

Biosynthese

Pityriarubine, biologisch aktive
Bis(indolyl)spirane aus Kulturen der lipophilen
Hefe *Malassezia furfur***

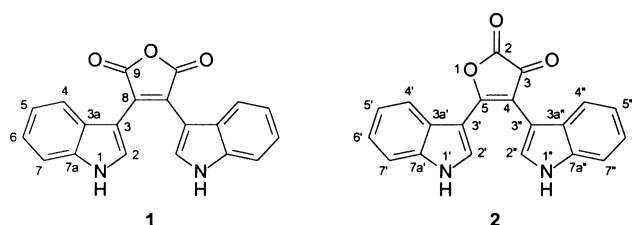
Bernhard Irlinger, Hans-Joachim Krämer, Peter Mayser*
und Wolfgang Steglich*

In memoriam Ernst Habermann

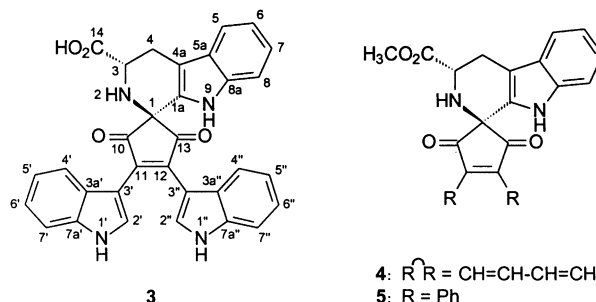
Lipophile Hefen der Gattung *Malassezia* (früher: *Pityrosporum*) gehören zur residenten Flora der menschlichen Haut und vieler Warmblüter.^[1] Derzeit werden sieben Spezies abgegrenzt, von denen *M. furfur* biochemische Besonderheiten aufweist. L-Tryptophan induziert als alleinige Stickstoffquelle in Kulturen dieser Spezies die Bildung einer Vielzahl von Indolalkaloiden, darunter zahlreiche Farb- und Fluoreszenzfarbstoffe.^[2–4] Dies könnte bedeutsam für die Pathogenese der Pityriasis versicolor (Kleinflechte) sein, einer mit schuppigen Läsionen einhergehenden *Malassezia*-assoziierten Hauterkrankung, die durch eine bislang ungeklärte Farbvarianz und Fluoreszenz ihrer Läsionen gekennzeichnet ist.^[5]

Wir berichten über die Isolierung von drei biologisch aktiven Bis(indolyl)spiranen aus Kulturen von *M. furfur*. Dazu wurde das Kulturmedium mit Essigester extrahiert und der Rohextrakt an Sephadex LH-20 vorfraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch an Kieselgel aufgetrennt. Aus den erhaltenen Zonen ließen sich nach wiederholter HPLC die drei orangefarbenen Pityriarubine A–C (**3**, **6** und **7**) sowie rotes Pityrianhydrid (**1**) und das unter UV-Licht gelb fluoreszierende Pityrialacton (**2**) rein gewinnen.

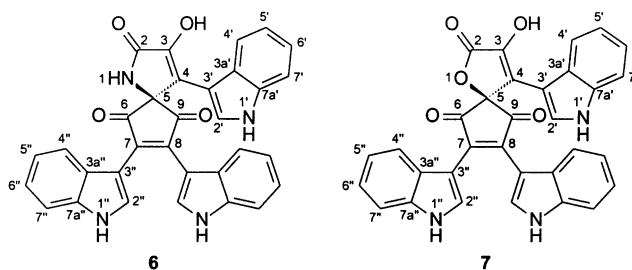
1 wurde anhand seiner spektroskopischen Daten und durch direkten Vergleich mit einer authentischen Probe als 3,4-Bis(indol-3-yl)maleinsäureanhydrid identifiziert, eine Zwischenstufe der Arcyriarubin-A-Synthese,^[6] die bisher nicht als Naturstoff bekannt war. **2** wurde von uns kürzlich als ungewöhnliches Bis(indolyl)oxobutenolid beschrieben.^[7]



