

Cyclopamin und der Hedgehog-Signaltransduktionsweg: Chemie, Biologie, medizinische Perspektiven

Philipp Heretsch, Lito Tzagkaroulaki und Athanassios Giannis*

Cyclopamin · Signaltransduktion · Medizinische Chemie · Naturstoffe · Tumortheraeutika

Als Odysseus nach zehnjähriger Belagerung siegreich das zerstörte Troja verließ, ahnte er nicht, welchen Prüfungen er sich noch zu stellen haben würde. Das Zusammentreffen mit dem Zyklopen, jenem riesigen Wesen mit nur einem Auge mitten auf der Stirn, gehörte ohne Zweifel zu den seltsamsten und gleichzeitig gefährlichsten seiner Erlebnisse – mithilfe eines Schafes gelang ihm schließlich die Flucht. Dass Homers Beschreibung des Zyklopen durch schrecklich fehlgebildete Neugeborene inspiriert wurde, ist nur Vermutung. Als allerdings Farmer in Idaho Mitte des letzten Jahrhunderts eine Häufung von zyklopenartigen Lämmern in ihren Herden verzeichneten, wurde eine Kaskade aus chemischen, biochemischen und medizinischen Entdeckungen in Gang gesetzt, die in ihrer Art einzigartig ist. Der vorliegende Kurzaufsatz soll diese Geschichte nachzeichnen und ihre Auswirkungen auf die heutige medizinisch-chemische Forschung beleuchten.

1. Chemie des Cyclopamins

1.1. Geschichte der Entdeckung des Cyclopamins

Veratrum californicum, gemeinhin als Kalifornischer Germer bezeichnet, ist eine Lilienart aus der Familie der Germergewächse, die auf der gesamten nördlichen Halbkugel heimisch ist, aber besonders ergiebig im gebirgigen Teil der westlichen USA gedeiht. Mitte des 20. Jahrhunderts mehrte sich dort in Schafherden (vor allem im Bundesstaat Idaho) die Geburt von Lämmern mit teils schwersten craniofacialen Defekten. Bis zu 25% der neugeborenen Lämmer von Schafen, die in den Bergen von Zentral-Idaho grasten, trugen diese Fehlbildungen davon. Die Schwere der Ausprägung dieser als Holoprosencephalie bezeichneten Missbildung reichte dabei von leicht verkürzten Oberkiefern bis hin zur Zyklopie, also dem Vorhandensein nur eines einzigen Auges mitten auf der Stirn, einhergehend mit schwersten Fehlbildungen des Gehirns. Diese betrafen unvollständig geteilte bis

vollkommen ungeteilte zerebrale Hemisphären sowie olfaktorische und optische Nerven. Die betroffenen Schafhirten baten schließlich das Department of Agriculture um Hilfe, nachdem die Erkrankung endemische Ausmaße angenommen hatte und die ökonomischen Ausfälle nicht mehr

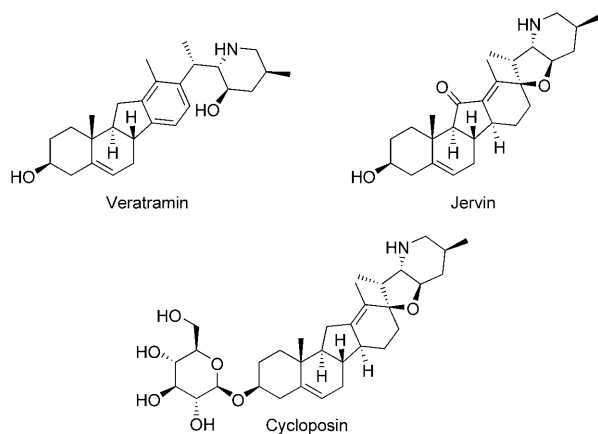
tragbar waren. Einer der zu Hilfe gekommenen Wissenschaftler, Lynn F. James, lebte Ende der 1950er Jahre für drei Sommer zusammen mit den Schafen und erkannte, dass die Schafe in Zeiten der Dürre höhere Weidestellen aufsuchten und dort von der in großer Zahl wachsenden Lilienart *Veratrum californicum* fraßen. Richard F. Keeler vom Poisonous Plant Research Laboratory konnte schließlich den Zusammenhang des Verzehrs von *Veratrum californicum* durch trüchtige Schafe mit dem Auftreten der Zyklopie herstellen. Dabei wurde in groß angelegten Fütterungsstudien von trüchtigen Schafen mit Zubereitungen von *Veratrum californicum* gezeigt, dass einzig die Aufnahme am 14. Tag der Schwangerschaft zum Auftreten der besagten Fehlbildungen und darüber hinaus zu einer um bis zu 87 Tage verlängerten Tragezeit führte (die natürliche Tragezeit beträgt bei Schafen 147 bis 152 Tage).^[1]

1.2. Isolierung und Strukturaufklärung des kausalen Agens

Ausgehend von diesen Untersuchungen wurde ein Extraktionsverfahren entworfen (siehe Abschnitt 1.4.1), das es ermöglichte, die in *Veratrum californicum* enthaltenen Alkaloide zu isolieren und anschließend an trüchtigen Schafen auf ihre Fähigkeit hin zu untersuchen, Zyklopie bei den Embryos

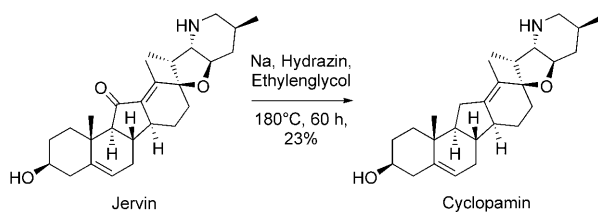
[*] Dr. P. Heretsch, L. Tzagkaroulaki, Prof. Dr. A. Giannis
Institut für Organische Chemie, Universität Leipzig
Johannisallee 29, 04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-9736599
E-Mail: giannis@uni-leipzig.de

zu induzieren. Es zeigte sich, dass drei Verbindungen in verschiedener Potenz diese Wirkung hatten, nämlich das bekannte Jervin, das Alkaloid X (später als 3-Glucosylcyclopamin identifiziert und als Cycloposin benannt) und ein drittes, dem Jervin ähnliches Steroidalkaloid, das in dieser Studie als mit Abstand aktivste Verbindung beim Nachwuchs von 40 trächtigen Schafen in 12 Fällen Zyklopie induzierte (Schema 1).



Schema 1. Strukturen von Veratramin, Jervin und Cycloposin.

Um die exakte Struktur der dritten Verbindung zu bestimmen, wurde mithilfe von IR- und UV-Spektroskopie zunächst die relative Ähnlichkeit zu den bekannten Steroidalkaloiden Jervin und Veratramin nachgewiesen. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung, der Elementaranalyse und der ^1H -NMR-Spektroskopie zeigten weitere Ähnlichkeiten zu Jervin. Der endgültige Strukturbeweis der Verbindung als 11-Desoxojervin gelang schließlich durch den Abbau von Jervin mithilfe einer Wolff-Kishner-Reduktion (Schema 2). Das so erhaltene Produkt war identisch mit



Schema 2. Wolff-Kishner-Reduktion von Jervin.

der fraglichen Verbindung. In Anlehnung an die Erzählungen Homers über die Irrfahrten des Odysseus und dessen Zusammentreffen mit dem Zyklopen Polyphem, benannte Keeler das 11-Desoxojervin als Cyclopamin.^[2]

Cyclopamin hat ein hexacyclisches Molekülgerüst aus vier anellierten Carbocyclen: drei sechsgliedrigen Ringen (A-, B- und D-Ring) und einem fünfgliedrigen Ring (C-Ring); ein hochsubstituiertes Furan bildet den E-Ring, der mit dem D-Ring spiro-verknüpft ist und zusätzlich an den F-Ring, einen Piperidinring mit sekundärem basischem Stickstoffatom,



Philipp Heretsch wurde 1982 in Lippstadt geboren. Er studierte Chemie an der Universität Leipzig und beendete kürzlich seine Promotion in der Arbeitsgruppe von Athanassios Giannis über die Synthese von Cyclopamin. Während seines Studiums und der Promotion war er Stipendiat des Fonds der Chemischen Industrie. 2008 erhielt er den Procter&Gamble-Förderpreis. Ab Sommer 2010 wird er bei K. C. Nicolaou als Postdoktorand arbeiten.

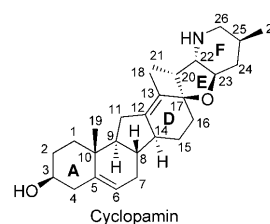


Lito Tzagkaroulaki wurde 1983 in Griechenland geboren. Von 2001 bis 2008 studierte sie Medizin in Athen. Seit 2008 fertigt sie an der Universität Leipzig in der Arbeitsgruppe von Athanassios Giannis ihre Dissertation über Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren und Modulatoren des Hh-Signaltransduktionswegs an.



