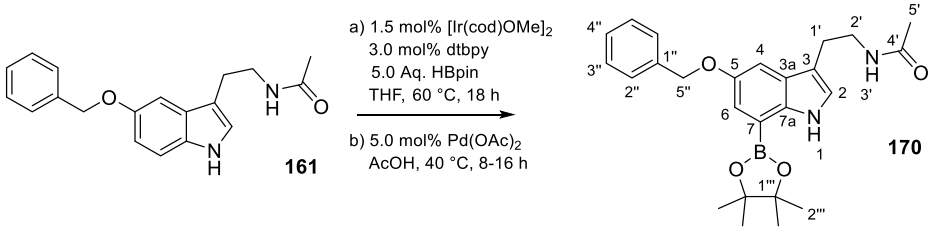
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3408 (w), 3287 (m), 1649 (vs), 1535 (m), 1482 (s), 1451 (s), 1292 (m), 1186 (s), 700 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{19}H_{20}N_2O_2$+H^+: 309.1598 [M+H]$^+$; gef.: 309.1600.

Schmelzpunkt: 133 °C.

7.3.3.2. 7-CH-Aktivierung mittels Ir-katalysierter Borylierung

170 *N*-Acetyl-*O*-benzyl-7-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)serotonin



Entsprechend Loach *et al.* wurden Indolamid **161** (2.5 g, 8.1 mmol, 1.0 Äq.), (1,5-Cyclooctadien)(methoxy)iridium(I)-Dimer (80 mg, 121 µmol, 1.5 mol%) und 4,4'-Di-*tert*butyl-2,2'-bipyridin (65 mg, 0.24 mmol, 3.0 mol%) in einen trockenen, sekurierten Reaktionskolben unter Argon gegeben und in getrocknetem THF (70 mL) gelöst. Während das dunkelbraune Reaktionsgemisch gerührt wird, wurde anschließend Pinakolboran (5.8 mL, 40 mmol, 5.0 Äq.) langsam zugegeben, wodurch die Reaktionslösung eine rötliche Farbe bekommt. Die Reaktion wurde für 18 h bei 60 °C gerührt. Nachdem die Lösung abgekühlt ist, wurde das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 8 mL Essigsäure gelöst. Nach Zugabe von Palladium-(II)-acetat (91 mg, 0.41 mmol, 5.0 mol%) wurde die Suspension für 18 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch Sand und Celite filtriert und der Kolben sowie der Filter mit EE ausgespült. Das Filtrat wurde durch Zugabe von Natronlauge

(1 M) und gesättigter, wässriger $NaHCO_3$-Lösung (60 mL) basisch eingestellt und die wässrige Phase mit EE (3 x 60 mL) extrahiert. Die vereinigte, organische Phase wurden an vermindertem Druck von Lösungsmittel befreit und das Rohprodukt säulenchromatographisch (EE/Et_3N: 98/2) von Verunreinigungen befreit. Dazu wurde das Kieselgel durch Konditionierung (EE/Et_3N: 95/5) zunächst basisch eingestellt, ehe das Rohprodukt aufgetragen wurde. Das Produkt wurde als braunes Öl erhalten.

Ausbeute: 2.43 g, 5.6 mmol, 69 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.95 (s, 1H, 1-H), 7.49 – 7.46 (m, 2H, 2''-H), 7.43 (d, $^2J_{4,6}$ = 2.4 Hz, 1H, 4-H), 7.38 (t, $^3J_{3'',2'',1''}$ = 7.6 Hz, 2H, 3''-H), 7.33 – 7.29 (m, 1H, 4''-H), 7.27 (d, $^3J_{6,4}$ = 2.5 Hz, 1H, 6-H), 7.08 (d, $^3J_{2,1}$ = 2.3 Hz, 1H, 2-H), 5.53 (s, 1H, 3'-H), 5.12 (s, 2H, 5''-H), 3.56 (app. q, $^3J_{2',1'}$ = 6.4 Hz, 2H, 2'-H), 2.98 – 2.90 (m, 2H, 1'-H), 1.90 (s, 3H, 5'-H), 1.39 (s, 12H, 2'''-H).

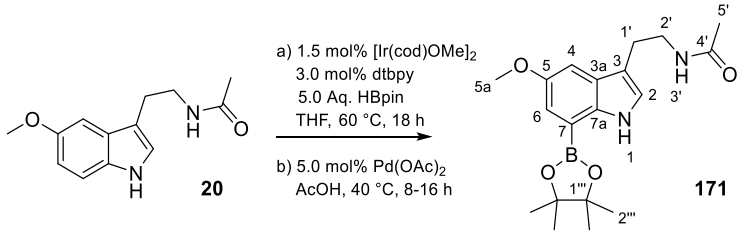
^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 170.2 (C-4'), 153.0 (C-5), 137.8 (C-1''), 137.3 (C-7a), 128.6 (C-3''), 127.8 (C-4''), 127.7 (C-2''), 127.1 (C-3a), 123.0 (C-2), 119.1 (C-4), 112.1 (C-3), 107.3 (C-6), 84.1 (C-1'''), 71.4 (C-5''), 39.9 (C-2'), 25.4 (C-1'), 25.1 (C-2'''), 23.5 (C-5').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3458 (w), 3305 (br), 2977 (m), 2931 (w), 1656 (m), 1435 (s), 1366 (s), 1313 (s), 1145 (vs), 855 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{25}H_{31}BN_2O_4$+H^+: 435.2450 [M+H]$^+$; gef.: 435.2499.

---

171 7-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)melatonin



Entsprechend Loach *et al.* wurden Melatonin (**20**) (1.0 g, 4.3 mmol, 1.0 Äq.), (1,5-Cyclooctadien)(methoxy)iridium(I)-Dimer (43 mg, 65 µmol, 1.5 mol%) und 4,4' Di-*tert*-butyl-2,2'-bipyridin (35 mg, 0.13 mmol, 3.0 mol%) in einen trockenen, sekurierten Reaktionskolben unter Argon gegeben und in getrocknetem THF (60 mL) gelöst. Während das dunkelbraune Reaktionsgemisch gerührt wird, wurde anschließend Pinakolboran (3.2 mL, 22 mmol, 5.0 Äq.) langsam zugegeben, wodurch die Reaktionslösung eine rötliche Farbe bekommt. Die Reaktion wurde für 18 h bei 60 °C gerührt. Nachdem die Lösung abgekühlt ist, wurde das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 7 mL Essigsäure gelöst. Nach Zugabe von Palladium-(II)-acetat (49 mg, 0.22 mmol, 5.0 mol%) wurde die Suspension für 18 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch Sand und Celite filtriert und der Kolben sowie der Filter mit EE ausgespült. Das Filtrat wurde durch Zugabe von Natronlauge (1 M) und gesättigter, wässriger $NaHCO_3$-Lösung (100 mL) basisch eingestellt und die wässrige Phase mit EE (3 x 40 mL) extrahiert. Die vereinigte, organische Phase wurde an vermindertem Druck von Lösungsmittel befreit und das Rohprodukt säulenchromatographisch (EE/Et_3N: 98:2) von Verunreinigungen befreit. Dazu wurde das Kieselgel durch Konditionierung (EE/Et_3N: 95/5) zunächst basisch eingestellt, ehe das Rohprodukt aufgetragen wurde. Das Produkt wurde als braunes Öl erhalten.

Ausbeute: 1.06 g, 3.0 mmol, 69 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.23 (d, $^4J_{4,5}$ = 2.5 Hz, 1H, 4-H), 7.15 (d, $^4J_{6,4}$ = 2.5 Hz, 1H, 6-H), 7.10 (s, 1H, 2-H), 3.84 (s, 3H, 5a), 3.45 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.4 Hz, 2H, 2′-H), 2.91 (t, $^3J_{1',2'}$ = 7.7 Hz, 2H, 1′-H), 1.91 (s, 3H, 5′-H), 1.40 (s, 12H, 2‴-H).

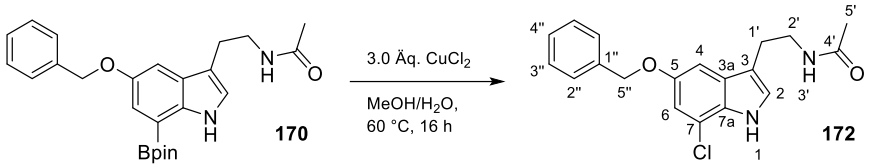
^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.3 (C-4′), 154.6 (C-5), 138.0 (C-7a), 128.8 (C-3a), 124.5 (C-2), 118.6 (C-6), 112.8 (C-3), 112.6 (C-7), 106.2 (C-4), 85.2 (C-1‴), 56.5 (C-5a), 41.5 (C-2′), 26.2 (C-1′), 25.2 (C-2‴), 22.6 (C-5′).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3461 (br), 2977 (m), 2937 (m), 2461 (w), 1634 (vs), 1480 (s), 1423 (vs), 1373 (vs), 1261 (s), 1217 (s), 1169 (s), 1141 (vs), 1040 (s), 850 (s).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{19}H_{27}BN_2O_4$+H$^+$: 359.2137 [M+H]$^+$; gef.: 359.2147.

7.3.3.3. Funktionalisierung der Indolamide

172 *N*-Acetyl-*O*-benzyl-7-chlorserotonin



Entsprechend Loach *et al.* wurde Boronsäureester **170** (200 mg, 0.46 mmol, 1.0 Äq.) in Methanol (5 mL) gelöst und in einem Reaktionskolben gerührt. Kupfer(II)-chlorid (185 mg, 1.4 mmol, 3.0 Äq.) wurde in Wasser (5 mL) gelöst und zur Reaktionslösung gegeben. Die Reaktion wurde unter Rühren für 16 h auf 60 °C erhitzt. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt ist, wurde gesättigte, wässrige NaCl-Lösung hinzugegeben (5 mL) und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten, organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (DCM/MeOH: 98/2) und das Produkt als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 150 mg, 0.44 mmol, 95 %.

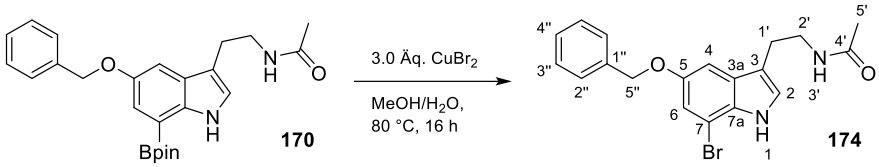
^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.16 (s, 1H, 1-H), 7.47 – 7.45 (m, 2H, 2‘‘-H), 7.41 – 7.37 (m, 2H, 3‘‘-H), 7.34 – 7.31 (m, 1H, 4‘‘-H), 7.07 (d, $^3J_{2,1}$ = 2.4 Hz, 1H, 2-H), 7.04 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.2 Hz, 1H, 4-H), 7.00 (d, $^4J_{6,4}$ = 2.1 Hz, 1H, 6-H), 5.51 (s, 1H, 3‘-H), 5.09 (s, 2H, 5‘‘-H), 3.56 (app. q, $^3J_{2',1'}$ = 6.6 Hz, 2H, 2‘-H), 2.90 (t, $^3J_{1',2'}$ = 6.8 Hz, 2H, 1‘-H), 1.93 (s, 3H, 5‘-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 170.4 (C-4‘), 153.4 (C-5), 137.2 (C-1‘‘), 129.3 (C-7a), 128.7 (C-3a), 128.7 (C-3‘‘), 128.1 (C-4‘‘), 127.7 (C-2‘‘), 123.7 (C-2), 117.0 (C-6), 113.9 (C-3), 112.6 (C-7), 101.4 (C-4), 71.3 (C-5‘‘), 39.8 (C-2‘), 25.4 (C-1‘), 23.4 (C-5‘).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2418 (br), 3287 (br), 276 (w), 2934 (w), 1658 (vs), 1573 (s), 1486 (vs), 1363 (s), 1299 (s), 1177 (s), 1074 (m), 1018 (m), 703 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{19}H_{19}ClN_2O_2$+H$^+$: 343.1208 [M+H]$^+$; gef.: 342.1212.

174 *N*-Acetyl-*O*-benzyl-7-bromserotonin



Entsprechend Loach *et al.* wurde Boronsäureester **170** (200 mg, 0.46 mmol, 1.0 Äq.) in Methanol (5 mL) gelöst und in einem Reaktionskolben gerührt. Kupfer(II)-bromid (307 mg, 1.4 mmol, 3.0 Äq.) wurde in Wasser (5 mL) gelöst und zur Reaktionslösung gegeben. Die Reaktion wurde unter Rühren für 16 h auf 80 °C erhitzt. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt ist, wurde gesättigte, wässrige NaCl-Lösung hinzugegeben (55 mL) und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten, organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (DCM/MeOH: 95/5) und das Produkt als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 137 mg, 0.35 mmol, 77 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.12 (s, 1H, 1-H), 7.48 – 7.44 (m, 2H, 2''-H), 7.42 – 7.37 (m, 2H, 3''-H), 7.35 – 7.31 (m, 1H, 4''-H), 7.16 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.1 Hz, 1H, 4-H), 7.09 (d, $^4J_{6,4}$ = 2.1 Hz, 1H, 6-H), 7.07 (d, $^3J_{2,1}$ = 2.3 Hz, 1H, 2-H), 5.54 (s, 1H, 3'-H), 5.09 (s, 2H, 5''-H), 3.56 (app. q, $^3J_{2',1'}$ = 6.5 Hz, 2H, 2'-H), 2.90 (t, $^3J_{1',2'}$ = 6.8 Hz, 2H, 1'-H), 1.92 (s, 3H, 5'-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 170.2 (C-4'), 153.7 (C-5), 137.2 (C-1''), 130.9 (C-7a), 128.7 (C-3''), 128.6 (C-3a), 128.1 (C-4''), 127.7 (C-2''), 123.6 (C-2), 115.6 (C-4), 114.3 (C-3), 105.0 (C-7), 102.2 (C-6), 71.4 (C-5''), 39.8 (C-2'), 25.6 (C-1'), 23.5 (C-5').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3411 (w), 3291 (br), 2920 (w), 1650 (vs), 1573 (s), 1474 (vs), 1425 (s), 1369 (s), 1299 (s), 1215 (m), 696 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{19}H_{19}BrN_2O_2$+H$^+$: 387.0703 [M+H]$^+$; gef.: 387.0707.

183 *N*-Acetyl-*O*-benzyl-7-hydroxyserotonin



Entsprechend Gupta *et al.*[195] wurde Boronsäureester **170** (100 mg, 0.23 mmol, 1.0 Äq.) in Methanol (5 mL) gelöst und unter Rühren Carbamidperoxid (UHP) (30 mg, 0.32 mmol, 1.4 Äq.) in mehreren Portionen zugegeben. Die Reaktion wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Wasser zur Reaktionslösung hinzugegeben und die wässrige Phase mit DCM extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten, organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde

säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/MeOH: 99/1) und das Produkt als orangenes Öl erhalten.

Ausbeute: 36 mg, 0.11 mmol, 49 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.51 – 7.43 (m, 2H, 2''-H), 7.40 – 7.35 (m, 2H, 3''-H), 7.34 – 7.28 (m, 1H, 4''-H), 6.98 (s, 1H, 2-H), 6.67 (d, $^3J_{4,6}$ = 2.1 Hz, 1H, 4-H), 6.31 (d, $^3J_{6,4}$ = 1.9 Hz, 1H, 6-H), 5.05 (s, 2H, 5''-H), 3.42 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.85 (t, $^3J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 1.91 (s, 3H, 5'-H).

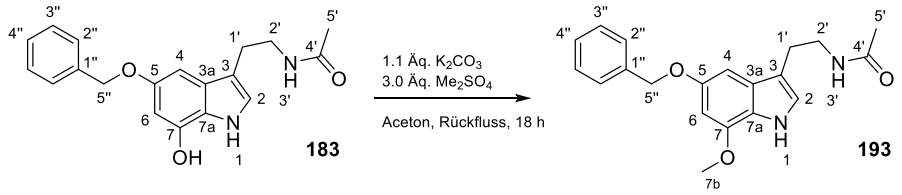
^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.3 (C-4'), 154.8 (C-5), 145.0 (C-7), 139.5 (C-1''),129.4 (C-3''), 128.7 (C-3a), 128.7 (C-2''), 128.7 (C-4''), 123.8 (C-7a), 123.5 (C-2), 113.5 (C-3), 98.4 (C-6), 94.2 (C-4), 71.9 (C-5''), 41.5 (C-2'), 26.4 (C-1), 22.6 (C-5').

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3332 (br), 2931 (w), 2501 (w), 1623 (vs), 1579 (s), 1479 (s), 1454 (s), 1422 (s), 1304 (m), 1072 (m), 740 (m), 698 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{19}H_{20}N_2O_3$+H: 325.1547 $[M+H]^+$; gef.: 325.1550.

---

193 *N*-Acetyl-*O*-benzyl-7-methoxyserotonin



Kaliumcarbonat (26 mg, 0.26 mmol, 1.1 Äq.) wurde in einem Reaktionskolben vorgelegt und Phenol **183** (77 mg, 0.24 mmol, 1.0 Äq.) gelöst in trockenem Aceton (4 mL) wurde hinzugegeben. Die Lösung wurde für 0.5 h gerührt und anschließend Dimethylsulfat (45 µL, 0.47 mmol, 2.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h zum Rückfluss erhitzt. Nachdem die Reaktionslösung abgekühlt ist, wurde das Gemisch mit wässriger, gesättigter NaCl-Lösung und EE verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 37 %, 27 mg, 80 µmol.

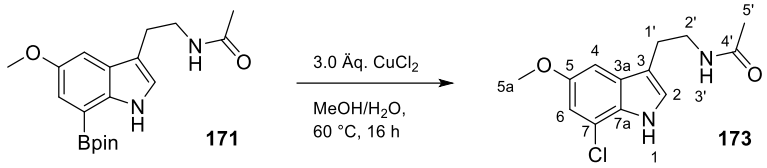
^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.47 (d, $^3J_{2'',3''}$ = 7.2 Hz, 2H, 2''-H), 7.37 (t, $^3J_{3'',2'',4''}$ = 7.3 Hz, 2H, 3''-H), 7.30 (d, $^3J_{4'',3''}$ = 7.1 Hz, 1H, 4''-H), 6.97 (s, 1H, 2-H), 6.75 (d, $^4J_{4,6}$ = 1.8 Hz, 1H, 4-H), 6.39 (d, $^4J_{6,4}$ = 1.7 Hz, 1H, 6-H), 5.08 (s, 2H, 5''-H), 3.89 (s, 3H, 7b-H), 3.42 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.86 (t, $^3J_{1',2'}$ = 7.4 Hz, 2H, 1'-H), 1.91 (s, 3H, 5'-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.2 (C-4'), 154.8 (C-5), 148.1 (C-7), 139.4 (C-1''), 129.5 (C-7a), 129.4 (C-3''), 128.8 (C-2''), 128.7 (C-4''), 123.9 (C-3a), 123.4 (C-2), 113.6 (C-3), 95.2 (C-6), 94.9 (C-4), 72.0 (C-5''), 55.8 (C-7b), 41.5 (C-2'), 26.3 (C-1'), 22.6 (5'-H).

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 2931 (w), 2413 (br), 1625 (vs), 1580 (s), 1485 (s), 1449 (vs), 1292 (s), 1141 (vs), 1027 (s), 806 (m), 739 (m), 699 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{20}H_{23}N_2O_3$+H: $[M+H]^+$; 339.1703 gef.: 339.1342.

173 7-Chlormelatonin



Entsprechend Loach *et al.* wurde Boronsäureester **171** (350 mg, 1.0 mmol, 1.0 Äq.) in Methanol (8 mL) gelöst und in einem Reaktionskolben gerührt. Kupfer(II)-chlorid (394 mg, 2.9 mmol, 3.0 Äq.) wurde in Wasser (8 mL) gelöst und zur Reaktionslösung gegeben. Die Reaktion wurde unter Rühren für 16 h auf 60 °C erhitzt. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt ist, wurde gesättigte, wässrige NaCl-Lösung hinzugegeben (10 mL) und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 15 mL). Die vereinigten, organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/EE: 1/6) und das Produkt als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 246 mg, 0.92 mmol, 94 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.15 (s, 1H, 3'-NH), 7.07 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.4 Hz, 1H, 4-H), 6.96 (d, $^4J_{6,4}$ = 2.2 Hz, 1H, 6-H), 6.91 (d, $^3J_{2,1}$ = 2.1 Hz, 1H, 2-H), 5.52 (s, 1H, 3'-NH), 3.85 (s, 3H, 5a-H), 3.57 (app. q, $^3J_{2',1'}$ = 6.5 Hz, 2H, 2'-H), 2.92 (t, $^3J_{1',2'}$ = 6.8 Hz, 2H, 1'-H), 1.94 (s, 3H, 5'-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 170.3 (C-4'), 154.5 (C-5), 129.2 (C-7a), 128.8 (C-3a), 123.5 (C-2), 117.1 (C-7), 114.0 (C-3), 112.0 (C-6), 99.8 (C-4), 56.3 (C-5a), 39.9 (C-2'), 25.5 (C-1'), 23.5 (C-5').

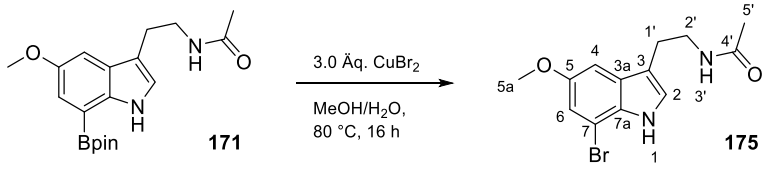
^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.11 (s, 1H, 2-H), 7.02 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.2 Hz, 1H, 4-H), 6.80 (d, $^4J_{6,4}$ = 2.2 Hz, 1H, 6-H), 3.82 (s, 3H, 5a-H), 3.44 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.89 (t, $^3J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 1.91 (s, 3H, 5'-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.3 (C-5'), 155.3 (C-5), 130.4 (C-7a), 130.4 (C-3a), 125.3 (C-2), 117.8 (C-7), 114.3 (C-3), 112.1 (C-6), 100.5 (C-4), 56.5 (C-5a), 41.4 (C-2'), 26.2 (C-1'), 22.6 (C-5').

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3281 (br), 2937 (w), 1634 (vs), 1575 (s), 1488 (vs), 1309 (s), 1220 (s),1080 (s), 1938 (s), 872 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{13}H_{15}ClN_2O_2$+H $^+$: 267.0895 $[M+H]^+$; gef.: 267.0899.

175 7-Brommelatonin



Entsprechend Loach *et al.* wurde Boronsäureester **171** (0.83 g, 2.3 mmol, 1.0 Äq.) in Methanol (25 mL) gelöst und in einem Reaktionskolben gerührt. Kupfer(II)-bromid (1.5 g,

6.9 mmol, 3.0 Äq.) wurde in Wasser (25 mL) gelöst und zur Reaktionslösung gegeben. Die Reaktion wurde unter Rühren für 16 h auf 80 °C erhitzt. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt ist, wurde gesättigte, wässrige NaCl-Lösung hinzugegeben (30 mL) und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 20 mL). Die vereinigten, organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/EE: 1/6) und das Produkt als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.49 g, 1.6 mmol, 69 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.11 (s, 1H, 2-H), 7.06 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.1 Hz, 1H, 4-H), 6.95 (d, $^4J_{6,4}$ = 2.1 Hz, 1H, 6-H), 3.82 (s, 4H, 5a-H), 3.43 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2′-H), 2.88 (t, $^3J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1′-H), 1.91 (s, 3H, 5′-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.3 (C-4′), 155.4 (C-5), 132.0 (C-7a), 130.2 (C-3a), 125.4 (C-2), 115.0 (C-6), 114.5 (C-2), 105.5 (C-7), 101.1 (C-4), 56.6 (C-5a), 41.3 (C-2′), 26.3 (C-1′), 22.6 (C-5′).

Reste der abgespaltenen Pinakolboronsäureester-Spezies sind noch im NMR-Spektrum erkennbar, da sich diese in der chromatographischen Aufreinigung nicht/nur in geringem Maße vom Produkt entfernt werden kann.

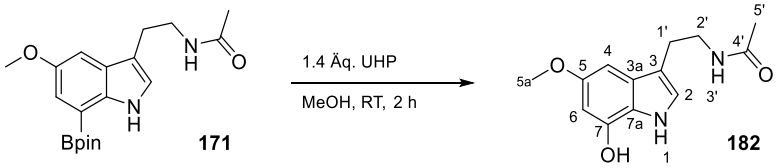
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3416 (br), 2977 (m), 2937 (w), 2418 (w), 1627 (vs), 2568 (m), 1483 (vs), 1425 (s), 1224 (s), 1168 (s), 1077 (m), 1038 (m), 831 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{13}H_{15}BrN_2O_2$+H $^+$: 311.0390 $[M+H]^+$; gef.: 311.0396.

Schmelzpunk: 139 °C.

---

182 7-Hydroxymelatonin



Entsprechend Gupta *et al.*[195] wurde Boronsäureester **171** (118 mg, 0.33 mmol, 1.0 Äq.) in Methanol (4 mL) gelöst und unter Rühren Carbamidperoxid (UHP) (43 mg, 0.46 mmol, 1.4 Äq.) in mehreren Portionen zugegeben. Die Reaktion wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Wasser zur Reaktionslösung hinzugegeben und die wässrige Phase mit DCM extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten, organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/MeOH: 98/2) und das Produkt als orangenes Öl erhalten.

Ausbeute: 58 mg, 0.23 mmol, 71 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 8.02 (s, 1H, 3'-NH), 6.97 (s, 1H, 2-H), 6.56 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.1 Hz, 1H, 4-H), 6.21 (d, $^4J_{6,4}$ = 2.1 Hz, 1H, 6-H), 3.78 (s, 3H, 5a-H), 3.43 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.86 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 1.92 (s, 3H, 5'-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.3 (C-4'), 155.8 (C-5), 145.0 (C-7), 130.1 (C-3a), 123.6 (C-7a), 123.4 (C-2), 113.5 (C-3), 97.8 (C-6), 92.3 (C-4), 56.1 (C-5a), 41.5 (C-2'), 26.4 (C-1'), 22.6 (C-5').

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3345 (br), 1738 (w), 1631 (vs), 1589 (s), 1433 (m), 1374 (m), 1230 (m), 1140 (m), 1036 (w).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{13}H_{16}N_2O_3$+H: 249.1234 $[M+H]^+$; gef.: 249.1234.

---

184 7-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)melatonin



Phenol **182** (32 mg, 0.13 mmol, 1.0 Äq.) und Imidazol (31 mg, 0.46 mmol, 3.5 Äq.) wurden in trockenem DCM (2 mL) gelöst und bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBS-Cl) (40 mg, 0.26 mmol, 2.0 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion für 18 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit Zitronensäurelösung (1 M, in Wasser) (3 x 1 mL) und mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 35 mg, 0.10 mmol, 75 %.

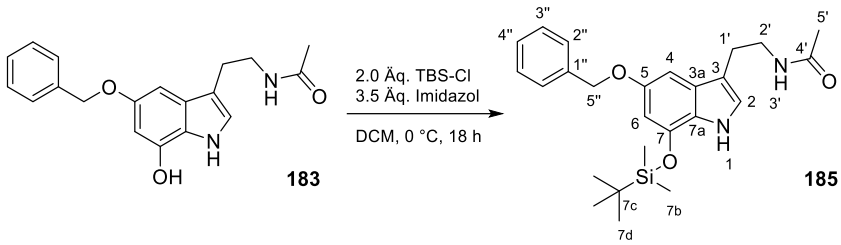
^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 9.69 (s, 1H, 1-NH), 8.04 (s, 1H, 3'-NH), 6.97 (s, 1H, 2-H), 6.66 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.1 Hz, 1H, 4-H), 6.22 (d, $^4J_{6,4}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 3.77 (s, 3H, 5a-H), 3.42 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.85 (t, $^3J_{1',2'}$ = 7.4 Hz, 2H, 1'-H), 1.90 (s, 3H, 5'-H), 1.02 (s, 9H, 7c-H), 0.24 (s, 6H, 7b-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.3 (C-4'), 155.4 (C-5), 143.1 (C-7a), 130.4 (C-3a), 126.0 (C-7), 124.0 (C-2), 113.7 (C-3), 102.4 (C-6), 94.3 (C-4), 56.2 (C-5a), 41.5 (C-2'), 26.4 (C-1), 26.3 (C-7d), 19.2 (C-7c) -4.0 (C-7b).

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 2929 (br), 1714 (vs), 1638 (vs), 1382 (s), 1194 (vs), 1108 (s), 789 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. for $C_{19}H_{30}N_2O_3Si$+H: 363.0298 $[M+H]^+$; gef.: 363.2101.

185 *N*-Acetly-*O*-benzyl-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)serotonin



Phenol **183** (166 mg, 0.51 mmol, 1.0 Äq.) und Imidazol (94 mg, 1.4 mmol, 2.7 Äq.) wurden in trockenem DCM (10 mL) gelöst und bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBS-Cl) (154 mg, 1.0 mmol, 2.0 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion für 18 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit Zitronensäurelösung (1 M, aq.) (3 x 1 mL) und mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 105 mg, 0.24 mmol, 47 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.47 – 7.41 (m, 2H, 2''-H), 7.39 – 7.31 (m, 2H, 3''-H), 7.31 – 7.26 (m, 1H, 4''-H), 6.98 (s, 1H, 2-H), 6.78 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.1 Hz, 1H, 4-H), 6.29 (d, $^3J_{6,4}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 5.05 (s, 2H, 5''-H), 3.41 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.84 (t, $^3J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 1.90 (s, 3H, 5'-H), 1.01 (s, 9H, 7d-H), 0.22 (s, 6H, 7b-H)

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.3 (C-4'), 154.3 (C-5), 143.1 (C-7), 139.4 (C-1''), 130.4 (C-3a), 129.4 (C-3''), 128.7 (C-4''), 128.7 (C-2''), 126.3 (C-7a), 124.1 (C-2), 113.7 (C-3), 103.0 (C-4), 96.5 (C-6), 72.1 (C-5), 41.4 (C-2'), 26.3 (C-7d), 26.2 (C-7c), 22.6 (C-1'), 19.2 (C-5'), -4.0 (C-7b).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3169 (br), 2929 (m), 2862 (w), 2495 (w), 1625 (vs), 1576 (s), 1470 (s), 1431 (s), 1300 (s), 1075 (m), 838 (m), 705 (w).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{25}H_{34}N_2O_3Si$+H: 439.2411 $[M+H]^+$; gef.: 439.2410.

7.3.3.4. Entschützungen zum 5-Phenol

176 *N*-Acetyl-7-chlorserotonin



Entsprechend Schneider[188] wurde Chlorid **173** (230 mg, 0.86 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DCM (15 mL) gelöst und bei einer Temperatur von -78 °C gerührt. Zu der Reaktionslösung wurde tropfenweise Bortribromid (3.0 mL (1 M in Hexan), 3.0 mmol, 3.5 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 20 h gerührt, wobei die Temperatur bis auf Raumtemperatur

angestiegen ist. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit trockenem DCM (10 mL) verdünnt und über eine Kanüle in einen Dreihalbskolben transferiert. Der Dreihalbskolben wurde zuvor ausgestattet mit einer rührenden, gesättigten, wässrigen $NaHCO_3$-Lösung (50 mL), welche mit Eis gekühlt wird. Durch eingeleitetes Argon wird in dem Dreihalbskolben ein leichter Überdruck angelegt, wobei durch einen weiteren Schlauch der Überdruck in ein Glas-Stripper gefüllt mit Natronlauge (2 M, mit Bromthymolblau versetzt) abgeleitet wird. Beim langsamen Zutropfen der Reaktionslösung entsteht dabei ein farbloser Rauch (HBr). Das Reaktionsgefäß wurde mit DCM (2 x 10) ausgespült (und ebenfalls in den Dreihalbskolben zugetropft) und die wässrige Phase im Folgenden extrahiert. Dazu wurde das Gemisch durch Zugabe von Natronlauge auf pH 12 eingestellt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 15 mL). Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von Salzsäure auf pH 2 eingestellt und erneut mit EE (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen, welche aus der sauren Lösung erhalten wurden, wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte in ausreichender Reinheit als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 211 mg, 0.83 mmol, 97 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.08 (s, 1H, 2-H), 6.87 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.1 Hz, 1H, 4-H), 6.70 (d, $^4J_{6,4}$ = 2.1 Hz, 1H, 6-H), 3.43 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.2 Hz, 2H, 2'-H), 2.85 (t, $^3J_{1',2'}$ = 7.2 Hz, 2H, 1'-H), 1.91 (s, 3H, 5'-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.4 (C-4'), 151.7 (C-5), 130.8 (C-7a), 130.1 (C-3a), 125.4 (C-2), 117.4 (C-7), 113.7 (C-3), 112.0 (C-6), 102.7 (C-4), 41.3 (C-2'), 26.2 (C-1'), 22.6 (C-4').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3252 (br), 2474 (w), 1620 (vs), 1485 (s), 1426 (s), 1364 (m), 1224 (m), 1173 (m), 874 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{12}H_{13}ClN_2O_2$+H$^+$: 253.0738 [M+H]$^+$; gef.: 253.0739.

---

177 *N*-Acetyl-7-bromserotonin



Entsprechend Schneider[188] wurde Bromid **175** (250 mg, 0.80 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem DCM (15 mL) gelöst und bei einer Temperatur von -78 °C gerührt. Zu der Reaktionslösung wurde tropfenweise Bortribromid (2.8 mL (1 M in Hexan), 2.8 mmol, 3.5 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 20 h gerührt, wobei die Temperatur bis auf Raumtemperatur angestiegen ist. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit trockenem DCM verdünnt und über eine Kanüle in einen Dreihalbskolben transferiert. Der Dreihalbskolben wurde zuvor ausgestattet mit einer rührenden, gesättigten, wässrigen $NaHCO_3$-Lösung (50 mL), welche mit Eis gekühlt wird. Durch eingeleitetes Argon wird in dem Dreihalbskolben ein leichter Überdruck angelegt, wobei durch einen weiteren Schlauch der Überdruck in ein Glas-Stripper gefüllt mit Natronlauge (2 M, mit Bromthymolblau versetzt) abgeleitet wird. Beim langsamen

Zutropfen der Reaktionslösung entsteht dabei ein farbloser Rauch (HBr). Das Reaktionsgefäß wurde mit DCM ausgespült (und ebenfalls in den Dreihalbskolben zugetropft) und die wässrige Phase im Folgenden extrahiert. Dazu wurde das Gemisch durch Zugabe von Natronlauge auf pH 12 eingestellt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 15 mL). Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von Salzsäure auf pH 2 eingestellt und erneut mit EE (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen, welche aus der sauren Lösung erhalten wurden, wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte in ausreichender Reinheit als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 124 mg, 0.42 mmol, 54 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 10.22 (s, 1H, 1-NH), 8.05 (s, 1H, 3'-NH), 7.08 (s, 1H, 2-H), 6.91 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.1 Hz, 1H, 4-H), 6.86 (d, $^4J_{6,4}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 3.43 (t, $^3J_{2',1'}$ = 5.9 Hz, 2H, 2'-H), 2.84 (t, $^3J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 1.91 (s, 3H, 5'-H).

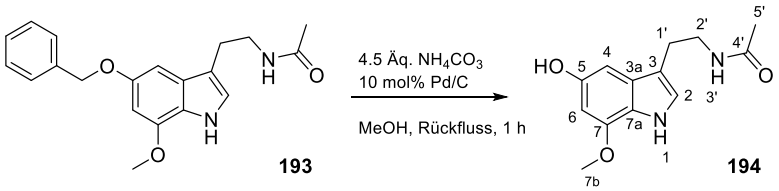
^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.3 (C-4'), 151.9 (C-5), 131.6 (C-7a), 130.6 (C-3a), 125.4 (C-2), 115.0 (C-6), 113.9 (C-3), 105.1 (C-7), 103.3 (C-4), 41.3 (C-2'), 26.3 (C-1'), 22.6 (C-5').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3290 (m), 1702 (w), 1626 (vs), 1565 (s), 1488 (s), 1427 (s), 1358 (s), 1221 (s), 839 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{12}H_{13}BrN_2O_2$+H$^+$: 297.0233 [M+H]$^+$; gef.: 297.0299.

---

194 *N*-Acetyl-7-methoxyserotonin



Ammoniumformiat (17 mg, 0.27 mmol, 4.5 Äq.) und Palladium auf Aktivkohle (6.3 mg, 5.9 µmol, 10 mol%) wurden in einem Reaktionskolben vorgelegt. Methylether **193** (20 mg, 59 µmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (2 mL) gelöst und in den Reaktionskolben gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Nachdem die Reaktionslösung abgekühlt ist, wurde das Gemisch durch Celite filtriert und mit DCM nachgespült. Das Lösungsmittel wurde an vermindertem Druck entfernt und das Produkt in ausreichender Reinheit als klares Öl erhalten.

Ausbeute: 15 mg, 59 µmol, quant.

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD): 6.94 (s, 1H, 2-H), 6.51 (d, $^4J_{4,6}$ = 1.9 Hz, 1H, 4-H), 6.24 (d, $^4J_{6,4}$ = 1.8 Hz, 1H, 6-H), 3.88 (s, 3H, 7b-H), 3.41 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.82 (t, $^3J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 1.90 (s, 3H, 5'-H).

^{13}C-NMR (76 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.3 (C-4'), 151.9 (C-5), 148.0 (C-7), 130.0 (C-3a), 123.5 (C-2), 123.2 (C-7a), 113.0 (C-3), 95.7 (C-4), 94.4 (C-6), 55.7 (C-7b), 41.5 (C-2'), 26.4 (C-1'), 22.6 (C-5').

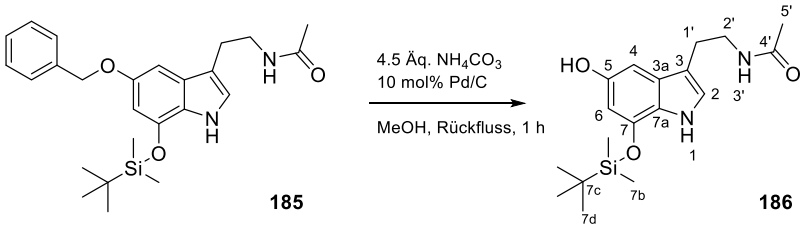
IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3264 (br), 2931 (w), 2511 (w), 1721 (w), 1623 (vs), 1583 (s), 1449 (m), 1274 (m), 1138 (s), 1043 (m), 974 (m), 817 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{13}H_{16}N_2O_3$+H: 249.1234 $[M+H]^+$; gef.: 249.1237.

Schmelzpunk: Zerfall ab ca. 160°C

---

186 *N*-Acetyl-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)serotonin



Ammoniumformiat (21 mg, 0.33 mmol, 4.5 Äq.) und Palladium auf Aktivkohle (7.7 mg, 7.2 µmol, 10 mol%) wurden in einem Reaktionskolben vorgelegt. Silylether **185** (40 mg, 72 µmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (2 mL) gelöst und in den Reaktionskolben gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Nachdem die Reaktionslösung abgekühlt ist, wurde das Gemisch durch Celite filtriert und mit DCM nachgespült. Das Lösungsmittel wurde an vermindertem Druck entfernt und das Produkt in ausreichender Reinheit als klares Öl erhalten.

Ausbeute: 33 mg, 71 µmol, quant.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 6.97 (s, 1H, 2-H), 6.56 (d, $^3J_{4,6}$ = 2.0 Hz, 1H, 4-H), 6.23 (d, $^3J_{6,4}$ = 1.9 Hz, 1H, 6-H), 3.42 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.4 Hz, 2H, 2'-H), 2.83 (t, $^3J_{1',2}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 1.92 (s, 3H, 5-H), 1.04 (s, 9H, 7d-H), 0.27 (s, 6H, 7b-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.3 (C-4'), 151.5 (C-5), 142.9 (C-7a), 130.8 (C-3a), 125.6 (C-7), 124.1 (C-2), 113.1 (C-3), 102.3 (C-6), 96.8 (C-4), 41.4 (C-2'), 26.4 (C-7c), 22.6 (C-1'), 19.2 (C-7c), -4.0 (C-7b).

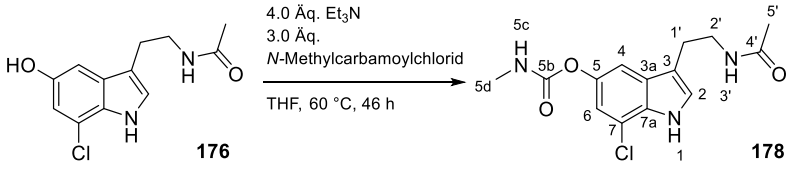
IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3244 (br), 2944 (w), 2929 (m), 2862 (w), 2502 (w), 1633 (s), 1588 (s), 1476 (s), 1424 (s), 1311 (m), 1139 (m), 839 (vs), 780 (m)

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{18}H_{28}N_2O_3Si$+H: 349.1942 $[M+H]^+$; gef.: 349.1939.

7.3.3.5. Carbamoylierungen zum Indolcarbamat

---

178 *N*-Acetyl-*O*-(methylcarbamoyl)-7-chlorserotonin



Entsprechend Schneider[188] wurde Phenol **176** (100 mg, 0.40 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem THF (8 mL) gelöst, in einem Reaktionskolben unter Argon vorgelegt und Triethylamin (0.22 mL, 1.6 mmol, 4.0 Äq.) zugetropft. Anschließend wurde *N*-Methylcarbamoylchlorid

(112 mg, 1.2 mmol, 3.0 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion für 46 h bei 60 °C gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt ist, wurden Wasser und EE hinzugegeben. Durch Zugabe von Natronlauge wurde das Reaktionsgemisch auf pH 12 eingestellt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (5 x 3 mL). Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von Salzsäure auf pH 2 eingestellt und erneut mit EE (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen, welche aus der basischen Lösung erhalten wurden, wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/MeOH: 95/5) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 43 mg, 0.14 mmol, 35 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7. 24 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.0 Hz, 1H, 4-H), 7.19 (s, 1H, 2-H), 6.92 (d, $^4J_{6,4}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 3.43 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.2 Hz, 3H, 2'-H), 2.89 (t, $^3J_{1',2'}$ = 7.2 Hz, 2H, 1'-H), 2.79 (s, 3H, 5b-H), 1.90 (s, 3H).

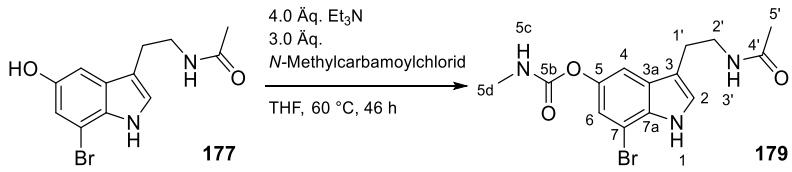
^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.3 (C-4'), 158.5 (C-5b), 145.5 (C-5), 132.8 (C-7a), 130.1 (C-3a), 126.0 (C-2), 117.2 (C-7), 116.7 (C-6), 115.1 (C-3), 110.9 (C-4), 41.4 (C-2'), 27.6 (C-5d), 26.1 (C-1'), 22.6 (C5').

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3387 (br), 2927 (w), 2462 (m), 2071 (w), 1715 (vs), 1622 (vs), 1475 (s), 1435 (vs), 1403 (vs), 1207 (s), 1169 (s), 1120 (m), 975 (m), 879 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{14}H_{16}N_3O_3Cl+H^+$: 310.0953.1 $[M+H]^+$; gef.: 310.0967.

---

179 *N*-Acetyl-*O*-(methylcarbamoyl)-7-bromserotonin



Entsprechend Schneider[188] wurde Phenol **177** (110 mg, 0.37 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem THF (10 mL) gelöst, in einem Reaktionskolben unter Argon vorgelegt und Triethylamin (0.21 mL, 1.5 mmol, 4.0 Äq.) zugetropft. Anschließend wurde *N*-Methylcarbamoylchlorid (103 mg, 1.1 mmol, 3.0 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion für 46 h bei 60 °C gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt ist, wurden Wasser und EE hinzugegeben. Durch Zugabe von Natronlauge wurde das Reaktionsgemisch auf pH 12 eingestellt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (5 x 3 mL). Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von Salzsäure auf pH 2 eingestellt und erneut mit EE (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen, welche aus der basischen Lösung erhalten wurden, wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/MeOH: 98/2) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 65 mg, 0.19 mmol, 50 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.28 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.0 Hz, 1H, 4-H), 7.20 (s, 1H, 2-H), 7,06 (d, $^4J_{6,4}$ = 1.9 Hz, 1H, 6-H), 3.43 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.2 Hz, 2H, 2′-H), 2.89 (t, $^3J_{1',2'}$ = 7.2 Hz, 2H, 1′-H), 2.80 (s, 3H, 3″-H), 1.90 (s, 3H, 5′-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.3 (C-4′), 158.5 (C-5b), 145.6 (C-5), 134.3 (C-7a), 129.8 (C-3a), 126.1 (C-2), 119.7 (C-6), 115.2 (C-3), 111.5 (C-4), 104.6 (C-7), 41.4 (C-2′), 27.6 (C-5d), 26.1 (C-1′), 22.6 (C-5′).

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3321 (br), 1717 (vs), 1641 (s), 1542 (s), 1481 (s), 1442 (s), 1259 (s), 1175 (s).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{14}H_{16}BrN_3O_3$+H$^+$: 354.0448 [M+H]$^+$; gef.: 354.0447.

---

195 *N*-Acetyl-*O*-(methylcarbamoyl)-7-methoxyserotonin



Entsprechend Schneider[188] wurde Phenol **194** (6.4 mg, 25 µmol, 1.0 Äq.) in trockenem THF (2 mL) gelöst, in einem Reaktionskolben unter Argon vorgelegt und Triethylamin (0.17 µL, 1.3 mmol, 5.0 Äq.) zugetropft. Anschließend wurde *N*-Methylcarbamoylchlorid (11 mg, 0.12 mmol, 4.7 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion für 46 h bei 60 °C gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt ist, wurden Wasser und EE hinzugegeben. Durch Zugabe von Natronlauge wurde das Reaktionsgemisch auf pH 12 eingestellt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (5 x 3 mL). Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von Salzsäure auf pH 2 eingestellt und erneut mit EE (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen, welche aus der basischen Lösung erhalten wurden, wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/MeOH: 98/2) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 41 %, 2.6 mg, 8.5 µmol.

^{1}H-NMR (300 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.03 (s, 1H, 2-H), 6.85 (d, $^4J_{4,6}$ = 1.8 Hz, 1H, 4-H), 6.40 (d, $^4J_{6,4}$ = 1.5 Hz, 1H, 6-H), 3.91 (s, 3H, 7b-H), 3.45 – 3.35 (m, 2H, 2'-H), 2.91 – 2.81 (m, 2H, 1'-H), 2.78 (s, 3H, 5b-H), 1.89 (s, 3H, 5'-H).

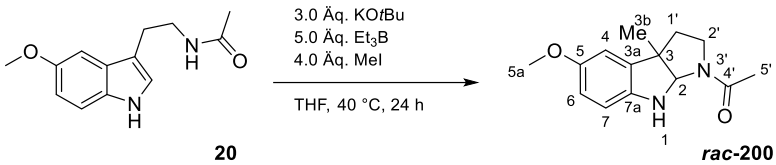
^{13}C-NMR (76 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.3 (C-4'), 159.1 (C-5a), 147.6 (C-7), 145.9 (C-5), 129.2 (C-3a), 126.0 (C-7a), 124.1 (C-2), 114.1 (C-3), 104.3 (C-4), 98.5 (C-6), 56.0 (C-7b), 41.6 (C-2'), 27.6 (C-5b), 26.2 (C-1'), 22.6 (C-5').

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 2951 (m), 2924 (s), 2864 (w), 2474 (br), 1721 (vs), 1627 (vs), 1586 (m), 1459 (s), 1425 (vs), 1398 (vs), 1163 (s), 1015 (m), 806 (s).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{15}H_{19}N_3O_4$+H: 306.1448 [M+H]$^+$; gef.: 306.1449.

7.3.3.6. *C3*-Methylierung und Pyrroloindolformation

***rac*-200** 1-(5-Methoxy-3a-methyl-3,3a,8,8a-tetrahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-1-yl)ethan-1-on



20 ***rac*-200**

Entsprechend Schneider[188] wurde Melatonin (**20**) (400 mg, 1.7 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem THF (25 mL) unter Argon gelöst und Kalium-*tert*-butanolat (5.1 mL (1 M in THF), 5.1 mmol, 3.0 Äq.) zugetropft. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 30 min bei 23 °C gerührt, wobei sich eine rosa-farbene Suspension bildete. Danach wurde Triethylboran (8.5 mL (1 M in THF), 8.5 mmol, 5.0 Äq.) hinzugegeben, wodurch sich wieder eine klare Lösung bildete. Nachdem die Lösung für weitere 30 min bei 23 °C gerührt wurde, wurde Methyliodid (0.42 mL, 6.8 mmol, 4.0 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion für 24 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde wässrige, gesättigte NH_4Cl-Lösung (10 mL) und EE (20 mL) hinzugegeben. Das Gemisch wurde mit EE extrahiert (3 x 30 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten. Es wurde außerdem das Nebenprodukt ***rac*-148** erhalten.

Ausbeute: 251 mg, 1.0 mmol, 59 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.68 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.5 Hz, 1H, 4-H), 6.64 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.5 Hz, $^3J_{6,4}$ = 2.5 Hz, 1H, 6-H), 6.52 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 5.14 (d, J = 3.8 Hz, 1H, 2-H), 3.75 (s, 3H, 5a-H), 3.58 (t, J = 8.8 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.22 (td, $^2J_{1',1'}$ = 10.4 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 6.5 Hz, 1H, 1'-H_b), 2.29 (dd, $^2J_{2',2'}$ = 12.5 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 6.0 Hz, 1H, 2'-H_a), 2.13 – 2.06 (m, 1H, 2'-H_b), 2.01 (s, 3H, 5'-H), 1.40 (s, 3H, 3b-H).

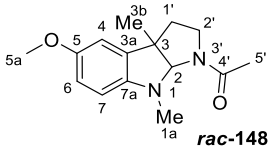
^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 170.3 (C-4'), 153.8 (C-5), 142.9 (C-7a), 134.8 (C-3a), 113.0 (C-6), 110.1 (C-7), 109.8 (C-4), 82.7 (C-2), 56.1 (C-5a), 52.8 (C-3), 47.5 (C-2'), 37.2 (C-1'), 24.2 (C-3b), 22.8 (C-5').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2962 (m), 2862 (w), 2832 (w), 1626 (s), 1488 (s), 1427 (m), 1275 (m), 1198 (s), 1061 (m), 1030 (m), 862 (w), 816 (w).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{14}H_{18}N_2O_2$+H^+: 247.1441 $[M+H]^+$; gef.: 247.1441.

Schmelzpunkt: 119 °C.

***rac*-148** 1-(5-Methoxy-3a,8-dimethyl-3,3a,8,8a-tetrahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-1(2*H*)-yl)ethan-1-on



***rac*-148**

Aus der zuvor beschriebenen Methylierung von Melatonin (**20**) zum Hexahydropyrrol ***rac*-200** wurde neben dem Produkt noch das *N*-methylierte Nebenprodukt ***rac*-148** als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 75 mg, 0.30 mmol, 17 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 6.72 (d, ^4J = 2.6 Hz, 1H, 4-H), 6.68 (d, $^3J_{6,7}$ = 8.4 Hz, $^4J_{6,4}$ = 2.6 Hz, 1H, 6-H), 6.38 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 5.25 (s, 1H, 1-H), 3.77 – 3.74 (m, 1H, 2'-H_a), 3.72 (s, 3H, 5a-H), 3.29 (m, 1H, 2'-H_b), 2.90 (s, 3H, 1a-H), 2.16 (ddd, $^2J_{1',1'}$ = 12.5 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 6.8 Hz, $^2J_{1',2'}$ = 4.2 Hz, 1H, 1'-H_a), 2.10 (s, 3H, 5'-H), 2.05 – 1.98 (m, 1H, 1-H_b), 1.40 (s, 3H, 3b-H).

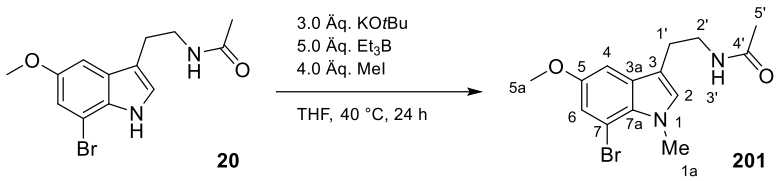
^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.2 (C-4'), 154.9 (C-5), 146.1 (C-7a), 137.0 (C-3a), 114.1 (C-6), 110.5 (C-4), 108.5 (C-7), 89.6 (C-2), 56.4 (C-5a), 52.7 (C-3), 48.8 (C-2'), 39.7 (C-1'), 35.4 (C-1a), 24.6 (C-3b), 22.6 (C-5').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2955 (m), 1646 (s), 1495 (s), 1405 (m), 1355 (m), 1279 (s), 1224 (m), 1197 (m), 1030 (w), 966 (w), 852 (w), 800 (w).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{15}H_{20}N_2O_2$+H^+: 261.1598 $[M+H]^+$; gef.: 261.1599.

---

201 7-Brom-1-methylmelatonin



Entsprechend Schneider[188] wurde 7-Brom-Melatonin (**171**) (240 mg, 0.78 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem THF (8 mL) unter Argon gelöst und Kalium-*tert*-butanolat (2.4 mL (1 M in THF), 2.4 mmol, 3.0 Äq.) zugetropft. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 30 min bei 23 °C gerührt, wobei sich eine rosa-farbene Suspension bildete. Danach wurde Triethylboran (3.9 mL (1 M in THF), 3.9 mmol, 5.0 Äq.) hinzugegeben, wodurch sich wieder eine klare Lösung bildete. Nachdem die Lösung für weitere 30 min bei 23 °C gerührt wurde, wurde Methyliodid (0.20 mL, 3.1 mmol, 4.0 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion für 24 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde wässrige, gesättigte NH_4Cl-Lösung (10 mL) und EE (10 mL) hinzugegeben. Das Gemisch wurde mit EE extrahiert (3 x 20 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 206 mg, 0.63 mmol, 81 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.03 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.2 Hz, 1H, 4-H), 6.96 (s, 1H, 2-H), 6.95 (d, $^4J_{6,4}$ = 2.2 Hz, 1H, 6-H), 4.04 (s, 3H, 1a-H), 3.81 (s, 3H, 5a-H), 3.41 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.84 (t, $^3J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 1.91 (s, 3H, 5'-H).

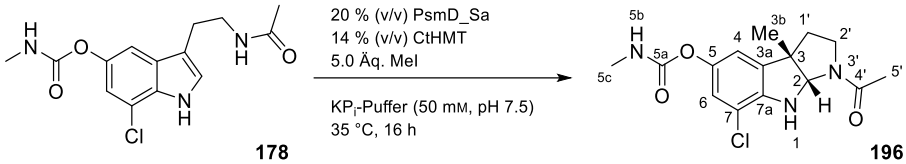
^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.3 (C-4'), 155.1 (C-5), 132.5 (C-7a), 132.0 (C-2), 130.4 (C-3a), 117.2, 112.6 (C-3), 104.6 (C-7), 101.3 (C-4), 56.4 (C-5a), 41.2 (C-2'), 36.7 (C-1a), 25.8 (C-1'), 22.6 (C-4').

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 1634 (s), 1571 (m), 1541 (m), 1488 (s), 1449 (m), 1408 (m), 1371 (s), 1288 (s), 1231 (m), 1069 (m), 1042 (w), 837 (w).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{14}H_{17}N_2O_2Br+H^+$: 325.0546 $[M+H]^+$; gef.: 325.0547.

---

196 (3a*S*,8a*S*)-1-Acetyl-7-chlor-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-5-yl-*N*-methylcarbamat



Chlorindolcarbamat **178** (40 mg, 0.13 mmol, 1.0 Äq.) wurde gelöst in DMSO (0.65 mL – 200 mM Stammlösung) und in eine Schraubdeckel-Flasche gegeben. Das CtHMT-Lysat (14 % v/v, 9.1 mL) und PsmD_Sa-Lysat (20 % v/v, 13 mL) (vorbereitet entsprechend Kapitel 7.2.6) wurden hinzugegeben und das Reaktionsvolumen mit KP_i-Puffer (50 mM, pH 7.5) auf das gewünschte Reaktionsvolumen (65 mL, finale Substratkonzentration von 2 mM) aufgefüllt. Anschließend wurde Methyliodid (65 µL einer 10 M Stammlösung in DMSO, 0.65 mmol, 5.0 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion für 16 h bei 35 °C und 300 rpm geschüttelt. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von gesättigter, wässriger $(NH_4)_2SO_3$–Lösung (30 mL) gestoppt und das Produkt mit EE extrahiert (3 x 65 mL). Die ausgefällten Proteintrümmer wurden durch Vakuumfiltration auf Celite von der Mischung getrennt. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/MeOH: 95/5) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 15.7 mg, 48 µmol, 38 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 6.86 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.1 Hz, 1H, 4-H), 6.83 (t, $^4J_{6,4}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 5.20 (s, 1H, 2-H), 3.71 (ddd, $^2J_{2',2'}$ = 10.3, $^3J_{2',1'}$ = 8.0, $^3J_{2',1'}$ = 2.0 Hz, 1H, 2'-H_a), 3.25 (dt, $^2J_{2',2'a}$ = 10.6, $^3J_{2',1'}$ = 5.3 Hz, 1H, 2'-H_b), 2.75 (s, 3H, 5c-H), 2.31 (ddd, $^2J_{1',1'}$ = 12.8, $^3J_{1',2'}$ = 6.5, $^3J_{1',2'}$ = 2.0 Hz, 1H, 1'-H_a), 2.16 – 2.11 (m, 1H, 1'-H_b), 2.03 (s, 3H, 5'-H), 1.40 (s, 3H, 3b-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 172.9 (C-4'), 158.1 (C-5a), 145.7 (C-5), 144.5 (C-7a), 137.0 (C-3a), 122.5 (C-6), 116.6 (C-4), 114.9 (C-7), 83.6 (C-2), 55.0 (C-3), 46.0 (C-2'), 38.0 (C-1'), 27.6 (C-5c), 24.4 (C-3b), 22.4 (C-5').

Signale des zweiten Rotamers:

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 6.86 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.1 Hz, 1H, 4-H), 6.83 (t, $^4J_{6,4}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 5.34 (s, 1H, 2-H), 3.89 (ddd, $^2J_{2',2'}$ = 11.2, $^3J_{2',1'}$ = 7.90, $^3J_{2',1'}$ = 2.5 Hz, 1H, 2'-H_a), 3.03 (dt, $^2J_{2',2'}$ = 11.2, $^3J_{2',1'}$ = 6.5 Hz, 1H, 2'-H_b), 2.75 (s, 3H, 5c-H), 2.31 (ddd, $^2J_{1',1'}$ = 12.8, $^3J_{1',2'}$ = 6.5, $^3J_{1',2'}$ = 2.0 Hz, 1H, 1'-H_a), 2.24 – 2.17 (m, 1H, 1'-H_b), 2.20 (s, 3H, 5'-H), 1.44 (s, 3H, 3b-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 172.5 (C-4'), 158.1 (C-5a), 145.8 (C-5), 144.5 (C-7a), 137.0 (C-3a), 122.5 (C-6), 116.5 (C-4), 115.0 (C-7), 84.2 (C-2), 57.4 (C-3), 48.5 (C-2'), 41.3 (C-1'), 27.6 (C-5c), 25.6 (C-3b), 22.0 (C-5').

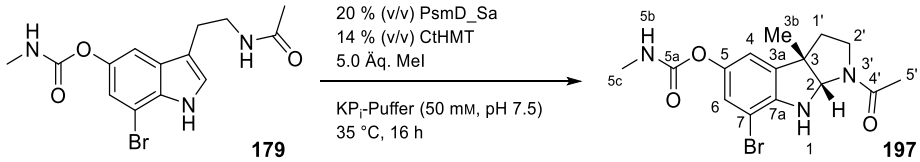
IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3310 (br), 2961 (w), 2938 (w), 2862 (w), 2475 (br), 1725 (vs), 1624 (vs), 1437 (vs), 1239 (m), 1192 (vs), 1118 (w), 1939 (w), 966 (w), 890 (w).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{15}H_{18}ClN_3O_3$+H: 324.1112 [M+H]$^+$; gef.: 324.1112.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -127 (c = 0.075, MeOH)

---

197 (3a*S*,8a*S*)-1-Acetyl-7-brom-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-5-yl-*N*-methylcarbamat



Bromoindolcarbamat **179** (110 mg, 0.31 mmol, 1.0 Äq.) wurde gelöst in DMSO (1.6 mL – 200 mM Stammlösung) und in eine Schraubdeckel-Flasche gegeben. Das CtHMT-*Resin* (entsprechend 14 Vol% des Zelllysats) und PsmD_Sa-*Resin* (entsprechend 20 Vol% des Zelllysats) (beide vorbereitet gemäß 7.2.6) wurden hinzugegeben und das Reaktionsvolumen mit KP_i-Puffer (50 mM, pH 7.5) auf das gewünschte Reaktionsvolumen (155 mL, finale Substratkonzentration von 2 mM) aufgefüllt. Anschließend wurde Methyliodid (160 µL einer 10 M Stammlösung in DMSO, 1.6 mmol, 5.0 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion für 16 h bei 35 °C und 300 rpm geschüttelt. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von gesättigter, wässriger $(NH_4)_2SO_3$–Lösung (70 mL) gestoppt. Das *Resin* wurde mittels Zentrifugation (3 000 rpm, 2 min) sedimentiert, der Überstand abgenommen und das Produkt mit EE extrahiert (3 x 160 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/MeOH: 95/5) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 16.1 mg, 43 µmol, 14 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 6.98 (d, $^4J_{6,4}$ = 2.1 Hz, 1H, 6-H), 6.91 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.1 Hz, 1H, 4-H), 5.20 (s, 1H, 2-H), 3.73 (ddd, $^2J_{1',1'}$ = 10.2 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 8.0, $^3J_{1',2'}$ = 2.0 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.26 (app. dd, $^2J_{1',1'}$ = 10.6, $^3J_{1',2'}$ = 6.5 Hz, 1H, 1'-H_b), 2.77 (s, 3H, 5c-H), 2.33 (ddd, $^2J_{2',2'}$ = 12.7, $^3J_{2',1'}$ = 6.4, $^3J_{2',1'}$ = 1.9 Hz, 1H, 2'-H_a), 2.16(ddd, $^2J_{2',2'}$ = 12.7, $^3J_{2',1'}$ = 10.6, $^3J_{2',1'}$ = 8.0 Hz, 1H, 2'-H_b), 2.05 (s, 3H, 5'-H), 1.42 (s, 3H, 3b-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.0 (C-4'), 158.1 (C-5a), 151.9 (C-5), 145.7 (C-7a), 136.7 (C-3a), 125.1 (C-6), 117.4 (C-4), 115.0 (C-7), 82.8 (C-2), 55.3 (C-3), 48.5 (C-2'), 38.0 (C-1'), 27.6 (C-5c), 24.4 (C-3b), 24.4 (C-5').

Es sind weitere Signale in den Spektren erkennbar, welche auf ein Rotamer zurückzuführen sind.

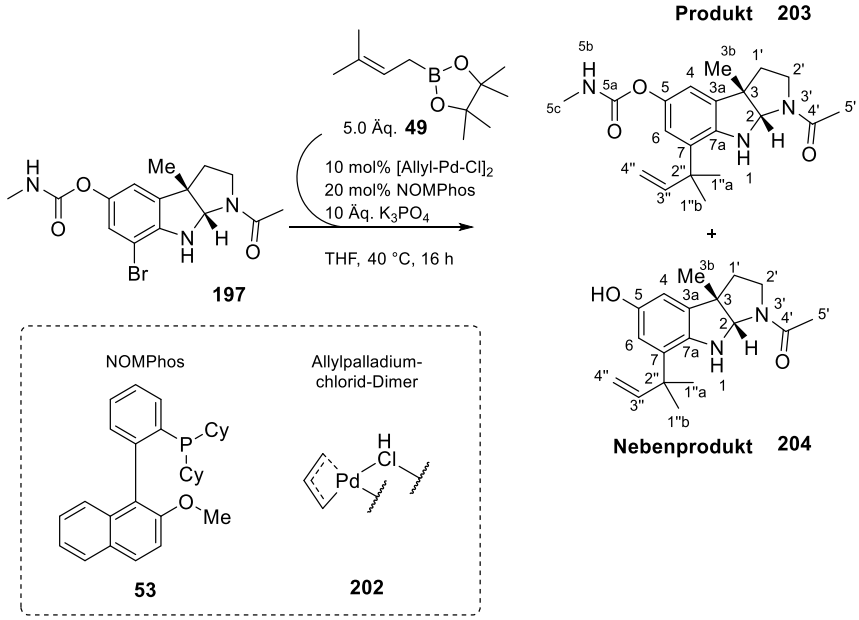
IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3307 (br), 2958 (w), 2924 (m), 2850 (w), 1721 (s), 1627 (vs), 1452 (vs), 1250 (m), 1183 (s), 1109 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{15}H_{18}BrN_3O_3$+H: 368.0604 [M+H]$^+$; gef.: 369.0606.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -57.5 (c = 0.087, MeOH).

7.3.3.7. 7-Prenylierung über Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung

203 (3a*S*,8a*S*)-1-Acetyl-3a-methyl-7-(2-methylbut-3-en-2-yl)-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-5-yl-*N*-methylcarbamat



Allylpalladiumchlorid (**202**) (0.40 mg, 1.1 µmol, 5.0 mol%), NOMPhos (**53**) (1.9 mg, 4.4 µmol, 20 mol%) und Kaliumcarbonat (29 mg, 0.21 mmol, 10 Äq.) wurden in einem wasserfreien Reaktionsgefäß unter Argon vorgelegt. 7-Brom-HHP **197** (8 mg, 21 µmol, 1.0 Äquiv.) und Prenylboronsäureester **49** (21 mg, 0.11 mmol, 5,0 Äquiv.) wurden beide in sauerstofffreiem THF (je 0.5 mL, *freeze-tump-thawed*) gelöst und hinzugegeben. Sauerstofffreies Wasser (0.5 mL, *freeze-pump-thawed*) wurde zugegeben und das Gemisch 16 h lang bei 40 °C gerührt. Nachdem die Reaktionslösung abgekühlt ist, wurde das Gemisch mit wässriger, gesättigter NaCl-Lösung (2 mL) und EE verdünnt (2 mL) und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE).

Ausbeute Produkt 187: 1.1 mg, 3.1 µmol, 14 %.

^{1}H-NMR (700 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 6.78 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.3 Hz, 1H, 4-H), 6.75 (d, $^4J_{6,4}$ = 2.3 Hz, 1H, 6-H), 5.84 (dd, $^3J_{3'',4''}$ = 17.5, $^3J_{3'',4''}$ =10.6 Hz, 1H, 7d-H), 5.03 (dd, $^3J_{4'',3''}$ = 10.6, $^3J_{4'',4''}$ = 1.3 Hz, 1H, 4''-H_b), 4.98 (s, 1H, 2-H), 4.96 (dd, $^3J_{4'',3''}$ = 17.5, $^3J_{4'',4''}$ = 1.3 Hz, 1H, 4''-H_a), 3.62 (m, 1H, 2'-H_a), 3.17 – 3.04 (m, 2H, 2'-H_b), 2.74 (s, 2H, 5c-H), 2.29 (m, 1H, 1'-H_a), 2.16 – 2.06 (m, 1H, 1'-H_b), 1.94 (s, 3H, 5'-H), 1.33 (s, 3H, 3b-H), 1.32 (s, 3H, 1''a-H), 1.30 (s, 1H, 1''b-H).

^{13}C-NMR (176 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 172.5 (C-4'), 158.7 (C-5a), 147.3 (C-3''), 145.9 (C-5), 145.3 (C-7a), 136.3 (C-3a), 130.5 (C-7), 119.7 (C-6), 115.8 (C-4), 112.9 (C-4''), 83.2 (C-2), 53.1

(C-3), 48.6 (C-2'), 41.4 (C-2''), 37.7 (C-1'), 28.3 (C-1''b), 27.6 (C-5c), 25.3 (C-1''a), 24.1 (C-3b), 22.2 (C-5').

Es sind weitere Signale in den Spektren erkennbar, welche auf ein Rotamer zurückzuführen sind.

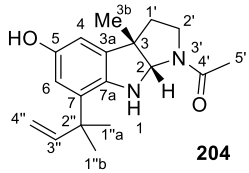
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3291 (br), 2920 (s), 2849 (w), 1727 (vs), 1636 (s), 1544 (m), 1446 (s), 1362 (s), 1222 (s), 1173 (m).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{20}H_{28}N_3O_3$+H: 358.2125 $[M+H]^+$; gef.: 358.2128.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = - 84.4 (c = 0.032, MeOH).

---

204 (3a*S*,8a*S*)-1-(5-Hydroxy-3a-methyl-7-(2-methylbut-3-en-2-yl)-3,3a,8,8a-tetrahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-1-yl)ethan-1-on



204

Bei der Prenylierung des Carbamats **197** über zuvor beschriebene Suzuki-Kreuzkupplung wurde neben dem erwarteten Reaktionsprodukt **203** auch das prenylierte 5-Phenol **204** als Nebenprodukt erhalten.

Ausbeute Nebenprodukt 188: 3.3 mg, 11 µmol, 51 %.

^{1}H-NMR (700 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 6.60 (d, $^4J_{6,4}$ = 2.4 Hz, 1H, 6-H), 6.53 (d, $^3J_{4,6}$ = 2.4 Hz, 1H, 4-H), 5.87 (dd, $^3J_{3'',4''}$ = 17.5, $^3J_{3'',4''}$ = 10.5 Hz, 1H, 3''-H), 5.03 (dd, $^3J_{4'',3''}$ = 10.5, $^2J_{4'',4''}$ = 1.4 Hz, 1H, 4''-H_b), 4.96 (s, 1H, 2-H), 4.95 (d, $^3J_{4'',3''}$ = 17.5 Hz, $^2J_{4'',4''}$ = 1.4 Hz, 1H, 4''-H_a), 3.65 (ddd, $^2J_{2',2'}$ = 9.5 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 8.1 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 1.2 Hz, 1H, 2'-H_a), 3.07 (ddd, $^2J_{2',2'}$ = 10.8 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 10.8 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 6.2 Hz, 1H, 2'-H_b), 2.28 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 12.6 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 6.2 Hz, 1H, 1'-H_a), 2.12 (ddd, $^2J_{1',1'}$ = 12.7 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 11.3, $^3J_{1',2'}$ = 8.1 Hz, 1H, 1'-H_b), 1.97 (s, 3H, 5'-H), 1.36 (s, 3H, 3b-H), 1.35 (s, 3H, 1''a-H), 1.33 (s, 3H, 1''b-H).

^{13}C-NMR (176 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 172.4 (C-4'), 152.4 (C-5), 147.7 (C-3''), 140.6 (C-7a), 136.7 (C-3a), 131.5 (C-7), 113.2 (C-6), 112.5 (C-4''), 108.9 (C-4), 83.3 (C-2), 53.2 (C-3), 48.6 (C-2'), 41.4 (C-2''), 37.7 (C-1'), 28.4 (C-1''a), 25.6 (C-1''b), 24.0 (C-3b), 22.2 (C-5').

Für einige Positionen wurden zusätzliche Rotamer-Signale gefunden:

^{13}C-NMR (176 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 148.4 (C-3''), 153.2 (C-5), 113.4 (C-6), 112.0 (C-4''), 108.7 (C-4), 84.1 (C-2), 55.9 (C-3), 41.6 (C-2''), 37.2 (C-1'), 27.1 (C-1''a), 26.5 (C-1''b).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3341 (br), 2962 (m), 2934 (m), 2863 (w), 1622 (vs), 1439 (vs), 1180 (m), 1074 (w), 864 (w).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{18}H_{24}N_2O_2$+H: 301.1911 $[M+H]^+$; gef.: 301.1913.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -210 (c =0.040, MeOH).

7.3.4. Synthesen des Lansai-B-Projekts

7.3.4.1. Synthese von Diketopiperazin-Substraten

270 (*S*)-7-Bromtryptophanmethylester



(*S*)-5-Bromtryptophan **268** (540 mg, 1.9 mmol, 1.0 Ä..) wurde in einen trockenen, sekurierten Reaktionskolben gegeben und in trockenem Methanol gelöst (25 mL). Nach vorsichtiger Zugabe von Thionylchlorid (0.38 mL, 5.3 mmol, 2.5 Äq.) wurde die Lösung 18 h bei 60 °C gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt ist, wurde das Gemisch mit EE (10 mL) und wässriger, gesättigter $NaHCO_3$-Lösung (10 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Reaktionsprodukt wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte in ausreichender Reinheit als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 564 mg, 1.9 mmol, quant.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.64 (d, $^4J_{4,6}$ = 1.9 Hz, 1H, 4-H), 7.26 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 7.17 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.6 Hz, $^4J_{6,4}$ = 1.9 Hz, 1H, 6-H), 7.12 (s, 1H, 2-H), 3.74 (t, $^3J_{2',1'}$ = 6.1 Hz, 1H, 2'-H), 3.65 (s, 3H, 3'-H_a), 3.15 – 3.06 (m, 2H, 1'-H_a, 1'-H_b).

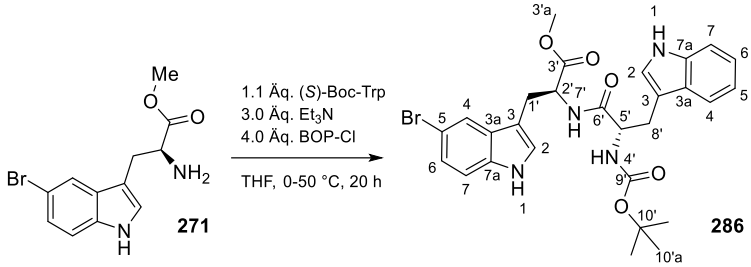
^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 175.2 (C-3'), 135.3 (C-7a), 129.2 (C-3a), 124.9 (C-2), 123.8 (C-6), 120.5 (C-4), 112.6 (C-7), 111.6 (C-5), 109.0 (C-3), 54.4 (C-2'), 51.1 (C-3'a), 29.7 (C-1').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3360 (w), 3295 (w), 2915 (m), 2850 (m), 1733 (vs), 1422 (s) 1334 (s), 1219 (s), 1199 (vs), 1180 (vs), 1111 (s), 1002 (vs), 866 (s), 793 (vs), 652 (s).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{12}H_{13}N_2O_2Br+H^+$: 297.0233 $[M+H]^+$; gef.: 297.0235.

Die ^{1}H- and ^{13}C-NMR Signale stimmen mit den publizierten Spektren überein.[273]

271 (*S*)-(*N-tert*-Butoxycarbonyl)-tryptophyl-(*S*)-5-bromtryptophanmethylester



(*S*)-5-Bromotryptophanmethylester (**271**) (564 mg, 1.90 mmol, 1.0 Äq.) und (*S*)-(*N*$_{\alpha}$-*tert*-Butoxycarbonyl)-tryptophan (636 mg, 2.1 mmol, 1.1 Äq.) wurden in einen Reaktionskolben gegeben und in trockenem THF (20 mL) gelöst. Die Reaktionslösung wurde bei 0 °C gerührt und Triethylamin (1.0 mL, 7.6 mmol, 4.0 Äq.) sowie Bis-(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinylchlorid (3.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h bei 23 °C gerührt. Anschließend wurde mit EE (20 mL) und wässriger, gesättigter NH_4Cl-Lösung (10 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (PE/EE: 2/1) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 942.3 mg, 1.61 mmol, 84 %.

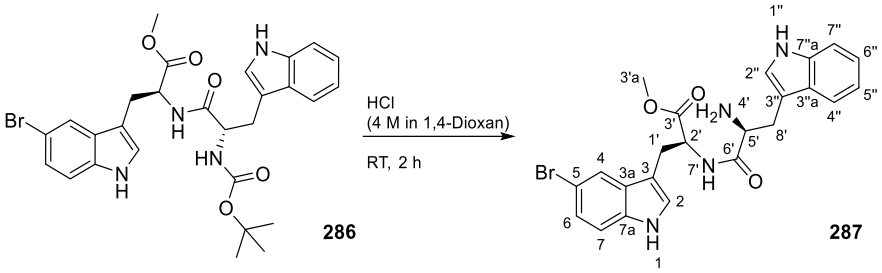
^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.57 (d, $^3J_{4'',5''}$ = 8.1 Hz, 1H, 4''-H), 7.55 (s, 1H, 4-H), 7.32 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 8.1 Hz, 1H, 7''-H), 7.24 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 7.17 (d, $^3J_{6,7}$ = 8.7 Hz, 2H, 6-H), 7.13 – 7.06 (m, 2H, 6''-H, 2''-H), 7.05 – 6.98 (m, 2H, 5''-H, 2-H), 4.66 (t, $^3J_{5',8'}$ = 6.2 Hz, 1H, 5'-H), 4.36 – 4.31 (m, 1H, 2'-H), 3.58 (s, 3H, 3'-H$_a$), 3.18 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.7 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 5.7 Hz, 1H, 8'-H$_a$), 3.11 (d, $^3J_{1',2'}$ = 6.4 Hz, 1H, 1'-H$_a$), 3.03 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.8 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 7.7 Hz, 1H, 8'-H$_b$), 1.34 (s, 9H, 10'a-H), 1.18 – 1.11 (m, 1H, 1'-H$_b$).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 174.5 (C-6'), 173.3 (C-3'), 157.5 (C-9'), 138.1 (C-7''a), 136.6 (C-7a), 130.5 (C-3a), 128.8 (C-3''a), 126.3 (C-2), 125.2 (C-6), 124.7 (C-2''), 122.4 (C-6''), 121.8 (C-4), 119.8 (C-5''), 119.4 (C-4''), 114.0 (C-7), 113.1 (C-5), 112.4 (C-3''), 112.3 (C-7''), 110.1 (C-3), 80.7 (C-10'), 56.8 (C-2'), 54.5 (C-5'), 52.7 (C-3'a), 29.1 (C-8'), 28.6 (C-10'a), 28.2 (C-1').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3321 (br), 2978 (w), 1704 (vs), 1664 (s), 1504 (s), 1457 (s), 1436 (s), 1364 (vs), 1222 (vs), 1164 (vs), 1099 (m), 743 (vs) 530 (vs).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{28}H_{32}N_4O_5Br+H^+$: 583.1551 $[M+H]^+$; gef.: 583.1555.

287 (*S*)-Tryptophyl-(*S*)-5-bromtryptophanmethylester



Das Dipeptid **286** (830 mg, 1.42 mmol, 1.0 Äq.) wurde in einem Reaktionskolben in THF (2 mL) gelöst und HCl (4 M in 1,4-Dioxan, 5 mL) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 2 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte in ausreichender Reinheit als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 646 mg, 1.4 mmol, quant.

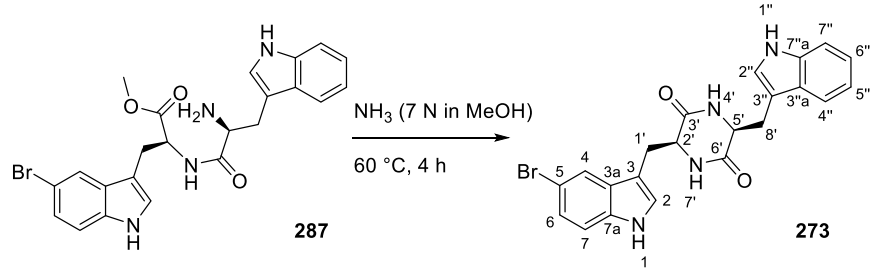
^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.66 (app. dd, *J* = 8.6, 1.4 Hz, 2H, 4-H, 4''-H), 7.38 (app. dd, $^3J_{7'',6''}$ = 8.1 Hz, $^4J_{7'',5''}$ = 0.9 Hz, 1H, 7''-H), 7.27 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 7.21 (s, 1H, 2''-H), 7.19 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.6 Hz, $^4J_{6,4}$ = 1.9 Hz, 1H, 6-H), 7.14 (dd, $^3J_{6'',7'''}$ = 8.1 Hz, $^3J_{6'',5''}$ = 7.0 Hz, $^4J_{6'',4''}$ = 1.1 Hz, 1H, 6''-H), 7.11 (s, 1H, 2-H), 7.05 (ddd, $^3J_{5'',4''}$ = 8.0 Hz, $^3J_{5'',6''}$ = 7.0 Hz, $^4J_{5'',7''}$ = 1.0 Hz, 1H, 5''-H), 4.75 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 7.5, 6.1 Hz, 1H, 2'-H), 4.14 (dd, $^3J_{5',8'}$ = 8.4, 5.9 Hz, 1H, 5'-H), 3.65 (s, 3H, 3'-H_a), 3.41 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 15.0 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 5.8 Hz, $^4J_{8',2''}$ = 1.0 Hz, 1H, 8'-H_a), 3.27 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.7 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 6.1 Hz, $^4J_{1',2}$ = 0.8 Hz 1H, 1'-H_a), 3.19 (app. td, *J* = 14.6, 8.0 Hz, 2H, 1'-H_b, 8'-H_a).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 173.1 (C-3'), 170.0 (C-6'), 138.3 (C-7''a), 136.7 (C-7a), 130.4 (C-3a), 128.3 (C-3''a), 126.2 (C-2), 125.8 (C-2''), 125.3 (C-6), 122.9 (C-6), 121.8 (C-4), 120.3 (C-5''), 119.1 (C-4''), 114.1 (C-7), 113.1 (C-5), 112.6 (C-7''), 110.3 (C-3), 107.8 (C3''), 55.0 (C-2'), 54.8 (C-5'), 52.8 (C-3'a), 28.8 (C-8'), 28.4 (C-1').

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3348 (br), 3204 (br), 2885 (br), 1724 (m), 1674 (s), 1458 (s), 1360 (m), 1232 (s), 1102 (s), 1034 (s), 882 (m), 799 (m), 743 (vs).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{23}H_{24}N_4O_3Br+H^+$: 483.1026 $[M+H]^+$; gef.: 483.1028.

273 (3*S*,6*S*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-6-((5-brom-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (5-Brom-cW$_S$W$_S$-DKP)



Das Amin **287** (640 mg, 1.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde in einem Reaktionskolben in einer Ammoniak-Lösung (7 N in Methanol, 8 mL) gelöst. Die Reaktion wurde für 4 h bei 60 °C gerührt

und anschließend das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/MeOH: 97/3) und das Produkt als weiß-gräulicher/weiß-gelblicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 601 mg, 1.3 mmol, 86 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.68 (d, $^4J_{4,6}$ = 1.9 Hz, 1H, 4-H), 7.44 (d, $^3J_{4'',5''}$ = 8.0 Hz, 1H, 4''-H), 7.32 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 8.2 Hz, 1H, 7''-H), 7.23 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 7.19 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.6 Hz, $^4J_{6,7}$ 1.8 Hz, 1H, 6-H), 7.11 (t, $^3J_{6'',5,7''}$ = 7.6 Hz, 1H, 6''-H), 7.03 (t, $^3J_{5'',4'',6''}$ = 7.5 Hz, 1H, 5''-H), 6.64 (s, 1H, 2''-H), 6.42 (s, 1H, 2-H), 4.08 (dd, $^3J_{5',8'}$ = 7.0, $^3J_{5',8'}$ = 4.0 Hz, 1H, 5'-H), 4.02 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 7.5, $^3J_{2',1'}$ = 3.9 Hz, 1H, 2'-H), 2.97 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 3.9 Hz, 1H, 8'-H_a), 2.84 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.5 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 4.0 Hz, 1H, 1'-H_a), 2.29 (dd, $^3J_{8',8'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 7.0 Hz, 1H, 8'-H_b), 2.03 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 12.6 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 6.3 Hz, 1H, 1'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 169.7 (C-3'/6'), 169.7 (C-6'/3'), 138.1 (C-7''a), 136.7 (C-7a), 130.4 (C-3a), 128.7 (C-3''a), 127.5 (C-2), 125.8 (C-2''), 125.3 (C-6), 122.6 (C-4), 122.2 (C-6''), 120.2 (C-5''), 119.7 (C-4''), 114.1 (C-7), 113.3 (C-5), 112.5 (C-7''), 109.6 (C-3''), 109.4 (C-3), 57.1 (C-5'), 56.6 (C-2'), 31.4 (C-8'), 31.3 (C-1').

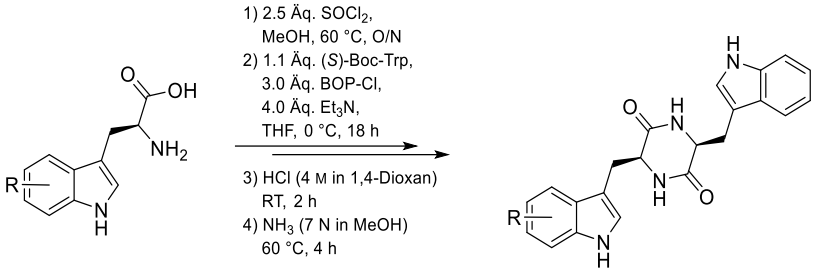
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3424 (w), 2181 (w), 2037 (w), 1661 (vs), 1456 (s), 1338 (m), 1092 (s), 867 (m), 799 (s), 743 (vs), 584 (s).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{22}H_{20}N_4O_2Br+H^+$: 451.0764 $[M+H]^+$; gef.: 451.0768.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -37 (c = 0.174, MeOH)

Schmelzpunkt: 277.1 °C.

Allgemeine Synthesevorschrift SV6



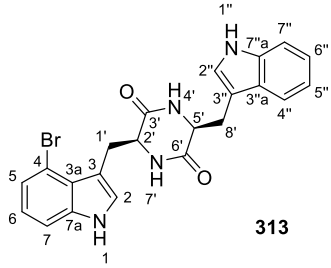
Schritt 1: Das jeweilige Tryptophan (1.0 Äq.) wurde in einen trockenen, sekurierten Reaktionskolben gegeben und in trockenem Methanol gelöst (10 mL/mmol Edukt). Nach vorsichtiger Zugabe von Thionylchlorid (2.5 Äq.) wurde die Lösung 18 h bei 60 °C gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt ist, wurde das Gemisch mit EE (10 mL/mmol Edukt) und wässriger, gesättigter $NaHCO_3$-Lösung (5 mL/mmol Edukt) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL/mmol Edukt). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt.

Schritt 2: Das Rohprodukt aus Schritt 1 (1.0 Äq.) und (*S*)-(*N-tert*-Butoxycarbonyl)-tryptophan (1.0 Äq.) wurde in einem Reaktionskolben gegeben und in trockenem THF (10 mL/mmol Edukt) gelöst. Die Reaktionslösung wurde bei 0 °C gerührt und Triethylamin (4.0 Äq.) sowie Bis-(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinylchlorid (3.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h bei 23 °C gerührt. Anschließend wurde mit EE (10 mL/mmol Edukt) und wässriger, gesättigter NH_4Cl-Lösung (5 mL/mmol Edukt) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL/mmol Edukt). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt.

Schritt 3: Das Rohprodukt aus Schritt 2 (1.0 Äq.) wurde in einem Reaktionskolben in THF (1 mL/mmol Edukt) gelöst und HCl (4 M in 1,4-Dioxan, 2mL/mmol Edukt) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 2 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt.

Schritt 4: Das Rohprodukt aus Schritt 3 (1.0 Äq.) wurde in einem Reaktionskolben in einer Ammoniak-Lösung (7 N in Methanol, 4 mL/mmol Edukt) gelöst. Die Reaktion wurde für 4 h bei 60 °C gerührt und anschließend das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/MeOH: 97/3) und das Produkt als weiß-gräulicher/weiß-gelblicher Feststoff erhalten.

313 (3*S*,6*S*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-6-((4-brom-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (4-Brom-cW$_S$W$_S$-DKP)



Die Verbindung wurde entsprechend der Synthesevorschrift SV6 hergestellt. Für den ersten Schritt wurde (*S*)-4-Bromtryptophan **297** (0.2 g, 0.71 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Während die Hälfte des erhaltenen Rohprodukts für den zweiten Schritt eingesetzt wurde, wurde für den dritten und vierten Schritt das gesamte Rohprodukt jeweils weiterverwendet.

Gesamt-Ausbeute: 0.17 mmol, 77.5 mg, 49 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD$_3$OD): δ [ppm] = 7.70 (d, $^3J_{4'',5''}$ = 7.9 Hz, 1H, 4''-H), 7.38 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 8.1 Hz, 1H, 7''-H), 7.21-7.17 (m, 1H, 6''-H), 7.13 (d, $^3J_{5'',4''/5'',6''}$ = 7.4 Hz, 1H, 5''-H), 7.15 (s, 1H, 2''-H), 7.06 (d, $^3J_{5,6}$ = 7.5 Hz, 1H, 5-H), 6.84 (t, $^3J_{6,7}$ = 7.8 Hz, 1H, 6-H), 5.34 (s, 1H, 2-H), 4.27-4.24 (m, 1H, 5'-H), 4.08-4.04 (m, 1H, 2'-H), 3.47 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.8 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 3.5 Hz, 1H, 8'-H$_a$), 3.29 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 13.1 Hz, $^3J_{1',2'}$= 3.7 Hz, 1H, 1'-H$_a$), 3.06 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.8 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 4.6 Hz, 1H, 8'-H$_b$), 0.83 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 13.9 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 11.0 Hz, 1H, 1'-H$_b$).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD$_3$OD): δ [ppm] = 169.8 (C-3'), 169.6 (C-6'), 139.6 (C-7a), 137.9 (C-7''a), 129.4 (C-3''a), 128.5 (C-2), 126.4 (C-2''), 126.1 (C-3a), 124. 0 (C-5), 123.1 (C-6), 120.4 (C-4''), 120.3 (C-5''), 114.2 (C-4), 112.7 (C-7''), 111.8 (C-7), 109.7 (C-3), 109.5 (C-3''), 57.2 (C-5'), 57.1 (C-2'), 32.5 (C-1'), 30.7 (C-8').

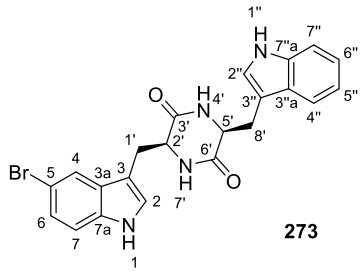
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{22}H_{19}N_4O_2Br+H^+$: 451.0764 $[M+H]^+$; gefunden: 451.0761.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3330 (w), 2929 (m), 1668 (s), 1457 (s), 1334 (s) 1087 (s), 765 (s), 741 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -122.4 (c = 0.37, MeOH).

Schmelzpunkt: 284 °C.

273 (3*S*,6*S*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-6-((5-brom-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (5-Brom-cW$_S$W$_S$-DKP)



Die Verbindung wurde entsprechend der Synthesevorschrift SV6 hergestellt. Für den ersten Schritt wurde (*S*)-5-Bromtryptophan **268** (0.20 g, 0.71 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Während die Hälfte des erhaltenen Rohprodukts für den zweiten Schritt eingesetzt wurde, wurde für den dritten und vierten Schritt das gesamte Rohprodukt jeweils weiterverwendet.

Gesamt-Ausbeute: 127 mg, 0.28 mmol, 69 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD$_3$OD): δ [ppm] = 7.68 (d, $^4J_{4,6}$ = 1.9 Hz, 1H, 4-H), 7.44 (d, $^3J_{4'',5''}$ = 8.0 Hz, 1H, 4''-H), 7.32 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 8.2 Hz, 1H, 7''-H), 7.23 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 7.19 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.6 Hz, $^4J_{6,7}$ 1.8 Hz, 1H, 6-H), 7.11 (t, $^3J_{6'',5,7''}$ = 7.6 Hz, 1H, 6''-H), 7.03 (t, $^3J_{5'',4'',6''}$ = 7.5 Hz, 1H, 5''-H),

6.64 (s, 1H, 2''-H), 6.42 (s, 1H, 2-H), 4.08 (dd, $^3J_{5',8'}$ = 7.0, $^3J_{5',8'}$ = 4.0 Hz, 1H, 5'-H), 4.02 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 7.5, $^3J_{2',1'}$ = 3.9 Hz, 1H, 2'-H), 2.97 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 3.9 Hz, 1H, 8'-H_a), 2.84 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.5 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 4.0 Hz, 1H, 1'-H_a), 2.29 (dd, $^3J_{8',8'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 7.0 Hz, 1H, 8'-H_b), 2.03 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 12.6 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 6.3 Hz, 1H, 1'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 169.7 (C-3'/6'), 169.7 (C-6'/3'), 138.1 (C-7''a), 136.7 (C-7a), 130.4 (C-3a), 128.7 (C-3''a), 127.5 (C-2), 125.8 (C-2''), 125.3 (C-6), 122.6 (C-4), 122.2 (C-6''), 120.2 (C-5''), 119.7 (C-4''), 114.1 (C-7), 113.3 (C-5), 112.5 (C-7''), 109.6 (C-3''), 109.4 (C-3), 57.1 (C-5'), 56.6 (C-2'), 31.4 (C-8'), 31.3 (C-1').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{22}H_{19}N_4O_2Br+H^+$: 451.0764 $[M+H]^+$; gefunden: 451.0768.

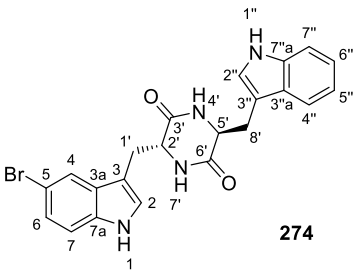
IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3424 (w), 2181 (w), 2037 (w), 1661 (vs), 1456 (s), 1338 (m), 1092 (s), 867 (m), 799 (s), 743 (vs), 584 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -37 (c = 0.174, MeOH).

Schmelzpunkt: 277 °C.

---

274 (3*S*,6*R*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-6-((5-brom-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (5-Brom-cW$_R$W$_S$-DKP)



Die Verbindung wurde entsprechend der Synthesevorschrift SV6 hergestellt. Für den ersten Schritt wurde das kommerziell-erhältliche racemische 5-Bromtryptophan ***rac*-268** (1.0 g, 3.5 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt. Das nach Schritt 4 erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch von Verunreinigungen befreit, wobei das (*S,S*)- und (*R,S*)-Diastereomer isoliert erhalten wurden. Die gemessenen Spektren des (*S,S*)-Diastereomers stimmen mit den zuvor beschriebenen Daten überein.

Gesamt-Ausbeute: 917 mg, 2.0 mmol, 27 % (des dargestellten Diastereomers).

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.59 (d, 4J4,6 = 1.9 Hz, 1H, 4-H), 7.43 (d, 3J4,5 = 8.0 Hz, 1H, 4''-H), 7.28 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 8.1 Hz, 1H, 7''-H), 7.18 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 7.10 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.6 Hz, $^4J_{6,4}$ = 1.9 Hz, 1H, 6-H), 7.02 (t, $^3J_{6'',5'',4''}$ = 7.5 Hz, 1H, 6''-H), 6.92 (m, 3H, 2-H, 2''-H, 5''-H), 3.49 (t, $^3J_{2',1'}$ = 4.5 Hz, 1H, 2'-H), 3.30 (d, $^3J_{5',8'}$ = 4.6 Hz, 1H, 5'-H), 3.19 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.8 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 4.6 Hz, 1H, 8'-Ha), 3.10 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.9 Hz, $^2J_{1',2'}$ = 4.7 Hz, 1H, 1'-Ha), 2.98 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.8 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 4.4 Hz, 1H, 8'-Hb), 2.88 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.9 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 4.4 Hz, 1H, 1'-Hb).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 170.7 (C-6'), 170.4 (C-3'), 137.9 (C-7''a), 136.4 (C-7a), 130.6 (C-3a), 128.8 (C-3''a), 127.0 (C-2), 125.7 (C2''), 125.3 (C-6), 122.5 (C-6''), 122.3 (C-4), 120.1 (C-5''), 119.7 (C-4''), 113.8 (C-7), 113.3 (C-5), 112.2 (C-7''), 109.1 (C-3), 109.1 (C-3''), 56.6 (C2'), 56.1 (C-5'), 30.3 (C-8'), 29.7 (C-1').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{22}H_{19}N_4O_2Br+H^+$: 451.0764 $[M+H]^+$; gefunden: 451.0768.

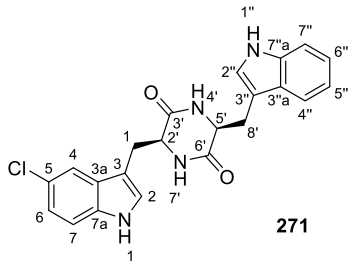
IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3241 (br), 2908 (br), 1663 (s), 1433 (m), 1315 (m), 1080 (m), 890 (m), 742 (vs), 602 (m).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -5 (c = 0.228, MeOH).

Schmelzpunkt: 178 °C.

---

271 (3*S*,6*S*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-6-((5-chlor-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (5-Chlor-cW$_S$W$_S$-DKP)



Die Verbindung wurde entsprechend der Synthesevorschrift SV6 hergestellt. Für den ersten Schritt wurde das kommerziell-erhältliche racemische 5-Chlortryptophan ***rac*-267** (840 mg, 3.5 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt. Das nach Schritt 4 erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch von Verunreinigungen befreit, wobei das (*S,S*)- und (*S,R*)-Diastereomer isoliert erhalten wurden.

Gesamt-Ausbeute: 432.4 mg, 1.1 mmol, 30 % (des dargestellten Diastereomers).

^{1}H-NMR (600 MHz, CD$_3$OD): δ [ppm] = 7.52 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.0 Hz, 1H, 4-H), 7.44 (dd, $^3J_{4'',5''}$ = 8.0 Hz, $^4J_{4'',6''}$ 1.0 Hz, 1H), 7.32 (dd, $^3J_{7'',6''}$ = 8.2 Hz, $^4J_{7'',5''}$ = 0.9 Hz, 1H, 7''-H), 7.27 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 7.11 (ddd, $^3J_{6'',7''}$ = 8.1 Hz, $^3J_{6'',5''}$ = 7.1 Hz, $^4J_{6'',4''}$ = 1.2 Hz, 1H, 6''-H), 7.06 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.6 Hz, $^4J_{6,4}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 7.03 (ddd, $^3J_{5'',4''}$ = 7.9 Hz, $^3J_{5'',6''}$ = 7.0 Hz, $^4J_{5'',7''}$ = 1.0 Hz, 1H, 5''-H), 6.63 (s, 1H, 2''-H), 6.45 (s, 1H, 2-H), 4.08 (ddd, $^3J_{2',1'}$ = 7.1, $^3J_{2',1'}$ = 3.9, $^3J_{2',NH}$ = 1.1 Hz, 1H, 2'-H), 4.03 (ddd, $^3J_{5',8'}$ = 7.4 Hz, $^3J_{5',8'}$ = 4.0 Hz, $^3J_{5',NH}$ = 1.1 Hz, 1H, 5'-H), 2.96 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.5, $^3J_{1',2'}$ = 3.9 Hz, 1H, 1'-H$_a$), 2.85 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.5 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 3.9 Hz, 1H, 8'-H$_a$), 2.28 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 7.0 Hz, 1H, 1'-H$_a$), 2.07 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.5 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 7.3 Hz, 1H, 8'-H$_b$).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD$_3$OD.): δ [ppm] = 169.7 (C-3'/6'), 169.7 (C-6'/3'), 138.1 (C-7''a), 136.4 (C-7a), 129.7(C-3a), 128.7 (C-3''a), 127.6 (C-2), 125.9 (C-5), 125.8 (C-2''), 122.7 (C-6/6''), 122.6 (C-6''/6), 120.2 (C-5''), 119.7 (C-4''), 119.1 (C-4), 113.6 (C-7), 112.5 (C-7''), 109.6 (C-3), 109.5 (C-3''), 57.0 (C-2'), 56.6 (C-5'), 31.4 (C-1'), 31.3 (C-8').

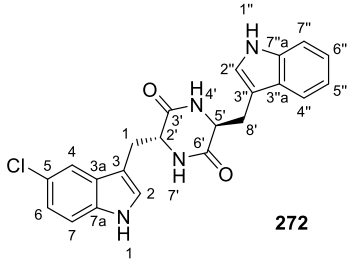
HRMS (ESI): *m/z* ber. for $C_{22}H_{19}ClN_4O_2$+H$^+$: 407.1269 [M+H]$^+$; gefunden: 407.1259.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3340 (br), 2930 (m), 1667 (vs), 1453 (s), 1330 (s), 1080 (m), 741 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -79 (c = 0.192, MeOH).

Schmelzpunkt: 207 °C.

272 (3*S*,6*R*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-6-((5-chlor-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (5-Chlor-cW$_R$W$_S$-DKP)



Die Verbindung wurde entsprechend der Synthesevorschrift SV6 hergestellt. Für den ersten Schritt wurde das kommerziell-erhältliche racemische 5-Chlortryptophan ***rac*-267** (840 mg, 3.5 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt. Das nach Schritt 4 erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch von Verunreinigungen befreit, wobei das (*S,S*)- und (*R,S*)-Diastereomer isoliert erhalten wurden.

Gesamt-Ausbeute: 461 mg, 1.2 mmol, 32 % (des dargestellten Diastereomers).

^{1}H-NMR (600 MHz, CD$_3$OD): δ [ppm] = 7.49 – 7.46 (m, 2H, 4-H, 5''-H), 7.31 (dd, $^3J_{7'',6''}$ = 8.2 Hz, $^4J_{7'',5''}$ = 0.9 Hz, 1H, 7''-H), 7.26 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 7.09 – 7.03 (m, 1H, 6''-H), 7.02 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.6 Hz, $^4J_{6,4}$ = 2.1 Hz, 1H, 6-H), 6.98 – 6.94 (m, 3H, 2-H, 2''-H, 4''-H), 3.54 – 3.50 (m, 1H, 2'-H), 3.41 – 3.33 (m, 1H, 5'-H), 3.23 (dd, $^2J_{1',1''}$ = 14.8 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 4.5 Hz, 1H, 1'-H$_a$), 3.15 (dd, $^2J_{8',8''}$ = 14.9 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 4.6 Hz, 1H, 8'-H$_a$), 3.01 (dd, $^2J_{1',1''}$ = 14.8 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 4.4 Hz, 1H, 1'-H$_b$), 2.92 (dd, $^2J_{8',8''}$ = 14.9 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 4.4 Hz, 1H, 8'-H$_b$).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD$_3$OD): δ [ppm] = 170.7 (C-6'), 170.5 (C-3'), 137.9 (C-7''a), 136.2 (C-7a), 129.9 (C-3a), 128.8 (C-3''a), 127.2 (C-2''), 125.8 (C-5), 125.7 (C-2), 122.7 (C-6), 122.5 (C-6''), 120.1 (C-5''), 119.7 (C-4''), 119.2 (C-4), 113.3 (C-7), 112.2 (C-7''), 109.2 (C-3''), 109.1 (C-3), 56.5 (C-2'), 56.2 (C-5'), 30.3 (C-1'), 29.7 (C-8').

