

***In vitro*-Untersuchungen von Schlüsselschritten der Borrelidin-  
und Ambruticin-Biosynthesen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

**Doktorin der Naturwissenschaften**

**(Dr. rer. nat.)**

genehmigte Dissertation

von

M. Sc. Nadine Kandziora

geboren am 08.05.1987 in Hildesheim

2015

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von April 2012 bis August 2015 unter der Leitung von Herrn Dr. Frank Hahn am Institut für Organische Chemie und am Biomolekularen Wirkstoffzentrum der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Master- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, 03.08.2015

Referent: Prof. Dr. Frank Hahn

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Kirschning

Tag der Promotion: 11.12.2015

*Meinen Eltern*

## Zusammenfassung

M. Sc. Nadine Kandziora

*In vitro*-Untersuchungen von Schlüsselschritten der Borrelidin- und Ambruticin-Biosynthesen

Schlagworte: Borrelidin, Ambruticin, Dehydratasedomäne, Epoxidase, Biosynthese

Die Naturstoffe Borrelidin und Ambruticin sind Polyketide, die durch TypI-Polyketidsynthasen hergestellt werden. In beiden Biosynthesewegen finden sich enzymatische Einheiten, die Reaktionen zu ungewöhnlichen Strukturmerkmalen katalysieren. So weist Borrelidin eine in Polyketiden selten auftretende *Z*-konfigurierte Doppelbindung auf. Ambruticin hingegen beinhaltet im westlichen Molekülteil einen vierfach-substituierten Tetrahydropyran-Ring. In der vorliegenden Dissertation wurden *in vitro*-Untersuchungen beider enzymatischen Einheiten durchgeführt, um den Mechanismus der Bildung beider Strukturmerkmale besser verstehen zu können.

Im ersten Teil der Promotionsarbeit werden die Ergebnisse zu Borrelidin präsentiert. Hierbei wurde ein Vorläufersurrogat der betrachteten Dehydratasedomäne BorDH3 sowie Referenzmoleküle synthetisiert. Die enzymatische Domäne wurde durch heterologe Genexpression hergestellt, gereinigt und mit dem Substrat in Enzymaktivitätstests umgesetzt. Massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Analyse der Reaktionsprodukte zeigte eine *E*-Selektivität von BorDH3. Zusammen mit Ergebnissen der spektroskopischen Analyse eines späten biosynthetischen Intermediates legt dieses Ergebnis einen aus BorDH3-katalysierter *E*-Doppelbindungsbildung und folgender Isomerisierung zur *Z*-konfigurierten Doppelbindung bestehenden Mechanismus nahe.

Im zweiten Teil der Dissertation werden die Arbeiten zur Ambruticinbiosynthese beschrieben. Zum einen wurde eine diastereoselektive Synthese zu einem vereinfachten Vorläufersurrogat der Epoxidase AmbJ etabliert. Zum anderen wurde das Enzym ausgehend von einem synthetischen Gen kloniert und heterolog in *E. coli* produziert. In Enzymaktivitätstests wurde das Substrat mit dem Lysat der Genexpression umgesetzt. Die massenspektroskopische Analyse zeigte keinen Umsatz des Substrates.

## Abstract

M. Sc. Nadine Kandziora

*In vitro*-Investigations towards key steps of the borrelidin and ambruticin biosyntheses

keywords: borrelidin, ambruticin, dehydratase domain, epoxidase, biosynthesis

The natural products borrelidin and ambruticin are both polyketides, which are produced by type I polyketide synthases. In both, the borrelidin and the ambruticin biosynthesis pathways, enzymatic units catalyse the formation of characteristic structures like the rare *Z*-configured double bond in borrelidin and the *tetra*-substituted tetrahydropyran ring in ambruticin. Both enzymatic units should be investigated in *in vitro*-tests to elucidate the mechanistic outcome of the catalysed reactions.

The first part of this thesis will present the results of borrelidin. A substrate mimic for the dehydratase domain BorDH3 and reference molecules were synthesised. Additionally the gene expression of BorDH3 was performed and the recombinant enzyme was purified and used in enzyme assays with the synthesised substrate. Mass and NMR analysis of the assay product revealed an *E*-selectivity of BorDH3. In conjunction with the spectroscopic analysis of a late-stage biosynthetic intermediate the results strongly suggest a mechanism consisting of *E*-double bond formation followed by isomerisation towards the *Z*-configuration.

The second part of this work features work on the Ambruticin biosynthesis. A diastereoselective synthetic route of a simplified substrate surrogate was established. The enzyme AmbJ was heterologously produced after cloning of a sequence-optimised synthetic gene and gene expression studies in *E. coli*. Enzyme assays between the substrate mimic and AmbJ were carried out. Analysis of the assay mixture showed now conversion of the substrate. Future work needs to be conducted to produce an active enzyme and to elucidate the outcome of the mechanism of the epoxidase AmbJ.

# Inhaltsverzeichnis

---

<b><u>1</u></b>	<b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>X</u></b>
1.1	VORBEMERKUNGEN	XIV
<b><u>2</u></b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b><u>1</u></b>
2.1	POLYKETIDSYNTHESEN	2
	<b><u>TEIL 1: BORRELIDIN</u></b>	<b><u>5</u></b>
<b><u>3</u></b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b><u>6</u></b>
3.1	BORRELIDIN	6
3.1.1	DER NATURSTOFF BORRELIDIN	6
3.1.2	DIE BIOSYNTHESE VON BORRELIDIN	7
3.2	STEREOSELEKTIVITÄT VON KETOREDUKTASEDOMÄNEN IN PKS	9
3.3	DEHYDRATASEDOMÄNEN	10
3.3.1	STRUKTUR UND MECHANISMUS DER DEHYDRATASEDOMÄNEN	11
3.3.2	<i>IN VITRO</i> -UNTERSUCHUNGEN ZU DEHYDRATASEDOMÄNEN	13
3.3.3	UNTERSUCHUNGEN ZU BORDH3 DER BORRELIDIN BIOSYNTHESE	32
<b><u>4</u></b>	<b><u>ZIELSETZUNG</u></b>	<b><u>35</u></b>
<b><u>5</u></b>	<b><u>BESCHREIBUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE</u></b>	<b><u>38</u></b>
5.1	SYNTHESE DES BORDH3-VORLÄUFERSURROGATES	38
5.2	SYNTHESE DER REFERENZMOLEKÜLE	39
5.3	TESTREAKTIONEN FÜR DIE AUSWERTUNG DER ENZYMAKTIVITÄTSTESTS	42
5.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN	42

5.4.1	EXPRESSION UND REINIGUNG DER DEHYDRATASEDOMÄNEN BORDH	43
<b>5.5</b>	<b>ENZYMAKTIVITÄTSTESTS DER DEHYDRATASEDOMÄNEN BORDH</b>	<b>45</b>
5.5.1	ENZYMAKTIVITÄTSTESTS DER BOR-DEHYDRATASEDOMÄNEN IM ANALYTISCHEN MAßSTAB	45
5.5.2	NMR-ENZYMAKTIVITÄTSTEST IM PRÄPARATIVEN MAßSTAB	48
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>52</b>
<b>TEIL 2: AMBRUTICIN</b>		<b>55</b>
<b>7</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>56</b>
<b>7.1</b>	<b>AMBRUTICIN</b>	<b>56</b>
7.1.1	DER NATURSTOFF AMBRUTICIN	56
7.1.2	STUDIEN ZUR BIOSYNTHESE VON AMBRUTICIN	58
<b>7.2</b>	<b>MYXOBAKTERIEN</b>	<b>61</b>
<b>7.3</b>	<b>OXIDOREDUKTASEN</b>	<b>63</b>
7.3.1	FLAVOENZYME	63
7.3.2	EISEN-ABHÄNGIGE OXYGENASEN	67
<b>7.4</b>	<b>TETRAHYDROPYRANRINGE IN NATURSTOFFEN</b>	<b>69</b>
7.4.1	BIOSYNTHETISCHE STRATEGIEN ZUM AUFBAU VON THP-RINGEN IN NATURSTOFFEN	70
7.4.2	CHEMISCHE STRATEGIE ZUM AUFBAU VON THP-RINGEN IN NATURSTOFFEN	79
<b>8</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>82</b>
<b>9</b>	<b>BESCHREIBUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE</b>	<b>84</b>
<b>9.1</b>	<b>ENANTIOSELEKTIVE SYNTHESE DES AMBJ-VORLÄUFERS</b>	<b>84</b>
9.1.1	OSA-MICHAEL-ADDITION AN ACROLEIN UND BROWN-ALLYLIERUNG	84
9.1.2	HALOZYKLISIERUNG UND EPOXIDBILDUNG	87
9.1.3	TBS-SCHÜTZUNG UND EPOXIDÖFFNUNG	89
9.1.4	TES-SCHÜTZUNG UND SWERN-OXIDATION	91
9.1.5	EPOXIDÖFFNUNG	95
9.1.6	IODSUBSTITUTION	96

<b>9.2</b>	<b>DIASTEREOSELEKTIVE SYNTHESEROUTE</b>	<b>97</b>
9.2.1	ALDOLREAKTION	98
9.2.2	NATRIUMBORHYDRIDREDUKTION UND OZONOLYSE	98
9.2.3	JULIA-KOCIENSKI-OLEFINIERUNG	100
9.2.4	WITTIG-OLEFINIERUNG	103
9.2.5	SCHLUSSEQUENZ DER SYNTHESE	105
<b>9.3</b>	<b>KLONIERUNG DES EPOXIDASEGENS <i>AMBJ</i></b>	<b>106</b>
<b>9.4</b>	<b>EXPRESSION DES EPOXIDASEGENS <i>AMBJ</i></b>	<b>113</b>
<b>9.5</b>	<b>REINIGUNG DER EPOXIDASE <i>AMBJ</i></b>	<b>121</b>
<b>9.6</b>	<b>ENZYMAKTIVITÄTSTESTS MIT DER EPOXIDASE <i>AMBJ</i></b>	<b>123</b>
<b>9.7</b>	<b>KLONIERUNG DER GENE <i>AMBS</i>, <i>AMBR</i>, <i>AMBQ</i> UND <i>AMBN</i> IN pCOLD-I</b>	<b>130</b>
<b>9.8</b>	<b>KLONIERUNG UND EXPRESSION DES KETOREDUKTASEGENS <i>AMBN</i></b>	<b>133</b>
9.8.1	KLONIERUNG VON <i>AMBN</i> IN PET28A(+)	133
9.8.2	EXPRESSION DES KETOREDUKTASEGENS <i>AMBN</i>	133

## **10 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK** **136**

<b>10.1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER SYNTHETISCHEN ARBEITEN</b>	<b>136</b>
<b>10.2</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER BIOLOGISCHEN ARBEITEN ZU <i>AMBJ</i></b>	<b>137</b>
<b>10.3</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER STUDIEN ZU DEN ENZYMAKTIVITÄTSTESTS</b>	<b>139</b>
<b>10.4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG DER KLONIERUNGS- UND EXPRESSIONSARBEITEN DER ANDEREN <i>POST</i>-PKS ENZYME</b>	<b>139</b>
<b>10.5</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>140</b>

## **TEIL 3:CHEMISCHE UND BIOLOGISCHE METHODEN**

### **144**

## **11 EXPERIMENTELLER TEIL** **145**

<b>11.1</b>	<b>ALLGEMEINE VORMERKUNGEN</b>	<b>145</b>
<b>11.2</b>	<b>VERSUCHSDURCHFÜHRUNGEN BORRELIDIN</b>	<b>148</b>
11.2.1	DARSTELLUNG DES SNAC-THIOESTERS 80	148
11.2.2	VERSUCHSVORSCHRIFT FÜR DIE TESTREAKTION AUS KAPITEL 5.3	157
<b>11.3</b>	<b>VERSUCHSDURCHFÜHRUNGEN AMBRUTICIN</b>	<b>158</b>

11.3.1	ENANTIOSELEKTIVE SYNTHESE	158
11.3.2	VERSUCHSVORSCHRIFTEN DER DIASTEREOSELEKTIVEN SYNTHESE	169
11.3.3	VERSUCHSVORSCHRIFTEN ZUR HERSTELLUNG DES JULIA-KOCIENSKI-SULFONS	174
11.3.4	VERSUCHSVORSCHRIFTEN ZUR HERSTELLUNG DES WITTIG-SALZES	177

## **12 MATERIAL UND METHODEN** **178**

---

<b>12.1</b>	<b>GERÄTE</b>	<b>178</b>
<b>12.2</b>	<b>CHEMIKALIEN UND ENZYME</b>	<b>180</b>
<b>12.3</b>	<b>SYNTHETISCHE GENE</b>	<b>180</b>
<b>12.4</b>	<b>BAKTERIENSTÄMME</b>	<b>180</b>
<b>12.5</b>	<b>VEKTOREN UND REKOMBINANTE PLASMIDE</b>	<b>181</b>
<b>12.6</b>	<b>OLIGONUKLEOTIDE</b>	<b>181</b>
<b>12.7</b>	<b>MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN</b>	<b>182</b>
12.7.1	MEDIEN UND NÄHRBÖDEN	182
12.7.2	PUFFER UND LÖSUNGEN	183
<b>12.8</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>186</b>
12.8.1	<i>E. COLI</i> -KULTIVIERUNG	186
12.8.2	ISOLIERUNG VON PLASMID DNA AUS <i>E. COLI</i>	186
12.8.3	BESTIMMUNG DER DNA-KONZENTRATION	187
12.8.4	RESTRIKTION	187
12.8.5	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	188
12.8.6	DNA-EXTRAKTION AUS AGAROSEGELEN	188
12.8.7	LIGATION	188
12.8.8	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	189
<b>12.9</b>	<b>MIKROBIOLOGISCHE UND PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN</b>	<b>191</b>
12.9.1	HERSTELLUNG CHEMISCH-KOMPETENTER ZELLEN	191
12.9.2	CHEMISCHE TRANSFORMATION	192
12.9.3	HETEROLOGE EXPRESSION	192
12.9.4	PRÄPARATION FÜR DEN ZELLAUFSCHLUSS	193
12.9.5	ZELLAUFSCHLUSS MIT ULTRASCHALL	193
12.9.6	ZELLAUFSCHLUSS MIT FRENCH-PRESS-VERFAHREN	193
12.9.7	PROTEINREINIGUNG DURCH AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	193
12.9.8	ENTSALZUNG UND KONZENTRATION	194

12.9.9	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	194
12.9.10	BESTIMMUNG DER GESAMTPROTEINKONZENTRATION (BRADFORD-TEST)	194
<b>12.10</b>	<b>ENZYMAKTIVITÄTSTEST</b>	<b>195</b>
12.10.1	ENZYMAKTIVITÄTSTESTS MIT BORDH	195
12.10.2	ENZYMAKTIVITÄTSTESTS MIT BORDH3 IM GROßEN MAßSTAB	195
12.10.3	ENZYMAKTIVITÄTSTESTS MIT AMBJ IM ANALYTISCHEN MAßSTAB	195
12.10.4	ENZYMAKTIVITÄTSTESTS MIT AMBJ IM GROßEN MAßSTAB	196
12.10.5	ENZYMAKTIVITÄTSTESTS MIT DEM LYSAT IM ANALYTISCHEN MAßSTAB	196

## **13 ANHANG** **197**

---

<b>13.1</b>	<b>GEN- UND PROTEINSEQUENZEN</b>	<b>197</b>
<b>13.2</b>	<b>VEKTORKARTEN</b>	<b>200</b>
<b>13.3</b>	<b>SYNTHETISCHE GENE</b>	<b>202</b>
<b>13.4</b>	<b>HERGESTELLTE KONSTRUKTE</b>	<b>203</b>
<b>13.5</b>	<b>SPEKTRENANHANG</b>	<b>205</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

---

$[\alpha]_D^T$	optische Rotation (Drehwert)
Ac	Acetat
AcOH	Essigsäure
Amb	Ambruticin
Ar	Aryl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bor	Borrelidin
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
<i>n</i> BuLi	<i>n</i> Butyllithium
<i>t</i> BuOH	<i>tert</i> -Butanol
°C	Grad Celsius
CoA	Coenzym A
Cy	Cyclohexyl
d	Tag(e)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DDQ	2,3-Dicyclo-5,6-dicyano-1,4-benzoquinon
DIPEA	<i>Diisopropylethylamin</i>
DH	Dehydratase
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMEA	Dimethylethylamin
DMF	Dimethylformamid

DMP	Dess-Martin-Periodinan
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dest.	destilliert
EH	Epoxidhydrolase
EPX	Epoxidase
ER	Enoylreduktase
ESI	<b>E</b> lectrospray- <b>I</b> onisation
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
eq.	Äquivalent(e)
FA	Ameisensäure
g	Gramm
ges.	gesättigt
h	Stunde(n)
HPLC	<b>H</b> igh- <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography
HRMS	<b>H</b> igh- <b>R</b> esolution <b>M</b> ass <b>S</b> pectrometry
Hz	Hertz
J	skalare Kopplungskonstante
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase
L	Liter
LC/MS	<b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography/ <b>M</b> ass <b>S</b> pectrometry
Lsg.	Lösung

M	Molmasse/mol
Me	Methyl
mg	Milligramm
min	Minute(n)
μL	Mikroliter
mL	Milliliter
mmol	Millimol
mol	Mol
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
<i>n</i>	<i>normal</i>
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<b>N</b> uclear <b>M</b> agnetic <b>R</b> esonance
<i>o</i>	<i>ortho</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
Ph	Phenyl
PKS	Polyketidsynthase
PMB	<i>para</i> -Methoxymethylbenzyl
ppm	parts per million
PS	Pyransynthase
Py	Pyridin
R	organischer Rest
s	Sekunde(n)
SNAC	<i>N</i> -Acetylcysteamin

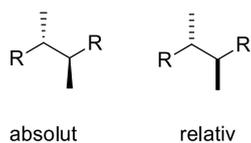
T	Temperatur
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBSCI	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TE	Thioesterase
TEA	Triethylamin
Tempo	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl
<i>tert</i>	tertiär
TES	Triethylsilyl
TMS	Trimethylsilyl
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
ThrRS	Threonin-tRNS-Synthase
TMSCH <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	Trimethylsilyldiazomethan
tRNS	Transfer-Ribonukleinsäure
TsOH	<i>p</i> -Toluoltrifluorsulfonsäure
UPLC	<b>Ultra Performance Liquid Chromatographie</b>
UV	Ultraviolett
ÜZ	Übergangszustand
WBB	Wasserstoffbrückenbindung

## 1.1 Vorbemerkungen

Die Nummerierung der Moleküle im Experimentellen Teil dieser Arbeit folgt nicht den IUPAC-Regeln, sondern wurde pragmatisch festgelegt. Die Nummerierung des Borrelidin-Grundgerüsts erfolgte nach der in der Literatur gefundenen Klassifizierung.

Die Stereochemie wurde in der vorliegenden Arbeit nach dem folgenden Prinzip angegeben:

Zur Darstellung der absoluten Stereochemie werden Keile verwendet, die relative Stereochemie wird durch Balken beschrieben.



## 2 Einleitung

---

In der modernen Therapie von Krankheiten bedient sich die Pharmaindustrie oftmals der Natur, um neue gezielt wirksame Therapeutika gegen beispielsweise Krebs, Malaria und AIDS zu gewinnen. Naturstoffe werden als Sekundärmetabolite von Pilzen, Bakterien oder Pflanzen produziert und weisen eine große strukturelle Vielfalt auf. Auf Grund ihrer biologischen Aktivität können sie als Leitstrukturen für die Wirkstoffforschung dienen. Viele Krankheitserreger entwickeln jedoch über die Jahre Resistenzen gegen gebräuchliche Therapeutika, sodass eine andauernde Nachfrage nach neuen Wirkstoffen oder verbesserten Varianten bekannter Wirkstoffe besteht. In diesen Fällen wird die Total- oder Semisynthese herangezogen, um Derivate für Studien von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR-Studien) herzustellen. Allerdings ist eine Totalsynthese oftmals schwierig, da beispielsweise viele Stereozentren selektiv aufgebaut werden müssen. Gerade für eine großtechnische Herstellung von Therapeutika ist dies gepaart mit einer aufwendigen Reinigung von Intermediaten und Endprodukten von Nachteil.

Durch das bessere Verständnis von Biosynthesewegen auf genetischer, enzymatischer und molekularer Ebene haben sich in den vergangenen drei Jahrzehnten vielfältige neuartige Ansätze für die Herstellung von Derivaten ergeben. Dazu zählen die Mutasyntese, die Metagenomik, die kombinatorische Biosynthese und die Chemoenzymatik.

Der Ansatz der Metagenomik versucht neue Wirkstoffe durch das Auffinden stiller Gencluster oder durch eine gezielte strukturbasierte Genclustersuche zu finden. Die kombinatorische Biosynthese hingegen stellt neue Wirkstoffe durch die Veränderung von Biosynthesegenen, die in einer veränderten Struktur der bekannten Verbindungen enden, her. Bei der Mutasyntese werden Deletionsmutanten verwendet, die es ermöglichen veränderte Vorläufermoleküle an Bakterien zu supplementieren. Der letzte Ansatz, die Chemoenzymatik, verwendet die heterologe Produktion von Enzymen, die bei der Synthese von Wirkstoffen eingesetzt werden.

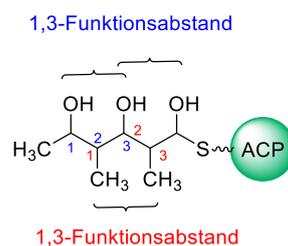
Therapeutika können den verschiedenen Naturstoffklassen der Polyketide, Peptide, Terpene, Glykoside oder Alkaloide zugeordnet werden. Trotz ihrer unterschiedlichen Ursprünge werden diese Naturstoffe durch Enzyme hergestellt. Enzyme stellen natürliche Katalysatoren von chemischen Transformationen dar und können durch einfache molekularbiologische Arbeiten rekombinant produziert werden. Durch den Einsatz von Enzymen können

Reaktionen selektiv im wässrigen Medium ohne Zusatz von toxischen Reagentien durchgeführt werden, was sie für eine Verwendung im Rahmen einer nachhaltigen Chemie attraktiv macht. Deren generell hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität wirkt sich ebenfalls günstig aus und führt letztlich zu kürzeren und effizienteren Routen, in denen Reinigungsschritte eingespart werden. Gerade im Einsatz zur Gewinnung von neuen Therapeutika können sich diese Eigenschaften als großer Vorteil herausstellen. Die biokatalytische Verwendung von Enzymen in Syntheserouten (Chemoenzymatik) wird also voraussichtlich in den nächsten Jahren zunehmend an Bedeutung gewinnen.

### 2.1 Polyketidsynthasen

Polyketide sind Naturstoffe, die trotz ihrer großen strukturellen Vielfalt eine gemeinsame biosynthetische Herkunft aufweisen und die in der Natur von Polyketidsynthasen (PKS) gebildet werden.<sup>1</sup> Eingeteilt sind die PKS-Systeme in die Typen I bis III und weisen unterschiedliche Charakteristika auf.

Die Typ I-PKS weist einen Multienzymkomplex auf, durch den der Aufbau des PKS-Grundgerüsts durch modulare Enzym-Domänen erfolgt. Die Typ II-PKS besteht ebenfalls aus einem Multienzymkomplex, allerdings arbeitet der Enzymkomplex iterativ, sodass Oligoketide entstehen, die in den meisten Fällen zu aromatischen Polyketiden kondensieren. Polyketidnaturstoffe der Typ III-PKS unterscheiden sich stark von den Typ I und Typ II-PKS-Systemen, da kein Acetylcarrierprotein (ACP) benötigt wird. Außerdem werden vor allem kleine Naturstoffe, wie Mono- oder Bicyclische Aromaten, hergestellt.

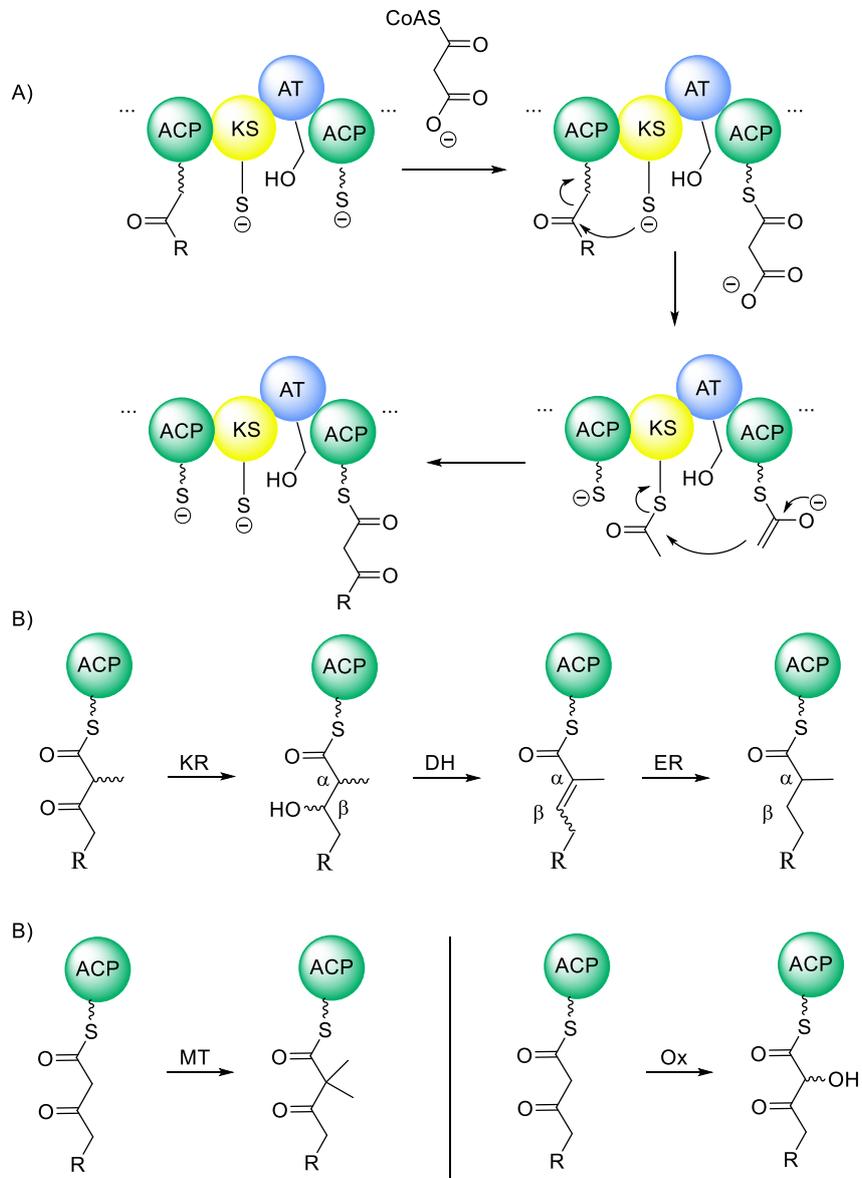


**Abbildung 1:** Der charakteristische Funktionsabstand in Polyketid-Naturstoffen.

---

<sup>1</sup> C. Hertweck *Trends in Biochemical Sciences* **2015**, *40*, 189-199.

Typisch für von Typ I-PKS gebildete Polyketide ist der häufig anzutreffende 1,3-Funktionsabstand von sauerstofftragenden Funktionalitäten und Doppelbindungen sowie, versetzt dazu um ein Kohlenstoffatom, der Alkylverzweigungen (Abbildung 1).



**Abbildung 2:** Enzymatische Domänen der PKS und deren katalysierte Reaktionen. A) Kettenverlängerung innerhalb der PKS. B) Reaktionen der reduktiven Schleife mit einer DH-, KR- und ER-Domäne. C) Katalysierte Reaktion einer Methyltransferasedomäne MT beziehungsweise einer Oxidasedomäne Ox.

Typ I-Polyketidsynthasen sind aus mehreren Modulen aufgebaut, die wiederum aus einzelnen Domänen bestehen. Dabei sind einzelne Module meist für die Kettenverlängerung um jeweils eine Ketideinheit verantwortlich („Kolinearität“, Kettenverlängerung siehe Abbildung 2,

A),<sup>2,3</sup> während die Wahl der Domänen die Funktionalisierung der neuen Einheit bestimmt. Jedes Basismodul einer *cis*-AT PKS besteht aus einer Acyltransferase (AT)-Domäne, einer Ketosynthase (KS)-Domäne und einem Acylcarrierprotein (ACP).<sup>4</sup> Bei einer *trans*-AT PKS findet sich keine spezifische AT-Domäne innerhalb der Module.<sup>5</sup> Eine oder mehrere, als diskrete Enzyme außerhalb der PKS kodierte, ATs agieren hier bei mehreren Modulverlängerungen in *trans*. Die Typ I-PKS starten mit einem Lademodul, das den Startbaustein auf die PKS auflädt und aus einer AT-Domäne sowie einem ACP besteht.

Neben den Standard-Verlängerungsdomänen gibt es spezifische Domänen, die gemeinsam die sogenannte „reduktive Schleife“ bilden können. Dazu zählen die Ketoreduktase (KR)-, die Dehydratase (DH)- und die Enoylreduktase (ER)-Domäne (Abbildung 2, B).<sup>2</sup> Diese tragen in erheblichem Maß zur Strukturvielfalt der Typ I PKS -Produkte bei, die auch als reduzierte Polyketide bezeichnet werden.

Zusätzlich zu den Domänen der reduktiven Schleife kann eine Vielzahl von enzymatisch aktiven Domänen auftreten, die zusätzliche Reaktionstypen, wie beispielsweise Methylierungen, Oxygenierungen oder Zyklisierungen katalysieren (Abbildung 2, C). Am Ende von Polyketidsynthasen finden sich häufig Thioesterase (TE)-Domänen, die die Polyketidkette entweder durch Zyklisierung oder Hydrolyse abspalten. Anschließend können weitere Modifizierungen am Naturstoff, die sogenannten *post*-PKS-Modifizierungen, durchgeführt werden. Dazu zählen u.a. Methylierungen, Glycosidierungen und Oxidationen. Katalysiert werden diese durch sogenannte *Tailoring*-Enzyme. Da diese Enzyme hochselektive Reaktionen an komplexen Grundgerüsten durchführen, sind sie für eine chemoenzymatische Verwendung besonders interessant.

---

<sup>2</sup> K. J. Weisman, M. Timoney, M. Bycroft, P. Grice, U. Hanefeld, J. Staunton, P. F. Leadlay *Biochemistry* **1997**, *36*, 13849-13855.

<sup>3</sup> A. P. Siskos, A. Baerga-Ortiz, S. Bali, V. Stein, H. Mamdani, D. Spittler, B. Popovic, J. Spencer, J. Staunton, K. J. weissman, P. F. Leadlay *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1145-1153.

<sup>4</sup> A. T. Keatinge-Clay *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1050-1073.

<sup>5</sup> K. J. Weissman *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 436-453.

## Teil 1: Borrelidin

---

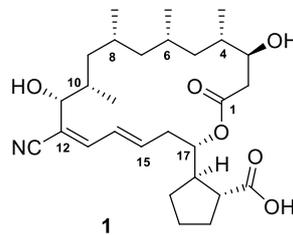
# 3 Einleitung

---

## 3.1 Borrelidin

### 3.1.1 Der Naturstoff Borrelidin

Borrelidin (**1**) ist ein Naturstoff mit antibakterieller Aktivität, der 1949 aus dem Stamm *Streptomyces rochei* isoliert wurde.<sup>6,7</sup> Später wurde dieser Naturstoff auch in anderen Streptomyceten gefunden und dessen planare Struktur 1967 von KELLER-SCHIERLEIN aufgeklärt.<sup>8</sup> 1989 konnte zusätzlich die absolute Konfiguration der neun vorhandenen Stereozentren von ANDERSON *et al.* durch Kristallstrukturanalyse bestimmt werden.<sup>9</sup>



**Abbildung 3:** Struktur des Naturstoffes Borrelidin (**1**).

Borrelidin (**1**) hat eine einzigartige Struktur (Abbildung 3). Die wichtigsten Strukturmerkmale des 18-gliedrigen Makrolaktons sind zum einen die reduzierte Polypropionat-Einheit zwischen C-4 und C-10, in der die Methylgruppen in einem relativen *syn/syn/anti*-Verhältnis zueinander stehen. Zum anderen ist ein Dien vorhanden, das sowohl konjugiert zu einer exozyklischen Nitril-Gruppe ist als auch eine in Polyketidnaturstoffen seltene Z-konfigurierte Doppelbindung aufweist. Die letzte Besonderheit ist die Cyclopentancarbonsäure-Einheit an C-17.<sup>7</sup>

Auf Grund der nicht-kompetitiven Hemmung der Threonin-*t*RNA-Synthetase (ThRS) zeigt Borrelidin verschiedene biologische Aktivitäten. Dazu zählen antibakterielle, antitumor,

---

<sup>6</sup> J. Berger, L. M. Jampolsky, M. W. Goldberg *Arch. Biochem.* **1949**, 22, 476.

<sup>7</sup> S. Vino, K. R. Lokesh *Advanced Biotech.* **2008**, 22-26.

<sup>8</sup> W. Keller-Schierlein *Helv. Chim. Acta* **1967**, 50, 731.

<sup>9</sup> B. F. Anderson, A. J. Herlt, R. W. Richards, G. B. Robertson *Arch. Biochem.* **1949**, 42, 717.

antimalaria, antivirale und immunosuppressive Eigenschaften.<sup>10</sup> Aktuelle Arbeiten zur Aktivität von Borrelidin beschäftigen sich mit der sehr guten Wirkung des Naturstoffes gegen Malaria. In *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zeigten zwei Derivate von **1** eine hoffnungsvolle Aktivität gegen Malaria.<sup>11</sup>

### 3.1.2 Die Biosynthese von Borrelidin

Die Biosynthese des Borrelidins (**1**) erfolgt durch eine Typ I-PKS.<sup>12,13</sup> Die Borrelidin PKS besteht aus den sechs Genen *BorA1* bis *BorA6*, auf die sich ein Lademodul und sechs Verlängerungsmodule verteilen (Abbildung 4).<sup>12</sup> Der Startbaustein ist die (1*R*, 2*R*)-Cyclopentan-1,2-dicarbonsäure (**19**).<sup>12</sup> Außerdem werden acht Verlängerungsbausteine (3x Malonyl-CoA, 5x Methylmalonyl-CoA) eingebaut.

---

<sup>10</sup> D. V. R. N. Bhikshapathi, Y Shraavan Kumar, Y. Madhusudan Rao, V. Kishan *Ind. J. Biotechnology* **2010**, *9*, 18-23.

<sup>11</sup> E. M. Novoa, N. Camacho, A. Tor, B. Wilkinson, S. Moss, P. Marín-García, I. G. Azcárate, J. M. Bautista, A. C. Mirando, C. S. Francklyn, S. Varon, M. Royo, A. Cortés, L Ribas de Pouplana *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, 1-10.

<sup>12</sup> C. Olano, B. Wilkinson, C. Sánchez, S. J. Moss, R. Sheridan, V. Math, A. J. Weston, A. F. Braña, C. J. Martin, M. Oliynyk, C. Méndez, P. F. Leadlay, J. A. Salas *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 87-97.

<sup>13</sup> O. Vergnolle, F. Hahn, A. Baerga-Ortiz, P. F. Leadlay, J. N. Anderson *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1011-1014.

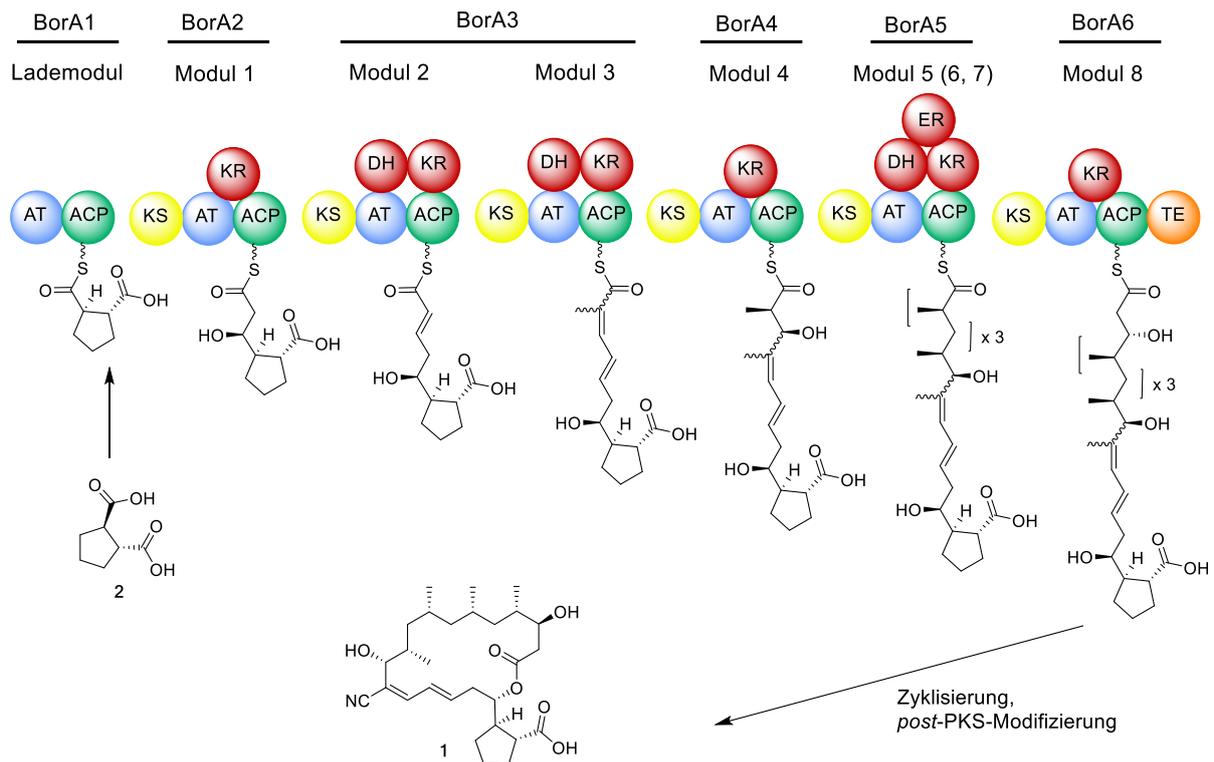


Abbildung 4: Borrelidin-Biosynthese.<sup>13</sup>

Dicarbonsäure **2** ist ein einzigartiger Startbaustein, der aus Tyrosin gebildet und der nach Aufladen auf das Lademodul in die Borrelidin-Biosynthese kanalisiert wird (Abbildung 4).<sup>12</sup> Des Weiteren weist Borrelidin ein Carbonitril an C-12 auf, das während der *post*-PKS-Modifizierungen aus einer Methylgruppe gebildet wird. Die biosynthetische Hypothese für die Synthese des Startbausteins und des Carbonitrils wurde 2004 von OLANO *et al.* durch Isolierung von biosynthetischen Intermediaten aus Gen-Knockoutstämmen erhärtet.<sup>12,14</sup>

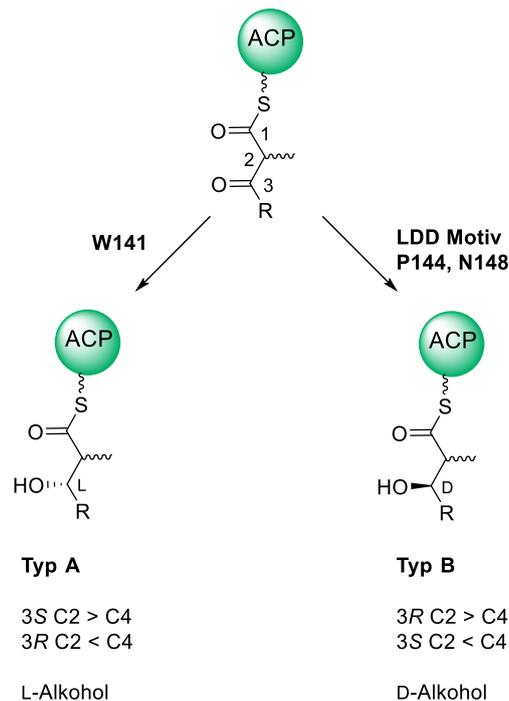
Die Bildung des mit dem Carbonitril in Konjugation stehenden *E,Z*-Diens war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht aufgeklärt (siehe Kapitel 3.3.3).

Borrelidin ist ein Nonaketid, wodurch angedeutet wird, dass die PKS auf das Lademodul folgend acht Verlängerungen des Rückgrates katalysiert.<sup>12</sup> Allerdings sind in der Bor-PKS nur sieben Module kodiert. Dies erklärt sich dadurch, dass Modul 5 iterativ arbeitet, wodurch die reduzierte Polypropionat-Einheit zwischen C-4 und C-8 entsteht.<sup>13</sup>

<sup>14</sup> C. Olano, S. J. Moss, A. F. Braña, R. M. Sheridan, V. Math, A. J. Weston, C. Méndez, P. F. Leadley, B. Wilkinson, J. A. Salas *Mol. Microbiol.* **2004**, 52, 1745-1756.

### 3.2 Stereoselektivität von Ketoreduktasedomänen in PKS

In den letzten Jahren wurden vermehrt Anstrengungen unternommen, die Katalyse der einzelnen PKS-Domänentypen (KR, DH, ER) genauer zu analysieren und die Stereoselektivität und Substratspezifität von diesen katalysierten Reaktionen zu verstehen. In diesem Zusammenhang wurden wegweisende Veröffentlichungen von CAFFREY und REID zu den KR-Domänen publiziert.<sup>16,15</sup>



**Abbildung 5:** KR-Domänen lassen sich anhand charakteristischer Aminosäuren an bestimmten Positionen einteilen in solche des Typs A- und des Typs B.<sup>15</sup>

Ketoreduktasedomänen (KRs) katalysieren die Reduktion einer Carbonylgruppe zur Hydroxygruppe unter Verbrauch des Kofaktors  $\beta$ -Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH). Der 2-Methyl-3-ketoacyl-Vorläufer ist dabei als Thioester kovalent an die ACP und damit die PKS gebunden. Die Reduktion der Ketofunktion kann zu einem D- oder L-Alkohol führen (Abbildung 5).<sup>15</sup> Sowohl CAFFREY als auch REID fanden, dass die Stereoselektivität der Reduktion auf charakteristischen Aminosäureeinheiten in der aktiven Tasche der KRs zurückzuführen ist, welche sich auf Ebene der Primärsequenz durch Alignments identifizieren lassen. Anhand der resultierenden Konfiguration der Hydroxy-

<sup>15</sup> P. Caffrey *ChemBioChem* **2003**, *4*, 649-662.

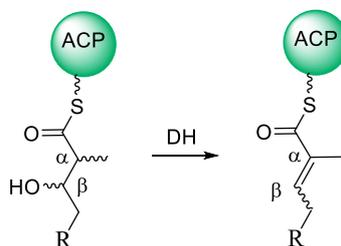
Gruppe werden KR-Domänen in solche des Typs A und des Typs B unterteilt (Abbildung 5).<sup>16,15</sup>

Ketoreduktasen des Typ B weisen in ihrer aktiven Tasche eine charakteristische Leucin-Asparaginsäure-Asparaginsäure Sequenz (LDD) auf, die im Typ A nicht zu finden ist. In dieser kann in Einzelfällen auch eine der beiden Asparaginsäuren gegen eine Glutaminsäure ausgetauscht sein. Außerdem ist die Aminosäureposition 144 immer ein Prolin (P) und die Position 148 ein Asparagin (N). Beim Typ A hingegen ist in Aminosäureposition 141 ein Tryptophan (W) konserviert, das in keiner Typ B KR auftritt. In der überwiegenden Zahl der Fälle folgen DH-Domänen auf Typ B-KR-Domänen (3D-Hydroxyacyl-Einheit).<sup>15</sup>

Ergänzend zu den Studien von CAFFREY und REID wurde von KALESSE eine bioinformatische Analyse durchgeführt, die zusätzlich zu der Bestimmung der Konfiguration der Alkoholfunktion die Stereochemie der Verzweigung in  $\alpha$ -Position bestimmt.<sup>17</sup> Hierzu wurden Alignments von verschiedenen Sequenzen bekannter KR-Domänen herangezogen, anhand derer charakteristische Regionen der Aminosäuresequenzen für die einzelnen Proteinfamilien detektiert wurden. In Verbindung mit dem HIDDEN MARKOV MODEL (HMM) konnten die konservierten Regionen der Proteintypen bestimmt werden.

### 3.3 Dehydratasedomänen

DH-Domänen katalysieren die Eliminierung von Wasser aus der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Position des von der KR-Domäne gebildeten 3-Hydroxy-Thioesterintermediates und führen somit zur Doppelbindungsbildung (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Mechanismus einer katalysierten Dehydratisierung durch eine Dehydratasedomäne DH.

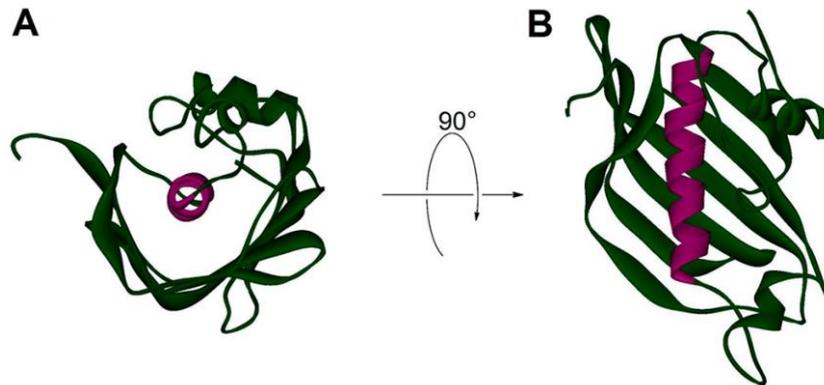
---

<sup>16</sup> R. Reid, M. Piagentini, E. Rodriguez, G. Ashley, N. Viswanathan, J. Carney, D. V. Santi, R. Hutchinson, R. McDaniel *Biochemistry* **2003**, *42*, 72-79.

<sup>17</sup> A. Kitsche, M. Kalesse *ChemBioChem* **2013**, *14*, 851-861.

### 3.3.1 Struktur und Mechanismus der Dehydratasedomänen

Die Struktur der zu den prozessierenden Enzymen gehörenden Dehydratasedomänen wurde durch verschiedene Kristallstrukturanalysen aufgeklärt. Dazu wurden die DH-Domänen der Curacin-Biosynthese und die EryDH4-Domäne aus der PKS sowie die FabA- und FabZ-DH-Domänen aus der Fettsäurebiosynthese herangezogen.<sup>18,19,20,21,22,23</sup>



**Abbildung 7:** Charakteristische HOTDOG-Faltung der Dehydratase-Isomerase FabA. Dargestellt zum einen als Draufsicht (A) und zum anderen als Sicht aus einer um 90°-gedrehten Position (B).<sup>23</sup>

Durch die Strukturanalysen wurde festgestellt, dass ein Dimer vorliegt, das eine lineare Konformation aufweist. Die Monomere der DHs liegen in einer doppelten HOTDOG-Faltung vor, die neben der *beta*-Faltblattstruktur auch ein *alpha*-Helix-Strukturmotiv zeigt (Abbildung 7).

---

<sup>18</sup> D. L. Akey, J. R. Razelun, J. Tehranisa, D. H. Sherman, W. H. Gerwick, J. L. Smith *Structure* **2010**, *18*, 94-105.

<sup>19</sup> A. Keatinge-Clay *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 941-953.

<sup>20</sup> D. Kostrewa, F. K. Winkler, G. Folkers, L. Scapozza, R. Perozzo *Science* **2005**, *14*, 1570-1580.

<sup>21</sup> M. Leesong, B. S. Henderson, J. R. Gillig, J. M. Schwab, J. L. Smith *Structure* **1996**, *4*, 253-264.

<sup>22</sup> T. Maier, M. Leibundgut, N. Ban *Science* **2008**, *321*, 1315-1322.

<sup>23</sup> J. W. Labonte, C. A. Townsend *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2182-2204.

HXXXGXXXXP und DXXXQ

Abbildung 8: Konservierte Aminosäuresequenzen innerhalb der aktiven Tasche der Dehydratasedomänen.<sup>24</sup>

Zwei konservierte Aminosäuren sind essentiell für die Aktivität der Dehydratasedomänen. Zum einen ein Histidin am schmalen Ende des N-Terminus des HOTDOGS und zum anderen eine Asparaginsäure, die auf der Helix des C-terminalen HOTDOGS sitzt. Hierzu wurde eine charakteristische Sequenz ausgemacht, die allen DHs gemein ist. Zusätzlich zu der katalytischen Dyade His-Asp wird eine dritte Aminosäure (hier: Q; Glutamin) beschrieben (Abbildung 8).<sup>24</sup> Allerdings kann anstelle von Glutamin auch Prolin oder Serin die katalytische Triade der Dehydratasedomänen vervollständigen.

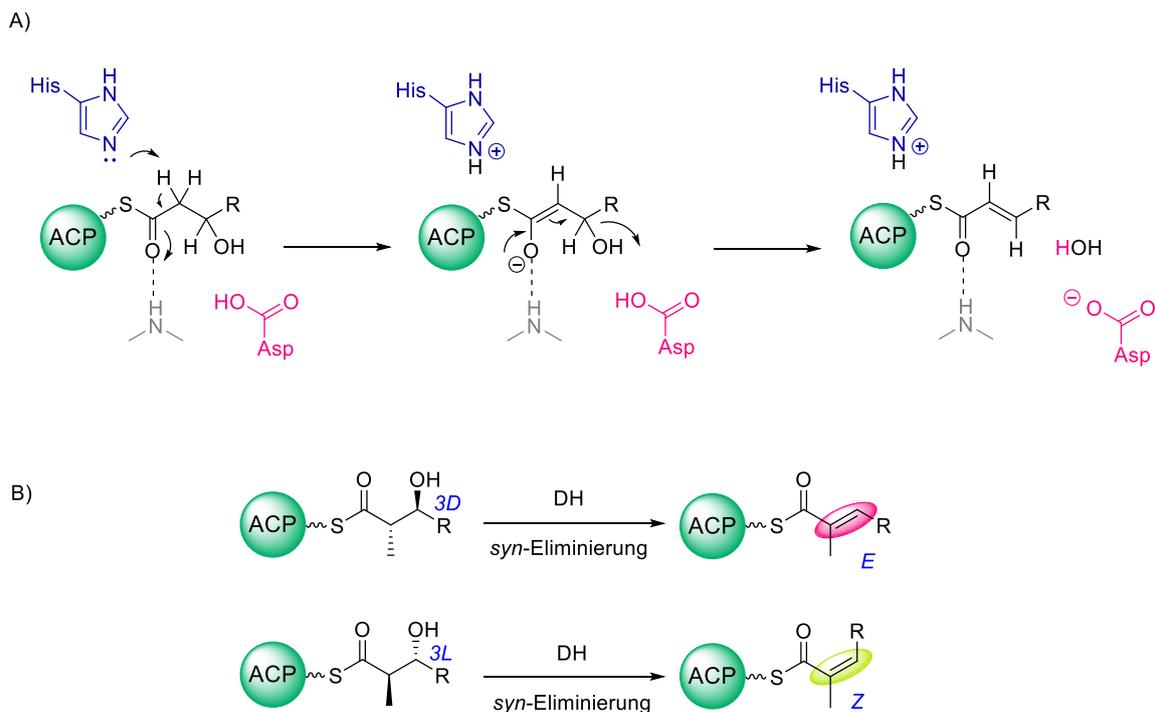


Abbildung 9: Mechanismus der Dehydratase-Domänen der Polyketidsynthasen. A) Mechanismus der katalytischen Triade.<sup>24,18</sup> B) Durch die DH-Domäne katalysierte formale *syn*-Dehydratisierung ausgehend von 3D- und 3L-Hydroxyacyl-Thioestern. Das gezeigte Enolatintermediat wurde bisher experimentell nicht bestätigt.

<sup>24</sup> X. Guo, T. Liu, C. R. Valenzano, Z. Deng, D. E. Cane *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14694-14696.

Das Histidin der katalytischen Dyade agiert als Base und abstrahiert ein Proton in C-2 Position des 3-Hydroxythioesters. Die Asparaginsäure protoniert die 3-Hydroxygruppe, wodurch ein Wassermolekül gebildet wird. Der postulierte Mechanismus soll über ein Enolat-Intermediat verlaufen, wobei bisher keinerlei gesicherte Daten über tatsächlich gebildete Zwischenstufen und Übergangszustände vorliegen (Abbildung 9, A).

Durch die formale *syn*-Dehydratisierung der 3D-Hydroxythioestern wird in den meisten Fällen eine *E*-konfigurierte Doppelbindung gebildet. Entscheidend für die Doppelbindungsgeometrie ist neben der beschriebenen *syn*-Eliminierung auch die durch vorangegangene Ketoreduktion erhaltene Konfiguration des 3-Hydroxythioesters. So wurde postuliert, dass eine *E*-konfigurierte Doppelbindung ausgehend von Produkten der B-Typ-KR-Domänen, den 3D-Hydroxyacyl-Einheiten, gebildet wird. Die selten vorkommenden *Z*-konfigurierten Doppelbindungen sollen hingegen ausgehend von 3L-Hydroxyacyl-Motiven durch eine *syn*-Dehydratisierung gebildet werden.<sup>18</sup> Dieses Postulat berücksichtigt allerdings nicht die Konfiguration der  $\alpha$ -Position des Vorläufers, die bei einer stereospezifischen Reaktion ebenfalls direkten Einfluss auf die Produktkonfiguration nehmen sollte. Eine detaillierte Untersuchung dieses Prozesses in PKS stand bei Aufnahme der Arbeiten an dieser Promotion weitgehend noch aus.

### 3.3.2 *in vitro*-Untersuchungen zu Dehydratasedomänen

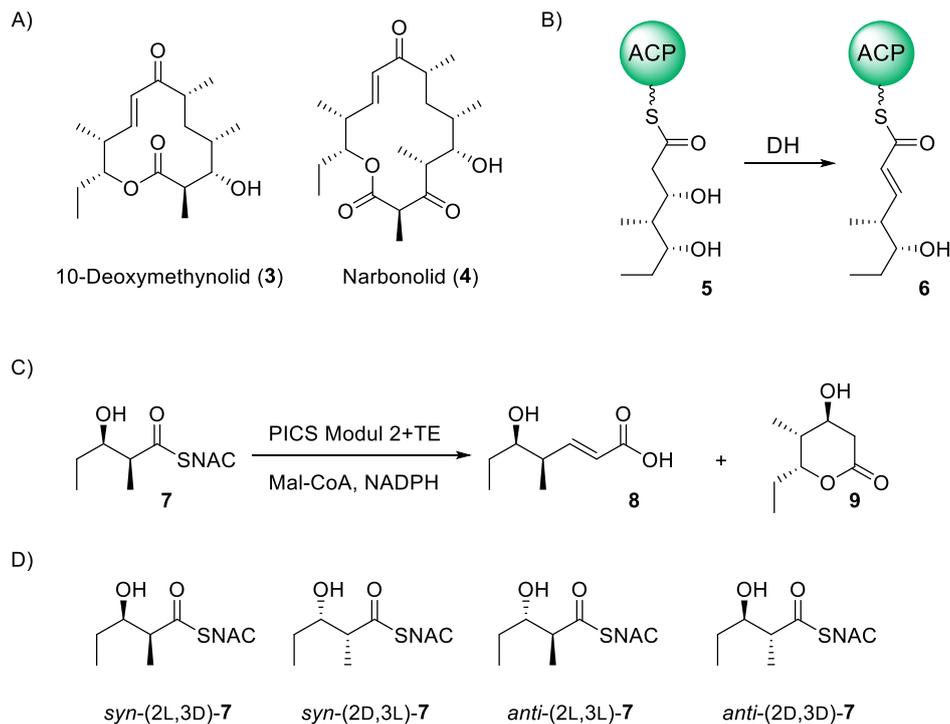
In den letzten zehn Jahren wurden die Dehydratasedomänen aus bekannten Biosynthesewegen herangezogen, um diese genauer zu analysieren und deren Stereoselektivität zu verstehen.

#### 3.3.2.1 *Picromycin/Methymycin-Synthase (PICS)*

Die Picromycin/Methymycin Synthase (PICS) ist eines der ersten Systeme, das *in vitro* untersucht wurde und dadurch die ersten Erkenntnisse über Struktur und Stereochemie der 3-Hydroxythioester-Vorläufer von DH-Domänen lieferte.<sup>25</sup>

---

<sup>25</sup> J. Wu, T. J. Zaleski, C. Valenzano, C. Khosla, D. E. Cane *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17393-17404.



**Abbildung 10:** Studien zu der Picromycin/Methymycin Polyketidsynthase. A) Strukturen der beiden PICS-Produkte. B) DH-katalysierte Reaktion im Modul 2 der PICS. C) Durchgeführte *in vitro*-Untersuchung mit dem Fusionsprotein PICS Modul 2+TE und Vorläufersurrogat **7**. Es wird ein Gemisch der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonsäure **8** und Laktone **9** erhalten. D) Strukturen der in den *in vitro*-Untersuchungen eingesetzten Diastereomere.

Die PICS besteht aus sechs Modulen, die durch eine Thioesterasedomäne ergänzt werden. Die TE-Domäne zyklisiert die Polyketidkette zum Makrolaktone und bildet dabei sowohl einen 12- als auch einen 14-gliedrigen Ring (10-Deoxymethynolid (**3**), Narbonolid (**4**), Abbildung 10, A) der durch *post*-PKS-Modifizierungen (Oxidation, Glykosylierung) in die Naturstoffe Picromycin beziehungsweise Methymycin überführt wird.

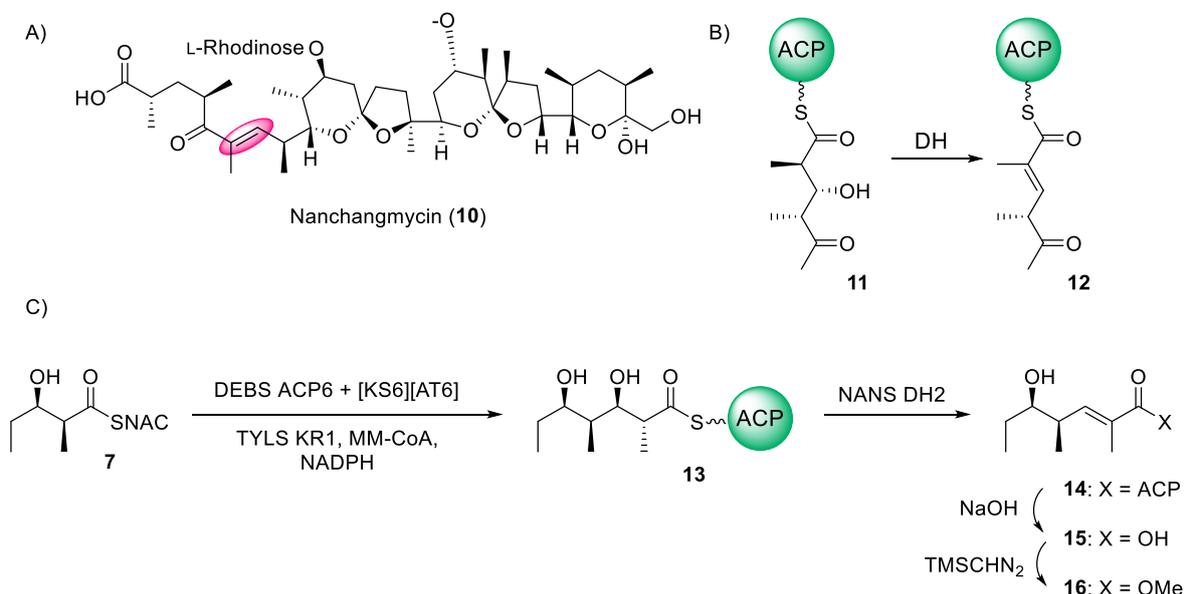
Das Modul 2 der PICS weist eine DH-Domäne auf, die eine *E*-konfigurierte Doppelbindung bilden sollte (Abbildung 10, B).<sup>25</sup> Um den Mechanismus und die Stereoselektivität der DH-Domäne sowie die Stereochemie der  $\beta$ -Hydroxygruppe im Vorläufer zu analysieren, wurde das PICS Modul 2 als Fusionsprotein mit der TE-Domäne (PICS Modul 2+TE) in *E. coli* überexprimiert und SNAC-Thioester **7** als Substrat synthetisiert. Der SNAC-Thioester wurde mit PICS Modul 2+TE, Malonyl-CoA (Mal-CoA) sowie NADPH in Enzymaktivitätstests eingesetzt, die die Umsetzung zum *E*-konfigurierten Produkt **8** lieferten (Abbildung 10, C).<sup>25</sup> Zusätzlich wurde zyklisiertes Laktone **9** erhalten, das durch TE-katalysierte Ringbildung nach Ketid-Verlängerung und Kettoreduktion entsteht. Durch diesen Aktivitätstest wurde gezeigt, dass das Fusionsprotein PICS Modul2+TE sowohl die Verlängerung um den Malonyl-CoA-

Baustein als auch die Reaktion zur *E*-konfigurierten Doppelbindung katalysiert. Ein Kontroll-experiment mit einer DH-Deletionsmutante zeigte, dass ausschließlich Lakton **9** erhalten wurde und bestätigte somit die Beteiligung der DH-Domäne an der Doppelbindungsbildung.<sup>25</sup>

Zusätzlich zu den Aktivitätstests wurden Studien zur Substratspezifität durchgeführt, in denen die möglichen Diastereomere des natürlichen Substrates eingesetzt und mit der PICS Modul 2+TE umgesetzt wurden (Abbildung 10, D). Hierbei zeigte sich, dass das *syn*-(2L,3D)-Substrat am besten akzeptiert wurde. Das *syn*-(2D,3L)-Enantiomer wurde genauso wie das diastereomere *anti*-(2L,3L)-Diketid akzeptiert, beide zeigten aber eine wesentlich geringere Aktivität. Im Gegensatz dazu wurde das diastereomere *anti*-(2D,3D)-Diketid nicht akzeptiert.<sup>25</sup> Dieses Ergebnis zeigt eine moderate Substratspezifität der PICS Modul 2+TE, da neben dem natürlichen Vorläufer auch zwei weitere Substrate angenommen und umgesetzt wurden.

### 3.3.2.2 Nanchangmycin Synthase und 6-Deoxyerythronilid B-Synthase

Aufbauend auf den Studien zu der PICS publizierten CANE *et al.* Arbeiten zu den DH-Domänen der Nanchangmycin (**10**) und Erythromycin-PKS.<sup>24,26</sup> Charakteristisch für die zwei Veröffentlichungen war, dass in diesen die ersten *in vitro*-Untersuchungen von isolierten, aktiven Domänen beschrieben wurden.

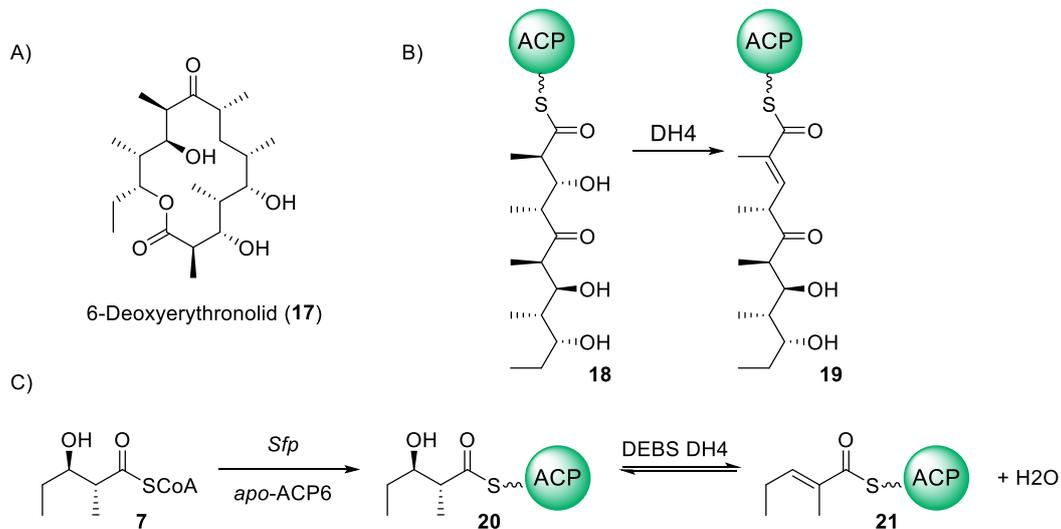


**Abbildung 11:** Studien zu der Dehydratasedomäne des Modules 2 der NANS. A) Struktur des Naturstoffs Nanchangmycin. B) Dehydrataseaktivität der enzymatischen Domäne NANS DH2. C) Durch NanDH2 katalysierte Reaktion. C) Durchgeführte *in vitro*-Untersuchungen mit der NANS DH2. Gezeigt sind zum einen die chemoenzymatische Synthese des

<sup>26</sup> C. Valenzano, Y.-O. You, A. Garg, A. Keatinge-Clay, C. Khosla, D. E. Cane *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14697-14699.

ACP-gebundenen Substrates **13** und zum anderen die enzymatische Umsetzung von Substrat **13** mit NANS DH2, deren Produkte und die anschließenden Derivatisierungsschritte. MM-CoA: Methylmalonyl-CoA.

Die Nanchangmycin-Synthase (NANS) besitzt eine Dehydratasedomäne in Modul 2 der PKS (Abbildung 11, B), die als isolierte Domäne heterolog in *E. coli* produziert und anschließend gereinigt wurde.<sup>24</sup> Das benötigte ACP-gebundene Substrat wurde durch eine chemoenzymatische Synthese gewonnen, bei der die enzymatischen Domänen KS6, AT6 und ACP6 der 6-Deoxyerythronilid B Synthase (DEBS) sowie die Ketoreduktasedomäne des ersten Moduls der Tylactone Synthase (TYLS KR1) verwendet wurden (Abbildung 11, C).<sup>24</sup> ACP-gebundenes Substrat **13** wurde *in situ* mit der enzymatischen Domäne NANS DH2 inkubiert. Die Analyse zeigte, dass eine *E*-konfigurierte Doppelbindung generiert worden ist, wodurch dargelegt wurde, dass die enzymatische Domäne NANS DH2 ein *anti*-(2*D*,3*D*)-2-Methyl-3-hydroxyacyl-Substrat **13** akzeptiert und zu einem *E*-2-Methylenoyl-ACP-Produkt konvertiert. Die katalysierte Reaktion ist eine *syn*-Eliminierung von Wasser.<sup>24</sup> Die Ergebnisse zeigen eine Substratspezifität sowie eine Stereoselektivität.

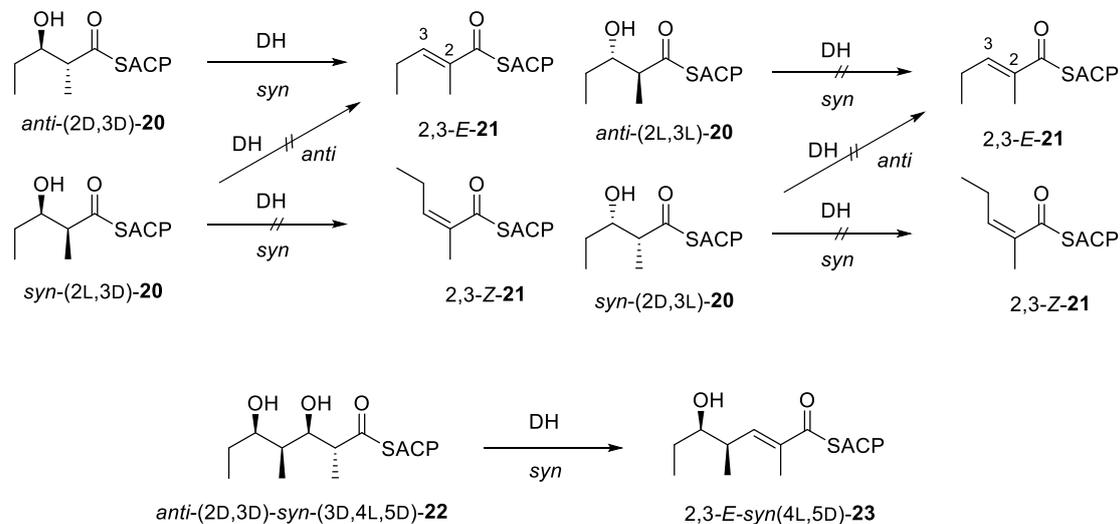


**Abbildung 12:** Studien zu EryDH4. A) Struktur des durch die DEBS produzierten 6-Deoxyerythronolides. B) Durch EryDH4 katalysierte Dehydratisierung. C) Durchgeführte *in vitro*-Untersuchungen mit der isolierten EryDH4. Gezeigt ist zum einen die chemoenzymatische Synthese von ACP-gebundenem Substrat **20** und zum anderen die Umsetzung mit der EryDH4-Domäne, die eine Gleichgewichtsreaktion und dadurch sowohl die Eliminierung als auch die Addition eines Wassermoleküls katalysiert.

Erythromycin wird durch die 6-Deoxyerythronilid-Synthase (DEBS) hergestellt. Obwohl der Naturstoff keine Doppelbindung aufweist, ist in Modul 4 der DEBS eine DH-Domäne enthalten, deren Produkt unmittelbar durch eine ER-Domäne zum gesättigten Thioester

reduziert wird (Abbildung 12, B). Somit ist die Stereochemie des EryDH4-Substrates unbekannt, sodass alleine von der Sequenz der Ketoreduktasedomäne auf dessen Stereochemie zurückgeschlossen wurde. Hierzu wurde das Modell von CAFFREY und REID (Kapitel 3.2) verwendet. Die Domäne EryKR4 besitzt ein konserviertes LDD-Motiv und ist dementsprechend eine B-Typ KR-Domäne, die eine 3D-konfigurierte Hydroxygruppe bildet.<sup>26</sup>

Das benötigte ACP-gebundene Substrat wurde im Fall des Erythromycins in Analogie zu den Studien mit der enzymatische Domäne NanDH2 über einen chemoenzymatischen Ansatz hergestellt. Hierzu wurde die freie Säure in den Coenzym A-Thioester überführt und im Anschluss mit der Phosphopantetheinyltransferase (Pptase) Sfp auf die Domäne *apo*-EryACP6 geladen (Abbildung 12, C).<sup>26</sup> ACP-gebundenes Substrat **20** wurde *in situ* mit der EryDH4 inkubiert und das Ergebnis mittels LC-MS analysiert. Als Produkt des Enzymaktivitätstests wurde der eine *E*-konfigurierte Doppelbindung tragende Enoyl-Thioester **21** erhalten. Ein weiterer Test zeigte, dass die enzymatische Domäne EryDH4 auch die Rückreaktion, die *syn*-Addition von Wasser an die Doppelbindung, katalysiert (Abbildung 12, C).



**Abbildung 13:** Untersuchung der Stereselektivität der EryDH4-Domäne.<sup>26</sup>

Zusätzlich wurden über einen chemoenzymatischen Ansatz die anderen Diastereomere des Substrates **22** erhalten und analog mit der EryDH4-Domäne inkubiert (Abbildung 13).<sup>26</sup> Die enzymatische Domäne EryDH4 katalysiert ausschließlich eine *syn*-Eliminierung, die in einer *E*-konfigurierten Doppelbindung resultiert. In den Enzymtests wurde weder eine *anti*-Eliminierung noch eine *Z*-konfigurierte Doppelbindung detektiert. Außerdem wurden



Im Rahmen der Gencluster-Analyse wurden auch die KR-Domänen eingehender bezüglich ihrer vorhergesagten Stereoselektivität untersucht (Abbildung 14, B). Hierbei zeigte sich, dass die Module CurG, CurI, CurJ und CurK eine B-Typ KR-Domäne aufweisen. Das Modul CurG hingegen beinhaltet eine A-Typ KR-Domäne. Dieses Ergebnis spiegelt die Erwartung wieder, da CurG eine *Z*-konfigurierte Doppelbindung generiert, die anderen Cur-Module hingegen eine *E*-konfigurierte Doppelbindung. Dies ist in Übereinstimmung mit der Hypothese, dass die Stereochemie der  $\beta$ -Hydroxygruppe die Konfiguration der Doppelbindung beeinflusst.<sup>18,16</sup>

Zusätzlich konnten durchgeführte Kristallstrukturanalysen die Struktur der DH-Domänen aufklären. AKEY *et al.* zeigten, dass die dimeren DH-Domänen aus zwei identischen Monomeren der Hotdog-Faltung bestehen. Die aktive Tasche besteht aus einem Histidin des N-terminalen Hotdogs und einem Aspartat des C-terminalen Hotdogs. Die umzusetzenden Substrate befinden sich in einem Substrattunnel, der sich in den C-terminalen Hotdog erstreckt und zwischen den Strukturmotiven  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt liegt. Der Substrattunnel ist überwiegend hydrophob und beinhaltet keine Funktionen für Wasserstoffbrückenbindungen.

Durch computerbasierte Studien (*substrate modeling*) konnte eine direkte Verbindung zwischen dem Substrat und der Stereochemie des Produktes festgestellt werden. Hierbei zeigten AKAY *et al.*, dass die Stereochemie der  $\beta$ -Hydroxygruppe die Konfiguration der durch die Dehydratisierung entstehenden Doppelbindung bestimmt. Die Stereochemie der  $\beta$ -Hydroxygruppe hingegen wird durch die Ketoreduktasedomäne festgelegt (siehe Kapitel 3.2).

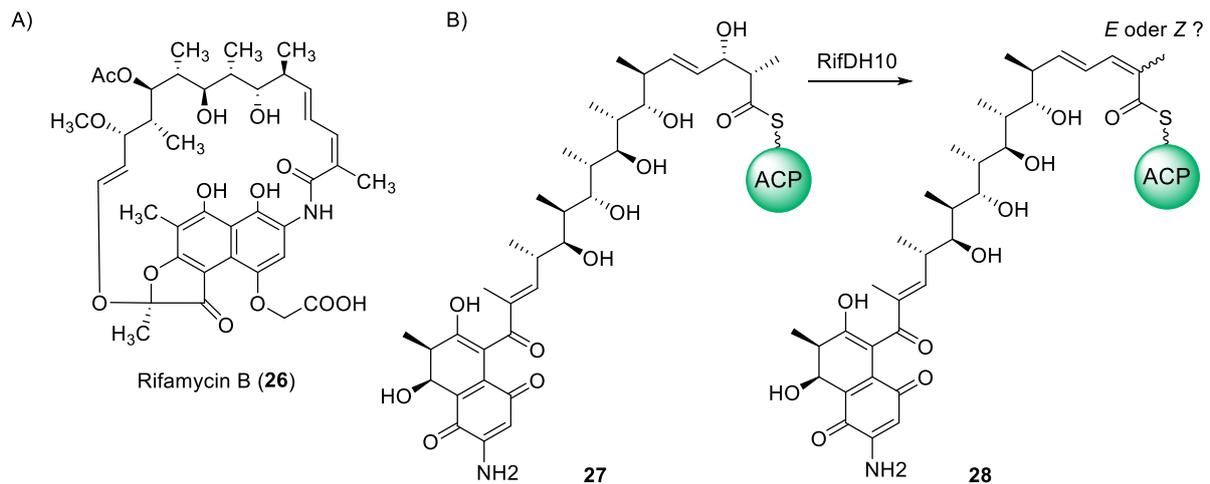
Die hier beschriebenen Ergebnisse wurden aus Sequenzanalysen und Kristallstrukturanalysen gewonnen. Ausstehend ist die Durchführung von *in vitro*-Tests mit isolierten Dehydratasedomänen.

### 3.3.2.4 Rifamycin-Polyketidsynthase

Rifamycin (**26**) ist ein Naturstoff der Gruppe der Ansamycine und weist eine dreifach substituierte *Z*-konfigurierte Doppelbindung auf, die im letzten Modul der Polyketidsynthase gebildet wird.<sup>27</sup>

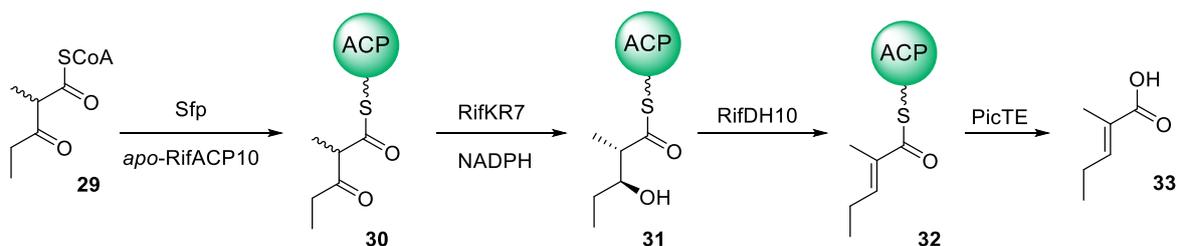
---

<sup>27</sup> D. Gay, Y.-O. You, A. Keatinge-Clay, D. E. Cane *Biochemistry* **2013**, 52, 8916-8928.



**Abbildung 15:** A) Struktur des Rifamycins B. B) Katalytische Dehydratisierung der RifDH10-Domäne, bei der die Konfiguration der entstehenden Doppelbindung unbekannt ist. ACP: RifACP10.

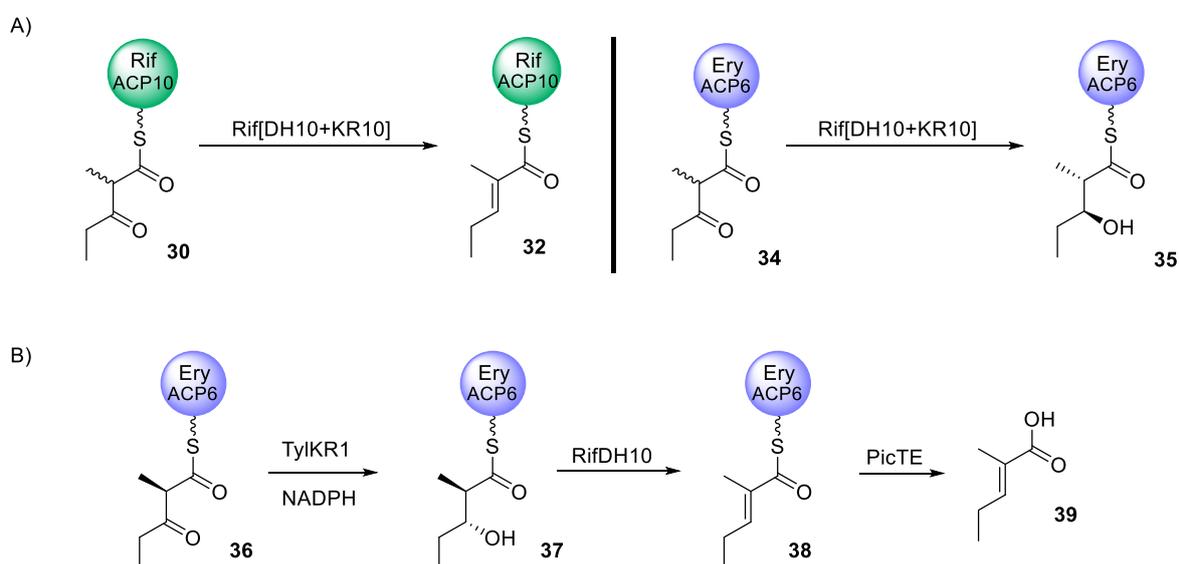
Der lineare Polyketid-Vorläufer von Rifamycin wird durch eine Amidsynthese RifF von der PKS abgespalten. Es ist unbekannt, ob der Vorläufer bereits eine *Z*-konfigurierte Doppelbindung trägt oder ob die Dehydratasedomäne des Modules 10 (RifDH10) zunächst eine *E*-konfigurierte Doppelbindung bildet, die während der RifF-katalysierten Reaktion isomerisiert (Abbildung 15, B). Alternativ könnte die Isomerisierung der Doppelbindung auch durch eine *post*-PKS-Modifizierung geschehen. Um den Ursprung der Doppelbindungskonfiguration aufzuklären, wurden Enzymaktivitätstests mit der isolierten RifDH10-Domäne durchgeführt.



**Abbildung 16:** Enzymatische Umsetzung von ACP-gebundenem Substrat 31 mit der isolierten Dehydratasedomäne RifDH10. Gezeigt ist die Beladung der exprimierten apo-RifACP10 mit der Pptase Sfp gefolgt von der Umsetzung von 30 mit RifKR7 sowie die Umsetzung mit der RifDH10-Domäne mit abschließender Abspaltung von der ACP mittels PicTE. ACP: RifACP10.

Die Gruppe von CANE zeigte bereits, dass die Ketoreduktasedomäne RifKR10 ein (2*L*,3*L*)-2-Methyl-3-Hydroxyacyl-ACP-Produkt generiert, sodass der natürliche Vorläufer der DH-

Domäne bekannt ist.<sup>28</sup> Ein vereinfachtes Surrogat wurde durch chemoenzymatische Synthese ausgehend von (2DL)-2-Methyl-3-ketopentanoyl-CoA mit der zuvor heterolog in *E. coli* produzierten apo-RifACP10-Domäne und der PPtase Sfp gefolgt von der Reaktion mit der isolierten RifKR7-Domäne hergestellt.<sup>27</sup> Die Umsetzung des (2L,3L)-konfigurierten Substrates **31** mit der in *E. coli* als His<sub>6</sub>-Fusionsprotein produzierten enzymatischen Domäne RifDH10 ergab ausschließlich das *E*-konfigurierte Alken (Abbildung 16). Keiner der diastereomeren Vorläufer wurde unter den gleichen Reaktionsbedingungen umgesetzt. Die Analyse der Enzymaktivitätstests erfolgte durch den Vergleich mit synthetisch hergestellten Referenzmolekülen, nachdem das Produkt mit der breitenspezifischen Thioesterasedomäne PicTE inkubiert und somit von der ACP abgespalten wurde.<sup>27</sup>



**Abbildung 17:** Studien zu der Stereospezifität der RifDH10-Domäne. A) Umsetzung von RifACP10-gebundenem Substrat **30** sowie von EryACP6-gebundenem Substrat **34** mit dem Fusionsprotein Rif[DH10+KR10]. Hierbei zeigte sich, dass die Dehydratasedomäne mit dem an EryACP10-gebundenem Substrat keine Dehydratisierung katalysiert, obwohl die Stereochemie nach der Ketoreduktion dem natürlichen Substrat entspricht. B) Enzymatische Untersuchungen zwischen der RifDH10-Domäne und dem EryACP6-gebundenem Substrat.

Zusätzlich zur isolierten Domäne wurde ein Rif[DH10+KR10]-Fusionsprotein hergestellt, das mit dem ACP-gebundenen Substrat **30** umgesetzt wurde. Auch in diesem Fall wurde nur die *E*-konfigurierte Doppelbindung **32** erhalten (Abbildung 17, A).<sup>27</sup>

Interessant an den Studien war, dass die Substratspezifität der RifDH10-Domäne verändert werden konnte, in dem das Substrat an die ACP-Domäne EryACP6 gebunden wurde. Dies gilt ebenso für die Panthetein- und SNAC-Thioester. In diesen Fällen wurden ausschließlich die

<sup>28</sup> Y. O. You, C. Khosla, D. E. Cane *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7406-7409.

(2D,3D)-Vorläufer akzeptiert und in das *E*-konfigurierte Alken überführt (Abbildung 17, A-B).<sup>27</sup> CANE *et al.* zeigten, dass die RifDH10-Domäne höchstwahrscheinlich *E*-selektiv ist, wodurch eine spätere Isomerisierung der Doppelbindung zur *Z*-Konfiguration führen muss.

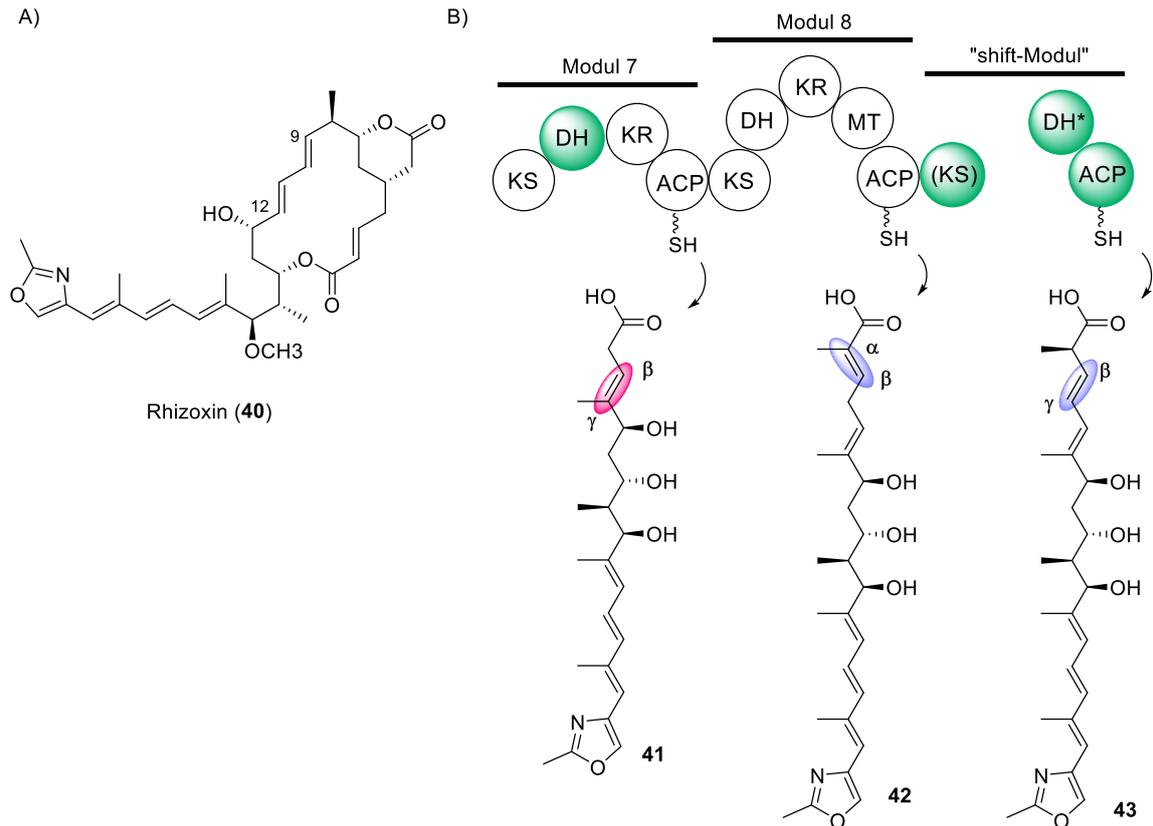
### 3.3.2.5 $\alpha,\beta \rightarrow \beta,\gamma$ Doppelbindungsverschiebungen

Das Polyketid Rhizoxin (**40**) ist ein Naturstoff, der ein Dien-System enthaltendes 16-gliedriges Makrolakton aufweist (Abbildung 18, A). Die Besonderheit des Dien-Systems zwischen den Kohlenstoffatomen C-9 und C-12 besteht darin, dass es bezüglich des aus einer PKS-Standardprozessierung zu erwartenden Muster um ein Kohlenstoffatom verschoben ist. Dies wirft Fragen bezüglich des mechanistischen und zeitlichen Verlaufs der Doppelbindungsbildung auf.

Ziel der Arbeiten von HERTWECK *et al.* war es herauszufinden, ob die Doppelbindungsverschiebung durch die PKS stattfindet und welche Domänen verantwortlich sind.<sup>29</sup> Hierzu wurde eine  $\Delta$ TE-Deletionsmutante hergestellt. Dies führte zu einem Auflaufen und teilweiser Ablösung langkettiger Intermediate der PKS. Nach deren Isolierung zeigte eine NMR-Analyse, dass diese Intermediate bereits die verschobenen Doppelbindungen aufweisen. Demnach ist die Verschiebung Bestandteil der von den jeweiligen PKS-Modulen katalysierten Reaktion. Zusätzlich wurde aus der  $\Delta$ TE-Mutante der Vorläufer **42** isoliert, bei dem nur eine der beiden Doppelbindungen verschoben ist.<sup>29</sup> Daraus resultiert, dass die Doppelbindungen einzeln aufgebaut und vor der nächsten Verlängerung des Rückgrades bereits verschoben werden.

---

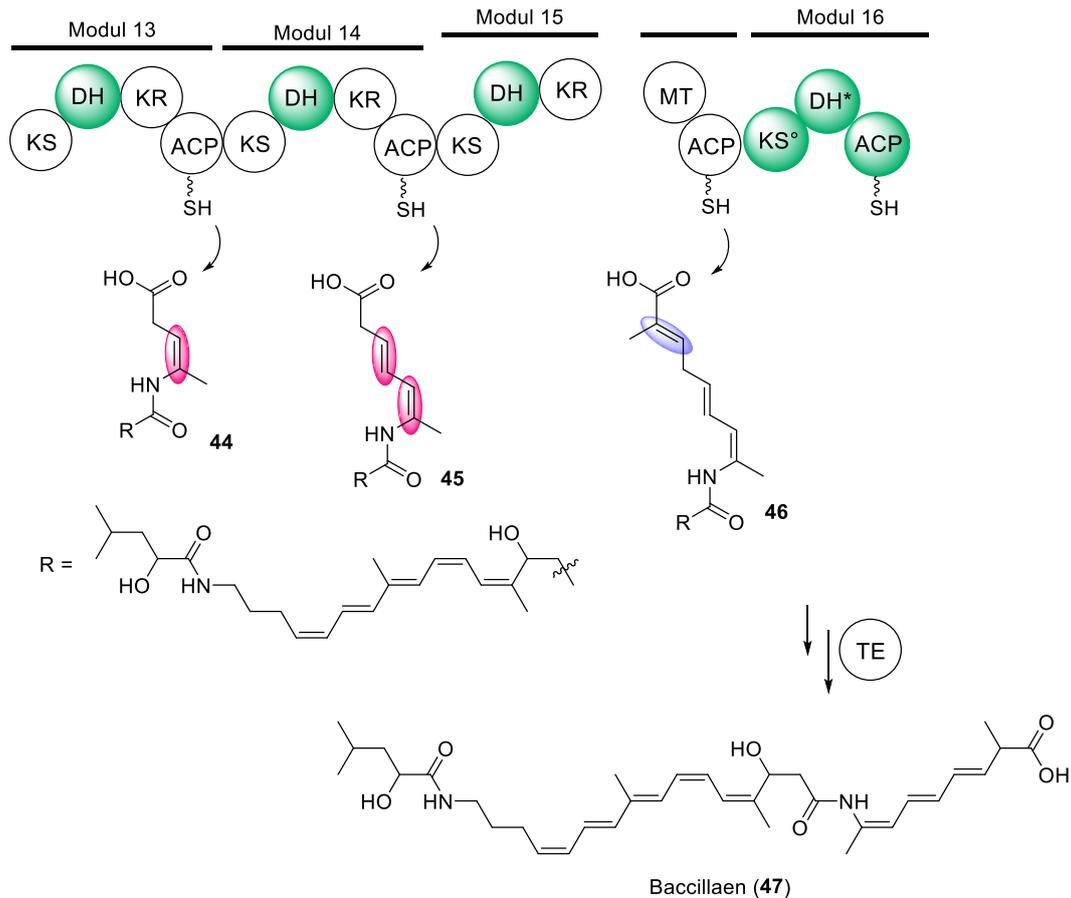
<sup>29</sup> B. Kusebauch, B. Busch, K. Scherlach, M. Roth, C. Hertweck *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1460-1464.



**Abbildung 18:** Ausschnitt aus der Biosynthese von Rhizoxin. Dargestellt sind die entscheidenden Module 7, 8 und das Verschiebungs-Modul mit den Polyketidketten, die als freie Säuren von der PKS abgespalten wurden. Hervorgehoben wurden die zwei unterschiedlich verschobenen Doppelbindungen.

Um diese Hypothese weiter zu stützen, wurde die DH\*-Domäne des Moduls 8 inaktiviert. Dieses Modul besteht aus einem verlängernden Modul sowie zusätzlich aus einer nicht funktionalen KS<sup>o</sup>-Domäne, der DH-ähnlichen DH\*-Domäne und einer ACP-Domäne („*shift-Modul*“, Abbildung 18, B). Die NMR-Analyse des akkumulierten Intermediates zeigte, dass vor Einwirkung der DH\*-Domäne die neu gebildete Doppelbindung noch in Konjugation zum Thioester und nicht zur bereits existierenden, verschobenen Doppelbindung steht.<sup>29</sup>

Die Experimente zeigen, dass zwei verschiedene mechanistische Wege zu den Doppelbindungsverschiebungen führen. Die Verschiebung der Doppelbindung in Modul 7 geht einher mit der Einführung der Doppelbindung und ist damit formal eine  $\beta,\gamma$ -Dehydratisierung. Die zweite Doppelbindungsverschiebung erfolgt durch ein sogenanntes Verschiebungs-Modul („*shift-module*“) katalysiert durch eine DH\*-Domäne.<sup>29</sup>



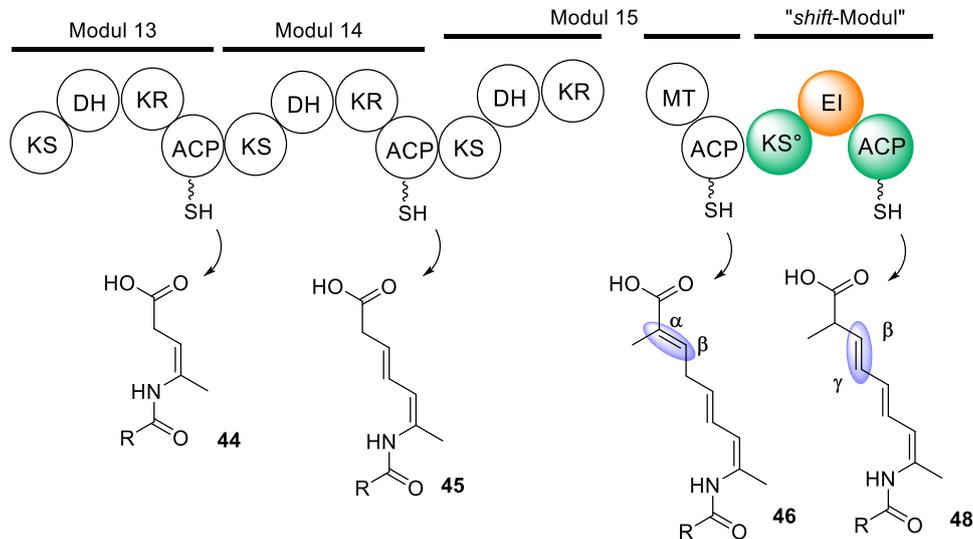
**Abbildung 19:** Ausschnitt aus der Biosynthese von Bacillaen (47). Dargestellt sind die entscheidenden Module 13, 14, 15 und 16. Untersuchungen mit einer  $\Delta$ Modul 16 Mutante führten zur Hydrolyse und Freisetzung der Polyketidintermediate in Form freier Säuren. Hervorgehoben sind die beiden bereits verschobenen Doppelbindungen sowie die sich noch in  $\alpha,\beta$ -Position zum Thioester befindende Doppelbindung.