Athanassios Giannis ist Chemiker und Arzt. Er wurde 1954 in Griechenland geboren und studierte von 1972 bis 1980 Chemie sowie von 1978 bis 1987 Medizin an der Universität Bonn. Er promovierte 1986 bei Konrad Sandhoff und habilitierte sich 1992 an der Universität Bonn für die Fächer Organische Chemie und Biochemie. Von 1998 bis 2002 war er C3-Professor an der Universität Karlsruhe. Seit 2002 ist er C4-Professor für Organische Chemie und Naturstoffchemie an der Universität Leipzig. Sein Forschungsgebiet ist die biologisch und medizinisch orientierte organische Chemie.

anelliert ist (Schema 3). Bei Cyclopamin handelt es sich also um ein seltenes Isosteroid („6-6-5-6-Struktur“). Die Molekülstruktur weist eine inhärente Instabilität auf, die durch das



Schema 3. Struktur von Cyclopamin mit Ring- und Kohlenstoffnummerierung.

Zusammenspiel der 12-13-Doppelbindung und des dadurch allylischen Furan-Sauerstoffatoms zustande kommt. Bei Umsetzung mit Lewis-Säuren oder bei $\text{pH} < 2$ wird die Spiroverknüpfung zu diesem Sauerstoffatom gebrochen und der D-Ring aromatisiert; dabei bildet sich das toxische Veratramin, das keinen der teratogenen Effekte des Cyclopamins aufweist.^[1] Nur ein Bruchteil des enthaltenen Cyclopamins

von *Veratrum californicum* bleibt nach Aufnahme und Passage durch den Magen strukturell intakt; diese Mengen genügen allerdings, um die beschriebenen Fehlbildungen auszulösen.

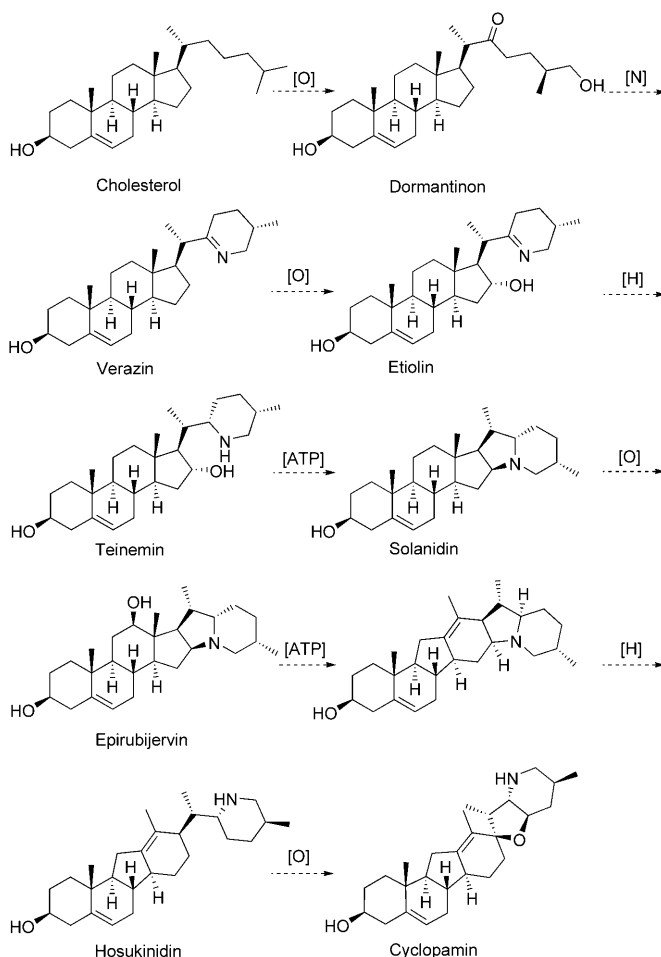
Während durch veränderte Weidestrategien das Auftreten der Zyklopie in den Herden schnell gebannt werden konnte, blieb der molekularbiologische Hintergrund und Wirkungsmechanismus dieses sonderbaren Moleküls weitere 25 Jahre lang unbekannt.

1.3. Biosynthese des Cyclopamins

Pflanzen aus der Gattung *Veratrum* enthalten fünf Typen von Steroidalkaloiden: die Solanidin-Alkaloide (Vertreter sind z.B. Solanidin, Rubijervin und Epirubijervin) und die Verazin-Alkaloide (mit Verazin und Etiolin als typischen Vertretern), die beide ein Steroidgerüst des klassischen Typs („6-6-6-5“) aufweisen, sowie die Veratramin-Alkaloide (mit Veratramin als Hauptvertreter), die Jervin-Alkaloide (mit Jervin und Cyclopamin als Vertreter) und schließlich die Cevanin-Alkaloide, die alle ein C-nor-D-homo-Steroidgerüst haben. Durch die Arbeiten von Tschesche und Kaneko^[3] an *Veratrum grandiflorum* konnte der biosynthetische Ursprung des Cyclopamins und der anderen *Veratrum*-Alkaloide in den späten 1960er und 1970er Jahren geklärt werden, indem Cholesterol durch Studien an ¹⁴C-markiertem Cholesterol und Acetat als Ausgangspunkt dieser Alkaloide identifiziert wurde. Dieses wird in der Pflanze in mehreren (teils nur angenommenen) Transformationen zunächst in die biosynthetische Stammverbindung dieser Klasse von Naturstoffen umgewandelt: das Solanidin. Hierbei bildet sich in einer Reihe oxidativer und reduktiver Prozesse zunächst ein Piperidin, das unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) den E-Ring des Solanidins schließt. Nachfolgend wird durch die Wirkung einer stereospezifischen Oxidase an der C-12-Position hydroxyliert, wobei die 12 α -Hydroxyverbindung (Rubijervin) im Rhizom angereichert wird. Die 12 β -Hydroxyverbindung (Epirubijervin) wird hingegen in den Blättern durch Konversion der Hydroxygruppe in eine Phosphat-Einheit als Abgangsgruppe in einer Wagner-Meerwein-Reaktion in das Grundgerüst der C-nor-D-homo-Steroidalkaloide umgelagert. Auch die Notwendigkeit von Licht für diese Umlagerung wurde diskutiert. Dieses Grundgerüst wird nun durch reduktive Öffnung des Pyrolidinrings (E-Ring) zum Husokinidin und schließlich durch oxidative Cyclisierung unter Bildung des Furans in Cyclopamin umgewandelt (Schema 4). Sowohl Jervin als auch Veratramin werden biosynthetisch aus Cyclopamin erzeugt, was durch Studien mit ¹⁴C-markiertem Cyclopamin belegt werden konnte.^[3]

1.4. Verfügbarmachung von Cyclopamin

„However, we believe that with this study, the evidence is in place to justify an effort to develop a supply [of cyclopamine] so that it can be tested in humans.“ Auf diese Weise äußerte sich Philip A. Beachy in einem Interview am Howard Hughes Medical Institute im Jahre 2002^[31] zur Notwendigkeit der



Schema 4. Biosynthese von Cyclopamin aus Cholesterol in *Veratrum grandiflorum*.

Verfügbarmachung größerer Mengen von Cyclopamin zu akzeptablen Preisen.

Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten zur Realisierung dieses Vorhabens: die Entwicklung eines verlässlichen Verfahrens zur Extraktion von Cyclopamin aus *Veratrum californicum* oder die Entwicklung eines präparativen Zugangs zu Cyclopamin. Zu beiden Ansätzen wurden seit Mitte der 1960er Jahre Studien durchgeführt, allerdings gelang es erst in jüngster Zeit, sowohl mit einem modernen Extraktionsverfahren als auch mit einer chemischen Synthese den Ansprüchen an Effizienz, Wirtschaftlichkeit und Durchführbarkeit gerecht zu werden.