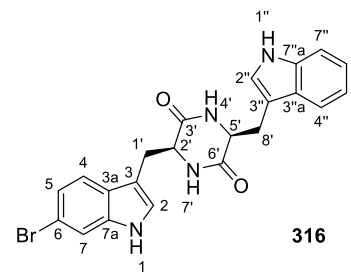
HRMS (ESI): *m/z* ber. for $C_{22}H_{19}ClN_4O_2$+H$^+$: 407.1269 [M+H]$^+$; gefunden: 407.1259.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3420 (w), 3346 (br), 2924 (w), 1669 (vs), 1456 (s), 1315 (m), 1093 (w), 746 (m).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -5 (c = 0.415, MeOH).

Schmelzpunkt: 169 °C.

316 (3*S*,6*S*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-6-((6-brom-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (6-Brom-cW$_S$W$_S$-DKP)



Die Verbindung wurde entsprechend der Synthesevorschrift SV6 hergestellt. Für den ersten Schritt wurde (*S*)-6-Bromtryptophan **298** (0.20 g, 0.71 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Während die Hälfte des erhaltenen Rohprodukts für den zweiten Schritt eingesetzt wurde, wurde für den dritten und vierten Schritt das gesamte Rohprodukt jeweils weiterverwendet.

Gesamt-Ausbeute: 91 mg, 0.20 mmol, 40 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.47 (d, $^4J_{7,5}$ = 1.7 Hz, 1H, 7-H), 7.45 (d, $^3J_{4'',5''}$ = 8.0 Hz, 1H, 4''-H), 7.33 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 8.3 Hz, 1H, 7''-H), 7.29 (d, $^3J_{4,5}$ = 8.5 Hz, 1H, 4-H), 7.13-7.10 (m, 1H, 6''-H), 7.11-7.09 (m, 1H, 5-H), 7.01 (ddd, $^3J_{5'',4''/5'',6''}$ = 8.0 Hz, 7.0 Hz, $^4J_{5'',7''}$ = 1.0 Hz, 1H, 5''-H), 6.65 (s, 1H, 2''-H), 6.42 (s, 1H, 2-H), 4.10-4.06 (m, 1H, 4'-H), 4.04-3.98 (m, 1H, 2'-H), 2.96 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 3.9 Hz, 1H, 8'-H_a), 2.87 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 3.9 Hz, 1H, 1'-H_a), 2.33 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.5 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 6.8 Hz, 1H, 8'-H_b), 2.02 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 7.6 Hz, 1H, 1'-H_a).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 169.6 (C-3'), 169.6 (C-6'), 138.9 (C-7a), 138.1 (C-7''a), 128.7 (C-3''a), 127.6 (C-3a), 126.7 (C-2), 125.8 (C-2''), 123.2 (C-5), 122.6 (C-6''), 121.2 (C-4), 120.2 (C-5''), 119.8 (C-4''), 115.9 (C-6), 115.2 (C-7), 110.0 (C-3), 109.5 (C-3''), 57.0 (C-2'), 56.8 (C-5'), 31.35 (C-8'), 31.3 (C-1').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{22}H_{19}N_4O_2Br+H^+$: 451.0764 $[M+H]^+$; gefunden: 451.0765.

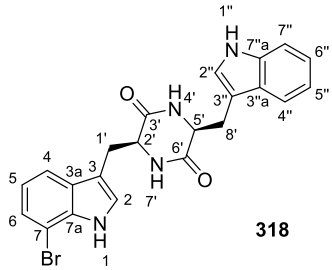
IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3318 (w), 2914 (m), 1738 (m), 1671 (s), 1461 (s), 1319 (m), 1236 (m), 1087 (m), 795 (s), 742 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -122.5 (c = 0.28, MeOH).

Schmelzpunkt: 281 °C.

---

318 (3*S*,6*S*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-6-((7-brom-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (7-Brom-cW$_S$W$_S$-DKP)



Die Verbindung wurde entsprechend der Synthesevorschrift SV6 hergestellt. Für den ersten Schritt wurde (*S*)-7-Bromtryptophan **107** (0.20 g, 0.71 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Während die Hälfte des erhaltenen Rohprodukts für den zweiten Schritt eingesetzt wurde, wurde für den dritten und vierten Schritt das gesamte Rohprodukt jeweils weiterverwendet.

Gesamt-Ausbeute: 84 mg, 0.19 mmol, 52 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.49 (d, $^3J_{4'',5''}$ = 8.0, 1H, 4''-H), 7.39 – 7.34 (m, 1H, 6-H), 7.35 – 7.30 (m, 1H, 7''-H), 7.27 – 7.22 (m, 1H, 4-H), 7.12 (dd, $^3J_{6'',5''}$ = 8.2 Hz, $^3J_{6'',7''}$ = 7.0 Hz, 1H, 6''-H), 7.04 (dd, $^3J_{5'',6''}$ = 8.0 Hz, $^3J_{5'',4''}$ = 7.0 Hz, 1H, 5''-H), 6.90 (dd, $^3J_{5,4}$ = 7.8 Hz $^3J_{5,6}$ = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 6.65 (s, 1H, 2''-H), 6.43 (s, 1H, 2-H), 4.13 – 4.08 (m, 1H, 5'-H), 3.98 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 8.0 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 3.7, 1H, 2'-H), 2.96 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.5 Hz, $^2J_{8',5'}$ = 4.1 Hz, 1H, 8-H_a), 2.91 – 2.79 (m, 1H, 1'-H_a), 2.44 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.5, $^2J_{8',5'}$ = 6.5 Hz, 1H, 8'-H_b), 1.90 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 8.0 Hz, 1H, 1'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 169.6 (C-3), 169.6 (C-6), 138.0 (C-7''a), 136.4 (C-7a), 130.1 (C-3a), 128.7 (C-3''a), 126.9 (C-2), 125.8 (C-2''), 125.1 (C-4), 122.6 (C-6''), 121.3 (C-5), 120.2 (C-5''), 119.8 (C-4''), 119.1 (C-6), 112.5 (C-7''), 111.0 (C-3), 109.5 (C-3''), 105.6 (C-7), 56.9 (C-5'), 56.8 (C-2'), 31.5 (C-1'), 31.3 (C-8').

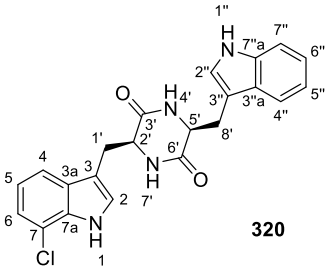
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{22}H_{19}N_4O_2Br+H^+$: 451.0764 $[M+H]^+$; gefunden: 451.0763.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3333 (br), 2922 (m), 1663 (vs), 1461 (m), 1326 (m), 1087 (w), 780 (m), 727 (m).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -30.5 (c = 0.086, MeOH).

Schmelzpunkt: 273 °C.

320 (3*S*,6*S*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-6-((7-chlor-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (7-Chlor-cW$_S$W$_S$-DKP)



320

Die Verbindung wurde entsprechend der Synthesevorschrift SV6 hergestellt. Für den ersten Schritt wurde (*S*)-7-Chlortryptophan **82** (0.20 g, 0.71 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Während die Hälfte des erhaltenen Rohprodukts für den zweiten Schritt eingesetzt wurde, wurde für den dritten und vierten Schritt das gesamte Rohprodukt jeweils weiterverwendet.

Gesamt-Ausbeute: 54 mg, 0.13 mmol, 32 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD$_3$OD): δ [ppm] = 7.49 (d, $^3J_{4'',5''}$ = 7.9 Hz, 1H, 4''-H), 7.33 (d, $^3J_{7'',6''/4,5}$ = 8.0 Hz, 2H, 7''-H, 4-H), 7.12 (ddd, $^3J_{6'',7''}$ = 8.2, $^3J_{6'',5''}$ = 7.0, $^2J_{6'',4''}$ = 1.1 Hz, 1H, 6''-H), 7.09 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.5 Hz, 1H, 6-H), 7.06 – 7.02 (m, 1H, 5-H), 6.95 (dd, $^3J_{5,4}$ = 7.8 Hz, $^3J_{5,6}$ =7.8 Hz, 1H, 5-H), 6.66 (s, 1H, 2''-H), 6.41 (s, 1H, 2-H), 4.11 – 4.09 (m, 1H, 5'-H), 4.02 – 3.95 (m, 1H, 2'-H), 2.96 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.5 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 4.1 Hz, 1H, 8'-H$_a$), 2.87 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 3.8 Hz, 1H, 1'-H$_a$), 2.45 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.5, $^3J_{8',5'}$ = 6.5 Hz, 1H, 8'-H$_b$), 1.90 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 7.9 Hz, 1H, 1'-H$_b$).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD$_3$OD): δ [ppm] = 169.6 (C-3), 169.6 (C-6), 138.0 (C-7''a), 135.0 (C-7a), 130.4 (C-3a), 128.7 (C-3''a), 126.9 (C-2), 125.8 (C-2''), 122.6 (C-6''), 121.9 (C-6), 120.9 (C-5), 120.2 (C-5''), 119.8 (C-4''), 118.5 (C-4), 117.8 (C-7), 112.5 (C-7''), 110.9 (C-3), 109.5 (C-3''), 56.9 (C-5'), 56.8 (C-2'), 31.5 (C-8'), 31.3 (C-1').

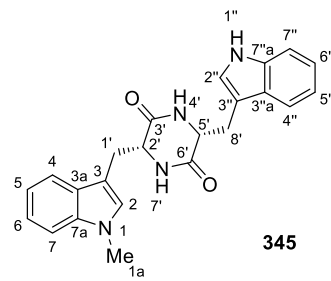
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{22}H_{19}N_4O_2Cl+H^+$: 407.1269 [M+H]$^+$; gefunden: 407.1273.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 2924 (w), 2448 (w), 2366 (w), 1658 (vs), 1455(m), 1435 (m), 1333 (m), 743 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -107 (c = 0.14, MeOH).

Schmelzpunkt: 183 °C.

345 (3*R*,6*R*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-6-((1-methyl-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (*N*-Methyl-cW$_R$W$_R$-DKP)



345

Die Verbindung wurde entsprechend der Synthesevorschrift SV6 hergestellt. Für den ersten Schritt wurde das kommerziell-erhältliche (*R*)-*N*-Methyltryptophan (0.60 g, 2.75 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Das gesamte Rohprodukt wurde für alle folgenden Schritte weiterverwendet. Das nach Schritt 4 erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch von Verunreinigungen befreit, wobei neben dem Produkt ein ein doppelt-methyliertes Nebenprodukt isoliert wurde.

Gesamt-Ausbeute des monomethylierten Produkts**:** 208 mg, 0.54 mmol, 19 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 10.86 (s, 1H, 1‘‘-H), 7.79 (d, $^3J_{7',2'}$ = 2.7 Hz, 1H, 7‘-H), 7.66 (d, $^3J_{4',5'}$ = 2.7 Hz, 1H, 4‘-H), 7.39 (d, $^3J_{4'',5''}$ = 7.9 Hz, 1H, 4‘‘-H), 7.31 (m, 3H, 4-H, 7-H, 7‘‘-H), 7.10 (t, ^3J = 7.7 Hz, 1H, 6-H/6‘‘-H), 7.07 (t, ^3J = 7.5 Hz, 1H, 6-H/6‘‘-H), 6.98 (app. q, J = 6.9 Hz, 2H, 5-H/5‘‘-H), 6.71 (d, $^3J_{2'',1''}$ = 2.3 Hz, 1H, 2‘‘-H), 6.41 (s, 1H, 2-H), 3.90 (d, $^3J_{5',8'}$ = 6.3 Hz, 1H, 5‘-H), 3.83 (dt, $^3J_{2',1'}$ = 7.1, 3.3 Hz, 1H, 2‘-H), 3.64 (s, 3H, 1a-H), 2.73 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 4.3 Hz, 1H, 8’-H_a), 2.67 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.3, $^3J_{1',2'}$ = 4.2 Hz, 1H, 1’-H_a), 2.35 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.3, $^3J_{8',5'}$ = 6.1 Hz, 1H, 8’-H_b), 2.02 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.3, $^3J_{1',2'}$ = 7.2 Hz, 1H, 1‘-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 166.7 (C-3’/6’), 166.7 (C-3’/6’), 136.5 (C-7a), 136.0 (C-7’’a), 128.7 (C-2), 127.6 (C-3a), 127.5 (C-3’’a), 124.4 (C-2’’), 120.9 (C-6/6’’), 120.8 (C-6/6’’), 118.7 (C-4), 118.7 (C-4’’), 118.5 (C-5/5’’), 118.4 (C-5/5’’), 111.3 (C-7’’), 109.4 (C-7), 108.8 (C-3), 108.1 (C-3’’), 55.3 (C-5’), 55.2 (C-2’), 32.2 (C-1a), 29.9 (C-8’), 29.8 (C-1’).

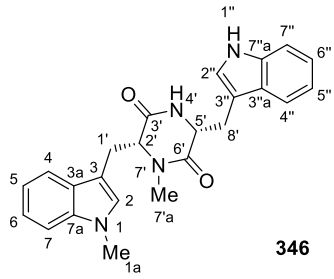
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{23}H_{22}N_4O_2$+H$^+$: 387.1816 [M+H]$^+$; gefunden: 387.1815.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3239 (br), 2973 (w), 2926 (w), 1738 (s), 1670 (vs), 1451 (m), 1362 (m), 1216 (m), 742 (m).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +96.2 (c = 0.026, MeOH).

---

346 (3*R*,6*R*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-1-methyl-6-((1-methyl-1*H*-Indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (*N,N’*-Dimethyl-cW_RW_R-DKP)



346

Die Verbindung wurde aus der Reaktion von DKP **345** als Nebenprodukt isoliert.

Gesamt-Ausbeute des dimethylierten Produkts**:** 40 mg, 0.10 mmol, 4%.

^{1}H-NMR (600 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 10.79 (s, 1H, 1‘‘-H), 7.68 (d, $^3J_{4',5'}$ = 3.1 Hz, 1H, 5‘-H), 7.45 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.35 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.2 Hz, 1H, 7-H), 7.28 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 8.1 Hz, 1H, 7‘‘-H), 7.22 (d, $^3J_{4'',5''}$ = 7.9 Hz, 1H, 4‘‘-H), 7.15 (t, $^3J_{6,5,4}$ = 7.6 Hz, 1H, 6-H), 7.05 (app. q, J = 7.0 Hz, 2H, 5-H, 6‘‘-H), 6.94 (t, $^3J_{5'',4'',6''}$ = 7.5 Hz, 1H, 4‘‘-H), 6.70 (s, 1H, 2-H), 6.31 (d, $^3J_{2'',1''}$ = 2.4 Hz, 1H, 2‘‘-H), 4.06 (t, $^3J_{2',1'}$ = 4.9 Hz, 1H, 2‘-H), 3.82 (td, $^3J_{5',8'}$ = 7.3, $^3J_{5',4'}$ = 3.3 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H, 1a-H), 2.91 – 2.83 (m, 1H, 1’-H_a), 2.78 (s, 3H, 7’a-H), 2.63 (app. ddd, J = 17.9, 14.6, 4.4 Hz, 2H, 1’-H_b, 8’-H_a), 1.59 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 14.2, $^3J_{8',5'}$ = 7.8 Hz, 1H, 8-H_b).

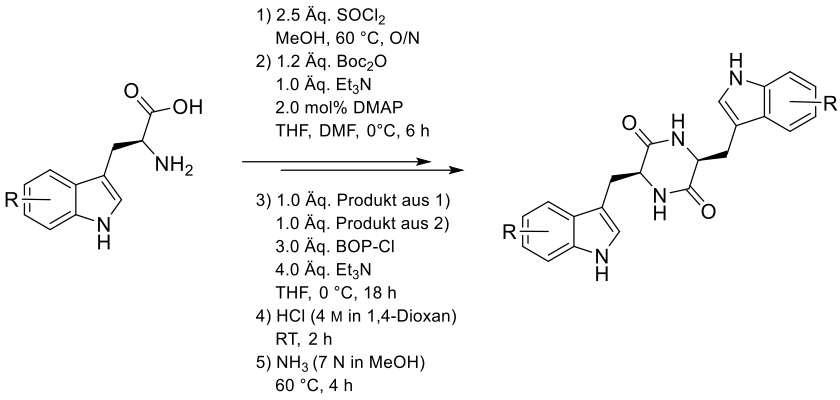
^{13}C-NMR (151 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 166.7 (C-3‘), 166.3 (C-6‘), 136.5 (C-7a), 136.2 (C-7’’a), 128.8 (C-2), 127.8 (C-3a), 127.1 (C-3’’a), 124.2 (C-2’’), 121.2 (C-6), 120.8 (C-6’’), 118.9 (C-4), 118.7 (C-5), 118.3 (C-7’’), 118.2 (C-5’’), 111.3 (C-4’’), 109.6 (C-7), 108.9 (C-3’’), 108.3 (C-3), 62.2 (C-2’), 55.5 (C-5’), 32.4 (C-1a), 32.3 (C-7’a), 30.8 (C-8’), 27.3 (C-1’).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{24}H_{24}N_4O_2$+H$^+$: 401.1972 [M+H]$^+$; gefunden: 401.1972.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3260 (br), 2921 (w), 1670 (vs), 1644 (vs), 1541 (m), 1331 (m), 737 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = +89.8 (c = 0.235, MeOH).

Allgemeine Synthesevorschrift SV7



Schritt 1: Das jeweilige Tryptophan (1.0 Äq.) wurde in einen trockenen, sekurierten Reaktionskolben gegeben und in trockenem Methanol (10 mL/mmol Edukt) gelöst. Nach vorsichtiger Zugabe von Thionylchlorid (2.5 Äq.) wurde die Lösung 18 h bei 60 °C gerührt. Nachdem das Reaktionsgemisch abgekühlt ist, wurde das Gemisch mit EE (10 mL/mmol Edukt) und wässriger, gesättigter $NaHCO_3$-Lösung (5 mL/mmol Edukt) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL/mmol Edukt). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt.

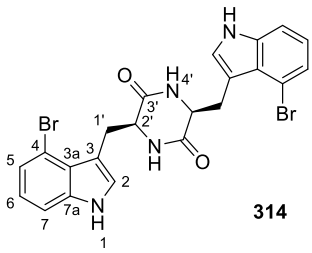
Schritt 2: Das jeweilige Tryptophan (1.0 Äq.) wurde in einen Reaktionskolben gegeben und in THF (2 mL/mmol Edukt) gelöst. Eine wässrige, gesättigte Na-HCO_3-Lösung (2 mL/mmol Edukt), Triethylamin (1.5 Äq.) und Di-*tert*-butydicarbonat (1.05 Äq.) wurden hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 16 h bei 23 °C gerührt. Anschließend wurde das Gemisch mit EE (10 mL/mmol Edukt) und wässriger, gesättigter NH_4Cl-Lösung (5 mL/mmol Edukt) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (5 x 5 mL/mmol Edukt). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt.

Schritt 3: Das Rohprodukt aus Schritt 1 (1.0 Äq.) und das Rohprodukt aus Schritt 2 (1.0 Äq.) wurden in einen trockenen, sekurierten Reaktionskolben gegeben und in trockenem THF (10 mL/mmol Edukt) gelöst. Die Reaktionslösung wurde bei 0 °C gerührt und Triethylamin (4.0 Äq.) sowie Bis-(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinylchlorid (3.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h bei 23 °C gerührt. Anschließend wurde mit EE (10 mL/mmol Edukt) und wässriger, gesättigter NH_4Cl-Lösung (5 mL/mmol Edukt) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL/mmol Edukt). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt.

Schritt 4: Das Rohprodukt aus Schritt 2 (1.0 Äq.) wurde in einem Reaktionskolben in THF (1 mL/mmol Edukt) gelöst und HCl (4 M in 1,4-Dioxan, 2mL/mmol Edukt) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 2 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt.

Schritt 5: Das Rohprodukt aus Schritt 3 (1.0 Äq.) wurde in einem Reaktionskolben in einer Ammoniak-Lösung (7 N in Methanol, 4 mL/mmol Edukt) gelöst. Die Reaktion wurde für 4 h bei 60 °C gerührt und anschließend das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/MeOH: 97/3) und das Produkt als weiß-gräulicher/weiß-gelblicher Feststoff erhalten.

314 (3*S*,6*S*)-3,6-Bis((4-brom-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (4,4''-Dibrom-cW$_S$W$_S$-DKP)



314

Die Verbindung wurde entsprechend der Synthesevorschrift SV7 hergestellt. Für den ersten Schritt wurde (*S*)-4-Bromtryptophan **297** (0.20 g, 0.71 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Für den zweiten Schritt wurde (*S*)-4-Bromtryptophan **297** (0.10 g, 0.35 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Im dritten Schritt wurde die Hälfte des Rohprodukts aus Schritt 1 sowie das Rohprodukt aus Schritt 2 verwendet, wobei die Menge des eingesetzten Rohprodukts aus Schritt 2 entsprechend der angegebenen Äquivalente angepasst wurde. Für den dritten und vierten Schritt wurde das gesamte Rohprodukt jeweils weiterverwendet.

Gesamt-Ausbeute: 46 mg, 87 µmol, 25 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.34 (d, $^3J_{7,6}$=8.1 Hz, 2H, 7-H), 7.19 (d, $^3J_{5,6}$ =7.5 Hz, 2H, 5-H), 6.96 (t, $^3J_{6,5,7}$ =7.9 Hz, 2H, 6-H), 6.86 (s, 2H, 2-H), 4.26 (dd, $^3J_{2',1'}$= 7.6 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 4.5 Hz, 2H, 2'-H), 3.47 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.5 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 4.5 Hz, 2H, 1'-H$_a$), 2.55 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.5 Hz, $^3J_{1',2'}$= 7.6 Hz, 2H, 1'-H$_b$).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 169.7 (C-3'), 139.7 (C-7a), 128.2 (C-2), 126, 7 (C-3a), 124.8 (C-5), 123.5 (C-6), 114.7 (C-4), 112.3 (C-7), 110.6 (C-3), 57.9 (C-2'), 31.9 (C-1').

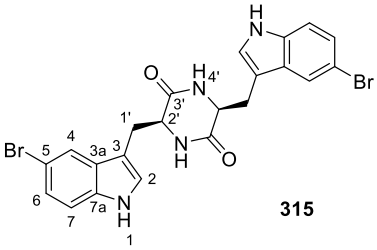
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{22}H_{18}N_4O_2Br_2$+H$^+$: 528.9869 [M+H]$^+$; gefunden: 528.9867.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3266 (w), 2929 (m), 2862 (m), 1669 (s), 1446 (m), 1416 (m), 1334 (s) 1079 (m), 772 (s), 735 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -125.9 (c = 0.058, MeOH).

Schmelzpunkt: 284 °C.

315 (3*S*,6*S*)-3,6-Bis((5-brom-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (5,5''-Dibrom-cW$_S$W$_S$-DKP)



Die Verbindung wurde entsprechend der Synthesevorschrift SV7 hergestellt. Für den ersten Schritt wurde (*S*)-5-Bromtryptophan **268** (0.20 g, 0.71 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Für den zweiten Schritt wurde (*S*)-5-Bromtryptophan **268** (0.10 g, 0.35 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Im dritten Schritt wurde die Hälfte des Rohprodukts aus Schritt 1 sowie das Rohprodukt aus Schritt 2 verwendet, wobei die Menge des eingesetzten Rohprodukts aus Schritt 2 entsprechend der angegebenen Äquivalente angepasst wurde. Für den dritten und vierten Schritt wurde das gesamte Rohprodukt jeweils weiterverwendet.

Gesamt-Ausbeute: 70 mg, 0.13 mmol, 37 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD$_3$OD): δ [ppm] = 7.70 (d, $^4J_{4,6}$ = 1.9 Hz, 2H, 4-H), 7.25 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.6 Hz, 2H, 7-H), 7.20 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.6 Hz, $^4J_{6,4}$ = 1.9 Hz, 2H, 6-H), 6.56 (s, 2H, 2-H), 4.05 (dd, $^3J_{2',1'}$= 7.0 Hz, $^3J_{2',1'}$= 4.0 Hz, 2H, 2'-H), 2.91-2.84 (m, 2H, 1'-H$_a$), 2.14 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.5 Hz, $^2J_{1',2'}$ = 7.1 Hz, 2H, 1'-H$_b$).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD$_3$OD): δ [ppm] = 169.7 (C-3'). 136.7 (C-7a), 130.4 (C-3a), 127.3 (C-2), 125.4 (C-6), 122.3 (C-4), 114.1 (C-7), 113.4 (C-5), 109.4 (C-3), 56.6 (C-2'), 31.4 (C-1').

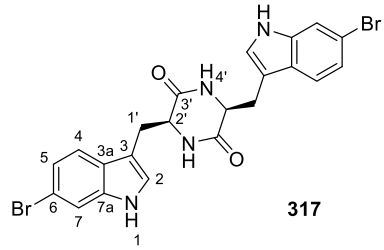
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{22}H_{18}N_4O_2Br_2$+H$^+$: 528.9869 [M+H]$^+$; gefunden: 528.9871.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3276 (s), 2922 (m), 1670 (s), 1458 (s) 1334 (m), 884 (s), 796 (s), 600 (m).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -38.0 (c = 0.35, MeOH).

Schmelzpunkt: 264 °C.

317 (3*S*,6*S*)-3,6-Bis((6-brom-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (6,6''-Dibrom-cW$_S$W$_S$-DKP)



Die Verbindung wurde entsprechend der Synthesevorschrift SV7 hergestellt. Für den ersten Schritt wurde (*S*)-6-Bromtryptophan **298** (0.20 g, 0.71 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Für den zweiten Schritt wurde (*S*)-6-Bromtryptophan **298** (0.10 g, 0.35 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Im dritten Schritt wurde die Hälfte des Rohprodukts aus Schritt 1 sowie das Rohprodukt aus Schritt 2 verwendet, wobei die Menge des eingesetzten Rohprodukts aus Schritt 2 entsprechend der angegebenen Äquivalente angepasst wurde. Für den dritten und vierten Schritt wurde das gesamte Rohprodukt jeweils weiterverwendet.

Gesamt-Ausbeute: 77 mg, 0.15 mmol, 41 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.48 (d, $^4J_{7,5}$ = 1.7 Hz, 2H, 7-H), 7.28 (d, $^3J_{4,5}$ = 8.5 Hz, 2H, 4-H), 7.13 (dd, $^3J_{5,5''}$ =8.5 Hz, $^4J_{5,7}$ = 1.7 Hz, 2H, 5-H), 6.60 (s, 2H, 2-H), 4.04 (dd, $^3J_{2',1'}$= 7.0 Hz, $^3J_{2',1}$ = 3.9 Hz, 2H, 2'-H), 2.90 (dd, $^2J_{1',1''}$ = 14.5 Hz, $^3J_{1',1''/1',2'}$= 3.9 Hz, 2H, 1'-H_a), 2.21-2.14 (m, 2H, 1'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 169.5 (C-3'), 138.8 (C-7a), 127.7 (C-3a), 126.5 (C-2),123.3 (C-5),121.2 (C-4),116.0 (C-6),115.3 (C-7),110.1 (C-3), 57.0 (C-2'), 31.2 (C-1').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{22}H_{18}N_4O_2Br_2$+H^+: 528.9869 $[M+H]^+$; gefunden: 528.9874.

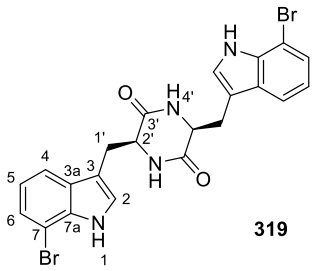
IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3401 (m), 2922 (m), 1746 (m), 1671 (s), 1454 (s), 1326 (s), 1221 (m), 1087 (s), 802 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -83.0 (c = 0.20, MeOH).

Schmelzpunkt: 290 °C.

---

319 (3*S*,6*S*)-3,6-Bis((7-brom-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (7,7''-Dibrom-cW$_S$W$_S$-DKP)



319

Die Verbindung wurde entsprechend der Synthesevorschrift SV7 hergestellt. Für den ersten Schritt wurde (*S*)-7-Bromtryptophan **107** (0.20 g, 0.71 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Für den zweiten Schritt wurde (*S*)-7-Bromtryptophan **107** (0.10 g, 0.35 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Im dritten Schritt wurde die Hälfte des Rohprodukts aus Schritt 1 sowie das Rohprodukt aus Schritt 2 verwendet, wobei die Menge des eingesetzten Rohprodukts aus Schritt 2 entsprechend der angegebenen Äquivalente angepasst wurde. Für den dritten und vierten Schritt wurde das gesamte Rohprodukt jeweils weiterverwendet.

Gesamt-Ausbeute: 45 mg, 85 µmol, 24 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.41 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 2H, 4-H), 7.29 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.5 Hz, 2H, 6-H), app. 6.95 (td, $^3J_{5,4}$ = 7.7 Hz, $^3J_{5,6}$ = 4.4 Hz, 2H, 5-H), 6.63 (s, 2H, 2-H), 4.07 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 6.4 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 3.6 Hz, 2H, 2'-H), 2.91 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.5 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 3.9 Hz, 2H, 1'-H), 2.18 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.5 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 7.2 Hz, 2H, 1'-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 169.5 (C-3'), 136.4 (C-7a), 130.2 (C-3a), 126.8 (C-2), 125.2 (C-6),121.4 (C-5),119.2 (C-4),111.0 (C-3),105.7 (C-7), 56.8 (C-2'), 31.5 (C-1').

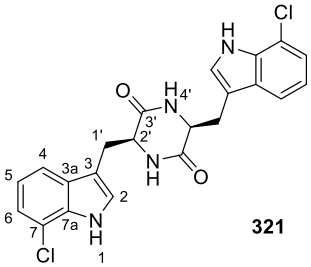
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{22}H_{18}N_4O_2Br_2$+H^+: 528.9869 $[M+H]^+$; gefunden: 528.9871.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3401 (w), 2922 (m), 1669 (s), 1461 (m), 1431 (m), 1326 (m), 1087 (s), 780 (s), 727 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -37.7 (c = 0.22, MeOH).

Schmelzpunkt: 271 °C.

321 (3*S*,6*S*)-3,6-Bis((7-chlor-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (7,7''-Dichlor-cW$_S$W$_S$-DKP)



321

Die Verbindung wurde entsprechend der Synthesevorschrift SV7 hergestellt. Für den ersten Schritt wurde (*S*)-7-Chlortryptophan **82** (0.20 g, 0.71 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Für den zweiten Schritt wurde (*S*)-7-Chlortryptophan **82** (0.10 g, 0.35 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Im dritten Schritt wurde die Hälfte des Rohprodukts aus Schritt 1 sowie das Rohprodukt aus Schritt 2 verwendet, wobei die Menge des eingesetzten Rohprodukts aus Schritt 2 entsprechend der angegebenen Äquivalente angepasst wurde. Für den dritten und vierten Schritt wurde das gesamte Rohprodukt jeweils weiterverwendet.

Gesamt-Ausbeute: 66 mg. 0.15 mmol, 36 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD$_3$OD): δ [ppm] = 7.37 (d, $^3J_{4,5}$= 8.0 Hz, 2H, 4-H), 7.13 (d, $^3J_{6,5}$= 7.6 Hz, 2H, 6-H), 6.99 (dd, $^3J_{5,4}$ = 7.8 Hz, $^3J_{5,6}$ = 7.8 Hz, 2H, 5-H), 6.63 (s, 2H, 2-H), 4.06 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 7.1 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 3.8 Hz, 2H, 2'-H), 2.92 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.5 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 3.9 Hz, 2H, 1'-H$_a$), 2.19 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.5 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 7.2 Hz, 2H, 1'-H$_b$).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD$_3$OD): δ [ppm] = 169.5 (C-3'), 135.0 (C-7a), 130.5 (C-3a), 126.8 (C-2), 122.1 (C-6), 121.0 (C-5), 117.9 (C-7), 110.9 (C-3), 56.8 (C-2'), 31.5 (C-1').

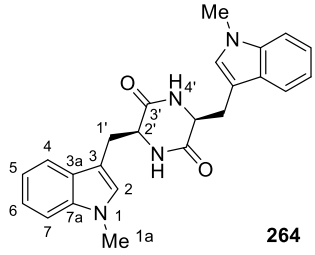
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{22}H_{18}N_4O_2Cl_2$+H$^+$: 441.0880 [M+H]$^+$; gefunden: 441.0879.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3438 (w), 3251 (w), 2922 (m), 1668 (s), 1446 (s), 1319 (m), 1094 (m), 780(s), 735 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -118.0 (c = 0.30, MeOH).

Schmelzpunkt: 245 °C.

264 (3*S*,6*S*)-3,6-Bis((1-methyl-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (*N*,*N*''-Dimethyl-cW$_S$W$_S$-DKP)



264

Die Verbindung wurde entsprechend der SV7 hergestellt. Für den ersten Schritt wurde das kommerziell-erhältliche (*S*)-*N*-Methyltryptophan **265** (0.20 g, 0.92 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Für den zweiten Schritt wurde das kommerziell-erhältliche (*S*)-*N*-Methyltryptophan **265** (0.20 g, 0.92 mmol, 1.0 Äq.) verwendet. Im dritten Schritt wurde das Rohprodukt aus Schritt 1 (113 mg, 0.49 mmol, 1.1 Äq.) sowie das Rohprodukt aus Schritt 2 (141 mg, 0.44 mmol, 1.0 Äq.) verwendet, wobei die Menge des eingesetzten Rohprodukts aus Schritt 2 entsprechend der angegebenen Äquivalente angepasst wurde. Für den dritten und vierten Schritt wurde das gesamte Rohprodukt jeweils weiterverwendet.

Gesamt-Ausbeute: 103 mg. 26 mmol, 28 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 7.78 (d, $^3J_{NH,2'}$ = 2.7 Hz, 2H, 4'-NH), 7.36 (d, $^3J_{4,5}$ = 8.0 Hz, 2H, 4-H), 7.33 (dd, $^3J_{7,6}$ = 8.3 Hz, $^4J_{7,5}$ = 1.0 Hz, 2H, 7-H), 7.13 (ddd, $^3J_{6,7}$ = 8.2 Hz, $^3J_{6,5}$ = 7.0 Hz, $^4J_{6,4}$ = 1.2 Hz, 2H, 6-H), 7.01 (ddd, $^3J_{5,4}$ = 7.9 Hz, $^3J_{5,6}$ = 7.0 Hz, $^4J_{5,7}$ = 1.0 Hz, 2H, 5-H), 6.53 (s, 2H, 2-H), 3.85 (dt, $^3J_{2',1'}$ = 6.7 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 3.5 Hz, 2H, 2'-H), 3.66 (s, 6H, 1a-H), 2.69 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.4 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 4.2 Hz, 2H, 1'-H_a), 2.16 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.3 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 6.7 Hz, 2H, 1'-H_b).

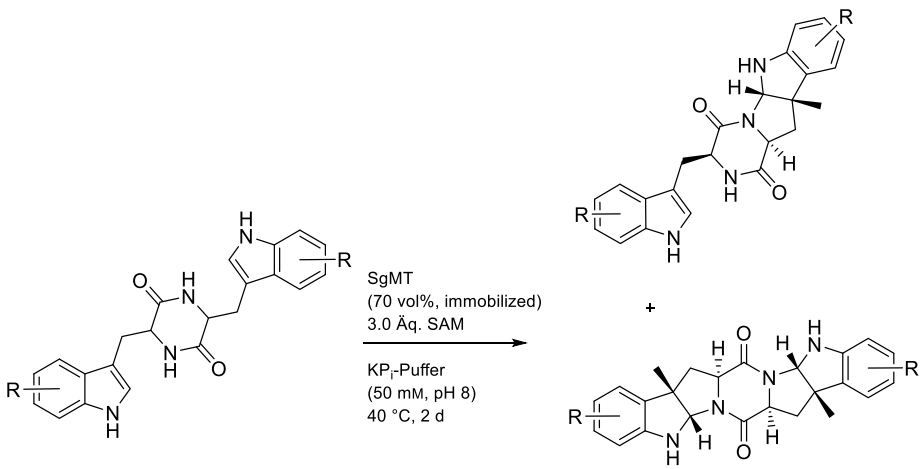
^{13}C-NMR (151 MHz, d_6-DMSO): δ [ppm] = 166.6 (C-3'), 136.5 (C-7a), 128.7 (C-2), 127.8 (C-3a), 121.0 (C-5), 118.8 (C-4), 118.5 (C-6), 109.5 (C-7), 108.1 (C-3), 55.3 (C-2'), 32.3 (C-1a), 29.8 (C-1').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{24}H_{24}N_4O_2$+H$^+$: 401.1972 [M+H]$^+$; gefunden: 401.1969.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3180 (br), 3049 (br), 2914 (w), 1691 (vs), 1457 (m), 1377 (w), 1328 (m), 1258 (w), 738 (vs).

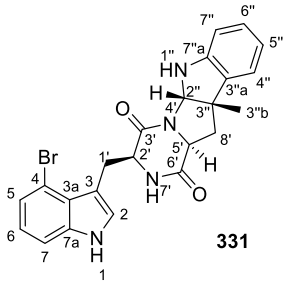
7.3.4.2. C3-Methylierung und Pyrroloindolformation

Allgemeine Synthesevorschrift SV8



Das entsprechende cWW-DKP (1.0 Äq., gelöst in DMSO (0.1 mL/mg Substrat)) und *S*-Adenosylmethionindisulfattosylat (**163**) (3.0 Äq.) wurden in eine Schraubdeckel-Flasche gegeben. Das an Ni-NTA-*Resin* immobilisierte Enzym (entsprechend 70 Vol% des Zelllysats) (vorbereitet entsprechend Kapitel 7.2.8) wurde hinzugegeben und das Reaktionsvolumen auf 1 mL/mg Substrat mit KP_i (50 mM, pH 8) eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 40 °C und 300 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Ni-NTA-*Beads* abfiltriert und das Produkt mit EE extrahiert (3 x 0.3 mL/mg Substrat). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EE) wurde das einfach-methylierte und das doppelt-methylierte Produkt isoliert jeweils als farbloser Feststoff erhalten.

331 (3*S*,5a*S*,10b*S*,11a*S*)-3-((4-Brom-1*H*-indol-3-yl)methyl)-10b-methyl-2,3,6,10b,11,11a-hexahydro-4*H*-pyrazino[1',2':1,5]pyrrolo[2,3-*b*]indol-1,4(5a*H*)-dion
(4-Brom-cW$_S$H$_S$-DKP)



Die Verbindung wurde entsprechend der SV8 hergestellt. Dazu wurde das 4-Brom-cW$_S$W$_S$-DKP **313** (100 mg, 0.22 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch von Verunreinigungen befreit, wobei das mono- und dimethylierte Reaktionsprodukt isoliert wurden.

Ausbeute des monomethylierten Produkt: 56.5 mg, 0.12 mmol, 56 %.

^{1}H-NMR (300 MHz, CDCl$_3$): δ [ppm] = 8.53 (s, 1H), 7.38 – 7.27 (m, 2H, 2-H, 7-H), 7.16 – 7.07 (m, 3H, 5-H, 4‘‘-H, 6‘‘-H), 7.03 (t, $^3J_{6,5,4}$ = 7.9 Hz, 1H, 6-H), 6.79 (t, $^3J_{5'',6'',4''}$ = 7.4 Hz, 1H, 5‘‘-H), 6.64 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 7.9 Hz, 1H, 7‘‘-H), 5.80 (s, 1H, 7‘-H), 5.32 (s, 1H, 2‘‘-H), 5.14 (s, 1H, 1‘‘-H), 4.49 (d, $^3J_{2',1'}$ = 8.5 Hz, 1H, 2‘-H), 4.20 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.8, $^3J_{1',2'}$ = 3.5 Hz, 1H, 1’-H$_a$), 4.01 (dd, $^3J_{5',8'}$ = 10.6 Hz, $^3J_{5',8'}$ = 5.9 Hz, 1H, 5‘-H), 2.89 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.8, $^3J_{1',2'}$ = 10.6 Hz, 1H, 1’-H$_b$), 2.73 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 12.6 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 6.2 Hz, 1H, 8’-H$_a$), 2.23 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 12.0 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 12.0 Hz, 1H, 8’-H$_b$), 1.46 (s, 3H, 3‘‘b-H).

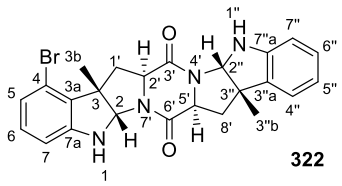
^{13}C-NMR (76 MHz, CDCl$_3$): δ [ppm] = 169.3 (C-6‘), 166.5 (C-3‘), 148.6 (C-7‘‘a), 138.2 (C-7a), 132.3 (C-3‘’a), 128.9 (C-6‘’), 125.7 (C-5), 125.1 (C-3a), 124.6 (C-2), 123.8 (C-6), 122.9 (C-4‘’), 119.7 (C5‘’), 114.1 (C-4), 111.1 (C-7), 110.7 (C-3), 109.7 (C-7‘’), 81.7 (C-2‘’), 59.3 (C-5’), 55.5 (C-2’), 51.7 (C-3‘’), 40.8 (C-8’), 27.4 (C-1’), 24.5 (C-3‘’b).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{23}H_{21}N_4O_2Br+H^+$: 465.0921 [M+H]$^+$; gefunden: 465.0918.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3341 (w), 3234 (br), 3052 (w), 1663 (vs), 1438 (s), 1190 (s), 1082 (s), 894 (m), 746 (w), 531 (w).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -304.3° (c = 0.286, MeOH)

322 4-Brom-cH$_S$H$_S$-DKP
(3aS,8aR)-4-Brom-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-
(3aS,8aR)-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-
(3*S,6S*)-2,5-diketopiperazin



Die Verbindung wurde entsprechend der SV8 hergestellt. Dazu wurde das 4-Brom-cW$_S$W$_S$-DKP **313** (100 mg, 0.22 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch von Verunreinigungen befreit, wobei das mono- und dimethylierte Reaktionsprodukt isoliert wurden.

Ausbeute des dimethylierten Produkts: 17.8 mg, 37 µmol, 17 %.

^{1}H-NMR (900 MHz, CDCl$_3$): δ [ppm] = 7.08 (dd, $^3J_{4'',5''}$ = 7.4 Hz, $^4J_{4'',6''}$ = 1.2 Hz, 1H, 4‘‘-H), 7.03 (td, $^3J_{6'',5'',7''}$ = 7.6 Hz, $^4J_{6'',4''}$ = 1.2 Hz, 1H, 6‘‘-H), 6.87 (t, $^3J_{6,4,7}$ = 7.8 Hz, 1H, 6-H), 6.83 (dd, $^3J_{5,6}$ = 7.9

Hz, $^4J_{5,7}$ = 1.0 Hz, 1H, 5-H), 6.76 (t, $^3J_{5'',4'',6''}$ = 7.4 Hz, 1H, 5''-H), 6.56 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 7.7 Hz, 1H, 7''-H), 6.45 (dd, $^3J_{7,6}$ = 7.6, $^4J_{7,5}$ = 1.0 Hz, 1H, 7-H), 5.22 (s, 1H, 2''-H), 5.18 (s, 1H, 2-H), 4.06 (ddd, $^3J_{5',8'}$ = 11.6, $^3J_{5',8'}$ = 6.2, $^3J_{5',2''}$ = 2.0 Hz, 1H, 5'-H), 4.02 (ddd, $^3J_{2',1'}$ = 11.2, $^3J_{2',1'}$ = 6.2, $^3J_{2',2}$ = 1.9 Hz, 1H, 2'-H), 3.50 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 13.5, $^3J_{1',2'}$ = 6.2 Hz, 1H, 1'-H_a), 2.71 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 13.0, $^3J_{8',5'}$ = 6.2 Hz, 1H, 8'-H_a), 2.30 – 2.26 (m, 1H, 8'-H_b), 2.13 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 13.5, $^3J_{1',2'}$ = 11.5 Hz, 1H, 1'-H_b), 1.57 (s, 3H, 3b-H), 1.45 (s, 3H, 3''b-H).

^{13}C-NMR (226 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 166.9 (C-6'), 166.6 (C-3'), 150.4 (C-7a), 148.3 (C-7''a), 132.2 (C-3''a), 130.5 (C-6), 128.9 (C-6''), 128.6 (C-3a), 123.8 (C-5), 122.7 (C-4''), 119.8 (C-5''), 119.1 (C-4), 109.7 (C-7''), 108.6 (C-7), 81.6 (C-2), 81.3 (C-2''), 60.7 (C-5'), 60.6 (C-2'), 54.2 (C-3), 52.1 (C-3''), 39.9 (C-8'), 37.2 (C-1'), 24.2 (C-3''b), 21.7 (C-3b).

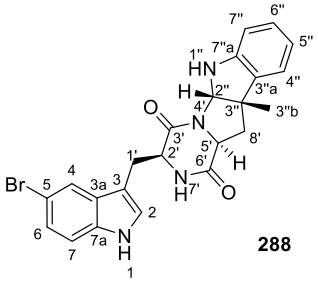
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{24}H_{23}N_4O_2Br+H^+$: 479.1077 $[M+H]^+$; gefunden: 479.1074.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3193 (m), 3050 (br), 2857 (m), 1667 (s), 1456 (vs), 1243 (m) 1163 (m), 1095 (m), 1069 (m), 990 (s), 914 (m), 517 (m).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -578.4° (c = 0.148, MeOH)

---

288 (3*S*,5a*S*,10b*S*,11a*S*)-3-((5-Brom-1*H*-indol-3-yl)methyl)-10b-methyl-2,3,6,10b,11,11a-hexahydro-4*H*-pyrazino[1',2':1,5]pyrrolo[2,3-*b*]indol-1,4(5a*H*)-dion (5-Brom-cW$_S$H$_S$-DKP)



Die Verbindung wurde entsprechend der SV8 hergestellt. Dazu wurde das 5-Brom-cW$_S$W$_S$-DKP **273** (50 mg, 0.11 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch von Verunreinigungen befreit, wobei das mono- und dimethylierte Reaktionsprodukt isoliert wurden.

Ausbeute des monomethylierten Produkt: 4.0 mg, 7.6 µmol, 6 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.79 (d, $^4J_{4,6}$ = 1.9 Hz, 1H, 4-H), 7.31 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 7.20 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.6 Hz, $^4J_{6,4}$ = 1.9 Hz, 1H, 6-H), 7.12 (s, 1H, 2-H), 6.96 (td, $^3J_{6'',5'',7''}$ = 7.6 Hz, $^4J_{6'',4''}$ = 1.2 Hz, 1H, 6''-H), 6.92 (d, $^3J_{4'',5''}$ = 7.4 Hz, 1H, 4''-H), 6.64 (t, $^3J_{5'',6'',4''}$ = 7.4 Hz, 1H, 5''-H), 6.52 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 7.8 Hz, 1H, 7''-H), 4.92 (s, 1H, 2''-H), 4.36 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 5.2, $^3J_{2',1'}$ = 2.8 Hz, 1H, 2'-H), 3.69 (ddd, $^2J_{5',8'}$ = 12.2 Hz, $^3J_{5',8'}$ = 5.2, $^3J_{5',2''}$ = 1.8 Hz, 1H, 5'-H), 3.50 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.6 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 3.5 Hz, 1H, 1'-H_b), 3.10 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.6 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 4.6 Hz, 1H, 1'-H_a), 2.11 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 11.8 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 5.2 Hz, 1H, 8'-H_a), 0.82 (s, 3H, 3''b-H), 0.51 (t, $J_{8',8',5'}$ = 12.0 Hz, 1H, 8'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 169.6 (C-2'), 167.0 (C-6'), 150.9 (C-7''a), 136.4 (C-7a), 133.5 (C-3''a), 130.5 (C-3a), 129.5 (C-6''), 128.0 (C-2), 125.4 (C-6), 123.8 (C-4''), 122.8 (C-4), 120.1 (C-5''), 114.1 (C-7), 113.4 (C-5), 109.8 (C-7''), 108.8 (C-3), 82.4 (C-2''), 59.3 (C-5'), 57.4 (C-2'), 52.6 (C-3''), 43.6 (C-8'), 30.6 (C-1'), 25.0 (C-3''b).

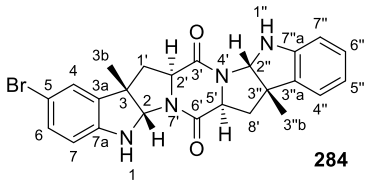
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{23}H_{21}N_4O_2Br+H^+$: 465.0921 $[M+H]^+$; gefunden: 465.0914.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3279 (br), 2924 (m), 2854 (m), 1661 (vs), 1609 (m), 1484 (m), 1455 (s), 1312 (m), 1214 (m), 1066 (s), 881 (m), 795 (m), 747 (s), 606 (m).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -180 (c = 0.31, $CHCl_3$)

---

284 5-Brom-cH$_S$H$_S$-DKP
(3aS,8aR)-5-Brom-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-(3aS,8aR)-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-(3*S,6S*)-2,5-diketopiperazin



284

Die Verbindung wurde entsprechend der SV8 hergestellt. Dazu wurde das 5-Brom-cW$_S$W$_S$-DKP **273** (50 mg, 0.11 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch von Verunreinigungen befreit, wobei das mono- und dimethylierte Reaktionsprodukt isoliert wurden.

Ausbeute des dimethylierten Produkts**:** 17.8 mg, 37 µmol, 17 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.25 (d, $^3J_{4,6}$ = 2.0 Hz, 1H, 4-H), 7.12 – 7.08 (m, 2H, 4''-H, 6-H), 7.00 (t, $^3J_{6'',5'',7''}$ = 7.6 Hz, 1H, 6''-H), 6.71 (t, $^3J_{5'',4'',6''}$ = 7.4 Hz, 1H, 5''-H), 6.56 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 7.8 Hz, 1H, 7''-H), 6.47 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.3 Hz, 1H, 7-H), 5.23 (s, 1H, 2-H), 5.21 (s, 1H, 2''-H), 4.08 – 3.99 (m, 2H, 2'-H, 5'-H), 2.65 (app. dt, *J* = 13.4, 6.8 Hz, 2H, 1'-H, 8'-H), 2.28 – 2.19 (m, 2H, 1'-H, 8'-H), 1.42 (s, 3H, 3b-H/3''b-H), 1.41 (s, 3H, 3''b-H/3b-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 168.1 (C-3'/6'), 168.0 (C-6'/3'), 150.3 (C-7''a), 149.7 (C-7a), 136.5 (C-3a), 133.9 (C-3''a), 132.3 (C-6), 129.6 (C-6''), 126.9 (C-4), 123.7 (C-4''), 120.3 (C-5''), 111.8 (C-7), 111.3 (C-5), 110.5 (C-7''), 82.5 (C-2/2''), 82.4 (C-2''/2), 61.4 (C-2'/5'), 61.3 (C-5'/2'), 53.1 (C-3/3''), 53.0 (C-3''/3), 41.6 (C-1'/8'), 41.5 (C-8'/1'), 25.0 (C-3b/3''b), 25.0 (C-3''b/3b).

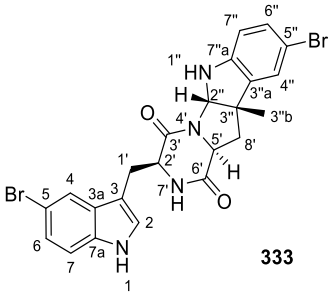
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{24}H_{23}N_4O_2Br+H^+$: 479.1077 $[M+H]^+$; gefunden: 479.1074.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3348 (br), 2971 (w), 2958 (m), 2925 (m), 2850 (w), 1661 (vs), 1600 (m), 1479 (s), 1427 (s), 1216 (m), 1190 (m), 1165 (m), 1057 (m), 813 (w), 753 (w).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -494 (c = 0.174, $CHCl_3$)

---

333 (3*S*,5a*S*,10b*S*,11a*S*)-9-Brom-3-((5-brom-1*H*-indol-3-yl)methyl)-10b-methyl-2,3,6,10b,11,11a-hexahydro-4*H*-pyrazino[1',2':1,5]pyrrolo[2,3-*b*]indol-1,4(5a*H*)-dion
(5,5''-Dibrom-cW$_S$H$_S$-DKP)



333

Die Verbindung wurde entsprechend der SV8 hergestellt. Dazu wurde das 5,5''-Dibrom-cW$_S$W$_S$-DKP **315** (10 mg, 19 µmol, 1.0 Äq.) eingesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch von Verunreinigungen befreit, wobei das mono- und dimethylierte Reaktionsprodukt isoliert wurden.

Ausbeute des monomethylierten Produkts**:** 5.5 mg, 10 µmol, 54 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.78 (d, $^3J_{2,1}$ = 2.0 Hz, 1H, 2-H), 7.31 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 7.20 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.6 Hz, $^2J_{6,4}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 7.12 (s, 1H, 4''-H), 7.08 – 7.05 (m, 2H, 4-H, 6''-H), 6.43 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 9.0 Hz, 1H, 7''-H), 5.50 (s, 1H, NH), 4.46 – 4.31 (m, 1H, 5'-H), 3.72 (app. ddd, *J* = 12.2, 5.1 Hz, 1.8 Hz, 1H, 2'-H), 3.50 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.6, $^3J_{1',2'}$ = 3.4 Hz, 1H, 1'-H_a), 3.10 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.6, $^3J_{1',2'}$ = 4.6 Hz, 1H, 1'-H_b), 2.10 (dd, $^2J_{8'a,8'b}$ = 11.9, $^3J_{8'a,\,5'}$ = 5.2 Hz, 1H, 8'-H_a), 0.81 (s, 3H, 3''b-H), 0.48 (dd, $^2J_{8'b,8'a}$= 12.1 Hz, $^3J_{8'b,5'}$ = 12.1 Hz, 1H, 8'-H_b).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 169.4 (C-3'), 166.9 (C-6'), 150.3 (C-7''a), 136.4 (C-7a), 136.1 (C-3''a), 132.2 (C-6''), 130.5 (C-3a), 128.0 (C-4''), 127.0 (C-4), 125.4 (C-6), 122.8 (C-2), 114.1 (C-7), 113.4 (C-5), 111.0 (C-7''), 110.9 (C-5''), 108.8 (C-3), 82.6 (C-2''), 59.3 (C-3''), 57.4 (C-5'), 52.7 (C-2'), 43.5 (C8'), 30.7 (C-1'), 24.9 (C-3''b).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{23}H_{20}N_4O_2Br_2$+H$^+$: 545.0006 [M+H]$^+$; gefunden: 545.0007.

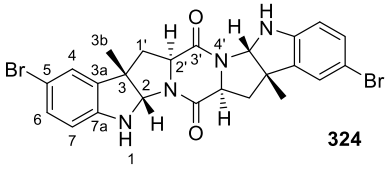
IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 2973 (br), 2921 (br), 1728 (vs), 1670 (w), 1446 (w), 1357 (s), 1232 (m), 2322 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -68.0 (c = 0.075, MeOH)

---

324 5,5''-Dibrom-cH_SH$_S$-DKP

(3a*S*,8a*R*)-5-Brom-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-(3a*S*,8a*R*)-5-Brom-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-(3*S,6S*)-2,5-diketopiperazin



324

Die Verbindung wurde entsprechend der SV8 hergestellt. Dazu wurde das 5,5''-Dibrom-cW_SW$_S$-DKP **315** (10 mg, 19 µmol, 1.0 Äq.) eingesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch von Verunreinigungen befreit, wobei das mono- und dimethylierte Reaktionsprodukt isoliert wurden.

Ausbeute des dimethylierten Produkts**:** 2.6 mg, 4.8 µmol, 25 %.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.09 (d, $^4J_{4,6}$ = 1.9 Hz, 2H, 4-H), 7.06 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.2, $^4J_{6,4}$ = 1.9 Hz, 2H, 6-H), 6.36 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.2 Hz, 2H, 7-H), 5.12 (s, 2H, 2-H), 3.97 (dd, $^3J_{2',1'}$ = 10.4, $^3J_{2',1'}$ = 6.2 Hz, 2H, 2'-H), 2.60 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 13.0, $^3J_{1',2'}$ = 6.2 Hz, 2H, 1'-H_a), 2.20 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 13 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 11.2 Hz, 2H, 1-H_a), 1.37 (s, 6H, 3b-H).

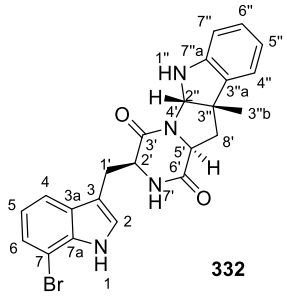
^{13}C-NMR (76 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 166.6 (C-3'), 147.4 (C-7a), 134.7 (C-3a), 131.7 (C-6), 126.1 (C-4), 125.9 (C-7), 111.2 (C-5), 81.4 (C-2), 60.9 (C-2'), 52.3 (C-3), 39.8 (C-1'), 29.8 (C-3b).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{24}H_{22}N_4O_2Br_2$+H$^+$: 559.0162 [M+H]$^+$; gefunden: 559.0159.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3348 (br), 2971 (w), 2958 (m), 2925 (m), 2850 (w), 1661 (vs), 1600 (m), 1479 (s), 1427 (s), 1216 (m), 1190 (m), 1165 (m), 1057 (m), 813 (w), 753 (w).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -157 (c = 0.021, MeOH).

332 (3*S*,5a*S*,10b*S*,11a*S*)-3-((7-Brom-1*H*-indol-3-yl)methyl)-10b-methyl-2,3,6,10b,11,11a-hexahydro-4*H*-pyrazino[1',2':1,5]pyrrolo[2,3-*b*]indol-1,4(5a*H*)-dion
(7-Brom-cW$_S$H$_S$-DKP)



332

Die Verbindung wurde entsprechend der SV8 hergestellt. Dazu wurde das 7-Brom-cW$_S$W$_S$-DKP **318** (100 mg, 0.22 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch von Verunreinigungen befreit, wobei das mono- und dimethylierte Reaktionsprodukt isoliert wurden.

Ausbeute des dimethylierten Produkts**:** 74 mg, 0.16 mmol, 72 %.

^{1}H-NMR (900 MHz, CDCl$_3$): δ [ppm] = δ 8.36 (s, 1H, 1-H), 7.51 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.38 (dd, $^3J_{6,5}$ = 7.6 Hz, $^2J_{6,4}$ = 0.8 Hz, 1H, 6-H), 7.17 (d, $^3J_{2,1}$ = 2.4 Hz, 1H, 2-H), 7.13 – 7.05 (m, 2H, 4''-H, 7''-H), 7.02 (t, $^3J_{5,6,4}$ = 7.8 Hz, 1H, 5-H), 6.78 (td, $^3J_{5'',4'',6''}$ = 7.4 Hz, $^2J_{5'',7''}$ = 1.0 Hz, 1H, 5''-H), 6.63 (dd, $^3J_{7'',6''}$ = 8.2 Hz, $^2J_{7'',5''}$ = 1.0 Hz, 1H, 7''-H), 5.68 (s, 1H, 7'-H), 5.25 (s, 1H, 2''-H), 4.31 (ddd, $^3J_{2',1'}$ = 10.2 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 3.7, $^3J_{2',7'}$ = 1.7 Hz, 1H, 2'-H), 3.97 (dd, $^3J_{5',8'}$ = 11.4 Hz, $^3J_{5',8'}$ = 6.1, 1H, 5'-H), 3.65 (ddd, $^2J_{1',1'}$ = 15.1 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 3.8 Hz, $^4J_{1',2}$ = 1.0 Hz, 1H, 1'-H$_b$), 3.02 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 15.1 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 10.1 Hz, 1H, 1'-H$_a$), 2.67 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 12.7 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 6.1 Hz, 1H, 8'-H$_b$), 2.06 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 12.7 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 11.3 Hz, 1H, 8'-H$_a$), 1.40 (s, 3H, 3''b-H).

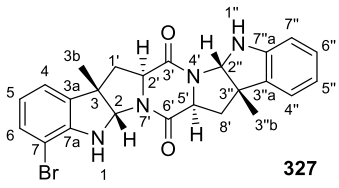
^{13}C-NMR (226 MHz, CDCl$_3$): δ [ppm] = 168.9 (C-6'), 166.0 (C-3'), 148.5 (C-7''a), 135.4 (C-7a), 132.2 (C-3''a), 128.9 (C-6''), 128.0 (C-3a), 125.3 (C-6), 124.1 (C-2), 122.9 (C-4''), 121.5 (C-5'), 119.8 (C-5''), 117.9 (C-4), 111.1 (C-3), 109.6 (C-7''), 105.3 (C-7), 81.6 (C-2), 59.2 (C-5'), 54.9 (C-2'), 51.8 (C-3''), 40.9 (C-8'), 27.4 (C-1'), 24.5 (C-3''b).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{23}H_{21}N_4O_2Br+H^+$: 465.0921 $[M+H]^+$; gefunden: 465.0918.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3301 (br), 1978 (w), 2918 (w), 1734 (m), 1660 (vs), 1479 (m), 1465 (s), 1432 (s), 1358 (m), 1210 (s), 1102 (w), 786 (w), 746 (w).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -176.8° (c = 0.203, MeOH)

327 7-Brom-cH$_S$H$_S$-DKP
(3aS,8aR)-7-Brom-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-
(3aS,8aR)-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-
(3*S,6S*)-2,5-diketopiperazin



327

Die Verbindung wurde entsprechend der SV8 hergestellt. Dazu wurde das 7-Brom-cW$_S$W$_S$-DKP **318** (100 mg, 0.22 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch von Verunreinigungen befreit, wobei das mono- und dimethylierte Reaktionsprodukt isoliert wurden.

Ausbeute des dimethylierten Produkts**:** 3.1 mg, 6.4 µmol, 3 %.

^{1}H-NMR (900 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.17 (dd, $^3J_{6,5}$ = 8.0 Hz, $^4J_{6,4}$ = 1.0 Hz, 1H, 6-H), 7.08 (dd, $^3J_{4'',5''}$ = 7.4 Hz, $^3J_{4'',6''}$ = 1.2 Hz, 1H, 4''-H), 7.02 (td, $^3J_{6'',5'',7''}$ = 7.6 Hz, $^4J_{6'',4''}$ = 1.2 Hz, 1H, 6''-H), 7.00 (dd, $^3J_{4,5}$ = 7.4 Hz, $^4J_{4,6}$ = 1.0 Hz, 1H, 4-H), 6.75 (t, $^3J_{5'',4'',6''}$ = 7.4 Hz, 1H, 5''-H), 6.63 (dd, $^3J_{5,6}$ = 7.9, $^3J_{5,4}$ = 7.4 Hz, 1H, 5-H), 6.54 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 7.8 Hz, 1H, 6''-H), 5.27 (s, 1H, 2-H), 5.20 (s, 1H, 2''-H), 4.11 – 4.03 (m, 2H, 2'-H, 5'-H), 2.73 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 12.9 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 6.2 Hz, 1H, 1'-H_a), 2.69 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 13.1 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 6.2 Hz, 1H, 8'-H_a), 2.28 (m, 2H, 1'-H_b, 8'-H_b), 1.46 (s, 4H, 3b-H), 1.45 (s, 4H, 3''b-H).

^{13}C-NMR (226 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 166.6 (C-3'), 166.6 (C-6'), 148.3 (C-7''a), 147.0 (C-7a), 133.5 (C-3a), 132.2 (C-3''a), 131.4 (C-6), 128.8 (C-6''), 122.8 (C-4''), 121.6 (C-4), 120.9 (C-5), 119.8 (C-5''), 109.7 (C-7''), 103.1 (C-7), 81.3 (C-2''), 80.2 (C-2), 60.7 (C-5'), 60.6 (C-2'), 53.4 (C-3), 52.1 (C-3''), 40.4 (C-1'), 40.0 (C-8'), 24.4 (C-3b), 24.2 (C-3''b).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{24}H_{24}N_4O_2Br+H^+$: 479.1077 $[M+H]^+$; gefunden: 479.1074.

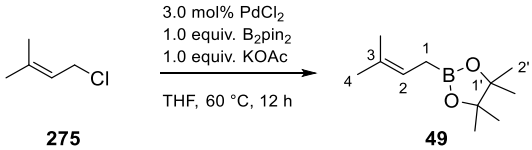
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3361 (br), 2918 (m), 2857 (w), 1741 (vs), 1667 (s), 1432 (m), 1364 (s), 1351 (m), 1210 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -278.3° (c = 0.064, MeOH)

Schmelzpunkt: 87°C

7.3.4.3. Prenylierung über Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung

49 4,4,5,5-Tetramethyl-2-(3-methylbut-2-en-1-yl)-1,3,2-dioxaborolan



275 **49**

Bis(pinakolat)dibor (4.5 g, 17.8 mmol, 1.0 Äq.), Palladiumdichlorid (94.4 mg, 0.53 mmol, 3.0 mol%) und Kaliumacetat (1.7 g, 17.8 mmol, 1.0 Äq.) wurden in einem 100 mL Rundkolben gegeben und in trockenem THF (20 mL) gelöst. Anschließend wurde kommerziell erworbenes 3-Methyl-2-butenylchlorid **275** (2.0 mL, 17.5 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch bei 60 °C für 18 h gerührt. Nachdem die Reaktion abgekühlt ist, wurde das Rohprodukt durch ein Silica-Pad filtriert, mit EE nachgespült und anschließend das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Nach Vakuum-Destillation (1-2 mbar und 60-80 °C) wurde das von Verunreinigungen befreite Produkt als farblose Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 3.0 g, 15.5 mmol, 87 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.34 – 5.15 (m, 1H), 1.69 (m, 3H), 1.63 – 1.57 (m, 5H), 1.24 (s, 12H).

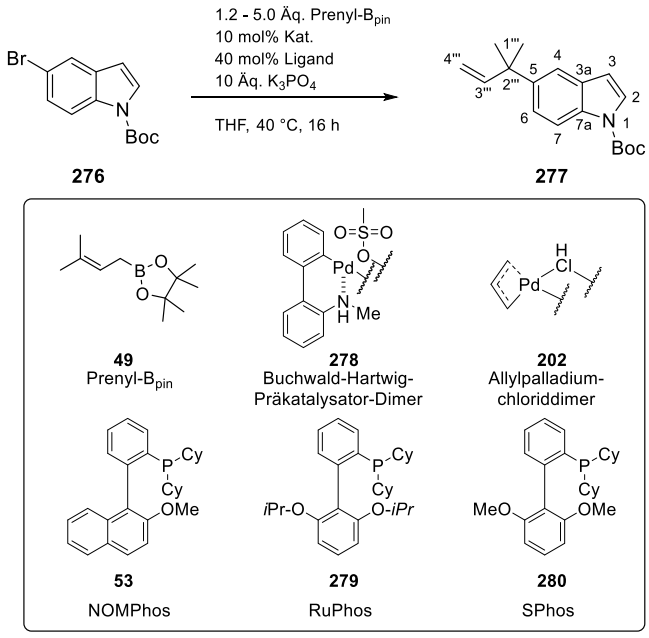
^{13}C-NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 131.6, 118.6, 83.2, 25.8, 24.9, 24.7.

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{11}H_{21}BO_2$-H^+: 195.1551 $[M-H]^+$; gef.: 195.1549.

Die ^{1}H- and ^{13}C-NMR Signale stimmen mit den publizierten Spektren überein.[274]

277 (*N*-*tert*-Butoxycarbonyl)-5-(2-methylbut-3-en-2-yl)-1*H*-indol

Entsprechend Yang *et al.* wurden für die Penylierung in 5-Position verschiedene Katalysator/Liganden-Kombinationen am *N*-Boc-5-Bromindol getestet.[89]



Unter Argon wurden der entsprechende Katalysator (10 mol%), der entsprechende Ligand (40 mol%) und Kaliumcarbonat (1.3 mL einer 2.5 M-Lösung in entgastem Wasser, *freeze-pump-thawed*, 3.4 mmol, 10.0 Äq.) in ein Schlenk-Rohr gegeben. Prenyl-Boronsäureester **49** (79 mg, 0.41 mmol, 1.2 Äq. / 331 mg, 1.7 mmol, 5.0 Äq.) und *N*-Boc-5-bromindol **276** (100 mg, 0.34 mmol, 1.0 Äq.) wurden jeweils in entgastem THF (3 mL, *freeze-pump-thawed*) gelöst und in den Reaktionskolben gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 40 °C für 16 h gerührt. Anschließend wurde mit EE (10 mL) und wässriger, gesättigter NaCl-Lösung (5 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde hinsichtlich des Produktgehalts mittels qNMR in Duplikaten analysiert, wobei Trimethoxybenzol als interner Standard verwendet wurde.

Tabelle 19: Untersuchte Katalysator/Ligand-Kombinationen für die reverse-Prenylierung

	Äq. Bpin	Katalysator	Ligand	Ausbeute* [%]
1	1.2	[Allyl-PdCl]$_2$ (**202**)	NOMPhos **53**	52.6 ± 3.9
2	5.0	[Allyl-PdCl]$_2$ (**202**)	NOMPhos **53**	59.2 ± 1.6
3	1.2	BH-Präkat.-Dimer **278**	NOMPhos **53**	60.9 ± 1.2
4	1.2	SPhos G4	SPhos **280**	64.4 ± 6.8
5	1.2	[Allyl-PdCl]2 (**202**)	RuPhos **279**	57.7 ± 4.0

* In Duplikaten gemessene Ausbeute mittels qNMR mit Trimethoxybenzol als internem Standard.

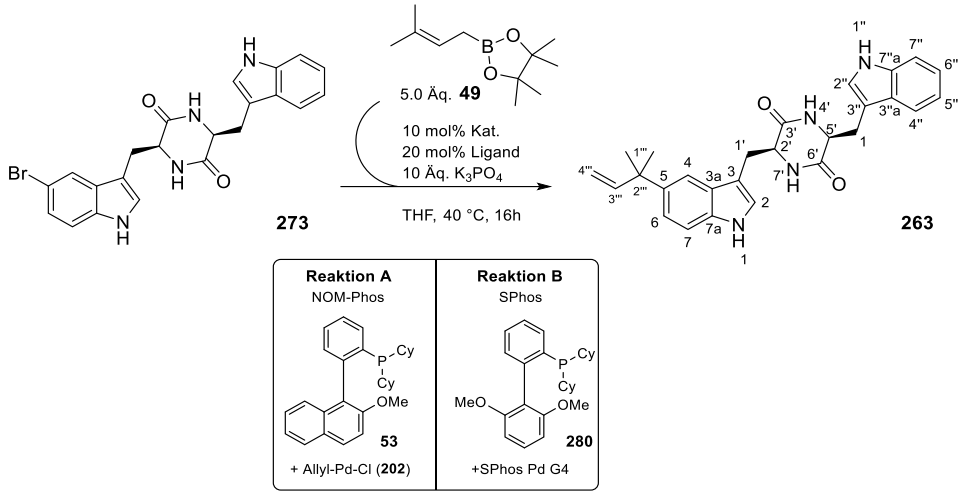
Für den Eintrag mit der höchsten gemessenen Ausbeute (Eintrag 4, SPos/SPhos Pd G4) wurde das Rohprodukt über eine kurze Silica-Säule von Verunreinigungen befreit, um den Großteil der Verunreinigungen zu entfernen und das Rohprodukt zu erhalten.

Ausbeute (isoliert aus Eintrag 4): 69 mg, 0.24 mmol, 71%.

Roh ^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.08 – 8.00 (m, 1H), 7.58 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, 2-H), 7.54 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.33 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 1H), 6.54 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.09 (dd, *J* = 17.4, 10.6 Hz, 1H), 5.07 (dd, *J* = 27.7, 1.4 Hz, 1H), 5.06 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 1.67 (s, 9H), 1.46 (s, 6H).

Die ^{1}H-NMR-Signale stimmen mit dem publizierten Spektrum überein, weshalb daher keine weitere Charakterisierung als notwendig erachtet wurde.[89]

263 (3*S*,6*S*)-3-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-6-((5-(2-methylbut-3-en-2-yl)-1*H*-indol-3-yl)methyl)piperazin-2,5-dion (5-Prenyl-cW$_S$W$_S$-DKP)



Reaktion A: Unter Argon wurden Allylpalladiumchlorid **202** (4.0 mg, 11 µmol, 10 mol%), NOMPhos **53** (9.5 mg, 22 µmol, 20 mol%) und Kaliumcarbonat (233 mg, 1.1 mmol, 10 Äq.) in ein Schlenk-Rohr gegeben.

Reaktion B: Unter Argon wurden SPhos Pd G4 (8.7 mg, 11 µmol, 10 mol%), SPhos **280** (9.0 mg, 22 µmol, 20 mol%) und Kaliumcarbonat (233 mg, 1.1 mmol, 10 Äq.) in ein Schlenk-Rohr gegeben.

Danach für beide Reaktionen: Prenyl-Boronsäureester **49** (108 mg, 0.55 mmol, 5.0 Äq.) und 5-Brom-cWW-DKP **273** (50 mg, 0.11 mmol, 1.0 Äq.) wurden jeweils in entgastem THF (3 mL, *freeze-pump-thawed*) gelöst und in den Reaktionskolben gegeben. Entgastes Wasser (2 mL, *freeze-pump-thawed*) wurde hinzugefügt und das Reaktionsgemisch bei 40 °C für 16 h gerührt. Anschließend wurde mit EE (10 mL) und wässriger, gesättigter NaCl-Lösung (5 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/PE: 1/1) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute Reaktion A: 35.0 mg, 0.80 mmol, 72 %.

Ausbeute Reaktion B: 39.9 mg, 0.90mmol, 82 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.57 (d, $^{4}J_{4,6}$ = 1.8 Hz, 1H, 4-H), 7.46 (dd, $^{3}J_{4'',5''}$ = 8.0 Hz, $^{4}J_{4'',6''}$ = 1.0 Hz, 1H, 4''-H), 7.30 (dd, $^{3}J_{7'',6'}$ = 8.1 Hz, $^{4}J_{7'',5''}$ = 0.9 Hz, 1H, 7''-H), 7.23 (dd, $^{3}J_{7,6}$ = 8.6 Hz, $^{4}J_{7,5}$ = 0.7 Hz, 1H, 7-H), 7.14 (dd, $^{3}J_{6,7}$ = 8.6 Hz, $^{4}J_{6,4}$ = 1.8 Hz, 1H, 6-H), 7.08 (ddd, $^{3}J_{6'',5''}$ = 8.2 Hz, $^{3}J_{6'',7''}$ = 7.0, $^{4}J_{6'',4''}$ = 1.2 Hz, 1H, 6''-H), 7.00 (ddd, $^{3}J_{5'',4''}$ = 8.0 Hz, $^{3}J_{5'',6''}$ = 7.0 Hz, $^{4}J_{5'',7''}$ = 1.0 Hz, 1H, 5''-H), 6.46 (s, 1H, 2-H), 6.34 (s, 1H, 2''-H), 6.12 (dd, $^{3}J_{3''',4'''}$ = 17.4, 10.6 Hz, 1H, 3'''-H), 5.06 (dd, $^{3}J_{4'''a,3'''}$ = 17.5 Hz, $^{3}J_{4'''a,4'''b}$ = 1.6 Hz, 1H, 4'''a-H), 5.00 (dd, $^{3}J_{4'''b,3'''}$ = 10.6 Hz, $^{4}J_{4'''b,4'''a}$ = 1.5 Hz, 1H, 4'''b-H),4.06 (ddd, $^{3}J_{2',1'}$ = 6.9 Hz, $^{3}J_{2',1'}$ = 4.0, $^{3}J_{2',NH}$ = 1.1 Hz, 1H, 2'-H), 4.02 (ddd, $^{3}J_{5',8'}$ = 7.9 Hz, $^{3}J_{5',8'}$ = 3.8 Hz, $^{3}J_{2',NH}$ = 1.1 Hz, 1H, 5'-H), 2.94 (dd, $^{2}J_{1',1'}$ = 14.4 Hz, $^{3}J_{1',2'}$ = 3.9 Hz, 1H, 1'-H_a), 2.90 (dd, $^{2}J_{8',8'}$ = 14.4 Hz, $^{3}J_{8',5'}$ = 3.8 Hz, 1H, 8'-H_b), 2.32 (dd, $^{2}J_{1',1'}$ = 14.4 Hz, $^{3}J_{1',2'}$ = 6.9 Hz, 1H, 1'-H_b), 1.99 (dd, $^{2}J_{8',8'}$ = 14.4, $^{3}J_{8',5'}$ = 7.8 Hz, 1H, 8'-H_a), 1.47 (s, 3H, 1'''a-H), 1.46 (s, 3H, 1'''b-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 169.8 (C-3'/6'), 169.7 (C-6'/C-3'), 150.6 (C-4'''), 140.5 (C-5), 138.2 (C-7''a), 136.4 (C-7a), 128.5 (C-3''a), 128.4 (C-3a), 126.2 (C-2), 125.9 (C-2''), 122.5 (C-6), 121.9 (C-6''), 120.0 (C-5''), 119.6 (C-4''), 116.5 (C-4), 112.4 (C-7''), 111.9 (C-7), 110.3 (C-3'''), 109.5 (C-2''), 109.5 (C-2), 56.8 (C-2'/5'), 56.8 (C-5'/2'), 42.1 (C-2'''), 31.5 (C-1'/8'), 31.4 (C-8'/1'), 29.4 (C-1''').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3287 (br), 2961 (w), (2923 (m), 2862 (w), 1709 (m), 1656 (vs), 1541 (s), 1383 (m), 1330 (m), 1246 (m), 738 (s).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{27}H_{28}N_4O_2$+H$^+$: 441.2285 $[M+H]^+$; gef.: 441.2281.

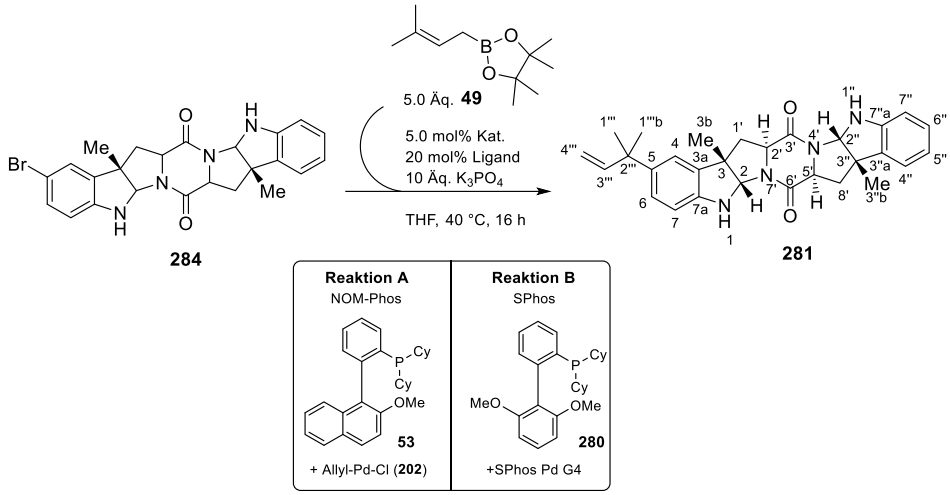
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -71 (c = 0.17, MeOH).

281 5-Prenyl-cH$_S$H$_S$-DKP

(3a*S*,8a*R*)-5-(2-methylbut-3-en-2-yl)-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-

(3a*S*,8a*R*)-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-

(3*S*,6*S*)-2,5-diketopiperazin



Reaktion A: Unter Argon wurden Allylpalladiumchlorid **202** (1.1 mg, 3.0 µmol, 5.0 mol%), NOMPhos **53** (5.2 mg, 12 µmol, 20 mol%) und Kaliumcarbonat (128 mg, 0.60 mmol, 10 Äq.) in ein Schlenk-Rohr gegeben. Prenyl-Boronsäureester **49** (59 mg, 0.30 mmol, 3.1 Äq.) und 5-Brom-cH$_S$H$_S$-DKP **284** (29 mg, 60 µmol, 1.0 Äq.) wurden jeweils in entgastem THF (1 mL, *freeze-pump-thawed*) gelöst und in den Reaktionskolben gegeben.

Reaktion B: Unter Argon wurden SPhos Pd G4 (1.3 mg, 1.6 µmol, 5.0 mol%), SPhos (**280**) (2.7 mg, 6.6 µmol, 20 mol%) und Kaliumcarbonat (70.0 mg, 0.33 mmol, 10 Äq.) in ein Schlenk-Rohr gegeben. Prenyl-Boronsäureester **49** (32.4 mg, 0.17 mmol, 3.1 Äq.) und 5-Brom-cWW-DKP **284** (15.9 mg, 33 µmol, 1.0 Äq.) wurden jeweils in entgastem THF (1 mL, *freeze-pump-thawed*) gelöst und in den Reaktionskolben gegeben.

Danach für beide Reaktionen: Entgastes Wasser (1 mL, *freeze-pump-thawed*) wurde hinzugefügt und das Reaktionsgemisch bei 40 °C für 16 h gerührt. Anschließend wurde mit EE (10 mL) und wässriger, gesättigter NaCl-Lösung (5 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/PE: 1/1) und Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute Reaktion A: 22.3 mg, 47 µmol, 78 %.

Ausbeute Reaktion B: 8.0 mg, 17 µmol, 52 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.14 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.0 Hz, 1H, 4-H), 7.06 (d, $^3J_{4'',5''}$ = 7.3 Hz, 1H, 4''-H), 7.01 (dd, $^3J_{6,7}$ =8.2Hz, $^4J_{6,4}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 6.98 (td, $^3J_{6'',5'',7''}$ =7.6 Hz, $^4J_{6'',4''}$ = 1.2 Hz,

1H, 6‘‘-H), 6.69 (td, $^{3}J_{5'',6'',4''}$ =7.4 Hz, $^{4}J_{5'',7''}$ = 1.1 Hz, 1H, 5‘‘-H), 6.53 (d, $^{3}J_{7'',6''}$ = 7.8 Hz, 1H, 7‘‘-H), 6.51 (d, $^{3}J_{7,6}$ = 8.1 Hz, 1H, 7-H), 5.98 (dd, $^{3}J_{3''',4'''}$ = 17.4, 10.6 Hz, 1H, 3‘‘‘-H), 5.21 (s, 1H, 2-H/2‘‘-H), 5.20 (s, 1H, 2‘‘-H/2-H), 5.00 (dd, $^{3}J_{4''',3'''}$ = 17.5 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, 4‘‘‘-H_a), 4.97 (dd, $^{3}J_{4''',3'''}$ = 10.6 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, 4‘‘‘-H_b), 4.06 – 3.93 (m, 2H, 2‘-H/5‘-H), 2.63 (app. dt, *J* = 12.6, 6.3 Hz, 2H, 1‘-H/8‘-H), 2.22 (app. ddd, *J* = 12.6, 11.3, 3.1 Hz, 2H, 1‘-H/8‘-H), 1.41 (s, 3H, 3b-H), 1.40 (s, 3H, 3‘‘b-H), 1.34 (s, 6H, 1‘‘‘-H, 1‘‘‘b-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 168.2 (C-3‘‘/6‘‘), 168.1 (C-6‘‘/3‘‘), 150.3 (C-7‘‘a), 150.0 (C-3‘‘‘), 148.3 (C-7a), 141.1 (C-5), 133.9 (C-3a/3‘‘a), 133.9 (C-3‘‘a/3a), 129.5 (C-6‘‘), 127.5 (C-6), 123.7 (C-4‘‘), 121.4 C-4), 120.3 (C-5‘‘), 110.6 (C-7‘‘/4‘‘‘), 110.5 (C-4‘‘‘/7‘‘), 110.3 (C-7), 82.8 (C-2/2‘‘), 82.3 (C-2‘‘/2), 61.4 (C-2’/5’), 61.4 (C-5’/2’), 53.2 (C-3/3‘‘), 53.0 (C-3‘‘/3), 41.8 (C-1’/8’/2‘‘‘), 41.7 (C-1’/8’/2‘‘‘), 41.6 (C-1’/8’/2‘‘‘), 29.1 (C-1‘‘‘/1‘‘‘b), 25.1 (C-3b/3‘‘b), 25.0 (C-3‘‘b/3b).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.06 (d, $^{3}J_{4'',5''}$ = 7.4 Hz, 1H, 4‘‘-H), 7.04 – 6.98 (m, 3H, 4-H, 6-H, 6‘‘-H), 6.74 (t, $^{3}J_{5'',4'',6''}$ = 7.4 Hz, 1H, 5‘‘-H), 6.51 (d, $^{3}J_{7'',6''}$ = 7.8 Hz, 1H, 7‘‘-H), 6.46 (d, $^{3}J_{7,6}$ = 8.0 Hz, 1H, 7-H), 5.93 (dd, $^{3}J_{3''',4'''}$ = 17.4, 10.6 Hz, 1H, 3‘‘‘-H), 5.19 (s, 1H, 2-H/2‘‘-H), 5.18 (s, 1H, 2‘‘-H/2-H), 5.01 (s, 1H, N-H), 4.01 – 4.96 (m, 2H, 4‘‘‘-H), 4.94 (s, 1H, N-H), 4.02 – 3.94 (m, 2H, 2’-H/5’-H), 2.70 (app. ddd, *J* = 12.7, 8.8, 6.0 Hz, 2H, 1’-H/8’-H), 2.26 (app. dt, *J* = 12.7, 10.6 Hz, 2H, 1’-H/8’-H), 1.44 (s, 3H, 3b-H/3‘‘b-H), 1.43 (s, 3H, 3‘‘b-H/3b-H), 1.31 (s, 6H, 1‘‘‘/1‘‘‘b-H).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 167.0 (C-3’/6’), 166.7 (C-6’/3’), 148.6 (C-3‘‘‘),148.4 (C-7a/7‘‘a), 146.3 (C-7‘‘a/7a), 140.4 (C-5), 132.2 (C-3a/3‘‘a), 132.1 (C-3‘‘a/3a), 128.8 (C-6), 126.5 (C-6‘‘), 122.7 (C-4‘‘), 120.4 (C-4), 119.8 (C-5‘‘), 110.4 (C-4‘‘‘), 109.6 (C-7‘‘), 109.2 (C-7), 81.7 (C-2/2‘‘), 81.3 (C-2‘‘/2), 60.7 (C-2’/5’), 60.7 (C-5’/2’), 52.2 (C-3/3‘‘), 52.1 (C-3‘‘/3), 40.9 (C-2‘‘‘), 39.9 (C-1’/8’), 39.9 (C-8’/1’), 28.7 (C-1‘‘‘/1‘‘‘b), 28.6 (1‘‘‘b/1‘‘‘), 24.2 (C-3b/3‘‘b), 24.1 (C-3‘‘b/3b).

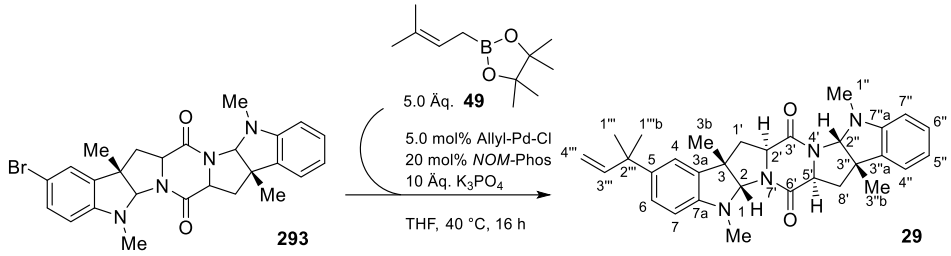
Die $CDCl_3$-Spektren wurden nach der Messung der CD_3OD-Messungen aufgenommen und enthalten auffälligerweise zusätzliche Signale im Hochfeld. Daher scheint der Prozess der Zugabe sowie des Entfernens von Lösungsmittel die Verbindungen zu einem gewissen Grad degradieren zu lassen, was die beobachteten Verunreinigungen im NMR erklärt.

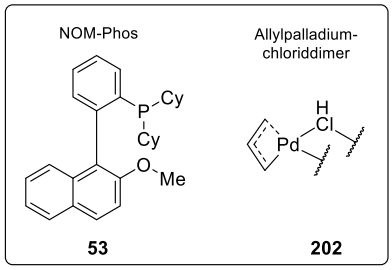
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{29}H_{32}N_4O_2+H^+$: 469.2598 $[M+H]^+$; gef.: 469.2600.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3356 (br), 2961 (w), 2929 (w), 2869 (w), 1659 (vs), 1611 (m), 1485 (m), 1420 (s), 1290 (m), 1191 (m), 1164 (m), 908 (s), 729 (vs).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -578 (c = 0.166, $CHCl_3$).

29 Lansai-B (5-Prenyl-*N,N''*-dimethyl-cH$_S$H$_S$-DKP)





Unter Argon wurden Allylpalladiumchlorid **202** (0.54 mg, 1.5 µmol, 8.0 mol%), NOMPhos **53** (2.5 mg, 5.9 µmol, 30 mol%) und Kaliumcarbonat (62 mg, 0.30 mmol, 10 Äq.) in ein Schlenk-Rohr gegeben. Prenyl-Boronsäureester **49** (29.0 mg, 0.15 mmol, 7.5 Äq.) und 5-Brom-*N,N''*-Dimethyl-cH$_S$H$_S$-DKP **293** (10 mg, 19 µmol, 1.0 Äq.) wurden jeweils in entgastem THF (1 mL, *freeze-pump-thawed*) gelöst und in den Reaktionskolben gegeben. Entgastes Wasser (1 mL, *freeze-pump-thawed*) wurde hinzugefügt und das Reaktionsgemisch bei 40 °C für 16 h gerührt. Anschließend wurde mit EE (10 mL) und wässriger, gesättigter NaCl-Lösung (5 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/PE: 1/1) und Lansai-B (**29**) als Reaktionsprodukt erhalten.

Ausbeute: 4.0 mg, 8.0 µmol, 41 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.12 – 7.08 (m, 1H, 4''-H), 7.07 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.1, $^4J_{6,4}$ = 1.9 Hz, 1H, 6-H), 7.04 (dd, $^3J_{6'',5''}$ = 7.4 Hz, $^4J_{6'',4''}$ = 1.3 Hz, 1H, 6''-H), 7.01 (d, $^4J_{4,6}$ = 1.9 Hz, 1H, 4-H), 6.72 (t, $^3J_{5'',4'',6''}$ = 7.4 Hz, 1H, 3''-H), 6.34 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 7.9 Hz, 1H, 7''-H), 6.27 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.1 Hz, 1H, 7-H), 5.96 (dd, $^3J_{3''',4'''}$ = 17.4, $^3J_{3''',4'''}$ = 10.6 Hz, 1H, 3'''-H), 5.44 (s, 1H, 2''-H), 5.42 (s, 1H, 2-H), 5.01 (dd, $^3J_{4''',3'''}$ = 17.0 Hz, $^2J_{4''',4'''}$ = 1.4 Hz, 1H, 4'''-H$_a$), 4.98 (d, $^3J_{4''',3'''}$ = 10.3 Hz, $^2J_{4''',4'''}$ = 1.4 Hz, 1H, 4'''-H$_b$), 4.19 – 4.11 (m, 2H, 2'-H, 5'-H), 2.97 (s, 3H, 1''a-H), 2.95 (s, 3H, 1a-H), 2.70 (app. ddd, *J* = 12.7, 6.0, 4.2 Hz, 2H, 1'a-H, 8'a-H), 2.24 – 2.13 (m, 2H, 1'a-H, 8'b-H), 1.47 (s, 3H, 3b-H), 1.46 (s, 3H, 3''b-H), 1.34 (s, 6H, 1'''-H, 1'''b-H).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 165.9 (C-3'), 165.7 (C-6'), 150.3 (C-7''a), 148.7 (C-3'''), 148.4 (C-7a), 138.8 (C-5), 133.0 (C-3a), 132.9 (C-3''a), 128.9 (C-4''), 126.4 (C-6), 122.5 (C-6''), 120.4 (C-4), 118.2 (C-5''), 110.3 (C-4'''), 106.0 (C-7''), 105.5 (C-7), 87.0 (C-2''), 86.7 (C-2), 60.3 (C-5'), 60.3 (C-2'), 50.6 (C3), 50.4 (C-3''), 42.9 (C-8'), 42.8 (C-1'), 40.8 (C-2'''), 33.3 (C-1a), 33.1 (C-1''), 28.7 (C-1'''), 28.7 (C-1'''b), 25.6 (C-3''b), 25.6 (C-3b).

^{1}H-NMR (700 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.12 – 7.10 (m, 1H, 4''-H), 7.09 (dd, $^{3}J_{6,7}$ = 8.1, $^{4}J_{6,4}$ = 1.6 Hz, 1H, 6-H), 7.04 (dd, $^{3}J_{6'',5''}$ = 7.4 Hz, $^{4}J_{6'',4''}$ = 1.3 Hz, 1H, 6''-H), 7.03 (d, $^{4}J_{4,6}$ = 1.9 Hz, 1H, 4-H), 6.72 (td, $^{3}J_{5'',4'',6''}$ = 7.4, $^{4}J_{4'',6''}$ = 0.9 Hz, 1H, 5''-H), 6.37 (d, $^{3}J_{7,6}$ = 7.9 Hz, 2H, 7-H), 6.37 (d, $^{3}J_{7'',6''}$ = 7.9 Hz, 2H, 7''-H), 5.96 (dd, $^{3}J_{3''',4'''}$ = 17.4, $^{3}J_{3''',4'''}$ = 10.6 Hz, 1H, 3'''-H), 5.44 (s, 1H, 2''-H), 5.43 (s, 1H, 2-H), 5.02 (d, $^{3}J_{4''',3'''}$ = 17.3 Hz, $^{2}J_{4''',4'''}$ = 1.4 Hz, 1H, 4'''-H_a), 5.00 (dd, $^{3}J_{4''',3'''}$ = 10.5 Hz, $^{2}J_{4''',4'''}$ = 1.5 Hz, 1H, 4'''-H_b), 4.22 (ddd, $^{3}J_{2',1'}$ = 11.1 Hz, $^{3}J_{2',1'}$ = 6.2, $^{4}J_{2',2}$ = 1.9 Hz, 1H, 2'-H), 4.18 (ddd, $^{3}J_{5',8'}$ = 11.1 Hz, $^{3}J_{5',8'}$ = 6.1 Hz, $^{4}J_{5',2''}$ = 2.0 Hz, 1H, 5'-H), 2.98 (s, 3H, 1''a-H), 2.97 (s, 3H, 1a-H), 2.70 (app. ddd, *J* = 12.8, 6.1, 3.3 Hz, 2H, 1'a-H, 8'a-H), 2.19 (app. ddd, *J* = 12.9, 11.1, 2.2 Hz, 2H, 1'b-H, 8'b-H), 1.48 (s, 3H, 3b-H), 1.47 (s, 3H, 3''b-H), 1.35 (s, 6H, 1'''-H, 1'''b-H).

^{13}C NMR (176 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 165.9 (C-3'), 165.9 (C-6'), 150.0 (C-7''a), 148.5 (C-3'''), 147.4 (C-7a), 140.0 (C-5), 133.4 (C-3a), 133.1 (C-3''a), 128.9 (C-4''), 126.6 (C-6), 122.5 (C-6''), 120.5 (C-4), 118.5 (C-5''), 110.5 (C-4'''), 106.7 (C-7''), 106.3 (C-7), 87.3 (C-2''), 86.8 (C-2), 60.3 (C-5'), 60.3 (C-2'), 50.7 (C-3), 50.5 (C-3''), 42.8 (C-8'), 42.8 (C-1'), 40.9 (C-2'''), 33.3 (C-1a/C-1''a), 29.9 (C-1'''), 28.6 (C-1'''a), 25.7 (C-3''b), 25.6 (C-3b).

Die 700 MHz-Spektren wurden einige Tage nach der Messung der 600 MHz-Messungen aufgenommen und enthalten auffälligerweise zusätzliche Signale im Hochfeld. Innerhalb dieses Zeitraums verblieb die Verbindung unangetastet in $CDCl_3$. Die Verbindung scheint dabei zu einem gewissem Grad zu degradieren, was die beobachteten Signale erklärt.

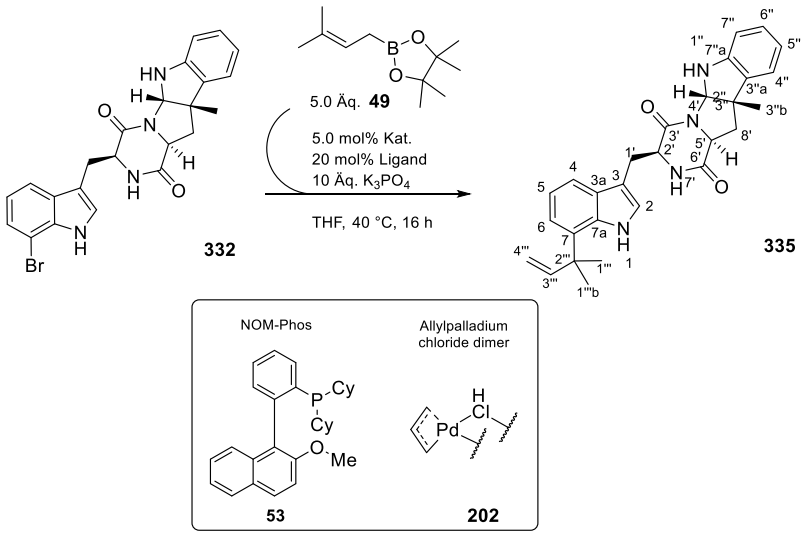
HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{31}H_{36}N_4O_2$+H^+: 497.2911 $[M+H]^+$; gef.: 497.2916.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2967 (m), 2924 (s), 2848 (m), 1735 (m), 1668 (vs), 1602 (m), 1494 (s), 1416 (s), 1299 (s), 1207 (s), 1163 (s), 1083 (m), 1004 (m), 909 (m), 814 (w), 733 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -531 (c = 0.268, $CHCl_3$), Lit.: $[\alpha]_D^{25}$ = -505 (c = 0.12, $CHCl_3$).[219]

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein.[62, 219]

335 (3*S*,5a*S*,10b*S*,11a*S*)-10b-Methyl-3-((7-(2-methylbut-3-en-2-yl)-1*H*-indol-3-yl)methyl)-2,3,6,10b,11,11a-hexahydro-4*H*-pyrazino[1',2':1,5]pyrrolo[2,3-*b*]indol-1,4(5a*H*)-dion (7-Prenyl-cW$_S$H$_S$-DKP)



Unter Argon wurden Allylpalladiumchlorid **202** (0.79 mg, 2.2 µmol, 5.0 mol%), NOMPhos **53** (3.7 mg, 8.6 µmol, 20 mol%) und Kaliumcarbonat (91 mg, 0.43 mmol, 10 Äq.) in ein Schlenk-Rohr gegeben. Prenyl-Boronsäureester **49** (42 mg, 0.21 mmol, 7.5 Äq.) und **7**-Brom-cH$_S$H$_S$-DKP **332** (20 mg, 43 µmol, 1.0 Äq.) wurden jeweils in entgastem THF (1 mL, *freeze-pump-thawed*) gelöst und in den Reaktionskolben gegeben. Entgastes Wasser (1 mL, *freeze-pump-thawed*) wurde hinzugefügt und das Reaktionsgemisch bei 40 °C für 16 h gerührt. Anschließend wurde mit EE (10 mL) und wässriger, gesättigter NaCl-Lösung (5 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch von Verunreinigungen befreit (EE/PE: 1/1) und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 15.9 mg, 34 µmol, 81 %.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.55 (s, 1H, 1-NH), 7.46 (d, $^3J_{6,5}$ = 7.7 Hz, 1H, 6-H), 7.19 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.1 Hz, 1H, 4-H), 7.12 (d, $^3J_{4'',5''}$ = 7.5 Hz, 1H, 4''-H), 7.10 – 7.02 (m, 3H, 2-H, 5-H, 6''-H) 6.78 (t, $^3J_{5'',6'',4''}$ = 7.4 Hz, 1H, 5''-H), 6.63 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 7.9 Hz, 1H, 7''-H), 6.22 (dd, $^3J_{3''',4'''}$ = 17.6, $^3J_{3''',4'''}$ = 10.5 Hz, 1H, 3'''-H), 5.79 (s, 2H, 5'-NH, 7'-NH), 5.44 – 5.23 (m, 2H, 4'''-H$_a$, 4'''-H$_b$), 4.31 (d, $^3J_{2',1'}$ = 10.4 Hz, 1H, 2'-H), 3.97 (dd, $^3J_{5',8'}$ = 11.2, $^3J_{5',8'}$ = 6.0 Hz, 1H, 5'-H), 3.68 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 15.0 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 3.6 Hz, 1H, 1'-H$_a$), 2.99 (dd, $^2J_{1',1'}$ = 14.9 Hz, $^3J_{1',2'}$ = 10.5 Hz, 2H, 1'-H$_a$), 2.66 (dd, $^2J_{8',8'}$ = 12.7 Hz, $^3J_{8',5'}$ = 6.1 Hz, 1H, 8'-H$_b$), 2.26 – 1.98 (m, 1H, 8'-H$_a$), 1.52 (s, 6H, 1'''-H, 1'''b-H), 1.39 (s, 3H, 3''b-H).

^{13}C-NMR (76 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 169.0 (C-6'), 166.3 (C-3'), 148.9 (C-3'''), 148.6 (C-7''a), 135.1 (C-7a), 132.3 (C-3''a), 131.2 (C-7), 128.8 (C-2), 127.5 (C-3a), 123.1 (C-6''), 122.9 (C-5), 120.3 (C-4''), 119.7 (C-5''), 119.3 (C-4), 117.3 (C-6), 111.9 (C-4'''), 109.5 (C-7''), 109.2 (C-3),

81.6 (C-2''), 59.2 (C-5'), 54.8 (C-2'), 51.8 (C-3''), 41.1 (C-2'''), 40.9 (C-8'), 27.4 (C-1'), 27.1 (C-1''b), 27.1 (C-1'''), 24.5 (C-3b).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{28}H_{30}N_4O_2$+H$^+$: 455.2442 [M+H]$^+$; gefunden: 455.2440.

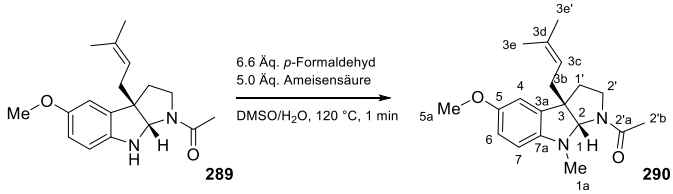
IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 3453 (br), 3338 (br), 2963 (m), 2926 (m), 2869 (w), 1738 (m), 1669 (vs), 1618 (m), 1440 (s), 1367 (m), 1211 (m), 1091 (m), 1065 (m), 747 (m).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -150.0 (c = 0.024, MeOH).

7.3.4.4. *N*-Methylierung

290 1-((3a*S*,8a*S*)-5-Methoxy-8-methyl-3a-(3-methylbut-2-en-1-yl)-3,3a,8,8a-tetrahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-1(2*H*)-yl)ethan-1-on

Das Modellsubstrat **289** wurde von M. Haase zur Verfügung gestellt.