Das optisch aktive Pityriarubin A (**3**) zeigt im (–)-FAB-Massenspektrum einen Molekülpeak bei m/z 525, was für die Summenformel $C_{32}H_{22}N_4O_4$ spricht. Im 1H -NMR-Spektrum erkennt man außer den Arensignalen drei Signale im aliphatischen Bereich, die aus einem ABC-Spinsystem resultieren. Signale bei $\delta = 2.92$ und 3.26 ppm sind einer diastereotopen CH_2 -Gruppe zuzuordnen, Singulets bei $\delta = 9.16$ (1H) und 9.99 ppm (2H) entsprechen drei stickstoffgebundenen Protonen aus Indolen. Im ^{13}C -NMR-Spektrum treten zwei Signale bei $\delta = 200.2$ und 200.7 ppm für die Carbonyl-C-Atome auf. Bei $\delta = 174.3$ ppm liegt das Signal eines Carboxy-C-Atoms, bei $\delta = 62.7$ ppm das Signal eines quartären C-Atoms. Daraus folgt für Pityriarubin A die Spirostruktur **3**, die mit allen spektroskopischen Daten im Einklang ist.



Um die *S*-Konfiguration von **3** zu sichern, wurden die Spiroverbindungen **4** und **5** aus L-Tryptophan und den entsprechenden Triketonen synthetisiert. Beide Moleküle haben wie **3** einen negativen Drehwert und stimmen im Verlauf der CD-Kurven sowie in ihren ^{13}C -NMR-Daten gut mit **3** überein.^[8]



Die 1H -NMR-Spektren der optisch inaktiven Pityriarubine B (**6**) und C (**7**) unterscheiden sich von dem von **3** durch fehlende Aliphatsignale. Im Arenbereich fallen zwei der drei Indol-Signalsätze zusammen, was für eine symmetrische Struktur spricht. Auch die ^{13}C -NMR-Daten von **6** und **7** sind gegenüber denen von **3** vereinfacht. Aus den chemischen

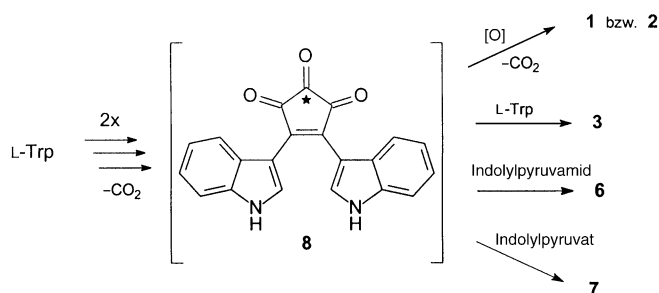
[*] Dr. H.-J. Krämer, Priv.-Doz. Dr. P. Mayser
Zentrum für Dermatologie und Andrologie
Justus-Liebig-Universität
Gaffkystraße 14, 35385 Gießen (Deutschland)
Fax: (+49) 641-9943349
E-mail: Peter.Mayser@derma.med.uni-giessen.de
Dr. B. Irlinger, Prof. Dr. W. Steglich
Department Chemie
Ludwig-Maximilians-Universität
Butenandtstraße 5–13, Haus F, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77756
E-mail: wos@cup.uni-muenchen.de

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung dieser Arbeit.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Verschiebungen und HMBC-Korrelationen ergibt sich, dass wie bei **3** eine 1,2-Bis(indol-3-yl)cyclopenten-3,5-dion-Einheit vorliegt, die am C4-Atom spiroartig mit einem 3-Hydroxypyrrolidin-2-on- bzw. einem 3-Hydroxyfuran-2-on-Ring verknüpft ist. Daraus folgen für die Pityriarubine B und C die Strukturen **6** bzw. **7**.