1.4.1. Extraktion aus *Veratrum californicum*

Keelers frühe Extraktionsversuche gingen von getrockneten und gemahlenden Wurzeln und Wurzelstöcken von *Veratrum californicum* aus. Dieses Material wurde mit Ammoniakwasser eingeweicht und anschließend mehrfach mit Benzol extrahiert. Die nach weitestgehender Entfernung des Lösungsmittelgemisches erhaltene Kristallfraktion wurde mithilfe mehrfacher Chromatographie und anschließender Umkristallisationen in die reinen Alkaloide Cyclopamin und

Veratramin aufgetrennt. Dieses Verfahren ergab eine Ausbeute von 320 mg Cyclopamin pro kg getrockneten Pflanzenmaterials.^[2]

Kürzlich konnten Cooper et al. eine deutliche Ertragssteigerung bei diesem Verfahren erreichen, indem sie getrocknetes Pflanzenmaterial mit Ammoniakwasser einweichten und die Alkaloide anschließend durch Soxhlet-Extraktion (Benzol als Extraktionsmittel) extrahierten. Nach Entfernen des Lösungsmittels konnte durch zweimalige chromatographische Reinigung, Fällung in Aceton und zweimaliges Umkristallisieren aus Ethanol/Wasser reines Cyclopamin in einer Ausbeute von 1.3 g pro kg getrockneten Pflanzenmaterials gewonnen werden. Da ein durchschnittlicher Gehalt an Cyclopamin in getrockneten Wurzeln von *Veratrum californicum* von 2.34 g pro kg vorliegt, ist dieses Verfahren mit einer Ausbeute von 55 % vergleichsweise effizient.^[4] Problematisch ist allerdings – besonders für eine Isolierung von Cyclopamin in größeren Mengen – die Verwendung von Benzol im Dekaliter-Maßstab.

1.4.2. Präparative Zugänge

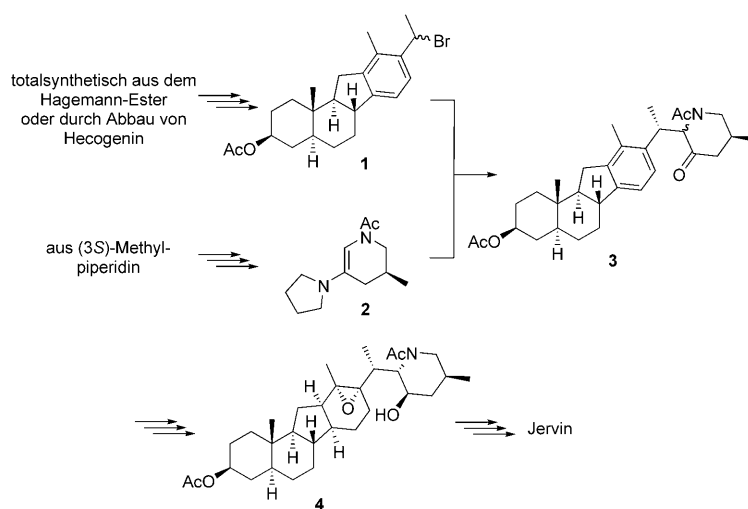
In den 1960er Jahren entwickelten die Gruppen um Masamune und Johnson einen totalsynthetischen Zugang zu Jervin, die Gruppe um Kutney folgte in den 1970er Jahren mit einer verbesserten Synthese eines Intermediates der ursprünglichen Route zu Jervin.^[5,6] Da Jervin mithilfe einer Wolff-Kishner-Reduktion einstufig in mäßiger Ausbeute in Cyclopamin umgewandelt werden kann, entsprechen diese Synthesen in formaler Weise einem Zugang zu Cyclopamin. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich eine Syntheseroute zu Cyclopamin ausgehend von kommerziell erhältlichem Dehydroepiandrosteron vollenden.^[7]

Masamune und Johnson entwickelten ausgehend vom Hagemann-Ester als Vorstufe des *C*-nor-*D*-homo-Steroids sowie (3*S*)-Methylpiperidin als Vorstufe des Alkaloidteils einen konvergenten Zugang zu Jervin. Aus dem Hagemann-Ester wurde über eine Wilds-Stoutamire-Anellierung und zwei Robinson-Anellierungen sowie mehrfache Angleichung

des Oxidationsniveaus die *C*-nor-*D*-homo-Steroidsstruktur zunächst in racemischer Form erhalten. An dieser Stelle erfolgte eine Racematspaltung, und das so erhaltene optisch reine Material entsprach jenem, das bereits durch Abbau und Umlagerung von Hecogenin in größerer Menge erhalten worden war. Als entscheidender Schritt schloss sich nun die Kupplung mit einer Alkaloidvorstufe an. Zu diesem Zweck wurde das Enamin **2** mit dem Bromid **1** gekuppelt. Diese Reaktion verlief nicht diastereoselektiv und ergab das gewünschte Diastereomer in einer Ausbeute von lediglich 5 %. Das so synthetisierte Veratraminderivat **3** wurde durch weitere Manipulationen der Oxidationsstufe in das Epoxid **4** umgewandelt, das nachfolgend durch Angriff des sekundären Alkoholats an der C-23-Position nucleophil geöffnet wurde. Es schlossen sich weitere oxidative und reduktive Prozesse hin zum Jervin an (Schema 5).^[5]

Diese erste Synthese des Cyclopamins zeigt klar die Probleme auf, die mit einem solchen Unterfangen verbunden sind: Eine konvergente Strategie muss eine effiziente und diastereoselektive Kupplungsmethode nutzen. Dies gelang den Autoren nicht. Eine Gesamtausbeute der Syntheseroute kann in diesem Zusammenhang nur abgeschätzt werden, da nicht für alle Stufen entsprechende Daten vorliegen; sie muss als ca. 0.001 % ausgehend von **1** angenommen werden. Mit diesem Ergebnis wird die Strategie modernen Ansprüchen an Effizienz, Eleganz und Ökonomie nicht gerecht, ist aber im Hinblick auf die Möglichkeiten der damaligen Zeit durchaus eine gute Leistung.

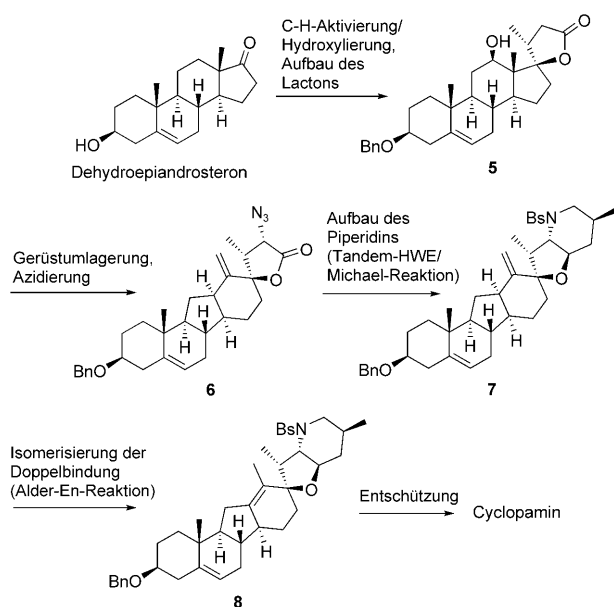
Die aus den 1970er Jahren stammende Formalsynthese von Kutney et al. macht ein fortgeschrittenes Intermediat der Masamune/Johnson-Route verfügbar. Ebenfalls in konvergenter Weise liefert die Kupplung eines lithiierten Picolins mit einem *C*-nor-*D*-homo-Steroid-Enon das Kupplungsprodukt in deutlich besserer Ausbeute (62 %) als die ursprüngliche Strategie, allerdings ebenfalls als Gemisch der C-20-Epimere. Da es nachfolgend gelingt, das Pyridinsystem zum Piperidin mit korrekter Konfiguration zu hydrieren (Ausbeute 18 % nach Abtrennung der Isomere), ist eine Steigerung der Ausbeute gegenüber jener der Ursprungsrouten er-



Schema 5. Synthese von Jervin nach Masamune, Johnson et al.

zielt worden.^[6] Da die Synthese aber nur das Problem der Fragmentkupplung auf neue Weise löst und ansonsten der bekannten Herstellung nach Masamune/Johnson ähnelt, ist insgesamt allerdings weder ein kürzerer noch ein deutlich effizienterer Zugang geschaffen worden.

Mit einer biomimetischen und vollständig diastereoselektiven Syntheseroute gelang es unserer Gruppe kürzlich, einen direkten präparativen Zugang zu Cyclopamin zu eröffnen, der nicht über Jervin verläuft.^[7] Diese Route liefert zunächst aus kommerziell verfügbarem Dehydroepiandrosteron in drei Stufen mithilfe Kupfer-katalysierter C-H-Aktivierung und Oxidation mit molekularem Sauerstoff ein 12 β -Hydroxysteroid, das in vier weiteren Stufen in das Lacton **5** umgewandelt wird. In einer Wagner-Meerwein-Umlagerung wird daraufhin das C-nor-D-homo-Steroidsystem erzeugt und nachfolgend das Lacton α -azidiert. In sieben Stufen erfolgt nun der Aufbau des Piperidinrings zum Cyclopaminderivat **7** mit exocyclischer Doppelbindung. Die entscheidende Transformation hierfür ist eine vollständig diastereoselektiv verlaufende Tandemsequenz aus Horner-Wadsworth-Emmons-(HWE)- und intramolekularer Michael-Reaktion. Die abschließende Isomerisierung der Doppelbindung in die 12-13-Position gelingt in einer Alder-En-Reaktion mit *N*-Sulfinylbenzolsulfonamid und anschließender Entschwefelung. Eine Entschützung liefert schließlich Cyclopamin in insgesamt 20 Stufen und einer Gesamtausbeute von 1 % (Schema 6).