Das Pyrroloindol **289** (9.0 mg, 30 µmol, 1.0 Äq.) wurde in einem Mikrowellenröhrchen in DMSO (0.2 mL) gelöst. *p*-Formaldehyd (4.3 µL, 0.20 mmol, 6.7 Äq.) und Ameisensäure (5.6 µL, 0.15 mmol, 5.0 Äq.) wurden hinzugegeben und das Reaktionsgemisch unter Bestrahlung durch Mikrowellen (120 W) auf eine Temperatur von 120 °C erhitzt. Nachdem die Reaktion abgekühlt ist, wurde mit DCM (3 mL) und wässriger, gesättigter NaCl-Lösung (2 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit EE extrahiert (3 x 5 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über eine kurze Silica-Säule (EE/PE: 1/1) von Verunreinigungen befreit, um den Großteil der Verunreinigungen zu entfernen und das Rohprodukt zu erhalten.

Ausbeute: 5.1 mg, 16 µmol, 54 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 6.70 (d, $^4J_{4,6}$ = 2.6 Hz, 1H, 4-H), 6.68 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.4, $^4J_{6,4}$ 2.6 Hz, 1H, 6-H), 6.37 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 5.31 (s, 1H, 2-H), 5.03 (ddd, $^3J_{3c,3b}$ = 9.1 Hz, $^3J_{3c,3b}$ = 5.2 Hz, $^3J_{3c,3e/3e'}$ = 1.5 Hz, 1H, 3c-H), 3.72 (s, 3H, 5a-H), 3.23 (app. ddd, *J* = 10.6 Hz, 9.2 Hz, 7.2 Hz, 1H, 2'-H), 2.89 (s, 3H, 1a-H), 2.43 (d, $^3J_{3b,3c}$ = 7.7 Hz, 2H, 3b-H), 2.13 (app. dd, *J* = 6.6, 3.2 Hz, 2H, 1'-H), 2.08 (s, 3H, 2'b-H), 1.66 (d, $^4J_{3e,3c}$ = 1.5 Hz, 3H, 3e'-H), 1.57 (d, $^4J_{3e,3c}$ = 1.4 Hz, 3H, 3e-H).

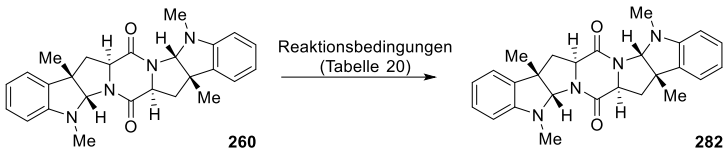
^{13}C-NMR (76 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 172.8 (C-2'a), 154.8 (C-5), 147.0 (C-7a), 135.7 (C-3d), 135.5 (C-3a), 120.8 (C-3c), 114.3 (C-6), 111.0 (C-4), 108.5 (C-7), 86.9 (C-2), 57.3 (C-3), 56.4 (C-5a), 48 (C-2'), 38.1 (C-1'), 37.3 (C-3b), 35.5 (C-1a), 26.1 (C-3e), 22.6 (C-2'b), 18.1 (C-3e').

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 2932 (br), 1649 (vs), 1496 (vs), 1407 (vs), 1277 (m), 1216 (m), 1031 (s), 857 (w), 803 (w).

MS (APCI): *m/z* ber. für $C_{19}H_{26}N_2O_2$+H$^+$: 315.2 [M+H]$^+$; gef.: 315.1.

282 *N,N''*-Dimethyl-c$H_S H_S$-DKP
(3a*S*,8a*R*)-3a,8-dimethyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-
(3a*S*,8a*R*)-3a,8-dimethyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-
(3*S,6S*)-2,5-diketopiperazin

Das Modellsubstrat **260** wurde von M. Haase zur Verfügung gestellt.



260 **282**

Das Pyrroloindol **260** (5 mg, 12 µmol, 1.0 Äq.) wurde im entsprechenden Lösungsmittel (1 mL). Unter Rühren wurden die weiteren Reagenzien hinzugegeben und die Reaktion für die beschriebene Zeit bei der genannten Temperatur gerührt (siehe Tabelle 20). Der Reaktionserfolg wurde mittels DC und MS überwacht. Nach der angegebenen Reaktionszeit wurde den Reaktionen wässrige, gesättigte NaCl-Lösung (1 mL) zugegeben und die wässrige Phase mit EE (4 x 1 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Nach chromatographischer Aufreinigung (PE/EE: 2/1) wurde das *N*-methylierte Produkt **282** erhalten.

Tabelle 20: Reaktionsbedingungen für die *N*-Methylierung des unsubstituierten c$H_S H_S$-DKP **244**.

	LM	Reagenz 1	Reagenz 2	Zeit	Temp. [°C]	Ausbeute
1	DSMO 1:1 H_2O	*p*- Formaldehyd (10 Äq.)	Ameisen-säure (3.0 Äq.)	1 min	120[1]	Isoliert: 5%
2	THF	MeI (10 Äq.)	KO*t*Bu (2.5 Äq.)	16 + 4 h	23 später 40	Isoliert: 11%
3[2]	DCM	Me_3OBF_4 (**291**) (8.0 Äq.)	1,8-Bis(N,N-dimethylamino)-naphthalin (**292**) (10.0 Äq.)	1.5 h	RT	Isoliert: 72 %

[1]Erhitzen mittels Mikrowelle. [2] Erhöhter Maßstab des Substrats (18.2 mg, 46 µmol)

Es wurden zudem weitere Reaktionsbedingungen getestet, welche in Kapitel 5.3.3.2 – Tabelle 4 gezeigt sind. Reaktionen, für die qNMRs angegeben sind, wurden ebenfalls wässrig aufgearbeitet (Zugabe von 1 mL wässriger, gesättigter NaCl-Lösung) und mit EE (4 x 1 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt. Das qNMR wurde mit Trimethoxybenzol (2-3 mg) als internem Standard durchgeführt und die Menge des erhaltenen Produkts anhand des Integrals des *N*-Methyl-Signals berechnet.

Ausbeute: 14 mg, 32 µmol, 72 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.09 (t, $^3J_{6,5,7}$ = 7.6 Hz, 2H, 6-H), 7.04 (d, $^3J_{4,5}$ = 7.3 Hz, 2H, 4-H), 6.70 (t, $^3J_{5,4,6}$ = 7.4 Hz, 2H, 5-H), 6.34 (d, $^3J_{7,6}$ = 7.8 Hz, 2H, 7-H), 5.44 (s, 2H, 2-H), 4.16

(dd, $^{3}J_{2',1'}$ = 11.0 Hz, $^{3}J_{2',1'}$ = 6.0 Hz, 2H, 2'-H), 2.97 (s, 6H, 1a-H), 2.70 (dd, $^{2}J_{1',1'}$ = 12.8 Hz, $^{3}J_{1',2'}$ = 5.9 Hz, 2H, 1'-H_b), 2.17 (dd, $^{2}J_{1',1'}$ = 11.9 Hz, $^{3}J_{1',2'}$ = 11.9 Hz, 2H, 1'-H_a), 1.47 (s, 6H, 3b-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 167.8 (C-3'), 151.6 (C-7a), 134.6 (C-3a), 129.7 (C-4), 123.3 (C-6), 119.3 (C-5), 107.1 (C-7), 88.1 (C-2), 61.2 (C-2'), 51.5 (C-3), 43.6 (C-1'), 33.3 (C-1a), 25.8 (C-3b).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{26}H_{28}N_4O_2$+H^+: 429.2285 $[M+H]^+$; gef.: 429.2285.

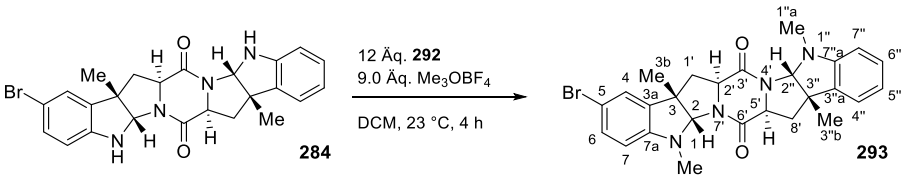
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -437 (c = 0.200, MeOH).

Schmelzpunkt: 148 °C.

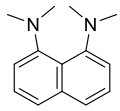
---

293 5-Brom-*N,N''*-dimethyl-c$H_S$$H_S$-DKP

(3aS,8aR)-5-Brom-3a,8-dimethyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol (3aS,8aR)-3a,8-dimethyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-(3*S,6S*)-2,5-diketopiperazin



1,8-Bis(*N,N*-dimethylamino)-naphthalin



292

Unter Argon wurde das 5-Br- c$H_S$$H_S$-DKP **284** (20 mg, 41 µmol, 1.0 Äq.) in DCM (2 mL) gelöst und bei 23 °C gerührt. 1,8-Bis(*N,N*-dimethylamino)-naphthalin (**292**) (36 mg, 0.17 mmol, 4.0 Äq.) und Trimethyloxoniumtetraflouroborat (**291**) (18 mg, 0.13 mmol, 3.0 Äq.) wurden hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 1.5 h gerührt. Über einen Zeitraum von 4 weiteren Stunden wurden zusätzliche Äquivalente des 1,8-Bis(*N,N*-dimethylamino)-naphthalins (**292**) (insgesamt 12.0 Äq.) und Trimethyloxoniumtetraflouroborats (**291**) (insgesamt 9.0 Äq.) in kleinen Portionen hinzugegeben. Die Reaktion wurde anschließend gestoppt, indem das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt wurde. Nach chromatographischer Aufreinigung (PE/EE: 1/1) wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 7 mg, 14 µmol, 33 %.

(Es wurde zudem das unveränderte Edukt sowie das einfach methylierte Intermediat reisoliert.)

^{1}H-NMR (600 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.21 (d, $^{4}J_{4,6}$ = 2.0 Hz, 1H, 4-H), 7.15 (dd, $^{3}J_{6,7}$ = 8.3 Hz, $^{4}J_{6,4}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 7.08 (dd, $^{3}J_{4'',5''}$ = 7.4 Hz, $^{4}J_{4'',6''}$ = 1.2 Hz, 1H, 4''-H), 7.05 (td, $^{3}J_{6'',5'',4''}$ = 7.7 Hz, $^{4}J_{6'',4''}$ = 1.2 Hz, 1H, 6''-H), 6.67 (td, $^{3}J_{5'',6'',4''}$ = 7.4 Hz, $^{4}J_{5'',7''}$ = 1.0 Hz, 1H, 5''-H), 6.38 (d, $^{3}J_{7'',6''}$ = 7.8 Hz, 1H, 7''-H), 6.29 (d, $^{3}J_{7,6}$ = 8.3 Hz, 1H, 7-H), 5.40 (s, 1H, 2-H), 5.38 (s, 1H, 2''-H), 4.27 – 4.09 (m, 2H, 2'-H/5'-H), 2.95 (s, 3H, 1''a-H), 2.92 (s, 3H, 1a-H), 2.59 (app. ddd, *J* = 13.5, 7.8, 6.1 Hz,

2H, 1‘-H/8‘-H), 2.20 (app. ddd, *J* = 12.5, 11.2, 4.9 Hz, 2H, 8‘-H/1‘-H), 1.43 (s, 3H, 3‘‘b/3‘‘a-H), 1.42 (s, 3H, 3‘‘b/3‘‘a-H).

^{13}C-NMR (151 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 167.8 (C-6‘/3‘), 167.6 (C-3‘/6‘), 151.6 (C-4‘‘), 150.8 (C-4), 137.2 (C-3a), 134.6 (C-3‘‘a), 132.4 (C-6), 129.8 (C-6‘‘), 126.6 (C-4), 123.3 (C-4‘‘), 119.3 (C-5‘‘), 110.4 (C-5), 108.4 (C-7), 107.1 (C-7‘‘), 88.1 (C-2/2’), 88.0 (C-2’/2), 61.2 (C-2’/5’), 61.1 (C-5’/2’), 51.6 (C-3/3‘‘), 43.5 (C-1’/8’), 43.4 (C-1’/8’), 33.3 (C-1a/1‘‘a), 33.2 (C-1a/1‘‘a), 25.8 (C-3b/3‘‘b), 25.7 (C-3b/3‘‘b).

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.17 (dd, $^{3}J_{6,7}$ = 8.3, $^{5}J_{6,4}$ = 2.0 Hz, 1H, 6-H), 7.11 (d, $^{4}J_{4,6}$ = 2.1 Hz, 1H, 4-H), 7.09 (td, $^{3}J_{6‘‘,5‘‘,7‘‘}$ = 7.7 Hz, $^{4}J_{6‘‘,4‘‘}$ = 1.3 Hz, 1H, 6‘‘-H), 7.04 (dd, $^{3}J_{4‘‘,5‘‘}$ = 7.4 Hz, $^{4}J_{4‘‘,6‘‘}$ = 1.2 Hz, 1H, 4‘‘-H), 6.70 (t, $^{3}J_{5‘‘,6‘‘,7‘‘}$ = 7.4 Hz, 1H, 5‘‘-H), 6.34 (d, $^{3}J_{7,6}$ = 7.8 Hz, 1H, 7-H), 6.20 (d, $^{3}J_{7‘‘,6‘‘}$ = 8.3 Hz, 1H, 7‘‘-H), 5.43 (s, 2H, 2-H/2‘‘-H), 4.16 (dd, $^{3}J_{2‘/5‘,1‘/8‘}$ = 11.1 Hz, 5.9 Hz, 2H, 2‘-H, 5‘-H), 2.97 (s, 3H, 1‘‘a-H), 2.94 (s, 3H, 1a-H), 2.70 (dd, $^{2}J_{1‘,1‘}$ =12.9 Hz, $^{3}J_{1‘,2‘}$ = 6.2 Hz, 1H, 1‘-H_a), 2.67 (dd, $^{2}J_{8‘,8‘}$ = 13.0 Hz, $^{3}J_{8‘,8‘}$ = 6.2 Hz, 1H, 8’-H_a), 2.17 (dd, $^{2}J_{8‘,8‘}$ = 13.7 Hz, $^{3}J_{8‘,5‘}$ = 2.4 Hz, 1H, 8’-H_b), 2.16 (dd, $^{2}J_{8‘,8‘}$ = 13.6 Hz, $^{3}J_{8‘,5‘}$ = 2.4 Hz, 1H, 8’-H_b), 1.47 (s, 3H, 3b-H/3‘‘b-H), 1.46 (s, 3H, 3b-H/3‘‘b-H).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 165.7 (C-6‘/3‘), 165.4 (C-3‘/6‘), 150.3 (C-4‘‘), 149.3 (C-4), 135.4 (C-3‘‘a), 133.0 (C-3a), 131.5 (C-6), 128.9 (C-6‘‘), 125.7 (C-4), 122.5 (C-4‘‘), 118.2 (C-5‘‘), 109.6 (C-5), 107.3 (C-7‘‘), 106.0 (C-7), 86.7 (C-2/2’), 86.6 (C-2/2’), 60.3 (C-2’/5’), 60.2 (C-2’/5’), 50.4 (C-3/3‘‘), 50.4 (C-3/3‘‘), 42.8 (C-1’/8’), 42.7 (C-1’/8’), 33.1 (C-1a/1‘‘a), 33.0 (C-1a/1‘‘a), 25.5 (C-3b/3‘‘b), 25.4 (C-3b/3‘‘b).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{26}H_{28}N_4O_2Br+H^+$: 507.1390 $[M+H]^+$; gef.: 507.1393.

IR (ATR): ṽ [cm^{-1}] = 2951 (w), 2924 (w), 2864 (w), 1741 (m), 1667 (vs), 1606 (m), 1492 (s), 1418 (s), 1294 (m), 1210 (m), 1163 (m), 1082 (w), 1001 (w), 806 (w), 746 (w).

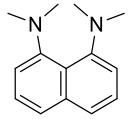
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -396 (c = 0.643, $CHCl_3$)

---

29 Lansai-B (5-Prenyl-*N,N‘‘*-dimethyl-cH_SH$_S$-DKP)



(1,8-Bis(*N,N*-dimethylamino)-naphthalin)



292

Unter Argon wurde das 5-Prenyl-cH_SH$_S$-DKP **281** (4 mg, 8.5 µmol,1.0 Äq.) in DCM (2 mL) gelöst und bei 23 °C gerührt. 1,8-Bis(*N,N*-dimethylamino)-naphthalin (**292**) (7.2 mg, 34 µmol, 4.0 Äq.) und Trimethyloxoniumtetraflouroborat (**291**) (3.7 mg, 26 µmol, 3.0 Äq.) wurden hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 1.5 h gerührt. Über einen Zeitraum von weiteren 5 Stunden wurden zusätzliche Äquivalente des 1,8-Bis(*N,N*-dimethylamino)-naphthalins (**292**)

(insgesamt 8.0 Äq.) und Trimethyloxoniumtetraflouroborats (**291**) (insgesamt 7.0 Äq.) in kleinen Portionen hinzugegeben, bis kein Edukt oder Intermediat mittels DC mehr beobachtet werden konnte. Die Reaktion wurde anschließend gestoppt, indem das Lösungsmittel an vermindertem Druck entfernt wurde. Nach chromatographischer Aufreinigung (PE/EE: 1/1) wurde das *N*-dimethylierte Produkt Lansai-B (**29**) als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3.4 mg, 6.7 µmol, 80 %.

^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.12 – 7.08 (m, 1H, 4''-H), 7.07 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.1, $^4J_{6,4}$ = 1.9 Hz, 1H, 6-H), 7.04 (dd, $^3J_{6'',5''}$ = 7.4 Hz, $^4J_{6'',4''}$ = 1.3 Hz, 1H, 6''-H), 7.01 (d, $^4J_{4,6}$ = 1.9 Hz, 1H, 4-H), 6.72 (t, $^3J_{5'',4'',6''}$ = 7.4 Hz, 1H, 3''-H), 6.34 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 7.9 Hz, 1H, 7''-H), 6.27 (d, $^3J_{7,6}$ = 8.1 Hz, 1H, 7-H), 5.96 (dd, $^3J_{3''',4'''}$ = 17.4, $^3J_{3''',4'''}$ = 10.6 Hz, 1H, 3'''-H), 5.44 (s, 1H, 2''-H), 5.42 (s, 1H, 2-H), 5.01 (dd, $^3J_{4''',3'''}$ = 17.0 Hz, $^2J_{4''',4'''}$ = 1.4 Hz, 1H, 4'''-H_a), 4.98 (d, $^3J_{4''',3'''}$ = 10.3 Hz, $^2J_{4''',4'''}$ = 1.4 Hz, 1H, 4'''-H_b), 4.19 – 4.11 (m, 2H, 2'-H, 5'-H), 2.97 (s, 3H, 1''a-H), 2.95 (s, 3H, 1a-H), 2.70 (app. ddd, *J* = 12.7, 6.0, 4.2 Hz, 2H, 1'a-H, 8'a-H), 2.24 – 2.13 (m, 2H, 1'a-H, 8'b-H), 1.47 (s, 3H, 3b-H), 1.46 (s, 3H, 3''b-H), 1.34 (s, 6H, 1'''-H, 1'''b-H).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 165.9 (C-3'), 165.7 (C-6'), 150.3 (C-7''a), 148.7 (C-3'''), 148.4 (C-7a), 138.8 (C-5), 133.0 (C-3a), 132.9 (C-3''a), 128.9 (C-4''), 126.4 (C-6), 122.5 (C-6''), 120.4 (C-4), 118.2 (C-5''), 110.3 (C-4'''), 106.0 (C-7''), 105.5 (C-7), 87.0 (C-2''), 86.7 (C-2), 60.3 (C-5'), 60.3 (C-2'), 50.6 (C3), 50.4 (C-3''), 42.9 (C-8'), 42.8 (C-1'), 40.8 (C-2'''), 33.3 (C-1a), 33.1 (C-1''), 28.7 (C-1'''), 28.7 (C-1'''b), 25.6 (C-3''b), 25.6 (C-3b).

^{1}H-NMR (700 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.12 – 7.10 (m, 1H, 4''-H), 7.09 (dd, $^3J_{6,7}$ = 8.1, $^4J_{6,4}$ = 1.6 Hz, 1H, 6-H), 7.04 (dd, $^3J_{6'',5''}$ = 7.4 Hz, $^4J_{6'',4''}$ = 1.3 Hz, 1H, 6''-H), 7.03 (d, $^4J_{4,6}$ = 1.9 Hz, 1H, 4-H), 6.72 (td, $^3J_{5'',4'',6''}$ = 7.4, $^4J_{4'',6''}$ = 0.9 Hz, 1H, 5''-H), 6.37 (d, $^3J_{7,6}$ = 7.9 Hz, 2H, 7-H), 6.37 (d, $^3J_{7'',6''}$ = 7.9 Hz, 2H, 7''-H), 5.96 (dd, $^3J_{3''',4'''}$ = 17.4, $^3J_{3''',4'''}$ = 10.6 Hz, 1H, 3'''-H), 5.44 (s, 1H, 2''-H), 5.43 (s, 1H, 2-H), 5.02 (d, $^3J_{4''',3'''}$ = 17.3 Hz, $^2J_{4''',4'''}$ = 1.4 Hz, 1H, 4'''-H_a), 5.00 (dd, $^3J_{4''',3'''}$ = 10.5 Hz, $^2J_{4''',4'''}$ = 1.5 Hz, 1H, 4'''-H_b), 4.22 (ddd, $^3J_{2',1'}$ = 11.1 Hz, $^3J_{2',1'}$ = 6.2, $^4J_{2',2}$ = 1.9 Hz, 1H, 2'-H), 4.18 (ddd, $^3J_{5',8'}$ = 11.1 Hz, $^3J_{5',8'}$ = 6.1 Hz, $^4J_{5',2''}$ = 2.0 Hz, 1H, 5'-H), 2.98 (s, 3H, 1''a-H), 2.97 (s, 3H, 1a-H), 2.70 (app. ddd, *J* = 12.8, 6.1, 3.3 Hz, 2H, 1'a-H, 8'a-H), 2.19 (app. ddd, *J* = 12.9, 11.1, 2.2 Hz, 2H, 1'b-H, 8'b-H), 1.48 (s, 3H, 3b-H), 1.47 (s, 3H, 3''b-H), 1.35 (s, 6H, 1'''-H, 1'''b-H).

^{13}C NMR (176 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 165.9 (C-3'), 165.9 (C-6'), 150.0 (C-7''a), 148.5 (C-3'''), 147.4 (C-7a), 140.0 (C-5), 133.4 (C-3a), 133.1 (C-3''a), 128.9 (C-4''), 126.6 (C-6), 122.5 (C-6''), 120.5 (C-4), 118.5 (C-5''), 110.5 (C-4'''), 106.7 (C-7''), 106.3 (C-7), 87.3 (C-2''), 86.8 (C-2), 60.3 (C-5'), 60.3 (C-2'), 50.7 (C-3), 50.5 (C-3''), 42.8 (C-8'), 42.8 (C-1'), 40.9 (C-2'''), 33.3 (C-1a/C-1''a), 29.9 (C-1'''), 28.6 (C-1'''a), 25.7 (C-3''b), 25.6 (C-3b).

Die 700 MHz-Spektren wurden einige Tage nach der Messung der 600 MHz-Messungen aufgenommen und enthalten auffälligerweise zusätzliche Signale im Hochfeld. Innerhalb dieses Zeitraums verblieb die Verbindung unangetastet in $CDCl_3$. Die Verbindung scheint dabei zu einem gewissem Grad zu degradieren, was die beobachteten Signale erklärt.

HRMS (ESI): *m/z* ber. für $C_{31}H_{36}N_4O_2$+H$^+$: 497.2911 [M+H]$^+$; gef.: 497.2916.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2967 (m), 2924 (s), 2848 (m), 1735 (m), 1668 (vs), 1602 (m), 1494 (s), 1416 (s), 1299 (s), 1207 (s), 1163 (s), 1083 (m), 1004 (m), 909 (m), 814 (w), 733 (s).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -531 (c = 0.268, $CHCl_3$), Lit.: $[\alpha]_D^{25}$ = -505 (c = 0.12, $CHCl_3$).[219]

Die gemessenen Werte stimmen mit den publizierten Daten überein.[62, 219]

8. ANHANG

8.1. Quellenangaben

[1] K. Dörre, *Berl. J. Soziol.* **2020**, *30*, 165-190, doi.org/10.1007/s11609-020-00416-4; 'Die Corona-Pandemie – Eine Katastrophe mit Sprengkraft'.

[2] J. K. Taubenberger, D. M. Morens, *Rev. Biomed.* **2006**, *17*, 69-79, doi.org/10.3201/eid1201.050979; '1918 Influenza: the mother of all pandemics'.

[3] N. P. A. S. Johnson, J. Müller, *Bull. Hist. Med.* **2002**, *76*, 105-115, doi.org/10.1353/bhm.2002.0022; 'Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920" Spanish" influenza pandemic'.

[4] J. Osterhammel, *Die Verwandlung der Welt: Eine Geschichte des 19. Jahrhunderts*, CH Beck, 978-3-406-58283-7, München, **2010**.

[5] S. Maul, *Erste Medizinkonzepte zwischen Magie und Vernunft*, Chronik-Verlag, doi.org/10.11588/propylaeumdok.00000864, Dortmund, **1993**.

[6] D. A. Dias, S. Urban, U. Roessner, *Metabolites* **2012**, *2*, 303-336, doi.org/10.3390/metabo2020303; 'A historical overview of natural products in drug discovery'.

[7] H. Askitopoulou, I. A. Ramoutsaki, E. Konsolaki, *Int. Congr. Ser.* **2002**, *1242*, 23-29, doi.org/10.1016/S0531-5131(02)00769-0; 'Archaeological evidence on the use of opium in the Minoan world'.

[8] A. Salavert, A. Zazzo, L. Martin, F. Antolín, C. Gauthier, F. Thil, O. Tombret, L. Bouby, C. Manen, M. Mineo, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 20263, doi.org/10.1038/s41598-020-76924-3; 'Direct dating reveals the early history of opium poppy in western Europe'.

[9] A. Salavert, *Veg. Hist. Archaeobot.* **2011**, *20*, 321-332, doi.org/10.1007/s00334-011-0297-z; 'Plant economy of the first farmers of central Belgium (Linearbandkeramik, 5200–5000 BC)'.

[10] P. Diepgen, H. Goerke, *Kurze Übersichtstabelle zur Geschichte der Medizin, 7*, Springer, 3540024980, Berlin, Heidelberg, **1960**.

[11] R. J. Huxtable, S. K. Schwarz, *Mol. Interv.* **2001**, *1*, 189, PMID: 14993340; 'The isolation of morphine—first principles in science and ethics'.

[12] W. E. Gerabek, B. D. Haage, G. Keil, W. Wegner, *Enzyklopädie Medizingeschichte*, De Gruyter, 3110976943, Berlin, **2011**.

[13] G. Habermehl, P. Hammann, H. C. Krebs, W. Ternes, *Naturstoffchemie: eine Einführung*, Springer, 3540737332, Berlin, Heidelberg, **2008**.

[14] H. H. Voigt, *Naturwissenschaften in Göttingen: eine Vortragsreihe*, Vandenhoeck & Ruprecht, 9783525358436, **1988**.

[15] A. Fleming, *British journal of experimental pathology* **1929**, *10*, 226, PMCID: PMC2048009; 'On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae'.

[16] A. Jemal, E. Ward, Y. Hao, M. Thun, *JAMA* **2005**, *294*, 1255-1259, doi.org/10.1001/jama.294.10.1255; 'Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002'.

[17] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 770-803, doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285; 'Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019'.

[18] J. Paterson, J. Lawrence, *Qjm* **2001**, *94*, 445-448, doi.org/10.1093/qjmed/94.8.445; 'Salicylic acid: a link between aspirin, diet and the prevention of colorectal cancer'.

[19] H. Liu, H. Yu, J. Xia, L. Liu, G. J. Liu, H. Sang, F. Peinemann, *Cochrane Database Syst. Rev.* **2020**, doi.org/10.1002/14651858.CD011368.pub2; 'Topical azelaic acid, salicylic acid, nicotinamide, sulphur, zinc and fruit acid (alpha-hydroxy acid) for acne'.

[20] K. Witthauer, *Therapeutische Monatshefte* **1899**, *3*, 330, 'Aspirin, ein neues Salicylpräparat'.

[21] D. Lester, G. Lolli, L. A. Greenberg, *J. Pharmacol. Exper. Therap.* **1946**, *87*, 329, PMID: 20279252; 'The fate of acetylsalicylic acid'.

[22] K. Dzobo, in *Comprehensive Pharmacology*, Elsevier, 978-0-12-820876-2, doi.org/10.1016/B978-0-12-820472-6.00041-4, Amsterdam, **2022**, S. 408-422.

[23] O. T. Ebob, S. B. Babiaka, F. Ntie-Kang, *Nat. Prod. Bioprospect.* **2021**, *11*, 611-628, doi.org/10.1007/s13659-021-00317-w; 'Natural products as potential lead compounds for drug discovery against SARS-CoV-2'.

[24] P. Nuhn, *Chemie der Naturstoffe: Bioorganische Chemie*, De Gruyter, 9783112650882, doi.org/10.1515/9783112650882, Berlin, **2022**.

[25] A. Kossel, *Arch. Physiol.* **1891**, 181-186, 'Über die chemische Zusammensetzung der Zelle'.

[26] J. R. Hanson, *Natural products: the secondary metabolites, 17*, Royal Society of Chemistry, 0854044906, doi.org/10.1039/9781847551535, London, **2003**.

[27] M. Zaynab, M. Fatima, Y. Sharif, M. H. Zafar, H. Ali, K. A. Khan, *Microb. Pathog.* **2019**, *137*, 103728, doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103728; 'Role of primary metabolites in plant defense against pathogens'.

[28] M. Zaynab, M. Fatima, S. Abbas, Y. Sharif, M. Umair, M. H. Zafar, K. Bahadar, *Microb. Pathog.* **2018**, *124*, 198-202, doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034; 'Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens'.

[29] D. B. Kell, A. S. Kaprelyants, A. Grafen, *Trends Ecol. Evol.* **1995**, *10*, 126-129, doi.org/10.1016/S0169-5347(00)89013-8; 'Pheromones, social behaviour and the functions of secondary metabolism in bacteria'.

[30] P. Nuhn, *Naturstoffchemie: mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe*, De Gruyter, 3112572742, doi.org/10.1515/9783112572740, Berlin, **1990**.

[31] H. Tao, I. Abe, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2021**, *69*, 52-59, doi.org/10.1016/j.copbio.2020.11.016; 'Enzymology and biosynthesis of the orsellinic acid derived medicinal meroterpenoids'.

[32] J. E. S. Kitchin, M. K. Pomeranz, G. Pak, K. Washenik, J. L. Shupack, *J. Am. Acad. Dermatol.* **1997**, *37*, 445-449, doi.org/10.1016/S0190-9622(18)30747-3; 'Rediscovering mycophenolic acid: a review of its mechanism, side effects, and potential uses'.

[33] B. Schäfer, *Naturstoffe der chemischen Industrie*, Springer-Spektrum, 978-3-662-61017-6, Berlin, **2020**.

[34] C. R. Craig, R. E. Stitzel, *Modern pharmacology with clinical applications*, Lippincott Williams & Wilkins, 9780316159340, **2004**.

[35] K. J. Ryan, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 3342-3344, PMID: 7083198; 'Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology'.

[36] P. M. Dewick, *The Shikimate Pathway: Aromatic Amino Acids and Phenylpropanoids, 3*, Wiley, doi.org/10.1002/9780470742761.ch4, Hoboken, **2009**.

[37] T. Vogt, *Mol. Plant.* **2010**, *3*, 2-20, doi.org/10.1093/mp/ssp106; 'Phenylpropanoid Biosynthesis'.

[38] R. Bentley, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1990**, *25*, 307-384, doi.org/10.3109/10409239009090615; 'The shikimate pathway - a metabolic tree with many branches'.

[39] P. M. Dewick, *Medicinal natural products: A biosynthetic approach, 2*, Wiley, 0471496405, Hoboken, **2002**.

[40] J. B. Tarr, J. Arditti, *Plant Physiol.* **1982**, *69*, 553-556, doi.org/10.1104/pp.69.3.553; 'Niacin biosynthesis in seedlings of Zea mays'.

[41] C. Lenz, A. Sherwood, R. Kargbo, D. Hoffmeister, *ChemPlusChem* **2021**, *86*, 28-35, doi.org/10.1002/cplu.202000581; 'Taking different roads: L-Tryptophan as the origin of psilocybe natural products'.

[42] H. Sayhan, S. G. Beyaz, A. Çeliktaş, *Alkaloids: Alternatives in Synthesis, Modification and Application*, **2017**.

[43] R. Verpoorte, in *Encyclopedia of Analytical Science, 2*, Elsevier, 978-0-12-369397-6, doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00010-8, Oxford, **2005**, S. 56-61.

[44] G. Guzmán, J. W. Allen, J. Gartz, *Ann. Mus. Civ. Rovereto* **1998**, *14*, 189-280, 'A worldwide geographical distribution of the neurotropic fungi, an analysis and discussion'.

[45] J. S. Siegel, S. Subramanian, D. Perry, B. P. Kay, E. M. Gordon, T. O. Laumann, T. R. Reneau, N. V. Metcalf, R. V. Chacko, C. Gratton, *Nature* **2024**, *632*, 131-138, doi.org/10.1038/s41586-024-07624-5; 'Psilocybin desynchronizes the human brain'.

[46] Bundesministerium der Justiz, *Gesetz über den Verkehr mit Betäubungsmitteln,* **16.10.2024**, https://www.gesetze-im-internet.de/btmg_1981/

[47] M. Hesse, *Alkaloids: Nature's curse or blessing?, 1*, Wiley, 3906390241, Weinheim, **2002**.

[48] N. Langlitz, *Hist. Human Sci.* **2010**, *23*, 37-57, doi.org/10.1177/0952695109352413; 'The persistence of the subjective in neuropsychopharmacology: observations of contemporary hallucinogen research'.

[49] N. Chwelos, D. B. Blewett, C. M. Smith, A. Hoffer, *J. Stud. Alcohol Drugs* **1959**, *20*, 577-590, doi.org/10.15288/qjsa.1959.20.577; 'Use of D-lysergic acid diethylamide in the treatment of alcoholism'.

[50] D. E. Nichols, *Pharmacol. Rev.* **2016**, *68*, 264-355, doi.org/10.1124/pr.115.011478; 'Psychedelics'.

[51] J. Leonard, *Nat. Prod. Rev.* **1999**, *16*, 319-338, doi.org/10.1039/A707500F; 'Recent progress in the chemistry of monoterpenoid indole alkaloids derived from secologanin'.

[52] Y. Qu, M. Easson, R. Simionescu, J. Hajicek, A. M. K. Thamm, V. Salim, V. De Luca, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2018**, *115*, 3180-3185, doi.org/10.1073/pnas.1719979115; 'Solution of the multistep

pathway for assembly of corynanthean, strychnos, iboga, and aspidosperma monoterpenoid indole alkaloids from 19E-geissoschizine'.

[53] K. Asada, V. Salim, S. Masada-Atsumi, E. Edmunds, M. Nagatoshi, K. Terasaka, H. Mizukami, V. De Luca, *Plant Cell* **2013**, *25*, 4123-4134, doi.org/10.1105/tpc.113.115154; 'A 7-Deoxyloganetic Acid Glucosyltransferase Contributes a Key Step in Secologanin Biosynthesis in Madagascar Periwinkle'.

[54] L. Caputi, J. Franke, K. Bussey, S. C. Farrow, I. J. C. Vieira, C. E. M. Stevenson, D. M. Lawson, S. E. O'Connor, *Nat. Chem. Biol.* **2020**, *16*, 383-386, doi.org/10.1038/s41589-019-0460-x; 'Structural basis of cycloaddition in biosynthesis of iboga and aspidosperma alkaloids'.

[55] R. N. Iyer, D. Favela, G. Zhang, D. E. Olson, *Nat. Prod. Rev.* **2021**, *38*, 307-329, doi.org/10.1039/D0NP00033G; 'The iboga enigma: the chemistry and neuropharmacology of iboga alkaloids and related analogs'.

[56] T. Szabó, B. Volk, M. Milen, *Molecules* **2021**, *26*, doi.org/10.3390/molecules26030663; 'Recent Advances in the Synthesis of β-Carboline Alkaloids'.

[57] R. B. Herbert, J. Mann, *J. Am. Chem. Soc., Perk. Trans. 1* **1982**, 1523-1525, doi.org/10.1039/P19820001523; 'The biosynthesis of the β-carboline alkaloids, harman and eleagnine'.

[58] H. Li, Y. Qiu, C. Guo, M. Han, Y. Zhou, Y. Feng, S. Luo, Y. Tong, G. Zheng, S. Zhu, *Chem. Comm.* **2019**, *55*, 8390-8393, doi.org/10.1039/C9CC03745D; 'Pyrroloindoline cyclization in tryptophan-containing cyclodipeptides mediated by an unprecedented indole C3 methyltransferase from *Streptomyces* sp. HPH0547'.

[59] D. A. Amariei, N. Pozhydaieva, B. David, P. Schneider, T. Classen, H. Gohlke, O. H. Weiergräber, J. Pietruszka, *ACS Catalysis* **2022**, *12*, 14130-14139, doi.org/10.1021/acscatal.2c04240; 'Enzymatic C3-Methylation of Indoles Using Methyltransferase PsmD─Crystal Structure, Catalytic Mechanism, and Preparative Applications'.

[60] H.-E. Lai, A. Kennedy, L. Tanner, E. A. Bartram, S. Mei Chee, P. S. Freemont, S. J. Moore, *ChemBiochem* **2024**, *25*, e202400357, doi.org/10.1002/cbic.202400357; 'Biosynthesis of Arcyriaflavin F from *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712'.

[61] T. R. Hodges, N. M. Benjamin, S. F. Martin, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 2254-2257, doi.org/10.1021/acs.orglett.7b00735; 'Syntheses of Gliocladin C and Related Alkaloids'.

[62] P. Tuntiwachwuttikul, T. Taechowisan, A. Wanbanjob, S. Thadaniti, W. C. Taylor, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 7583-7586, doi.org/10.1016/j.tet.2008.05.104; 'Lansai A–D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp. SUC1'.

[63] C. N. Teijaro, A. Adhikari, B. Shen, *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **2019**, *46*, 433-444, doi.org/10.1007/s10295-018-2094-5; 'Challenges and opportunities for natural product discovery, production, and engineering in native producers versus heterologous hosts'.

[64] G. G. Conrado, R. da Rosa, R. D. Reis, L. R. Pessa, *Rev. Bras. Farmacogn.* **2024**, 1-16, doi.org/10.1007/s43450-024-00540-9; 'Building Natural Product–Based Libraries for Drug Discovery: Challenges and Opportunities from a Brazilian Pharmaceutical Industry Perspective'.

[65] A. Muscat, E. M. de Olde, I. J. M. de Boer, R. Ripoll-Bosch, *Glob. Food Secur.* **2020**, *25*, 100330, doi.org/10.1016/j.gfs.2019.100330; 'The battle for biomass: A systematic review of food-feed-fuel competition'.

[66] H. Steinfeld, C. Opio, *Adv. Anim. Biosci.* **2010**, *1*, 421-475, doi.org/10.1017/S2040470010000488; 'The availability of feeds for livestock: Competition with human consumption in present world'.

[67] S. Manceron, T. Ben-Ari, P. Dumas, *OCL* **2014**, *21*, 10, doi.org/10.1051/ocl/2014020; 'Feeding proteins to livestock: Global land use and food vs. feed competition'.

[68] F. Chemat, M. Abert-Vian, A. S. Fabiano-Tixier, J. Strube, L. Uhlenbrock, V. Gunjevic, G. Cravotto, *Trends Anal. Chem.* **2019**, *118*, 248-263, doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.037; 'Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges'.

[69] A. G. Atanasov, S. B. Zotchev, V. M. Dirsch, C. T. Supuran, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 200-216, doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z; 'Natural products in drug discovery: advances and opportunities'.

[70] I. Paterson, N. Y. S. Lam, *J. Antibiot.* **2018**, *71*, 215-233, doi.org/10.1038/ja.2017.111; 'Challenges and discoveries in the total synthesis of complex polyketide natural products'.

[71] P. S. Baran, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 4751-4755, doi.org/10.1021/jacs.8b02266; 'Natural product total synthesis: as exciting as ever and here to stay'.

[72] P. M. Dewick, *Essentials of organic chemistry: for students of pharmacy, medicinal chemistry and biological chemistry, 1*, Wiley, 0470016655, Hoboken, **2006**.

[73] F. G. Bordwell, G. E. Drucker, H. E. Fried, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 632-635, doi.org/10.1021/jo00316a032; 'Acidities of carbon and nitrogen acids: the aromaticity of the cyclopentadienyl anion'.

[74] A. Baeyer, C. A. Knop, *Liebigs Ann. Chem.* **1866**, *140*, 1-38, doi.org/10.1002/jlac.18661400102; 'Mittheilungen aus dem organischen Laboratorium der Gewerbe-Academie in Berlin. I. Untersuchungen über die Gruppe des Indigblau's'.

[75] A. Baeyer, *Liebigs Ann. Chem.* **1866**, *140*, 295-296, doi.org/10.1002/jlac.18661400306; 'Über die Reduction aromatischer Verbindungen mittelst Zinkstaub'.

[76] A. Baeyer, A. Emmerling, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1869**, *2*, 679-682, doi.org/10.1002/cber.186900201268; 'Synthese des indols'.

[77] E. Fischer, F. Jourdan, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1883**, *16*, 2241-2245, doi.org/10.1002/cber.188301602141; 'Über die Hydrazine der Brenztraubensäure'.

[78] M. Bandini, A. Eichholzer, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 9608-9644, doi.org/10.1002/anie.200901843; 'Catalytic functionalization of indoles in a new dimension'; (*Angew. Chem.* **2009**, 121, 9786-9824).

[79] R. Sundberg, *The chemistry of indoles, 18*, Elsevier, 0323147860, Amsterdam, **2012**.

[80] R. Dalpozzo, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 742-778, doi.org/10.1039/C4CS00209A; 'Strategies for the asymmetric functionalization of indoles: an update'.

[81] J. Wen, Z. Shi, *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 1723-1736, doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00888; 'From C4 to C7: Innovative Strategies for Site-Selective Functionalization of Indole C–H Bonds'.

[82] K. Urbina, D. Tresp, K. Sipps, M. Szostak, *Adv. Synth. Catal.* **2021**, *363*, 2723-2739, doi.org/10.1002/adsc.202100116; 'Recent Advances in Metal-Catalyzed Functionalization of Indoles'.

[83] D. W. Robbins, T. A. Boebel, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4068-4069, doi.org/10.1021/ja1006405; 'Iridium-Catalyzed, Silyl-Directed Borylation of Nitrogen-Containing Heterocycles'.

[84] R. P. Loach, O. S. Fenton, K. Amaike, D. S. Siegel, E. Ozkal, M. Movassaghi, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 11254-11263, doi.org/10.1021/jo502062z; 'C7-derivatization of C3-Alkylindoles including tryptophans and tryptamines'.

[85] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483, doi.org/10.1021/cr00039a007; 'Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds'.

[86] R. Martin, S. L. Buchwald, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1461-1473, doi.org/10.1021/ar800036s; 'Palladium-Catalyzed Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reactions Employing Dialkylbiaryl Phosphine Ligands'.

[87] R. Kranthikumar, *Organomet.* **2022**, *41*, 667-679, doi.org/10.1021/acs.organomet.2c00032; 'Recent Advances in C(sp3)–C(sp3) Cross-Coupling Chemistry: A Dominant Performance of Nickel Catalysts'.

[88] G. L. Beutner, E. M. Simmons, S. Ayers, C. Y. Bemis, M. J. Goldfogel, C. L. Joe, J. Marshall, S. R. Wisniewski, *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 10380-10396, doi.org/10.1021/acs.joc.1c01073; 'A Process Chemistry Benchmark for sp2–sp3 Cross Couplings'.

[89] Y. Yang, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10642-10645, doi.org/10.1021/ja405950c; 'Ligand-controlled palladium-catalyzed regiodivergent Suzuki-Miyaura cross-coupling of allylboronates and aryl halides'.

[90] B. W. Glasspoole, K. Ghozati, J. W. Moir, C. M. Crudden, *Chem. Comm.* **2012**, *48*, 1230-1232, doi.org/10.1039/C2CC16076E; 'Suzuki–Miyaura cross-couplings of secondary allylic boronic esters'.

[91] C. Yanofsky, *RNA* **2007**, *13*, 1141-1154, doi.org/10.1261/rna.620507 'RNA-based regulation of genes of tryptophan synthesis and degradation, in bacteria'.

[92] X. Tang, S. Ezaki, S. Fujiwara, M. Takagi, H. Atomi, T. Imanaka, *Mol. Gen. Genet.* **1999**, *262*, 815-821, doi.org/10.1007/s004380051145; 'The tryptophan biosynthesis gene cluster trpCDEGFBA from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 is regulated at the transcriptional level and expressed as a single mRNA'.

[93] M. A. Molina-Henares, A. García-Salamanca, A. J. Molina-Henares, J. De La Torre, M. C. Herrera, J. L. Ramos, E. Duque, *Microb. Biotechnol.* **2009**, *2*, 91-100, doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00062.x; 'Functional analysis of aromatic biosynthetic pathways in *Pseudomonas putida* KT2440'.

[94] E. R. Radwanski, R. L. Last, *Plant Cell* **1995**, *7*, 921-934, doi.org/10.1105/tpc.7.7.921; 'Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics'.

[95] C. Yanofsky, T. Platt, I. P. Crawford, B. P. Nichols, G. E. Christie, H. Horowitz, M. VanCleemput, A. M. Wu, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 6647-6668, doi.org/10.1093/nar/9.24.6647; 'The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *Escherichia coli*'.

[96] R. J. Payne, M. D. Toscano, E. M. M. Bulloch, A. D. Abell, C. Abell, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2271-2281, doi.org/10.1039/B510633H; 'Design and synthesis of aromatic inhibitors of anthranilate synthase'.

[97] Z. He, K. D. Stigers Lavoie, P. A. Bartlett, M. D. Toney, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2378-2385, doi.org/10.1021/ja0389927; 'Conservation of Mechanism in Three Chorismate-Utilizing Enzymes'.

[98] M. Q. Fatmi, R. Ai, C.-e. A. Chang, *Biochem.* **2009**, *48*, 9921-9931, doi.org/10.1021/bi901358j; 'Synergistic Regulation and Ligand-Induced Conformational Changes of Tryptophan Synthase'.

[99] D. Niks, E. Hilario, A. Dierkers, H. Ngo, D. Borchardt, T. J. Neubauer, L. Fan, L. J. Müller, M. F. Dunn, *Biochem.* **2013**, *52*, 6396-6411, doi.org/10.1021/bi400795e; 'Allostery and Substrate Channeling in the Tryptophan Synthase Bienzyme Complex: Evidence for Two Subunit Conformations and Four Quaternary States'.

[100] A. R. Buller, S. Brinkmann-Chen, D. K. Romney, M. Herger, J. Murciano-Calles, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112*, 14599-14604, doi.org/10.1073/pnas.1516401112; 'Directed evolution of the tryptophan synthase β-subunit for stand-alone function recapitulates allosteric activation'.

[101] J. Murciano-Calles, D. K. Romney, S. Brinkmann-Chen, A. R. Buller, F. H. Arnold, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 11577-11581, doi.org/10.1002/anie.201606242; 'A Panel of TrpB Biocatalysts Derived from Tryptophan Synthase through the Transfer of Mutations that Mimic Allosteric Activation'; (*Angew. Chem.* **2016**, 128, 11749-11753).

[102] M. Dick, N. S. Sarai, M. W. Martynowycz, T. Gonen, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 19817-19822, doi.org/10.1021/jacs.9b09864; 'Tailoring Tryptophan Synthase TrpB for Selective Quaternary Carbon Bond Formation'.

[103] D. K. Romney, J. Murciano-Calles, J. E. Wehrmuller, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10769-10776, doi.org/10.1021/jacs.7b05007; 'Unlocking Reactivity of TrpB: A General Biocatalytic Platform for Synthesis of Tryptophan Analogues'.

[104] G. Wille, W. Steglich, *Synthesis* **2001**, *5*, 759-762, doi.org/10.1055/s-2001-12776; 'A short synthesis of the bacterial pigments violacein and deoxyviolacein'.

[105] R. D. DeMoss, in *Biosynthesis*, Springer, 978-3-662-38441-1, doi.org/10.1007/978-3-662-38441-1_9, Berlin, Heidelberg, **1967**, S. 77-81.

[106] I. C. d. Siqueira, J. Dias, H. Ruf, E. A. G. Ramos, E. A. P. Maciel, A. Rolim, L. Jabur, L. Vasconcelos, C. Silvany, *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, doi.org/10.3201/eid1109.050278; '*Chromobacterium violaceum* in siblings, Brazil'.

[107] B. Alisjahbana, J. Debora, E. Susandi, G. Darmawan, *Int. J. Gen. Med.* **2021**, *14*, 3259-3270, doi.org/10.2147/ijgm.S272193; 'Chromobacterium violaceum: A Review of an Unexpected Scourge'.

[108] S. Y. Choi, K.-h. Yoon, J. I. Lee, R. J. Mitchell, *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 465056, doi.org/10.1155/2015/465056; 'Violacein: Properties and Production of a Versatile Bacterial Pigment'.

[109] N. Durán, G. Z. Justo, C. V. Ferreira, P. S. Melo, L. Cordi, D. Martins, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2007**, *48*, 127-133, doi.org/10.1042/BA20070115; 'Violacein: properties and biological activities'.

[110] H. C. Lichstein, V. F. Van De Sand, *J. Infect. Dis.* **1945**, *76*, 47-51, jstor.org/stable/30085685?seq=1; 'Violacein, an Antibiotic Pigment Produced by *Chromobacterium violaceum*'.

[111] Y. Nakamura, C. Asada, T. Sawada, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2003**, *8*, 37-40, doi.org/10.1007/BF02932896; 'Production of antibacterial violet pigment by psychrotropic bacterium RT102 strain'.

[112] L. L. Cazoto, D. Martins, M. G. Ribeiro, N. Durán, G. Nakazato, *J. Antibiot.* **2011**, *64*, 395-397, doi.org/10.1038/ja.2011.13; 'Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from Bovine Mastitis'.

[113] A. O. d. Souza, D. C. G. Aily, D. N. Sato, N. Durán, *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **1999**, 59-62, doi.org/10.53393/rial.1999.58.36676; 'Atividade da violaceína in vitro sobre o *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra'.

[114] C. A. Aruldass, S. R. L. Masalamany, C. K. Venil, W. A. Ahmad, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2018**, *25*, 5164-5180, doi.org/10.1007/s11356-017-8855-2; 'Antibacterial mode of action of violacein from *Chromobacterium violaceum* UTM5 against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)'.

[115] A. C. G. Cauz, G. P. B. Carretero, G. K. V. Saraiva, P. Park, L. Mortara, I. M. Cuccovia, M. Brocchi, F. J. Gueiros-Filho, *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5*, 539-549, doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00245; 'Violacein Targets the Cytoplasmic Membrane of Bacteria'.

[116] C. Andrighetti-Fröhner, R. Antonio, T. Creczynski-Pasa, C. Barardi, C. Simões, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2003**, *98*, 843-848, doi.org/10.1590/S0074-02762003000600023 'Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*'.

[117] M. A. Dogancı, F. Ay Sal, H. I. Guler, H. Katı, E. Ceylan, A. O. Belduz, G. Bozdal, N. Yaylı, S. Canakcı, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, *38*, 161, doi.org/10.1007/s11274-022-03350-0; 'Investigation of potential inhibitor properties of violacein against HIV-1 RT and CoV-2 Spike RBD:ACE-2'.

[118] L. L. Kodach, C. L. Bos, N. Durán, M. P. Peppelenbosch, C. V. Ferreira, J. C. H. Hardwick, *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 508-516, doi.org/10.1093/carcin/bgi307; 'Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells'.

[119] D. D. de Carvalho, F. T. M. Costa, N. Duran, M. Haun, *Toxicol. In Vitro* **2006**, *20*, 1514-1521, doi.org/10.1016/j.tiv.2006.06.007; 'Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells'.

[120] C. V. s. Ferreira, C. L. Bos, H. H. Versteeg, G. Z. Justo, N. Durán, M. P. Peppelenbosch, *Blood* **2004**, *104*, 1459-1464, doi.org/10.1182/blood-2004-02-0594; 'Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death'.

[121] N. Bromberg, J. L. Dreyfuss, C. V. Regatieri, M. V. Palladino, N. Durán, H. B. Nader, M. Haun, G. Z. Justo, *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, *186*, 43-52, doi.org/10.1016/j.cbi.2010.04.016; 'Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor'.

[122] C. Matz, J. S. Webb, P. J. Schupp, S. Y. Phang, A. Penesyan, S. Egan, P. Steinberg, S. Kjelleberg, *PLOS ONE* **2008**, *3*, e2744, doi.org/10.1371/journal.pone.0002744; 'Marine Biofilm Bacteria Evade Eukaryotic Predation by Targeted Chemical Defense'.

[123] G. Nemer, N. Louka, P. Rabiller Blandin, R. G. Maroun, E. Vorobiev, T. Rossignol, J.-M. Nicaud, E. Guénin, M. Koubaa, *Molecules* **2023**, *28*, doi.org/10.3390/molecules28114292; 'Purification of Natural Pigments Violacein and Deoxyviolacein Produced by Fermentation Using Yarrowia lipolytica'.

[124] A. S. Mendes, J. E. de Carvalho, M. C. T. Duarte, N. Durán, R. E. Bruns, *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 1963-1969, doi.org/10.1023/A:1013734315525; 'Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production'.

[125] A. Ahmed, A. Ahmad, R. Li, W. Al-Ansi, M. Fatima, B. S. Mushtaq, S. Basharat, Y. Li, Z. Bai, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *31*, 1465-1480, doi.org/10.4014/jmb.2107.07045; 'Recent Advances in Synthetic, Industrial and Biological Applications of Violacein and Its Heterologous Production'.

[126] P. R. August, T. H. Grossman, C. Minor, M. Draper, I. A. MacNeil, J. M. Pemberton, K. Call, D. Holt, M. S. Osburne, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *2*, 513-519, PMID: 11075927; 'Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*'.

[127] K. Shinoda, T. Hasegawa, H. Sato, M. Shinozaki, H. Kuramoto, Y. Takamiya, T. Sato, N. Nikaidou, T. Watanabe, T. Hoshino, *Chem. Comm.* **2007**, 4140-4142, doi.org/10.1039/B705358D; 'Biosynthesis of violacein: a genuine intermediate, protoviolaceinic acid, produced by VioABDE, and insight into VioC function'.

[128] C. J. Balibar, C. T. Walsh, *Biochem.* **2006**, *45*, 15444-15457, doi.org/10.1021/bi061998z; 'In Vitro Biosynthesis of Violacein from l-Tryptophan by the Enzymes VioA–E from *Chromobacterium violaceum*'.

[129] T. Hoshino, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 1463-1475, doi.org/10.1007/s00253-011-3468-z; 'Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum*: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core'.

[130] A. Ahmetagic, J. M. Pemberton, *Plasmid* **2010**, *63*, 79-85, doi.org/10.1016/j.plasmid.2009.11.004; 'Stable high level expression of the violacein indolocarbazole anti-tumour gene cluster and the *Streptomyces lividans* amyA gene in *E. coli* K12'.

[131] P.-x. Jiang, H.-s. Wang, C. Zhang, K. Lou, X.-H. Xing, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 1077-1088, doi.org/10.1007/s00253-009-2375-z; 'Reconstruction of the violacein biosynthetic pathway from *Duganella* sp. B2 in different heterologous hosts'.

[132] X. Xing, P. Jiang, 2014, Recombinant bacteria for producing deoxyviolacein and uses thereof, USA, Google Patents, US8778654B2.

[133] A. Domröse, R. Weihmann, S. Thies, K.-E. Jaeger, T. Drepper, A. Loeschcke, *Synth. Syst. Biotechnol.* **2017**, *2*, 310-319, doi.org/10.1016/j.synbio.2017.11.001; 'Rapid generation of recombinant *Pseudomonas putida* secondary metabolite producers using yTREX'.

[134] M. T. Petersen, T. E. Nielsen, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1986-1989, doi.org/10.1021/ol400654r; 'Tandem Ring-Closing Metathesis/Isomerization Reactions for the Total Synthesis of Violacein'.

[135] K. R. Dvorak, J. J. Tepe, *Nat. Prod. Rep.* **2024**, doi.org/10.1039/D4NP00012A; 'Advances in the total synthesis of bis-and tris-indole alkaloids containing N-heterocyclic linker moieties'.

[136] S. L. Hooe, M. Thakur, G. Lasarte-Aragonés, J. C. Breger, S. A. Walper, I. L. Medintz, G. A. Ellis, *ACS Omega* **2024**, *9*, 3894-3904, doi.org/10.1021/acsomega.3c08233; 'Exploration of the In Vitro Violacein Synthetic Pathway with Substrate Analogues'.

[137] H.-E. Lai, A. M. C. Obled, S. M. Chee, R. M. Morgan, R. Lynch, S. V. Sharma, S. J. Moore, K. M. Polizzi, R. J. M. Goss, P. S. Freemont, *ACS Chem. Biol.* **2021**, *16*, 2116-2123, doi.org/10.1021/acschembio.1c00483; 'GenoChemetic Strategy for Derivatization of the Violacein Natural Product Scaffold'.

[138] C. Sánchez, I. A. Butovich, A. F. Braña, J. Rohr, C. Méndez, J. A. Salas, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 519-531, doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00126-6; 'The Biosynthetic Gene Cluster for the Antitumor Rebeccamycin: Characterization and Generation of Indolocarbazole Derivatives'.

[139] C. Schnepel, I. Kemker, N. Sewald, *ACS Catalysis* **2019**, *9*, 1149-1158, doi.org/10.1021/acscatal.8b04944; 'One-Pot Synthesis of D-Halotryptophans by Dynamic Stereoinversion Using a Specific L-Amino Acid Oxidase'.

[140] T. Spolitak, D. P. Ballou, *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *573*, 111-119, doi.org/10.1016/j.abb.2015.03.020; 'Evidence for catalytic intermediates involved in generating the chromopyrrolic acid scaffold of rebeccamycin by RebO and RebD'.

[141] S. Brownstein, A. E. Stillman, *J. Phys. Chem.* **1959**, *63*, 2061-2062, doi.org/10.1021/j150582a022; 'Proton Resonance Shifts of Acids in Liquid Sulfur Dioxide'.

[142] A. Loeschcke, A. Markert, S. Wilhelm, A. Wirtz, F. Rosenau, K.-E. Jaeger, T. Drepper, *ACS Synth. Biol.* **2013**, *2*, 22-33, doi.org/10.1021/sb3000657; 'TREX: A Universal Tool for the Transfer and Expression of Biosynthetic Pathways in Bacteria'.

[143] A. Domröse, J. Hage-Hülsmann, S. Thies, R. Weihmann, L. Kruse, M. Otto, N. Wierckx, K.-E. Jaeger, T. Drepper, A. Loeschcke, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7028, doi.org/10.1038/s41598-019-43405-1; '*Pseudomonas putida* rDNA is a favored site for the expression of biosynthetic genes'.

[144] R. Weihmann, A. Domröse, T. Drepper, K. E. Jaeger, A. Loeschcke, *Microb. Biotechnol.* **2020**, *13*, 250-262, doi.org/10.1111/1751-7915.13402; 'Protocols for yTREX/Tn5-based gene cluster expression in *Pseudomonas putida*'.

[145] R. Weihmann, S. Kubicki, N. L. Bitzenhofer, A. Domröse, I. Bator, L.-M. Kirschen, F. Kofler, A. Funk, T. Tiso, L. M. Blank, K.-E. Jaeger, T. Drepper, S. Thies, A. Loeschcke, *FEMS Microbes* **2023**, *4*, xtac030, doi.org/10.1093/femsmc/xtac030; 'The modular pYT vector series employed for chromosomal gene integration and expression to produce carbazoles and glycolipids in *P. putida*'.

[146] R. Weihmann, Dissertation, 'Rekombinante Alkaloidproduktion in *Pseudomonas putida* mit Hilfe modularer Systeme zur Genclusterexpression', Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf) **2023**.

[147] V. Pelicic, J. M. Reyrat, B. Gicquel, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 1197-1199, doi.org/10.1128/jb.178.4.1197-1199.1996; 'Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria'.

[148] M. Steinmetz, D. Le Coq, H. B. Djemia, P. Gay, *Mol. Gen. Genet.* **1983**, *191*, 138-144, doi.org/10.1007/BF00330901; 'Analyse génétique de sacB, gène de structure d'une enzyme secrétée, la lévane-saccharase de *Bacillus subtilis* Marburg'.

[149] L. R. Hmelo, B. R. Borlee, H. Almblad, M. E. Love, T. E. Randall, B. S. Tseng, C. Lin, Y. Irie, K. M. Storek, J. J. Yang, R. J. Siehnel, P. L. Howell, P. K. Singh, T. Tolker-Nielsen, M. R. Parsek, H. P. Schweizer, J. J. Harrison, *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 1820-1841, doi.org/10.1038/nprot.2015.115; 'Precision-engineering the Pseudomonas aeruginosa genome with two-step allelic exchange'.

[150] P. Gay, D. Le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelman, C. I. Kado, *J. Bacteriol.* **1985**, *164*, 918-921, doi.org/10.1128/jb.164.2.918-921.1985; 'Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria'.

[151] J. Kuepper, J. Dickler, M. Biggel, S. Behnken, G. Jäger, N. Wierckx, L. M. Blank, *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, doi.org/10.3389/fmicb.2015.01310; 'Metabolic Engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 to Produce Anthranilate from Glucose'.

[152] J. Lassak, A.-L. Henche, L. Binnenkade, M. Thormann Kai, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 3263-3274, doi.org/10.1128/AEM.00512-10; 'ArcS, the Cognate Sensor Kinase in an Atypical Arc System of *Shewanella oneidensis* MR-1'.

[153] C. B. Gronkowsky, Bachelor Thesis, 'Towards establishing a *Pseudomonas putida*-based mutasynthesis for the production of deoxyviolacein derivatives', Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf) **2022**.

[154] D. C. Volke, L. Friis, N. T. Wirth, J. Turlin, P. I. Nikel, *Metab. Eng. Commun.* **2020**, *10*, e00126, doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00126; 'Synthetic control of plasmid replication enables target- and self-curing of vectors and expedites genome engineering of *Pseudomonas putida*'.

[155] A. Gawin, S. Valla, T. Brautaset, *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 702-718, doi.org/10.1111/1751-7915.12701; 'The XylS/Pm regulator/promoter system and its use in fundamental studies of bacterial gene expression, recombinant protein production and metabolic engineering'.

[156] S. Hartmans, J. P. Smits, M. J. van der Werf, F. Volkering, J. A. M. de Bont, *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 2850-2855, doi.org/10.1128/aem.55.11.2850-2855.1989; 'Metabolism of Styrene Oxide and 2-Phenylethanol in the Styrene-Degrading *Xanthobacter* Strain 124X'.

[157] S. Liu, J.-Z. Xu, W.-G. Zhang, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, *38*, 22, doi.org/10.1007/s11274-021-03212-1; 'Advances and prospects in metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-tryptophan production'.

[158] T. Mohrbach, Dissertation, 'Untersuchungen zum Export von Tryptophan in *Escherichia coli*', Universität zu Köln (Köln) **2010**.

[159] E. Martínez-García, V. de Lorenzo, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *47*, 120-132, doi.org/10.1016/j.copbio.2017.06.013; 'Molecular tools and emerging strategies for deep genetic/genomic refactoring of *Pseudomonas*'.

[160] A. Rojas, E. Duque, G. Mosqueda, G. Golden, A. Hurtado, L. Ramos Juan, A. Segura, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 3967-3973, doi.org/10.1128/jb.183.13.3967-3973.2001; 'Three Efflux Pumps Are Required To Provide Efficient Tolerance to Toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E'.

[161] G. Orhan, I. Orhan, N. Subutay-Oztekin, F. Ak, B. Sener, *Recent Pat. CNS Drug Discov.* **2009**, *4*, 43-51, doi.org/10.2174/157488909787002582; 'Contemporary anticholinesterase pharmaceuticals of natural origin and their synthetic analogues for the treatment of Alzheimer's disease'.

[162] G. E.-S. Batiha, L. M. Alkazmi, E. H. Nadwa, E. K. Rashwan, A. M. Beshbishy, H. Shaheen, L. Wasef, *J. Drug. Deliv.* **2020**, *10*, 187-190, doi.org/10.22270/jddt.v10i1-s.3866; 'Physostigmine: A plant alkaloid isolated from *Physostigma venenosum*: A review on pharmacokinetics, pharmacological and toxicological activities'.

[163] S. Scheindlin, *Mol. Interv.* **2010**, *10*, 4, doi.org/10.1124/mi.10.1.1; 'Episodes in the story of physostigmine'.

[164] A. Proudfoot, *Toxicol. Rev.* **2006**, *25*, 99-138, doi.org/10.2165/00139709-200625020-00004; 'The Early Toxicology of Physostigmine'.

[165] T. Swain, *Plants in the Development of Modern Medicine*, Harvard University Press, 9780674865266, doi.org/10.4159/harvard.9780674865266, Cambridge, London, **1972**.

[166] Z.-J. Zhan, H.-L. Bian, J.-W. Wang, W.-G. Shan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1532-1534, doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.01.097; 'Synthesis of physostigmine analogues and evaluation of their anticholinesterase activities'.

[167] N. G. Blackstone, A. Olson, B. Ainapurapu, *Cureus* **2020**, *12*, e11739, doi.org/10.7759/cureus.11739; 'Physostigmine in Anticholinergic Poisoning: An Old Antidote With Resurgence'.

[168] K. Lao, N. Ji, X. Zhang, W. Qiao, Z. Tang, X. Gou, *J. Drug Target.* **2019**, *27*, 164-173, doi.org/10.1080/1061186x.2018.1474361; 'Drug development for Alzheimer's disease: review'.

[169] R. M. Lane, S. G. Potkin, A. Enz, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2006**, *9*, 101-124, doi.org/10.1017/s1461145705005833; 'Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia'.

[170] F. Coelho, J. Birks, *Cochrane Database Syst. Rev.* **2001**, doi.org/10.1002/14651858.cd001499; 'Physostigmine for Alzheimer's disease'.

[171] R. W. Nickalls, E. A. Nickalls, *Anaesthesia* **1988**, *43*, 776-779, doi.org/10.1111/j.1365-2044.1988.tb05755.x; 'The first use of physostigmine in the treatment of atropine poisoning. A translation of Kleinwachter's paper entitled 'Observations on the effect of Calabar bean extract as an antidote to atropine poisoning''.

[172] D. J. Triggle, R. Filler, *CNS Drug Rev.* **1998**, *4*, 87-136, doi.org/10.1111/j.1527-3458.1998.tb00059.x; 'The pharmacology of physostigmine'.

[173] V. Tougu, *Curr. Med. Chem.:Cent. Nerv. Syst. Agents* **2001**, *1*, 155-170, doi.org/10.2174/1568015013358536; 'Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition'.

[174] B. Truong, J. P. Quiroz, R. Priefer, *Med. Res. Arch.* **2020**, *8*, doi.org/10.18103/mra.v8i12.2271; 'Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: past, present, and potential future'.

[175] N. H. Greig, K. Sambamurti, Q.-s. Yu, A. Brossi, G. B. Bruinsma, D. K. Lahiri, *Curr. Alzheimer Res.* **2005**, *2*, 281-290, doi.org/10.2174/1567205054367829; 'An overview of phenserine tartrate, a novel acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease'.

[176] L. S. Schneider, Y. Geffen, J. Rabinowitz, R. G. Thomas, R. Schmidt, S. Ropele, M. Weinstock, *Neurology* **2019**, *93*, e1474-e1484, doi.org/10.1212/wnl.0000000000008239; 'Low-dose ladostigil for mild cognitive impairment: A phase 2 placebo-controlled clinical trial'.

[177] M. Alcolea-Palafox, P. Posada-Moreno, I. Ortuño-Soriano, J. L. Pacheco-del-Cerro, C. Martínez-Rincón, D. Rodríguez-Martínez, L. Pacheco-Cuevas, in *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease* (Eds.: R. Atta ur, M. I. Choudhary), Elsevier, 978-0-12-803959-5, doi.org/10.1016/B978-0-12-803959-5.50008-8, **2014**, S. 426-477.

[178] P. L. Julian, J. Pikl, *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 755-757, doi.org/10.1021/ja01307a051; 'Studies in the Indole Series. V. The Complete Synthesis of Physostigmine (Eserine)'.

[179] M. Polonovski, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1915**, *17*, 235-244, 'N o 29–Étude sur les alcaloides de la fève de Calabar (I). Esérine'.

[180] J.-C. Yi, C. Liu, L.-X. Dai, S.-L. You, *Chem. Asian J.* **2017**, *12*, 2975-2979, doi.org/10.1002/asia.201701151; 'Synthesis of C3-Methyl-Substituted Pyrroloindolines and Furoindolines via Cascade Dearomatization of Indole Derivatives with Methyl Iodide'.

[181] A. Lin, J. Yang, M. Hashim, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1950-1953, doi.org/10.1021/ol4005992; 'N-Indolyltriethylborate: A Useful Reagent for Synthesis of C3-Quaternary Indolenines'.

[182] S. Lucarini, F. Bartoccini, F. Battistoni, G. Diamantini, G. Piersanti, M. Righi, G. Spadoni, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3844-3847, doi.org/10.1021/ol101527j; 'A Novel One-Pot Approach of Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole Nucleus by a cascade addition/cyclization strategy: Synthesis of (±)-Esermethole'.

[183] A. D. Marchese, M. Wollenburg, B. Mirabi, X. Abel-Snape, A. Whyte, F. Glorius, M. Lautens, *ACS Catalysis* **2020**, *10*, 4780-4785, doi.org/10.1021/acscatal.0c00841; 'Nickel-Catalyzed Enantioselective Carbamoyl Iodination: A Surrogate for Carbamoyl Iodides'.

[184] M. Chartrain, L. Katz, C. Taylor, J. Zhang, T. Brix, P. Salmon, R. Greasham, *J. Ind. Microbiol.* **1995**, *15*, 414-417, doi.org/10.1007/BF01569967; 'Physostigmine production by *Streptomyces griseofuscus* NRRL 5324: Process development and scale-up studies'.

[185] B. Zhao, S. M. Moochhala, S.-y. Tham, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **2004**, *812*, 183-192, doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.08.031; 'Biologically active components of *Physostigma venenosum*'.

[186] J. Liu, T. Ng, Z. Rui, O. Ad, W. Zhang, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 136-139, doi.org/10.1002/anie.201308069; 'Unusual Acetylation-Dependent Reaction Cascade in the Biosynthesis of the Pyrroloindole Drug Physostigmine'; (*Angew. Chem.* **2014**, 126, 140-143).

[187] J. Liu, Dissertation, 'Biosynthesis and Heterologous Expression of Medicinally Active Natural Products', University of California (Berkeley) **2016**.

[188] P. Schneider, Dissertation, 'Charakterisierung von Methyltransferasen zur enantioselektiven Synthese von Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol basierten Naturstoffen', Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf) **2022**.

[189] P. Schneider, B. Henssen, B. Paschold, B. P. Chapple, M. Schatton, F. P. Seebeck, T. Classen, J. Pietruszka, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 23412-23418, doi.org/10.1002/anie.202107619; 'Biocatalytic C3-Indole Methylation-A Useful Tool for the Natural-Product-Inspired Stereoselective Synthesis of Pyrroloindoles'; (*Angew. Chem.* **2021**, 133, 23600-23606).

[190] K. Hsiao, H. Zegzouti, S. A. Goueli, *Epigenomics* **2016**, *8*, 321-339, doi.org/10.2217/epi.15.113; 'Methyltransferase-Glo: A Universal, Bioluminescent and Homogenous Assay for Monitoring all Classes of Methyltransferases'.

[191] D. A. Amariei, J. Tenhaef, T. Classen, B. David, T. M. Rosch, H. Gohlke, S. Noack, J. Pietruszka, *Catal. Sci. Technol.* **2024**, *14*, 6298-6306, doi.org/10.1039/D4CY00657G; 'Directed evolution of C-methyltransferase PsmD for enantioselective pyrroloindole derivative production'.

[192] M. S. Congreve, E. C. Davison, M. A. M. Fuhry, A. B. Holmes, A. N. Payne, R. A. Robinson, S. Ward, *Synlett* **1993**, *1993*, 663-664, doi.org/10.1055/s-1993-22563; 'Selective cleavage of benzyl ethers'.

[193] H. Tokuyama, K. Okano, K.-i. Okuyama, T. Fukuyama, *Synlett* **2008**, *2008*, 1977-1980, doi.org/10.1055/s-2008-1077980; 'Mild Debenzylation of Aryl Benzyl Ether with BCl3 in the Presence of Pentamethylbenzene as a Non-Lewis-Basic Cation Scavenger'.

[194] I. S. Myeong, N. H. Avci, M. Movassaghi, *Org. Lett.* **2021**, *23*, 9118-9122, doi.org/10.1021/acs.orglett.1c03448; 'Total Synthesis of (-)-Kopsifoline A and (+)-Kopsifoline E'.

[195] S. Gupta, P. Chaudhary, V. Srivastava, J. Kandasamy, *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 2506-2510, doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.04.099; 'A chemoselective ipso-hydroxylation of arylboronic acids using urea-hydrogen peroxide under catalyst free condition'.

[196] T. M. Kosak, H. A. Conrad, A. L. Korich, R. L. Lord, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 7460-7467, doi.org/10.1002/ejoc.201501042; 'Ether Cleavage Re-Investigated: Elucidating the Mechanism of BBr_3-Facilitated Demethylation of Aryl Methyl Ethers'.

[197] C. Sousa, P. J. Silva, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 5195-5199, doi.org/10.1002/ejoc.201300337; 'BBr_3-Assisted Cleavage of Most Ethers Does Not Follow the Commonly Assumed Mechanism'.

[198] T. M. Kosak, H. A. Conrad, A. L. Korich, R. L. Lord, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 7460-7467, doi.org/10.1002/ejoc.201501042; 'Ether Cleavage Re-Investigated: Elucidating the Mechanism of BBr_3-Facilitated Demethylation of Aryl Methyl Ethers'.

[199] M. Baumann, I. R. Baxendale, S. V. Ley, N. Nikbin, C. D. Smith, J. P. Tierney, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1577-1586, doi.org/10.1039/B801631N; 'A modular flow reactor for performing Curtius rearrangements as a continuous flow process'.

[200] A. K. Ghosh, M. Brindisi, A. Sarkar, *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2351-2373, doi.org/10.1002/cmdc.201800518; 'The Curtius Rearrangement: Applications in Modern Drug Discovery and Medicinal Chemistry'.

[201] F. Weber, A. Weber, L. Schmitt, I. Lechtenberg, J. Greb, B. Henßen, S. Wesselborg, J. Pietruszka, *Chem. Eur. J.* **2024**, *30*, e202400559, doi.org/10.1002/chem.202400559; 'From the Total Synthesis of Semi–Viriditoxin, Semi–Viriditoxic Acid and Dimeric Naphthopyranones to their Biological Activities in Burkitt B Cell Lymphoma'.

[202] C. I. Grove, M. J. Di Maso, F. A. Jaipuri, M. B. Kim, J. T. Shaw, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4338-4341, doi.org/10.1021/ol301743t; 'Synthesis of 6,6′-Binaphthopyran-2-one Natural Products: Pigmentosin A, Talaroderxines A and B'.

[203] C. Liao, F. P. Seebeck, *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 696-701, doi.org/10.1038/s41929-019-0300-0; 'S-adenosylhomocysteine as a methyl transfer catalyst in biocatalytic methylation reactions'.

[204] Z. Liu, N. Dong, M. Xu, Z. Sun, T. Tu, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7436-7444, doi.org/10.1021/jo400803s; 'Mild Negishi Cross-Coupling Reactions Catalyzed by Acenaphthoimidazolylidene Palladium Complexes at Low Catalyst Loadings'.

[205] J. Tan, K. Clagg, H. Zhang, *J. Org. Chem.* **2024**, *89*, 17773-17777, doi.org/10.1021/acs.joc.4c01534; 'C1 Functionalization of β-Carboline via Knochel–Hauser Base-Directed Metalation and Negishi Coupling'.

[206] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95, doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9; 'A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity'.

[207] M. L. Raves, K. Giles, J. D. Schrag, M. F. Schmid, G. N. Phillips, W. Chiu, A. J. Howard, I. Silman, J. L. Sussman, in *Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins*, Springer US, 978-1-4899-1540-5, doi.org/10.1007/978-1-4899-1540-5_97, Boston, **1998**, S. 351-356.

[208] Y. Bourne, P. Taylor, P. Marchot, *Cell* **1995**, *83*, 503-512, doi.org/10.1016/0092-8674(95)90128-0; 'Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: Crystal structure of the complex'.

[209] M. A. Silva, A. S. Kiametis, W. Treptow, *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60*, 3463-3471, doi.org/10.1021/acs.jcim.9b01073; 'Donepezil Inhibits Acetylcholinesterase via Multiple Binding Modes at Room Temperature'.

[210] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3-25, doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1; 'Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in Advanced Drug Delivery Reviews 23 (1997) 3–25.1'.

[211] D. F. Veber, S. R. Johnson, H.-Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615-2623, doi.org/10.1021/jm020017n; 'Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates'.

[212] R. Raju, A. M. Piggott, X.-C. Huang, R. J. Capon, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2770-2773, doi.org/10.1021/ol200904v; 'Nocardioazines: A Novel Bridged Diketopiperazine Scaffold from a Marine-Derived Bacterium Inhibits P-Glycoprotein'.

[213] M. Wang, X. Feng, L. Cai, Z. Xu, T. Ye, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4344-4346, doi.org/10.1039/c2cc31025b; 'Total synthesis and absolute configuration of nocardioazine B'.

[214] S. P. Marsden, K. M. Depew, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11143-11144, doi.org/10.1021/ja00103a034; 'Stereoselective total syntheses of amauromine and 5-N-acetylardeemin. A concise route to the family of" Reverse-Prenylated" hexahydropyrroloindole alkaloids'.

[215] K. M. Depew, S. P. Marsden, D. Zatorska, A. Zatorski, W. G. Bornmann, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11953-11963, doi.org/10.1021/ja991558d; 'Total Synthesis of 5-N-Acetylardeemin and Amauromine: Practical Routes to Potential MDR Reversal Agents'.

[216] C. S. López, C. Pérez-Balado, P. Rodríguez-Graña, Á. R. de Lera, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 77-80, doi.org/10.1021/ol702732j; 'Mechanistic Insights into the Stereocontrolled Synthesis of Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indoles by Electrophilic Activation of Tryptophan Derivatives'.

[217] C. Pérez-Balado, Á. R. de Lera, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3701-3704, doi.org/10.1021/ol8013073; 'Expedient Total Syntheses of WIN 64745 and WIN 64821'.

[218] V. R. Espejo, X.-B. Li, J. D. Rainier, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8282-8284, doi.org/10.1021/ja103428y; 'Cyclopropylazetoindolines as Precursors to C(3)-Quaternary-Substituted Indolines'.

[219] H. Wang, S. E. Reisman, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 6206-6210, doi.org/10.1002/anie.201402571; 'Enantioselective total synthesis of (-)-lansai B and (+)-nocardioazines A and B'; (*Angew. Chem.* **2014**, 126, 6320-6324).

[220] L. M. Repka, S. E. Reisman, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 12314-12320, doi.org/10.1021/jo4017953; 'Recent developments in the catalytic, asymmetric construction of pyrroloindolines bearing all-carbon quaternary stereocenters'.

[221] X. Li, S. Luo, J.-P. Cheng, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 14290-14294, doi.org/10.1002/chem.201002563; 'Asymmetric Conjugate Addition of Oxindoles to 2-Chloroacrylonitrile: A Highly Effective Organocatalytic Strategy for Simultaneous Construction of 1,3-Nonadjacent Stereocenters Leading to Chiral Pyrroloindolines'.

[222] X. Shen, J. Zhao, Y. Xi, W. Chen, Y. Zhou, X. Yang, H. Zhang, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 14507-14517, doi.org/10.1021/acs.joc.8b02329; 'Enantioselective Total Synthesis of (+)-Nocardioazine B'.

[223] T. M. Khopade, K. Ajayan, D. M. Vincent, A. L. Lane, R. Viswanathan, *J. Org. Chem.* **2022**, *87*, 11519-11533, doi.org/10.1021/acs.joc.2c01120; 'Biomimetic Total Synthesis of (+)-Nocardioazine B and Analogs'.

[224] T. M. Khopade, K. Ajayan, S. S. Joshi, A. L. Lane, R. Viswanathan, *ACS Omega* **2021**, *6*, 10840-10858, doi.org/10.1021/acsomega.1c00515; 'Bioinspired Brønsted Acid-Promoted Regioselective Tryptophan Isoprenylations'.

[225] C. Sun, W. Tian, Z. Lin, X. Qu, *Nat. Prod. Rev.* **2022**, *39*, 1721-1765, doi.org/10.1039/D2NP00030J; 'Biosynthesis of pyrroloindoline-containing natural products'.

[226] N. Alqahtani, S. K. Porwal, E. D. James, D. M. Bis, J. A. Karty, A. L. Lane, R. Viswanathan, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 7177-7192, doi.org/10.1039/C5OB00537J; 'Synergism between genome sequencing, tandem mass spectrometry and bio-inspired synthesis reveals insights into nocardioazine B biogenesis'.

[227] E. D. James, B. Knuckley, N. Alqahtani, S. Porwal, J. Ban, J. A. Karty, R. Viswanathan, A. L. Lane, *ACS Synth. Biol.* **2016**, *5*, 547-553, doi.org/10.1021/acssynbio.5b00120; 'Two Distinct Cyclodipeptide Synthases from a Marine Actinomycete Catalyze Biosynthesis of the Same Diketopiperazine Natural Product'.

[228] G. Deletti, S. D. Green, C. Weber, K. N. Patterson, S. S. Joshi, T. M. Khopade, M. Coban, J. Veek-Wilson, T. R. Caulfield, R. Viswanathan, A. L. Lane, *Nat. Comm.* **2023**, *14*, 2558, doi.org/10.1038/s41467-023-38168-3; 'Unveiling an indole alkaloid diketopiperazine biosynthetic pathway that features a unique stereoisomerase and multifunctional methyltransferase'.

[229] I. B. Jacques, M. Moutiez, J. Witwinowski, E. Darbon, C. Martel, J. Seguin, E. Favry, R. Thai, A. Lecoq, S. Dubois, J.-L. Pernodet, M. Gondry, P. Belin, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 721-727, doi.org/10.1038/nchembio.1868; 'Analysis of 51 cyclodipeptide synthases reveals the basis for substrate specificity'.

[230] M. Haase, B. David, B. Paschold, T. Classen, P. Schneider, N. Pozhydaieva, H. Gohlke, J. Pietruszka, *ACS Catalysis* **2024**, *14*, 227-236, doi.org/10.1021/acscatal.3c04952; 'Application of the C3-methyltransferase StspM1 for the Synthesis of the Natural Pyrroloindole Motif'.

[231] M. Haase, O. H. Weiergraeber, B. David, E. Pfirmann, B. Paschold, H. Gohlke, J. Pietruszka, *Chem. Sci.* **2025**, *16*, 4519-4527, doi.org/10.1039/JS8773200725; 'Characterization of a C-methyltransferase from *Streptomyces griseoviridis*–crystal structure, mechanism, and substrate scope'.

[232] N. C. Bruno, N. Niljianskul, S. L. Buchwald, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 4161-4166, doi.org/10.1021/jo500355k; 'N-substituted 2-aminobiphenylpalladium methanesulfonate precatalysts and their use in C-C and C-N cross-couplings'.

[233] Y. Guo, M. Wang, G. Liu, *Asian J. Org. Chem.* **2024**, *13*, e202400464, doi.org/10.1002/ajoc.202400464; 'Recent Advances on Regioselective C−H Borylation of Indoles'.

[234] Y.-C. Hu, X.-T. Min, D.-W. Ji, Q.-A. Chen, *Trends Chem.* **2022**, *4*, 658-675, doi.org/10.1016/j.trechm.2022.04.004; 'Catalytic prenylation and reverse prenylation of aromatics'.

[235] J.-X. Liang, P.-F. Yang, W. Shu, *Organomet.* **2022**, *41*, 3795-3800, doi.org/10.1021/acs.organomet.2c00509; 'Synthesis of (Hetero)aryl/Alkenyl Iodides via Ni-Catalyzed Finkelstein Reaction from Bromides or Chlorides'.

[236] W. Eschweiler, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, *38*, 880-882, doi.org/10.1002/cber.190503801154; 'Ersatz von an Stickstoff gebundenen Wasserstoffatomen durch die Methylgruppe mit Hülfe von Formaldehyd'.

[237] M. L. Laurila, N. A. Magnus, M. A. Staszak, *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13*, 1199-1201, doi.org/10.1021/op900256t; 'Green N-Methylation of Electron Deficient Pyrroles with Dimethylcarbonate'.

[238] P. H. Vendramini, L. A. Zeoly, R. A. Cormanich, M. Buehl, M. N. Eberlin, B. R. V. Ferreira, *J. Mass Spectrom.* **2021**, *56*, e4707, doi.org/10.1002/jms.4707; 'Unveiling the mechanism of N-methylation of indole with dimethylcarbonate using either DABCO or DBU as catalyst'.

[239] M. Schatton, M. Haase, J. Tenhaef, C. Gronkowsky, S. Noack, J. Pietruszka, *Chem. Eur. J.* **2025**, *31*, e202500740, doi.org/10.1002/chem.202500740; 'Chemoenzymatic Total Synthesis of Lansai B'.

[240] A. R. Buller, S. Brinkmann-Chen, D. K. Romney, M. Herger, J. Murciano-Calles, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112*, 14599-14604, doi.org/10.1073/pnas.1516401112; 'Directed evolution of the tryptophan synthase beta-subunit for stand-alone function recapitulates allosteric activation'.

[241] F. Stuhldreier, L. Schmitt, T. Lenz, I. Hinxlage, M. Zimmermann, P. Wollnitzke, J. Schliehe-Diecks, Y. Liu, P. Jäger, S. Geyh, N. Teusch, C. Peter, S. Bhatia, R. Haas, B. Levkau, A. S. Reichert, K. Stühler, P. Proksch, B. Stork, S. Wesselborg, *Cell Death Discov.* **2022**, *13*, 938, doi.org/10.1038/s41419-022-05356-w; 'The mycotoxin viriditoxin induces leukemia- and lymphoma-specific apoptosis by targeting mitochondrial metabolism'.

[242] K. Schiedlauske, A. Deipenbrock, M. Pflieger, A. Hamacher, J. Hänsel, M. U. Kassack, T. Kurz, N. E. Teusch, *Pharmaceuticals* **2024**, *17*, doi.org/10.3390/ph17060752; 'Novel Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Induces Apoptosis and Suppresses Invasion via E-Cadherin Upregulation in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC)'.

[243] N. Lall, C. J. Henley-Smith, M. N. De Canha, C. B. Oosthuizen, D. Berrington, *Int. J. Microbiol.* **2013**, *2013*, 420601, doi.org/10.1155/2013/420601; 'Viability Reagent, PrestoBlue, in Comparison with Other Available Reagents, Utilized in Cytotoxicity and Antimicrobial Assays'.

[244] B. Luzak, P. Siarkiewicz, M. Boncler, *In Vitro Toxicol.* **2022**, *83*, 105407, doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105407; 'An evaluation of a new high-sensitivity PrestoBlue assay for measuring cell viability and drug cytotoxicity using EA.hy926 endothelial cells'.

[245] A. D. Borthwick, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3641-3716, doi.org/10.1021/cr200398y; '2, 5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products'.

[246] C.-B. Cui, H. Kakeya, G. E. N. Okada, R. I. E. Onose, M. Ubukata, I. Takahashi, K. Isono, H. Osada, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1382-1384, doi.org/10.7164/antibiotics.48.1382; 'Tryprostatins A and B, novel mammalian cell cycle inhibitors produced by *Aspergillus fumigatus*'.

[247] C.-B. Cui, H. Kakeya, H. Osada, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 534-540, doi.org/10.7164/antibiotics.49.534; 'Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins A, B and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus* II. Physico-chemical properties and structures'.

[248] C.-B. Cui, H. Kakeya, G. Okada, R. Onose, H. Osada, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 527-533, doi.org/10.7164/antibiotics.49.527; 'Novel Mammalian Cell Cycle Inhibitors, Tryprostatins A, B and Other Diketopiperazines Produced by *Aspergillus Fumigatus* I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Properties'.

[249] S. Zhao, K. S. Smith, A. M. Deveau, C. M. Dieckhaus, M. A. Johnson, T. L. Macdonald, J. M. Cook, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1559-1562, doi.org/10.1021/jm0155953; 'Biological activity of the tryprostatins and their diastereomers on human carcinoma cell lines'.

[250] D. H. El-Kashef, D. D. Obidake, K. Schiedlauske, A. Deipenbrock, S. Scharf, H. Wang, D. Naumann, D. Friedrich, S. Miljanovic, T. Haj Hassani Sohi, C. Janiak, K. Pfeffer, N. Teusch, *Mar. Drugs* **2024**, *22*, doi.org/10.3390/md22010005; 'Indole Diketopiperazine Alkaloids from the Marine Sediment-Derived Fungus *Aspergillus chevalieri* against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma'.

[251] N. Shangguan, W. J. Hehre, W. S. Ohlinger, M. P. Beavers, M. M. Joullié, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6281-6287, doi.org/10.1021/ja800067q; 'The Total Synthesis of Roquefortine C and a Rationale for the Thermodynamic Stability of Isoroquefortine C over Roquefortine C'.

[252] J. Liu, Y. Yang, L. Harken, S.-M. Li, *J. Nat. Prod.* **2021**, *84*, 3100-3109, doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00844; 'Elucidation of the streptoazine biosynthetic pathway in *Streptomyces aurantiacus* reveals the presence of a promiscuous prenyltransferase/cyclase'.

[253] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organomet.* **2010**, *29*, 2176-2179, doi.org/10.1021/om100106e; 'NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist'.

[254] M. Haase, Dissertation, 'Application of *C3*-methyltransferases for natural product synthesis', Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf) **2025**.

[255] D. Amariei, Dissertation, 'Indole *C*-methyltransferases –creating an efficient platform for the enantioselective methylation of bioactive compounds', Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf) **2025**.

[256] M. Dick, N. S. Sarai, M. W. Martynowycz, T. Gonen, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 19817-19822, doi.org/10.1021/jacs.9b09864; 'Tailoring Tryptophan Synthase TrpB for Selective Quaternary Carbon Bond Formation'.

[257] C. E. Boville, D. K. Romney, P. J. Almhjell, M. Sieben, F. H. Arnold, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 7447-7452, doi.org/10.1021/acs.joc.8b00517; 'Improved Synthesis of 4-Cyanotryptophan and Other Tryptophan Analogues in Aqueous Solvent Using Variants of TrpB from *Thermotoga maritima*'.

[258] M. J. Bedding, B. C. Forster, A. M. Giltrap, M. T. Stevens, L. Corcilius, W. J. Britton, R. J. Payne, *Org. Lett.* **2024**, *26*, 10993-10998, doi.org/10.1021/acs.orglett.4c04163; 'Modular Total Synthesis and Antimycobacterial Activity of Rufomycins'.

[259] A. Kasahara, R. Yamada, T. Hyodo, K. Yamaguchi, Y. Otani, S. Sumimoto, M. Okada, T. Ohwada, *J. Org. Chem.* **2025**, *90*, 623-635, doi.org/10.1021/acs.joc.4c02532; 'Generation and Application of All Possible Conformations of Cyclic Tryptophan within and beyond Post-translational Modification'.

[260] L. Roux, C. Charrier, A. Defoin, P. Bisseret, C. Tarnus, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 8722-8728, doi.org/10.1016/j.tet.2010.09.005; 'Iodine(III)-mediated ring expansion: an efficient and green pathway in the synthesis of a key precursor for the design of aminopeptidase (APN or CD13) inhibitors'.

[261] K. Foo, T. Newhouse, I. Mori, H. Takayama, P. S. Baran, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 2716-2719, doi.org/10.1002/anie.201008048; 'Total Synthesis Guided Structure Elucidation of (+)-Psychotetramine'; (*Angew. Chem.* **2011**, 123, 2768-2771).

[262] E. Marelli, Y. Renault, S. V. Sharma, S. P. Nolan, R. J. M. Goss, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 3832-3836, doi.org/10.1002/chem.201700680; 'Mild, Aqueous α-Arylation of Ketones: Towards New Diversification Tools for Halogenated Metabolites and Drug Molecules'.

[263] M. Kaiser, C. Siciliano, I. Assfalg-Machleidt, M. Groll, A. G. Milbradt, L. Moroder, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3435-3437, doi.org/10.1021/ol035178f; 'Synthesis of a TMC-95A Ketomethylene Analogue by Cyclization via Intramolecular Suzuki Coupling'.

[264] J. Sperry, C. J. Moody, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6483-6495, doi.org/10.1016/j.tet.2010.03.012; 'Diazonamide studies. A direct synthesis of the indole bis-oxazole fragment from tri- and tetra-peptides using biomimetic oxidative cyclizations'.

[265] Y. Yokoyama, H. Hikawa, M. Mitsuhashi, A. Uyama, Y. Hiroki, Y. Murakami, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *2004*, 1244-1253, doi.org/10.1002/ejoc.200300603; 'Total Synthesis without Protection: Three-Step Synthesis of Optically Active Clavicipitic Acids by a Biomimetic Route'.

[266] G. Blaser, J. M. Sanderson, A. S. Batsanov, J. A. K. Howard, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2795-2798, doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.02.120; 'The facile synthesis of a series of tryptophan derivatives'.

[267] S. Y. Wang, J. Zhao, H. D. Que, *Chem. Nat. Compd.* **2019**, *55*, 499-501, doi.org/10.1007/s10600-019-02724-5; 'Synthesis of the Natural Product Iotrochamide B'.

[268] Y. Konda-Yamada, C. Okada, K. Yoshida, Y. Umeda, S. Arima, N. Sato, T. Kai, H. Takayanagi, Y. Harigaya, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7851-7861, doi.org/10.1016/S0040-4020(02)00909-2; 'Convenient synthesis of 7′ and 6′-bromo-d-tryptophan and their derivatives by enzymatic optical resolution using d-aminoacylase'.

[269] K.-H. van Pée, O. Salcher, F. Lingens, *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, *1981*, 233-239, doi.org/10.1002/jlac.198119810207; 'Synthese von 7-Chlor-L- und 7-Chlor-D-tryptophan; Biosynthese von Pyrrolnitrin'.

[270] X. Xu, H.-S. Kim, W.-M. Chen, X. Ma, G. J. Correy, M. G. Banwell, C. J. Jackson, A. C. Willis, P. D. Carr, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 4044-4053, doi.org/10.1002/ejoc.201700705; 'Total Syntheses of the Amaryllidaceae Alkaloids Zephycandidine III and Lycosinine A and Their Evaluation as Inhibitors of Acetylcholinesterase'.

[271] N. David, R. Pasceri, R. R. A. Kitson, A. Pradal, C. J. Moody, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 10867-10876, doi.org/10.1002/chem.201601605; 'Formal Total Synthesis of Diazonamide A by Indole Oxidative Rearrangement'.

[272] C. Markl, W. P. Clafshenkel, M. I. Attia, S. Sethi, P. A. Witt-Enderby, D. P. Zlotos, *Arch. Pharm.* **2011**, *344*, 666-674, doi.org/10.1002/ardp.201100125; 'N-Acetyl-5-arylalkoxytryptamine analogs: probing the melatonin receptors for MT(1) -selectivity'.

[273] A. A. Fayad, C. Pubill-Ulldemolins, S. V. Sharma, D. Day, R. J. M. Goss, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 5603-5609, doi.org/10.1002/ejoc.201500589; 'A One-Pot Synthesis of Symmetrical and Unsymmetrical Dipeptide Ureas'.

[274] L. Mao, R. Bertermann, S. G. Rachor, K. J. Szabó, T. B. Marder, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 6590-6593, doi.org/10.1021/acs.orglett.7b03296; 'Palladium-Catalyzed Oxidative Borylation of Allylic C–H Bonds in Alkenes'.

8.2. Zusätzliche Abbildungen und Tabellen

8.2.1. Ellmans-Assay

Optimierung der Assay-Bedingungen für die BChE

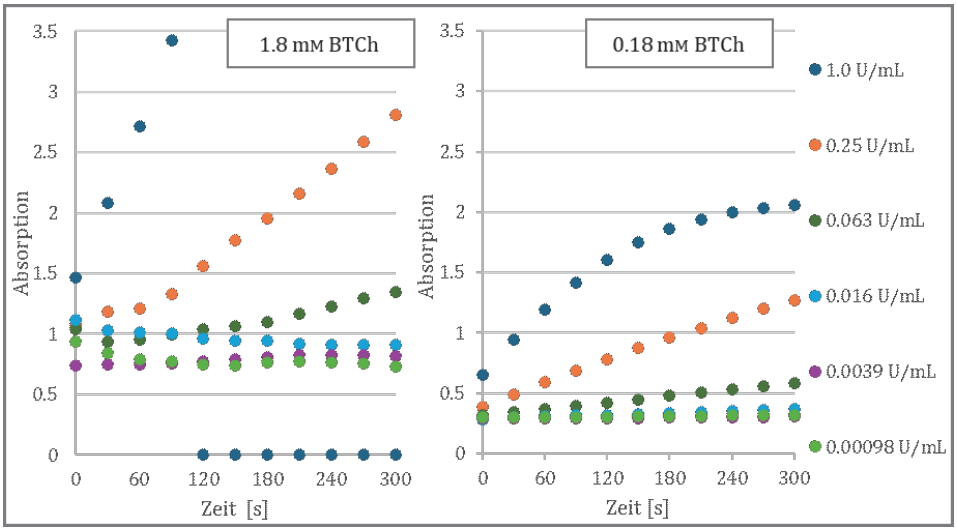


Abbildung 74: Auftragung der gemessenen Absorption gegen die Reaktionszeit des Ellmans-Assays zur Untersuchung der notwendigen Enzym- und Substratkonzentration für die BChE. Links: 1.8 mM Butyrylthiocholin. Rechts: 0.18 mM Butyrylthiocholin.

Messung der BChE-Aktivität bei Inhibition durch das unsubstituierte HHP 143

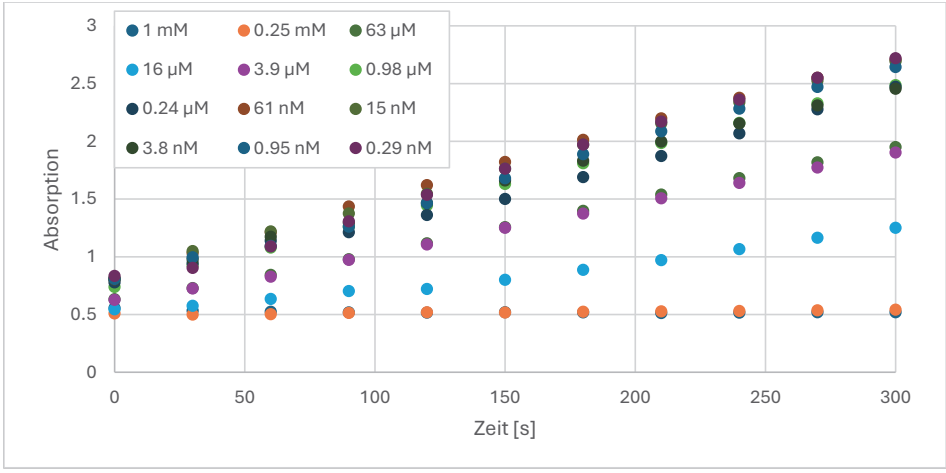


Abbildung 75: Auftragung der gemessenen Absorption gegen die Reaktionszeit zur Ermittlung der BChE-Aktivität bei Inhibition durch das unsubstituierte HHP **157** in Abhängigkeit von der zugefügten Inhibitorkonzentration (Tabelle 1).

Substanz-Wirkungskurven der verschiedenen AChE/BChE Inhibitoren

Auftragung der Auftragung der verbleibenden, relativen Enzymaktivität der AChE (blau) und BChE (rot) (in Triplikaten gemessen) gegen den dekadischen Logarithmus der eingesetzten Inhibitorkonzentration bei Inhibition durch die jeweilige Verbindung mit eingefügten Substanz-Wirkungskurven über einen nicht-linearen *fit* (Origin: *dose-response*).

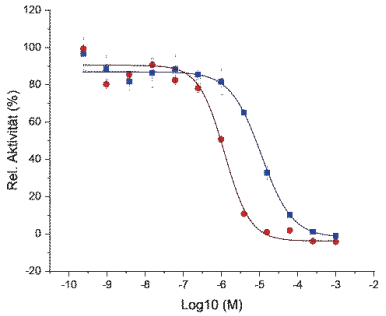


Abbildung 76: Substanz-Wirkungskurven bei Inhibition durch das 7-bromierte Hexahydropyrroloindol **197**.

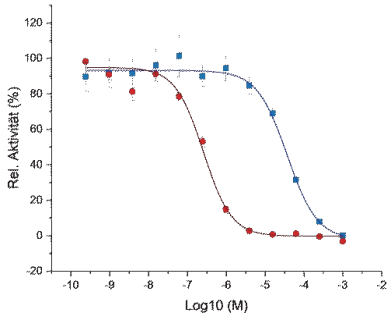


Abbildung 77: Substanz-Wirkungskurven bei Inhibition durch das 7-chlorierte Hexahydropyrroloindol **196**.

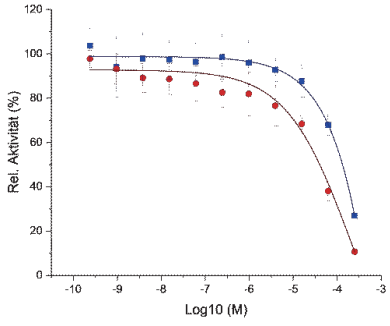


Abbildung 78: Substanz-Wirkungskurven bei Inhibition durch das 7-prenylierte Hexahydropyrroloindolphenol **204.**

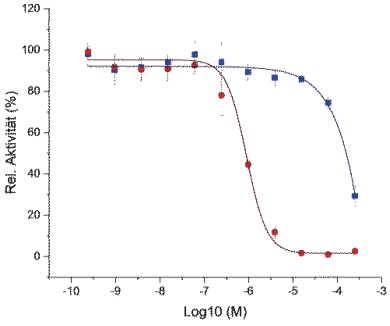


Abbildung 79: Substanz-Wirkungskurven bei Inhibition durch das 7-prenylierte Hexahydropyrroloindol **203**.

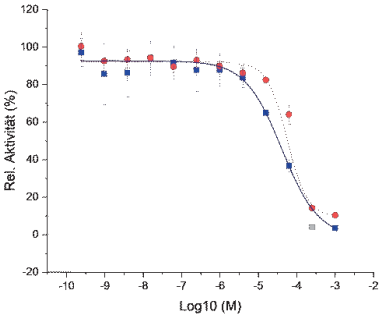


Abbildung 80 Substanz-Wirkungskurven bei Inhibition durch Eserolin (**139**).

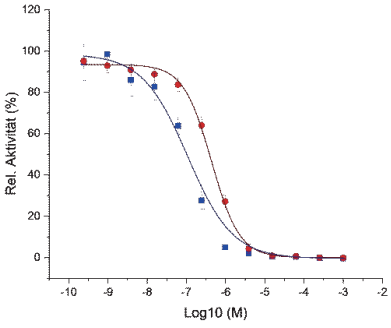


Abbildung 81: Substanz-Wirkungskurven bei Inhibition durch Physostigmin (**28**).