Die Strukturen der *Malassezia*-Metabolite lassen sich auf einfache Weise ableiten, wenn man das Triketon **8** als Vorstufe annimmt (Schema 1). Pictet-Spengler-Kondensation



Schema 1. Vorschlag zur Biosynthese der Bis(indolyl)metabolite in Kulturen von *Malassezia furfur* (*: ^{13}C -Markierung nach Verfütterung von $\text{D,L-[1',-}^{13}\text{C]Tryptophan}$).

von **8** mit L-Tryptophan würde Pityriarubin A (**3**) liefern, während die Reaktion von **8** mit Indol-3-yl-brenztraubensäureamid oder der entsprechenden Carbonsäure zu Pityriarubin B (**6**) bzw. C (**7**) führen würde. Ähnliche Reaktionen sind von Ninhydrin bekannt.^[9] Auch Pityriahydrid (**1**) und Pityrialacton (**2**) könnten aus **8** durch selektive oxidative Spaltung, gefolgt von oxidativer Decarboxylierung der resultierenden α -Ketosäure und anschließendem Ringschluss entstehen.

Um diesen Biosynthesevorschlag zu prüfen, wurde $\text{D,L-[1',-}^{13}\text{C]Tryptophan}$ an eine *M. furfur*-Kultur verfüttert. Nach 14 Tagen wurden die Metabolite isoliert und der Einbaugrad ^{13}C -NMR-spektroskopisch bestimmt. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, entsteht das Spiro-C-Atom der Pityriarubine aus der Carboxygruppe des Tryptophans, während die Carboxygruppe der zweiten Tryptophaneinheit verloren geht. Dies ist mit der Annahme des Triketons **8** als Zwischenstufe und dessen Bildung aus zwei Molekülen Indolylbrenztraubensäure vereinbar. Überraschenderweise zeigen die verschiedenen Metabolite große Unterschiede im ^{13}C -Einbaugrad. Auch die jeweiligen Markierungspositionen weisen Differenzen auf, die sich bisher nicht erklären lassen.

Die Pityriarubine haben interessante biologische Wirkungen, die ihre nahe Verwandtschaft zu den als Proteinkinase-

Tabelle 1: Markierung der Metabolite von *Malassezia furfur* nach Verfütterung von $\text{D,L-[1',-}^{13}\text{C]Tryptophan}$.

	Position der Markierung (Einbaugrad [%])
Pityrialacton (2)	C2 (62.6)
Pityriarubin A ^[a] (3)	C1 (32.1); C14 (44.4)
Pityriarubin B (6)	C2 (16.1); C5 (8.5)
Pityriarubin C (7)	C2, ^[b] C5 (3.8)

[a] Optisch inaktiv. [b] Wegen Verunreinigung mit einem markierten Cometaboliten ist die Angabe der ^{13}C -Anreicherung nicht möglich.

Inhibitoren wirksamen Bis(indolyl)maleinimiden^[10] widerspiegeln. Beide Verbindungstypen unterdrücken konzentrationsabhängig den „Oxidativen Burst“ von menschlichen Granulozyten im μM -Bereich, wobei die Wirkung der Pityriarubine mit der von Arcyriarubin A vergleichbar ist.^[11] Im Hinblick auf den eingesetzten Stimulus sind die Pityriarubine jedoch signifikant selektiver. Der Angriffsort ist noch zu ermitteln. Unter der Annahme der Entstehung der Metabolite in vivo passen die entzündungshemmenden Eigenschaften der Pityriarubine zur klinisch bemerkenswert gering ausgeprägten granulozytären Reaktion in Läsionen der Pityriasis versicolor.^[11] Über die Isolierung und Strukturaufklärung weiterer Indolmetabolite aus *M. furfur* wird gesondert berichtet werden.

Experimentelles

Kultivierung und Isolierung: *Malassezia furfur* (CBS 1878) wurde wie in Lit. [2] beschrieben auf einem Agar-Medium unter Zusatz von L-Tryptophan 14 Tage bei 30°C kultiviert. Details der Kultivierung und der genaue Trennungsgang zur Isolierung der Metabolite sind den Hintergrundinformationen zu entnehmen.