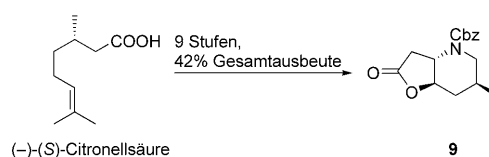


Schema 6. Biomimetische Synthese von Cyclopamin nach Giannis et al. Bn = Benzyl, Bs = Benzolsulfonyl.

Diese Strategie fußt auf dem bereits aus der Biosynthese vermuteten Konzept der Erzeugung des C-nor-D-homo-Steroidgerüsts durch C-H-Aktivierung/Oxidation in 12 β -Position und der Ringkontraktion/-expansion durch Überführung der erhaltenen Alkoholfunktion in eine Abgangsgruppe und ist damit biomimetisch. Des Weiteren umgeht sie das Problem der fehlenden Selektivität der Fragmentknüpfung bei einem konvergenten Ansatz. Sämtliche Reaktionen verlaufen unter

Substratkontrolle, was den Einsatz von chiralen Auxiliaren und Katalysatoren unnötig macht. Diese Syntheseroute eröffnet darüber hinaus den schnellen Zugang zu anders konfigurierten Cyclopaminderivaten, was grundlegende Aktivitätsstudien möglich machen wird. Hier ist insbesondere auf das Potenzial von Cyclopaminderivaten mit exocyclischer Doppelbindung zu verweisen, die eine höhere metabolische Stabilität als Cyclopamin aufweisen könnten und daher nicht wie dieses durch Aromatisierung des D-Rings in das toxische Veratramin umgewandelt werden sollten.

Kürzlich wurde von unserer Gruppe auch ein totalsynthetischer Zugang zu allen Diastereomeren der Piperidin-Alkaloid-Substruktur von Cyclopamin und allen anderen *Veratrum*-Alkaloiden erarbeitet.^[8] Diese Syntheseroute ermöglicht z.B. in einer neunstufigen Sequenz die Herstellung des korrekt substituierten Piperidinlactons **9**, das zusätzliche funktionelle Gruppen für eine Fragmentknüpfung trägt, in enantiomerenreiner Form (Schema 7). Da die Syntheseroute



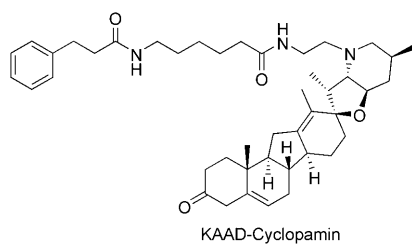
Schema 7. Synthese der Piperidin-Alkaloid-Substruktur von Cyclopamin. Cbz = Benzyloxycarbonyl.

ausgehend von Citronellsäure in einer Gesamtausbeute von 42 % verläuft, scheint diese Strategie als Ausgangspunkt für eine neuartige, konvergente Cyclopaminsynthese geeignet zu sein.

1.5. Derivate von Cyclopamin

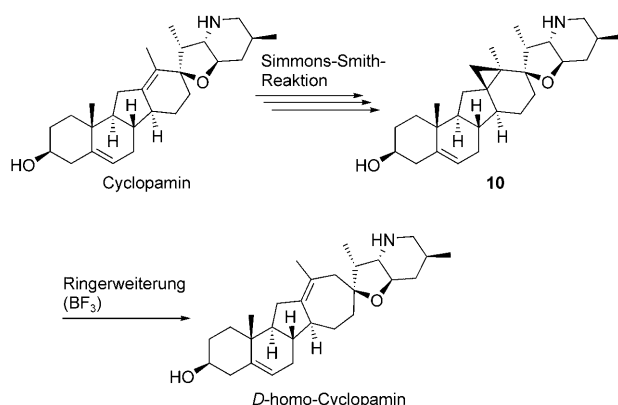
Infolge der Tatsache, dass Cyclopamin in den letzten Jahren dank verbesserter Verfahren zur Extraktion aus Pflanzenmaterial (siehe Abschnitt 1.4.1) wesentlich leichter verfügbar geworden ist – was eine Preissenkung um den Faktor 50 und einen problemlosen Erwerb von Mengen im Gramm-Maßstab mit sich gebracht hat –, hat die Zahl semisynthetischer Cyclopaminderivate deutlich zugenommen. Bei den bisher synthetisierten Cyclopamin-ähnlichen Strukturen handelt es sich um semisynthetische Derivate, also um aus natürlichem gewonnenem Cyclopamin durch chemische Modifikation erhaltene Verbindungen. Da bisher keine ausreichend effizienten (Total-)Syntheserouten zu Cyclopamin entwickelt wurden, gibt es noch keine vollsynthetischen Cyclopamin-Analoga.

KAAD-Cyclopamin (Schema 8), das erste Derivat, das sich insbesondere durch bessere Löslichkeit und um den Faktor 10–20 gesteigerte biologische Potenz auszeichnet, wurde in einer fünfstufigen Synthese ausgehend von natürlichem Cyclopamin erhalten.^[9] Inwieweit die nichtkonjugierte Doppelbindung in 5-6-Position unter physiologischen Bedingungen in eine Enongruppierung umgewandelt wird, ist bisher ungeklärt.



Schema 8. Struktur von KAAD-Cyclopamin.

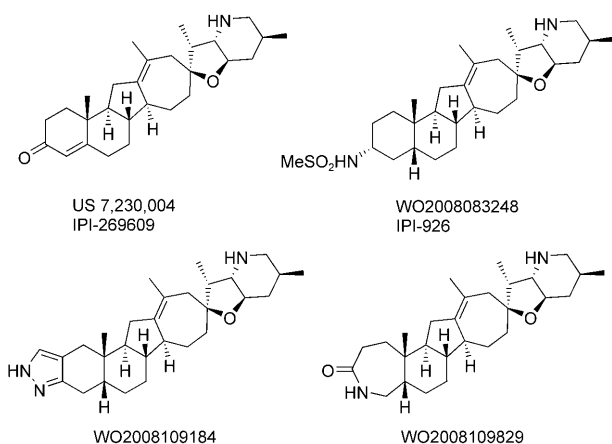
Bei Infinity Pharmaceuticals wurde eine mehrstufige Route zu *D*-homo-Cyclopaminderivaten, Verbindungen mit einem siebengliedrigen D-Ring, entworfen (Schema 9). Diese



Schema 9. *D*-Ringerweiterung von Cyclopaminderivaten.

Derivate sind nicht mehr so labil wie Cyclopamin, da keine Aromatisierung stattfinden kann und damit die Triebkraft für den Bruch des Allyl ethersystems fehlt. Eine Vielzahl derartiger Derivate wurde mittlerweile synthetisiert und patentiert sowie auf ihr biologisches Profil untersucht; einige Vertreter sind in Schema 10 gezeigt.^[10] Unter Anwendung des Konzepts der Klick-Chemie gelang weiterhin die Synthese einer Reihe von Kohlenhydrat-Cyclopamin-Konjugaten.^[11]

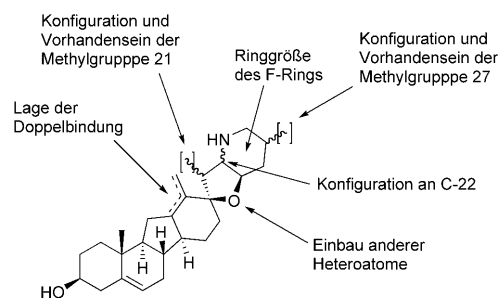
Winkler et al. stellten in vier Stufen ein stark vereinfachtes Cyclopamin-Analogon ausgehend von Östron her. Dabei



Schema 10. Struktur einiger *D*-homo-Ringderivate von Cyclopamin.

wurde auf die *C*-nor-*D*-homo-Steroidstruktur verzichtet, an die Stelle des Piperidins trat ein Pyridin und an die Stelle des Homoallylkohols ein Phenol. Dieses Derivat zeigte biologische Wirksamkeit, obwohl die Veränderungen sowohl struktureller Natur waren als auch Einfluss auf Polarität und Acidität hatten.^[12]

Ausgehend von unserer Cyclopaminsynthese^[7] könnte durch Verzicht auf die finale Isomerisierung der Doppelbindung mithilfe der Alder-En-Reaktion ein Cyclopaminderivat mit exocyclischer Doppelbindung hergestellt werden. Darüber hinaus ermöglicht unsere Synthesestrategie die flexible Einführung der Methylgruppen in Position 21 und 27 mit unterschiedlichen Konfigurationen sowie die Variation der Konfiguration des Stickstoff-substituierten Stereozentrums an C-22, die Herstellung vereinfachter Derivate ohne die genannten Methylgruppen, die Erzeugung unterschiedlicher F-Ringgrößen und die Einführung verschiedener Heteroatome in den E-Ring; damit kann eine Vielzahl von Cyclopaminanaloga erschlossen und auf ihre biologische Potenz zur Ableitung grundlegender Struktur-Aktivitäts-Beziehungen untersucht werden (Schema 11).