Zusätzlich zu dem Naturstoff Rhizoxin weist auch das Polyendiamid Bacillaen (47) ein im Laufe der Biosynthese offensichtlich verschobenes Trien-System auf. Bacillaen wird durch ein *trans*-AT-PKS-NRPS-Hybridsystem mit 17 Modulen gebildet.<sup>30</sup> Die Module 13-16 sind verantwortlich für die Einführung der Doppelbindungen, wobei Modul 16, ähnlich wie die Rhizoxin-PKS, eine zusätzliche DH\*-Domäne besitzt (Abbildung 19). Um aufzuklären, wie die verschobenen Doppelbindungen entstehen, wurde in der Gruppe von PIEL das Modul 16 deletiert ( $\Delta$ Modul 16-Mutante).<sup>30</sup> Die anschließende NMR-spektroskopische Analyse der erhaltenen Intermediate 44-46 zeigte, dass die beiden in den Modulen 13 und 14 eingeführten Doppelbindungen am Ende von Modul 15 bereits in  $\beta,\gamma$ -Position zur Carbonylfunktion stehen

<sup>30</sup> J. Moldenhauer, D. C. G. Götz, C. R. Albert, S. K. Bischof, K. Schneider, R. D.

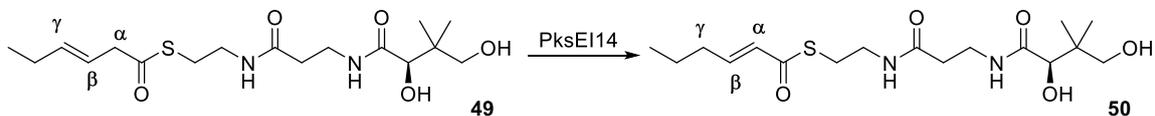
Süssmuth, M. Engeser, H. Gross, G. Bringmann, J. Piel *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1465-1467.

(Abbildung 19). Die Doppelbindung aus Modul 15 liegt noch in  $\alpha,\beta$ -Position zum Thioester vor, sodass davon ausgegangen wurde, dass die Verschiebung innerhalb des Modules 16 stattfindet (Abbildung 19).<sup>30</sup>



**Abbildung 20:** Ausschnitt aus der Biosynthese von Baccillaene. Dargestellt sind die entscheidenden Module 13, 14, 15 und das Verschiebungs-Modul mit den Polyketidketten, die als freie Säuren von der PKS abgespalten wurden. Hervorgehoben wurde die durch das Verschiebungs-Modul in die  $\beta,\gamma$ -Position verschobene Doppelbindung.

In weiterführenden Arbeiten von KEATINGE-CLAY wurde die Doppelbindungsverschiebung des Modules 16 anhand von *in vitro*-Untersuchungen eingehender untersucht.<sup>31</sup> Hierzu wurde die zunächst als inaktive DH-Domäne annotierte PksDH16 (Pks: Abkürzung für die Baccillaen-Polyketidsynthase) als Enoylisomerase EI und das Modul 16 als Verschiebungs-Modul („*shifted-module*“; vgl. Rhizoxin PKS) mit den Domänen  $KS^{\circ}$ -EI(DH\*)-ACP erkannt (Abbildung 20).

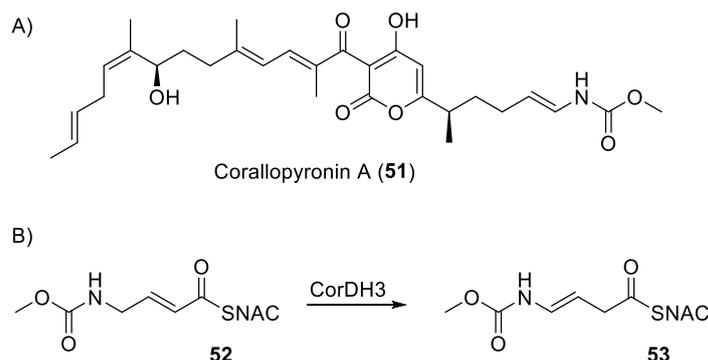


**Abbildung 21:** Enzymatische Umsetzung der isolierten PksEI14-Domäne mit Substrat **49**.

Für die Enzymaktivitätstests wurde die enzymatische Domäne PksEI16 heterolog in *E. coli* produziert und anschließend isoliert. Außerdem wurde ein Substratanalogon synthetisiert. Hierbei handelt es sich um einen Panthetein-Thioester **49**, der eine  $\beta,\gamma$ -Doppelbindung

<sup>31</sup> D. C. Gay, P. J. Spear, A. T. Keatinge-Clay *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 2374-2381.

aufweist (Abbildung 21).<sup>31</sup> Die PksEI16-Domäne soll in *in vitro*-Tests demnach die Verschiebung zu einer  $\alpha,\beta$ -Doppelbindung katalysieren. Diese Reaktion soll der  $\alpha,\beta \rightarrow \beta,\gamma$ -Verschiebung gegenüber auf Grund der Konjugation der Doppelbindung mit dem Thioester im Produkt thermodynamisch begünstigt sein. Die Enzymaktivitätstests wurden mittels LC-MS analysiert und bestätigen, dass die Doppelbindung katalysiert durch die PksEI16-Domäne verschoben wird (Abbildung 21).<sup>31</sup>

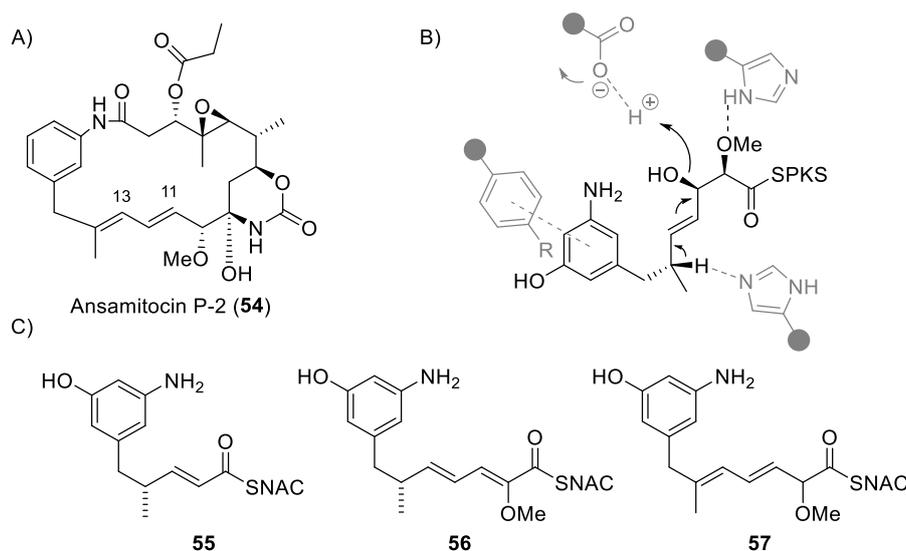


**Abbildung 22:** Studien zu der Dehydratasedomäne des Modules 3 der Corallopyronin A PKS. A) Struktur von Corallopyronin A. B) Enzymatische Umsetzung der CorDH3-Domäne mit SNAC-Thioestersubstrat **52**.

Der dritte Naturstoff, der zum einen eine in  $\beta,\gamma$ -Position verschobene Doppelbindung und zum anderen das charakteristische Verschiebungs-Modul ( $\text{KS}^\circ\text{-DH}^*\text{-ACP}$ ) aufweist, ist das Corallopyronin A (**51**, Abbildung 22, A).<sup>32</sup> Die Gruppe von SCHÄBERLE konnte in *in vitro*-Untersuchungen mit der isolierten  $\text{DH}^*$ -Domäne und anschließender NMR-Analyse zeigen, dass eine Doppelbindungsverschiebung katalysiert wird. Hierzu wurden SNAC-Thioester des natürlichen Substrates mit der isolierten Dehydratasedomäne inkubiert (Abbildung 22, B).<sup>32</sup>

Zusätzlich wurde eine Mutante hergestellt, in der die Aminosäure Histidin in ein Alanin geändert wurde ( $\text{DH}^*\text{H47A}$ ). Enzymtests mit der Mutante zeigten keine Doppelbindungsverschiebung, wodurch bewiesen wurde, dass auch bei einer Doppelbindungsverschiebung der Histidin-Rest entscheidend ist.<sup>32</sup>

<sup>32</sup> F. Lohr, I. Jenniches, M. Frizler, M. Meehan, M. Sylvester, A. Schmitz, M. Gütschow, P. C. Dorrestein, G. M. König, T. F. Schäberle *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 4175-4180.



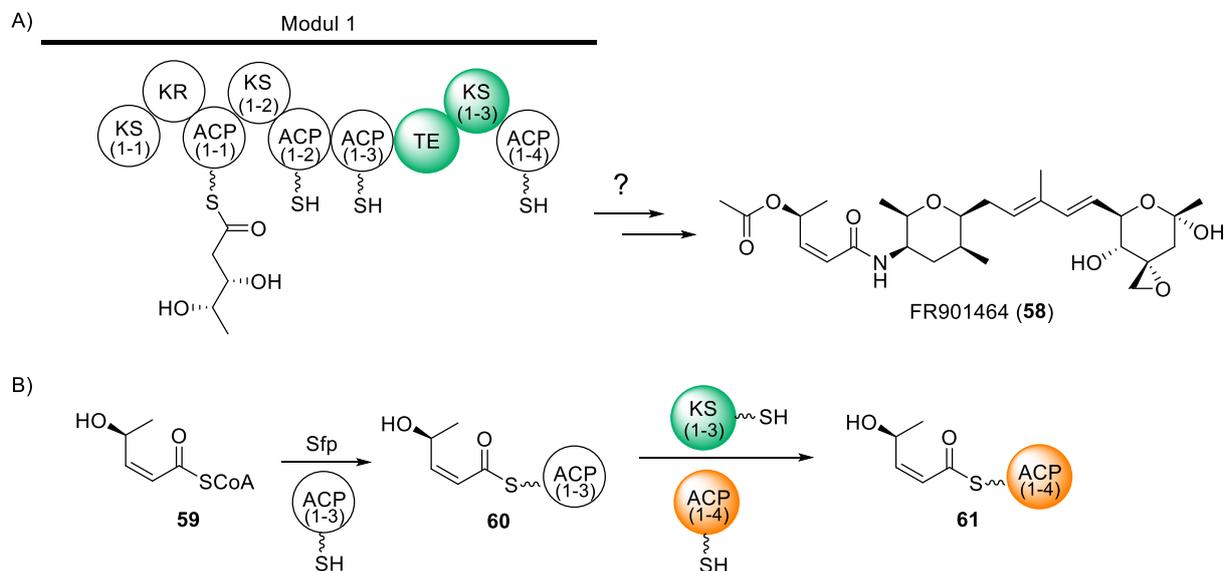
**Abbildung 23:** Studien zur Doppelbindungsverschiebung in Ansamitocin P-2 (**54**). A) Struktur von Ansamitocin P-2 (**54**). B) Mechanismus der vinylogen syn-Eliminierung. C) Synthetisierte Di- und Triketide.

Ansamitocin P-2 (**54**, Abbildung 23, A) ist ein weiteres Beispiel für einen Naturstoff, der ein verschobenes Doppelbindungsmotiv aufweist.<sup>33</sup> Die entsprechenden Doppelbindungen an den Kohlenstoffatomen C-11 und C-13 werden in den Modulen 2 und 3 der Ansamitocin-PKS gebildet. TAFT *et al.* zeigten, dass die Doppelbindungsverschiebung mit der Einführung des Olefins in Modul 3 einhergeht. Hierzu wurden die Di- beziehungsweise Triketide **55-57** der entsprechenden Module als SNAC-Thioester synthetisiert und an eine Deletionsmutante, bei der die Bildung des Startbausteins der PKS verhindert wird, supplementiert (Abbildung 23, C).<sup>33</sup> Bei den Studien wurde gezeigt, dass die Substrate **55** und **57** von der Deletionsmutante zum fertigen Naturstoff prozessiert werden.<sup>33</sup> Substrat **56** konnte nicht zum fertigen Naturstoff umgesetzt werden. Folglich werden nur Bausteine, die das verschobene  $\beta$ - $\gamma$ / $\delta$ - $\epsilon$ -Substitutionsmuster der Doppelbindungen zur Carbonylfunktion aufweisen, von Modul 3 in das Modul 4 weitergegeben. TAFT *et al.* postulierten, dass das Diensystem durch eine vinyloge *syn*-Eliminierung während der Dehydratisierung der DH-Domäne entsteht (Abbildung 23, B).<sup>33</sup>

<sup>33</sup> F. Taft, M. Brünjes, T. Knobloch, H. G. Floss, A. Kirschning *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3812-3813.

### 3.3.2.6 Thioesterase mit Dehydratasefunktion

Das Polyketid FR901464 (**58**) ist ein Naturstoff, der neben zwei mehrfachsubstituierten Tetrahydropyranringen eine ungewöhnliche *Z*-konfigurierte Doppelbindung aufweist.<sup>34</sup>

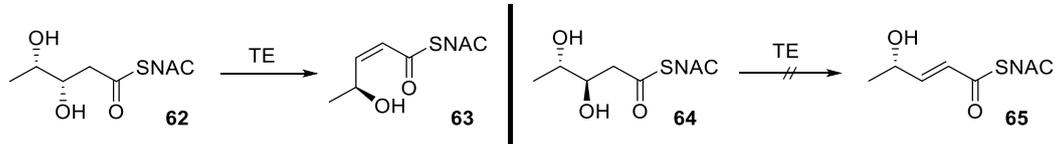


**Abbildung 24:** Studien zur Einführung der *Z*-konfigurierten Doppelbindung in den Naturstoff FR901464 (**58**). A) Modul 1 der FR901464 (**58**)-bildenden PKS. B) Enzymatische Umsetzung der Ketosynthasedomäne KS<sub>1-3</sub> mit *Z*-konfiguriertem ACP<sub>1-3</sub>-gebundenem Substrat **60** und der isolierten ACP<sub>1-4</sub>-Domäne.

Das doppelbindungsbildende Modul 1 weist keine Dehydratasedomäne auf, sodass zunächst angenommen wurde, dass die Doppelbindung *post*-PKS eingeführt wird (Abbildung 24, A). Allerdings konnte diese Hypothese durch Genclusteranalysen ausgeschlossen werden, da kein entsprechendes Enzym annotiert werden konnte. He *et al.* stellten die Theorie auf, dass eine DH-Domäne aus einem späteren Modul für die Einführung der Doppelbindung verantwortlich ist. Um dies zu belegen, wurden *in vitro*-Tests mit der heterolog in *E. coli* produzierten KS\*-Domäne durchgeführt (Abbildung 24, B).<sup>34</sup> Die Ketosynthasedomäne soll den Transfer des Substrates vom ACP<sub>1-3</sub> des ersten Modules auf das ACP<sub>1-4</sub> desselben Modules katalysieren. Auf Grund der zu erwartenden Substratspezifität der KS\*-Domäne sollte nur eine Doppelbindungskonfiguration akzeptiert werden. Die durchgeführten Enzymtests mit den enzymatischen Domänen KS\*, ACP<sub>1-2</sub>, ACP<sub>1-3</sub>, ACP<sub>1-4</sub> und dem ACP gebundenen *Z*-beziehungsweise *E*-konfiguriertem Substrat zeigten, dass nur das *Z*-konfigurierte Substrat akzeptiert wurde (Abbildung 24, B). Da die Ketoreduktasedomäne aus Modul 1 eine B-Typ KR-Domäne (bildet 3D-Alkohol, der zu einer *E*-konfigurierten Doppelbindung führt) ist,

<sup>34</sup> H.-Y. He, M.C. Tang, F. Zhang, G.-L. Tang *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4488-4491.

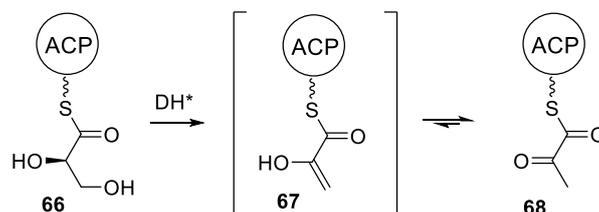
widerlegt dieses Ergebnis die Hypothese, dass eine Dehydratasedomäne aus einem anderen Modul die Doppelbindung einführt.<sup>34</sup>



**Abbildung 25:** Enzymatische Umsetzung der isolierten TE-Domäne des Modules 1 mit den Substraten **62** und **64**.

Das Modul 1 der FR901464 Polyketidsynthase beinhaltet eine TE-Domäne, die ebenfalls als Kandidat für die Bildung der Z-konfigurierten Doppelbindung in Frage käme. Um dies zu überprüfen, wurde die TE-Domäne heterolog in *E. coli* produziert und in *in vitro*-Untersuchungen mit den SNAC-Thioestern **62** und **64** eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass die TE-Domäne die Doppelbindung ausschließlich ausgehend vom 3D-konfigurierten Alkohol **62** generiert (Abbildung 25).<sup>34</sup>

Die Übernahme der Rolle einer DH-Domäne im Rahmen einer Doppelbindungsbildung durch eine TE-Domäne ist zunächst ungewöhnlich. Gleichwohl teilen DH- und TE-Domänen einige zentrale mechanistische und strukturelle Eigenschaften. In beiden Fällen handelt es sich um hydrolytische Enzyme, die beide die typische doppelte HOTDOG-Faltung und sehr ähnliche Aminosäuren an charakteristischen Positionen des aktiven Zentrums tragen (DH: His-Asp; TE: Ser-His-Asp).<sup>34</sup>



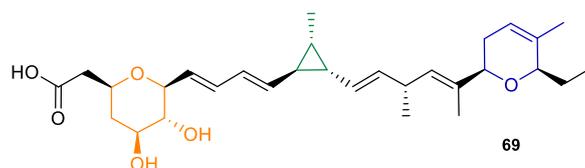
**Abbildung 26:** Enzymatische Umsetzung der DH\*-Domäne aus dem Lademodul der FR901464-Biosynthese.

Zusätzlich zu der TE-Domäne in Modul 2 weist die PKS des Naturstoffes FR901464 (**58**) eine weitere ungewöhnliche dehydrataseähnliche Domäne DH\* im Lademodul auf. Die Funktion der DH\*-Domäne wurde ebenfalls durch *in vitro*-Untersuchungen aufgeklärt. Es wurde

gezeigt, dass die DH\*-Domäne ACP-gebundenes Glycerat akzeptiert und die Reaktion zu einem  $\alpha$ -Ketothioester katalysiert (Abbildung 26).<sup>35</sup>

### 3.3.2.7 Ambruticin-Polyketidsynthase

Ambruticin (**69**, Abbildung 27) ist ein Polyketid Typ I, das durch eine *cis*-AT PKS gebildet wird. Die Struktur von Ambruticin weist unterschiedliche Charakteristika auf. Hierzu zählen ein Tetrahydropyranring, ein Cyclopropylring und ein Dihydropyranring.



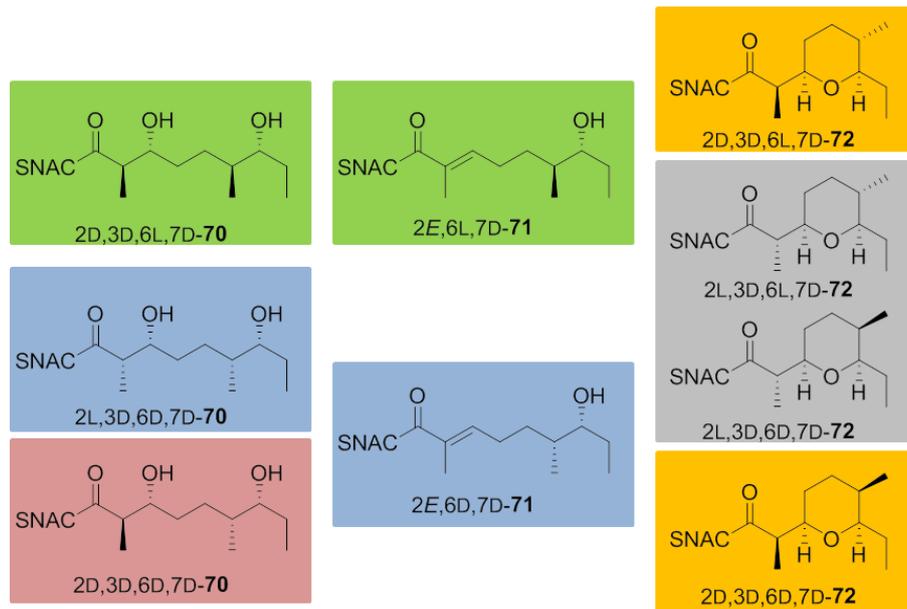
**Abbildung 27:** Struktur von Ambruticin S (**69**).

Zum Aufbau des Dihydropyranringes (DHP) wird zunächst ein Tetrahydropyranring (THP) hergestellt, der durch *post*-PKS-Modifizierungen in den DHP-Ring überführt wird. BERKHAN *et al.* konnten zeigen, dass die Dehydratasedomäne des Modules 3 (AmbDH3) die Bildung des THP-Ringes katalysiert.<sup>36</sup>

---

<sup>35</sup> H.-Y. He, H. Yuan, M.-C. Tang, G.-L. Tang *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11315-11319.

<sup>36</sup> G. Berkhan, F. Hahn *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14240-14244.



**Abbildung 28:** Synthetisierte und die in *in vitro*-Tests mit der AmbDH3-Domäne eingesetzten Substrate. Die Verbindungen wurden farblich unterlegt, um die Akzeptanz der Substrate von der DH-Domäne zu verdeutlichen. Außerdem sind die cyclisierten Produkte der Reaktion mit der AmbDH3-Domäne dargestellt. Grün: sehr gute Akzeptanz von AmbDH3, blau: moderate Akzeptanz, rot: das Substrat wurde nicht akzeptiert, orange: Produkte der Enzymreaktion, die von dem Enzym hergestellt werden, grau: Produkte der chemischen Cyclisierung der offenkettigen Vorläufer.

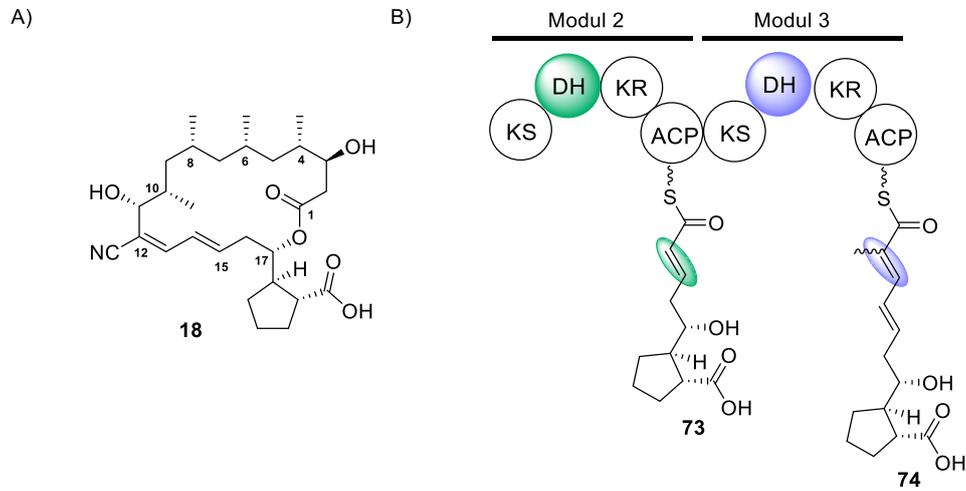
Hierzu wurden Enzymaktivitätstests mit der in *E. coli* produzierten, gereinigten enzymatischen Domäne AmbDH3 und synthetischen, potentiellen Vorläufersurrogaten durchgeführt. Außerdem wurden Referenzmoleküle zur Aufklärung der gebildeten Stereochemie hergestellt (Abbildung 28).<sup>36</sup>

Die Enzymtests zeigten, dass die AmbDH3-Domäne 2D,3D-konfigurierte Vorläufer akzeptiert und diese in 2E-konfigurierte Olefine überführt. Des Weiteren weist die AmbDH3-Domäne eine Zyklase-Aktivität auf, wodurch stereoselektiv 2D,3D-konfigurierte, cyclisierte Produkte gebildet werden. Durch die Verwendung der verschiedenen Diastereomere wurde gezeigt, dass die Konfiguration an C-6 die Aktivität der AmbDH3-Domäne stark beeinflusst, sodass die Konfiguration des Intermediates bestimmt wurde.<sup>36</sup>

Die Dehydratasedomäne des Modules 3 der Ambruticin-PKS konnte auf Grund von Sequenzvergleichen in dieselbe Klasse wie andere DH-Domänen von *cis*-AT PKS-Systemen zugeordnet werden. Auch die katalytische Triade ist identisch. Die AmbDH3-Domäne zeigt zusätzlich zu der vorhergesagten Dehydrataseaktivität eine Aktivität als Pyran-bildende Zyklase.<sup>36</sup>

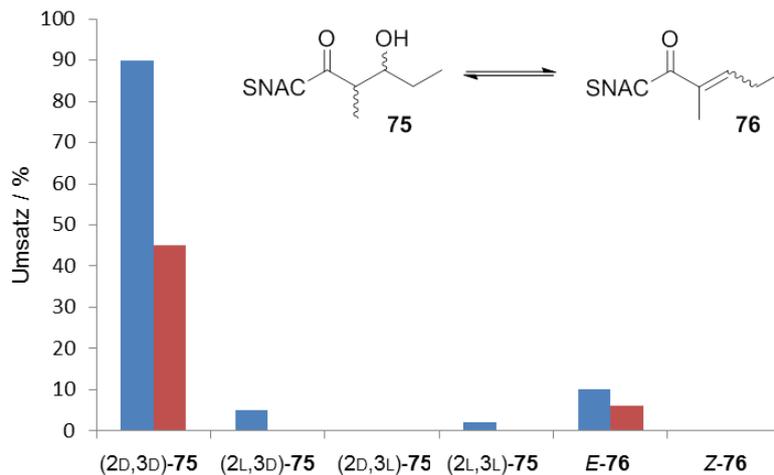
### 3.3.3 Untersuchungen zu BorDH3 der Borrelidin Biosynthese

Borrelidin (**1**) weist ein ungewöhnliches Cyano-Dien mit einer *Z*-konfigurierten Doppelbindung auf (Abbildung 29, A), die katalysiert durch das Modul 3 gebildet wird.



**Abbildung 29:** Ausschnitt aus der Borrelidin-Polyketidsynthese. A) Struktur von Borrelidin (**1**). B) Gezeigt sind die Module 2 und 3, die je eine DH-Domäne aufweisen. Farblieh hervorgehoben sind die DH-Domänen sowie die entstehenden Doppelbindungen.

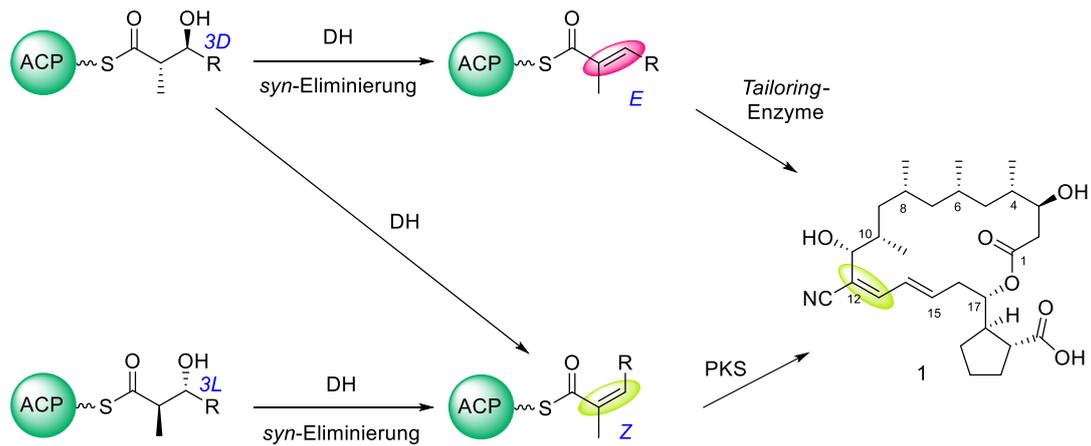
Gemäß CAFFREY und REID wurde die Domäne BorKR3 den B-Typ Ketoreduktasen zugeordnet, die ausgehend von einem 3D-Alkohol eine *E*-konfigurierte Doppelbindung generieren. Daher sollte durch *in vitro*-Untersuchungen mit der isolierten BorDH3-Domäne geklärt werden, ob zunächst eine *E*-konfigurierte Doppelbindung entsteht, die in einem späteren Schritt der Biosynthese isomerisiert, oder ob direkt eine *Z*-Konfiguration gebildet wird (Abbildung 29, B).



**Abbildung 30:** Ergebnisse der Enzymaktivitätstests mit den isolierten Dehydratasedomänen BorDH2 und BorDH3. Blau: BorDH2, Rot: BorDH3.<sup>13</sup>

Für die Enzymaktivitätstests wurden die Dehydratasedomänen der Module 2 und 3 (BorDH2, BorDH3) heterolog in *E. coli* produziert. Zusätzlich wurden unverzweigte, D-konfigurierte 3-Hydroxythioester sowie alle Diastereomere vom 2-Methyl-3-hydroxy-Substrat **75** (Abbildung 30) synthetisiert und in Form von SNAC-Thioestern umgesetzt.<sup>13</sup>

Die Gruppe von LEADLAY zeigte, dass lediglich (2D,3D)-konfigurierte Substrate sowohl von BorDH2 als auch von BorDH3 zu einer E-konfigurierten Doppelbindung umgesetzt wurden, wodurch eine Substratspezifität sowie eine Stereoselektivität der enzymatischen Domänen nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse stützen die These, dass die beiden enzymatischen Domänen im Rahmen der Borrelidin-Biosynthese E-konfigurierte Alkene bilden. Da die eingesetzten Thioester deutlich vereinfachte Substrate darstellen und der SNAC-Rest den ACP-gebundenen Zustand nur auf minimale Art und Weise widerspiegelt, ist es notwendig ein System zu entwickeln, das den natürlichen Zustand besser imitiert.



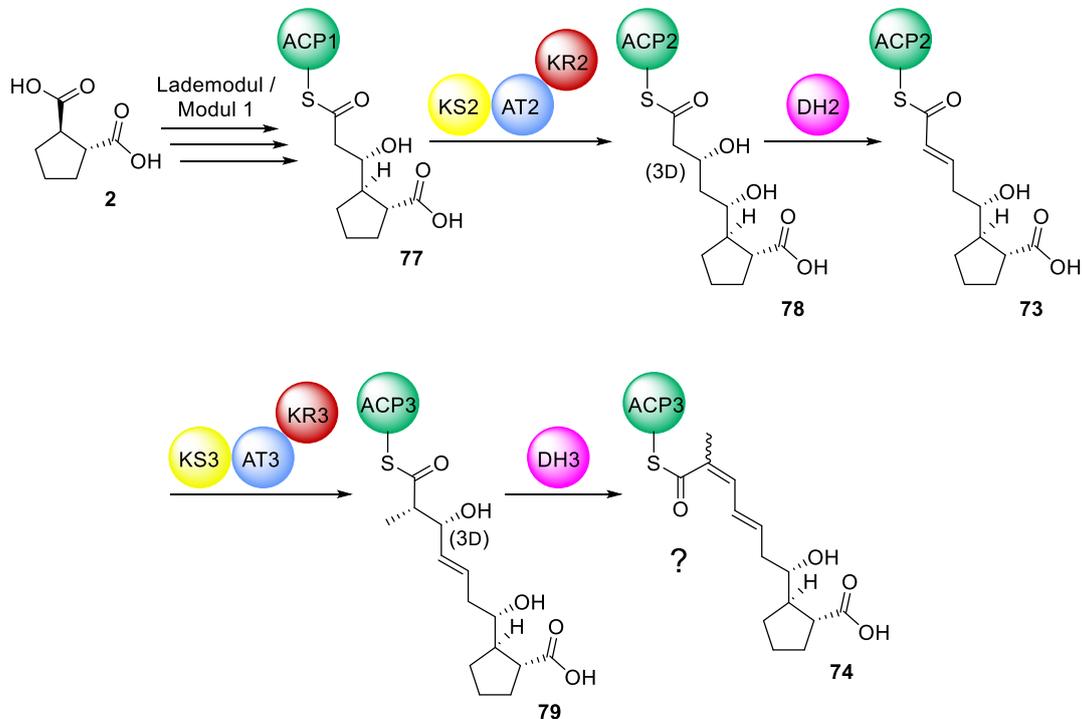
**Abbildung 31:** Möglichkeiten um die Z-konfigurierte Doppelbindung in Borrelidin aufzubauen.

Allgemein können Z-konfigurierte Doppelbindungen in der Polyketidbiosynthese durch eine *syn*-Dehydratisierung von 3L-konfigurierten Alkoholen gebildet werden (Abbildung 31). Darüber hinaus sind zwei bisher mechanistisch noch nicht studierte Fälle denkbar, bei denen die Doppelbindungsbildung von außerhalb der PKS kodierten Enzymen sowohl durch eine Isomerisierung von E-konfigurierten Doppelbindungen als auch durch eine von 3D-konfigurierten Alkoholen ausgehende Z-selektive Dehydratisierung durchgeführt wird.

Die Konfiguration des Diensystems in Borrelidin (**1**) wird zunächst durch die KR- und DH-Domänen in den Modulen 2 und 3 der Borrelidin-Polyketidsynthese gebildet. Allerdings ist unbekannt, ob zunächst das E,E-konfigurierte oder direkt das E,Z-konfigurierte Dien entsteht.

## 4 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit soll die durch die Dehydratasedomäne BorDH3 der Borrelidin-PKS gebildete Doppelbindungskonfiguration bestimmt werden.



**Abbildung 32:** Ausschnitt aus der Borrelidin-Biosynthese.

Der Naturstoff Borrelidin (**1**) ist ein 18-gliedriges Makrolakton, das außergewöhnliche Strukturmerkmale aufweist. Dazu zählt das Cyano-Dien zwischen den Kohlenstoffatomen C12 bis C15, das eine für Naturstoffe unübliche *Z*-konfigurierte Doppelbindung beinhaltet. Da jedoch unbekannt ist, ob zunächst ein *E,E*-oder direkt das *E,Z*-Dien entsteht, sollten Enzymaktivitätstests durchgeführt werden, in denen die heterolog produzierten DH-Domänen der Module 2 und 3 direkt mit realistischen Vorläufersurrogaten umgesetzt werden (Abbildung 32).

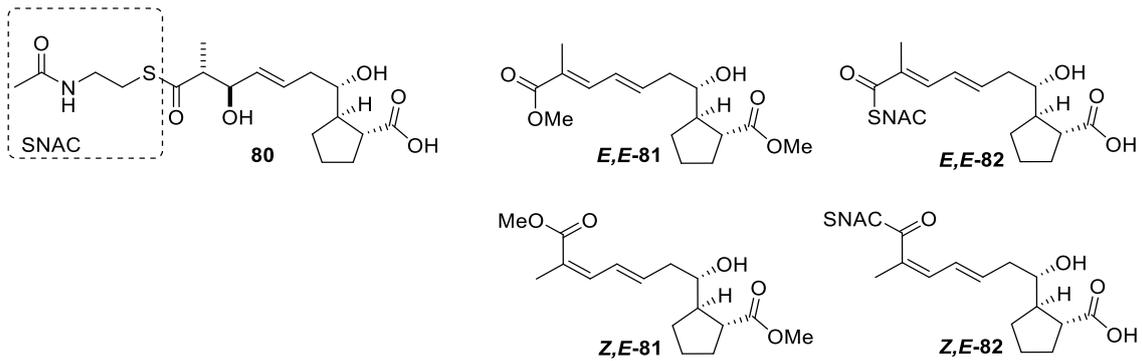


Abbildung 33: Synthetische Zielmoleküle.

Aufbauend auf vorangegangene Arbeiten<sup>37,13</sup> sollte eine Syntheseroute des für die Enzymaktivitätstests benötigten Vorläufersurrogates des Modules 3 durchgeführt werden. Vorläufer **80** soll als SNAC-Thioester synthetisch hergestellt werden. Zusätzlich sollen für die Auswertung der Enzymaktivitätstests benötigte Referenzmoleküle **81-82** synthetisiert werden (Abbildung 33).

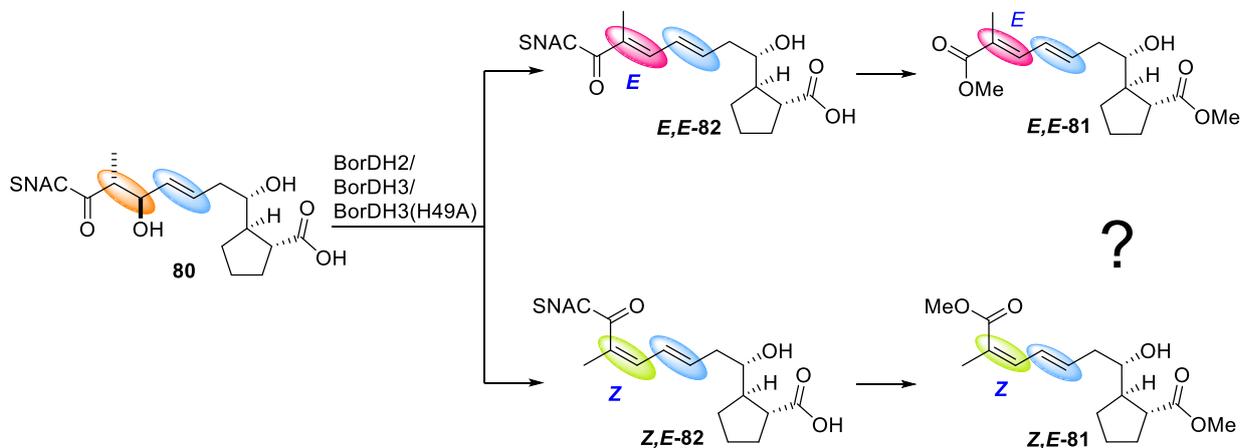


Abbildung 34: Geplante Enzymaktivitätstests. Enzymaktivitätstests im analytischen Maßstab mit BorDH3, BorDH2 oder BorDH3(H49A).

Des Weiteren sollten die enzymatischen Domänen BorDH3 und BorDH2 sowie die Punktmutante BorDH3(H49A) ausgehend von vorhandenen Plasmiden<sup>38</sup> heterolog in *E. coli*

<sup>37</sup> N. Kandziora, „*Synthese potentieller Vorläufer der Borrelidin Biosynthese*“, Leibniz Universität Hannover, **2012**

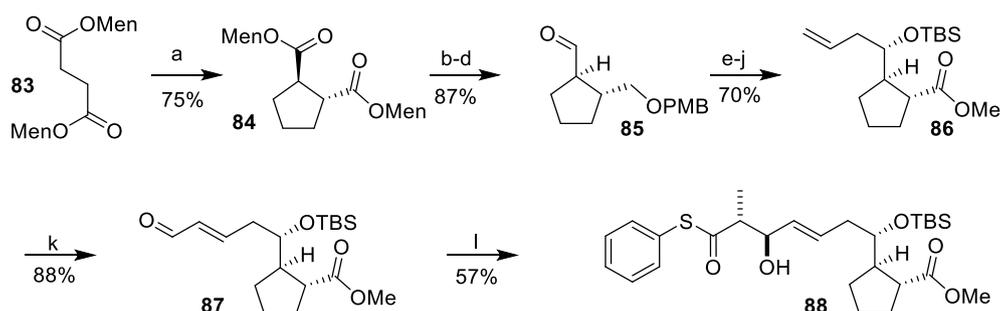
<sup>38</sup> Laboratorien von P. Leadlay, University of Cambridge/UK.

produziert und gereinigt werden. Die enzymatischen Domänen sollten in Enzymaktivitätstests eingesetzt werden. Dabei sollte zum einen die Akzeptanz der BorDH2- und BorDH3-Domänen für den synthetisch hergestellten Vorläufer getestet (Substratspezifität) und zum anderen die gebildeten Doppelbindungen auf ihre Geometrie hin überprüft werden (Stereoselektivität). Dies sollte sowohl durch Enzymaktivitätstests im analytischen Maßstab mit anschließender HPLC-MS-Analyse vor und nach Derivatisierung als auch über die NMR-spektroskopische Analyse eines Enzymtestes im semipräparativen Maßstab erfolgen (Abbildung 34).

# 5 Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse

## 5.1 Synthese des BorDH3-Vorläufersurrogates

Die Synthese des für die Enzymaktivitätstests benötigten Vorläufers **80** des Modules 3 der Borrelidin-Polyketidsynthese wurde bereits in früheren Arbeiten basierend auf der Totalsynthese von OMURA *et al.* begonnen.<sup>37,39,40</sup> Ausgehend von *bis*-(L)-Menthylsuccinat (**6**) konnte Verbindung **7** in einer von YAMAMOTO beschriebenen Carbozyklisierung erhalten werden. Nach anschließenden Reduktions- und Oxidationsschritten wurde Aldehyd **8** in einer chelatkontrollierten SAKURAI-Reaktion eingesetzt, dessen Ausbeute im Rahmen dieser Arbeit verbessert wurde. Durch weitere Entschützungs- und Oxidationsschritte konnte Olefin **9** in guten Ausbeuten hergestellt und im Anschluss an eine Kreuzmetathese mit dem GRUBBS II-Katalysator in einer *anti*-selektiven Thioaldolreaktion zu Aldolprodukt **11** umgesetzt werden (Schema 1). Thiophenolester **88** wurde als Enantiomerenpaar erhalten.



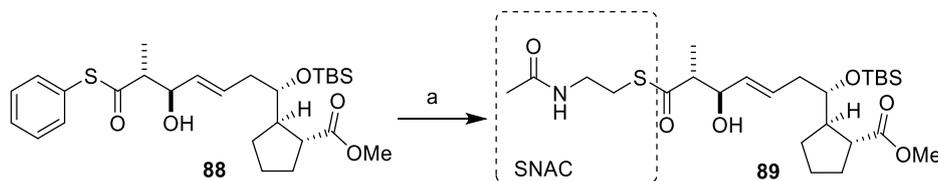
**Schema 1:** Synthese von Aldolprodukt **11**: a) LiTMP, 1,3-Ditosylpropan, THF, -78 °C, 2 h, 75%; b) LiAlH<sub>4</sub>, Et<sub>2</sub>O, 0 °C, 2 h; c) PMBCl, NaH, DMF, -30 °C, 2 h, 85% über 2 Stufen; d) DMP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 2 h; e) Allyl-TMS, MgBr<sub>2</sub>·Et<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 6 h, 0 °C, 67% über 2 Stufen; f) TBS-OTf, 2,6-Lutidin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, 1 h; g) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 30 min, 84% über 2 Stufen; h) DMP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 2 h; i) NaClO<sub>2</sub>, 2-Methyl-2-Buten, *t*BuOH, Phosphatpuffer, RT, 16 h; j) TMS-CHN<sub>2</sub>, Toluol-MeOH (2:3), RT, 40 min, 71% über 3 Stufen, k) Crotonaldehyd, Grubbs II, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50 °C, 2 h, 88%, l) Thiophenolpropionat, Me<sub>2</sub>EtN, Cy<sub>2</sub>BCl, Et<sub>2</sub>O, -78 °C für 2 h, dann -20 °C für 18 h, 57%.<sup>41</sup>

<sup>39</sup> Dr. F. Hahn, Leibniz Universität Hannover, Institut für Organische Chemie und Biomolekulares Wirkstoffzentrum, Hannover, **2012**.

<sup>40</sup> T. Nagamitsu, D. Takano, K. Marumoto, T. Fukuda, K. Furuya, K. Otoguru, K. Takeda, I. Kuwajima, Y. Harigaya, S. Omura *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 2744-2756.

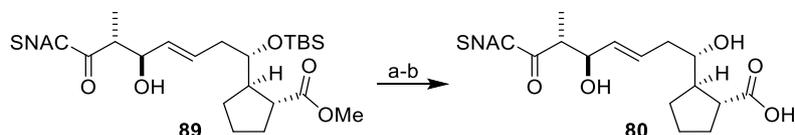
<sup>41</sup> F. Hahn, N. Kandziora, S. Friedrich, P. L. Leadlay *Beilstein. J. Org. Chem* **2014**, 10, 634-640.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausgehend von **88** eine Umesterung zum SNAC-Thioester durchgeführt. Dazu wurde eine Vorschrift von WHITE *et al.* verwendet.<sup>42</sup> Thioester **89** konnte in guter Ausbeute (70%, Schema 2) erhalten werden.



**Schema 2:** Synthese von SNAC-Thioester **89**: a) HSNAC, DiPEA, DMF, RT, 16 h, 70%.<sup>42</sup>

Zum Abschluss der Synthese erfolgte eine Entschützungssequenz der TBS-Gruppe und des Methylesters. Zunächst wurde der Silylether unter schwach sauren Bedingungen mit Ameisensäure gespalten. Die Reaktion wurde mittels LC-MS verfolgt und das Produkt ohne weitere Reinigung direkt in die Entschützung des Methylesters mit Schweineleberesterase (SLE) eingesetzt (Schema 3). Nach der Detektion des vollständigen Umsatzes der Reaktion per LC-MS wurde die Reaktion aufgearbeitet und Produkt **80** mittels massengekoppelter, präparativer HPLC gereinigt. Das Vorläufersurrogat der BorDH3-Domäne **80** konnte in guter Ausbeute erhalten werden (81% über 2 Stufen, Schema 3).



**Schema 3:** Finale Entschützungssequenz zum Vorläufer des Modules 3 der Borrelidin-PKS: a) THF:HCOOH:H<sub>2</sub>O (6:3:1), RT, 5 d, b) SLE, Puffer (pH 8), RT, 5 d, 81% über 2 Stufen. SLE: Schweineleberesterase.<sup>43,44</sup>

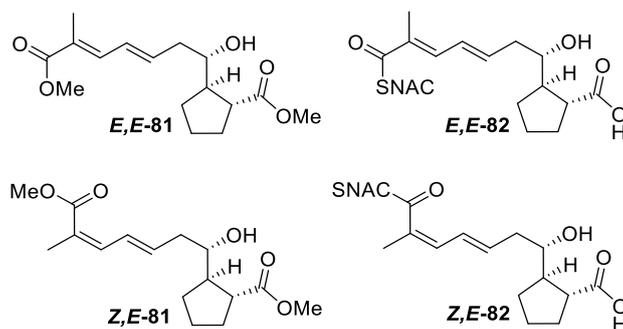
## 5.2 Synthese der Referenzmoleküle

Die Auswertung der Enzymaktivitätstests mit der BorDH3-Domäne sollte auf zwei unterschiedlichen Wegen realisiert werden. Zum einen im analytischen Maßstab durch eine UPLC-MS-Analyse und zum anderen im semipräparativen Maßstab durch eine NMR-spektroskopische Analyse. Dazu sollten die Referenzmoleküle **81** und **82** hergestellt werden. Die Doppelbindungsisomere *E,E*-**81** und *Z,E*-**81** wurden bereits in einer vorangegangenen Arbeit synthetisiert.<sup>37</sup> Außerdem wurde SNAC-Thioester *E,E*-**82** von F. HAHN bereitgestellt.

<sup>42</sup> S. Fanjul, A. N. Hulme, J. W. White *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4219-4222.

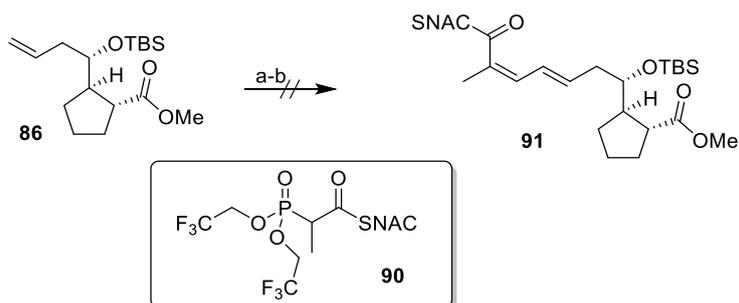
<sup>43</sup> E. J. Thomas, A. C. Williams *J. Am. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 992.

<sup>44</sup> Y. Morimoto, Y. Terao, K. Achiwa *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 226-2271.



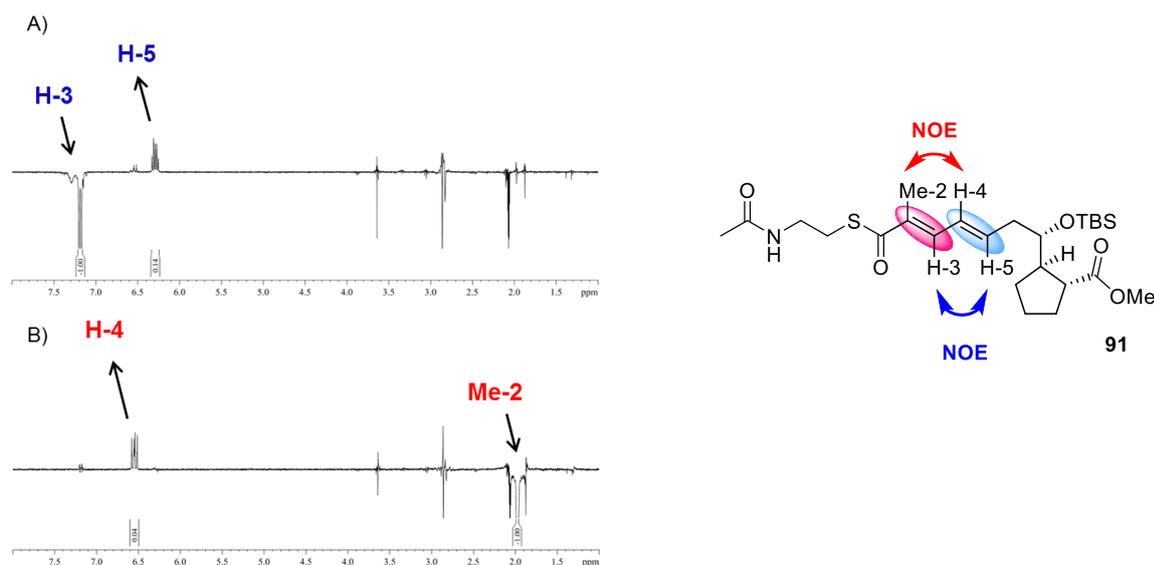
**Abbildung 35:** Synthetisierte Referenzmoleküle für die UPLC-MS-Analyse.

Zusätzlich zu den vorhandenen Referenzmolekülen sollte *Z,E*-Dien **82** durch eine STILLGENNARI-Olefinierung synthetisiert werden. Dazu wurde Olefin **86** in einer vom GRUBBS-Katalysator der zweiten Generation katalysierten Kreuzmetathese mit anschließender STILLGENNARI-Olefinierung eingesetzt. Basierend auf der Vorschrift von TAFT *et al.* sollte SNAC-Thioesterphosphonat **90** mit Aldehyd **87** zur *Z*-konfigurierten Doppelbindung reagieren.



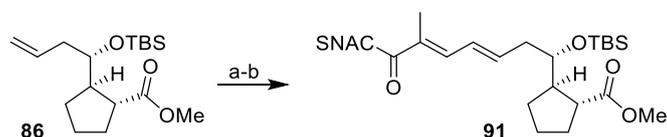
**Schema 4:** Synthese von SNAC-Thioester **91**; a) Crotonaldehyd, Grubbs II,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Rückfluss, 2 h, 88%, b) SNAC-Thioesterphosphonat **15**, 18-Krone-6,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , Toluol,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , 3 h.

NMR-spektroskopische Analyse der Reaktion zeigte, dass ein Olefinierungsprodukt gebildet wurde, dessen Konfiguration durch NOE-Experimente analysiert wurde. Dabei wurde auf die Doppelbindungsprotonen und die Methylgruppe an C-2 eingestrahlt (Abbildung 36).



**Abbildung 36:** NOE-Analyse des Produktes **91**; A) Eingestrahlt wurde bei 7.23 ppm (H-3), Wechselwirkung mit 6.24 ppm (H-5), keine Korrelation mit Me-2. B) Eingestrahlt wurde bei 2.03 ppm (Me-2), Wechselwirkung mit 6.57 ppm (H-4); aufgenommen in Aceton- $d_6$  bei 500 MHz.

Die NOE-Signale zeigen, dass die Methylgruppe mit dem Proton H-4 wechselwirkt. Des Weiteren zeigen die Protonen H-3 und H-5 eine Wechselwirkung, wodurch gezeigt wurde, dass die Doppelbindung *E*-konfiguriert ist (Abbildung 36, Schema 5).



**Schema 5:** Synthese von SNAC-Thioester **91**; a) Crotonaldehyd, Grubbs II,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Rückfluss, 2 h, 88%, b) SNAC-Thioesterphosphonat **90**, 18-Krone-6,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , Toluol,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , 3 h, 35%.

Durch das NOE-Experiment wurde bestätigt, dass die STILL-GENNARI-Olefinierung nicht zum gewünschten *Z*-konfiguriertem Produkt **91** geführt hat. Dies kann an der Basenlabilität des Produktes liegen. Auf Grund der vorhandenen konjugierten Doppelbindungen kann an mehreren Stellen eine Deprotonierung stattfinden. Durch eine wässrige Aufarbeitung kann die Reprotonierung mit einer Isomerisierung der Doppelbindung einhergehen.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit konnte das *Z,E*-konfigurierte Dien nicht erhalten werden, sodass die Konfigurationsbestimmung des Rohproduktes der Enzymreaktionen nach Derivatisierung oder durch direkte NMR-spektroskopische Analyse mit nachfolgendem NOE-Experiment notwendig war.

### 5.3 Testreaktionen für die Auswertung der Enzymaktivitätstests

Die Konfigurationsbestimmung des Rohproduktes der im analytischen Maßstab durchgeführten Enzymreaktion sollte durch den Vergleich mit den bereitgestellten Referenzmolekülen *E,E*-**81** und *Z,E*-**81** erfolgen (Abbildung 37). Hierzu sollte zunächst ein zuverlässiges Verfahren entwickelt werden, durch das die Primärprodukte des Enzymaktivitätstests in die entsprechenden *bis*-Methylester überführt werden konnten.

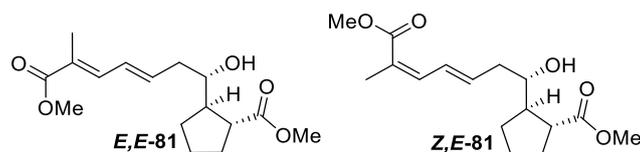
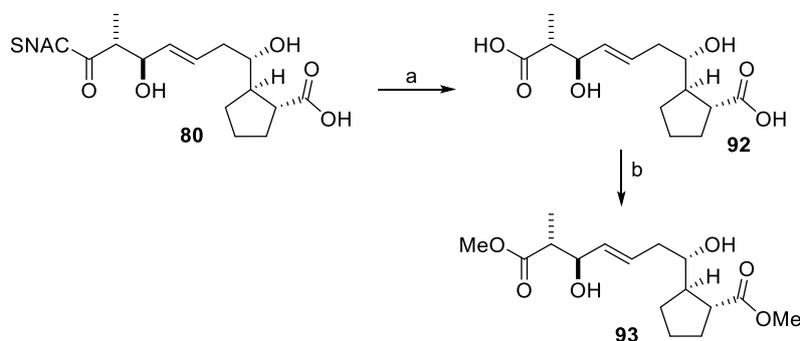


Abbildung 37: Bereitgestellte Referenzmoleküle.

Zur Derivatisierung wurde Thioester **80** als Modells substrat mit 0.5 M Natronlauge und anschließend mit TMS-Diazomethan behandelt. Der Verlauf der Reaktion wurde ausschließlich per LC-MS verfolgt. Methylester **93** konnte erfolgreich erhalten werden (Schema 6). Es erfolgte keine Reinigung und Isolierung des Produktes.



Schema 6: Synthese von Methylester **93**; a) 0.5 M NaOH, H<sub>2</sub>O, THF, RT, 15 min, b) TMS-Diazomethan, Toluol, MeOH, RT, 15 min, vollständiger Umsatz.

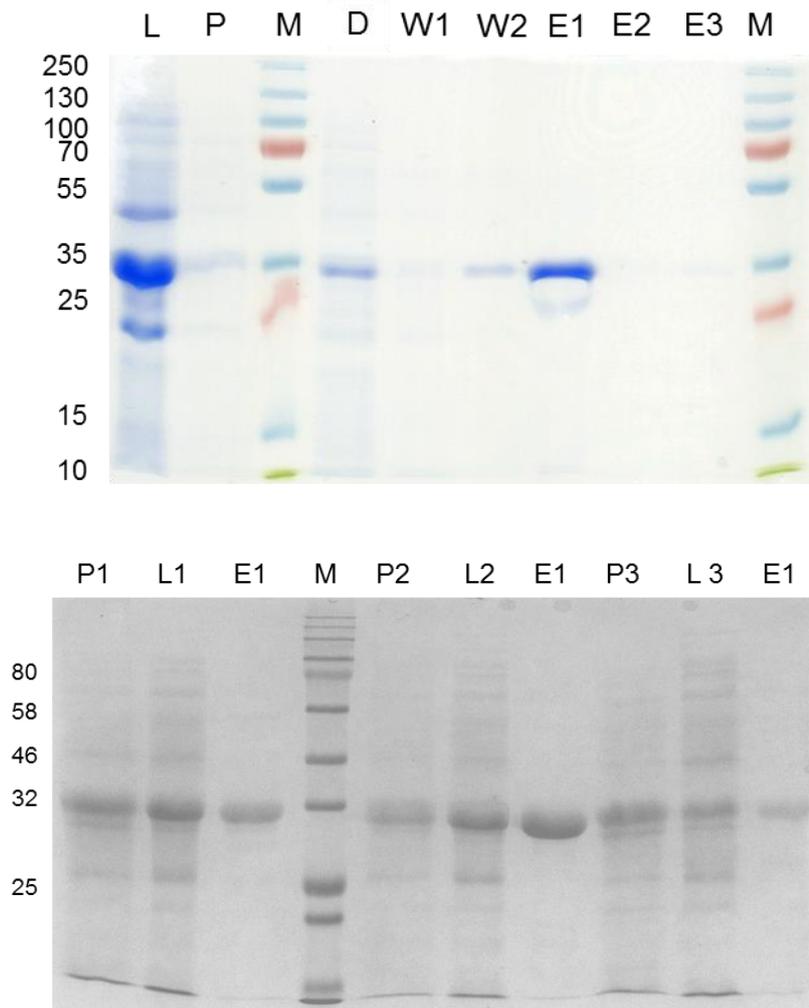
### 5.4 Molekularbiologische Arbeiten

Für die Enzymaktivitätstests mit realistischen Vorläufersurrogaten der BorDH3-Domäne sollten die BorDH3- und BorDH2-Domänen heterolog in *E. coli* produziert werden. Außerdem sollte eine inaktive, spezifische Punktmutante eingesetzt werden, bei der in der katalytischen Triade ein Histidin gegen ein Alanin ausgetauscht ist.

#### 5.4.1 Expression und Reinigung der Dehydratasedomänen BorDH

Die Expression der Dehydratasedomänen BorDH erfolgte nach einer Vorschrift von ANDEXER *et al.* ausgehend von den rekombinanten Plasmiden *borDH3\_pET28a(+)*, *borDH2\_pET28a(+)* und *borDH3(H49A)\_pET28a(+)*, die in Laboratorien der Arbeitsgruppe LEADLAY kloniert wurden.<sup>13</sup> Hierzu wurden zunächst Transformationen chemisch-kompetenter *E. coli* BL21 (DE3) RP Codon Plus-Zellen mit dem jeweiligen Plasmid durchgeführt. Im Anschluss wurden Flüssigkulturen mit einer das Plasmid tragenden Bakterienkolonie inokuliert und die Expression mit IPTG induziert. Die Zellen wurden geerntet und die nach Zentrifugation erhaltenen Zellpellets mit Hilfe der FRENCH-PRESS aufgeschlossen.

Die Fusion der Dehydratasedomänen mit einem *N*-terminalen His<sub>6</sub>-Tag ermöglicht es, das Protein per immobilisierter Metall-Ionen-Affinitätschromatographie (IMAC) an Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Säulenmaterial zu reinigen. Bei dieser Methode werden die Fremdproteine, die nicht an das Säulenmaterial binden, in zwei Waschschritten ausgewaschen. Im Anschluss wird das gebundene Zielprotein mit Fraktionen steigenden Imidazol-Gehaltes von der Ni-NTA-Säule eluiert. Zur Analyse wurden die Proteine in den Wasch- und Elutionsfraktionen sowie im Durchlauf nach ihrer Größe mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Auf den SDS-Polyacrylamidgelen (beispielhaft für die BorDH3-Domäne, Abbildung 38, oben) ist zu erkennen, dass das Zielprotein mit einer Größe von ca. 35 kDa im ersten Elutionsschritt (100 mM Imidazol) enthalten ist (Abbildung 38; Vergleich der drei DH-Domänen BorDH3, BorDH2 und BorDH3(H49A) siehe Abbildung 38, unten). Außerdem befindet sich ein Teil des Proteins im Durchlauf, sodass davon ausgegangen werden kann, dass nicht die gesamte Proteinmenge an das Säulenmaterial gebunden hat.

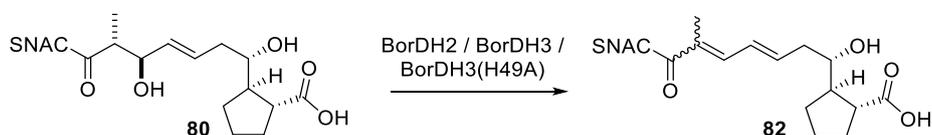


**Abbildung 38:** SDS-Polyacrylamidgele der mikrobiellen Expression der Dehydratasedomänen. oben: SDS-Polyacrylamidgel (12%) der mikrobiellen Expression der Dehydratasedomäne BorDH3 in 2TY-Medium. M: Protein-Größenstandard PageRuler™ Presatinated Broad Range Protein Ladder (FERMENTAS); unten: SDS-Polyacrylamidgel (15%) der mikrobiellen Expression der Dehydratasedomänen in 2TY-Medium. P1+L1: BorDH3, P2 + L2: BorDH2, P3 + L3: BorDH3(H49A), M: Protein-Größenstandard Color Prestained Protein Standard Broad Range (11–245 kDa, NEW ENGLAND BIOLABS); L: Lysat, P: Pellet, D: Durchfluss, W: Waschschrte 1-2 (0 mM, 50 mM Imidazol), E: Elutionsschritte 1-3 (100 mM, 250 mM, 500 mM Imidazol). Theoretisches Molekulargewicht der Dehydratasedomänen: 35 kDa.

Nach der Ni-NTA-Säule wurden die Elutionslösungen, die die entsprechenden Zielproteine enthielten, durch Ultrafiltration konzentriert, durch Größenausschlusschromatographie mit PD-10 Säulen entsalzt und das Protein gleichzeitig umgepuffert. Im Anschluss wurde die Proteinlösung erneut konzentriert und entweder sofort in die Enzymaktivitätstests eingesetzt oder bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 50% Glycerin aufbewahrt.

## 5.5 Enzymaktivitätstests der Dehydratasedomänen BorDH

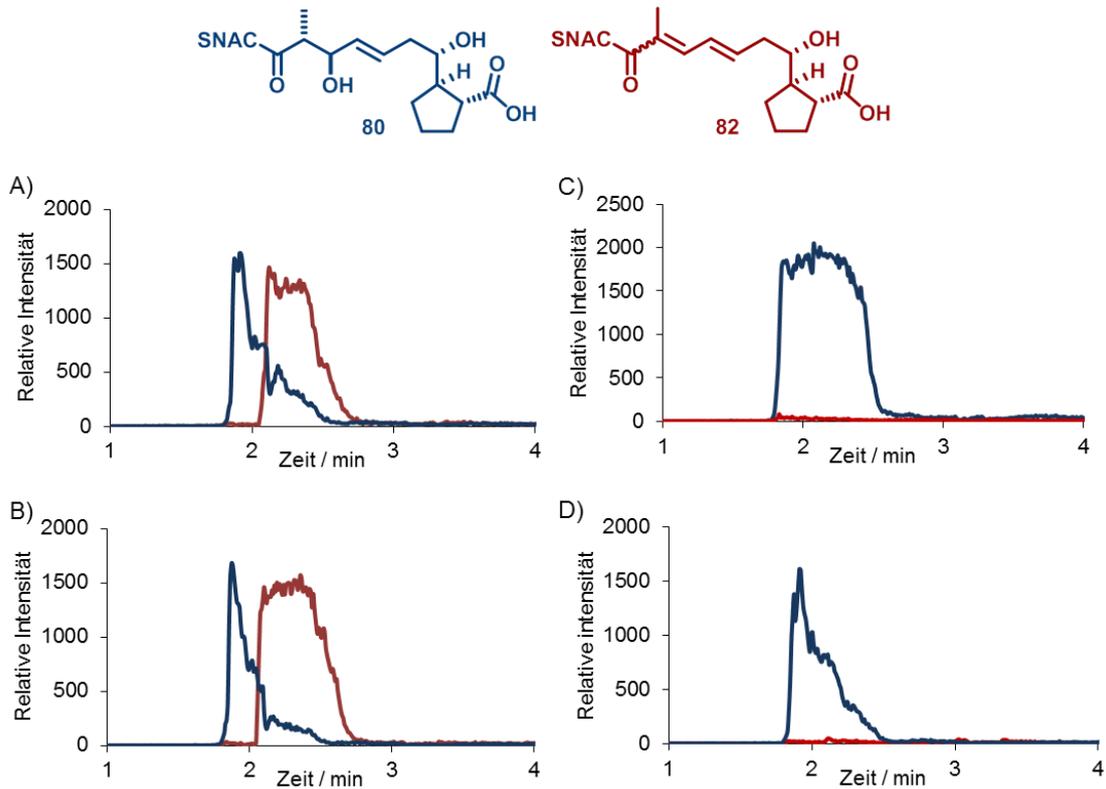
Die Dehydratasedomäne BorDH3 katalysiert im Modul 3 der Borrelidin-Polyketidsynthase nach erfolgter Ketoreduktion eine *syn*-Dehydratisierung, um eine Doppelbindung zu erhalten. Da diese Bindung im Naturstoff eine seltene *Z*-Konfiguration aufweist, stellt sich die Frage, ob die BorDH3-Domäne die Bildung einer *Z*- oder *E*-konfigurierten Doppelbindung katalysiert. Hierzu wurde das realistische Vorläufersurrogat des Modules 3 der Borrelidin-Polyketidsynthase chemisch synthetisiert und anschließend in Enzymaktivitätstests mit dem gereinigten Protein BorDH3 eingesetzt. Zusätzlich wurde die gereinigte enzymatische Domäne BorDH2 sowie die Punktmutante BorDH3(H49A) in Vergleichsexperimenten verwendet (Schema 7).



**Schema 7:** Enzymatische Umsetzung des Vorläufers mit jeweils einer der drei Dehydratasedomänen.

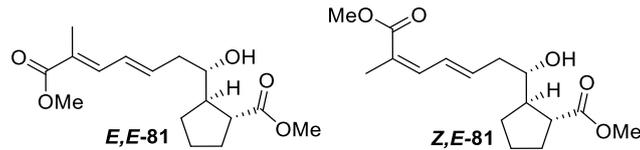
### 5.5.1 Enzymaktivitätstests der Bor-Dehydratasedomänen im analytischen Maßstab

Die Durchführung der Enzymaktivitätstests erfolgte nach einer Vorschrift von ANDEXER *et al.* in HEPES-Puffer für einen Zeitraum von 22 Stunden.<sup>13</sup> Im Anschluss wurden die Proben mit Essigsäureethylester extrahiert und per UPLC-MS analysiert. Zusätzlich zu den drei Enzymreaktionen mit den BorDH3-, BorDH2- oder BorDH3(H49A)-Domänen wurde ein Kontrollexperiment ohne Zusatz von Enzym durchgeführt. Um verlässliche Resultate zu erzielen, wurden die Enzymumsetzungen mehrmals wiederholt.



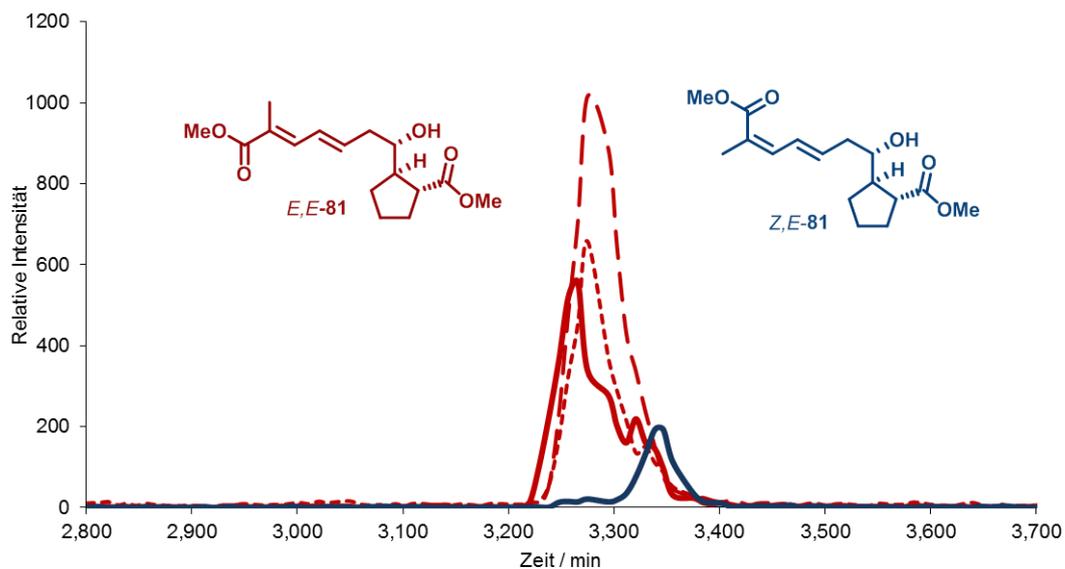
**Abbildung 39:** UPLC-MS-Analyse der Enzymaktivitätstests mit BorDH2, BorDH3 und BorDH3(H49A). A) Inkubation von **80** mit BorDH3, B) Inkubation von **2** mit BorDH2, C) Inkubation von **80** mit BorDH3(H49A), D) Inkubation von **2** unter Enzymaktivitätstestbedingungen ohne Enzym. Blaue Linie: **80** ( $[M+Na]^+ = 410$ ), rote Linie: dehydratisiertes Produkt **82** ( $[M+Na]^+ = 392$ ).

In Abbildung 39 sind die durch UPLC-MS-Analytik erhaltenen Massenspuren der Natriumaddukte von Substrat **80** sowie vom dehydratisierten Enzymaktivitätstestprodukt **82** dargestellt. Bei der Inkubation von **80** mit der BorDH3- beziehungsweise der BorDH2-Domäne findet eine teilweise Dehydratisierung statt (Abbildung 39, A und B). Die beiden Kontrollexperimente mit der Punktmutante BorDH3(H49A) beziehungsweise ohne Enzym zeigen keine Bildung des dehydratisierten Produktes (Abbildung 39, C und D). Die Enzyminkubationen mit der spezifischen, inaktiven Punktmutante BorDH3(H49A) sollten als Vergleichsexperimente dienen. Durch den Austausch von Histidin gegen Alanin wird die BorDH3-Domäne inaktiviert, sodass gezeigt wurde, dass die Dehydratisierung ausschließlich durch die enzymatische Domäne BorDH3 und nicht durch eine Proteinverunreinigung katalysiert wird.



**Abbildung 40:** Verwendete Referenzmoleküle für die UPLC-MS-Auswertung.

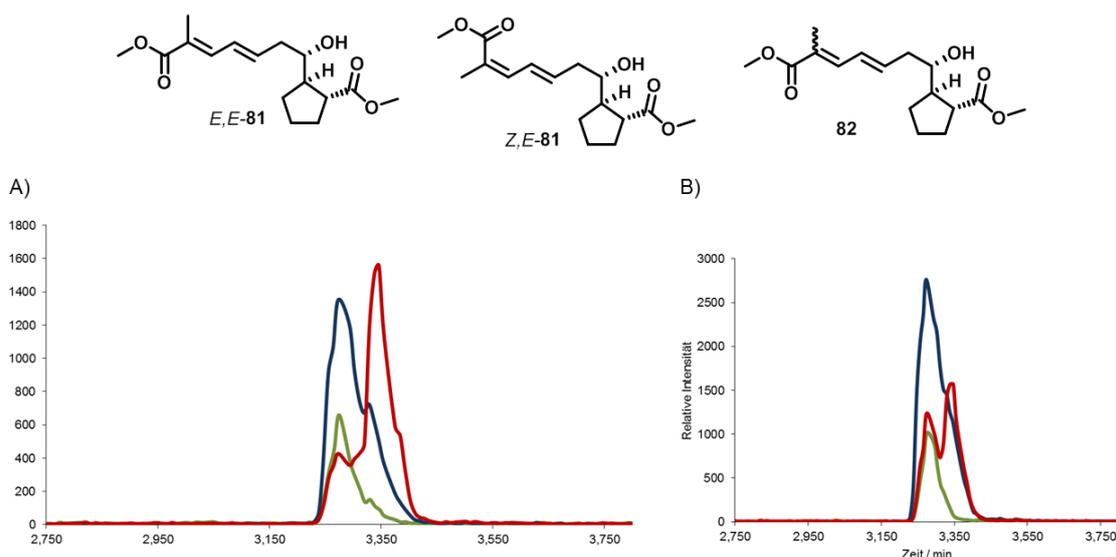
Durch die Enzymtests sollte geklärt werden, welche Doppelbindungskonfiguration durch die BorDH3- aber auch durch die BorDH2-Domäne generiert wird. Auf Grund des fehlenden *Z,E*-konfigurierten Referenzmoleküles **82** sollte das Rohprodukt der Enzymreaktion durch Derivatisierung in eine bezüglich der Konfiguration analysierbare Form gebracht werden (s. Kapitel 5.3). Im Anschluss sollte die Analyse per UPLC-MS einhergehend mit dem Vergleich zu den Referenzmolekülen *E,E*-**81** und *Z,E*-**81** erfolgen (Abbildung 40).



**Abbildung 41:** UPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests. Rote Linie: synthetisch hergestelltes Dien *E,E*-**81** ( $[M+Na] = 319$ ), rote, gestrichelte Linie: Enzymaktivitätstestprodukt der Testung mit BorDH2 ( $[M+Na] = 319$ ), rote, gepunktete Linie: Enzymaktivitätstestprodukt der Testung mit BorDH2 ( $[M+Na] = 319$ ), blaue Linie: synthetisch hergestelltes Dien *Z,E*-**81** ( $[M+Na] = 319$ ).

Das derivatisierte Rohprodukt der Reaktion sowohl mit der BorDH3-Domäne als auch mit der BorDH2-Domäne wurde mittels UPLC-MS analysiert und zeigten dieselbe Retentionszeit wie der *E*-konfigurierte *bis*-Methylester *E,E*-**81** (Abbildung 41). Um dieses Ergebnis zusätzlich abzusichern, wurden die derivatisierten Produkte der Aktivitätstests mit den Referenzmolekülen im Zuge eines Standard-Additionsverfahrens (*spiken*) versetzt. Dabei

zeigte sich eine relative Erhöhung der Intensität des Signals für das Natriumaddukt des Rohproduktes der Enzyminkubation bei einer Retentionszeit von 3.27 min, wenn der *E*-konfigurierte *bis*-Methylester zugegeben wurde (blaue Linie, Abbildung 42). Wurden die derivatisierten Rohprodukte der Enzyminkubation mit *Z*-konfiguriertem Substrat **81** versetzt, war ein zweites Signal mit einer Retentionszeit von 3.35 min deutlich zu erkennen (rote Linie, Abbildung 42).



**Abbildung 42:** UPLC-MS-Analyse der derivatisierten Enzymaktivitätstestprodukte nach Zusatz der Doppelbindungs-isomere *E,E*-**81** und *Z,E*-**81**. A) Analytik der BorDH3 Enzymaktivitätstests: grüne Linie: **82** ( $[M+Na] = 319$ ), blaue Linie: **82** versetzt mit *E,E*-**81**, rote Linie: **82** versetzt mit *Z,E*-**81**. B) Analytik der BorDH2 Enzymaktivitätstests, grüne Linie: **82** ( $[M+Na] = 319$ ), blaue Linie: **82** versetzt mit *E,E*-**81**, rote Linie: **82** versetzt mit *Z,E*-**81**.

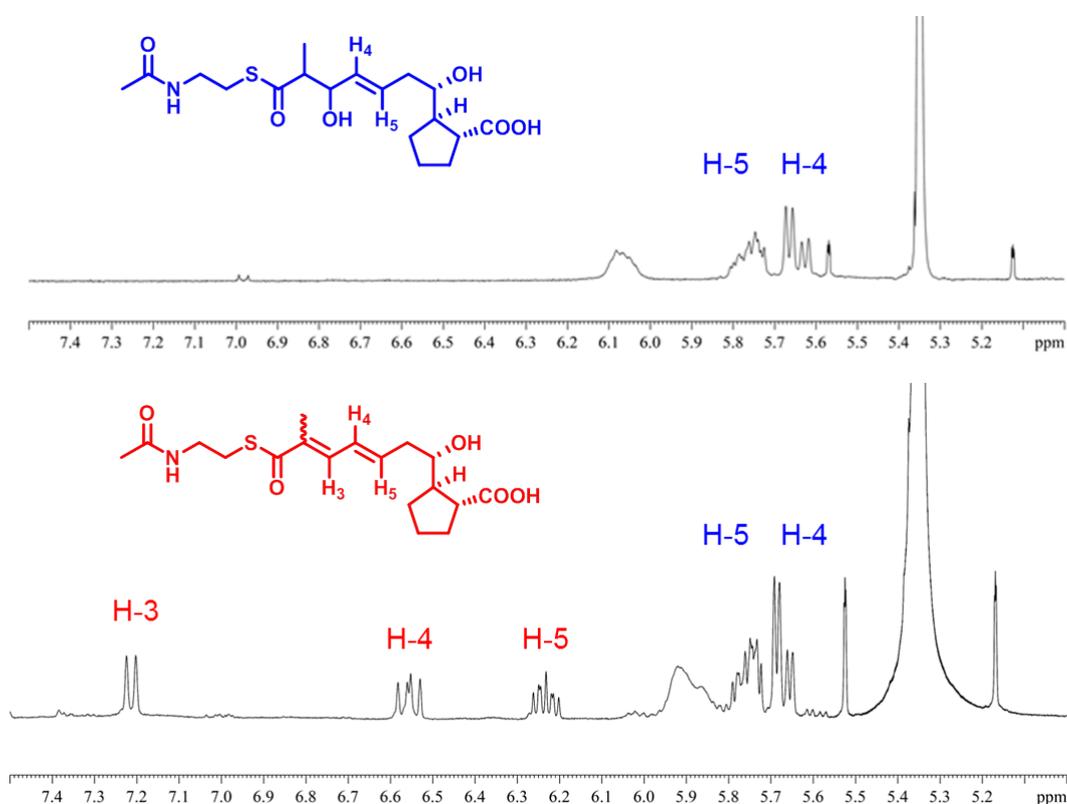
Durch die Enzymstests im analytischen Maßstab mit anschließender Derivatisierung wurde gezeigt, dass die Dehydratasedomäne im Modul 3 der Borrelidin-Polyketidsynthese eine *E*-konfigurierte Doppelbindung generiert.

Die Enzymaktivitätstests mit der BorDH2-Domäne zeigten, dass auch diese *in vitro* selektiv eine *E*-konfigurierte Doppelbindung bilden. Des Weiteren konnte die Akzeptanz der BorDH2-Domäne für ein unnatürliches, um eine Ketid-Einheit verlängertes Substrat gezeigt werden.

### 5.5.2 NMR-Enzymaktivitätstest im präparativen Maßstab

Die Enzymaktivitätstests mit der enzymatischen Domäne BorDH3 zeigten nach Derivatisierung eine *E,E*-Konfiguration des resultierenden Diens. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Doppelbindung unter den Derivatisierungsbedingungen isomerisiert,

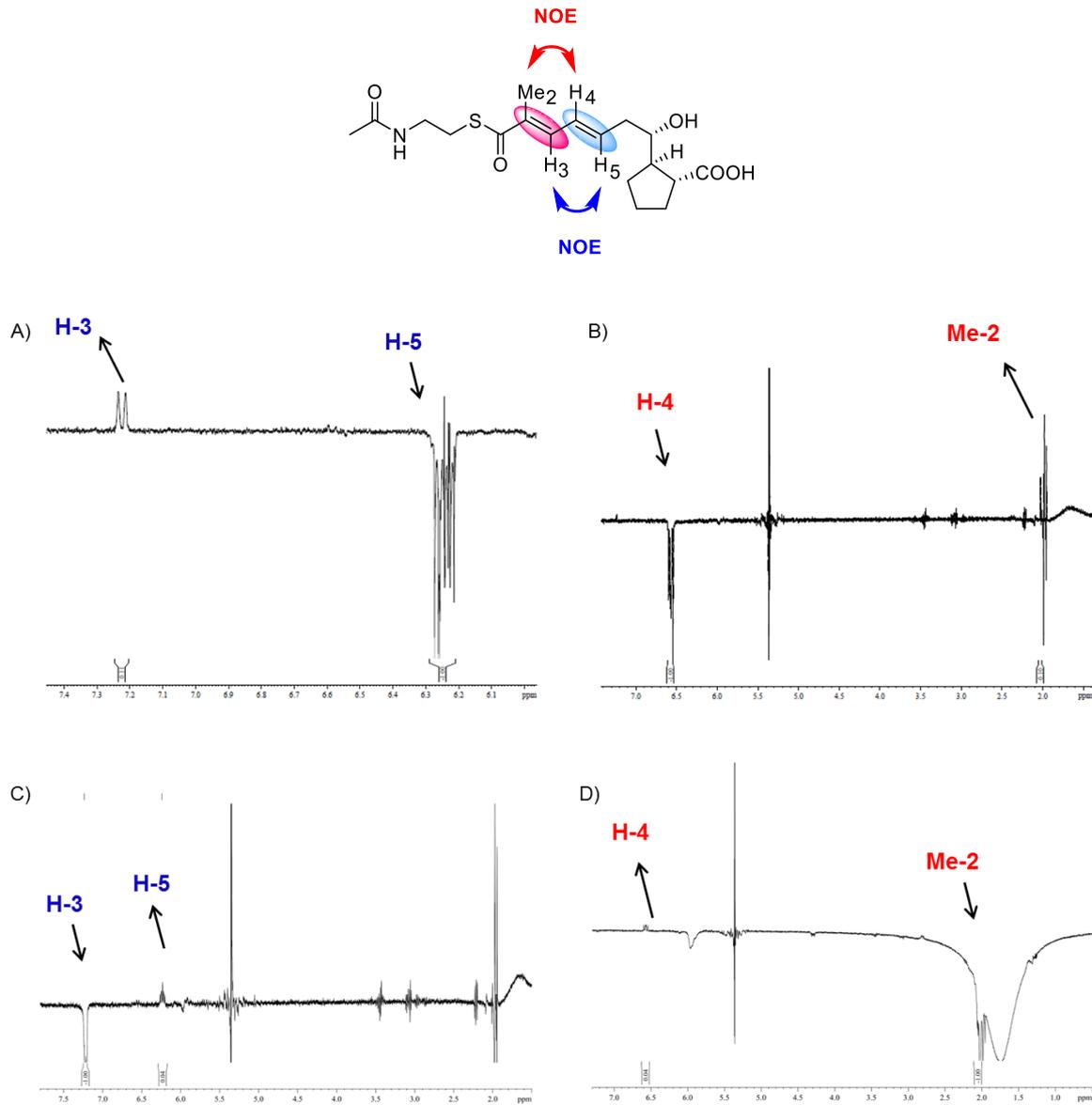
sollte ein Enzymaktivitätstest in einem Maßstab durchgeführt werden, der eine direkte Analyse des Primärproduktes durch NMR-Spektroskopie ermöglicht. Hierzu wurde die BorDH3-Domäne erneut heterolog in *E. coli* produziert sowie isoliert und gereinigt. Neben 6 mg/mL Enzym wurden 10 mg Substrat **80** in HEPES-Puffer (1 mL) über einen Zeitraum von 22 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit Essigsäureethylester extrahiert und nach dem Entfernen des Lösungsmittels in deuteriertem Dichlormethan aufgenommen. Es wurde ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum vermessen sowie NOE-Experimente durchgeführt.



**Abbildung 43:** NMR-Analyse des Enzymaktivitätstests mit der enzymatischen Domäne BorDH3. Oben: Ausschnitt des olefinischen Bereiches aus dem NMR-Spektrum des Startmaterials, aufgenommen in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , 500 MHz; unten: Ausschnitt des olefinischen Bereiches aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Rohproduktes der Enzymreaktion, aufgenommen in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , 500 MHz;

Das Protonenspektrum zeigt, dass neben Substrat **80** ein Dehydratisierungsprodukt vorliegt (Abbildung 43). Vor allem im olefinischen Bereich ist dieser Unterschied erkennbar. Zusätzlich zu den beiden olefinischen Protonen H-4 und H-5 des Startmaterials bei 5.6 – 5.8 ppm fanden sich drei tieffeldverschobene Signalsätze bei 6.2, 6.6 und 7.2 ppm. Die

Verschiebungswerte in Zusammenhang mit den relativ großen Kopplungskonstanten (10-15 Hz) deuten auf ein  $\alpha$ -substituiertes, in Konjugation mit einer Carbonylgruppe stehendes *E,E*-konfiguriertes Diensystem hin.



**Abbildung 44:** NOE-Analyse des BorDH3 Enzymaktivitätstestproduktes; A) Eingestrahlt wurde bei 6.24 ppm (H-5), Wechselwirkung mit 7.23 ppm (H-3), B) Eingestrahlt wurde bei 6.57 ppm (H-4), Wechselwirkung mit 2.03 ppm (Me-1), C) Eingestrahlt wurde bei 7.23 ppm (H-3), Wechselwirkung mit 6.24 ppm (H-5), D) Eingestrahlt wurde bei 2.03 ppm (Me-1), Wechselwirkung mit 6.57 ppm (H-4); aufgenommen in Aceton- $d_6$  bei 500 MHz.

Bei den NOE-Experimenten wurde auf die olefinischen Protonen beziehungsweise die Methylgruppe an C-2 eingestrahlt (Abbildung 44). Die erhaltenen vier NOE-Spektren zeigen, dass die Methylgruppe Me-2 mit dem Proton H-4 wechselwirkt und keine Korrelation mit

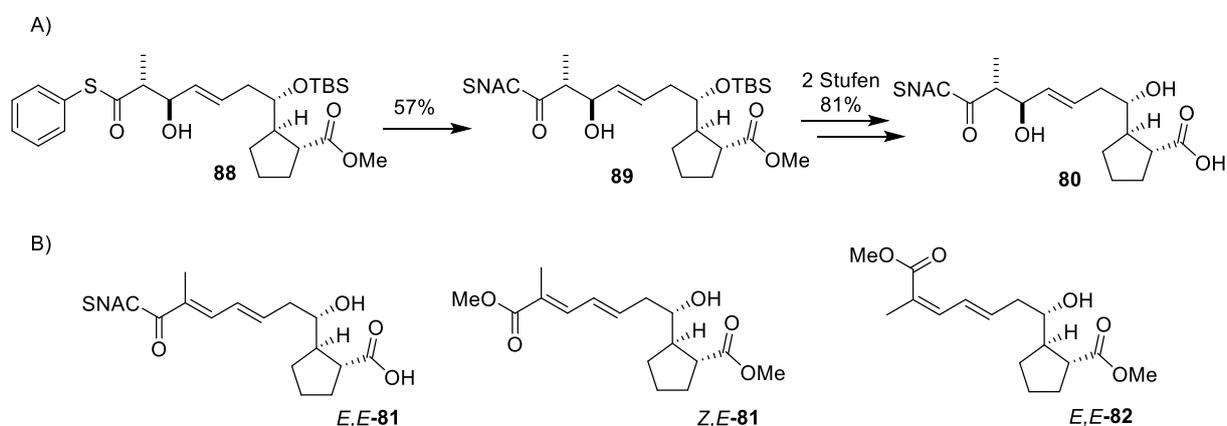
dem Proton H-3 aufweist. Des Weiteren zeigen die Protonen H-3 und H-5 eine Wechselwirkung, wodurch gezeigt wurde, dass die Doppelbindung *E*-konfiguriert ist.

Die NMR-spektroskopische Analyse der enzymatischen Umsetzung von **80** mit der BorDH3 zeigte, dass im Protonenspektrum neue Signale im olefinischen Bereich auftreten, die identische Verschiebungen zu den Signalen der synthetische Verbindung (*2E,4E*)-**82** aufweisen. Des Weiteren konnte eine *E*-konfigurierte Doppelbindung durch die NOE-Experimente bestätigt werden.

Die Ergebnisse aus der NMR-spektroskopischen Analyse der Enzymreaktion decken sich mit den nach Derivatisierung und UPLC-MS-Analyse gewonnenen Ergebnissen.

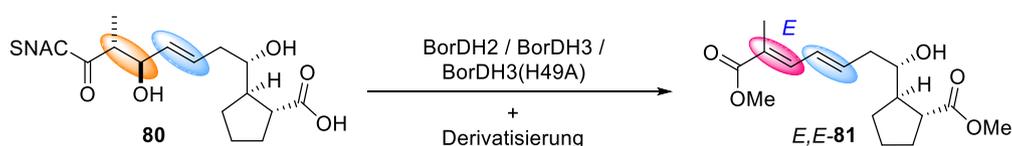
## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Synthese des für die Enzymaktivitätstests benötigten Vorläufers der BorDH3-Domäne abgeschlossen. Dabei wurde neben einer Umesterung von Aldolprodukt **88** zu SNAC-Thioester **89** eine finale Entschützungssequenz etabliert (Schema 8, A). Zusätzlich wurde Referenzmolekül *E,E*-**82** von F. HAHN zur Verfügung gestellt (Schema 8, B).<sup>41</sup> Die *bis*-Methylester *E,E*-**81** und *Z,E*-**81** wurden in einer vorangegangenen Arbeit synthetisiert.<sup>37</sup>



**Schema 8:** Synthese von SNAC-Thioester **80** (A) und verwendete Referenzmoleküle (B).<sup>42</sup>

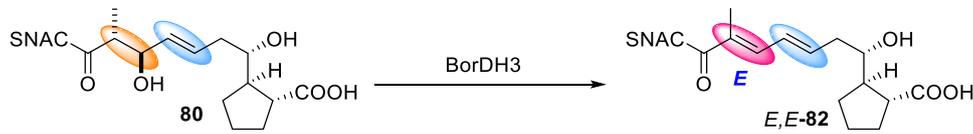
Neben den chemischen Arbeiten konnten die enzymatischen Arbeiten zu den Dehydratasedomänen der Borrelidin-Polyketidsynthese durchgeführt werden. Die BorDH3-, BorDH2- und BorDH3(H49A)-Domänen wurden heterolog in *E. coli* produziert, per Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Säulenmaterial gereinigt und in den Enzymreaktionen eingesetzt.



**Abbildung 45:** Enzymaktivitätstests mit den Dehydratasedomänen der Module 2 und 3 mit anschließender Derivatisierung.

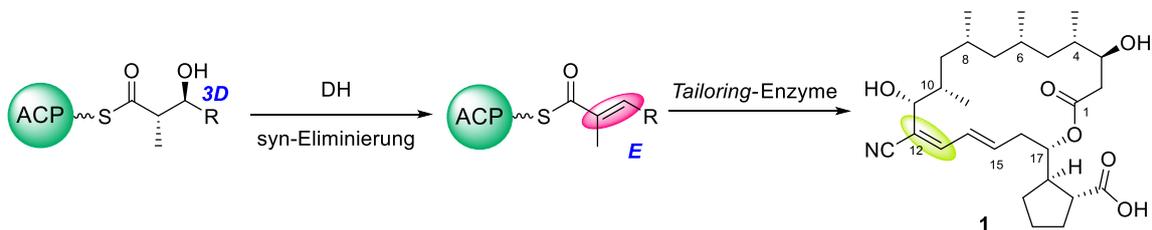
Die Enzymaktivitätstests wurden zwischen Substrat **80** und den Dehydratasedomänen BorDH bei 37 °C in HEPES-Puffer durchgeführt und nach Derivatisierung per UPLC-MS analysiert.

Durch den Vergleich der Retentionszeiten synthetisch hergestellter Referenzmoleküle *E,E*-**81** und *Z,E*-**81** mit dem derivatisierten Rohprodukt des Enzymtests konnte das Dien-System als (*2E,4E*)-konfiguriert bestimmt werden (Abbildung 45).



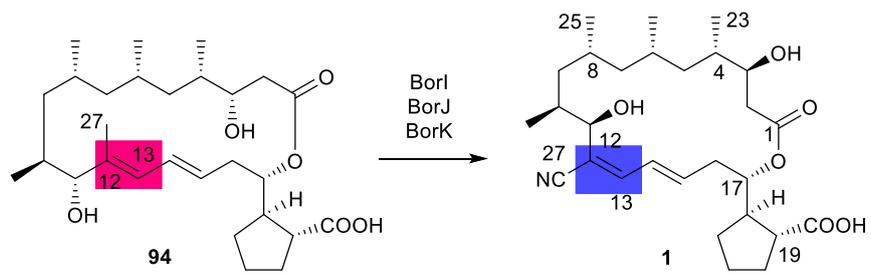
**Abbildung 46:** Enzymaktivitätstests mit der BorDH3 und anschließender NMR-Analyse.

Außerdem wurden NMR-Enzymaktivitätstests mit der BorDH3 durchgeführt. Durch Vergleich der Signale im Protonenspektrum mit synthetisch hergestelltem *E,E*-**82** sowie NOE-Experimenten und durch die Kopplungskonstanten konnte die *E*-Konfiguration der im Enzymtest gebildeten Doppelbindung bestätigt werden (Abbildung 46). Dieses Resultat zeigt, dass die Dehydratasedomäne im Modul 3 der Borrelidin-Biosynthese eine formale *syn*-Dehydratisierung zur *E*-konfigurierten Doppelbindung durchführt und kein Sonderfall vorliegt (Abbildung 47).



**Abbildung 47:** Ergebnis der Enzymaktivitätstests der Dehydratasedomäne des Modul 3 der Borrelidin-Biosynthese und der potentielle Weg der Bildung der *cis*-Doppelbindung im Endmolekül.