8.2.2. Vergleich der physikalischen Parameter verschiedener DKP

Um die Konfiguration der synthetisierten Diketopiperazine aus der racemischen Diketopiperazin-Synthese sowie der enantiomerenreinen Synthese zu bestimmen, sind im Folgenden charakteristische NMR-Signale sowie die gemessenen Drehwerte dargestellt. Zum Vergleich sind die entsprechenden Werte des (*S,S*)-DKP und (*R,S*)-DKP dargestellt.

Tabelle 21: Vergleich bestimmter NMR-Signale sowie des Drehwerts, um die entsprechenden Diastereomere aus der racemischen DKP-Synthese und der enantiomerenreinen DKP-Synthese zu bestimmen, im Vergleich zu den unsubstituierten DKPs **253** und ***ent*-253**.

	(*R,S*)-5-Cl 272		**(*R,S*)-5-Br 274**		**(*S,S*)-5-Br 273**		**(*S,S*)-5-Cl 271**		**(*S,S*)-5-Prenyl 263***		**(*S,S*)-DKP[1] 253**		**(*R,S*)-DKP[1] *ent*-253**	
Position	**^{1}H**	**^{13}C**	**^{1}H**	**^{13}C**	**^{1}H**	**^{13}C**	**^{1}H**	**^{13}C**	**^{1}H**	**^{13}C**	**^{1}H**	**^{13}C**	**^{1}H**	**^{13}C**
2	6.96	125.7	6.92	127.0	6.42	127.5	6.45	127.7	6.46	126.2	6.49	125.9	6.44	125.9
2''	6.96	127.2	6.92	125.7	6.64	125.8	6.63	125.6	6.35	125.9				
2'	3.52	56.5	3.49	56.6	4.02	56.6	4.08	57.0	4.06	56.8	4.06	56.9	4.03	56.9
5'	3.37	56.2	3.30	56.1	4.08	57.1	4.03	56.6	4.02	56.8				
Drehwert	- 5° (c = 0.415, MeOH)		- 5° (c = 0.228, MeOH)		- 37° (c = 0.174, MeOH)		- 79° (c = 0.192, MeOH)		- 71° (c = 0.17, MeOH)		-77° (c = 0.40, DMSO)		0°	

[1] Die entsprechenden Werte stammen aus der Publikation von M. Haase.[230]

8.2.3. Zytotoxizitäts Assay mittels PrestoBlue

Auftragung der relativen Zellviabilität (in 9 Replikaten gemessen) gegen den dekadischen Logarithmus der verwendeten Substanzkonzentration mit eingefügter Substanz-Wirkungskurve über einen nicht-linearen *fit* (Origin: *dose-response*).

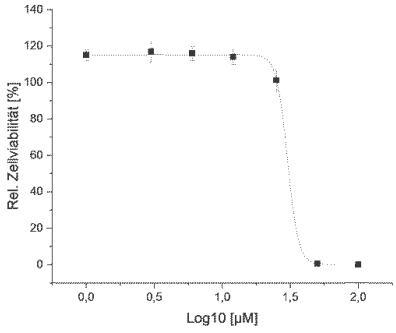


Abbildung 82: Substanz-Wirkungskurve gegenüber der HL-60-Zelllinie nach Behandlung mit Verbindung **314**.

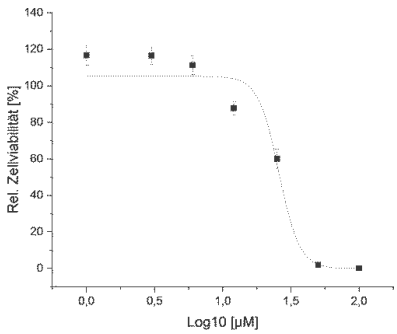


Abbildung 83: Substanz-Wirkungskurve gegenüber der HL-60-Zelllinie nach Behandlung mit Verbindung **315**.

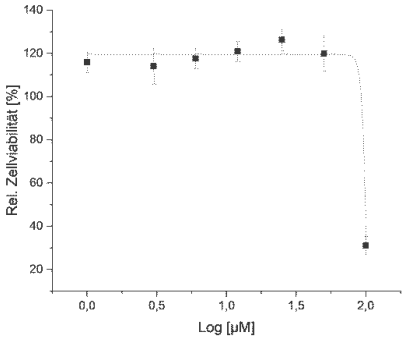


Abbildung 84: Substanz-Wirkungskurve gegenüber der HL-60-Zelllinie nach Behandlung mit Verbindung **317**.

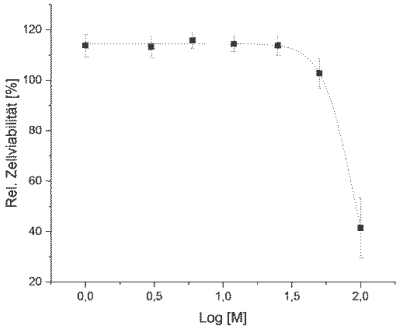


Abbildung 85: Substanz-Wirkungskurve gegenüber der HL-60-Zelllinie nach Behandlung mit Verbindung **319**.

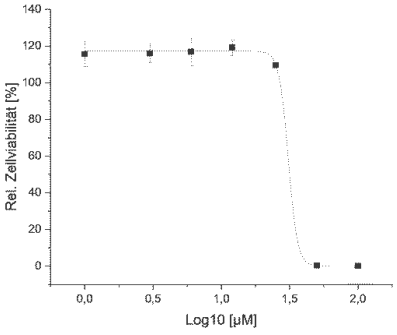


Abbildung 86: Substanz-Wirkungskurve gegenüber der HL-60-Zelllinie nach Behandlung mit Verbindung **263**.

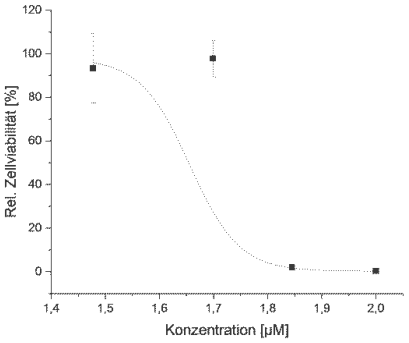


Abbildung 87: Substanz-Wirkungskurve gegenüber der Ramos-Zelllinie nach Behandlung mit Verbindung **314**.

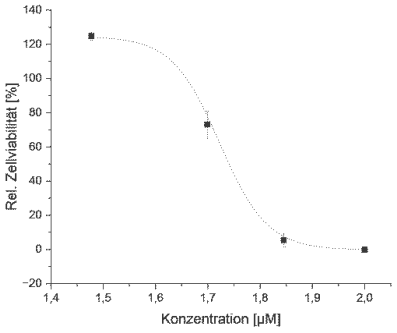


Abbildung 88: Substanz-Wirkungskurve gegenüber der Ramos-Zelllinie nach Behandlung mit Verbindung **315**.

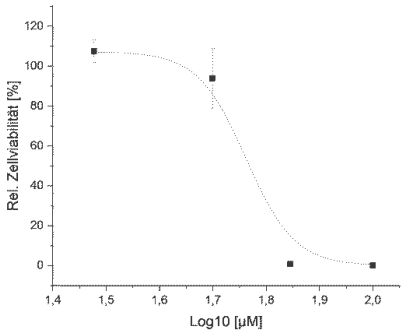


Abbildung 89: Substanz-Wirkungskurve gegenüber der Ramos-Zelllinie nach Behandlung mit Verbindung **335**.

8.3. NMR-Spektren

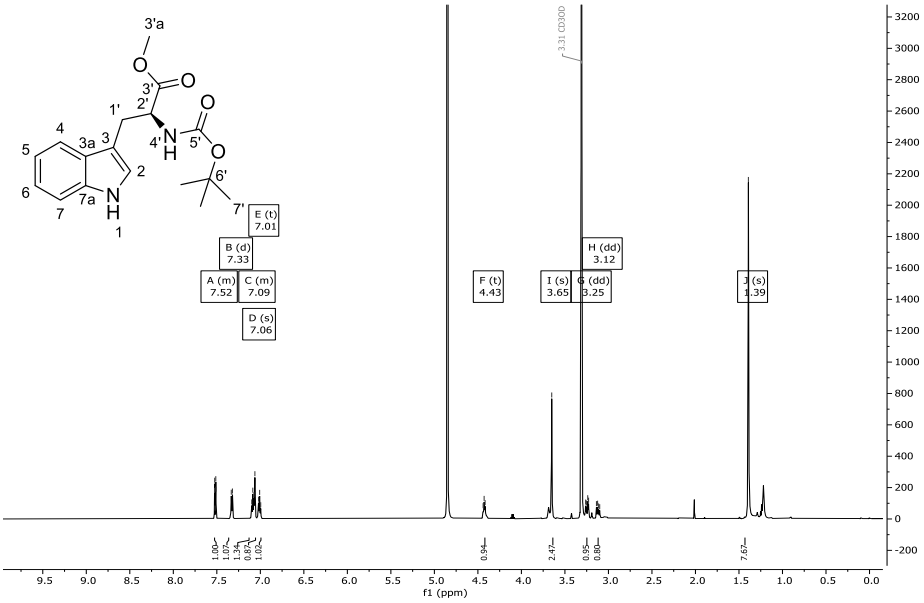


Abbildung 90: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **42** in CD_3OD.

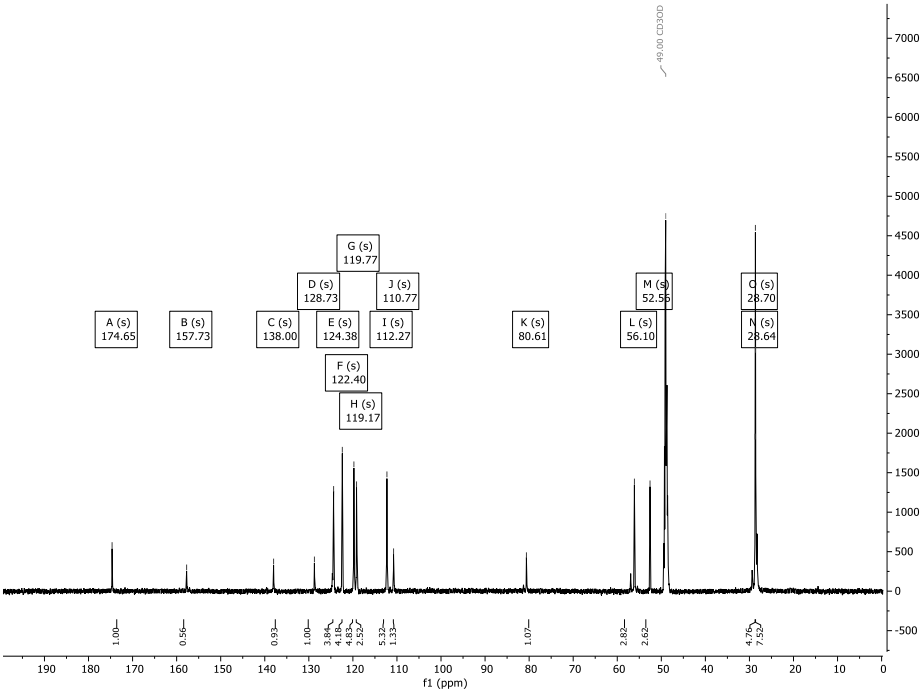


Abbildung 91: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **42** in CD_3OD.

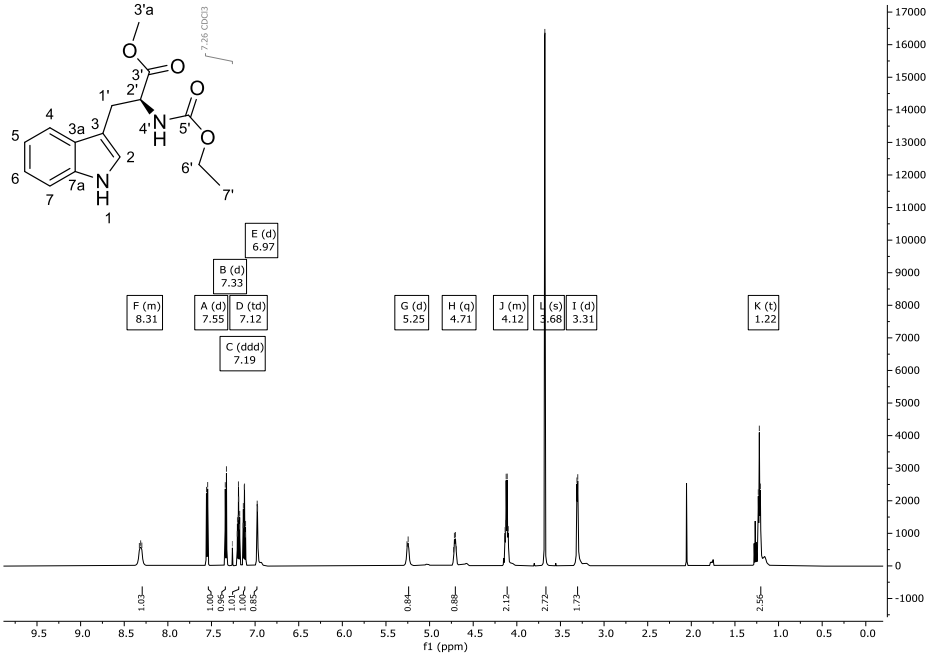


Abbildung 92: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **109** in $CDCl_3$.

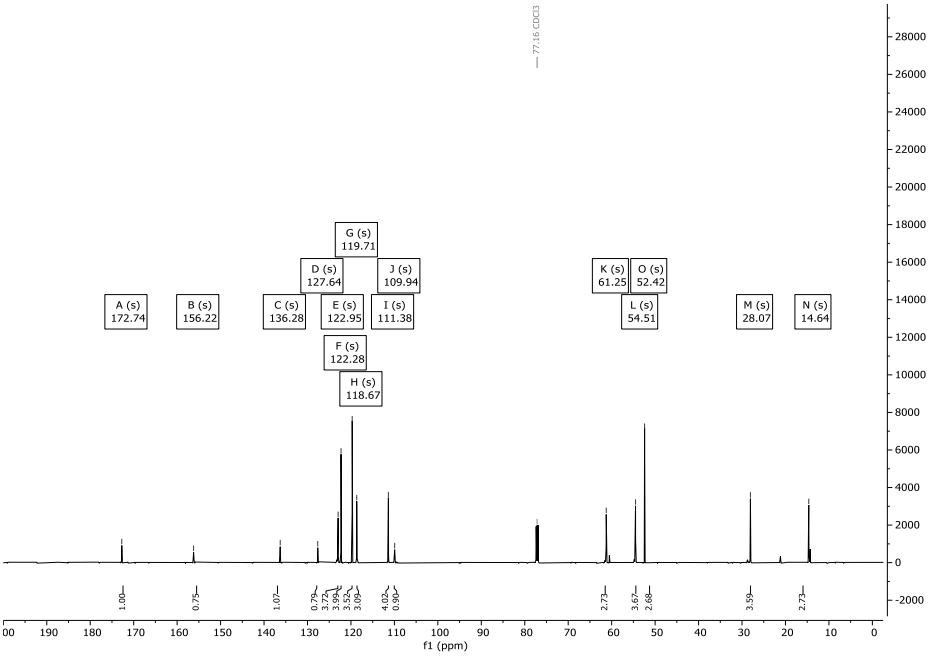


Abbildung 93: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **109** in $CDCl_3$.

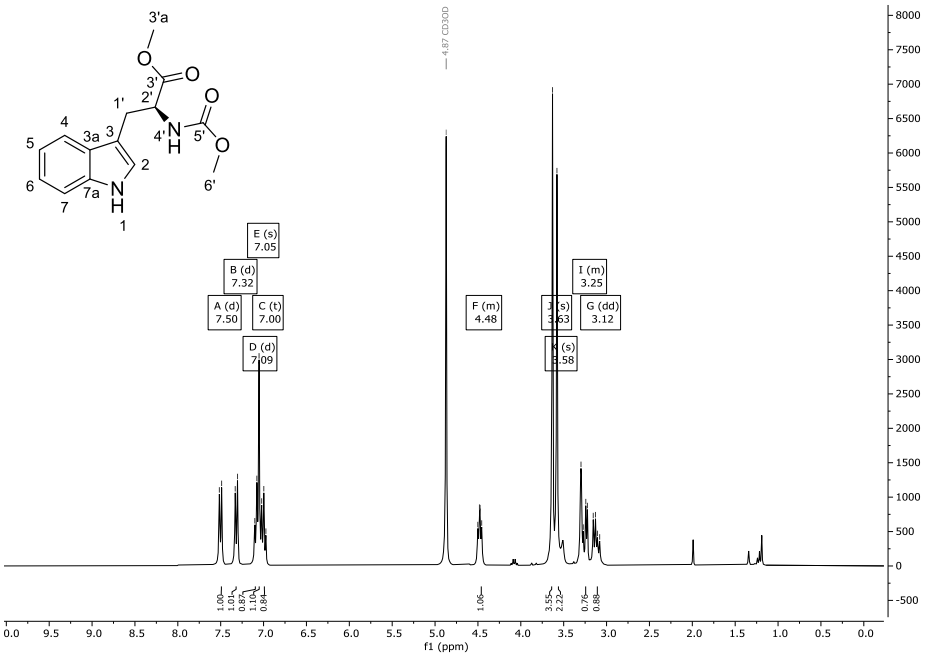


Abbildung 94: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **110** in CD_3OD.

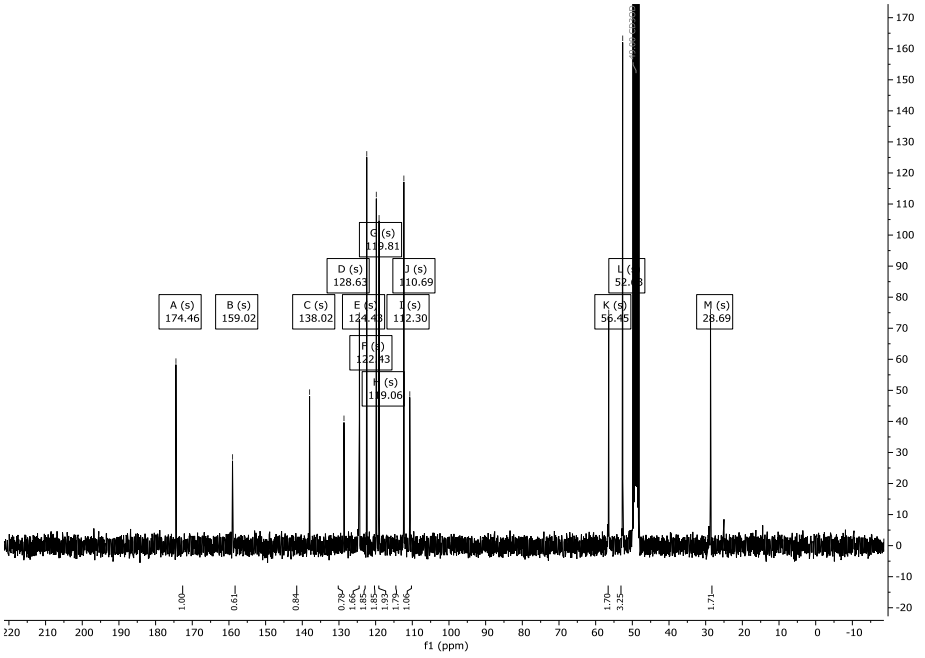


Abbildung 95: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **110** in CD_3OD.

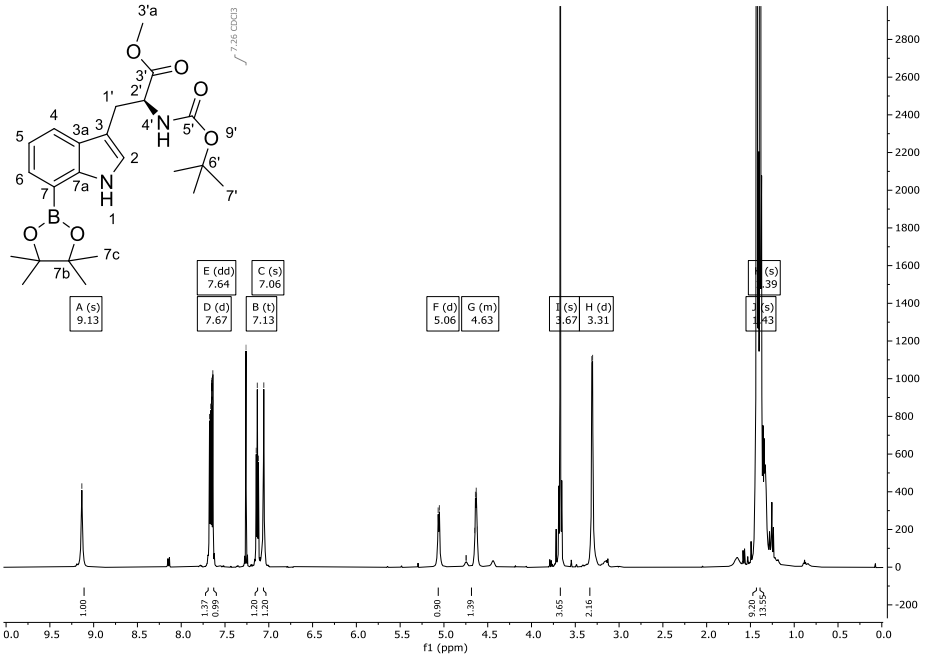


Abbildung 96: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **102** in $CDCl_3$.

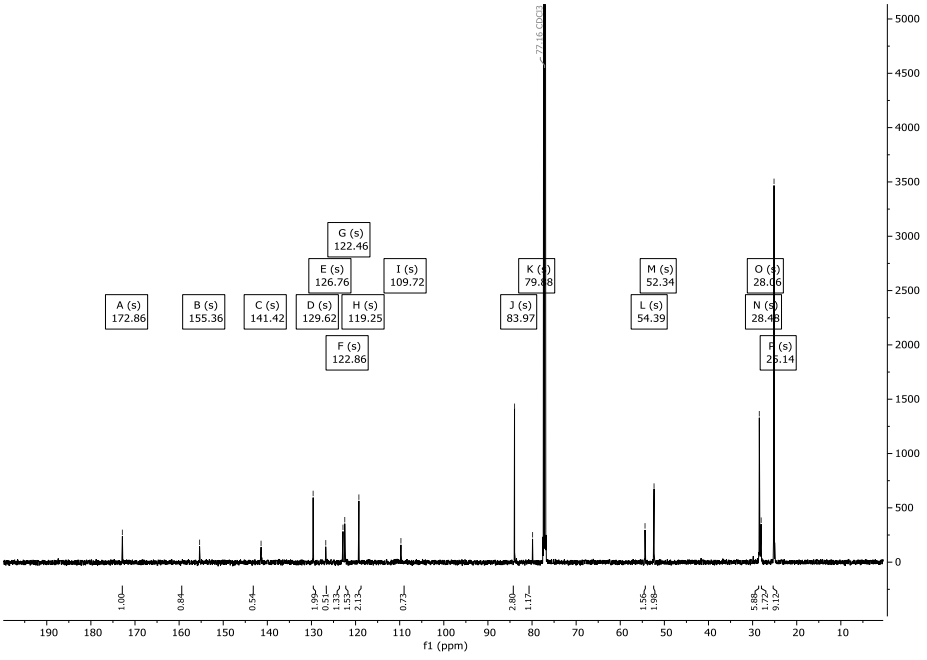


Abbildung 97: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **102** in $CDCl_3$.

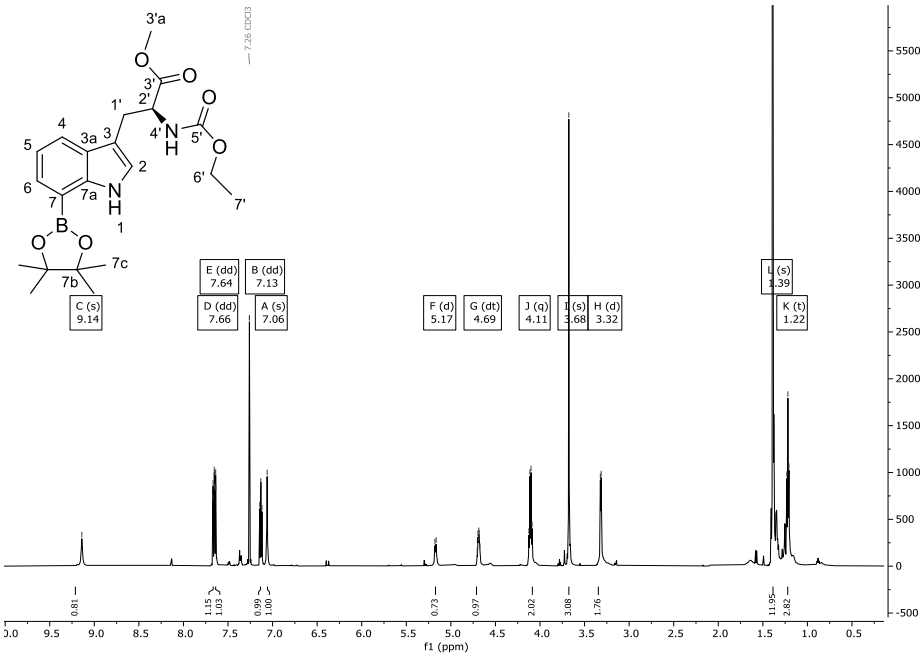


Abbildung 98: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **111** in $CDCl_3$.

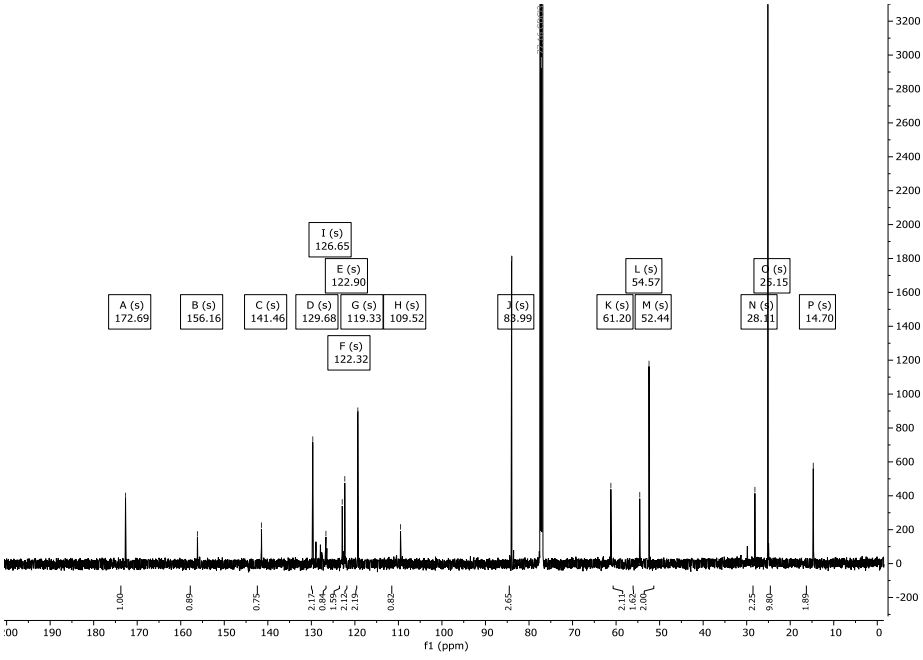


Abbildung 99: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **111** in $CDCl_3$.

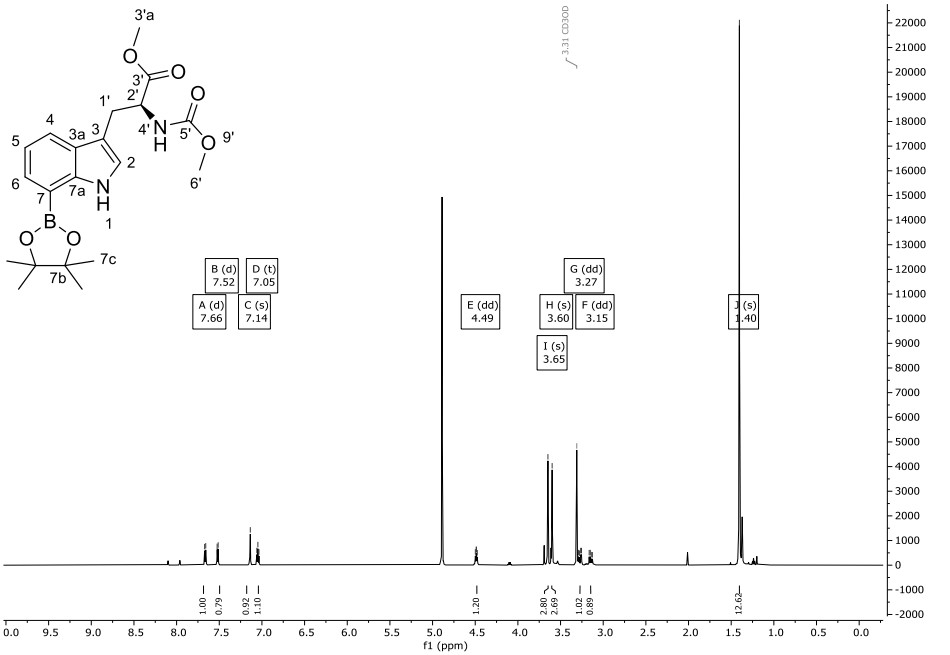


Abbildung 100: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **112** in CD_3OD.

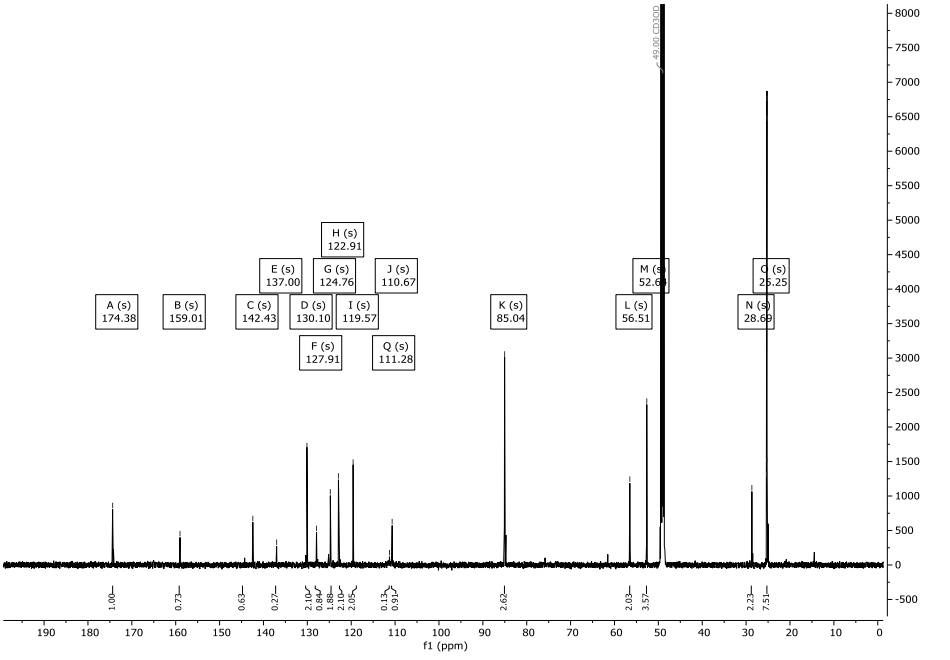


Abbildung 101: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **112** in CD_3OD.

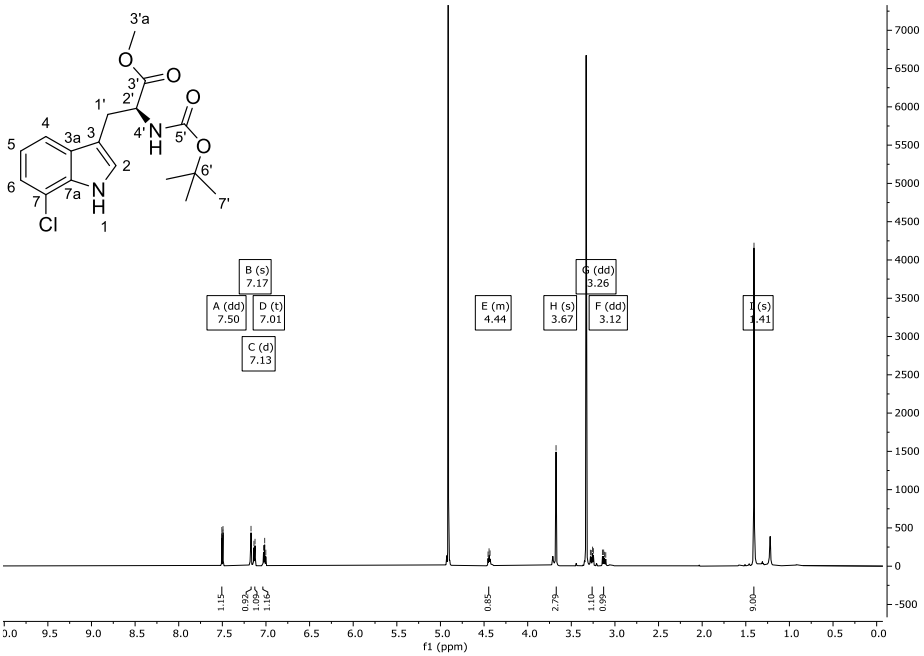


Abbildung 102: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **103** in CD_3OD.

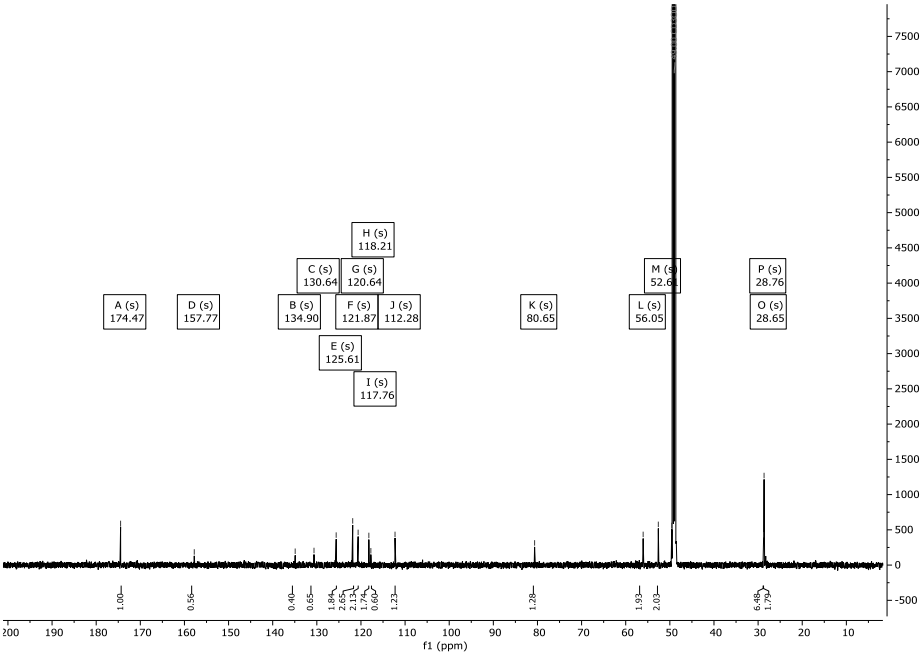


Abbildung 103: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **103** in CD_3OD.

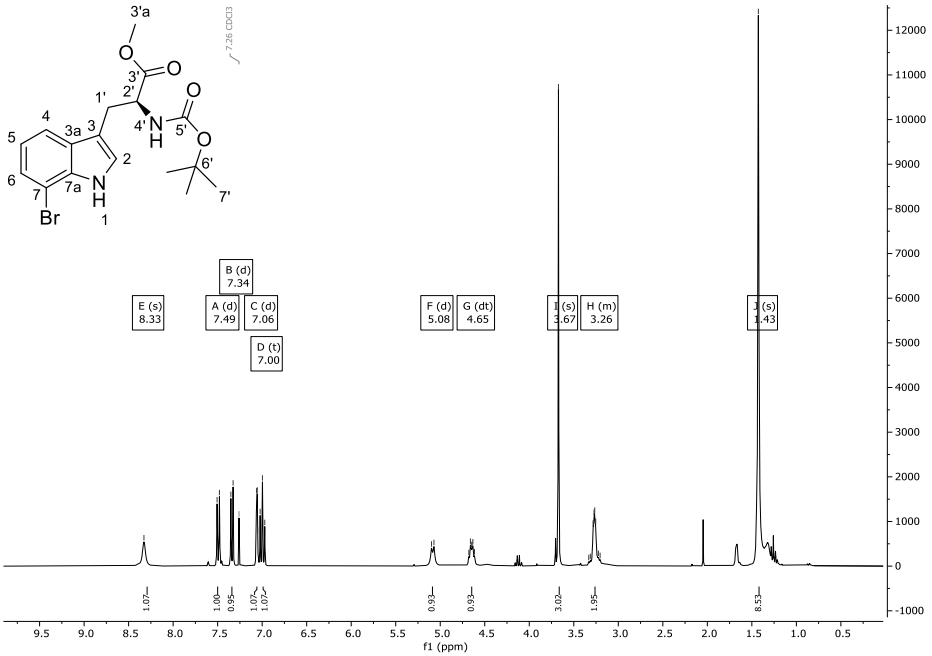


Abbildung 104: ^{1}H-NMR-Spektrum (300 MHz) von Verbindung **104** in $CDCl_3$.

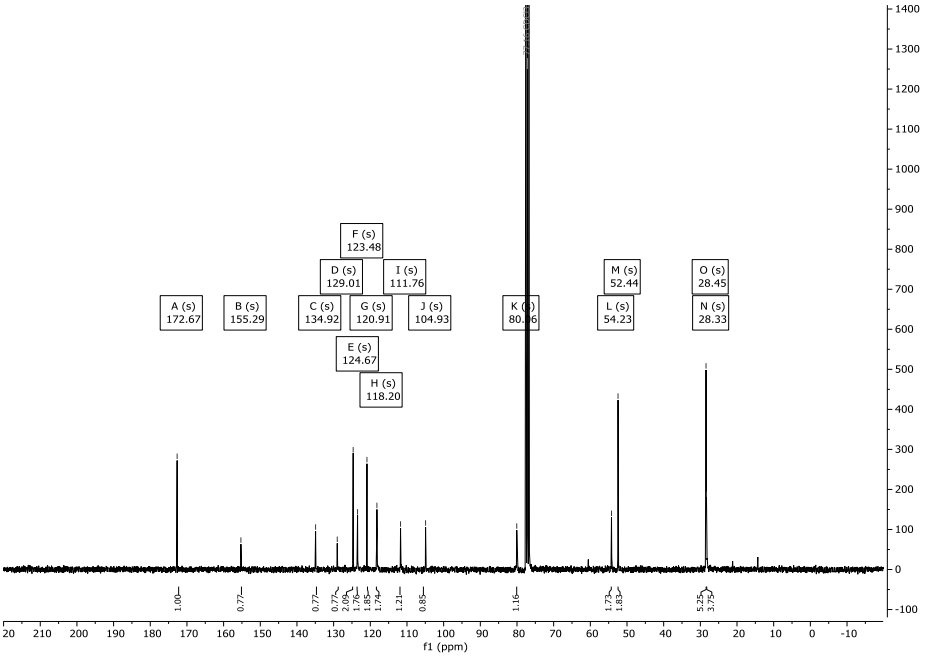


Abbildung 105: ^{13}C-NMR-Spektrum (76 MHz) von Verbindung **104** in $CDCl_3$.

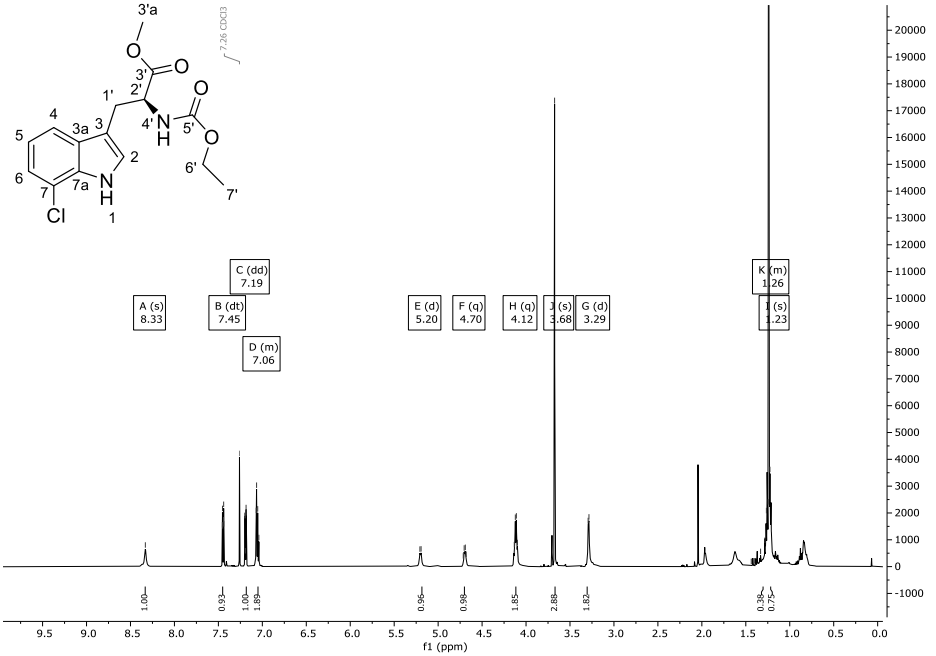


Abbildung 106: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **113** in $CDCl_3$.

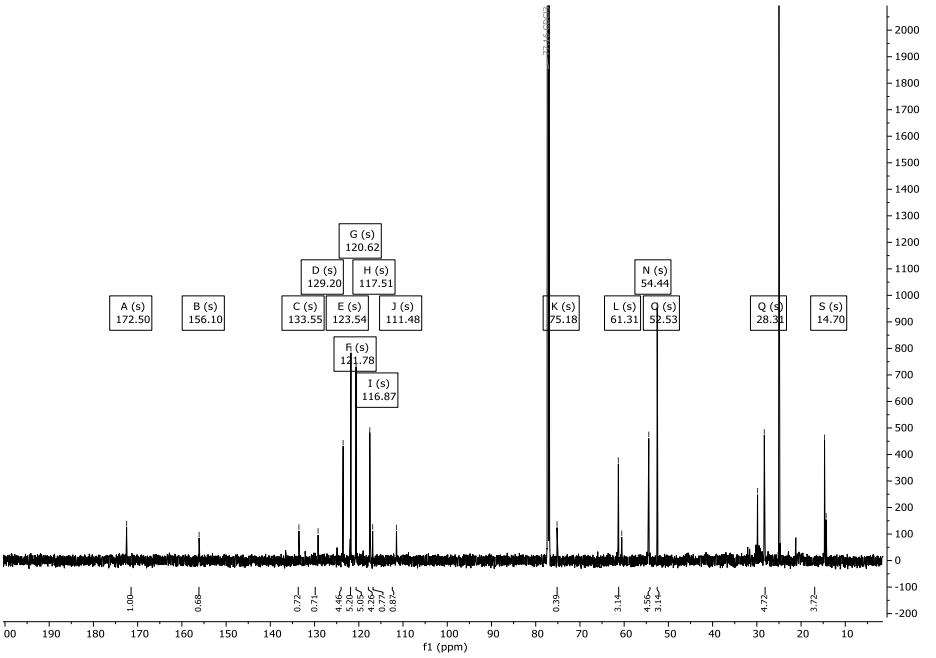


Abbildung 107: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **113** in $CDCl_3$.

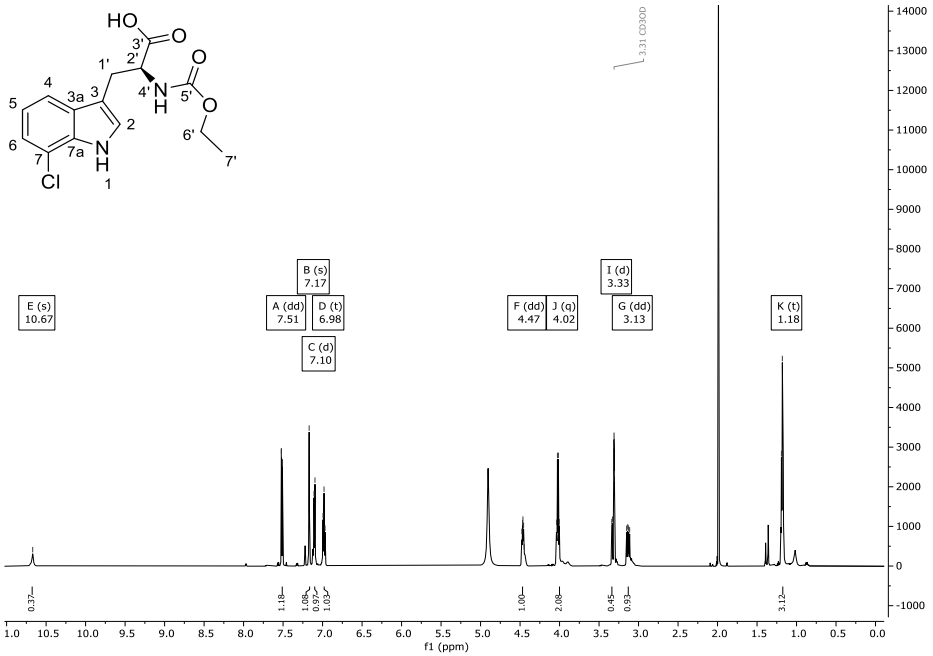


Abbildung 108: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **344** in CD_3OD.

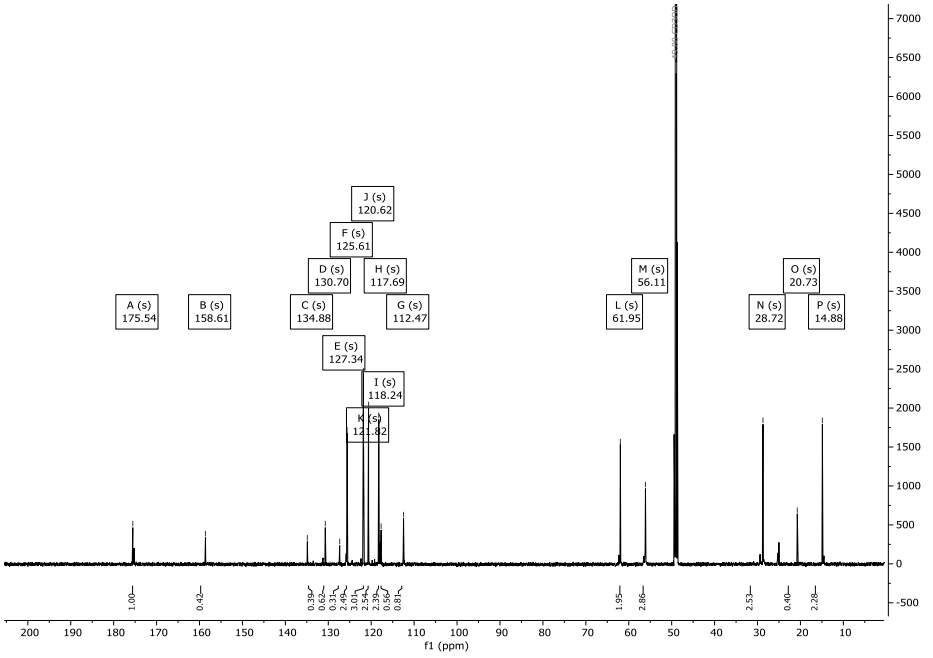


Abbildung 109: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **344** in CD_3OD.

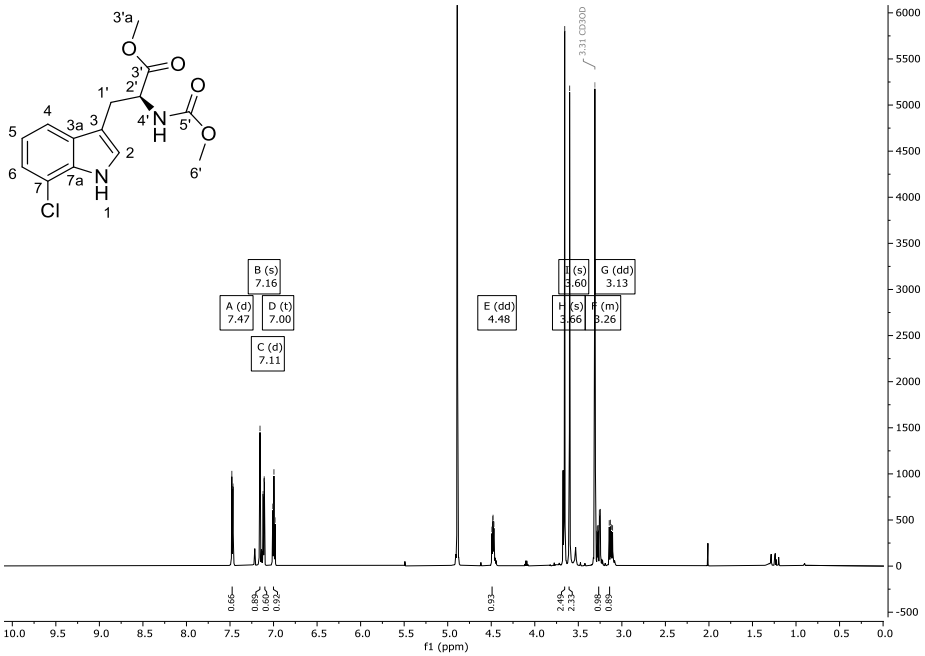


Abbildung 110: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **114** in CD_3OD.

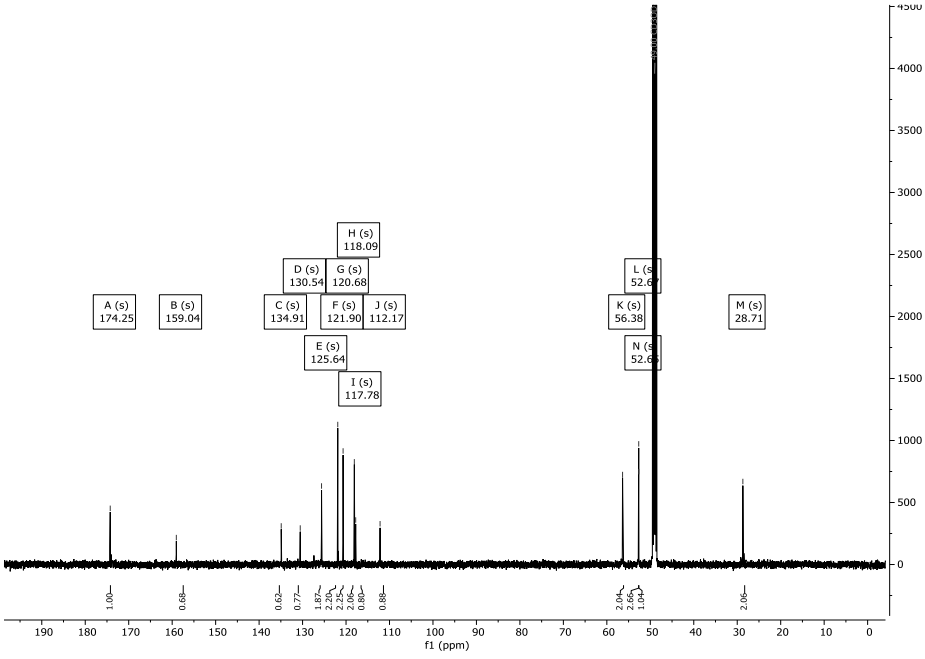


Abbildung 111: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **114** in CD_3OD.

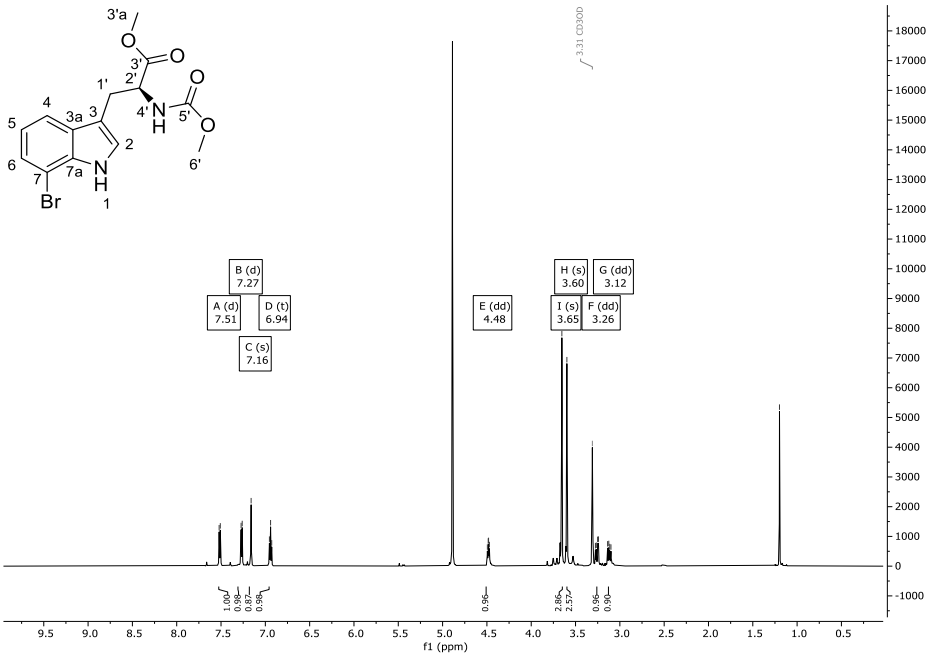


Abbildung 112: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **118** in CD_3OD.

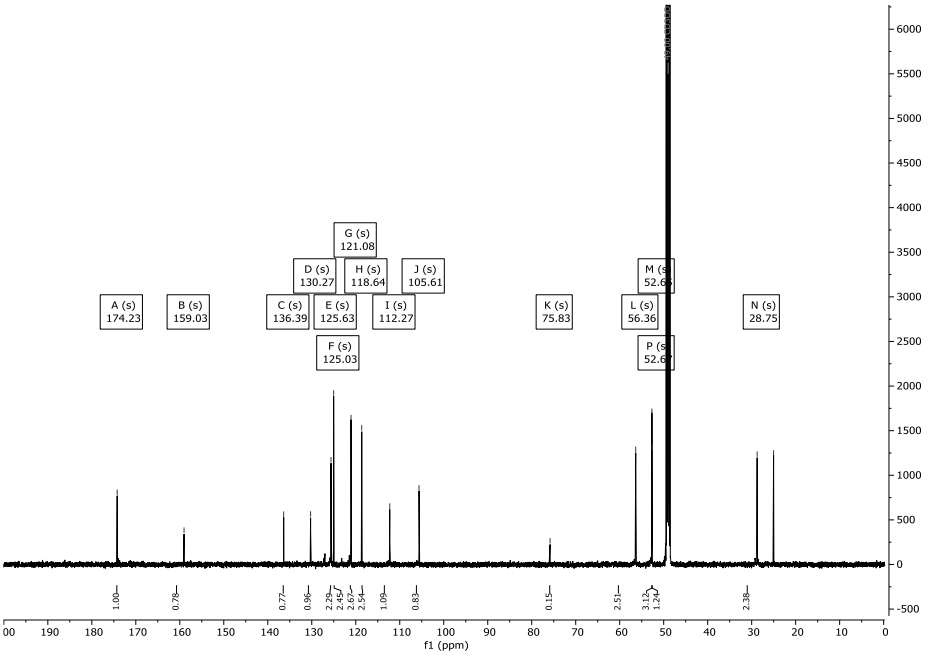


Abbildung 113: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **118** in CD_3OD.

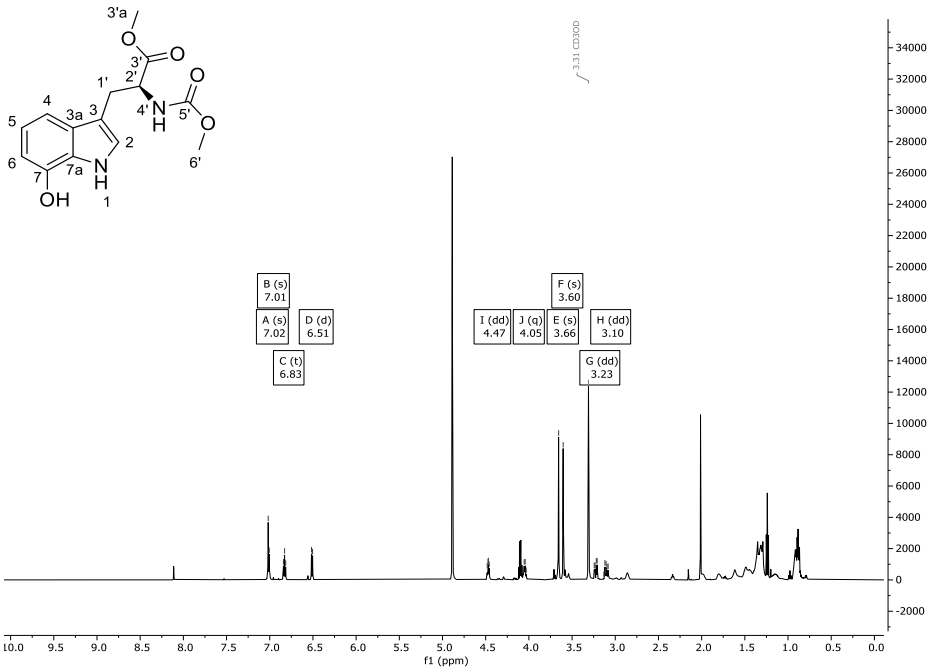


Abbildung 114: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **117** in CD_3OD.

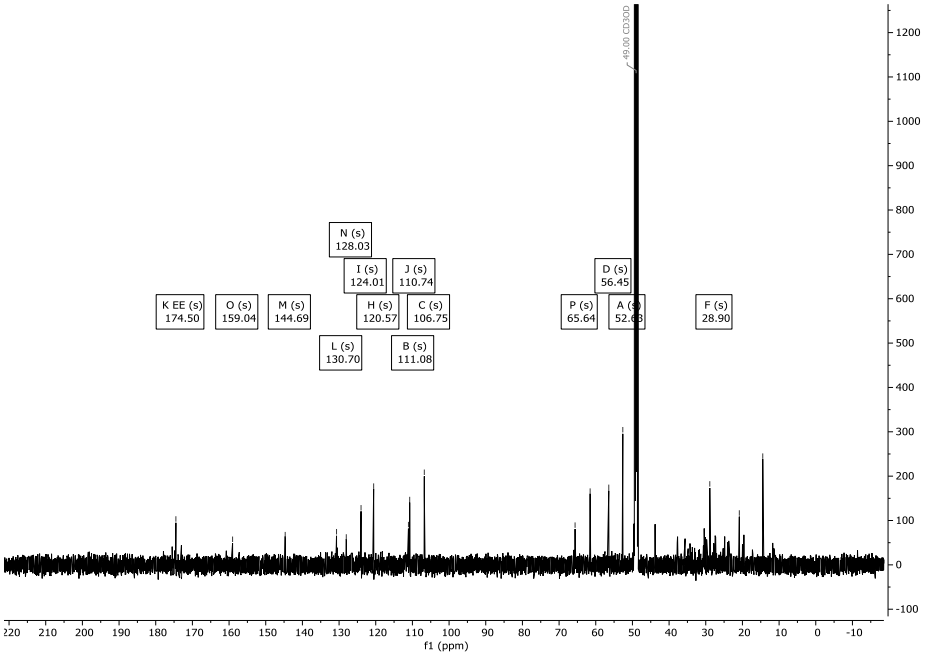


Abbildung 115: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **117** in CD_3OD.

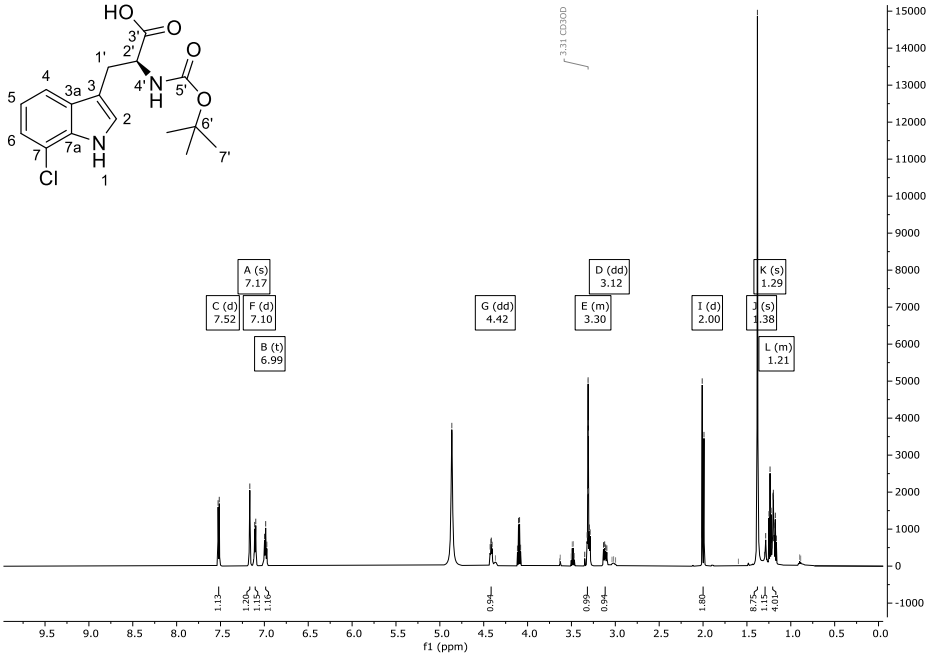


Abbildung 116: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **105** in CD_3OD.

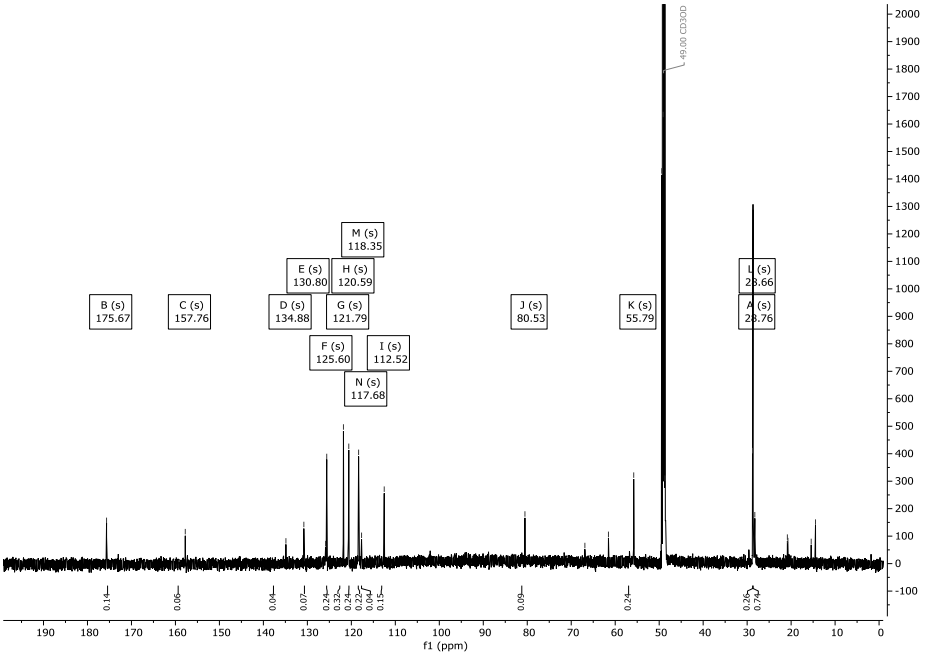


Abbildung 117: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **105** in CD_3OD.

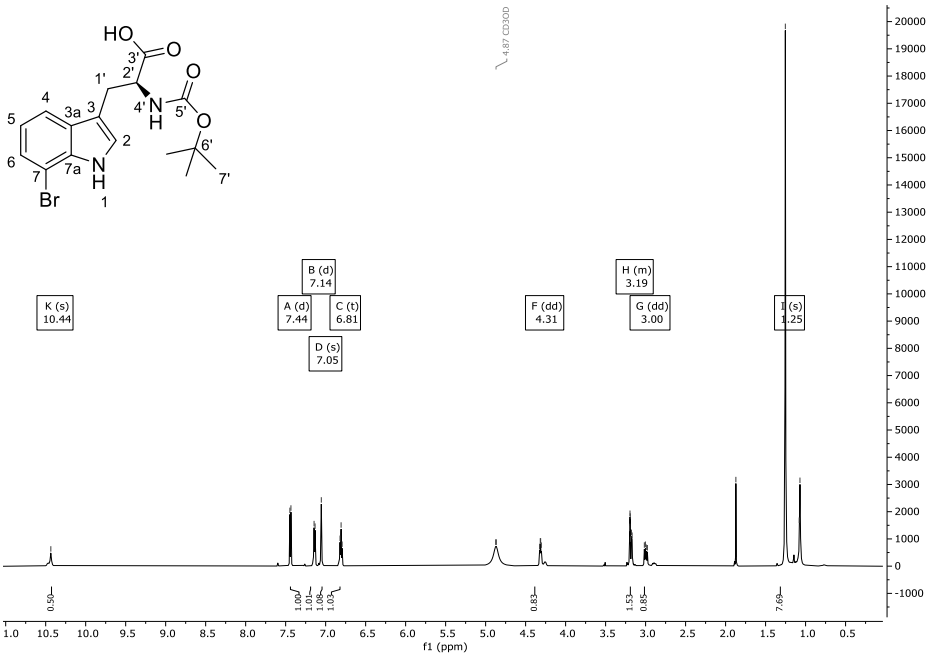


Abbildung 118: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **106** in CD_3OD.

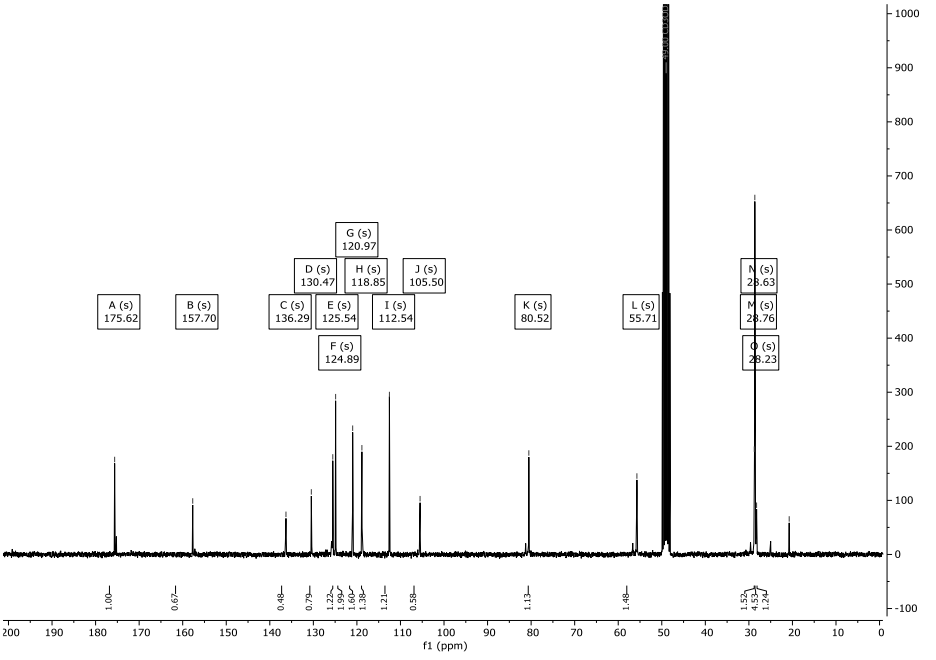


Abbildung 119: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **106** in CD_3OD.

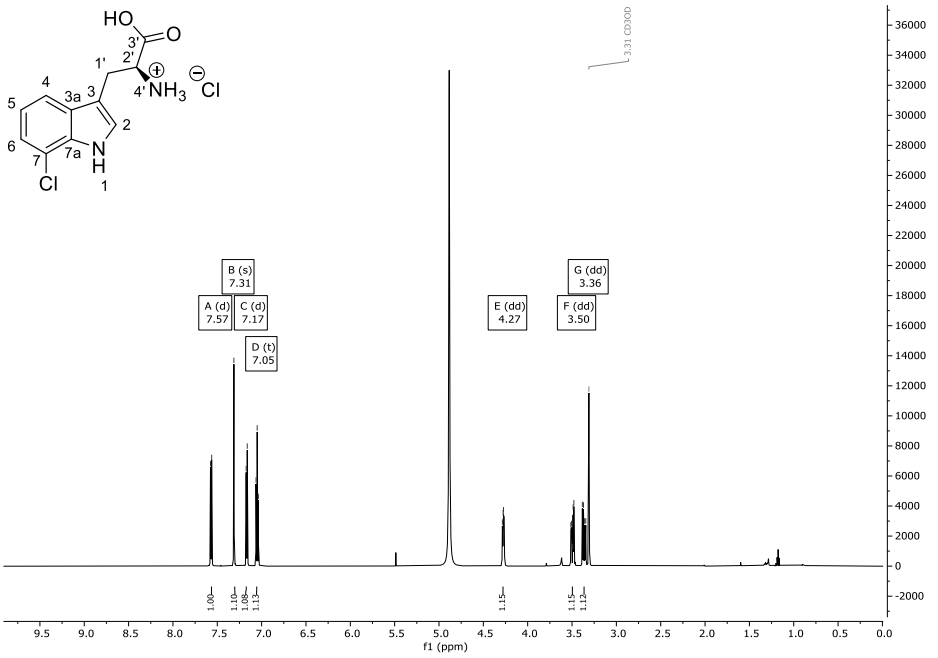


Abbildung 120: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **82-HCl** in CD_3OD.

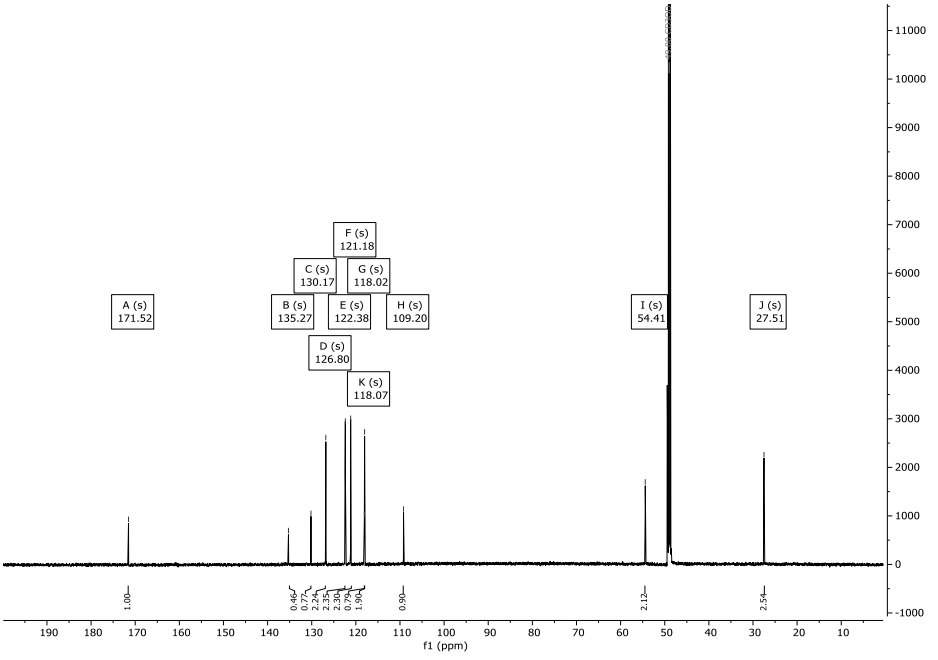


Abbildung 121: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **82-HCl** in CD_3OD.

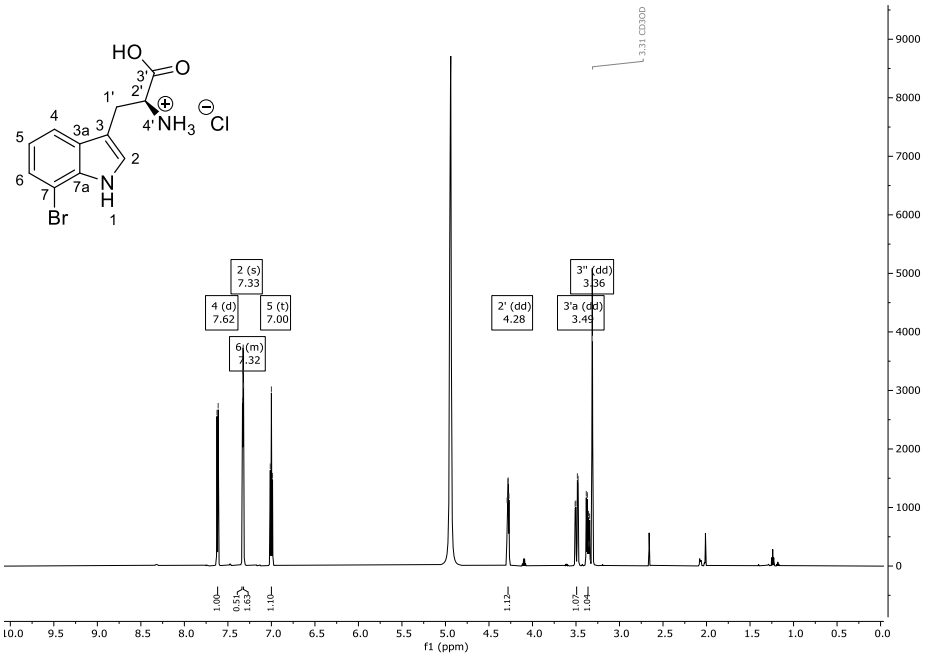


Abbildung 122: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **107-HCl** in CD_3OD.

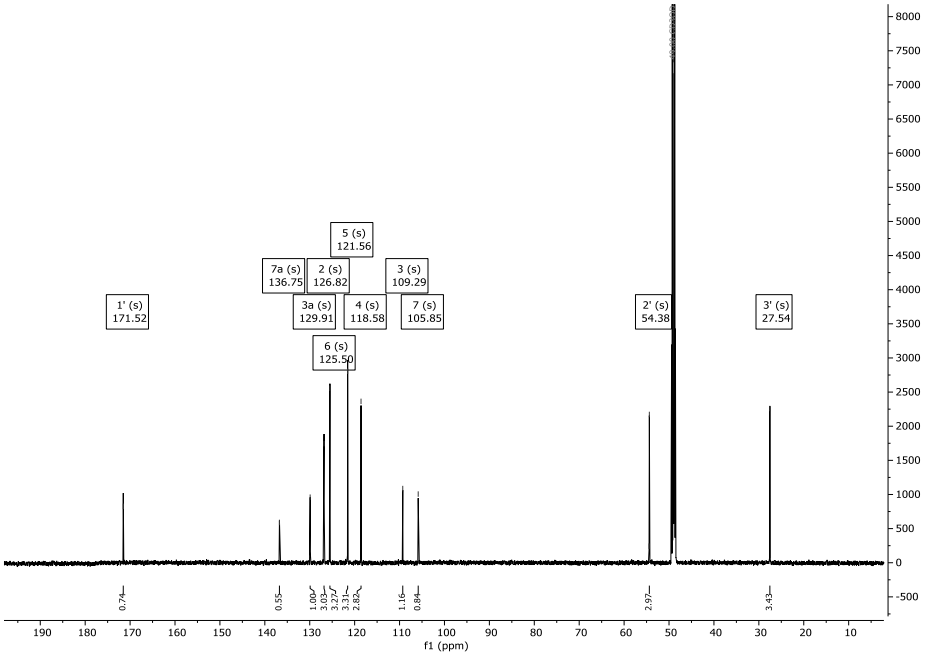


Abbildung 123: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **107-HCl** in CD_3OD.

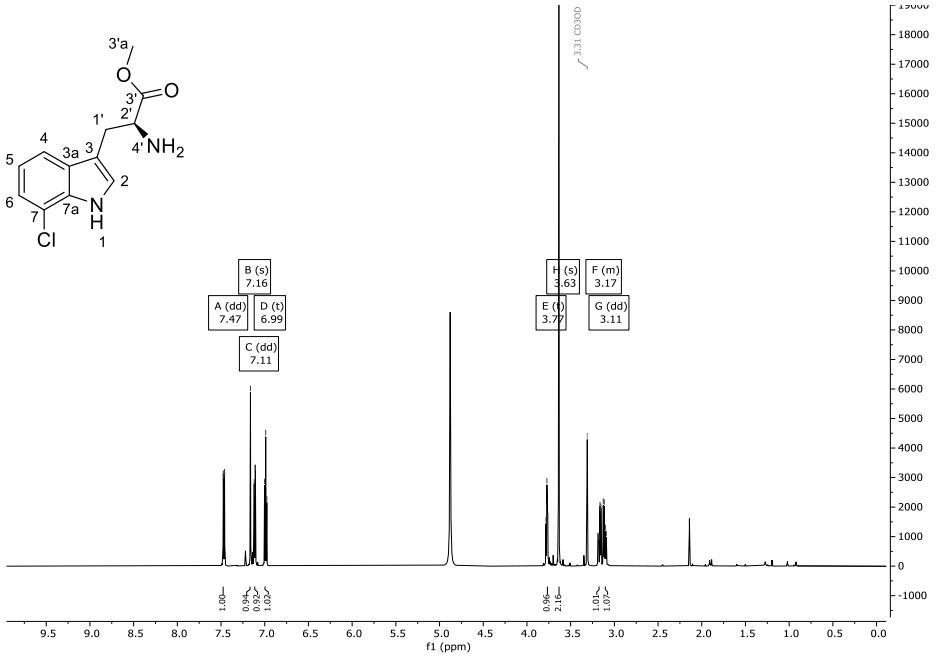


Abbildung 124: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **115** in CD_3OD.

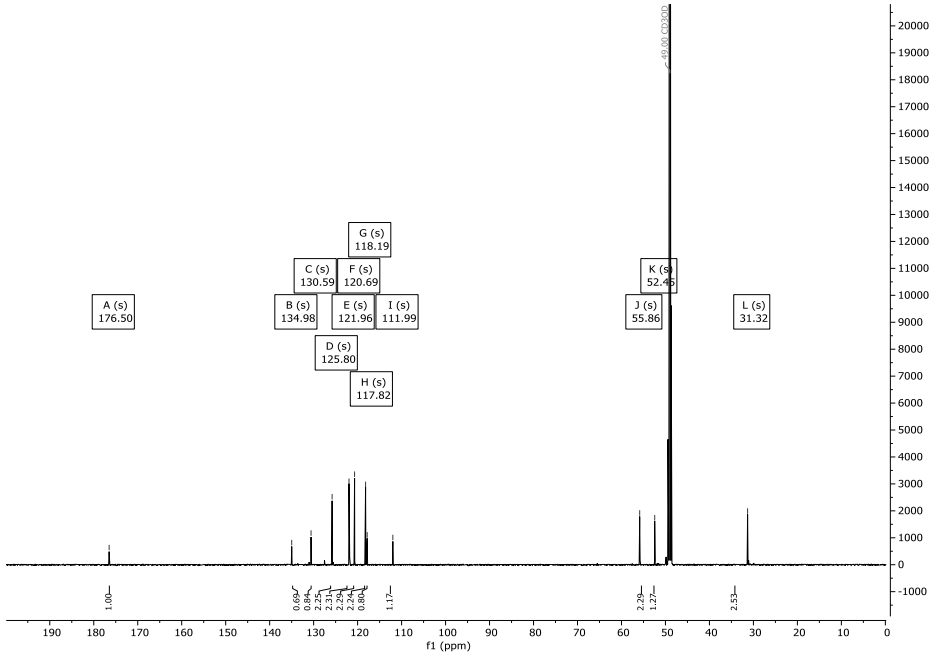


Abbildung 125: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **115** in CD_3OD.

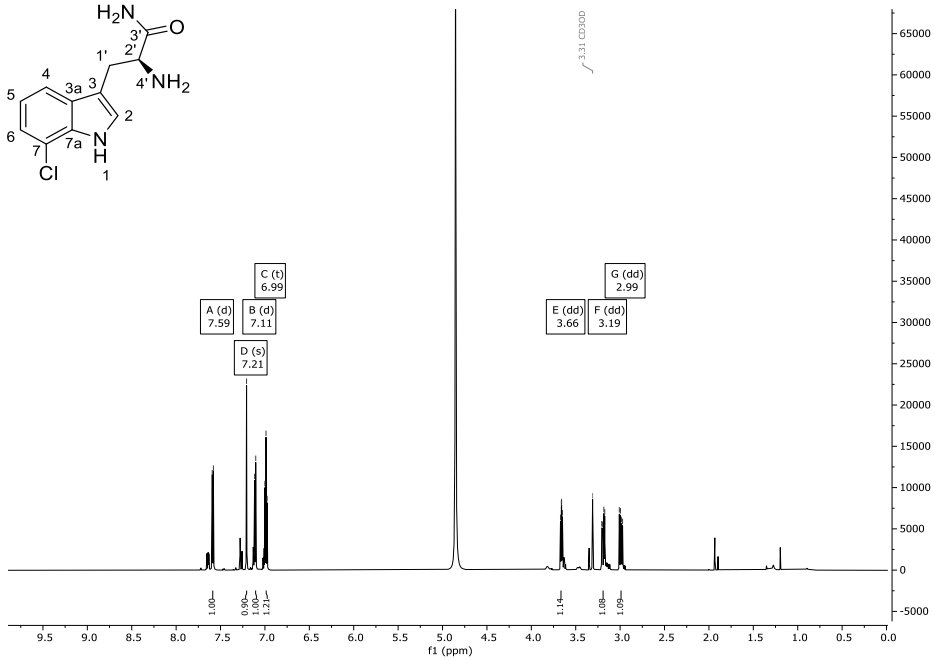


Abbildung 126: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **116** in CD_3OD.

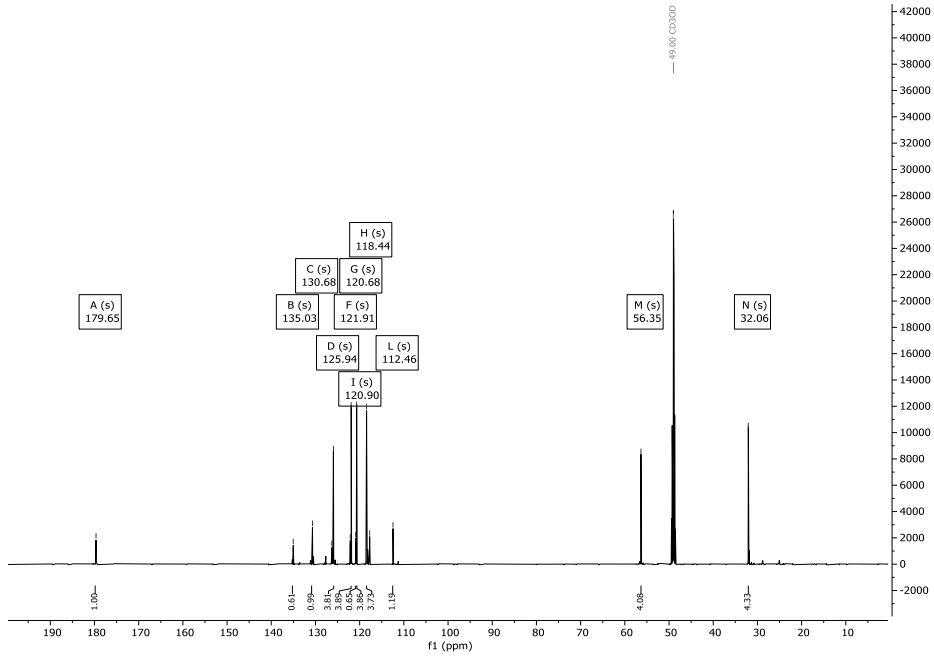


Abbildung 127: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **116** in CD_3OD.

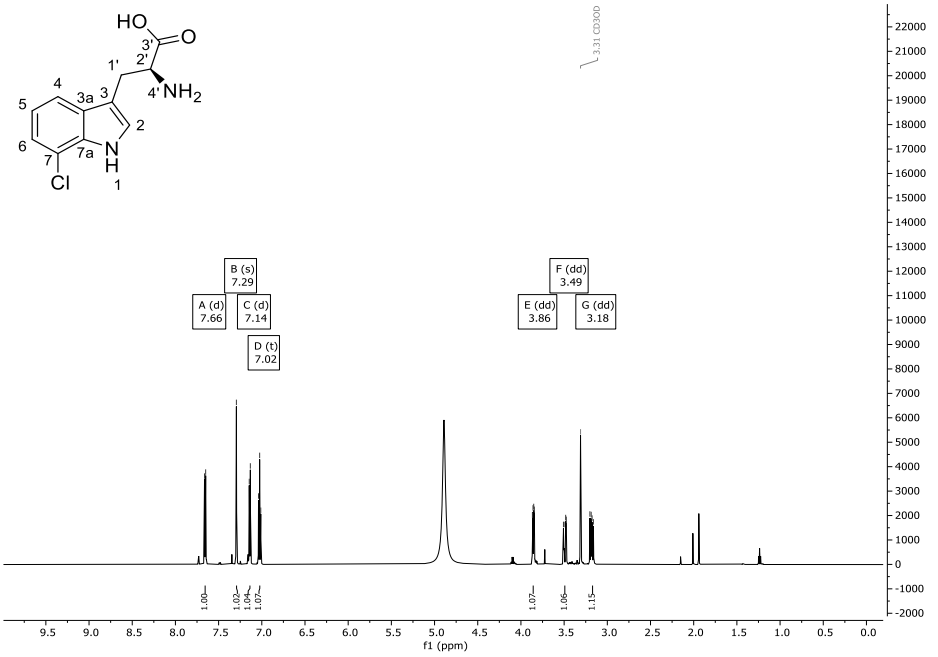


Abbildung 128: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **82** in CD_3OD.

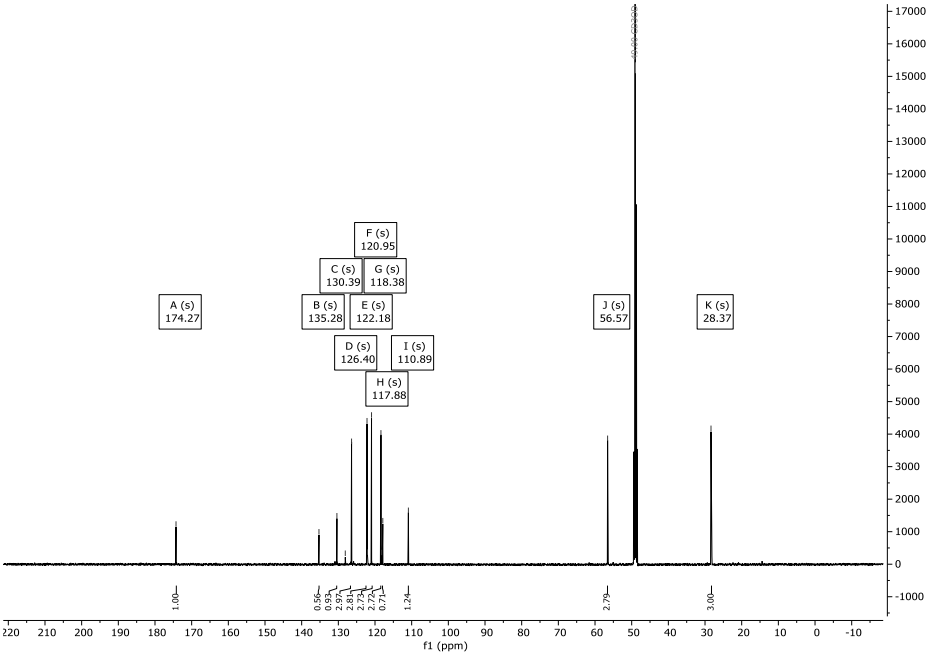


Abbildung 129: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **82** in CD_3OD.

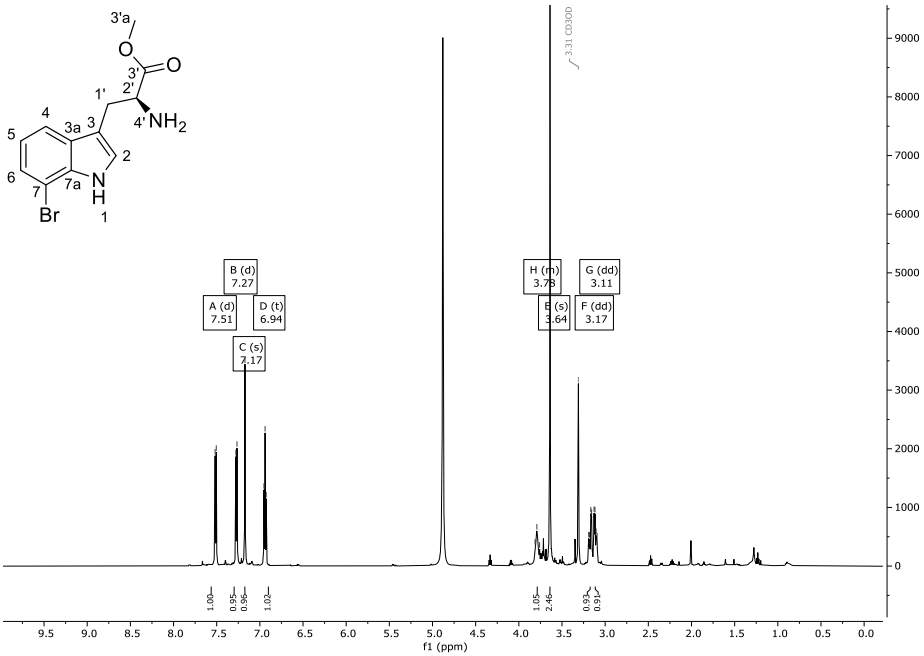


Abbildung 130: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **294** in CD_3OD.

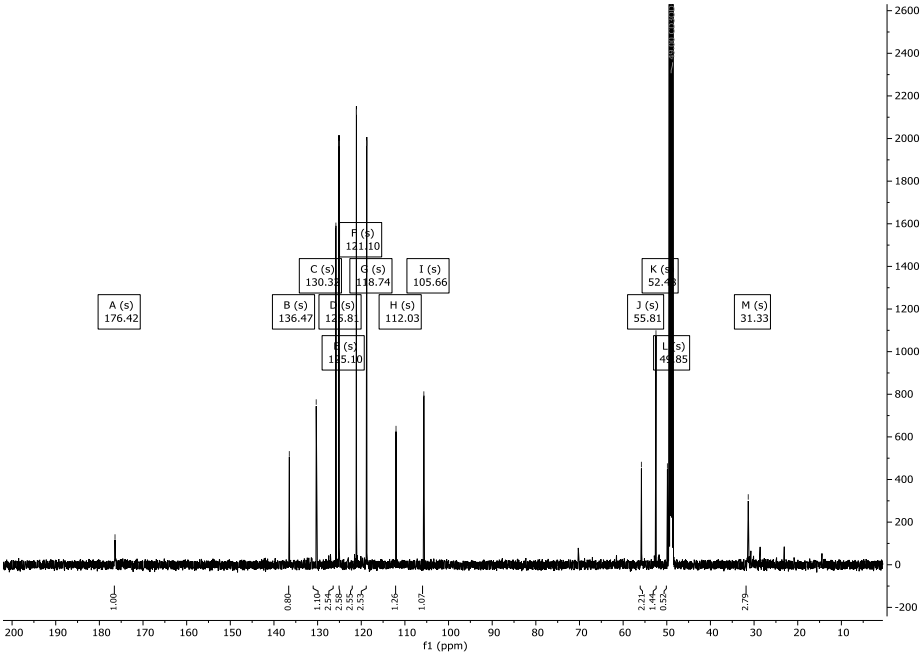


Abbildung 131: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **294** in CD_3OD.

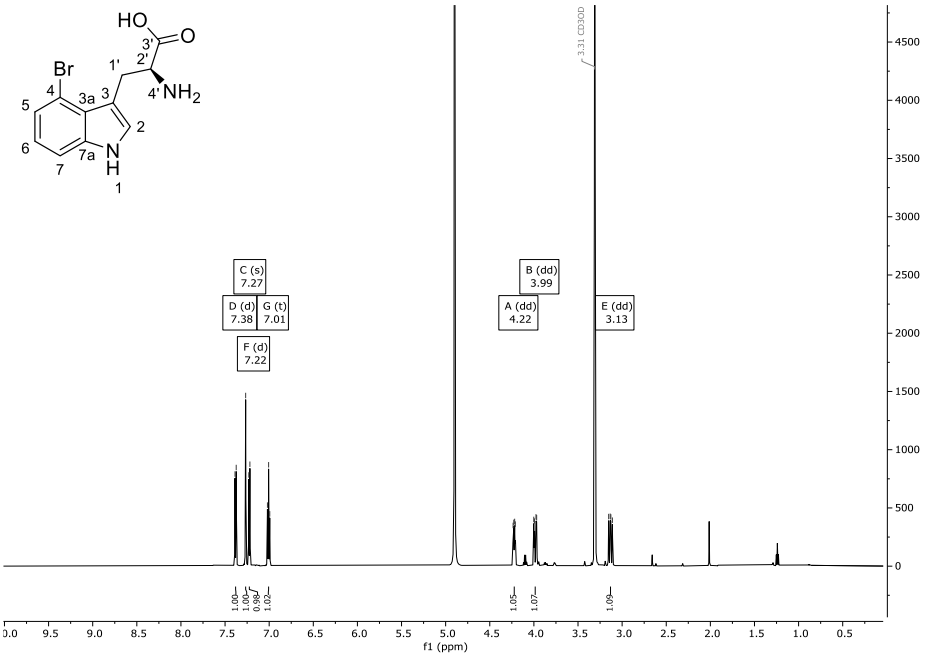


Abbildung 132: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **297** in CD_3OD.

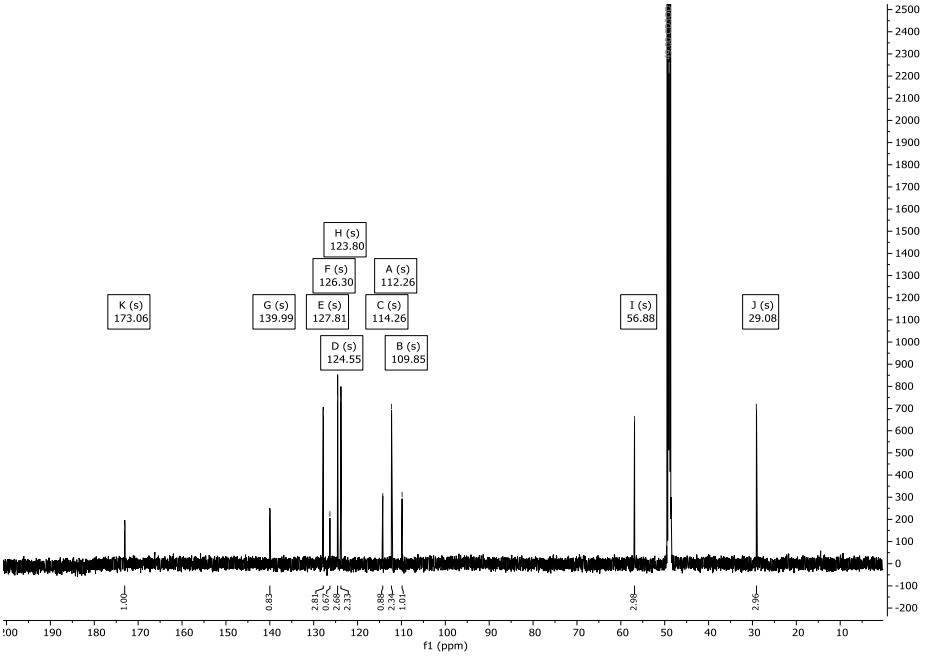


Abbildung 133: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **297** in CD_3OD.

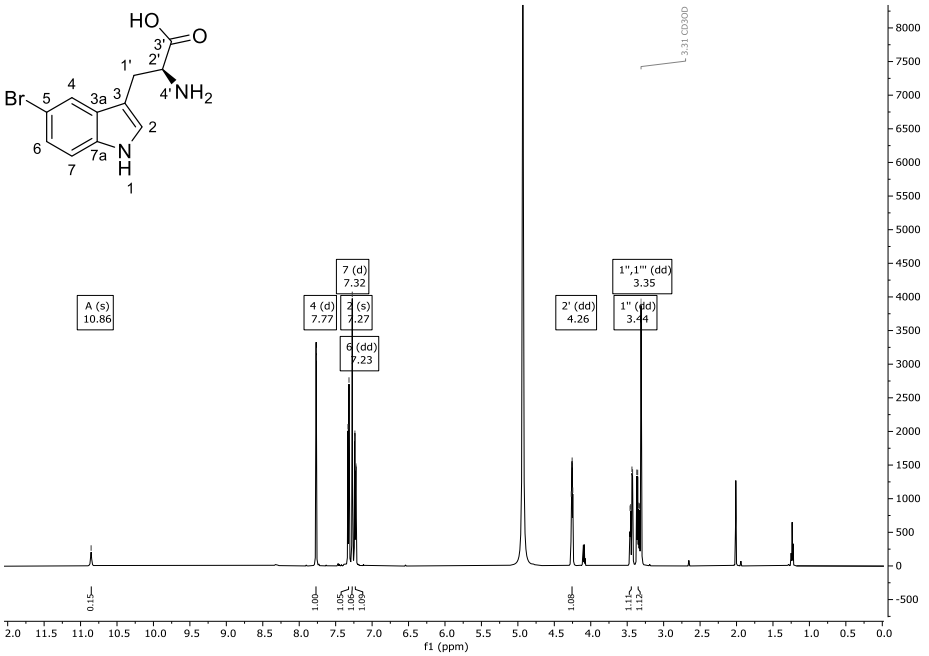


Abbildung 134: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **268** in CD_3OD.

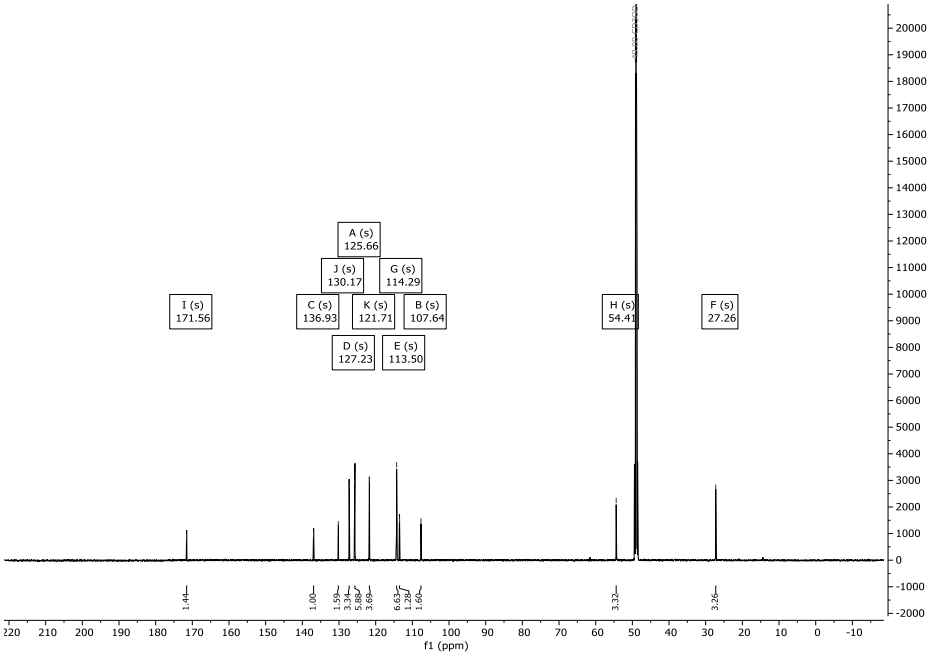


Abbildung 135: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **268** in CD_3OD.

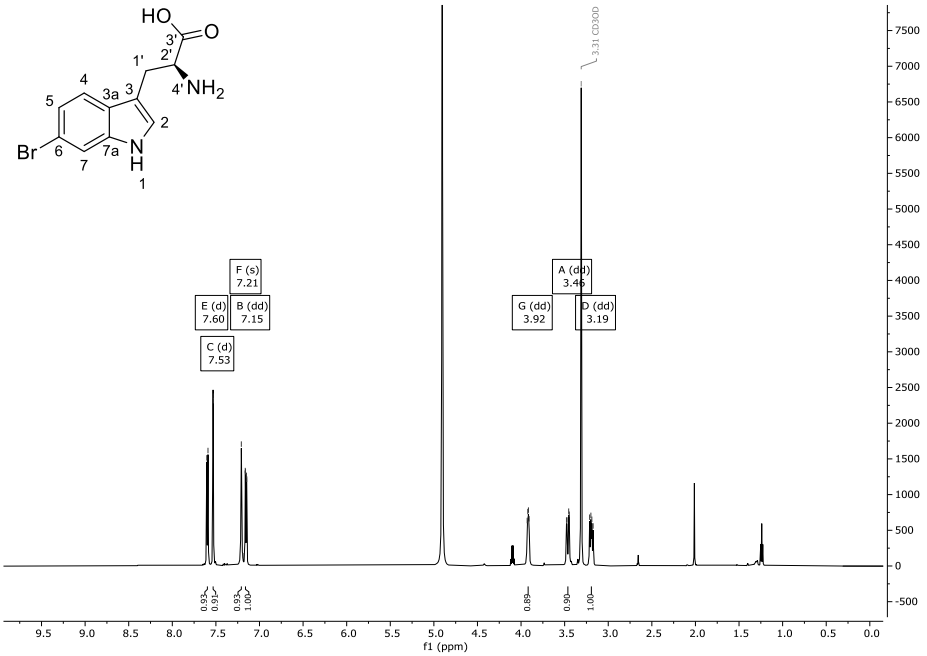


Abbildung 136: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **298** in CD_3OD.

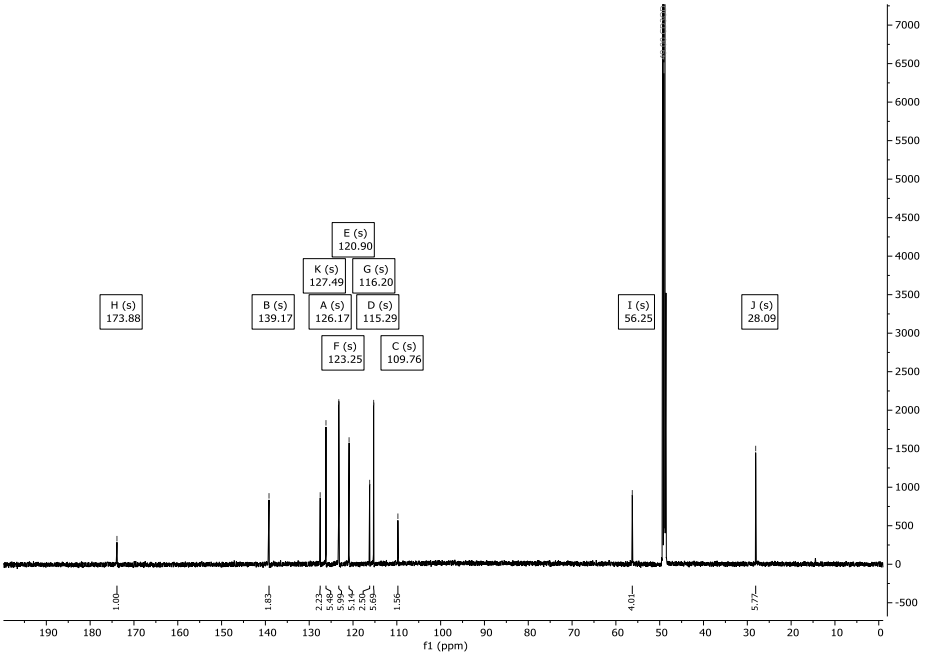


Abbildung 137: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **298** in CD_3OD.