Schema 11. Variationsmöglichkeiten der Cyclopaminsynthese nach Giannis et al.

2. Biologische Eigenschaften von Cyclopamin

In den späten 1970er Jahren führten Nüsslein-Volhard und Wieschaus großangelegte Studien am Europäischen Molekularbiologischen Laboratorium in Heidelberg über Mutationen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* durch und identifizierten mehr als 50 Gene, die direkte Bedeutung für die Embryonalentwicklung haben. Eines dieser Gene führt, wenn es fehlerhaft ist, zu Fruchtfliegenlarven mit stacheligem Aussehen. Die Ähnlichkeit dieser Larven mit Igel gab diesem Gen den Namen *hedgehog* (*Hh*). Für ihre bahnbrechenden Beiträge auf dem Feld der Genetik der frühen Embryonalentwicklung wurde Christiane Nüsslein-Volhard und Eric F. Wieschaus zusammen mit Edward B. Lewis 1995 der Nobelpreis für Medizin verliehen.^[13]

Das *hedgehog*-Gen kodiert für drei einzigartige Proteine, Shh (Sonic hedgehog), Ihh (Indian hedgehog) und Dhh (Desert hedgehog), die als Liganden des membran-gebundenen Rezeptors Patched (eines zwölf transmembranäre Helices umfassenden Proteins) den hedgehog-Signal-

transduktionsweg steuern und schließlich zur Transkription verschiedener *hedgehog-response*-Gene führen. Der Hh-Signaltransduktionsweg umfasst eine Abfolge repressiver Interaktionen. In Abwesenheit von Hh-Liganden ist das membrangebundene Protein Patched1 (Ptc1) an der Basis der primären Zilien der Zellmembran (in der Nähe des Zentrosoms) lokalisiert. Zilien sind herausragende Gebilde der Zellmembran und kommen auf nahezu jeder eukaryotischen Zelle jeweils in einer Kopie vor. Sie sind an der Wahrnehmung mechanischer und chemischer Reize beteiligt und haben entscheidende Bedeutung als Kommunikationsschaltstellen der Zelldifferenzierung und -polarität. Ptc1 verhindert an der Zilienbasis in einem noch ungeklärten Mechanismus die Translokation des transmembranären Rezeptors Smoothed (Smo; bestehend aus sieben transmembranären Helices) aus intrazellulären Kompartimenten in die Zilien. Damit bleibt SuFu (der Suppressor des Proteins Fused), ein Negativ-Regulator des Hh-Weges, aktiv, was schließlich zur proteosomalen Spaltung der Gli2- und Gli3-Transkriptionsfaktoren und ihrer Überführung in die Repressor-Form führt. Diese Gli2/3R-Faktoren verhindern die Transkription der *hedgehog-response*-Gene. Viele dieser Schritte sind bis heute wenig verstanden, neue Studien lassen allerdings darauf schließen, dass die Translokation von Smo aus den Endosomen hin zur Zilienmembran unterbunden wird, indem die Lipidzusammensetzung dieser Kompartimente durch Ptc1 verändert wird.^[14a]

Ist ein Hh-Ligand zugegen, bindet dieser an Ptc1 und sorgt für dessen Translokation heraus aus den primären Zilien und für seinen Abbau in den Lysosomen. Damit wird der Eintritt von Smo in die Zilien ermöglicht, wo es als Aktivator des Hh-Weges den Abbau von Gli2 und Gli3 verhindert. Aktives Gli2 (und in schwächerer Ausprägung Gli3) bindet daraufhin an Gli-Promotoren im Zellkern und ermöglicht die Transkription der *hedgehog-response*-Gene.^[14]

Das *hedgehog*-Gen ist von der Fruchtfliege bis zum Menschen konserviert und wird heute als Schlüsselregulator der Embryonalentwicklung angesehen. Bei Insekten kontrolliert der Hh-Signalweg den korrekten Ablauf der Segmentierung und Flügelbildung, bei den höheren Tieren wiesen Tabin et al. 1993 die Existenz des *Shh*-Gens nach.^[15a] Dort induziert der Hh-Weg die bilaterale Symmetrie und ist für die korrekte Ausbildung der Gliedmaßen, des Skeletts, der Muskulatur, der Haut, der Augen, der Lunge, der Zähne, des Nervensystems und des Gastrointestinaltrakts sowie für die Differenzierung von Sperma- und Knorpelzellen verantwortlich.

Während ihrer Beschäftigung mit dem Hh-Signaltransduktionsweg suchten Beachy et al. eine einfache Möglichkeit der Kontrolle dieses Weges, die nicht auf dem Knockout einzelner Gene der studierten Lebensform beruhte. Die Verwendung kleiner Moleküle als biochemische Sonden bot sich als eine einfache und schnelle Alternative an. Allerdings waren zu diesem Zeitpunkt keine entsprechenden Moleküle bekannt, die steuernd auf den Hh-Signaltransduktionsweg einwirken.

Beachy et al. gelang nun die Verknüpfung zweier scheinbar grundverschiedener wissenschaftlicher Bereiche zur Lösung dieses Problems: Die Vorgänge in Idaho in den 1950er

Jahren waren bisher eine Fußnote der Wissenschaftsgeschichte geblieben. Es war aber bekannt, dass auch in schweren Fällen des Smith-Lemli-Opitz-Syndroms (einer Störung der Cholesterol-Biosynthese durch eine stark eingeschränkte Aktivität der 7-Dehydrocholesterol-Reduktase) Holoprosencephalie beobachtet wird. Beachy et al. vermuteten zunächst, dass Cyclopamin ein Inhibitor der Cholesterol-Biosynthese sei (ein Gedanke, der durch die Strukturähnlichkeit dieser Moleküle gestützt wurde). Diese erste Annahme stellte sich jedoch nachfolgend als falsch heraus. Tatsächlich gelangten Beachy et al. bei nachfolgenden Studien im Jahr 1998 zur Erkenntnis, dass Cyclopamin mit dem Protein Smo des Hh-Signaltransduktionsweges wechselwirkt und selbst in Gegenwart von Hh-Liganden die Aktivität des Hh-Weges unterdrückt. Hierzu bindet Cyclopamin an Smo und unterdrückt dessen Aktivität durch eine Konformationsänderung. Allerdings ist der Hh-Weg wegen der Notwendigkeit der C-terminalen Cholesteroylesterung der Hh-Liganden in deren Reifungsprozess generell auch von Cholesterol und seinen metabolischen Produkten abhängig; zusätzlich findet N-terminal eine Palmitoylierung statt (Abbildung 1).^[15]

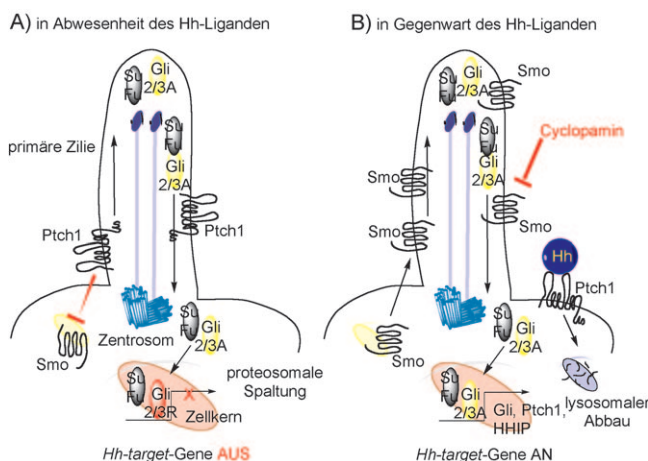


Abbildung 1. Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg. A) In Abwesenheit des Hh-Liganden verhindert Ptc1 die Translokation von Smo zu den primären Zilien; damit bleibt SuFu aktiv, was zur proteosomalen Spaltung der Gli2/3-Transkriptionsfaktoren und der Verhinderung der Transkription der *Hh-target*-Gene führt. B) Die Gegenwart des Hh-Liganden inhibiert Ptc1, was die Aufnahme von Smo in die Zilien ermöglicht; dort wird SuFu inhibiert, und die aktive Form der Gli2/3-Faktoren kann im Zellkern die Transkription der *Hh-target*-Gene initiieren; Cyclopamin inhibiert die Aktivität von Smo und sorgt für einen desaktivierten Hh-Weg. Weitere Details siehe Text; Schema modifiziert nach Lit. [14b].