1: orangefarbener Feststoff, Schmp. 227–230°C. Spektroskopische Daten identisch mit denen des Syntheseproduktes.^[6]

2: blassgelbes Pulver, Schmp. > 250°C; UV/Vis (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 224 (4.07), 292 (sh, 3.55), 356 nm (3.55); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3400 (s, br.), 1736 (s), 1639 (ss), 1536 (m), 1458 (m), 1424 (m), 744 cm^{-1} (m); ^1H -NMR (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{Aceton}$): δ = 6.48 (dd, J = 7.4, 7.4 Hz, 1H, 5'-H), 6.65 (m, 2H, 4'/5'-H), 6.88 (dd, J = 7.4, 7.4 Hz, 1H, 6'-H), 6.94 (dd, J = 8.2, 8.2 Hz, 1H, 6''-H), 7.00 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 4''-H), 7.27 (d, J = 7.4 Hz, 1H, 7'-H), 7.32 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 7''-H), 7.41 (d, J = 2.3 Hz, 1H, 2'-H), 7.57 (br. s, 1H, 2'-H), 11.24 (s, 1H, 1'-H), 11.48 ppm (br. s, 1H, 1'-H); ^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3CN): δ = 107.0 (C3''), 108.4 (C3'), 111.5 (C7'), 111.6 (C7''), 117.3 (C4), 118.7 (C5''), 119.1 (C5'), 120.8 (C4''), 121.1 (C6'), 121.3 (C6''), 121.4 (C4'), 125.4 (C3a'), 126.4 (C2'', C3a''), 128.1 (C2'), 135.8 (C7a''), 136.2 (C7a'), 151.9 (C5), 168.1 (C2), 172.8 ppm (C3); EI-MS: m/z (%): 329 (15), 328 (92) $[M]^+$, 315 (15), 314 (64), 270 (16), 269 (22), 257 (38), 256 (100), 255 (38), 207 (59), 128 (20); HR-EI-MS: ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ $[M]^+$: 328.0866; gef. 328.0848.

3: orangefarbenes Pulver, Schmp. > 200°C (Zers.); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = -80 (c = 0.05, CH_3CN). UV/Vis (CH_3CN): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 198 (4.46), 219 (4.43), 277 (4.04), 385 (3.63), 436 nm (3.68); CD (CH_3CN): λ_{max} ($\Delta \epsilon$) = 207 (-1.77), 211 (0), 222 (+2.07), 231 (0), 241 (-1.72), 255 (0), 265 (+0.82), 278 (0), 298 (-2.23), 350 (0), 374 (+0.44), 391 (0), 434 (-0.94), 503 nm (0); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3400 (ss, br.), 2927 (w), 1683 (ss), 1516 (m), 1458 (w), 1422 (s), 1336 (w), 1243 (m), 1202 (s), 1135 (s), 1012 (w), 744 (m), 723 cm^{-1} (w); ^1H -NMR (600 MHz, CD_3CN): δ = 2.92 (dd, J = 15.5, 10.7 Hz, 1H, 4-H_a), 3.26 (dd, J = 15.5, 4.3 Hz, 1H, 4-H_b), 4.52 (dd, J = 10.7, 4.3 Hz, 1H, 3-H), 6.66 (m, 2H, 5'/5''-H), 6.86 („d“, J = 8.2 Hz, 2H, 4'/4''-H), 7.02 (m, 2H, 6'/6''-H), 7.08 (dd, J = 8.0, 8.0 Hz, 1H, 6-H), 7.12 (dd, J = 8.0, 8.0 Hz, 1H, 7-H), 7.25 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 8-H), 7.42 (m, 2H, 7'/7''-H), 7.55 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 5-H), 8.03 („d“, J = 3.0 Hz, 2H, 2'/2''-H), 9.16 (br. s, 1H, 9-H), 9.99 ppm (br. s, 2H, 1'/1''-H); ^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3CN): δ = 25.8 (C4), 54.1 (C3), 62.7 (C1), 107.9 (C3'/3''), 112.3 (C8), 112.7 (C7'/7''), 112.8 (C4a), 119.1 (C5), 120.5 (C6), 120.9 (C5'/5''), 122.7 (C4'), 122.8 (C4''), 123.2 (C6'), 123.3 (C6''), 123.4 (C7), 126.6 (C3a'), 126.7 (C3a''), 127.6 (C5a), 129.9 (C1a), 131.8 (C2'), 131.9 (C2''), 137.1 (C7a'/7a''), 137.8 (C8a), 144.7 (C11), 144.9 (C12), 174.3 (C14), 200.2 (C10), 200.7 ppm (C13). (–)-HR-FAB-MS: ber. für $\text{C}_{32}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4$ $[M-H]^-$: 525.1548; gef.: 525.1563.