In weiterführenden Arbeiten von LEADLAY *et al.* wurde eine Mutante, bei der das *Tailoring*-Enzym BorI delitiert wurde, hergestellt.<sup>45</sup> Durch verschiedene massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Analysen wurde die Konfiguration des 12,13-Diens als *E,E*-Konfiguration bestimmt (Abbildung 48). Dies zeigt, dass die BorDH3-Domäne eine *E*-konfigurierte Doppelbindung generiert, die durch ein *Tailoring*-Enzym zur *Z*-Konfiguration isomerisiert. Um den vollständigen Mechanismus aufzuklären, müssten die Enzyme BorI, BorH und BorJ heterolog in *E.coli* produziert und mit dem spezifischen Substrat umgesetzt werden.



**Abbildung 48:** Isomerisierung der *E*-konfigurierten Doppelbindung in der Borrelidin-Biosynthese zur *Z*-Konfiguration.<sup>45</sup>

<sup>45</sup> N. Kandziora, J. N. Andexer, S. J. Moss, B. Wilkinson, P. F. Leadlay, F. Hahn *Chem. Sci.* **2014**, 5, 3563-3567.

## Teil 2: Ambruticin

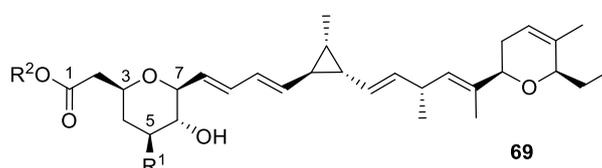
---

# 7 Einleitung

## 7.1 Ambruticin

### 7.1.1 Der Naturstoff Ambruticin

Das Fungizid Ambruticin ist eine Cyclopropyl-Polyensäure, die 1977 in Laboratorien von WARNER-LAMBERT aus dem Myxobakterium *Polyangium cellulorum* var. *fulvum* (heute *Sorangium cellulorum* Soce10) isoliert wurde.<sup>46</sup> In denselben Laboratorien wurde die Struktur des Naturstoffes mittels verschiedener analytischer Methoden (NMR-, IR-, UV-, Massen- und Röntgenstrukturanalyse) aufgeklärt und war dadurch der erste Naturstoff aus Myxobakterien, dessen Struktur vollständig bekannt war.<sup>46</sup>



R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Ambruticin
H	OH	S
H	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	VS-5
H	NH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup>	VS-4
H	NH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	VS-3
CH <sub>3</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup>	VS-2
H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup>	VS-1

Abbildung 49: Strukturen der Ambruticine.

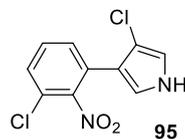
1990 konnte die Gruppe von REICHENBACH im Forschungszentrum der GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG weitere natürlich vorkommende Derivate mit der Ambruticin-Grundstruktur aus Myxobakterien isolieren.<sup>47</sup> Nach diesem Fund wurde der ursprünglich als Ambruticin bezeichnete Naturstoff in Ambruticin S (**69**) umbenannt. Die

<sup>46</sup> D. T. Connor, R. C. Greenough, M. Strandtmann *J. Org. Chem.* 1977, 42, 3664-3669.

<sup>47</sup> G. Höfle, H. Steinmetz, K. Gerth, H. Reichenbach *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 941-945.

neuen Naturstoffe wurden der VS-Serie zugeordnet und unterscheiden sich strukturell nur in dem Substitutionsmuster an der C-5-Position des Ambruticins (Abbildung 49). Neben dem strukturellen Unterschied an C-5 teilen sich die Ambruticine mehrere charakteristische Strukturmerkmale. Dazu zählen der Tetrahydro- und Dihydrofuranring sowie die dreifachsubstituierte Cyclopropyl-Einheit.

Die Ambruticine weisen eine starke *in vivo*- und *in vitro*-Aktivität gegen verschiedene pathogene Pilze auf.<sup>48,49</sup> Dazu zählen unter anderem *Histoplasma capsulatum* und *Coccidioides immitis*. Zusätzlich zeigen die Naturstoffe eine moderate antibakterielle Wirkung gegen *Streptococcus pyogenes* und *Bacillus cereus*, obwohl eine Inaktivität gegen die meisten Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien detektiert wurde.<sup>48</sup>



**Abbildung 50:** Struktur des Pyrrolnittrins (95).

In Studien zum Wirkmechanismus der Ambruticine trat eine Kreuzresistenz zu dem Phenylpyrrol Pyrrolnitrin (95, Abbildung 50) auf.<sup>50</sup> Dies weist auf einen gemeinsamen Wirkort hin. Bei beiden Naturstoffen konnte eine Einwirkung auf das osmoregulative System, genauer den HOG-Signalweg (*high osmolarity glycerol signaling pathway*), ausgemacht werden.<sup>51</sup> Ambruticin interferiert mit dem HOG-Signalweg, wodurch eine Anreicherung von Glycerol innerhalb der Zellen auftritt. Als Begleiterscheinung reichern sich ebenfalls verschiedene Fettsäuren an. Bei einer geringen externen Osmolarität führt die Akkumulation zu einer erhöhten Permeabilität der Zellmembran und dadurch zum Austreten von Zellinhalt aus der Zelle. Letztendlich resultiert dies im Zelltod.<sup>51</sup> Das exakte Target der Naturstoffe

---

<sup>48</sup> S. M. Ringel, R. C. Greenough, S. Roemer, D. Connor, A. L. Gutt, B. Blair, G. Kanter, M. von Strandtmann *J. Antibiot.* **1977**, 371-375.

<sup>49</sup> S. Shadomy, D. M. Dixon, A. Espinel-Ingroff, G. E. Wagner, H. P. Yu, H. J. Shadomy *Antimicrob. Agents Chemoth.* **1987**, 14, 99-104.

<sup>50</sup> P. Knauth, H. Reichenbach *J. Antibiot.* **2000**, 53, 1182-1190.

<sup>51</sup> L. Vetcher, H. G. Menzella, T. Kudo, T. Motoyama, L. Katz *Antimicrob. Agents Chemoth.* **2007**, 51, 3734-3736.

innerhalb der HOG-Signalkaskade und der genaue Wirkmechanismus konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

In weiterführenden Studien mit den Ambruticinen VS-5 und VS-4 konnten Aussagen zu den Strukturaktivitätsbeziehungen gemacht werden.<sup>52</sup> Die Säurefunktion am Kohlenstoffatom C-1 ist nicht essentiell für eine antifungale Aktivität und kann als Ester mit sterisch nicht anspruchsvollen Substituenten vorliegen. Durch die auftretende mehrfache Substitution der Aminofunktion an C-5 konnte ausgeschlossen werden, dass an dieser Position ein Donor für eine Wasserstoffbrückenbindung vorhanden sein muss. Allerdings ist die Aminofunktion entscheidend für die erhöhte antifungale Wirkung im Gegensatz zu dem Ambruticin S. Des Weiteren konnte in der Studie gezeigt werden, dass kleine unpolare Alkylgruppen, die durch reduktive Aminierung an durch Fermentation gewonnenen Naturstoffen eingeführt wurden, als Substituenten am Stickstoffatom der Aminofunktion eine erhöhte orale Verfügbarkeit sowie eine verbesserte Aktivität hervorrufen.<sup>52</sup>

### 7.1.2 Studien zur Biosynthese von Ambruticin

Die Biosynthese der Ambruticine konnte bislang nicht abschließend aufgeklärt werden. Allerdings ergab eine von JULIEN *et al.* durchgeführte Studie einen hypothetischen Biosyntheseweg (Abbildung 51).<sup>53</sup> Dieser beruht auf Genclusteranalysen, bei denen den meisten der kodierenden Gene aufgrund von Sequenzhomologien eine spezifische Rolle innerhalb des Biosyntheseweges zugeordnet wurde, sowie auf den Strukturaufklärungen von aus Deletionsmutanten erhaltenen Intermediaten. Die Ambruticine werden multimodular durch ein *cis*-AT PKS-System innerhalb von neun aufeinanderfolgenden Modulen und mehreren *post*-PKS Modifizierungen aufgebaut. Die Schritte, die *post*-PKS katalysiert werden, erzeugen die zwei unterschiedlichen Klassen der Ambruticine. Die beiden Klassen haben einen gemeinsamen Vorläufer, das Ambruticin J, das durch die TE-Domäne von der PKS abgespalten wurde.

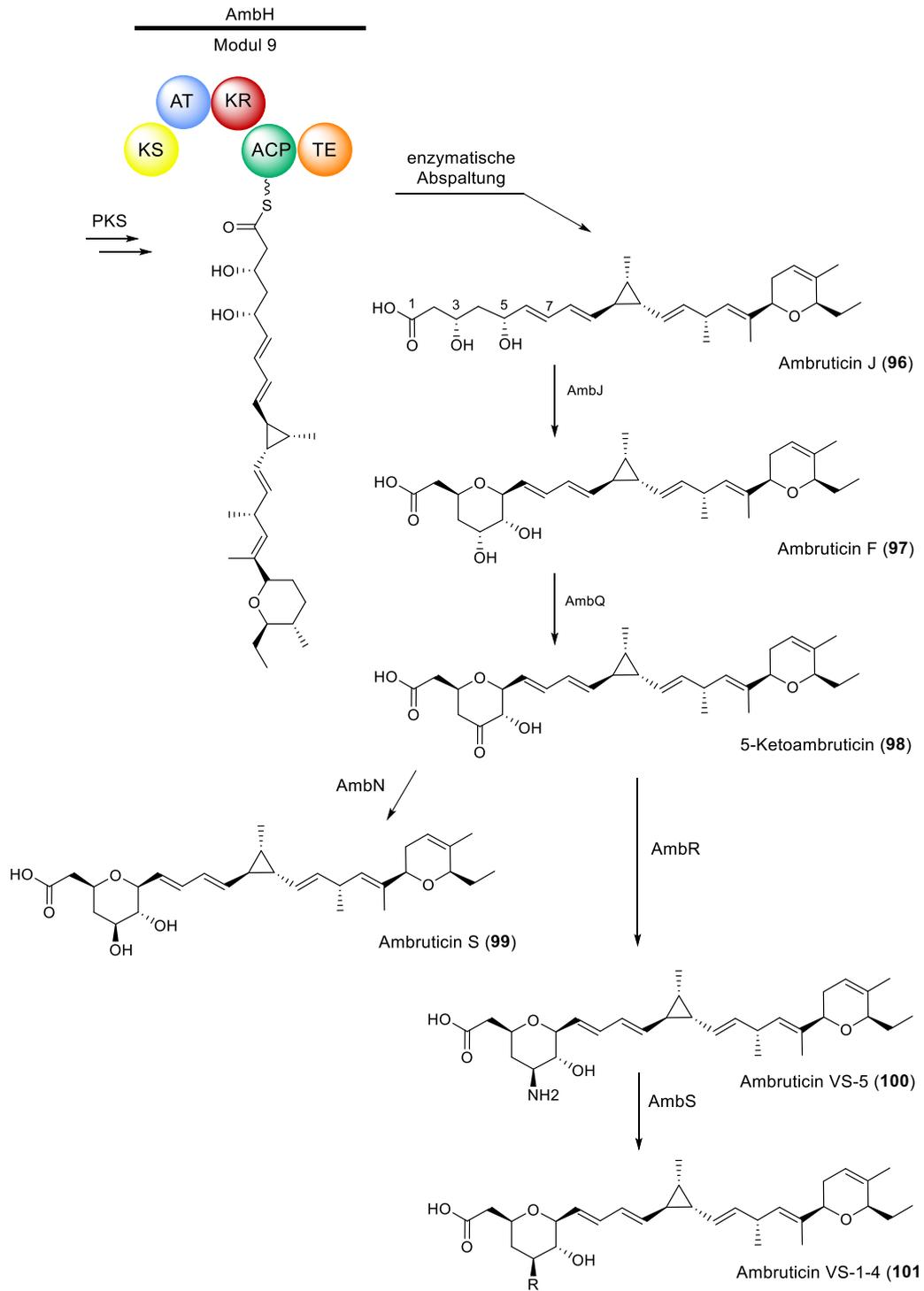
Ambruticin J wird durch fünf *Tailoring*-Enzyme in die entsprechenden Ambruticine S beziehungsweise VS-1 bis VS-5 umgewandelt. Dazu zählt die Epoxidase AmbJ, die Desaturase AmbQ, die Aldehyddehydrogenase AmbN, die Aminotransferase AmbR sowie die

---

<sup>52</sup> Z.-Q. Tian, Z. Wang, Y. Xu, C. Q. Tran, D. C. Myles, Z. Zhong, J. Simmons, L. Vetcher, L. Katz, Y. Li, S. J. Shaw *ChemMedChem* **2008**, *3*, 963-969.

<sup>53</sup> B. Julien, Z.-Q. Tian, R. Reid, C. D. Reeves *Chem. & Biol.* **2006**, *13*, 1277-1286.

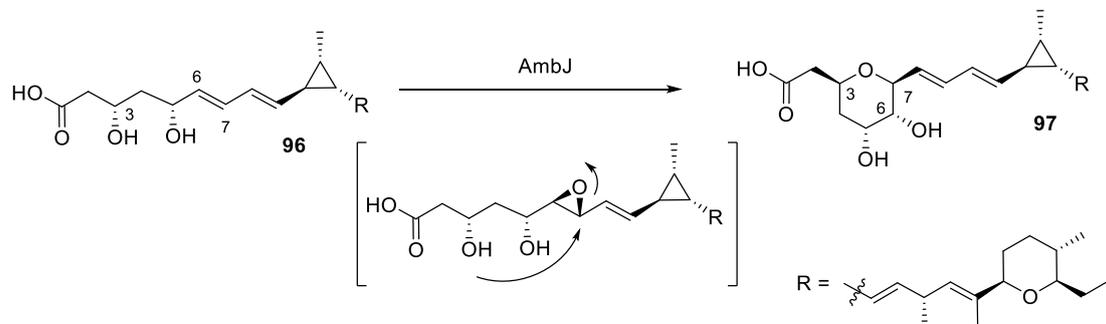
N-Methyltransferase AmbS. Die Rolle und Reihenfolge der *Tailoring*-Enzyme wurde durch Intermediatisolation aus Deletionsmutanten mit nachfolgender Strukturaufklärung per Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie bestimmt. Im Fall der  $\Delta ambJ$ -Mutante wurde das Produkt der PKS, Ambruticin J (**96**), isoliert. Anhand von Kopplungskonstanten konnte die Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C-6 und C-7 der *E*-Konfiguration zugeordnet werden. Um aufzuklären, ob die Hydroxygruppen an C-3 und C-5 in einem *syn*- oder *anti*-Verhältnis zueinander stehen, wurde das Acetonid hergestellt.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Analyse konnte nach der RYCHNOWSKY-Methode eine relative *syn*-Konfiguration der beiden sekundären Alkohole detektieren. Die absolute Stereochemie der beiden Hydroxyfunktionen wurde durch die Aufklärung der Stereochemie der OH-Gruppe an C-3 im Ambruticin S auf das Ambruticin J zurückgeschlossen.



**Abbildung 51:** Von JULIEN *et al.* postulierte post-PKS-Prozessierung im Ambruticin-Biosyntheseweg. A) Dargestellt sind das letzte Modul der PKS, gefolgt von der Abspaltung des Ambruticin J von der PKS und die Schritte zum 5-Ketoambruticin. B) Umsetzung des 5-Ketoambruticins in Ambruticin S. C) Umsetzung des 5-Ketoambruticins in die Ambruticine der VS-Serie.

Das Besondere an den *post*-PKS Schritten ist die Bildung des Tetrahydropyranringes. JULIEN *et al.* postulierten, dass dieser katalysiert durch das Enzym AmbJ aufgebaut wird. Hierbei soll zunächst aus der Doppelbindung zwischen C-6 und C-7 ein Epoxid gebildet werden, das

durch die Hydroxygruppe an C-3 geöffnet wird. In einer 6-*endo-tet*-Zyklisierung wird der Pyranring gebildet. Dabei ist unklar, ob die Zyklisierung spontan abläuft oder ebenfalls durch die Epoxidase katalysiert wird (Abbildung 52). Eine Epoxidhydrolase, durch die die Tetrahydropyranbildung katalysiert werden könnte, wird im Gencluster nicht gefunden.



**Abbildung 52:** Postulierter Mechanismus des *Tailoring*-Enzyms AmbJ.

## 7.2 Myxobakterien

Myxobakterien sind Gram-negative Bodenbakterien, die aus verrottenden organischen Materialien (Mist, Holz, Baumringe) bestehenden Bodenproben gewonnen werden.<sup>54,55</sup> Sie gehören der  $\delta$ -Gruppe der Proteobakterien an und weisen mehrere Charakteristika auf.<sup>54</sup> Dazu zählt das Fortbewegen, das aktiv durch Gleit- oder Kriechvorgänge erfolgt. Des Weiteren weisen die Myxobakterien ein ungewöhnlich hohes Maß an sozialem Verhalten auf, indem die Bakterien Schwärme zur Nahrungssuche bilden (Abbildung 53, linkes Bild).<sup>56</sup> In Zeiten einer nichtausreichenden Versorgung mit Nährstoffen kommt es zur Ausbildung von Fruchtkörpern, die die Myxosporen enthalten (Abbildung 53, rechtes Bild).<sup>55</sup>

<sup>54</sup> S. C. Wenzel, R. Müller *Nat. Rep. Prod.* **2007**, *24*, 1211-1224.

<sup>55</sup> S. Pradella, A. Hans, C. Spröer, H. Reichenbach, K. Gerth, S. Beyer *Arch. Microbiol.* **2002**, *178*, 484-492.

<sup>56</sup> K. Gerth, S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Müller *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 233-253.

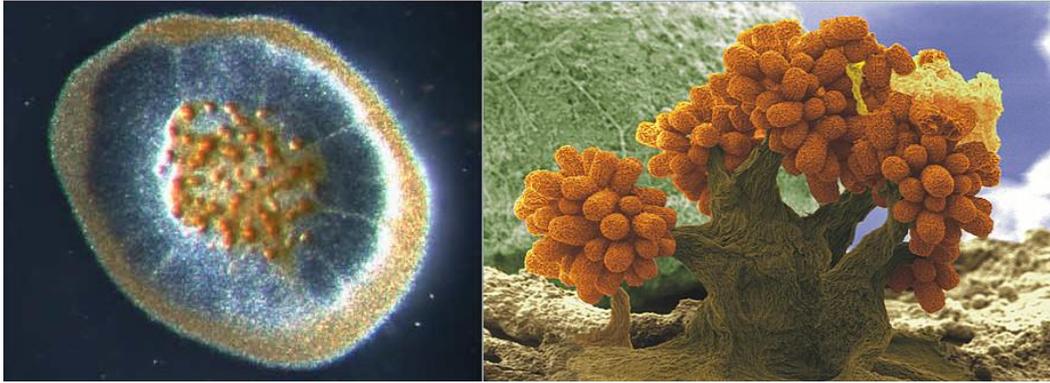


Abbildung 53: Schwarmbildung (linkes Bild) und Fruchtkörper (rechtes Bild) von *Sorangium cellulosum*.<sup>57,56</sup>

Actinomyceten und insbesondere Streptomyceten sind schon sehr lange als wichtige Quellen neuer Naturstoffe bekannt, wobei die Anzahl neuer aus diesen isolierter Strukturen seit Jahren rückläufig ist. Die Bedeutung der Myxobakterien als Naturstoffproduzenten hat in den letzten Dekaden hingegen stark zugenommen. In den 7500 isolierten Bakterien dieser Art konnten bisher mehr als 100 neuer Grundstrukturen und über 500 Modifikationen isoliert werden.<sup>58</sup>

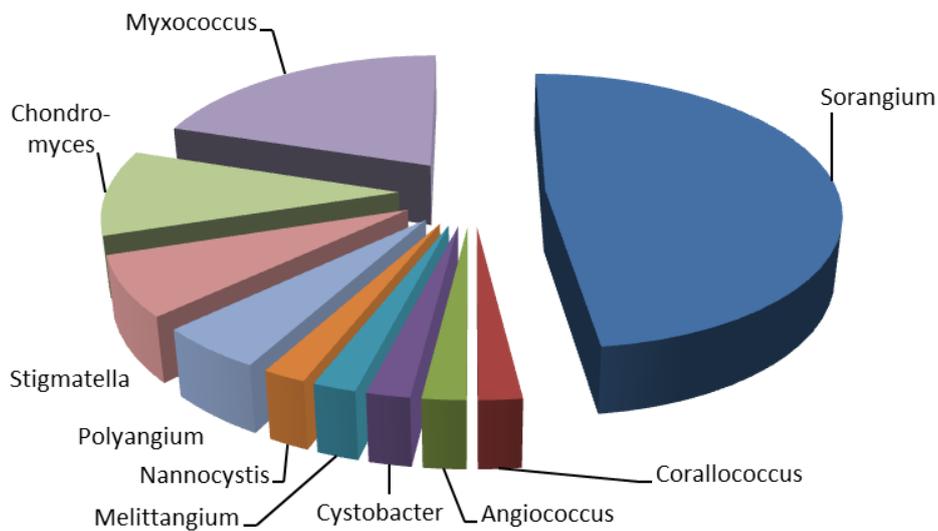


Abbildung 54: Anteil und Verteilung isolierter Naturstoffe aus Gattungen der Myxobakterien in Prozent.<sup>56</sup>

<sup>57</sup> [http://www.helmholtzhzi.de/de/infothek/themenportal/unser\\_immunsystem/infektionen\\_und\\_krebs/#content](http://www.helmholtzhzi.de/de/infothek/themenportal/unser_immunsystem/infektionen_und_krebs/#content), 29.05.2015.

<sup>58</sup> H. Bode, R. Müller *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 33, 577-588.

Die meisten Naturstoffe weisen ein Polyketidsynthase-Hybridsystem bestehend aus Polyketidsynthasen (PKS) und Nichtribosomalen Peptidsynthasen (NRPS) auf, wodurch eine große strukturelle Vielfalt erhalten wird.<sup>58</sup> Unter den Myxobakterien hat die Gattung *Sorangium* eine herausragende Bedeutung, da die meisten isolierten Naturstoffe von *Sorangien* produziert werden (Abbildung 54).<sup>56</sup>

### 7.3 Oxidoreduktasen

Oxidoreduktasen bilden nach der systematischen Nomenklatur der Enzyme die erste Enzymklasse und katalysieren Reaktionen, in denen ein Reaktionspartner oxidiert und ein zweiter reduziert wird (Abbildung 55).



**Abbildung 55:** Allgemeine Reaktionsgleichung für durch Oxidoreduktasen katalysierte Redoxreaktionen. A und B stellen die jeweiligen Reaktionspartner dar.

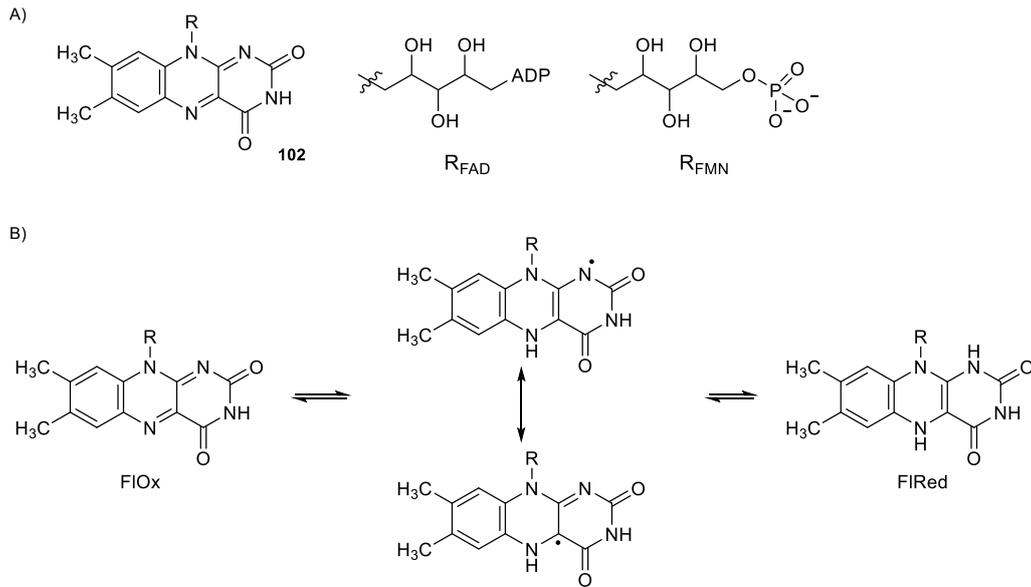
Die Enzymklasse der Oxidoreduktasen kann in mehrere Untergruppen eingeteilt werden. Dazu gehören die Monooxygenasen, Dioxygenasen, Oxidasen, Dehydrogenasen, Reduktasen und Peroxygenasen. Die verschiedenen Unterklassen verwenden unterschiedliche Kofaktoren, z. B. NAD(P)H, FAD/FMN oder Eisen. Dabei ist die Familie der Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)/Flavin-Mononukleotid (FMN)-abhängigen Flavoenzyme eine der bisher am besten untersuchten Enzymfamilien.

#### 7.3.1 Flavoenzyme

FAD- oder FMN-abhängige Enzyme werden als Flavoenzyme zusammengefasst. Deren katalytisch aktive Einheit ist das Isoalloxazin-Ringsystem, das aus einer hydrophoben Dimethylbenzol-Einheit und einer hydrophilen Pyrimidin-Einheit besteht (Abbildung 56).<sup>59</sup> Der Kofaktor kann kovalent oder nicht kovalent an das entsprechende Enzym binden.

---

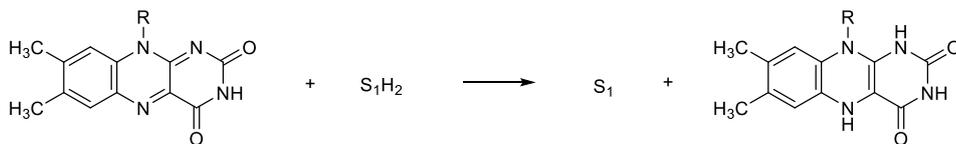
<sup>59</sup> M. W. Fraaije, A. Mattevi Trends in *Biochemical Sciences* **2000**, 25, 126-132.



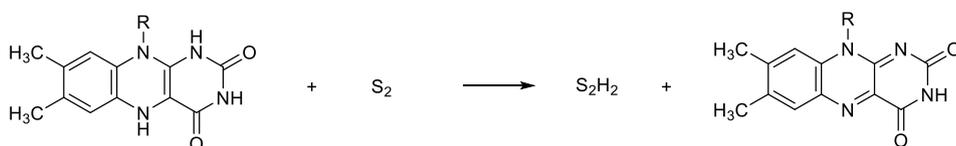
**Abbildung 56:** A) Struktur von Flavin **102** sowie des Flavin-Adenin-Dinukleotids und des Flavinmononukleotids. B) Intermediate der typischen 1-Elektron-Reduktionsschritte des Flavins.

Das Redoxpotential des Flavins ermöglicht es diesem, sowohl in Einelektronen- als auch an Zweielektronen-Übertragungsreaktionen teilzunehmen.<sup>60</sup> Der Katalysezyklus FAD-beziehungswise FMN-tragender Flavoenzyme besteht aus zwei Halbreaktionen. Bei der reduktiven Reaktion wird das Substrat oxidiert und das Flavin reduziert (Abbildung 57). Im zweiten Schritt wird das Flavin reoxidiert und ein Cosubstrat (NAD(P)+ oder Sauerstoff) reduziert (reoxidierende Halbreaktion, Abbildung 57). Durch die beiden Halbreaktionen wird der Kofaktor innerhalb eines Zyklus regeneriert.<sup>60</sup>

A) reduktive Halbreaktion



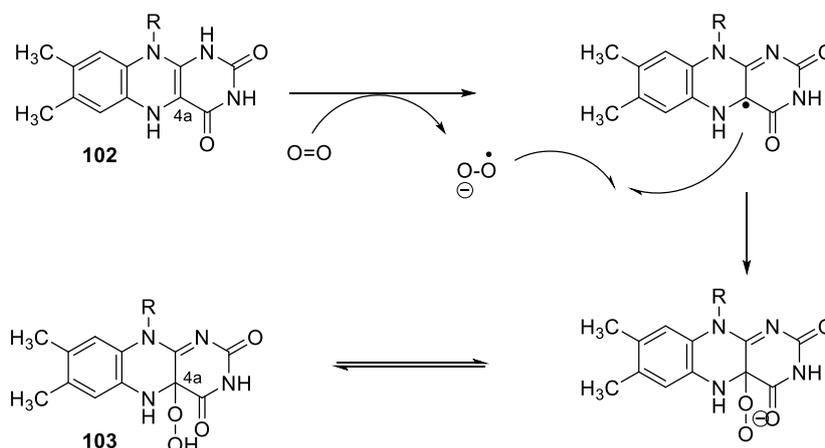
B) reoxidierende Halbreaktion



**Abbildung 57:** Reaktionsgleichungen der reduktiven und reoxidativen Halbreaktion.<sup>60</sup>

<sup>60</sup> C. T. Walsh, T. A. Wenciewicz *Nat. Prod. Rep* **2013**, *30*, 175-200.

Flavoenzyme sind vor allem dafür bekannt, Sauerstofffunktionalitäten in organische Moleküle einzubringen. Dazu wird molekularer Sauerstoff durch das Flavin aktiviert und kann in verschiedenen Mechanismen auf das Substrat übertragen werden. Nach der ersten Ein-Elektronen-Übertragungsreaktion kann, nach Übertragung von molekularem Sauerstoff, das entstehende C-4a-Hydroperoxyflavin (**103**) durch verschiedene Reaktionswege Sauerstoff übertragen.<sup>60</sup>



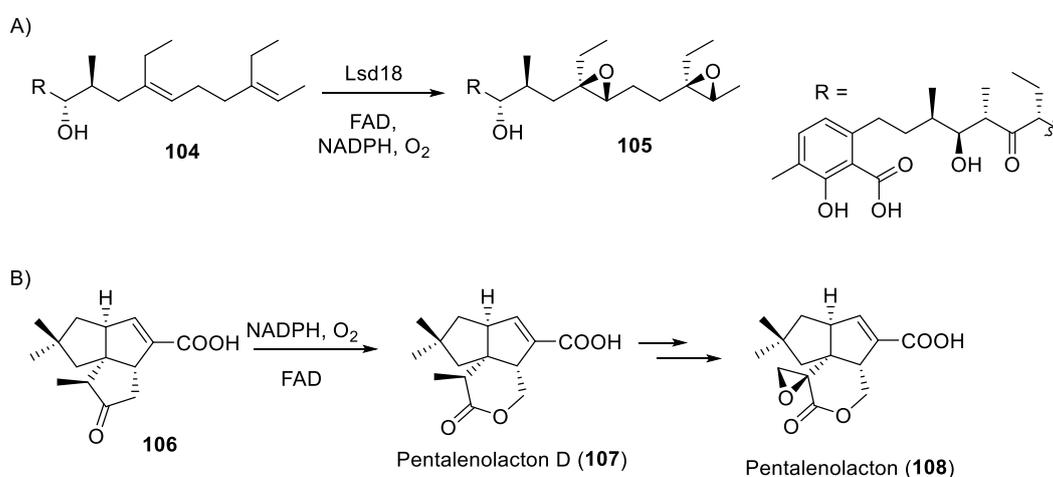
**Abbildung 58:** Reaktionsmechanismus zur Bildung des C-4a-Hydroperoxyflavins.<sup>60</sup>

Reaktionen der Oxidasen werden unter anderem dadurch charakterisiert, dass das C-4a-Hydroperoxyflavin durch einen Protonentransfer Wasserstoffperoxid eliminieren kann. Einer zweiten Klasse gehören die Monooxygenasen an, bei denen das Peroxyflavin ein elektrophiles Sauerstoffatom auf ein Substrat überträgt. Die dritte Möglichkeit ist die Bildung von Hypochloriger Säure oder deren Äquivalenten ausgehend von dem C-4a-Hydroperoxyflavin. Dieser Weg ermöglicht die Halogenierungen von Substraten.<sup>60</sup> Ebenso ist ein nukleophiler Angriff des Peroxyanions denkbar.

Das Bestreben unterschiedliche Flavoenzyme zu charakterisieren und in der organischen Synthese einzusetzen, resultiert aus der sehr hohen Regio-, Chemo- und/oder Stereospezifität der Enzymklasse. Des Weiteren gehören die Flavine zu den Kofaktoren, die den größten Grad an Vielfalt in katalysierten Reaktionen zeigen.<sup>59,60</sup> Besonders BAYER-VILLIGER-Monooxygenasen wurden in den letzten Jahren untersucht und als lyophilisierte Enzyme für den Einsatz in der Synthese von chiralen Feinchemikalien und Naturstoffen auf den Markt gebracht.

### 7.3.1.1 Monooxygenasen

Die flavinabhängigen Monooxygenasen können molekularen Sauerstoff durch die Bildung des C-4a-Hydroperoxyflavins aktivieren und bringen dadurch ein einzelnes Sauerstoffatom in ein Substrat ein. Das zweite Sauerstoffatom wird in Form eines Wassermoleküls freigesetzt, sodass die oxidierte Form des Kofaktors für eine Regeneration zur Verfügung steht. Besonders in den letzten Jahren wurden viele Flavin-abhängige Monooxygenasen charakterisiert. Auf Grund der vielfältigen Struktur und Funktionalitäten wurden die Monooxygenasen in Unterklassen eingeteilt.<sup>61</sup> Als bekannte Klassen zählen hier die Epoxidasen und BAYER-VILLIGER-Monooxygenasen.



**Abbildung 59:** Beispiele für bekannte Flavin-abhängige Monooxygenasen. A) Durch die Epoxidase Lsd18 aus der Lasalocid Biosynthese katalysierte, mehrfache Epoxidierung eines Polyenintermediates. B) Durch eine Monooxygenase aus der Pentalenolacton D Biosynthese katalysierte BAYER-VILLIGER-Oxidation.<sup>60,62,63</sup>

Epoxidasen katalysieren die Sauerstoffübertragung auf eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung. Interessante Vertreter dieser Klasse finden sich in den Biosynthesewegen aller Naturstoffklassen und agieren beispielsweise in den Biosynthesewegen der Naturstoffe Squalen, Fumiquinazolin oder Lasalocid (beispielsweise Abbildung 59).<sup>60</sup> Zu der Klasse der BAYER-VILLIGERasen, die ein aktiviertes Sauerstoffmolekül in eine Kohlenstoff-

<sup>61</sup> V. Joosten, W. J. H. van Berkel *Current Opinion in Chemical Biology* **2007**, *11*, 195-202.

<sup>62</sup> J. Jiang, C. N. Tetzlaff, S. Takamatsu, M. Iwatsuki, M. Komatsu, H. Ikeda, D. E. Cane *Biochemistry* **2009**, *48*, 6431-6440.

<sup>63</sup> A. Minami, M. Shimaya, G. Suzuki, A. Migita, S.S. Shinde, K. Sato, K. Watanabe, T. Tamura, H. Oguri, H. Oikawa *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7246-7249.

Kohlenstoffbindung insertieren, zählen beispielsweise Enzyme der Mithramycin- oder Chromomycin-Biosynthesewege (beispielsweise Abbildung 59).<sup>60</sup>

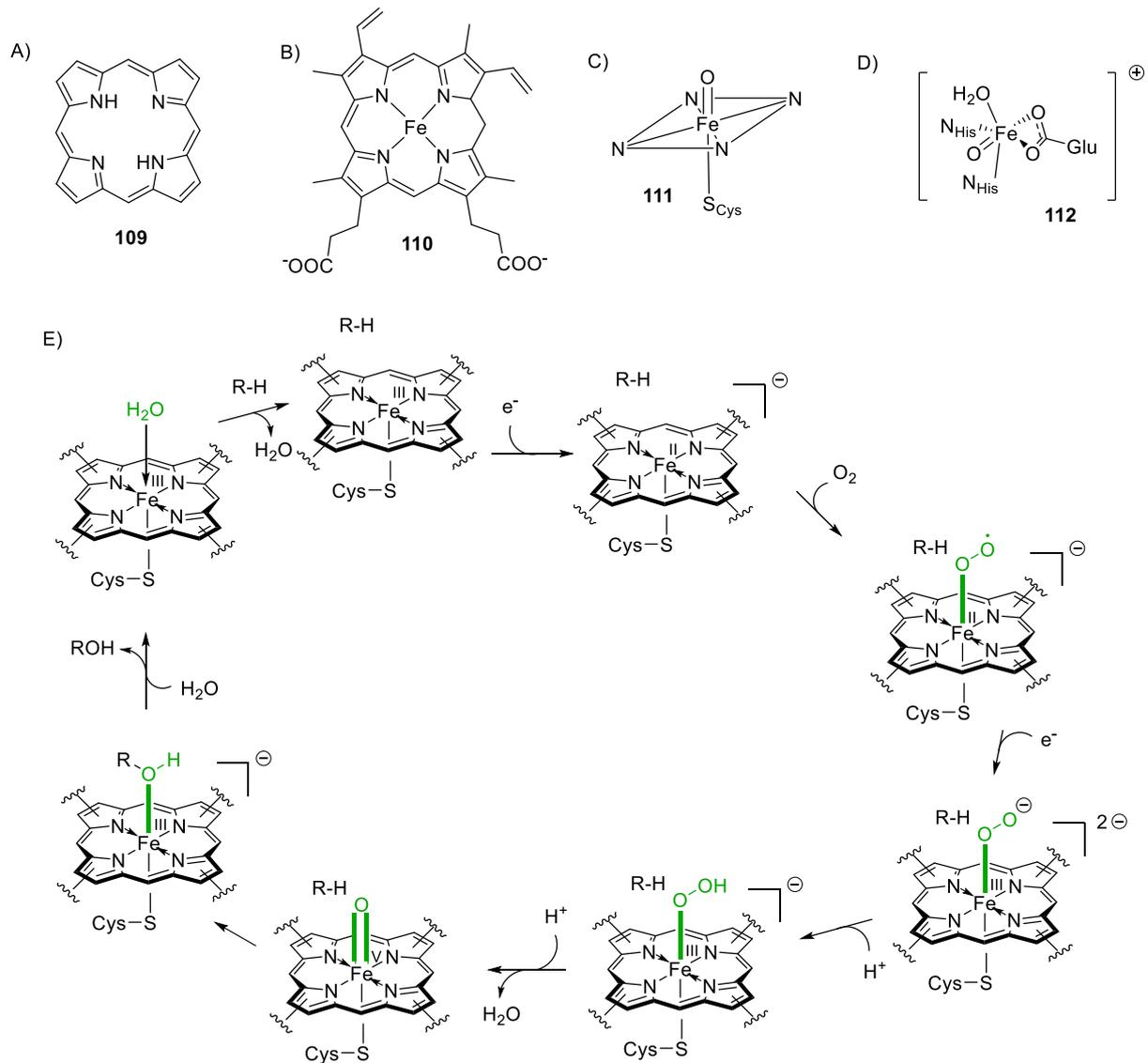
### 7.3.2 Eisen-abhängige Oxygenasen

Neben den Flavoenzymen bilden die Eisen-abhängigen Enzyme eine weitere große Untergruppe von Oxidoreduktasen. Dazu zählen die Oxygenasen, durch die entweder ein oder zwei Sauerstoffatome (Monooxygenasen beziehungsweise Dioxygenasen) in ein Substrat übertragen werden. Der für die Übertragung notwendige aktivierte Sauerstoff wird ausgehend von molekularem Sauerstoff durch ein Eisen-Ion des Kofaktors gebildet. Dabei wird zwischen Häm- und nicht-Häm-abhängigen Enzymen entschieden.

Bei den Häm-abhängigen Enzymen liegt ein Eisen(III)-Ion als Zentralion innerhalb eines Porphyrin-Moleküls vor (Abbildung 60, A, B).<sup>64</sup> Diese prosthetische Gruppe hat das Eisen-Protoporphyrin IX (kurz Häm) als bekanntesten Vertreter. Andere Häm-Liganden zeigen ein anderes Substitutionsmuster am Porphyrin-Grundgerüst. Das Eisen-Ion liegt hierbei oktaedrisch-sechsfach koordiniert vor und bindet sowohl das Häm, das Thiol eines konservierten Cysteins als auch ein Wassermolekül, das zu Beginn des Katalysezyklus durch das Substrat verdrängt wird. Zusätzlich nimmt das Eisen-Ion molekularen Sauerstoff auf, dessen eines Sauerstoffatom durch Ein-Elektronen-Übertragungen in das Substrat insertiert wird (Abbildung 60, C + E). Das zweite Sauerstoffatom wird zu Wasser umgesetzt.<sup>64</sup>

---

<sup>64</sup> M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter, J. H. Dawson *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2841-2887.



**Abbildung 60:** Aufbau der Eisen-abhängigen Enzyme. A) Struktur des allgemeinen Häm-Liganden. B) Koordination des Eisen-Ions im Häm-b-Liganden. C) Aktive Spezies der Häm-abhängigen Oxygenasen. D) Aktive Spezies der nicht-Häm-abhängigen Oxygenasen am Beispiel der Pterin-abhängigen aromatischen Aminosäurehydroxylasen. E) Mechanismus der Häm-abhängigen Oxygenasen.<sup>65</sup>

Die nicht-Häm-abhängigen Enzyme enthalten ein Eisen-Ion, das durch Aminosäuren koordiniert wird und das molekularen Sauerstoff binden kann.<sup>66</sup> Durch ein Kosubstrat wird der Sauerstoff aktiviert und durch die aktive Eisen(IV)-Sauerstoff-Spezies auf das Substrat

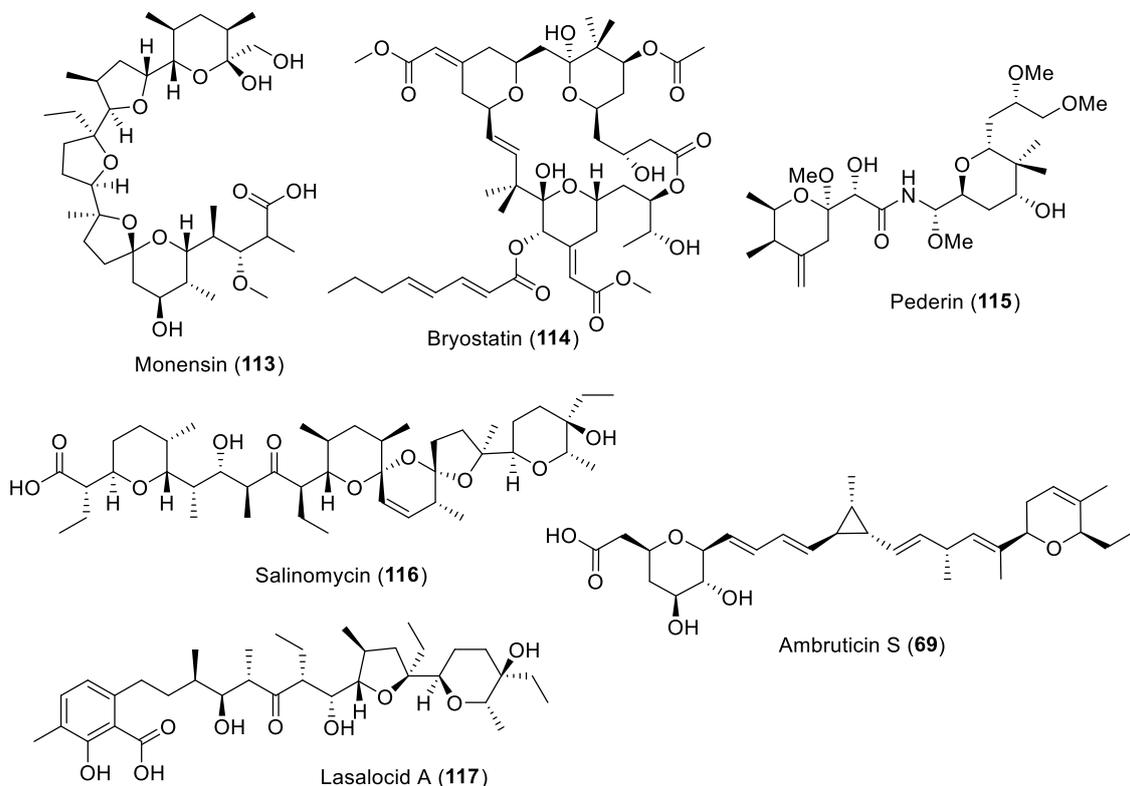
<sup>65</sup> A. Kirschning, Biogenese von Naturstoffen, Leibniz Universität Hannover, Stand September 2014.

<sup>66</sup> M. M. Abu-Omar, A. Loaiza, N. Hontzas *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2227-2252.

übertragen (Abbildung 60, D). Als Beispiel kann die Pterin-abhängige aromatische Aminosäurehydroxylase aufgeführt werden. Pterin dient hierbei als Kosubstrat.

## 7.4 Tetrahydropyranringe in Naturstoffen

In vielen biologisch aktiven Naturstoffen werden fünf- beziehungsweise sechs-gliedrige zyklische Ether-Einheiten gefunden. Dabei können sowohl Bakterien als auch Schwämme marinen Ursprungs oder Dinoflagellate als Quelle dienen. Bekannte und pharmakologisch relevante Vertreter dieser Gruppe sind Bryostatin (**114**) und Salinomycin (**116**). Insbesondere die Gruppe der ionophoren terrestrischen Polyether zeichnet sich durch eine dichte Funktionalisierung mit Sauerstoffheterozyklen als hervorstechendem Strukturmerkmal aus (Monensin (**113**), Salinomycin (**116**) und Lasalocid (**117**) in Abbildung 61). Auch die Ambruticine und Pederin (**115**) sind aufgrund ihres Wirk- und Toxizitätsprofils von Interesse für die Wirkstoffforschung. Richtungweisende Arbeiten zur biosynthetischen Bildung von Hydropyranen wurden am Beispiel dieser beiden Moleküle durchgeführt.<sup>36,78</sup>

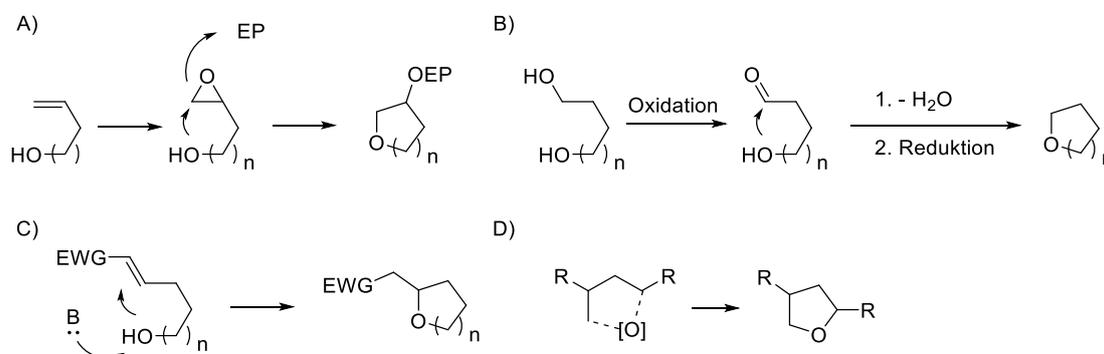


**Abbildung 61:** Beispiele für ionophore Polyether-Naturstoffe.

In den vergangenen Jahren wurde die biosynthetische Bildung zyklischer Ether und Methoden zu deren stereoselektiver Synthese intensiv untersucht.

### 7.4.1 Biosynthetische Strategien zum Aufbau von THP-Ringen in Naturstoffen

Die biosynthetische Bildung zyklischer Ether-Einheiten in Naturstoffen kann auf unterschiedlichen Wegen geschehen.<sup>67</sup> Dazu zählen zum einen Epoxidierungs-Epoxidöffnungs-Kaskaden (Abbildung 62, A), Halbacetalbildung gefolgt von Dehydratisierung und Reduktion (Abbildung 62, B), die oxa-konjugierte Addition (Abbildung 62, C) sowie als vierte Variante die direkte oxidative Zyklisierung (Abbildung 62, D).



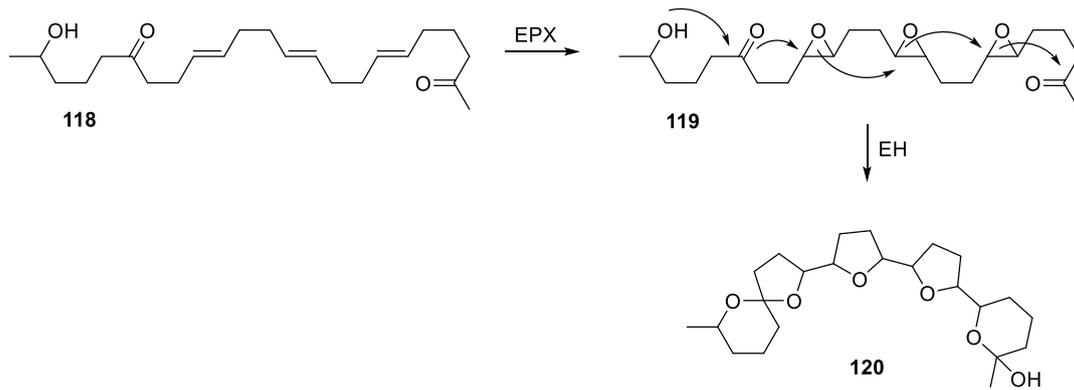
**Abbildung 62:** Potentielle Mechanismen der biosynthetischen Bildung von zyklischen Ether-Einheiten. A) Mechanismus der Epoxidierungs-Epoxidöffnungs-Kaskade. B) Mechanismus der Oxidations-Dehydratisierungs-Reduktions-Kaskade. C) Mechanismus der oxa-konjugierten Addition. D) Direkte oxidative Zyklisierung. EWG: elektronenziehende Gruppe. EP: Elektrophil. B: Base mit freiem Elektronenpaar.<sup>67</sup>

#### 7.4.1.1 Epoxidierungs-Epoxidöffnungs-Kaskaden

Für ionophore Polyether wie Monensin, Lasalocid oder Salinomycin, wurde 1983 das CANE-CELMER-WESTLEY-Model postuliert, in dem die Biosynthese der Etherringe als ein Zusammenspiel von Epoxidasen (EPX) auch Epoxidhydrolasen (EH) beschrieben wird.<sup>68</sup> Diese katalysieren die regio- und stereoselektive Poly-Epoxidierung eines linearen Polyether-Intermediates, gefolgt von einer regioselektiven Zyklisierungskaskade (Abbildung 63).<sup>68</sup>

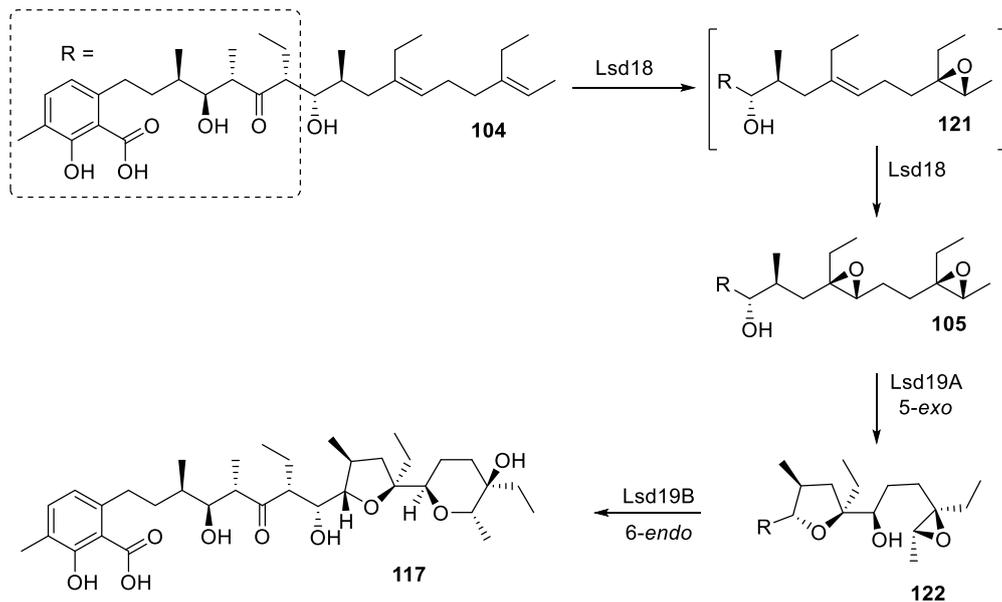
<sup>67</sup> M. E. A. Richter, N. Traitcheva, U. Knüpfer, C. Hertweck *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9004-9007.

<sup>68</sup> D. E. Cane, W. D. Celmer, J. W. Westley *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3594-3600.



**Abbildung 63:** Beispielhafter allgemeiner Mechanismus der Epoxidierungs-Epoxidöffnungs-Kaskadenreaktion nach dem CCW-Model.<sup>68</sup>

Die Aufklärung des Genclusters von Monensin ergab 2001 den ersten Hinweis darauf, dass das CCW-Model zutrifft.<sup>69</sup> LEADLAY *et al.* konnten eine Flavin-abhängige Monooxygenase (EPX, *monCI*) und zwei Epoxidhydratasen (EH, *monBI*, *monBII*) finden, deren Funktion durch Studien mit Deletionsmutanten bestätigt wurde.<sup>69</sup> Jedoch war es die Gruppe von OIKAWA, die mit der Untersuchung der Biosynthese von Lasalocid die ersten *in vitro*-Experimente zur Charakterisierung von EPX- und EH-Domänen durchgeführt hat.<sup>63</sup>



**Schema 9:** Katalysierte Reaktionen der Epoxidase Lsd18 sowie der Epoxidhydratase Lsd19 aus der Lasalocid-Biosynthese.

<sup>69</sup> P. F. Leadlay, J. Staunton, M. Oliynyk, C. Bisang, J. Cortés, E. Frost, Z. A. Hughes-Thomas, M. A. Jones, S. G. Kendrew, J. B. Lester, P. F. Long, H. A. McArthur, E. L. McCormick, Z. Oliynyk, C. B. W. Stark, C. J. Wilkinson *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 27, 360-367.

Lasalocid (**117**) ist ein ionophorer Polyether mit zwei Ether-Einheiten, die durch die Epoxidase Lsd18 (LasC) und die Epoxidhydrolase Lsd19 (LasC) aufgebaut werden sollen.<sup>70</sup> Beide Enzyme konnten durch heterologe Genexpression rekombinant hergestellt und in *in vitro*-Untersuchungen eingesetzt werden.<sup>63,71</sup> Dabei zeigte sich, dass die EPX Lsd18 die sequenzielle Epoxidierung des Polyens durchführt, wodurch zunächst das Mono- und letztendlich das Bisepoxid gebildet wird (Schema 9).<sup>63</sup> Im Anschluss an die Epoxidierung katalysiert die Epoxidhydrolase Lsd19 die Zyklisierungen zu dem Tetrahydrofuran- und dem Tetrahydropyran-Ring. Hierbei wird zuerst der fünf-gliedrige zyklische Ether in einer nach den Baldwin-Regeln begünstigten *5-exo-tet*-Zyklisierung gebildet. Die nicht-favorisierte *6-endo-tet*-Zyklisierung zum Pyran-Ring geschieht dann nur unter Katalyse der EH Lsd19.<sup>71</sup> Es wurde gezeigt, dass das terminale Epoxid unter Säurekatalyse spontan zum Tetrahydrofuran-Ring geöffnet wird.<sup>71</sup>

Zusätzlich zu der Aufklärung der Mechanismen konnten OIKAWA *et al.* eine Röntgenstrukturanalyse der Epoxidhydrolase Lsd19 durchführen. Hierbei wurde festgestellt, dass Lsd19 aus zwei Domänen besteht; der N-terminalen Lsd19A-Domäne sowie der C-terminalen Lsd19B-Domäne.<sup>71,72</sup> In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Domänen spezifisch für einen der beiden Ringschlüsse zuständig sind. Die Lsd19A katalysiert ausschließlich die initiale *5-exo-tet*-Zyklisierung und die Lsd19B ausschließlich den *6-endo-tet*-Ringschluss (Schema 9).<sup>71,73</sup>

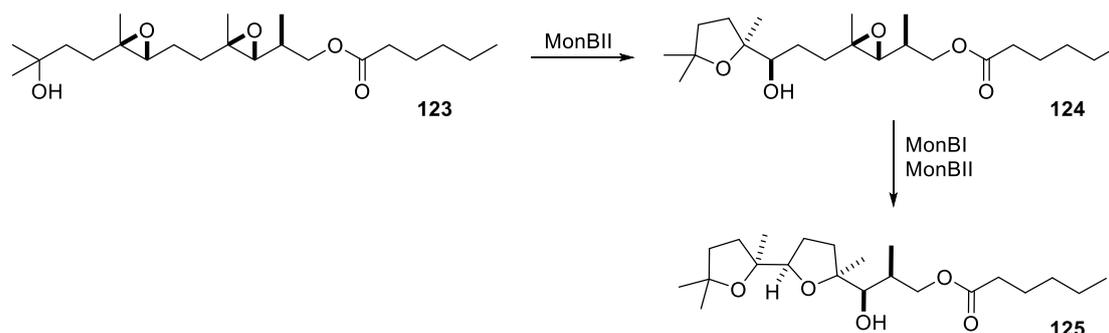
---

<sup>70</sup> M. Tosin, L. Smith, P. F. Leadlay *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12136-12139.

<sup>71</sup> A. Minami, A. Migita, D. Inada, K. Hotta, K. Watanabe, H. Oguri, H. Oikawa *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1638-1641.

<sup>72</sup> K. Hotta, X. Cien, R. S. Paton, A. Minami, H. Li, K. Swaminathan, I. I. Mathews, K. Watanabe, H. Oikawa, K. N. Houk, C.-Y. Kim *Nature* **2012**, *483*, 355-359.

<sup>73</sup> A. Minami, H. Oguri, K. Watanabe, H. Oikawa *Curr. Opinion Chem. Biol.* **2013**, *14*, 555-561.

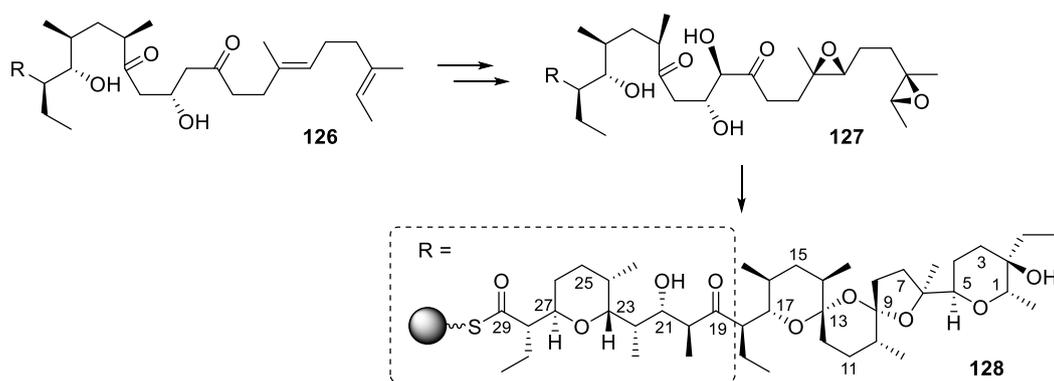


**Schema 10:** Katalysierte Reaktionen mit Testsubstraten der Epoxidhydrolasen MonBI und MonBII aus der Monensin-Biosynthese.<sup>74</sup>

Die Untersuchungen zu Lasalocid legen nahe, dass jede einzelne Epoxidöffnung durch eine einzelne Domäne der Hydrolase katalysiert wird.<sup>73</sup> Am Beispiel der Monensin-Biosynthese wurde allerdings deutlich, dass diese Verallgemeinerung nicht auf alle Polyether übertragbar ist. Hier finden sich zwei Epoxidhydrolasen, MonBI und MonBII, im Gencluster.<sup>69</sup> Der Naturstoff weist jedoch drei Furan-Einheiten auf, die ausgehend von einem *E,E,E*-Trien gebildet werden. Um den Mechanismus der Epoxidhydrolasen und damit die Furan-Bildung genauer zu verstehen, wurden die Enzyme MonBI und MonBII durch Genexpression rekombinant hergestellt und in *in vitro*-Untersuchungen eingesetzt.<sup>74,75</sup> Diese Tests zeigten, dass die Epoxidhydrolase MonBII die erste Epoxidöffnung katalysiert. Die zweite Epoxidhydrolyse kann nur ablaufen, wenn beide Enzyme MonBI und MonBII zusammenarbeiten (Schema 10).<sup>74</sup> Dieses Ergebnis zeigt allosterische Wechselwirkungen zweier homologer Enzyme.<sup>75</sup>

<sup>74</sup> A. Minami, T. Ose, K. Sato, A. Oikawa, K. Kuroki, K. Maenaka, H. Oguri, H. Oikawa *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 562-569.

<sup>75</sup> K. Sato, A. Minami, T. Ose, H. Oguri, H. Oikawa *Tet. Lett.* **2011**, *52*, 5277-5280.



**Abbildung 64:** Postulierter Mechanismus für die Bildung der zyklischen Ether-Einheiten in Salinomycin.<sup>77</sup>

Ein weiterer Naturstoff, der in die Klasse der ionophoren Polyether fällt und in dessen Biosynthese das Zusammenspiel von Epoxidasen und Epoxidhydrolasen stattfindet, ist Salinomycin (**116**). Im Rahmen von dessen Genclusteranalyse wurden Gene gefunden, die für drei Epoxidhydrolasen und eine Flavin-abhängige Epoxidase kodieren.<sup>76</sup> Die Struktur von Salinomycin weist fünf zyklische Ether-Einheiten auf, von denen die Pyrane zwischen C-1 und C-9 durch eine Epoxidierungs-Epoxidöffnungs-Kaskade gebildet werden sollen (Abbildung 64).<sup>76,77</sup> Die Bildung des Pyranringes zwischen C-23 und C-27 soll in Folge der Abspaltung von der Polyketidsynthese, aber angebunden an ein bisher unbekanntes Enzym, stattfinden. Hierbei soll eine oxa-MICHAEL-Addition ablaufen. Allerdings wurde das beteiligte Enzym bisher nicht gefunden.<sup>76,77</sup>

Die Ambruticine stellen eine weitere Gruppe reduzierter Polyketide mit Sauerstoffheterozyklen dar. Diese weisen neben einem Dihydropyran- einen Tetrahydropyran-Ring auf. Die beiden Ether-Einheiten werden in der Biosynthese durch zwei verschiedene Mechanismen gebildet, wobei die THP-Ringbildung wahrscheinlich durch ein *Tailoring*-Enzym und die DHP-Ringbildung bestätigterweise durch eine Domäne der PKS katalysiert wird (siehe Teil 1; Abschnitt 3.3.2.7).<sup>53</sup> Anhand einer Genanalyse konnte eine Flavin-abhängige Epoxidase (AmbJ) identifiziert werden, welche im Fall des THP-Ringes an einer Epoxidierungs-Epoxidöffnungs-Kaskade teilnehmen könnte (siehe Abschnitt 7.1.2).<sup>53</sup> Allerdings wurde kein Gen gefunden, dass für eine Epoxidhydrolase kodiert. Zukünftige *in*

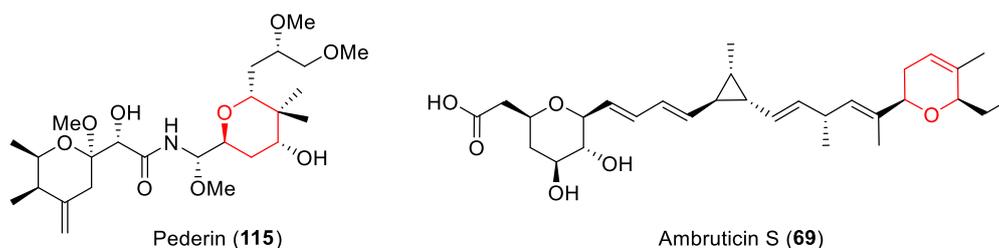
<sup>76</sup> M. E. Yurkovich, P. A. Tyrakis, H. Hong, Y. Sun, M. Samborsky, K. Kamiya, P. F. Leadlay *ChemBioChem* **2012**, *13*, 66-71.

<sup>77</sup> H. Luhavaya, S. R. Williams, H. Hong, L. Gonzaga de Oliveira, P. F. Leadlay *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2081-2085.

*in vitro*-Untersuchungen sollten überprüfen, wie viele und welche Enzyme in den Prozess involviert sind.

#### 7.4.1.2 oxa-MICHAEL-Addition

Neben Epoxidierungs-Epoxidöffnungs-Kaskaden ist die oxa-MICHAEL-Reaktion eine weitere Möglichkeit zyklische Ether-Einheiten biosynthetisch in Naturstoffe einzuführen. Im Gegensatz zur Kaskadenreaktion findet die oxa-MICHAEL-Addition an ACP-gebundenen Substraten auf der Polyketidsynthase statt.<sup>78</sup> Bisher wurden eine Pyransynthase (PS)-Domäne aus einer *trans*-AT-PKS und eine bifunktionale Domäne einer *cis*-AT-PKS durch *in vitro*-Untersuchungen charakterisiert.<sup>78,36</sup> Die Gruppe PIEL verwirklichte die Charakterisierung einer PS-Domäne aus der Pederin Polyketidsynthase und die Gruppe HAHN einer DH-Domäne mit zusätzlicher Pyransynthaseaktivität aus der Ambruticin-Biosynthese (Abbildung 65).

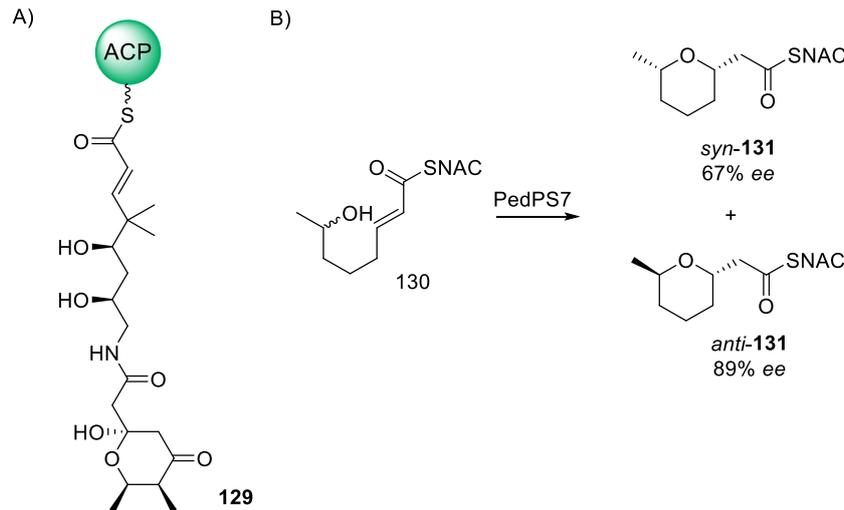


**Abbildung 65:** Struktur der Naturstoffe Pederin und Ambruticin S. Farblich hervorgehoben sind die jeweiligen Tetrahydrobeziehungweise Dihydropyrane, die durch eine oxa-MICHAEL Addition gebildet werden.

Pederin (**115**) ist ein Naturstoff mit zwei Tetrahydropyran-Einheiten, von denen eine durch eine Pyransynthasedomäne hergestellt wird.<sup>79</sup> Die enzymatische Domäne PS wurde durch Genexpression rekombinant hergestellt und mit strukturell stark vereinfachten synthetischen Vorläufersurrogaten *in vitro* umgesetzt.<sup>78</sup> Die Analyse der Tests zeigte, dass ein Pyran-Ring gebildet wurde (Abbildung 66). Durch diese Untersuchungen konnten PIEL *et al.* den ersten Beweis für die oxa-konjugierte Addition als neuen Reaktionstyp innerhalb von Polyketidsynthasen erbringen.<sup>78</sup> PIEL *et al.* zeigten, dass die Pyransynthasedomäne ein vereinfachtes Substrat annimmt und zwei diastereomere Pyrane gebildet werden. Demnach existieren eine flexible Substratspezifität und eine geringe Stereoselektivität.

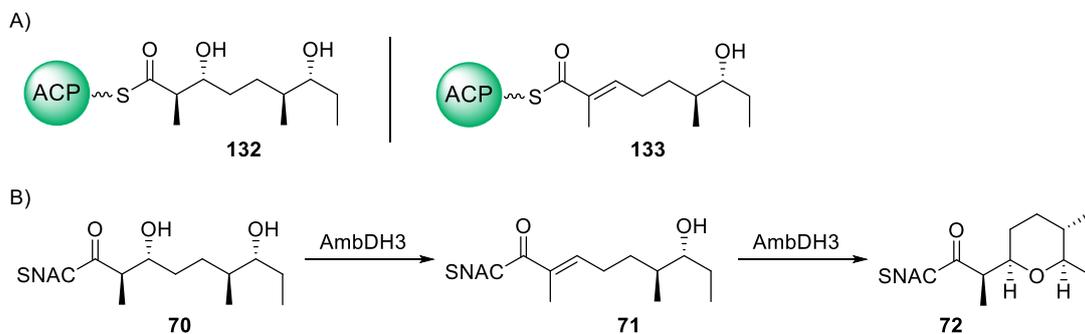
<sup>78</sup> P. Pöplau, S. Frank, B. I. Morinaka, J. Piel *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 13215-13218.

<sup>79</sup> J. Piel *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 14002-14007.



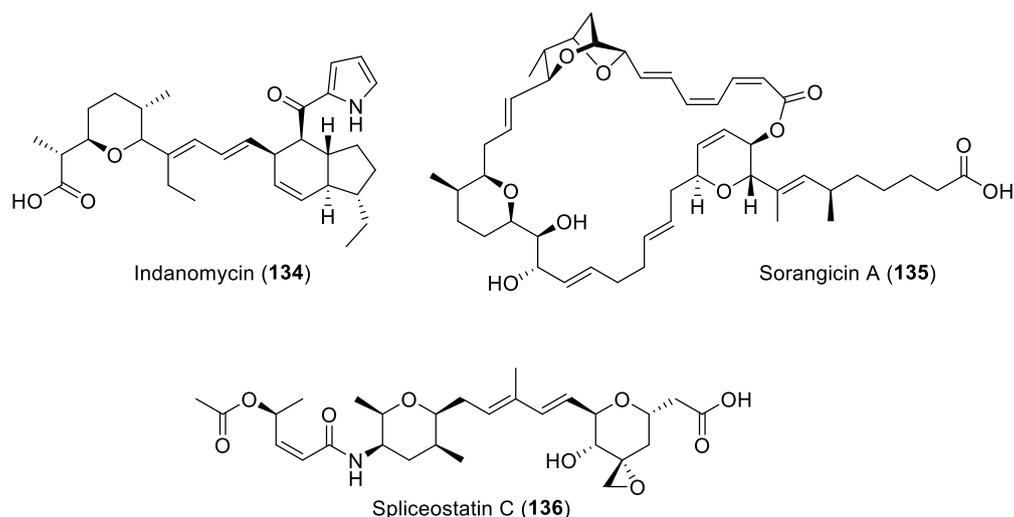
**Abbildung 66:** Pyransynthesedomäne der Pederin-PKS. A) ACP-gebundenes Substrat der PedPS7. B) Durch die PS-Domäne katalysierte Reaktion.

Die Gruppe von HAHN konnte in *in vitro*-Untersuchungen mit der rekombinanten Domäne AmbDH3 zeigen, dass diese zum einen die formale *syn*-Eliminierung von Wasser aus Vorläufer **70** und zum anderen die Bildung des Pyran-Ringes über eine oxa-MICHAEL-Addition katalysiert (Abbildung 67 und siehe Teil 1, Abschnitt 3.3.3).<sup>36</sup>



**Abbildung 67:** Funktion der bifunktionalen Domäne AmbDH3 der Ambruticin-PKS. A) ACP-gebundene Substrate der AmbDH3-Domäne. B) Aktivität der bifunktionalen Domäne in der Ambruticin-Biosynthese.

Zusätzlich zu den bereits untersuchten Domänen konnten der Hinweis auf diese Domänen in anderen Polyketidsynthasen gefunden werden. Dazu zählt die PKS von Indanomycin (**134**) sowie von Sorangicin (**135**) und Spliceostatin (**136**).<sup>76,77,78</sup>



**Abbildung 68:** Strukturen der Naturstoffe Indanomycin, Sorangicin A und Spliceostatin C.

Im Fall von Sorangicin (**135**) wurden im Gencluster drei mögliche, für PS-Domänen kodierende, Gene gefunden.<sup>80</sup> Dasselbe gilt für die PKS von Spliceostatin (**136**).<sup>81</sup> Für die Bildung der Tetrahydropyran-Einheit in Indanomycin (**134**) wurde ebenfalls eine oxa-MICHAEL-Addition postuliert. Allerdings konnte keine DH-Domäne innerhalb des entsprechenden Modules gefunden werden. Denkbar wäre, dass eine Cyclasedomäne sowohl die Dehydratisierung als auch die Pyranbildung katalysiert. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Cyclasedomäne die Tetrahydropyran-Bildung durch eine direkte nukleophile Substitution katalysiert.<sup>82</sup>

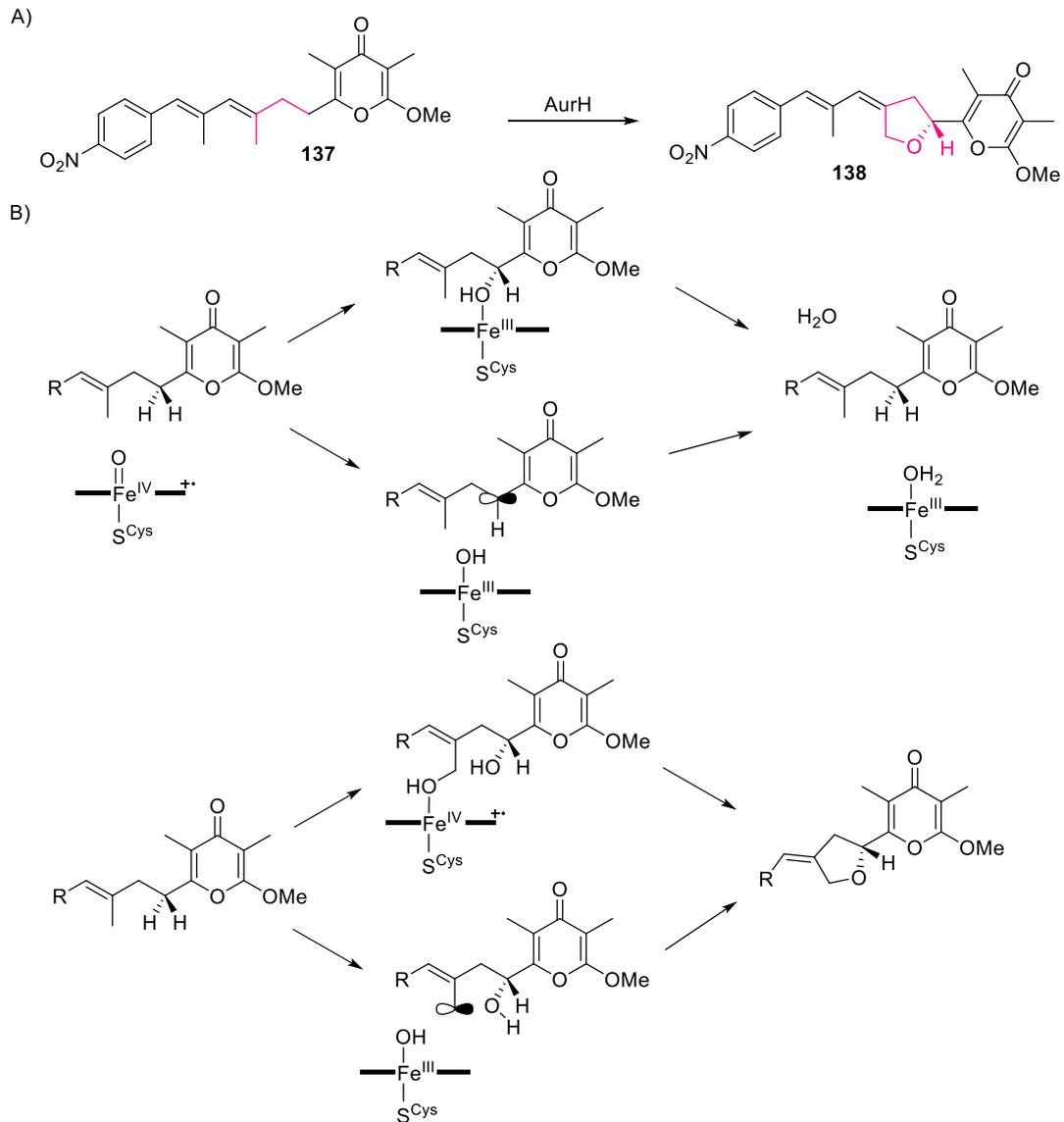
#### 7.4.1.3 Direkte oxidative Zyklisierung

Ein abweichender Mechanismus für die Bildung eines Tetrahydrofuran-Ringes wurde in der Aureothin-Biosynthese gefunden (Abbildung 69, A).<sup>67</sup> Durch Genclusteranalysen wurde ein hierfür verantwortliches Gen, *aurH*, entdeckt, das für eine Cytochrom P450 Monooxygenase kodiert.<sup>67</sup>

<sup>80</sup> H. Irschik, M. Kopp, K. J. Weissman, K. Buntin, J. Piel, R. Müller *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1840-1849.

<sup>81</sup> A. S. Eustáquio, J. E. Janso, A. S. Ratnayake, C. J. O'Donnell, F. E. Koehn *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, E3376-E3385.

<sup>82</sup> C. Li, K. E. Roege, W. L. Kelly *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1064-1072.



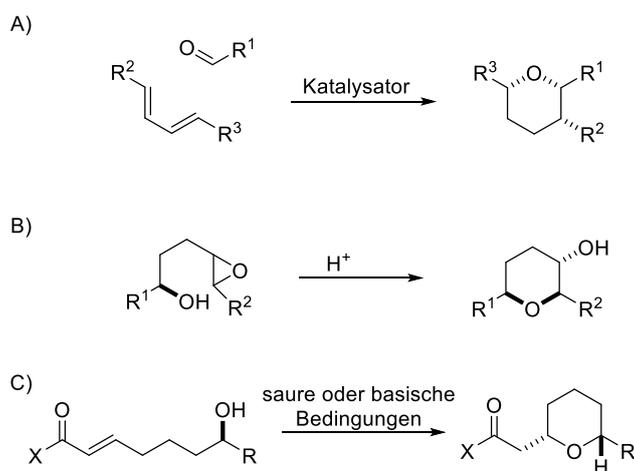
**Abbildung 69:** Untersuchung der ungewöhnlichen Oxygenierung in der Aureothin-Biosynthese. A) Katalysierte Reaktion von AurH. B) Mechanismus der Oxygenierung katalysiert durch AurH.<sup>62</sup>

Die Gruppe von HERTWECK konnte in *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen zeigen, dass die Monooxygenase AurH die sequenzielle Einführung eines Sauerstoffatoms und die anschließende Ringbildung katalysiert (Abbildung 69, B).<sup>67</sup> Dies stellt den ersten aufgeklärten Fall einer oxidativen Zyklisierung zum Aufbau von zyklischen Ether-Einheiten dar. Das durch die Zyklisierung gebildete Stereozentrum wird durch das beteiligte Enzym mit einer sehr hohen Stereoselektivität eingeführt.

AurH wurde von HENROT *et al.* in der Totalsynthese von Aureothin eingesetzt.<sup>83</sup> Dazu wurde Desoxyaureothin (**137**) synthetisiert und mit der durch Genexpression rekombinant hergestellten Monooxygenase AurH umgesetzt. Aureothin konnte auf diesem Wege in moderater Ausbeute mit einem sehr guten Enantiomerenüberschuss hergestellt werden.

#### 7.4.2 Chemische Strategie zum Aufbau von THP-Ringen in Naturstoffen

In der organischen Synthese existieren verschiedene Synthesestrategien für die Herstellung von Sauerstoffheterozyklen, die auch in die Naturstoffsynthese Anwendung finden.<sup>84,85,86</sup> Zu den drei bekanntesten Methoden, um THP-Ringe aufzubauen, zählt die HETERO-DIELS-ALDER-Reaktion, der Angriff einer Hydroxygruppe auf ein Epoxid sowie die Addition einer Hydroxygruppe an einen MICHAEL-Akzeptor (Schema 11). Die Stereochemie kann im Fall der DIELS-ALDER-Reaktion durch den Einsatz von Katalysatoren gesteuert werden. Bei den anderen Reaktionen wird die Stereochemie durch die Konfiguration der Hydroxygruppe des Substrates, also letztlich durch Substratkontrolle, gesteuert.



**Schema 11:** Allgemeine Reaktionen zur THP-Ringbildung. A) HETERO-DIELS-ALDER-Reaktion. B) Zyklisierung durch Epoxideinwirkung. C) oxa-MICHAEL-Reaktion.

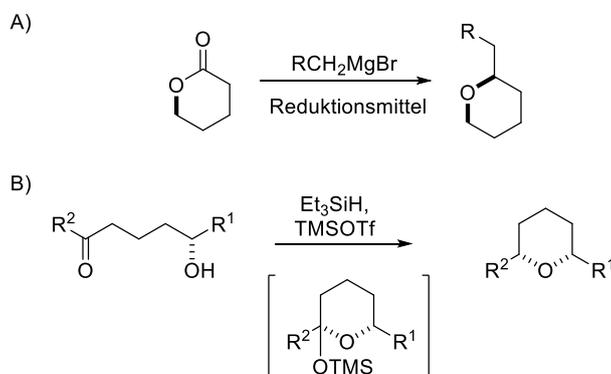
<sup>83</sup> M. Henrot, M. E. A. Richter, J. Maddaluno, C. Hertweck, M. De Paolis *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *124*, 9725-9729.

<sup>84</sup> P. A. Clarke, S. Santos *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2045-2053.

<sup>85</sup> M. M. Faul, B. E. Huff *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2407-2473.

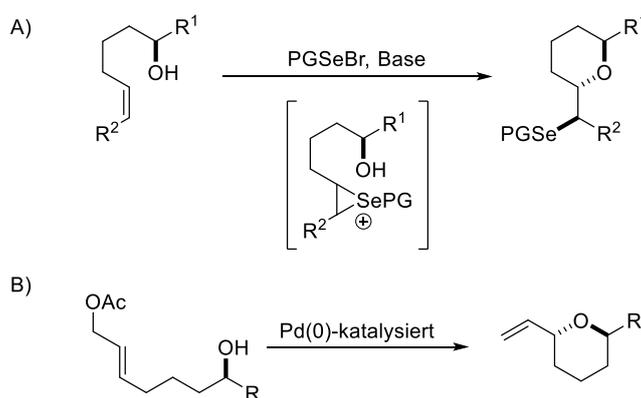
<sup>86</sup> K. C. Nicolaou, M. O. Frederick, R. J. Aversa *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7182-7225.

Reduktive Zyklisierungen stellen eine weitere Möglichkeit zur Bildung von THP-Ringen dar. Dabei wird in zwei Gruppen unterschieden. Zum einen die Reaktionen, bei denen eine Addition an einem Lakton-Vorläufer stattfindet und zum anderen Reaktionen, die über ein zyklisches Hemiacetal verlaufen (Schema 12).



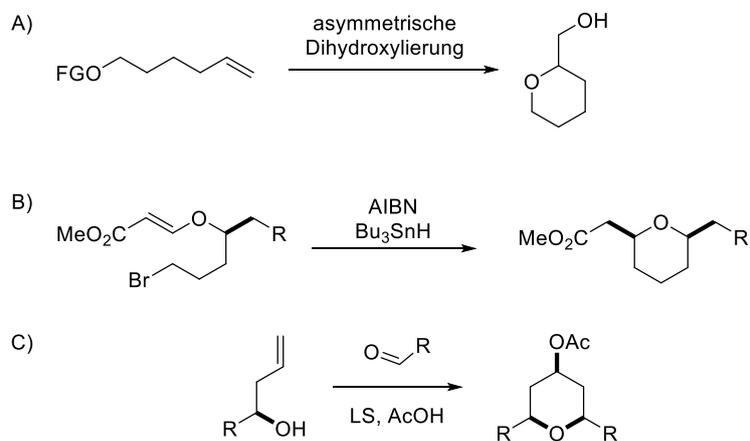
**Schema 12:** Allgemeine Reaktionen zur THP-Bildung durch reduktive Zyklisierungen. A) GRIGNARD-Addition an ein Lakton. B) THP-Ringbildung über ein zyklisches Hemiacetal.

Eine weitere Gruppe der THP-Ring-bildenden Reaktionen ist die Zyklisierung durch den Angriff einer Hydroxygruppe auf eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung. Diese Reaktionen benötigen einen Katalysator, der die Doppelbindung *in situ* aktiviert. Pd(0)- und Pd(II)-enthaltende Katalysatoren werden hauptsächlich eingesetzt. Zusätzlich sind Reaktionen bekannt, in denen Quecksilber, Selen oder Iod zum Aktivieren der Doppelbindung über ein Onium-Ion verwendet werden (Schema 13).



**Schema 13:** Allgemeine Reaktionen der Zyklisierung durch Angriff an elektrophil aktivierten Doppelbindungen. A) Reaktion über das Selenonium-Ion. B) Pd-katalysierte Reaktion. PG: Schutzgruppe.

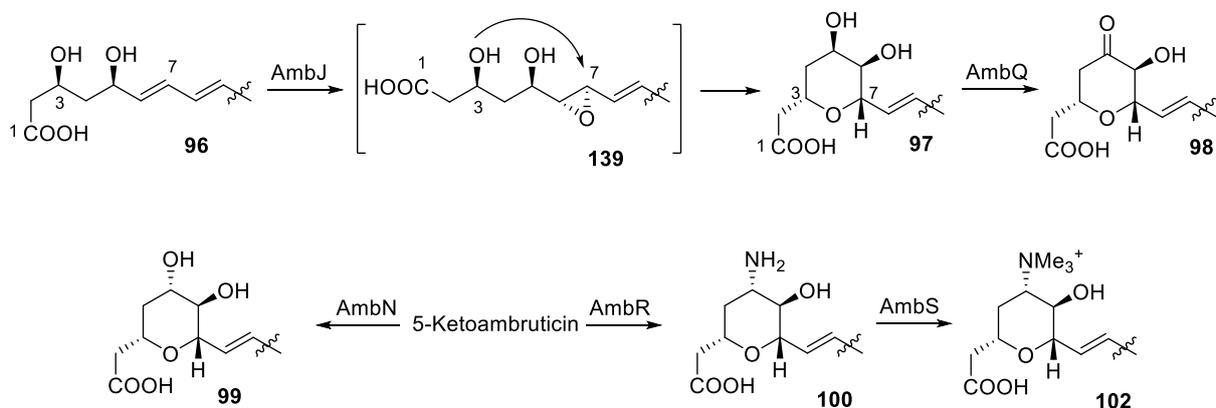
Eine eher klassische Variante ist die WILLIAMSON-ETHER-Synthese (Schema 14). Außerdem sind radikalische Mechanismen zur THP-Ringbildung bekannt, bei denen Azobis-(isobutyronitril) (AIBN) eingesetzt wird, um das initiale Radikal zu erzeugen. Außerdem kann die PRINS-Reaktion zur Bildung des THP-Ringes eingesetzt werden (Schema 14).



**Schema 14:** Allgemeine Reaktionen zur Bildung von THP-Ringen. A) WILLIAMSON-ETHER-Synthese. B) Radikalische Reaktion unter Verwendung von AIBN. C) PRINS-Zyklisierung. FG: Fluchtgruppe. LS: LEWIS-Säure.

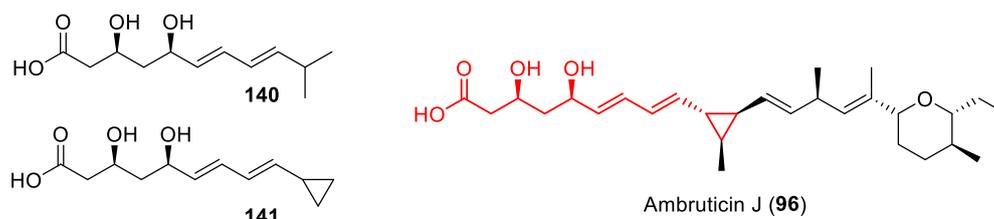
## 8 Zielsetzung

Der Naturstoff Ambruticin (**69**) ist ein Polyketid, das außergewöhnliche Strukturmerkmale aufweist. Dazu zählt der vierfach-substituierte Tetrahydropyranring, der innerhalb der *post*-PKS-Schritte der Ambruticin-Biosynthese gebildet wird. JULIEN *et al.* postulierten, dass das Tetrahydropyran durch eine 6-*endo-tet*-Zyklisierung der Alkoholfunktion an C3 mit einem zuvor durch die flavinabhängige Monooxygenase AmbJ gebildeten Epoxids aufgebaut wird (Abbildung 70).



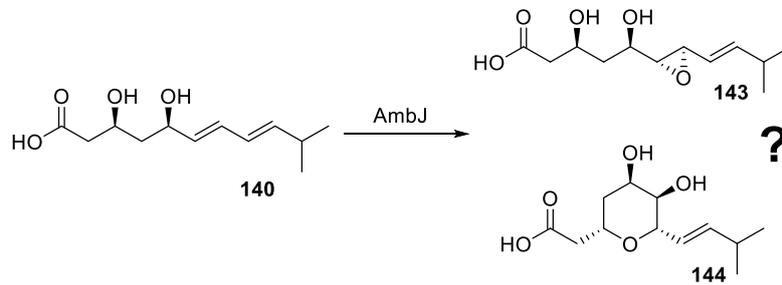
**Abbildung 70:** Postulierte *post*-PKS Modifizierungen innerhalb der Ambruticin-Biosynthese.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die postulierte Biosynthese des Tetrahydropyranringes aufgeklärt werden. Dazu sollte zunächst ein Vorläufersurrogat der Epoxidase AmbJ der Ambruticin-Biosynthese hergestellt und zusätzlich die Epoxidase AmbJ nach Klonierung heterolog in *E. coli* produziert und anschließend gereinigt werden. Abschließend sollten das Vorläufersurrogat und die Epoxidase in Enzymaktivitätstests eingesetzt werden, die durch massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Analyse ausgewertet werden sollen.



**Abbildung 71:** Strukturen der zu synthetisierenden Vorläufermoleküle **140** und **141** sowie von Ambruticin J (**96**). Farblich hervorgehoben ist der übereinstimmende Bereich von Ambruticin J mit den Vorläufermolekülen **140** und **141**.

Als Vorläufersurrogate sollten Säuren **140** und **141** hergestellt werden. Beide Strukturen ähneln dem putativen Epoxidasevorläufer Ambruticin J (**96**) und weisen die für die Epoxidierung und Pyranbildung wichtigen Strukturmerkmale auf (Abbildung 71).



**Abbildung 72:** Mögliche Umsetzung des Vorläufers **140** mit *AmbJ*.

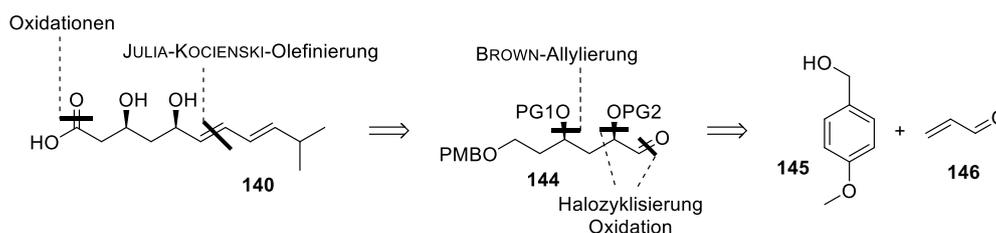
Für die biologischen Arbeiten sollte das Monooxygenasegen *ambJ* in unterschiedliche Expressionsvektoren kloniert werden. Im Anschluss sollten Expressionsstudien durchgeführt werden, um die Epoxidase *AmbJ* löslich herzustellen. Den Abschluss der biologischen Arbeiten bildet die Reinigung mittels Affinitätschromatographie mit einhergehender Isolierung des Proteins. Außerdem sollte getestet werden, ob *AmbJ* aktiv ist und eine Epoxidierung oder Pyranbildung katalysiert (Abbildung 72).

Zusätzlich zu der Monooxygenase *AmbJ* runden vier posttranslationale Modifizierungen das Substitutionsmuster am Tetrahydropyranring des Ambruticins ab und bilden dadurch die Ambruticin-S und -VS-Serie (Abbildung 70). Hierbei handelt es sich um die Desaturase *AmbQ*, die Aldehyddehydrogenase *AmbN*, die Aminotransferase *AmbR* und die Methyltransferase *AmbS*. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Enzyme *AmbQ*, *AmbN*, *AmbR* und *AmbS* ausgehend von synthetischen Genen in verschiedene Expressionssysteme kloniert und erste Expressionsstudien durchgeführt werden.

## 9 Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse

### 9.1 Enantioselektive Synthese des AmbJ-Vorläufers

Ziel dieser Arbeit ist es, die *Tailoring*-Enzyme der Ambruticin-Biosynthese auf ihre postulierte Funktion zu untersuchen. Dazu sollten Enzymaktivitätstests mit realistischen, synthetisch hergestellten Vorläufersurrogaten durchgeführt werden, die mit den heterolog in *E. coli* produzierten Enzymen inkubiert werden.



**Schema 15:** Geplante Synthese des AmbJ-Vorläufermoleküls.

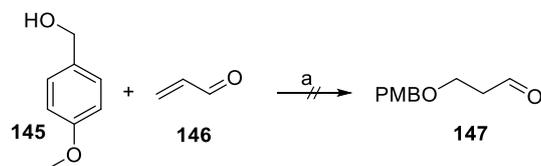
Das Vorläufersurrogat von AmbJ sollte ausgehend von Acrolein synthetisiert werden. Die Retrosynthese weist eine stereoselektiv verlaufende Allylierung nach BROWN sowie eine JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung als Schlüsselschritte auf (Schema 15). Ein weiterer Schlüsselschritt sollte eine stereoselektive Halozyklisierung sein. Die letzten Syntheseschritte zu Säure **140** sollten aus Entschützung sowie aus Oxidation des primären Alkohols zur Carbonsäure bestehen. Zusätzlich sollte eine Schutzgruppenstrategie für eine spätere selektive Entschützung der verschiedenen Alkoholfunktionen angewandt werden, bei der neben der PMB-Gruppe zwei unterschiedliche Silylgruppen (PG1 und PG2 siehe Schema 15) eingeführt werden sollten.