Wird Cyclopamin von trächtigen Schafen aufgenommen, wird die Embryonalentwicklung, die zu bestimmten Zeiten (z. B. dem 14. Tag der Schwangerschaft) die Aktivität des Hh-Signaltransduktionsweges benötigt, entscheidend gestört; die Auswirkungen sind jene Fehlbildungen, wie sie in Idaho auftraten.

3. Medizinische Bedeutung von Cyclopamin und dem Hedgehog-Signaltransduktionsweg

Der Hh-Signaltransduktionsweg hat entscheidenden Anteil an einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen sowie der Stammzellenregulation, -proliferation und -differenzierung. Da die fehlerhafte Aktivierung des Hh-Weges zu malignen Veränderungen wie Basalzellkarzinom, Medulloblastom, Rhabdomyosarkom, Prostata-, Pankreas- und Brustkrebs führt, bietet die Inhibierung des Hh-Weges eine neue Möglichkeit der Therapie dieser Krankheiten. Inhibitoren des Hh-Weges (HPI) erwiesen sich als effektiv sowohl bei In-vitro-Studien an Krebszell-Linien als auch im Tiermodell. Darüber hinaus konnte die Wirksamkeit dieser Inhibitoren auch in klinischen Studien nachgewiesen werden. In diesem Abschnitt sollen einige Aspekte und Prinzipien der Beteiligung des Hh-Weges an der Entstehung von Krebs sowie bedeutende Entwicklungen auf diesem Gebiet vorgestellt werden. Eine ausführliche Darstellung geht allerdings über die Zielsetzung dieses Kurzaufsatzes hinaus, der interessierte Leser sei auf einige exzellente Übersichtsartikel verwiesen.^[16] Zum Abschluss sollen einige Resultate (prä)klinischer Studien zur Verwendung von Smo-Inhibitoren in der Krebstherapie vorgestellt werden.

3.1. Modelle der Krebsentstehung unter Hedgehog-Beteiligung

Die neuere Literatur^[17] diskutiert drei Modelle der Hh-Beteiligung an der Krebsentstehung (Abbildung 2):

- A) Maligne Veränderungen des Typs 1 (Ligand-unabhängig, ausgelöst durch Mutationen der beteiligten Proteine) wurden als Erstes entdeckt. Patienten mit dem Gorlin-Syndrom, das dieser Kategorie angehört, zeigen eine

hohe Inzidenz für die Entstehung eines Basalzellkarzinoms (BCC), Medulloblastoms und Rhabdomyosarkoms. Die molekulare Ursache für die Entwicklung dieser Krebsarten ist eine erbliche Mutation von *Ptch1*, die zur Inaktivität des Proteins (durch Verlust der Heterozygotie und/oder inaktivierende Mutationen) führt. Dies resultiert in einer konstitutiven Aktivierung des Hh-Weges, auch in Abwesenheit von Hh-Liganden. Patienten mit dem Gorlin-Syndrom sind ausgezeichnete Kandidaten für die Therapie mit Inhibitoren von Smo oder nachgeschalteten Komponenten des Hh-Weges.

- B) Maligne Veränderungen des Typs 2 sind abhängig von autokrin sezernierten Hh-Liganden. Hh-Liganden werden also von derselben Tumorzelle sezerniert und akzeptiert. Ein abschließender Beweis für das Auftreten dieses Typs in menschlichen Krebszellen des Dickdarms konnte erst kürzlich erbracht werden.^[18]
- C) Maligne Veränderungen des Typs 3 sind abhängig von parakrin sezernierten Hh-Liganden. Neue Studien zeigen, dass in der Mehrheit Hh-abhängiger Tumoren eine Überproduktion der Hh-Liganden vorliegt. Diese stimulieren nahe gelegene Stromazellen (Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten und Immunzellen). Dies führt zu einer indirekten Unterstützung des Tumorwachstums durch Mechanismen, deren Ursprünge in den Stromazellen liegen. Solche Mechanismen umfassen die Unterstützung der Tumorzellen einschließlich der Tumorstammzellen, die Stimulation der Tumorangiogenese, die Beeinflussung der extrazellulären Matrix und die Ausschüttung molekularer Komponenten anderer Signalwege, z. B. des insulin-like growth factor (IGF) und von Wnt.
- D) Eine Variante dieses Typs ist der „invers-parakrine“ Typ (Typ 3b), bei dem Stromazellen durch eine Überproduktion von Hh-Liganden das Wachstum eines Tumors anregen.

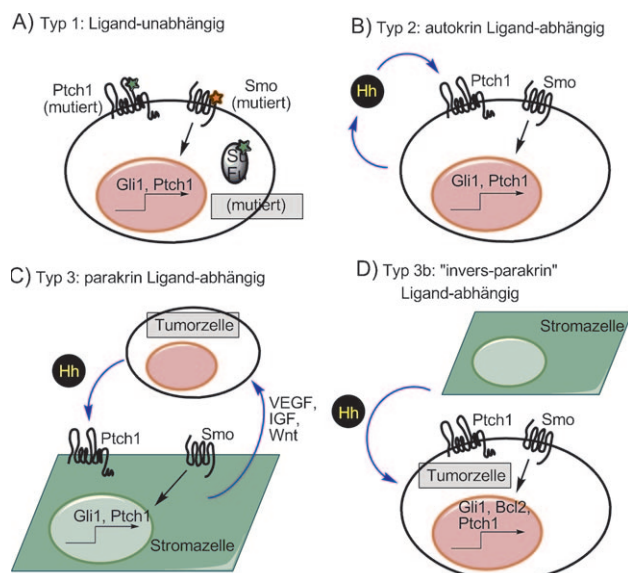


Abbildung 2. Modelle für die Krebsentstehung unter Beteiligung des Hh-Weges; auf die Darstellung der Zilien wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Weitere Details siehe Text; Schema modifiziert nach Lit. [14b].

3.2. Behandlung von Pankreaskarzinomen mit Cyclopamin und seinen Derivaten

Mehr als 90 % aller Pankreaskarzinome sind Adenokarzinome des ductalen Typs. Sie sind geschlechtsunabhängig die vierthäufigste krebssbedingte Todesursache in den USA. Metastasierende Pankreaskarzinome sprechen fast niemals auf die Gabe heute verfügbarer Medikamente an, und die Überlebenswahrscheinlichkeit in einem Fünfjahreszeitraum liegt bei unter 2 %. Selbst bei im Frühstadium erkanntem und lokal begrenztem Pankreaskrebs, der chirurgisch entfernt werden kann, entwickelt die Mehrzahl der Patienten einen Rezidiv an gleicher Stelle oder als Metastasen in anderen Organen.^[19] Intensive Forschungsarbeiten der letzten Jahre mit dem Ziel der Entwicklung neuartiger Therapiestrategien für metastasierende Tumoren werden unzweifelhaft einen bedeutenden Einfluss auf die Klinik haben: Eine kürzlich durchgeführte Studie unter Einsatz globaler Sequenzanalysen identifizierte den Hh-Weg als einen der zentralen Signaltransduktionswege, die der somatischen Veränderung bei nahezu allen Pankreaskarzinomen unterliegen.^[20] Die Verwendung von Cyclopamin als Inhibitor des Hh-Weges im

genetisch induzierten Mausmodell des Pankreaskarzinoms führte zur Verringerung der Sterblichkeit bei gleichzeitiger Hemmung der Metastasierung orthotopischer Xenotransplantate.^[21] Diese Studie validiert den Hh-Weg als Angriffspunkt für neuartige Therapeutika zur Behandlung des Pankreaskarzinoms; der Hh-Weg sollte also unbedingt in entsprechende klinische Studien einbezogen werden.

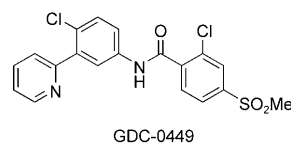
Da Cyclopamin eine vergleichsweise geringe Affinität zu Smo hat, darüber hinaus wegen geringer metabolischer Stabilität nicht oral verabreicht werden kann und eine suboptimale Pharmakokinetik aufweist, wurde das Derivat IPI-269609 (Schema 10) entwickelt. Dieses ist ähnlich wirksam, ist dabei aber metabolisch stabiler und hat günstigere physikochemische Eigenschaften. IPI-269609 unterdrückte vollständig die Metastasierung orthotopischer Xenotransplantate aus humanen Pankreas-Krebszelllinien. Das später entwickelte IPI-926 (Schema 10) zeigt ein weiter verbessertes pharmakokinetisches Profil und ist von substanziell höherer Potenz als Cyclopamin. An einem genetisch erzeugten Mausmodell mit hochinvasivem Pankreaskrebs konnten Olive et al.^[22] eine deutlich erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit bei einer Kombinationsgabe aus IPI-926 und Gemcitabin bei vorliegender Gemcitabinresistenz nachweisen. Diese Studie unterstreicht die Bedeutung der Inhibition des Hh-Weges in Stromazellen maligner Tumoren, die sich in der Abnahme der Dichte des fibrotischen Gewebes der Tumoren widerspiegelt. Zusätzlich erhöht IPI-926 die Neovaskularisation des Tumors, was zu einer verbesserten Verteilung des Gemcitabins an die malignen Zellen führt. Insgesamt profitieren also besonders Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskrebs von der Inhibition des Hh-Weges.