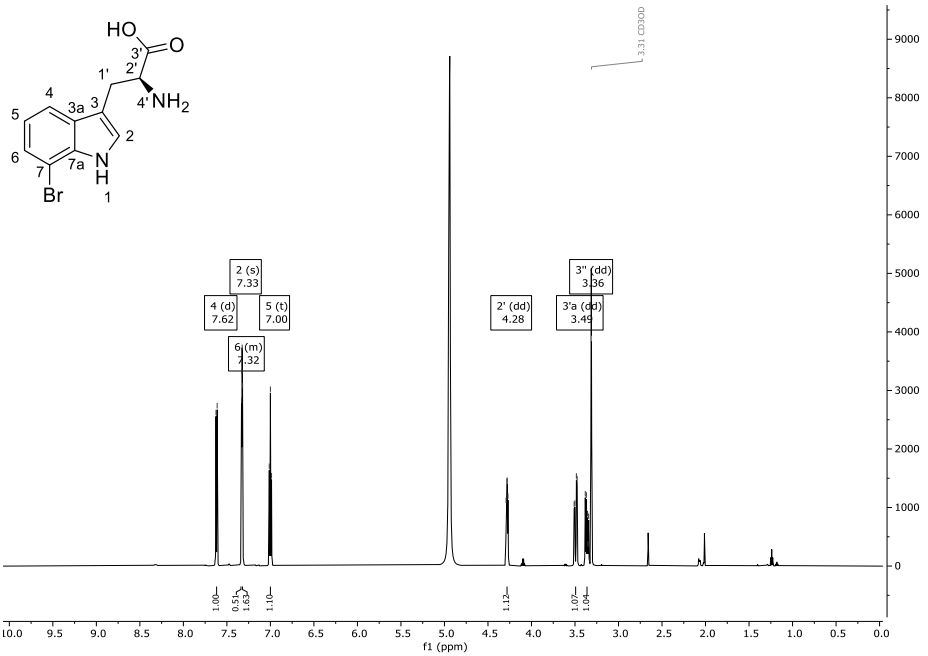


Abbildung 138: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **107** in CD_3OD.

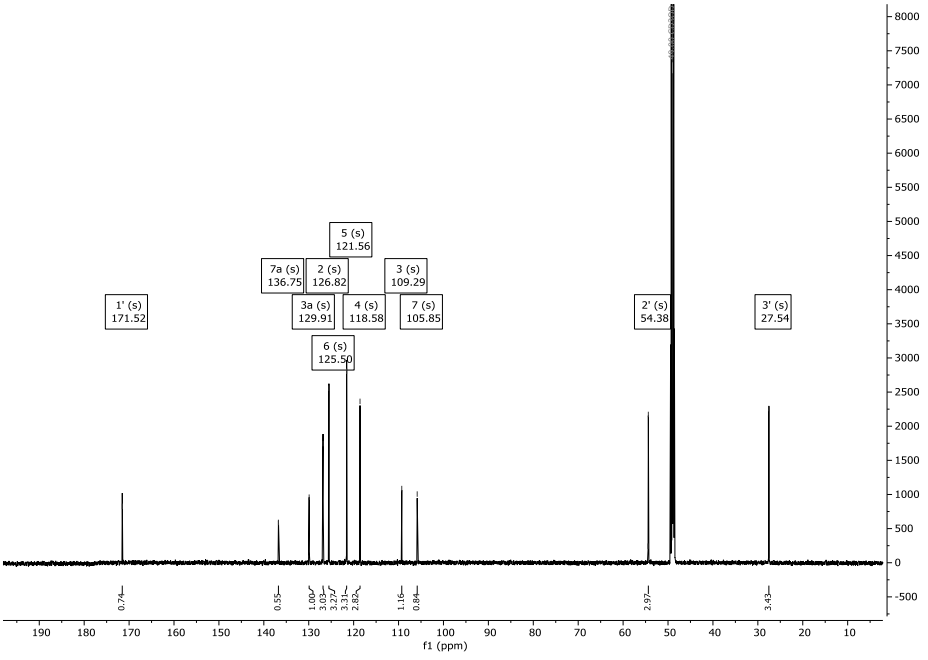


Abbildung 139: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **107** in CD_3OD.

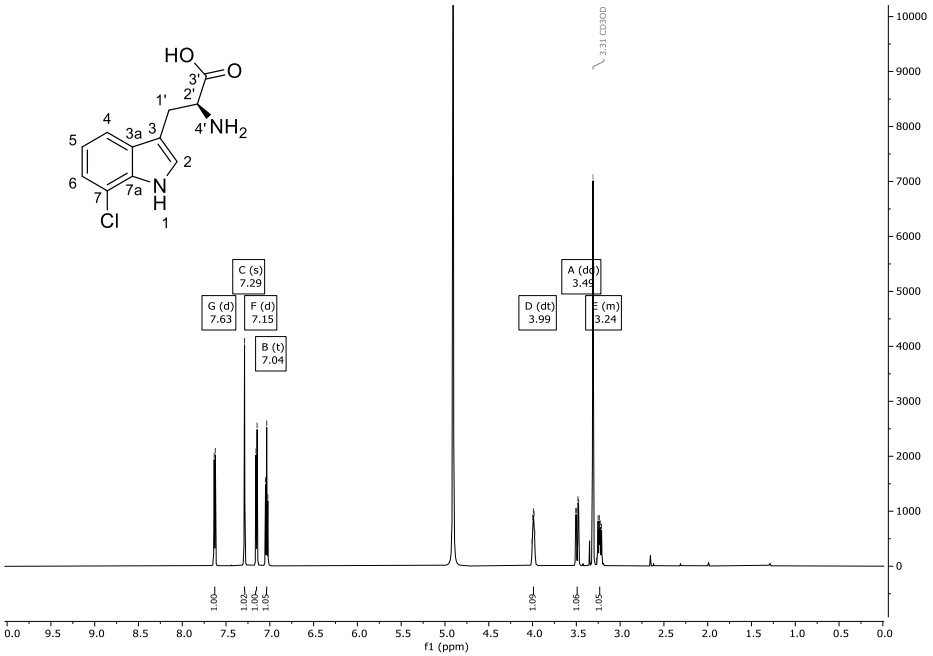


Abbildung 140: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **82** in CD_3OD.

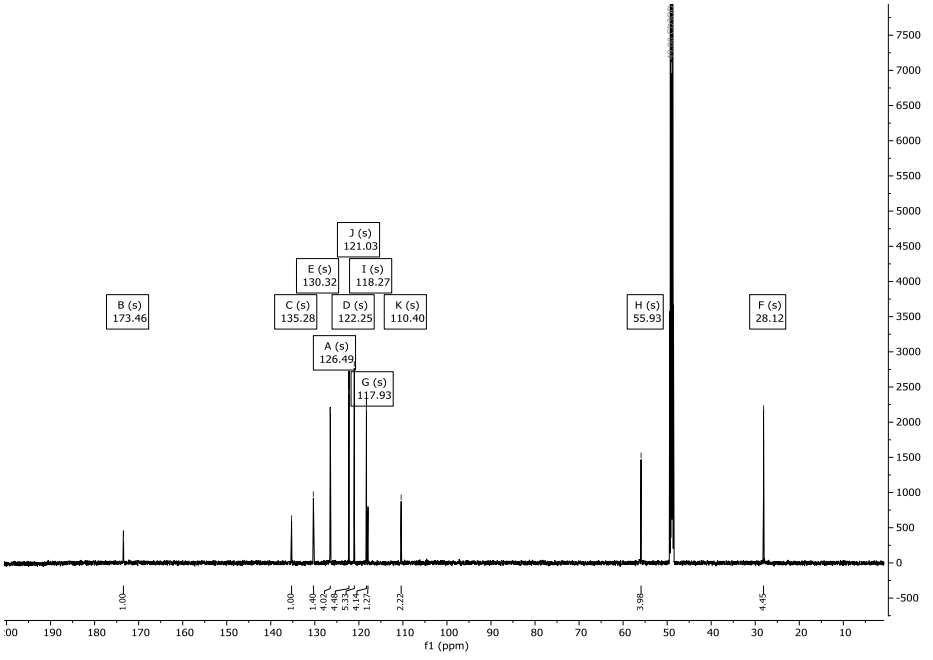


Abbildung 141: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **82** in CD_3OD.

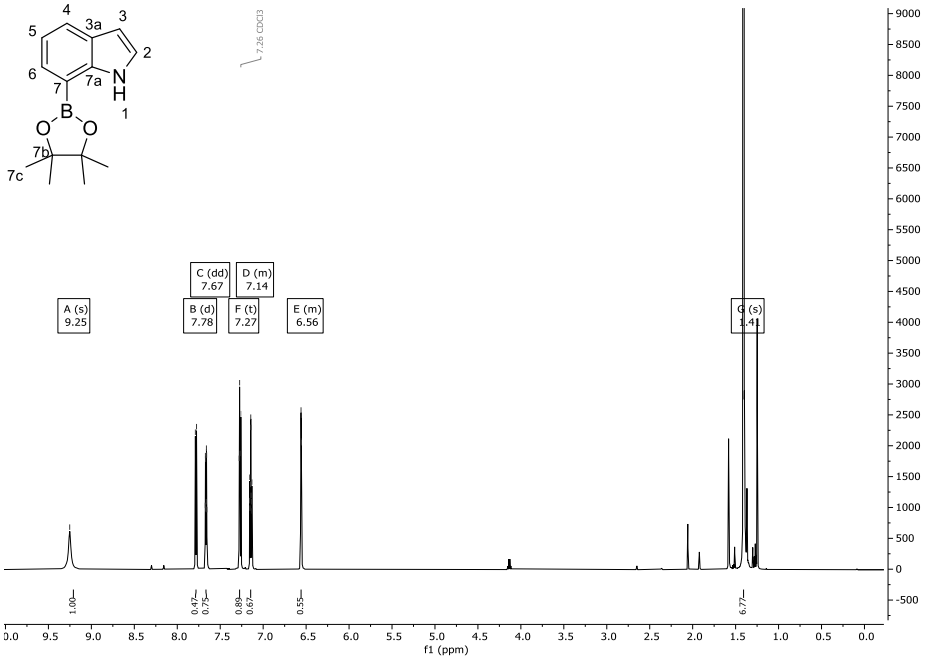


Abbildung 142: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **38** in $CDCl_3$.

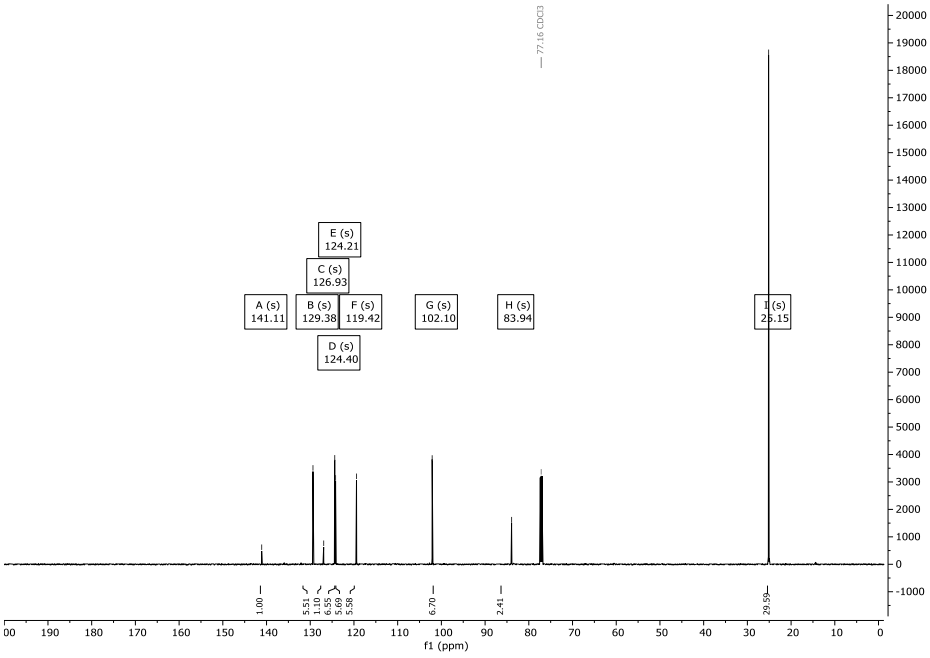


Abbildung 143: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **38** in $CDCl_3$.

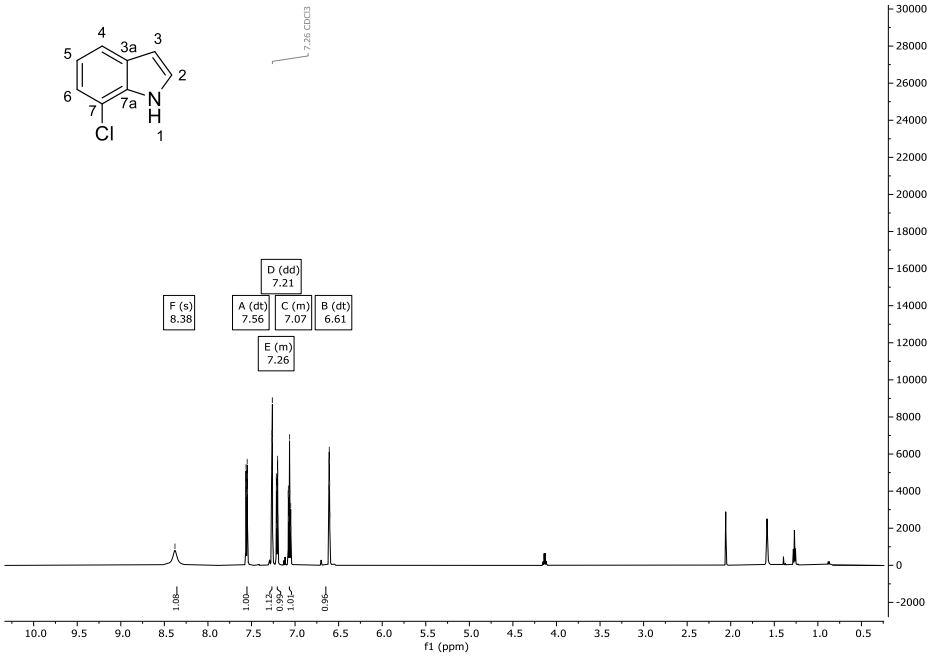


Abbildung 144: ^{1}H-NMR-Spektrum (300 MHz) von Verbindung **45** in $CDCl_3$.

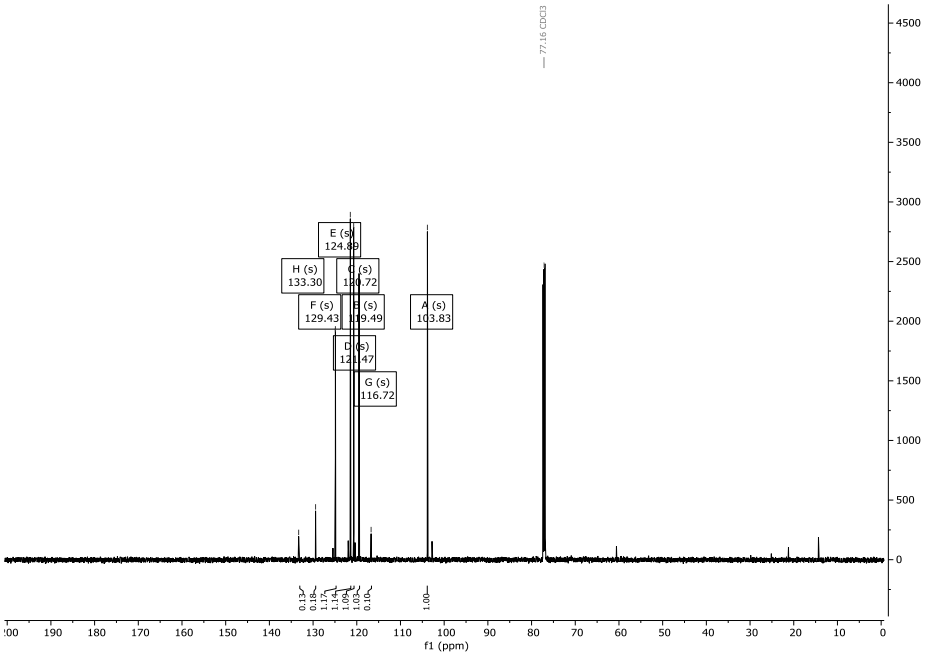


Abbildung 145: ^{13}C-NMR-Spektrum (76 MHz) von Verbindung **45** in $CDCl_3$.

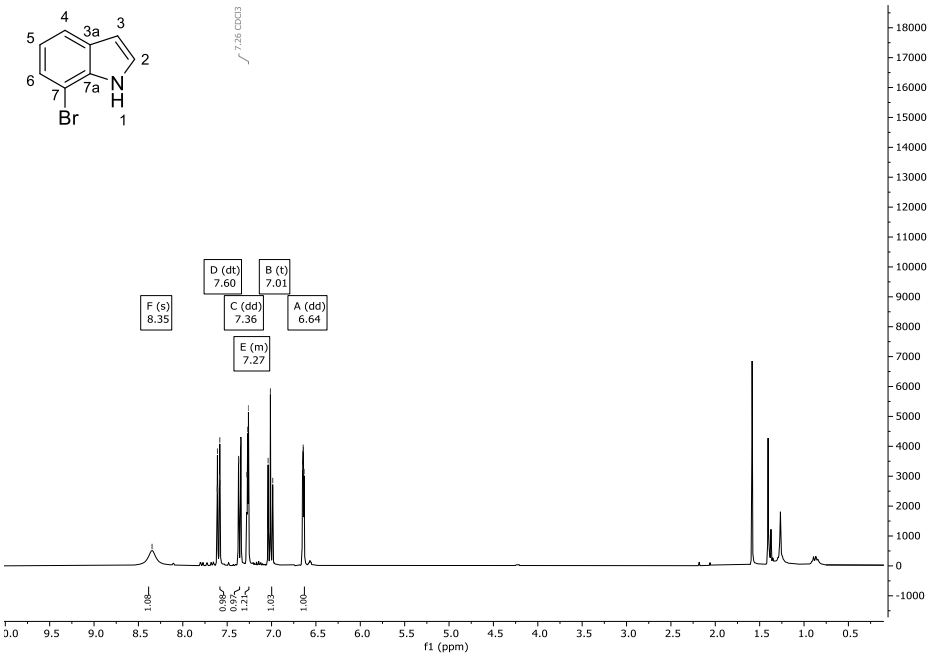


Abbildung 146: ^{1}H-NMR-Spektrum (300 MHz) von Verbindung **46** in $CDCl_3$.

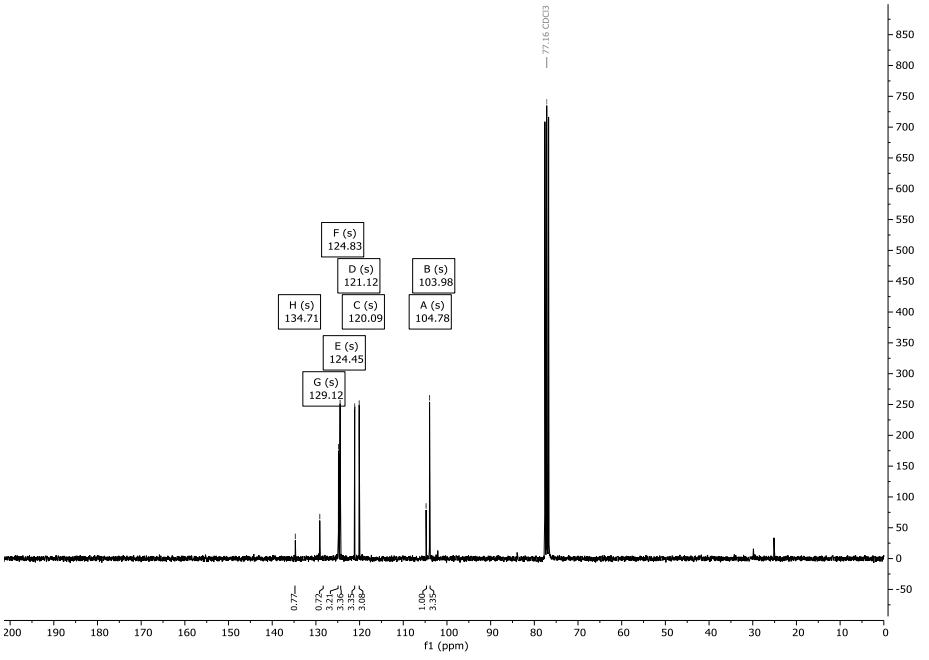


Abbildung 147: ^{13}C-NMR-Spektrum (76 MHz) von Verbindung **46** in $CDCl_3$.

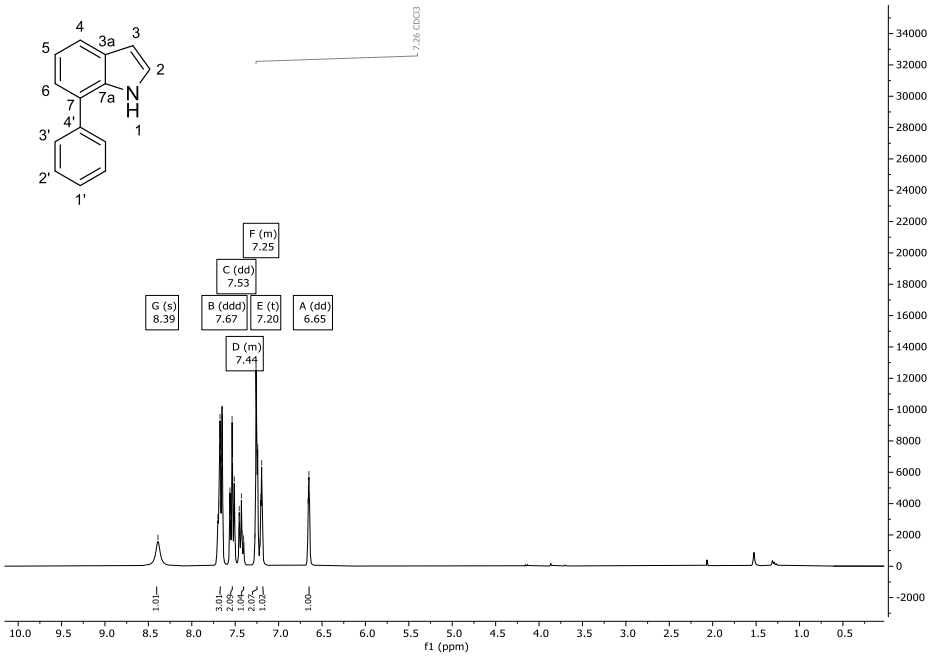


Abbildung 148: ^{1}H-NMR-Spektrum (300 MHz) von Verbindung **120** in $CDCl_3$.

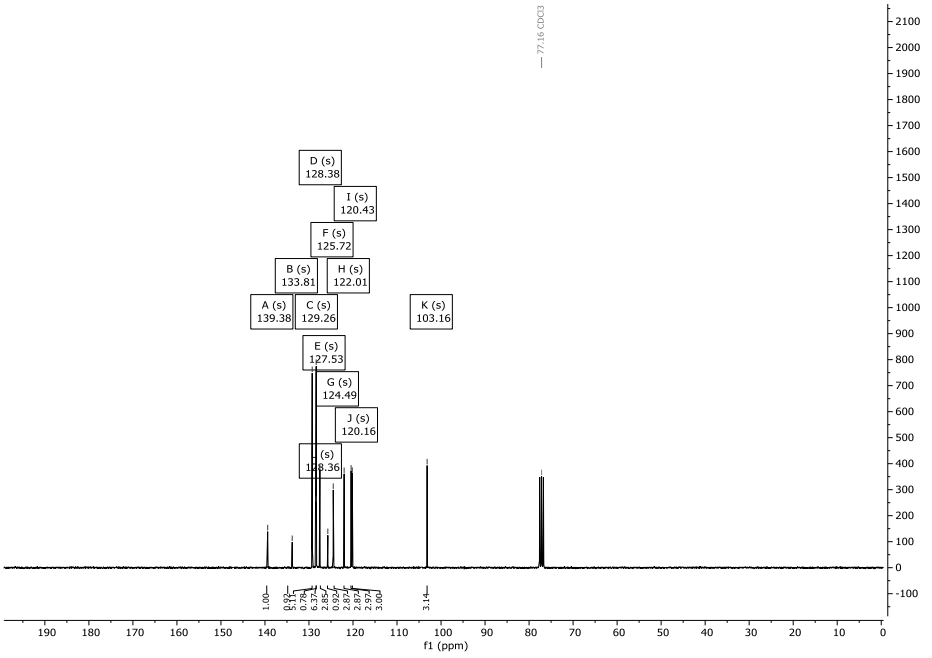


Abbildung 149: ^{13}C-NMR-Spektrum (76 MHz) von Verbindung **120** in $CDCl_3$.

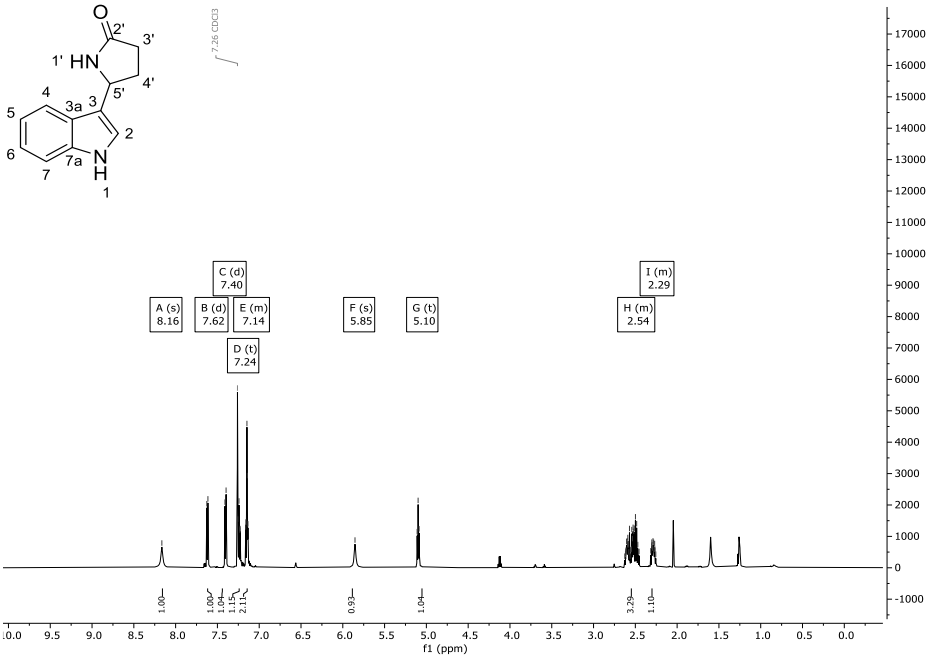


Abbildung 150: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **68** in $CDCl_3$.

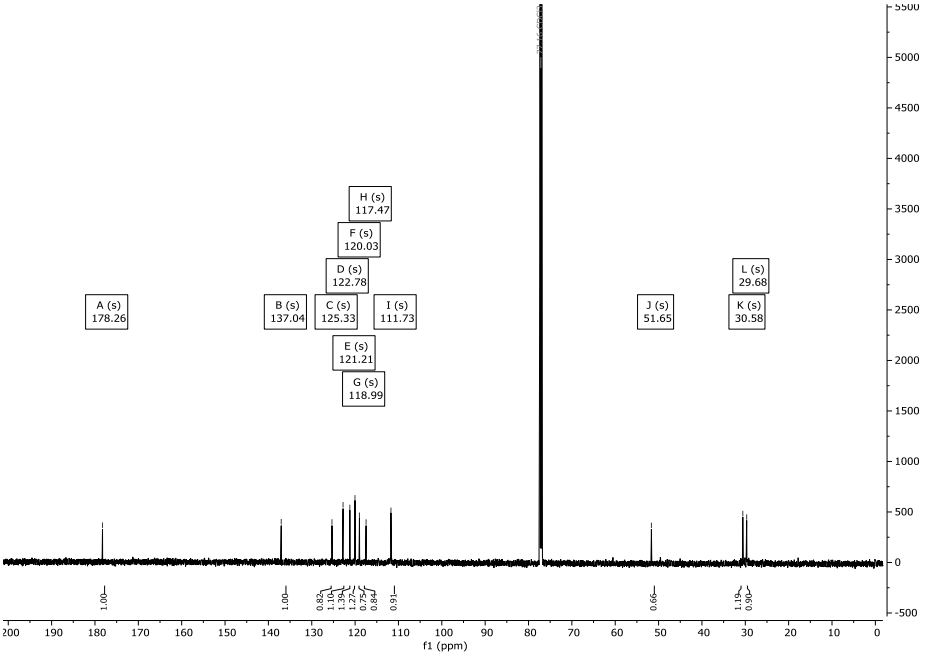


Abbildung 151: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **68** in $CDCl_3$.

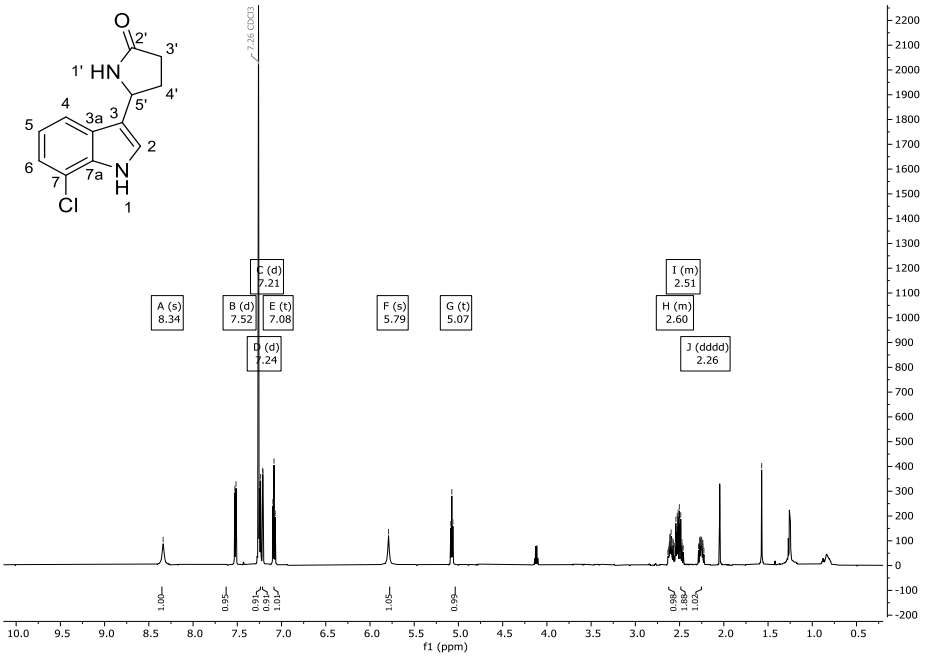


Abbildung 152: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **88** in $CDCl_3$.

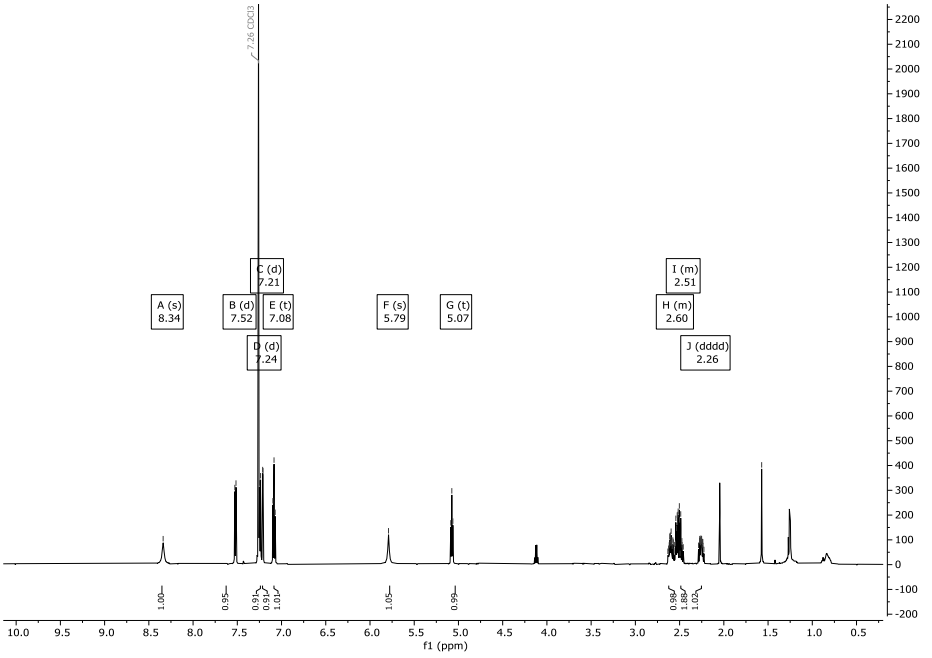


Abbildung 153: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **88** in $CDCl_3$.

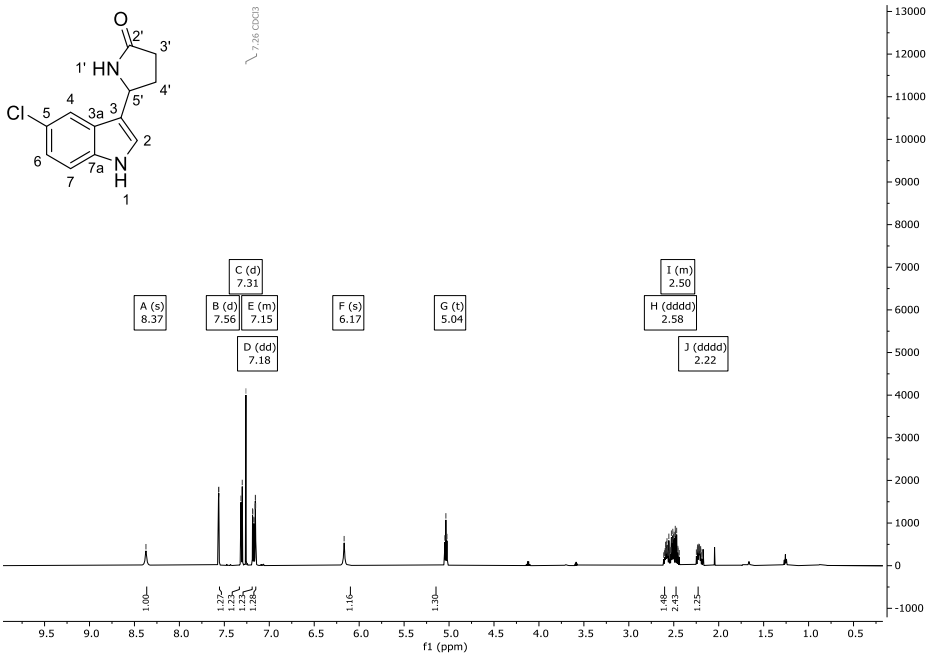


Abbildung 154: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **87** in $CDCl_3$.

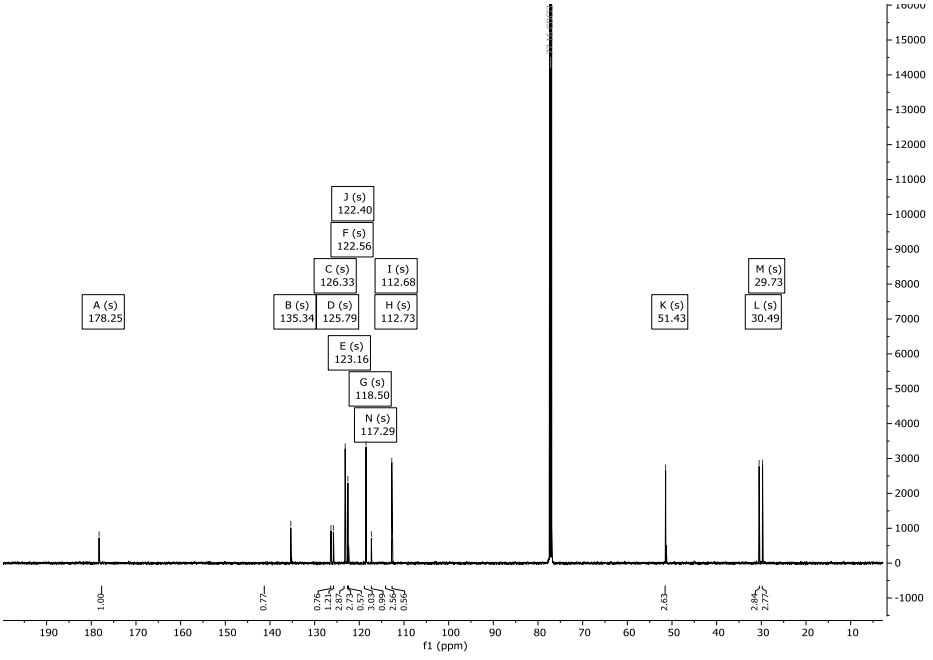


Abbildung 155: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **87** in $CDCl_3$.

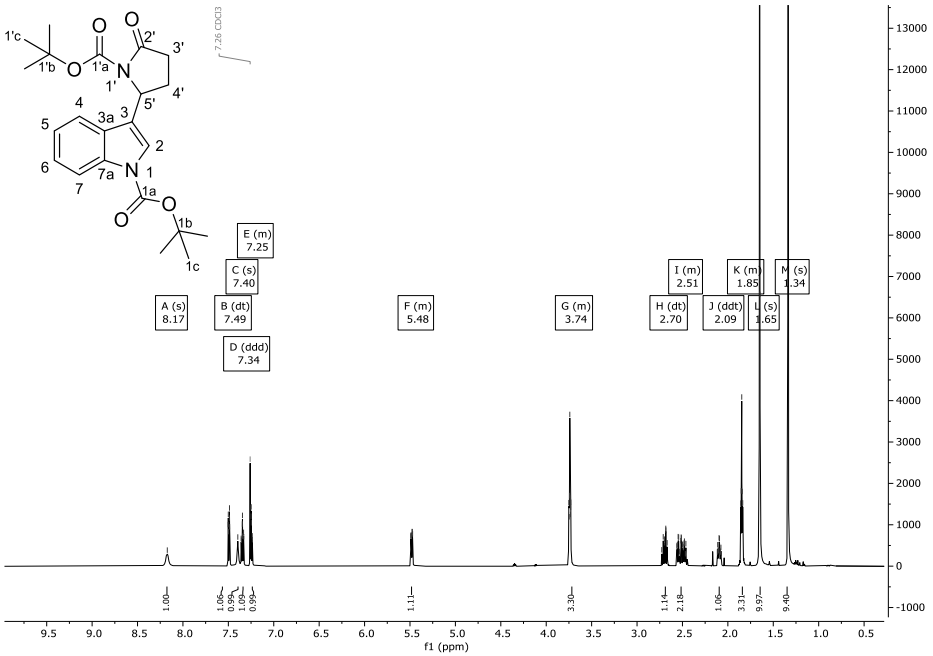


Abbildung 156: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **70** in $CDCl_3$.

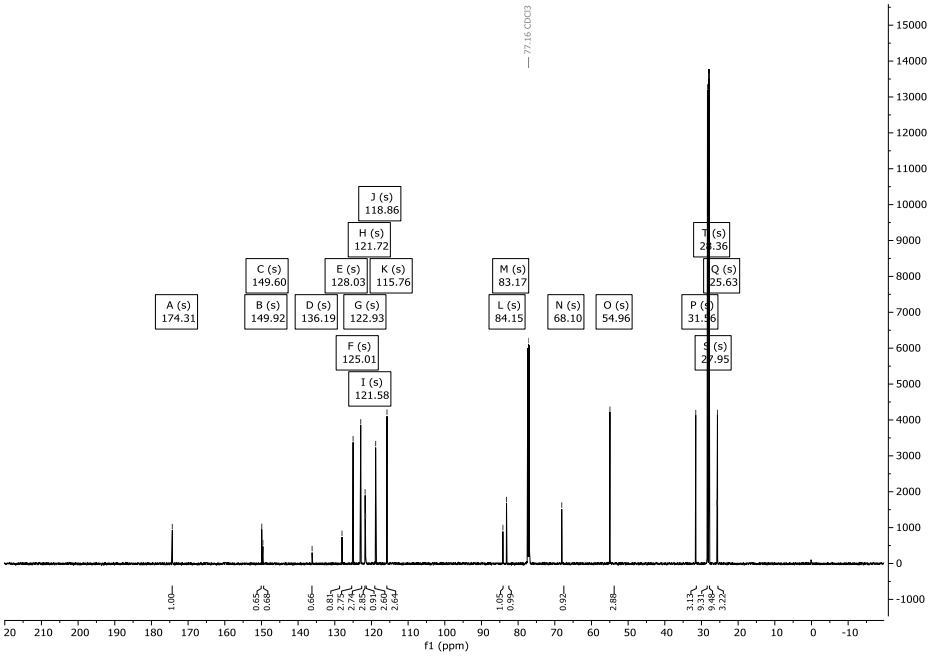


Abbildung 157: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **70** in $CDCl_3$.

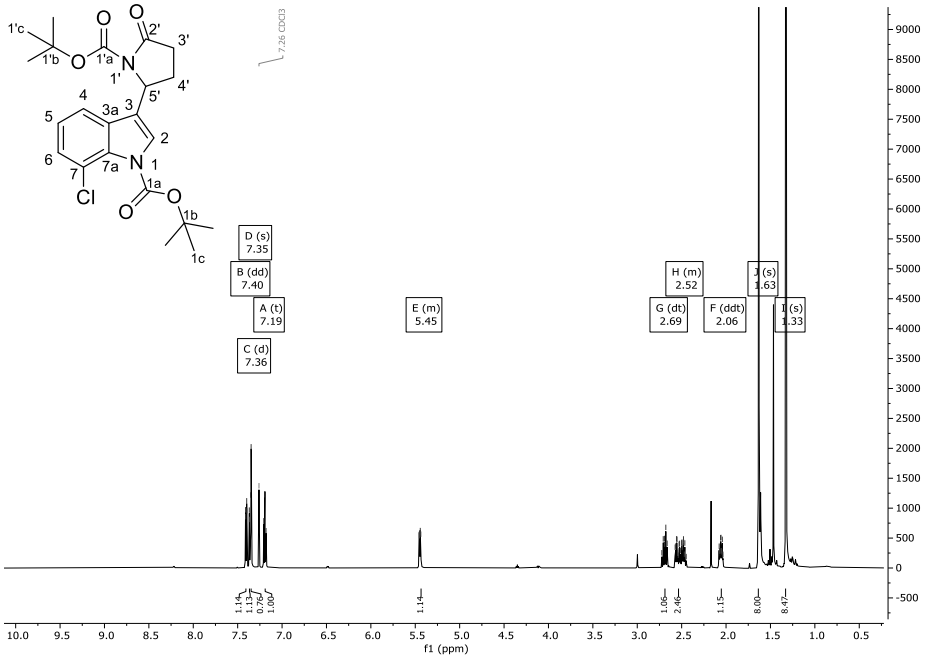


Abbildung 158: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **90** in $CDCl_3$.

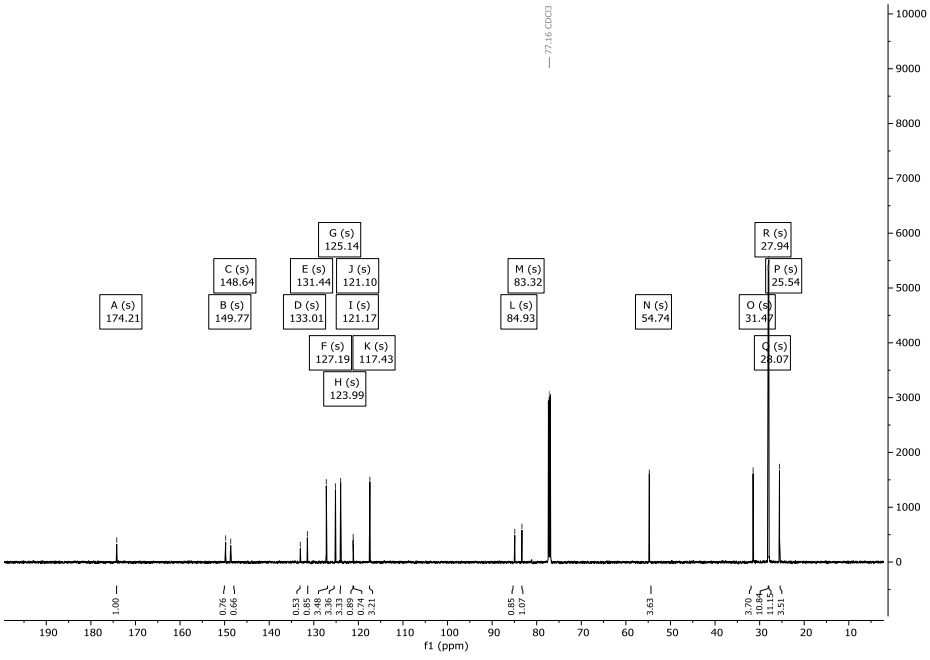


Abbildung 159: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **90** in $CDCl_3$.

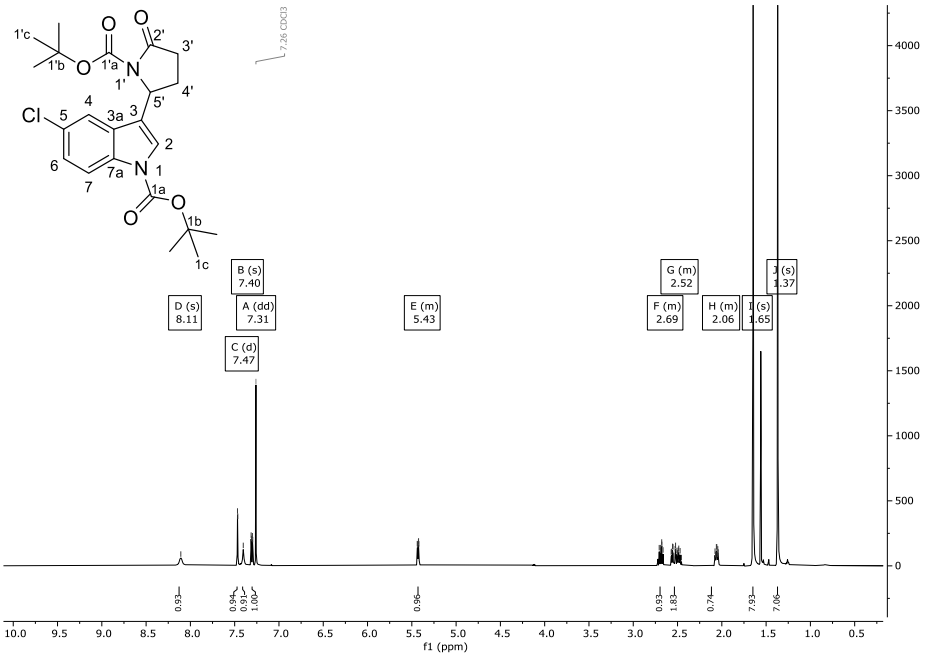


Abbildung 160: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **89** in $CDCl_3$.

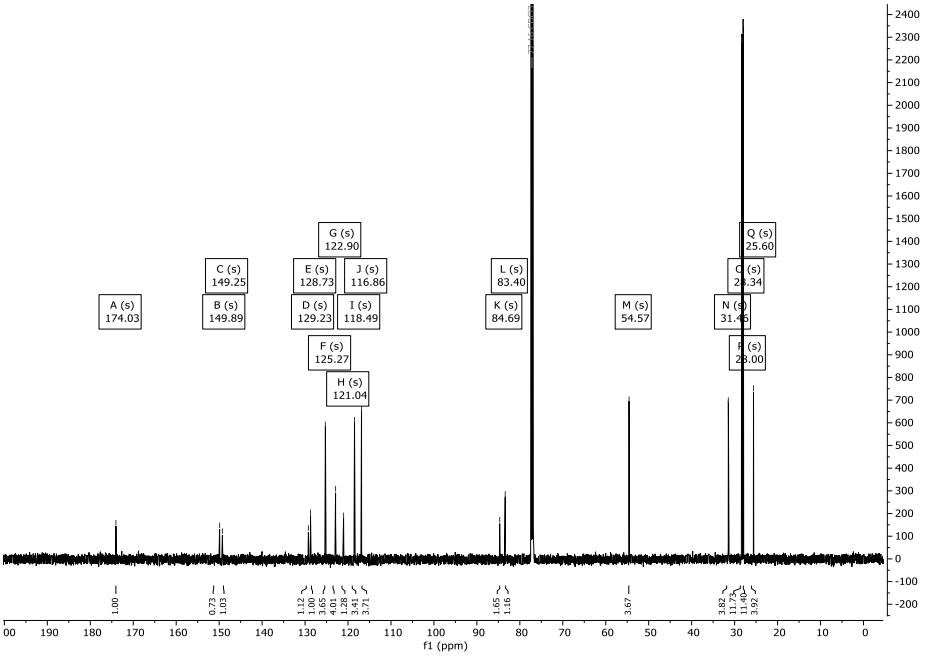


Abbildung 161: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **89** in $CDCl_3$.

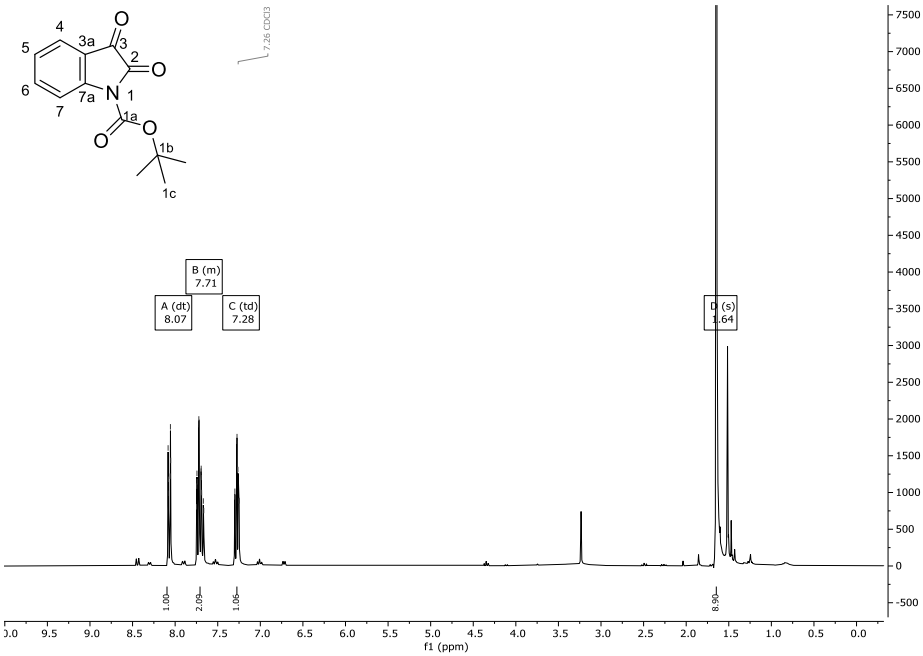


Abbildung 162: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **72** in $CDCl_3$.

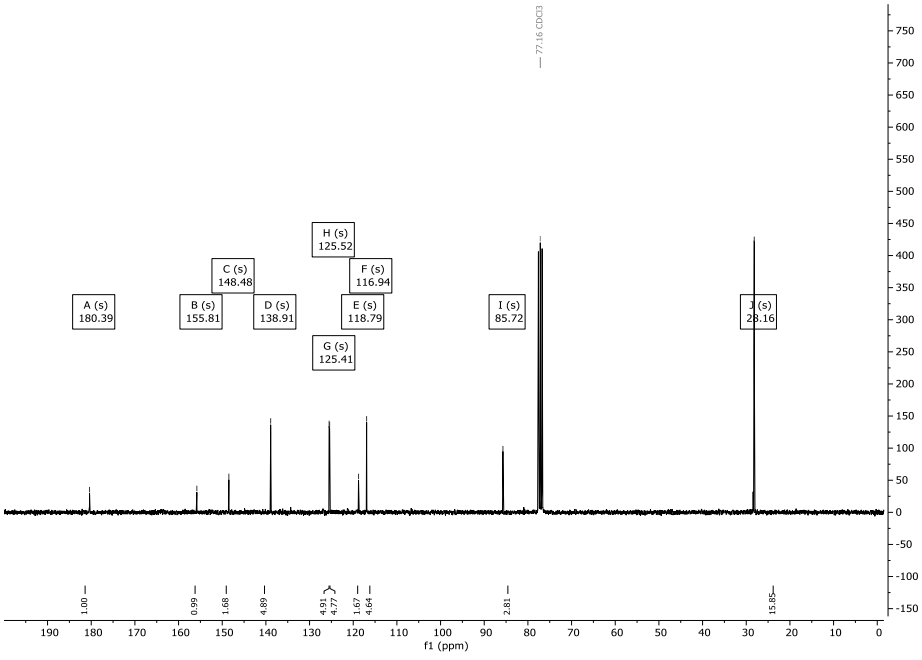


Abbildung 163: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **72** in $CDCl_3$.

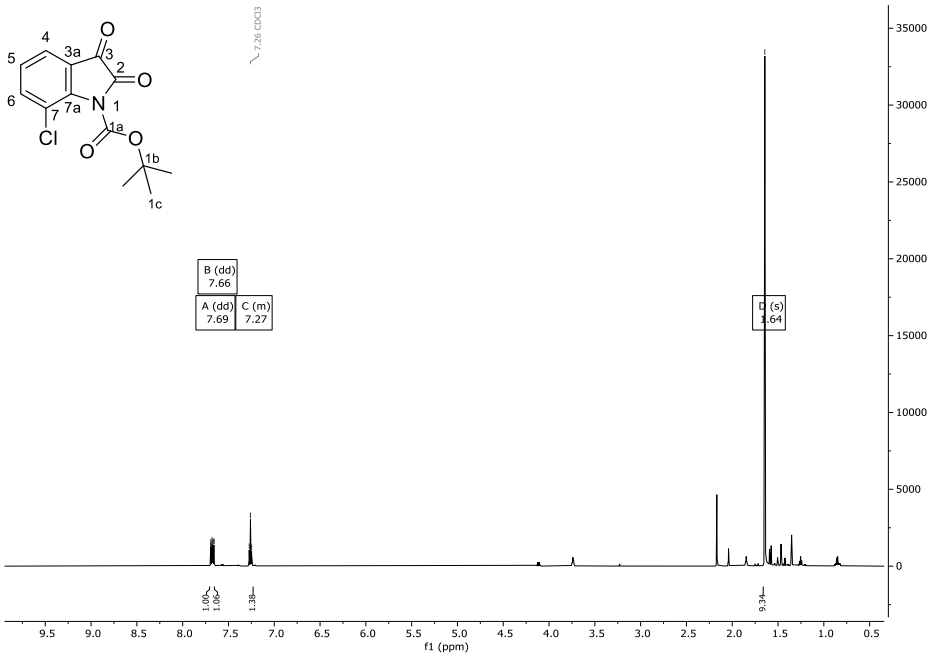


Abbildung 164: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **94** in $CDCl_3$.

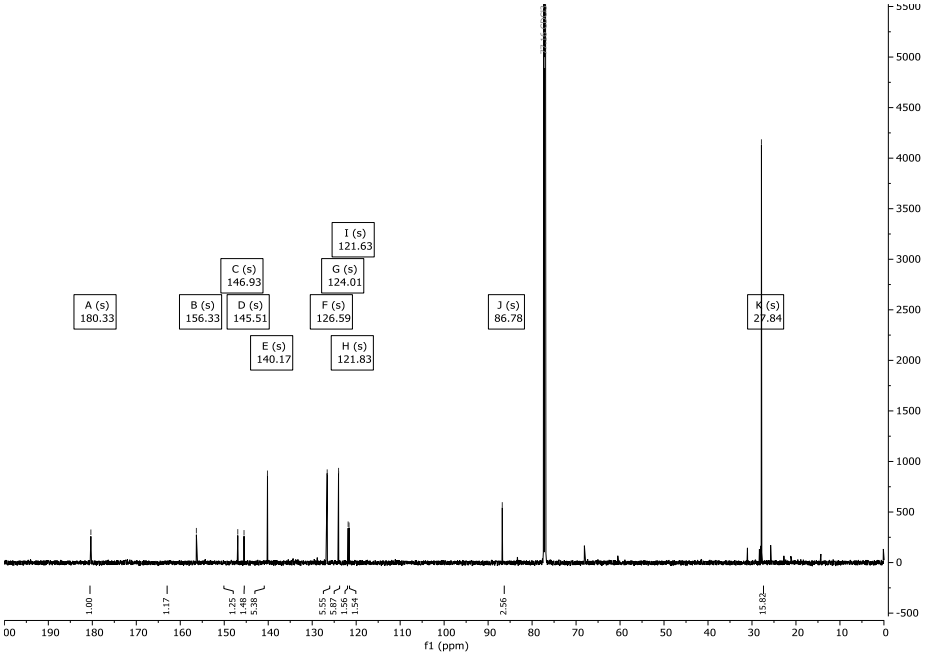


Abbildung 165: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **94** in $CDCl_3$.

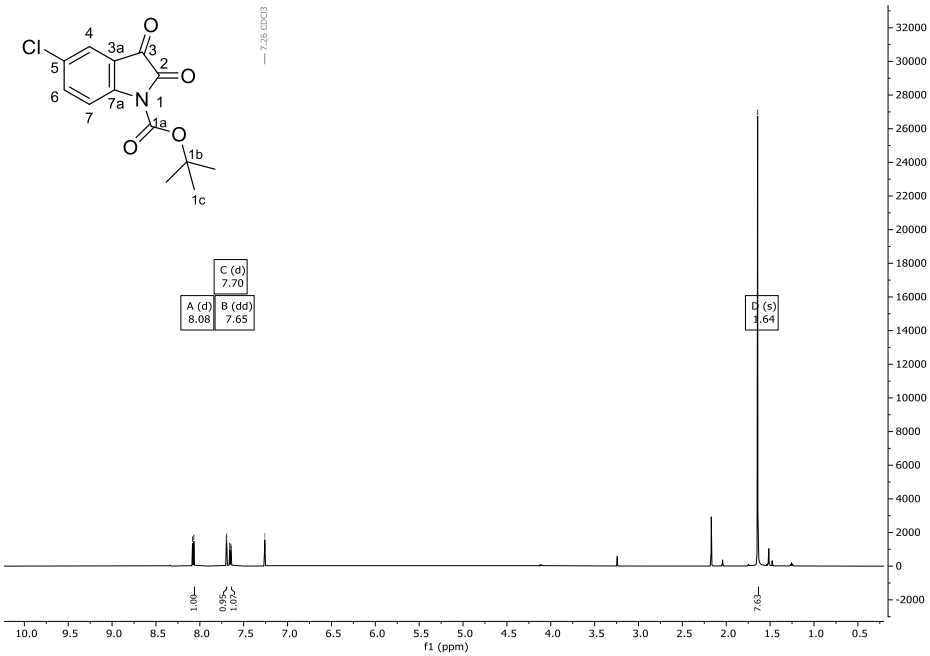


Abbildung 166: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **93** in $CDCl_3$.

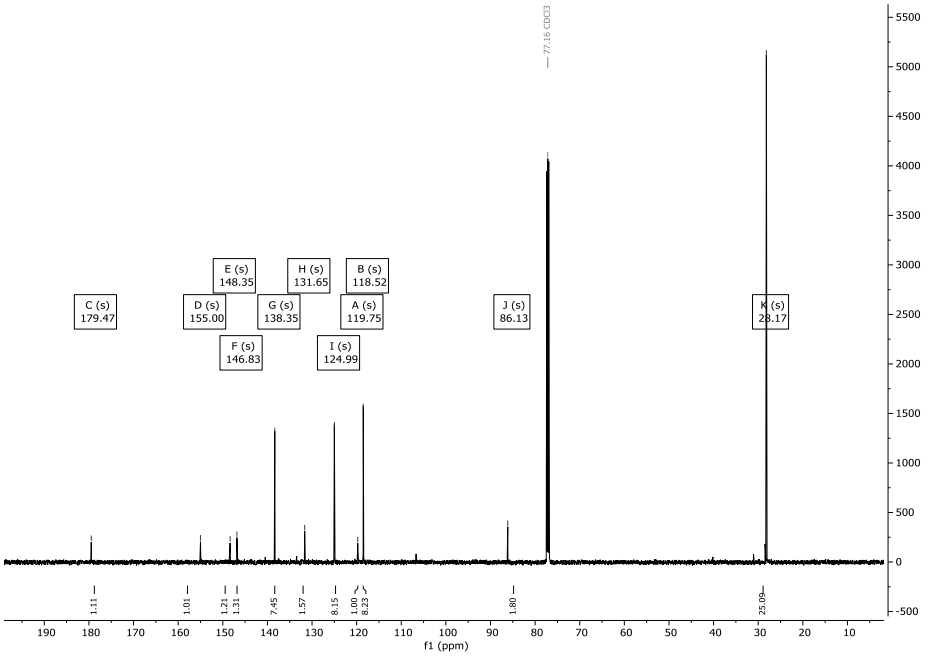


Abbildung 167: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **93** in $CDCl_3$.

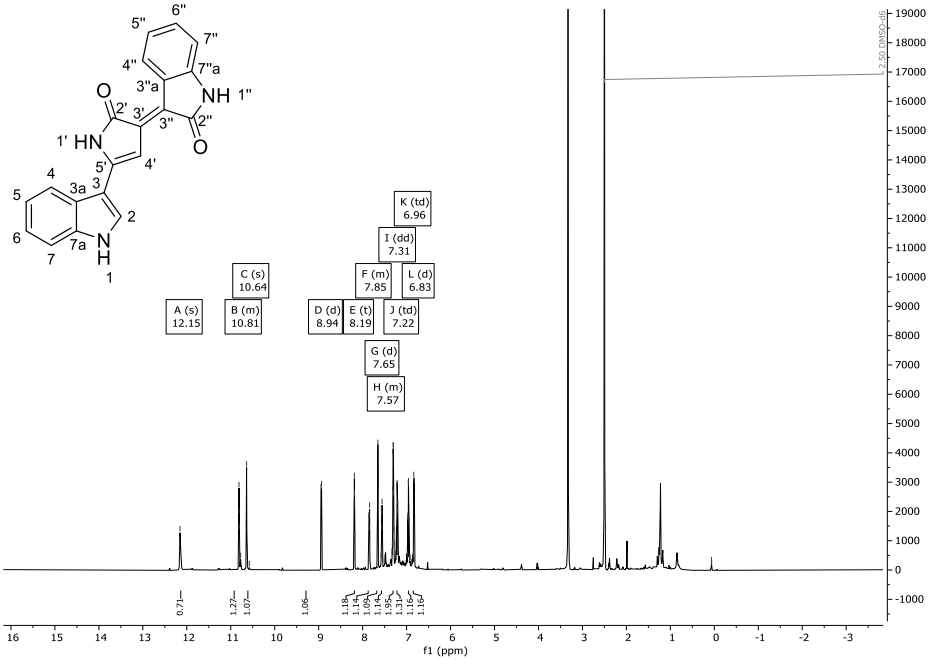


Abbildung 168: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) der violetten Fraktion von Verbindung **31** in d_6-DMSO.

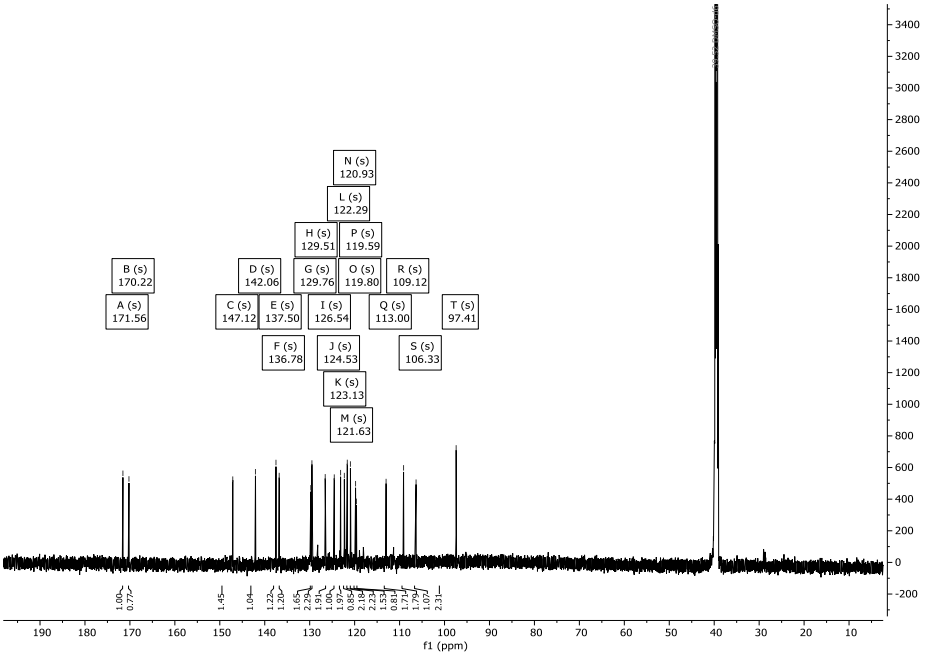


Abbildung 169: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) der violetten Fraktion von Verbindung **31** in d_6-DMSO.

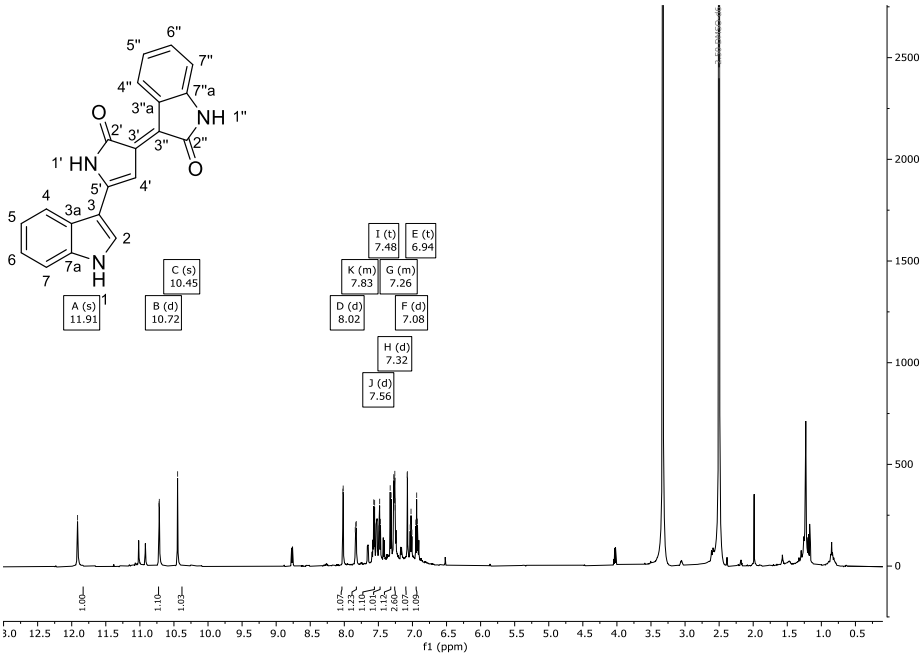


Abbildung 170: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) der blauen Fraktion von Verbindung **31** in d_6-DMSO.

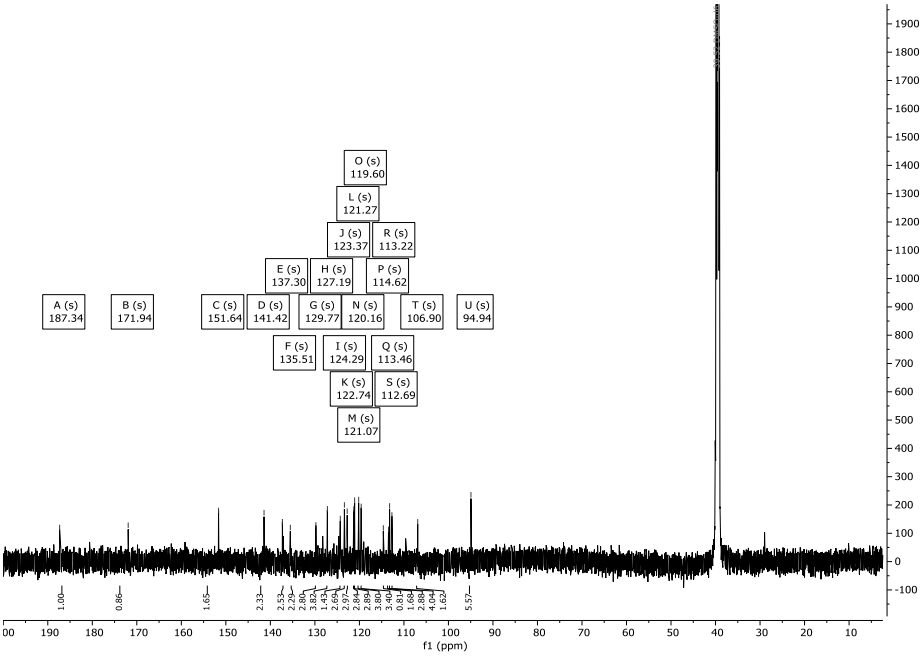


Abbildung 171: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) der blauen Fraktion von Verbindung **31** in d_6-DMSO.

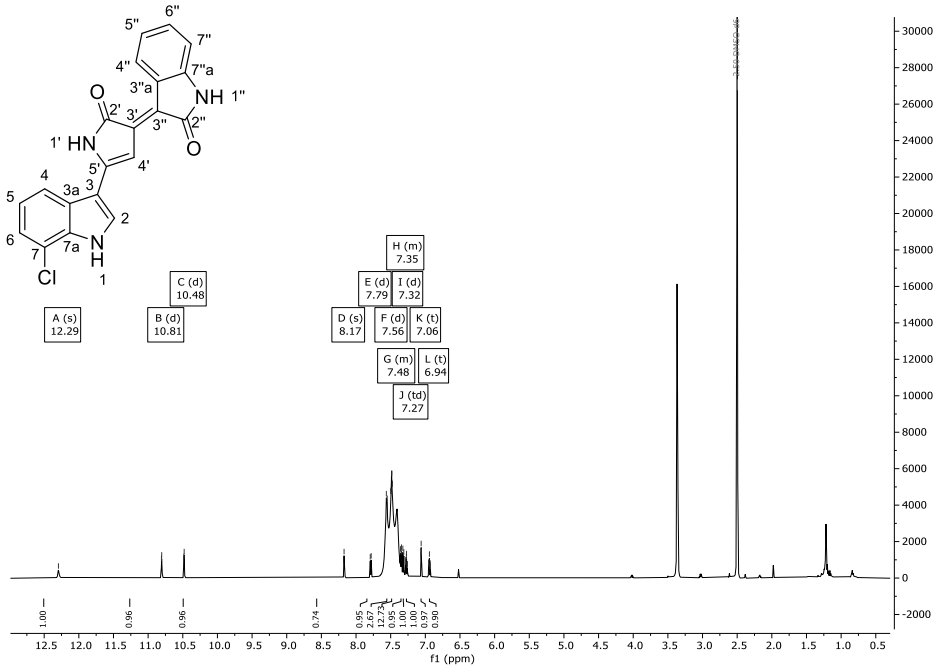


Abbildung 172: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) der blauen Fraktion von Verbindung **96** in d_6-DMSO.

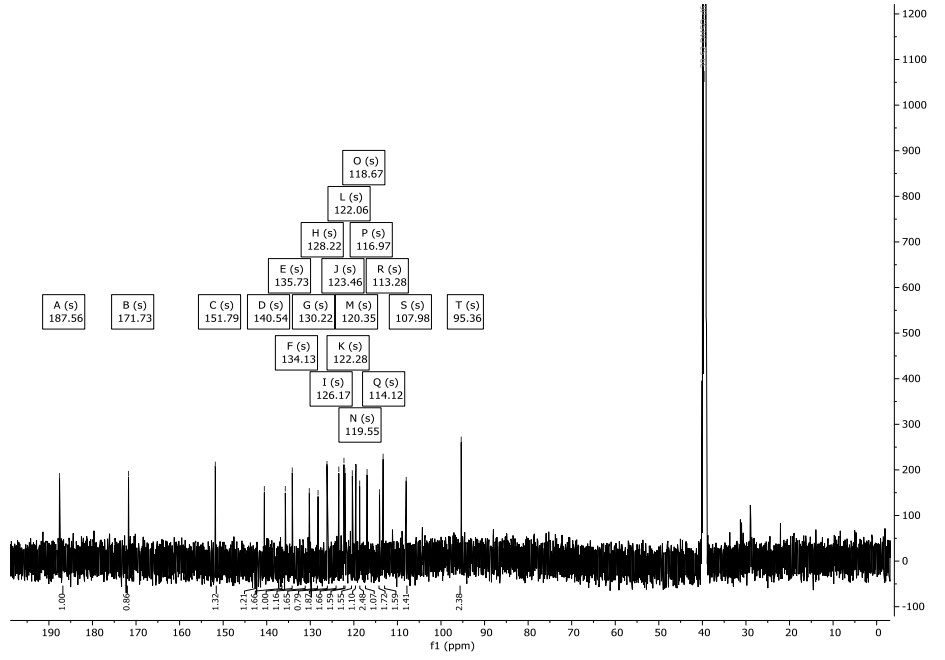


Abbildung 173: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) der blauen Fraktion von Verbindung **96** in d_6-DMSO.

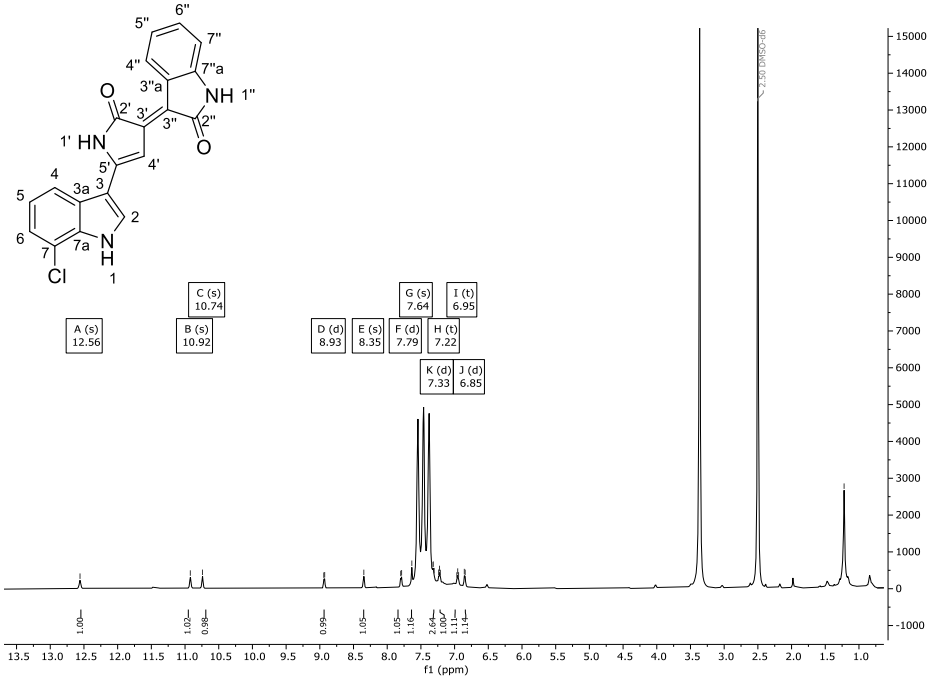


Abbildung 174: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) der violetten Fraktion von Verbindung **96** in d_6-DMSO.

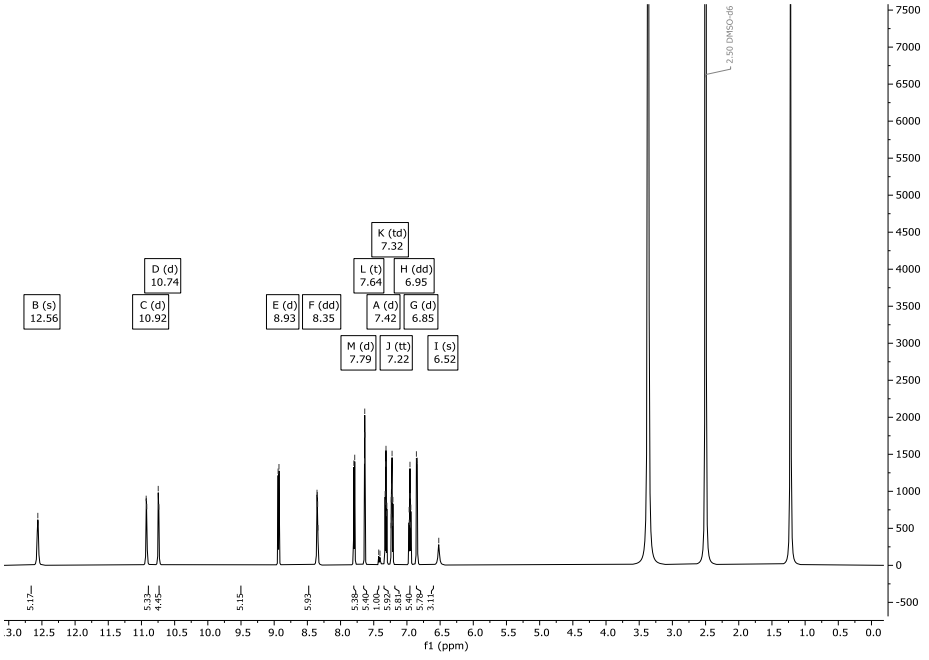


Abbildung 175: Synthetisches ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) der violetten Fraktion von Verbindung **96** in d_6-DMSO.

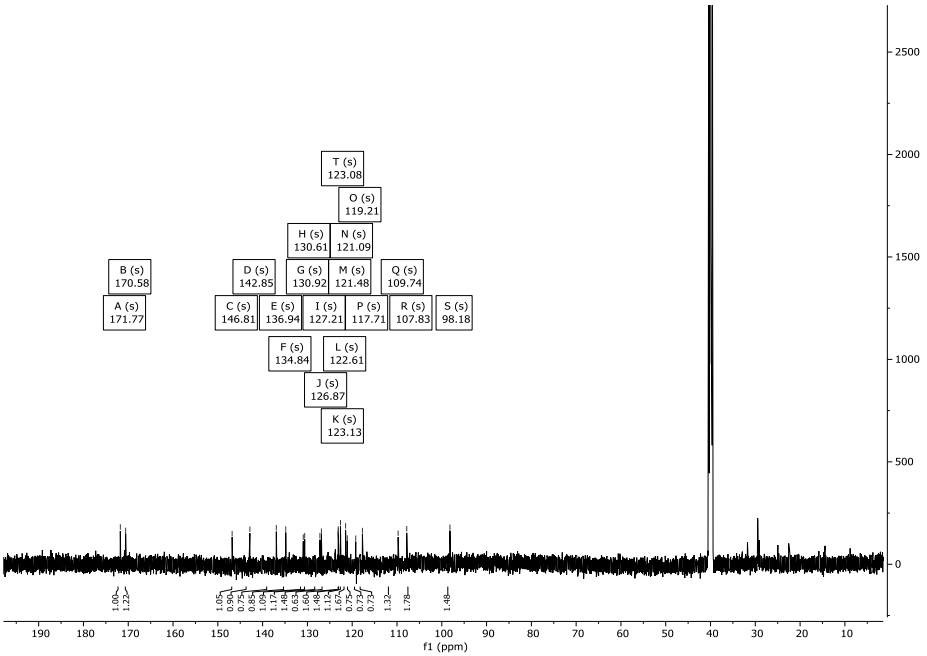


Abbildung 176: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) der violetten Fraktion von Verbindung **96** in d_6-DMSO.

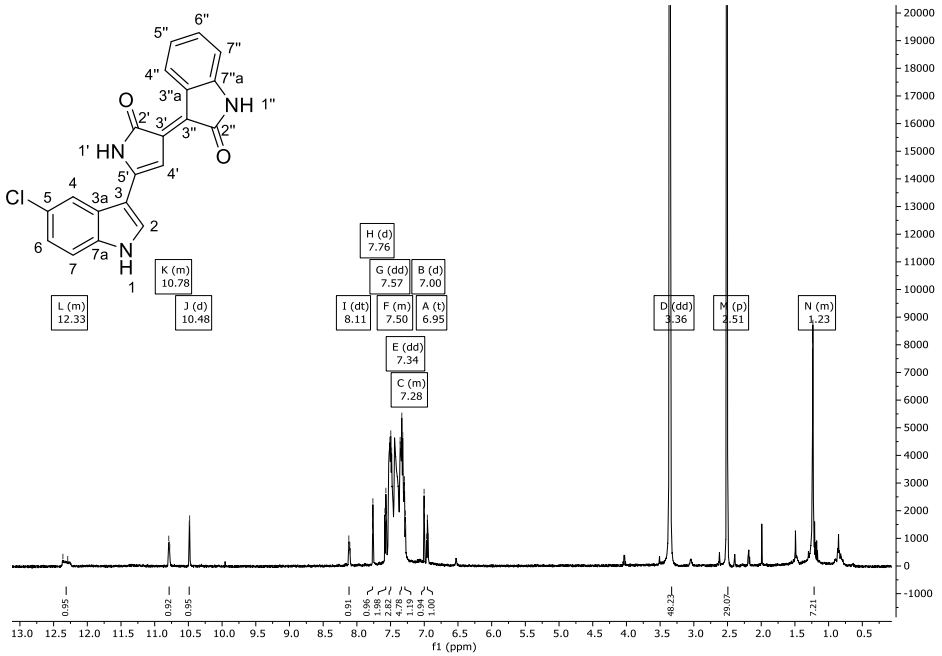


Abbildung 177: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) der blauen Fraktion von Verbindung **95** in d_6-DMSO.

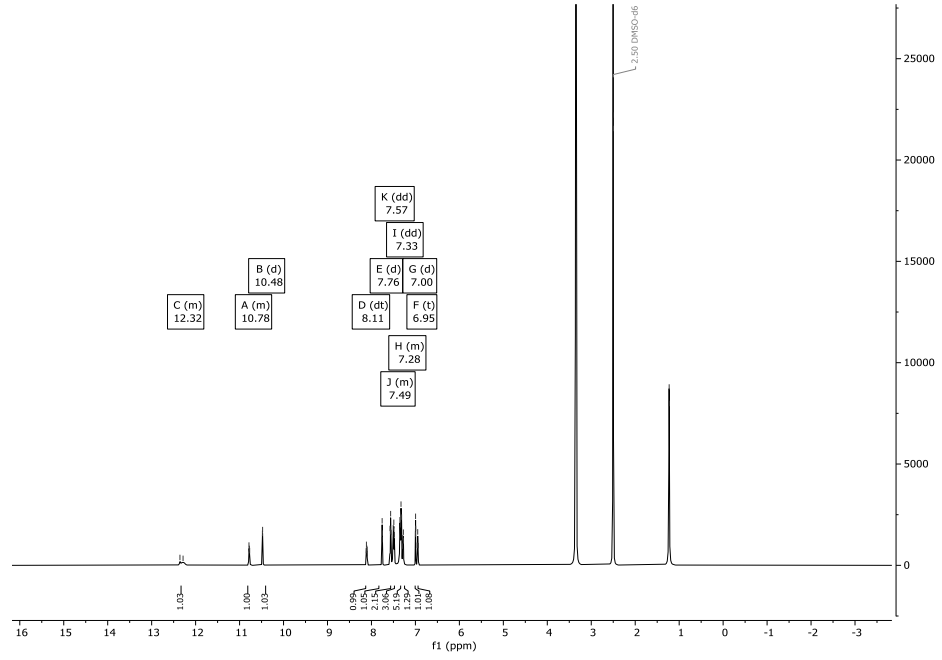


Abbildung 178: Synthetisches ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) der blauen Fraktion von Verbindung **95** in d_6-DMSO.

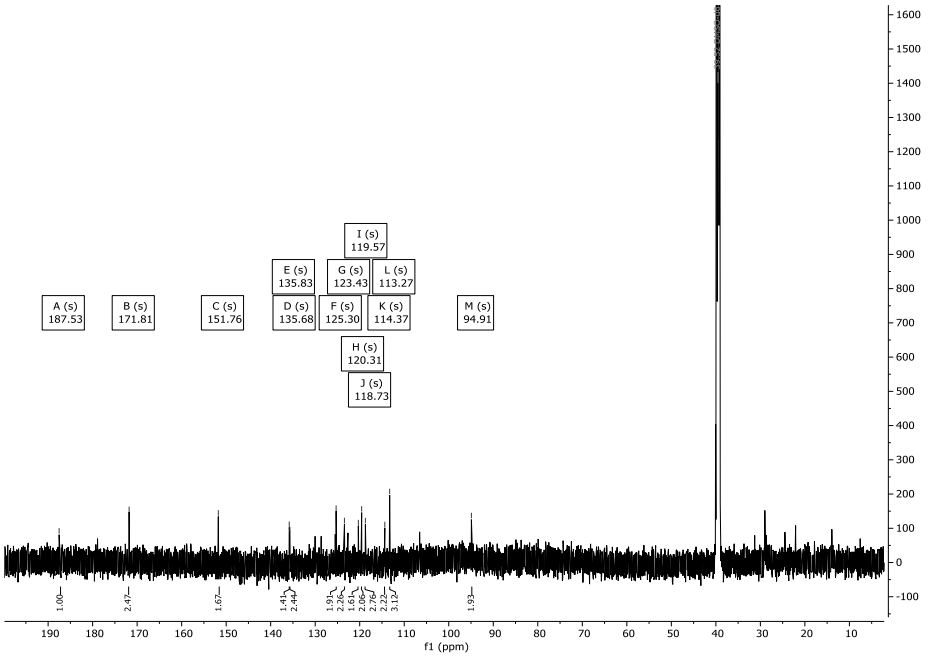


Abbildung 179: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) der blauen Fraktion von Verbindung **95** in d_6-DMSO.

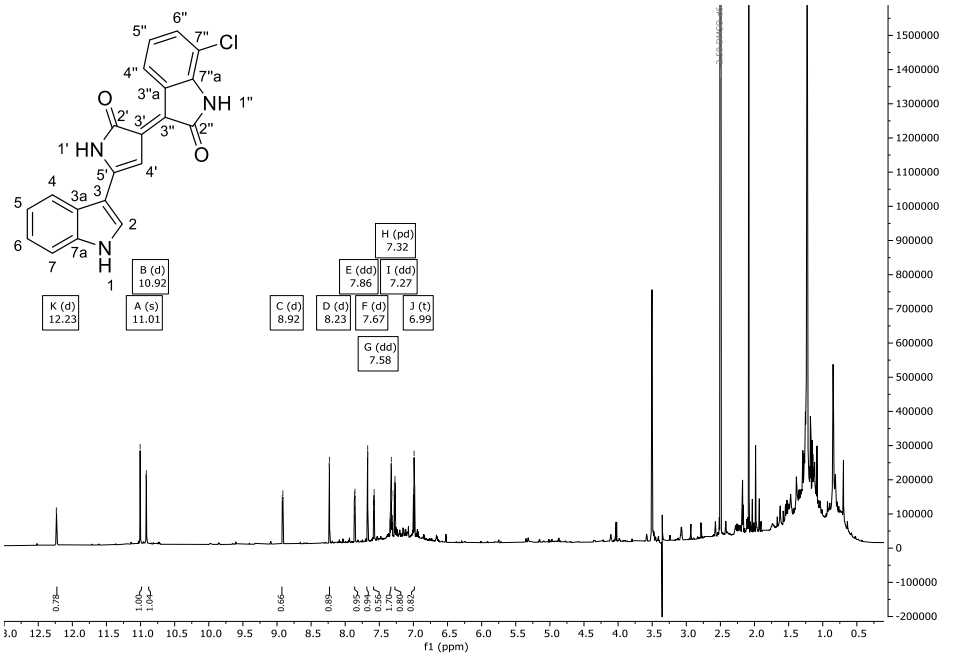


Abbildung 180: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) der violetten Fraktion von Verbindung **98** in d_6-DMSO.

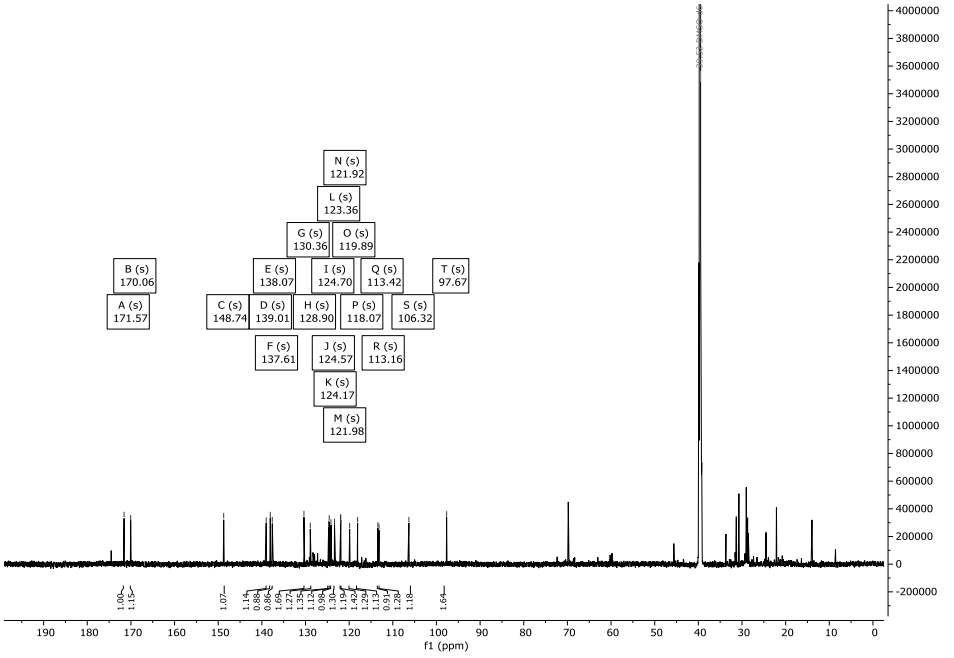


Abbildung 181: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) der violetten Fraktion von Verbindung **98** in d_6-DMSO.

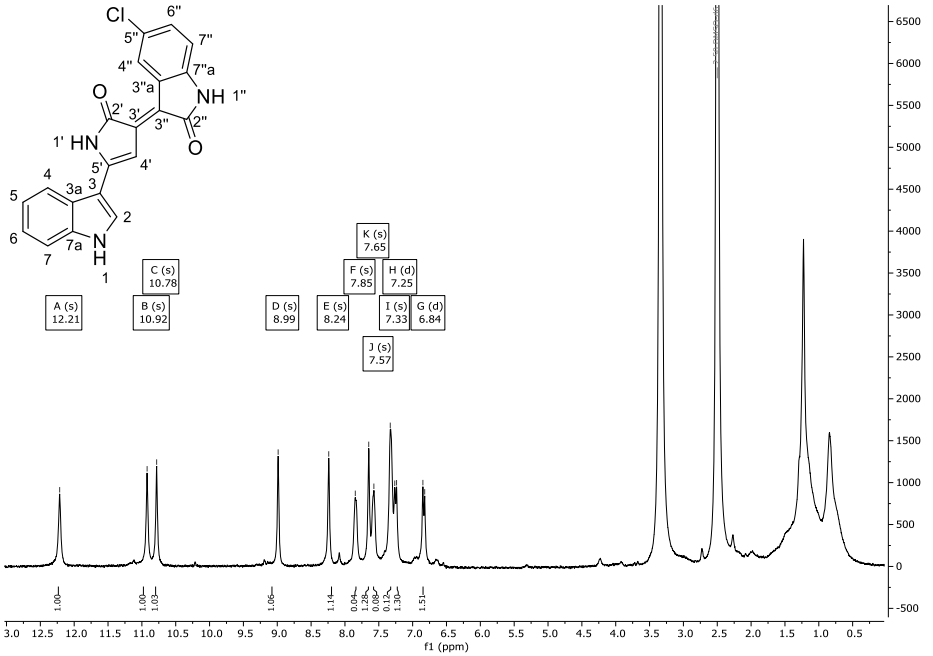


Abbildung 182: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **97** in d_6-DMSO.

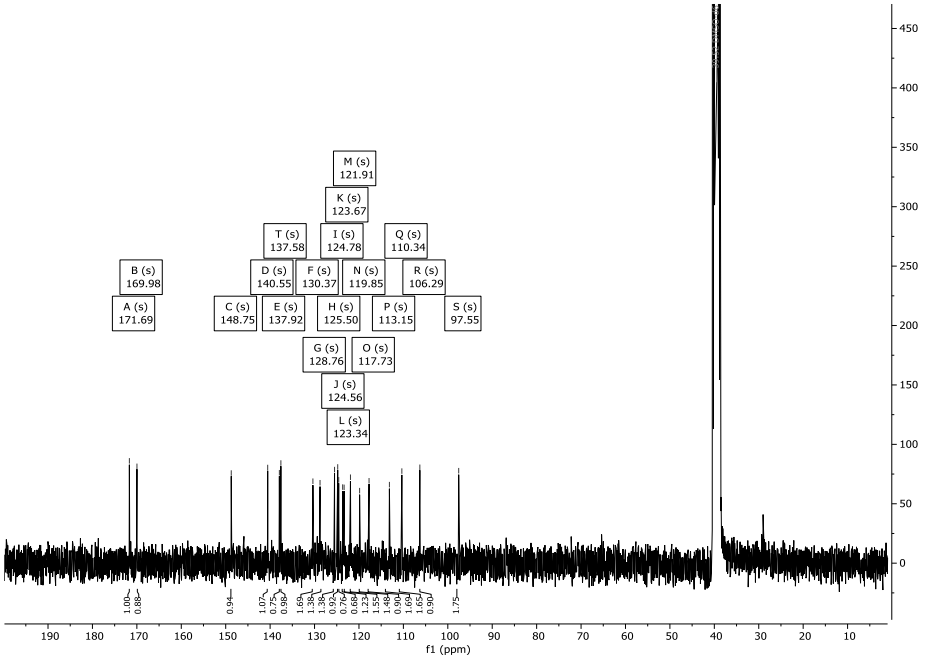


Abbildung 183: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **97** in d_6-DMSO.

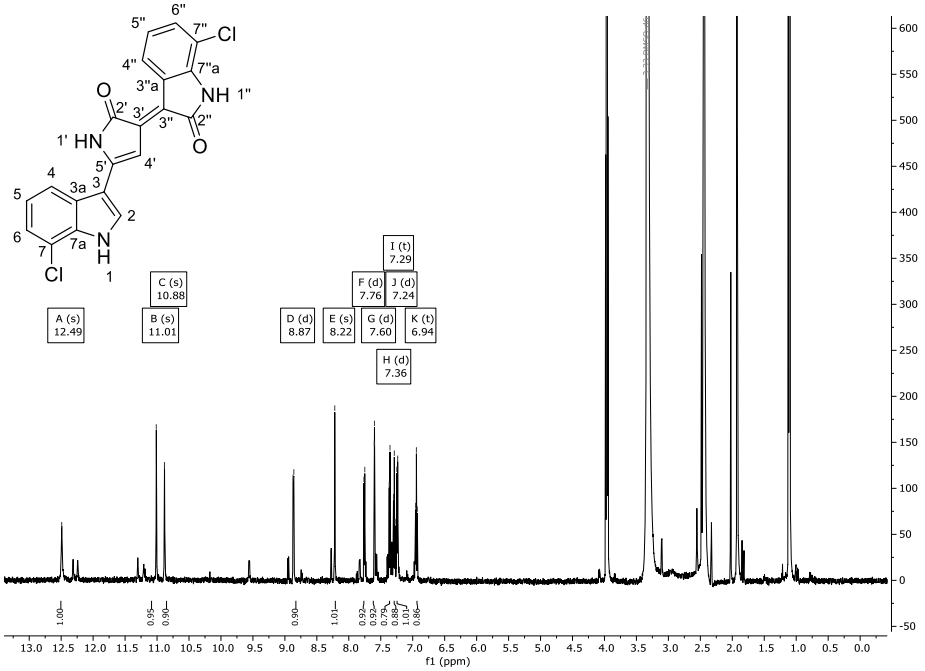


Abbildung 184: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **100** in d_6-DMSO.

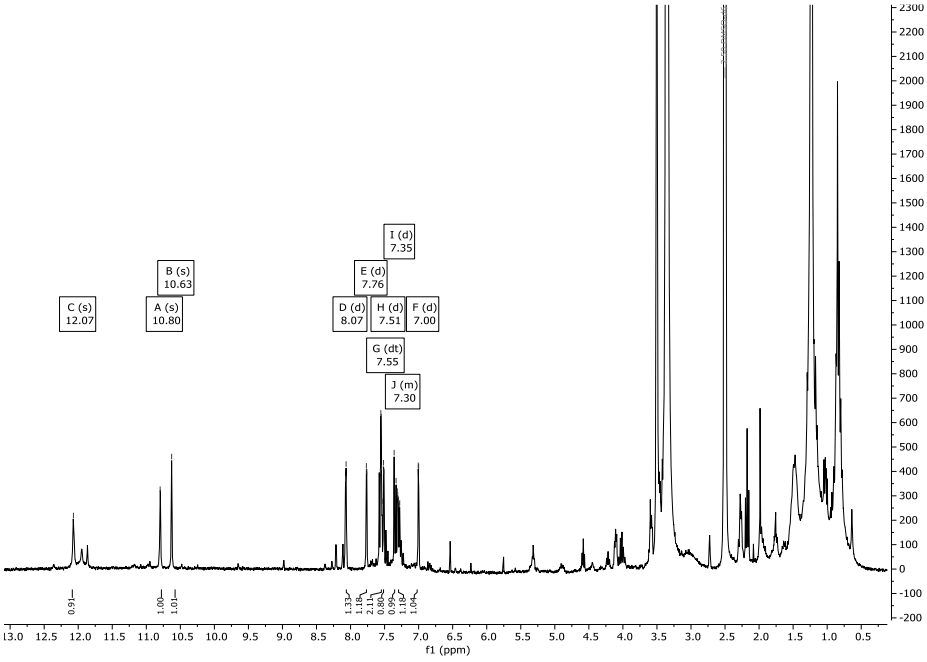


Abbildung 185: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **100** in d_6-DMSO.

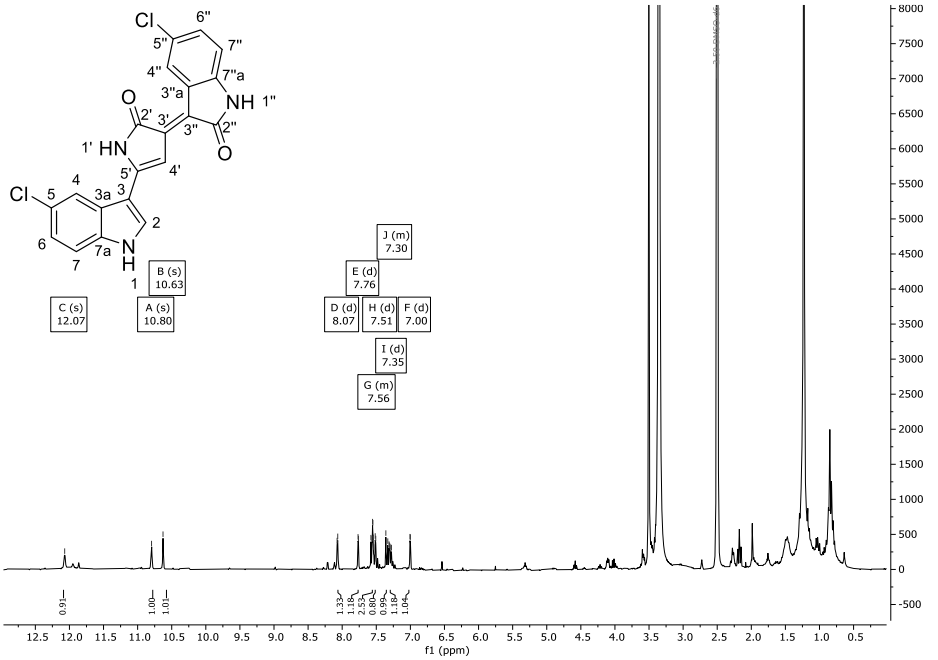


Abbildung 186: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **99** in d_6-DMSO.

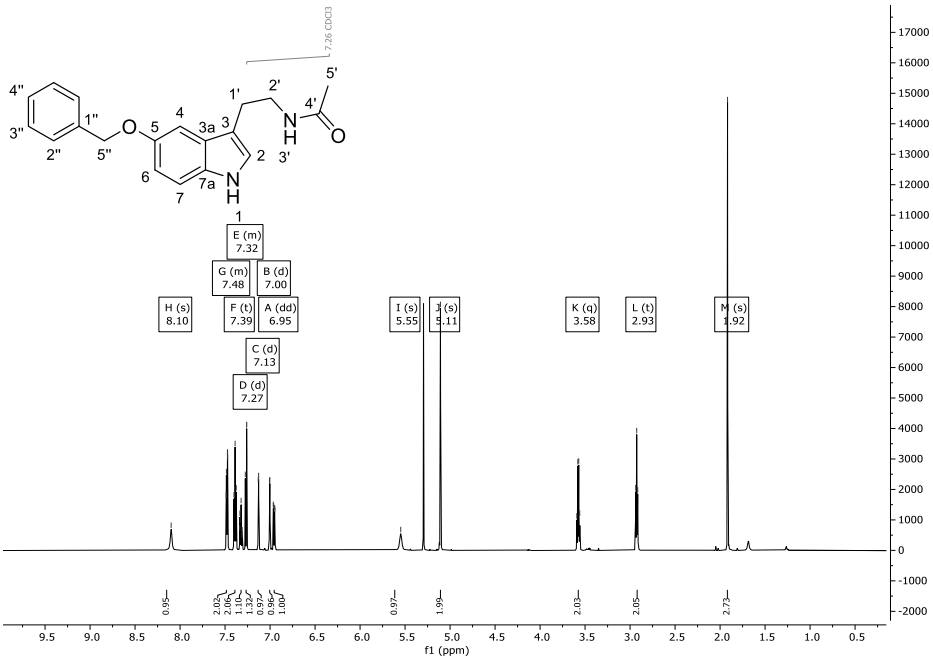


Abbildung 187: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **161** in $CDCl_3$.