#### 9.1.1 OXA-MICHAEL-Addition an Acrolein und BROWN-Allylierung

Der erste Syntheseschritt zur Herstellung des Vorläufersurrogates der Epoxidase AmbJ war eine säurekatalysierte 1,4-ADDITION zwischen frisch destilliertem Acrolein (**146**) und PMB-Alkohol **145** nach einer Vorschrift von CHANDRASEKHAR *et al.* (Schema 16).<sup>87</sup> Die Reaktion

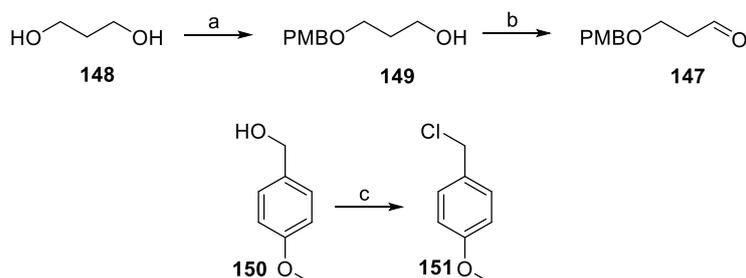
<sup>87</sup> S. Chandrasekhar, G. Parimala, B. Tiwari, C. Narsihmulu, G. D. Sarma *Synthesis* **2007**, *11*, 1677–1682.

lief über einen Zeitraum von sieben Tagen und wurde nach kurzer Aufarbeitung destilliert. Allerdings konnte kein Produkt isoliert und nur Startmaterial **145** zurückgewonnen werden.



**Schema 16:** Synthese von Aldehyd **147**. a) AcOH, NaOH, ClCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, H<sub>2</sub>O, 40 °C, 7 d.<sup>87</sup>

Im Rahmen der Bachelorarbeit von A. SEEMANN wurde die Syntheseroute weitergeführt und zunächst eine alternative Synthese von PMB-geschütztem Aldehyd **147** getestet.<sup>88</sup> Dazu wurde eine PMB-Monoschutzung von 1,3-Propanediol (**148**) unter basischen Bedingungen mit zuvor synthetisiertem PMB-Chlorid durchgeführt und Alkohol **149** in guten Ausbeuten erhalten (Schema 17).<sup>89,90</sup> Nach erfolgreicher SWERN-Oxidation konnte gewünschter Aldehyd **147** in drei Schritten erhalten werden.<sup>91</sup>



**Schema 17:** Synthese von Aldehyd **147**. a) i) NaH, DMF, 0 °C, dann RT, 1 h, ii) PMB-Cl, 0 °C, dann RT, 24 h, 70%, b) DMSO, Oxalylchlorid, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -60 °C, 90 min, 72%, c) Thionylchlorid, Benzotriazol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 10 min, quant.

Zuvor synthetisierter Aldehyd **147** wurde in einer BROWN-Allylierung eingesetzt. Obwohl unter wasserfreien Bedingungen und mit frisch hergestelltem Ipc-Boran gearbeitet wurde,

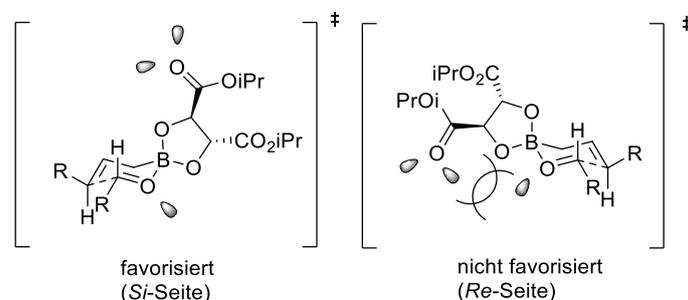
<sup>88</sup> A. Seeman, Initiale Studien zur Synthese eines Intermediates der Ambruticin-Biosynthese, Bachelorarbeit, Hannover **2013**.

<sup>89</sup> S. S. Chaudhari, K. G. Akamanchi *Synlett* **1999**, *11*, 1763–1765.

<sup>90</sup> O. Barun, K. Kumar, S. Sommer, A. Langerak, T. U. Mayer, O. Müller, H. Waldmann *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4773–4788.

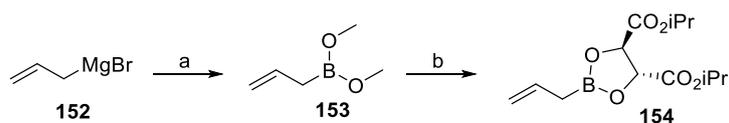
<sup>91</sup> E. Feng, Y. Zhou, D. Zhang, L. Zhang, H. Sun, H. Jiang, H. Liu *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3274–3282.

konnte kein Allylierungsprodukt dargestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde anstelle der BROWN-Allylierung eine ROUSH-Allylierung durchgeführt. Der Vorteil dieser stereoselektiven Allylierung liegt darin, dass die verwendete chirale Borverbindung stabiler gegen Hydrolyse ist, als das zuvor verwendete Ipc-Boran.



**Abbildung 73:** Zwei der möglichen Übergangszustände der ROUSH-Allylierung.

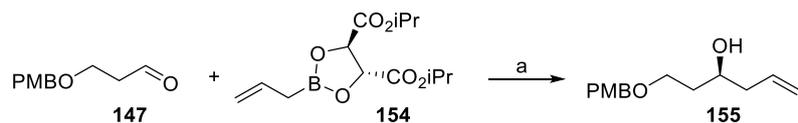
Der Mechanismus der ROUSH-Allylierung verläuft über einen sechsgliedrigen ZIMMERMANN-TRAXLER-Übergangszustand. In Abbildung 73 sind zwei der möglichen Übergangszustände gezeigt, bei denen vor allem die Interaktionen der freien Elektronenpaare an den Sauerstoffatomen des Tartrat-Restes und des Aldehyds entscheidend sind. Da bei einem Angriff auf die *Re*-Seite des Aldehyds repulsive Wechselwirkungen zwischen den Elektronenpaaren des Sauerstoffes auftreten, ist dieser nicht favorisiert. Bei einem Angriff auf die *Si*-Seite hingegen treten keine repulsiven Wechselwirkungen auf, wodurch dieser Übergangszustand favorisiert ist.



**Schema 18:** Synthese von Boronat **154**. a) Trimethylboronat, Et<sub>2</sub>O, -78 °C, 3 h, b) (L)-(+)-DIPT, Et<sub>2</sub>O, RT, 16 h, 36% über 2 Stufen.

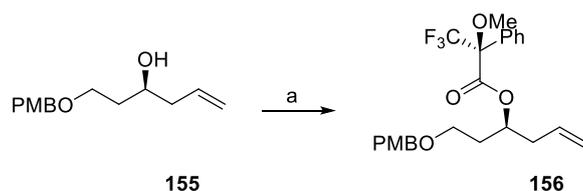
Um bei der Allylierung einen (*S*)-Alkohol zu generieren, wurde (L)-(+)-Diisopropyltartrat als chiraler Ligand am Boronat gewählt. Dieses wurde mit zuvor aus Allylmagnesiumbromid gewonnener Boronsäure **153** umgesetzt. Dabei konnte Boronat **154** nach Destillation in moderater Ausbeute erhalten werden (36% über 2 Stufen, Schema 18).<sup>92</sup>

<sup>92</sup> W. R. Roush, A. E. Walts L. K. Hoong *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 8186-8190.



**Schema 19:** Synthese von Alkohol **155**. a) Toluol, 4Å-MS, -90 °C, 20 h, 72%, 68% *ee*.

Die Allylierung wurde nach einer Vorschrift von ROUSH *et al.* durchgeführt, wobei das Allylierungsprodukt in guter Ausbeute erhalten wurde (72%, Schema 19).<sup>92</sup>



**Schema 20:** Synthese von MOSHER-Ester **156**; a) (*S*)-MTPA, Et<sub>3</sub>N, DMAP, 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, Toluol, 0 °C → RT, 16 h, 52%, *d.r.* 6.25:1.<sup>93</sup>

Um den Enantiomerenüberschuss zu bestimmen, wurde die MOSHER-Methode angewandt. Bei dieser wird das Enantiomergemisch in ein Diastereomergemisch zweier Ester überführt. Da Diastereomere durch <sup>1</sup>H-NMR-Analyse unterschieden werden können, kann auf das Enantiomerenverhältnis zurückgeschlossen werden. Dazu wurde Alkohol **155** unter YAMAGUCHI-Bedingungen mit (*S*)-MTPA ((*S*)-3,3,3-Trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropan-säure) umgesetzt (Schema 20). Die Reaktion verlief in guter Ausbeute und zeigte ein Diastereomerenverhältnis von 6.25:1. Dies entspricht einem Enantiomerenüberschuss von 68%. Um herauszufinden, ob das richtige Enantiomer gebildet wurde, wurde der Drehwert von Allylierungsprodukt **155** ( $[\alpha]_D^{25} = -2.6$ ) gemessen, der im Vorzeichen mit der literaturbekannten Verbindung ( $[\alpha]_D^{25} = -3.0$ ) übereinstimmt.<sup>93</sup>

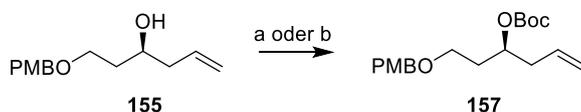
### 9.1.2 Halozyklisierung und Epoxidbildung

Für die Halozyklisierung wurde Alkohol **155** mit der Boc-Gruppe geschützt. Dazu wurde eine Vorschrift von MOHAPATRA *et al.* unter Verwendung von Triethylamin und 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) durchgeführt.<sup>94</sup> Carbonat **157** konnte nur in moderater

<sup>93</sup> M. Dieckmann, D. Menche *Org. Lett.* **2013**, *15*, 228-231.

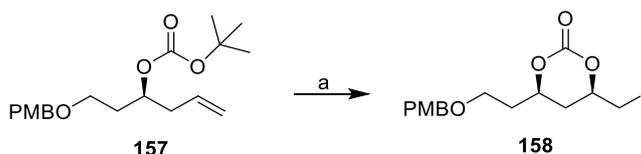
<sup>94</sup> D. K. Mohapatra, E. Bhimoreddy, P. S. Krishnarao, P. P. Das, J. S. Yadav *Org. Lett.*

Ausbeute (42%, Schema 21) erhalten werden, sodass alternative Reaktionsbedingungen unter Verwendung von NaHMDS gewählt wurden.<sup>95</sup> Hierbei konnte eine quantitative Ausbeute erhalten werden (Schema 21).



**Schema 21:** Synthese von **157**; a)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , RT, 4 h, 42%, b) NaHMDS, THF,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 min, dann  $\text{Boc}_2\text{O}$ , RT, 30 min, quant.<sup>94,95</sup>

Im nächsten Schritt der Synthese wurde eine Iodlaktonisierung von Allylcarbonat **157** durchgeführt. Dazu addiert Iod elektrophil an die terminale Doppelbindung und erzeugt ein Iodonium-Ion. Dieses wird intramolekular vom *tert*-Butylcarbonat angegriffen und geöffnet, wodurch Carbonat **158** entsteht. Die Stereoselektivität der Reaktion wird durch das bereits vorhandene Stereozentrum gesteuert. Als Iodquelle wurde zunächst *N*-Iodsuccinimid unter Reaktionsbedingungen nach MOHAPATRA *et al.* verwendet.<sup>94</sup> Hierbei trat ausschließlich eine Zersetzung von Carbonat **157** auf, sodass die Iodquelle geändert wurde. Bei Reaktionsbedingungen nach SMITH *et al.* unter Verwendung von IBr konnte das Produkt dargestellt werden.<sup>95</sup> Hierzu wurde entweder eine 1 M-Lösung von IBr in Dichlormethan selbst hergestellt oder von SIGMA ALDRICH bezogen. Da die Zersetzung von **158** bei der säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel auftrat, wurde Carbonat **158** direkt in die nachfolgenden Reaktionen eingesetzt.



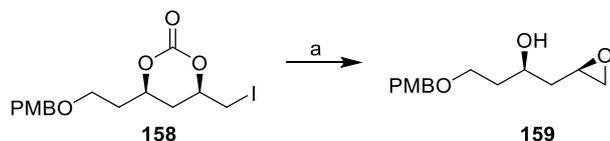
**Schema 22:** Synthese von Carbonat **158**; a) IBr, Toluol,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 h.<sup>94,95</sup>

Carbonat **158** wurde mit Kaliumcarbonat versetzt und Epoxid **159** in moderater Ausbeute erhalten (22% über 2 Stufen, Schema 23). Eine NMR-spektroskopische Analyse zeigte, dass

2011, 13, 744-747.

<sup>95</sup> A. B. Smith III, Q. Lin, V. A. Doughty, L. Zhuang, M. D. McBriar, J. K. Kerns, A. M. Boldi, N. Murase, W. H. Moser, C. S. Brook, C. S. Bennett, K. Nakayama, M. Sobukawa, R. E. Lee Trout Tetrahedron **2009**, 65, 6470-6488.

kein Diastereomer vorlag, wodurch bestätigt wurde, dass die zuvor durchgeführte Iodlaktonisierung stereoselektiv abgelaufen ist.

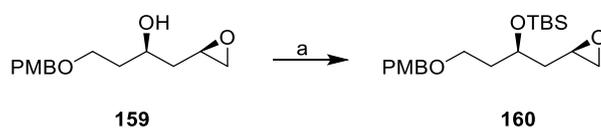


**Schema 23:** Synthese von Epoxid **159**; a)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, RT, 18 h, 22% über 2 Stufen.<sup>95</sup>

Die Strategie der Epoxidbildung gefolgt von der Epoxidöffnung wurde gewählt, damit die gebildeten Alkoholfunktionen durch unterschiedliche Schutzgruppen differenziert werden können.

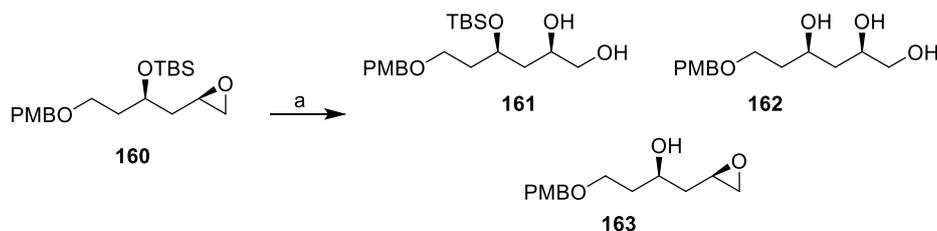
### 9.1.3 TBS-Schätzung und Epoxidöffnung

Nach der Epoxidierung wurde eine Schätzung der freien Alkoholgruppe durch eine TBS-Gruppe durchgeführt. In der Gegenwart von Silbernitrat zur Koordination des Epoxids konnte Verbindung **160** in guter Ausbeute (59%, Schema) erhalten werden.



**Schema 24:** Synthese von **160**; a)  $\text{AgNO}_3$ , Pyridin, TBSCl, THF, RT, 18 h, 59%.<sup>96</sup>

Im nächsten Schritt wurde die Epoxidöffnung von Verbindung **160** unter sauren oder basischen Reaktionsbedingungen durchgeführt und per analytischer HPLC-MS verfolgt. Die verschiedenen Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 1 dargestellt.

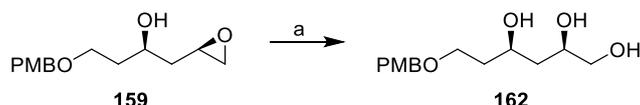


<sup>96</sup> K. D. Schleicher, T. F. Jamison *Beilst. J. Org. Chem.* **2013**, 9, 1533-1550.

**Tabelle 1:** Bedingungen der Epoxidöffnung.

	Säure/Base	Bedingungen	Erhaltene Produkte
1	HClO <sub>4</sub>	MeCN, H <sub>2</sub> O, 0 °C	<b>160</b>
2	HAc (konz.)	MeCN, H <sub>2</sub> O, RT	<b>160, 161, 162, 163</b>
3	NaOH (1M)	EtOH, 80 °C	<b>162</b>
4	NaOH (1M)	EtOH, RT	<b>160, 161, 162, 163</b>
5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , TEA	DMF, 80 °C	<b>160, 161, 162, 163</b>

Unter Verwendung von Perchlorsäure wurde ausschließlich Startmaterial zurückgewonnen (Eintrag 1, Tabelle 1).<sup>97</sup> Wurde Essigsäure beziehungsweise Kaliumcarbonat eingesetzt, wurde ein Produktgemisch aus Startmaterial, gewünschtem, silyliertem Produkt **161** sowie Triol **162** und TBS-entschütztem Epoxid **163** erhalten (Eintrag 2 und 5, Tabelle 1).<sup>98,99</sup> Unter Verwendung von Natronlauge bei 80 °C konnte das Epoxid geöffnet werden. Allerdings wurde die TBS-Schutzgruppe ebenfalls entfernt, wodurch Triol **162** mit quantitativem Umsatz erhalten wurde (Eintrag 3, Tabelle 1).<sup>100</sup> Des Weiteren wurde Verbindung **160** mit Natronlauge bei Raumtemperatur behandelt, um das Epoxid unter Bildung von Verbindung **161** zu öffnen. Allerdings konnte hierbei nur das Produktgemisch der Verbindungen **161-163** erhalten werden (Eintrag 4, Tabelle 1). Unter keiner der angewandten Reaktionsbedingungen konnte gewünschtes Produkt B in ausreichender Menge und Reinheit erhalten werden, sodass für die nachfolgende Synthese die Epoxidöffnung mit NaOH bei 80 °C direkt ausgehend von Epoxid **159** durchgeführt wurde. Triol **162** wurde als Rohprodukt in die nächsten Stufen eingesetzt (Schema 25).

**Schema 25:** Epoxidöffnung mit Natronlauge. a) NaOH (1 M), EtOH, 80 °C, 16 h, quant.<sup>100</sup>

<sup>97</sup> D. N. Kumar, C. R. Reddy, B. Das *Synthesis* **2011**, 3190-3194.

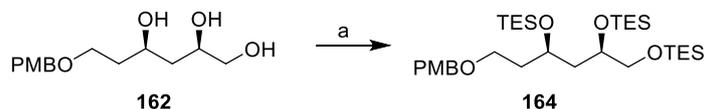
<sup>98</sup> P. Mituła, C. Wawrzeńczyk *Arkivoc* **2012**, (iv), 216-232.

<sup>99</sup> Y. Osa, Y. Hikima, Y. Sato, K. Takino, Y. Ida, S. Hirono, H. i Nagase *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5737-5740.

<sup>100</sup> S. Sangthong, K. Krusong, N. Ngamrojanavanich, T. Vilaivan, S. Puthong, S. Chandchawan, N. Muangsin *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4813-4818.

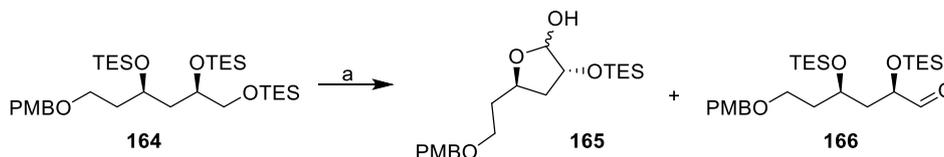
### 9.1.4 TES-Schützung und SWERN-Oxidation

Im nächsten Schritt sollte Polyol **162** mit Triethylsilyl-Gruppen dreifach geschützt werden. Die Verwendung von TES-Triflat in Kombination mit Lutidin führte zu keinem Produkt, sodass TES-Chlorid in Kombination mit DMAP und Imidazol eingesetzt wurde. Dies führte zu silyliertem Polyol **163** in moderater Ausbeute (35%, Schema 26).<sup>101,102</sup>



**Schema 26:** Reaktionsbedingungen für TES-geschütztes Polyol. a) TES-Cl, Imidazol, DMAP, DMF, RT, 16 h, 35%.

Silyliertes Polyol **164** wurde im Anschluss in einer SWERN-Oxidation eingesetzt, unter deren Bedingungen die primäre TES-Gruppe selektiv entschützt sowie der entstehende Alkohol zum Aldehyd oxidiert werden sollte. Die NMR-spektroskopische Analyse nach erfolgter Reaktion zeigte ein Produktgemisch bestehend aus Startmaterial **164**, Aldehyd **165** und Laktol **166**. Durch eine säulenchromatographische Reinigung konnten die drei Substanzen einzeln isoliert werden, wodurch Laktol **166** mit einer Ausbeute von 50% als Hauptprodukt der Reaktion erhalten wurde (Schema 27). Aldehyd **165** wurde als Nebenprodukt in 7% Ausbeute hergestellt.



**Schema 27:** Reaktionsbedingungen der SWERN-Oxidation von Polyol **164**. a) Oxalylchlorid, DMSO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, 1.5 h, 50% für **166**, 7% für **165**.

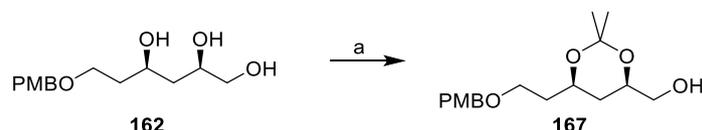
Der nächste Schritt der Synthese sollte eine JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung sein. Da in der Literatur kein Beispiel für eine Reaktion zwischen einem Hemiacetal und einem Sulfon beschrieben ist, wurde die Syntheseroute leicht umgestellt, um zu einem Aldehyd zu

<sup>101</sup> B. M. Trost, P. E. Harrington *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5028-5029.

<sup>102</sup> 1) T. J. Donohoe, M. D. Cheeseman, T. J. C. O’Riordan, J. A. Kershaw *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3896-3898; 2) W. T. Lambert, G. H. Hanson, F. Benayoud, S. D. Burke *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9382-9398.

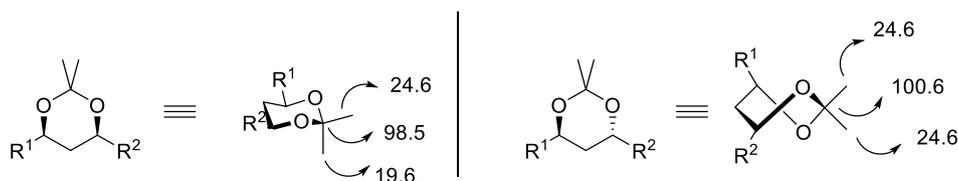
gelangen. Polyol **162** sollte nun in Acetonid **167** überführt werden. Die primäre Alkoholfunktion sollte im Anschluss selektiv zum Aldehyd oxidiert werden.

Polyol **162** wurde zunächst nach einer Vorschrift von GERBER-LEMAIRE *et al.* unter Verwendung von 2,2-Dimethoxypropan und einer katalytischen Menge CSA (Campher-sulfonsäure) in acetonidgeschütztes Polyol **167** überführt (52%, Schema 28).<sup>103</sup>



**Schema 28:** Synthese von acetonidgeschütztem Polyol **167**. a) 2,2-Dimethoxypropan, CSA (kat.), Aceton, 0 °C, 16 h, 52%.<sup>103</sup>

Acetonid **167** wurde im Anschluss für die Acetonid-Methode nach RYCHNOVSKY verwendet, mit der die relative Stereochemie des 1,3-Diols bestimmt werden kann.<sup>104</sup> Hierbei wird sich zu Nutze gemacht, dass diastereomere Diole in unterschiedlichen Konformationen vorliegen. *syn*-1,3-Diole nehmen die Sesselkonformation ein und *anti*-1,3-Diole die verdrehte Boot-Konformation (Abbildung 74).<sup>104</sup> Beide Konformationen weisen unterschiedliche Verschiebungen der Kohlenstoffatome der geminalen Methyl-Gruppen im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum auf, sodass anhand der Verschiebungen festgestellt werden kann, welches der möglichen 1,3-Diole vorliegt.

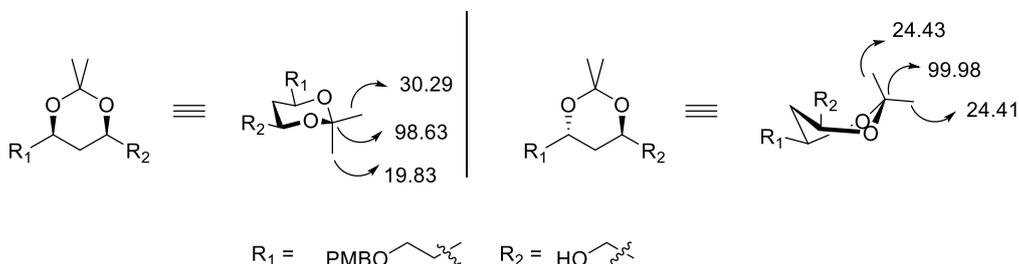


**Abbildung 74:** Charakteristische Konformation und die entsprechenden Verschiebungen im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von 1,3-Diolen.

<sup>103</sup> S. Gerber-Lemaire, A. T. Carmona, K. T. Meilert, P. Vogel *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 891-900.

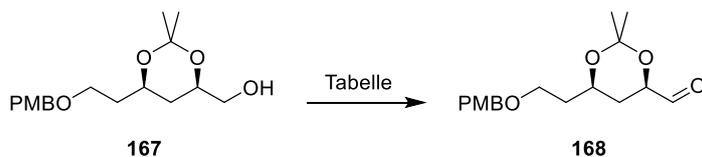
<sup>104</sup> 1) S. D. Rychnovsky, D. J. Skalitzky *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 945-948; 2) D. A. Evans, D. L. Rieger, J. R. Gage *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 7099-70100; 3) R. N. Kumar, H. M. Meshram *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 1003-1007.

Im vorliegenden Fall konnte durch die Acetonid-Methode nachgewiesen werden, dass überwiegend das gewünschte *syn*-1,3-Diol als Hauptdiastereomer vorliegt. Zusätzlich zeigt das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum auch Signale des *anti*-1,3-Diols in einer geringeren Intensität.



**Abbildung 75:** Auswertung der Konformation von Verbindung **167** anhand der Acetonid-Methode.

Im Anschluss an die Acetonid-Schätzung sollte primärer Alkohol **167** in Aldehyd **168** überführt werden. Hierzu wurden unterschiedliche Oxidationsmethoden getestet (Tabelle 2).



**Tabelle 2:** Reaktionsbedingungen der Oxidation zu Aldehyd **168**.

	Reagenzien	Bedingungen	Anmerkungen
1	DMP	30 min, RT	kein Umsatz, <b>167</b>
2	DMP	16 h, RT	kein Umsatz, <b>167</b>
3	Oxalylchlorid, DMSO	1.5 h, -78 °C	kein Umsatz, <b>167</b>
4	Oxalylchlorid, DMSO	1.5 h, RT	kein Umsatz, <b>167</b>
5	SO <sub>3</sub> xPyr, DMSO, Et <sub>3</sub> N	45 min, RT	<b>167</b> , <b>168</b> (25%)
6	SO <sub>3</sub> xPyr, DMSO, Et <sub>3</sub> N	72 h, RT	kein Umsatz, <b>167</b>
7	1. SO <sub>3</sub> xPyr, DMSO, Pyr 2. Alkohol, DiPEA, DMSO	4 h, RT	<b>167</b> , <b>168</b> (30%)
8	Tempo, KBr, NaClO	1 h, 0 °C	Zersetzung
9	TPAP, NMO, 4Å MS	30 min, 0 °C, 16 h, RT	kein Umsatz, <b>167</b>
10	PCC	16 h, RT	kein Umsatz, <b>167</b>

11 PCC, 4Å MS, NaOAc

1 h, RT

kein Umsatz, **167**

Die Einträge 1 bis 4 der Tabelle 2 zeigen, dass sowohl die DESS-MARTIN-<sup>105</sup> als auch die SWERN-Oxidation keinen Umsatz ergaben und nur das Startmaterial zurückgewonnen werden konnte. Durch die Durchführung einer PARIKH-DOERING-Oxidation unter Verwendung des Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplexes konnte nach einer Reaktionszeit von 45 min ein Produkt-Eduktgemisch erhalten werden (Eintrag 5, Tabelle 2).<sup>106</sup> Eine Verlängerung der Reaktionszeit ergab eine Verschlechterung des Umsatzes (Eintrag 6, Tabelle 2), sodass die Reaktion nach einer leicht modifizierten Vorschrift durchgeführt wurde, die eine leichte Verbesserung der Ausbeute ergab (Eintrag 7, Tabelle 2).<sup>107</sup> Nachdem die Oxidationsmethoden unter Verwendung der aktiven Schwefelspezies zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis führten, wurden weitere Reaktionsbedingungen angewendet. Eine Tempo-Oxidation von Alkohol **167** lieferte nur Zersetzung des Startmaterials (Eintrag 9, Tabelle 2),<sup>108</sup> wohingegen eine durchgeführte Pyridiniumchlorochromat (PCC)-Oxidation keinen Umsatz zeigte (Eintrag 10 und 11, Tabelle 2).<sup>109</sup> Auch eine LEY-Oxidation mit Tetrapropylammoniumper Ruthenat (TPAP) und *N*-Methyl-morpholin-*N*-oxid (NMO) ergab keinen Umsatz (Eintrag 8, Tabelle 2).<sup>110</sup>

<sup>105</sup> C. Bonini, L. Chiummiento, M. Pullez, G. Solladié, F. Colobert *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5015-5022.

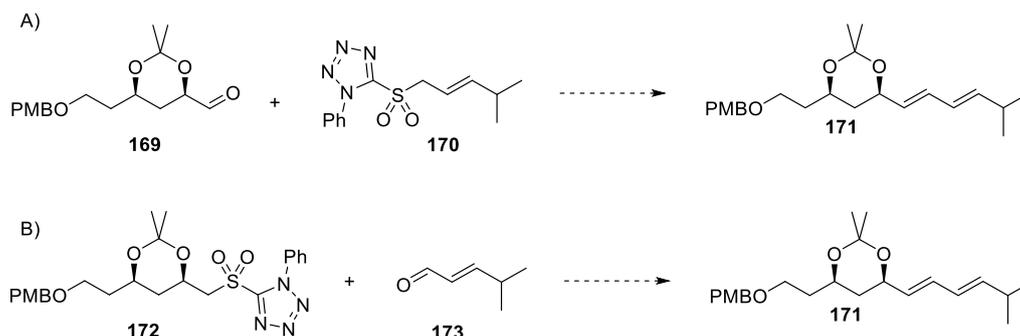
<sup>106</sup> K. C. Nicolaou, R. A. Daines, J. Uenishi, W. S. Li, D. P. Papahathis, T. K. Chakraborty *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4672-4685.

<sup>107</sup> *GLENMARK PHARMACEUTICALS LIMITED*, Patent: WO2008/59519 A2, **2008**;  
Location in patent: Page/Page column 12; 18; 23 ;

<sup>108</sup> A. M. Szpilman, D. M. Cereghetti, N. R. Wurtz, J. M. Manthorpe, E. M. Carreira *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 43335-43338.

<sup>109</sup> 1) M. Sato, S. Takeuchi, M. Ishibashi, J. Kobayashi *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4819-4826;  
2) J. Kobayashi, M. Yonezawa, S. Takeuchi, M. Ishibashi *Heterocycles* **1998**, *49*, 39-42.

<sup>110</sup> *WARNER-LAMBERT COMPANY LLC*; Patent: WO2005/56004 A1, **2005** ; Location in patent: Page/Page column 52; 145-146.

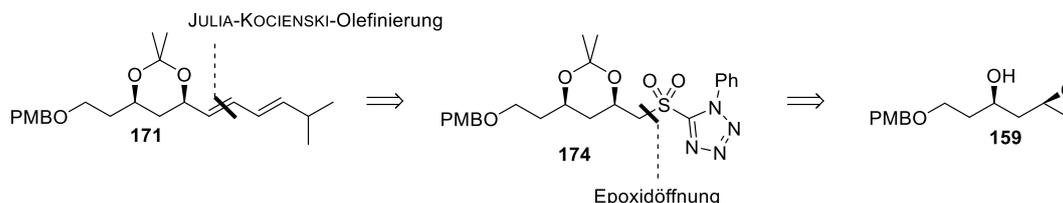


**Schema 29:** Alternative Vorläufer **169** und **172** für die JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung. Zwischen den Beispielen A und B wurden die Funktionalitäten des Aldehyds und des Sulfons getauscht.

An dieser Stelle der Synthese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Alternativen gesucht, um den für die JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung benötigten Vorläufer herzustellen. Im Folgenden sollten die Funktionalitäten in der JULIA-KOCIENSKI-Reaktion getauscht werden, wodurch anstelle des Aldehyds das Sulfon gebildet werden sollte (Schema 29). Zum einen wurde hierzu eine Epoxidöffnung (Abschnitt 9.1.5) und zum anderen eine Iodsubstitution (Abschnitt 9.1.6) angedacht.

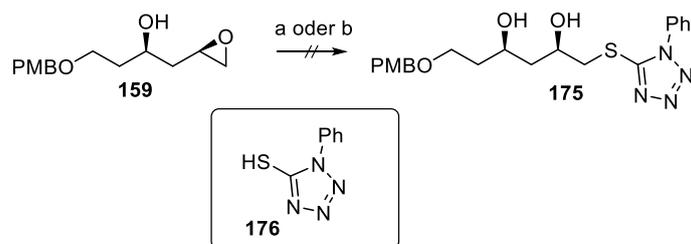
### 9.1.5 Epoxidöffnung

Der benötigte Vorläufer für die JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung sollte durch eine Epoxidöffnung an Substrat **159** mit 1-Phenyl-1*H*-tetrazol-5-thiol (PTSH) gefolgt von einer Acetonidschätzung hergestellt werden



**Schema 30:** Alternative Synthese des Ambruticin-Vorläufermoleküls.

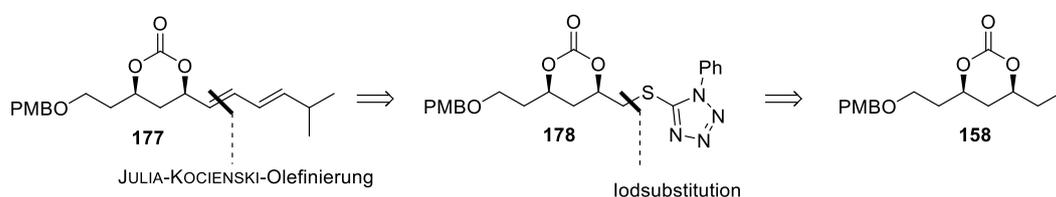
Zuvor synthetisiertes Epoxid **159** wurde mit PTSH **176** sowohl unter Verwendung einer Base als auch ohne Base umgesetzt. Eine massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Analyse der Reaktion zeigte ausschließlich die Zersetzung des Startmaterials beziehungsweise im Fall ohne Base keinen Umsatz (Schema 31).



**Schema 31:** Reaktionsbedingungen der Epoxidöffnung. a) NaH, **176**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 16 h; b) **176**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 16 h.

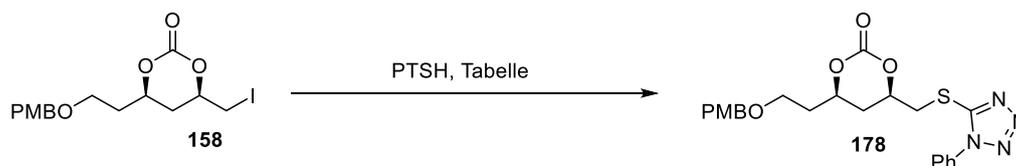
### 9.1.6 Iodsubstitution

Alternativ zum Ansatz der Epoxidöffnung mit PTSH sollte primäres Iodid **158** in das Sulfon **178** überführt werden (Schema 32).



**Schema 32:** Synthese des Ambruticin-Vorläufermoleküls.

Ausgehend von primärem Iodid **158** (Synthese Abschnitt 9.1.2) wurde eine nukleophile Substitution mit PTSH (**176**) unter basischen Bedingungen mit Triethylamin beziehungsweise Natriumhydrid durchgeführt (Eintrag 1 und 2, Tabelle 3). Nach gleichzeitiger Zugabe der Reagentien wurden die Reaktionen mittels Dünnschichtchromatographie (DC) verfolgt und zeigten schon nach kurzer Reaktionszeit eine Vielzahl von neuen Spots. Nach 16 Stunden konnten nur Zersetzungsprodukte sowie das PTSH mittels <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopischer Analyse detektiert werden. Da davon ausgegangen wurde, dass die Basen das Substrat zersetzen, wurde die Base mit PTSH vorbehandelt. Im Anschluss wurde primäres Iodid **158** langsam zugegeben (Eintrag 3 und 4, Tabelle 3). Allerdings konnten auch bei dieser Reaktionsdurchführung nur Zersetzungsprodukte detektiert werden. Unter Verwendung der Base Kaliumhydroxid (KOH) konnten ebenfalls nur Zersetzungsprodukte erhalten werden (Eintrag 5, Tabelle 3). Wurde die Reaktion ohne Base durchgeführt, konnte kein Umsatz der Startmaterialien detektiert werden (Eintrag 6, Tabelle 3).



**Tabelle 3:** Reaktionsbedingungen für die Iodsubstitution.

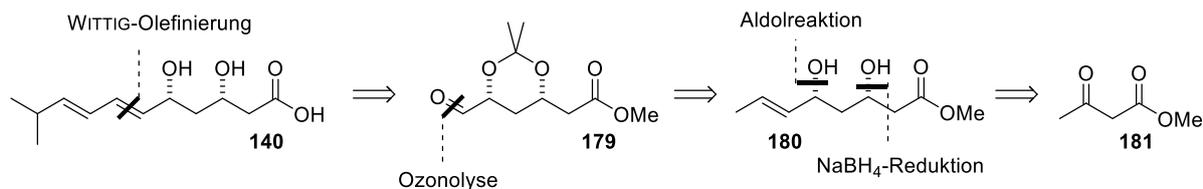
	Reagenzien	Bedingungen	Kommentar
1	Et <sub>3</sub> N, THF	16 h, RT	Zersetzung
2	NaH, THF	16 h, RT	Zersetzung
3	Et <sub>3</sub> N, THF	16 h, RT <sup>a</sup>	Zersetzung
4	NaH, THF	16 h, RT <sup>a</sup>	Zersetzung
5	KOH, EtOH	16 h, RT	Zersetzung
6	ohne Base	16 h, RT	kein Umsatz

a: Base in THF, 0 °C, PTSH in THF langsam dazu, 10 min bei 0 °C, dann Iodid in THF, 16 h bei RT

Nachdem die Iodsubstitution sowie die Epoxidöffnung nicht zum Vorläufersurrogat **140** der Epoxidase AmbJ der Ambruticin-Polyketidsynthese führten, wurde die Arbeit an der geplanten enantioselektiven Syntheseroute an dieser Stelle beendet und eine neue diastereoselektive Synthese durchgeführt.

## 9.2 Diastereoselektive Syntheseroute

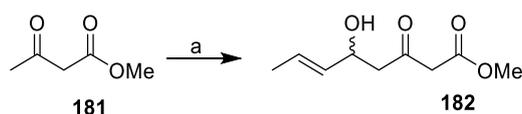
Ausgehend von Methylacetoacetat (**181**) sollte zunächst eine nicht stereoselektiv verlaufende Aldolreaktion durchgeführt werden, deren Produkt in Diol **180** überführt werden sollte. Dazu sollte Natriumborhydrid in Kombination mit Diethylmethoxyboran verwendet werden, das ausschließlich die enantiomeren *syn*-Dirole generieren sollte. Nach erfolgter Acetonidbildung und Ozonolyse sollte eine JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung als Schlüsselschritt zur Bildung von Dien **140** durchgeführt werden. Die Syntheseroute sollte durch eine Entschützungssequenz beendet werden. Produkt **140** wird durch diese Synthesestrategie als Enantiomerenpaar erhalten (Schema 33).



Schema 33: Geplante diastereoselektive Syntheseroute.

### 9.2.1 Aldolreaktion

Die Aldolreaktion wurde zwischen Methylacetoacetat (**181**) und Crotonaldehyd durchgeführt. Dazu mussten Reaktionsbedingungen gewählt werden, die eine Reaktion an der acideren  $\alpha$ -Position der Esterfunktion verhindern. In der Literatur ist die kombinierte Verwendung der beiden Basen Natriumhydrid und *n*-Butyllithium für diesen Typ von Aldolreaktionen beschrieben.



Schema 34: Synthese von Aldolprodukt **182**. a) i) NaH, THF, 0 °C, 30 min, ii) *n*BuLi, THF, 0 °C, 10 min, iii) Crotonaldehyd, 0°C, 10 min, 87%; oder a) i) NaH, THF, 0 °C, 30 min, ii) *n*BuLi, THF, -78 °C, 30 min, iii) Crotonaldehyd, THF, -78 °C, 4 h, 99%.

Zunächst wurde die Reaktion unter Verwendung von Natriumhydrid und *n*-Butyllithium nach einer Vorschrift von BLAKE *et al.* durchgeführt.<sup>111</sup> Dabei konnte kein Produkt detektiert werden, sodass die Reaktionsbedingungen geändert wurden. Eine Verkürzung der Reaktionszeit mit gleichzeitiger Erhöhung der Temperatur beziehungsweise eine Verlängerung der Reaktionszeit mit gleichzeitiger Erniedrigung der Temperatur ergaben das Aldolprodukt in sehr guten Ausbeuten (87% beziehungsweise 99%, Schema 34).

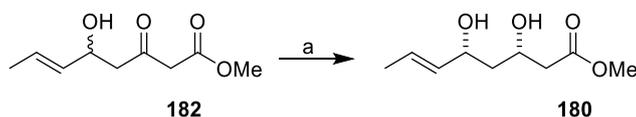
### 9.2.2 Natriumborhydridreduktion und Ozonolyse

Das Aldolprodukt sollte im nächsten Schritt in *syn*-Diol **180** überführt werden. Dazu wurde Natriumborhydrid mit der Lewis-Säure Diethylmethoxyboran verwendet, da durch diese

<sup>111</sup> P. A. Clarke, W. H. C. Martin, J. M. Hargreaves, C. Wilson, A. J. Blake *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 3551-3563.

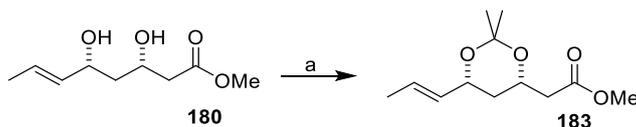
Reaktionsbedingungen selektiv *syn*-Diole generiert werden.<sup>137</sup> Für die entsprechenden *anti*-Diole würde Tetrabutylammoniumborhydrid eingesetzt werden.<sup>112</sup>

*syn*-Diol **180** konnte nach einer Vorschrift von COLOBERT *et al.* als Enantiomergemisch in quantitativer Ausbeute erhalten werden (Schema 35).<sup>113</sup>



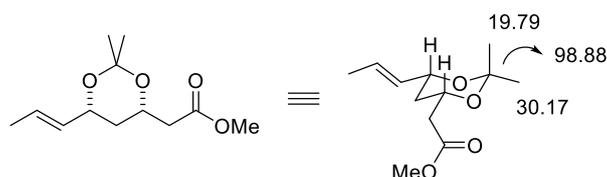
**Schema 35:** Synthese von *syn*-Diol **180**. a) NaBH<sub>4</sub>, Diethylmethoxyboran, THF/MeOH (4:1), -78 °C, 5 h, quant.

Im Anschluss an die Reduktion sollte Diol **180** als Acetonid geschützt werden. Hierfür wurde Camphersulfonsäure als Katalysator und 2,2-Dimethoxypropan eingesetzt. Acetonid **183** konnte in guter Ausbeute (58%, Schema 36) erhalten werden.



**Schema 36:** Synthese von Methyl ester **183**. a) CSA, 2,2-Dimethoxypropan, Aceton, RT, 16 h, 58%.<sup>103</sup>

Die RYCHNOVSKY-Acetonid-Methode (siehe Abschnitt 9.1.4) bestätigte, dass ein *syn*-1,3-Diol vorlag.<sup>104</sup> In Abbildung 76 sind die entsprechenden <sup>13</sup>C-NMR-Verschiebungen aufgeführt.

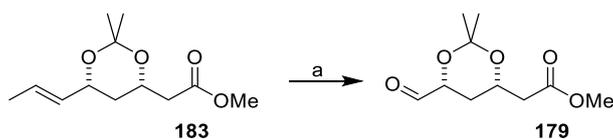


**Abbildung 76:** Acetonid-Methode von Methyl ester **183** mit den entsprechenden Verschiebungen (in ppm) des <sup>13</sup>C-NMR-Spektrums.

Das Acetonid-geschützte *syn*-1,3-Diol **183** wurde durch Ozonolyse mit quantitativem Umsatz in Aldehyd **179** überführt (Schema 37).

<sup>112</sup> A. Fettes, E. M. Carreira *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4098-4101.

<sup>113</sup> G. Solladié, L. Gressot, F. Colobert *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 357-362.



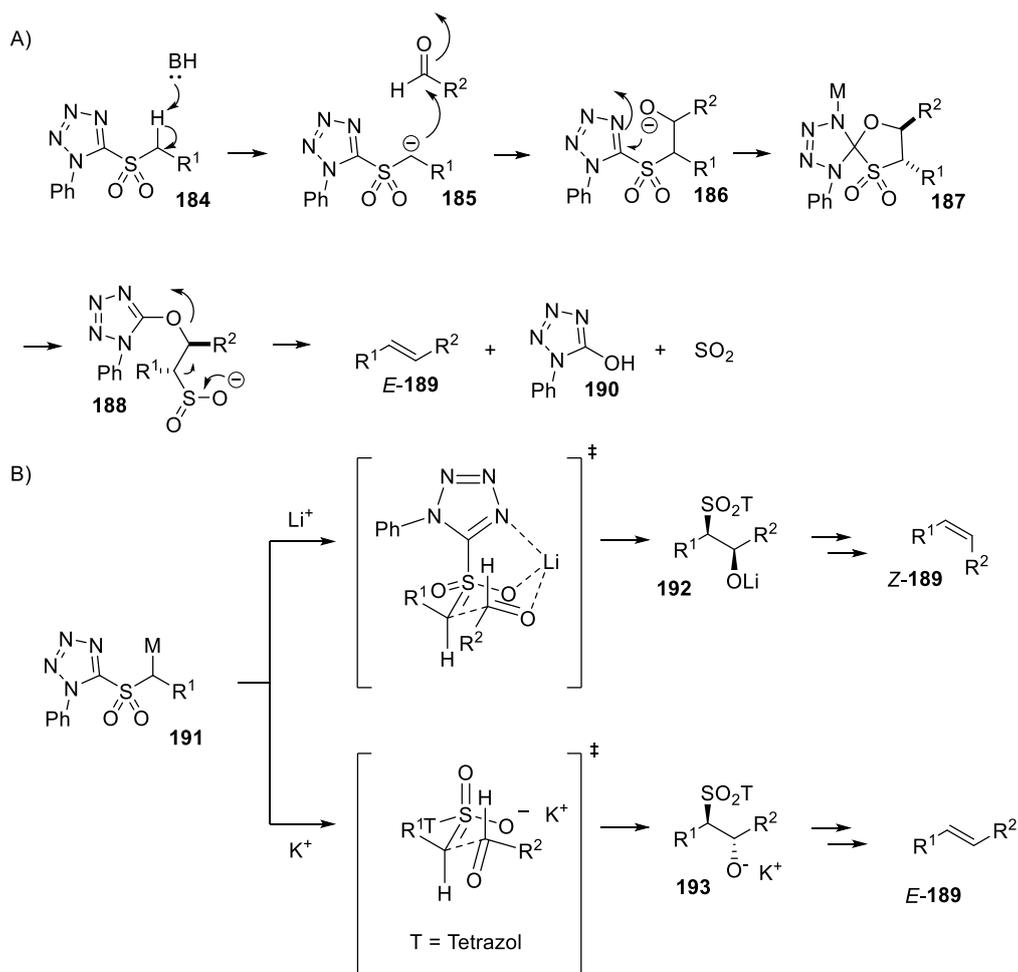
**Schema 37:** Synthese von Aldehyd **179**. a) Ozon, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, 20 min, quantitativ.

### 9.2.3 JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung

Der Schlüsselschritt der Syntheseroute sollte eine JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung sein. Dabei handelt es sich um eine Methode, bei der durch Reaktion von Aldehyden mit Sulfonen unter basischen Reaktionsbedingungen Alkene mit hoher *E*-Selektivität gebildet werden. In der vorliegenden Arbeit sollte die Olefinierung die Synthese verschiedener Derivate des Substrates ermöglichen, da unterschiedliche Reste durch das Sulfon in das Molekül eingebracht werden können.

Der Mechanismus der JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung beginnt mit der basenkatalysierten Deprotonierung des  $\alpha$ -Protons des Sulfons (Abbildung 77, A). Die generierte negative Ladung greift im Anschluss die Aldehydfunktion des Substrates an, wodurch Spiroverbindung **187** gebildet wird, die im Zuge einer SMILES-Umlagerung das *E*-konfigurierte Alken freisetzt. Der Mechanismus verläuft über einen Übergangszustand,<sup>114</sup> in dem das Gegenion der eingesetzten Base die *E/Z*-Selektivität der Olefinierung beeinflusst. Große Gegenionen (beispielsweise Kaliumionen) führen zu einem offenen Übergangszustand und somit zu einer *E*-Konfiguration, wohingegen kleine Gegenionen (beispielsweise Lithiumionen) zu einem chelatisierten Übergangszustand und damit zu einer *Z*-Konfiguration führen (siehe Abbildung 77, B).

<sup>114</sup> J. J. Li *Name Reactions*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2003,2006, S. 321 f.



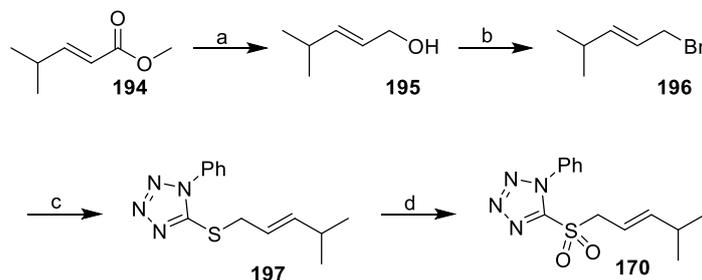
**Abbildung 77:** Mechanistische Einblicke in die JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung. A) Mechanismus der JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung. B) Mögliche Übergangszustände.<sup>115</sup>

Das für die JULIA-KOCIENSKI-Reaktion benötigte Sulfon **170** wurde ausgehend von kommerziell erhältlichem Methyl-(*E*)-4-methylpent-2-enoat (**194**) über vier Stufen hergestellt. Dazu wurde Methylester **194** zunächst in einer DiBAL-Reduktion zum korrespondierenden Alkohol **195** umgesetzt (82%, Schema 38).<sup>116</sup> Dieser wurde im Anschluss unter Verwendung von *N*-Bromsuccinimid (NBS) in Bromid **196** überführt (50%, Schema

<sup>115</sup> 1) J. B. Baudin, G. Hareau, S. A. Julia, O. Ruel *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1175-1178; 2) P. J. Kocienski, A. Bell, P. R. Blakemore *Synlett* **2000**, 365-366; 3) I. P. Sánchez, E. Tuross *Tetrahedron* **2009**, 20, 1646-1660; 4) P. R. Blakemore *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2002**, 2563-2585.

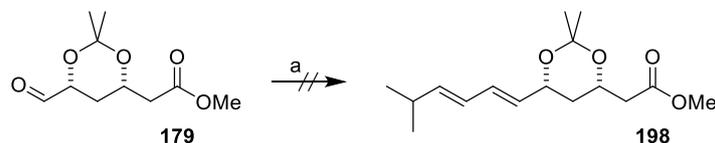
<sup>116</sup> E. Piers, G. L. Jung, E. H. Ruediger *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 670-682.

38), das zur Herstellung von Sulfid **197** benötigt wurde (65%, Schema 38). Mit Hilfe von *m*CPBA wurde **197** abschließend zum Sulfon **170** oxidiert (60%, Schema 38).<sup>117</sup>



**Schema 38:** Synthese von Sulfon **170**. a) DiBAL-H, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, 1 h, 82%, b) NBS, Me<sub>2</sub>S, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 2 h, RT, 2 h, 50%, c) i) NaH, DMF, 0 °C, ii) PTSH, DMF, 0 °C – RT, 10 min, ii) **196**, DMF, RT, 16 h, 65%, d) *m*CPBA, NaHCO<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 24 h, 60%.<sup>117</sup>

In der vorliegenden Arbeit sollte eine *E*-konfigurierte Doppelbindung ausgehend von Aldehyd **179** und Sulfon **170** hergestellt werden. Um die *E*-Selektivität der Reaktion zu beeinflussen wurden Kaliumhexamethyldisilazid (KHMDS) als Base und Tetrahydrofuran (THF) als polares Lösungsmittel gewählt. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde ein Olefinierungsprodukt erhalten. Allerdings zeigte die NMR-spektroskopische Analyse des Rohproduktes eine Vielzahl verschiedener Doppelbindungssignale, die die Bildung von Nebenprodukten nahelegen. Auch die zusätzliche Verwendung des Kronenethers 18-Krone-6, der das Kalium-Ion komplexieren sollte, um eine Reaktion der Sulfone untereinander auszuschließen, erbrachte keine Verbesserung des Umsatzes zum gewünschten Produkt. So waren weiterhin acht anstelle von vier Protonensignalen im olefinischen Bereich des NMR-Spektrums zu sehen. Säulenchromatographie an Silicagel sowie eine präparative HPLC ergaben ebenfalls keine signifikante Verbesserung der Reinheit, sodass an dieser Stelle beschlossen wurde eine andere Olefinierungsmethode durchzuführen.



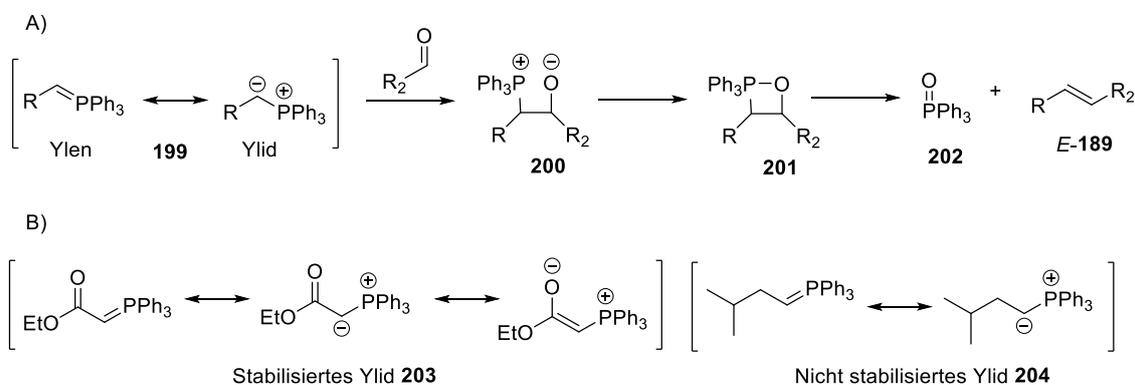
**Schema 39:** Geplante Synthese von JULIA-KOCIENSKI-Produkt **198**. a) Sulfon **170**, KHMDS, THF, -78 °C, 30 min, 0 °C, 1 h.

<sup>117</sup> J. P. Kennedy, C. W. Lindsley *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2493-2496.

### 9.2.4 WITTIG-Olefinierung

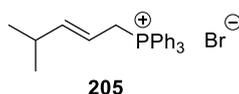
An Stelle der JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung sollte eine WITTIG-Olefinierung als Schlüsselschritt der Synthese des AmbJ-Vorläufersurrogates durchgeführt werden.

Eine WITTIG-Reaktion ist eine C-C-Verknüpfungsreaktion zwischen einer Carbonylverbindung (Aldehyd oder Keton) und einem Phosphorylid, bei der Olefine gebildet werden. Die Reaktion verläuft je nach Wahl der eingesetzten Phosphorylide diastereoselektiv zu einer *E*- oder *Z*-konfigurierten Doppelbindung. Hierbei ergeben resonanzstabilisierte Ylide vorwiegend eine *E*-Konfiguration und nicht stabilisierte Ylide vorwiegend eine *Z*-Konfiguration (siehe Abbildung 78). Der Mechanismus der Olefinierung verläuft über eine viergliedrige Zwischenstufe, das Oxaphosphetan **201** (Abbildung 78).



**Abbildung 78:** Informationen zur WITTIG-Olefinierung. A) Allgemeiner Mechanismus der WITTIG-Reaktion. B) Beispiele für stabilisierte und nicht stabilisierte Ylide.<sup>118</sup>

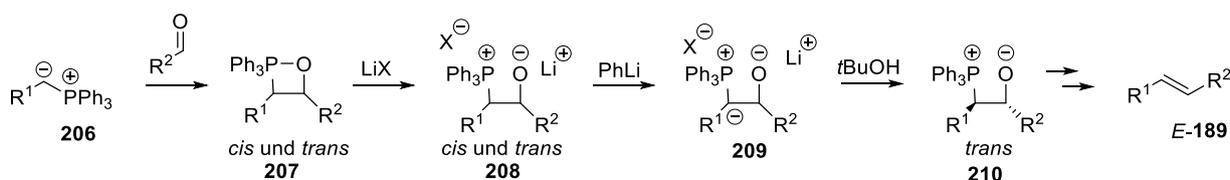
In der vorliegenden Arbeit sollte die WITTIG-Olefinierung zwischen Aldehyd **179** und dem Phosphoniumsalz **205** verwirklicht werden (Abbildung 79). Da eine *E*-konfigurierte Doppelbindung hergestellt werden sollte, wurde eine Variante der WITTIG-Reaktion, die SCHLOSSER-WITTIG-Olefinierung, durchgeführt.



**Abbildung 79:** Struktur des benötigten WITTIG-Salzes.

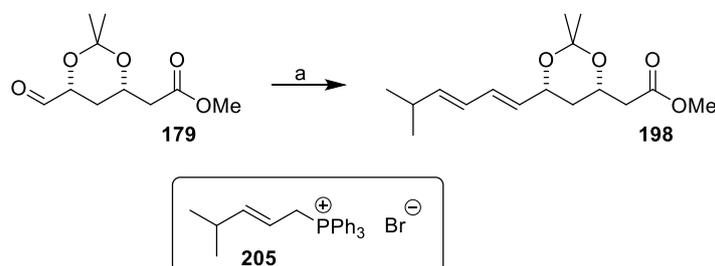
<sup>118</sup> G. Wittig, G. Geissler *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, 580, 44-57.

Bei der SCHLOSSER-Variante werden zusätzlich Lithiumsalze verwendet, durch die selektiv *E*-konfigurierte Olefine erzeugt werden können. Aus den zunächst gebildeten *cis*- und *trans*-Oxaphosphetanen **207** wird unter Verwendung von Phenyllithium das Carbanion **209** gebildet, das durch Protonierung selektiv zum *trans*-Addukt **210** überführt wird. Addukt **210** wird im Anschluss, wie in der konventionellen WITTIG-Reaktion (siehe Abbildung 78, A), zum *E*-konfigurierten Olefin prozessiert (Abbildung 80).



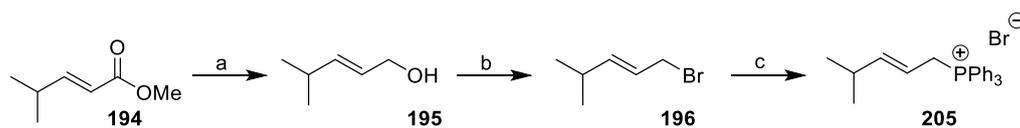
**Abbildung 80:** Mechanismus der SCHLOSSER-Modifikation der WITTIG-Reaktion.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Synthese von **198** SCHLOSSER-WITTIG-Bedingungen unter Verwendung von *n*BuLi gewählt, die ausschließlich die *E*-konfigurierte Doppelbindung lieferten. Das Olefinierungsprodukt **198** konnte in moderater Ausbeute (40%, Schema 40) erhalten werden.



**Schema 40:** Synthese von Olefinierungsprodukt **198**. a) *n*BuLi, **205**, THF, -78 °C – RT, 16 h, 40%.

Das verwendete Phosphoniumsalz **205** wurde zuvor ausgehend von kommerziell erhältlichem Methyl-(*E*)-4-methylpent-2-enoat (**194**) über drei Stufen synthetisiert. Dazu wurde zunächst eine DiBAL-Reduktion zu primärem Alkohol **195** durchgeführt, der in Bromid **196** überführt wurde. Das Phosphoniumsalz wurde durch die Reaktion von **196** mit Triphenylphosphin (PPh<sub>3</sub>) in guter Ausbeute erhalten (59%, Schema 41).

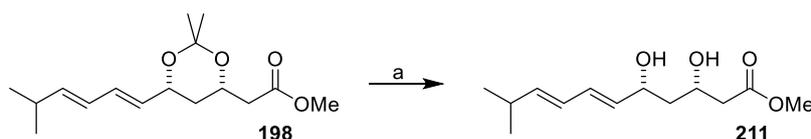


**Schema 41:** Synthese von WITTIG-Salz **205**. a) DiBAL-H, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, 1 h, 82%, b) NBS, Me<sub>2</sub>S, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 2 h, RT, 2 h, 50%, c) PPh<sub>3</sub>, Toluol, 100 °C, 16 h, 59%.

### 9.2.5 Schlussequenz der Synthese

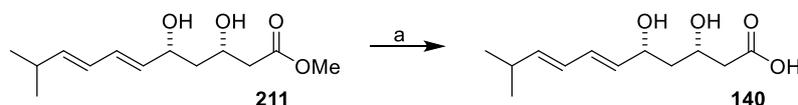
Den Abschluss der Syntheseroute sollte eine globale Entschützung darstellen. Hierzu sollte zunächst das Acetonid gespalten werden, um Diol **211** freizusetzen und im Anschluss sollte der Methyl ester verseift werden, um die freie Säure zu generieren. Bei dieser Reaktionsfolge musste auf saure Bedingungen verzichtet werden, da das Substrat säurekatalysiert ein sechsgliedriges Laktone bilden kann.

Das Acetonid wurde durch Pyridinium *p*-toluolsulfonat (PPTS) unter sehr milden Bedingungen gespalten, sodass Diol **211** mit quantitativem Umsatz erhalten wurde (Schema 42). Auf eine Reinigung auf dieser Stufe wurde ebenfalls auf Grund der befürchteten Laktonebildung verzichtet und das Rohprodukt direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.



**Schema 42:** Synthese von Diol **211**. a) PPTS, MeOH, RT, 16 h, 22% über zwei Stufen.

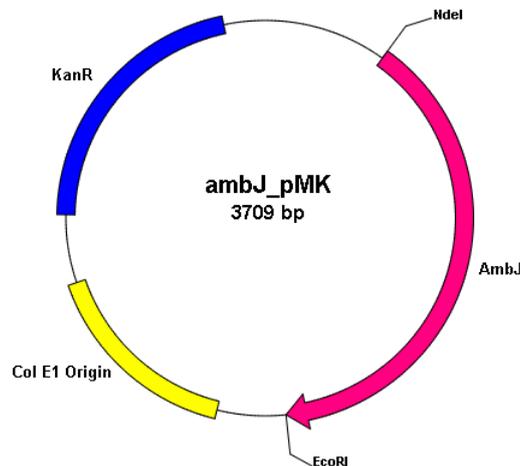
Im Anschluss wurde der Methyl ester durch Behandlung mit Natronlauge gespalten. Die Reaktion verlief mit vollständigem Umsatz. Allerdings erwies sich die Reinigung von Säure **140** auf Grund der Polarität der Verbindung sowie deren Säurelabilität, als problematisch und konnte nicht durch säulenchromatographische Reinigung an Silicagel realisiert werden. Durch semi-präparative Umkehrphasen-HPLC konnte Säure **140** in moderater Ausbeute isoliert werden (22% über zwei Stufen, Schema 43).



**Schema 43:** Synthese von Säure **140**. a) NaOH (1M), EtOH, RT, 22% über zwei Stufen.

### 9.3 Klonierung des Epoxidasegens *ambJ*

Die flavinabhängige Epoxidase AmbJ führt den Schlüsselschritt des biosynthetischen Endspiels der Ambruticin-Biosynthese durch, weshalb diese zunächst charakterisiert werden sollte. Ziel ist es, diese Epoxidase heterolog in *E. coli* zu produzieren und im Anschluss in Enzymaktivitätstests mit realistischen Vorläufersurrogaten einzusetzen.

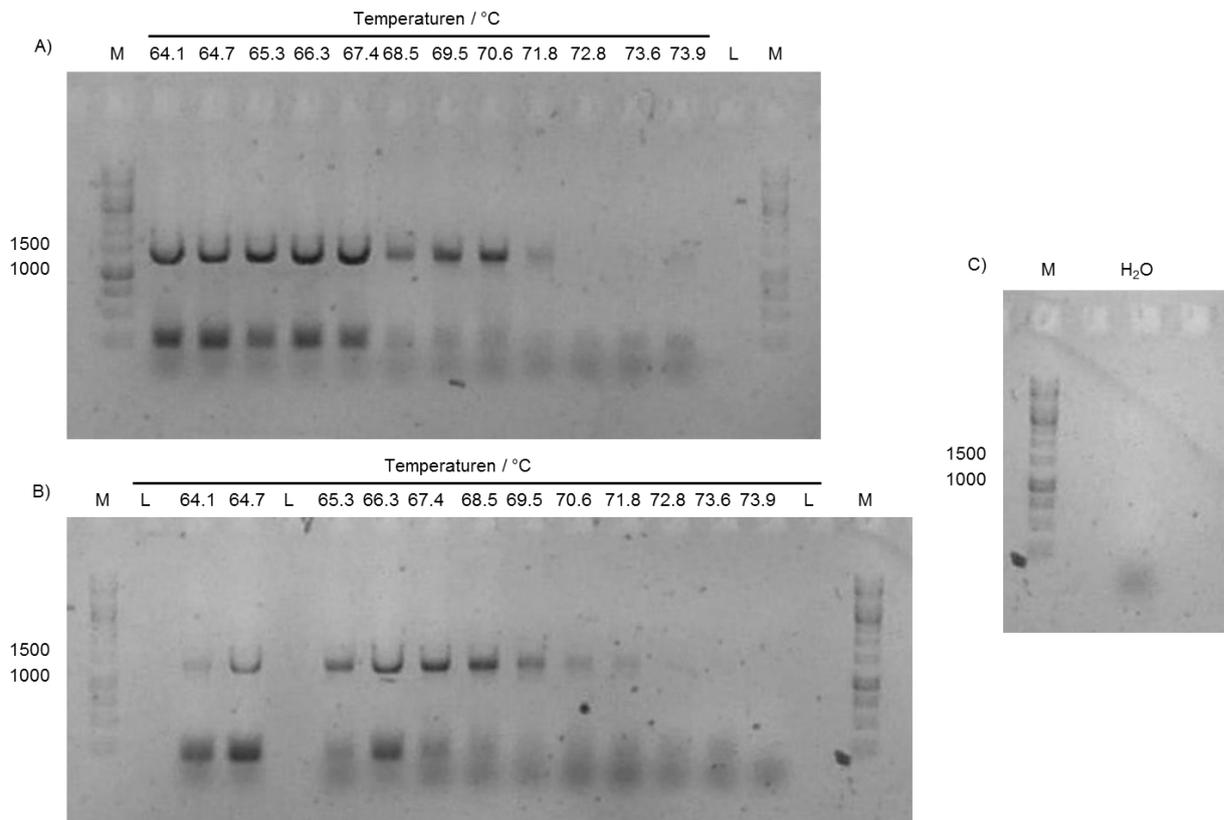


**Abbildung 81:** Vereinfachte Vektorkarte des synthetischen Gens *ambJ\_pMK*.

Zu diesem Zweck wurde das für eine Expression in *E. coli* sequenzoptimierte *ambJ* im Klonierungsvektor pMK von der Firma LIFE TECHNOLOGIES bezogen (Abbildung 81). Zunächst sollte dieses Gen in verschiedene Expressionsvektoren eingebracht werden. Zum einen sollten dafür die Vektoren pET28a(+)- und pCold-I verwendet werden. Hierfür wurden die Schnittstellen *EcoRI* (3'-Ende) und *NdeI* (5'-Ende) für das synthetische Gen *ambJ* gewählt, um N-terminal His<sub>6</sub>-getaggte Fusionsproteine produzieren zu können. Zum anderen sollten die Vektoren pET20b(+), pET32a(+), pGEX-4T-3 und pGEX-6P-1 verwendet werden, die His<sub>6</sub>-, Trx- oder GST-getaggte Fusionsproteine ermöglichen. Die benötigten Schnittstellen *XhoI* (3'-Ende) und *EcoRI* (5'-Ende) wurden mit Hilfe von entsprechenden Primern angepasst. Außerdem wurde für den pET20b(+)-Vektor ein Rückwärtsprimer ohne Stopcodon entwickelt, um das Gen mit und ohne C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag exprimieren zu können. Primerpaare wurden von der Firma SIGMA-ALDRICH bezogen (Die Primersequenzen sind in Kapitel 12.6 dargestellt).

Für die Vervielfältigung von *ambJ* wurden parallel mehrere PCR-Programme mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen im Bereich von 69 °C ±5 °C durchgeführt. Die anschließende Agarosegelelektrophorese zeigte, dass das gewünschte, 1.4 kbp lange

Amplifikat bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen gebildet wurde. Allerdings traten bei Temperaturen von 64 - 67 °C unspezifische DNA-Fragmente unter 1 kb auf. Dieses Phänomen kann beobachtet werden, wenn die Primer ein 'Self-Annealing' durchführen. Die besten Amplifizierungsergebnisse konnten ohne Stopcodon bei einer Annealing-Temperatur von 69.5 beziehungsweise 70.6 °C und im Falle des Rückwärtsprimers mit Stop-Codon bei 67.4 beziehungsweise 68.5 °C erzielt werden (Abbildung 82).



**Abbildung 82:** Gradienten-PCR von *ambJ* zur Einführung neuer Schnittstellen; A) *ambJ*\_ohne Stopcodon, B) *ambJ*\_mit Stopcodon, C) mitgeführte Wasserkontrolle, M: DNA-Größenstandard GeneRuler 1 kb DNA Ladder (FERMENTAS), L: leere Tasche. Größe von *ambJ*: 1431 bp.

Nachdem ein präparatives Agarosegel angefertigt wurde, wurde die DNA aus dem Gel extrahiert und gereinigt. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wiesen durch die Verwendung der Phusion Polymerase *glatte Enden* auf und wurden direkt in den Klonierungsvektor pJET1.2 ligiert. Dieser wurde als bereits geschnittener Vektor mit ebenfalls *glatten Enden* von der Firma THERMO SCIENTIFIC bezogen.

Der Ligationsansatz wurde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden chemisch kompetente *E. coli* Top10<sup>®</sup> Zellen direkt durch Zugabe des Ligationsansatzes transformiert. Der Transformationsansatz wurde im Anschluss unter Selektionsdruck auf LB-Medium

ausplattiert. Nach erfolgter Kultivierung wurde die Reinigung und Isolierung der Plasmid-DNA per alkalischer Lyse durchgeführt.

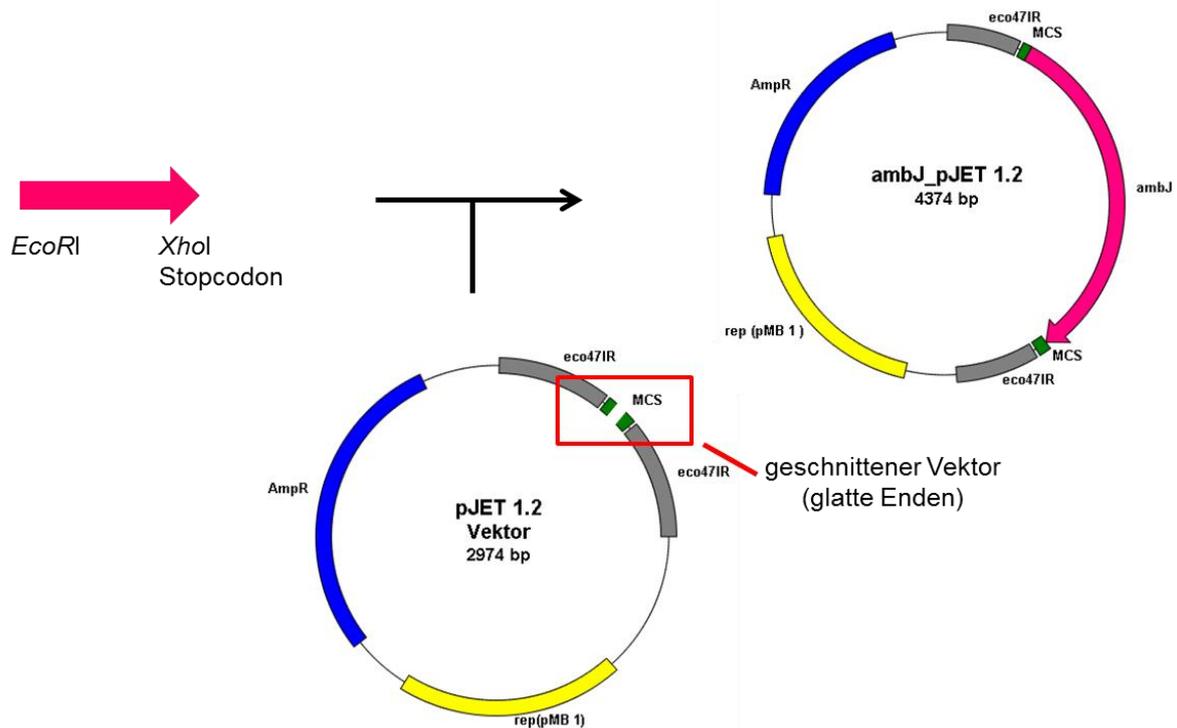


Abbildung 83: Strategie zur Ligation von *ambJ*.

Die im Anschluss durchgeführte Testrestriktion der pJET1.2-Konstrukte mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* zeigt nach erfolgter Agarose-Gelelektrophorese zwei Banden, deren Laufverhalten in Übereinstimmung mit einer Größe von 1431 bp für *ambJ* und 2974 bp für den pJET1.2-Vektor war (Abbildung 84).

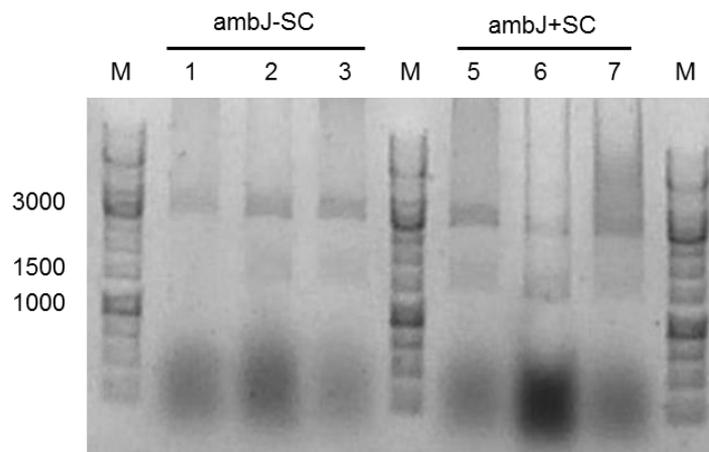


Abbildung 84: Testrestriktion der *ambJ\_pJET1.2*-Konstrukte, M: DNA-Größenstandard GeneRuler 1 kb DNA Ladder (FERMENTAS), SC: Stopcodon. Größe von *ambJ*: 1431 bp. Größe von pJET1.2: 2974 bp.

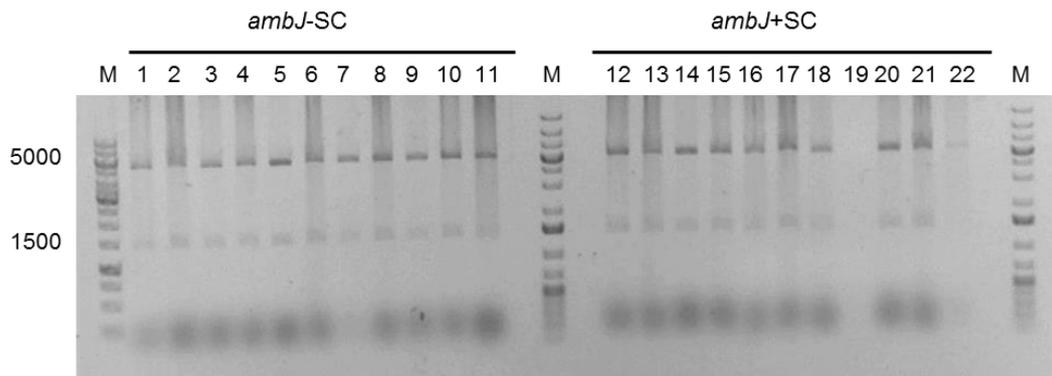
Die pJET1.2-Konstrukte sowie die Expressionsvektoren pET28a(+), pET20b(+), pET32a(+), pGEX-4T-3 und pGEX-6P-1 wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* verdaut. Des Weiteren wurden das synthetische Gen *ambJ* und der Kälteschock-Expressionsvektors pCold-I mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *EcoRI* verdaut. Die erhaltenen Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und DNA-Fragmente aus dem Gel extrahiert. Das Laufverhalten der entsprechenden Banden stimmte mit den zu erwartenden Größen von *ambJ* sowie des Expressionsvektors überein (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Größe der verwendeten Expressionsvektoren.

Vektorbezeichnung	Vektorgröße
pET28a(+)	5396 bp
pET20b(+)	3716 bp
pET32a(+)	3900 bp
pGEX-4T-3	4968 bp
pGEX-6P-1	4984 bp
pCold-I	4407 bp

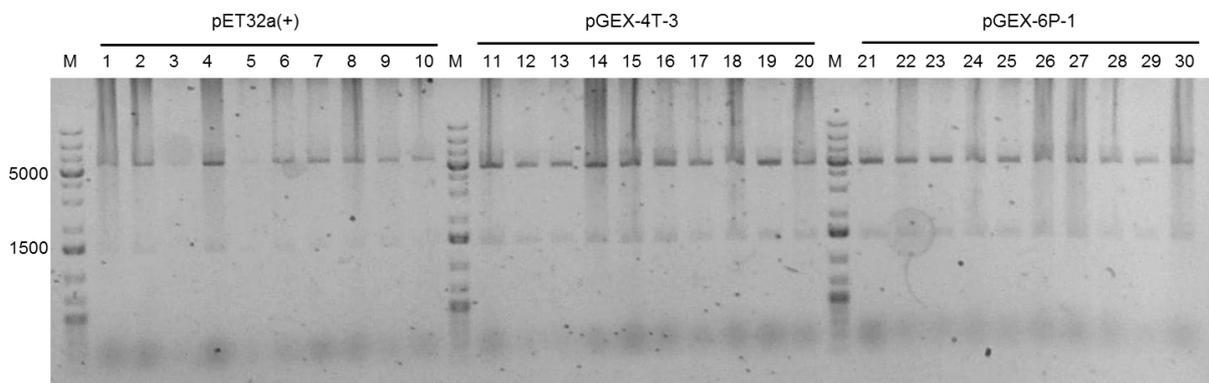
Nach der erfolgreichen Restriktion erfolgte die Ligation von *ambJ* mit dem linearisierten Expressionsvektoren pET28a(+), pET20b(+), pET32a(+), pGEX-4T-3, pGEX-6P-1 sowie pCold-I, gefolgt von der Transformation kompetenter *E. coli* TOP10<sup>®</sup>-Zellen mit dem Ligationsansatz. Nachdem der Transformationsansatz auf Kanamycin- beziehungsweise Carbenicilin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert wurde, wurden Flüssigkulturen inokuliert und über Nacht inkubiert. Aus diesen wurden die rekombinanten Plasmide mittels alkalischer Lyse isoliert und gereinigt. Um die Ligation zu überprüfen wurde ein Restriktionsverdau (Pipettierschema siehe Kapitel 12.8.4) mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XhoI* beziehungsweise *NdeI* und *EcoRI* durchgeführt und mit gelelektrophoretischer Auftrennung überprüft.

Abbildung 85 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsansätze der pET28a(+)-Konstrukte. Für die Ligation wurde *ambJ* sowohl mit als auch ohne Stopcodon verwendet, um Proteine mit einem und zwei His<sub>6</sub>-Tags zu erhalten. Anhand des Agarosegels ist erkennbar, dass für beide pET28a(+)-Konstrukte mehrere positive Klone erhalten wurden. Die Größe der Fragmente stimmt dabei mit den zu erwartenden Fragmenten von pET28a(+) (5396 bp) und *ambJ* (1431 bp) überein.



**Abbildung 85:** Testrestriktion der *ambJ*\_pET28a(+)-Konstrukte, M: DNA-Größenstandard GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (FERMENTAS). Größe von *ambJ*: 1431 bp, Größe von pET28a(+): 5396 bp.

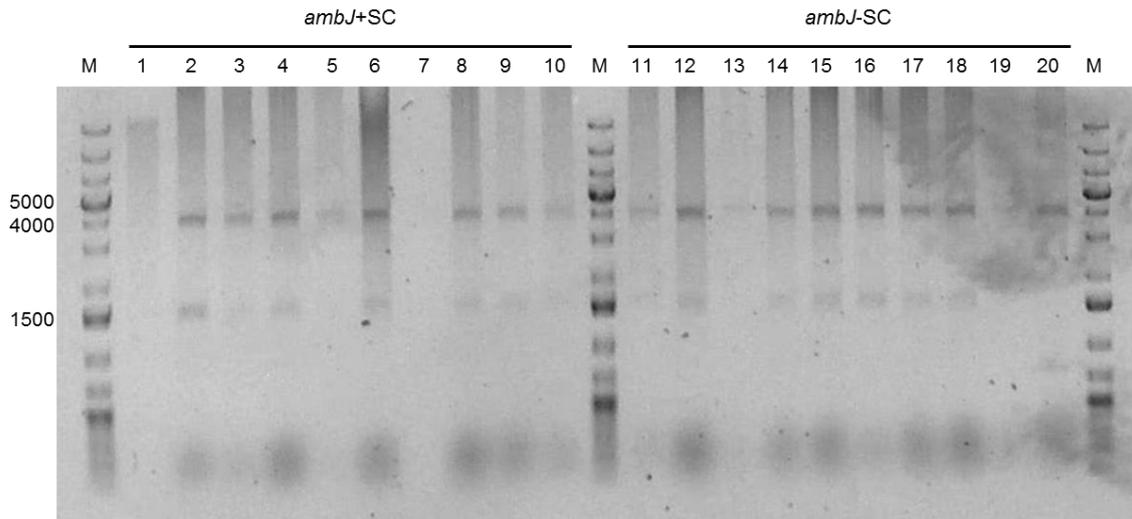
Die Ergebnisse des Restriktionsverdaus der pET32a(+)-, pGEX-4T-3- sowie pGEX-6P-1-Konstrukte sind in Abbildung 86 dargestellt. Für die Ligation wurde *ambJ* mit Stopcodon mit dem jeweiligen Vektor über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anhand der Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese konnten positive Klone für jedes Konstrukt ermittelt werden. Die Größe der Fragmente stimmt dabei mit den zu erwartenden Fragmenten von pET32a(+) (5900 bp), pGEX-4T-3 (4968 bp), pGEX-6P-1 (4984 bp) und *ambJ* (1431 bp) überein.



**Abbildung 86:** Testrestriktion der *ambJ*-Konstrukte, M: DNA-Größenstandard GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (FERMENTAS). Größe der Vektoren und Gene: pET32a(+) (5900 bp), pGEX-4T-3 (4968 bp), pGEX-6P-1 (4984 bp), *ambJ* (1431 bp).

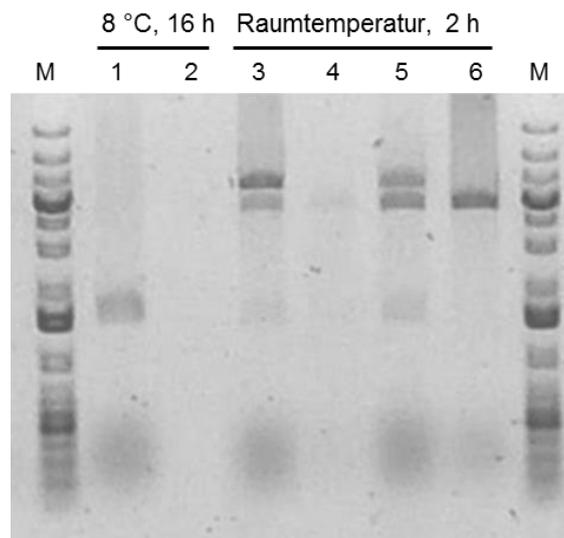
Der pET20b(+)-Vektor wurde sowohl mit *ambJ* mit Stopcodon als auch mit *ambJ* ohne Stopcodon ligiert, um Proteine mit beziehungsweise ohne Affinitäts-Tag zu erhalten. Die Ergebnisse des Restriktionsverdaus sind in Abbildung 87 dargestellt. Für beide pET20b(+)-

Konstrukte wurden positive Klone erhalten. Die Größe der Fragmente stimmt dabei mit den zu erwartenden Fragmenten von pET20b(+) (3716 bp) und *ambJ* (1431 bp) überein.



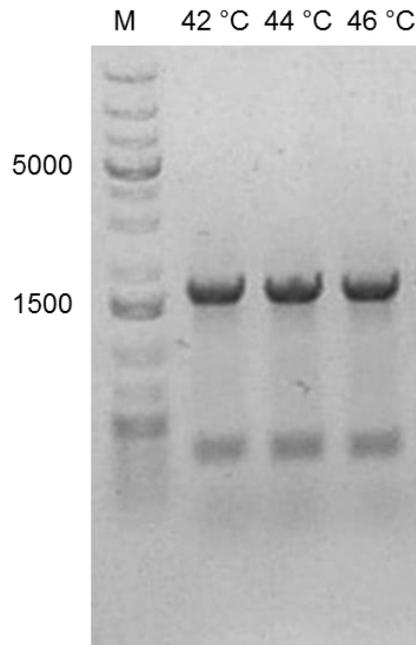
**Abbildung 87:** Testrestriktion der *ambJ*\_pET20b(+)-Konstrukte, M: DNA-Größenstandard GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (FERMENTAS). Größe von *ambJ*: 1431 bp. Größe von pET20b(+): 3716 bp.

Die Ligation von *ambJ* in den Kälteschockexpressionsvektor pCold-I wurde auf zwei verschiedene Weisen durchgeführt. Zum einen bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von zwei Stunden und zum anderen bei 8 °C über Nacht. Die Ligation über Nacht ergab keine positiven Klone. Abbildung 88 zeigt, dass die Ligation bei Raumtemperatur zwei positive Klone lieferte. Die Größe der Fragmente stimmt dabei mit den zu erwartenden Fragmenten von pCold-I (4407 bp) und *ambJ* (1431 bp) überein.



**Abbildung 88:** Testrestriktion der *ambJ*\_pCold-I-Konstrukte, M: DNA-Größenstandard GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (FERMENTAS). Größe von *ambJ*: 1431 bp. Größe von pCold-I: 4407 bp.

Zur weiteren Überprüfung der positiven Klone des *ambJ*\_pCold-I-Konstruktes wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden Primer gewählt, die sequenzspezifisch an den pCold-I-Vektor binden. Die Sequenzen der von SIGMA ALDRICH bezogenen Primer sind in Abschnitt 12.6 dargestellt.



**Abbildung 89:** Kolonie-PCR der *ambJ*\_pCold-I-Konstrukte, M: DNA-Größenstandard GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (FERMENTAS).

Für die Kolonie-PCR wurde ein PCR-Programm verwendet, in dem unterschiedliche Annealing-Temperaturen von  $44\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  getestet wurden. Die anschließende Agarose-gelelektrophorese zeigte, dass das gewünschte Amplifikat von etwa 1.5 kb bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen gebildet wurde (Abbildung 89). Die Kolonie-PCR bestätigte somit, dass das Konstrukt *ambJ*\_pCold-I erfolgreich erhalten wurde.

Die erfolgreiche Insertion von *ambJ* in die Vektoren pET28a(+), pET20b(+), pET32a(+), pGEX-4T-3, pGEX-6P-1 und pCold-I wurde durch Sequenzierung bestätigt (Abbildung 90).

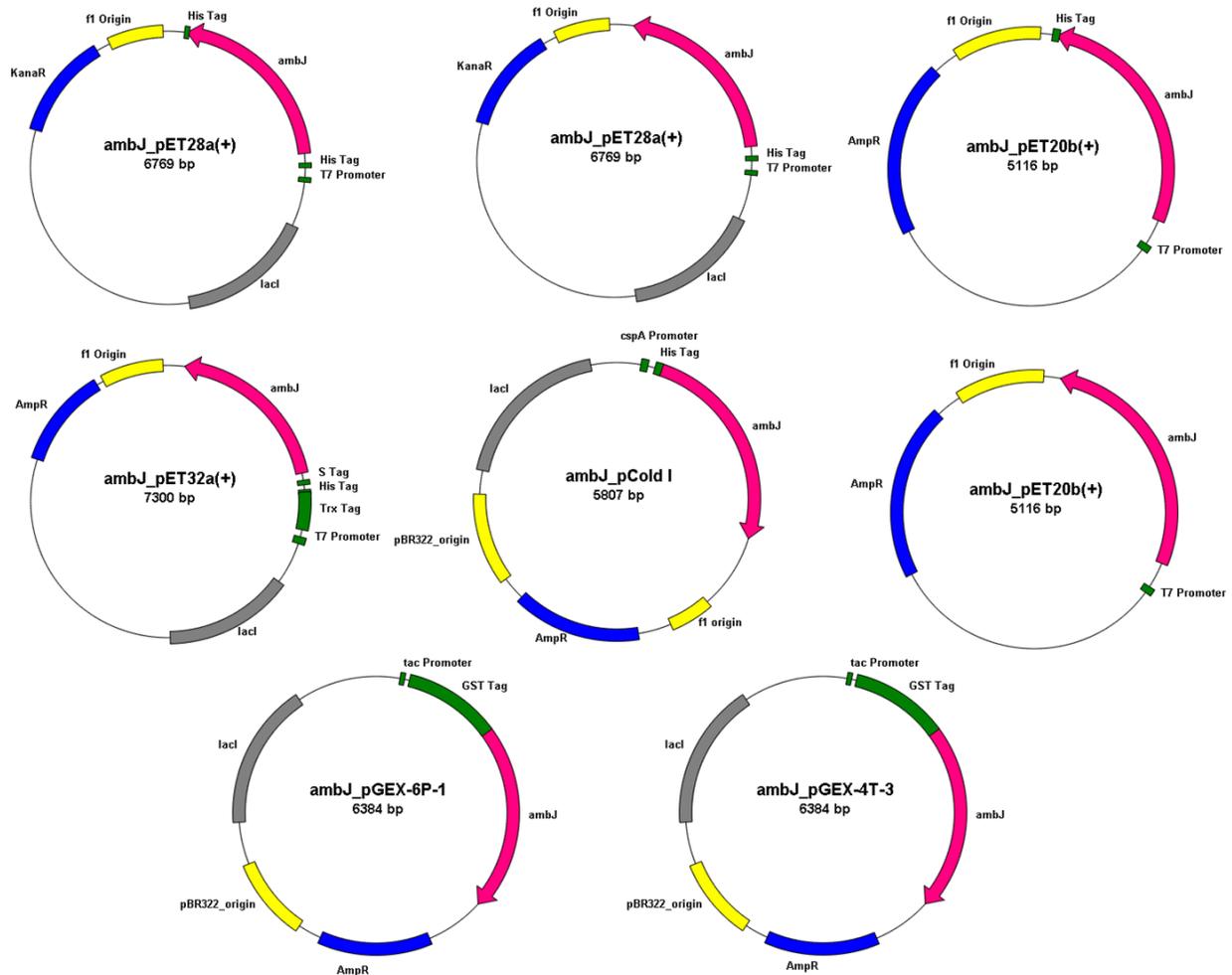


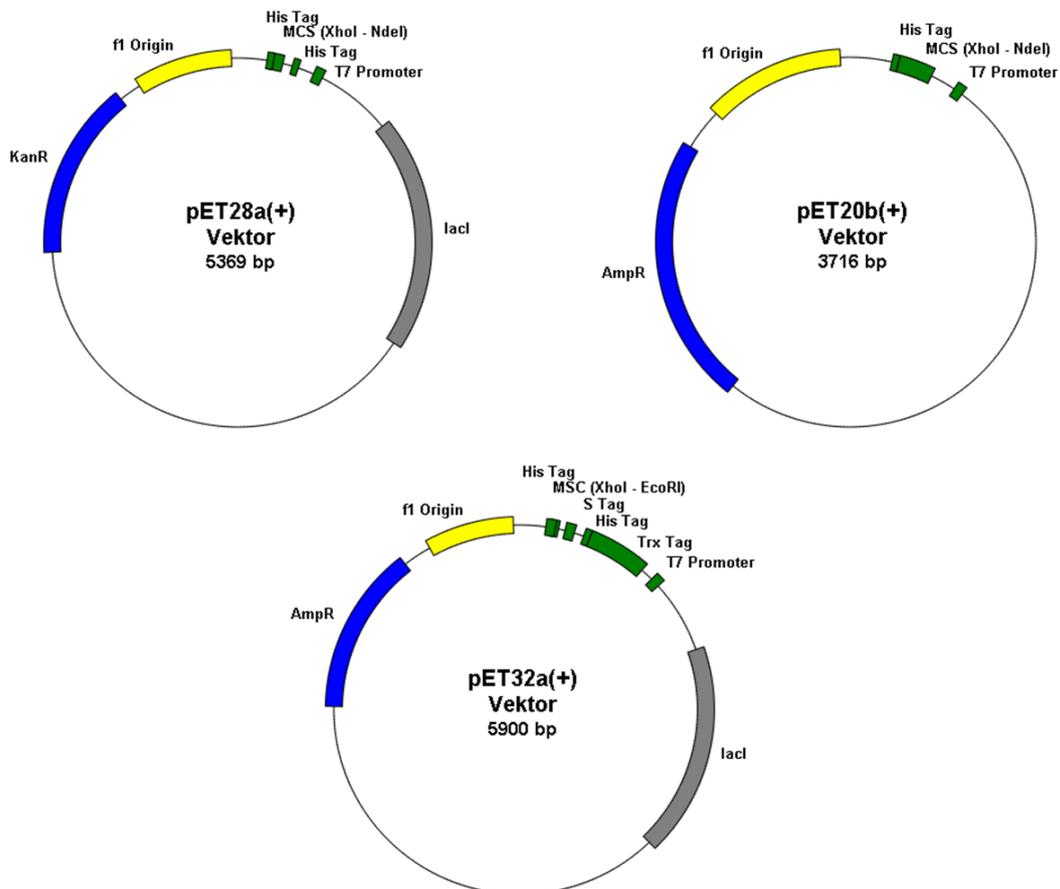
Abbildung 90: Hergestellt Expressionskonstrukte von *ambJ* in unterschiedlichen Vektorsystemen.