6: orangefarbenes Pulver, Schmp. 180–183°C (Zers.); UV/Vis (CH_3CN): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 196 (4.38), 218 (4.34), 277 (4.05), 382 (3.55), 446 nm (3.61); IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3401 (s, br.), 2927 (w), 2228 (w), 1732 (m), 1689 (s), 1618 (w), 1518 (m), 1423 (m), 1275 (w), 1244 (m), 1198 (m),

1133 (m), 1014 (w), 816 (w), 744 (m), 720 cm⁻¹ (w); ¹H-NMR (600 MHz, [D₆]Aceton): δ = 6.52 (ddd, *J* = 7.8, 7.8, 1.1 Hz, 2H, 5''-H), 6.65 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, 4''-H), 6.91 (ddd, *J* = 7.8, 7.8, 1.1 Hz, 2H, 6''-H), 6.98 (ddd, *J* = 7.8, 7.8, 1.1 Hz, 1H, 5'-H), 7.00 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, 2'-H), 7.02 (ddd, *J* = 7.8, 7.8, 1.1 Hz, 1H, 6'-H), 7.21 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 7'-H), 7.34 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, 7''-H), 7.88 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 4'-H), 7.92 (s, 1H, 1-H), 7.98 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H, 2''-H), 10.26 (br. s, 1H, 1'-H), 10.95 ppm (br. s, 2H, 1''-H); ¹³C-NMR (151 MHz, [D₆]Aceton): δ = 68.5 (C5'), 107.1 (C3'), 107.8 (C3''), 112.0 (C7'), 112.5 (C3a'), 117.9 (C4), 120.1 (C5'), 120.7 (C5''), 122.2 (C4''), 122.7 (C4'), 122.8 (C6'), 122.9 (C6''), 124.2 (C2'), 126.5 (C3a''), 127.5 (3-a'), 131.5 (C2''), 137.1 (C7a'), 137.2 (C7a''), 144.2 (C3), 145.1 (C7/8), 170.5 (C2), 199.0 ppm (C6/9); EI-MS: *m/z* (%): 524 (52) [M]⁺, 496 (4), 340 (4), 256 (22), 255 (13), 207 (10), 157 (4), 144 (8), 130 (10), 117 (24), 90 (8), 89 (6), 44 (100), 43 (25); HR-EI-MS: ber. für C₃₂H₂₀N₄O₄ [M]⁺: 524.1525; gef.: 524.1509.