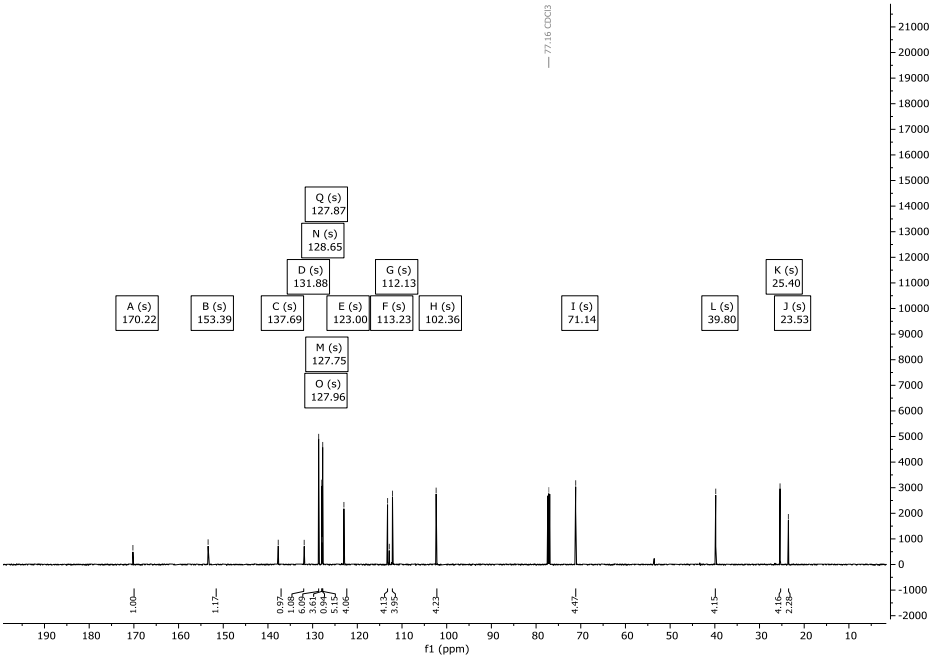


Abbildung 188: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **161** in $CDCl_3$.

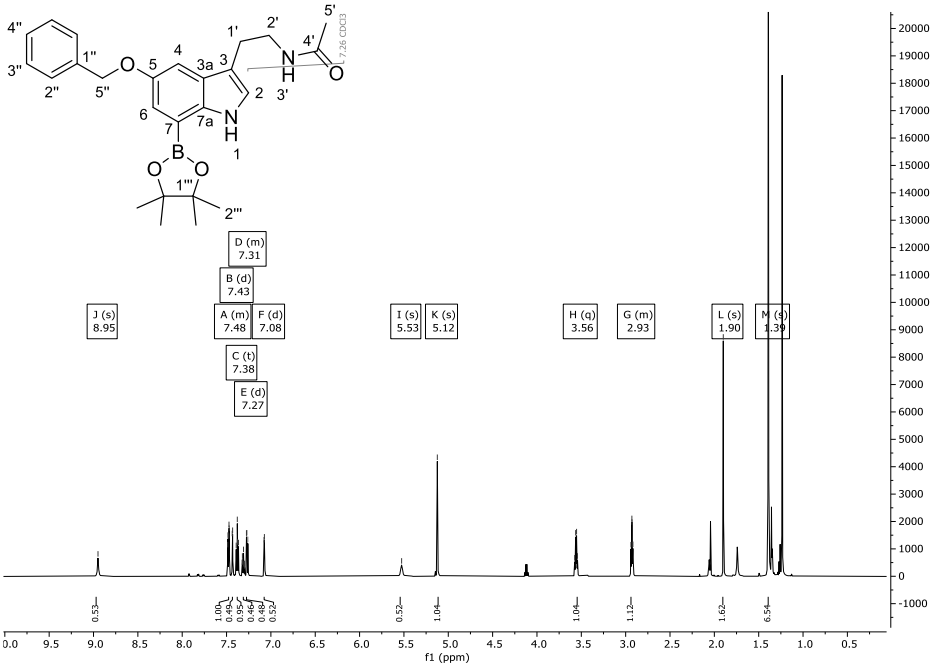


Abbildung 189: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **170** in $CDCl_3$.

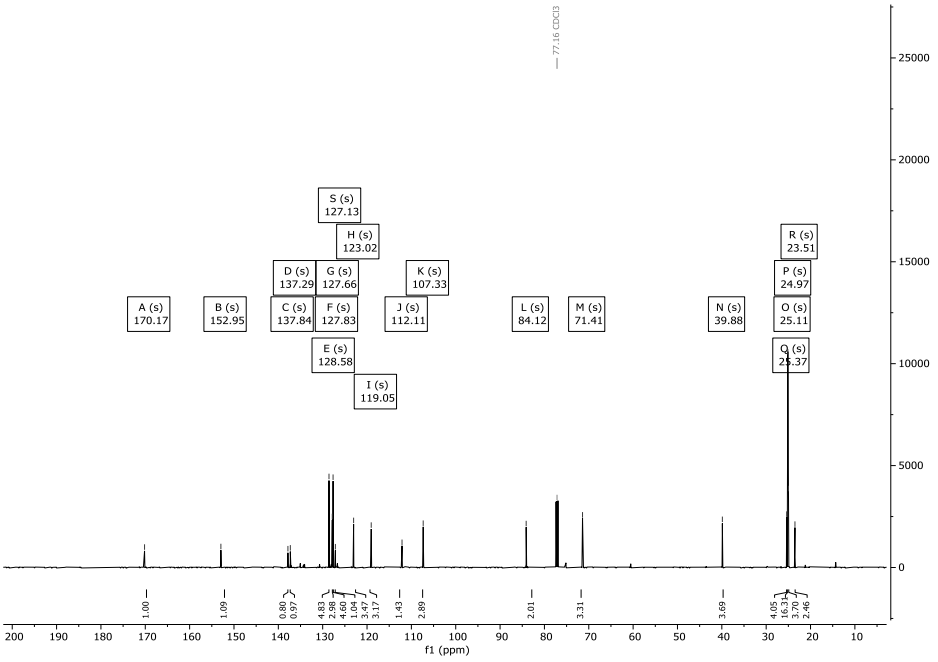


Abbildung 190: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **170** in $CDCl_3$.

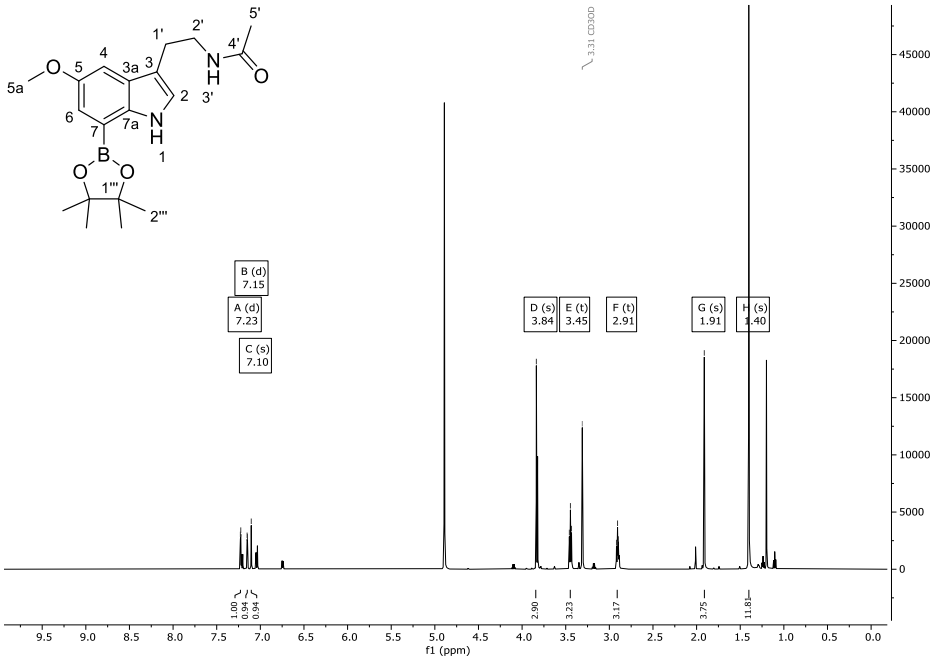


Abbildung 191: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **171** in CD_3OD.

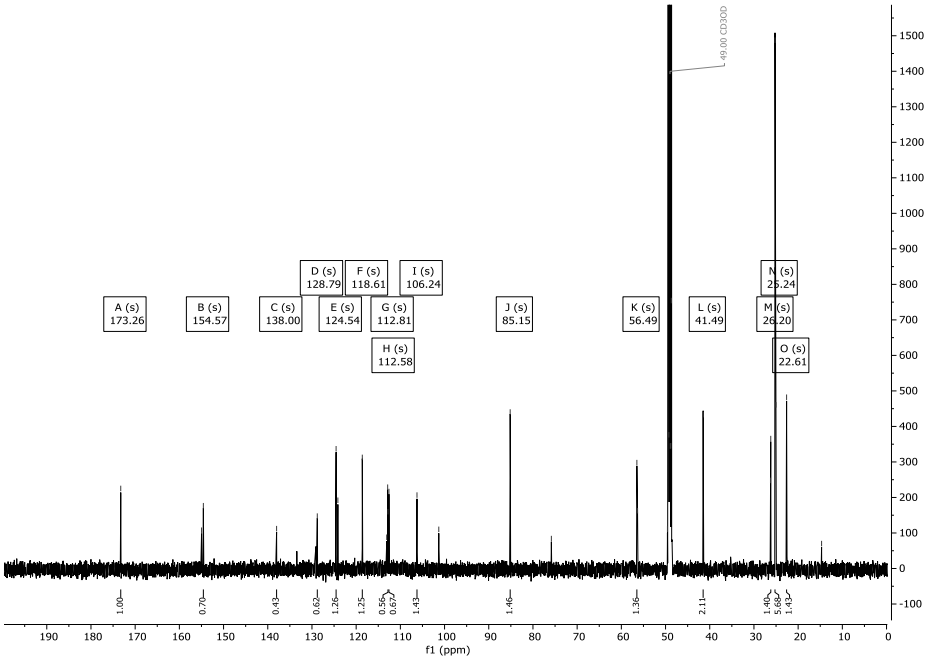


Abbildung 192: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **171** in CD_3OD.

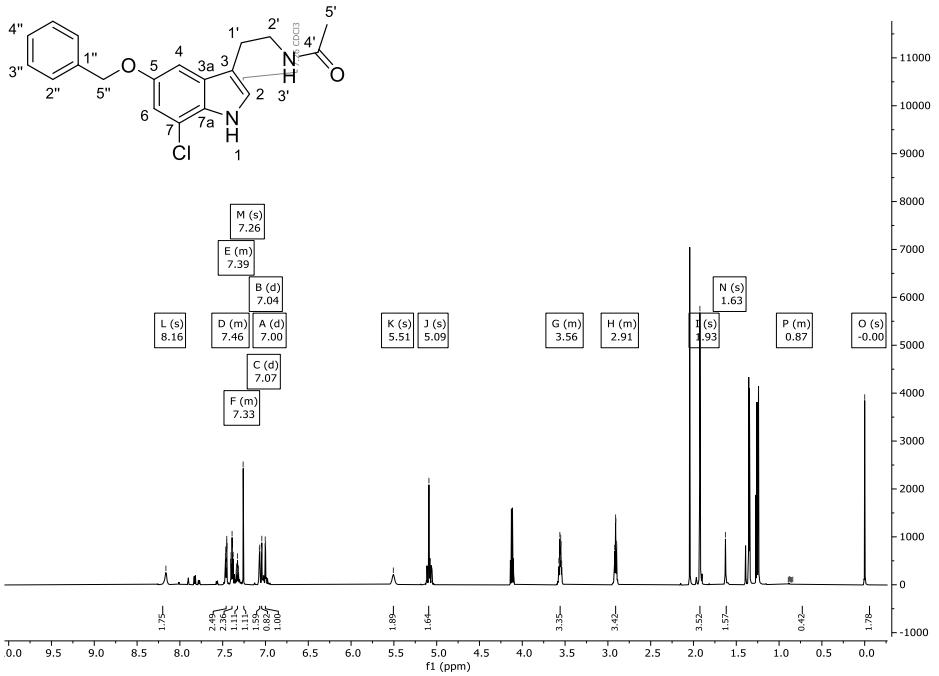


Abbildung 193: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **172** in $CDCl_3$.

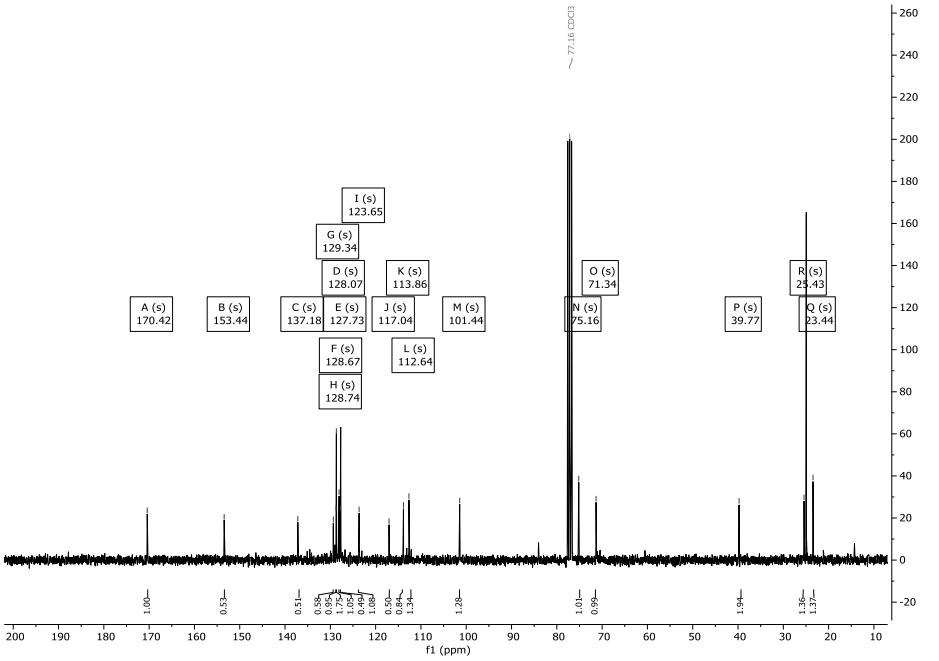


Abbildung 194: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **172** in $CDCl_3$.

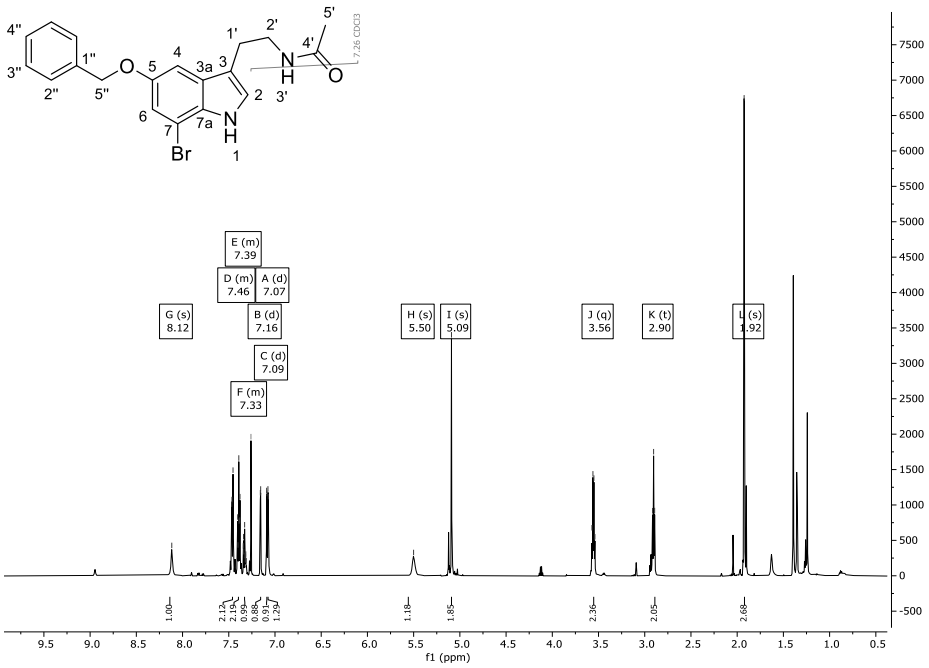


Abbildung 195: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **174** in $CDCl_3$.

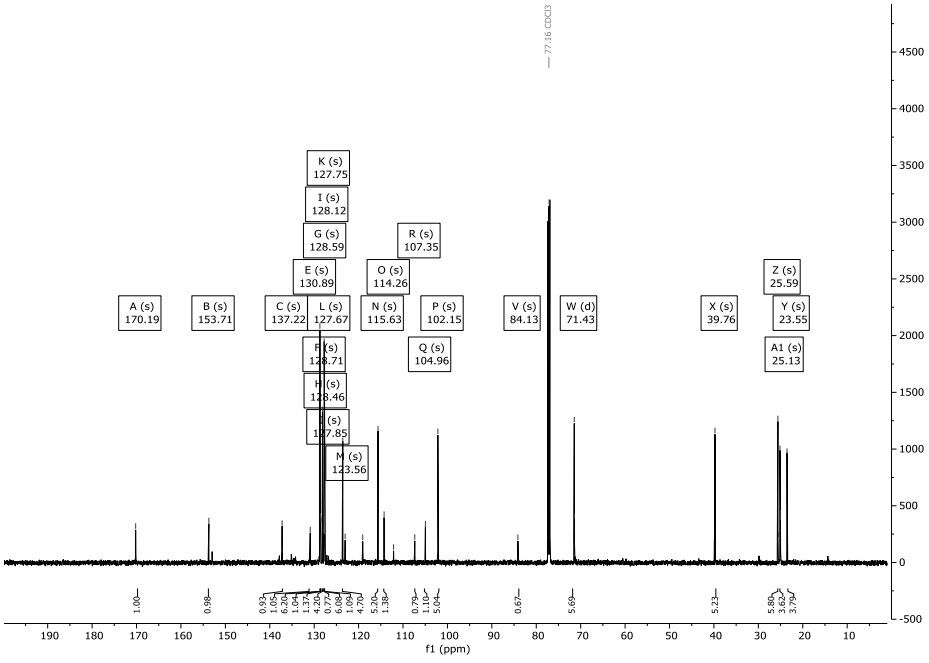


Abbildung 196: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **174** in $CDCl_3$.

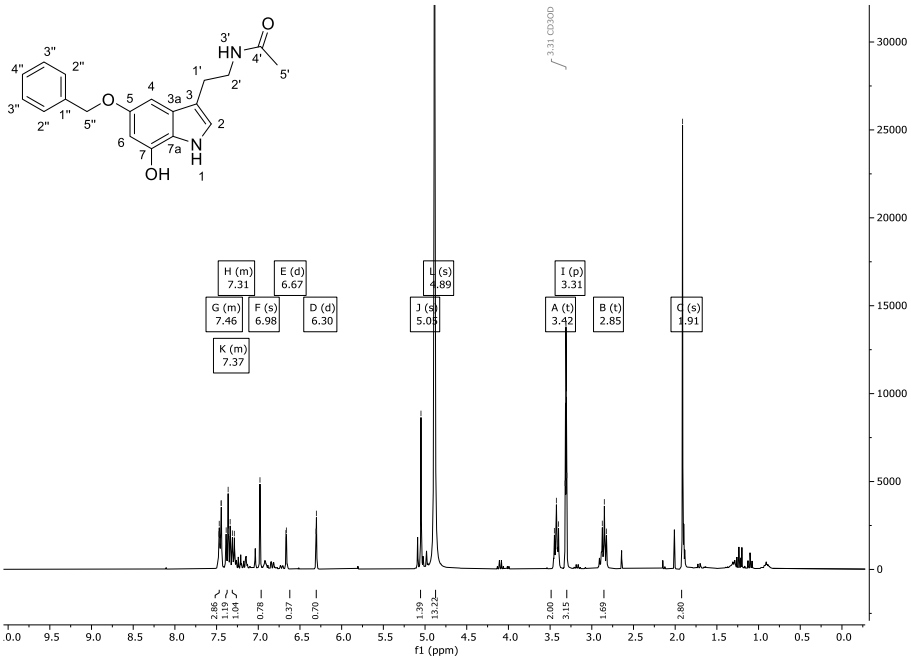


Abbildung 197: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **183** in CD_3OD.

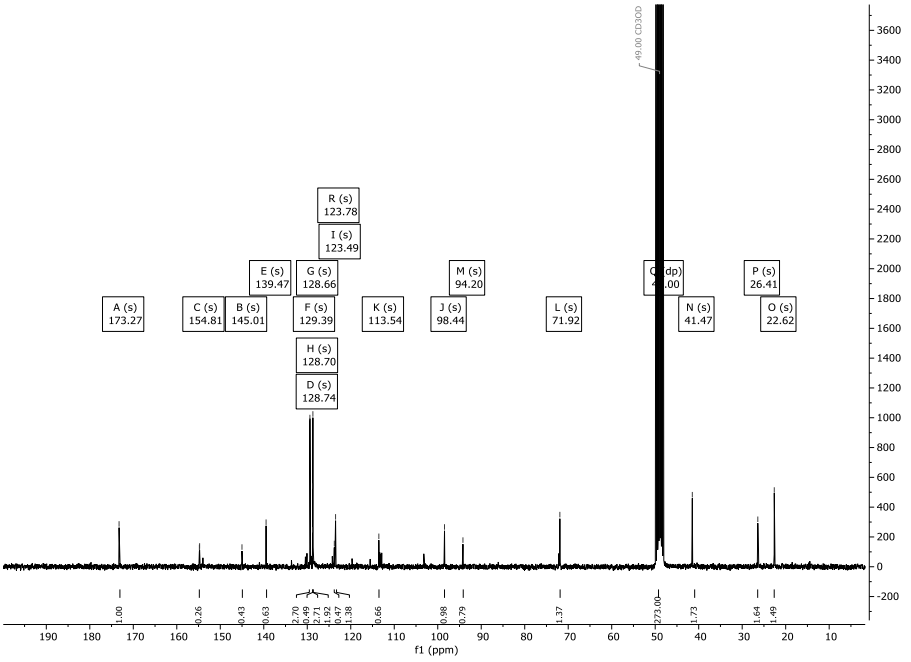


Abbildung 198: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **183** in CD_3OD.

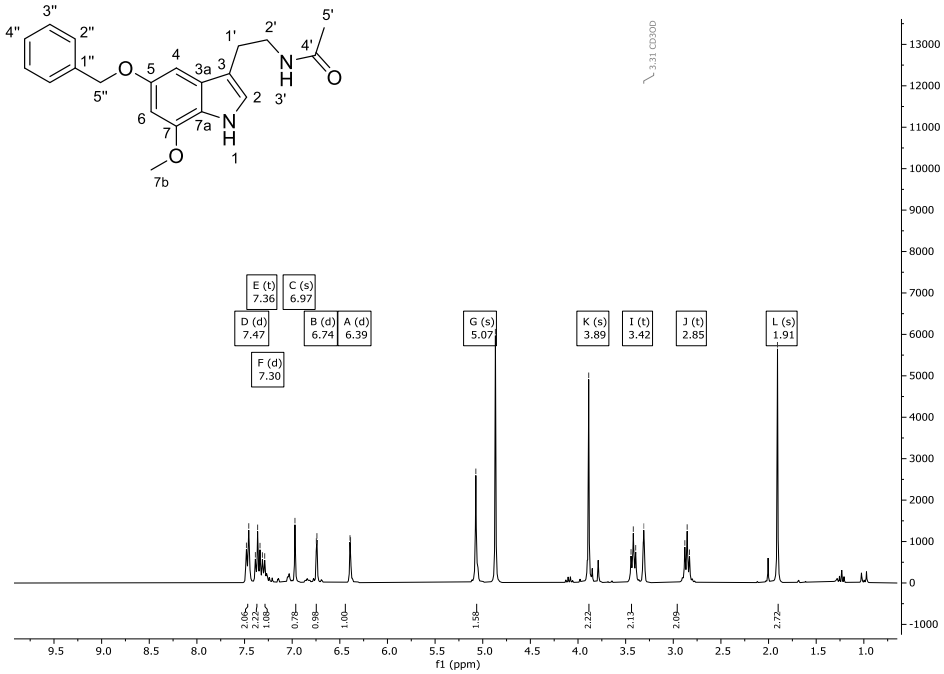


Abbildung 199: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **193** in CD_3OD.

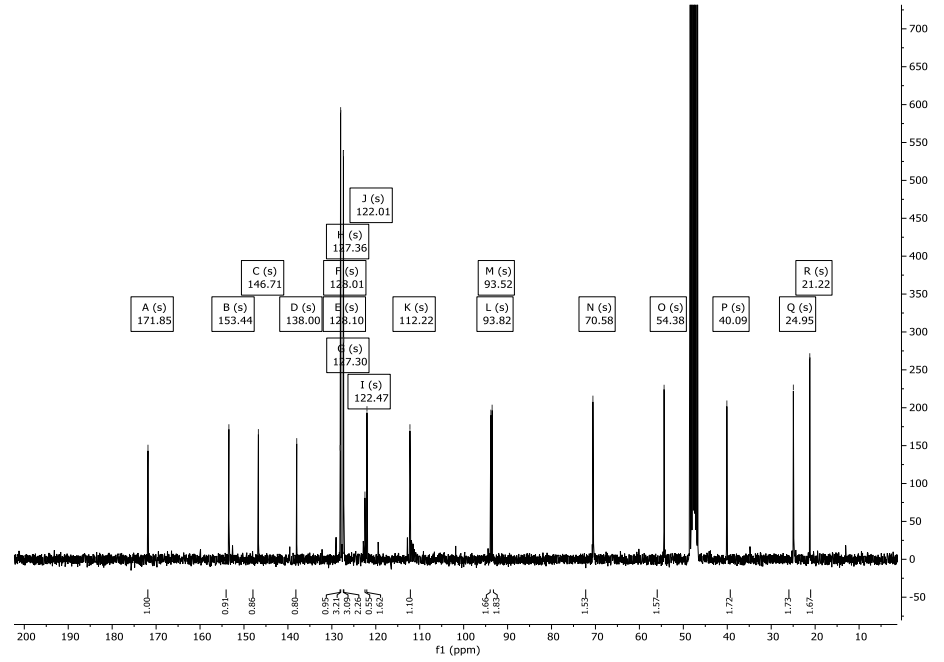


Abbildung 200: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **193** in CD_3OD.

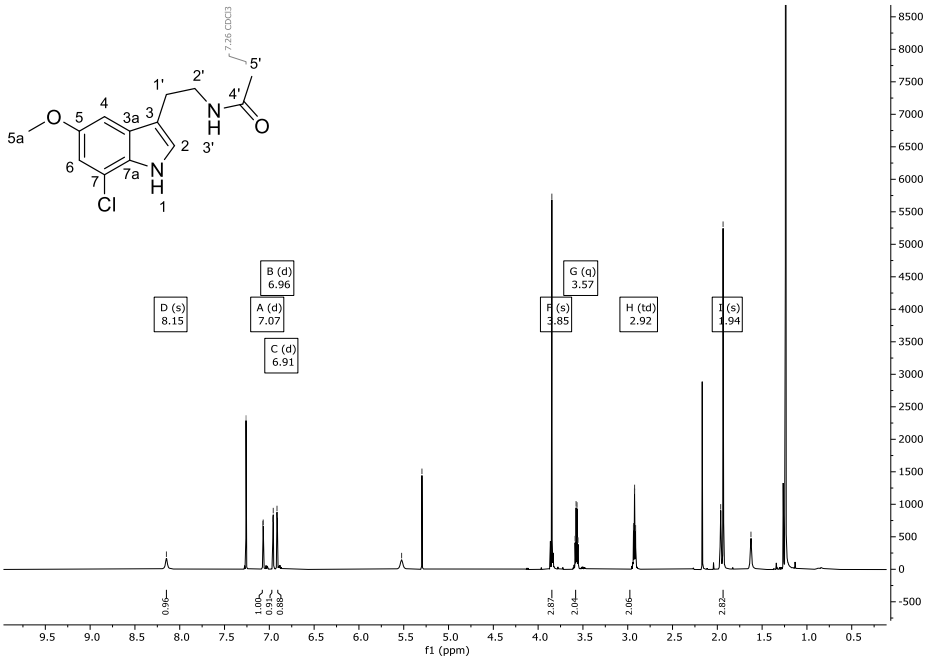


Abbildung 201: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **173** in $CDCl_3$.

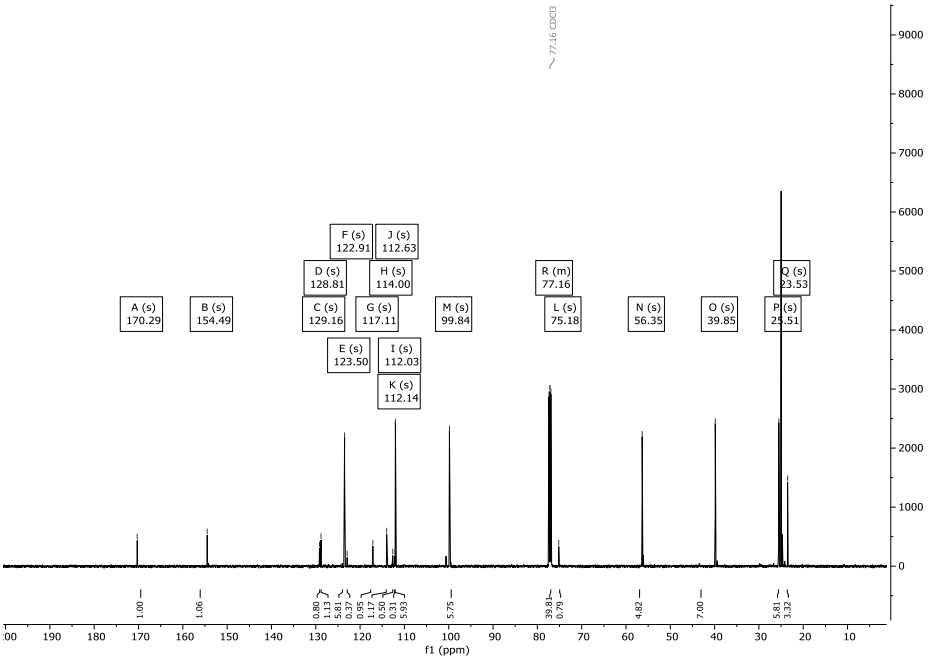


Abbildung 202: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **173** in $CDCl_3$.

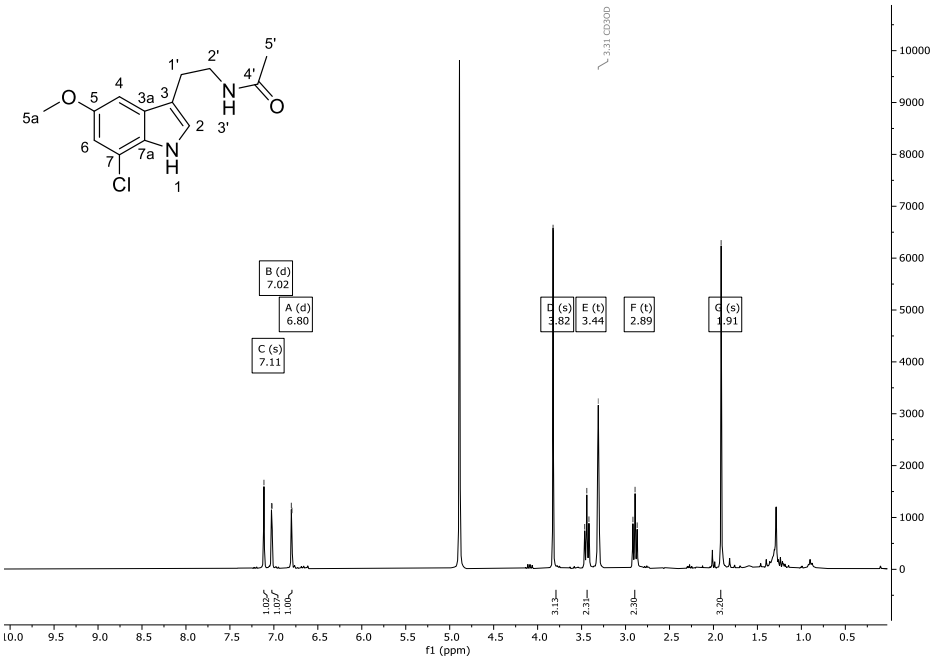


Abbildung 203: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **173** in CD_3OD.

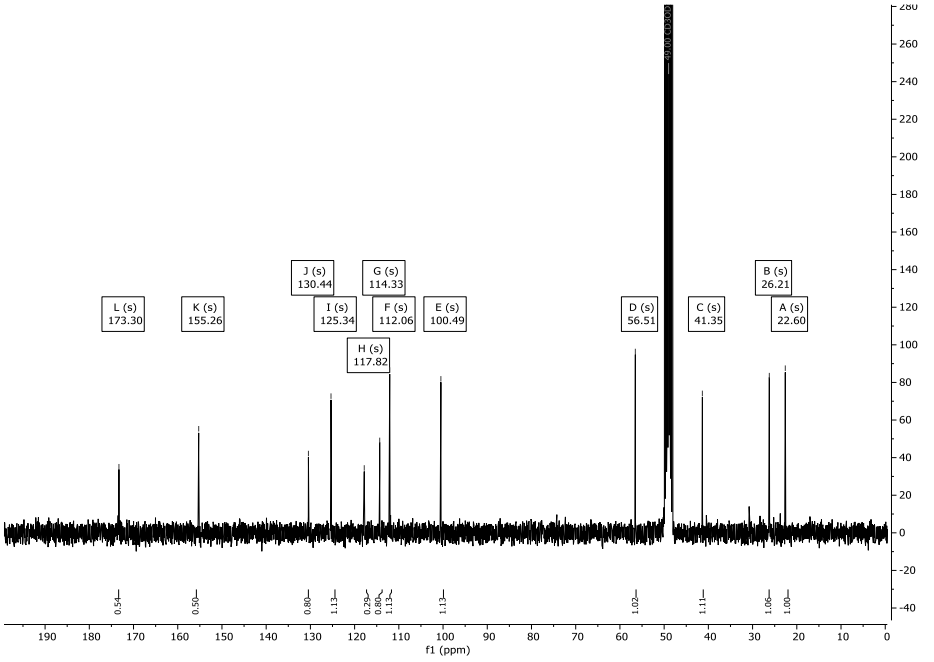


Abbildung 204: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **173** in CD_3OD.

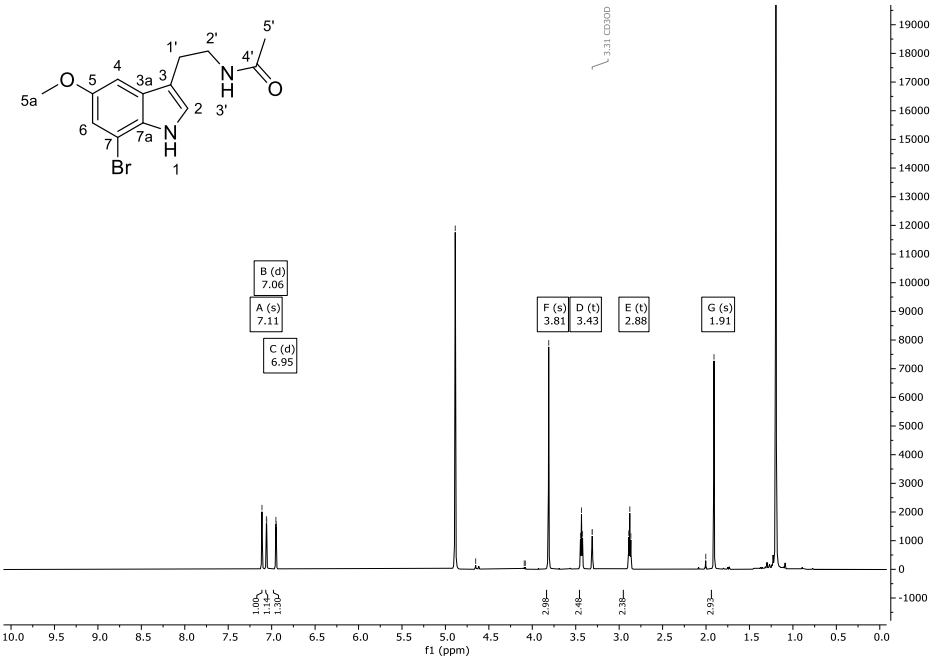


Abbildung 205: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **175** in $CDCl_3$.

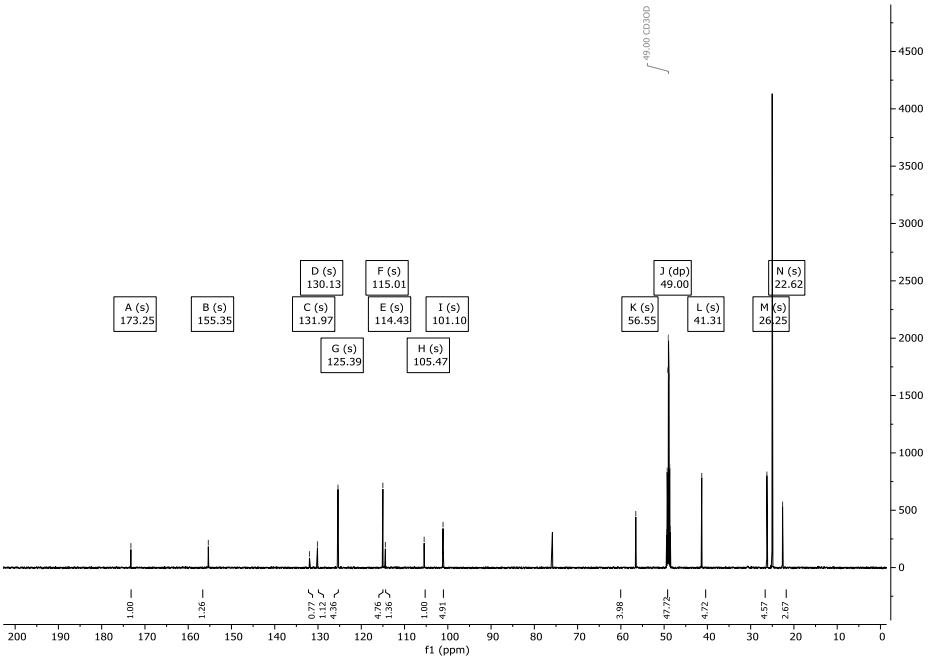


Abbildung 206: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **175** in CD_3OD.

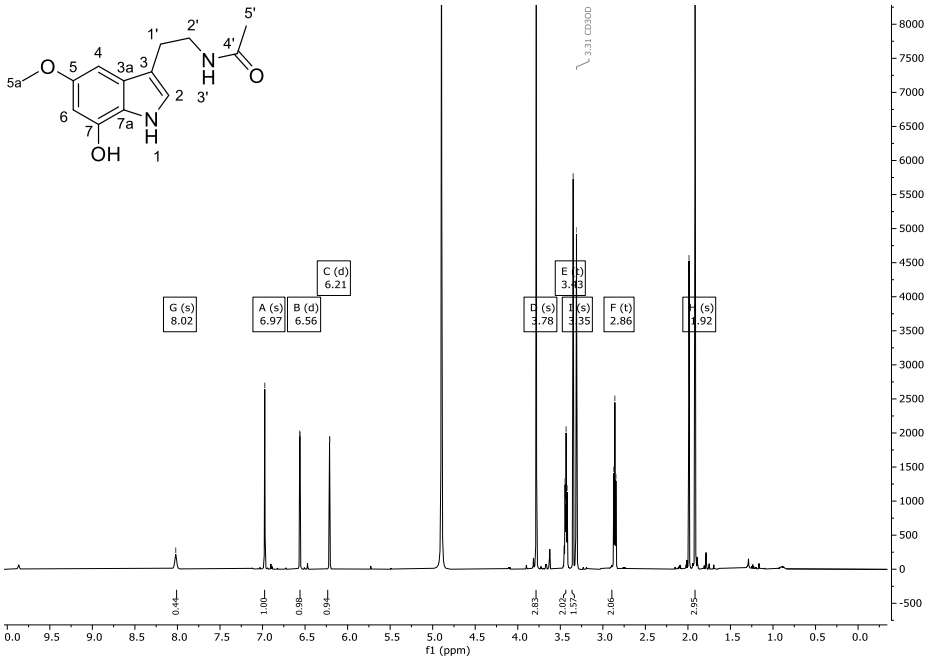


Abbildung 207: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **182** in CD_3OD.

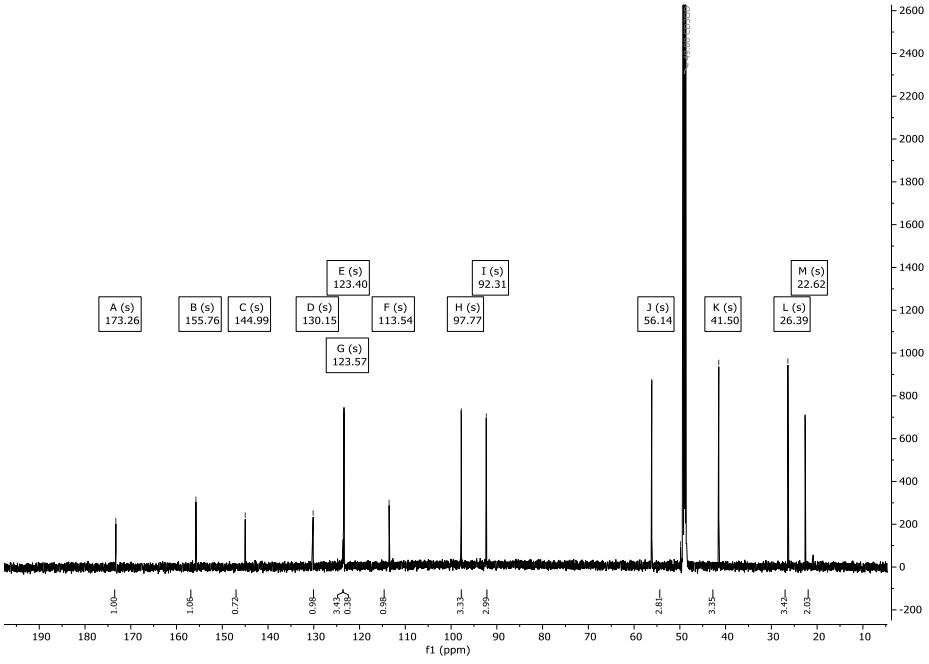


Abbildung 208: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **182** in CD_3OD.

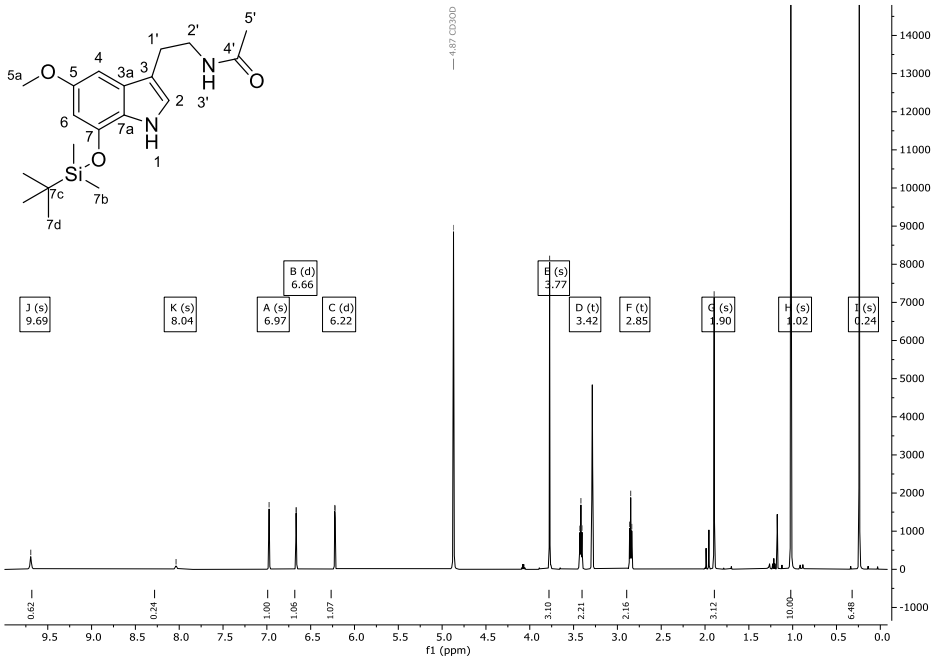


Abbildung 209: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **184** in CD_3OD.

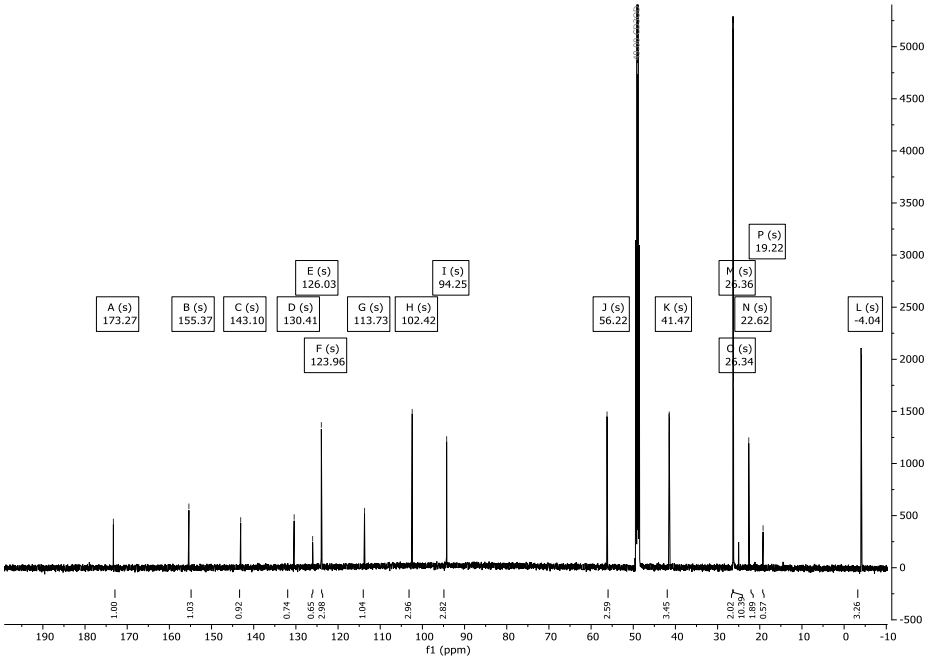


Abbildung 210: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **184** in CD_3OD.

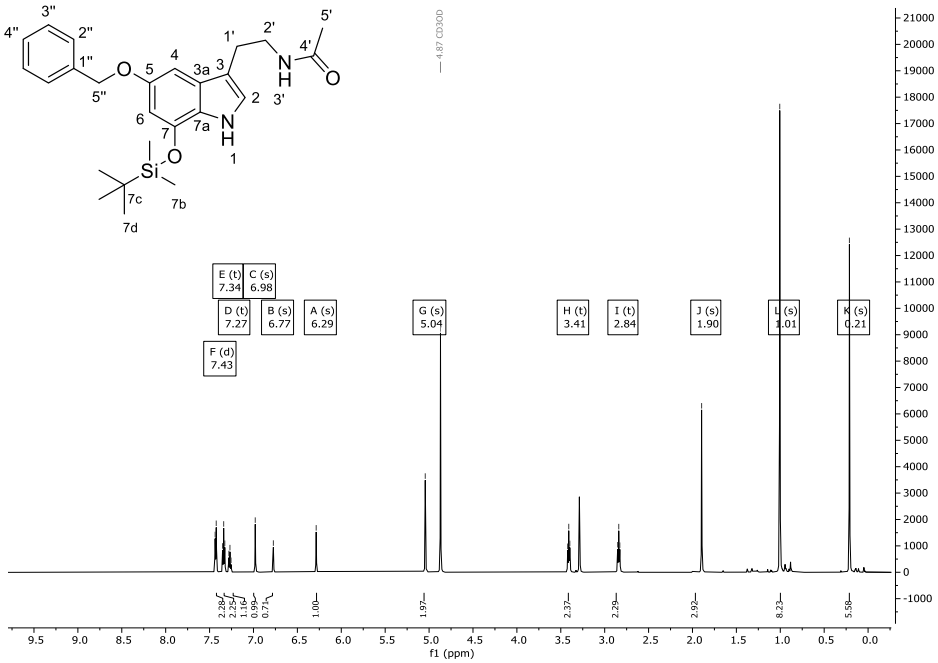


Abbildung 211: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **185** in CD_3OD.

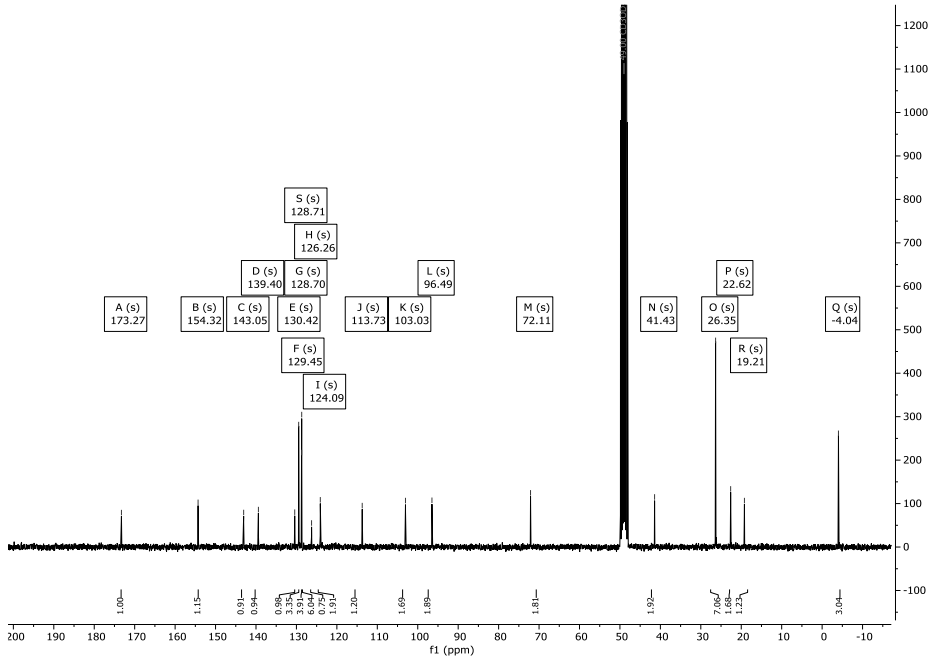


Abbildung 212: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **185** in CD_3OD.

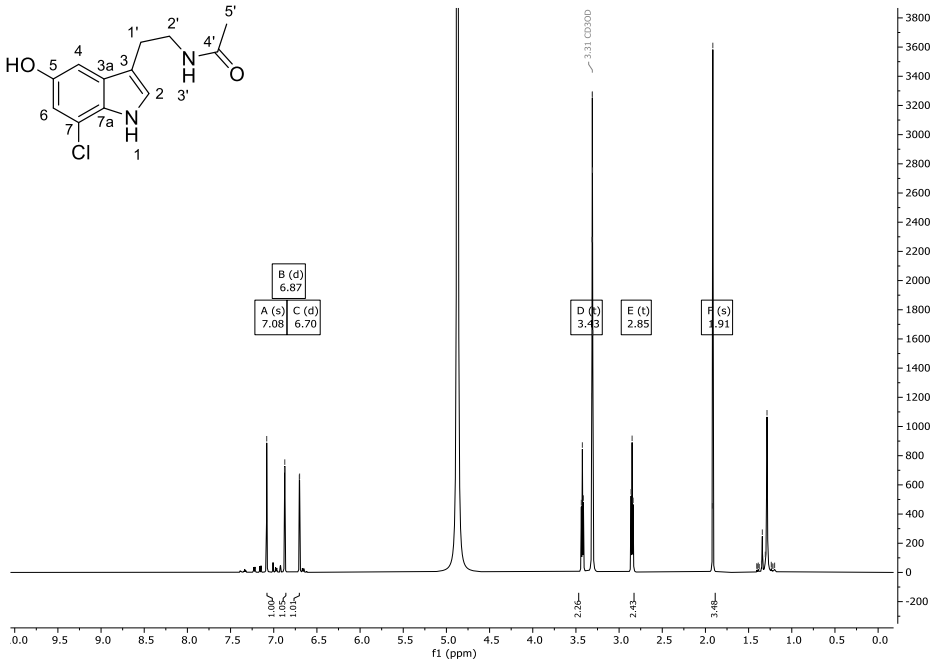


Abbildung 213: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **176** in $CDCl_3$.

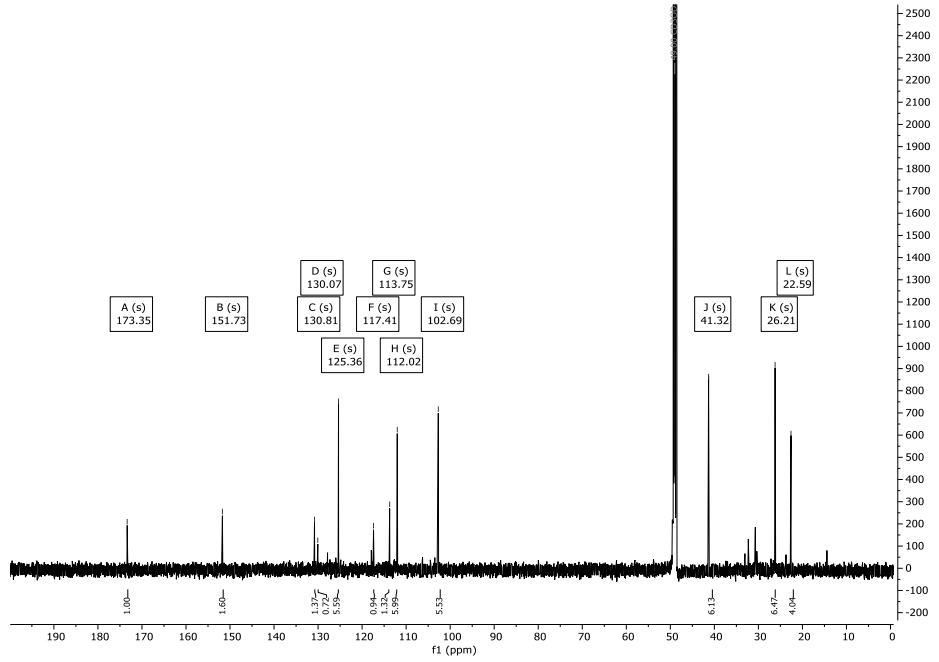


Abbildung 214: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **176** in CD_3OD.

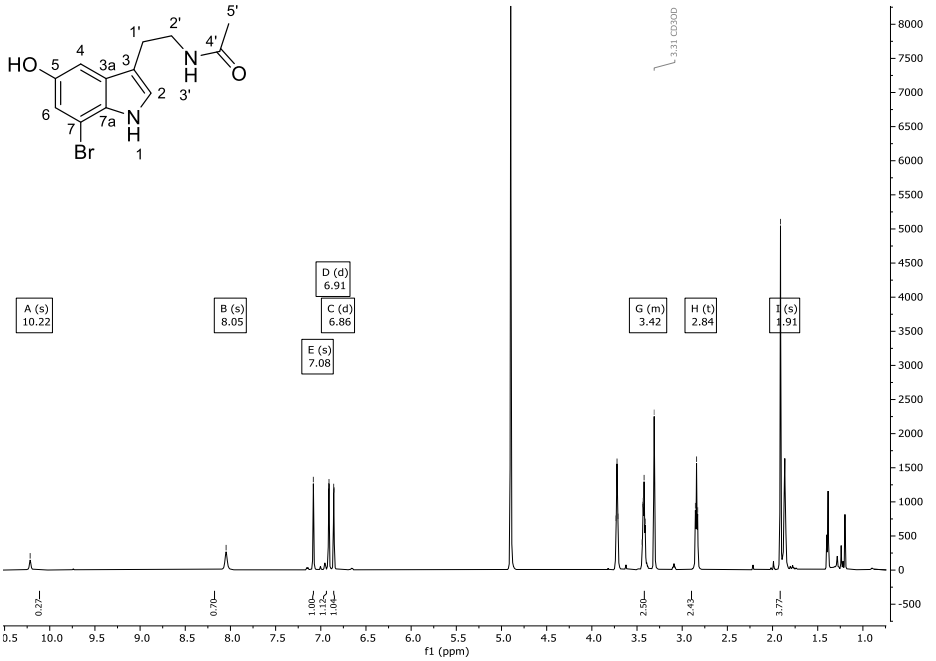


Abbildung 215: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **177** in CD_3OD.

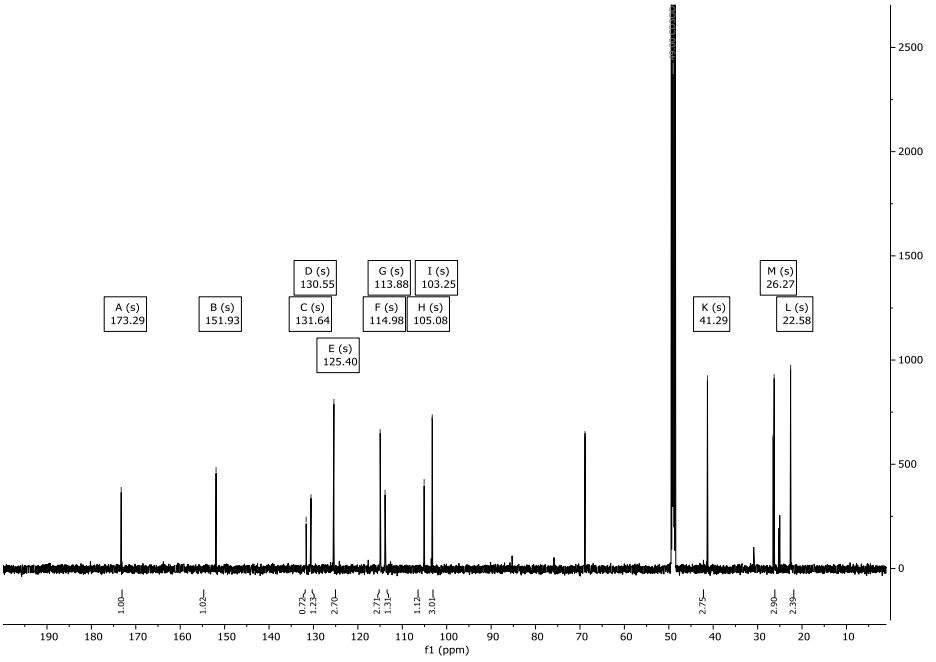


Abbildung 216: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **177** in CD_3OD.

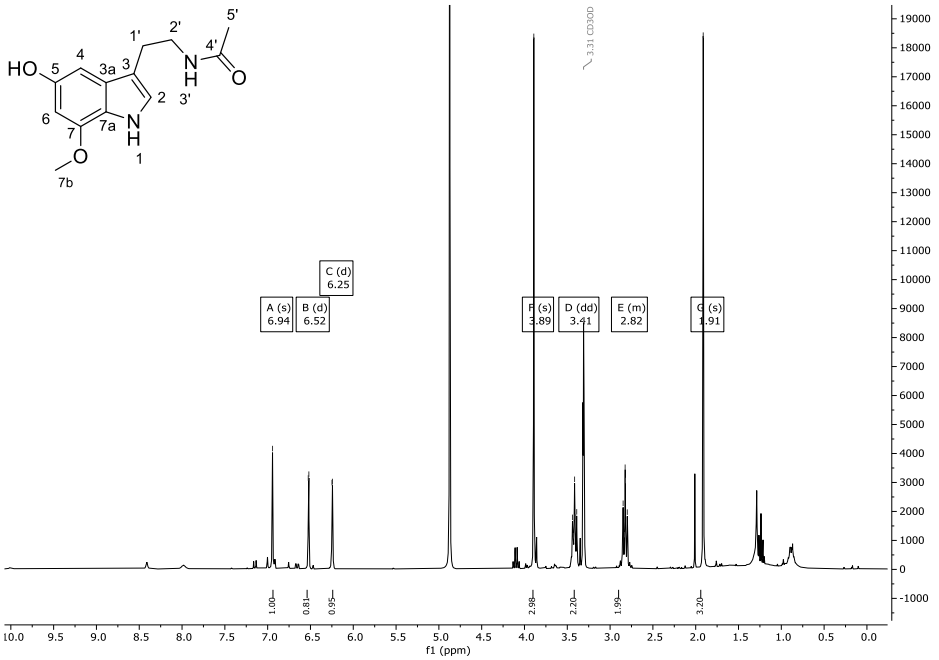


Abbildung 217: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **194** in CD_3OD.

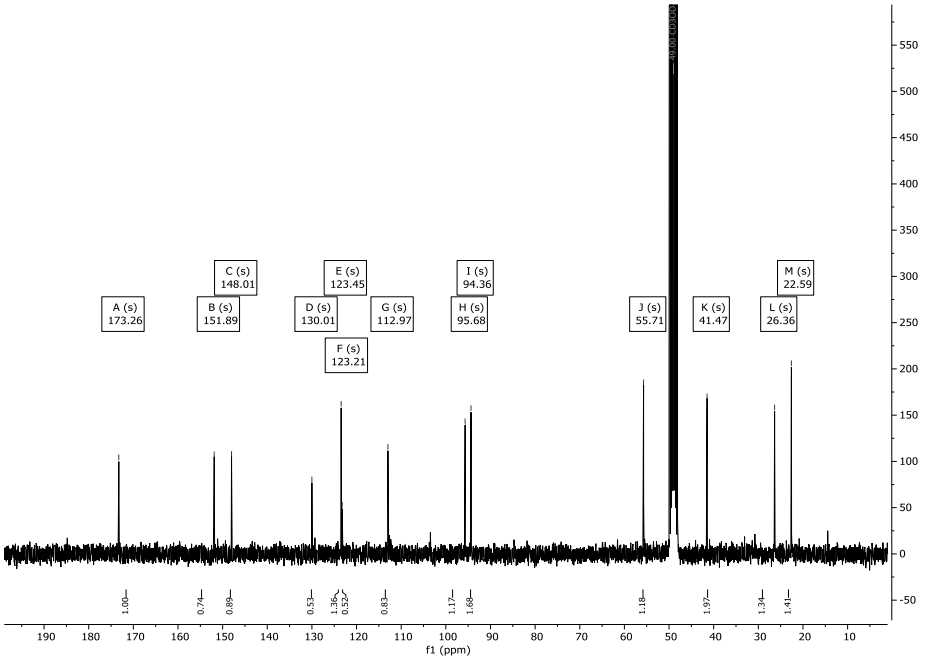


Abbildung 218: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **194** in CD_3OD.

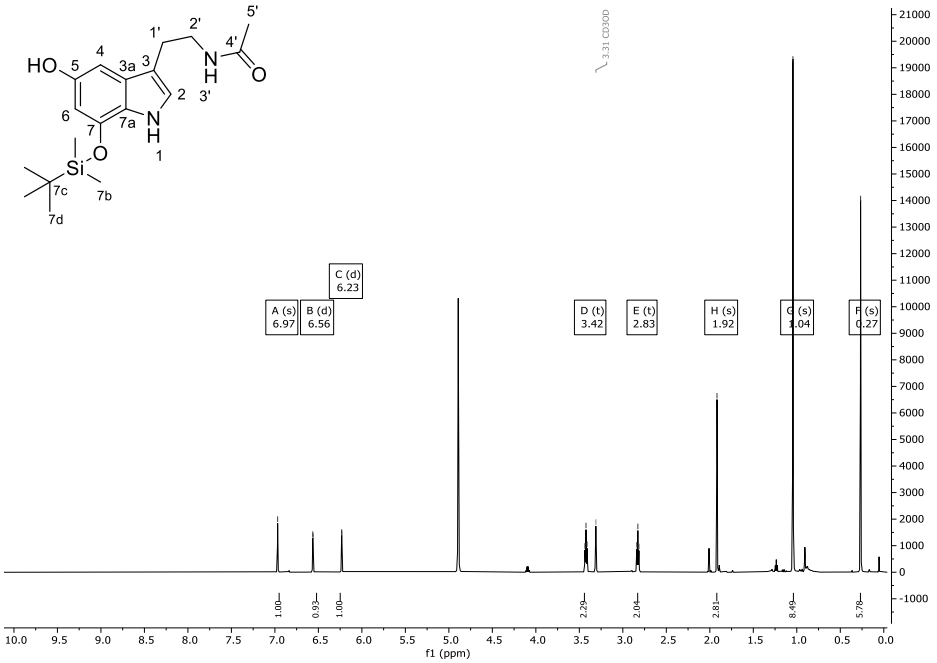


Abbildung 219: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **186** in CD_3OD.

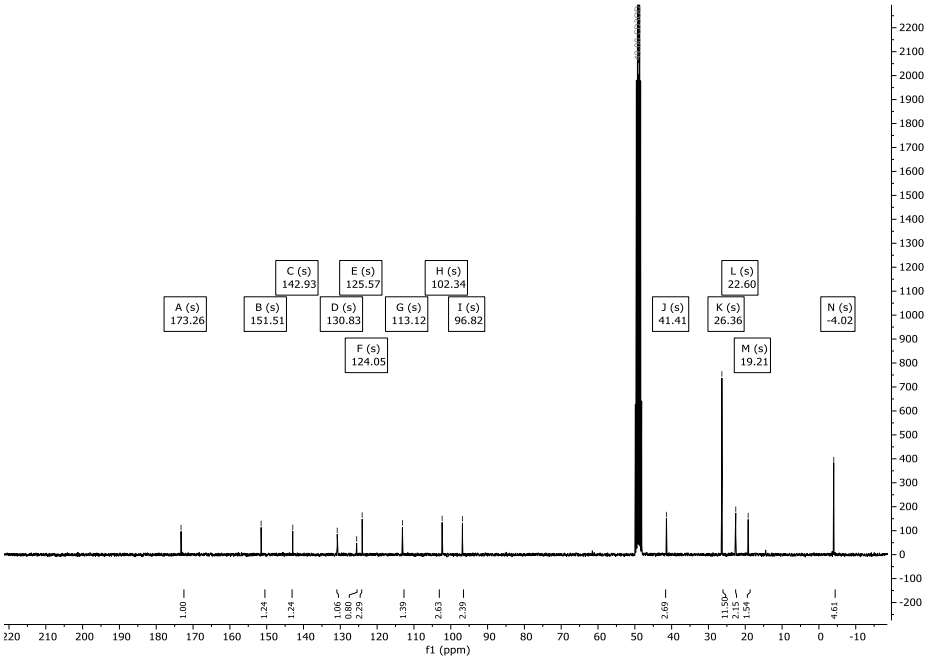


Abbildung 220: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **186** in CD_3OD.

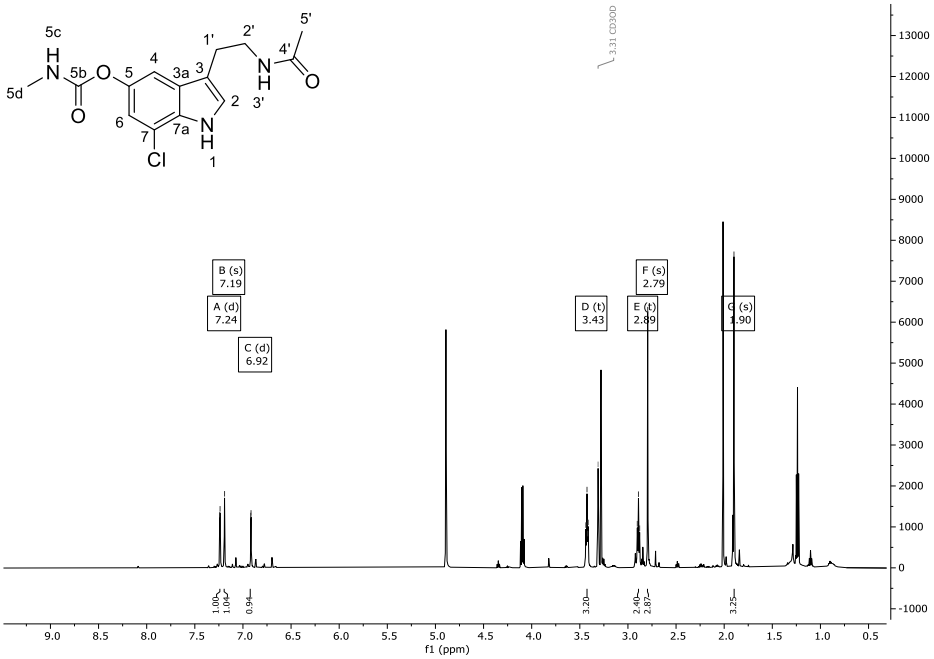


Abbildung 221: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **178** in CD_3OD.

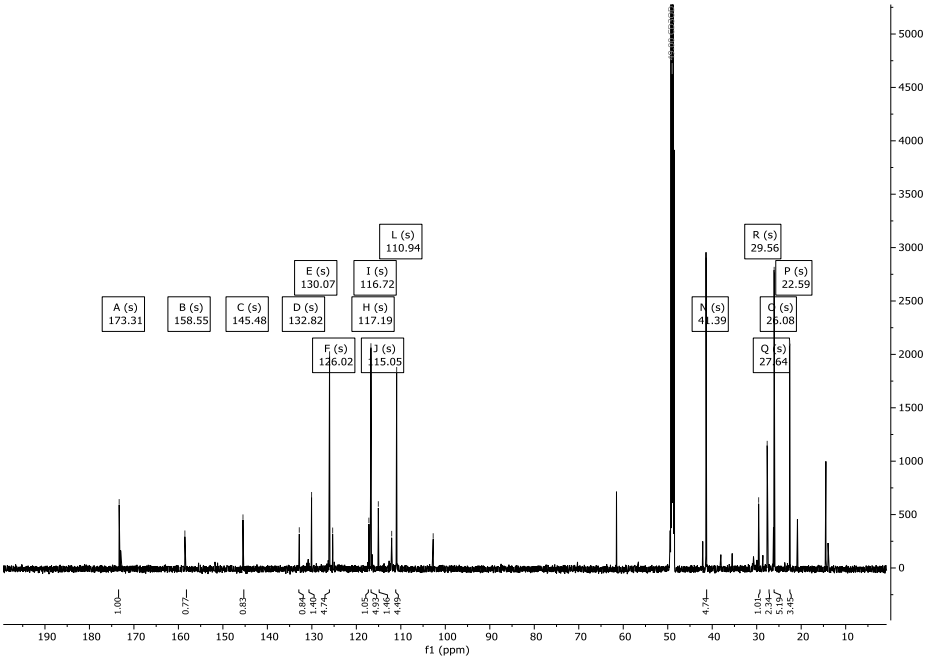


Abbildung 222: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **178** in CD_3OD.

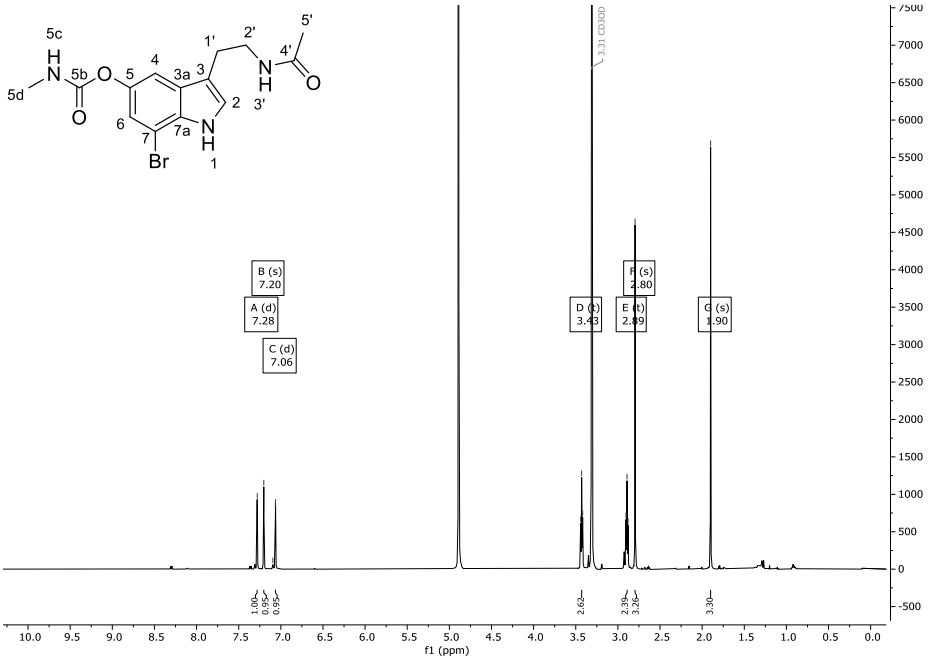


Abbildung 223: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **179** in CD_3OD.

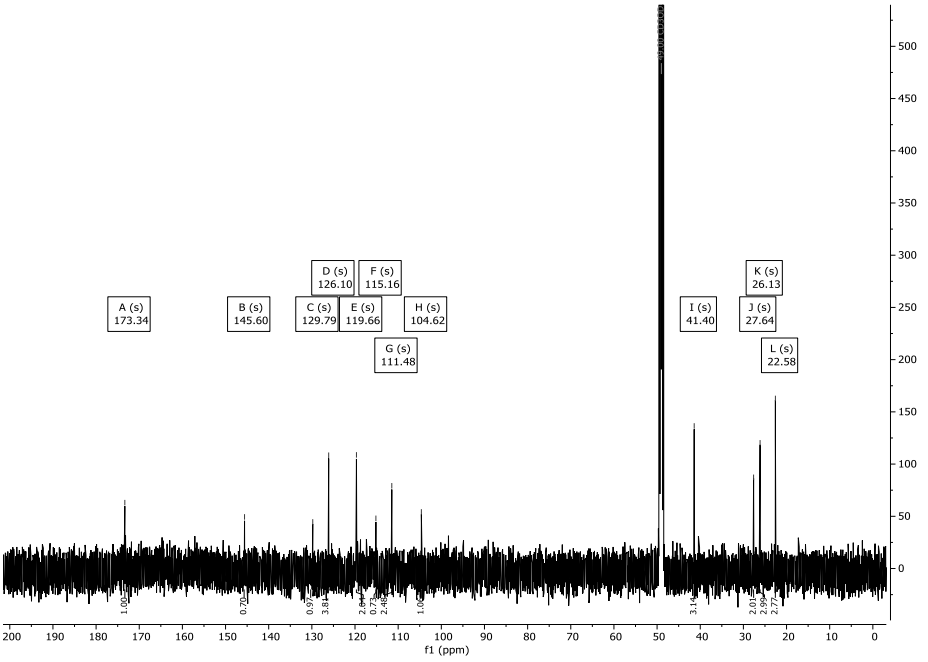


Abbildung 224: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **179** in CD_3OD.

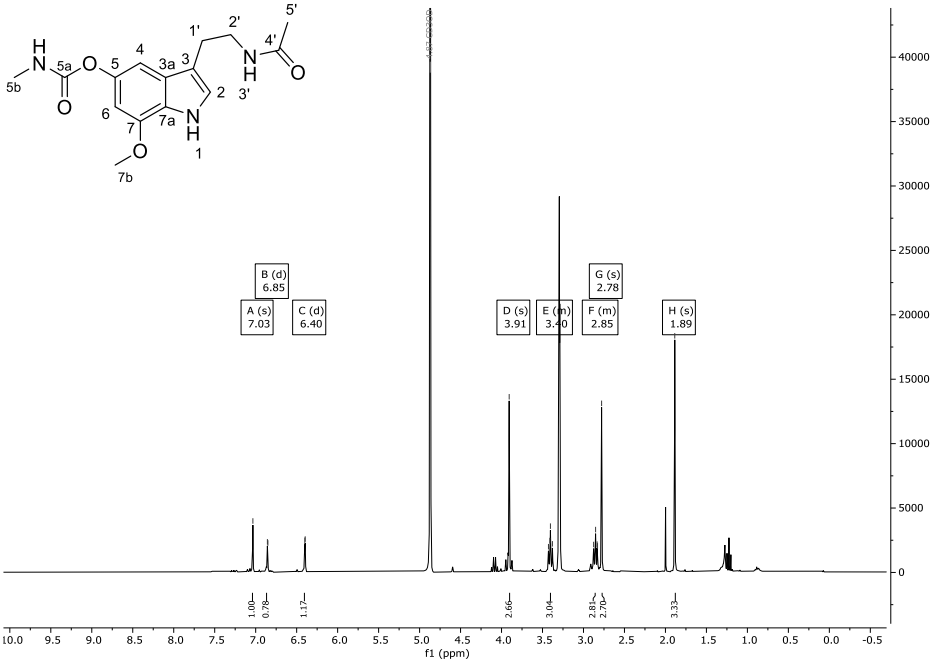


Abbildung 225: ^{1}H-NMR-Spektrum (300 MHz) von Verbindung **195** in CD_3OD.

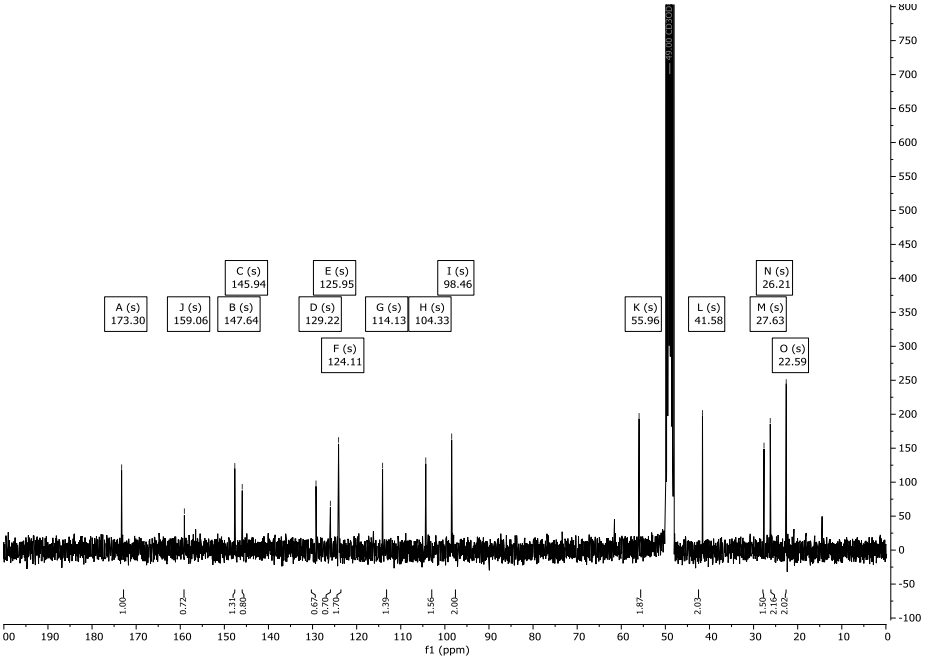


Abbildung 226: ^{13}C-NMR-Spektrum (76 MHz) von Verbindung **195** in CD_3OD.

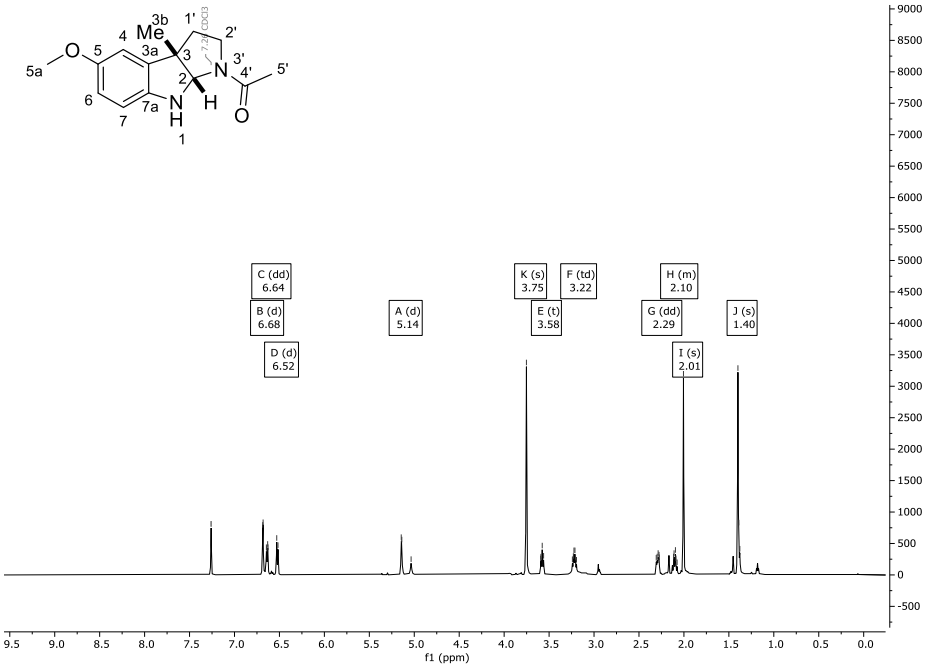


Abbildung 227: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung ***rac*-200** in $CDCl_3$.

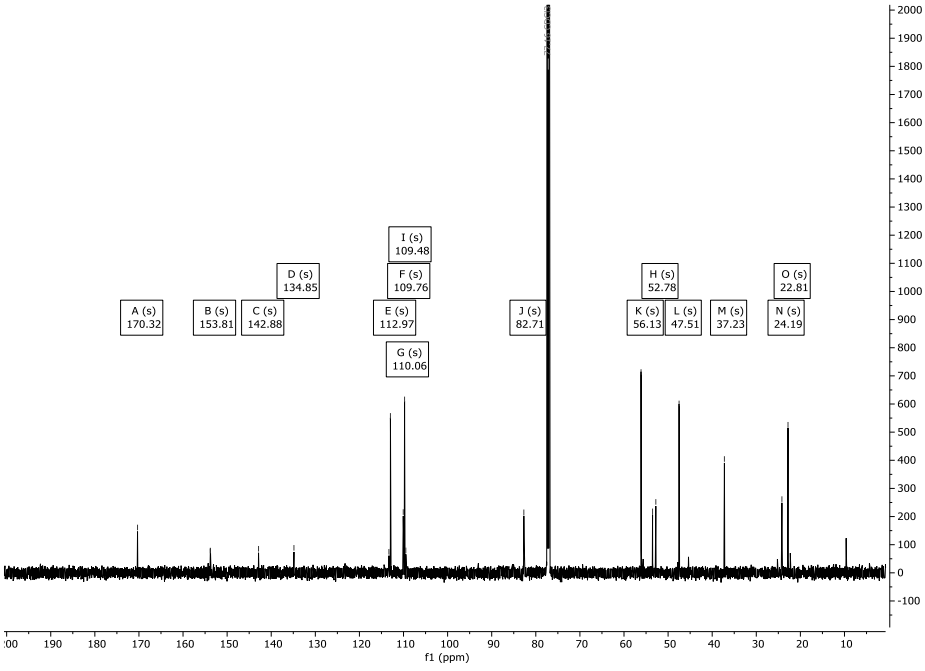


Abbildung 228: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung ***rac*-200** in $CDCl_3$.

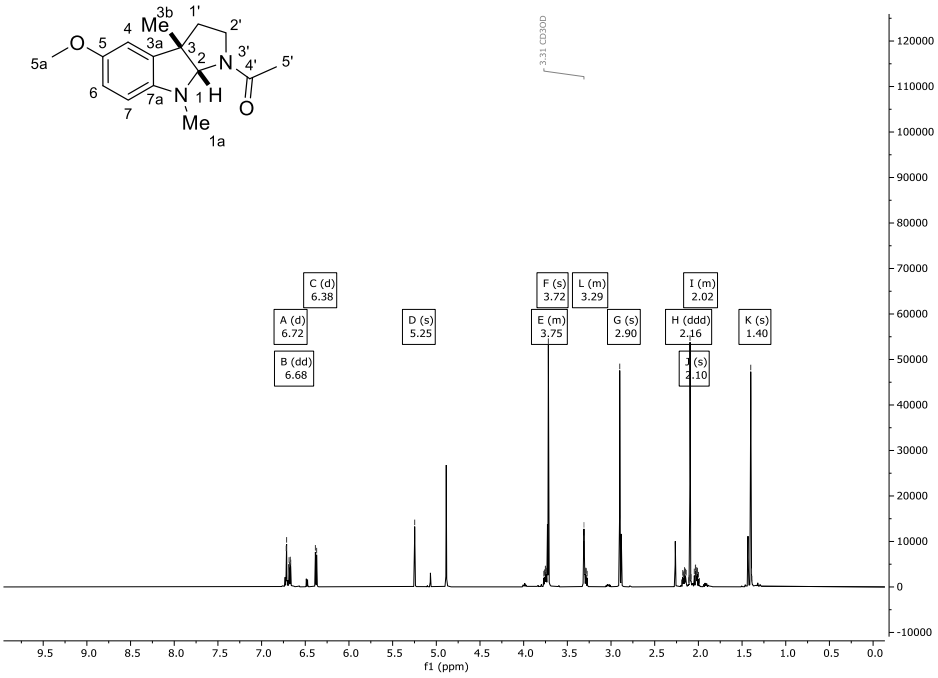


Abbildung 229: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung ***rac*-148** in CD_3OD.

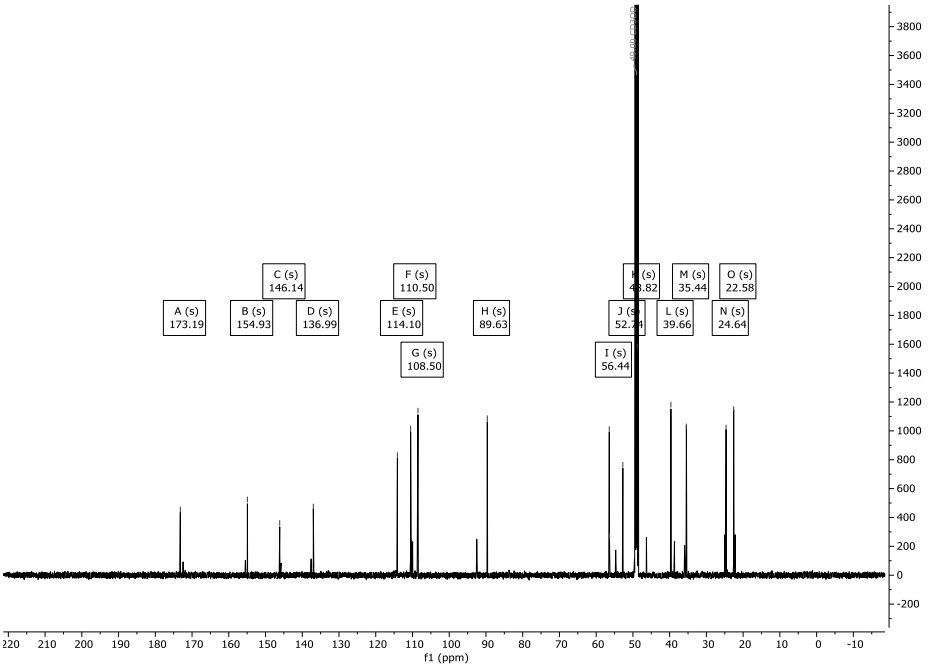


Abbildung 230: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung ***rac*-148** in CD_3OD.

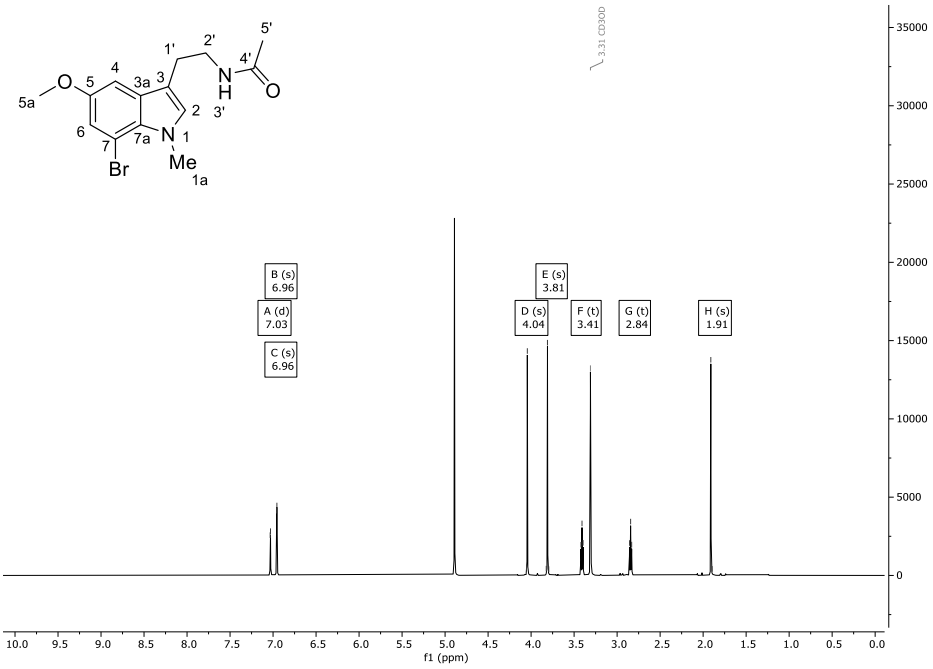


Abbildung 231: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **201** in CD_3OD.

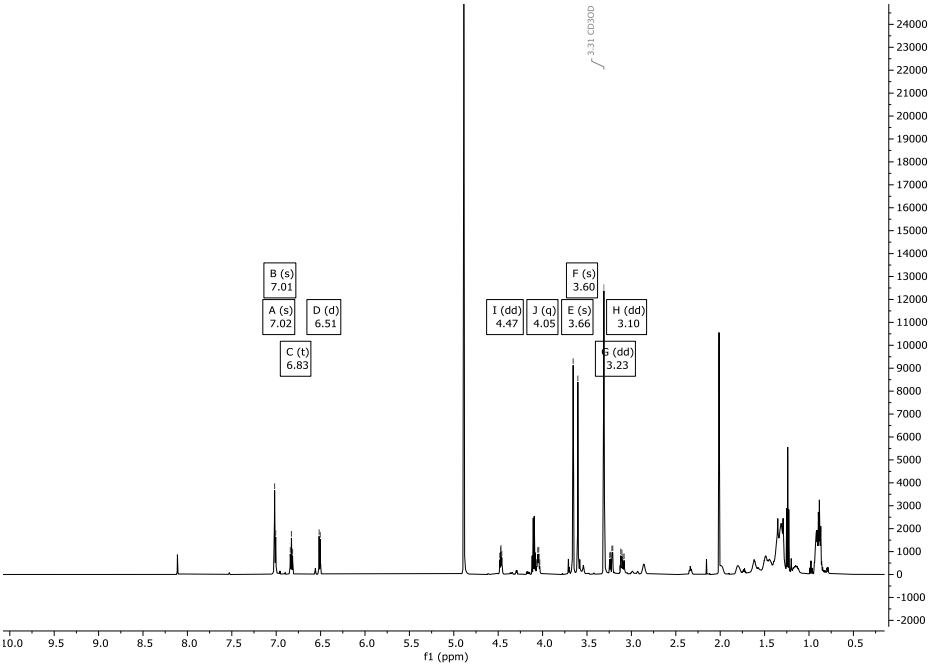


Abbildung 232: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **201** in CD_3OD.

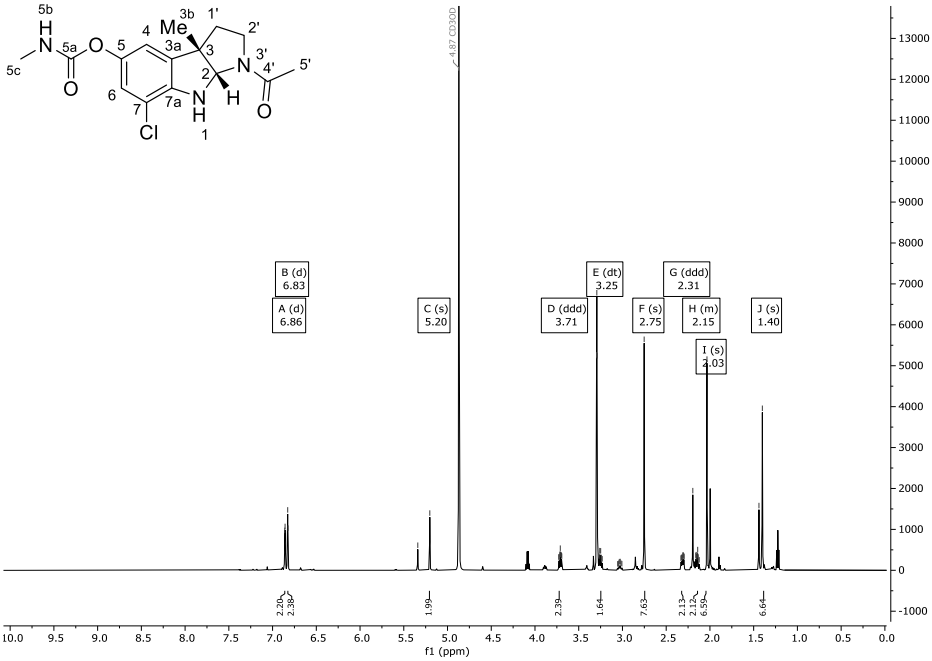


Abbildung 233: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **196** in CD_3OD.

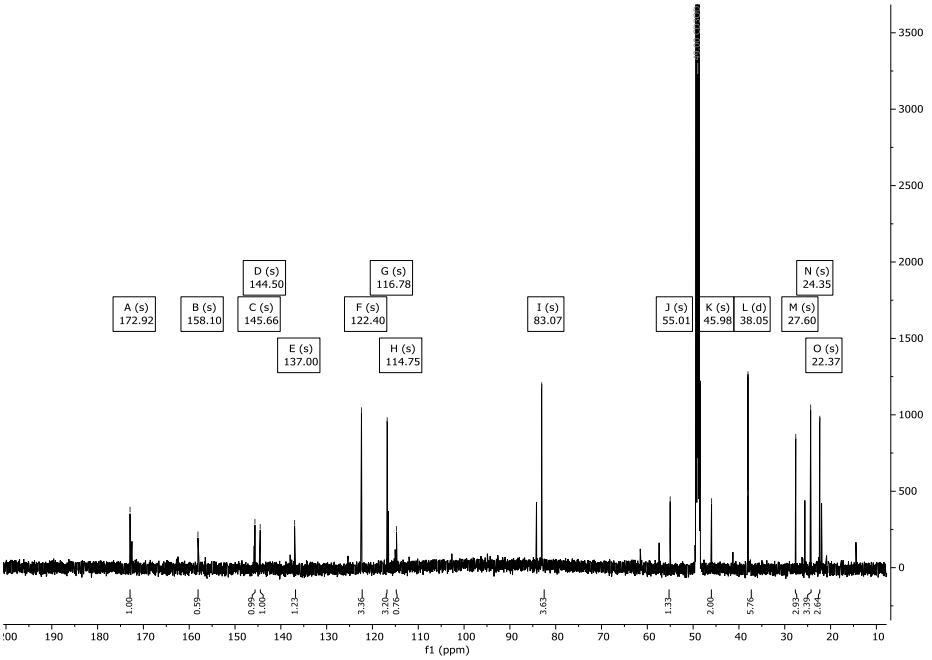


Abbildung 234: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **196** in CD_3OD.

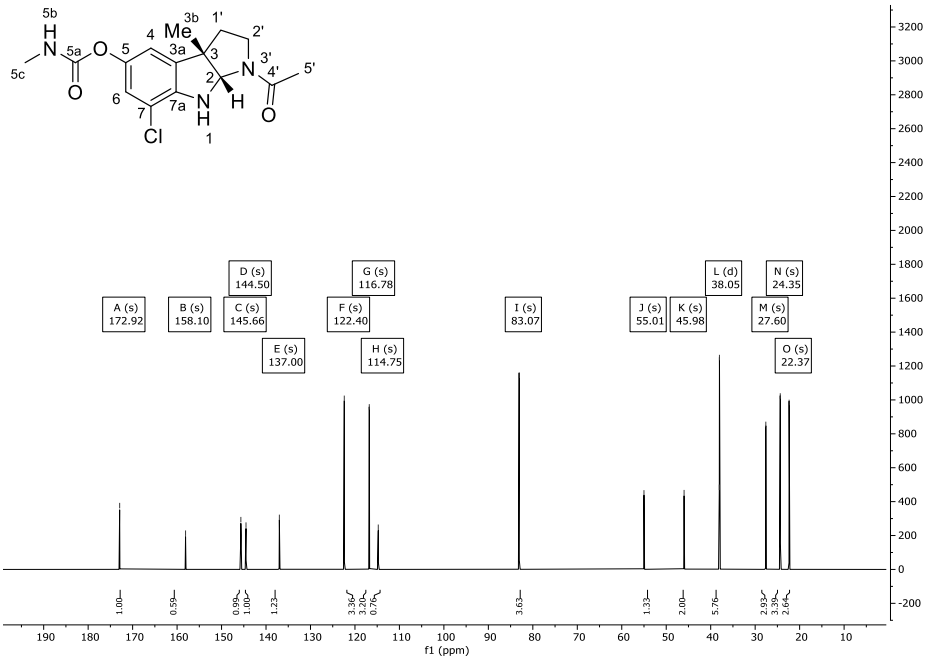


Abbildung 235: Synthetisches ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) des prädominanten Rotamers von Verbindung **196** in CD_3OD.

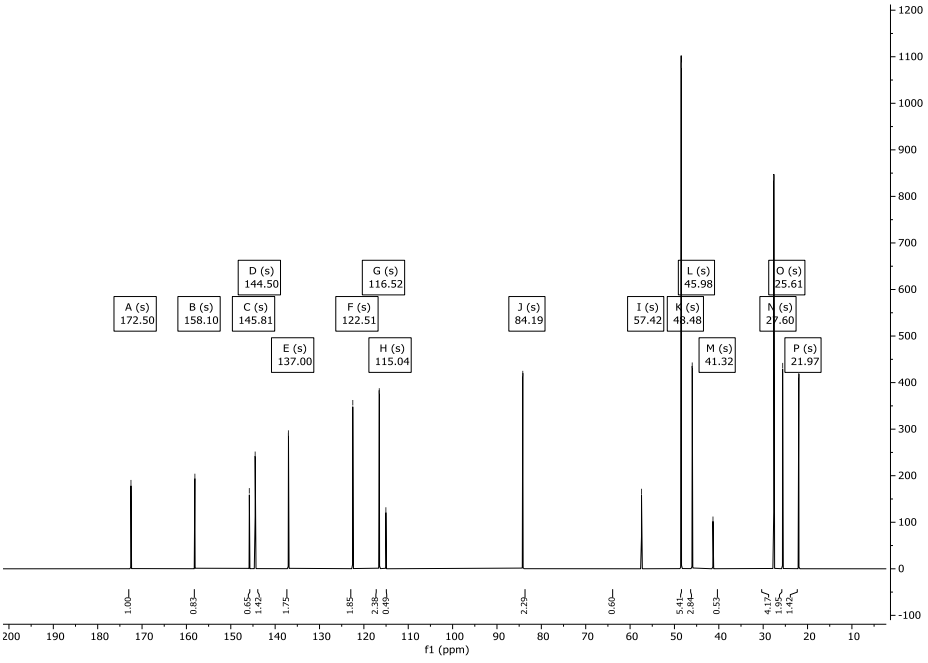


Abbildung 236: Synthetisches ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) des geringer-vorliegenden Rotamers von Verbindung **196** in CD_3OD.

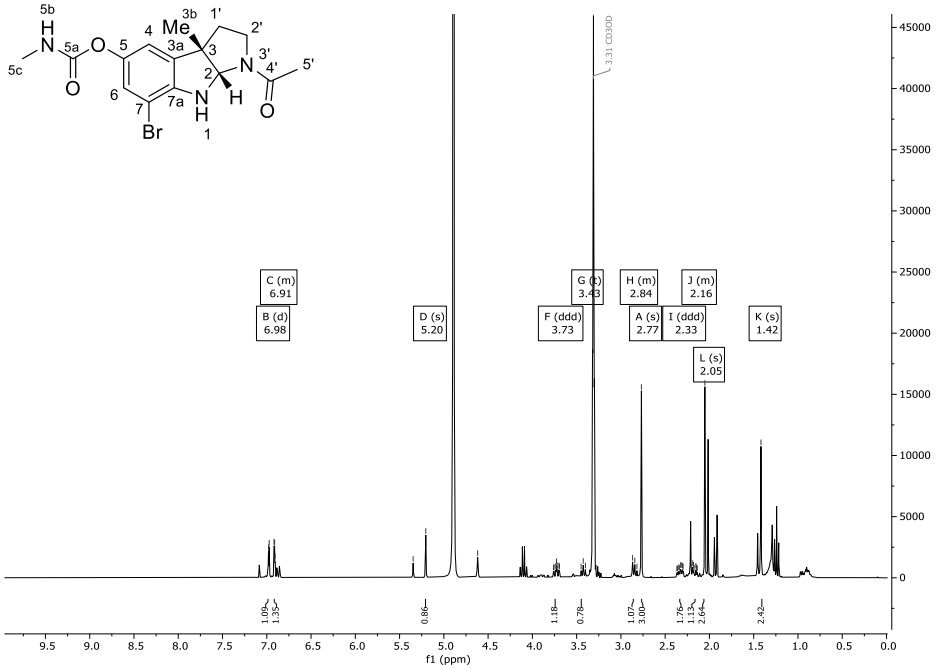


Abbildung 237: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **197** in CD_3OD.

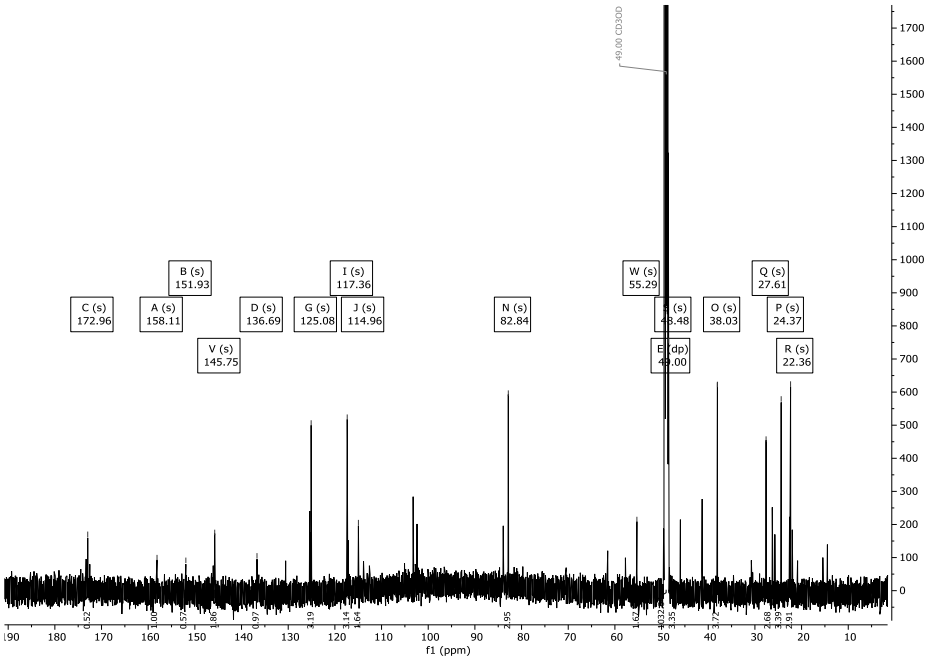


Abbildung 238^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **197** in CD_3OD.