## 9.4 Expression des Epoxidasegens *ambJ*

Für die Expressionsoptimierung des Epoxidasegens *ambJ* wurden verschiedene Expressionskonstrukte direkt verglichen. Die Vektoren unterscheiden sich vor allem in der Art der Affinitäts-Tags in den resultierenden Fusionsproteinen und in der Natur des Promotors.

Mit pET-Vektoren (Abbildung 91) transformierte Zellen des Stammes *E. coli* BL21(DE3) stellen die erste Gruppe der verwendeten Expressionssysteme dar. Die mit diesen rekombinant hergestellten Fusionsproteine weisen Hexahistidin (His<sub>6</sub>)-Tags am N-Terminus auf. Mit einer Größe von 0.8 kDa handelt es sich dabei um einen der kleinsten Tags, der die Aktivität von Proteinen häufig nicht wesentlich beeinflusst und daher nach erfolgter Reinigung meist nicht abgespalten werden muss. Proteine, die einen His<sub>6</sub>-Tag aufweisen,

können mittels immobilisierter Metall-Ionen-Affinitätschromatographie (IMAC) an Nickel-Cobalt- oder Kupfer-Nitrilotriessigsäure-Säulenmaterial gereinigt werden.



**Abbildung 91:** Vereinfachte Vektorkarten der pET-Vektoren.

Der pET28a(+)-Vektor bietet die Möglichkeit zur Fusion sowohl eines N- als auch eines C-terminalen Affinitäts-Tags. Durch die Verwendung von *ambJ* mit Stopcodon beziehungsweise von *ambJ* ohne Stopcodon werden zwei unterschiedliche Fusionsproteine erhalten. Das eine trägt einen Affinitäts-Tag lediglich am N-terminalen Ende und das andere trägt diese an beiden möglichen Enden.

Der pET20b(+)-Vektor ermöglicht die Einbringung eines C-terminalen His<sub>6</sub>-Tags an das Zielprotein. Je nachdem, ob das Stopcodon am 3'-Ende mit inkliniert wurde, kann dieser Tag entweder mitexprimiert oder das Protein komplett ohne Tag erhalten werden. In letzterem Fall ist keine Reinigung per Affinitätschromatographie möglich. Alternativ kann hier auf andere Methoden wie die Größenausschlusschromatographie zurückgegriffen werden.

Der pET32a(+)-Vektor ermöglicht sowohl die Fusion eines C- beziehungsweise N-terminalen His<sub>6</sub>-Tags als auch N-terminaler Thioredoxin (Trx)- und S-Protein (S)-Tags. In der vorliegenden Arbeit wird auf Grund des eingebrachten Stopcodons am 3'-Ende der C-terminale His<sub>6</sub>-Tag nicht mit exprimiert.

Bei einem Trx-Tag handelt es sich um einen 12 kDa großen Löslichkeits-Tag. Thioredoxin selbst ist ein kleines Protein, das sehr gut löslich ist und sich bevorzugt an cytoplasmatische Zelladhäsionsbereiche anlagert, wodurch es fusionierte Proteine durch ein einfaches „Einfrieren-Auftauen“-Protokoll in die lösliche Form bringt.<sup>119</sup> Der S-Tag ist ein Affinitäts-Tag, bei dem sich die starke Bindung zwischen dem N-terminalen S-Peptid (15 Aminosäuren) und dem S-Protein der RNase A zu Nutze gemacht wird. Die beiden Tags müssen nach erfolgter Reinigung durch die Verwendung spezifischer Proteasen abgespalten werden.

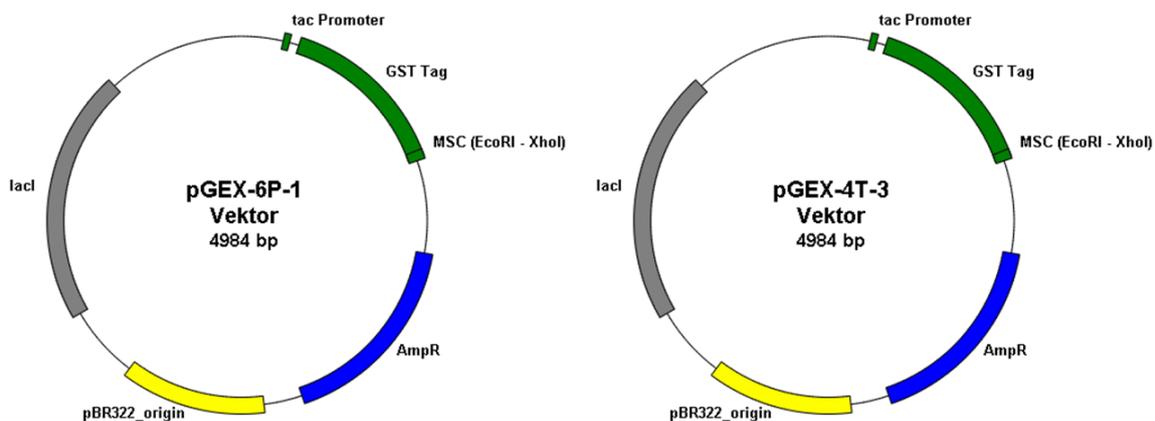
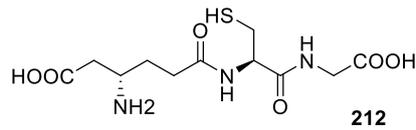


Abbildung 92: Vereinfachte Vektorkarten der pGEX-Vektoren.

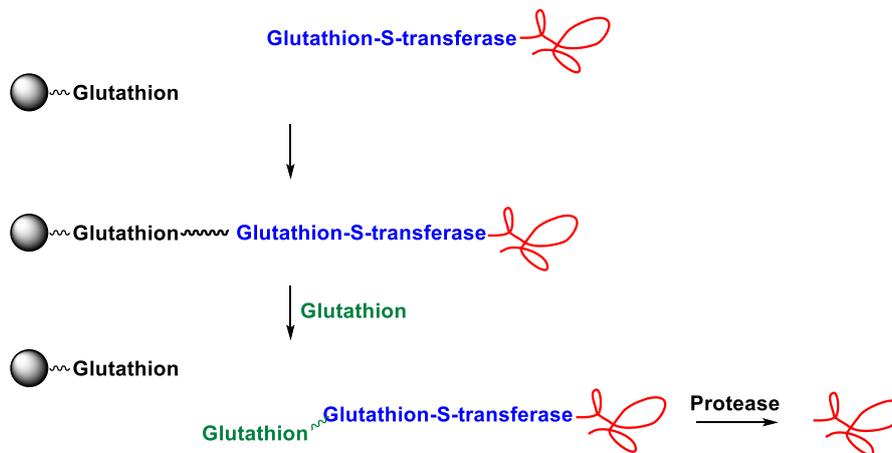
Die zweite verwendete Gruppe an Expressionssystemen sind die pGEX-Vektoren, die die Fusion eines Glutathion-S-transferase (GST)-Tags ermöglichen (Abbildung 92). Dieser bindet an Glutathion und erfüllt ebenfalls die Rolle eines Löslichkeits-Tags. Mit einer Größe von 26 kDa ist dieser Tag einer der Größten und muss nach erfolgter Reinigung durch Proteasen vom Zielprotein abgespalten werden. Die Reinigung der Proteine wird durch eine Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion durchgeführt (Abbildung 93, Abbildung 94).

<sup>119</sup> A. Malhotra *Methods Enzymol.* **2009**, 463, 239-258.



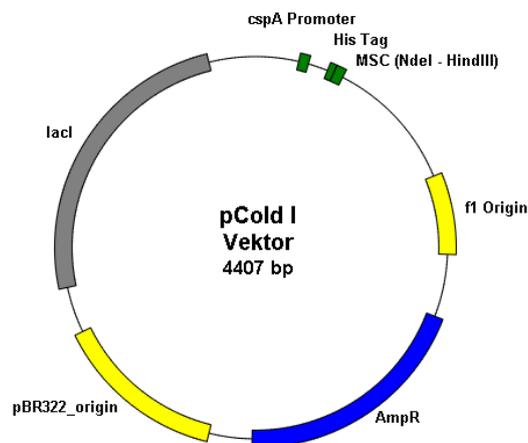
**Abbildung 93:** Struktur von Glutathion (212).

Der Unterschied zwischen dem pGEX-6P-1- und dem pGEX-4T-3-Vektor besteht ausschließlich in der Natur der verwendeten Proteaseschnittstelle. Bei dem pGEX-6P-1-Vektor ist eine N-terminal Schnittstelle für die PreScission-Protease und bei dem pGEX-4T-3-Vektor eine Proteaseschnittstelle für Thrombin vorhanden.



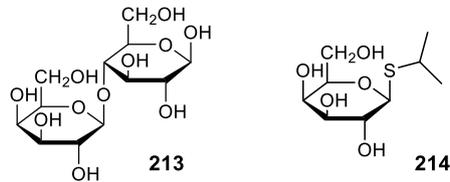
**Abbildung 94:** Prinzip der Affinitätschromatographie unter Verwendung eines GST-Tags.

Die dritte verwendete Vektorklasse ist pCold-I, bei dem es sich um einen Kälteschockexpressionsvektor handelt. Zur Reinigung kann der N-terminale His<sub>6</sub>-Tag verwendet werden (Abbildung 95).



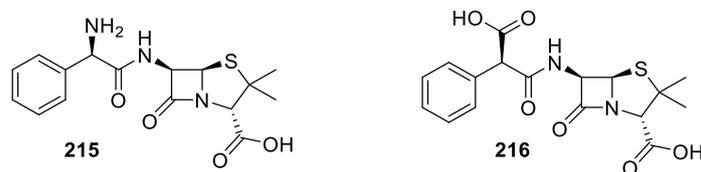
**Abbildung 95:** Vereinfachte Vektorkarte des pCold I-Kälteschockvektors.

Bei allen verwendeten Expressionsvektoren wird Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (**214**, IPTG) zur Induktion der Expression verwendet. IPTG ist ein Laktoseanalogon (Abbildung 96), das nicht abgebaut werden kann und den *lac*-Promoter dauerhaft aktiviert. Im Fall des pCold-I-Vektors wird zusätzlich der *cspA*-Promoter durch einen Kälteschock bei 4 °C induziert.



**Abbildung 96:** Struktur von Laktose (**213**) und seinem Analogon Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (**214**, IPTG).

Die Expressionsvektoren pET20b(+), pET32a(+), pGEX-4T-3, pGEX-6P-1 und pCold-I weisen eine Ampicillin-Resistenz auf. Ampicillin (**215**) ist ein Antibiotikum, das eine Licht- und Temperaturinstabilität aufweist, sodass für die biologischen Arbeiten oft das Struktur-analogon Carbenicillin (**216**, Abbildung 97) bevorzugt wird. Der pET28a(+)-Vektor hat eine Kanamycin-Resistenz. Allgemein werden Antibiotikaresistenzen als Selektionsmarker verwendet.



**Abbildung 97:** Struktur von Ampicillin (**215**) und seinem Struktur-analogon Carbenicillin (**216**).

Die Expression der Epoxidase soll in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen durchgeführt werden. Hierbei handelt es sich um einen modifizierten *E. coli*-Stamm, der speziell für die Herstellung von rekombinanten Proteinen konstruiert wurde. Zwei wichtige Merkmale der BL21 (DE3)-Zellen sind die Induzierbarkeit von Promotoren sowie passende Markergene. Die Markergene ermöglichen, dass sich rekombinante RNA beziehungsweise Proteine im Medium anreichern können, ohne dass deren Abbau eintritt.<sup>120</sup>

<sup>120</sup> <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/C600003>, 15.05.2015.

Trotz der Optimierung der *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen können während der Expression Probleme auftreten, die vor allem mit der Löslichkeit der Proteine zusammenhängen. Auf Grund von Fehlfaltungen bei der Translation können Proteinaggregate (*inclusion bodies*) ausgebildet werden, die bei der Zellyse nicht in den löslichen Teil übergehen, sondern im Zellpellet zurückbleiben. Ein weiteres Problem ist, dass die fusionierten Tags, die zur Reinigung benötigt werden, in Folge der Fehlfaltungen innerhalb der Proteine liegen und somit für die Bindung an das Säulenmaterial nicht zur Verfügung stehen. Um diese Probleme zu umgehen, wurden die verschiedenen Expressionssysteme vergleichend für die heterologe Expression eingesetzt. Die unterschiedlichen Affinitäts-Tags können hierbei Einfluss auf die Löslichkeit sowie die Reinigung der Fusionsproteine haben. Zusätzlich sollen Chaperone koexprimiert werden, die unter der Kontrolle eines nicht durch IPTG induzierten Promotors stehen und die Faltung der gebildeten rekombinanten Proteine positiv beeinflussen.

**Abbildung 98:** Vektorkarte des Chaperon tragenden Plasmids pG-KJE8.

Für die Koexpression der Chaperone wurde ein entsprechender Vektor, pG-KJE8, verwendet, auf dem fünf unterschiedliche Chaperon-Gene codiert sind (Abbildung 98). Unter dem Begriff Chaperon werden Proteine zusammengefasst, die die korrekte Faltung des naszierenden Peptidrückrades unterstützen und eine Aggregation verhindern. Dabei treten sie direkt in Konkurrenz mit Aggregationsvorgängen und beeinflussen nicht-kovalente Wechselwirkungen.

**Tabelle 5:** Charakteristika von pG-KJE8.<sup>121</sup>

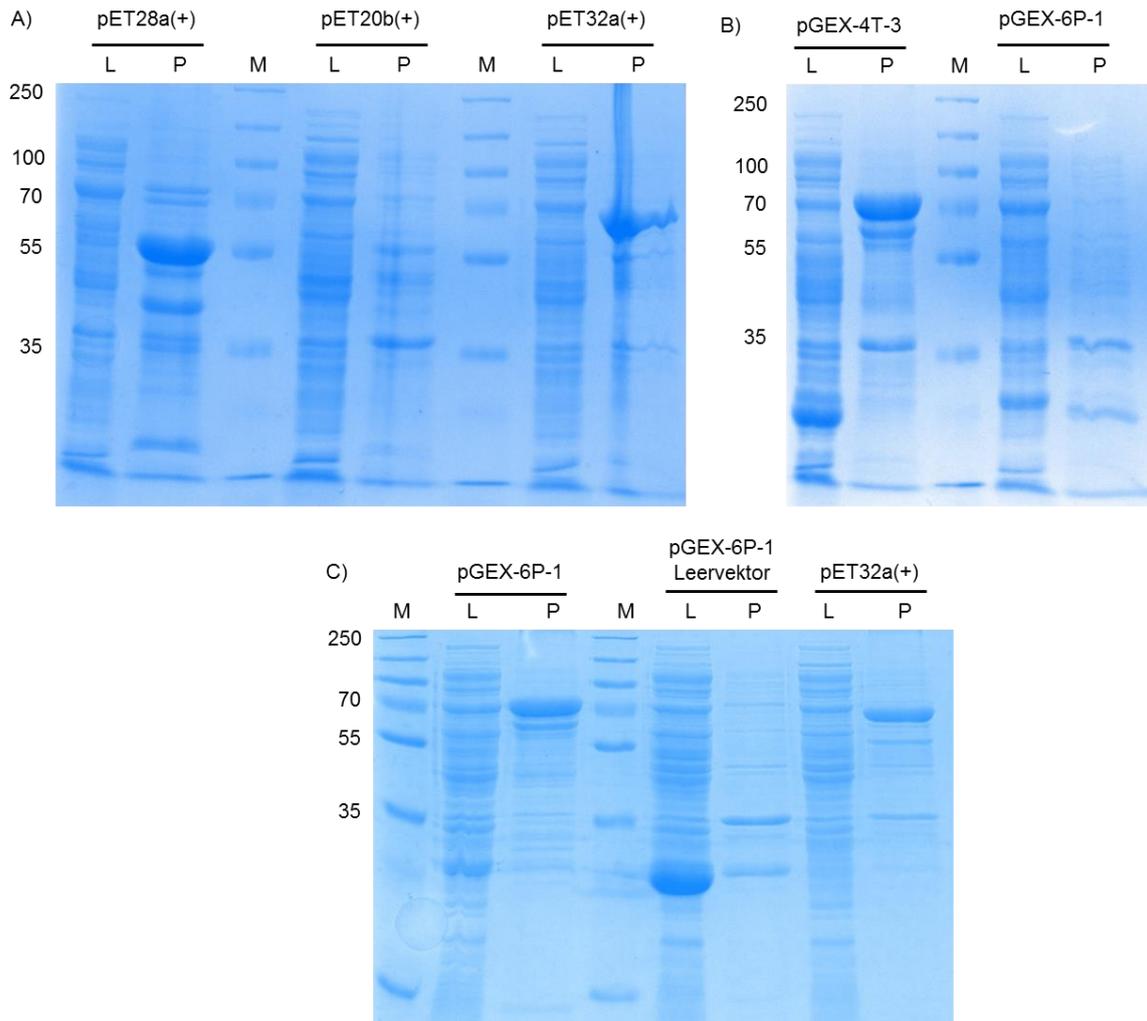
Plasmid	Chaperone	Promoter	Induktor	Resistenz
pG-KJE8	Dank-DnaJ-GrpE	araB	L-Arabinose	Cm
	GroES-GroEL	Pzt-1	Tetracyclin	

Für die Expression des Epoxidasegens *ambJ* wurde zunächst eine Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit den rekombinanten Plasmiden *ambJ\_pET28a(+)*, *ambJ-SC\_pET28a(+)*, *ambJ\_pET20b(+)*, *ambJ-SC\_pET20b(+)*, *ambJ\_pET32a(+)*, *ambJ\_pGEX-4T-3*, *ambJ\_pGEX-6P-1* und *ambJ\_pCold-I* durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Transformation pG-KJE8-enthaltender chemisch-kompetenter *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit dem Plasmid *ambJ\_pCold-I* durchgeführt. Zur Expression wurden 20 mL 2TY-Medium mit einer Vorkultur auf eine OD<sub>595</sub> von 0.05 angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Nachdem eine OD<sub>595</sub> von 0.5-0.8 erreicht wurde, wurde die Expression mit 0.1 beziehungsweise 0.4 mM IPTG induziert und über Nacht bei 16, 18 beziehungsweise 25 °C und 160 rpm kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe von Ultraschall beziehungsweise der FRENCH-PRESS aufgeschlossen.

---

<sup>121</sup> Chaperone Plasmid Set, Product Manual, TaKaRa;

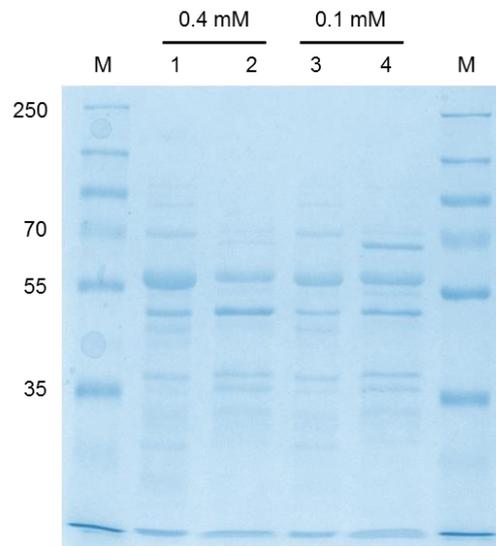
[http://www.clontech.com/takara/DE/Products/Protein\\_Research/Protein\\_Folding\\_and\\_Expression/ibcGetAttachment.jsp?cItemId=10211&fileId=6865609&sitex=10035:22372:US](http://www.clontech.com/takara/DE/Products/Protein_Research/Protein_Folding_and_Expression/ibcGetAttachment.jsp?cItemId=10211&fileId=6865609&sitex=10035:22372:US), 15.05.2015.



**Abbildung 99:** SDS-Polyacrylamidgele (12%) der heterologen Expression von *ambJ* in *E. coli* BL21 (DE3) bei 25 °C. A) 1+2: *ambJ*\_pCold+pG-KEJ8, 3+4: *ambJ*+Stop\_pET28a(+), 5+6: *ambJ*\_pET32a(+); B) 1+2: *ambJ*\_pGEX-4T-3, 3+4: *ambJ*\_pGEX-6P-1; C) 1+2: *ambJ*\_pGEX-6P-1, 3+4: pGEX-6P-1 (Leervektor), 5+6: *ambJ*\_pET32a(+); M: Protein-Größenstandard PageRuler™ Presatined Broad Range Protein Ladder (FERMENTAS), Theoretische Molekulargewichte der Epoxidase-Fusionsproteine von *ambJ*: pET28a(+): 55 kDa, pET32a(+): 68 kDa, pGEX-4T-3/pGEX-6P-1: 79 kDa. pCold: 54 kDa, pET20b(+): 54 kDa.

Die Expressionen wurden im Anschluss mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert. Dazu wurden Proben des Lysates und des Pellets genommen und die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierbei zeigte sich, dass die Epoxidase *AmbJ* mit einer Größe von 53 kDa größtenteils im Zellpellet vorliegt. Nur ein geringer Anteil befindet sich im Lysat (Abbildung 99).

Nur im Falle des pGEX-6P-1-Systems (0.1 mM IPTG, 25 °C, 20 h, FRENCH-PRESS) wurde das Protein komplett in der löslichen Fraktion erhalten (Abbildung 99, C) 1+2). Dieses Ergebnis konnte allerdings nicht reproduziert werden. Außerdem zeigte die Negativkontrolle, dass bei 70 kDa ein Protein in der Basalexpression auftritt (Abbildung 99, C) 3+4).



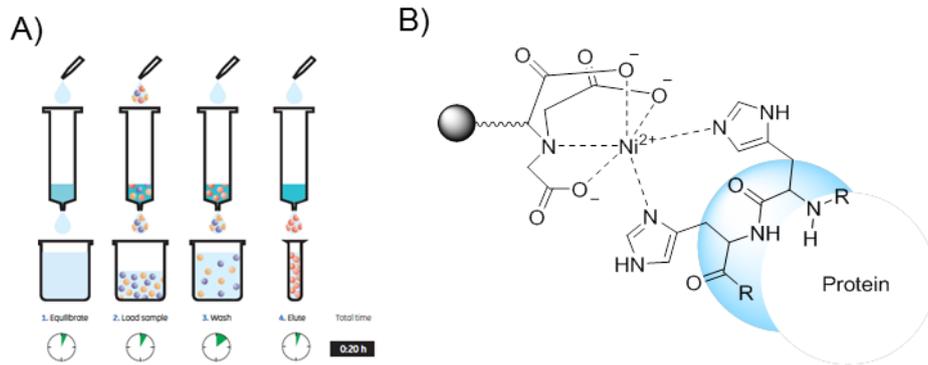
**Abbildung 100:** SDS-Polyacrylamidgel (12%) der heterologen Coexpression von *ambJ* und pG-KEJ8. 1+2: Induktion mit 0,4 mM IPTG, 3+4: Induktion mit 0,1 mM IPTG (1,3: Lysat, 2,4: Pellet), M: Protein-Größenstandard PageRuler™ Presatined Broad Range Protein Ladder (FERMENTAS), Theoretisches Molekulargewicht der Epoxidase AmbJ: 54 kDa.

Bei der Wiederholung der Coexpression des Plasmids *ambJ\_pCold-I* mit pG-KJE8 in *E. coli* BL21(DE3) bei einer Temperatur von 15 °C und unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen fand sich das Protein teilweise in der löslichen Phase (Abbildung 100). Bei einer IPTG-Konzentration von 0,4 mM wurde das beste Ergebnis erhalten (Abbildung 100, Bahn 1+2).

Die größte Menge an rekombinantem Zielprotein wurde bei der Induktion mit 0,4 mM IPTG und einem Kälteschock bei 4 °C erhalten.

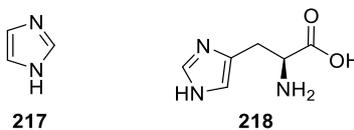
### 9.5 Reinigung der Epoxidase AmbJ

Die Expression des Epoxidasegens als Fusionsprotein mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag ermöglicht es, das Protein per immobilisierter Metall-Ionen-Affinitätschromatographie (IMAC) an einer stationären Phase aus Nickel-Nitrilo-triessigsäure (Ni-NTA)-Säulenmaterial zu reinigen.



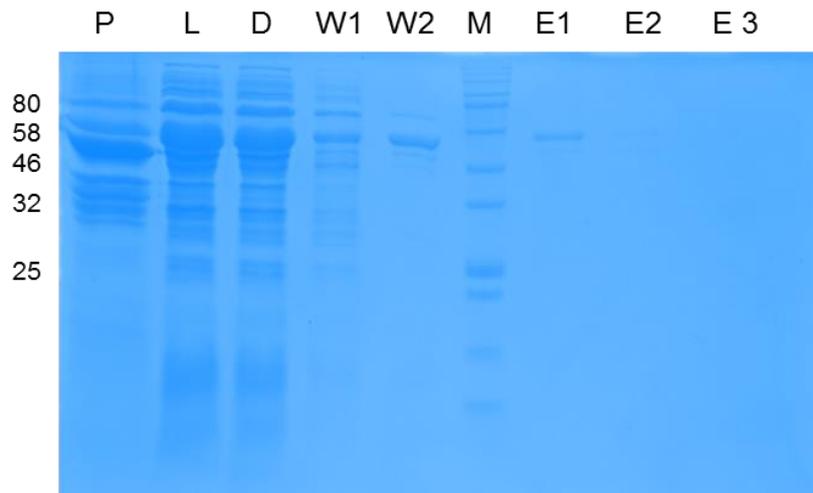
**Abbildung 101:** Prinzipien der Affinitätschromatographie. A) Ablauf der immobilisierten Metall-Ionen-Affinitätschromatographie (IMAC) an Nickel-Nitrilotriessig-säure (Ni-NTA)-Säulenmaterial. B) Struktur des sich bei der Metall-Ionen-Affinitätschromatographie ausbildenden Komplexes am Beispiel eines mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladenen Harzes.

Bei dieser Methode werden nach Anbindung unspezifisch gebundene Proteine ausgewaschen. Im Anschluss wird das gebundene Zielprotein in mehreren Schritten von der Ni-NTA-Säule eluiert (Abbildung 101). Imidazol eignet sich als Strukturanalogon von Histidin ausgezeichnet, um in Konkurrenz mit dem His<sub>6</sub>-Tag mit dem Säulenmaterial zu wechselwirken und den His<sub>6</sub>-Tag zu verdrängen (Abbildung 102).



**Abbildung 102:** Strukturen von Imidazol (217) und Histidin (218).

Zur Analyse wurden die Proteine in den Wasch- und Elutionsfraktionen sowie im Durchlauf mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrer Größe nach aufgetrennt. Auf dem SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 103) ist zu erkennen, dass das Zielprotein mit einer Größe von ca. 54 kDa im jeweils ersten Elutionsschritt (100 mM Imidazol) enthalten war. Außerdem befindet sich eine große Menge des Proteins im Durchlauf, sodass davon ausgegangen werden kann, dass nicht die gesamte Proteinmenge an das Säulenmaterial gebunden hat. Für eine schlechte Bindung an das Säulenmaterial spricht ebenfalls, dass das Protein bereits in den Waschfraktionen eluiert.

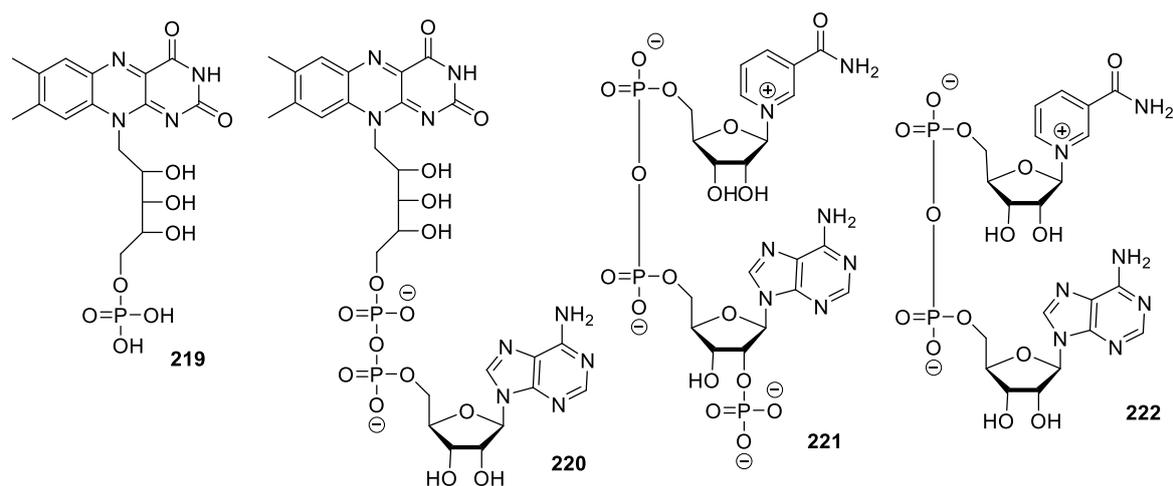


**Abbildung 103:** SDS-Polyacrylamidgel (15%) der Reinigung der Epoxidase AmbJ. M: Protein-Größenstandard Color Prestained Protein Standard Broad Range (11–245 kDa, NEW ENGLAND BIOLABS); L: Lysat, P: Pellet, D: Durchfluss, W: Waschschrte 1-2 (0 mM, 50 mM Imidazol), E: Elutionsschrte 1-3 (100 mM, 250 mM, 500 mM Imidazol). Theoretisches Molekulargewicht der Epoxidase AmbJ: 54 kDa.

Für die Enzymaktivitätstests wurde die erste Elutionsfraktion eingesetzt, die zunächst per Ultrafiltration konzentriert und deren Konzentration per BRADFORD-Test ermittelt wurde.

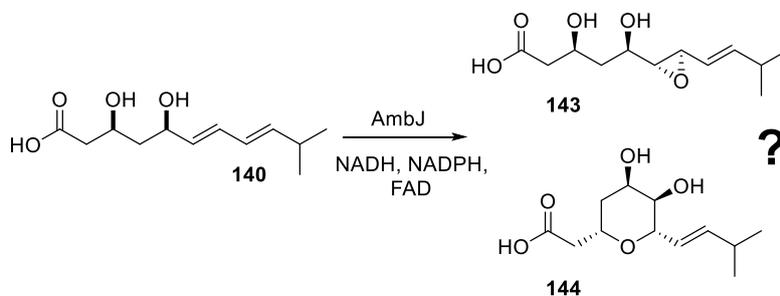
## 9.6 Enzymaktivitätstests mit der Epoxidase AmbJ

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, die Bildung des Tetrahydropyranringes in der Ambruticin-Biosynthese aufzuklären. Auf Grund von Sequenzhomologien zu anderen Epoxidasen wird vorhergesagt, dass die Monooxygenase AmbJ zunächst die Bildung eines Epoxids katalysiert. Dieses wird entweder spontan oder enzymkatalysiert durch den nukleophilen Angriff einer Hydroxygruppe in ein Tetrahydropyran umgewandelt. Für die entsprechenden Enzymtests von AmbJ wurde ein Vorläufersurrogat synthetisch hergestellt sowie die Monooxygenase AmbJ heterolog in *E. coli* produziert und durch Affinitätschromatographie gereinigt.



**Abbildung 104:** Strukturen der möglichen Kofaktoren von Monoxygenasen. Flavin-Mononucleotid (FMN, **219**), Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD, **220**),  $\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH, **221**),  $\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH, **222**).

AmbJ ist eine flavinabhängige Monoxygenase, wodurch ein Flavin-tragender Kofaktor (FAD oder FMN, **219** oder **220**) benötigt wird. Da nicht bekannt ist, wie dieser Kofaktor regeneriert wird, sollte in den Enzymreaktionen sowohl das  $\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH, **221**) als auch das  $\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH, **222**) zugegeben werden.

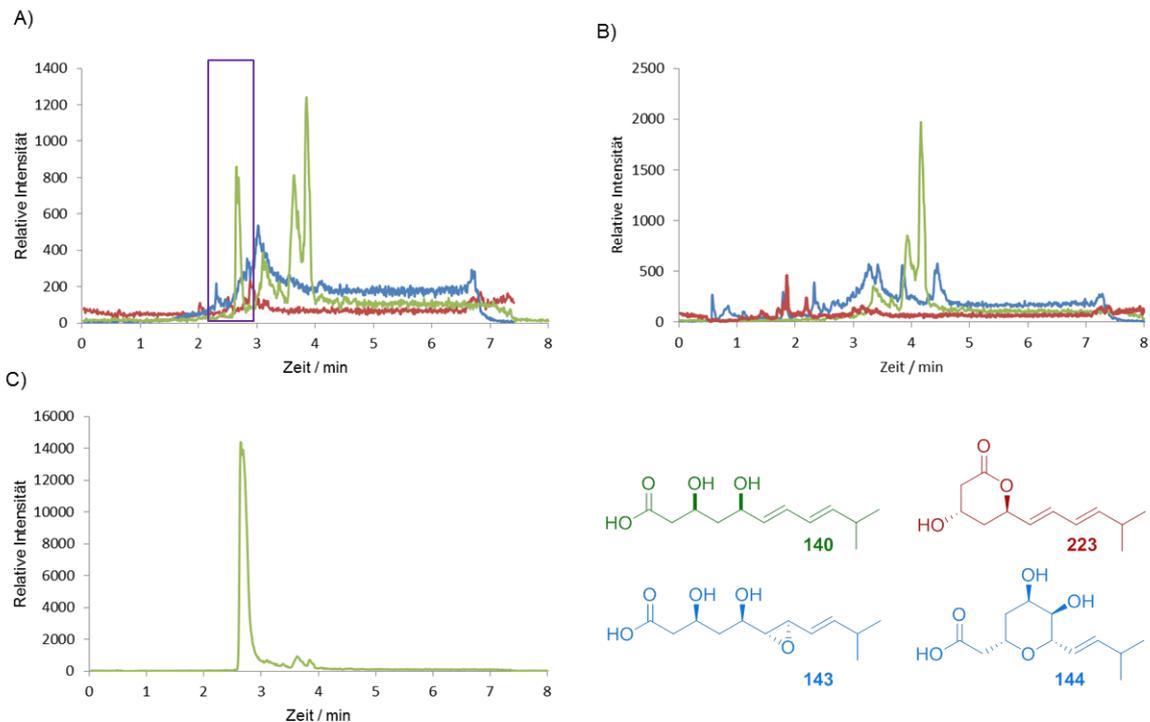


**Abbildung 105:** Geplante Enzymaktivitätstests mit der Epoxidase AmbJ. Gezeigt sind zum einen Substrat **140** und zum anderen die zwei möglichen Produkte **143** und **144**.

Als Substrat für die Enzymaktivitätstests wurde Vorläufer **140** eingesetzt. Es ist denkbar, dass zwei Produkte aus der Reaktion hervorgehen. Zum einen Epoxid **143** und zum anderen Tetrahydropyran **144** (Abbildung 105).

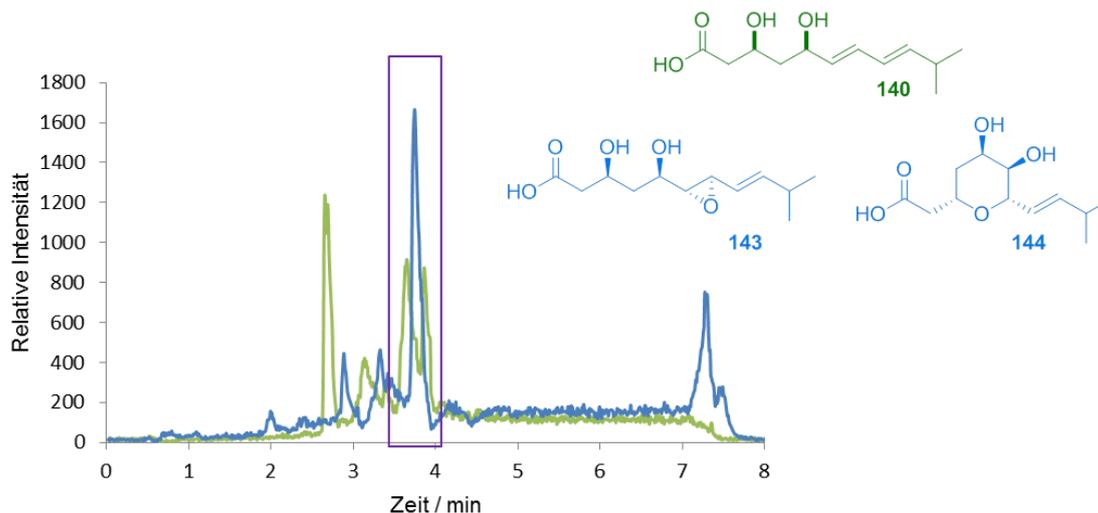
In Anlehnung an literaturbeschriebene Protokolle homologer Monoxygenasen wurde AmbJ (Endkonzentration: 80  $\mu$ M) mit Substrat **140** (Endkonzentration: 80  $\mu$ M) sowie den Kofaktoren NADPH, NADH und FAD (Endkonzentrationen; NADPH und NADH: 2 mM,

FAD: 80  $\mu$ M) bei unterschiedlichen Temperaturen (25-37 °C) über einen Zeitraum von 16 h inkubiert. Die Proben wurden mit Essigsäureethylester extrahiert und mittels UPLC-MS-Analyse ausgewertet. In Kontrollexperimenten wurden entweder Enzym oder Substrat **140** in den Umsetzungen ausgelassen.



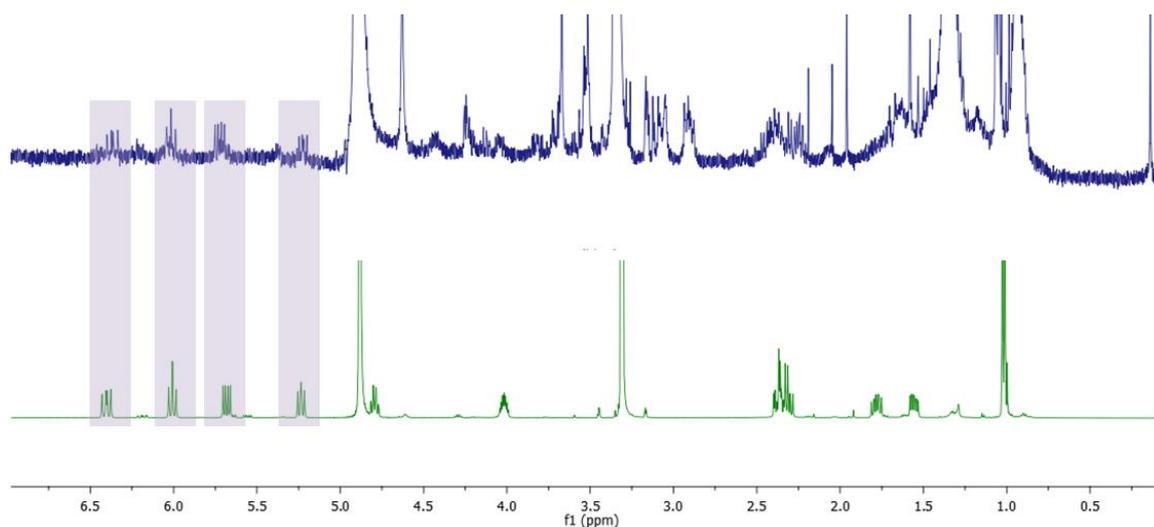
**Abbildung 106:** UPLC-MS-Analyse der Referenzexperimente unter Auslassen einzelner Komponenten. A) Inkubation von Substrat **140** unter den Testbedingungen ohne Enzym, B) Inkubation von AmbJ unter den Testbedingungen ohne Substrat. C) Referenzlauf der synthetischen Verbindung **140**. Grüne Linie: Substrat **140** ( $[M-H]^- = 227$ ), blaue Linie: Produktmasse ( $[M+Na]^+ = 267$ ), rote Linie:  $\delta$ -Lakton ( $[M+H]^+ = 211$ ).

Die massenspektrometrische Analyse der durchgeführten Referenzexperimente zeigt, dass das Substrat im Puffer unter den Testbedingungen stabil ist und keine spontane Zyklisierung zum  $\delta$ -Lakton **223** stattfindet (Abbildung 106, A). Die Signale bei 3.64 und 3.85 min entstammen dem verwendeten Lösungsmittel und können auch im Referenzlauf des gereinigten, synthetischen Substrates gefunden werden (Abbildung 106, C). Weder durch die Gegenwart von Kofaktoren oder andere Pufferbestandteile kam es zur spontanen Bildung von Verbindungen mit einer dem epoxidierten Produkt identischen Masse (Abbildung 106, A und B).



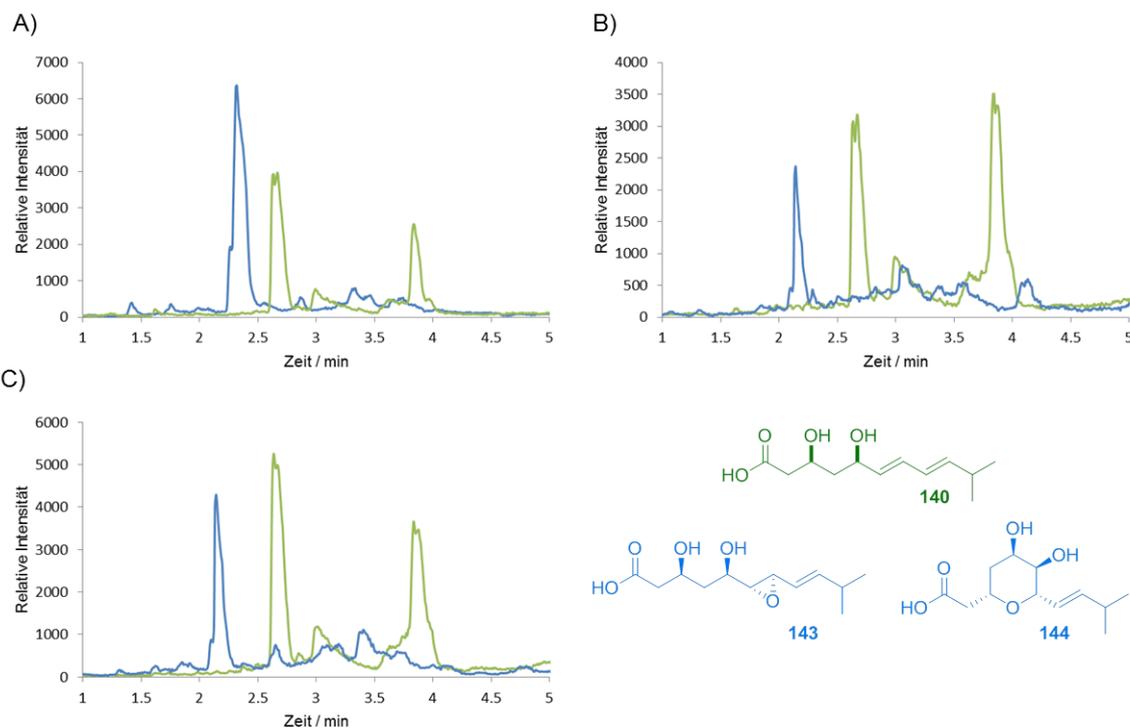
**Abbildung 107:** Chromatogramm der durchgeführten Enzymtests mit der Epoxidase AmbJ. Grüne Linie: Substrat **140** ( $[M-H]^- = 227$ ), blaue Linie: Produktmasse ( $[M+Na]^+ = 267$ ).

In den UPLC-MS Chromatogrammen der durchgeführten Enzymumsetzungen konnte ein Signal für Substrat **140** gefunden werden (siehe Abbildung 107; Retentionszeit: 2.64 min), das mit der synthetischen Referenz übereinstimmt (siehe Abbildung 106, C). Zusätzlich dazu wurde ein Signal bei einer Retentionszeit von 3.8 min detektiert, das die gewünschte Produktmasse besitzt. Allerdings wurde hier nur das Signal des Protonenadduktes und nicht das Signal des Natriumadduktes gefunden. Dieses Signal ist im Referenzexperiment ohne Enzym nicht vorhanden (Abbildung 106, A).



**Abbildung 108:** Vergleich der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des Enzymaktivitätstests mit dem synthetischen Substrat. Grüne Linie: synthetisches Substrat **140**, blaue Linie: Spektrum nach der Extraktion des Enzymaktivitätstests.

Zur weiteren Analyse des auftretenden Signals bei einer Retentionszeit von 3.8 min wurde das Experiment im semipräparativen Maßstab wiederholt. Hierzu wurde gereinigtes AmbJ (Proteinkonzentration: 5 mg/mL) mit 5 mg Substrat **140** (Endkonzentration 10 mM) sowie den Kofaktoren FAD, NADH und NADPH (Endkonzentrationen; FAD: 10 mM, NADH: 200 mM, NADPH: 200 mM) inkubiert und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Rückstand wurde in deuteriertem Methanol aufgenommen und mittels Kernresonanzspektroskopie analysiert. Hierbei zeigte sich keine signifikante Veränderung der Doppelbindungsprotonen zwischen 5.0 und 6.5 ppm (Abbildung 108), sodass davon ausgegangen werden muss, dass keine Reaktion zu Epoxid **143** oder Pyran **144** stattgefunden hat. Ein mögliches Problem könnte die hohe Substratkonzentration gegenüber der eingesetzten Enzymmenge sein. Hierdurch könnte eine Inhibierung stattgefunden haben.

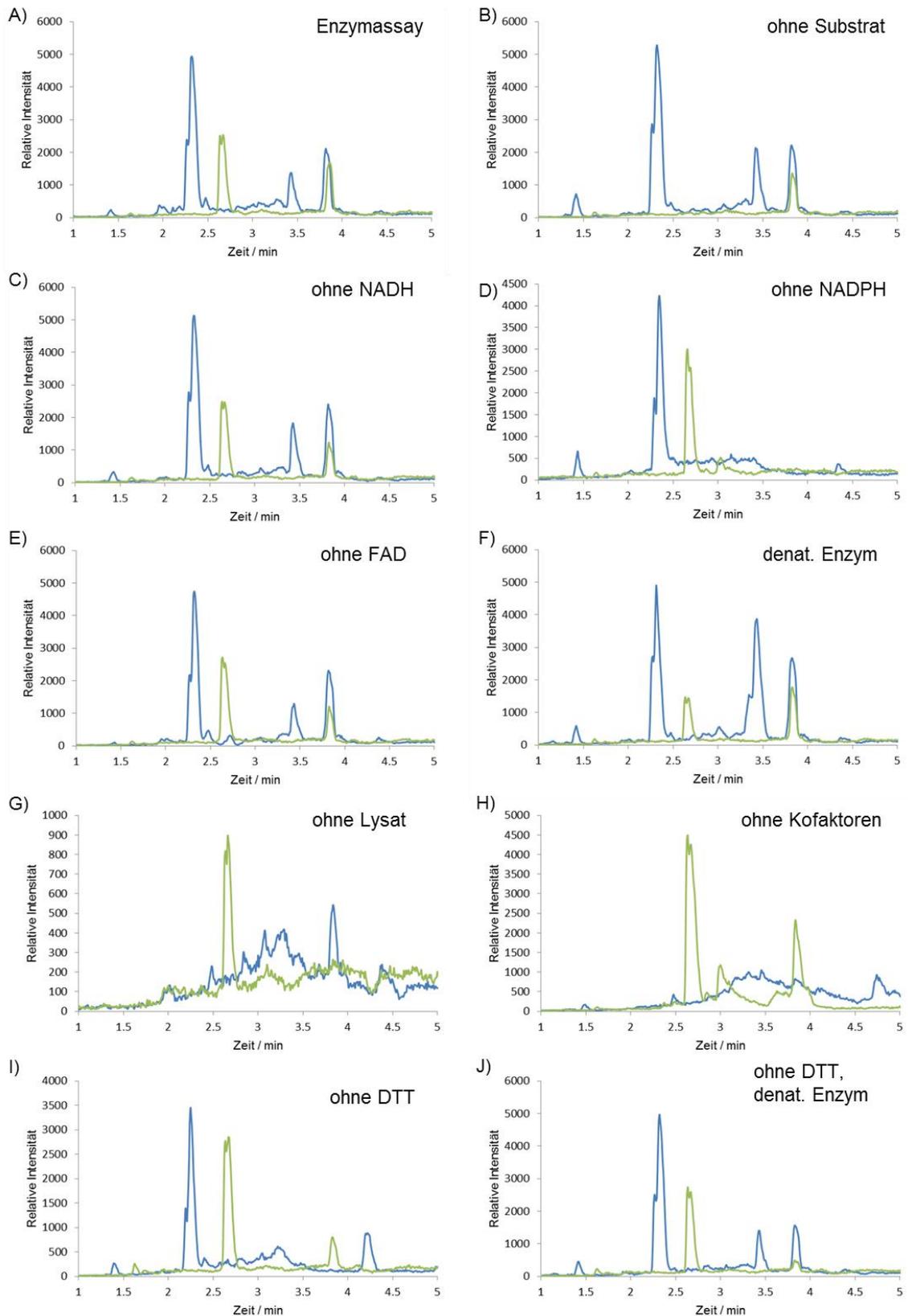


**Abbildung 109:** Chromatogramm der Umsetzung von Substrat **140** mit dem Lysat der Genexpression. A) Umsetzung des Lysates der Genexpression mit dem Substrat **140**. B) Umsetzung des Lysates einer mit dem pCold-I-Leervektor transformierten *E. coli* BL21 (DE3)-Kultur mit **140**. C) Umsetzung des denaturierten Enzyms mit **140**. Grüne Linie: Substrat **140** ( $[M-H]^- = 227$ ), blaue Linie: Produktmasse ( $[M+Na]^+ = 267$ ).

Um auszuschließen, dass das Enzym bei der Reinigung mittels Affinitätschromatographie nicht seine Aktivität verliert, sollte das Lysat der Genexpression mit dem Substrat **140** inkubiert werden. Dabei wurden zwei verschiedene Vorgehensweisen gewählt. Zum einen

wurde nur das Lysat verwendet und zum anderen wurde das Lysat mit den Kofaktoren NADPH, NADH und FAD (Endkonzentrationen; NADPH und NADH: 2 mM, FAD: 80  $\mu$ M) supplementiert. Durch eine Extraktion mit Essigsäureethylester und anschließender Analyse per UPLC-MS konnte gezeigt werden, dass bei dem Experiment mit dem Lysat in Kombination mit den Kofaktoren ein Signal bei einer Retentionszeit von 2.32 min auftritt, das auf eine stattfindende Oxidation hindeutet (Abbildung 109, A). Zur Kontrolle wurden Transformationen mit dem Lysat einer mit dem pCold-I-Leervektor transformierten *E. coli* BL21 (DE3)-Kultur durchgeführt. Die UPLC-MS-Analyse zeigte, dass das Signal bei einer Retentionszeit von 2.32 min mit der potentiellen Produktmasse hier ebenfalls auftritt (Abbildung 109, B). Auch bei der Inkubation von Substrat **140** mit denaturiertem Enzym (Denaturierung bei 90 °C für 20 min) unter den Bedingungen der Enzymaktivitätstests trat ein Signal bei 2.32 min auf (Abbildung 109, C), wodurch bestätigt wurde, dass die beobachtete Oxidation unabhängig von der Gegenwart von AmbJ geschieht.

Um herauszufinden, durch welche Komponente der Reaktionsmischung das Signal bei der Retentionszeit von 2.32 min verursacht wird, wurden Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen jeweils einzelne Komponente des Gesamtansatzes einzeln ausgelassen wurden (Abbildung 110). Zu den in den UPLC-MS-Chromatogrammen A-J der Abbildung 110 auftretenden Signalen zählt das Signal des Substrates bei einer Retentionszeit von 2.64 min. Des Weiteren tritt ein Signal bei 2.32 min auf, das die Produktmasse zeigt. Zusätzlich werden Signale bei einer Retentionszeit von 1.43, 3.43 und 3.82 min gefunden, die aus dem Hintergrund der Umsetzungen oder beeinflusst von den Kofaktoren auftreten.



**Abbildung 110:** Enzymaktivitätstests und Kontrollexperimente mit der Epoxidase AmbJ unter Ausschluss jeweils einer Komponente. A) Standardaktivitätstest mit Lysat, Substrat und Kofaktoren. B) Ohne Zusatz des Substrates. C) Ohne Zusatz von NADH. D) Ohne Zusatz von NADPH. E) Ohne Zusatz von FAD. F) Mit denaturiertem Enzym. G) Ohne Zusatz des Lysates. H) Auslassung aller Kofaktoren. I) Ohne Zusatz von DTT. J) Ohne Zusatz von DTT mit denaturiertem Enzym. Grüne Linie: Substrat **140** ( $[M-H]^- = 227$ ), blaue Linie: Produktmasse ( $[M+Na]^+ = 267$ ).

Das Signal bei 2.32 min kann in den meisten Umsetzungen nachgewiesen werden (Abbildung 110, A-F, I-J). Bei drei Umsetzungen tritt dieses Signal allerdings nicht auf. Zum einen bei der Testung ohne Zusatz von Lysat und zum anderen beim Test ohne Zusatz von Kofaktoren (Abbildung 110, G und H). Außerdem kann das Signal auch bei der Inkubation des Lysates mit den Kofaktoren ohne zugegebenes Substrat detektiert werden. Besonders der letzte Test zeigt, dass das Signal bei 2.32 min unabhängig vom Substrat auftritt (Abbildung 110, B). Durch dieses Ergebnis wurde bestätigt, dass das entsprechende Signal aus einer Hintergrundreaktion der Kofaktoren mit dem Lysat entsteht.

Zusätzlich kann eine Aussage zu den restlichen Signalen getroffen werden. Das Signal bei einer Retentionszeit von 3.43 min tritt bei fast allen Umsetzungen auf. Nur bei Umsetzungen, in denen kein NADPH zugegeben wurde, kann es nicht detektiert werden (Abbildung 110, D und H). Diese Beobachtung zeigt, dass das Signal beeinflusst durch NADPH entsteht.

Die bisherigen Ergebnisse signalisieren, dass die Epoxidase mit dem bereitgestellten Substrat **140** keine Aktivität zeigt. Dies kann zum einen daran liegen, dass eine Fehlfaltung des Enzyms vorliegt oder dass das Enzym aus anderen Gründen nicht aktiv ist. Zum anderen ist es denkbar, dass das Substrat, das ein vereinfachtes Analogon des tatsächlichen Biosynthesevorläufers der Epoxidase AmbJ darstellt, von diesem nicht erkannt wird. Fraglich ist, welche Strukturmerkmale nötig sind, damit AmbJ das Substrat erkennt. Sowohl die Cyclopropyl- als auch die Dihydropyran-Einheit des Ambruticins fehlen im eingesetzten Substrat und könnten für die Erkennung durch das Enzym benötigt werden. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Vorläufermolekül von AmbJ im Gegensatz zur postulierten Biosynthese von JULIEN gebunden an die PKS vorliegt. Hierdurch müsste Substrat **140** als SNAC-Thioester eingesetzt werden, damit das Enzym das Substrat umsetzen kann. Diese Fragestellungen sollen in nachfolgenden Arbeiten geklärt werden.

### **9.7 Klonierung der Gene *ambS*, *ambR*, *ambQ* und *ambN* in pCold-I**

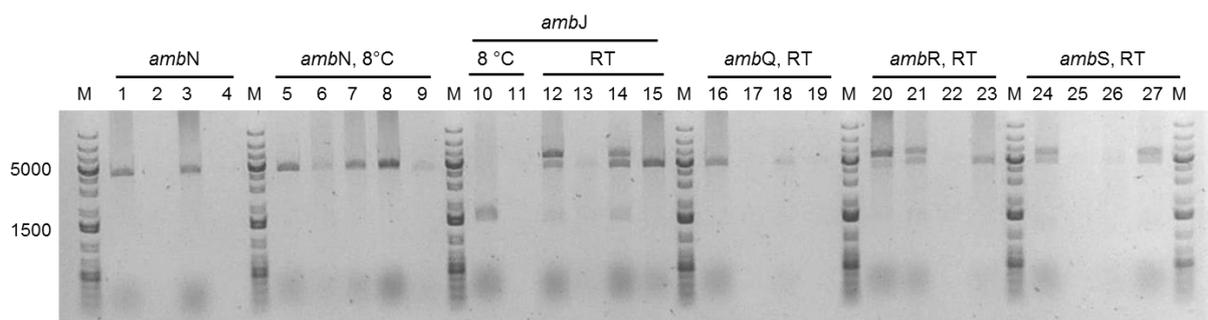
Für die Klonierung der *Tailoring*-Enzyme AmbS, AmbN, AmbR und AmbQ wurden die synthetisch hergestellten, sequenzoptimierten Gene *ambS*\_pMK, *ambR*\_pMK, *ambN*\_pMK, *ambQ*\_pMK (Vektorkarten im Anhang) und der Expressionsvektor pCold-I mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NdeI* beziehungsweise *EcoRI* und *HindIII* (*ambN*) zur Erzeugung homologer, kohäsiver Enden geschnitten. Die Restriktionen wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft und die geschnittenen DNA-Fragmente aus dem Gel

extrahiert. Die Größe der Fragmente stimmt dabei mit den zu erwartenden Fragmenten von pCold-I (4407 bp) und den *amb*-Genen (Tabelle 6) überein.

**Tabelle 6:** Größe der verwendeten *amb*-Gene.

<i>amb</i> -Gen	Größe
<i>ambJ</i>	1431 bp
<i>ambN</i>	1641 bp
<i>ambQ</i>	1614 bp
<i>ambR</i>	1348 bp
<i>ambS</i>	1087 bp

Nach erfolgreichem Restriktionsverdau erfolgte die Ligation der *amb*-Gene in den linearisierten Expressionsvektor pCold-I, gefolgt von der Transformation kompetenter *E. coli* TOP10<sup>®</sup>-Zellen mit den Ligationsansätzen. Nach Ausplattieren des Transformationsansatzes auf Carbenicilin-haltigen LB-Agarplatten wurden Flüssigkulturen mit Positivklonen inokuliert und über Nacht inkubiert. Aus diesen wurden die rekombinanten Plasmide mittels alkalischer Lyse isoliert und gereinigt. Um den Erfolg der Ligation zu überprüfen, wurde ein Restriktionsverdau (Pipettierschema siehe Kapitel 12.8.4) mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* beziehungsweise *EcoRI* und *NdeI* durchgeführt und mit Hilfe einer gelelektrophoretischen Auftrennung überprüft.

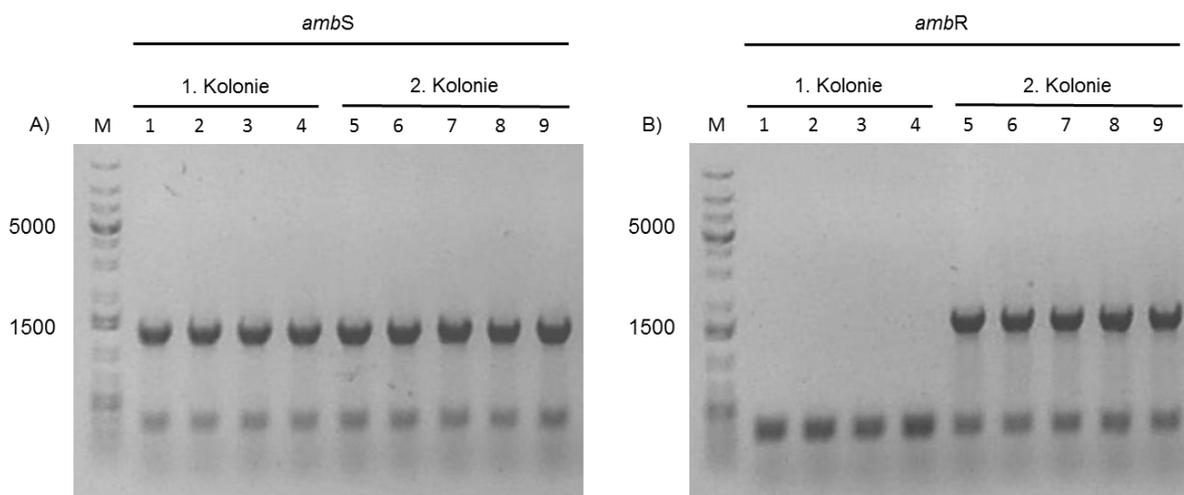


**Abbildung 111:** Testrestriktion der pCold-I-Konstrukte, M: DNA-Größenstandard GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (FERMENTAS).

Abbildung 111 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der geschnittenen pCold-I-Konstrukte. Anhand des Agarosegels ist erkennbar, dass im Fall der *ambN*-pCold-I-Konstrukte kein positiver Klon erhalten wurde (Bahnen 1-9). Auch für das *ambQ*-pCold-I-Konstrukt zeigten sich keine Banden passender Größe (Bahnen 16-19). Für die Konstrukte

*ambS*\_pCold-I und *ambR*\_pCold-I wurden jeweils zwei positive Klone erhalten (Bahnen 20, 21, 24 und 27 der Bahnen 20-27). Die Größen der Fragmente stimmte dabei mit denen des pCold-I (4407 bp)-Vektors sowie der einzelnen Gene *ambR* (1348 bp) beziehungsweise *ambS* (1087 bp) überein.

Zur weiteren Überprüfung der positiven *ambS*\_pCold-I und *ambR*\_pCold-I-Konstrukte wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden Vektorspezifische Primer verwendet, sodass das PCR-Produkt sowohl ein Stück des Vektors als auch das *amb*-Gen beinhalten sollte. Die Sequenzen der von SIGMA ALDRICH bezogenen Primer sind in Kapitel 12.6 dargestellt. Für die Kolonie-PCR wurde ein PCR-Programm mit einer Annealingtemperatur von 44 °C gewählt. Die anschließende Agarosegelelektrophorese zeigte das gewünschte Fragment von *ambS* bei 1.4 kb (Abbildung 112, A). Die zwei zu überprüfenden Klone des *ambR*\_pCold-I-Konstruktes zeigten nur in einem Fall eine Bande bei 1.5 kb (Abbildung 112, B, Bahnen 5-9), sodass scheinbar ein falsch positiver Klon bei der Transformation und Restriktion identifiziert wurde.



**Abbildung 112:** Kolonie-PCR als Gradienten-PCR der pCold-I-Konstrukte, M: DNA-Größenstandard GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (FERMENTAS), A) *ambR*\_pCold-I. B) *ambS*\_pCold-I. Größe von *ambR*: 1626 bp. Größe von *ambS*: 1365 bp. Größe von pCold-I: 4407 bp.

Die erfolgreiche Klonierung von *ambS* und *ambR* in den Vektor pCold-I wurde per Sequenzierung bestätigt.

## 9.8 Klonierung und Expression des Ketoreduktasegens *ambN*

### 9.8.1 Klonierung von *ambN* in pET28a(+)

Für die Klonierung von *ambN* wurde ein synthetisch hergestelltes, sequenzoptimiertes Gen und der linearisierte Expressionsvektor pET28a(+) verwendet. Zunächst wurden chemisch-kompetente Zellen des Stammes *E. coli* TOP10<sup>®</sup> mit dem Vektor *ambN*\_pMK transformiert und anschließend auf kanamycinhaltigem LB-Festmedium ausplattiert. Nach Inokulierung positiver Klone und Kultivierung in Flüssigmedium erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA per alkalischer Lyse sowie ein Restriktionsverdau des Vektors mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII*. Nach der Behandlung des pET28a(+)-Vektors mit *EcoRI* und *HindIII* wurden die präparativ durchgeführten Restriktionen mittels Agarosegelelektrophorese überprüft sowie die geschnittenen DNA-Fragmente aus dem Gel extrahiert und gereinigt. Dabei wiesen das *ambN*-Gen und der linearisierte pET28a(+)-Vektor die gewünschte Größe von 1641 bp beziehungsweise 5323 bp auf.

Im Anschluss erfolgte die Ligation des *ambN*-Gens mit dem linearisierten pET28a(+)-Vektor, gefolgt von der Transformation von kompetenten *E. coli* TOP10-Zellen mit dem Ligationsansatz. Nachdem Ausplattieren des Transformationsansatzes auf Kanamycinhaltigen Agarplatten, wurden Positivklone inokuliert und über Nacht in Flüssigmedium inkubiert. Aus diesen wurde das rekombinante Plasmid *AmbN*\_pET28a(+) isoliert und gereinigt. Um den Erfolg der Ligation zu überprüfen wurde eine Testrestriktion mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* durchgeführt und mittels gelelektrophoretischer Auftrennung überprüft. Dabei wiesen das *ambN*-Gen und der linearisierte pET28a(+)-Vektor die erwartete Größe von 1641 bp und 5323 bp auf. Die erfolgreiche Klonierung des Plasmids *AmbN*\_pET28a(+) wurde per Sequenzierung bestätigt.

### 9.8.2 Expression des Ketoreduktasegens *ambN*

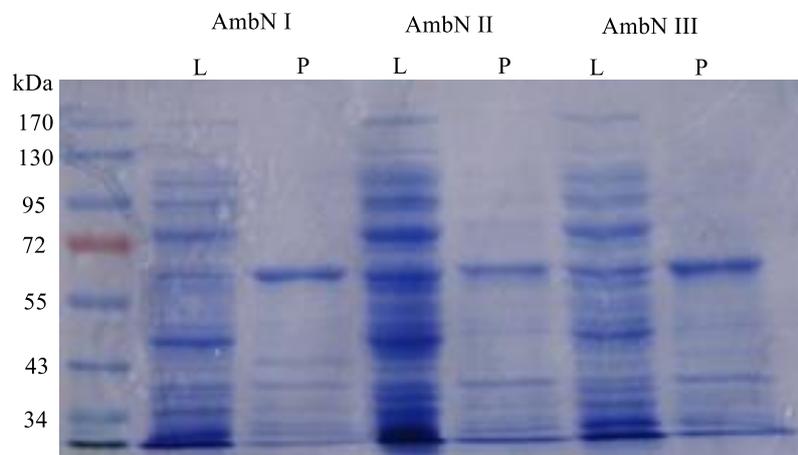
Für die Expression des Ketoreduktasegens *ambN* wurde zunächst eine Transformation chemisch-kompetenter Zellen des Stammes *E. coli* BL21 (DE3) mit dem rekombinanten Plasmid *ambN*\_pET28a(+) durchgeführt und der Transformationsansatz auf kanamycinhaltigem LB-Medium ausplattiert. Zur Expression wurden 50 mL 2TY-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit der zuvor hergestellten Vorkultur auf eine  $OD_{595}=0.05$  angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer  $OD_{595}$  von 0.5-0.8 wurde die Expression mit 0.1 beziehungsweise 0.4 mM IPTG induziert und über Nacht bei 16 beziehungsweise 25 °C und 160 rpm kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und

mittels Ultraschall oder FRENCH-PRESS aufgeschlossen. Außerdem wurde die Gesamteproteinkonzentration nach BRADFORD bestimmt.

**Tabelle 7:** Expressionsbedingungen der Ketoreduktase AmbN.

	I	II	III	IV	V
Ansatz	50 mL 2TY-Medium + 50 µL Kanamycin				+ 4% Glucose
Angeimpft	OD <sub>595</sub> =0.05	mit 1 mL VK	mit 1 mL VK	OD <sub>595</sub> =0.05	OD <sub>595</sub> =0.05
Temperatur	37 °C	16 °C	16 °C	25 °C	25 °C
IPTG-Konz.	0.1 mM	0.1 mM	0.4 mM	0.1 mM	0.1 mM
Zeit	3 h	16 h	16 h	24 h	24 h
Zellaufschluss	Ultraschall	Ultraschall	Ultraschall	FRENCH PRESS	FRENCH PRESS
Proteinkonz.	1 mg/mL	1.6 mg/mL	1.2 mg/mL	2.95 mg/mL	0.48 mg/mL

In Tabelle 7 sind die jeweiligen Bedingungen und die erhaltenen Proteinkonzentrationen aufgeführt. Es ist erkennbar, dass die höchste Konzentration an Enzym erreicht wurde, indem die Expression über einen Zeitraum von 24 h bei 25 °C in 2TY-Medium ohne Glucose durchgeführt wurde (Ansatz IV). Die Expression wurde mit 0.1 mM IPTG induziert und die Zellen mit der FRENCH-PRESS aufgeschlossen.



**Abbildung 113:** SDS-Polyacrylamidgel (15%) der heterologen Expression der Ketoreduktase AmbN in 2TY-Medium. M: Protein-Größenstandard PageRuler™ Presatined Broad Range Protein Ladder (FERMENTAS), L: lösliche Fraktion nach Zellaufschluss, P: nicht-lösliche Fraktion nach Zellaufschluss. Theoretisches Molekulargewicht der Ketoreduktase AmbN: 59 kDa.

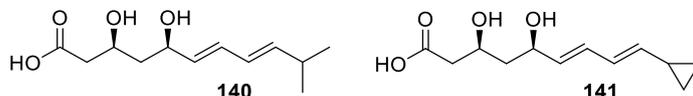
Die Expression wurde im Anschluss mittels SDS-PAGE analysiert. Dazu wurden Proben des Lysats und des Pellets genommen und die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierbei

zeigte sich, dass die Ketoreduktase AmbN mit einer Größe von 59 kDa erfolgreich exprimiert wurde. Allerdings befindet sich die größte Menge des Proteins im Zellpellet (Abbildung 113)

## 10 Zusammenfassung und Ausblick

---

Ein Teil der vorliegenden Promotionsarbeit beschäftigt sich mit der Aufklärung der biosynthetischen Bildung des Tetrahydropyran-Ringes im westlichen Teil der Ambruticine. Ziel war die chemische Synthese approbater Vorläufersurrogate der Epoxidase AmbJ, welche einen Schlüsselschritt im biosynthetischen *Tailoring* des PKS-Produktes katalysiert (Abbildung 114). Dieses Enzym sollte kloniert, heterolog in *E. coli* produziert und gereinigt werden. Abschließend sollten Enzymaktivitätstests mit den synthetischen Vorläufern und AmbJ durchgeführt werden.



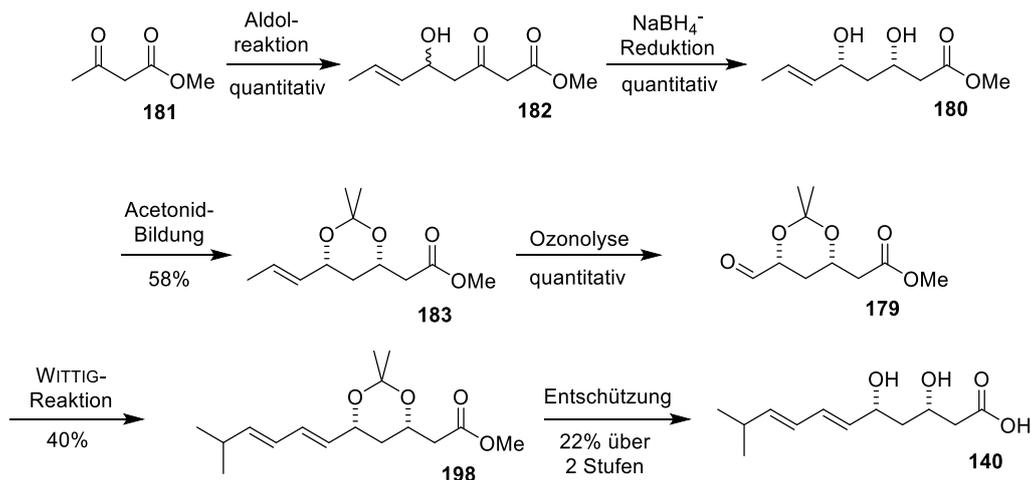
**Abbildung 114:** Zu synthetisierende Vorläufer **140** und **141**.

Neben der Arbeiten zu AmbJ sollten die folgenden *post*-PKS-Enzyme AmbQ, AmbN, AmbR und AmbS ebenfalls heterolog in *E. coli* produziert und initiale Expressionsstudien durchgeführt werden.

### 10.1 Zusammenfassung der synthetischen Arbeiten

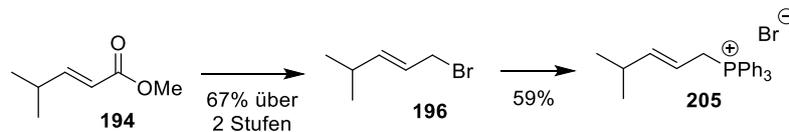
Die Synthese der für die Enzymtestungen benötigten Vorläufer **140** und **141** sollte zunächst über eine Route mit den Schlüsselschritten ROUSH-Allylierung, Halozyklisierung und JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung verwirklicht werden. Wegen im Rahmen dieser Route auftretenden Problemen bei der Differenzierung einzelner Hydroxygruppen durch selektive Schutzgruppenmanipulation und bei der Herstellung eines der beiden Kupplungspartner für die JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung (s. Kapitel 9.1.4) wurde die Strategie geändert.

Die anschließend erfolgreich für die Herstellung von Vorläufer **140** verfolgte diastereoselektive Syntheseroute basierte auf einer Aldolreaktion, stereoselektiver Reduktion und WITTIG-Reaktion als Schlüsselschritten (Schema 44). Hierbei bietet die WITTIG-Reaktion die Möglichkeit, leicht Derivate zu erhalten.



**Schema 44:** Diastereoselektive Synthese von Vorläufer **140**.

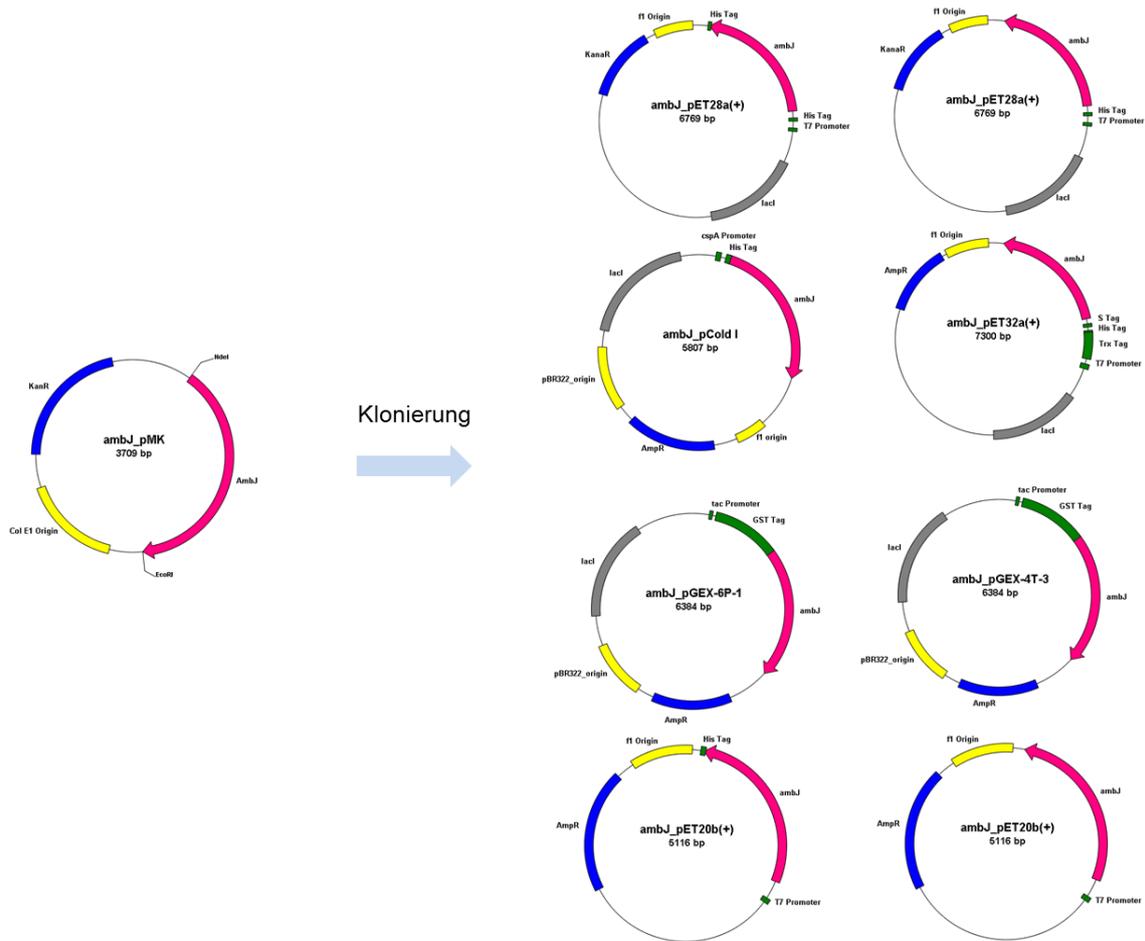
Das für die WITTIG-Reaktion benötigte Phosphoniumsalz **205** konnte erfolgreich in drei Stufen ausgehend von kommerziell erhältlichem Methyl-(*E*)-4-methylpent-2-enoat (**194**) hergestellt werden (Schema 45).



**Schema 45:** Synthese von Phosphoran **205**.

## 10.2 Zusammenfassung der biologischen Arbeiten zu AmbJ

Ausgehend von einem synthetischen, sequenzoptimierten Gen konnte *ambJ* erfolgreich in die Expressionsvektoren pET28a(+), pET20b(+), pET32a(+), pGEX-6P-1, pGEX-4T-3 und pCold I kloniert werden, wodurch die rekombinanten Plasmide *ambJ*\_pET28a(+), *ambJ*-SC\_pET28a(+), *ambJ*\_pET20b(+), *ambJ*-SC\_pET20b(+), *ambJ*\_pET32a(+), *ambJ*\_pGEX-4T-3, *ambJ*\_pGEX-6P-1 und *ambJ*\_pCold-I hergestellt wurden (Abbildung 115).



**Abbildung 115:** Erfolgreiche Klonierung von *ambJ* in unterschiedliche Expressionsvektoren.

Die Expressionsoptimierung von *ambJ* wurde parallel mit allen Expressionsvektoren unter variierenden Bedingungen durchgeführt. Im Fall des rekombinanten Plasmids *ambJ\_pCold-I* wurde bei Koexpression des Chaperon-tragenden Plasmids pG-KJE8 die Epoxidase AmbJ als lösliches Protein erhalten (Abbildung 116). Eine anschließende Reinigung mittels Affinitätschromatographie ergab das Fusionsprotein AmbJ, das in Enzymtestungen Anwendung fand.

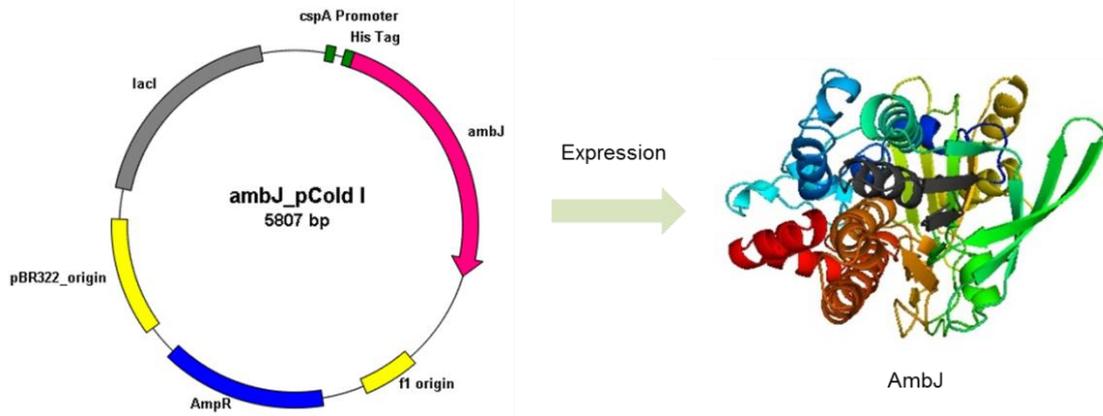


Abbildung 116: Erfolgreiche Expression von *ambJ*.<sup>122</sup>

### 10.3 Zusammenfassung der Studien zu den Enzymaktivitätstests

Das zuvor synthetisierte Substrat **140** konnte mit der durch heterologe Genexpression erhaltenen Epoxidase AmbJ in Enzymaktivitätstests eingesetzt werden. Dazu wurden die Kofaktoren NADH, NADPH und FAD verwendet.

Die *in vitro*-Tests mit dem durch Affinitätschromatographie gereinigten Enzym zeigten keinen gewünschten Umsatz zu einem epoxidierten oder zyklisierten Produkt. Allerdings konnte die Stabilität des Substrates unter den Testbedingungen überprüft werden.

In Enzymaktivitätstests mit dem Lysat der Genexpression in Kombination mit den Kofaktoren konnte ein Signal, das die Masse des gewünschten Produktes aufweist, detektiert werden. Allerdings konnte durch Experimente mit denaturiertem Enzym sowie mit dem Ganzzellextrakt von *E. coli* BL21 (DE3) ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesem Signal um das erwartete Produktsignal handelt.

### 10.4 Zusammenfassung der Klonierungs- und Expressionsarbeiten der anderen *post*-PKS Enzyme

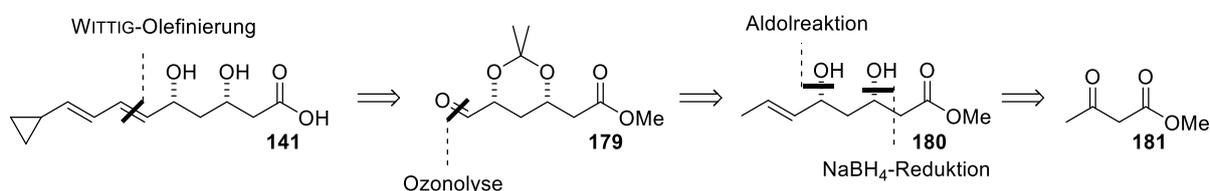
Die Klonierung der für die *post*-PKS Enzyme AmbR und AmbS codierenden Gene *ambR* und *ambS* in den pCold-I-Expressionsvektor wurde erfolgreich durchgeführt und durch Sequenzierung bestätigt. Die Klonierung der Gene *ambN* und *ambQ* in diesen Vektortyp

<sup>122</sup> Model der Enzymstruktur von AmbJ, Steffen Friedrich, **Mai 2012** (PyMOL, <https://www.pymol.org/>).

gelang nicht. Das Gen *ambN* konnte erfolgreich in den pET28a(+)-Vektor inkloniert werden. Im Anschluss wurden initiale Expressionsstudien mit diesem Konstrukt durchgeführt, bei denen eine Expression in nicht-löslichem Protein resultierte.

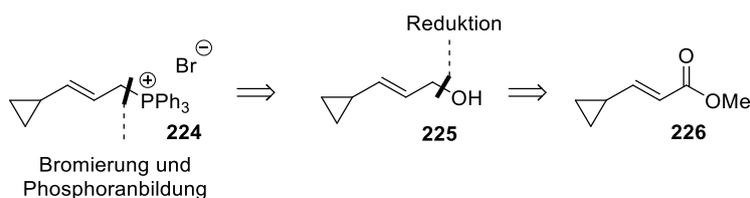
## 10.5 Ausblick

Für zukünftige Arbeiten zur Aufklärung der biosynthetischen Bildung des Tetrahydropyranrings im westlichen Teil der Ambruticine soll das Vorläufermolekül **141** sowie weitere, dem natürlichen Vorläufer ähnelnde Surrogate synthetisiert werden. Dazu kann die bereits etablierte Syntheseroute von Aldehyd **179** verwendet werden, der im Anschluss in einer WITTIG-Reaktion mit Phosphoniumsalzen wie **205** eingesetzt und geschützt würde.



**Schema 46:** Mögliche Syntheseroute zur Herstellung von Vorläufer **141**.

Phosphoniumsalz **224** soll zuvor ausgehend von kommerziell erhältlichem Methylester **226** innerhalb von drei Schritten hergestellt werden.



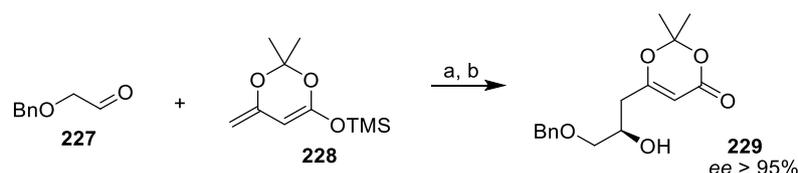
**Schema 47:** Mögliche Synthese für Phosphoran **224**.

Außerdem sollte eine enantioselektive Syntheseroute für AmbJ-Vorläufersurrogate entwickelt werden. Dazu kann zum einen eine enantioselektive vinyloge MUKAYAMA-Aldolreaktion zur Etablierung des ersten Stereozentrums genutzt werden (Schema 48)<sup>123,124,125</sup> Alternativ könnte

<sup>123</sup> I. Paterson, A. Steven, C. A. Luckhurst *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 3026-3038.

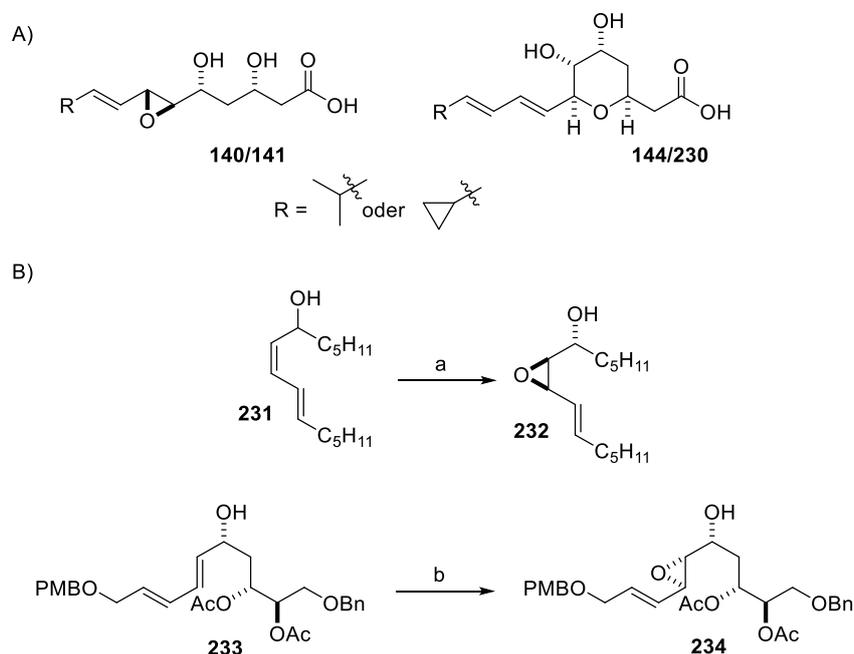
<sup>124</sup> B. L. Pagenkopf, J. Krüger, A. Stojanovic, E. M. Carreira *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3312-3314.

das resultierende Enantiomergemisch aus der ungerichteten Aldolreaktion auch durch eine enzymatische Racematspaltung, welche nach Schützung des Ketons auch als dynamische, kinetische Racematspaltung durchführbar wäre, getrennt werden.<sup>126</sup>



**Schema 48:** Literaturbeispiel für eine enantioselektive Aldolreaktion. a)  $[\text{Cu}((R,R)\text{-Ph-pybox})]\text{-(SbF}_6)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-98\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow -78\text{ }^\circ\text{C}$ . b) PPTS, MeOH.<sup>126</sup>

Zusätzlich zu den Vorläufersurrogaten **140** und **141** sollen **144** und **230** als Referenzverbindungen für die massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Analyse von weiteren Enzymtests hergestellt werden (Schema 49, A). Dies könnte in Analogie zu Literaturbeispielen entweder durch eine Epoxidierung mit *m*CPBA oder durch eine SHARPLESS-Epoxidierung verwirklicht werden (Schema 49, B).



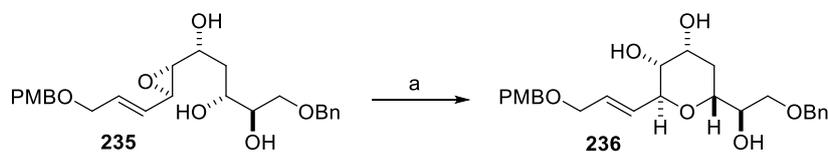
**Schema 49:** Geplante Referenzmoleküle und Beispiele für eine Epoxidierung. A) Zu synthetisierende Referenzmoleküle **144** und **230**. B) Literaturbeispiele für Epoxidierungsreaktionen. a) *m*CPBA,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 40 min, 77%; b) D-(-)-DET,

<sup>125</sup> J. Krüger, E. M. Carreira *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 837-838.

<sup>126</sup> A. L. E. Larsson, B. A. Persson, J.-E. Bäckvall *Angew. Chem.* 1997, *109*, 1256-1258

Ti(O*i*Pr)<sub>4</sub>, TBHP, MS 4Å, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -20 °C. mCPBA: *meta*Chlorperbenzoesäure; TBHP: *tert*Butylhydroperoxid; DET: Diethyltartrat.<sup>127,134</sup>

Die Tetrahydrofuranbildung ist nach den BALDWIN-Regeln als 6-*endo-tet*- gegenüber der 5-*exo-tet*-Zyklisierung nicht begünstigt. Aus diesem Grund wurden in den letzten Dekaden verschiedene Studien durchgeführt, in denen Methoden entwickelt wurden, um die Selektivität auf die Seite der 6-*endo-tet*-Zyklisierungen zu verschieben. NICOLAOU *et al.* lieferten den Startpunkt dieser Studien mit den Arbeiten zu Brevetoxin.<sup>128</sup> Hierbei wurden neben dem Epoxid Funktionalitäten, die durch ihre  $\pi$ -Orbitale Nachbargruppeneffekte ausüben können, eingeführt, die die benachbarte C-O-Bindung aktivieren. Aufbauend auf diesen Arbeiten wurden Sulfonyl-<sup>129</sup> oder Trimethylsilyl-Gruppen<sup>130</sup> zur Aktivierung der C-6-Position am Epoxid eingeführt. Des Weiteren kann eine Veränderung der Selektivität ohne Veränderung des Substrates durch Antikörper-Katalyse,<sup>131</sup> La(OTf)<sub>3</sub>-katalysierte Zyklisierungen<sup>132</sup> oder durch eine Reagenzkontrolle<sup>133</sup> bewirkt werden. KANEMOTO *et al.* zeigten ein Beispiel, bei dem die Aktivierung durch ein  $\pi$ -Orbital zum gewünschten Tetrahydropyranring führte (Schema 50).<sup>134</sup>



**Schema 50:** In der Literatur beschriebene Synthese eines Tetrahydropyranrings durch eine 6-*endo-tet*-Zyklisierung. a) PPTS, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 19 h.<sup>134</sup>

<sup>127</sup> Y. Kobayashi, S. Yoshida, M. Asano, A. Takeuchi, H. P. Acharya *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 1707-1716.

<sup>128</sup> K. C. Nicolaou, C. V. C. Prasad, P. K. Somers, C.-K. Hwang *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5330-5334.

<sup>129</sup> Y. Mori, K. Yaegashi, H. Furukawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8158-8159.

<sup>130</sup> T. P. Heffron, T. F. Jamison *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2339-2342.

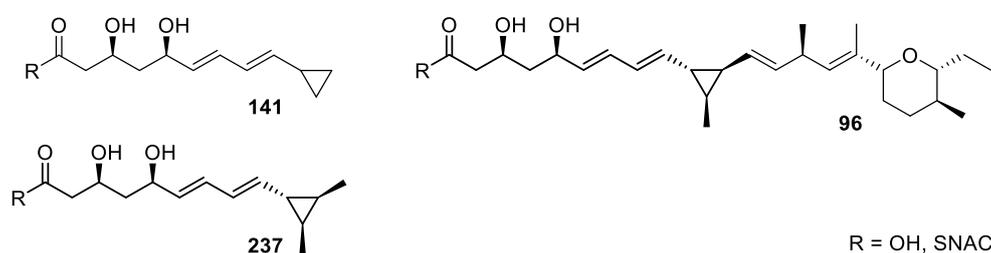
<sup>131</sup> K. D. Janda, C. G. Shevlin, R. A. Lerner *Science* **1993**, *259*, 490-493.

<sup>132</sup> T. Tokiwano, K. Fujiwara, A. Murai *Synlett* **2000**, 335-338.

<sup>133</sup> Y. Morimoto, Y. Nishikawa, C. Ueba, T. Tanaka *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 810-812.

<sup>134</sup> M. Kanemoto, M. Murata, T. Oishi *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8810-8813.

Da in bisherigen Experimenten keine Aktivität von AmbJ detektiert wurde, sollen die Bedingungen der Enzymreaktion weiter optimiert werden. Hierzu sollen die Konzentrationen der eingesetzten Kofaktoren variiert werden. Außerdem sollte getestet werden, ob eine höhere Konzentration von FAD in Bezug auf das Substrat beziehungsweise die Verwendung eines Regenerationssystems für FAD die Enzymreaktion beeinflussen kann. Des Weiteren soll ein Substrat synthetisiert und verwendet werden, das mehr dem Vorläufer von AmbJ entspricht (Abbildung 117). Um ausschließen zu können, dass eine PKS-Anbindung von Ambruticin J innerhalb der Biosynthese vorliegt, sollen die Substrate **141**, **237**, und **96** zusätzlich als SNAC-Thioester synthetisiert werden.



**Abbildung 117:** Mögliche Substrate für die Enzymumsetzungen mit AmbJ.

Für die Expressionsstudien mit den anderen *post*-PKS Enzymen AmbQ, AmbN, AmbR und AmbS sollten alle Gene in die vorliegenden pET-, pGEX- und pCold-Vektorsysteme ligiert werden und unter verschiedenen Bedingungen (Temperatur, Zeit, Medienzusätze) heterolog in *E. coli* produziert werden. Sollten die Fusionsproteine nur in nicht-löslicher Form vorliegen, sollten Detergenzien zur Solubilisierung verwendet werden. Hierbei wären z. B. Tween 20 oder *N*-Lauroylsarcosin zu nennen.

## Teil 3: Chemische und Biologische Methoden

---

# 11 Experimenteller Teil

---

## 11.1 Allgemeine Vorbemerkungen

### Reaktionen

Die Reaktionen, bei denen luft- und/oder feuchtigkeitsempfindliche Chemikalien verwendet wurden, wurden in zuvor ausgeheizten Apparaturen unter Argonatmosphäre durchgeführt. Die Spritzen und Kanülen wurden ebenfalls mit Argon gespült.

### Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographien wurden mit Kieselgel beschichteten Aluminiumfolien ALUGRAM Xtra G/UV<sub>254</sub> von MACHEREY-NAGEL durchgeführt. Die Indikation erfolgte durch Fluoreszenzdetektion mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 254$  nm sowie durch Benetzen der DC-Karten mit den Tauchlösungen Anisaldehyd und Kaliumpermanganat mit anschließendem Erhitzen.

### Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel der Firma MERCK (Korngröße 35-70  $\mu\text{m}$ , 60 Å) bei leichtem Überdruck durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel sind den Versuchsbeschreibungen zu entnehmen.