3.3. Ein Hedgehog-Weg-Inhibitor zur Behandlung von Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen

Das Basalzellkarzinom ist die häufigste Hautkrebsart in den USA mit einem Anteil von ca. 80 % an allen Nichtmelanomen; seine geschätzte jährliche Inzidenz liegt bei 0,1–0,5 %, ^[23] und es wird hauptsächlich durch UV-Strahlung verursacht. Während in den meisten Fällen eine Heilung durch chirurgische Entfernung des Tumors gelingt, entwickeln einige Patienten lebensbedrohliche inoperable Formen, die sowohl lokal fortschreiten als auch metastasieren. Aus den in Abschnitt 3.2 genannten Gründen bieten Hh-Inhibitoren auf der Ebene von Smo auch in diesem Fall wertvolle Therapieansätze. Eine lokale Behandlung von Basalzellkarzinomen mit einer Formulierung von Cyclopamin als Creme wurde bei Patienten durchgeführt, die für einen operativen Eingriff vorgesehen waren; in sämtlichen Fällen entwickelten sich die behandelten Tumoren schnell zurück.^[24] Histologische und immunhistochemische Untersuchungen belegten die Hemmung der Proliferation und die effiziente Induktion der Differenzierung und Apoptose der Tumorzellen. Die hohe Selektivität und Effizienz durch kurzzeitige Inhibition des Hh-Weges in diesen Tumoren zeigen einen rationalen Ansatz für die Behandlung des Basalzellkarzinoms auf.

Kürzlich wurde 33 Patienten mit metastasierendem oder lokal fortgeschrittenem BCC die Verbindung GDC-0449 oral

verabreicht. GDC-0449 ist ein niedermolekularer Inhibitor des Proteins Smo, dessen Struktur (Schema 12) sich von der Cyclopaminstruktur unterscheidet.^[25] Von den 33 behandel-



Schema 12. Struktur von GDC-0449.

ten Patienten sprachen 18 auf die Behandlung an, was mithilfe bildgebender Verfahren und/oder physischer Untersuchung in elf Fällen belegt wurde. Von diesen Patienten sprachen zwei sehr gut, 16 anteilig auf die Behandlung an. Die anderen Patienten zeigten entweder gleich bleibende Tumorgöße (15 Fälle) oder, in vier Fällen, einen progredienten Krankheitsverlauf. Es wurde keine Toxizität festgestellt, die die zu verabreichende Dosis beschränken würde. Zusammenfassend zeigt GDC-0449 antitumorale Wirkung bei lokal fortgeschrittenem und metastasierendem BCC. Dies bestätigt die Beteiligung des Hh-Weges bei Basalzellkarzinomen und unterstreicht die Nützlichkeit der Inhibition dieses Weges bei ansonsten inoperablen Tumoren.

GDC-0449 wurde darüber hinaus bei der Therapie des Medulloblastoms eingesetzt.^[26] Medulloblastome sind die häufigsten embryonalen Tumoren bei Kindern; sie werden im Mittel um das fünfte Lebensjahr diagnostiziert, treten aber bis in das frühe Erwachsenenalter auf. Ihre Therapie umfasst eine operative Entfernung mit anschließender Strahlen- und Chemotherapie. Diese Behandlungen haben ernste Nebenwirkungen, darunter neurokognitive Defizite, Endokrinopathien, Sterilität sowie ein erhöhtes Risiko von sekundären hochgradigen Gliomen und Meningiomen.^[27] Bei der erwähnten Studie zeigte ein 26-jähriger Mann trotz wiederholter Therapie ein wiederkehrendes metastasierendes Medulloblastom. Die Behandlung mit GDC-0449 hatte einen zwar schnellen, aber nur kurzzeitigen Rückgang des Tumors bei gleichzeitiger deutlicher Abschwächung der Symptomatik zur Folge. Eine vor der Behandlung durchgeführte genetische Analyse des Tumorgewebes deutete auf einen vorliegenden Verlust der Heterozygotie und somatische Mutation des *Ptch1*-Gens hin. Um die Art der vorliegenden Resistenz des Medulloblastoms gegen die GDC-0449-Behandlung zu bestimmen, wurden die am Hh-Weg beteiligten Gene nach weiterem Fortschreiten der Krankheit analysiert.^[28] Die Autoren identifizierten einen Aminosäure-Austausch eines konservierten Aspartatrestes in Smo, der keinen Einfluss auf die Aktivität des Hh-Weges hatte, aber eine Wechselwirkung mit dem Inhibitor GDC-0449 unterband. Die gleiche Mutation wurde künstlich im Mausmodell erzeugt und führte auch dort zu einem GDC-0449-resistenten Medulloblastom. Diese Befunde zeigen, dass erworbene Mutationen in transmembranären Rezeptoren mit Eigenschaften, die jenen der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ähneln, als Erklärungsmodell für die Resistenzentwicklung bei Tumoren im Menschen dienen können. Diese Mutationen haben keinen Einfluss auf

den Hh-Weg selbst; dies unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung von Smo-Inhibitoren der 2. Generation, die erworbene Resistenzen überwinden können, sowie der Identifizierung von Inhibitoren für Signalmoleküle an späterer Stelle des Hh-Weges.^[29]

Alle diese klinischen Studien kennzeichnen den Hh-Signaltransduktionsweg als wichtigen Angriffspunkt einer neuen Klasse von Therapeutika mit weitreichender Bedeutung für die Onkologie.^[30]

4. Zusammenfassung

Die Geschichte des Cyclopamins begann 1957 mit einer verstörenden Entdeckung und wäre möglicherweise nach der Lösung dieses Problems eine Fußnote in der Wissenschaftsgeschichte geblieben. Erst das Zusammenspiel verschiedener Disziplinen aus der Chemie, Biologie und Medizin verhalf Cyclopamin zu einer zweiten Blüte. Nur aufbauend auf den grundlegenden Arbeiten von Keeler und James einerseits sowie jenen von Nüsslein-Volhard und Wieschaus andererseits konnte Beachy zur entscheidenden Schlussfolgerung gelangen und den Grundstein für ein Tumorthapeutikum legen, dessen Potenzial noch lange nicht ausgeschöpft ist. Diese Entwicklung dauert nun 50 Jahre an und kann als Paradebeispiel für eine nicht geradlinig verlaufende Forschung aufgefasst werden, die den genauen und ausdauernden Beobachter belohnt.