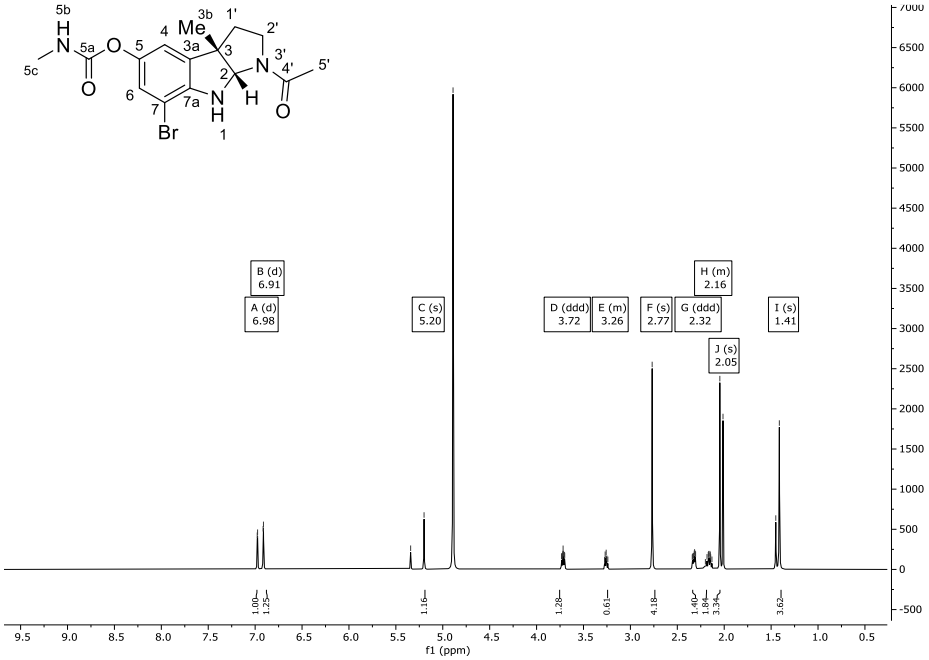


Abbildung 239: Synthetisches ^{1}H-NMR-Spektrum (600MHz) des prädominanten Rotamers von Verbindung **197** in CD_3OD.

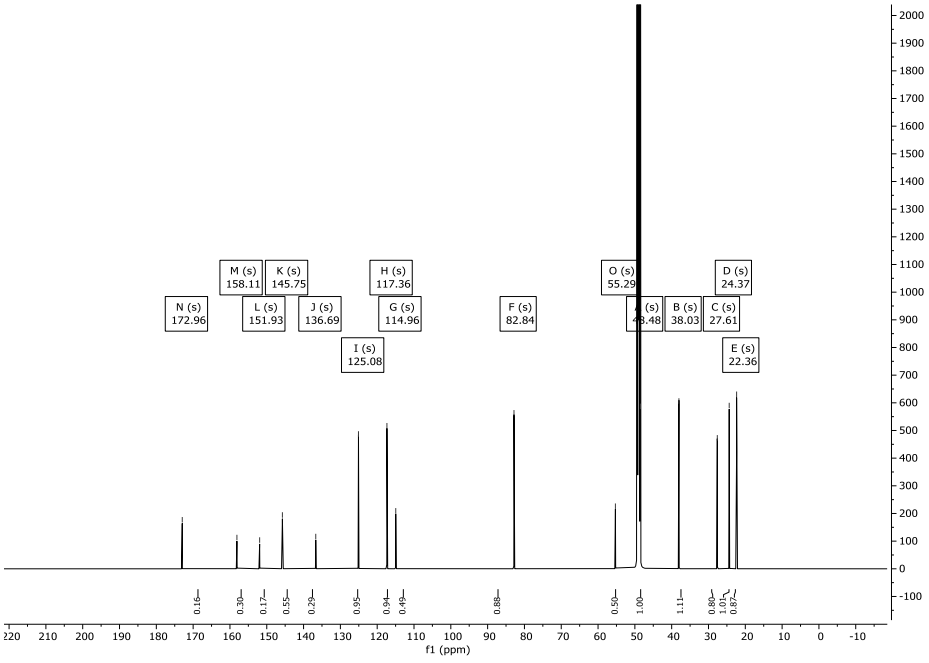


Abbildung 240: Synthetisches ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) des prädominanten Rotamers von Verbindung **197** in CD_3OD.

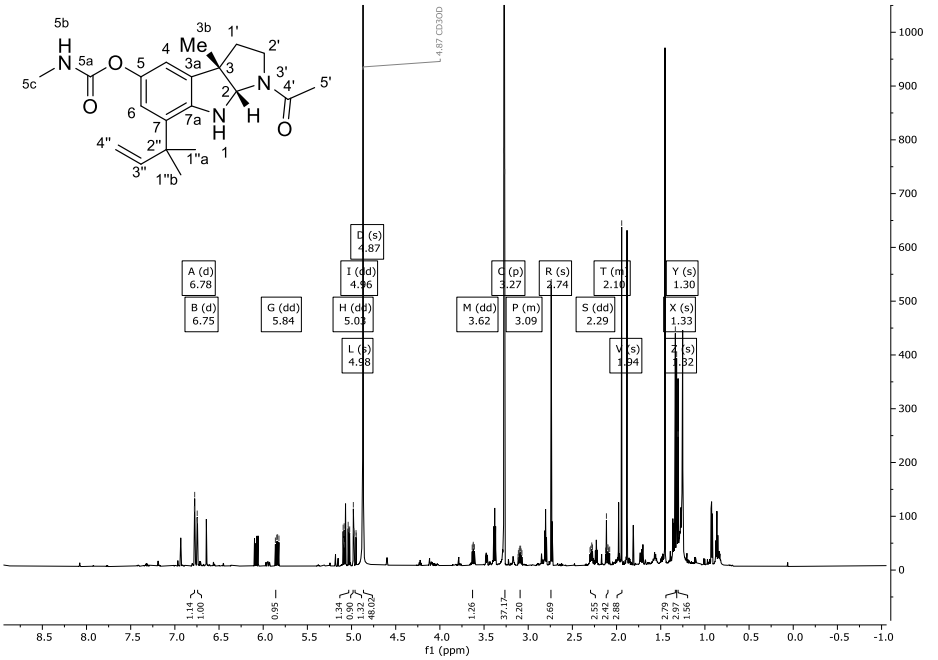


Abbildung 241: ^{1}H-NMR-Spektrum (700 MHz) von Verbindung **203** in CD_3OD.

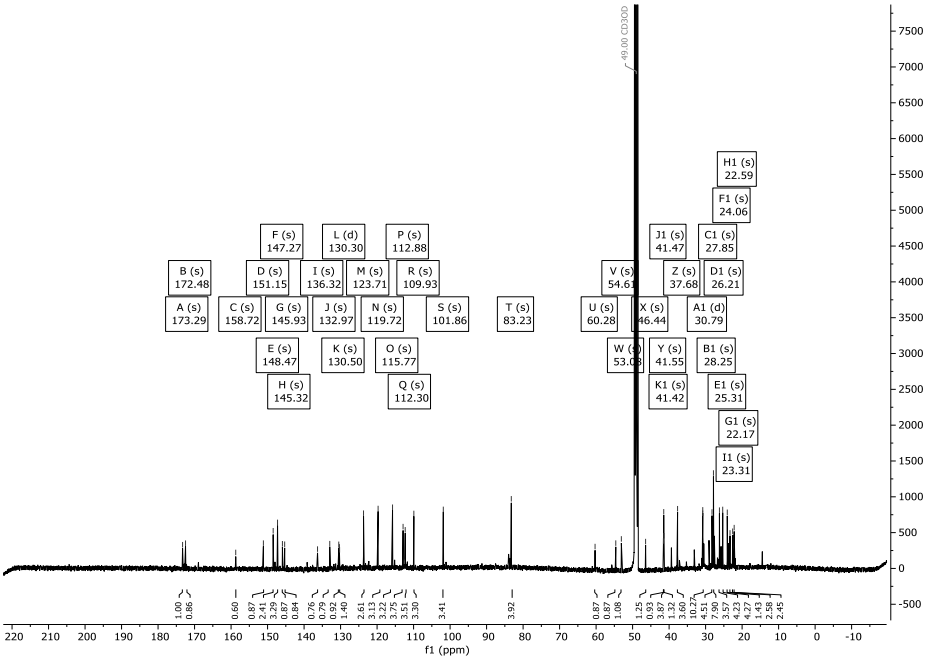


Abbildung 242: ^{13}C-NMR-Spektrum (176 MHz) von Verbindung **203** in CD_3OD.

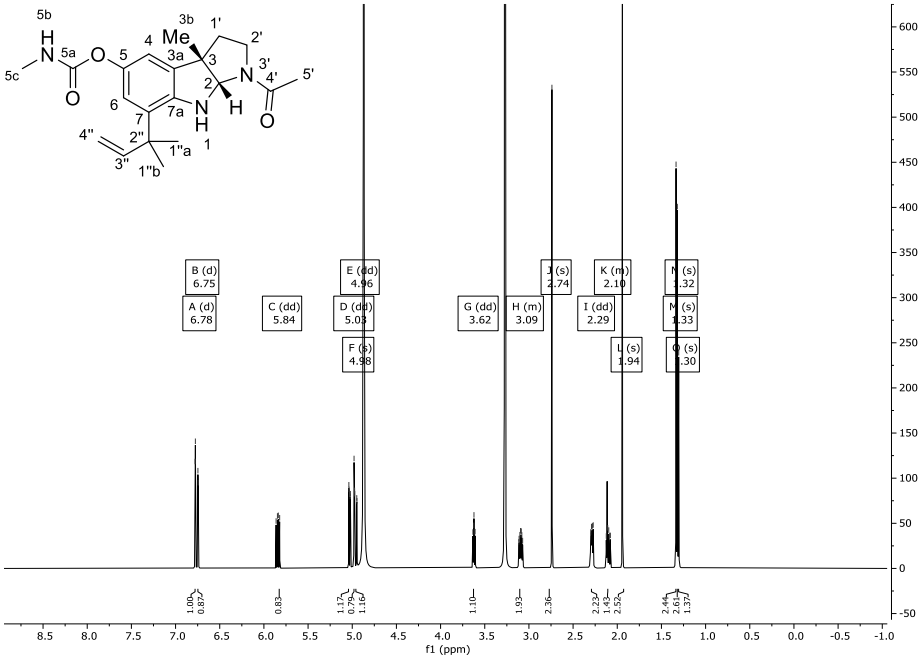


Abbildung 243: Synthetisches ^{1}H-NMR-Spektrum (700 MHz) des prädominanten Rotamers von Verbindung **203** in CD_3OD.

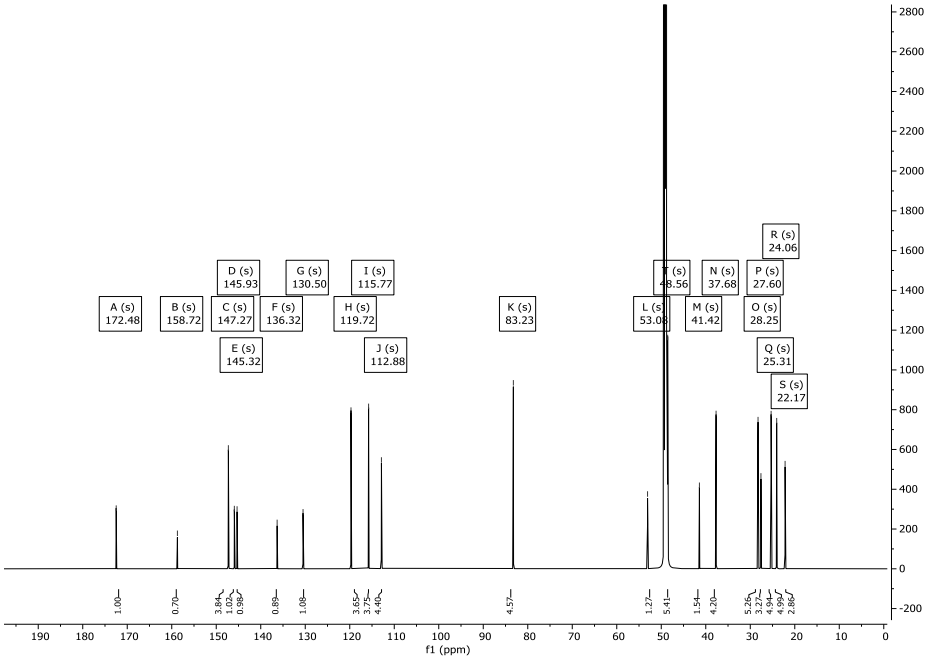


Abbildung 244: Synthetisches ^{13}C-NMR-Spektrum (176 MHz) des prädominanten Rotamers von Verbindung **203** in CD_3OD.

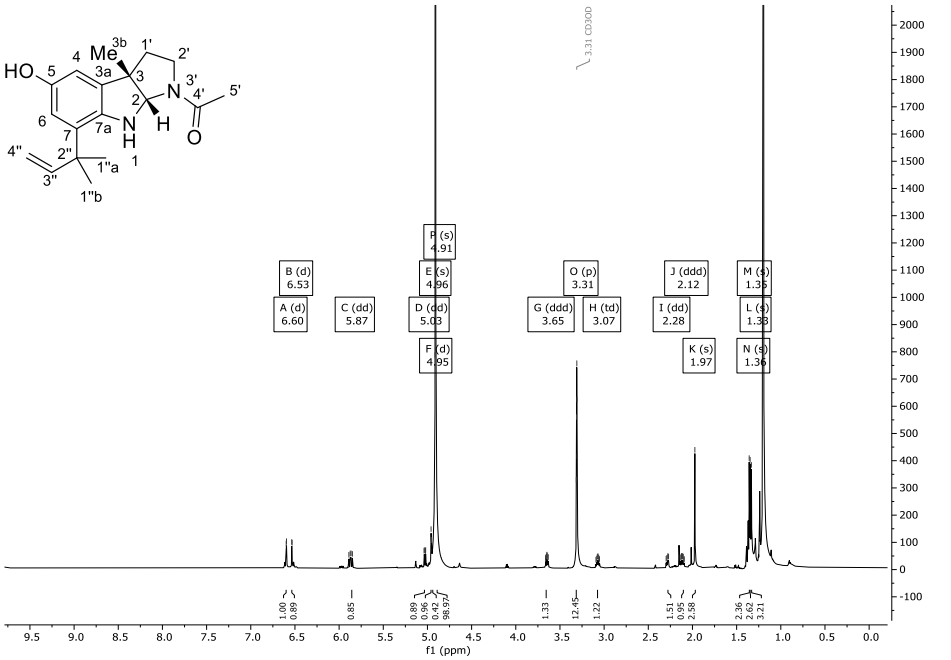


Abbildung 245: ^{1}H-NMR-Spektrum (700 MHz) von Verbindung **204** in CD_3OD.

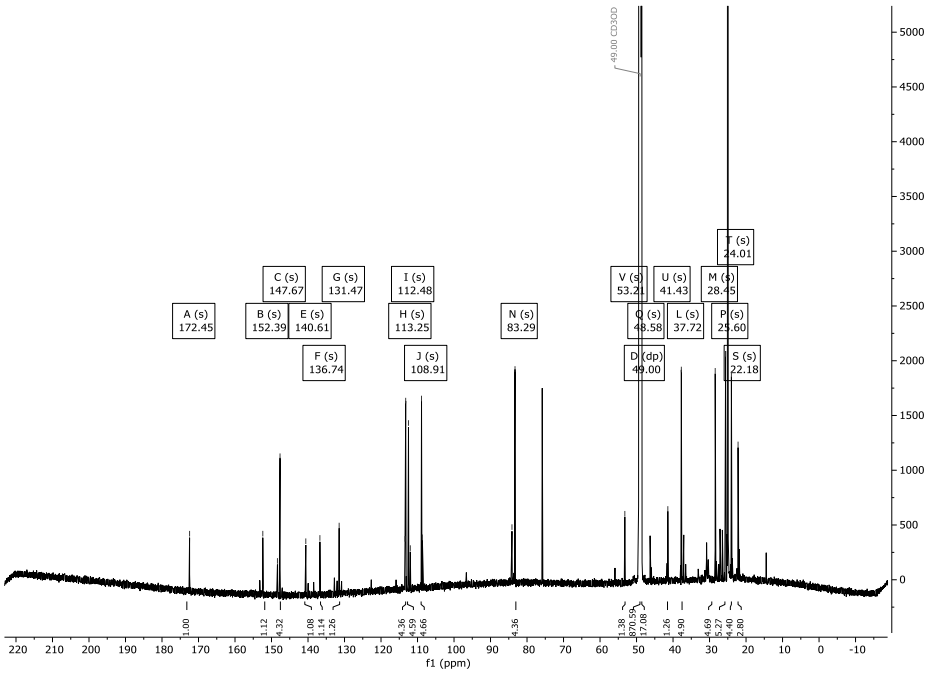


Abbildung 246: ^{13}C-NMR-Spektrum (176 MHz) von Verbindung **204** in CD_3OD.

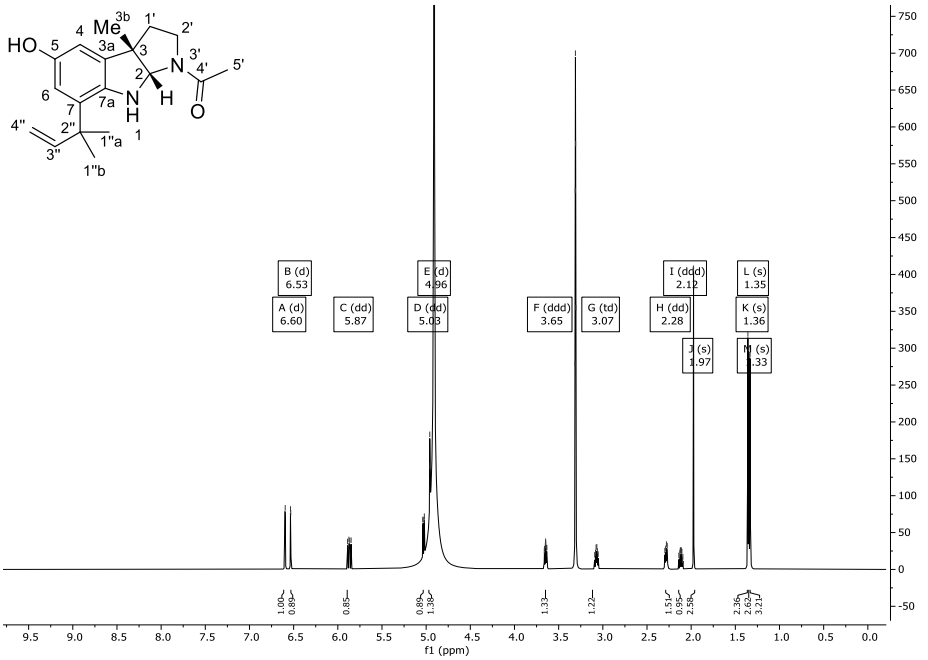


Abbildung 247: Synthetisches ^{1}H-NMR-Spektrum (700 MHz) des prädominanten Rotamers von Verbindung **204** in CD_3OD.

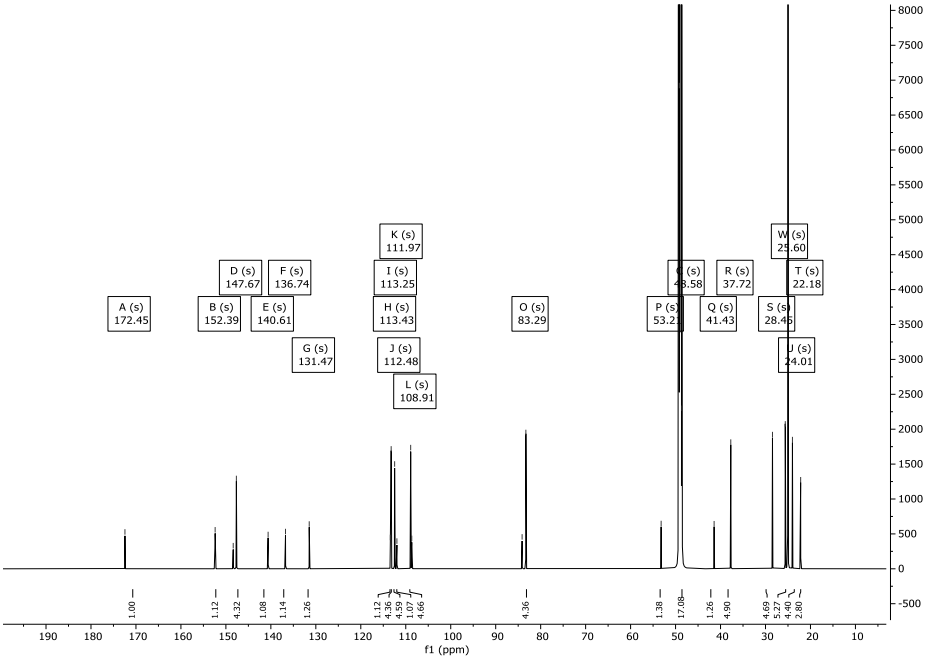


Abbildung 248: Synthetisches ^{13}C-NMR-Spektrum (176 MHz) des prädominanten Rotamers von Verbindung **204** in CD_3OD.

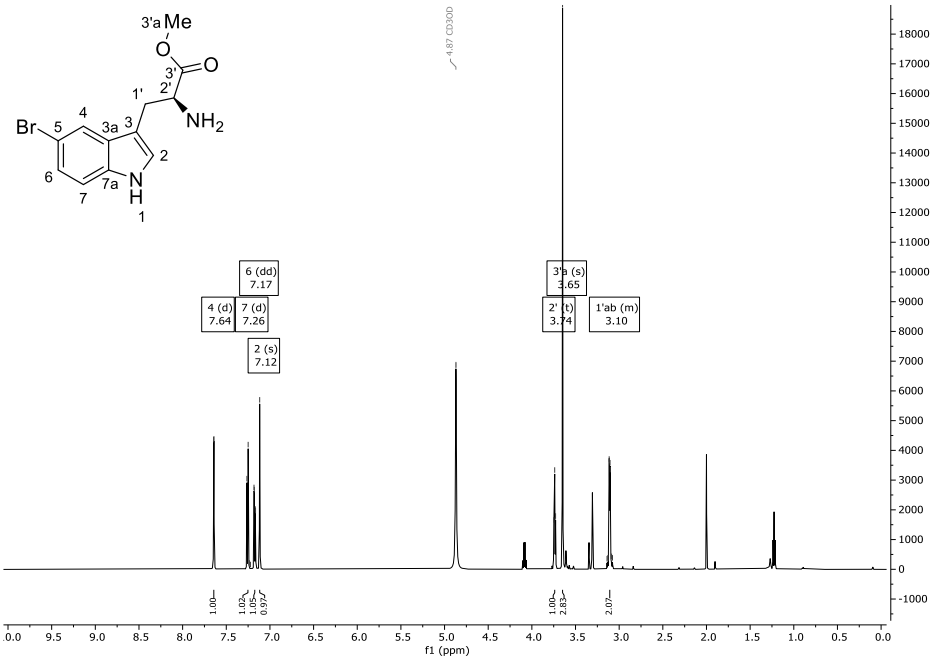


Abbildung 249: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **270** in CD_3OD.

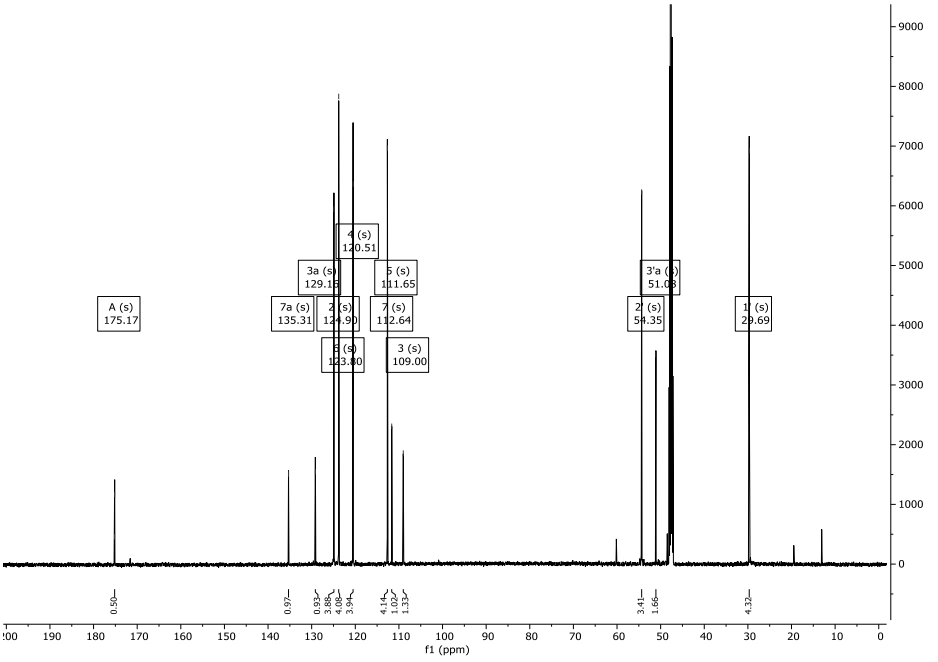


Abbildung 250: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **270** in CD_3OD.

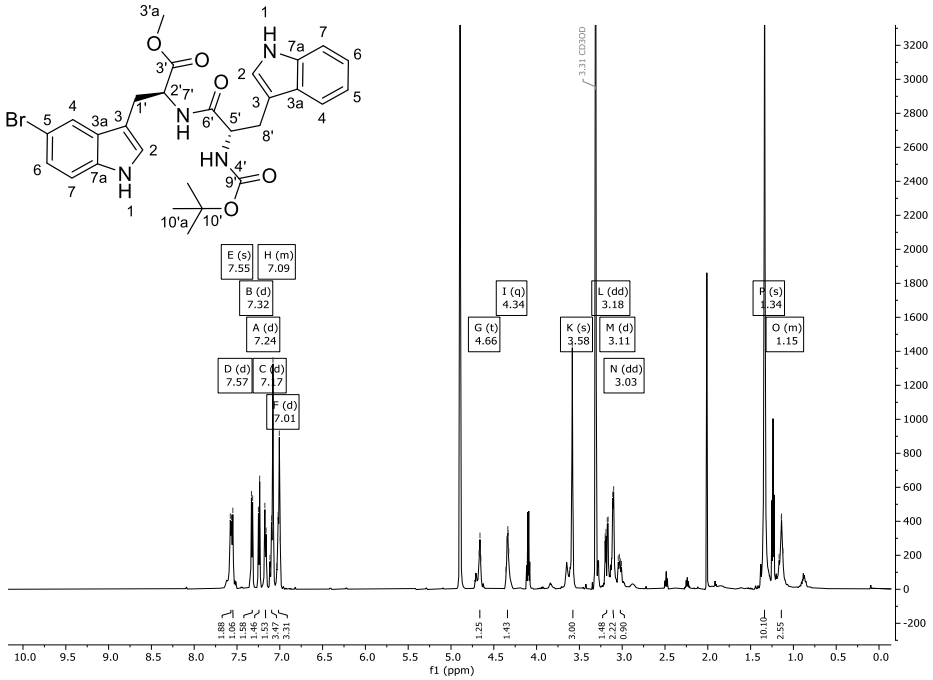


Abbildung 251: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **286** in CD_3OD.

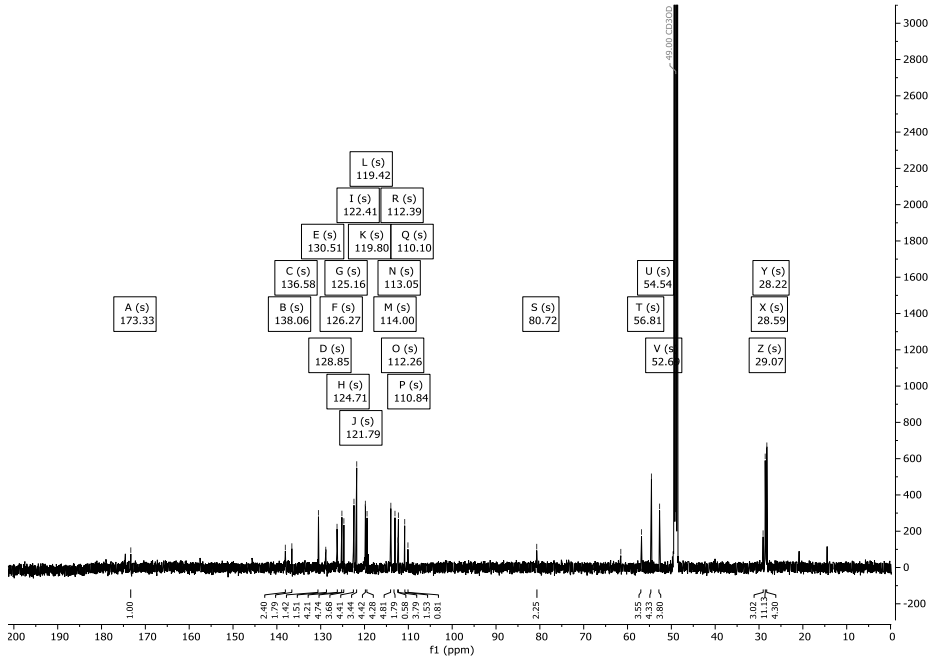


Abbildung 252: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **286** in CD_3OD.

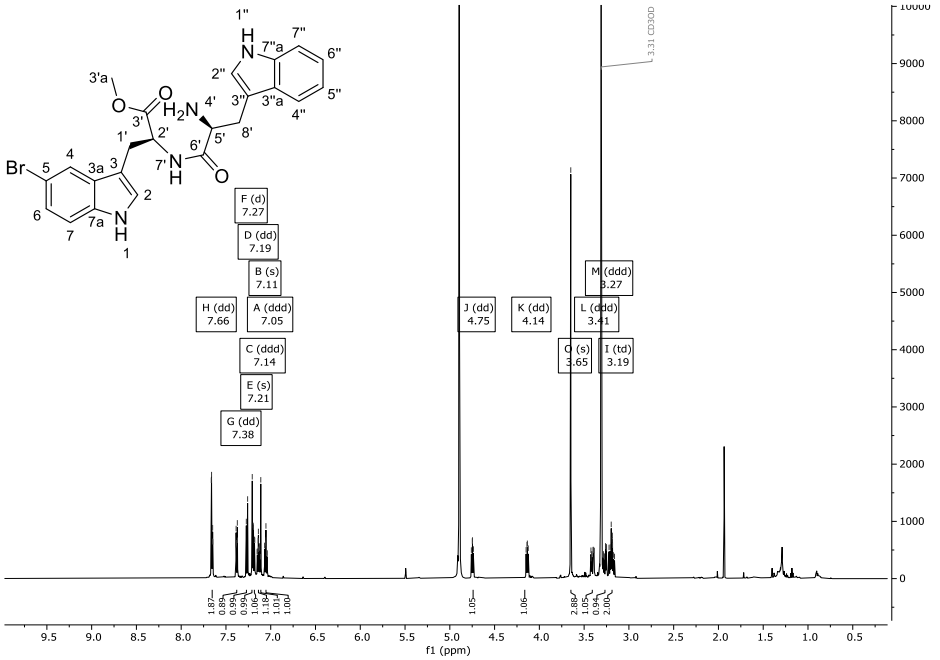


Abbildung 253: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **287** in CD_3OD.

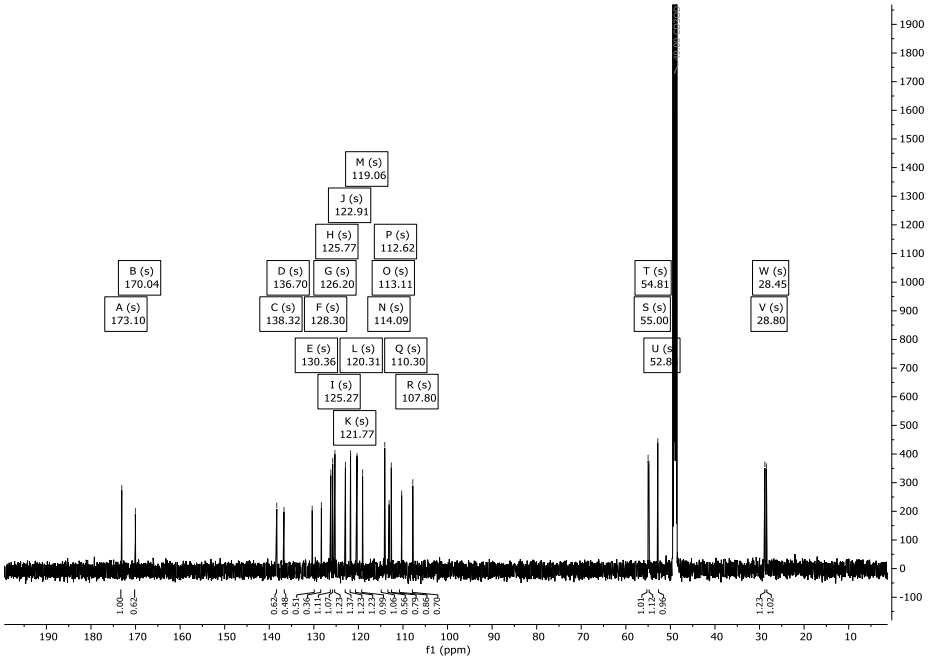


Abbildung 254: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **287** in CD_3OD.

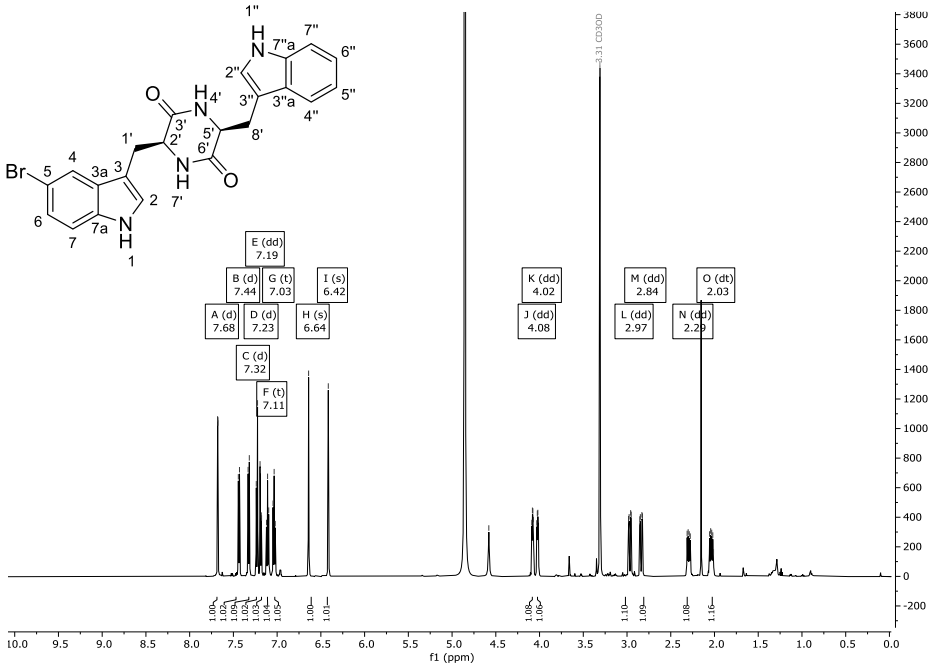


Abbildung 255: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **273** in CD_3OD.

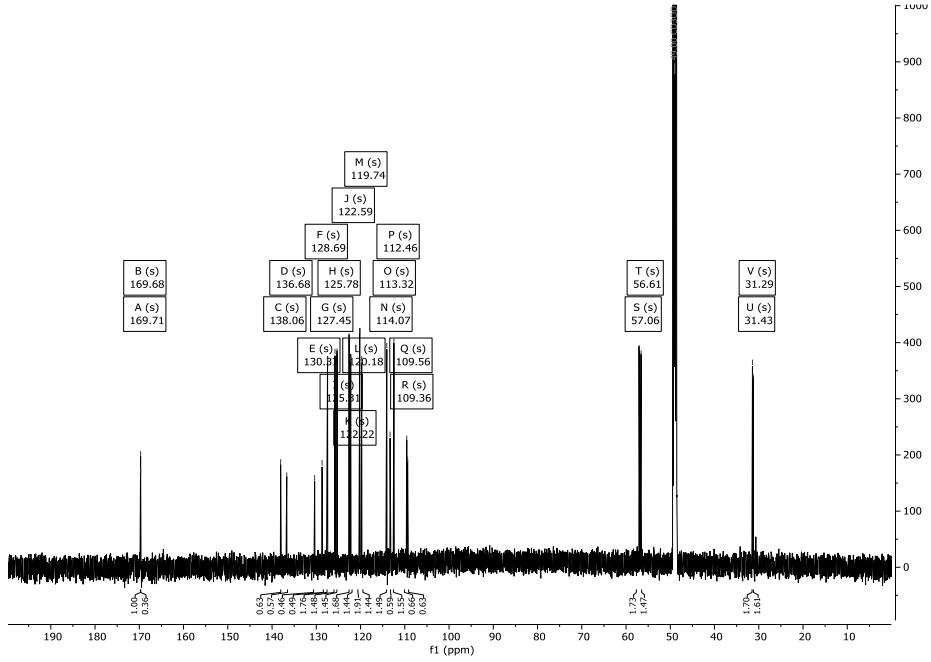


Abbildung 256: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **273** in CD_3OD.

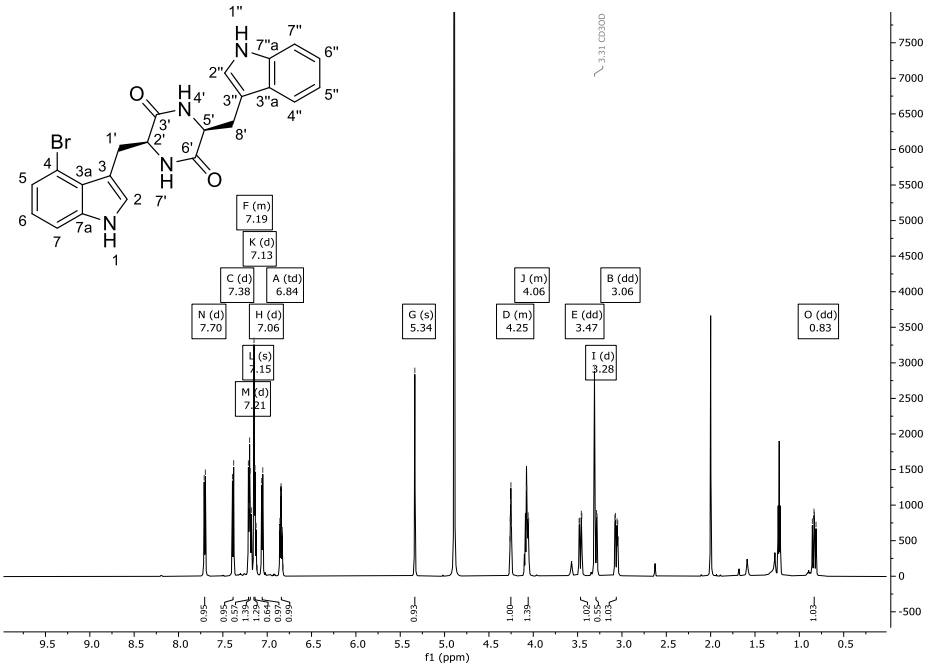


Abbildung 257: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **313** in CD_3OD.

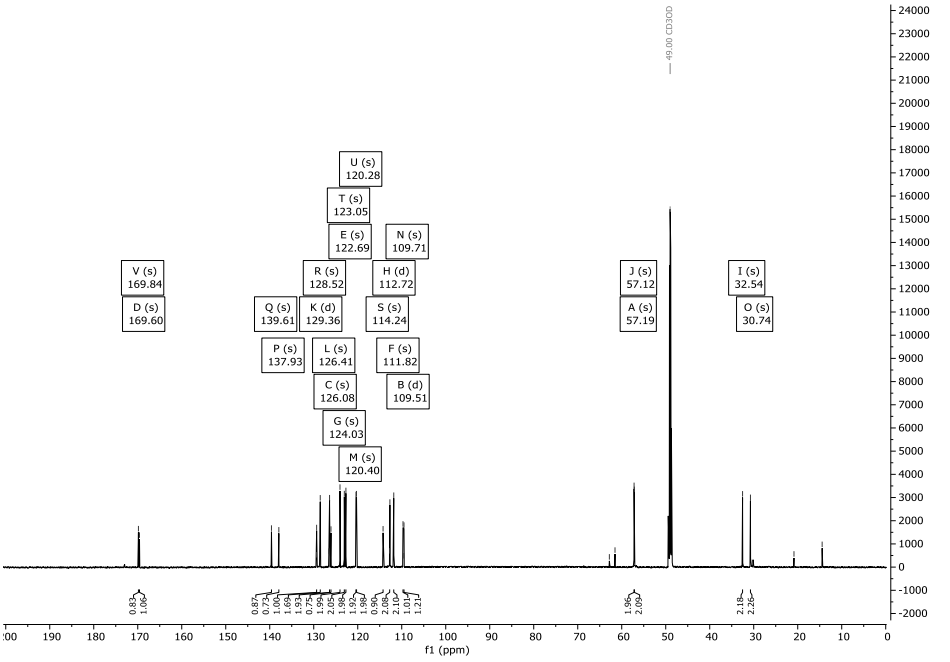


Abbildung 258: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **313** in CD_3OD.

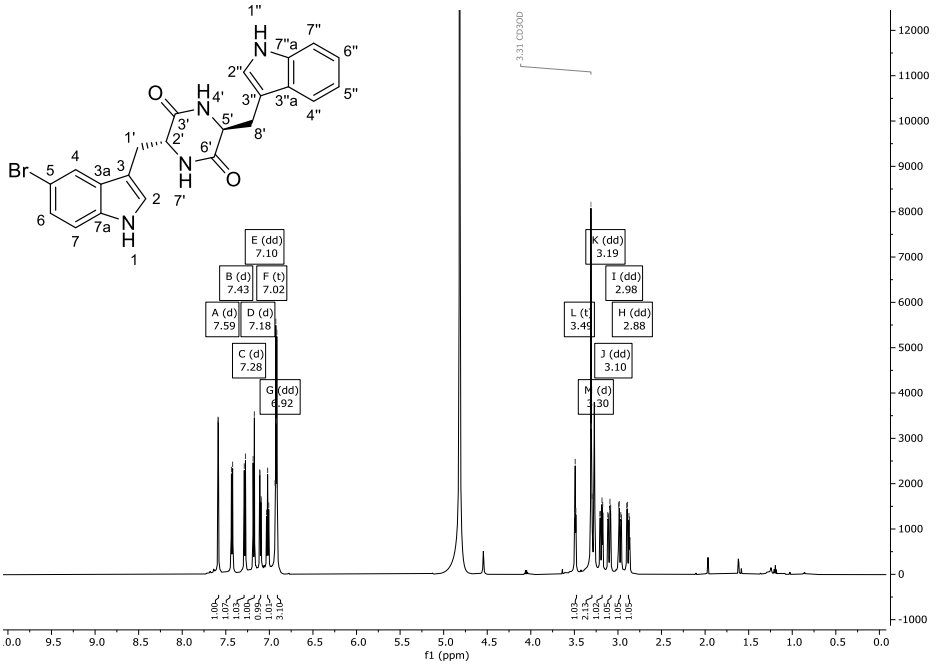


Abbildung 259: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **274** in CD_3OD.

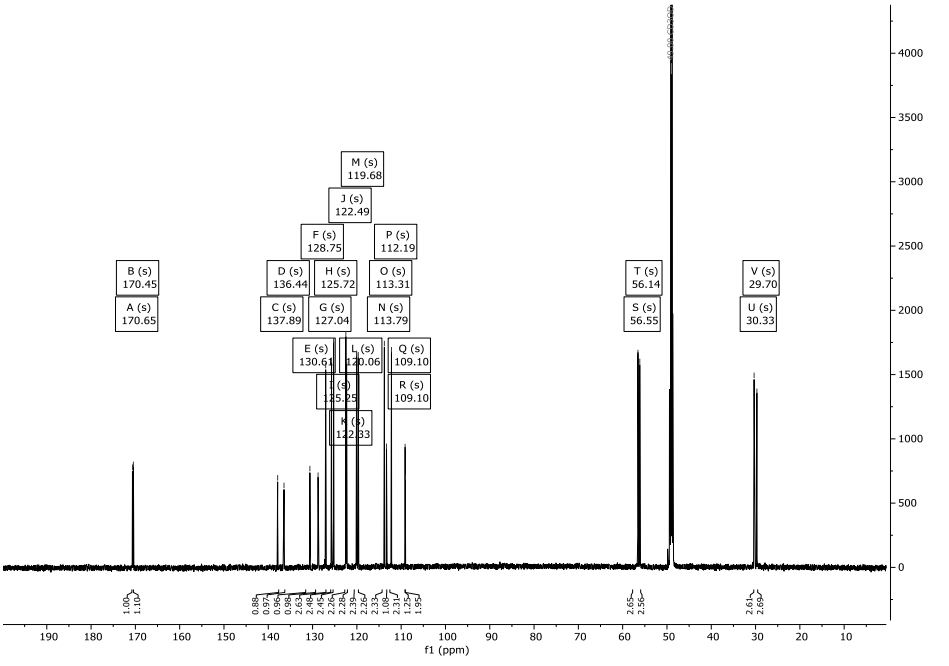


Abbildung 260: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **274** in CD_3OD.

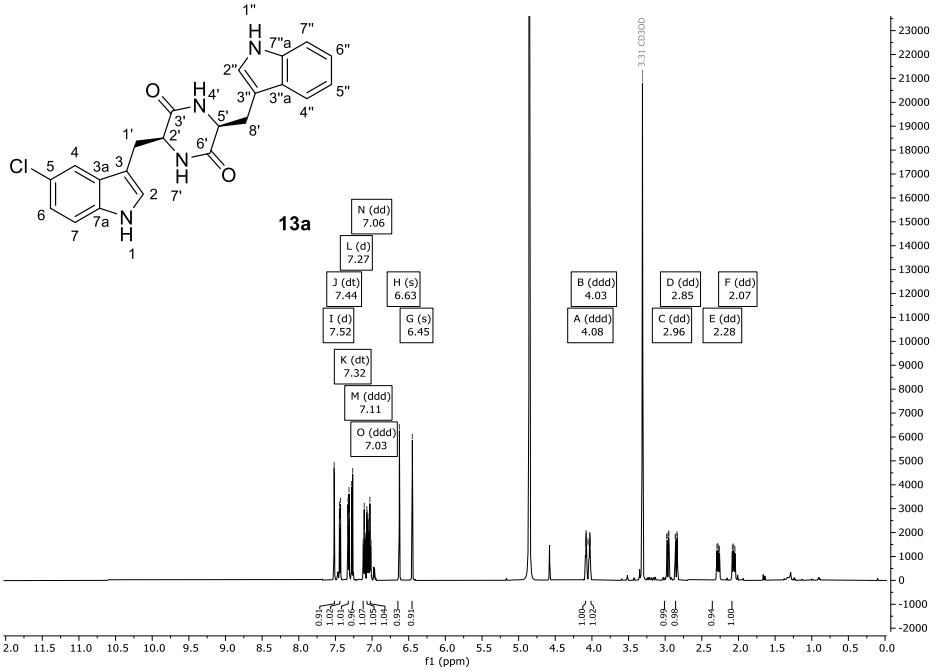


Abbildung 261: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **271** in CD_3OD.

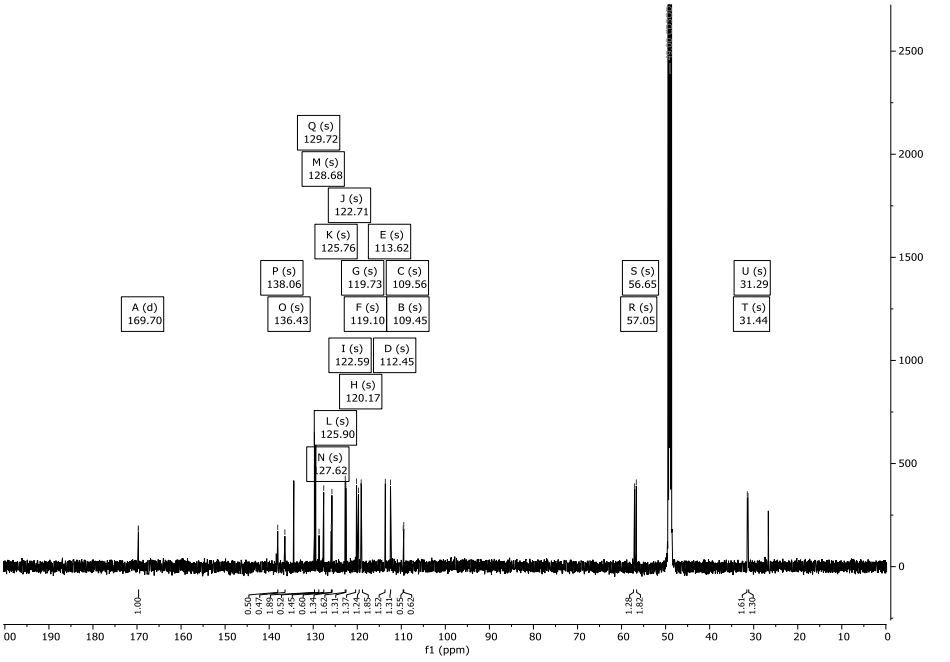


Abbildung 262: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **271** in CD_3OD.

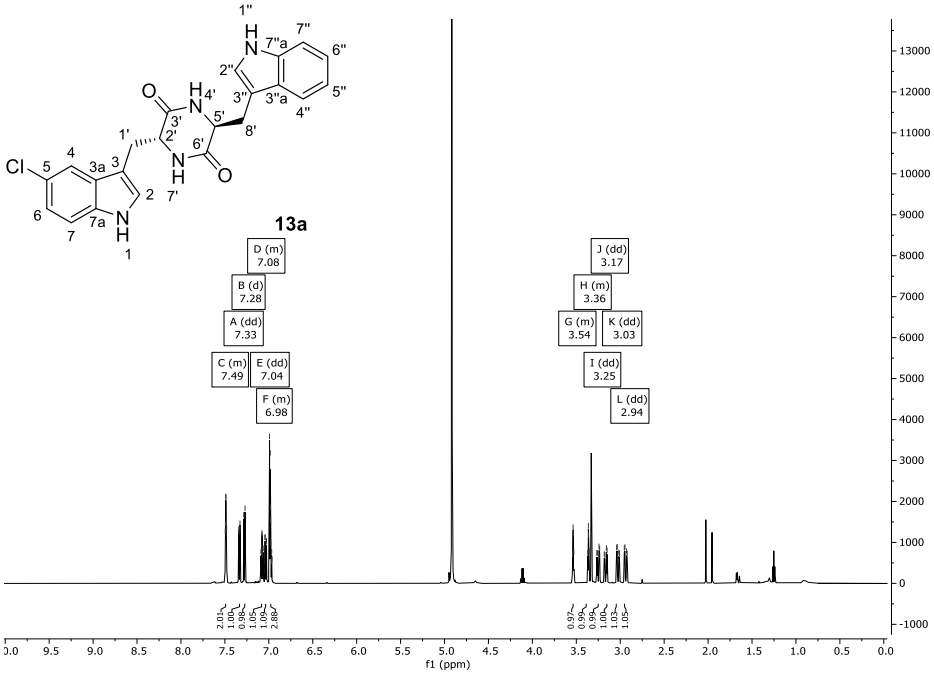


Abbildung 263: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **272** in CD_3OD.

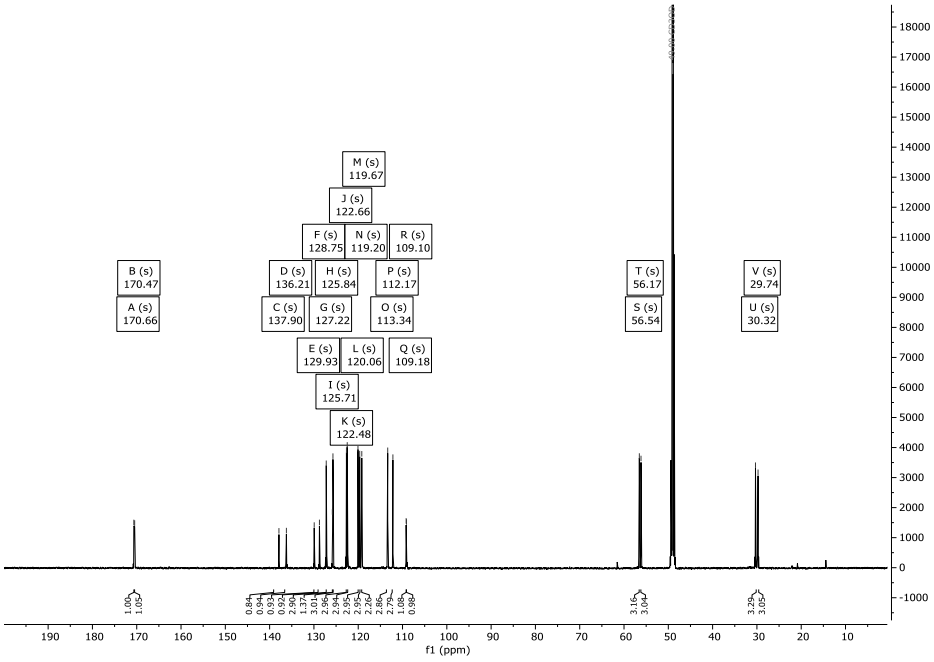


Abbildung 264: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **272** in CD_3OD.

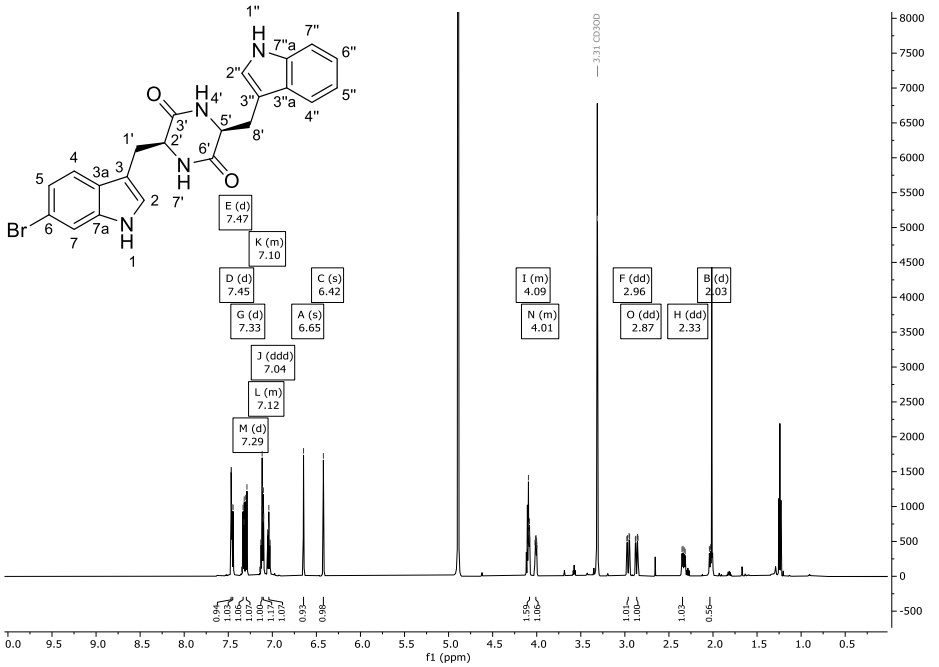


Abbildung 265: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **316** in CD_3OD.

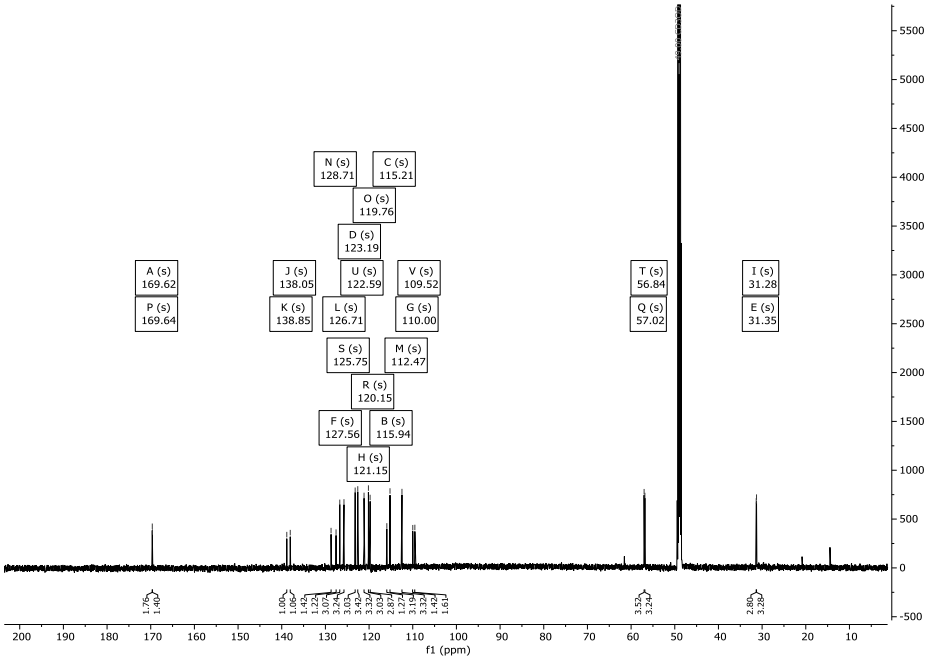


Abbildung 266: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **316** in CD_3OD.

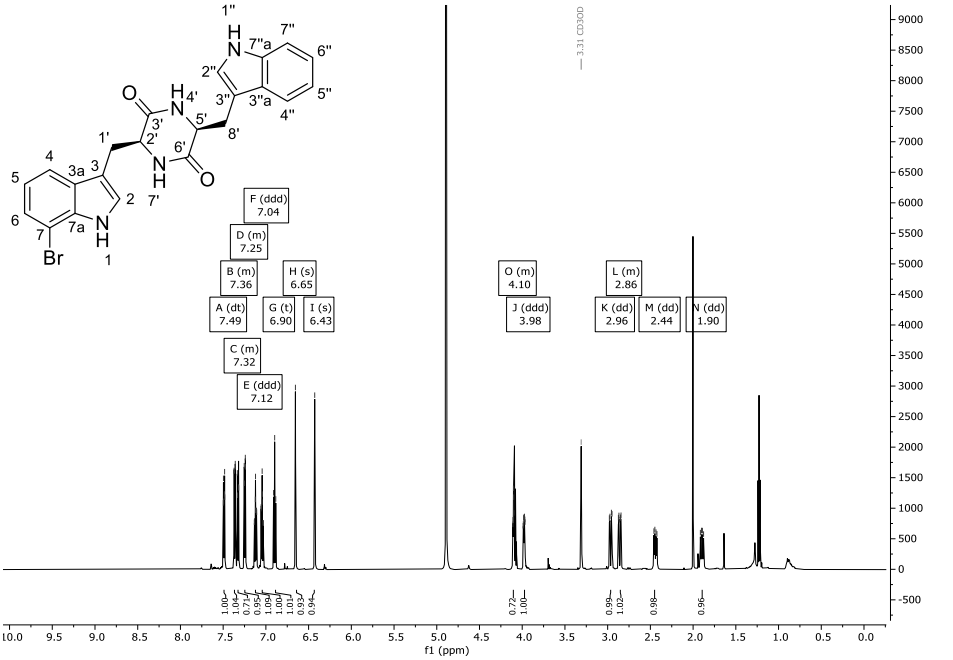


Abbildung 267: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **318** in CD_3OD.

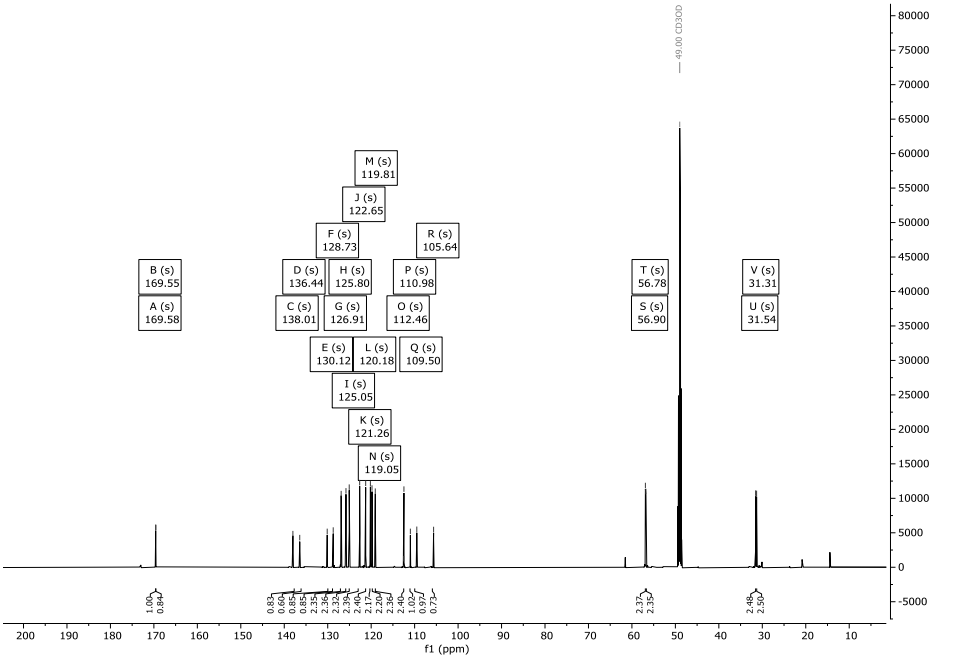


Abbildung 268: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **318** in CD_3OD.

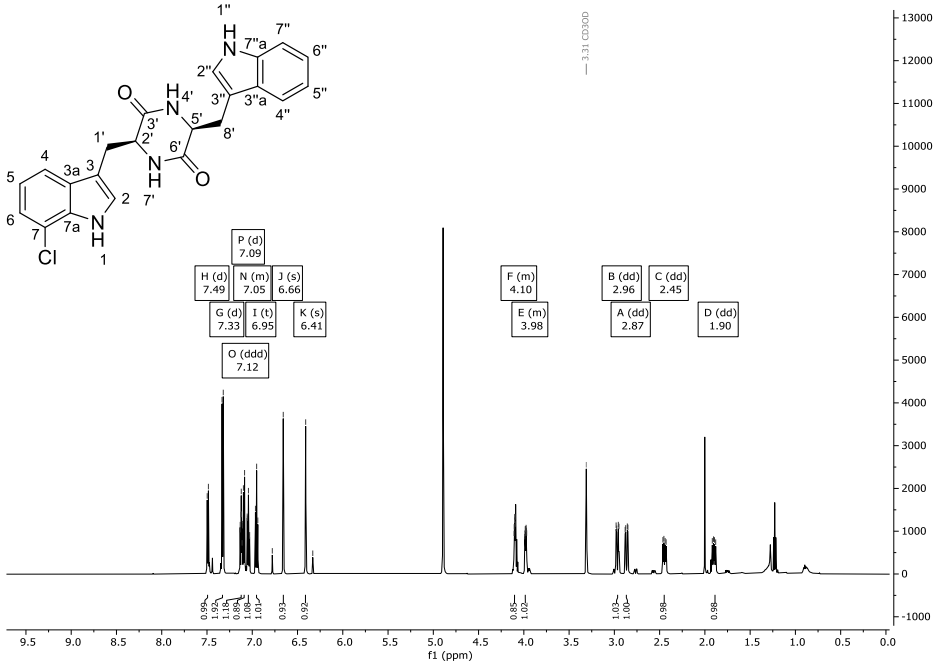


Abbildung 269: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **320** in CD_3OD.

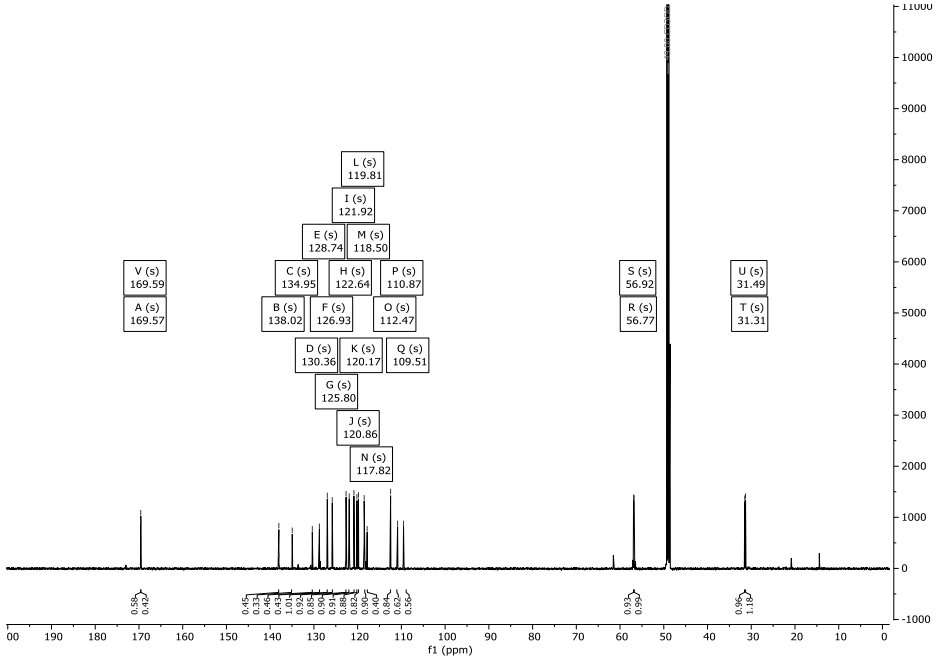


Abbildung 270: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **320** in CD_3OD.

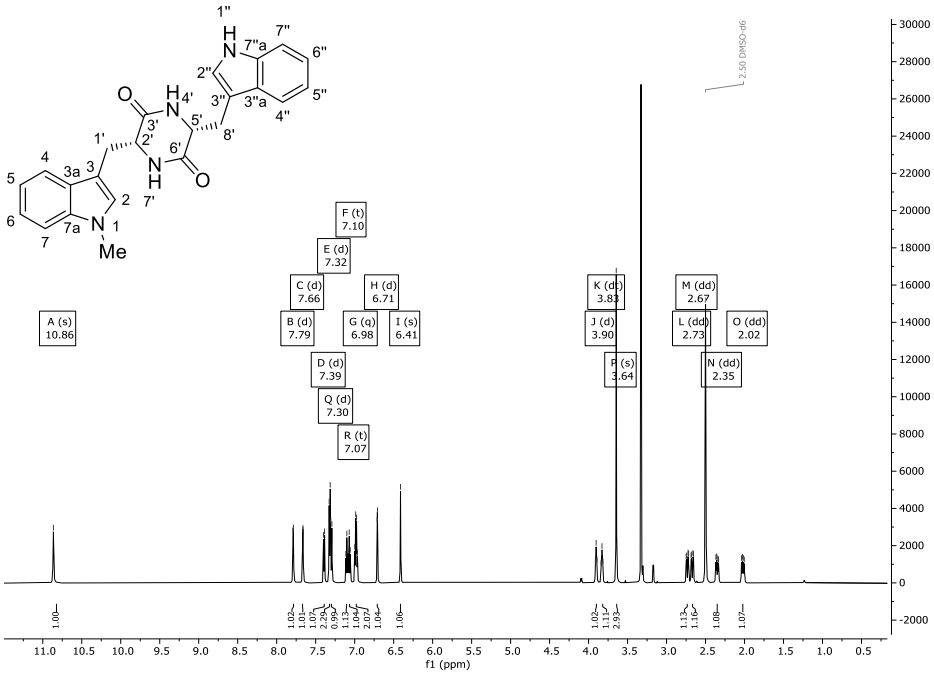


Abbildung 271: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **346** in d_6-DMSO

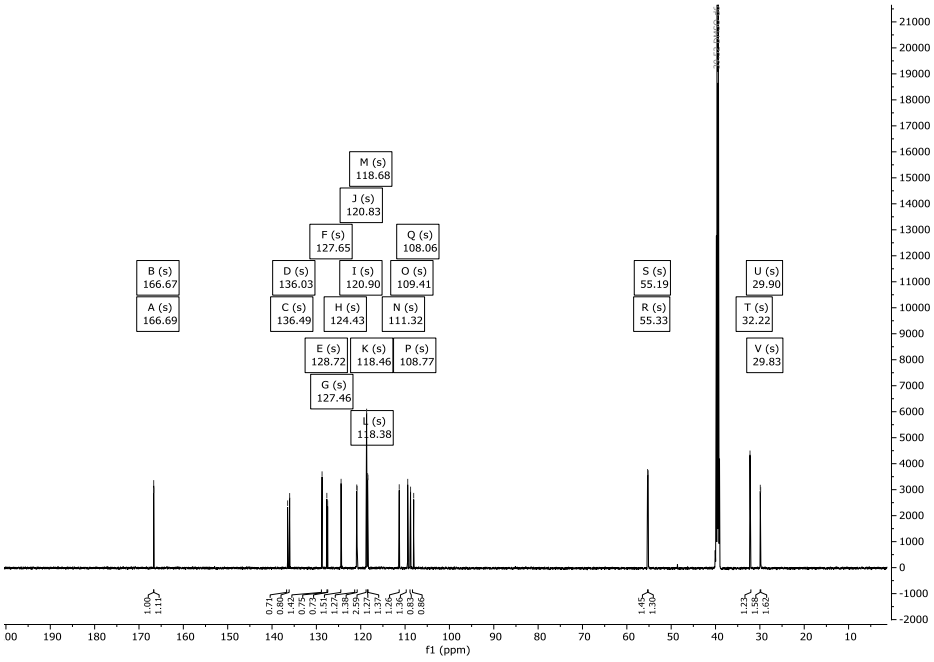


Abbildung 272: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **346** in d6-DMSO.

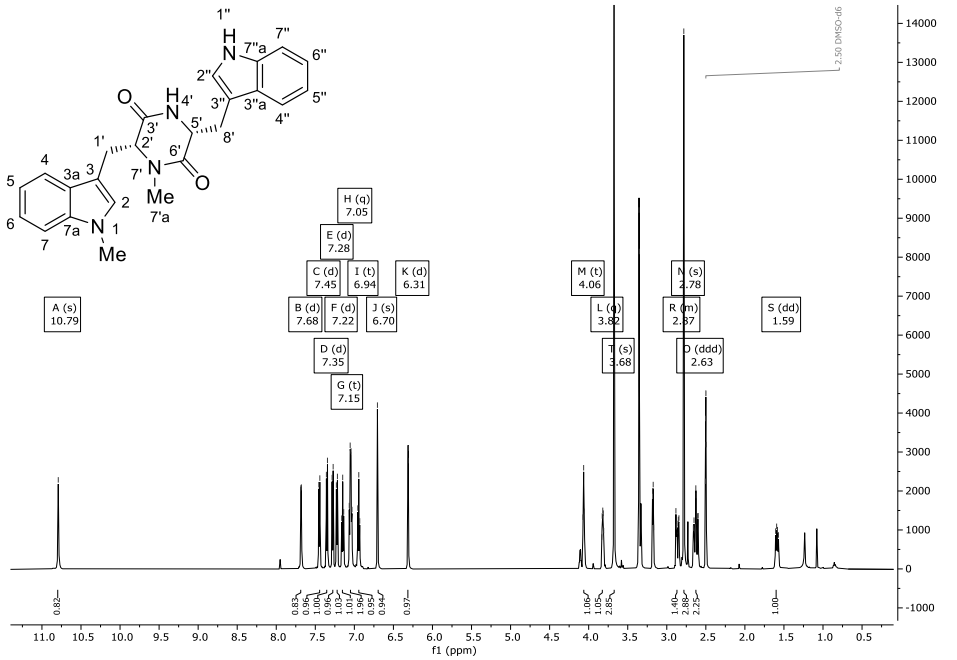


Abbildung 273: [1]H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **347** in d_6-DMSO.

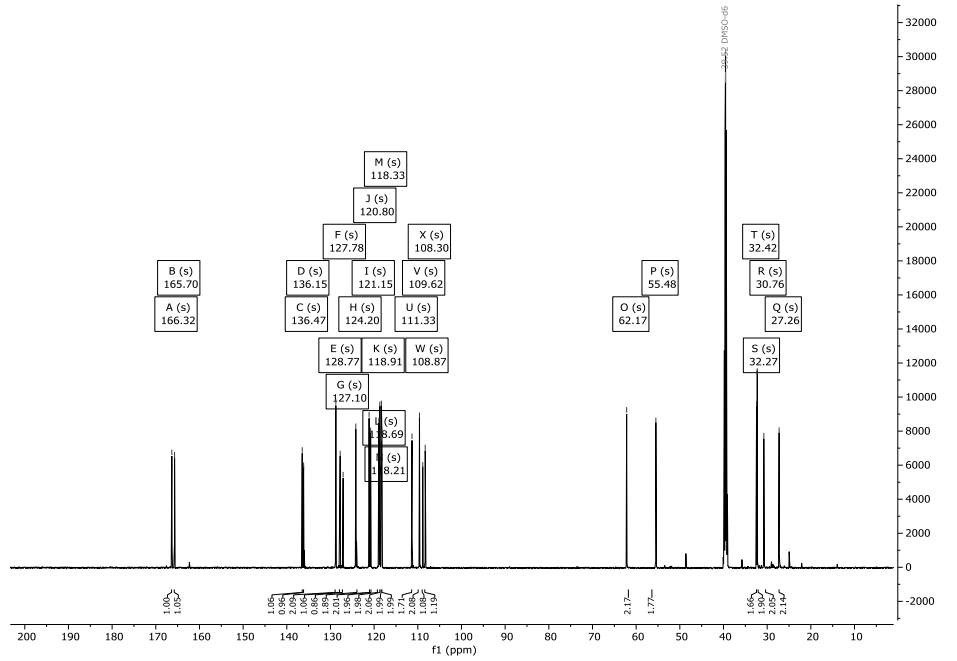


Abbildung 274: [13]C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **347** in d_6-DMSO.

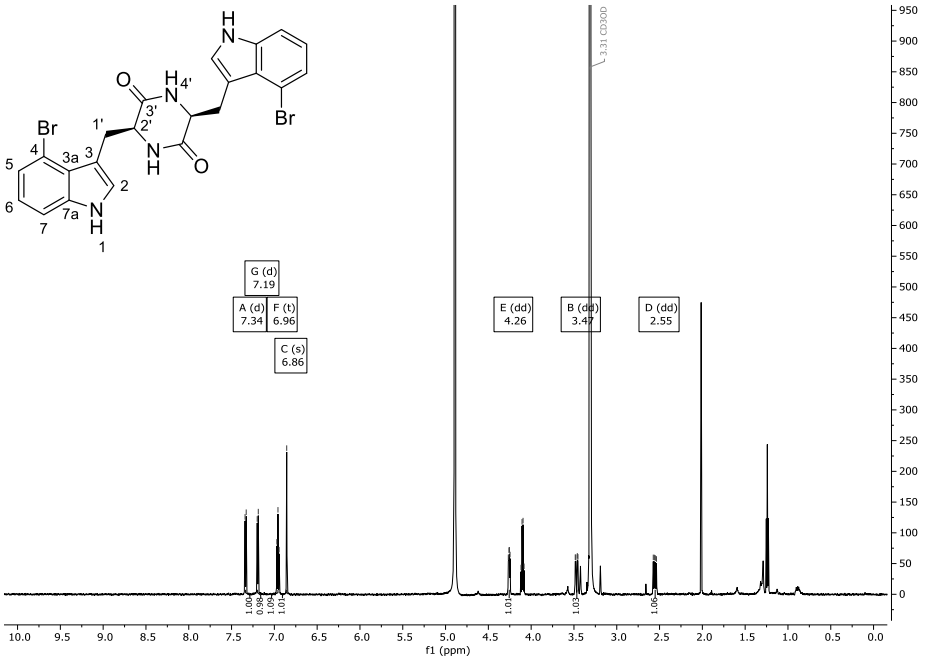


Abbildung 275: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **314** in CD_3OD.

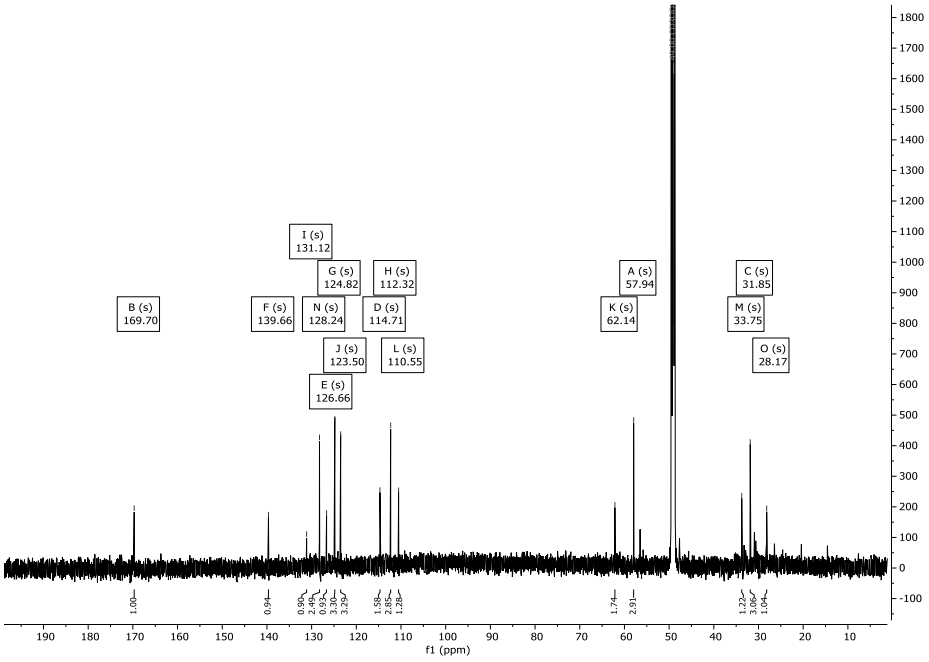


Abbildung 276: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **314** in CD_3OD.

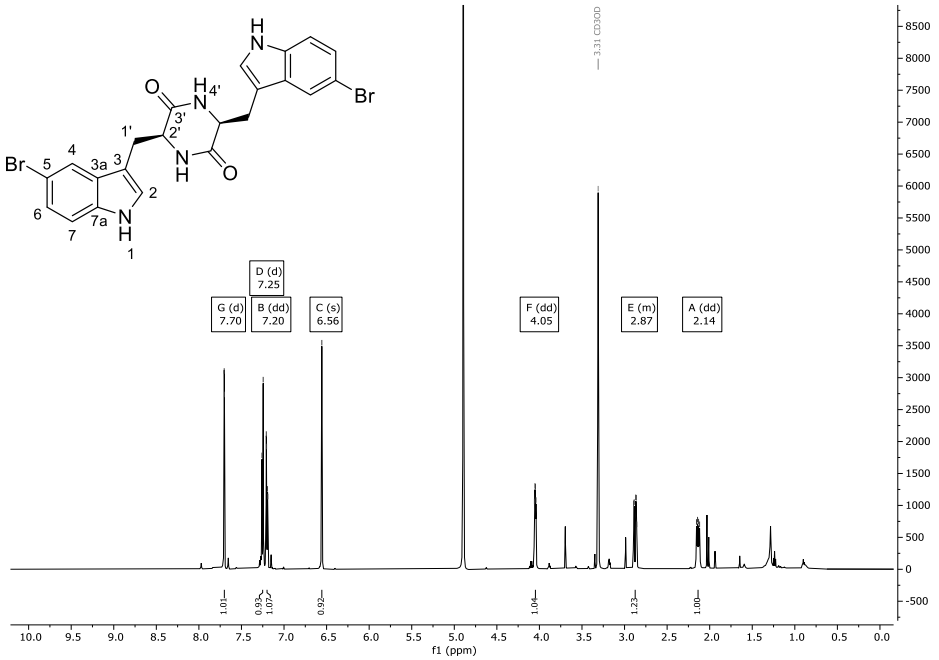


Abbildung 277: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **315** in CD_3OD.

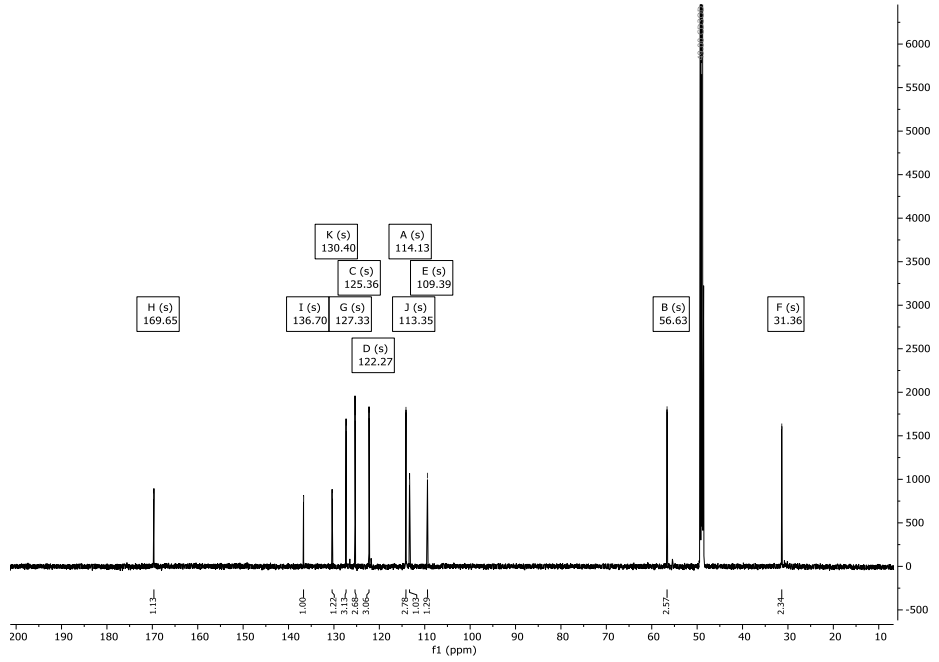


Abbildung 278: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **315** in CD_3OD.

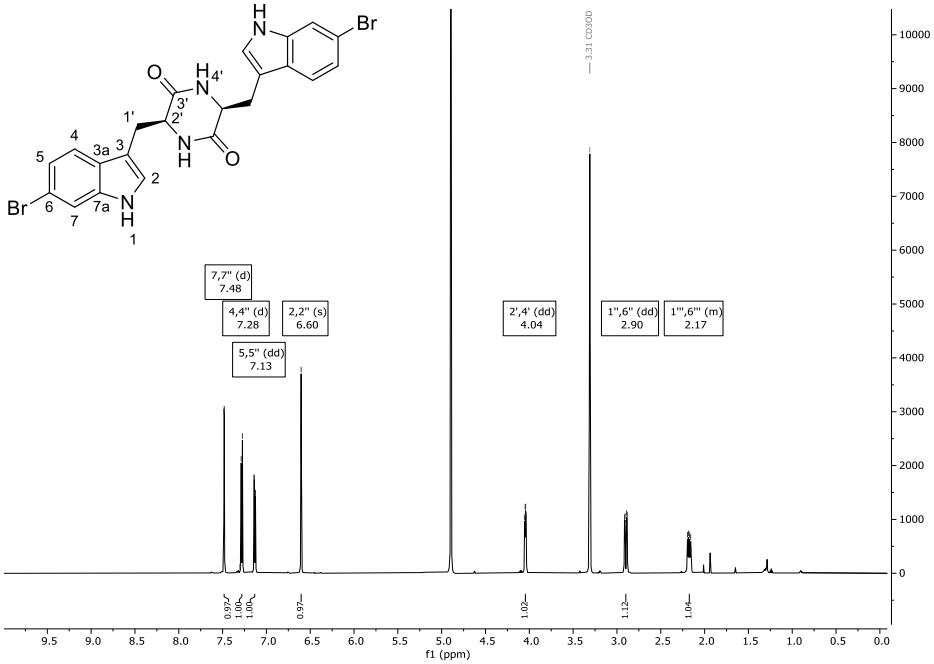


Abbildung 279: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **317** in CD_3OD.

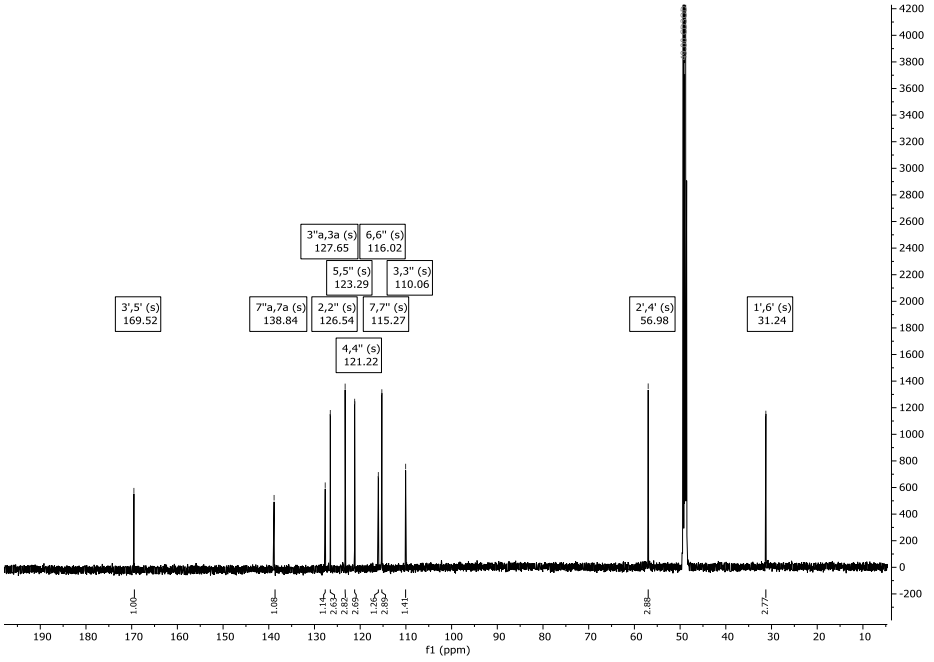


Abbildung 280: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **317** in CD_3OD.

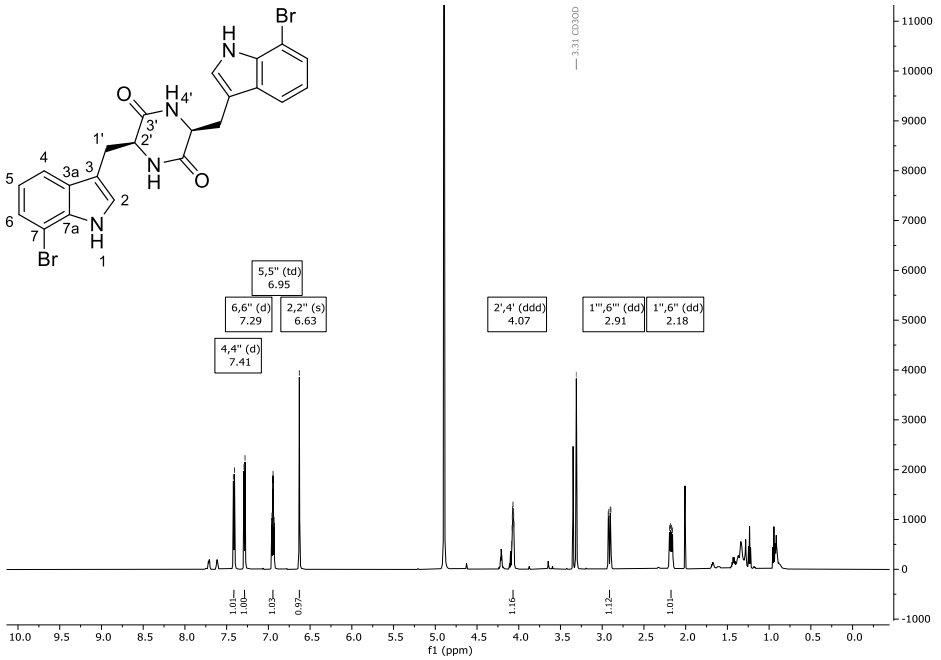


Abbildung 281: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **319** in CD_3OD.

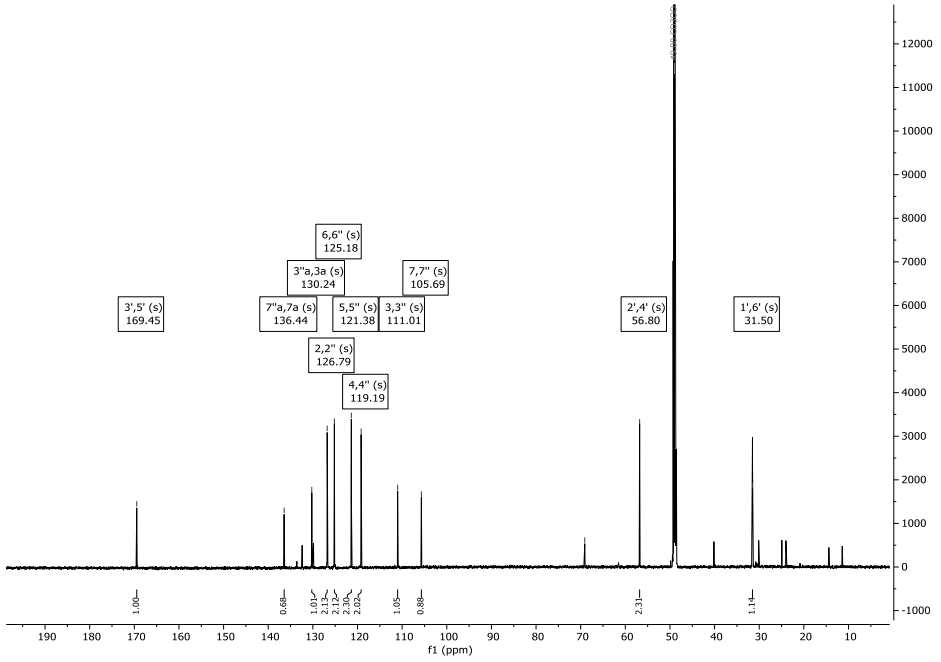


Abbildung 282: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **319** in CD_3OD.

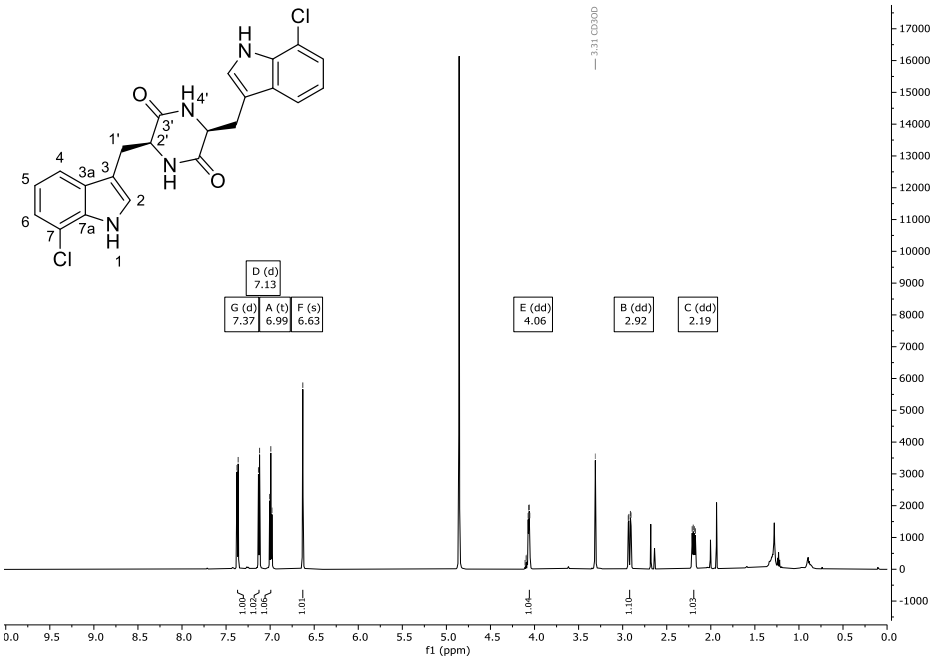


Abbildung 283: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **321** in CD_3OD.

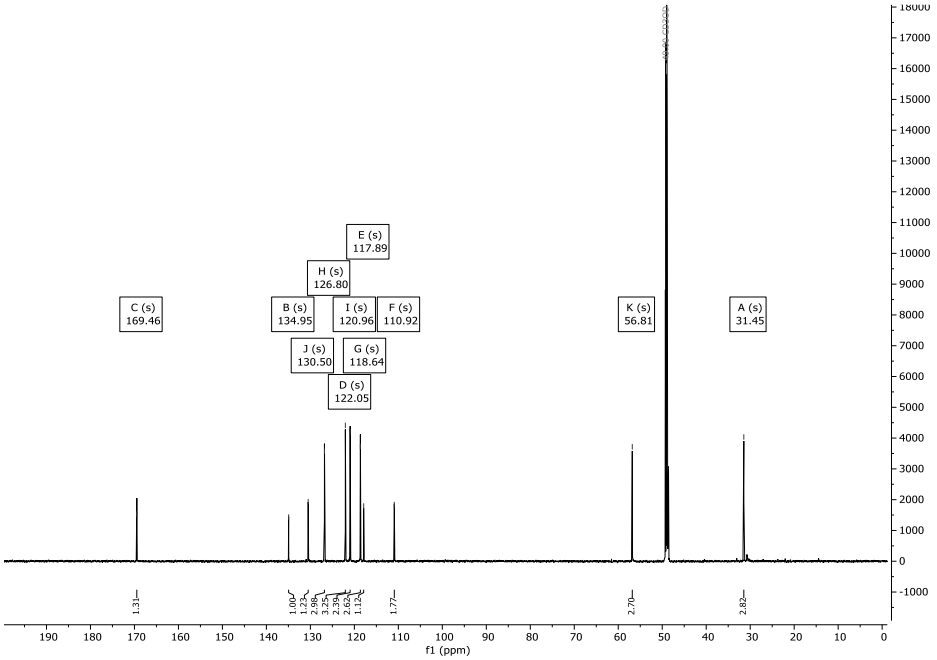


Abbildung 284: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **321** in CD_3OD.

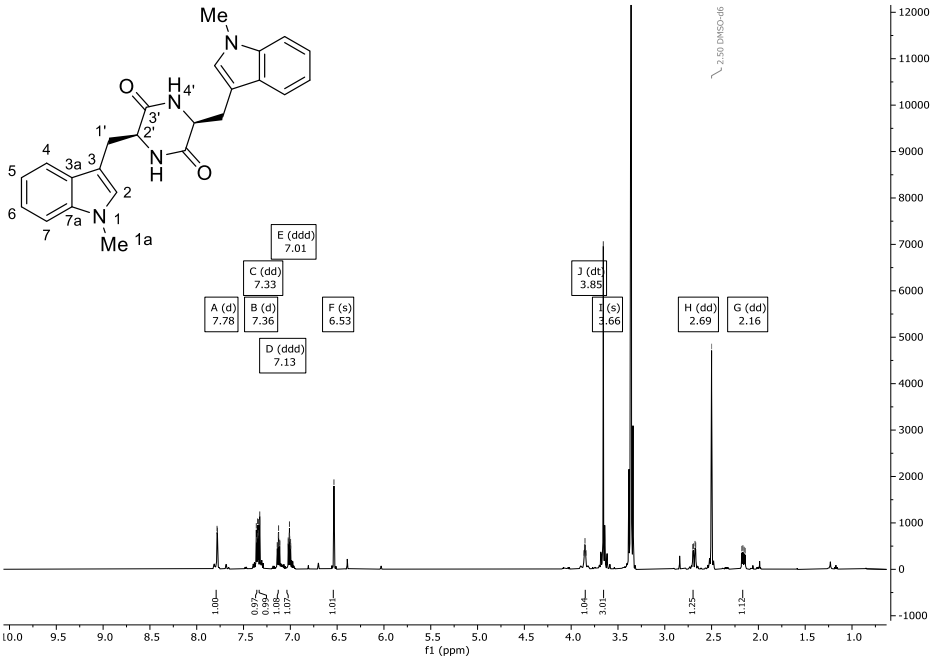


Abbildung 285: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **264** in d_6-DMSO.

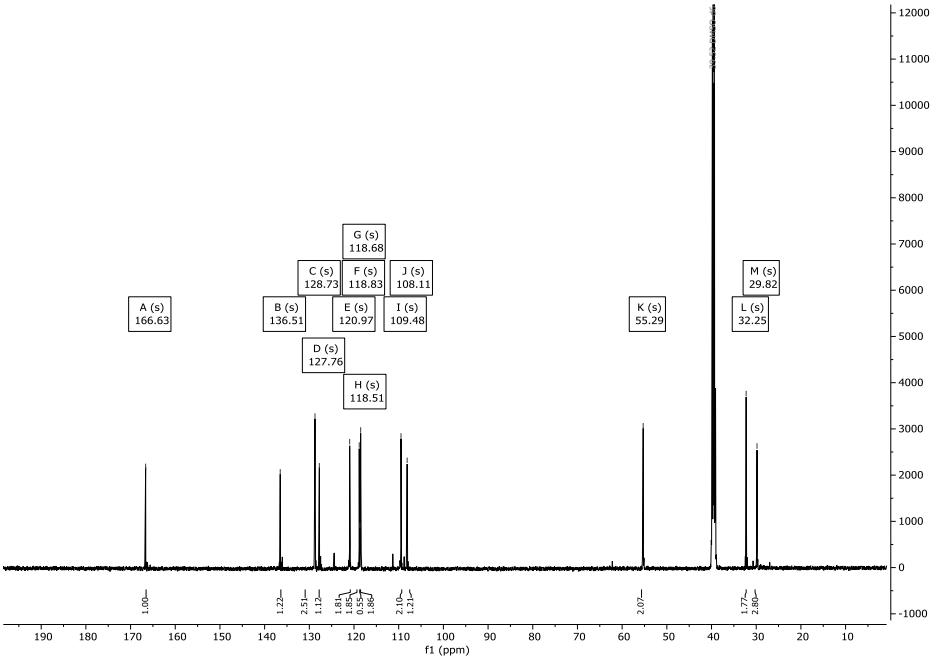


Abbildung 286: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **264** in d_6-DMSO.

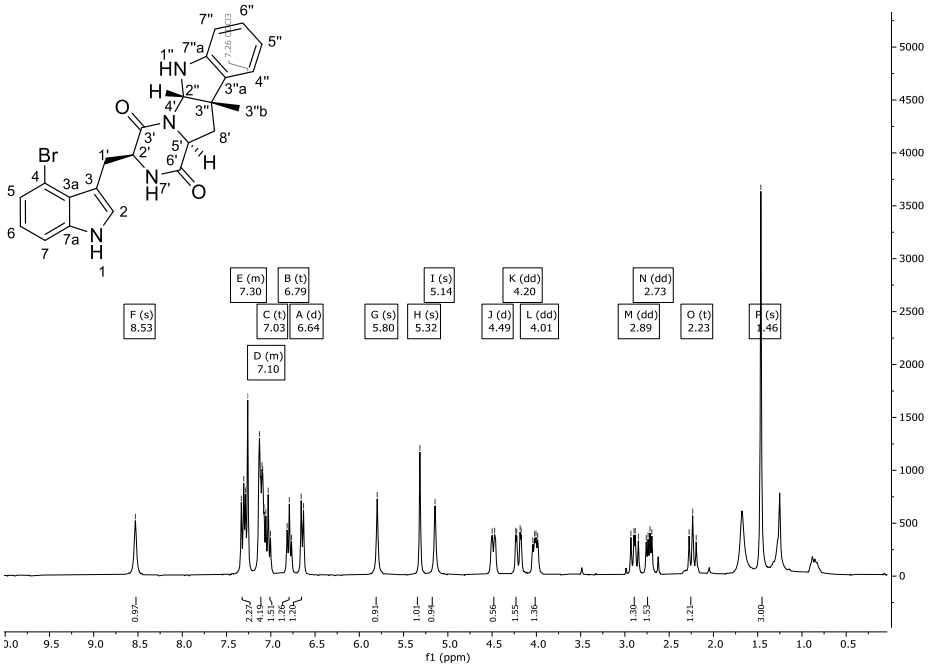


Abbildung 287: ^{1}H-NMR-Spektrum (300 MHz) von Verbindung **331** in $CDCl_3$.

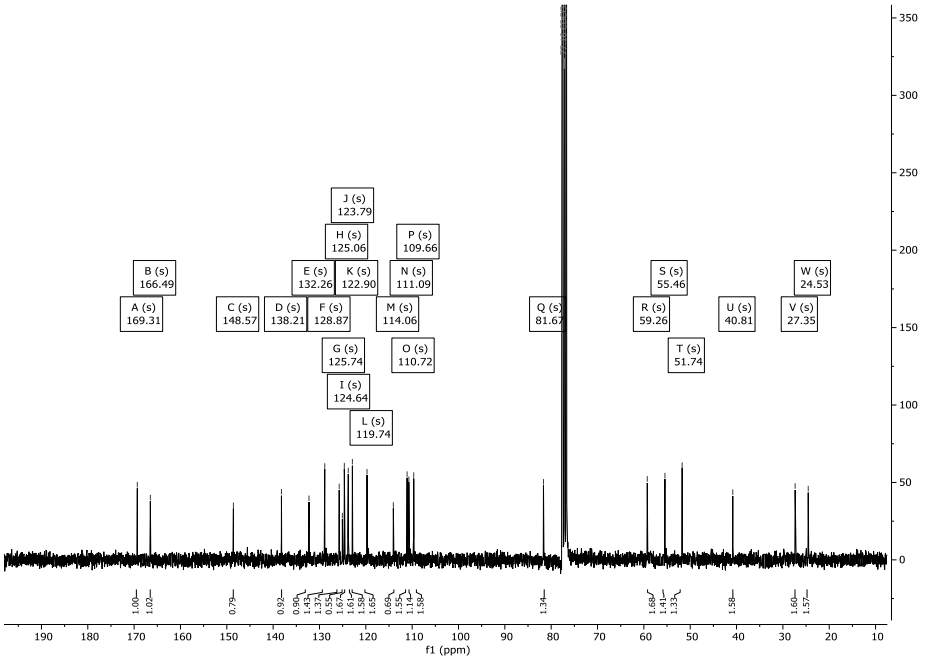


Abbildung 288: ^{13}C-NMR-Spektrum (76 MHz) von Verbindung **331** in $CDCl_3$.