### Trockene Lösungsmittel und Reagenzien

Die Lösungsmittel wurden direkt trocken von den Firmen ACROS oder SIGMA-ALDRICH oder aus einer Lösungsmittel-Trocknungsanlage der Firma M. BRAUN bezogen. Alle Reagenzien stammen von den Firmen ACROS, SIGMA-ALDRICH, FLUKA, ABCR und ROTH.

### Deuterierte Lösungsmittel

d<sub>1</sub>-Chloroform, d<sub>4</sub>-Methanol und d<sub>6</sub>-Benzol wurden von der Firma DEUTERO GmbH bezogen.

### NMR-Spektren

Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden mit den Geräten DPX 200, Avance 400, DPX 400 und DRX 500 der Firma BRUKER aufgenommen. Die Signale wurden teilweise mit Hilfe der zweidimensionalen Methoden <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY, <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC und <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-*J*<sub>3</sub>-HMBC zugeordnet. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  werden in ppm, die jeweiligen Kopplungskonstanten *J* in Hz angegeben. Als Lösungsmittel wurden deuteriertes Chloroform, Methanol, Benzol oder Wasser eingesetzt. Die Signale, die durch den Restprotonengehalt der deuterierten Lösungsmittel entstanden sind, wurden zur Kalibrierung verwendet.

CDCl<sub>3</sub> :  $\delta = 7.26$  ppm

MeOD :  $\delta = 3.35$  ppm

C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> :  $\delta = 7.16$  ppm

D<sub>2</sub>O :  $\delta = 4.79$  ppm

CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> :  $\delta = 5.35$  ppm

Die Signalmultiplizitäten werden durch folgende Abkürzungen gekennzeichnet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, qt = Quintett m = Multiplett, dd = Dublett von Dubletts, dt = Dublett von Triplets, ddt = Dublett von Dubletts von Triplets, st = Sextett, bs = breites Singulett.

Die <sup>13</sup>C-NMR wurden Avance 400, DPX 400 und DRX 500 der Firma Bruker aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  werden in ppm angegeben. Als Lösungsmittel wurden deuteriertes Chloroform, Methanol oder Benzol eingesetzt. Zur Kalibrierung werden die folgenden Signale verwendet:

CDCl<sub>3</sub> :  $\delta = 77.16$  ppm

MeOD :  $\delta = 49.0$  ppm

$C_6D_6$  :  $\delta = 128.06$  ppm

$CD_2Cl_2$  :  $\delta = 53.40$  ppm

Die Signale werden durch folgende Abkürzungen gekennzeichnet: p = primär, s = sekundär, t = tertiär, q = quartär.

### Massenspektren

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden nach dem Elektronenspray-Verfahren (ESI) an einem MICROMASS LCT beziehungsweise einem MICROMASS LCT PREMIER mit Lock-Spray-Einheit der Firma WATERS aufgenommen. Injiziert wurden die Proben im Loop-Modus in einer HPLC-Anlage der Firma WATERS (Alliance 2695). Alternativ wird mit einem MICROMASS Q-TOF in Verbindung mit einer WATERS AQUITY UPLC-Anlage gemessen. Die berechneten und die gemessenen Massen werden angegeben.

### Drehwerte

Die spezifische Rotation  $[\alpha]$  wurde mit einem Polarimeter der Firma PERKIN-ELMER des Typs 210 gemessen. Dazu wurde eine Quarzglasküvette (Länge 10 cm) bei  $\lambda = 589$  nm (Natrium D-Linie) verwendet. Die Angabe der Drehwerte erfolgt in  $[\text{° mL g}^{-1} \text{ dm}^{-1}]$  mit einer Konzentration  $c = 1$  definitionsgemäß in 10 mg/mL Lösung. Als Lösungsmittel wurde  $CH_2Cl_2$  verwendet.

### HPLC

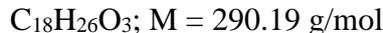
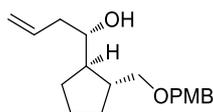
Für reversed phase-HPLC-Anwendungen wurden grundsätzlich Membran-filtriertes und danach bidestilliertes Wasser, sowie kommerziell verfügbare Lösungsmittel in HPLC-Qualität (Methanol oder Acetonitril) verwendet, die zuvor im Ultraschallbad entgast wurden. Präparative HPLC wurde an einer HPLC-Anlage der Firma MERCK HITACHI (Pumpe L-7150, Interface D-7000, Diode Array Detector L-7450) durchgeführt. Hierfür kam folgende stationäre Phase zur Anwendung: **(C18-SP)** TRENTEC Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 $\mu$ m, 250 mm \*  $\varnothing$  8 mm, entsprechender Vorsäulenkartusche, 40 mm \*  $\varnothing$  8 mm; **(CN-SP)**

TRENTEC Reprisil 100 CN 5 $\mu$ m, 250 nm \* Ø 8 mm, entsprechender Vorsäulenkartusche, 40 mm \* Ø 8 mm. Alternativ wurde präparative HPLC an einer VARIAN HPLC-Anlage (Pumpen Prepstar Model 218, Variabler Wellenlängendetektor Prostar ( $\lambda = 248$  nm) mit paralleler Massendetektion (MICROMASS Typ ZMD ESI-Quad-Spektrometer) unter Verwendung der stationären Phase C18-P<sub>[B]</sub> durchgeführt. Die verwendeten Elutionsprogramme und Retentionszeiten ( $t_R$ ) sind in den jeweiligen Versuchsvorschriften angegeben.

## 11.2 Versuchsdurchführungen Borrelidin

### 11.2.1 Darstellung des SNAC-Thioesters **80**

#### Alkohol **238**



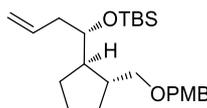
Aldehyd **85** (900 mg, 3.1 mmol, 1 eq.) wurde in  $CH_2Cl_2$  (70 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt.  $MgBr_2 \cdot Et_2O$  (930 mg, 3.1 mmol, 1 eq.) und TMS-Allyl (890  $\mu$ L, 4.7 mmol, 1.5 eq.) wurden unter Rühren zugefügt. Die Reaktionslösung wurde 16 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde Wasser (25 mL), Methanol (25 mL) und NaOH (25 mL) zugegeben und die Lösung weitere 15 min gerührt. Die wässrige Phase wurde mit  $CH_2Cl_2$  (1x 100 mL) und EtOAc (2x 100 mL) extrahiert und mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether/EtOAc 20:1, 10:1) gereinigt. Produkt **238** wurde als gelbes Öl in 42% Ausbeute (386 mg, 1.3 mmol) erhalten.

$R_f = 0.1$  (Petrolether/EtOAc 10:1);  $[\alpha]_D^{21} = -17.7$  ( $c = 0.5$ ,  $CH_2Cl_2$ );  $^1H$ -NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.22 – 7.28 (m, 2 H,  $CH(PMB)$ ), 6.86 – 6.90 (m, 2 H,  $CH(PMB)$ ), 5.87 – 6.07 (m, 1 H,  $CH_2=CH$ ), 5.08 – 5.15 (m, 1 H,  $CH_2=CH$ ), 5.04 – 5.06 (m, 1 H,  $CH_2=CH$ ), 4.49 (m, 2 H,  $CH_2(PMB)$ ), 3.81 (s, 3 H,  $OCH_3$ ), 3.32 – 3.46 (m, 2 H,  $CH_2OPMB$ ), 3.19 (dd,  $J_1 = 8.8$  Hz,  $J_2$

= 9.99 Hz, 1 H, *CHOH*), 2.03 – 2.18 (m, 2 H, *CH*<sub>2</sub>), 1.19 – 1.85 (m, 8 H, 3x *CH*<sub>2</sub>(Cyclopentan), 2x *CH*).

*Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.*<sup>40</sup>

### Silylether 239



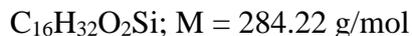
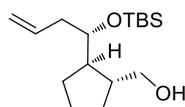
$C_{24}H_{40}O_3Si$ ;  $M = 404.27$  g/mol

Alkohol **238** (30 mg, 100  $\mu$ mol, 1 eq.) wurde in  $CH_2Cl_2$  (4 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Lutidin (16 mg, 18  $\mu$ L, 15  $\mu$ mol, 1.5 eq.) und TBSOTf (34 mg, 30  $\mu$ L, 130  $\mu$ mol, 1.3 eq.) wurden unter Rühren zugegeben und die Reaktion für zwei Stunden bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit ges.  $NaHCO_3$ -Lösung (4 mL) versetzt und die wässrige Phase mit  $CH_2Cl_2$  (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether/EtOAc 50:1) gereinigt. Produkt **239** wurde als gelbes Öl in 76% Ausbeute (30 mg, 74  $\mu$ mol) erhalten.

$R_f = 0.3$  (Petrolether/EtOAc 50:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.22 – 7.29 (m, 2 H, *ArH*), 6.83 – 6.91 (m, 2 H, *ArH*), 5.73 – 5.94 (m, 1 H, *CH*<sub>2</sub>=*CH*), 5.02 – 5.05 (m, 1 H, *CH*<sub>2</sub>=*CH*), 4.94 – 5.00 (m, 1 H, *CH*<sub>2</sub>=*CH*), 4.42 (d,  $J = 3.6$  Hz, 2 H, *CH*<sub>2</sub>(*PMB*)), 3.80 (s, 3 H, *O-CH*<sub>3</sub>), 3.59 – 3.67 (m, 1 H, *CH*<sub>2</sub>*OPMB*), 3.41 – 3.49 (m, 1 H, *CH*<sub>2</sub>*OPMB*), 3.16 (t,  $J = 8.9$  Hz, 1 H, *CHOTBS*), 2.08 – 2.34 (m, 3 H, 2x *CH*<sub>2</sub>, 1x *CH*), 1.46 – 1.73 (m, 7 H, 3x *CH*<sub>2</sub> (Cyclopentan), *CH*), 1.19 – 1.33 (m, 1 H, *CH*), 0.88 (s, 9 H,  $OSi(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), 0.04 (s, 6 H,  $OSi(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ).

*Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.*<sup>40</sup>

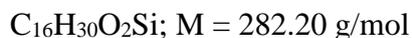
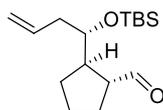
Alkohol 240



**239** (30 mg, 80  $\mu$ mol, 1 eq.) wurde in  $CH_2Cl_2$  (3.5 mL) vorgelegt. Unter Rühren wurden Phosphatpuffer (pH 7, 900  $\mu$ L),  $t$ BuOH (90  $\mu$ L) und DDQ (54 mg, 240  $\mu$ mol, 3 eq.) zugegeben und die Reaktion für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Diethylether (4 mL) zugefügt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Diethylether (2x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit  $H_2O$  (10 mL) und ges.  $NaHCO_3$ -Lösung (10 mL) gewaschen und über  $MgSO_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether/EtOAc 50:1) gereinigt. Alkohol **240** wurde als gelbes Öl in 90% Ausbeute (20 mg, 70  $\mu$ mol) erhalten.

$R_f = 0.2$  (Petrolether/EtOAc 50:1);  $^1H$ -NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  5.83 – 5.94 (m, 1 H,  $CH_2=CH$ ), 5.07 (bs, 1 H,  $CH_2=CH$ ), 5.03 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1 H,  $CH_2=CH$ ), 3.48 – 3.58 (m, 2 H,  $CH_2OH$ ), 3.33-3.38 (m, 1 H,  $CHOTBS$ ), 2.61 (bs, 1 H,  $OH$ ), 2.34 – 2.41 (m, 1 H,  $CH_2CHOTBS$ ), 2.19 – 2.27 (m, 1 H,  $CH_2CHOTBS$ ), 2.00-2.08 (m, 1 H,  $CHCH_2OH$ ), 1.80-1.88 (m, 1 H,  $CH_2CH_2CH$ ), 1.65-1.76 (m, 2 H,  $CH_2CHCH_2OH$ ), 1.53-1.61 (m, 1 H,  $CH_2CH_2CH$ ), 1.41-1.50 (m, 1 H,  $CH_2CH_2CH$ ), 1.16-1.37 (m, 3 H,  $CH_2CH_2CH$ ,  $CH_2CH_2CH$ ), 0.90 (s, 9 H,  $OSi(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), 0.09 (s, 6 H,  $OSi(CH_3)_2C(CH_3)_3$ );  $^{13}C$ -NMR-NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  134.0 (t,  $CH_2=CH$ ), 117.2 (s,  $CH_2=CH$ ), 76.2 (t,  $CHOTBS$ ), 67.2 (s,  $CH_2OH$ ), 47.7 (t,  $CH_2CH_2CH$ ), 43.8 (t,  $CHCH_2OH$ ), 40.0 ( $CH_2CHOTBS$ ), 31.6 (s,  $CH_2CH_2CH_2CH$ ), 30.8 (s,  $CH_2CH_2CH_2CH$ ), 30.0 (s,  $CH_2CH_2CH_2CH$ ), 26.0 (p,  $OSi(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), 18.1 (q,  $OSi(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), -4.3 (s,  $OSi(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ).

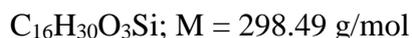
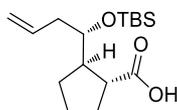
Aldehyd 241



Alkohol **240** (25 mg, 90  $\mu$ mol, 1 eq.) wurde in  $CH_2Cl_2$  (500  $\mu$ L) vorgelegt und DMP (59 mg, 14  $\mu$ mol, 1.5 eq.) zugegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde gerührt und anschließend mit einem 1:1 Gemisch aus ges.  $NaHCO_3$ - und 1.5M  $Na_2S_2O_3$ -Lösung versetzt. Die Reaktionsmischung wurde gerührt bis eine klare Lösung entstand. Anschließend wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Diethylether (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit Wasser (10 mL) und ges. NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen und über  $MgSO_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und Produkt **241** als gelbes Öl in 85% Ausbeute (22 mg, 88  $\mu$ mol) erhalten, das ohne weitere Reinigung in die nächste Stufe eingesetzt wurde.

$R_f = 0.3$  (Petrolether/EtOAc 50:1);  $^1H$ -NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9.62 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1 H, CHO), 5.73 – 5.94 (m, 1 H,  $CH_2=CH$ ), 5.07 - 5.10 (m, 1 H,  $CH_2=CH$ ), 4.98 – 5.05 (m, 1 H,  $CH_2=CH$ ), 3.63 – 3.71 (m, 1 H, CHOTBS), 2.66 – 2.79 (m, 1 H, CHCHO), 2.20 – 2.46 (m, 2 H,  $CH_2$ ), 1.19 – 1.93 (m, 8 H, 3x  $CH_2$  (Cyclopentan), 2x CH), 0.88 (s, 9 H,  $OSi(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ), 0.07 (s, 6 H,  $OSi(CH_3)_2C(CH_3)_3$ ).

Carbonsäure 242

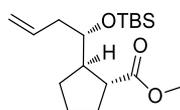


Aldehyd **241** (1.1 g, 3.89 mmol, 1 eq.) wurde in  $t$ BuOH (80 mL) und 2-Methyl-2-buten (20 mL) gelöst. Unter Rühren wurde Natriumchlorit (2.82 g, 31.15 mmol, 8 eq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde nach Zugabe eines Phosphatpuffers (15 mL, pH = 7) für 16 h gerührt.  $t$ BuOH wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit Wasser (160 mL) versetzt und die wässrige Phase mit EtOAc (3x 160 mL) extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter

vermindertem Druck entfernt. Säure **242** wurde als gelbliches Öl in 88% Ausbeute (1.02 g, 3.43 mmol) erhalten.

$R_f = 0.5$  (Petrolether/EtOAc 9:1);  $[\alpha]_D^{22} = -5.8$  ( $c = 1.2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ );  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$  5.79 – 5.90 (m, 1 H,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 5.04–5.07 (m,  $J_2 = 10.6$  Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 5.02 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 3.70 – 3.74 (m, 1 H,  $\text{CHOTBS}$ ), 2.68 – 2.74 (m, 1 H,  $\text{CHCOOH}$ ), 2.46 – 2.53 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHCOOH}$ ), 2.19 – 2.34 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CHOTBS}$ ), 1.87 – 1.96 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHCOOH}$ ), 1.74 – 1.83 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CHCOOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.63 – 1.69 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.42 – 1.47 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 0.91 (s, 9 H,  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.09 (s, 6 H,  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, MeOD)  $\delta$  181.1 (q,  $\text{COOH}$ ), 136.2 (t,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 117.7 (s,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 76.2 (t,  $\text{CHOTBS}$ ), 49.0 (t,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 46.4 (t,  $\text{CHCOOH}$ ), 41.5 (s,  $\text{CH}_2\text{CHOTBS}$ ), 33.3 (s,  $\text{CH}_2\text{CHCOOH}$ ), 31.1 (s,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 27.2 (s,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 26.6 (p,  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.1 (q,  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), -3.7 (p,  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), -4.4 (p,  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

### Methylester **86**



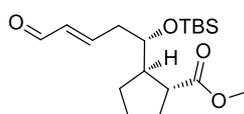
$\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{Si}$ ;  $M = 312.52$  g/mol

**242** (1.02 g, 3.43 mmol, 1 eq.) wurde in Toluol/Methanol (1:3.5; 7 mL) gelöst und unter Rühren  $\text{TMSCH}_2\text{N}_2$  (2.23 mL, 4.46 mmol, 2 M in  $\text{Et}_2\text{O}$ ) tropfenweise zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether/EtOAc 10:1) gereinigt. Produkt **86** wurde als farbloses Öl in 88% Ausbeute (936 mg, 2.99 mmol) erhalten.

$R_f = 0.54$  (Petrolether/EtOAc 9:1);  $[\alpha]_D^{21} = +0.8$  ( $c = 0.6$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ );  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.74 – 5.85 (m, 1 H,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 5.03 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1 H,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 4.98–5.02 (m, 1 H,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 3.64 – 3.66 (m, 1 H,  $\text{CHOTBS}$ ), 3.65 (s, 3 H,  $\text{COOCH}_3$ ), 2.73 – 2.79 (m, 1 H,  $\text{CHCOOCH}_3$ ), 2.45 – 2.52 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 2.20 – 2.24 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CHOTBS}$ ), 1.82 – 1.91 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHCOOCH}_3$ ), 1.72 – 1.80 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CHCOOCH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.59 – 1.66 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.35 – 1.44 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 0.87 (s, 9 H,  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.06 (s, 3 H,  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.05 (s, 3 H,  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ );  $^{13}\text{C-}$

**NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 178.1 (q, COOCH<sub>3</sub>), 135.3 (t, CH<sub>2</sub>=CH), 117.2 (t, CH<sub>2</sub>=CH), 74.9 (t, CHOTBS), 51.9 (p, COOCH<sub>3</sub>), 47.8 (t, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 44.8 (t, CHCOOCH<sub>3</sub>), 40.8 (s, CH<sub>2</sub>CHOTBS), 32.5 (s, CH<sub>2</sub>CHCOOCH<sub>3</sub>), 30.2 (s, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 26.2 (s, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 26.0 (p, OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.5 (q, OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -3.9 (p, OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.5 (p, OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>NaSi [M+Na]<sup>+</sup>: 335.2018, gefunden: 335.2020.

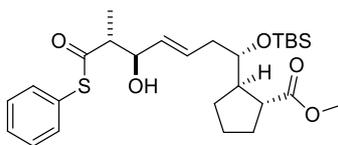
α,β-ungesättigter Aldehyd **87**



C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>Si; M = 340.21 g/mol

Olefin **86** (200 mg, 640 μmol, 1 eq.) wurde in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) vorgelegt und unter Rühren mit Crotonaldehyd (1.13 g, 1.30 mL, 25 eq.) versetzt. Nach der Zugabe von Grubbs II (27 mg, 32 μmol, 5 mol%) wurde die Reaktionsmischung für zwei Stunden auf Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Petrolether/EtOAc 9:1) gereinigt. Aldehyd **38** wurde als braunes Öl in 88% Ausbeute (192 mg, 0.57 mmol) erhalten. Wegen der Oxidationsempfindlichkeit von **87** wurde dieses sofort weiter eingesetzt und lediglich per <sup>1</sup>H-NMR auf seine Reinheit überprüft.

**R<sub>f</sub>** = 0.33 (Petrolether/EtOAc 9:1); **<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.51 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, HCO), 6.89 (dt, *J*<sub>1</sub> = 7.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 15.6 Hz, 1 H, HC(O)CH), 6.05-6.18 (m, 1 H, HC(O)CHCH), 3.76 – 3.86 (m, 1 H, CHOTBS), 3.65 (s, 3 H, COOCH<sub>3</sub>), 2.67 – 2.78 (m, 1 H, CHCOOCH<sub>3</sub>), 2.39 – 2.55 (m, 3 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH, CH<sub>2</sub>CHOTBS), , 1.57 – 1.97 (m, 6 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH, CH<sub>2</sub>CHCOOCH<sub>3</sub>), 0.88 (s, 9 H, OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.07 (s, 3 H, OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.06 (s, 3 H, OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

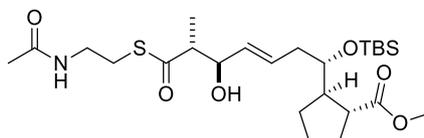
Thiophenolester **88**

Dicyclohexylborchlorid (200  $\mu\text{L}$ , 192  $\mu\text{mol}$ , 3 eq., 1 M in Hexan) wurde in Diethylether (5 mL) vorgelegt und auf  $-78^\circ\text{C}$  gekühlt. Dimethylethylamin (17 mg, 25  $\mu\text{L}$ , 230  $\mu\text{mol}$ , 3.6 eq.) und Phenylthiopropionat (22 mg, 130  $\mu\text{mol}$ , 2 eq.) wurden unter Rühren zugegeben und die Reaktionsmischung für zwei Stunden bei  $0^\circ\text{C}$  gerührt. Die Lösung wurde bei  $-78^\circ\text{C}$  mit Aldehyd **87** (26 mg, 64  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) versetzt und zwei Stunden bei  $-78^\circ\text{C}$  gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 18 h bei  $-20^\circ\text{C}$  im Gefrierschrank gelagert. Die Reaktionslösung wurde mit Methanol (2 mL), pH 7 Puffer (2 mL) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (35%, 2 mL) versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x 10 mL) extrahiert und die vereinigten, organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 100:1, Petrolether/EtOAc 50:1, Petrolether/EtOAc 20:1) gereinigt. Produkt **88** (50 mg, 98.8  $\mu\text{mol}$ ) wurde als Diastereomerengemisch in 57% Ausbeute erhalten.

$R_f = 0.17$  (Petrolether/EtOAc 9:1);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.42 (s, 5 H,  $\text{CH}(\text{ar})$ ), 5.68-5.77 (m, 1 H,  $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}$ ), 5.42-5.42 (m, 1 H,  $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}$ ), 4.26 (dd,  $J_1 = 7.5 \text{ Hz}$ ,  $J_2 = 7.5 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{CHOH}$ ), 3.64-3.69 (m, 1 H,  $\text{CHOTBS}$ ), 3.66 (s, 3 H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.87 (dq,  $J_1 = 7.5 \text{ Hz}$ ,  $J_2 = 7.0 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 2.73-2.79 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 2.44-2.51 (m, 1 H,  $\text{CHCOOCH}_3$ ), 2.22-2.26 (m, 1 H,  $\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ), 1.83-1.92 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHCOOCH}_3$ ), 1.71-1.82 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHCOOCH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.59-1.66 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.35-1.44 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.24 (d,  $J = 7.0 \text{ Hz}$ , 3 H,  $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 0.88 (s, 9 H,  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.06 (s, 3 H,  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.05 (s, 3 H,  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  201.3 (q, 1 C,  $\text{SCO}$ ), 177.7 (q, 1 C,  $\text{COOCH}_3$ ), 134.4 (t, 2 C,  $\text{ArC}$ ), 132.3 (t, 1 C,  $\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ), 130.2 (t, 1 C,  $\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ), 129.4 (t, 2 C,  $\text{ArC}$ ), 129.2 (t, 1 C,  $\text{ArC}$ ), 127.5 (q, 1 C,  $\text{ArC}$ ), 75.1 (t, 1 C,  $\text{CHOH}$ ), 74.4 (t, 1 C,  $\text{CHOTBS}$ ), 53.7 (t, 1 C,  $\text{CH}_3\text{CH}$ ), 51.7 (p, 1 C,  $\text{COOCH}_3$ ), 47.2 (t, 1 C,  $\text{CHCOOCH}_3$ ), 44.4 (t, 1 C,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 38.9 (s, 1 C,  $\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ), 32.1 (s, 1 C,  $\text{CH}_2\text{CHCOOCH}_3$ ), 30.1 (s, 1 C,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 26.1 (s, 1 C,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 25.9 (p, 3 C,  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 18.0 (q, 1 C,  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 15.0 (p, 1 C,  $\text{CH}_3\text{CH}$ ), -4.1 (p, 1

C, OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.7 (p, 1 C, OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>5</sub>SSiNa [M+Na]<sup>+</sup>: 529.2420, gefunden: 529.2422.

### SNAC-Thioester **89**



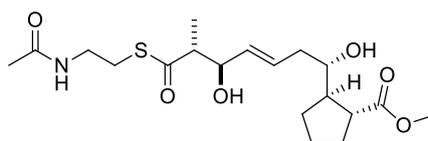
C<sub>25</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>6</sub>SSi; M = 515.27 g/mol

Thiophenolester **88** (10 mg, 20 μmol, 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in DMF (1 mL) vorgelegt und mit DIPEA (4 μL, 2.56 mg, 20 μmol, 1 eq.) und HSNAC (4 μL, 4.7 mg, 40 μmol, 2 eq.) versetzt. Die Reaktion wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde ges. NaCl-Lösung (5 mL) zugegeben und die Reaktionsmischung weitere 5 min gerührt. Die wässrige Phase wurde mit Ether (3x 5 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt per HPLC (C18-ISIS) (H<sub>2</sub>O:MeOH = 80:20 {10 min}, Gradient H<sub>2</sub>O:MeOH = 80:20 → 45:55 {30 min}, Gradient H<sub>2</sub>O:MeOH = 45:55 → 20:80 {25 min}, Gradient H<sub>2</sub>O:MeOH = 20:80 → 10:90 {30 min}, Gradient H<sub>2</sub>O:MeOH = 10:90 → 0:100 {5 min}, 2.5 mL/min → 3.5 mL/min) gereinigt. **89** wurde als farbloses Öl in 70% Ausbeute (t<sub>R</sub> = 72.5 min, 7.2 mg, 14 μmol) erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.93-6.01 (m, 1 H, NH), 5.69-5.79 (m, 1 H, CH=CHCH<sub>2</sub>), 5.37-5.47 (m, 1 H, CH=CHCH<sub>2</sub>), 4.22-4.26 (m, 1 H, CHOH), 3.67-3.71 (m, 1 H, CHOTBS), 3.68 (d, *J* = 5.6 Hz, 1 H, OMe), 3.42-3.56 (m, 2 H, NHCH<sub>2</sub>), 3.04-3.14 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>S), 2.75-2.81 (m, 2 H, CHCH<sub>3</sub>, CHCOOH), 2.45-2.51 (m, 1 H, CH), 2.20-2.30 (m, 1 H, OH), 1.98 (s, 3 H, CHCH<sub>3</sub>), 1.88-1.95 (m, 1 H, 1x CH<sub>2</sub>CHCOOH), 1.73-1.82 (m, 2 H, 1x CH<sub>2</sub>CHCOOH, 1x CH<sub>2</sub>CH), 1.63-1.68 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 1.37-1.45 (m, 1 H, 1x CH<sub>2</sub>CH), 1.16 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H, CH<sub>3</sub>CO), 0.90 (s, 9 H, OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.08 (dd, *J*<sub>1</sub> = 2.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.7 Hz, 6 H, OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 203.4 (q, 1 C, SCO), 177.8 (q, 1 C, COOCH<sub>3</sub>), 170.4 (q, 1 C, CH<sub>3</sub>CONH), 132.4 (t, 1 C, CH=CHCH<sub>2</sub>), 130.5 (t, 1 C, CH=CHCH<sub>2</sub>), 75.4 (t, 1 C, CHOTBS), 74.2 (t, 1 C, CHOH), 54.1 (t, 1 C, CHCH<sub>3</sub>), 51.6 (p, 1 C, OMe), 47.2 (t, 1 C, CHCOOH), 44.5 (t, 1 C, CH), 39.4 (s, 1 C, NHCH<sub>2</sub>), 38.8 (s, 1 C, CH=CHCH<sub>2</sub>), 32.1 (s, 1 C, CH<sub>2</sub>CHCOOH), 30.2 (s, 1 C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 26.1 (s, 1 C, CH<sub>2</sub>S),

25.8 (p, 3 C, OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 23.3 (s, 1 C, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 18.0 (q, 1 C, OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 15.0 (p, 1 C, CHCH<sub>3</sub>), -4.1 (p, 2 C, OSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>46</sub>NO<sub>6</sub>SSi [M+H]<sup>+</sup>: 516.2815, gefunden: 516.2820.

### Thioester 243

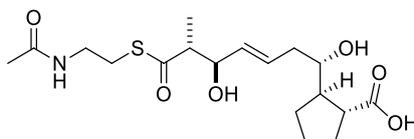


C<sub>19</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>6</sub>S; M = 401.19 g/mol

SNAC-Thioester **89** (30 mg, 58 μmol) wurde mit einer Mischung aus THF : HCOOH : H<sub>2</sub>O (6:3:1, 2 mL) versetzt und bei Raumtemperatur für 48 h gerührt. Anschließend wurde ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (5 mL) zugegeben und die wässrige Phase mit EtOAc (3x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mit Toluol kdestilliert und direkt in die nächste Stufe eingesetzt.

**HRMS (ESI)** *m/z* berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>6</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 402.1950, gefunden: 402.1936.

### SNAC-Thioester 80



C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub>S; M = 387.17 g/mol

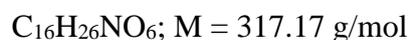
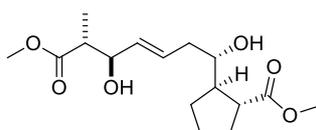
Methylester **243** (22 mg, 57.4 μmol) wurde in Phosphatpuffer (2 mL, pH 8) vorgelegt und mit Schweineleberesterase (100 units) versetzt. Die Reaktion wurde 5 d gerührt und per LC-MS verfolgt. Anschließend wurde die wässrige Phase mit EtOAc (3x 1.5 mL) sowie EtOAc/*iso*-Propanol (3:1, 1.5 mL) extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde per präparativer HPLC (C<sub>18</sub>-ISIS) (H<sub>2</sub>O:Acetonitril = 80:20 {10 min}, Gradient H<sub>2</sub>O:Acetonitril = 80:20 → 0:100 {80 min}, H<sub>2</sub>O:Acetonitril = 0:100 {10 min}),

15 mL/min) gereinigt. **80** wurde als farbloses Öl in 81% Ausbeute (18 mg, 46.5  $\mu$ mol,  $t_R$  = 40.0 min) erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  6.07 (bs, 1 H, NH), 5.72-5.81 (m, 1 H,  $\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ), 5.65 (dd,  $J_1 = 15.4$  Hz,  $J_2 = 6.5$  Hz, 1 H,  $\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ), 4.24-4.31 (m, 1 H,  $\text{CHOH}$ ), 3.53-3.60 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CHOH}$ ), 3.38-3.48 (m, 2 H,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.04-3.11 (m, 1 H, 1x  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 2.93-3.01 (m, 1 H, 1x  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 2.84-2.90 (m, 1 H,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.75-2.81 (m, 1 H,  $\text{CHCOOH}$ ), 2.44-2.51 (m, 1 H, 1x  $\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ), 2.05-2.24 (m, 3 H, 1x  $\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ,  $\text{CH}$ , 1x  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.97 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1.80-1.92 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CHCOOH}$ ), 1.58-1.74 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.26-1.34 (m, 1 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 1.22 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3 H,  $\text{CHCH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  203.0 (q, 1 C,  $\text{SCO}$ ), 176.6 (q, 1 C,  $\text{COOH}$ ), 171.2 (q, 1 C,  $\text{CH}_3\text{CONH}$ ), 134.2 (t, 1 C,  $\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ), 128.4 (t, 1 C,  $\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ), 75.9 (t, 1 C,  $\text{CH}_2\text{CHOH}$ ), 74.8 (t, 1 C,  $\text{CHOH}$ ), 54.2 (t, 1 C,  $\text{CHCH}_3$ ), 48.9 (t, 1 C,  $\text{CH}$ ), 48.2 (t, 1 C,  $\text{CHCOOH}$ ), 39.1 (s, 1 C,  $\text{NHCH}_2$ ), 38.9 (s, 1 C,  $\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ), 30.6 (s, 1 C,  $\text{CH}_2\text{CHCOOH}$ ), 29.3 (s, 1 C,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 28.8 (s, 1 C,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ), 25.7 (s, 1 C,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$ ), 22.9 (p, 1 C,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 14.0 (p, 1 C,  $\text{CHCH}_3$ ); **HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NO}_6\text{SNa}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 410.1613, gefunden: 410.1653.

### 11.2.2 Versuchsvorschrift für die Testreaktion aus Kapitel 5.3

#### Bis-Methylester *E,E*-81



SNAC-Thioester **80** (0.5 mg, 1.3  $\mu$ mol) wurde in THF (0.1 mL) und Wasser (0.1 mL) gelöst und mit 0.5 M NaOH (0.1 mL) versetzt. Die Reaktion wurde 15 min bei Raumtemperatur gerührt und mit Salzsäure neutralisiert. Im Anschluss wurde die Lösung in der SPEEDVAC (65  $^\circ\text{C}$ ) bis zur Trockne eingengt und anschließend in Toluol/MeOH (3.5/1) aufgenommen. TMS-Diazomethan (0.1 mL, 2M in  $\text{Et}_2\text{O}$ ) wurde zugegeben und die Reaktion für 15 min gerührt.

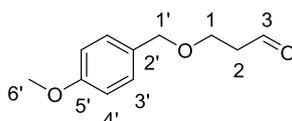
Die Reaktion wurde per LC-MS verfolgt.

**HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $C_{16}H_{26}NO_6Na$   $[M+Na]^+$ : 337.1627, gefunden: 337.1629.

## 11.3 Versuchsdurchführungen Ambruticin

### 11.3.1 Enantioselektive Synthese

Aldehyd 147<sup>91</sup>



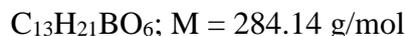
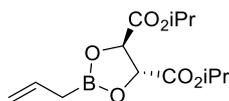
$C_{11}H_{14}O_3$ ;  $M = 194.09$  g/mol

DMSO (3.8 mL, 4.0 g, 52.9 mmol, 5.2 eq.) wurde in trockenem Dichlormethan (50 mL) vorgelegt und auf  $-60$  °C gekühlt. Oxalylchlorid (2.1 mL, 3.1 g, 24.5 mmol, 2.4 eq.) wurde über einen Zeitraum von 7 min zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 30 min bei  $-60$  °C gerührt. Nachdem Alkohol **145** (2 g, 10 mmol, 1 eq.) zugegeben wurde, wurde die Reaktion 90 min bei  $-60$  °C gerührt und im Anschluss mit DiPEA (11.4 mL, 8.6 g, 67.0 mmol, 6.7 eq.) beendet. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur aufgewärmt und mit dest. Wasser (100 mL) versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 5:1) gereinigt. Aldehyd **147** (1.4 g, 72.1 mmol) wurde als gelbes Öl in 72% Ausbeute erhalten.

$R_f = 0.67$  (Petrolether/EtOAc 2:1);  $^1H$ -NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9.79 (t,  $J = 1.9$  Hz, 1 H, H-3), 7.22 – 7.27 (m, 2 H, H-3'), 6.84 – 6.92 (m, 2 H, H-4'), 4.46 (s, 2 H, H-1'), 3.80 (s, 3 H, H-6'), 3.75-3.82 (t, 2 H, H-1), 2.68 (dt,  $J_1 = 6.1$  Hz,  $J_2 = 1.9$  Hz, 2 H, H-2); **HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $C_{11}H_{14}O_3Na$   $[M+Na]^+$ : 217.0841, gefunden: 217.0839.

*Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur gefundenen Daten überein.*<sup>91</sup>

**Boronat 154**<sup>92</sup>



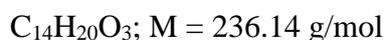
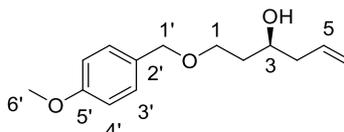
Trockener Diethylether (25 mL) wurde auf  $-78$  °C gekühlt und Allylmagnesiumbromid (26 mL, 25.9 mmol, 0.9 eq., 1 M in  $Et_2O$ ) und Trimethylborat (3 g, 28.9 mmol, 1 eq.) gelöst in Diethylether (25 mL) simultan über einen Zeitraum von 30 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei  $-78$  °C gerührt und im Anschluss auf Raumtemperatur erwärmt. Nach der Zugabe von vorgekühlter Salzsäure (27 mL, 2 M) wurde die Reaktionslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wurde mit einem Gemisch aus Diethylether und Dichlormethan (5:1) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $MgSO_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt (nicht bis zur Trockene) und Allylboronsäure als gelbe Lösung erhalten.

Allylboronsäure wurde in Diethylether (40 mL) vorgelegt und mit L-(+)-DIT (3.9 mL, 4.3 g, 18.2 mmol, 0.7 eq. bezogen auf Allylmagnesiumbromid) versetzt. Die Reaktion wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt und 1 g  $MgSO_4$  zugegeben. Das Lösungsmittel wurde unter Luftausschluss im Vakuum entfernt und der Rückstand im Hochvakuum destilliert. Produkt **43** wurde als farbloses Öl in 33% Ausbeute (1.7 g, 5.9 mmol) über zwei Stufen erhalten und ohne Charakterisierung direkt in den Folgereaktionen eingesetzt.

**Sdp.** =  $115$  °C, 0.4 mbar

*Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur gefundenen Daten überein.*<sup>92</sup>

**Alkohol 155**<sup>93</sup>



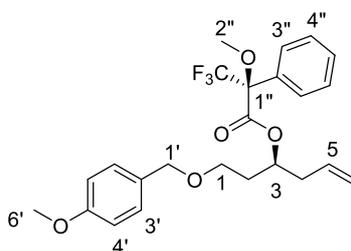
Boronat **154** (109.8 mg, 0.38 mmol, 1.5 eq.) wurde in trockenem Toluol (0.5 mL) vorgelegt und mit 4Å Molsieb (50 mg) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde auf  $-87$  °C gekühlt und

Aldehyd **147** gelöst in 0.5 mL Toluol per Spritzenpumpe (0.5 mL/h) zugegeben. Die Reaktion wurde für 16 h bei  $-87\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt und durch Zugabe von 1 M NaOH (10 mL) und Diethylether (10 mL) beendet. Die Lösung wurde für weitere 30 min gerührt und auf Raumtemperatur erwärmt. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase mit Diethylether (3x 10 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 5:1) gereinigt. Alkohol **155** (44 mg, 0.19 mmol) wurde als farbloses Öl in 72% Ausbeute und 68% *ee* erhalten.

$R_f = 0.25$  (Petrolether/EtOAc 4:1);  $[\alpha]_D^{25} = -2.6$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.25 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2 H, H-3'), 6.88 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2 H, H-4'), 5.78-5.88 (m, 1 H, H-5), 5.09-5.13 (m, 1 H, H-6a), 5.08-5.09 (m, 1 H, H-6b), 4.45 (s, 2 H, H-1'), 3.83-3.89 (m, 1 H, H-3), 3.80 (s, 3 H, H-6'), 3.67-3.72 (m, 1H, H-1a), 3.59-3.64 (m, 1 H, H-1b), 2.89 (bs, 1 H, OH), 2.24 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2 H, H-4), 1.72-1.77 (m, 2 H, H-2);  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159.25 (q, C-5'), 134.88 (t, C-5), 130.03 (s, C-2'), 129.34 (q, C-3'), 128.62 (s, C-3'), 117.50 (s, C-6), 113.83 (s, C-4'), 72.94 (s, C-1'), 70.46 (t, C-3), 68.64 (s, C-1), 55.26 (p, C-6'), 41.89 (s, C-4), 35.81 (s, C-2); **HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_3\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 259.1310, gefunden: 259.1308.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur gefundenen Daten überein.<sup>93</sup>

### MOSHER-Ester **156**<sup>92</sup>



$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{O}_5$ ;  $M = 452.18$  g/mol

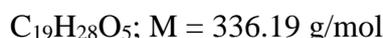
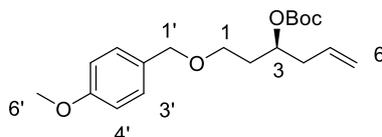
(S)-MTPA (10  $\mu\text{L}$ , 7.1 mg, 0.03 mmol, 3.0 eq.) wurde in trockenem Toluol (0.2 mL) vorgelegt und auf  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Triethylamin (10  $\mu\text{L}$ , 14.3 mg, 0.14 mmol, 3.3 eq.), Trichlorbenzoyl-chlorid (10  $\mu\text{L}$ , 6.5 mg, 0.03 mmol, 3.0 eq.) und DMAP (14 mg, 0.11 mmol, 3.3 eq.) wurden zugegeben und die Reaktionsmischung für 5 min gerührt. Nach der Zugabe von Alkohol **155** gelöst in Toluol (0.2 mL) wurde die Reaktion bei Raumtemperatur für 16 h

gerührt und mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung beendet. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Diethylether (3x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 50:1  $\rightarrow$  25:1) gereinigt und **156** (5 mg, 0.011 mmol) als farbloses Öl in 52% Ausbeute und mit einem *d.r.* von 6.25:1 erhalten.

$R_f = 0.23$  (Petrolether/EtOAc 8:1);  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.51-7.56 (m, 2 H, H-3''/H-4''), 7.35-7.40 (m, 2 H, H-3''/H-4''), 7.21-7.27 (m, 2 H, H-3'), 6.86-6.89 (m, 2 H, H-4'), 5.71-5.81 (m, 1 H, H-5), 5.33-5.39 (m, 2 H, H-3, H-6a), 5.08-5.11 (m, 1 H, H-6b), 4.32 (d,  $J = 5.6$  Hz, 1 H, H-1'), 3.80 (s, 3 H, H-6'), 3.54 (s, 3 H, H-2''), 3.34-3.38 (m, 2 H, H-1a), 3.23-3.31 (m, 2 H, H-1b), 2.43-2.46 (m, 2 H, H-4), 1.82-1.95 (m, 2 H, H-2).

*Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur gefundenen Daten überein.*<sup>93</sup>

### Carbonat **157**



### Methode A:

Alkohol **156** (300 mg, 1.27 mmol, 1.0 eq.) wurde in trockenem Dichlormethan (2 mL) vorgelegt. DMAP (3.1 mg, 0.025 mmol, 0.02 eq.),  $\text{Et}_3\text{N}$  (70  $\mu\text{L}$ , 51 mg, 5.1 mmol, 0.4 eq.) und  $\text{Boc}_2\text{O}$  (400  $\mu\text{L}$ , 414 mg, 1.9 mmol, 1.5 eq.) wurden zugegeben und die Reaktionsmischung für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von dest. Wasser beendet und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3x 5 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 9:1) gereinigt. Produkt **157** wurde als farbloses Öl in 42% Ausbeute (177 mg, 0.53 mmol) erhalten.

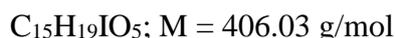
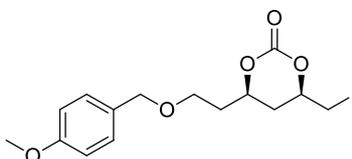
Methode B:

Alkohol **156** (1 g, 4.23 mmol, 1.0 eq.) wurde in trockenem THF (20 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Nachdem NaHMDS-Lösung (2.75 mL, 5.5 mmol, 1.3 eq., 2M in THF) langsam zugetropft wurde, wurde die Reaktionslösung für 30 min bei 0 °C gerührt. Nach der Zugabe von Boc<sub>2</sub>O (1.2 mL, 1.2 g, 5.5 mmol, 1.3 eq.) wurde die Reaktionsmischung für weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NaCl-Lösung beendet und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit einem 1:1-Gemisch aus Diethylether und Petrolether (3x 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 9:1) gereinigt. Produkt **157** wurde als farbloses Öl in quantitativer Ausbeute (1.39 g, 4.13 mmol) erhalten.

$R_f = 0.55$  (Petrolether/EtOAc 9:1);  $[\alpha]_D^{25} = +18.5$  ( $c = 1$ , CHCl<sub>3</sub>); **<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.23-7.27 (m, 3 H, H-3'), 6.85-6.89 (m, 3 H, H-4'), 5.73-5.83 (m, 1 H, H-5), 5.05-5.12 (m, 2 H, H-6), 4.88 (qt,  $J_I = 6.4$  Hz, 1 H, H-3), 4.42 (s, 2 H, H-1'), 3.80 (s, 3 H, H-6'), 3.45-3.54 (m, 2 H, H-1), 2.37 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2 H, H-4), 1.88 (q,  $J_I = 6.36$  Hz, 2 H, H-2), 1.47 (s, 9 H, Boc); **<sup>13</sup>C NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  159.13 (q, C-5'), 153.20 (q, Boc), 133.37 (t, H-5), 130.44 (q, C-2'), 129.27 (t, C-3'), 117.95 (s, C-6), 113.76 (t, C-4'), 73.88 (t, C-3), 72.74 (s, C-1'), 66.18 (s, C-1), 55.25 (p, C-6'), 38.93 (s, C-4), 33.86 (s, C-2), 27.78 (p, Boc).

*Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur gefundenen Daten überein.*<sup>96</sup>

Iodid **158**

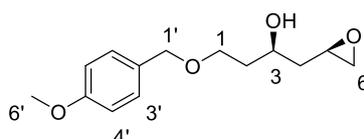


Carbonat **157** (1 g, 2.97 mmol, 1.0 eq.) wurde in trockenem Toluol (15 mL) vorgelegt und auf -78 °C gekühlt. Unter Lichtausschluss wurde eine IBr-Lösung (4.5 mL, 4.45 mmol, 1.5 eq., 1 M in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) zugetropft und die Reaktionslösung vier Stunden bei -78 °C gerührt. Eine 1:1-Mischung aus ges. NaHCO<sub>3</sub>- und Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung (50 mL) wurde zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Et<sub>2</sub>O (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen

Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Auf Grund der Zersetzung von Iodid **158** an Kieselgel wurde das Produkt ohne Charakterisierung direkt weiter eingesetzt.

**HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{IO}_5\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 429.0175, gefunden: 429.0175.

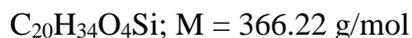
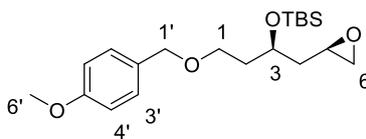
### Epoxid **159**



$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_4$ ;  $M = 252.14$  g/mol

Iodid **158** (30 mg, 0.07 mmol, 1.0 eq.) wurde in trockenem Methanol (0.6 mL) vorgelegt und auf  $0\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Kaliumcarbonat (34 mg, 0.22 mmol, 3.0 eq.) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung unter langsamen aufwärmen auf Raumtemperatur für 16 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von dest. Wasser (2 mL) beendet, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x 5 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 1:1) gereinigt und Produkt **159** (7.3 mg, 0.03 mmol) als farbloses Öl in 43% Ausbeute erhalten.

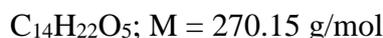
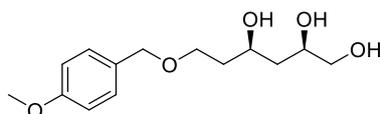
$R_f = 0.35$  (Petrolether/EtOAc 1:1);  $[\alpha]_D^{24} = -3.0$  ( $c = 0.7$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.23-7.26 (m, 2 H, H-3'), 6.86-6.89 (m, 2 H, H-4'), 4.46 (s, 2 H, H-1'), 4.02-4.09 (bs, 1 H, H-3), 3.80 (s, 3 H, H-6'), 3.68-3.73 (m, 1 H, H-1a), 3.61-3.68 (m, 1 H, H-1b), 3.07-3.12 (m, 1 H, H-5), 2.77 (t,  $J_1 = 4.6$  Hz, 1 H, H-6a), 2.50 (dd,  $J_1 = 2.7$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz, 1 H, H-6b), 1.81-1.90 (m, 1 H, H-2a), 1.80-1.81 (m, 1 H, H-2b), 1.75-1.80 (m, 1 H, H-4a), 1.72-1.75 (m, 1 H, H-4b);  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159.28 (q, C-5'), 129.90 (q, C-2'), 129.32 (t, C-3'), 113.85 (t, C-4'), 73.00 (s, C-1'), 69.63 (t, C-3), 68.64 (s, C-1), 55.26 (p, C-6'), 49.95 (t, C-5), 46.62 (s, C-6), 39.79 (s, C-4), 36.28 (s, C-2); **HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 275.1259, gefunden: 275.1258.

**Epoxid 160**

Alkohol **159** (50 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq.) wurde in trockenem THF (2 mL) vorgelegt. Pyridin (80  $\mu\text{L}$ , 79 mg, 1.0 mmol, 5.0 eq.) und Silbernitrat (51 mg, 0.3 mmol, 1.5 eq.) wurden zugegeben und die Suspension bei Raumtemperatur für 10 min gerührt. Nachdem TBSCl (53 mg, 0.35 mmol, 1.75 eq.) zugegeben wurde, wurde die Reaktion weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat mit dest. Wasser (4 mL) versetzt. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase mit Diethylether (3x 10 mL) extrahiert und die vereinten organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 9:1) gereinigt. Produkt **160** (43 mg, 0.12 mmol) konnte als farbloses Öl in 59% Ausbeute erhalten werden.

$R_f = 0.26$  (Petrolether/EtOAc 9:1);  $[\alpha]_D^{22} = +8.2$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.23-7.27 (m, 2 H, H-3'), 6.85-6.89 (m, 2 H, H-4'), 4.41 (q,  $J_1 = 12.0$  Hz, 2 H, H-1'), 4.03-4.09 (m, 1 H, H-3), 3.80 (s, 3 H, H-6'), 3.50-3.55 (m, 2 H, H-1), 3.02-3.06 (m, 1 H, H-5), 2.74 (t,  $J_1 = 4.8$  Hz, 1 H, H-6a), 2.43 (dd,  $J_1 = 2.7$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz, 1 H, H-6b), 1.81-1.87 (m, 2 H, H-2), 1.68 (t,  $J_1 = 1.7$  Hz, 2 H, H-4), 0.88 (s, 9 H, *SitBu*), 0.06 (s, 6 H, *SiMe*);  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159.13 (q, C-5'), 130.57 (q, C-2'), 129.27 (t, C-3'), 113.77 (t, C-4'), 72.66 (s, C-1'), 67.43 (t, C-3), 66.55 (s, C-1), 55.30 (p, C-6'), 49.24 (t, C-5), 46.80 (s, C-6), 40.44 (s, C-4), 37.11 (s, C-2), 25.82 (p, *SitBu*), 18.03 (q, *SitBu*), -4.54 (p, *SiMe*), -4.74 (p, *SiMe*); **HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 373.2175, gefunden: 373.2177.

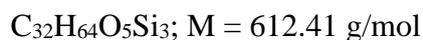
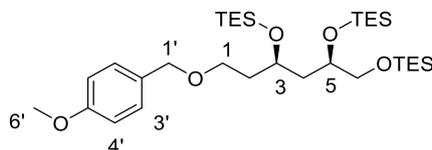
**Polyol 162**



Epoxid **159** (400 mg, 1.58 mmol, 1 eq.) wurde in Ethanol (60 mL) vorgelegt und mit NaOH (1 M, 120 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 80 °C erhitzt und für 16 h bei 80 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von dest. Wasser (50 mL) und Dichlormethan (50 mL) beendet und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (2x 100 mL) und EtOAc (2x 100 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt **162** (400 mg, 1.48 mmol) direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

$R_f = 0.19$  (Petrolether/EtOAc 1:1); **HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $C_{14}H_{22}O_5Na$   $[M+Na]^+$ : 293.1365, gefunden: 293.1362.

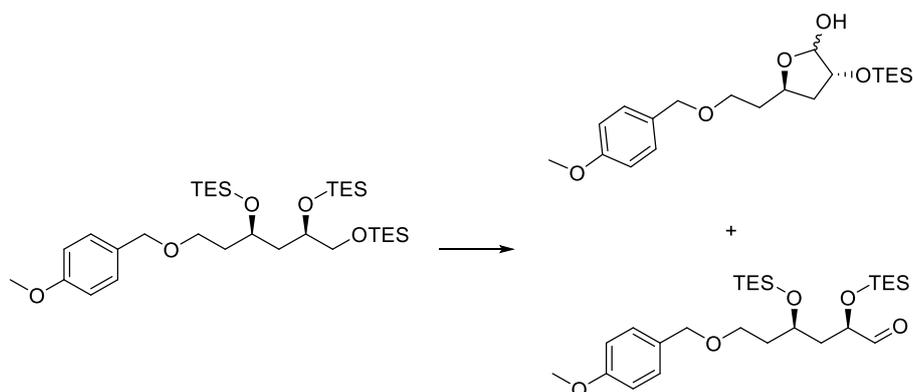
**Silylether 164**



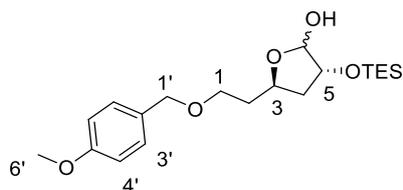
Triol **162** (260 mg, 0.96 mmol, 1 eq.) wurde in trockenem DMF (6 mL) vorgelegt und mit Imidazol (654 mg, 9.6 mmol, 10 eq.), DMAP (70.86 mg, 0.58 mmol, 0.6 eq.) und TESCl (975  $\mu$ L, 869 mg, 5.76 mmol, 6 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion durch Zugabe von dest. Wasser (5 mL) und Diethylether (10 mL) beendet. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase mit Salzsäure (1 M, 5 mL) und mit ges.  $NaHCO_3$ -Lösung (3x 10 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 50:1) gereinigt und silyliertes Produkt **164** (200 mg, 0.33 mmol) als farbloses Öl in 35% Ausbeute erhalten.

$R_f = 0.76$  (Petrolether/EtOAc 9:1);  $[\alpha]_D^{23} = +8.6$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.23-7.27 (m, 2 H, C-3'), 6.85-6.88 (m, 2 H, H-4'), 4.41 (s, 2 H, H-1'), 3.96-4.02 (m, 1 H, H-3), 3.80 (s, 3 H, H-6'), 3.72-3.78 (m, 1 H, H-5), 3.48-3.55 (m, 3 H, H-1, H-6a), 3.39-3.43 (m, 1 H, H-6b), 1.82-1.90 (m, 1 H, H-2a), 1.64-1.76 (m, 2 H, H-2b, H-4a), 1.52-1.60 (m, 1 H, H-4b), 0.91-0.96 (m, 27 H, SiEt), 0.55-0.62 (m, 18 H, SiEt);  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159.05 (q, C-5'), 130.83 (q, C-2'), 129.22 (t, C-3'), 113.67 (t, C-4'), 72.60 (s, C-1'), 70.55 (t, C-5), 67.43 (t, C-3), 66.86 (s, C-6), 66.78 (s, C-1), 55.28 (p, C-6'), 42.73 (s, C-4), 36.97 (s, C-2), 6.92 (p, SiEt), 6.76 (p, SiEt), 5.08 (s, SiEt), 5.03 (s, SiEt), 4.34 (s, SiEt); **HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_5\text{Si}_3\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 635.3959, gefunden: 635.3962.

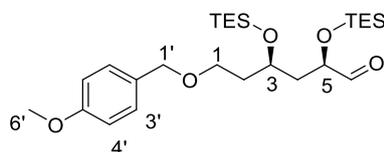
### SWERN-Oxidation



Trockenes Dichlormethan (1 mL) und trockenes DMSO (30  $\mu\text{L}$ , 33 mg, 423.9  $\mu\text{mol}$ , 5.2 eq.) wurden vorgelegt und auf  $-78^\circ\text{C}$  gekühlt. Nach der Zugabe von Oxalylchlorid (18  $\mu\text{L}$ , 24 mg, 196  $\mu\text{mol}$ , 2.4 eq.) wurde die Reaktionslösung für 30 min bei  $-78^\circ\text{C}$  gerührt. Silyliertes Polyol **164** (50 mg, 81.5  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) wurde gelöst in trockenem Dichlormethan (0.5 mL) zu der Reaktionsmischung zugegeben und diese für 90 min bei  $-78^\circ\text{C}$  gerührt. Nach der Zugabe von trockenem DiPEA (300  $\mu\text{L}$ ) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur aufgewärmt und die Reaktion mit dest. Wasser (5 mL) beendet. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (3x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 50:1) gereinigt. Als Hauptprodukt wurde Hemiacetal **165** (10 mg, 40  $\mu\text{mol}$ ) als farbloses Öl in 50% Ausbeute erhalten. Aldehyd **166** (3 mg, 6  $\mu\text{mol}$ ) wurde als farbloses Öl in 7% Ausbeute erhalten.

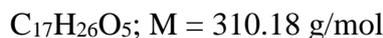
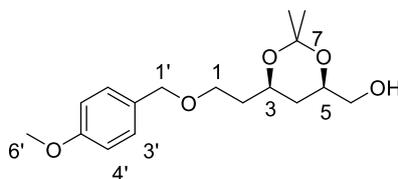
Hemiacetal 165

$R_f = 0.35$  (Petrolether/EtOAc 9:1);  $[\alpha]_D^{23} = +12.2$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.22-7.27 (m, 2 H, H-3'), 6.85-6.88 (m, 2 H, H-4'), 4.43 (s, 2 H, H-1'), 4.06-4.23 (m, 2 H, H-3, H-6), 3.80 (p, 3 H, H-6'), 3.70 (dt,  $J = 1.21, 6.49$  Hz, 2 H, H-1), 3.56 (dd,  $J = 5.46, 9.91$  Hz, 1 H, H-4a), 3.39 (dd,  $J_1 = 6.5$  Hz,  $J_2 = 9.9$  Hz, 1 H, H-4b), 2.71-2.75 (m, 2 H, H-2), 1.77-1.86 (m, 1 H, H-5);  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  207.74 (t, C-6), 159.18 (q, C-5'), 130.28 (q, C-2'), 129.29 (t, C-3'), 113.75 (t, C-4'), 72.84 (s, C-1'), 69.54 (t, C-5), 66.74 (t, C-3), 64.80 (s, C-1), 55.25 (p, C-1'), 48.24 (s, C-4), 44.35 (s, C-2), 6.79 (p, SiEt), 6.72 (p, SiEt), 4.83 (s, SiEt), 4.28 (s, SiEt); **HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{SiNa}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 405.2065, gefunden: 405.2073.

Aldehyd 166

$R_f = 0.76$  (Petrolether/EtOAc 9:1);  $[\alpha]_D^{23} = +17.3$  ( $c = 0.3$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.58 (d,  $J_1 = 1.5$  Hz, 1 H, H-6), 7.24 (d,  $J_1 = 8.6$  Hz, 2 H, H-3'), 6.87 (d,  $J_1 = 8.6$  Hz, 2 H, H-4'), 4.40 (s, 2 H, H-1'), 4.05-4.14 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.80 (s, 3 H, H-1'), 3.49 (t,  $J_1 = 6.5$  Hz, 2 H, H-1), 1.78-1.86 (m, 4 H, H-2, H-4), 0.92-0.96 (m, 18 H, SiEt), 0.56-0.63 (m, 12 H, SiEt);  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  203.79 (t, C-6), 159.31 (q, C-5'), 130.57 (q, C-2'), 129.36 (t, C-3'), 113.77 (t, C-4'), 74.74 (s, C-1'), 72.47 (t, C-5), 66.72 (t, C-3), 65.51 (s, C-1), 55.37 (p, C-6'), 41.00 (s, C-4), 36.76 (s, C-2), 6.88 (p, SiEt), 6.71 (p, SiEt), 5.06 (s, SiEt); **HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{26}\text{H}_{48}\text{O}_5\text{Si}_2\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 519.2938, gefunden: 519.2937.

Acetonid **167**

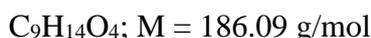
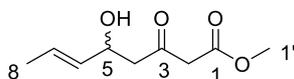


Triol **162** (50 mg, 185  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) wurde in trockenem Aceton (540  $\mu\text{L}$ ) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Die Reaktionslösung wurde mit 2,2-Dimethoxypropan (540  $\mu\text{L}$ , 462 mg, 4.44 mmol, 24 eq.) und einer katalytischen Menge CSA versetzt und bei 0 °C für 16 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. (10 mL) beendet und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3x 10 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 9:1) gereinigt. Acetonid **167** (30 mg, 96.7  $\mu\text{mol}$ ) wurde als farbloses Öl in 52% Ausbeute erhalten.

$R_f = 0.33$  (Petrolether/EtOAc 4:1);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.25 (d,  $J = 8.88 \text{ Hz}$ , 2 H, H-3'), 6.87 (d,  $J_1 = 8.9 \text{ Hz}$ , 2 H, H-4'), 4.42 (d,  $J_1 = 3.0 \text{ Hz}$ , 2 H, H-1'), 4.01-4.08 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.80 (s, 3 H, H-6'), 3.43-3.59 (m, 3 H, H-1, H-6a), 3.26-3.33 (m, 1 H, H-6b), 1.70-1.82 (m, 3 H, H-2, H-4a), 1.44-1.70 (m, 1 H, H-4b), 1.39 (s, 3 H, H-8a), 1.33 (s, 3 H, H-8b);  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  159.15 (q, C-5'), 130.72 (q, C-2'), 129.45 (t, C-3'), 113.92 (t, C-4'), 98.58 (q, C-7), 74.45 (s, C-6), 72.69 (s, C-1'), 66.92 (t, C-3, C-5), 65.92 (s, C-1), 55.40 (p, C-6'), 36.73 (s, C-2), 34.00 (s, C-4), 30.29 (p, C-8a), 19.83 (p, C-8b); **HRMS (ESI)  $m/z$**  berechnet für  $C_{17}H_{26}O_5\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 333.1678, gefunden: 333.1678.

### 11.3.2 Versuchsvorschriften der diastereoselektiven Synthese

#### Aldolprodukt 182<sup>135,136,137</sup>



#### Methode A:

Natriumhydrid (0.41 g, 10.32 mmol, 1.2 eq., 60% in Mineralöl) wurde in trockenem THF (20 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Acetoacetat (0.93 mL, 1 g, 8.6 mmol, 1 eq.) wurde zugegeben und die Reaktionslösung für 30 min bei 0 °C gerührt bis die Gasbildung beendet war. Nach der Zugabe von *n*BuLi (3.78 mL, 9.46 mmol, 1.1 eq., 2.5 M in Hexan) wurde die Reaktion für weitere 10 min bei 0 °C gerührt bevor Crotonaldehyd (0.78 mL, 0.66 g, 9.46 mmol, 1.1 eq.) zugegeben wurde. Nachdem die Reaktionsmischung für 10 min bei 0 °C gerührt wurde, wurde die Reaktion durch die Zugabe von ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (20 mL) beendet. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 9:1) gereinigt und Aldolprodukt **182** (1.4 g, 7.5 mmol) als farbloses Öl in 87% Ausbeute erhalten. Das Aldolprodukt lag als Enantiomerenpaar vor.

#### Methode B:

Natriumhydrid (0.41 mg, 10.3 mmol, 1.2 eq., 60% in Mineralöl) wurde in trockenem THF (20 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Acetoacetat (0.93 mL, 1 g, 8.6 mmol, 1 eq.) wurde zugegeben und die Reaktionslösung für 30 min bei 0 °C gerührt bis die Gasbildung beendet war. Die Reaktionsmischung wurde auf -78 °C gekühlt und *n*BuLi (3.78 mL, 9.5 mmol,

<sup>135</sup> S. N. Huckin, L. Weiler *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, 2157-2164.

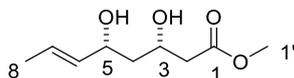
<sup>136</sup> F. G. Kathawala, B. Prager, K. Prasad, O. Repič, M. J. Shapiro, R. S. Stabler, L. Weiler *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 803-805.

<sup>137</sup> K.-M. Chen, G. E. Hardtmann, K. Prasad, O. Repič, M. J. Shapiro *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 155-158.

1.1 eq., 2.5 M in Hexan) zugegeben. Nachdem die Reaktion für 30 min bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt wurde, wurde Crotonaldehyd (0.78 mL, 0.66 g, 9.5 mmol, 1.1 eq.) zugefügt. Die Reaktionslösung wurde für weitere 4 h bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt und die Reaktion durch die Zugabe von ges.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lsg. (20 mL) beendet. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 9:1) gereinigt und Aldolprodukt **182** (1.6 g, 8.6 mmol) als farbloses Öl in quantitativer Ausbeute erhalten. Das Aldolprodukt lag als Enantiomerenpaar vor.

$R_f = 0.3$  (Petrolether/EtOAc 4:1);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.67-5.76 (m, 1 H, H-7), 5.47 (dd,  $J_1 = 6.7\text{ Hz}$ , 1 H, H-6), 4.53 (bs, 1 H, H-5), 3.73 (s, 3 H, H-1'), 3.49 (s, 2 H, H-2), 2.71-2.75 (m, 2 H, H-4), 1.67 (d,  $J_1 = 7.2\text{ Hz}$ , 3 H, H-8);  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  202.70 (q, C-3), 167.30 (q, C-1), 131.69 (t, C-6), 127.47 (t, C-7), 68.43 (t, C-5), 52.37 (p, C-1'), 49.68 (s, C-2), 49.62 (s, C-4), 17.57 (p, C-8); **HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 209.0790, gefunden: 209.0787.

### Diol **180**



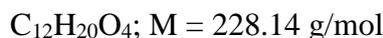
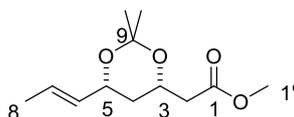
$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$ ;  $M = 188.11\text{ g/mol}$

Aldolprodukt **182** (1 g, 5.3 mmol, 1 eq.) wurde in trockenem THF (30 mL) und trockenem Methanol (7.5 mL) vorgelegt und auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Diethylmethoxyboran (5.9 mL, 5.9 mmol, 1.1 eq., 1 M in THF) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung für 45 min bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt. Nachdem Natriumborhydrid (0.22 g, 5.9 mmol, 1.1 eq.) verteilt auf zwei Portionen zugegeben wurde, wurde die Reaktionslösung für 5 h bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Essigsäure (20 mL, 1 M) beendet und die Lösung für weitere 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc (3x 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 9:1) gereinigt und Diol **180** (987 mg,

5.2 mmol) als farbloses Öl in quantitativer Ausbeute erhalten. Das Produkt lag als Gemisch beider enantiomeren *syn*-Diole vor.

$R_f = 0.52$  (Petrolether/EtOAc 4:1);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.70-5.79 (m, 1 H, H-7), 5.42-5.48 (m, 1 H, H-6), 4.38, 4.45 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.71 (s 3 H, H-1'), 2.63 (dd,  $J_1 = 6.8$  Hz,  $J_2 = 15.7$  Hz, 1 H, H-2a), 2.45 (dd,  $J_1 = 6.8$  Hz,  $J_2 = 15.5$  Hz, 1 H, H-2b), 2.02 (dt,  $J_1 = 2.8$  Hz,  $J_2 = 13.8$  Hz, 1 H H-4a), 1.71 (d,  $J_1 = 6.5$  Hz, 3 H, H-8), 1.40-1.53 (m, 1 H, H-4b);  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.18 (q, C-1), 131.73 (t, C-6), 127.16 (t, C-7), 71.62 (t, C-3), 67.82 (t, C-5), 51.70 (p, C-1'), 41.95 (s, C-2), 38.70 (s, C-4), 17.62 (p, C-8); **HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 211.0946, gefunden: 211.0942.

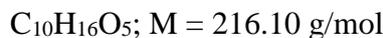
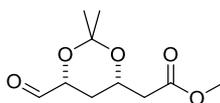
### Acetonid **183**



Diol **180** (2 g, 10.6 mmol, 1 eq.) wurde in trockenem Aceton (40 mL) vorgelegt und mit 2,2-Dimethoxypropan (32 mL, 27 g, 255 mmol, 24 eq.) versetzt. Nach der Zugabe einer katalytischen Menge CSA wurde die Reaktionslösung für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung beendet und die Phasen wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3x 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 50:1) gereinigt. Das Produkt (1.4 g, 6.1 mmol) wurde als farbloses Öl in 58% Ausbeute erhalten. Acetonid **183** lag als *syn*-Enantiomerenpaar vor.

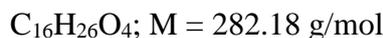
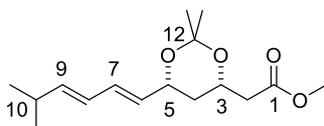
$R_f = 0.4$  (Petrolether/EtOAc 4:1);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.61-5.81 (m, 1 H, H-7), 5.38-5.56 (m, 1 H, H-6), 4.26-4.42 (m, 2 H, H-3, H-5), 3.69 (s, 3 H, H-1'), 2.32-2.65 (m, 2 H, H-2), 1.71-1.75 (m, 3 H, H-4a, H-8), 1.54 (s, 3 H, H-10a), 1.49 (s, 3 H, H-10b), 1.20-1.37 (m, 1 H, H-4a);  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.40 (q, C-1), 131.50 (t, C-6), 128.03 (t, C-7), 98.88 (q, C-9), 69.99 (t, C-3), 65.69 (t, C-5), 51.67 (p, C-1'), 41.21 (s, C-2), 36.62 (s, C-4), 30.13 (p, C-10a), 19.77 (p, C-10b), 17.78 (p, C-8); **HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 251.1259, gefunden: 251.1260.

Aldehyd 179



Acetonid **179** (1.4 g, 6.1 mmol, 1 eq.) wurde in Dichlormethan (15 mL) vorgelegt und auf  $-78$  °C gekühlt. Zuvor durch elektrische Ladung erzeugtes Ozon wurde durch die Reaktionslösung geleitet bis eine Blaufärbung der Lösung bestehen blieb. Überschüssiges Ozon wurde durch gasförmigen Sauerstoff vertrieben und die Reaktion bei  $-78$  °C mit Dimethylsulfid (5 mL) beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und Aldehyd **179** (1.32 g, 6.1 mmol) als farbloses Öl mit quantitativem Umsatz erhalten. Das Rohprodukt wurde direkt weiter in die nächste Stufe eingesetzt.

Dien 198

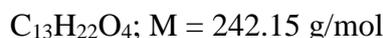
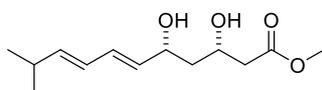


WITTIG-Salz **205** (3.5 g, 8.14 mmol, 2.2 eq.) wurde in trockenem THF (32 mL) vorgelegt und auf  $-78$  °C gekühlt. nBuLi (2.2 mL, 5.5 mmol, 1.5 eq., 2.5 M) wurde zugegeben und die Reaktionslösung 1 h bei  $-78$  °C gerührt. Nach der Zugabe von Aldehyd **179** (0.8 g, 3.7 mmol, 1 eq.) wurde die Reaktionsmischung für 16 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von dest. Wasser beendet und die Phasen wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3x 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $MgSO_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 9:1) gereinigt. WITTIG-Produkt **198** (0.4 g, 1.48 mmol) wurde als farbloses Öl in 40% Ausbeute erhalten.

$R_f = 0.58$  (Petrolether/EtOAc 4:1);  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6.24 (dd,  $J_1 = 11.0$  Hz,  $J_2 = 15.2$  Hz, 1 H, H-8), 6.03 (t,  $J_1 = 11.0$  Hz, 1 H, H-7), 5.71 (dd,  $J_1 = 7.0$  Hz,  $J_2 = 15.2$  Hz, 1 H, H-9), 5.23 (dd,  $J_1 = 8.2$  Hz,  $J_2 = 11.0$  Hz, 1 H, H-6), 4.81-4.86 (m, 1 H, H-5), 4.35-4.42 (m, 1 H, H-3), 3.69 (s, 3 H, H-1'), 2.57 (dd,  $J_1 = 7.0$  Hz,  $J_2 = 15.5$  Hz, 1 H, H-2a), 2.33-2.43 (m,

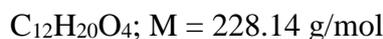
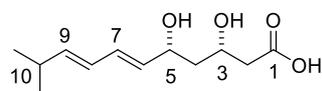
2 H, H-2b, H-10), 1.58-1.63 (m, 1 H, H-4a), 1.54 (s, 3 H, H-10a), 1.41 (s, 3 H, H-10b), 1.28-1.39 (m, 1 H, H-4b), 1.03 (s, 3 H, H-11a), 1.01 (s, 3 H, H-11b);  $^{13}\text{C NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.39 (q, C-1), 144.63 (t, C-9), 131.15 (t, C-6), 128.48 (t, C-7), 122.02 (t, C-8), 98.95 (q, C-12), 65.70 (t, C-3), 65.63 (t, C-5), 51.67 (p, C-1'), 41.18 (s, C-2), 36.50 (s, C-4), 31.38 (t, C-10), 30.16 (p, C-13a), 22.21 (q, C-11), 19.73 (p, C-13b); **HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 305.1729, gefunden: 305.1729.

### Diol **211**



Dien **198** (200 mg, 0.83 mmol, 1 eq.) wurde in trockenem Methanol (15 mL) vorgelegt und PPTS (207 mg, 0.83 mmol, 1 eq.) zugegeben. Die Reaktion wurde für 16 h bei Raumtemperatur gerührt und durch die Zugabe von ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. beendet. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt **211** wurde direkt weiter in der nächsten Stufe eingesetzt.

### Diensäure **140**



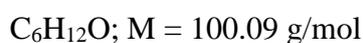
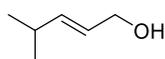
Diol **211** (200 mg, 0.8 mmol, 1 eq.) wurde in Ethanol (2 mL) vorgelegt und mit Natronlauge (0.1 mL, 1 M) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von  $\text{CaCl}_2$ -Lsg. (1 mL, 2.5 M) wurde die Reaktionsmischung für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde per HPLC (C18-ISIS) ( $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN} = 95:5$  {5 min}, Gradient  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN} = 95:5 \rightarrow 45:55$  {35 min}, Gradient  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN} = 45:55 \rightarrow 15:85$  {25 min}, Gradient  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN} = 15:85 \rightarrow 0:100$  {15 min},  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN} = 0:100$  {20 min},

2.5 mL/min) gereinigt. **140** wurde als weißer Feststoff (40 mg, 0.18 mmol,  $t_R = 8$  min) in 22% Ausbeute über zwei Stufen erhalten.

**$^1\text{H NMR}$**  (500 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$  6.40 (dd,  $J_1 = 11.0$  Hz,  $J_2 = 15.3$  Hz, 1 H, H-8), 6.01 (t  $J_1 = 11.0$  Hz, 1 H, H-7), 5.68 (dd,  $J_1 = 7.3$  Hz,  $J_2 = 15.3$  Hz, 1 H, H-9), 5.24 (t,  $J_1 = 9.9$  Hz, 1 H, H-6), 4.79 (q,  $J_1 = 7.3$  Hz, 1 H, H-5), 3.99-4.04 (m, 1 H, H-3), 2.28-2.40 (m, 3 H, H-10, H-2a, H-2b), 1.75-1.81 (m, 1 H, H-4), 1.53-1.58 (m, 1 H, H-4), 1.03 (s, 3 H, H-11), 1.01 (s, 3 H, H-11);  **$^{13}\text{C NMR}$**  (125 MHz, MeOH- $d_4$ )  $\delta$  181.83 (q, C-1), 144.61 (t, C-9), 132.47 (t, C-6), 131.44 (t, C-7), 123.94 (t, C-8), 68.35 (t, C-3), 66.84 (t, C-5), 45.40 (s, C-2), 45.14 (s, C-4), 32.59 (t, C-10), 22.75 (p, 2x C-11); **HRMS (ESI)**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_4$  [M-H] $^-$ : 227.1283, gefunden: 227.1283.

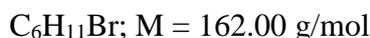
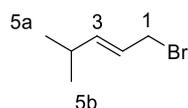
### 11.3.3 Versuchsvorschriften zur Herstellung des JULIA-KOCIENSKI-Sulfons

#### (E)-4-Methylpent-2-en-1-ol (195)



Ester **194** (5 g, 39 mmol, 1 eq.) wurde in trockenem Dichlormethan (175 mL) vorgelegt und auf  $-78$  °C gekühlt. DiBAI-H (113 mL, 113 mmol, 2.9 eq., 1 M in Hexan) wurde langsam zugegeben und die Reaktionslösung für 1 h bei  $-78$  °C gerührt. Nach der Zugabe von ges. Na-K-Tartrat-Lsg. (100 mL) wurde die Reaktionsmischung für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (3x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde direkt weiter in die nächste Stufe eingesetzt.

(E)-1-Bromo-4-methylpent-2-en (196)

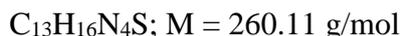
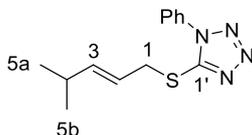


NBS (10.5 g, 59 mmol, 1.5 eq.) wurde in trockenem Dichlormethan (150 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Dimethylsulfid (5.2 mL, 4.5 g, 72 mmol, 1.9 eq.) wurde zugegeben und die Reaktionslösung auf -20 °C gekühlt. Alkohol **195** (3.9 g, 39 mmol, 1 eq.) wurde gelöst in Dichlormethan zugetropft und die Reaktionsmischung für 2 h bei 0 °C gerührt. Nachdem die Reaktion für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde die Reaktionsmischung auf Eis gekippt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (3x 100 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über  $MgSO_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether/EtOAc 50:1) gereinigt. Bromid **196** (4.2 g, 25.9 mmol) wurde als farbloses Öl in 67% Ausbeute über zwei Stufen erhalten.

$R_f = 0.7$  (Cyclohexan);  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  5.55-5.81 (m, 2 H, H-2, H-3), 3.95 (dd,  $J = 0.56, 6.65$  Hz, 2 H, H-1), 2.25-2.41 (m, 1 H, H-4), 1.02 (s, 3 H, H-5a oder H-5b), 0.98 (s, 3 H, H-5a oder H-5b).

*Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur gefundenen Daten überein.*<sup>138</sup>

(E)-5-[(4-Methylpent-2-en-1-yl)thio]-1-phenyl-1H-tetrazol (197)



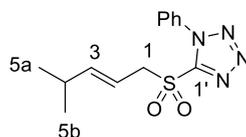
Natriumhydrid (1.1 g, 28 mmol, 1 eq., 60% in Mineralöl) wurde in trockenem DMF (30 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. PTSH (4.9 g, 28 mmol, 1 eq.) wurde gelöst in DMF (10 mL) langsam zugegeben und die Reaktionslösung 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach der

<sup>138</sup> D. J. Vyas, M. Oestreich *Chem. Commun.* **2010**, 46, 568-570.

Zugabe von Bromid **196** (4.5 g, 28 mmol, 1 eq.) gelöst in DMF (10 mL) wurde die Reaktionsmischung für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von dest. Wasser (50 mL) beendet und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (3x 50 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaHCO<sub>3</sub>- und NaCl-Lsg. gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde in vacuo entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether /EtOAc 50:1) gereinigt. Tetrazol **197** (5 g, 19 mmol) wurde als farbloses Öl in 68% Ausbeute erhalten.

$R_f = 0.38$  (Petroleter/EtOAc 9:1);  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.51-7.59 (m, 5 H, Ph), 5.75-5.81 (m, 1 H, H-3), 5.51-5.59 (m, 1 H, H-2), 3.99 (d,  $J_1 = 7.16$  Hz), 2 H, H-1), 2.28 (st,  $J_1 = 6.62$  Hz, 1 H, H-4), 0.97 (s, 3 H, H-5a oder H-5b), 0.95 (s, 3 H, H-5a oder H-5b);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  144.10 (q, C-1'), 130.05 (t, C-3), 129.74 (t, Ph), 123.87 (t, Ph), 119.87 (t, C-2), 35.80 (s, C-1), 30.84 (t, C-4), 21.98 (p, C-5a und C-5b).

(E)-5-[4-Methylpent-2-en-1-yl)sulfonyl]-1-phenyl-1H-tetrazol (**170**)

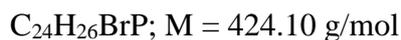
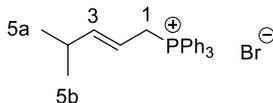


Tetrazol **197** (2.5 g, 9.6 mmol, 1 eq.) wurde in trockenem Dichlormethan (30 mL) vorgelegt und mit NaHCO<sub>3</sub> (4g, 48 mmol, 5 eq.) sowie *m*CPBA (3 g, 12 mmol, 1.3 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss über Celite filtriert. Der Rückstand wurde mit ges. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- (2x, 20 mL) und ges. NaCl-Lösung. (2x 20 mL) gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, das Rohprodukt in wenig Dichlormethan aufgenommen und mit Hexan ausgefällt. Produkt **170** (1.7 g, 5.8 mmol) wurde als weißer Feststoff in 60% Ausbeute erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.56-7.69 (m, 5 H, Ph), 5.92 (ddt,  $J_1 = 1.1$  Hz,  $J_2 = 6.7$  Hz,  $J_3 = 15.5$  Hz, 1 H, H-3), 5.34-5.50 (m, 1 H, H-2), 4.35 (dt,  $J_1 = 0.8$  Hz,  $J_2 = 7.3$  Hz, 2 H, H-1), 2.33 (st,  $J_1 = 6.65$  Hz, 1 H, H-4), 0.97 (s, 3 H, H-5a oder H-5b), 0.94 (s, 3 H, H-5a oder H-5b),  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  151.86 (t, C-3), 131.42 (q, C-1'), 129.63 (t, Ph), 110.0 (t, C-2), 59.85 (s, C-1), 31.39 (t, C-4), 21.59 (p, C-5).

### 11.3.4 Versuchsvorschriften zur Herstellung des WITTIG-Salzes

#### (E)-(4-Methylpent-2-en-1-yl)triphenylphosphoniumbromid (205)



Bromid **196** (4.2 g, 25.9 mmol, 1 eq.) wurde in trockenem Toluol (10 mL) vorgelegt und  $\text{PPh}_3$  (6.8 g, 25.9 mmol, 1 eq.) wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 100 °C erwärmt und für 16 h bei 100 °C gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde filtriert, mit Petrolether (50 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Phosphoniumsalz **205** (6.5 g, 15.3 mmol) wurde als weißer Feststoff in 59% Ausbeute erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.62-7.91 (m, 5 H, Ph), 5.71-5.85 (m, 1 H, H-3), 5.14-5.31 (m, 1 H, H-2), 4.73 (dd,  $J_1 = 7.3$  Hz,  $J_2 = 14.5$  Hz, 2 H, H-1), 2.13-2.27 (m, 1 H, H-4), 0.84 (s, 3 H, H-5a oder H-5b), 0.81 (s, 3 H, H-5a oder H-5b);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  134.88 (q, Ph), 134.08 (t, Ph), 133.92 (t, Ph), 130.29 (t, Ph), 130.18 (t, Ph), 118.67 (t, C-3), 117.85 (t, C-2), 31.57 (s, C-1), 27.72 (t, C-4), 21.72 (p, C-5a und C-5b).

*Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur gefundenen Daten überein.*<sup>139</sup>

<sup>139</sup> J. M. Clough, H. Dube, B. J. Martin, G. Pattenden, K. S. Reddy, I. R. Waldron *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2906-2911.

## 12 Material und Methoden

---

### 12.1 Geräte

Tabelle 8: Geräte.

Beschreibung	Firma
<b>Autoklaven</b>	
Autoklav VX-95	SYSTEC
Autoklav VX-150	SYSTEC
<b>Geldokumentation</b>	
Gel Doc™ XR+	BIO-RAD
Alpha Digi Doc™	BIOZYM
<b>Gelkammern</b>	
Gelkammer Mini PROTEAN Tetra System	BIO-RAD
GelkammerComPhor Mini	BIOZYM SCIENTIFIC GMBH
PerfectBlue Gelsystem Mini S	PEQLAB
PerfectBlue Gelsystem Midi S	PEQLAB
<b>Heizblöcke</b>	
Heizblock Blockthermostat tcr 100	ROTH
Thermoblock Thermostat 5320	EPPENDORF
Thermomixer Comfort	EPPENDORF
<b>Inkubatoren</b>	
HEPATHERM Inkubator	THERMO SCIENTIFIC
Inkubator VT5042EK	HERAEUS
<b>Netzteile</b>	
Power Supply E833	CONSORT
Power Supply E835	CONSORT
<b>pH-Meter</b>	
Checker	HANNA
pHenominal™ pH 100L	VWR
<b>Photometer</b>	
Elisa Reader Mithras LB 940	BERTHOLD TECHNOLOGIES

FoodALYT Photometer	FOODALYT
Photometer UV-1601 PC Spektrophotometer	SHIMADZU
SPECTRA max 384 Plus	MOLECULAR DEVICES
<b>Proteinreinigung</b>	
ÄKTA™ pure, mit UV-Dektor U9-L mit Leitfähigkeitsdetektor C9, HisTrap™ FF 5x5mL	GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES
<b>Reinstwassersystem</b>	
BARNSTEAM GENPUREPRO	THERMO SCIENTIFIC
<b>Schüttler</b>	
CH-4103	INFORS-AG
Innova 4900 Multi-Tier Environmental Shaker	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
INNOVA® 44 INCUBATOR SHAKER SERIES	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
EXCELLA E24 INCUBATOR SHAKER SERIES	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
<b>Sonstige Geräte</b>	
Clean Bench SAFE 2020	THERMO SCIENTIFIC
NanoDrop 1000	EPPENDORF
Nanodrop DS-11 + Spektrophotometer	DENOVIX®
SpeedvacConcentrator 5301	EPPENDORF
Vortex-Genie 2	SCIENTIFIC INDUSTRIES
<b>UV-Tisch</b>	
N-90M	BENDA
Double Vision UVVIS UV-Tisch	HOEFER
UV-Tisch KW 312 nm (Transilluminator)	BENDA
<b>Zellaufschluss</b>	
French Press R 125	AMERICAN INSTRUMENT COMPANY
Ultraschallgerät Sonoplus Typ UW31000	BANDELIN
<b>Zentrifugen</b>	
5147 R Mikrocentrifuge, Rotortyp: F-45-30-11	EPPENDORF
Heraeus Megafuge 16R, Rotortyp: Highconic II	THERMO SCIENTIFIC

Qikspin Mikrozentrifuge	EDWARSS INSTRUMENTS
Galaxy Mini Centrifuge Mini Star <i>silverline</i>	VWR
Heraeus Fresco 21 Centrifuge, Rotortyp: 24 x 1.5/2.0 mL rotor with click seal	THERMO SCIENTIFIC
Sorvall LYNX 6000 Centrifuge Rotortyp: F14-14x50cy	THERMO SCIENTIFIC

---

### 12.2 Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien, die zur Herstellung von Medien, Lösungen und Puffern verwendet wurden, wurden von den Firmen APPLICHEM, CARL ROTH, SIGMA-ALDRICH und FLUKA bezogen. Von den Firmen FERMENTAS, THERMO SCIENTIFIC und NEW ENGLAND BIOLABS wurden die in dieser Arbeit aufgeführten Enzyme und die zugehörigen Puffer verwendet.

### 12.3 Synthetische Gene

Die synthetischen Gene *ambJ*, *ambN*, *ambQ*, *ambR* und *ambS* wurden im Klonierungsvektor pMK mit Kanamycinresistenz von der Firma LIFE TECHNOLOGIES bezogen.

### 12.4 Bakterienstämme

**Tabelle 9:** Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) RP Codon Plus	P. Leadlay*
<i>E. coli</i> One Shot® TOP10	Invitrogen

\*aus Laboratorien von P. LEADLAY, University of Cambridge, UK

## 12.5 Vektoren und rekombinante Plasmide

**Tabelle 10:** Übersicht der verwendeten Plasmide.

Plasmide	Antibiotikaresistenz	Referenz
AmbJ_pMK	Kanamycin	Invitrogen
AmbN_pMK	Kanamycin	Invitrogen
AmbQ_pMK	Kanamycin	Invitrogen
AmbR_pMK	Kanamycin	Invitrogen
AmbS_pMK	Kanamycin	Invitrogen
BorDH3_pET28a(+)	Kanamycin	P. Leadlay*
BorDH2_pET28a(+)	Kanamycin	P. Leadlay *
BorDH3(H49A)_pET28a(+)	Kanamycin	P. Leadlay *
pJET1.2	Ampicillin	Thermo Scientific
pET28a(+)	Kanamycin	Novagen
pET20b(+)	Ampicillin	Novagen
pET32a(+)	Ampicillin	Novagen
pGEX-4T-3	Ampicillin	Novagen
pGEX-6P-1	Ampicillin	Novagen
pCold-I	Ampicillin	Takara
pG-KJE8	Chloramphenicol	Takara

---

\*aus Laboratorien von P. LEADLAY, University of Cambridge, UK

## 12.6 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide zur Einbringung neuer Restriktionsschnittstellen wurden in lyophilisierter Form von der Fa. SIGMA ALDRICH bezogen (Sequenzen s. Tabelle 11). Die Primer wurden in dd H<sub>2</sub>O gelöst, um eine Konzentration von 100 µM zu erhalten.

**Tabelle 11:** Sequenzen der sequenzspezifischen Primer für die Vervielfältigung von *ambJ*.

Bezeichnung	DNA-Sequenz (5' → 3')
ambJ_fw_221013	TATAGAATTCATGAGCCGTGAATTGTTATTGGTG
ambJ_rev_stop_221013	TATTCTCGAGTTACATTGCTGCACCCGCTG
ambJ_rev_no_stop_221013	TATACTCGAGCATTGCTGCACCCGCTG

**Tabelle 12:** Sequenzen der Primer für die Kolonie-PCR.

Bezeichnung	DNA-Sequenz (5' → 3')
pColdI-fw	GCCATATCGCCGAAAG
pColdI-rev	GGCAGGGATCTTAGATTC

### 12.7 Medien, Puffer und Lösungen

Die bei der Bakterienkultivierung eingesetzten Medien, Puffer und Lösungen wurden zunächst autoklaviert (20 min, 121 °C).

#### 12.7.1 Medien und Nährböden

**Tabelle 13:** Übersicht der verwendeten Medien und Nährböden.

Beschreibung	Komponenten
LB-Medium	10.0 g/L Trypton
	10.0 g/L NaCl
	5.0 g/L Hefeextrakt
LB-Agar	10.0 g/L Trypton
	10.0 g/L NaCl
	5.0 g/L Hefeextrakt
	15.0 g/L Agar
2TY-Medium	16.0 g/L Trypton
	5.0 g/L NaCl
	10.0 g/L Hefeextrakt
2TY-Agar	16.0 g/L Trypton
	5.0 g/L NaCl
	10.0 g/L Hefeextrakt

16.0 g/L Agar

---

### 12.7.2 Puffer und Lösungen

**Tabelle 14:** Puffer für die Isolierung von Plasmid-DNA.

Beschreibung	Komponenten
Lösung I	50 mM Tris 10 mM EDTA 100 µg/mL RNase in TE-Puffer pH 8.0
Lösung II	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
Lösung III	3 M KOAc pH 5.5
TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8.0

**Tabelle 15:** Puffer für die Agarosegelelektrophorese.

Beschreibung	Komponenten
50x TAE-Puffer	2 M Tris-Acetat 5 mM EDTA pH 8.0
6x Probenpuffer	0.25% (w/v) Bromphenolblau 0.25% (w/v) Xylencyanol FF 30% (v/v) Glycerin

**Tabelle 16:** Puffer für die SDS-PAGE.

Beschreibung	Komponenten
<i>Lower</i> Tris-Puffer	1.5 M Tris 4% (w/v) SDS pH 8.8
<i>Upper</i> Tris-Puffer	0.5 M Tris 4% (w/v) SDS pH 6.8

Ammoniumperoxodisulfat	10% (w/v)
Sammelgel (5%, 5 mL)	0.63 mL <i>Lower</i> Tris-Puffer 3.4 mL dd H <sub>2</sub> O 0.83 mL Rotiophoresegel 30 0.005 mL TEMED 0.08 mL 10% APS 0.05 mL SDS
Trenngel (12%, 15 mL)	3.8 mL <i>Upper</i> Tris-Puffer 4.9 mL dd H <sub>2</sub> O 6.0 mL Rotiophorese Gel 30 0.15 mL 10% APS 0.006 mL TEMED 0.15 mL SDS
Trenngel (15%, 10 mL)	2.5 mL <i>Upper</i> Tris-Puffer 2.3 mL dd H <sub>2</sub> O 5.0 mL Rotiophorese Gel 30 0.1 mL 10% APS 0.004 mL TEMED 0.1 mL SDS
Ladepuffer	1x Lämmli-Mix 1% (w/v) SDS 100 mM DTT
10x Lämmli-Mix	150 mM Tris pH 6.8 6% (w/v) SDS 30% (v/v) Glycerin 0.02% (w/v) Bromphenolblau
50x SDS-TAE-Laufpuffer	2 M Tris-Acetat 5 mM EDTA pH 8.0
Färbelösung	25% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure 1% (v/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
Entfärbelösung	25% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure

**Tabelle 17:** Binde- und Lagerpuffer.

Beschreibung	Komponenten
Bindepuffer	40 mM Tris-HCl
	100 mM NaCl
	pH 7.8
Lagerpuffer (BorDH3)	25 mM HEPES
	150 mM NaCl
	pH 7.5
Reaktionspuffer (AmbJ)	40 mM Tris-HCl
	100 mM NaCl
	1 mM DTT
	pH 8.0

**Tabelle 18:** Puffer für die Affinitätschromatographie.

Beschreibung	Komponenten
Equilibrierungspuffer	40 mM Tris-HCl
	100 mM NaCl
Waschpuffer	40 mM Tris-HCl
	100 mM NaCl
	25 mM Imidazol
Elutionspuffer I	40 mM Tris-HCl
	50 mM NaCl
	100 mM Imidazol
Elutionspuffer II	40 mM Tris-HCl
	100 mM NaCl
	100 mM Imidazol
Elutionspuffer III	40 mM Tris-HCl
	100 mM NaCl
	250 mM Imidazol
Elutionspuffer IV	40 mM Tris-HCl
	100 mM NaCl
	500 mM Imidazol

**Tabelle 19:** Kompetenzpuffer.

Beschreibung	Komponenten
Kompetenzpuffer	50 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM Kaliumacetat pH 6.2

## 12.8 Molekularbiologische Methoden

### 12.8.1 *E. coli*-Kultivierung

*E. coli*-Bakterien wurden bei 37 °C über Nacht auf LB- beziehungsweise 2TY-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Für Übernachtkulturen wurde eine Kolonie in 5 mL des mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten LB- oder 2TY-Mediums überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

### 12.8.2 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

#### 12.8.2.1 Miniprep

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* erfolgte ausgehend von einer bei 37 °C inkubierten Flüssigkultur. Davon wurden 2 mL in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt und 3 min bei 10,000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 250 µL Lösung I resuspendiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min und der Zugabe von 250 µL Lösung II wurde gut vermischt und anschließend für 5 min inkubiert. Nach der Zugabe von 250 µL Lösung III und 2-3 Tropfen Chloroform wurde für 10 min bei 13,000 x g zentrifugiert. Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µL *iso*-Propanol versetzt. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 13,000 x g für 30 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet zweimal mit 70%igem Ethanol (v/v, 500 µL) gewaschen. Das Pellet wurde mit der SPEEDVAC getrocknet, in 20-50 µL dd H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

#### 12.8.2.2 Midiprep

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* im großen Maßstab erfolgte ausgehend von einer bei 37 °C inkubierten Flüssigkultur (6 mL). Nachdem die Übernachtkultur für 3 min bei 10,000 x g zentrifugiert wurde, wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 mL

Lösung I resuspendiert. Nach der Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min und der Zugabe von 2 mL Lösung II wurde gut vermischt und anschließend für 5 min inkubiert. Nach der Zugabe von 1.5 mL Lösung III wurden 500 µL Chloroform zugefügt, gut gemischt und für 10 min bei 10,000 x g zentrifugiert. Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 3.5 mL *iso*-Propanol versetzt. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 13,000 x g für 30 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet zweimal mit 70%igem Ethanol (v/v, 1 mL) gewaschen. Das Pellet wurde bei 60 °C getrocknet, in 300-500 µL dd H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 12.8.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte durch spektroskopische Analyse (*NanoDrop*) mit einem Biophotometer der Fa. EPPENDORF.