7: roter Feststoff, Schmp. 125–130°C (Zers.); UV/Vis (CH₃CN): λ_{max} (lg ε) = 195 (4.66), 218 (4.60), 277 (4.37), 323 (sh, 4.08), 394 (3.74), 4.62 nm (3.83). IR (KBr): ν̄ = 3415 (ss, br.), 2924 (w), 1765 (s), 1686 (s), 1619 (w), 1571 (w), 1514 (m), 1459 (m), 1422 (s), 1337 (w), 1241 (m), 1199 (w), 1128 (m), 1095 (m), 1014 (m), 744 cm⁻¹ (m); ¹H-NMR (600 MHz, [D₆]Aceton): δ = 6.60 (dd, *J* = 8.2, 8.2 Hz, 2H, 5''-H), 6.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, 4''-H), 6.98 (dd, *J* = 8.2, 8.2 Hz, 2H, 6''-H), 7.06 (dd, *J* = 8.2, 8.2 Hz, 1H, 5'-H), 7.11 (dd, *J* = 8.2, 8.2 Hz, 1H, 6'-H), 7.22 (s, 1H, 2'-H), 7.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 7'-H), 7.42 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, 7''-H), 8.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 4'-H), 8.16 (s, 2H, 2''-H), 10.59 (br. s, 1H, 1'-H), 11.14 ppm (br. s, 2H, 1''-H); ¹³C-NMR (151 MHz, [D₆]Aceton): δ = 82.2 (C5'), 105.9 (C3'), 107.5 (C3''), 112.4 (C7'), 112.6 (C7''), 120.8 (C5'), 121.0 (C5''), 122.3 (C4''), 122.9 (C4'), 123.2 (C6''), 123.4 (C6'), 124.6 (C4), 125.2 (C2'), 126.3 (C3a''), 126.7 (C3a'), 132.3 (C2''), 137.1 (C7a''), 137.2 (C7a'), 138.0 (C3), 145.6 (C7/8), 169.4 (C2), 195.4 ppm (C6/9); (+)-FAB-MS (Glycerin): *m/z* (%): 526 (13) [M+H]⁺, 256 (25); HR-(+)-FAB-MS: ber. für C₃₂H₂₀N₃O₅ [M+H]⁺: 526.1403; gef.: 526.1382.

Eingegangen am 4. August 2003 [Z52549]

Stichwörter: Alkaloide · Biosynthese · Hautkrankheiten · Hefen

- [1] G. Midgley, *Med. Mycol.* **2000**, 38(Suppl. 1), 9–16.
- [2] P. Mayser, G. Wille, A. Imkamp, W. Thoma, N. Arnold, T. Monsees, *Mycoses* **1998**, 41, 265–271.
- [3] G. Wille, P. Mayser, W. Thoma, T. Monsees, A. Baumgart, H.-J. Schmitz, D. Schrenk, K. Polborn, W. Steglich, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 955–960.
- [4] P. Mayser, U. Schäfer, H.-J. Krämer, B. Irlinger, W. Steglich, *Arch. Dermatol. Res.* **2002**, 294, 131–134.
- [5] A. K. Gupta, R. Bluhm, R. Summerbell, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2002**, 16, 19–33.
- [6] M. Brenner, H. Rexhausen, B. Steffan, W. Steglich, *Tetrahedron* **1988**, 44, 2887–2892.
- [7] P. Mayser, H. Stapelkamp, H.-J. Krämer, M. Podobinska, W. Wallbott, B. Irlinger, W. Steglich, *Antonie van Leeuwenhoek* **2003**, 84, 185–191.
- [8] Details siehe Hintergrundinformationen.
- [9] a) A. Heesing, R. Müller-Matthesius, H. Rose, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1970**, 735, 72–76; b) H. N. Song, J. S. Son, M. R. Seong, J. N. Kim, *Synth. Commun.* **1998**, 28, 687–692.
- [10] Übersichten: a) W. Steglich, *Pure Appl. Chem.* **1989**, 61, 281–288; b) M. Gill, W. Steglich, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1987**, 51, 1–317; c) G. W. Gribble, S. J. Berthel, *Stud. Nat. Prod. Chem.* **1993**, 12, 365–409 (Stereoselective Synthesis); d) J. Bergman, T. Janosik, N. Wahlstrom, *Adv. Heterocycl. Chem.* **2001**, 80, 1–71.
- [11] H.-J. Krämer, D. Kessler, W. Steglich, P. Mayser, *Arch. Dermatol. Res.* **2003**, 294, 492.