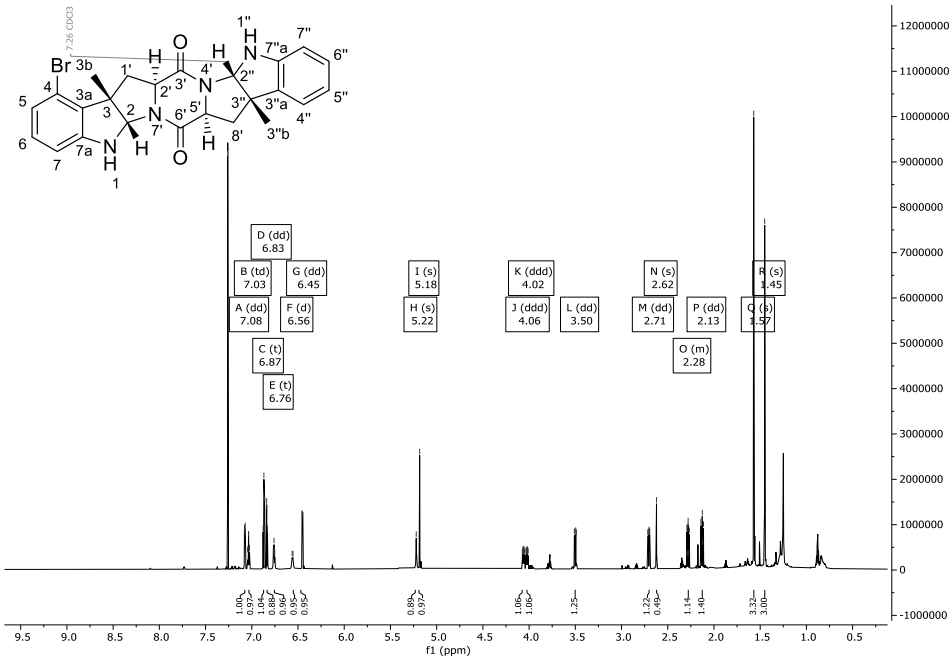


Abbildung 289: ^{1}H-NMR-Spektrum (900 MHz) von Verbindung **322** in $CDCl_3$.

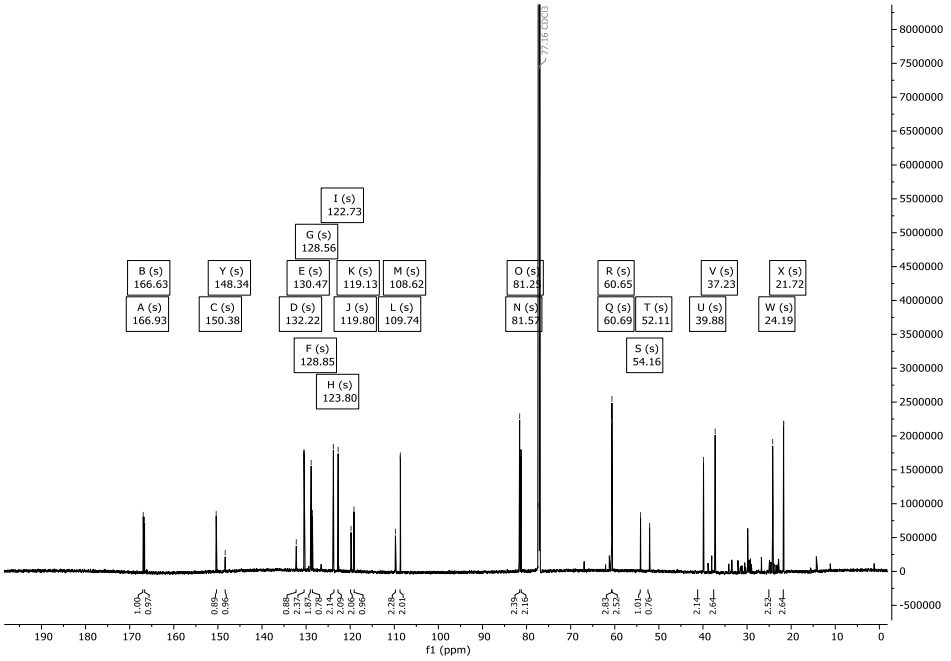


Abbildung 290: ^{13}C-NMR-Spektrum (226 MHz) von Verbindung **322** in $CDCl_3$.

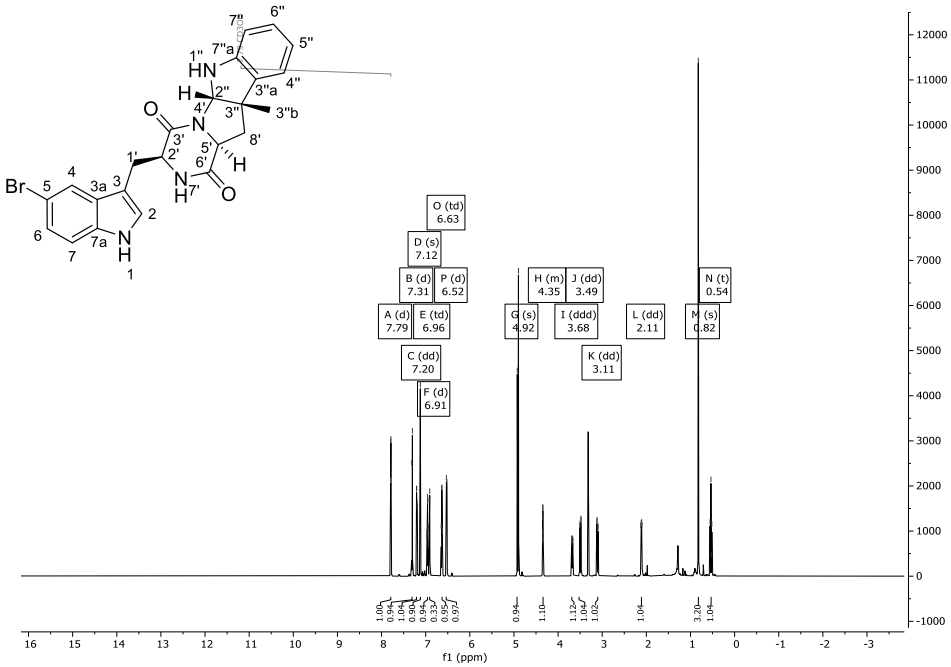


Abbildung 291: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **288** in CD_3OD.

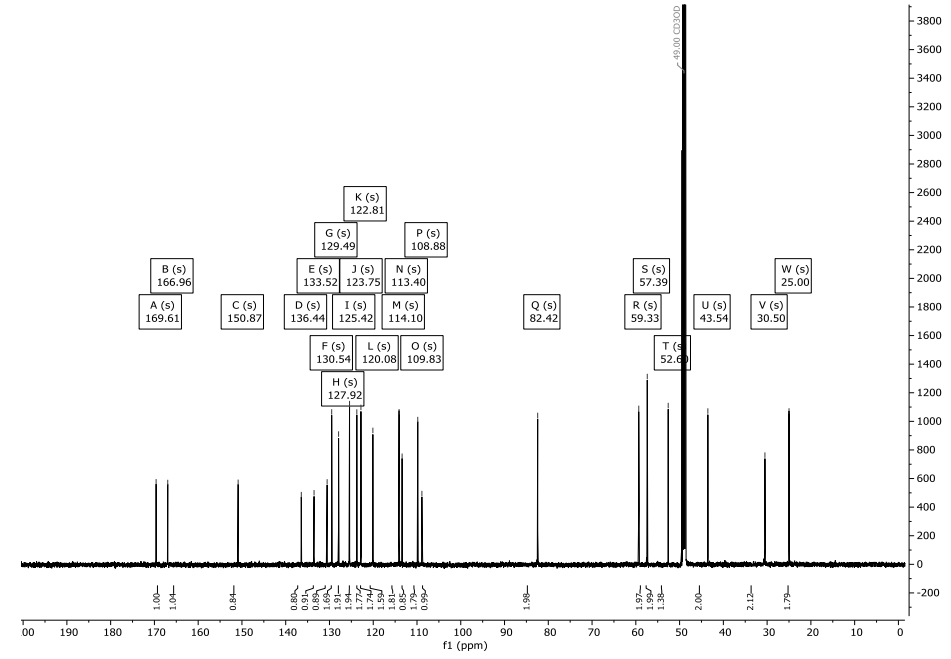


Abbildung 292: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **288** in CD_3OD.

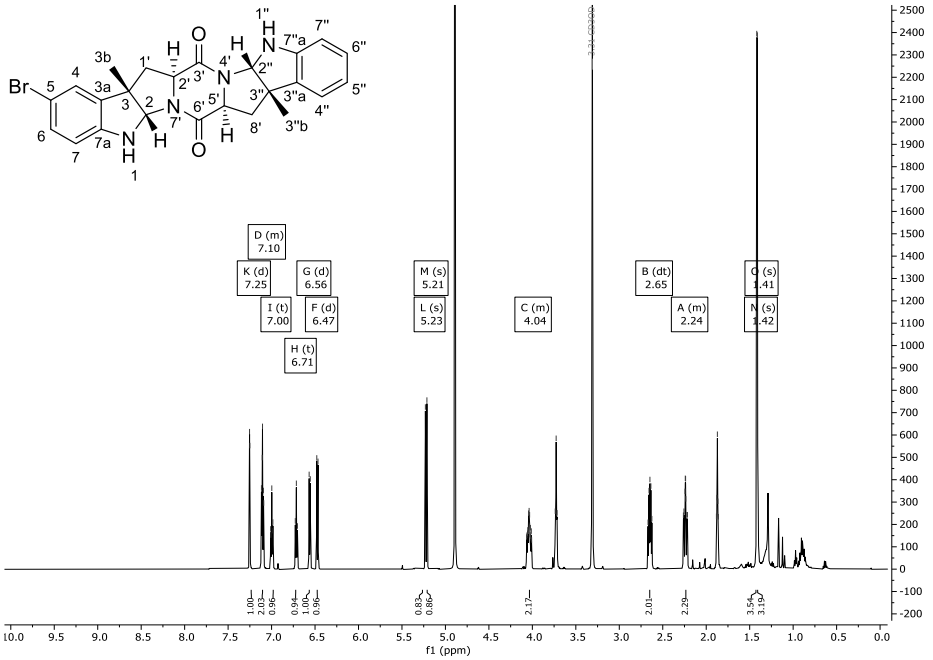


Abbildung 293: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **284** in CD_3OD.

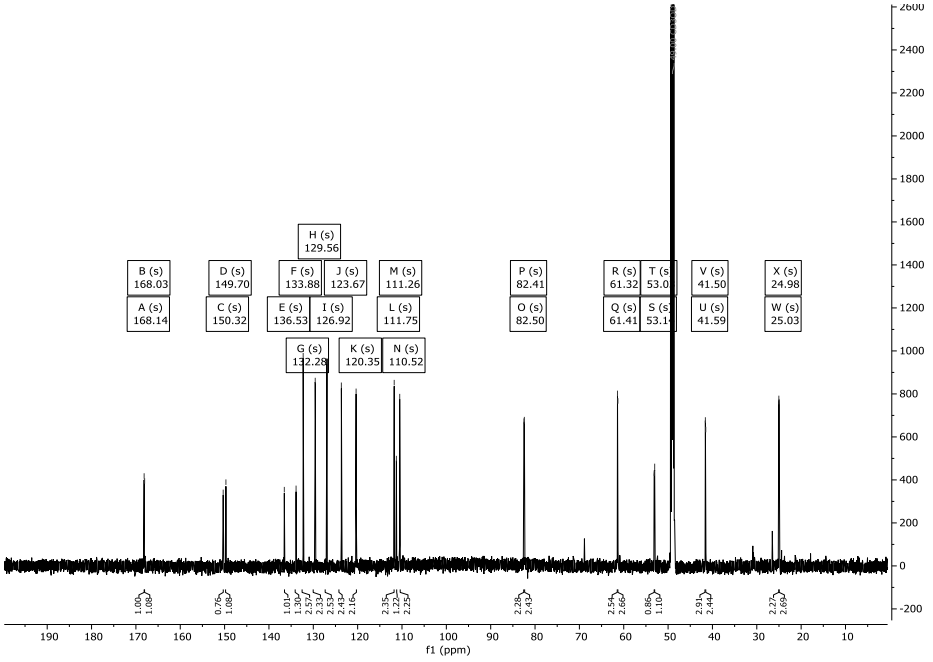


Abbildung 294: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **284** in CD_3OD.

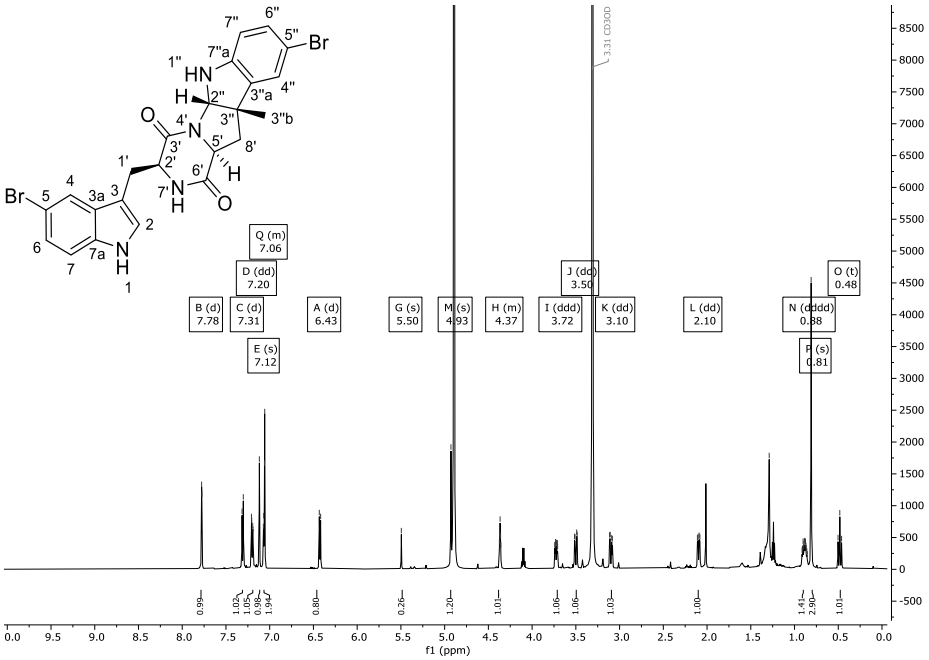


Abbildung 295: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **333** in CD_3OD.

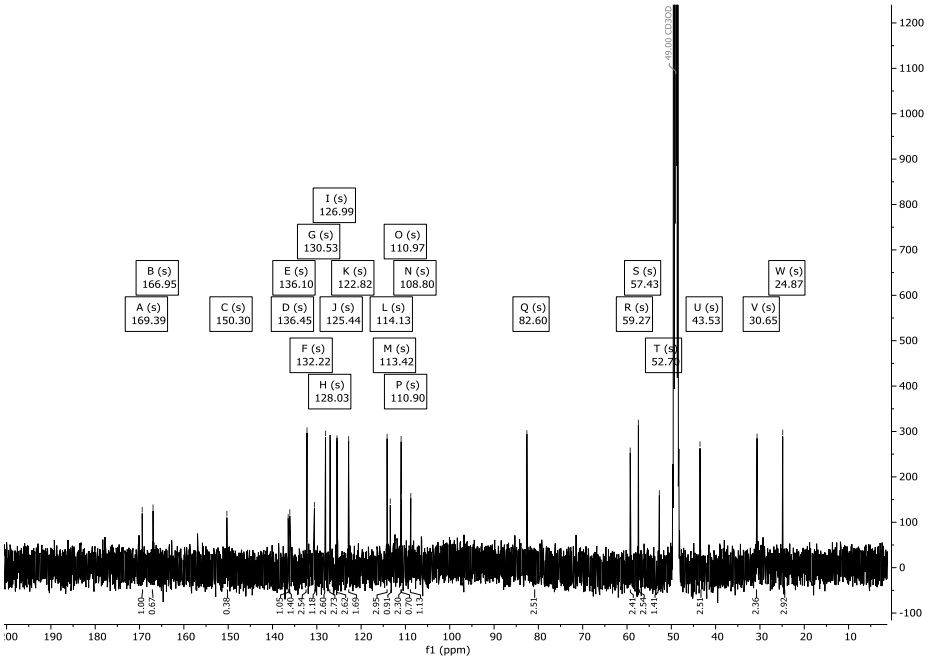


Abbildung 296: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **333** in CD_3OD.

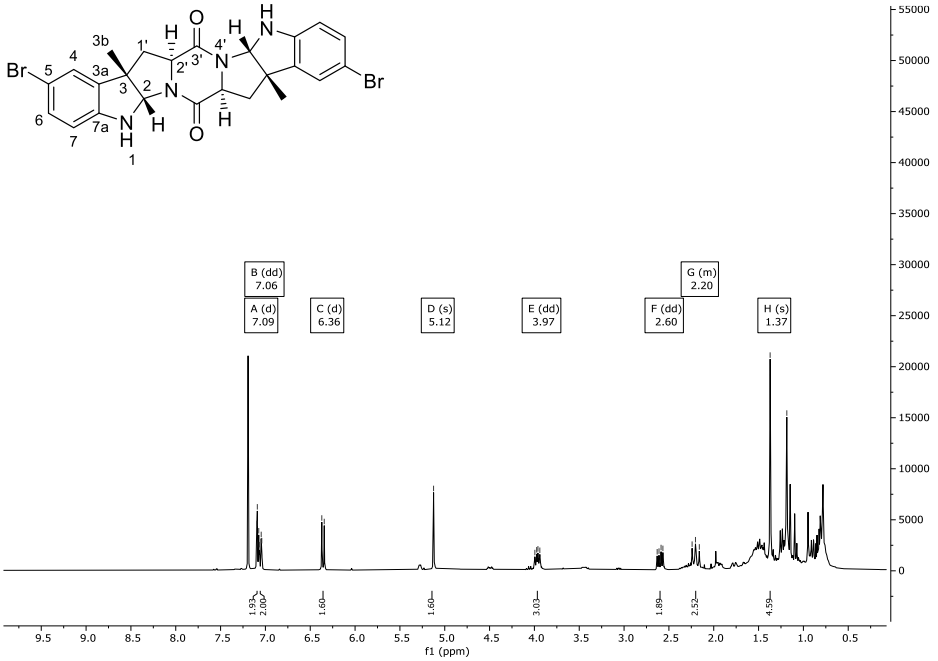


Abbildung 297: ^{1}H-NMR-Spektrum (300 MHz) von Verbindung **324** in $CDCl_3$.

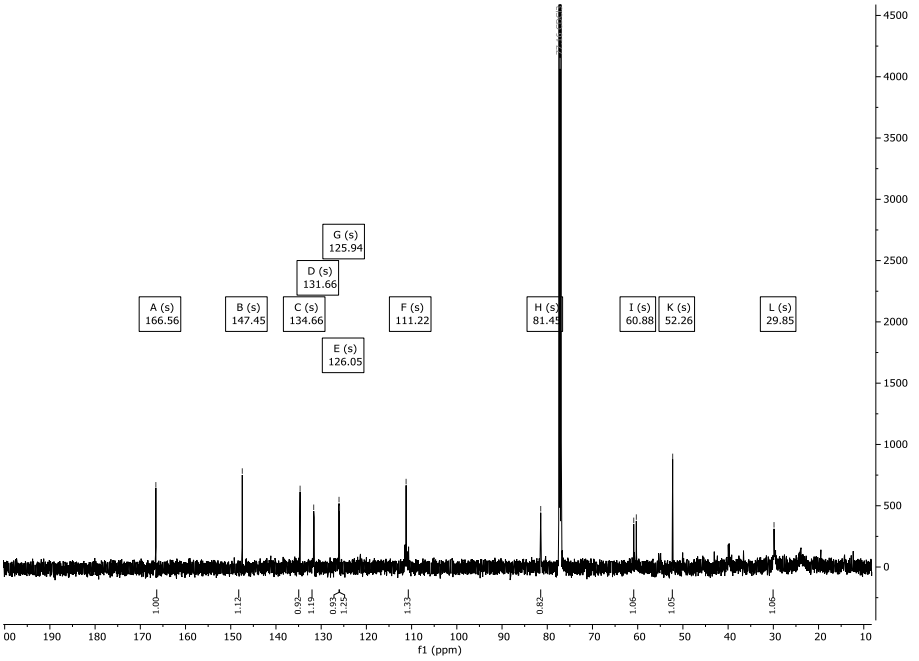


Abbildung 298: ^{13}C-NMR-Spektrum (76 MHz) von Verbindung **324** in $CDCl_3$.

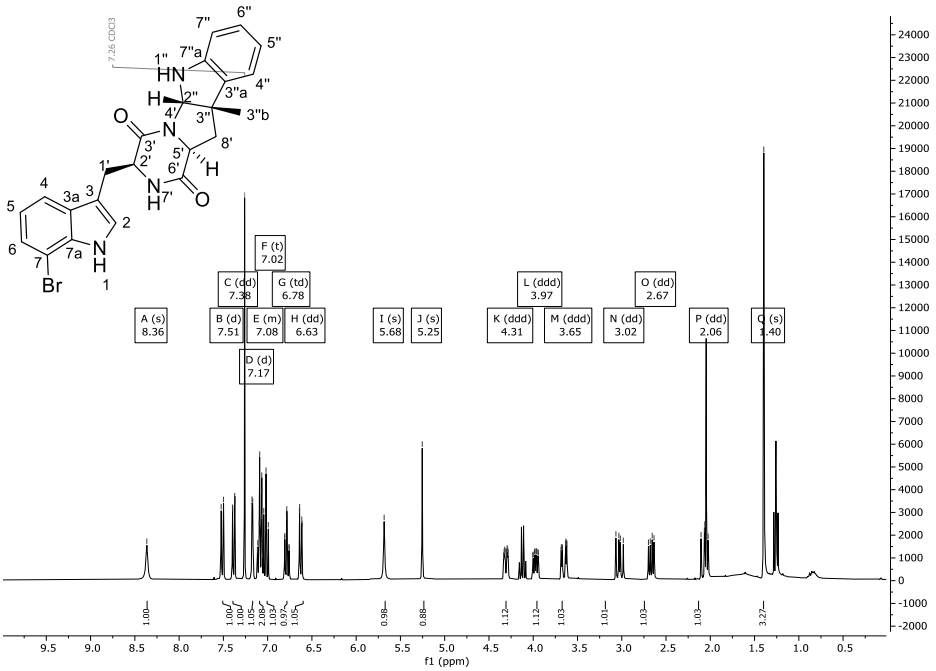


Abbildung 299: ^{1}H-NMR-Spektrum (900 MHz) von Verbindung **332** in $CDCl_3$.

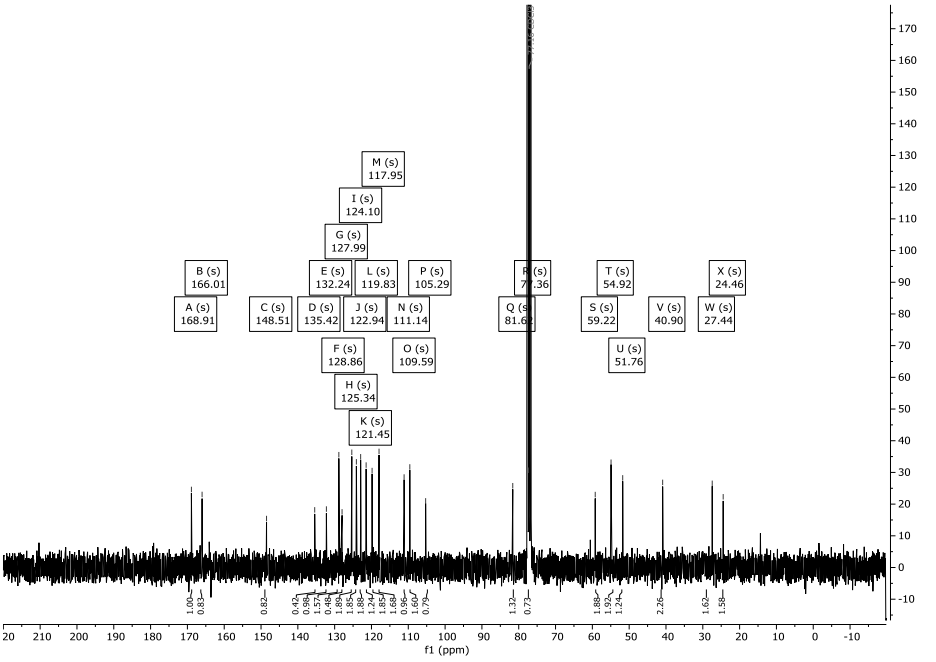


Abbildung 300: ^{13}C-NMR-Spektrum (226 MHz) von Verbindung **332** in $CDCl_3$.

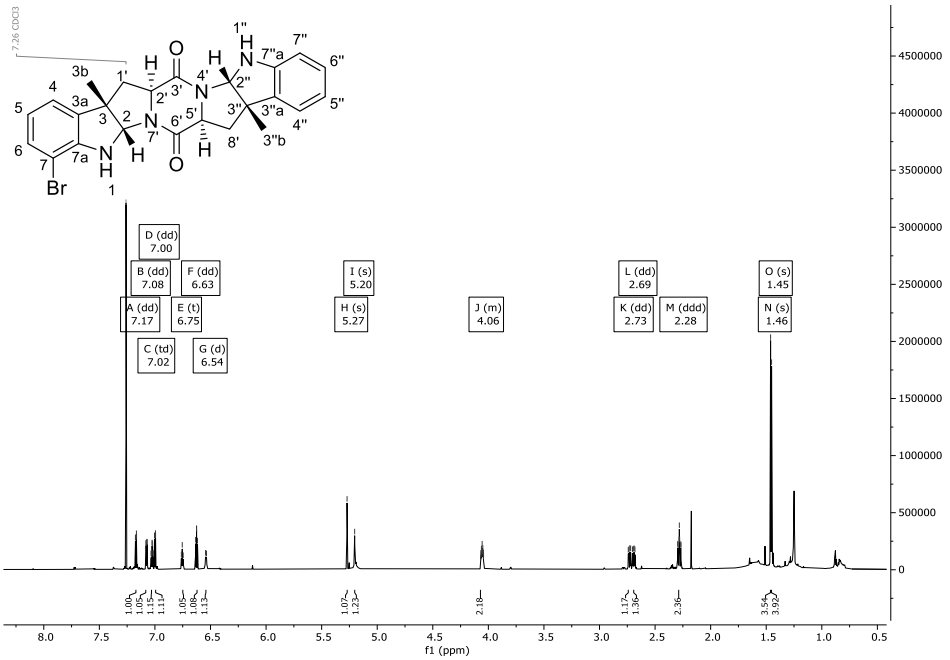


Abbildung 301: ^{1}H-NMR-Spektrum (900 MHz) von Verbindung **327** in $CDCl_3$.

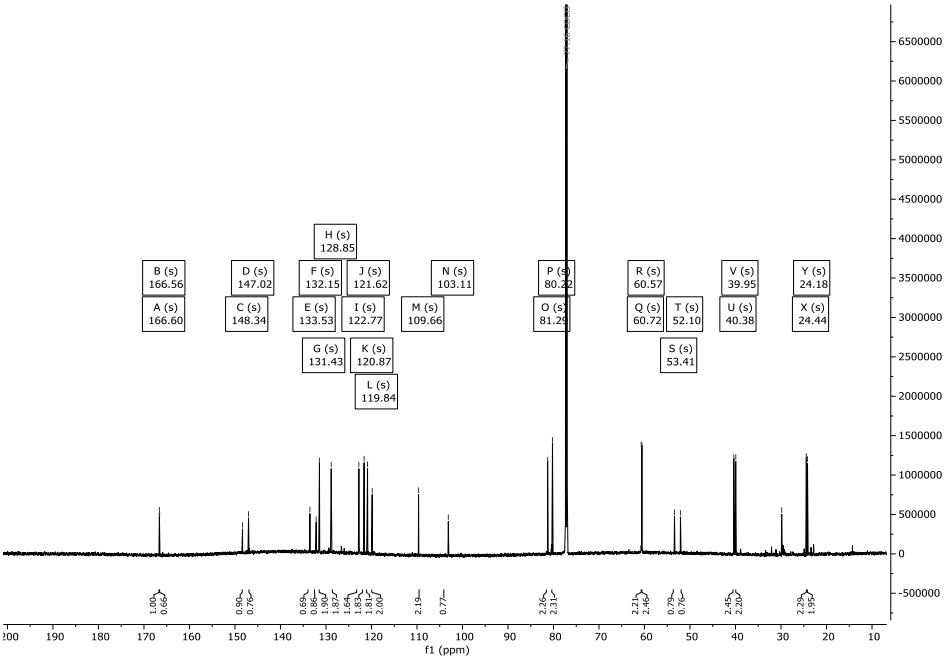


Abbildung 302: ^{13}C-NMR-Spektrum (226 MHz) von Verbindung **327** in $CDCl_3$.

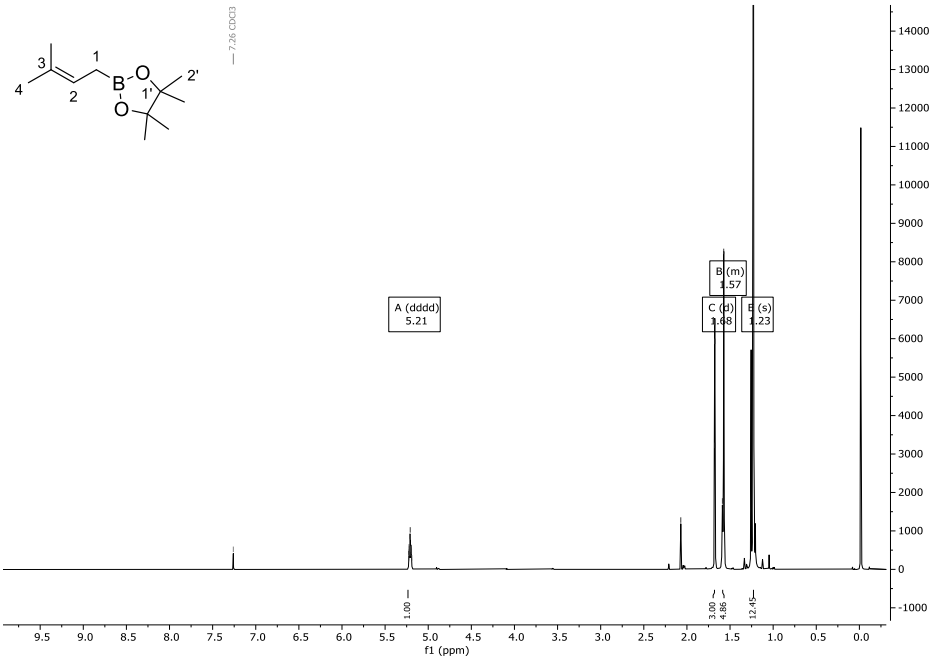


Abbildung 303: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **49** in $CDCl_3$.

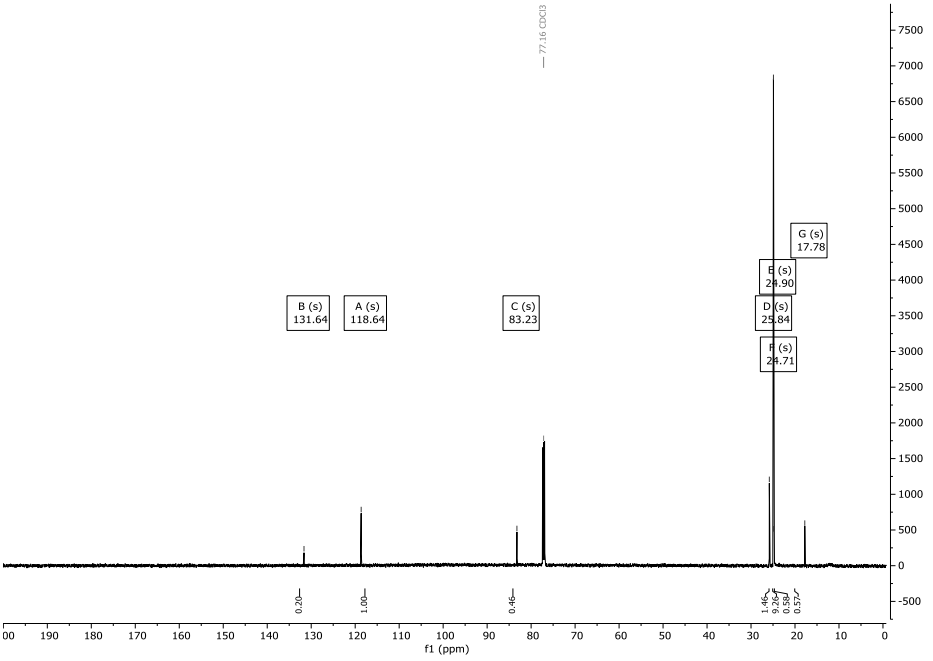


Abbildung 304: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **49** in $CDCl_3$.

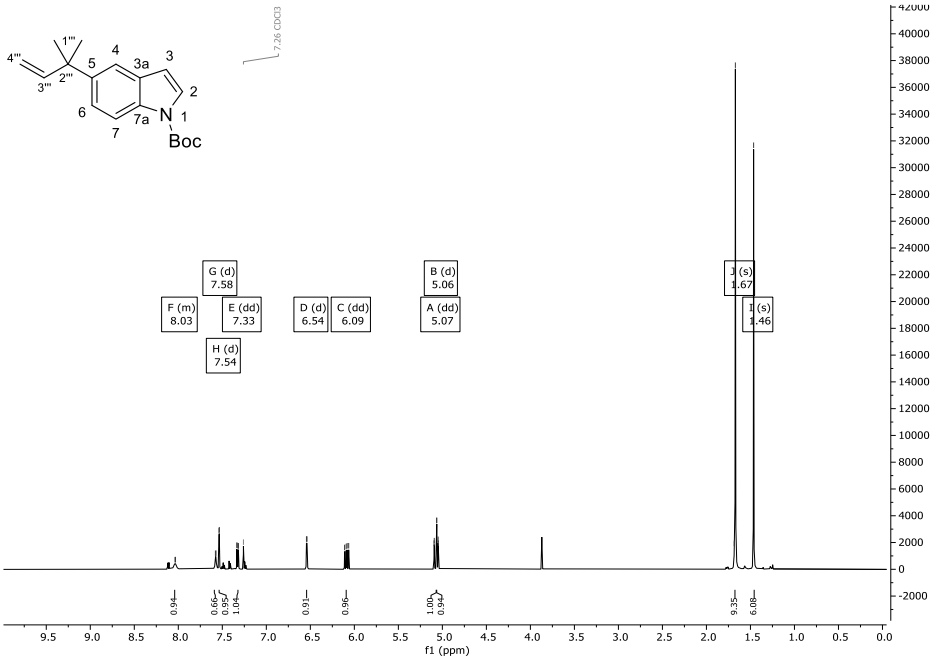


Abbildung 305: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **277** in $CDCl_3$.

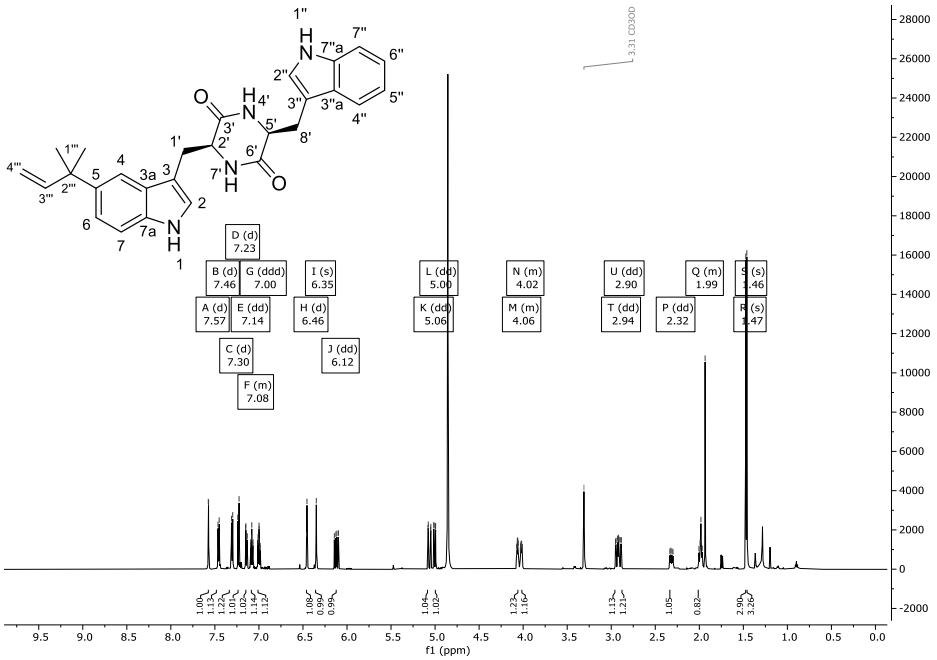


Abbildung 306: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **263** in CD_3OD.

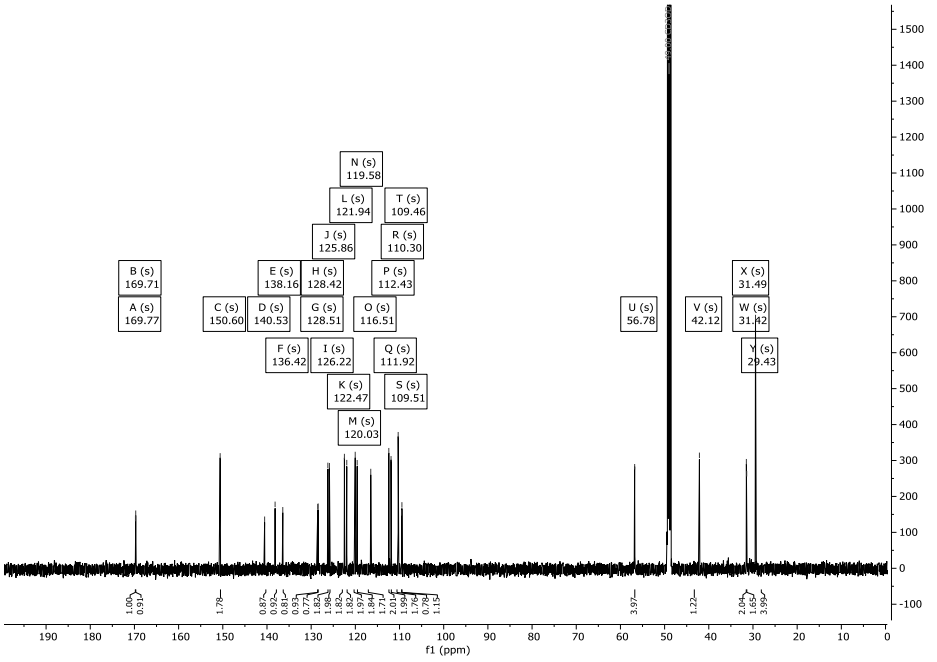


Abbildung 307: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **263** in CD_3OD.

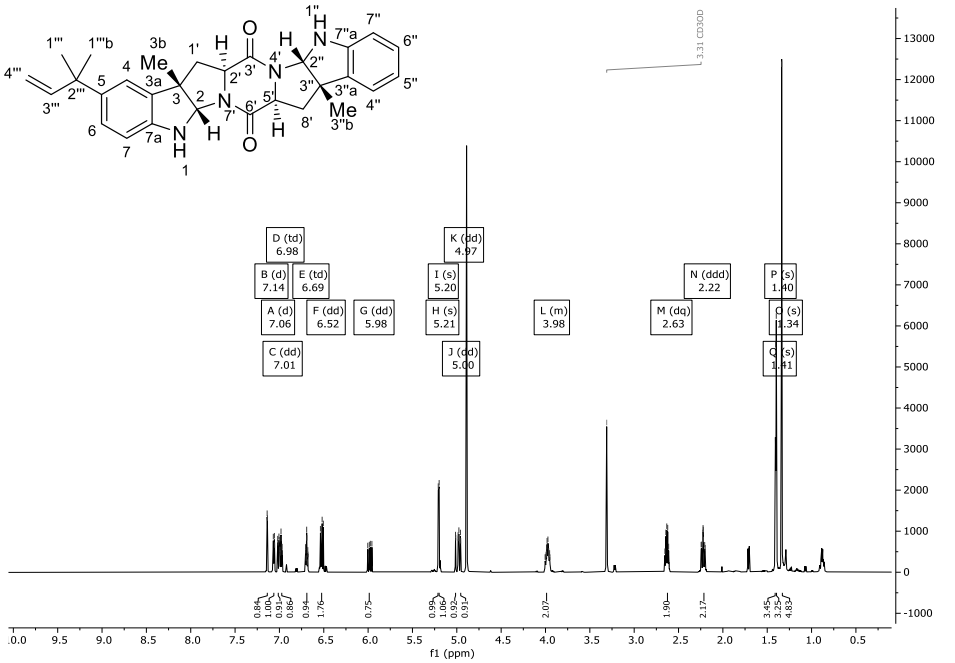


Abbildung 308: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **281** in CD_3OD.

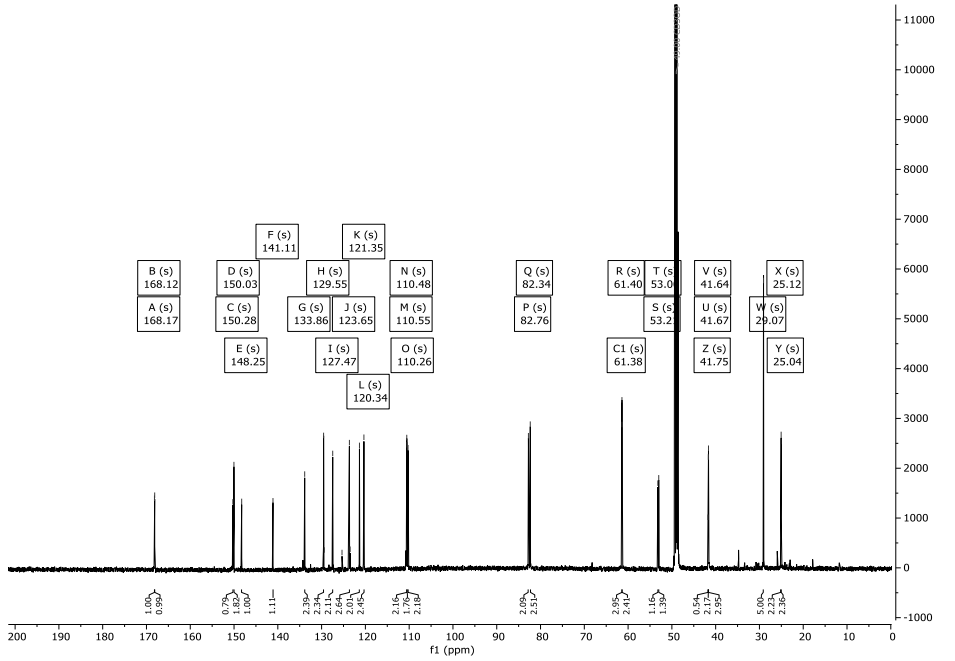


Abbildung 309: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **281** in CD_3OD.

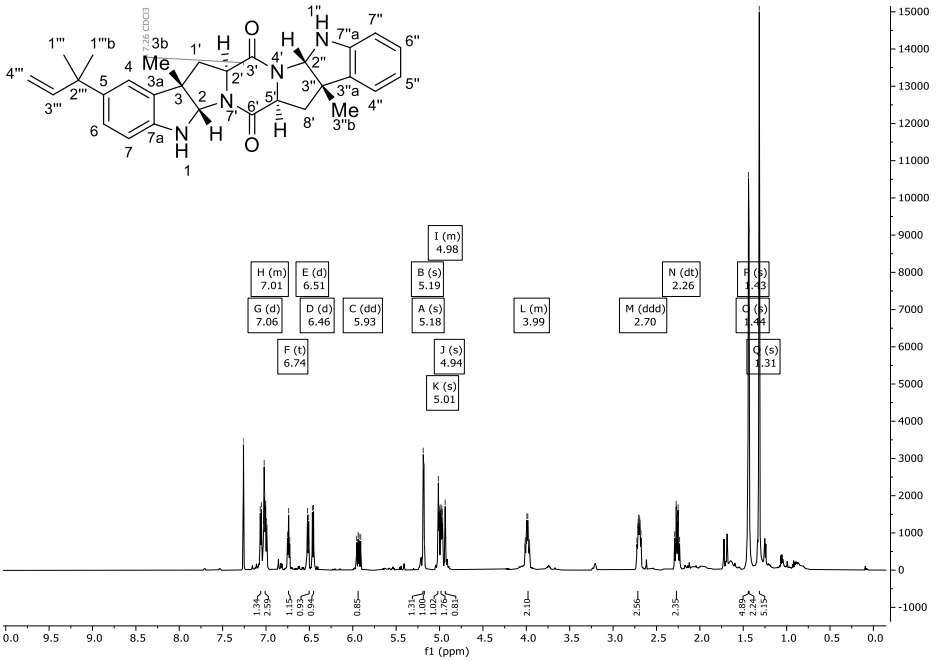


Abbildung 310: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **281** in $CDCl_3$.

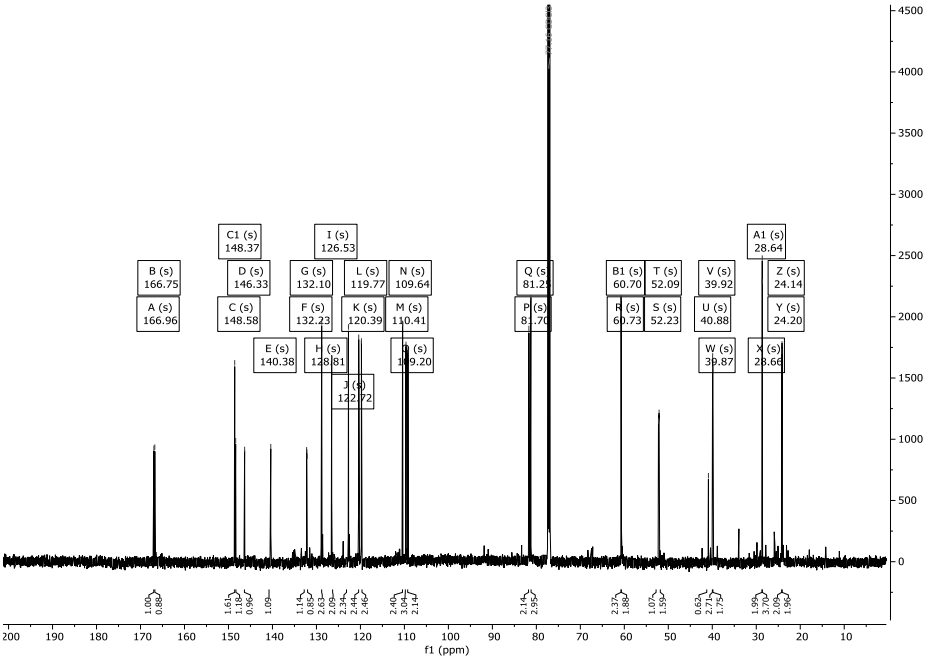


Abbildung 311: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **281** in $CDCl_3$.

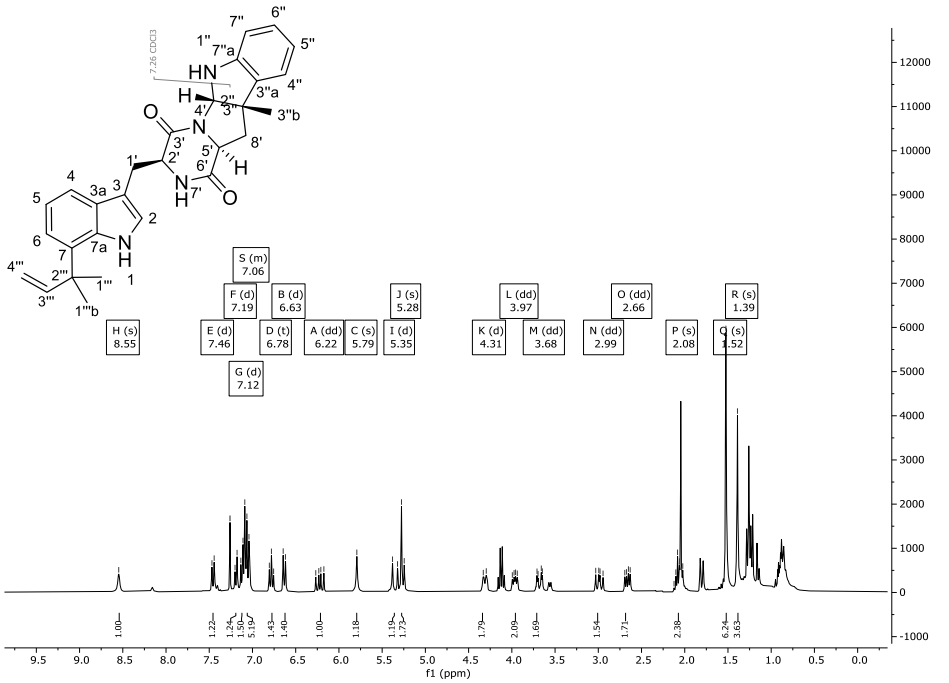


Abbildung 312: ^{1}H-NMR-Spektrum (300 MHz) von Verbindung **335** in $CDCl_3$.

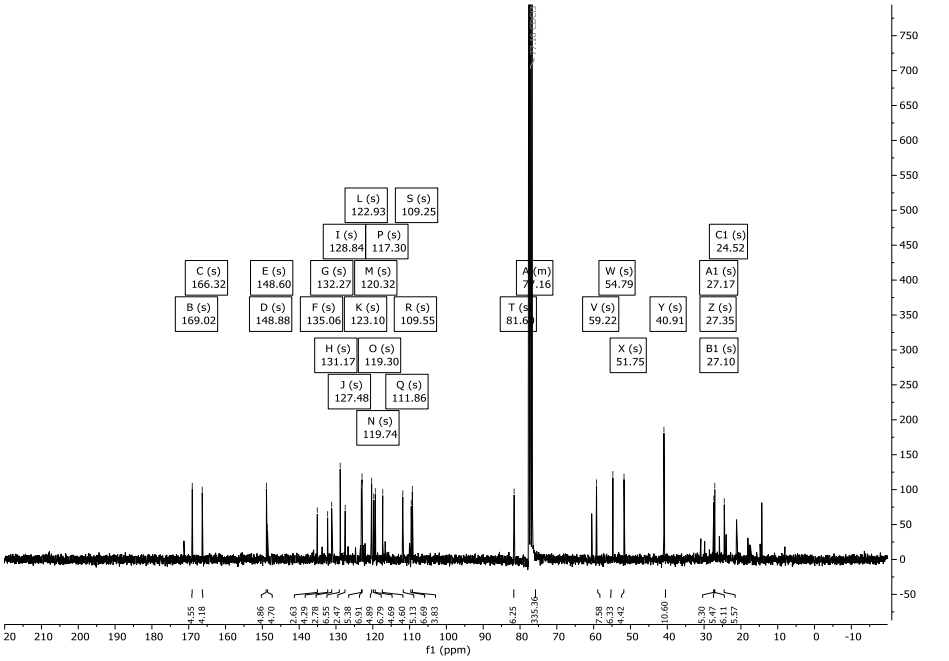


Abbildung 313: ^{13}C-NMR-Spektrum (76 MHz) von Verbindung **335** in $CDCl_3$.

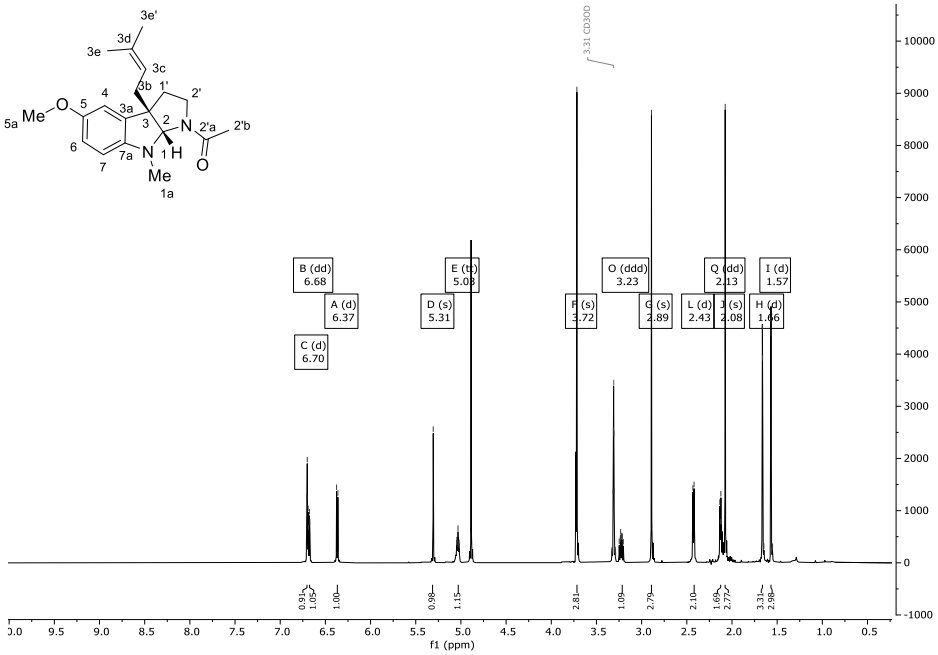


Abbildung 314: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **290** in CD_3OD.

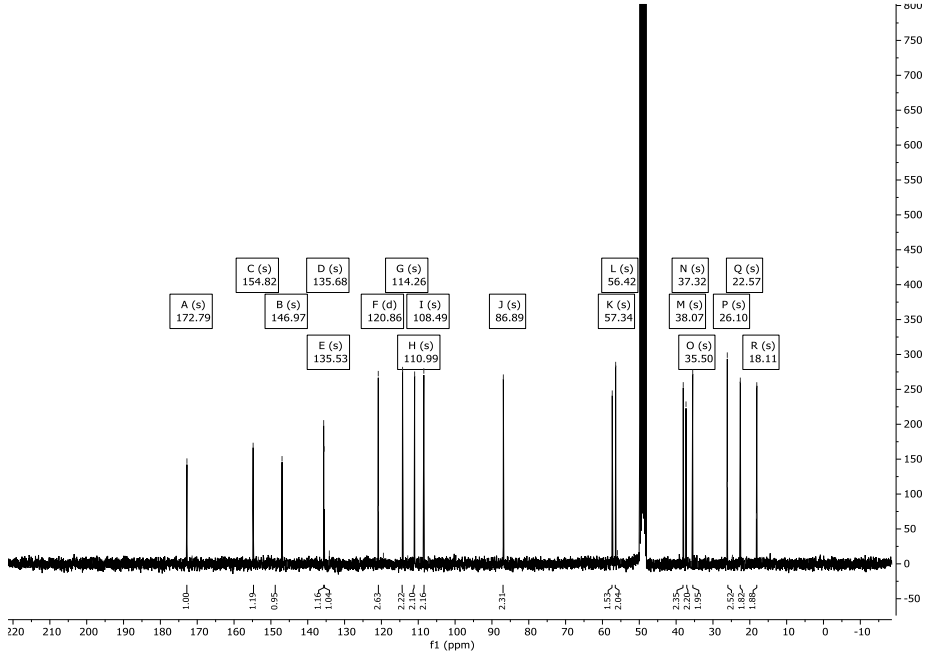


Abbildung 315: ^{13}C-NMR-Spektrum (76 MHz) von Verbindung **290** in CD_3OD.

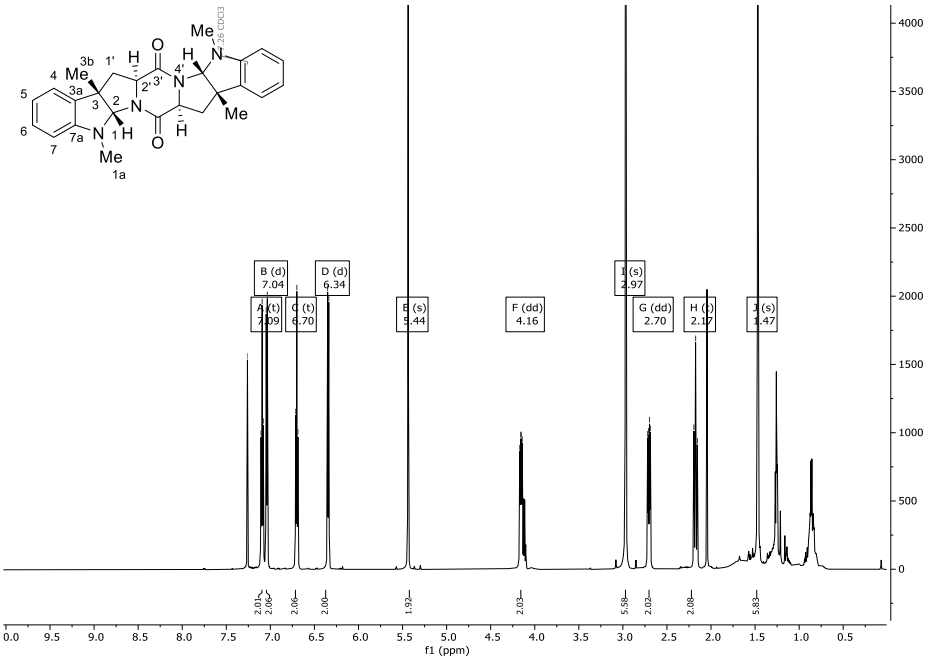


Abbildung 316: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **282** in $CDCl_3$.

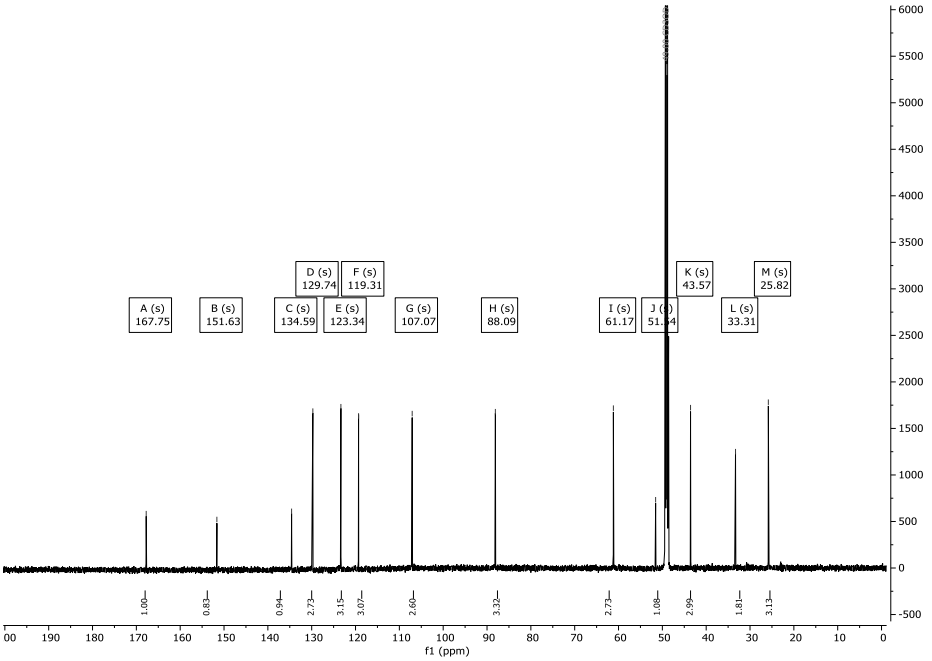


Abbildung 317: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **282** in CD_3OD.

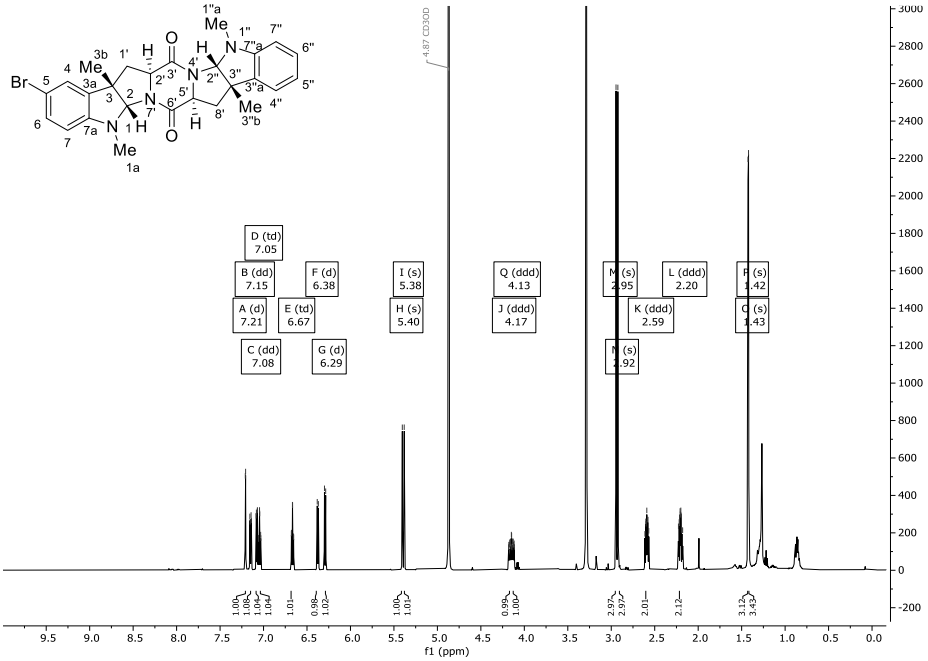


Abbildung 318: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **293** in CD_3OD.

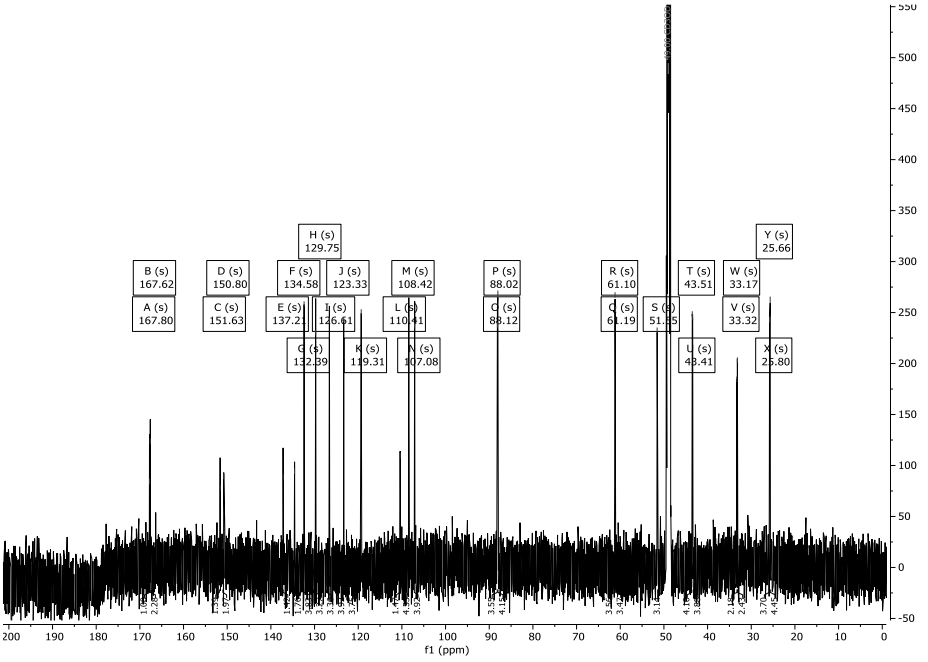


Abbildung 319: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **293** in CD_3OD.

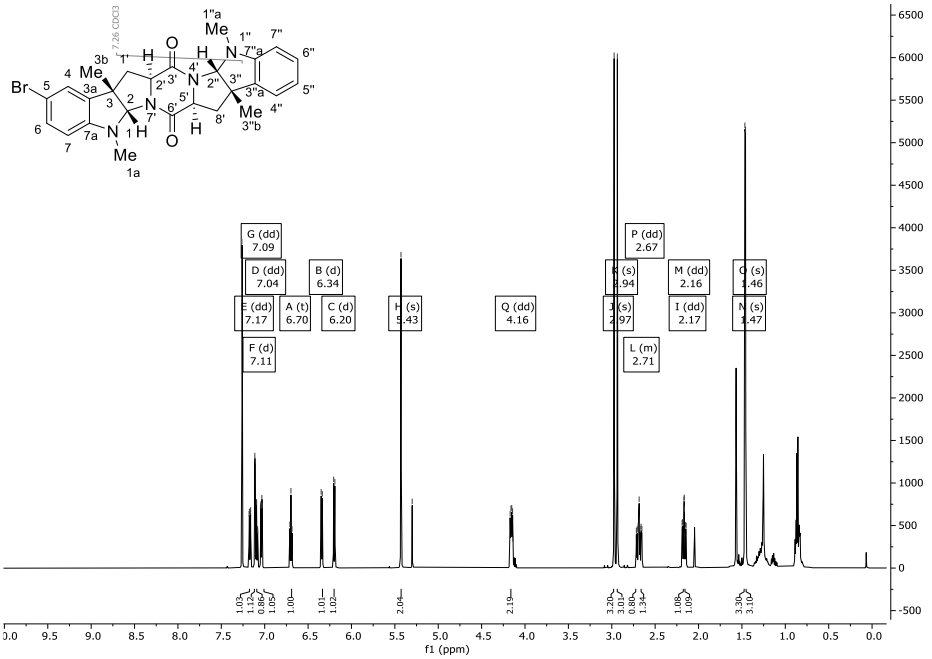


Abbildung 320: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **293** in $CDCl_3$.

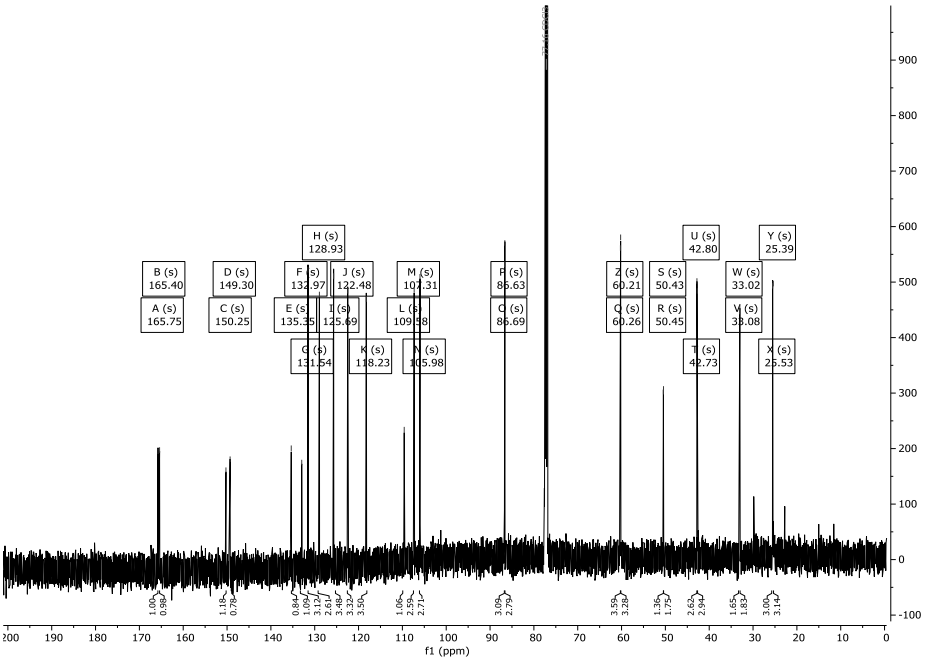


Abbildung 321: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **293** in $CDCl_3$.

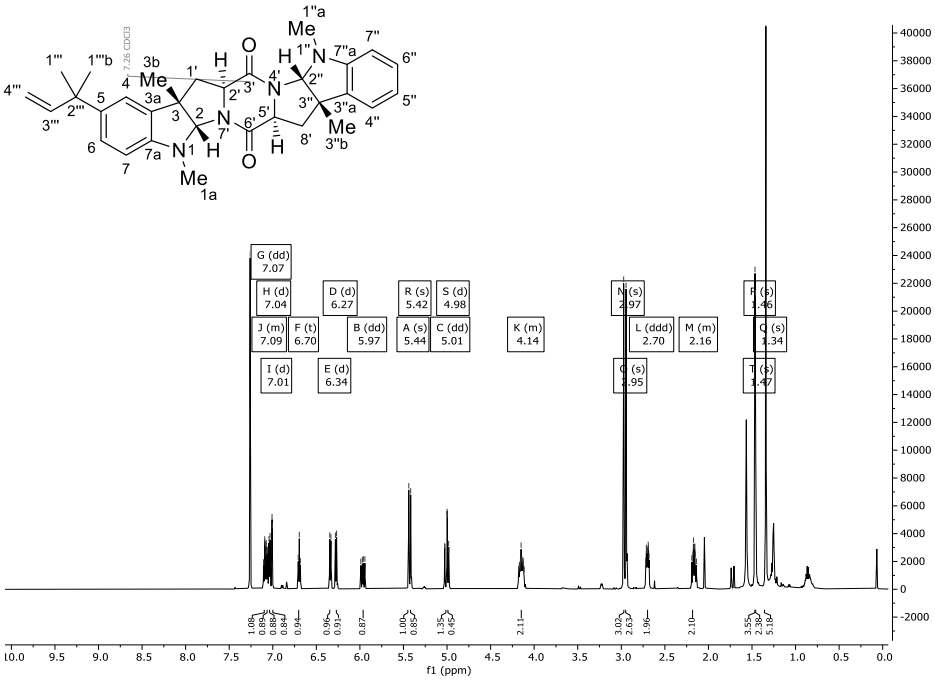


Abbildung 322: ^{1}H-NMR-Spektrum (600 MHz) von Verbindung **29** in $CDCl_3$.

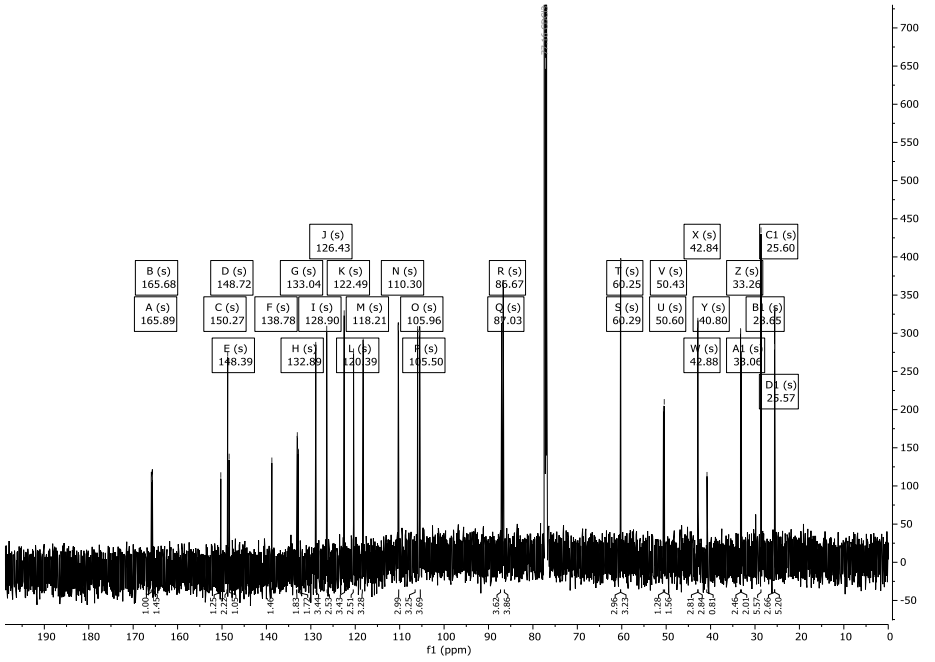


Abbildung 323: ^{13}C-NMR-Spektrum (151 MHz) von Verbindung **29** in $CDCl_3$.

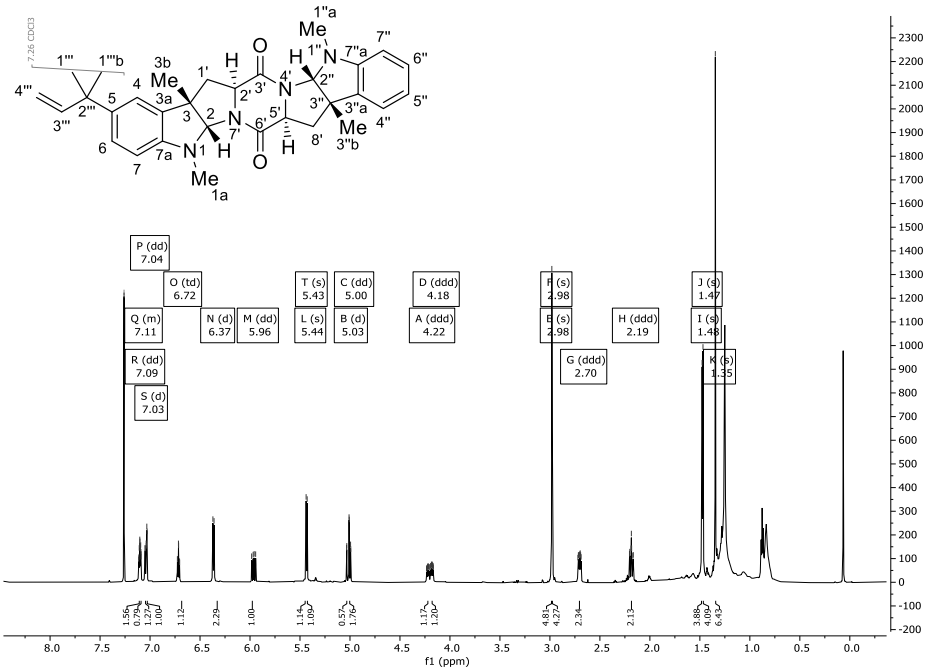


Abbildung 324: ^{1}H-NMR-Spektrum (700 MHz) von Verbindung **29** in $CDCl_3$.

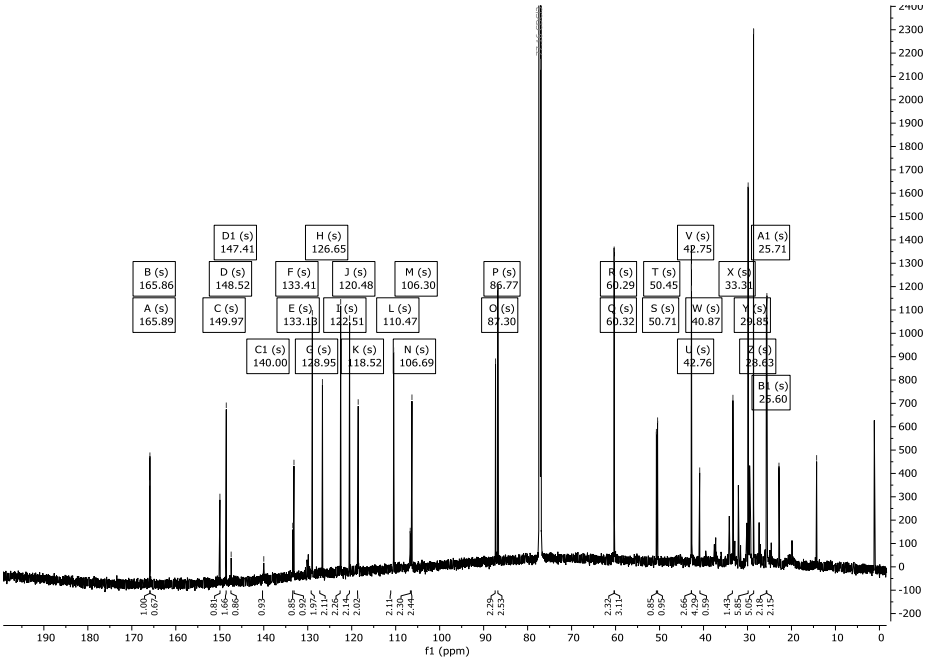
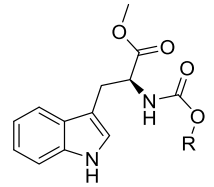
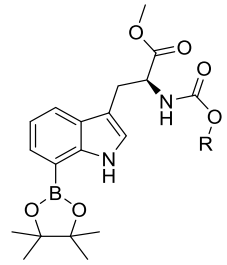
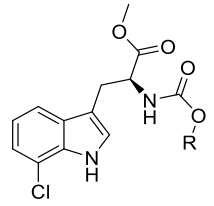
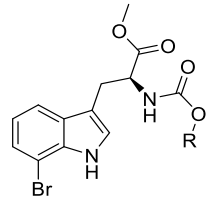
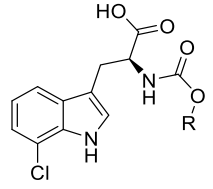
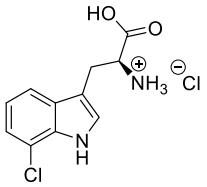
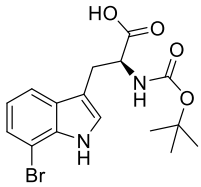
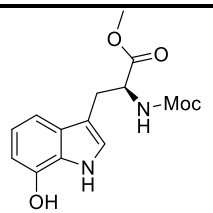
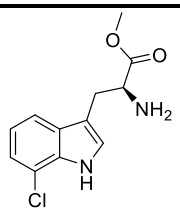
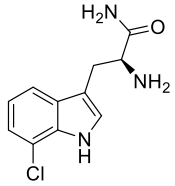
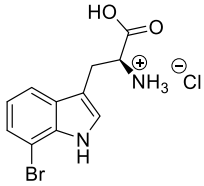
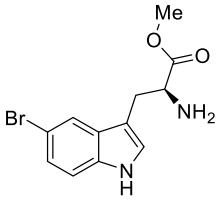
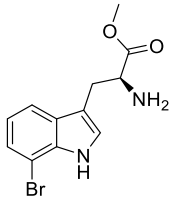


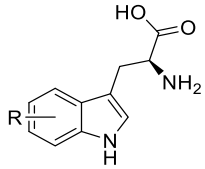
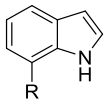
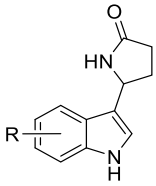
Abbildung 325: ^{13}C-NMR-Spektrum (176 MHz) von Verbindung **29** in CD_3OD.

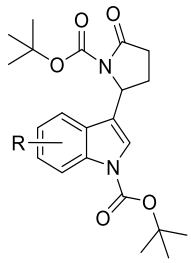
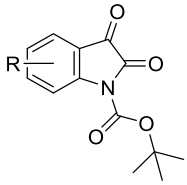
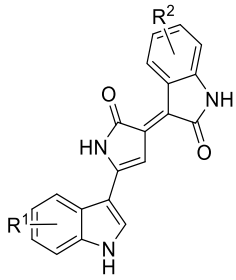
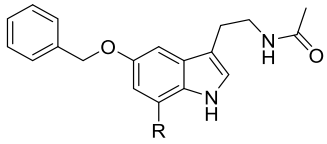
8.4. Molekülverzeichnis

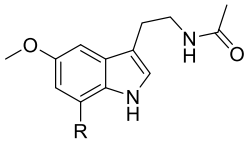
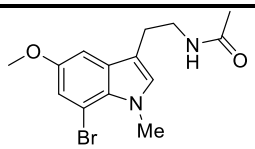
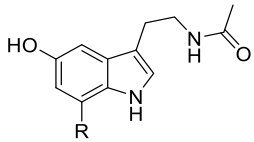
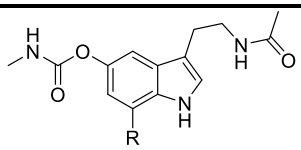
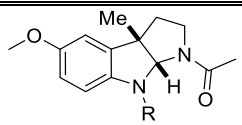
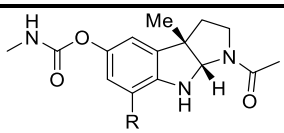
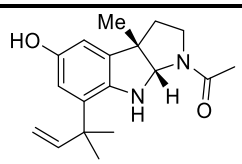
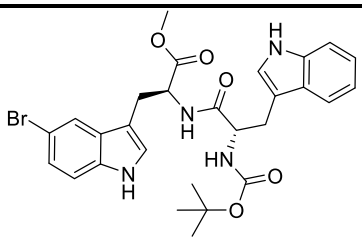
Die innerhalb dieser Arbeit hergestellten Verbindungen sind im Folgenden unter Angabe der Strukturnummer sowie der Experiment-Bezeichnung dargestellt. Allgemein bekannte Verbindungen, welche schon hinreichend beschrieben wurden, sind nicht aufgeführt.

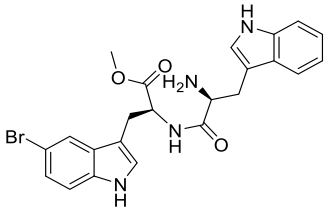
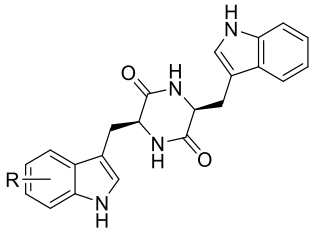
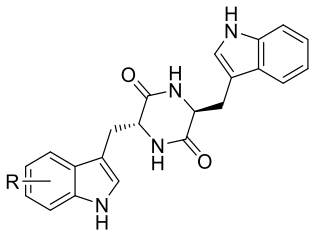
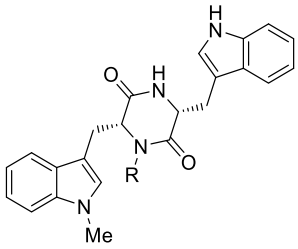
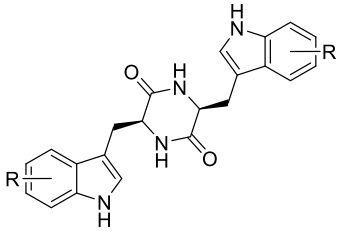
	**42**	R = *tert*-Bu	MAS003V008
	109	R = Ethyl	MAS003V064
	110	R = Methyl	MAS003_LME011
	**102**	R = *tert*-Bu	MAS003V029
	111	R = Ethyl	MAS003V062
	112	R = Methyl	MAS_LME008
	**103**	R = *tert*-Bu	MAS003V021
	113	R = Ethyl	MAS003V063
	114	R = Methyl	MAS_LME009
	**104**	R = *tert*-Bu	MAS003V042
	118	R = Methyl	MAS_LME019
	**105**	R = *tert*-Bu	MAS003V025
	344	R = Ethyl	MAS_003V077

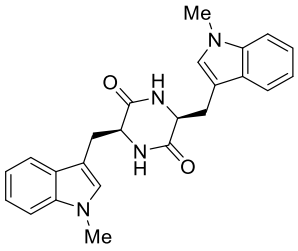
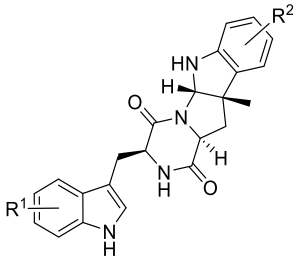
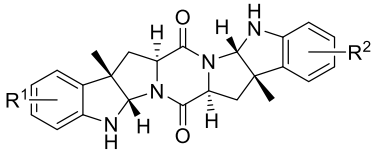
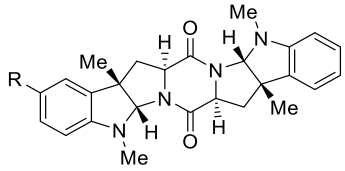
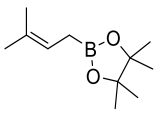
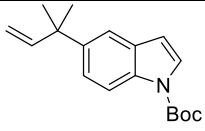
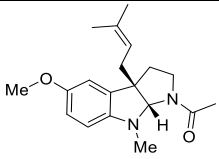
	**82-HCl** MAS003V028		**106** MAS003V045
	**117** TBA003V025		**115** MAS_LME013
	**116** MAS003V084		**107-HCl** CGR010V001
	**270** CGR008V002		**294** MAS_LME020

	**297**	R = 4-Br	CGR004V001
	268	R = 5-Br	CGR008V001
	298	R = 6-Br	CGR006V001
	107	R = 7-Br	CGR010V001
	82	R = 7-Cl	MAS003V089 CGR003V001
	**38**	R = Bpin	MAS001V015
	45	R = Cl	MAS001V024
	46	R = Br	MAS001V028
	120	R = Ph	MAS001V025
	**68**	R = H	MAS002V015
	87	R = 5-Cl	MAS_TPAV014
	88	R = 7-Cl	MAS_TPAV012

	**70**	R = H	MAS002V006
	89	R = 5-Cl	MAS_TPAV011
	90	R = 7-Cl	MAS_TPAV013
	**72**	R = H	MAS002V004
	93	R = 5-Cl	MAS_TPAV007
	94	R = 7-Cl	MAS_COPV001
	**31**	R^1 = H R^2 = H	MAS002V014
	95	R^1 = 5-Cl R^2 = H	MAS002V012
	96	R^1 = 7-Cl R^2 = H	MAS002V013
	97	R^1 = H R^2 = 5-Cl	MAS_TPA009
	98	R^1 = H R^2 = 7-Cl	MAS_LME034
	99	R^1 = 5-Cl R^2 = 5-Cl	MAS_TPAV015
	100	R^1 = 7-Cl R^2 = 7-Cl	MAS_LME025
	**161**	R = H	MAS001V036
	170	R = Bpin	MAS001V013
	172	R = Cl	MAS001V035 MAS003V042
	174	R = Br	MAS001V031
	183	R = OH	MAS001V098
	185	R = OTBS	MAS001V088
	193	R = OMe	MAS001V104

	**171**	R = Bpin	TBA003V012
	173	R = Cl	MAS001V055
	175	R = Br	TBA003V019
	182	R = OH	MAS001V077
	184	R = OTBS	MAS001V080
	**201** TBA003V035		
	**176**	R = Cl	MAS001V055 MAS001V038
	177	R = Br	TBA003V018
	186	R = OTBS	MAS001V089
	194	R = OMe	MAS001V107
	**178**	R = Cl	MAS001V056
	179	R = Br	TBA003V024
	195	R = OMe	MAS001V111
	***rac*-200**	R = H	TBAV003V020_14-28
	***rac*-148**	R = Me	TBAV003V020_6-12
	**196**	R = Cl	MAS001V073
	197	R = Br	MAS001V095
	203	R = Prenyl	MAS001V103
	**204** MAS001V103		
	**286** MAS003V131		

	**287** MAS003V132		
	**313**	R = 4-Br	CGR004V008
	273	R = 5-Br	SIP002V004
	271	R = 5-Cl	MHA_AA007
	263	R = 5-Prenyl	MAS003V092
	316	R = 6-Br	CGR006V008
	318	R = 7-Br	MAS_LME024
	320	R = 7-Cl	MAS_LME023
	**274**	R = 5-Br	SIP002V004
	272	R = 5-Cl	MAS003V105
	**345**	R = H	MAS_LME005_F2
	346	R = Me	MAS_LME005_F1
	**314**	R = 4-Br	CGR004V009
	315	R = 5-Br	CGR008V006
	317	R = 6-Br	CGR006V009
	319	R = 7-Br	CGR010V006
	321	R = 7-Cl	CGR003V007

	**264** TBA003V039		
	**331**	R^1 = 4-Br R^2 = H	MAS003V171_MoMe
	288	R^1 = 5-Br R^2 = H	MAS003V133_MoMe
	333	R^1 = 5-Br R^2 = 5-Br	MAS003V156
	332	R^1 = 7-Br R^2 = H	MAS003V172_MoMe
	335	R^1 = 7-Prenyl R^2 = H	MAS003V175
	**260**	R^1 = H R^2 = H	MAS003V158
	322	R^1 = 4-Br R^2 = H	MAS003V171_DiMe
	284	R^1 = 5-Br R^2 = H	MAS003V133_DiMe
	324	R^1 = 5-Br R^2 = 5-Br	MAS003V165
	327	R^1 = 7-Br R^2 = H	MAS003V172_DiMe
	281	R^1 = 5-Prenyl R^2 = H	MAS003V155 MAS003V142
	**282**	R = H	MAS003V158
	293	R = Br	MAS003V161
	29	R = Prenyl	MAS003V166
	**49** MAS003V024 MAS003V154		**277** MAS003V069
	**290** MAS003V135		

9. ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die vorliegende Dissertation wurde ausschließlich an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt. Es wurde zuvor kein weiterer Promotionsversuch unternommen.

Marcel Schatton

10. DANKSAGUNG

Zu Beginn dieser Arbeit habe ich einige Worte darüber verloren, welche Entwicklung ich in den letzten vier Jahren durchlaufen habe. In diesem Zusammenhang möchte ich noch einmal betonen, dass ich diesen Weg keineswegs alleine gelaufen bin. Vielmehr hatte ich jederzeit wundervolle Menschen an meiner Seite, denen ich meine Probleme schildern konnte – sei es, um gemeinsam Lösungen für Probleme zu finden oder um auf andere Gedanken zu kommen. Daher möchte ich mich in diesem letzten Abschnitt bei all denen bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet haben.

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Pietruszka bedanken, der mir nicht nur die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit zu verfassen, sondern auch meinen Auslandsaufenthalt in Finnland im Rahmen der Masterarbeit ermöglicht hat. Damit hast du einen wichtigen Beitrag zu meiner akademischen Laufbahn geleistet – einen Weg, für den ich mich jederzeit wieder entscheiden würde. Besonders beeindruckt hat mich deine Art, ein Institut zu führen und deinen Mitarbeitenden auf Augenhöhe zu begegnen. Ebenso habe ich sowohl deine stets offene Tür geschätzt, um auch kleinste Fragen unkompliziert klären zu können, als auch die tiefgründigen Gespräche, die wir hinter verschlossenen Türen geführt haben.

Jedes Institut braucht einen guten Cop und einen bösen Cop – und ich denke, Dr. Tom Classen vereint beides auf bemerkenswerte Weise in einer Person. Dafür möchte ich mich bei dir bedanken: für all die Hilfestellungen, die du mir gegeben hast, für deine realistischen Einschätzungen, die mir oftmals die Augen geöffnet haben, und für dein aufrichtiges Interesse daran, nicht nur unsere wissenschaftliche, sondern auch unsere persönliche Entwicklung als Doktoranden zu fördern.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die Begleitung meiner ersten Schritte in der organischen Chemie möchte ich mich außerdem bei Prof. Dr. Thomas Müller bedanken, ohne dessen prägenden Einfluss ich wohl kaum den Weg in die bioorganische Chemie gefunden hätte.

Außerdem möchte ich meinen Dank an die vielen festangestellten Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter aussprechen, die im Hintergrund unseres Instituts wirken und als Fels in der Brandung dafür sorgen, dass bei einer neuen Welle von Studierenden und Doktoranden nicht alles aus dem Ruder läuft. Besonders hervorheben möchte ich Birgit, die mit ihrer exzellenten Organisation mir so manche Arbeit abgenommen hat.

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich bereits einige Personen genannt, die direkt oder indirekt an den Projekten mitgewirkt haben. Für diese wertvollen Kooperationen möchte ich mich ebenfalls bei allen Partnern herzlich bedanken. Im Viola-Projekt gilt mein besonderer Dank Dr. Robin Weihmann, Dr. Alexander Reiter und Dr. Anita Loeschcke, wobei Letztere mir auch im Labor mit großer Hingabe Geräte und Methoden nähergebracht hat. Für die beiden weiteren Projekte möchte ich insbesondere Diana Amariei und Mona Haase hervorheben, die mit ihrer Expertise in ihren Fachgebieten die Zusammenarbeit entscheidend vorangebracht haben. Darüber hinaus haben Cornelius, Tim, Simon, Athina, Nikkie, Lars und Tillmann im Rahmen

von Praktika oder Ausbildungen an dieser Arbeit mitgewirkt – euch danke ich sehr für euer Engagement. Ich hoffe, die gemeinsame Arbeit hat euch ebenso viel Freude bereitet wie mir.

Die Korrektur dieser Arbeit war sicherlich kein leichtes Unterfangen, da meine Rechtschreibfehler wohl ein ebenso breites Spektrum abdecken wie meine Projekte. Dafür möchte ich mich herzlich bei Catharina Gronkowsky, Lea Hoppe und Thorsten Lechtenberg bedanken.

Abgesehen von meinen offiziellen Betreuern, Kooperationspartnern und Mentoren möchte ich mich von ganzem Herzen beim gesamten Team IBOC bedanken. Vier Jahre sind eine lange Zeit, in der ich verschiedene Generationen von Doktoranden und Studierenden kennen- und schätzen lernen durfte. Es fällt mir schwer, an dieser Stelle allen gerecht zu werden, dennoch möchte ich den Versuch wagen, mich bei einigen persönlich zu bedanken.

Zunächst möchte ich mich bei meinen Atzen und Perlen aus Labor 304 bedanken, wo zynischer Humor noch großgeschrieben wird und jeder noch so schlechte Tag mit einem Lächeln endet – das ist der feine Unterschied. Als Cindy mich damals am Institut eingearbeitet hat, hätte ich nie gedacht, was für eine tiefe Freundschaft entstehen würde. Die Gespräche mit dir über Musik, Filme und vieles Weitere habe ich sehr genossen und zuletzt auch vermisst. Große Fußstapfen, die gefüllt werden mussten von unserem Vorzeige-Laborleiter Philipp. Du hast dich stets gewissenhaft um alles gekümmert, was nur irgendwie anstand, und hast mit fetzigen Designs meinen Alltag erheitert. Ich hoffe, dass du niemals deine große Begeisterungsfähigkeit verlierst. Corny, ich werde immer behaupten, dass ich dein Betreuer war und du eigentlich alles nur von mir gelernt hast. Spaß beiseite, ich habe mich jedes Mal darauf gefreut, dir zu erzählen, wie scheiße irgendetwas gerade läuft, und mich anschließend mit dir über die Lage lustig zu machen, um der Thematik die Schwere zu nehmen. Humor ist, wenn‘s wehtut und man trotzdem lachen kann. Außerdem danke ich Vicky, die zuletzt das Herz und die Seele unseres Labors war. Ich denke, ich kann für alle sprechen, wenn ich sage, dass du da oben so einiges zusammenhältst. Ich hoffe, dass du niemals aufhörst, dich mit deiner positiven und ergreifenden Art einzubringen. Neben Nina, Lars, Tillmann und Tim hatte ich mit euch allen eine großartige Zeit und konnte mich stets auf euren Rückhalt verlassen. Daher auch nochmal ein großes Dankeschön für die vielen kleinen Gefallen, die ihr für mich erledigt habt, während ich diese Arbeit verfasst habe.

Bei meinen Partypeoples Simon, Marisa und Stina möchte ich mich für die vielen Gespräche bedanken – sowohl für den schnellen, ungezwungenen Small-Talk am Mittagstisch als auch für den tiefen Real-Talk an anderer Stelle. Ich wünschte, wir hätten am Institut mehr Zeit zusammen verbringen können.

Zudem möchte ich mich bei Mona bedanken, die mich während meines gesamten Studiums begleitet hat. Du hast mir an manchen Stellen die Motivation gegeben, bis zu diesem Punkt weiterzumachen, und ich finde es schön, dass wir trotz allem nun beide unseren Abschluss gemeinsam erleben.

Davon ab möchte ich mich auch bei all jenen bedanken, die ich aufgrund der unterschiedlichen Labore nicht täglich im Blick hatte, bei denen ich aber trotzdem immer wusste, dass wir an einem Strang ziehen. Danke an Moritz K. und Sebastian für eure Kompetenz bei jeder noch so komplexen Frage – und für jeden noch so bodenlosen Flachwitz. Danke an Lea für die vielen kleinen Gesten, Hilfestellungen und den Intfeed auf der Botlane. Danke an

Matthias fürs Kaffee-Machen (sorry, das konnte ich mir nicht verkneifen). Mein Dank gilt dir ebenso wie dem gesamten NMR-Team für eure entgegenkommende und zuverlässige Art, auch wenn es mal stressiger zuging. Danke an Lisa, Vicky und Jasmin für eure Mühe, den Absolvent*innen mit Geschenken und Hüten eine Freude zu bereiten. Schließlich gilt mein Dank allen anderen, die ich jetzt nicht namentlich erwähnt habe, die mir aber ebenso mit offenem Ohr und helfender Hand zur Seite standen.

Am Ende möchte ich mich außerdem bei meinen engsten Vertrauten bedanken. Dazu zähle ich nicht nur meine direkten Verwandten, sondern auch meine besten Freunde, die für mich mittlerweile ebenso Familie sind. Als ich damals nach Düsseldorf gezogen bin, hätte ich nicht gedacht, dass unsere WG-Zeit uns so nah zusammenwachsen lassen würde. Daher möchte ich Noah, Adrian und Gereon von ganzem Herzen danken, immer an meiner Seite gewesen zu sein. Ihr wart für mich stets der Gegenpol zu meiner akademischen Laufbahn, und ohne euren Rückhalt würde ich heute nicht da stehen, wo ich jetzt bin. Ebenso wäre ich ohne die unentwegte Unterstützung meiner Eltern nicht hier gelandet. Danke, dass ihr mir all das ermöglicht habt.

Ebenso möchte ich mich bei dir bedanken, Lena. Auch du hast dir immer wieder meine Weh-Wehchen angehört, mir wieder Mut gemacht und mich motiviert. Zudem war es sicherlich nicht leicht, in dieser letzten, recht turbulenten Phase meine Launen auszuhalten. Dabei hast du mir Sicherheit gegeben und mit mir jede noch so kleine Errungenschaft gefeiert. Ich freue mich, wenn ich dir dies zu gegebener Zeit auch anbieten kann.

Um es für alle noch einmal zusammenzufassen: Danke für alles!

Mit diesen letzten Worten beende ich nicht nur ein Buch, sondern ein großes Kapitel meines Lebens. Doch mit dem Ende meiner akademischen Laufbahn beginnt zugleich ein noch größerer Abschnitt. Zwiegespalten in meinen Emotionen, bin ich einerseits melancholisch über die Studentenzeit, die nun leider der Vergangenheit angehört, und andererseits gespannt, welche Höhen und Tiefen die Zukunft bereithält. Jedoch bin ich mit euch allen an meiner Seite in jedem Fall bereit, eine neue Welt zu entdecken.

Will immer, was man nicht sieht und davon zu viel
Dabei hab' ich alles und vielleicht noch mehr, was ich gar nicht verdien'

Dreh' mich zu selten nach links und rechts
Immer nach vorne und langsam verstehe ich

Vieles was man so versucht zu erreichen
Ist weniger wert als alles, was du hinterlässt

- ‚Distanz II' von Ahzumjot -

Band 40
Die farbenfrohe Welt der Prodiginine – Neue Enzyme für die Synthese bioaktiver Naturstoffderivate
H. U. C. Braß (2021), IX, 349 pp
ISBN: 978-3-95806-523-9

Band 41
Oxidoreduktasen: Von neuen Biokatalysatoren bis zum fertigen Naturstoff
D. Dickmann (2021), 274 pp
ISBN: 978-3-95806-573-4

Band 42
Chemie ohne Grenzen – Biokatalysatoren und Bororganyle als wertvolle Hilfsmittel für die zielmolekülorientierte, enantioselektive Synthese
M. R. Mantel (2021), 487 pp
ISBN: 978-3-95806-585-7

Band 43
Über tetraolbasierte Allylboronsäureester und deren Potential in der stereoselektiven Synthese
P. Ullrich (2022), xii, 324 pp
ISBN: 978-3-95806-618-2

Band 44
Design, Synthese und Charakterisierung neuartiger *photocaged compounds* – Optimierte Werkzeuge zur Etablierung wellenlängenselektiver Genexpression
F. Hogenkamp (2022), V, 456 pp
ISBN: 978-3-95806-637-3

Band 45
Charakterisierung von Methyltransferasen zur enantioselektiven Synthese von Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol basierten Naturstoffen
P. Schneider (2023), x, 315 pp
ISBN: 978-3-95806-690-8

Band 46
Untersuchungen zu enzymatischen Halogenierungsreaktionen in der organischen Synthese
A. V. Fejzagić (2023), XI, 264 pp
ISBN: 978-3-95806-728-8

Band 47
Biochemische Charakterisierung von modularen dirigierenden Proteinen
N. Huwa (2024), X, 235 pp
ISBN: 978-3-95806-745-5

Band 48
Immobilisierte Enzyme und Kofaktor-Regenerierung in der kontinuierlichen Durchflusssynthese
B. Baumer (2024), XVIII, 231 pp
ISBN: 978-3-95806-783-7

Band 49
Biaryl-based natural products as structural motif for pharmaceutically relevant compounds
M. K. T. Klischan (2025), V, 657 pp
ISBN: 978-3-95806-801-8

Band 50
Flavin-abhängige Halogenasen zur Derivatisierung von Naturstoffen
J. Gebauer (2025), XXIV, 321 pp
ISBN: 978-3-95806-850-6

Band 51
Lipase-catalyzed kinetic resolution: Synthesis and application of axially chiral biphenols
R. C. Ganardi (2025), 423 pp
ISBN: 978-3-95806-854-4

Band 52
Application of *C3*-methyltransferases for natural product synthesis
M. Haase (2025), 432 pp
ISBN: 978-3-95806-862-9

Band 53
Optimierende Untersuchung von Acetaldehydabhängigen Aldolasen und deren Anwendung in der organischen Synthese
J. Hindges (2025), 211 pp
ISBN: 978-3-95806-865-0

Band 54
Indole *C*-methyltransferases – creating an efficient platform for the enantioselective methylation of bioactive compounds
D.-A. Amariei (2026), 339 pp
ISBN: 978-3-95806-881-0

Band 55
Indolderivate in der Synthese von naturstoffinspirierten Wirkstoffen
M. Schatton (2026), XV, 423 pp
ISBN: 978-3-95806-930-5 (Print)
ISBN: 978-3-95806-931-2 (E-Book)

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich

Herausgegeben von Jörg Pietruszka

Naturstoffe stellen eine unverzichtbare Quelle für medizinisch relevante Verbindungen dar, ihre Erforschung ist jedoch mit grundlegenden Herausforderungen verbunden. Sowohl die aufwendige Isolation aus natürlichen Quellen als auch die komplexe chemische Totalsynthese stehen in einem Spannungsfeld zwischen Effizienz, Nachhaltigkeit und praktischer Umsetzbarkeit. Zudem entfaltet sich das Potenzial vieler Naturstoffe als Wirkstoffkandidaten erst durch gezielte strukturelle Modifikationen.

Die vorliegende Arbeit greift diese Problematik auf und untersucht alternative Zugänge zur gezielten Derivatisierung ausgewählter Naturstoffe. Im Fokus stehen die Indolalkaloide Physostigmin, Deoxyviolacein und Lansai-B, für die bislang nur eine begrenzte Anzahl struktureller Varianten beschrieben wurde.

Durch die Kombination chemischer, biotechnologischer und biochemischer Methoden werden neue Synthesewege und Modifikationsstrategien entwickelt, um die strukturelle Vielfalt dieser Verbindungen zu erweitern. Dabei werden bestehende Ansätze aufgegriffen, angepasst und durch neue Konzepte ergänzt. Ein vergleichender Blick auf die eingesetzten Methoden ermöglicht zudem eine differenzierte Einordnung ihrer jeweiligen Stärken und Grenzen.

Die hergestellten Derivate werden abschließend hinsichtlich ihrer biologischen Eigenschaften untersucht. Die Arbeit leistet damit einen Beitrag zur Entwicklung alternativer Strategien im Umgang mit komplexen Naturstoffen und zeigt Möglichkeiten auf, deren Potenzial systematisch zu erschließen.

Band 55
ISBN 978-3-95806-931-2