### 12.8.4 Restriktion

Zur Restriktion wurde die Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen bei 37 °C über einen Zeitraum von 1 h inkubiert. Für eine Testrestriktion wurden Reaktionsvolumina von 20 µL und für eine präparative Restriktion von 100 µL verwendet.

**Tabelle 20:** Pipettierschema für den Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.

Reagentien	Volumen [µL]	Volumen [µL]
Plasmid-DNA	10	8
Puffer	10	4
Restriktionsenzym 1	4	0.5
Restriktionsenzym 2	4	0.5
dd H <sub>2</sub> O	ad 100 µL	ad 20 µL

### 12.8.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte mit 1%igen beziehungsweise 0.7%igen (w/v) Agarose-Gelen, die vor dem Gießen mit 0.1% Ethidiumbromid beziehungsweise 0.5% Roti<sup>®</sup>-Gel Stain versetzt wurden. Hierzu wurde 1% bzw 0.7% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle geschmolzen. Das fertige Gel wurde in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer überführt und befüllt. Hierzu wurden 20 µL der DNA-Probe mit 3 µL 6x Probenpuffer versetzt. Außerdem wurden 5 µL der Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder der Fa. FERMENTAS oder QuickLoad<sup>®</sup> 1 kb DNA-Ladder der Fa. NEW ENGLAND BIOLABS als DNA-Größenstandard verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei 110 V (const.) für 50 min durchgeführt und die DNA-Bande anschließend mit UV-Licht detektiert.

### 12.8.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion der DNA nach Ausschneiden der entsprechenden Bande aus dem Agarosegel erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des Nucleospin<sup>®</sup> Gel und PCR Clean-up-Kits der Fa. MACHEREY-NAGEL. Dazu wurden 100 mg Agarosegel mit 200 µL Puffer NTI versetzt und für 5-10 min bei 50 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die DNA durch Zentrifugation bei 11000 x g für 1 min auf die Membran der Reinigungssäulen gebunden. Durch Zugabe des Puffers NT3 (70% EtOH im zweiten Waschgang) und Zentrifugation bei 11,000 x g für 1 min wurde die Membran gewaschen. Nachdem das Waschen der Membran wiederholt wurde, wurde diese getrocknet, indem die Säulen zweimal bei 11,000 x g für 1 min zentrifugiert wurden. Um die DNA zu eluieren, wurden 20 µL dd H<sub>2</sub>O auf die Membran aufgetragen und für 1 min bei 11,000 x g zentrifugiert. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert oder direkt für Folgereaktionen eingesetzt.

### 12.8.7 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit Plasmid DNA erfolgte nach erfolgreicher Restriktion mit anschließender Inaktivierung der Restriktionsenzyme bei 80 °C durch Verwendung der T4 DNA-Ligase bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 1 h. Um die benötigte Menge des Inserts zu bestimmen, wurde die folgende Formel verwendet.

**Formel 1:** Formel zur Berechnung der benötigten Menge an Insert bei der Ligation.

$$ng(Insert) = \frac{ng(Vektor) \times kb(Insert)}{kb(Vektor)} \times 5$$

**Tabelle 21:** Pipettierschema für die Ligation.

Reagentien	Volumen [ $\mu$ L]
Vektor	1
DNA-Fragment (Insert)	5
T4 DNA-Ligase (5 u/ $\mu$ L)	1
10x T4 DNA-Ligase Puffer	2
ad 20 $\mu$ L dd H <sub>2</sub> O	

### 12.8.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### 12.8.8.1 Einbringung neuer Schnittstellen an das Gen ambJ

Die Einbringung der Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* an die Gene ambJ, ambS, ambR, ambN und ambQ erfolgte mit Hilfe von selektiven Primern (s. Oligonukleotide) unter Verwendung der Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity-Polymerase der Fa. THERMO SCIENTIFIC. Die Zusammensetzung der Standard-PCR-Ansätze ist in Tabelle 22 dargestellt.

**Tabelle 22:** Standard-PCR-Ansatz für die Kolonierung der *amb*-Gene mit der Phusion® High Fidelity Polymerase.

	H <sub>2</sub> O-Kontrolle [μL]	PCR [μL]	Endkonzentration
5x Phusion® HF buffer	4	4	1x
10mM dNTPs	0.4	0.4	200 μM
5'-Primer	2	2	10 pM
3'-Primer	2	2	10 pM
DNA	-	0.2	0.2 ng/μL
Phusion® DNA Polymerase	0.2	0.2	0.02 u/μL
ad 20 μL dd H <sub>2</sub> O			

Die PCR-Ansätze wurden in einem Thermoblock mit den entsprechenden Genen angepasstem Temperaturprogramm inkubiert. Das PCR-Programm kann Tabelle 23 entnommen werden.

**Tabelle 23:** Temperaturprogramm der PCR für die *amb*-Gene.

Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	98 °C	1 min
30	Denaturierung	98 °C	15 s
	Primer-Annealing	64 – 74 °C	20 s
	Elongation	72 °C	50 s
1	Terminale Elongation	72 °C	5 min
1	Ende	8 °C	bis zur Probenentnahme

#### 12.8.8.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wird zur Überprüfung von erfolgreichen Ligationen eingesetzt, indem eine transformierte *E. coli* Kolonie als Templat für die PCR verwendet wird. Hierzu wurde zunächst die Bakterienmasse in 6 mL 2TY-Flüssigkulturen über Nacht bei 37 °C inkubiert. 50 μL dieser Kultur wurden bei 5,000 x g für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Zellpellet wurde mit dem PCR-Ansatz (Pipettierschema s. Tabelle

25) unter Verwendung eines spezifischen Temperaturprogramms in einem Thermoblock inkubiert.

**Tabelle 24:** Pipettierschema für die Kolonie-PCR.

	PCR [ $\mu$ L]
10x Dream Tag Puffer	2
10mM dNTPs	0.4
5'-Primer	1
3'-Primer	1
DNA	Zellpellet
Dream Tag Polymerase	0.1
ad 20 $\mu$ L dd H <sub>2</sub> O	

**Tabelle 25:** Temperaturprogramm der Kolonie-PCR.

Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	98 °C	1 min
30	Denaturierung	98 °C	15 s
	Primer-Annealing	44 °C	20 s
	Elongation	72 °C	50 s
1	Terminale Elongation	72 °C	5 min
1	Ende	8 °C	bis zur Probenentnahme

## 12.9 Mikrobiologische und proteinbiochemische Methoden

### 12.9.1 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

Chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen wurden hergestellt, indem 50 mL 2TY-Medium mit 1 mL einer Flüssigkultur (37 °C, 200 rpm) inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert wurden. Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Bei einer OD<sub>595</sub> von 0.5-0.8 wurde die Kultur bei 3500 x g für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 50 mL Kompetenzpuffer resuspendiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation auf Eis für 1 h sowie

Zentrifugation für 10 min bei 3500 x g. Das Zellpellet wurde in mit 20% (v/v) Glycerin versetztem Kompetenzpuffer aufgenommen, zu 100 µL aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### **12.9.2 Chemische Transformation**

#### *12.9.2.1 Transformation mit Plasmid DNA*

Die chemische Transformation wurde mit zuvor auf Eis aufgetauten chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen durchgeführt. Dazu wurde 1 µL Plasmid-DNA mit 100 µL kompetenter Zellen vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 60 s und Inkubation auf Eis für 10 min. Nach der Zugabe von 500 µL LB-Medium wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 30 s bei 5000 x g zentrifugiert. 500 µL des Überstandes wurden verworfen und das Zellpellet im restlichen Volumen resuspendiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB- oder 2TY-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika (50 µg/mL) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### *12.9.2.2 Transformation mit Plasmid DNA nach Ligation*

Die Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid DNA nach Ligation erfolgte wie unter 3.8.2.1 beschrieben. Jedoch wurden hierbei 100 µL kompetenter Zellen mit dem gesamten Ligationsansatz transformiert.

### **12.9.3 Heterologe Expression**

Die heterologe Expression erfolgte ausgehend von einer Transformation der entsprechenden chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen mit dem jeweiligen Plasmid und Selektion auf Agarplatten mit Selektionsdruck. Anschließend wurde eine Übernachtskultur mit Zellmaterial einer Einzelkolonie inokuliert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Mit dieser Flüssigkultur wurde eine Hauptkultur auf eine OD<sub>595</sub> von 0.05 angeimpft und unter Selektionsdruck (50 µg/mL Antibiotikum) bei 37 °C und 160 rpm kultiviert. Nachdem die Kultur eine OD<sub>595</sub> von 0.5-0.8 erreicht hatte, wurde die Expression mit IPTG induziert und für 16-24 h bei 15-25 °C inkubiert. Nach dem Zentrifugieren bei 4 °C und 4,500 x g für 30 min wurde das Lysat verworfen und das Zellpellet für den anschließenden Zellaufschluss auf Eis gelagert.

#### **12.9.4 Präparation für den Zellaufschluss**

Das durch die heterologe Expression mit anschließender Sedimentation gewonnene Zellpellet wurde in Bindepuffer resuspendiert. Dabei wurden 10 mL Puffer für 1 g Pellet verwendet.

#### **12.9.5 Zellaufschluss mit Ultraschall**

Der Zellaufschluss in Volumina von 1-5 mL wurde mit einem Ultraschall-Homogenisator (*duty cycle: 30%, output control: 20 W* beziehungsweise *duty cycle: 45%, output control: ca. 5 kJ*) unter Eiskühlung in jeweils sieben Zyklen (2 min Ultraschall, 1 min Eiskühlung beziehungsweise 30 s Ultraschall, 30 s Eiskühlung) durchgeführt. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 10,000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert und das Zelllysate bei -20 °C zur Proteinreinigung gelagert beziehungsweise für die nächsten Reinigungsschritte verwendet.

#### **12.9.6 Zellaufschluss mit FRENCH-PRESS-Verfahren**

Der Zellaufschluss von Volumina zwischen 5 und 15 mL wurde nach dem FRENCH-PRESS-Verfahren in zwei Zyklen bei 1,000 psi (*high*) durchgeführt. Dazu wurde zunächst der Metallzylinder für 5 min bei -80 °C gekühlt. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 10,000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert und das Zelllysate bei -20 °C zur Proteinreinigung gelagert beziehungsweise für die nächsten Reinigungsschritte verwendet.

#### **12.9.7 Proteinreinigung durch Affinitätschromatografie**

Die Metallchelate-Affinitätschromatografie mit einer Säule mit Ni-NTA His<sup>®</sup> Resin der Fa. NOVAGEN wurde zur Reinigung der durch heterologe Expression erhaltenen Enzyme verwendet. Hierzu wurde zunächst die FPLC-Säule mit dem 10-fachen Säulenvolumen des Bindepuffers equilibriert. Im Anschluss wurde das Lysat aufgetragen. Nachfolgend erfolgten zwei Waschläufe mit jeweils 10-fachem Säulenvolumen des Bindepuffers beziehungsweise der Waschlösung. Anschließend wurde das Enzym in drei Schritten mit dem jeweils 10-fachen Säulenvolumen von der Säule eluiert. Hierzu wurden nacheinander die Elutionspuffer I bis IV verwendet. Nachdem Imidazolrückstände mit 0.5 M Natronlauge von der Säule gewaschen wurden, wurde das Ni-NTA His<sup>®</sup> Resin im Lagerpuffer (Bindepuffer mit 20% (v/v) Ethanol) aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

### **12.9.8 Entsalzung und Konzentration**

Für die Konzentration der Proteinproben wurden entweder 1.5 mL Roti® Spin Mini-10 Ultrafiltrationssäulen mit einem MWCO (*Molecular Weight Cut Off*) von 10 kDa der Fa. CARL ROTH, 5 mL Amicon® Ultrafiltrationssäulen mit einem MWCO von 30 kDa beziehungsweise 10 kDa der Fa. MILLIPORE verwendet. Für die anschließende Entsalzung wurden PD-10 Säulen mit Sephadex™ G-25M Säulenmaterial der Fa. GE HEALTHCARE verwendet.

Die das gewünschte Protein enthaltenden Proben wurden zunächst mit Ultrafiltrationssäulen auf ein Volumen von 2 mL konzentriert (4,500 x g, 15-30 min). Anschließend wurden die Proben mit PD-10-Säulen nach den Vorgaben des Herstellers entsalzt und erneut mit den Ultrafiltrationssäulen auf ein Volumen von 500 µL aufkonzentriert. Die erhaltenden Proteine wurden direkt in die Enzymaktivitätstests eingesetzt oder versetzt mit 50% Glycerin bei -20 °C gelagert.

### **12.9.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden 5%ige Sammel- und 12%ige bzw 15%ige Trenngele verwendet. Zur Analyse der Zellproben wurden 10 µL Lysat mit 10 µL SDS-Ladepuffer sowie eine Pipettenspitze des Zellpellets mit jeweils 10 µL SDS-Ladepuffer und 10x Lämmli-Mix vermischt und bei 95 °C für 10 min inkubiert. Aufgetragen wurden 4 µL PageRuler™ Prestained/Unstained Protein Ladder der Fa. FERMENTAS beziehungsweise Colour Prestained Protein Standard Broad Range (11-245 kDa) der Fa. NEW ENGLAND BIOLABS als Proteinstandard und jeweils 20 µL Proteinprobe. Die Proben wurden bei 125 V für 10 min fokussiert und bei 175 V für 50 min aufgetrennt. Die Gele wurden für eine Stunde in Färbelösung gefärbt und anschließend über Nacht mit Entfärbelösung bis zur gewünschten Farbintensität entfärbt.

### **12.9.10 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration (BRADFORD-Test)**

Die Gesamtproteinkonzentration wurde mittels BRADFORD-Test bestimmt. Hierzu wurden Mikrotiterplatten verwendet, in denen jeweils 50 µL der verdünnten Proteinprobe (1:40-Verdünnung) mit 200 µL Arbeitslösung Roti® Nanoquant der Fa. CARL ROTH versetzt wurden. Nach anschließender Inkubation für 5 min wurde die Absorption bei 620 nm mit einem Elisa Reader bestimmt. Alternativ wurde ein Mikrotiterplatten Lesegerät verwendet,

bei dem die Absorption bei 460 nm und 590 nm gemessen wurde. Die Gesamtprotein-konzentration wurde im Anschluss durch Verwendung einer erstellten Kalibriergerade einer BSA-Standardreihe ermittelt.

### **12.10 Enzymaktivitätstest**

#### **12.10.1 Enzymaktivitätstests mit BorDH**

Die Enzymaktivitätsassays wurden in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ L durchgeführt. Dazu wurden 12 mM des Substrates **80** und bis zu 3 mg/mL der entsprechenden DH-Domäne (BorDH) in HEPES-Puffer (25 mM, pH 7.5, 100 mM NaCl) verwendet. Die Reaktionen wurden für 16 h bei 37 °C inkubiert und im Anschluss mit EtOAc (3x 1 mL) extrahiert. Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde, wurden die Proben in 50  $\mu$ L MeOH aufgenommen und per UPLC-MS analysiert. Die resultierenden Chromatogramme und Massenspuren wurden mit Referenzläufen verglichen. Außerdem wurden Reaktionen ohne Enzym beziehungsweise mit einer Mutante der Dehydratasedomäne als Kontrollexperimente durchgeführt.

#### **12.10.2 Enzymaktivitätstests mit BorDH3 im großen Maßstab**

10 mg Substrat wurden mit 6 mg/mL BorDH3 in 25 mM HEPES (pH7.5, 100 mM NaCl) bei einer Temperatur von 37 °C für 16 h inkubiert (Gesamtvolumen 1 mL). Im Anschluss wurde die Probe mit EtOAc (3x 1 mL) extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt des Enzymaktivitätstests wurde in Dichlormethan- $d_2$  gelöst und das aufgenommene Spektrum mit dem Spektrum des synthetisch gewonnenen Materials verglichen.

#### **12.10.3 Enzymaktivitätstests mit AmbJ im analytischen Maßstab**

Substrat **140** wurde in Methanol beziehungsweise DMSO gelöst (Stammlösung: 1.6 mM) und 10  $\mu$ L dieser Lösung in die Enzymaktivitätstests eingesetzt (Endkonzentration: 80  $\mu$ M (entspricht: 3.6  $\mu$ g)). Außerdem wurden Stammlösungen der Kofaktoren NADPH (Stammlösung: 40 mM), NADH (Stammlösung: 40 mM) und FAD (Stammlösung 1.6 mM) in dest. Wasser hergestellt und jeweils 10  $\mu$ L dieser Lösungen für die Tests verwendet (Endkonzentrationen; NADPH und NADH: 2 mM, FAD: 80  $\mu$ M). Das durch heterologe Expression gewonnene und über Ni-NTA gereinigte Enzym AmbJ wurde zu der Lösung

zugefügt (Stammlösung: 3-5 mg/mL, Endkonzentration: 15  $\mu$ M (entspricht: 162  $\mu$ g)) und das Gesamtvolumen mit dem Reaktionspuffer auf 200  $\mu$ L aufgefüllt. Die Enzymtests wurden bei 28 °C über 16 h inkubiert und im Anschluss mit Ethylacetat (3x 200  $\mu$ L) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in 200  $\mu$ L MeOH aufgenommen und per UPLC-MS analysiert.

### **12.10.4 Enzymaktivitätstests mit AmbJ im großen Maßstab**

5 mg Substrat **140** wurde in DMSO (50  $\mu$ L) gelöst (Endkonzentration: 10 mM). Außerdem wurden die Kofaktoren NADPH, NADH und FAD für die Tests verwendet (Endkonzentrationen; NADPH und NADH: 2 mM, FAD: 80  $\mu$ M). Das durch heterologe Expression gewonnene und über Ni-NTA gereinigte Enzym AmbJ wurde zu der Lösung zugefügt (3-5 mg/mL) und das Gesamtvolumen mit dem Reaktionspuffer auf 2 mL aufgefüllt. Die Enzymtests wurden bei 28 °C über 16 h inkubiert und im Anschluss mit Ethylacetat (3x 2 mL) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in deuteriertem MeOH aufgenommen und per NMR analysiert.

### **12.10.5 Enzymaktivitätstests mit dem Lysat im analytischen Maßstab**

Substrat **140** wurde in DMSO gelöst (Stammlösung: 1.6 mM) und 10  $\mu$ L dieser Lösung in die Enzymaktivitätstests eingesetzt (Endkonzentration: 80  $\mu$ M (entspricht: 3.6  $\mu$ g)). Außerdem wurden Stammlösungen der Kofaktoren NADPH (Stammlösung: 40 mM), NADH (Stammlösung: 40 mM) und FAD (Stammlösung 1.6 mM) in dest. Wasser hergestellt und jeweils 10  $\mu$ L dieser Lösungen für die Tests verwendet (Endkonzentrationen; NADPH und NADH: 2 mM, FAD: 80  $\mu$ M). Das durch heterologe Expression gewonnene und das Enzym AmbJ enthaltene Lysat (3 mL, 1 g Pellet) wurde zu der Lösung zugefügt und das Gesamtvolumen mit dem Reaktionspuffer auf 4 mL aufgefüllt. Die Enzymtests wurden bei 28 °C über 16 h inkubiert und im Anschluss mit Ethylacetat (3x 4 mL) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in 1 mL MeOH aufgenommen und per UPLC-MS analysiert.

# 13 Anhang

## 13.1 Gen- und Proteinsequenzen

### *ambJ*

```
CATATGAGCC GTGCAATTGT TATTGGTGGT AGCATTGCAG GTATGTGTAG CGCACGTGTT
CTGTGTGATT TTTTGTGATGA AGTGGTGATT CTGGATCGTG ATCAGTTTCC GACCGAAATT
GCACCGCGTC CGGGTGTTC GCAGAGCCGT CATACCCATG TTCTGCTGCC TCGTGGTGAA
CAAGAAGTGG AAGAAGTGT TCCGGGTTTT AGCGCAAGCA TGATGGCAGC CGGTGCACTG
AAATTTGATG TTGGCACCGG TATGGCAGTT CGTCGTGTTT TTGGTTGGCA GACCGTTGGT
CCGACAGGTC GTGAACTGCT GTGGGCAAGC CGTGACCTGT TTGAAGGCAC CATTTCGTAGC
CTGATGCGTC AGCAGACCAA AGTTCGTATT CGTGAAGGTA GCCAGGTTCT GGCCTGCGT
AGCACCGCAG GCGAACGTCC GCGTATTTCG GGTGTGCTGC TGCGTGATGA TGCAGCAGAG
CAAGAGCTGG AAGCAGATCT GGTTGTTGAT GCAAGCGGTC GCCATACCCG TGCAGAACAG
TGGCTGACCG AACTGGGTCT GCCTGCACCG AAAACCCAGT GTGTTGATAG CCGTGCAGGT
TATGCAAGCC GTTTCTATAA AGTTCGCCT CCGGAACGTC GTCCGAGCGA TTGGTGGTGG
AAAGGTCTGT GGGTTGAAGC AGAACCCGAT CGTCCGCGTG GTGCAGTTGT TTTTCCGATT
GAAGGTGATC GTTGGCTGGT TACCGCAAGC GGTTTTAGTG GTAGCTATCC GCCTACCGAT
GAACAGGGTT TTCTGGAACA TCTGGCAAGC CTGAGCAGCC CGATTGTTGC ACGTGCCGTT
GCACTGGCAG AACCGATTAG CCCGATTTAT GGTAATCGTA GCATGGCAAAA TGTTAGCCGT
GCCTATGATC GCTGGGAAAT TCAGCTGCCT GGTTTTGTTG CAGTTGGTGA TGCAGCCTGT
GCATTTAATC CGGTTTATGG TCAGGGTATG AGCACCAGCA CCGTTAGCGC AGTTATTCTG
CGTGACGTTT TCGCTCGTGC TGGTCCGGGT GCAGGTTTTG AACCGGGTTT TTTTCAGCAG
CAGGCAAAAT TTCTGCGTAG CGTTTGGGAT TTTGCAACCC GTAGCGATT TCGTTGGCCT
GGCACCGTTG GTGACGCTCC TCATACACCG GCAATTATTG GTGCCATATG AAAACTGGCA
ATTGAAAGCG CACATCATGA TAGCGCAATT CGTCGTCACC TGTTTCCAGC ATTTGATCTG
ACCGGTAGCG CAACCCTGCT GTTTGAACCG CTGTTTGTG GTAAAGTTCT GCTGAGCGCA
GGTCAGCGTC GTCTGCGTCA GCGTCTGCTG GGCACCCCTC CGATTCCGGA AAGCCCTCCG
GTTCTGTCAG GCGTTCCTCG TTGGGCAGCG GGTGCAGCAA TGTAAGAATT C
```

### **AmbJ**

```
1 MRDAHCEPRG ASGKLPPFR ANEEPLMAQA FPASPTTTPS TRTLVVQSPI DGSRLGEVPL
61 MGDAEVHAAV ERARLAQRAW AQLPIETRAG RVARVIDAFV ERLDDLVDVAV VLETGKPRND
121 ALAEWITVVD ACHYFTRHAG RILADTSITL HHMKWRGSYV TYVPMGVVAV ISPWNLPLAI
181 PMGSVIEALI AGNAVVKPS EVTPLTLLKA KEVVDAIGIP TDLFQVVTDG ARTGAALIDA
241 GVQKVVFTGG VSSGRRVGAA CAERLIPCVL ELGGKAPLIA CDDCEIERTA RSIVAGGFIN
301 SGQLCISVER VLATEAVHDR LVDRVVALTR ELRQGDPRAD DVDVGAIIFA KQMDIAEBAHI
361 KDAVARGALV ATGRRRRPGP GMFFEPTVLT RCTPEMTVMR EEIFGPVVPI MKVRDEDEAV
421 RIANDSPLGL HAYVFSRDKT RARAVERIE AGTVMINDVL VSYCAPEAPF GGIKNSGYGR
481 VHSDDSLRAM CYARHVNER FAMPLNSPLL FPYTTAKYRG MRAAIRATFK RTPLLGLRLAD
541 LL
```

### *ambN*

```
GAATTCATGC GTGATGCACA TTGTGAACCG CGTGGTGCAA GCGGTAAACT GCCTCCGCGT
TTTCGTGCAA ATGAAGAACC GCTGATGGCA CAGGCATTTT CCGCAAGCCC GACCACCACC
CGAGCACCCG TACCCTGGTT GTTCAGAGCC CGATTGATGG TAGCCGCTG GGTGAAGTTC
TCTGATGGGT GATGCCGAAG TTCATGCAGC AGTTGAACGT GCCCGTCTGG CACAGCGTGC
ATGGGCACAG CTGCCGATTG AAACCCGTGC AGGTCGTGTT GCACGTGTTA TTGATGCATT
```

TGTTGAACGT CTGGATGATC TGGTTGATGC CGTTGTTCTG GAAACCGGTA AACCGCGTAA  
 TGATGCACTG GCAGAATGGA TTACCGTTGT TGATGCATGT CATTATTTCA CCCGTCATGC  
 CGGTCGTATT CTGGCAGATA CCAGCATTAC CCTGCATCAT ATGAAATGGC GTGGTAGCTA  
 TGTTACCTAT GTTCCGATGG GTGTTGTTGC AGTTATTAGC CCGTGGAATC TGCCGCTGGC  
 AATCCCCGATG GGTAGCGTTA TTGAAGCACT GATTGCAGGT AATGCGGTTG TTGTTAAACC  
 GAGCGAAGTT ACACCGCTGA CCCTGCTGAA AGCAAAAGAA GTTGTGACG CAATTGGTAT  
 TCCGACCGAC CTGTTTCAGG TTGTTACCGG TGATGCACGT ACCGGTGCAG CGCTGATTGA  
 TGCGGGTGT CAGAAAGTTG TTTTTACCGG TGGTGTAGC AGCGGTCGTC GTGTGGTGC  
 AGCATGTGAT GAACGTCTGA TTCCGTGCGT TCTGGAACCTG GGTGGTAAAG CACCGCTGAT  
 TGCATGTGAT GATTGTGAAA TTGAACGTAC CGCACGTAGC ATTGTTGCCG GTGGTTTTAT  
 CAATAGCGGT CAGCTGTGTA TTAGCGTGGA ACGTGTCTG GCCACCGAAG CAGTTCATGA  
 TCGTCTGGTG GATCGTGTTG TGGCACTGAC CCGTGAACCTG CGTCAGGGTG ATCCGCGTGC  
 AGATGATGTT GATGTTGGTG CCATTATCTT TGCCAAACAA ATGGATATTG CCGAGGCCCA  
 TATTAAAGAT GCAGTTGCCC GTGGTGCACCT GGTGCGACC GGTGGTCGTC GTCGTCCGGG  
 TCCGGGTATG TTTTTTGAAC CGACCGTTCT GACCCGTTGT ACACCGGAAA TGACCGTTAT  
 GCGTGAAGAA ATTTTTGGTC CGGTTGGCCG ATTATGAAAG TTCGTGATGA AGATGAAGCC  
 GTGCGTATTG CAAATGATAG TCCGCTGGGT CTGCATGCAT ATGTTTTTAG CCGTGATAAA  
 ACACGTGCGC GTGCAGTTGC GGAACGCATT GAAGCAGGCA CCGTTATGAT TAATGATGTT  
 CTGGTTAGCT ATTGTGCACC GGAAGCACCG TTTGGTGGTA TCAAAAATAG CGGTTATGGT  
 CGTGTTCCATA GTGATGATAG CCTGTGCAAT GTGTTATGCA CGTCATGTTA ATCATGAACG  
 TTTTGCAATG CCGCTGAATA GCCCTCTGCT GTTTCCGTAT ACCACCGCAA AATATCGTGG  
 TATGCGTGCA GCAATTCGTG CAACCTTTAA ACGCACACCG CTGCTGGGTC GTCTGGCCGA  
 TCTGCTGTAA AAGCTT

**AmbN**

1 MRDAHCEPRG ASGKLPPFR ANEEPLMAQA FPASPTTTPS TRTLVVQSPI DGSRLGEVPL  
 61 MGDAEVHAAV ERARLAQRAW AQLPIETRAG RVARVIDAFV ERLDDLVDVAV VLETGKPRND  
 121 ALAEWITVVD ACHYFTRHAG RILADTSITL HHMKWRGSYV TYVPMGVVAV ISPWNLPLAI  
 181 PMGSVIEALI AGNAVVKPS EVTPLTLKKA KEVVDAIGIP TDLFQVVTDG ARTGAALIDA  
 241 GVQKVVFTGG VSSGRRVGA CAERLIPCVL ELGGKAPLIA CDDCEIERTA RSIVAGGFIN  
 301 SQQLCISVER VLATEAVHDR LVDRVVALTR ELRQGDPRAD DVDVGAIIFA KQMDIAEABI  
 361 KDAVARGALV ATGGRRRPGP GMFFEPTVLT RCTPEMTVMR EEIFGPVVI MKVRDEDEAV  
 421 RIANDSPLGL HAYVFSRDKT RARAVAERIE AGTVMINDVL VSYCAPEAPF GGIKNSGYGR  
 481 VHSDDSLRAM CYARHVNHER FAMPLNSPLL FPYTTAKYRG MRAAIRATFK RTPLLGLRAD  
 541 LL

**ambS**

CATATGCCTC CGACCGAAGA TCTGAAACAA ATTCTGGAAC AGCTGGGTAG CGCACGTCTG  
 AGCCATGAAG TTGAACTGAG CCAGCTGATG GCACCGCTGA GTCCGGAAGA AGTTCTGTTT  
 TGTTTTCTGT TTATCAAAAG CCGTAGTGCC GAAGGTTTTG GTGAAGAACC GGTGCGTTTT  
 AAAGATCTGC CGAGCGCACC GGATCGTTTT TGGAAAGCAA TGGCACTGCA TGTTGGTGCA  
 CTGAGCGGTC AGTTTTAAACC GCTGCCTCCG AGCTATCTGA AAGATGCATG GCTGCGTTTT  
 GTTAAAGAAC GTCCGGGTGA TGAACCGCTG AGCCTGCTGG AATATTACAG CCTGGCAGCA  
 CAGCTGCTGA GCGATACCGA TCGTGTTTTT ATCAATCATG GTTATGCCTT TCTGAATCCG  
 GCAGAAGCAC CGAGTCTGGC AGCATGGGAA GAACCGAGCC GTCTGAGCAT TCATCTGTAT  
 CATAAAGTGC TGGGTGGTCA GGATTTTACC GGTCTGGATG TTGTTGATAT GGCATGTGGT  
 CGTGGTGGTG GTAGCCTGTA CCTGAAACAG CGTAAAGAAG CACGTCTGGT TGCAGGTATT  
 GATGCAGTTC GTACCCATGT TCTGCTGGCA CGTGAAGCAC ATCCGAGCGT TGATGGTGT  
 TATTTTCTGC ATGGTCGTGC AGAAGAAATT CCGCTGCCGA CCGGTGCATT TGATGCCCTG  
 ATTGCAGTTG ATGCCGTTTT TCATTTTCCG CTGCGTGAGT TCCTGCATGA AGCCATCGT  
 GTTGTAAAC CGGGTGGTCG CTGTTTTCTG AATAGCTGG GTCCGCCTAC CTGGTATATG  
 GATCTGGAAG GTGCAGTTGA AAGCTGTGGT TGGAAACTGG AACATGCCGA AGATATTACC  
 ACCGGTGTGC TGCTGGCTCG CGAACAGTGG CGCACCCATG ATATGTTTAC CTGGGTTCGT  
 AGCCGTCCGC GTAAATGTGC TCCGGAATC TATATTGAAT TTGACCGTAT GGTGATGCTG  
 CCGGTTGAAG GTCGTCGCTA TTATAACTTT CATCTGACCC GTCTGGATCA GAAAGCAAGC  
 TGAATTC

**AmbS**

1 MPPTEDLKQI LEQLGSARLS HEVELSQLMA PLSPEEVLFC FLFIKSGSAE GFGEPEVRFK  
 61 DLPSAPDRFW KAMALHVGAL SGQFKPLPPS YLKDAWLRV KERPGEPLS LLEYYSLAAQ  
 121 LLSDTDRVFI NHGYAFLNPA EAPSLAAWEE PSRLSIHLYH KLLGGQDFTG LDVVDMACGR  
 181 GGGSLYLKQR KEARLVAGID AVRTHVLLAR EAHPSVDGVY FLHGRAEEIP LPTGAFDALI  
 241 AVDAVFHFPL REFLHEAHRV VKPGGRCFLN SWGPPTWYMD LEGAVESCGW KLEHAEDITT  
 301 GVLLAREQWR THDMFTWVRS RPRKCRPEIY IEFDRMVMLP VEGRRYYNFH LTRLDQKAS

***ambR***

CATATGGCAA GCAGCGAAGA TGGCACCCGT AGCTGGTCAA ATACCAAAAAG CCTGGCACTG  
 CATGAACGTG CAGCAAAAGT TATGCCTGGT GGTCAGGCAA ATTTTCGTGG TGGTCTGCTG  
 AGCACACCGC TGTTTTTTAG CCATGCACGT GGTGCACGTC TGTGGGATGT TGATGGTAAT  
 GAATATGTGG ATCTGATTAA TGCCGGTGGT CCGGGTATTC TGGGTCATAA TGATCCGGAA  
 TACATTGATG CACTGAAACG TCAGCTGGAT ACCGTTTATA GCCTGGGTAG CGGTATTTGT  
 CAGACCGAAC AGGATATTGA ACTGGCAGAA AAAATTGCAA GCCATGTTCC GTGTGCAGAA  
 CGTGTTCTGT TTTGTGTTAC CGGTAGCGAA GCAGTTCATC TGGCCCTGCG TCTGGCACGT  
 GCATATACCA AACGTCCGTA TTTTATCCGT TTTTCAGACCC ATTATCATGG CTGGTTTGAT  
 AGCGTTCTGG GTGGTGTGTG TGATGAACAT CCGGAAGGTC GTCCGCTGCC GCTGGAAAAGC  
 GAACAGAGCT TTTTTCATAC CGAAGGTCGT GTTCCGGATG CATTCAAATA TAGCTTTCTG  
 CTGCCGTGGA ATGATATTGA TGTTCTGGAA GAAACCCTGA AAAAATACGG TCATGAAAGTT  
 GCCATGATTC ACATGGAACC GATTCTGGTT AATGGTGGTG GTTGTCCGCC TCGTCCGGGT  
 TATCTGGAAC GTGTGCGTGA ACTGTGTGAT CAGCATGGTA TTGTTCTGGG TTTTGATGAA  
 GTGATTACCG GTTTTCGTGT TGGCCTGGGT GGCACACAGG CAGCACTGGG TGTTACACCG  
 GATCTGGCAA CCTTTGGTAA AGCACTGGGA GGTGGTATGC CGATGGCAGC AGTTGCAGGT  
 AAAGCAGAAA TCATGGATCA GCTGCGTACC GGTAAAGTGA CCGGTGCAGG CACCTTTAAT  
 GGTATCCGC TGGGTGTTGC AGCAAGCCTG GCCACACTGA AAATTCTGGA ACGGGATGAT  
 GGTGCAGTTT ATCGTCGTAT TGATATGATG CAGGCACGTC TGAAAGAAGG TCTGCTGGAT  
 ATTTGTAAAC GTCGTGGTAT TCCGGCACTG GTTCAGGGTC CGCGTGGTGT TTTTTTCTG  
 CTGTTTACCG ATAAACCGGT GATCTATAGT TTTCAAGAAC TGATGGAAGC AGCACTGCCT  
 CGTCAGTTTA AATTCTATAG CACCATGCCG GAAGAGGGCA CCCTGCTGAT GTATGGTGGT  
 CGTTGGTATA TTAGCGCAGC ACTGACCGAA GCAGATGTTG ATTGTGCACT GGAAAGTGCA  
 GATCGTACCC TGGCACGTAT TTGAATTC

**AmbR**

1 MASSEDGTRS WSNTKSLALH ERAAKVMPGG QANFRGGLLS TPLFFSHARG ARLWDVDGNE  
 61 YVDLINAGGP GILGHNDPEY IDALKRQLDT VYSLGSGICQ TEQDIELAEK IASHVPCAER  
 121 VRFCVTGSEA VHLALRLARA YTKRPFYFIRF QTHYHGWFDV VLGGVVDEHP EGRPLPLESE  
 181 QSFFHTEGRV PDAFKYSFLL PWNDIDVLEE TLKKGHEVA MIHMEPILVN GGGCPRPGY  
 241 LERVRELCDQ HGIVLGFDEV ITGFRVGLGG AQAALGVTPD LATFGKALGG GMPMAAVAGK  
 301 AEIMDQLRTG KVTGAGTFNG YPLGVAASLA TLKILERDDG AVYRRIDMMQ ARLKEGLLDI  
 361 CKRRGIPALV QGPRGVFFLL FTDKPVIIYSF QELMEALPR QFKFYSTMPE EGTLLMYGGR  
 421 WYISAALTEA DVDCALESAD RTLARI

***ambQ***

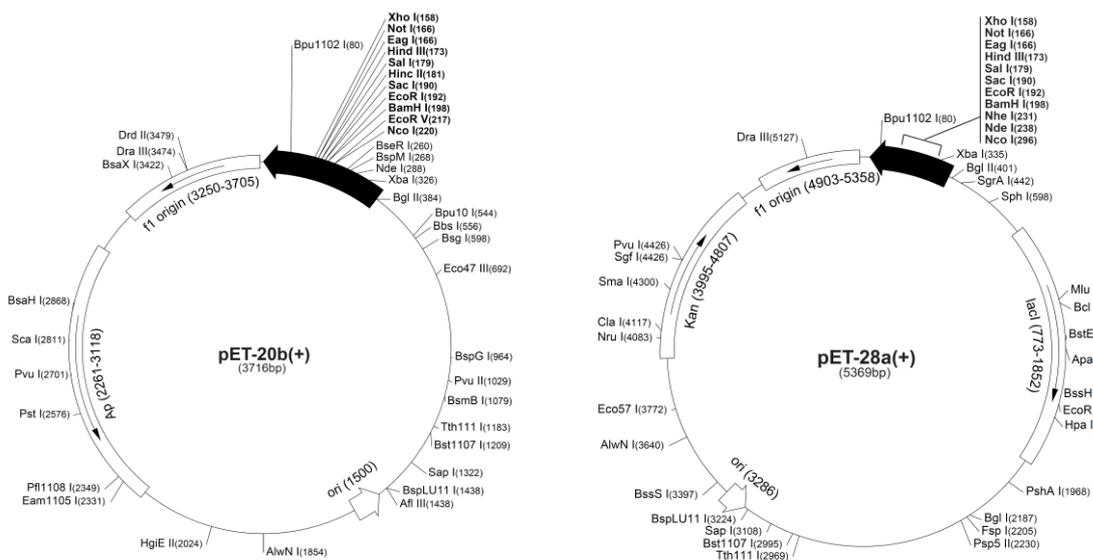
CATATGGTTT GGCAGCATGG TCGTCAGAGC CTGCATGAAT GTCATGATGG TGGTCTGTA  
 CCGTGTAGCG AAACCAGCGA AATTCGTGGT GCACCGCCTG GTCTGGATCG TATGACCGTT  
 CCGGGTCTGA GCACCCGTCA TGTTTTTTCAT CTGTGTTATA AACCGCAGCT GGGTGGTCTG  
 GCACGTCTGC GTCGTAGCGC GACCAGCAGC TGGGATGCAC GTCGTCCGCG TCACGCTCAG  
 CTGGAACCGC GTGCAGATAA TGCAACCCTG AATGCCCGTC TGCCCGAGGC ACCGCTGGCA  
 GATACCATGG AACCGAAAGC ACATGGCACC ATTCCGGAAG AAATGATGCA GAGCACCGCA  
 ACCATTGCTC CGCTGGCCGT TCTGTTTGTG CTGATGGCAA TTGAAGCAGT TGTTGCACGT

CATCGTCGTG GTGATAACCAC CTATCGTCTG CCGGATACCG TTGCAAGCGT TGGTGTGGT  
 GTGGGTTATT TTGCACTGGT TGCATTTTTT AGCTTCATCA GCATTGTGGT GTATGACATT  
 GTTTATGAAC GTTGGGCAAT TACCCATCAT GCACGTAGCG CAGTTACCAT TGTTTTTACC  
 ATTTTTGCAG CCGATTTTCT GTACTACCTG TTTTCATCGTG CAAGCCATCG TATTAATGTT  
 CTGTGGGCAA TTCATGTTGT GCATCATCAG AGCCGTGAAC AGAATCTGGC AGTTAATCTG  
 CGTATGCCGT GGCTGCAACC GGCATATCAG TGGTTTTTCT ATCTGCCGCT GGCATTTCTG  
 GGTATCCCG CTGCAGTTTT TCTGCTGGCA CGTGGTGTTA GCATTAGCTA TAATGTGTTT  
 ACCCATAACC GTGCAGTTGG TAAACTGGGT CCGCTGGAAT ATGTTCTGAA TACCCCGAGC  
 CATCATCGTG TTCATCATGG TATGGATGAG CAGTATCTGG ATTGTAATTA TGGTGGCATT  
 TTTATCGTTT GGGATCGTCT TCTGGGCACC TTTGTTCCGG AAGGTAAAGA ACCGACCTAT  
 GGCACCCGTC GTCGTGTTGT TAGCTGGAAT CCGATTTGGC TGAATGTTGA ACCGTTTATT  
 CATCTGGCAA AACTGAGCCG TGCAGCACGT AGCCCGTGGG ATCGTGTTAA AGTTTGGTTT  
 ATGCCACCGG AATGGCAGCC TGCCGGTGTT CTGGAAGCAA GCGCACCGCC AGAACCTCGT  
 GATGTTGAAA GCCGTGGTAG TACCGCAAGC AGCATTGCAC AGATGGCACT GAGCGTGGGT  
 GTTACC GTT TATTGGTGC AATGGTTATT ATGTATAACG GCACCAGCAG CACCATGCCT  
 CGTCTGGCAC TGCTGGTTCT GCTGCTGGCA AGCCTGGGTG CACATGCCCG TAGCCTGGAA  
 AGTCCGGGTT TTGCATGGCG TTTTGAAC TG CACGCGCAG CACTGCTGCT GGCCGTGCA  
 GGTGGCTGG ATGCAAGCGG TGCACGTCCG CTGGCGAGCG TTGCCCTGAT GGCAGCGGT  
 CTGAGCGCAG CAAGTGGTGT TCTGTTTCGT CTGGGTCGCC GTCCGCGTGG TAGCCGTGCC  
 GGTGGTGCAG AAGATGCAGC ACCGAGCATG AGCCTGCCTG GTAGCTAAGA ATTC

**AmbQ**

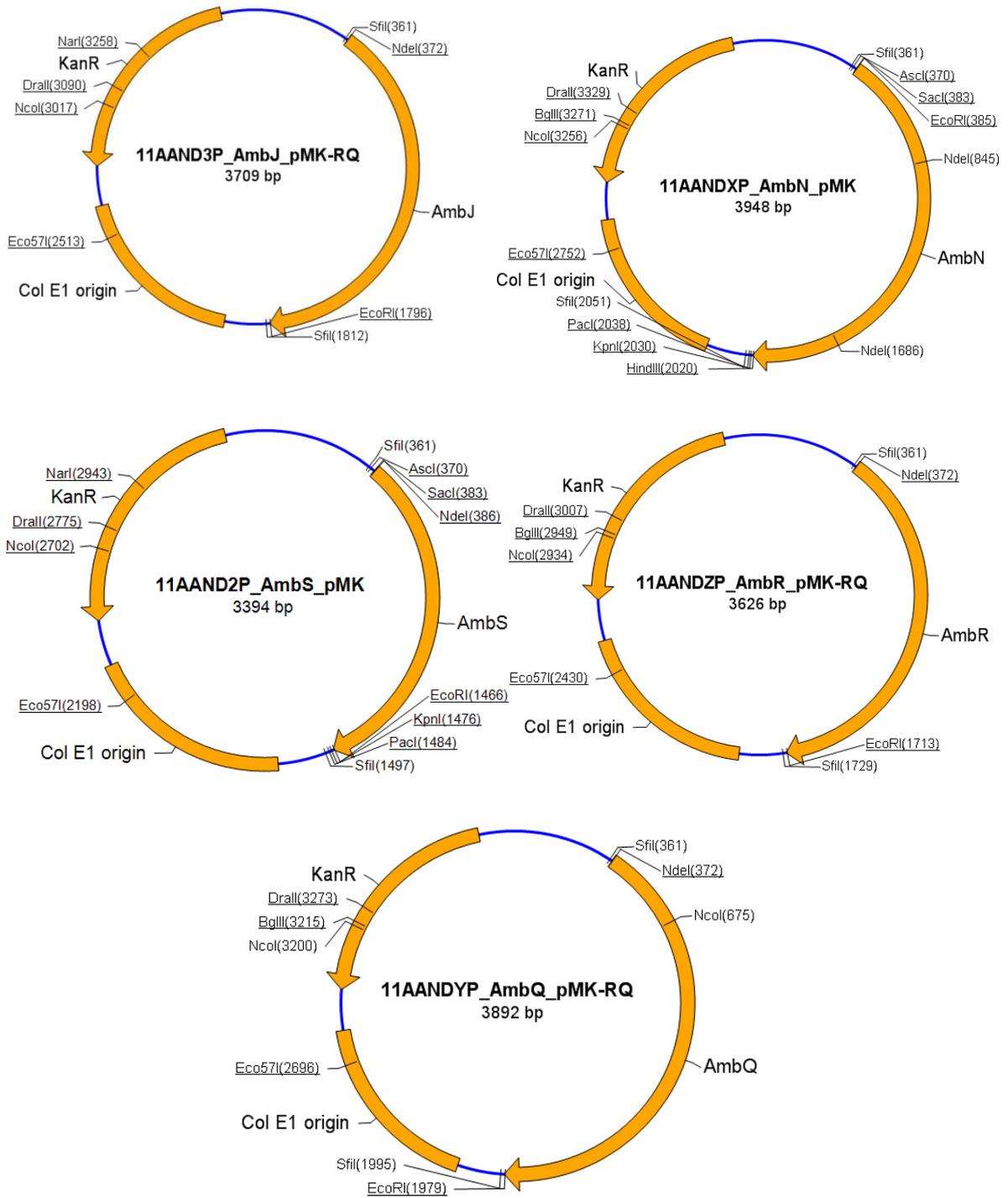
1 MVWQHGRQSL HECHDGGREP CSETSEIRGA PPGLDRMTVP GLSTRHVFHL CYKPQLGGLA  
 61 RLRRSATSSW DARRPRQRQL EPRADNATLN ARLPQAPLAD TMEPKAHGTI PEEMMQSTAT  
 121 IAPLAVLFVL MAIEAVVARH RRGDTTYRLP DTVASVGVGV GYFALVAFFS FISIVVYDIV  
 181 YERWAITHHA RSAVTIVFTI FAADFLYYLF HRASHRINVL WAIHVVHHQS REQNLAVNLR  
 241 MPWLQPAYQW FFYLPPLAFLG IPPAVFLLAR GVSISYNVFT HTRAVGKLG P LEYVLNTPSH  
 301 HRVHHGMDEQ YLDCNYGGIF IVWDRLLGTF VPEGKEPTYG TRRRVVS WNP IWLNVPEFIH  
 361 LAKLSRAARS PWDRVKWFWM PPEWQPAGVL EASAPPEPRD VESRGSTASS IAQMALSVGV  
 421 TVVIGAMVIM YTGTSSTMPR LALLVLLLAS LGAHARSLES PGFAWRFE LA RAALLLAVAG  
 481 WLDASGARPL ASVALMAGGL SAASGVLFRL GRRPRGSRAG GAEDAAPSMS LPGS

**13.2 Vektorkarten**

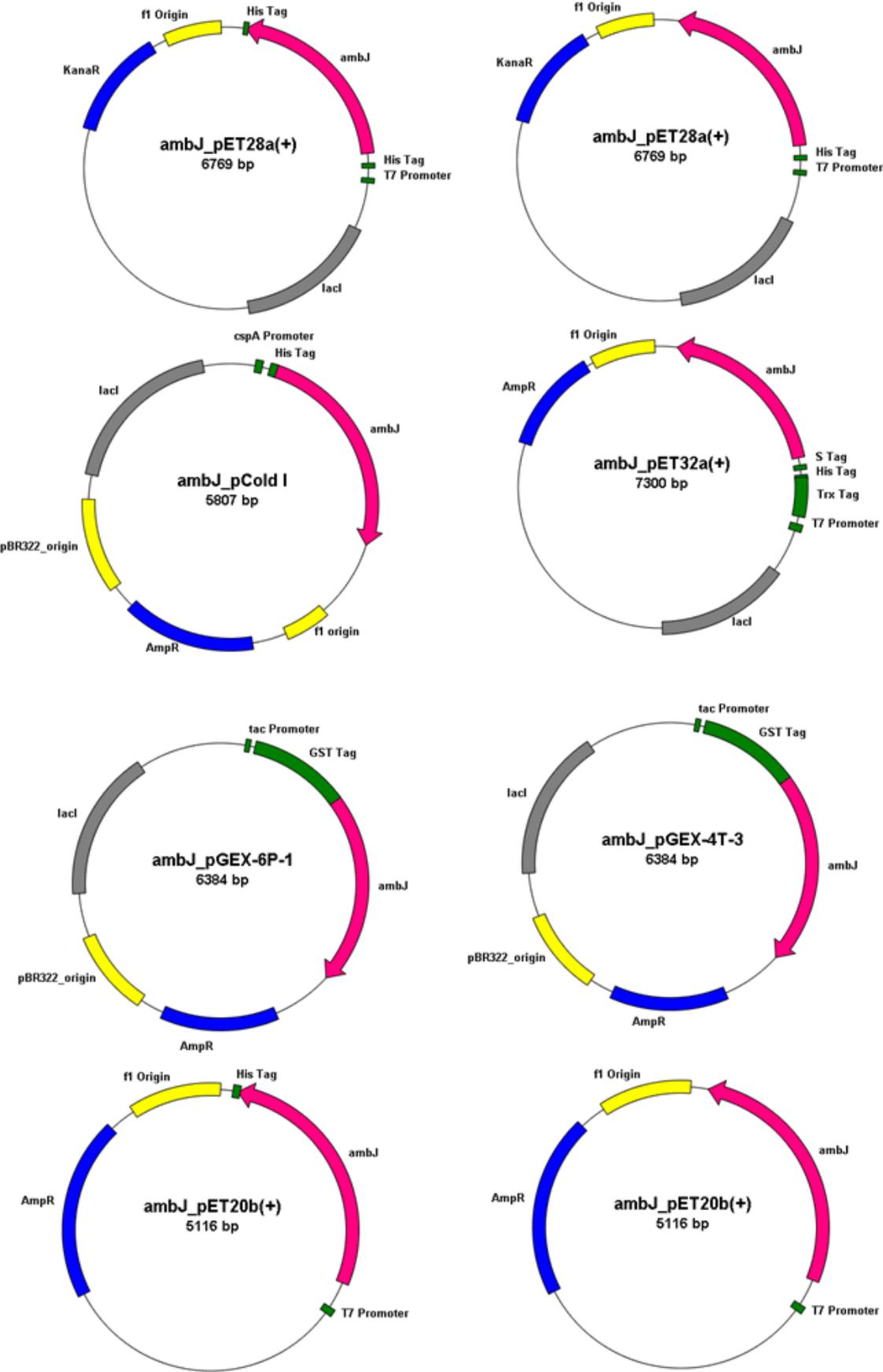


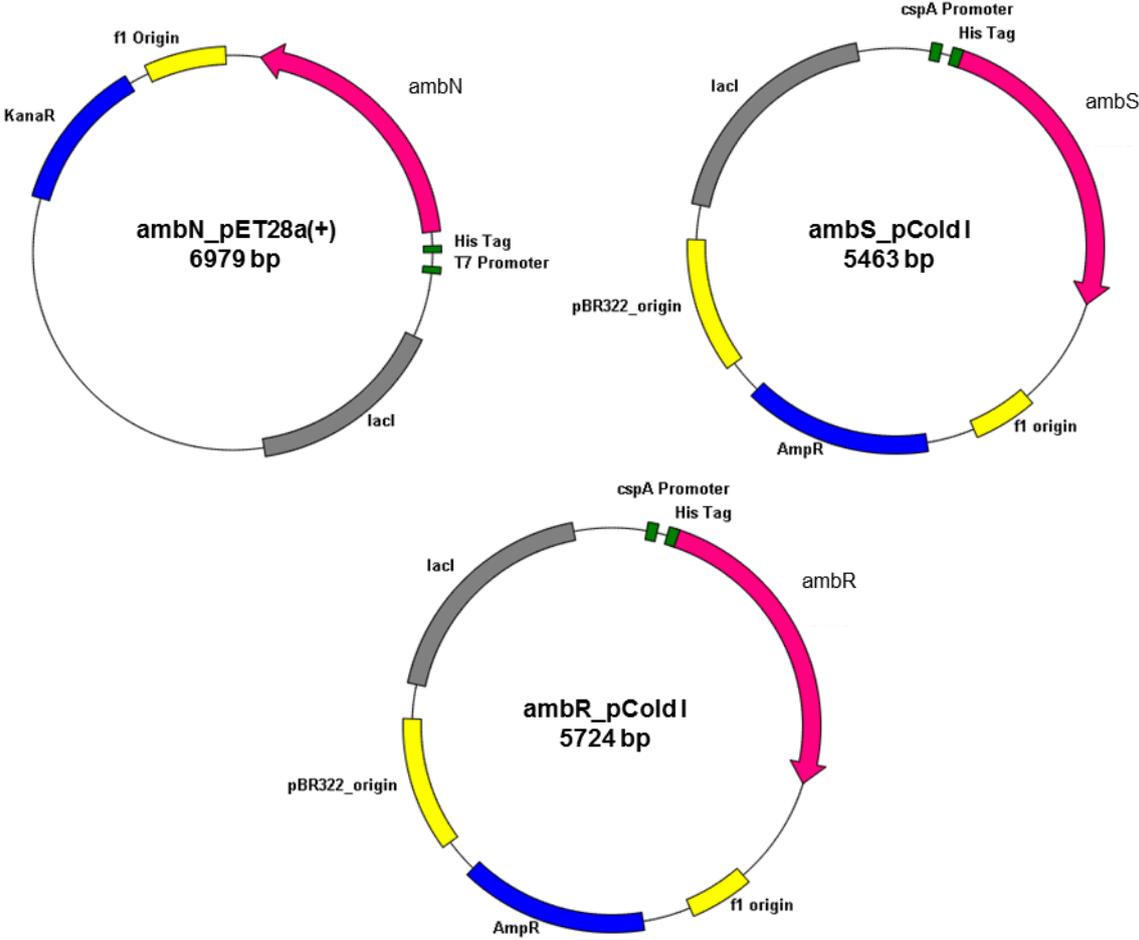


### 13.3 Synthetische Gene

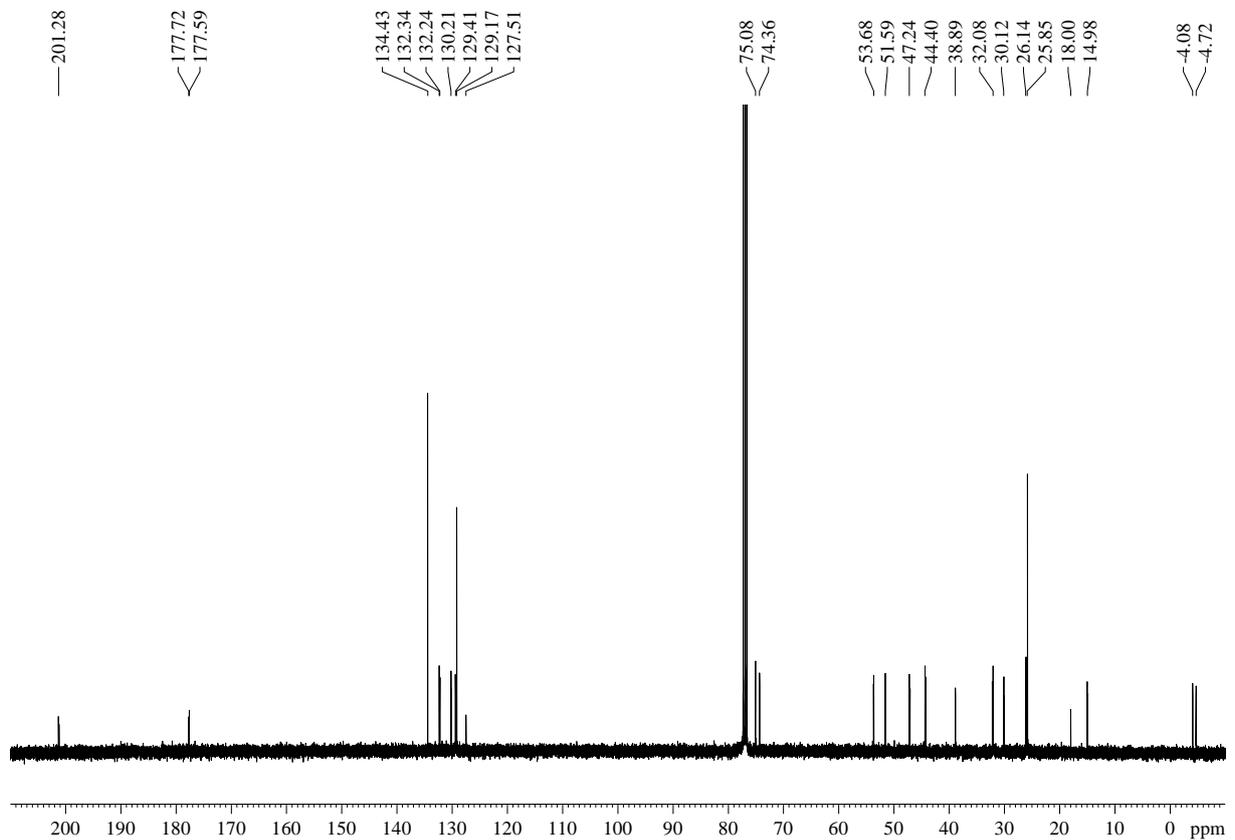
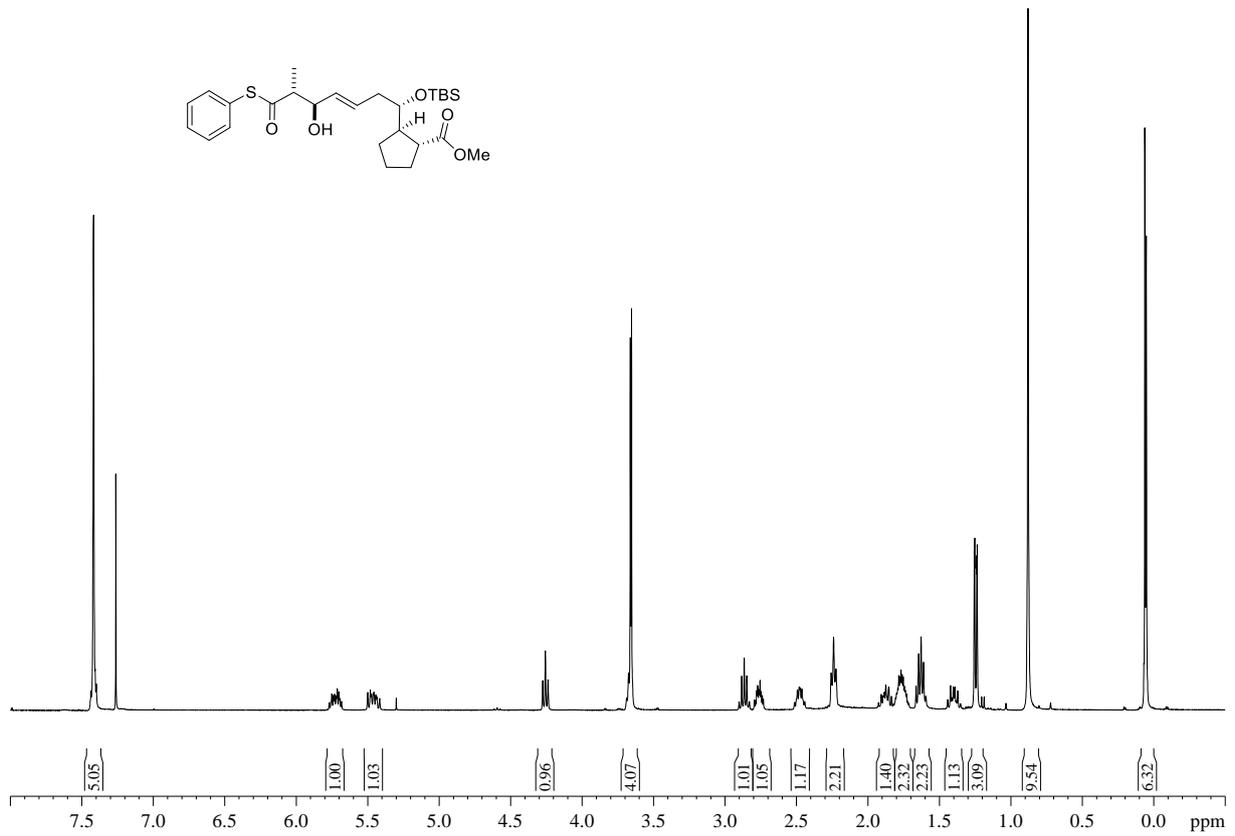


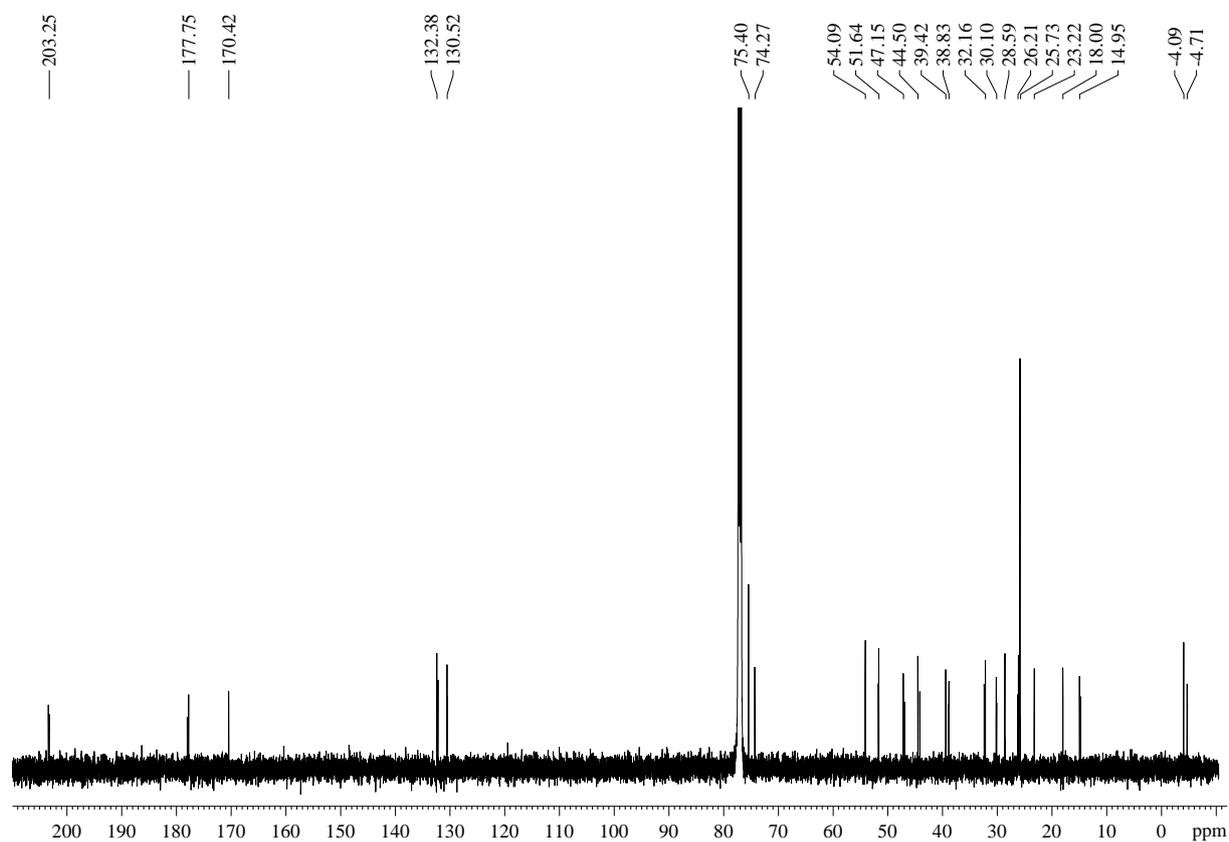
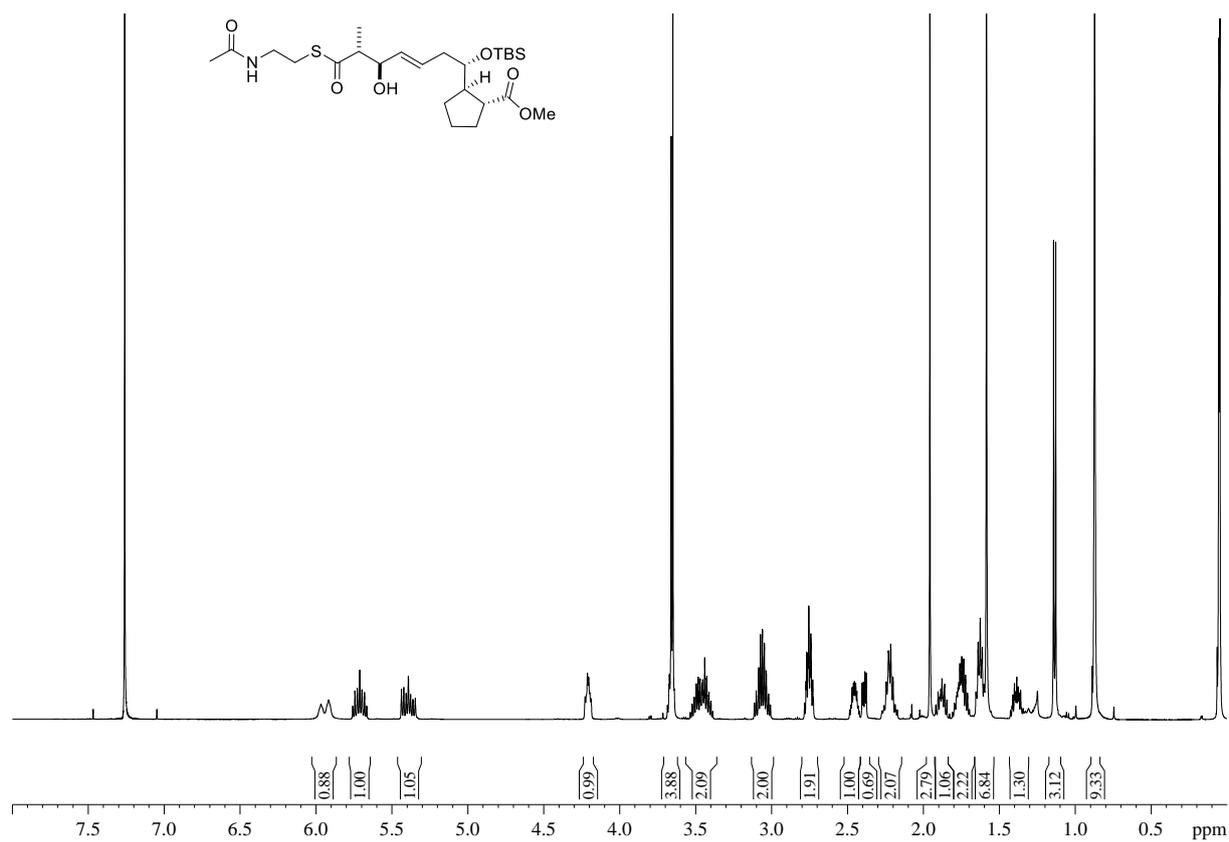
### 13.4 Hergestellte Konstrukte

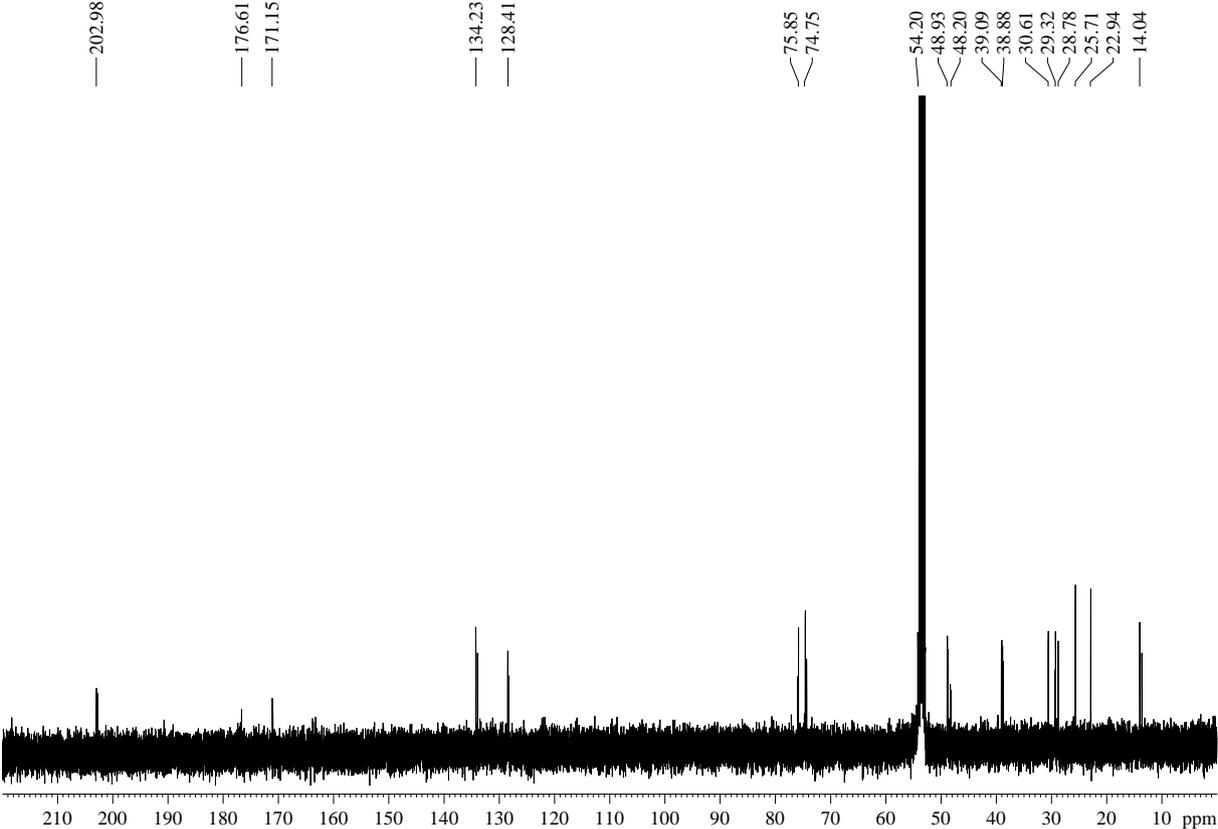
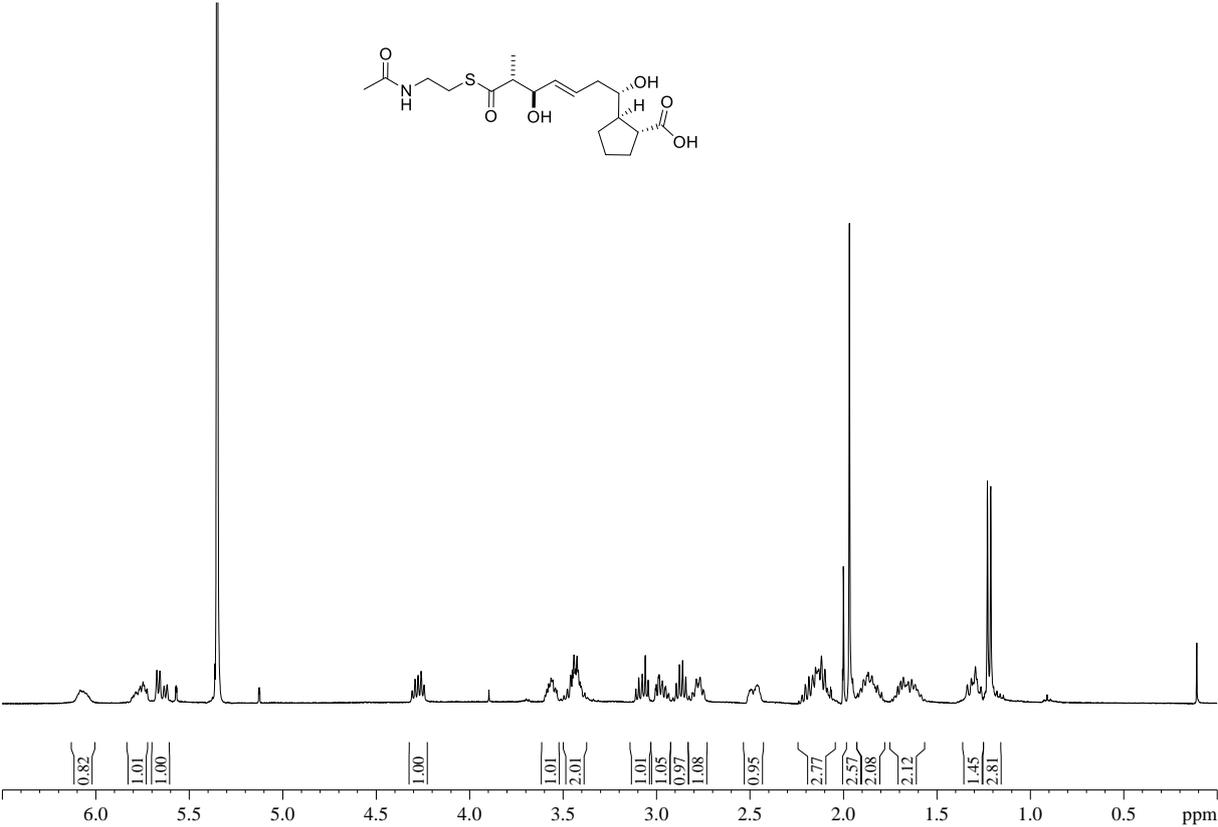


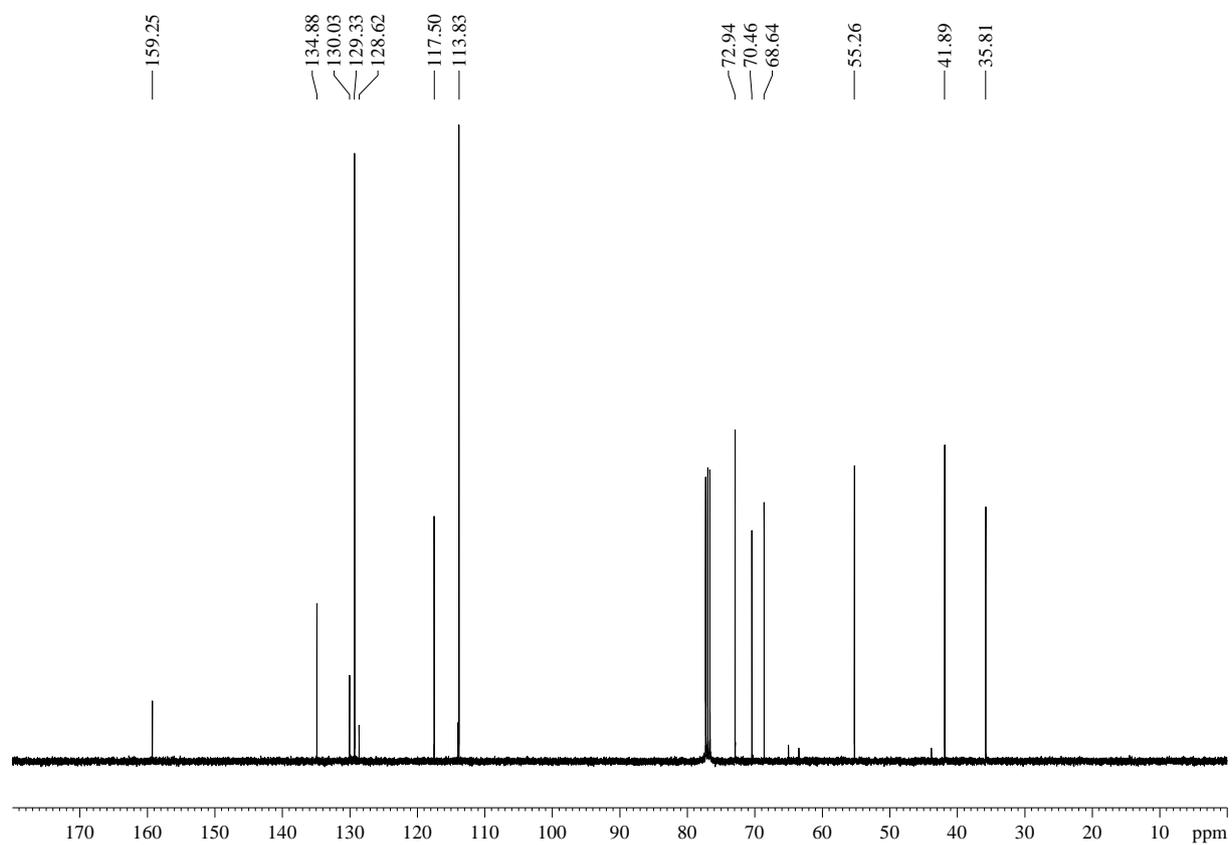
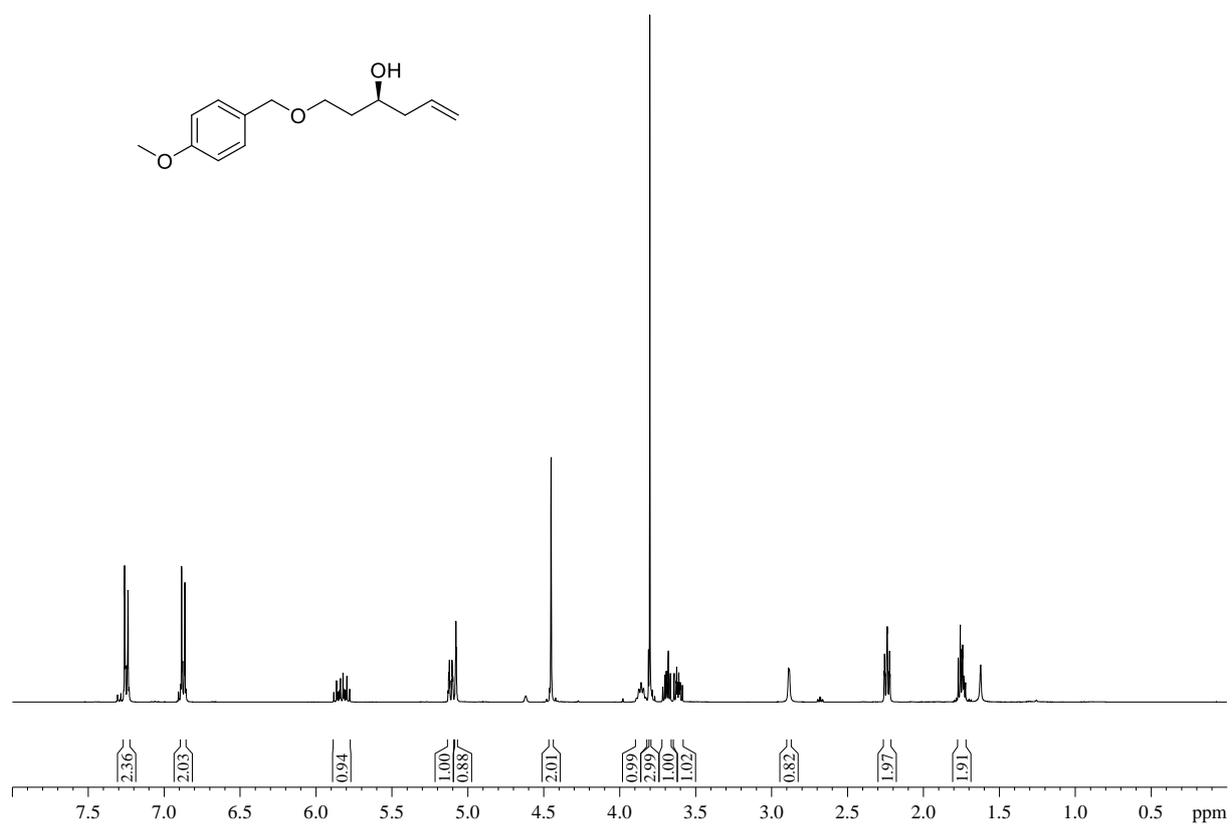


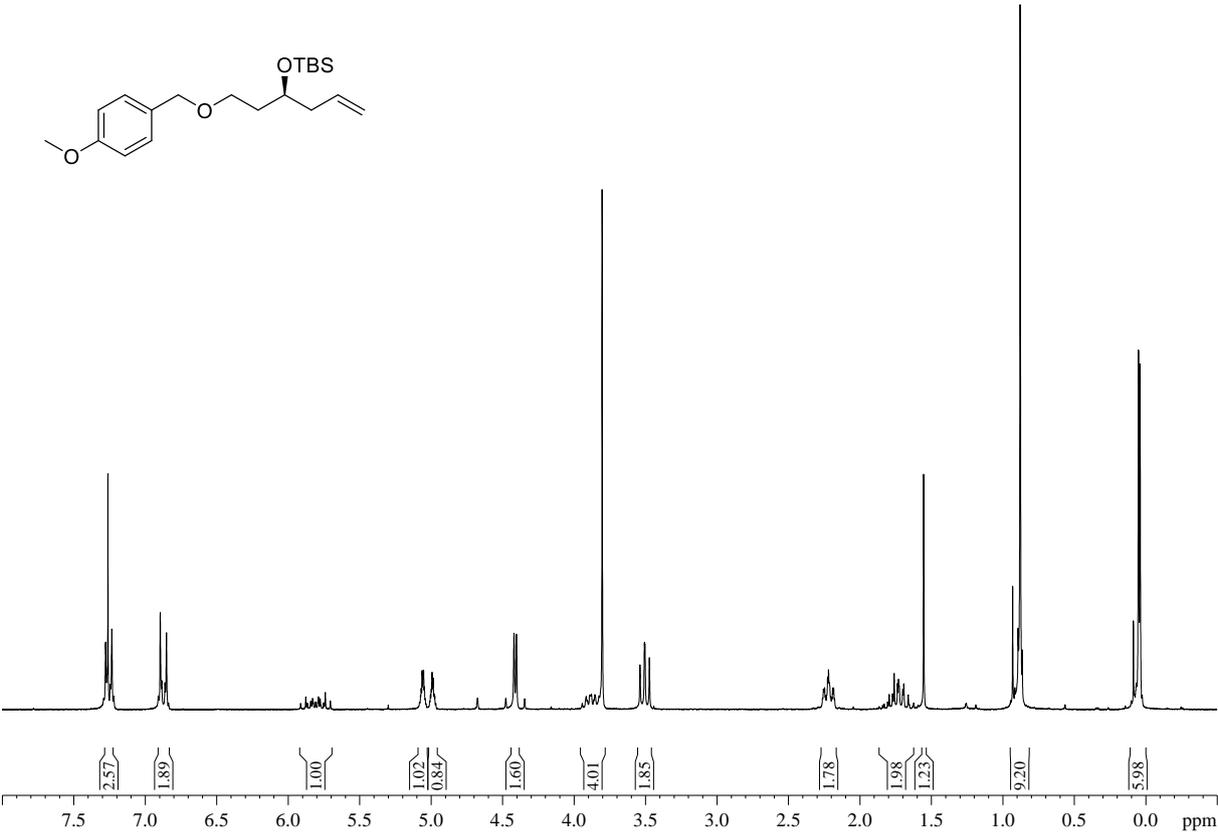
### 13.5 Spektrenanhang

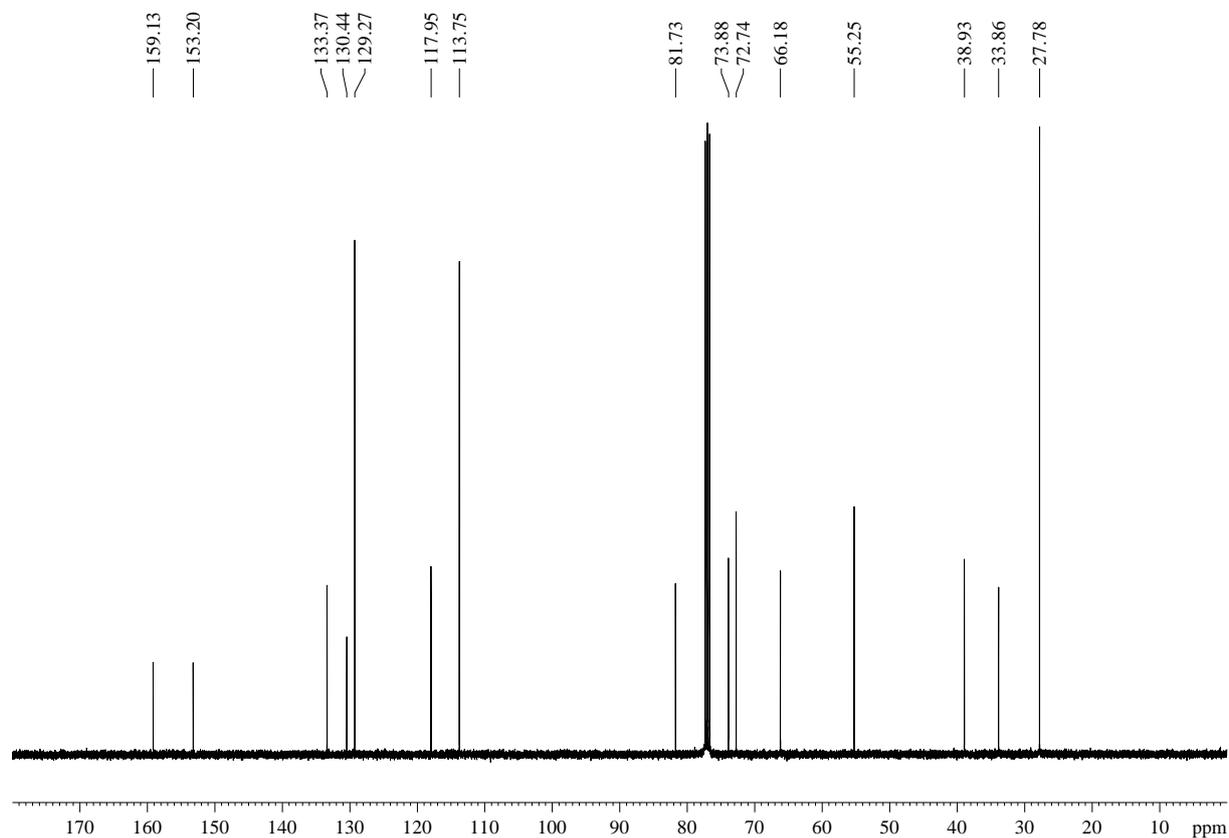
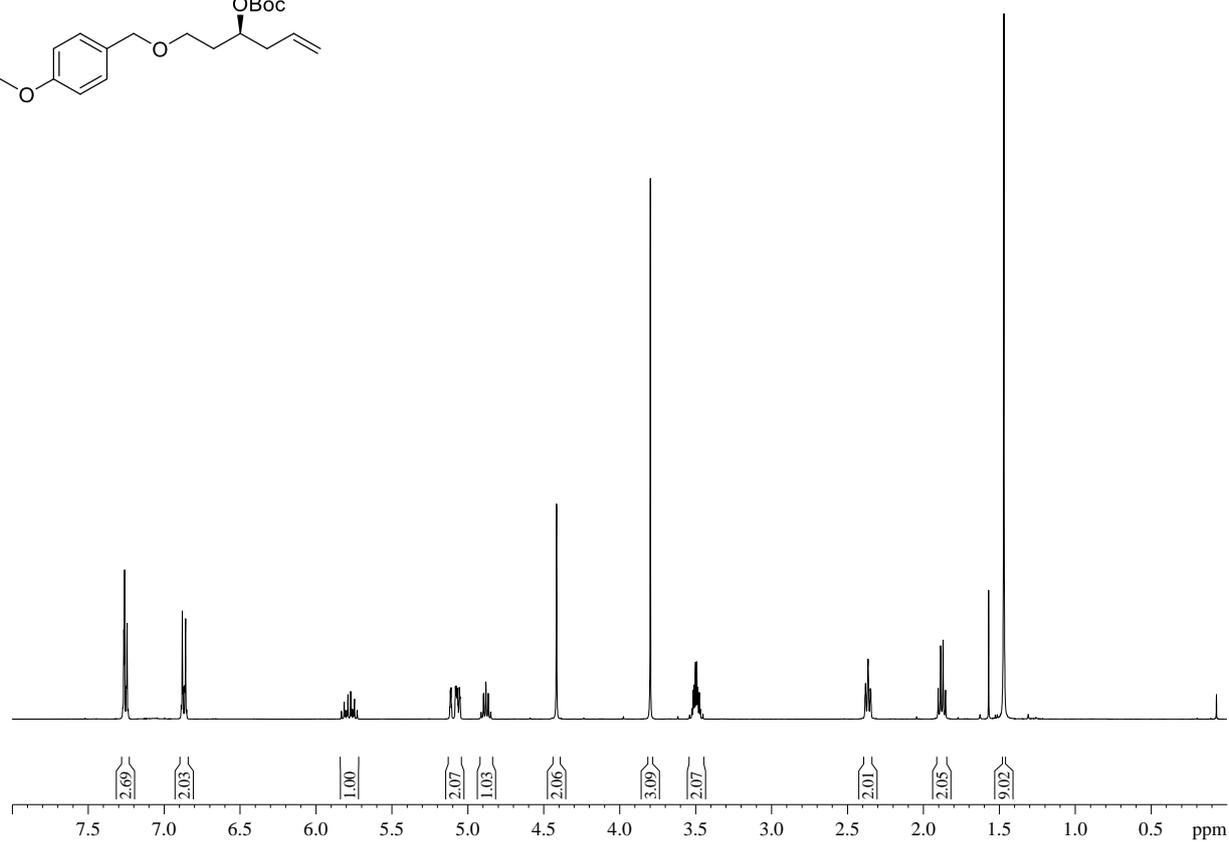
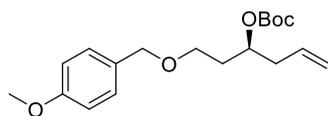