Eingegangen am 10. Dezember 2009

Online veröffentlicht am 6. April 2010

- [1] a) R. F. Keeler, *J. Agric. Food Chem.* **1969**, *17*, 473–482; b) L. F. James, K. E. Panter, W. Gaffield, R. J. Molyneux, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3211–3230.
- [2] R. F. Keeler, *Phytochemistry* **1968**, *7*, 303–306.
- [3] a) K. Kaneko, H. Mitsuhashi, K. Hirayama, N. Yoshida, *Phytochemistry* **1970**, *9*, 2489–2495; b) K. Kaneko, H. Mitsuhashi, K. Hirayama, S. Ohmori, *Phytochemistry* **1970**, *9*, 2497–2501; c) K. Kaneko, H. Seto, C. Motoki, H. Mitsuhashi, *Phytochemistry* **1975**, *14*, 1295–1301; d) K. Kaneko, M. W. Tanaka, H. Mitsuhashi, *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1391–1393; e) K. Kaneko, M. W. Tanaka, H. Mitsuhashi, *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1247–1251; f) R. Tschesche, H. Hulpke, *Z. Naturforsch. B* **1966**, *21*, 494–495.
- [4] J. E. Oatis, Jr., P. Brunfeldt, J. W. Rushing, P. D. Moeller, D. W. Bearden, T. N. Gallien, G. Cooper IV, *Chem. Cent. J.* **2008**, *2*, 12.
- [5] a) T. Masamune, Y. Mori, M. Takasugi, A. Murai, S. Ohuchi, N. Sato, N. Katsui, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1965**, *38*, 1374–1378; b) T. Masamune, M. Takasugi, A. Murai, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4521–4523; c) W. S. Johnson, J. M. Cox, D. W. Graham, H. W. Whitlock, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4524–4526.
- [6] a) J. P. Kutney, A. By, J. Cable, W. A. F. Gladstone, T. Inaba, S. Y. Leong, P. Roller, E. J. Torupka, W. D. C. Warnock, *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 1775–1795; b) J. P. Kutney, J. Cable, W. A. F. Gladstone, H. W. Hanssen, G. V. Nair, A. E. J. Torupka, W. D. C. Warnock, *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 1796–1817.
- [7] A. Giannis, P. Heretsch, V. Sarli, A. Stöbel, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8052–8055; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7911–7914.
- [8] P. Heretsch, S. Rabe, A. Giannis, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5410–5412.
- [9] J. Taipale, J. K. Chen, M. K. Cooper, B. Wang, R. K. Mann, L. Milenkovic, M. P. Scott, P. A. Beachy, *Nature* **2000**, *406*, 1005–1009.
- [10] a) M. R. Tremblay, M. Nevalainen, S. J. Nair, J. R. Porter, A. C. Castro, M. L. Behnke, L.-C. Yu, M. Hagel, K. White, K. Faia, L. Grenier, M. J. Campbell, J. Cushing, C. N. Woodward, J. Hoyt, M. A. Foley, M. A. Read, J. R. Sydor, J. K. Tong, V. J. Palombella, K. McGovern, J. Adams, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6646–6649; b) M. R. Tremblay, A. Lescarbeau, M. J. Grogan, E. Tan, G. Lin, B. C. Austad, L.-C. Yu, M. L. Behnke, S. J. Nair, M. Hagel, K. White, J. Conley, J. D. Manna, T. M. Alvarez-Diez, J. Hoyt, C. N. Woodward, J. R. Sydor, M. Pink, J. MacDougall, M. J. Campbell, J. Cushing, J. Ferguson, M. S. Curtis, K. McGovern, M. A. Read, V. J. Palombella, J. Adams, A. C. Castro, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4400–4418; c) M. R. Tremblay, M. Nesler, R. Weatherhead, A. C. Castro, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2009**, *19*, 1039–1056.
- [11] J. Zhang, M. Garrossian, D. Gardner, A. Garrossian, Y.-T. Chang, Y. K. Kim, C.-W. T. Chang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1359–1363.
- [12] J. D. Winkler, A. Isaacs, L. Holderbaum, V. Tatar, N. Dahmane, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2824–2827.
- [13] a) C. Nüsslein-Volhard, E. F. Wieschaus, *Nature* **1980**, *287*, 795–801; b) C. Nüsslein-Volhard, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2316–2328; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2176–2187.
- [14] a) H. Khaliullina, D. Panáková, C. Eugster, F. Riedel, M. Carvalho, S. Eaton, *Development* **2009**, *136*, 4111–4121; b) S. J. Scales, F. J. de Sauvage, *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 303–312; c) R. Rohatgi, M. P. Scott, *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 1005–1009; d) S. Tvorup, C. M. Ott, *Science* **2007**, *317*, 330–331; e) D. Huangfu, K. V. Anderson, *Development* **2006**, *133*, 3–14; f) Y. Wang, Z. Zhou, C. T. Walsh, A. P. McMahon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2623–2628.
- [15] a) R. D. Riddle, R. L. Johnson, E. Laufer, C. Tabin, *Cell* **1993**, *75*, 1401–1416; b) J. A. Porter, K. E. Young, P. A. Beachy, *Science* **1996**, *274*, 255–259; c) R. K. Mann, P. A. Beachy, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 891–923; d) R. Edison, M. Muenke, *Congenital Anomalies* **2003**, *43*, 1–21; e) M. K. Cooper, J. A. Porter, K. E. Young, P. A. Beachy, *Science* **1998**, *280*, 1603–1607; f) J. P. Incardona, W. Gaffield, R. P. Kapur, H. Roelink, *Development* **1998**, *125*, 3553–3562.
- [16] a) L. Yang, G. Xie, Q. Fan, J. Xie, *Oncogene* **2009**, *29*, 469–481; b) T. Curran, J. M. Y. Ng, *Nature* **2008**, *455*, 293–294; c) P. J. King, L. Guasti, E. Laufer, *J. Endocrinol.* **2008**, *198*, 439–450; d) S. Eaton, *Nat. Rev.* **2008**, *9*, 437–445; e) J. Taipale, P. A. Beachy, *Nature* **2001**, *411*, 349–354; f) L. L. Rubin, F. J. de Sauvage, *Nat. Rev. Cell Biol.* **2006**, *5*, 1026–1033; g) M. P. di Magliano, M. Hebrok, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *3*, 903–911; h) N. Mahindroo, C. Punchihewa, N. Fujii, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3829–3845.
- [17] a) L. L. Rubin, F. J. de Sauvage, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 1026–1033; b) S. J. Scales, F. J. de Sauvage, *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 303–312.
- [18] F. Varnat, A. Duquet, M. Malerba, M. Zbinden, C. Mas, P. Gervaz, A. Ruiz i Altaba, *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 338–351.
- [19] J. M. Löhr, *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2007**, *7*, 533–544.
- [20] S. Jones, X. Zhang, D. W. Parsons, J. C.-H. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, H. Kamiyama, A. Jimeno, S.-M. Hong, B. Fu, M.-T. Lin, E. S. Calhoun, M. Kamiyama, K. Walter, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, J. Hartigan, D. R. Smith, M. Hidalgo, S. D. Leach, A. P. Klein, E. M. Jaffee, M. Goggins, A. Maitra, C. Jacobuzio-Donahue, J. R. Eshleman, S. E. Kern, R. H. Hruban, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu, K. W. Kinzler, *Science* **2008**, *321*, 1801–1806.

- [21] G. Feldmann, N. Habbe, S. Dhara, S. Bisht, H. Alvarez, V. Fendrich, R. Beaty, M. Mullendore, C. Karikari, N. Bardeesy, M. M. Ouellette, W. Yu, A. Maitra, *Gut* **2008**, 57, 1420–1430.
- [22] K. P. Olive, M. A. Jacobetz, C. J. Davidson, A. Gopinathan, D. McIntyre, D. Honess, B. Madhu, M. A. Goldgraben, M. E. Caldwell, D. Allard, K. K. Frese, G. DeNicola, C. Feig, C. Combs, S. P. Winter, H. Ireland-Zecchini, S. Reichelt, W. J. Howat, A. Chang, M. Dhara, L. Wang, F. Rückert, R. Grützmann, C. Pilarsky, K. Izeradjene, S. R. Hingorani, P. Huang, S. E. Davies, W. Plunkett, M. Egorin, R. H. Hruban, N. Whitebread, K. McGovern, J. Adams, C. Iacobuzio-Donahue, J. Griffiths, D. A. Tuveson, *Science* **2009**, 324, 1457–1461.
- [23] A. I. Rubin, E. H. Chen, D. Ratner, *N. Engl. J. Med.* **2005**, 353, 2262–2269.
- [24] S. Tabs, O. Avci, *Eur. J. Dermatol.* **2004**, 14, 96–102.
- [25] D. D. Von Hoff, P. M. LoRusso, C. M. Rudin, J. C. Reddy, R. L. Yauch, R. Tibes, G. J. Weiss, M. J. Borad, C. L. Hann, J. R. Brahmer, H. M. Mackey, B. L. Lum, W. C. Darbonne, J. C. Marsters, Jr., F. J. de Sauvage, J. A. Low, *N. Engl. J. Med.* **2009**, 361, 1164–1172.
- [26] C. M. Rudin, C. L. Hann, J. Laterra, *N. Engl. J. Med.* **2009**, 361, 1173–1178.
- [27] J. R. Crawford, T. J. MacDonald, R. J. Packer, *Lancet Neurol.* **2007**, 6, 1073–1085.
- [28] R. L. Yauch, G. J. P. Dijkgraaf, B. Alicke, T. Januario, C. P. Ahn, T. Holcomb, K. Pujara, J. Stinson, C. A. Callahan, T. Tang, J. F. Bazan, Z. Kan, S. Seshagiri, C. L. Hann, S. E. Gould, J. A. Low, C. M. Rudin, F. J. de Sauvage, *Science* **2009**, 326, 572–574.
- [29] J. M. Hyman, A. J. Firestone, V. M. Heine, Y. Zhao, C. A. Ocasio, K. Han, M. Sun, P. G. Rack, S. Sinha, J. J. Wu, D. E. Solow-Cordero, J. Jiang, D. H. Rowitch, J. K. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 14132–14137.
- [30] A. A. Dlugosz, M. Talpaz, *N. Engl. J. Med.* **2009**, 361, 1202–1205.
- [31] <http://www.hhmi.org/news/beachy2.html>.