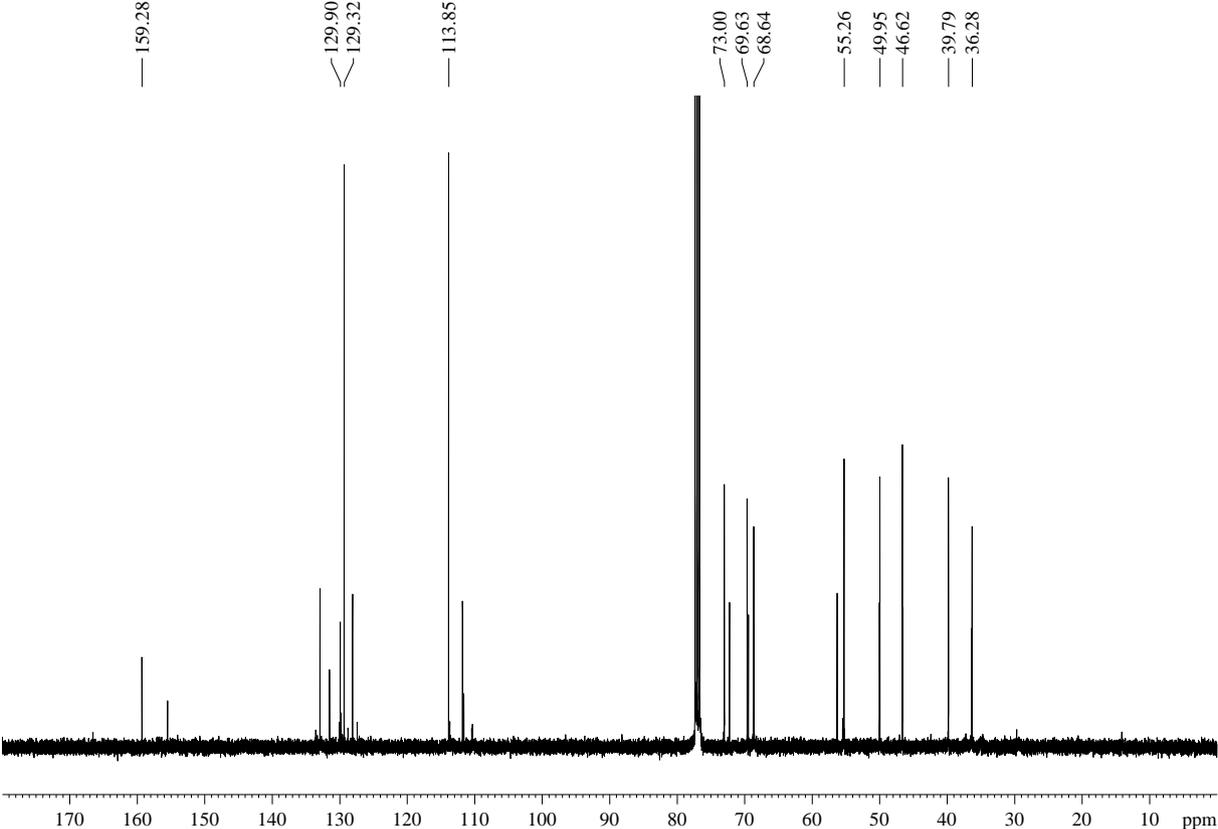
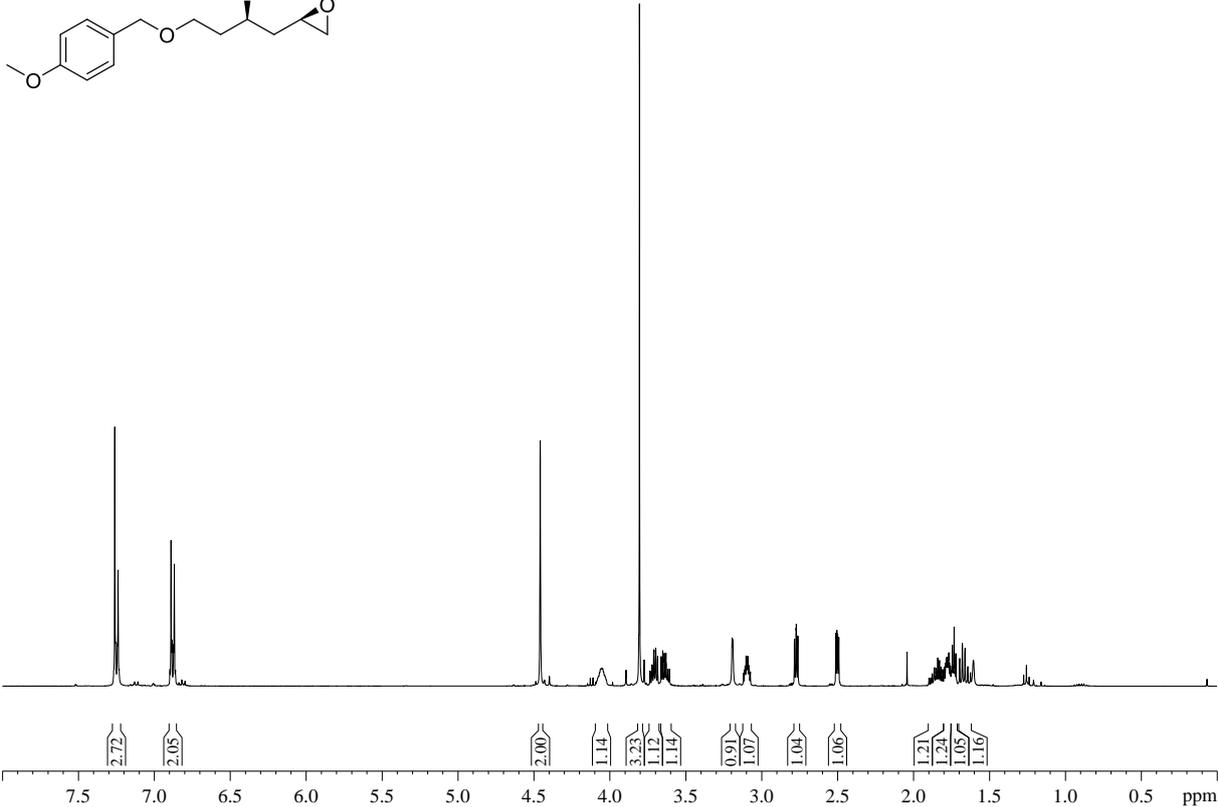
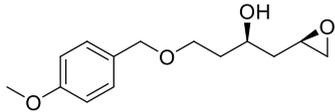


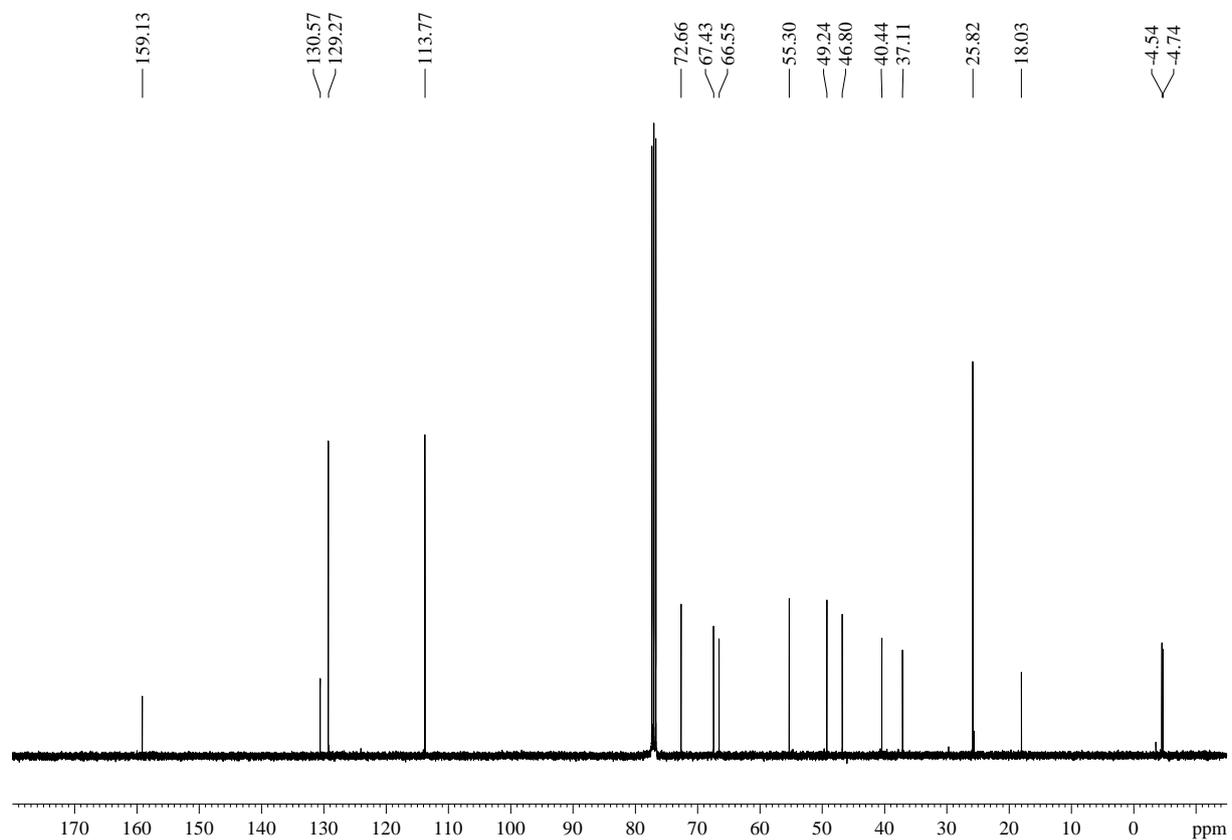
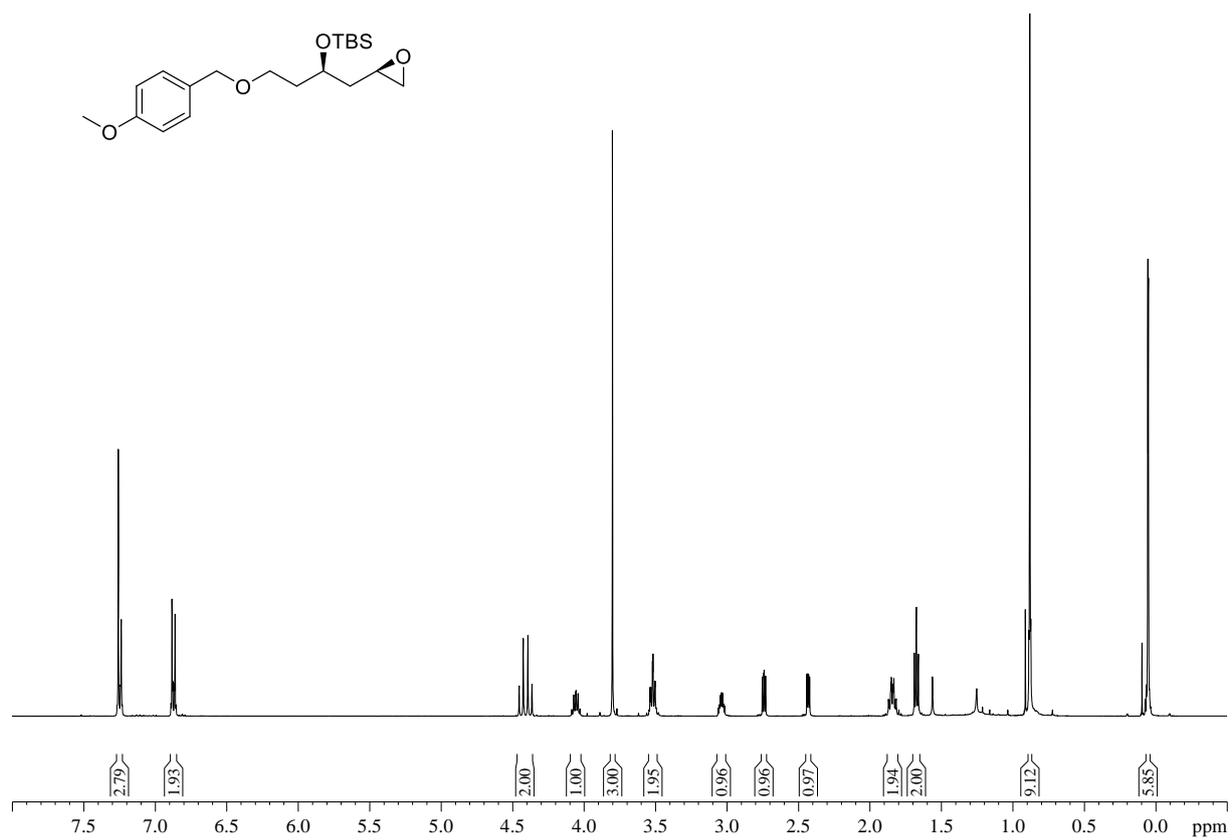


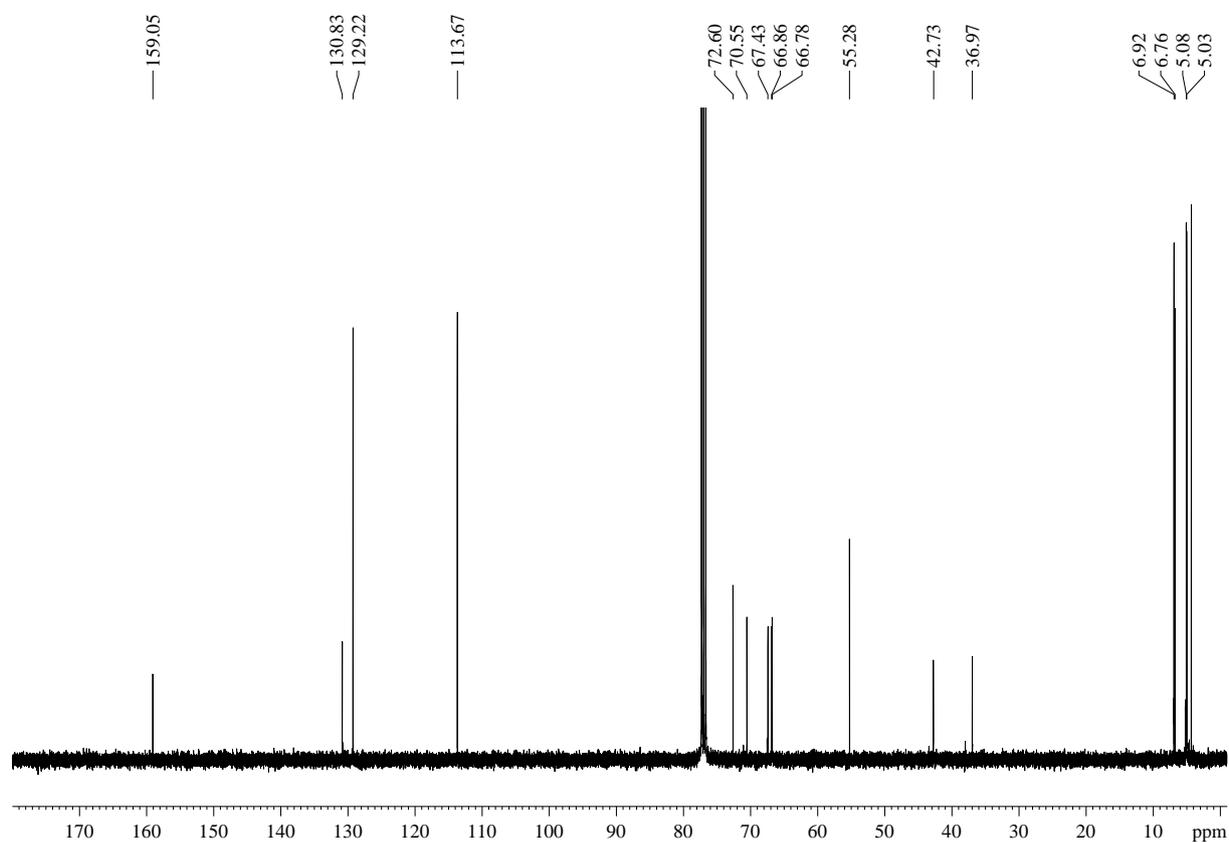
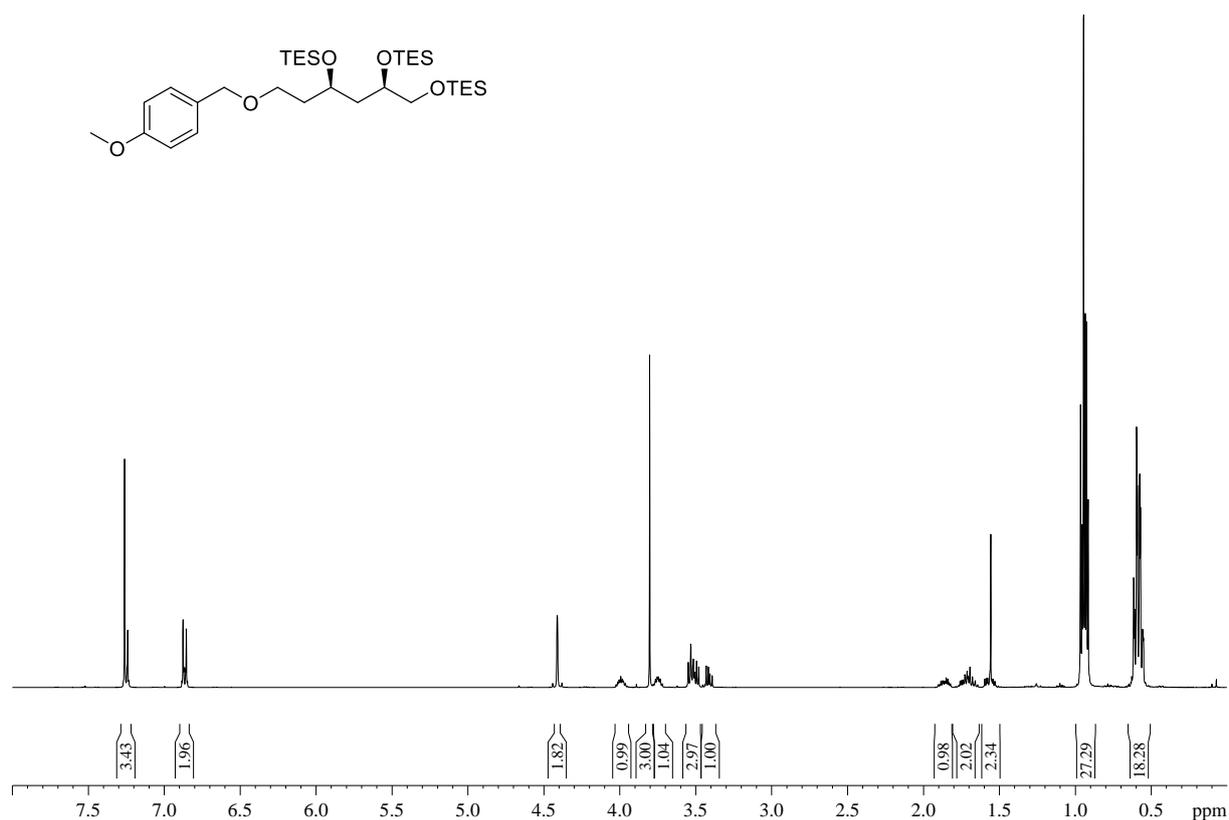


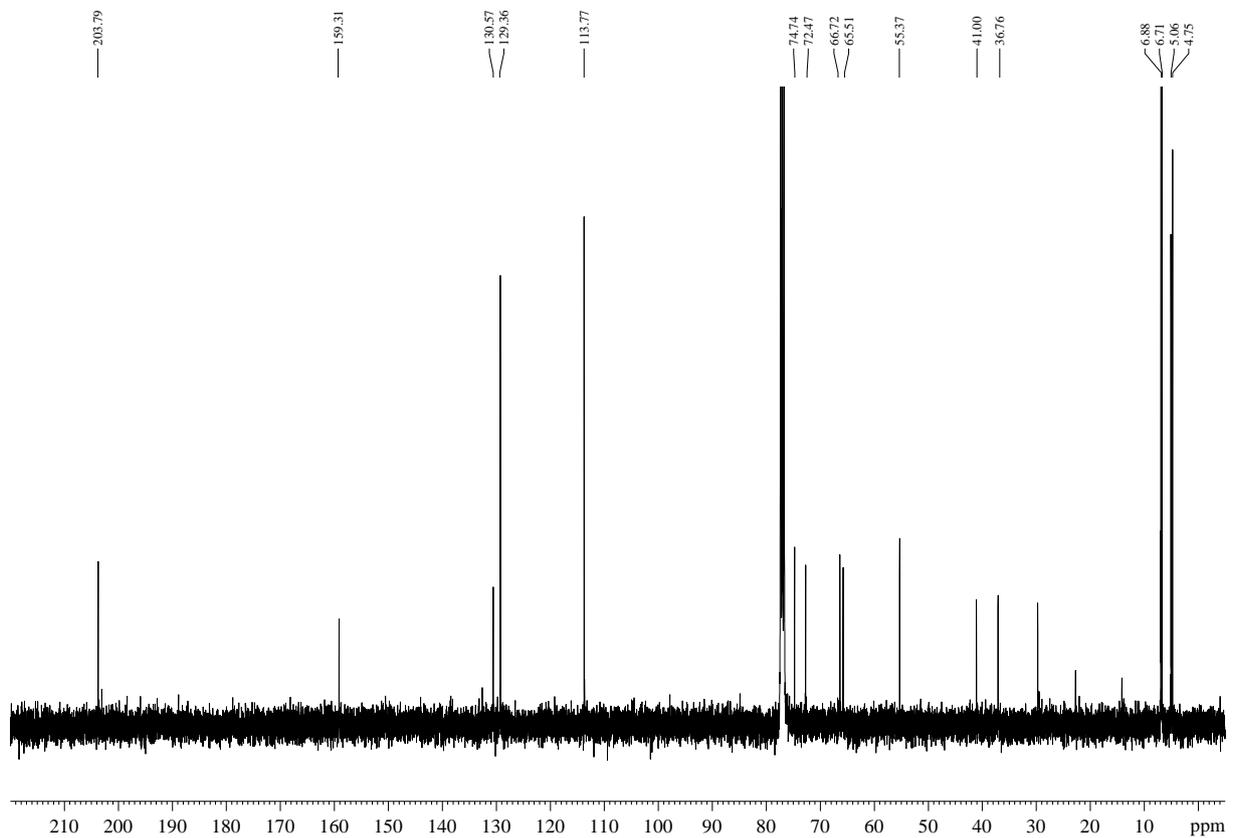
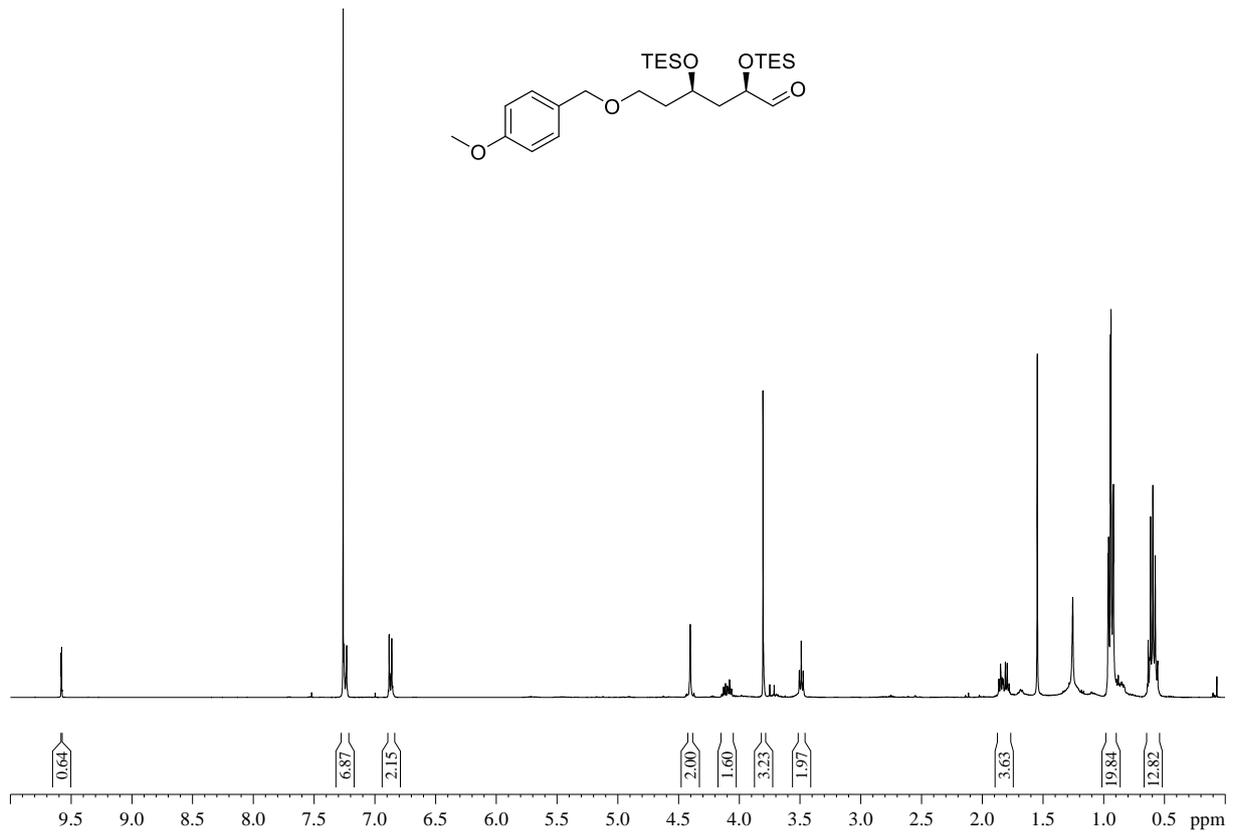


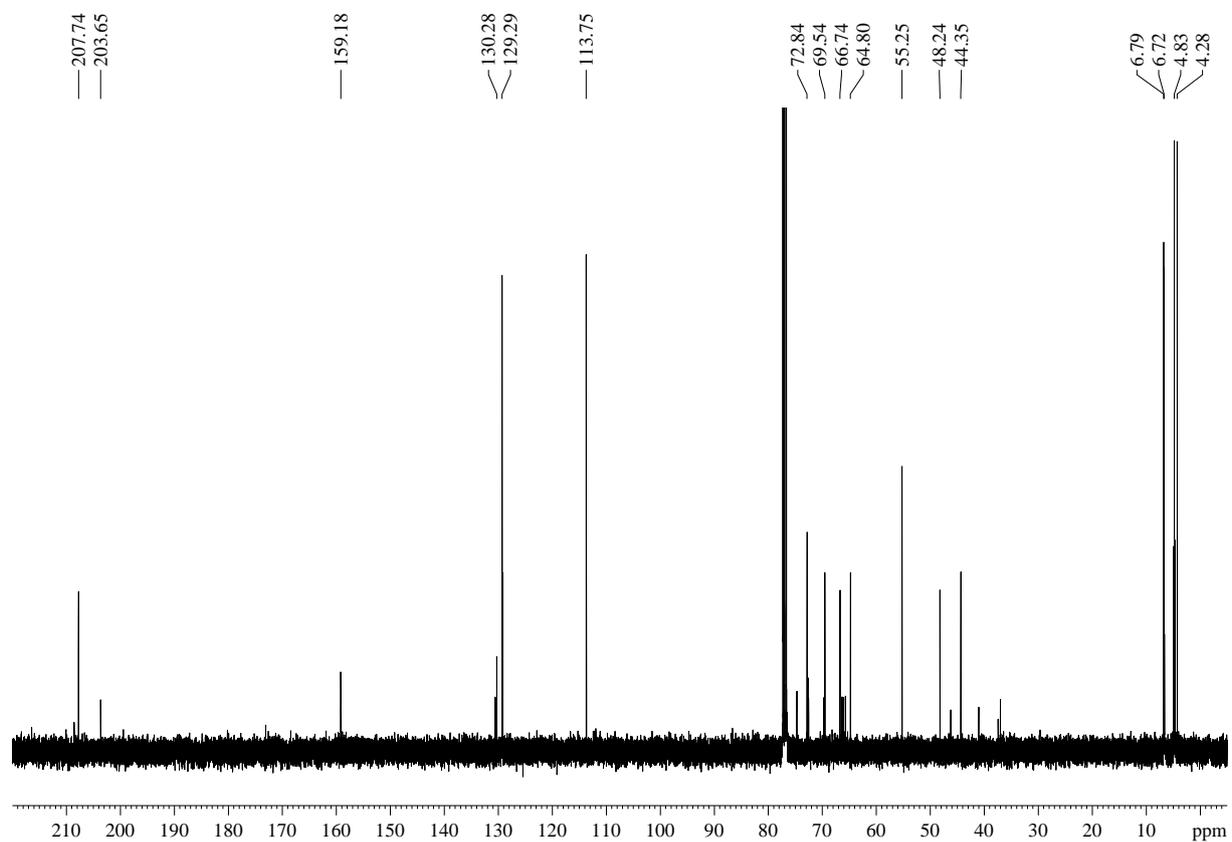
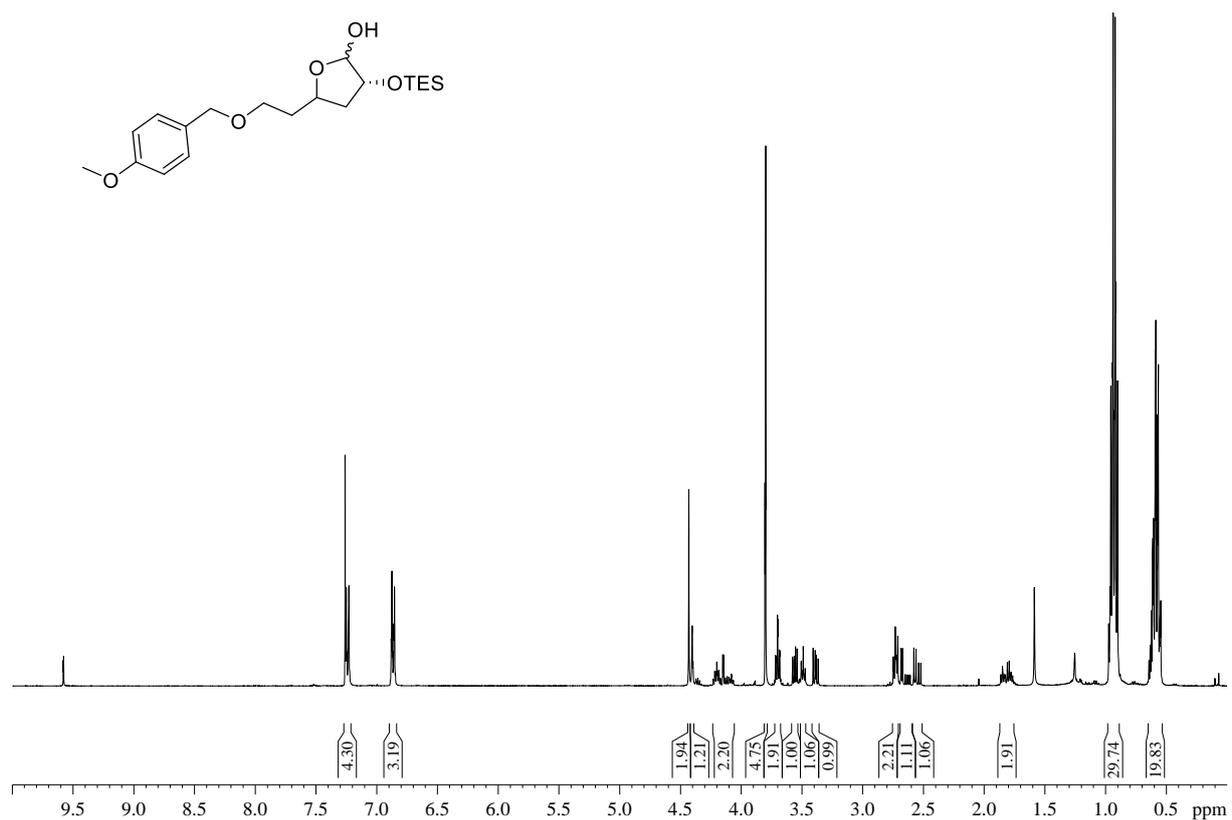


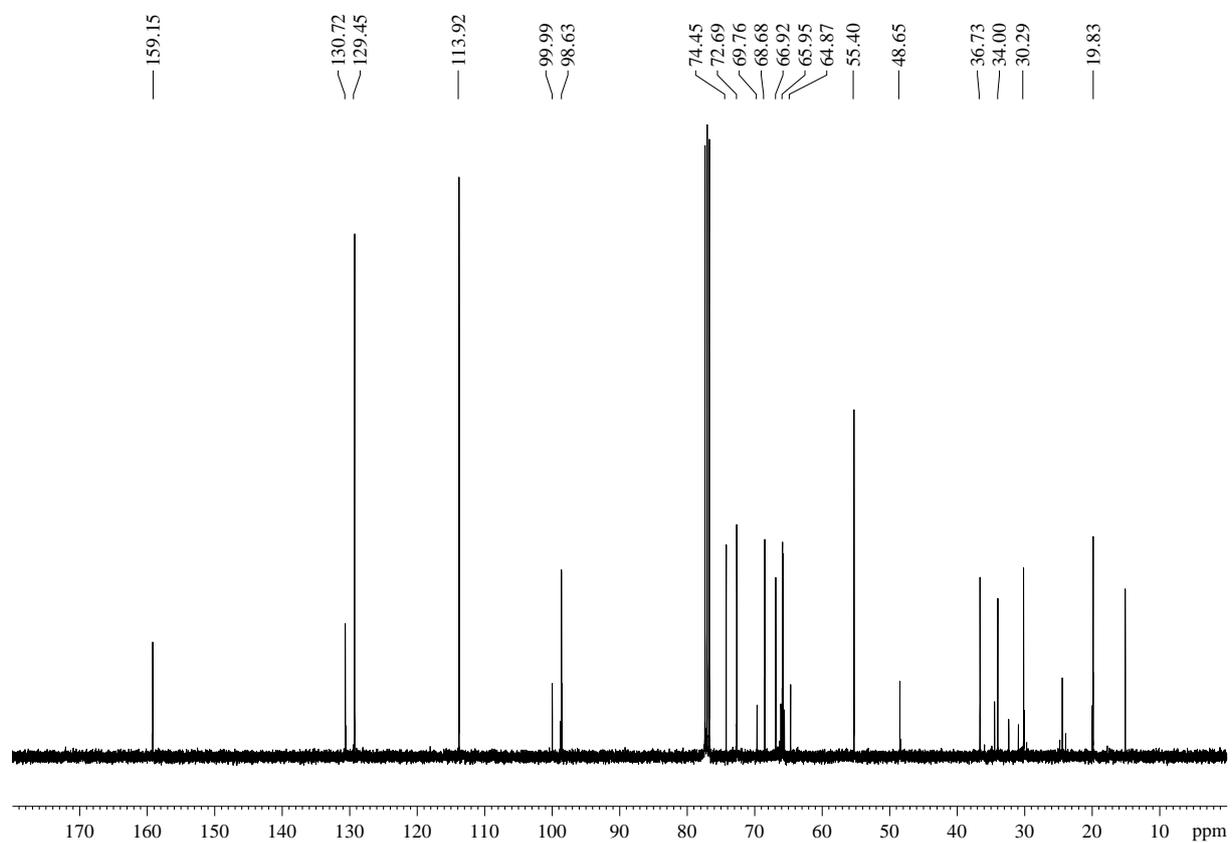
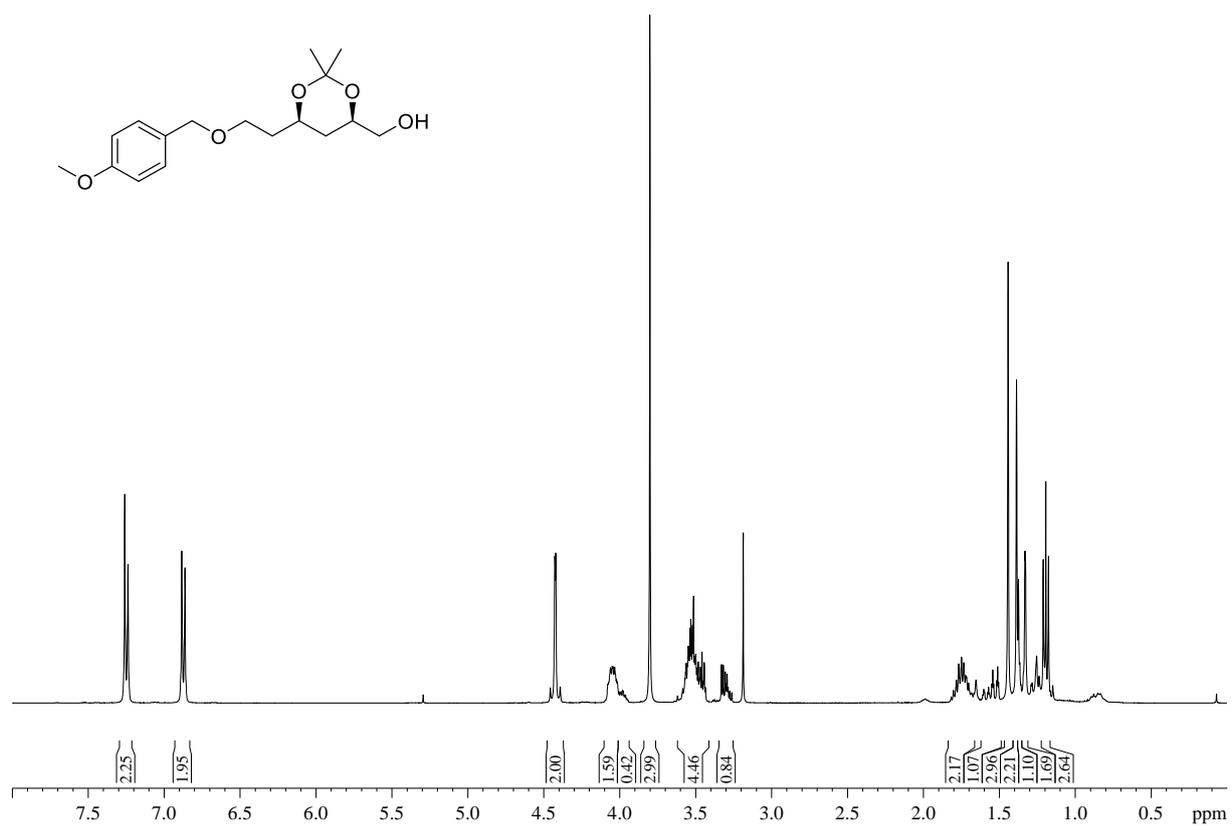


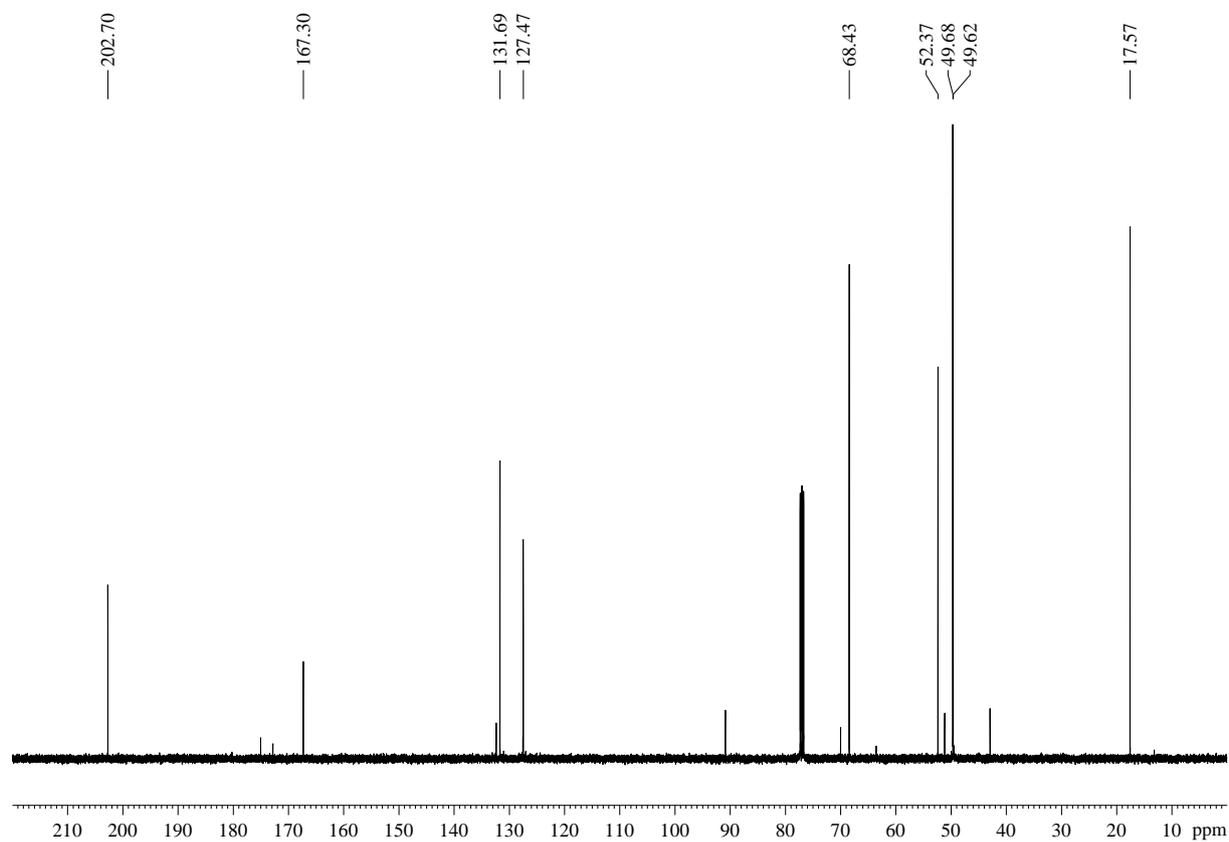
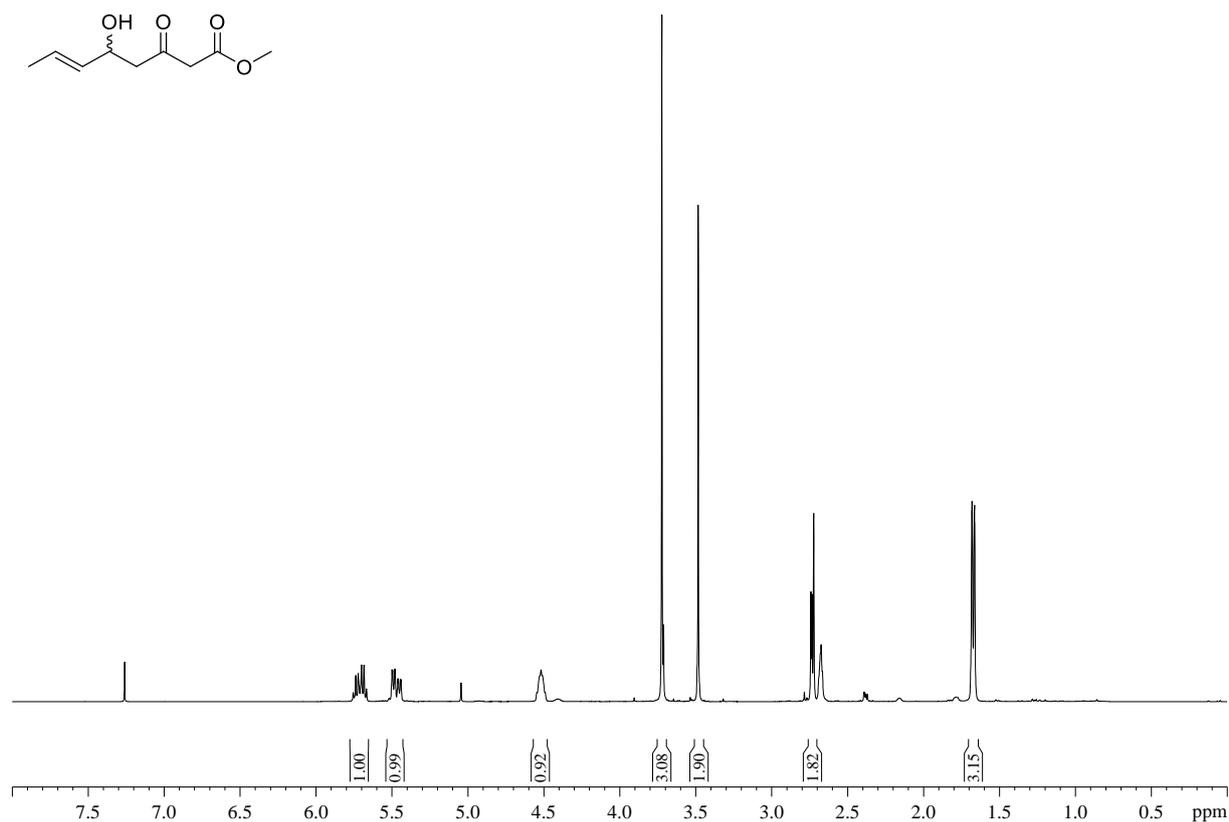
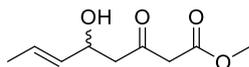


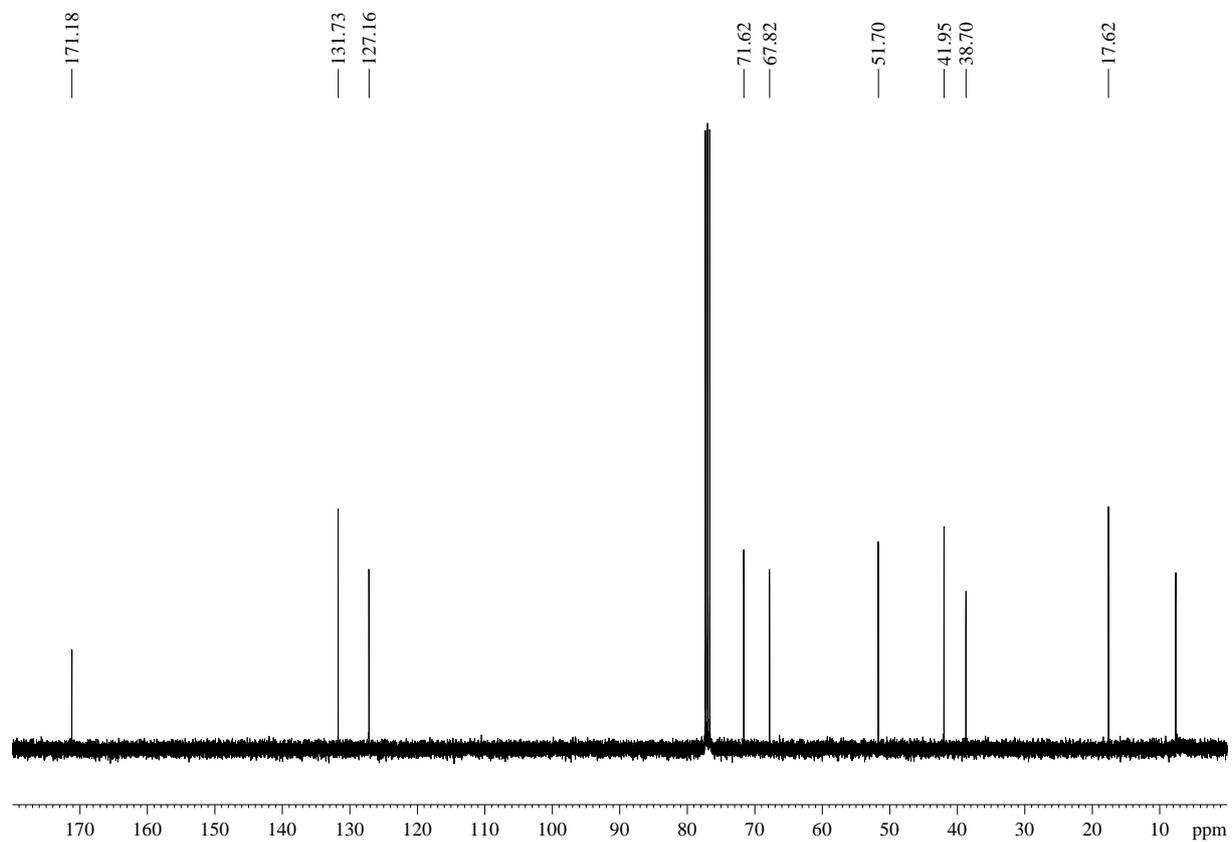
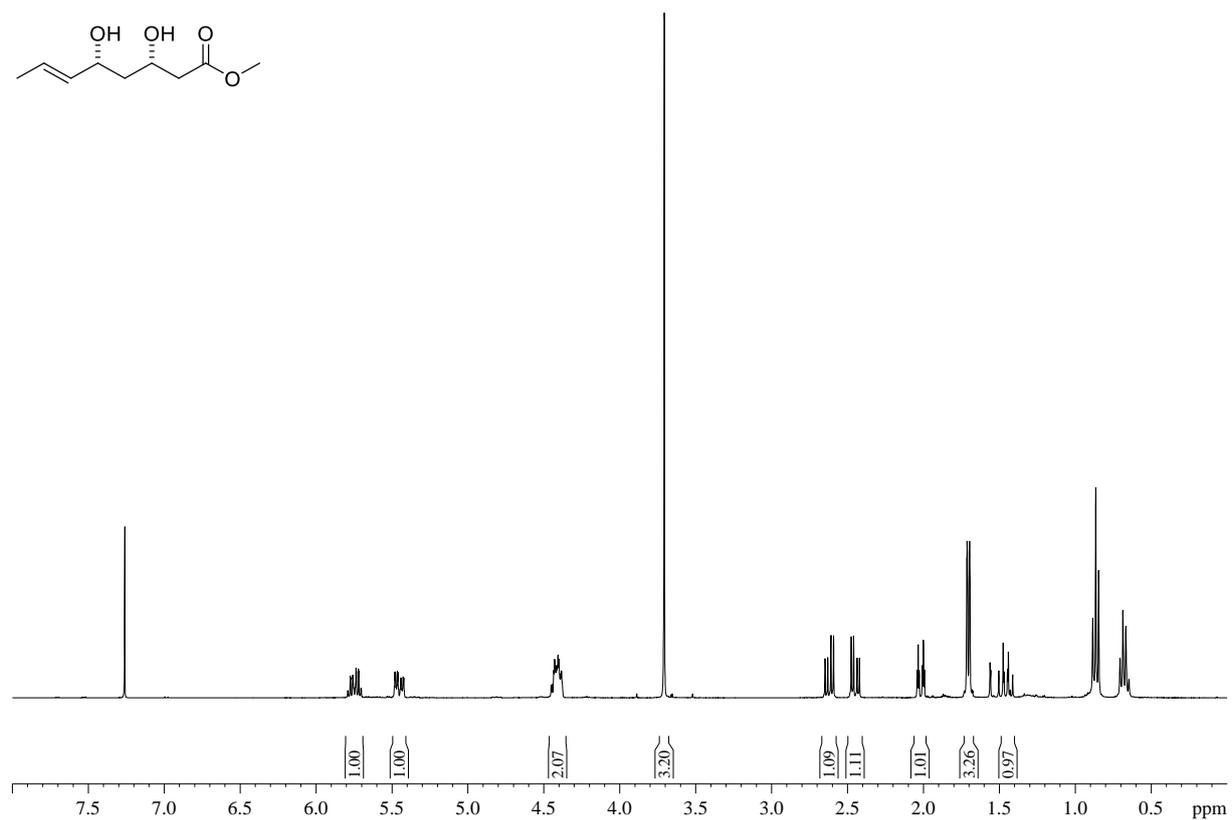
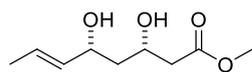


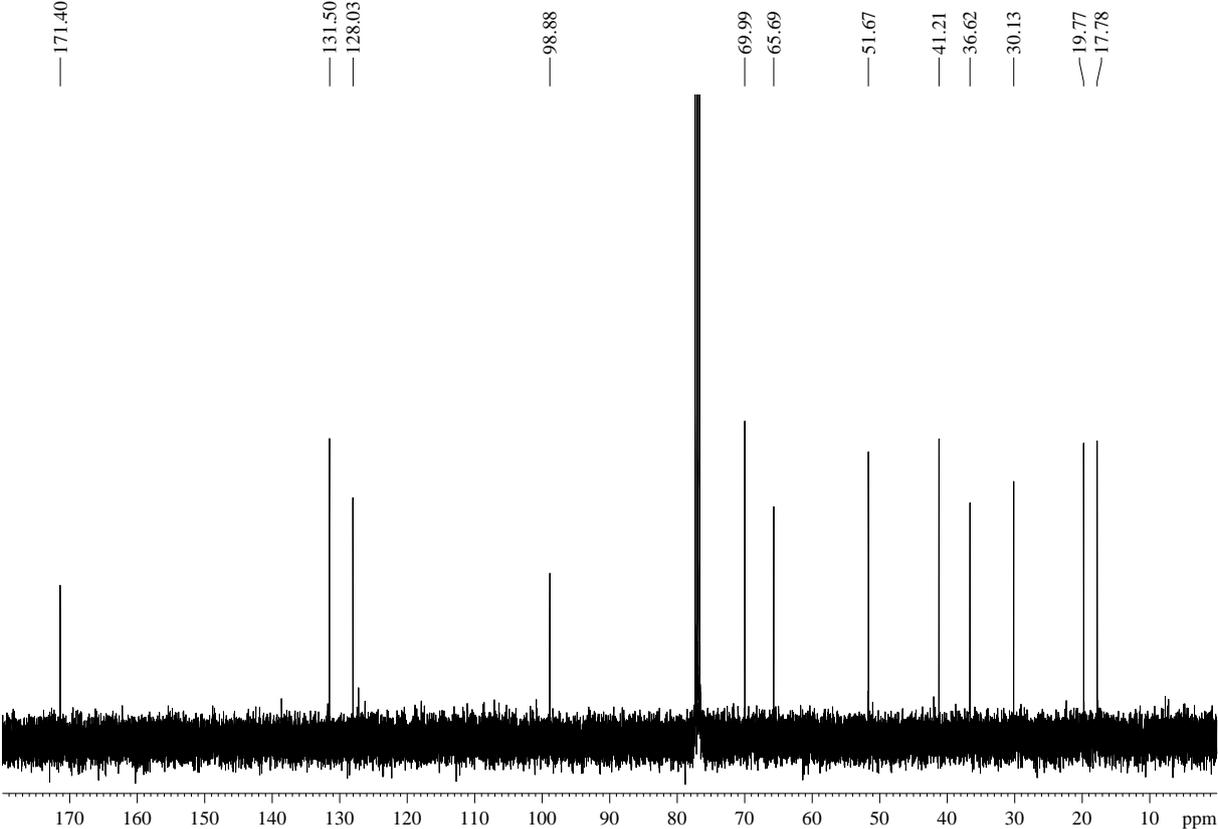
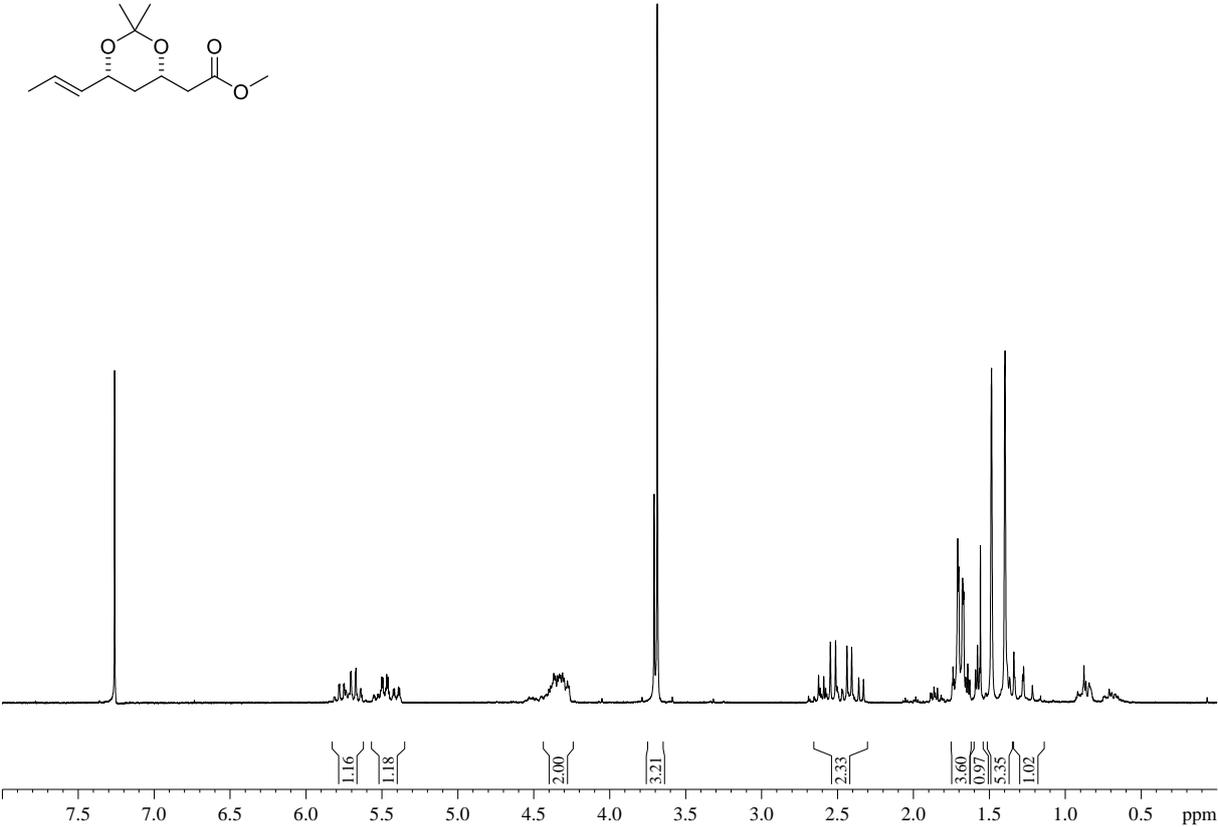


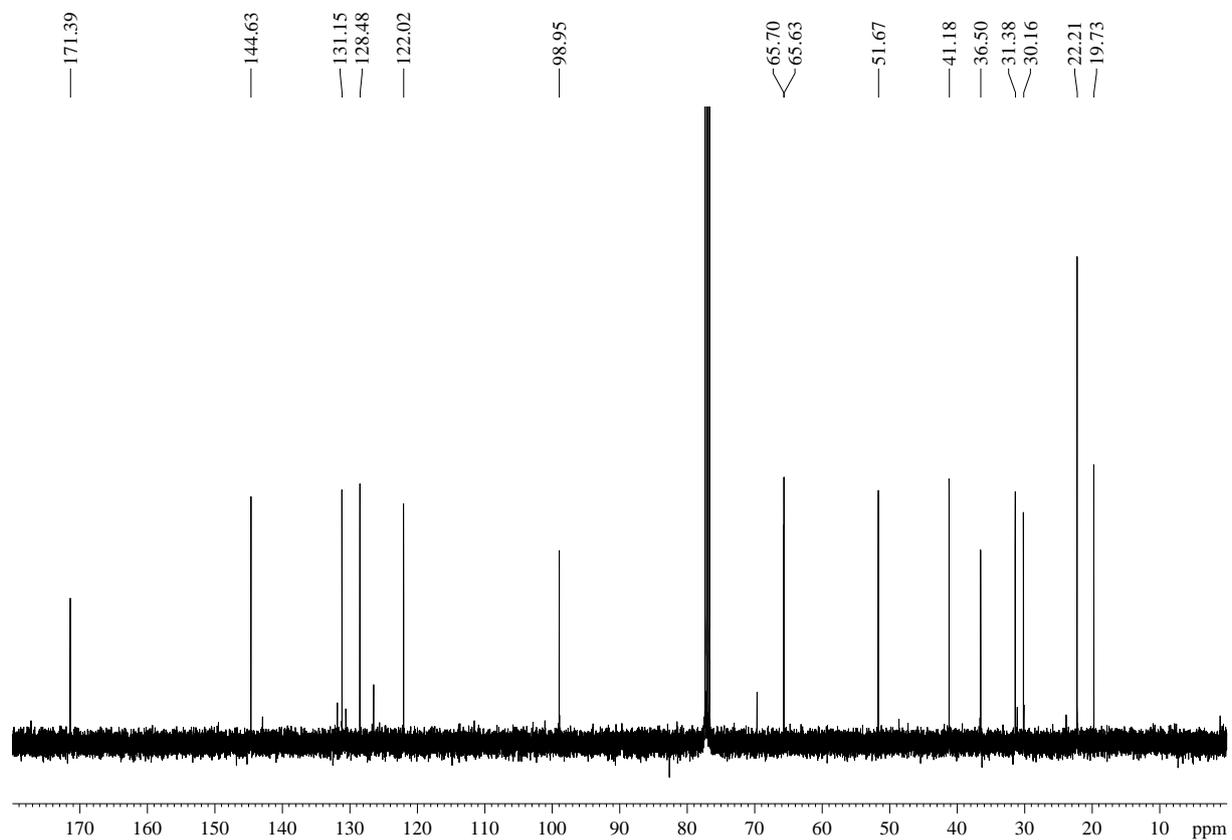
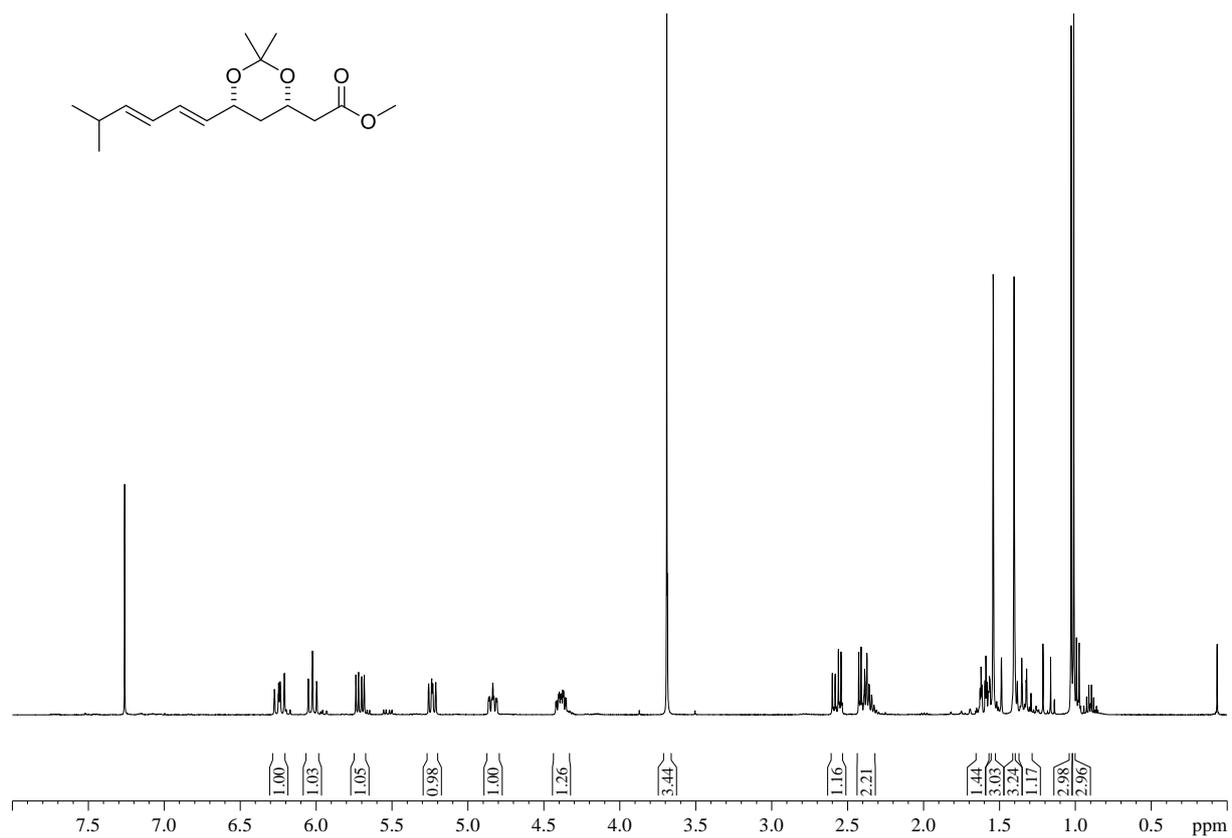


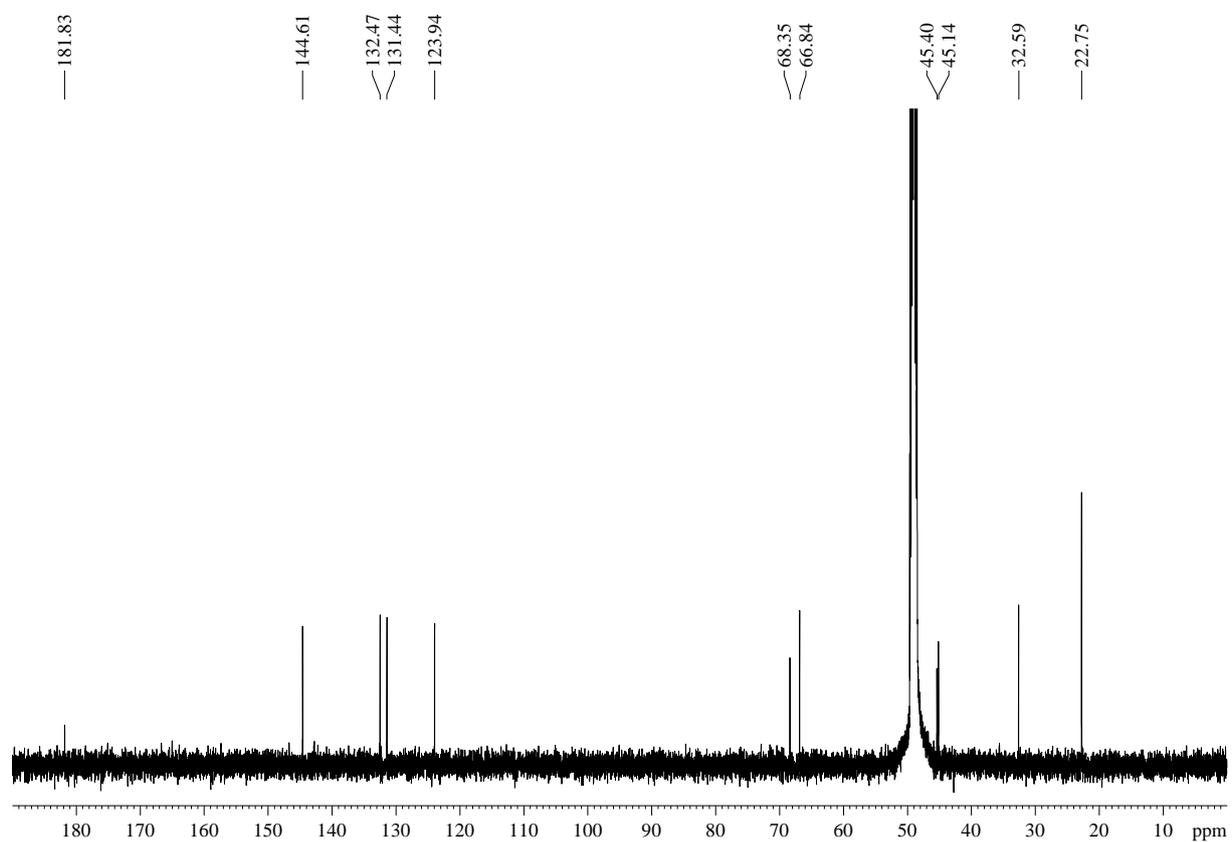
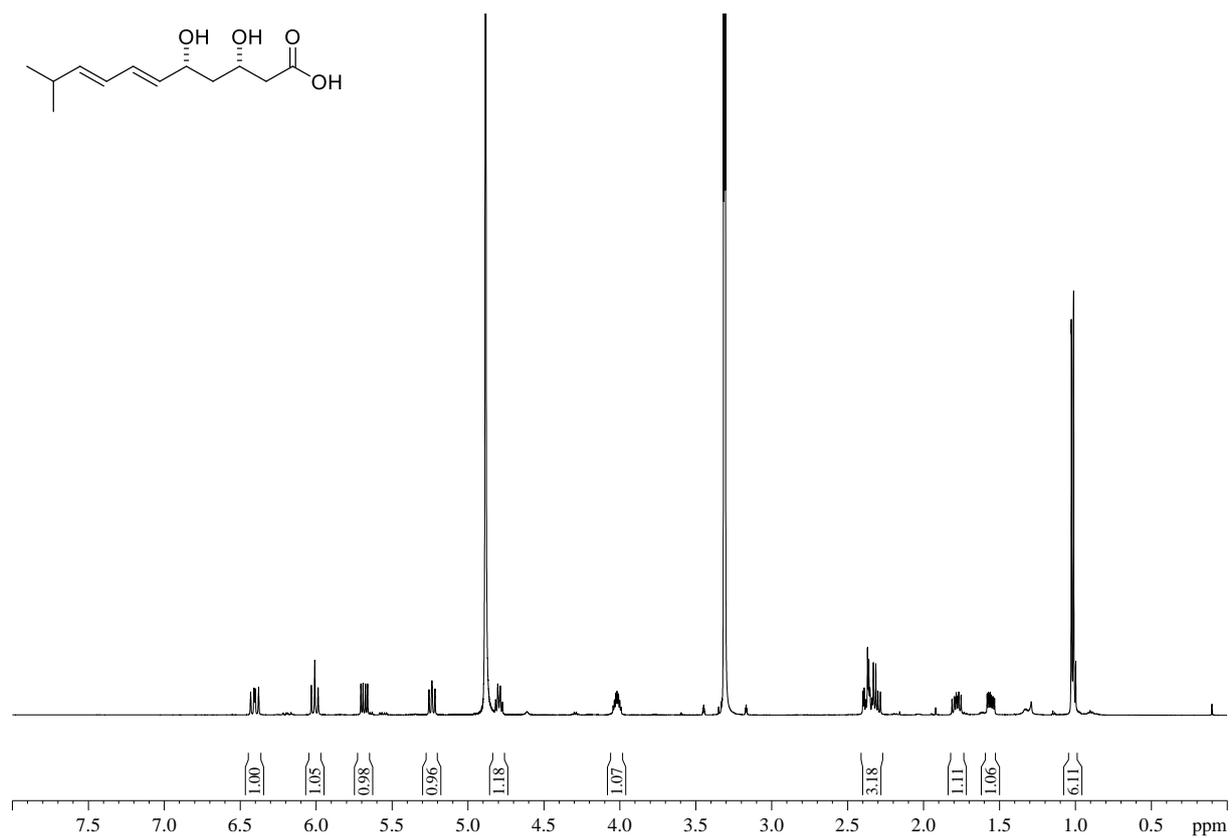


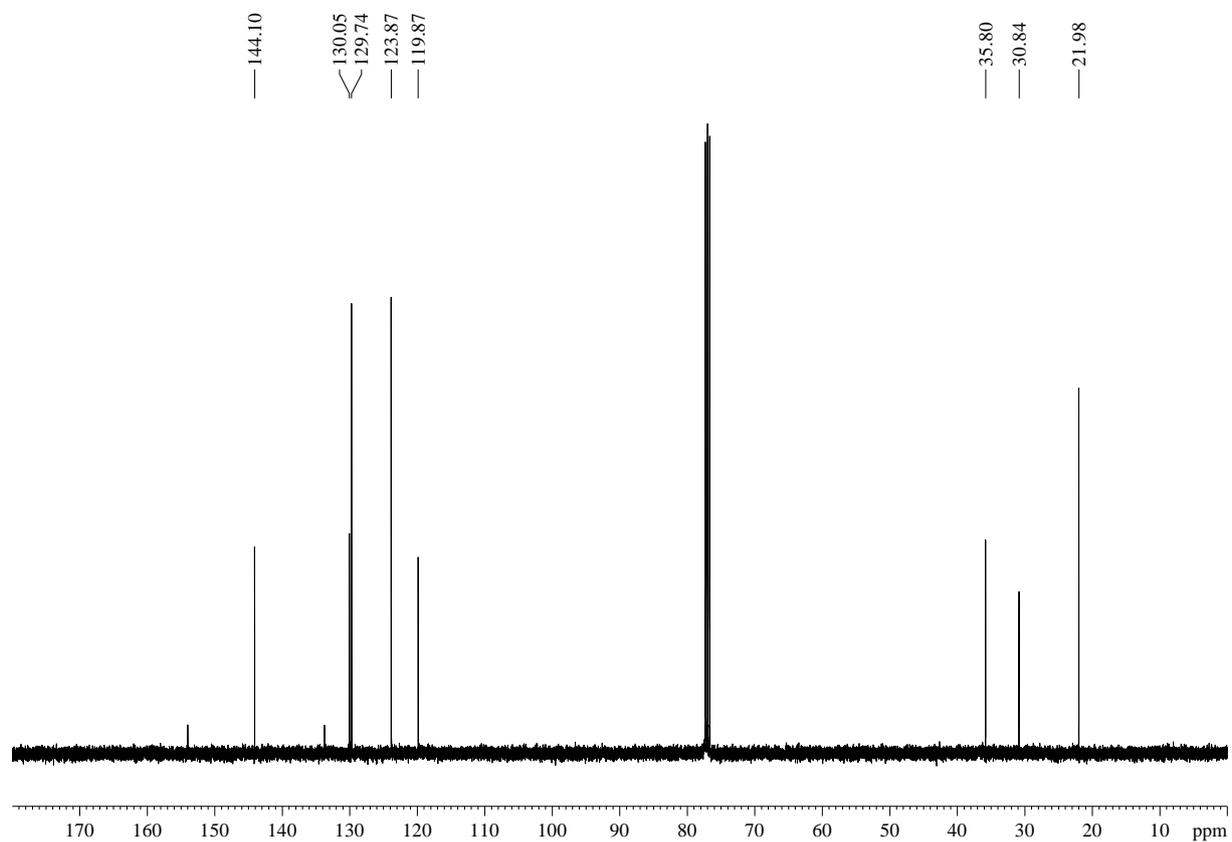
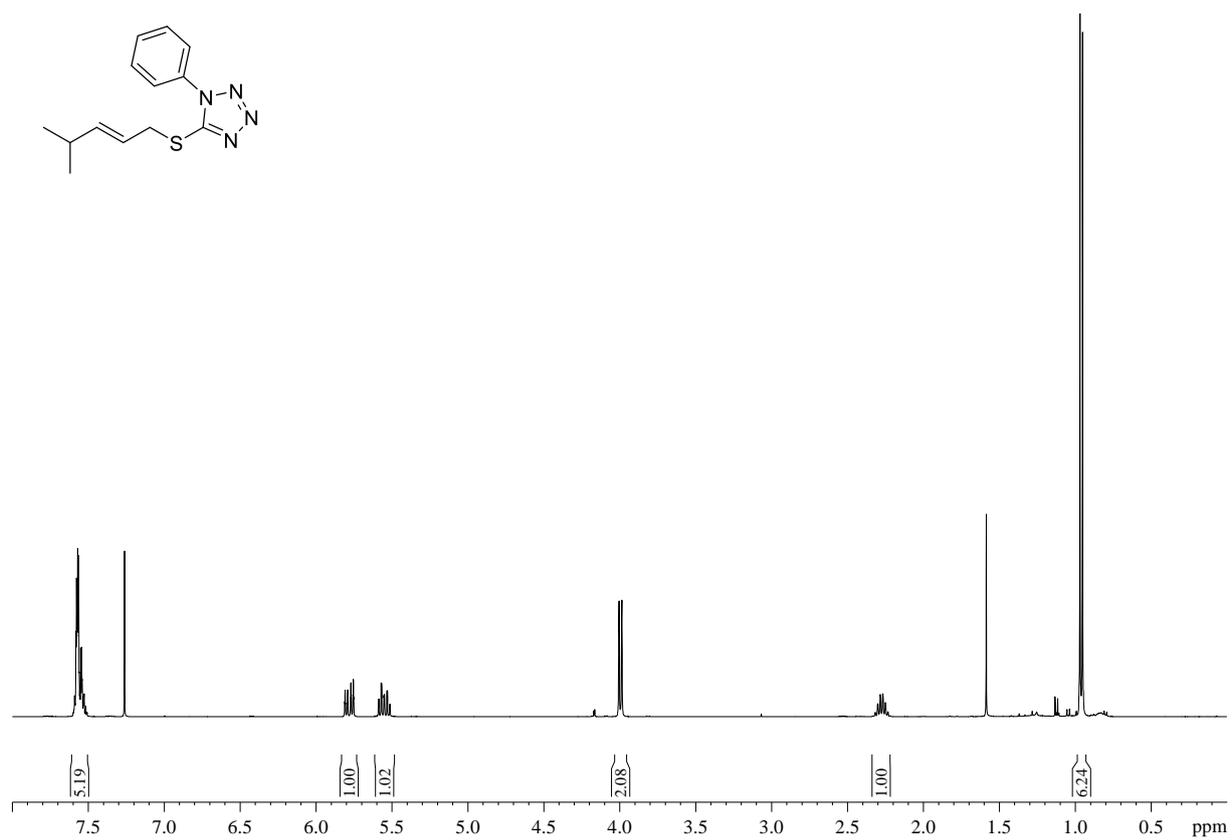
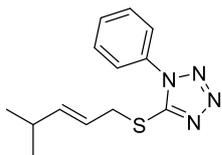


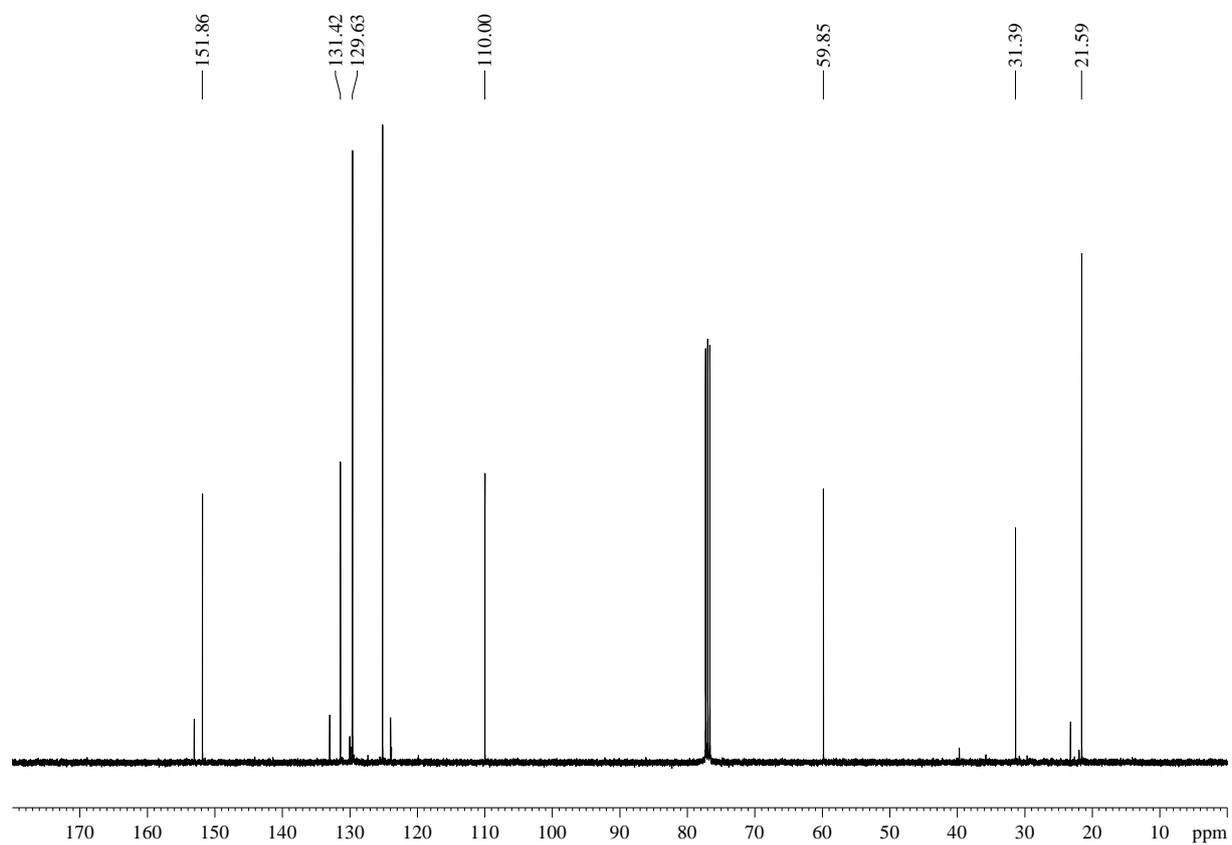
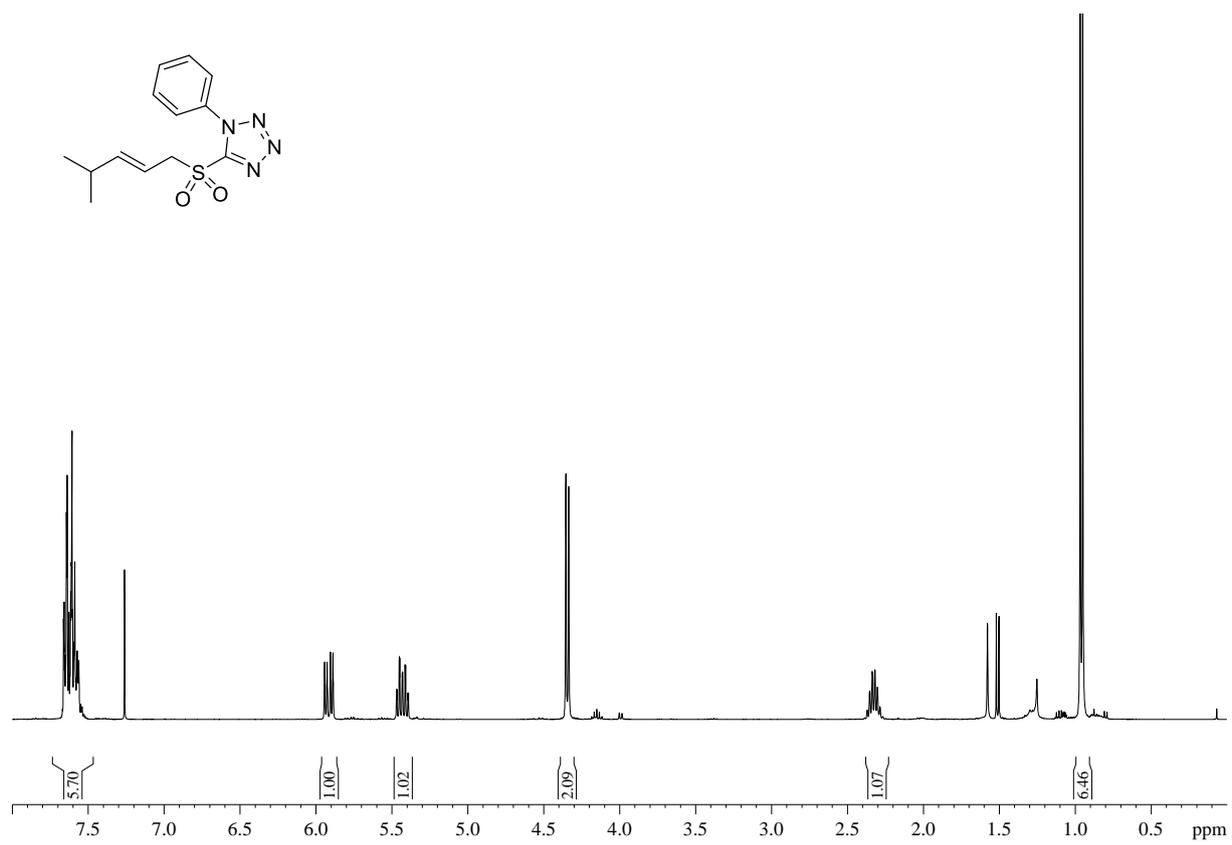


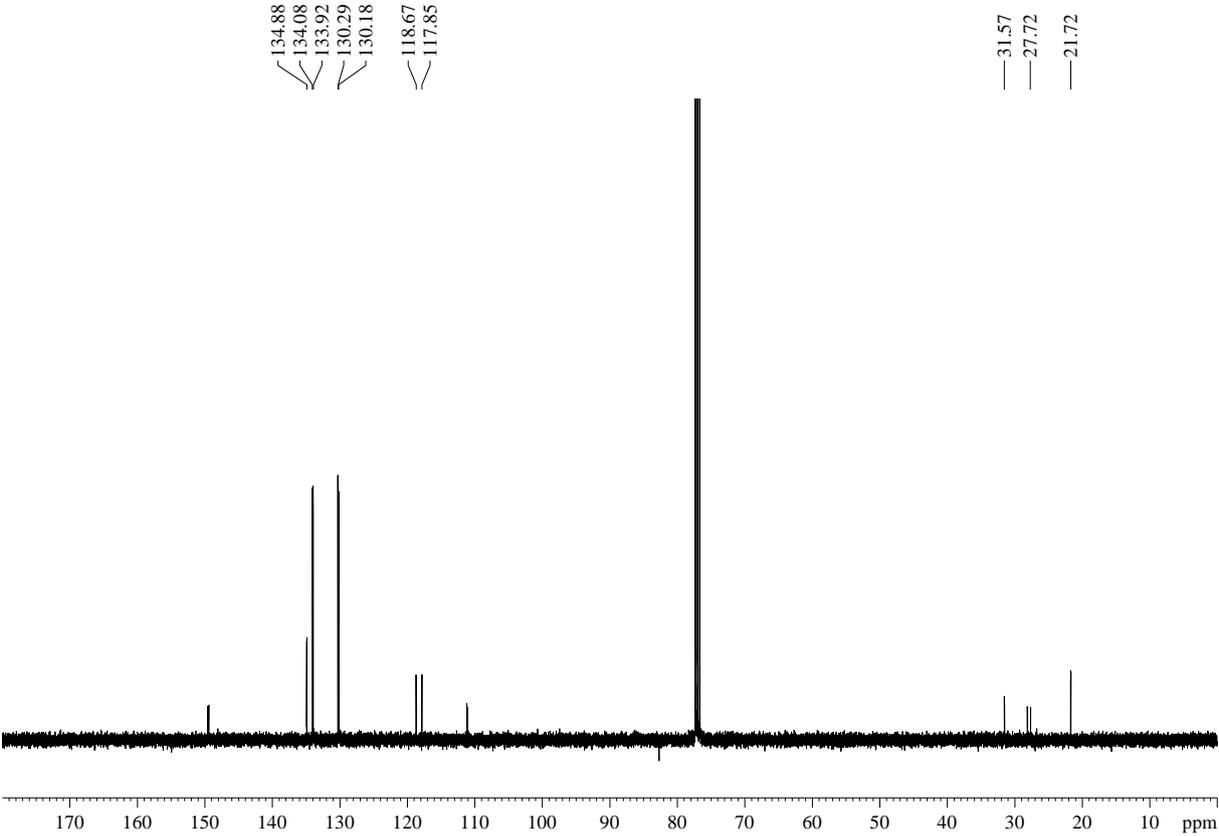
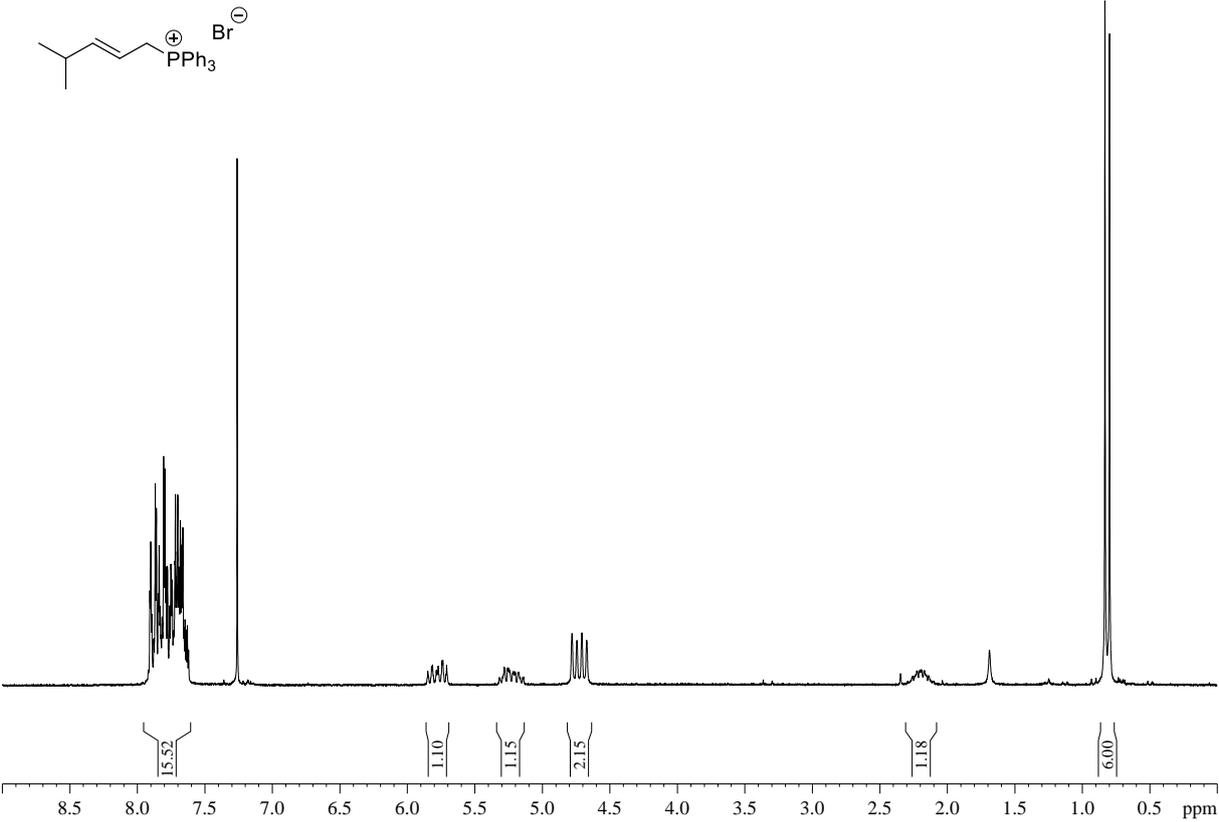












## Danksagung

---

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Dr. Frank Hahn für die interessante Themenstellung, die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung in den letzten vier Jahren bedanken. Danke, dass ich den Arbeitskreis mit Dir aufbauen und durch die spannenden ersten Jahre begleiten durfte.

Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning möchte ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes sowie der Aufgabe des Zweitgutachters danken. Außerdem gilt mein Dank der guten Aufnahme in Ihren Arbeitskreis und der Unterstützung in den letzten Jahren.

Für die Übernahme des Amtes des Drittprüfers danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper.

Des Weiteren gilt ein großer Dank Herrn Dr. Gerald Dräger für die Einführung in die Welt der Massenspektrometer und der HPLC-Anlagen, aber auch der guten Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeitszeit.

Katja Kräling möchte ich für Ihre Arbeit im Biobereich danken. Die Liste all deiner Aufgaben ist so lang, dass ich mich hier auf ein riesiges Dankeschön beschränken möchte!

Der Massen- und vor allem der NMR-Abteilung möchte ich für die schnelle Messung meiner Proben danken. Ein besonderer Dank soll an Monika Rettstadt für die oftmals sehr spontanen Messungen meiner Lösungsmittelgemische gerichtet sein.

Besonders möchte ich dem Sekretariat, insbesondere Frau Griese und Kristina Struckmeier, für die große Hilfe bei allen Formalitäten aber auch für die netten und informativen Gespräche danken.

Meinen ehemaligen und derzeitigen Laborkollegen Dr. Jekaterina Ongouta, Claudia Holec, Steffen Friedrich, Gesche Berkhan, Benjamin Schröder, Marius Schröder, Hendrik Geise, Frederick Lindner und Anna-Luisa Warnke möchte ich für die gute Zusammenarbeit, für eine freundliche Laboratmosphäre und viele lustige Momente danken. Dies gilt auch für die Laborkollegen des alten Biolabors Franziska Hemmerling und Anja Heutling. Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei Katja, die mit mir für zwei Jahre das Labor geteilt hat und mit mir durch viele chemische Höhen und Tiefen gegangen ist. Vielen Dank für die tollen Gespräche, die hilfreichen Tipps und die langen Abende im Labor, die durch dich nie langweilig wurden.

Ein weiterer Dank gilt meinem gesamten Arbeitskreis. Vielen Dank für die tollen Momente, die hilfreichen Diskussionen und für viele gemeinsame Kaffeepausen. Ein besonderer Dank geht hierbei an Gesche und Steffen – ohne euch wären die letzten drei Jahre nicht dasselbe gewesen!

Dem Arbeitskreis Kirschning möchte ich für die gute Aufnahme, die vielen Ausflüge und die zahlreichen gemeinsam verbrachten Kaffeepausen danken. Vielen Dank an die alten und neuen Mitglieder – Dr. Arne Weber, Dr. Lukas Kupracz, Dr. Gerrit Jürjens, Dr. Thomas Schmidt, Jan Hartwig, Jessica Buchholz, Katja Seidel, Ilona Bulyszko, Nick Dibbert, Bastian Dieter, Maik Siebke, Michael Wolling, Egor Geist, Dr. Nazar Pidlypnyi, Mona Oltmanns...

Für die tolle Atmosphäre während der Mittagspausen im BMWZ möchte ich Katja Seidel, Ilona Bulyszko, Raissa Schor, Dr. Nina Duensing und vor allem Christoph Bartel danken.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Gesche Berkhan, Egor Geist, Benjamin Schröder, Beate Bensch, Hendrik Geise, Raissa Schor, Marius Schröder, Thea Schubach, Dr. Nina Duensing und Christoph Bartel.

Meinen ehemaligen Praktikanten, besonders Oliver Sowada und Alexandra Seemann, möchte ich für das Nachziehen meiner Synthesestufen danken.

Dem gesamten OCI mit den Arbeitsgruppen Gaich, Kalesse, Kirschning, Butenschön, Cox und Boysen möchte ich für anregende Diskussionen, Hilfe bei Synthesefragen und vor allem für die gemeinsam verbrachten Veranstaltungen außerhalb der Arbeitszeit danken. Ein besonderer Dank hierbei gilt dem AK Boysen, mit dem ich viele schöne Momente erleben durfte.

Meinen Mädels Dr. Katja Ongouta, Dr. Lena Mancuso, Claudia Holec und Franziska Gille möchte ich für eine tolle Zeit im und außerhalb des Labors danken! Danke für die gemeinsamen Frühstücke, Geburtstagsfeiern und Mädelsabende. Ein weiterer Dank gilt Thea Schubach für die gemeinsam verbrachten Stunden nach der Arbeitszeit. Tobias Kreft möchte ich für seine immerwährende Unterstützung danken. Michael Wolling und Hanna Möller danke ich für die zahlreichen Spieleabende in guter Atmosphäre mit Dr. Gerrit Jürjens, Maik Siebke, Jan Hartwig und Dr. Nazar Pidlypnyi.

Meinen besten Freundinnen Fabienne Meier und Regina Rother möchte ich für all die Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit danken. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Der letzte und größte Dank gilt meinen Eltern. Ohne euch wäre ich heute nicht der Mensch der ich bin. Vielen Dank für eure Unterstützung und Liebe während des Studiums und der nicht immer einfachen Zeit der Doktorarbeit. Danke für alles, was ihr bisher für mich gemacht habt! Ihr seid immer für mich da! Dasselbe gilt für meine Geschwister, die mich noch nie im Stich gelassen haben. Ohne euch wäre ich nicht dieselbe!

## Lebenslauf

---

Nadine Kandziora

geb. am 08.Mai 1987 in Hildesheim

ledig

## Akademischer Werdegang

---

04.2012 - 12.2015	Promotion am Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover (Dr. Frank Hahn) „ <i>In vitro</i> -Untersuchungen von Schlüsselschritten der Borrelidin- und Ambruticin-Biosynthesen“
10.2009 - 02.2012	Masterstudium der Wirk- & Naturstoffchemie, Leibniz Universität Hannover, (Master of Science, 1.5); Masterarbeit bei Dr. F. Hahn und Prof. Dr. A. Kirschning „Synthese potentieller Vorläufer der Borrelidin Biosynthese“
09.2010 - 03.2011	Forschungsaufenthalt am Imperial College London bei Dr. M. J. Fuchter (ERASMUS Stipendium) „Synthesis and Application of <i>N</i> -Heterocyclic Carbenes“
10.2006 - 09.2009	Bachelorstudium der Chemie, Leibniz Universität Hannover (Bachelor of Science, 2.5), Bachelorarbeit bei Prof. Dr. M. M. K. Boysen „ <i>pseudo</i> -enantiomere Kohlenhydratliganden“ (1.7)
08.1999 - 07. 2006	Bischofliches Gymnasium Josephinum Hildesheim, Allgemeine Hochschulreife (3.0)

## Publikationen

---

1. N. Kandziora, J. N. Andexer, S. J. Moss, B. Wilkinson, P. F. Leadlay, F. Hahn,  
“Uncovering the origin of *Z*-configured double bonds in polyketides: intermediate *E*-  
double bond formation during borrelidin biosynthesis”, *Chemical Science* **2014**, *5*,  
3563-3567.

2. F. Hahn\*, N. Kandziora\*, S. Friedrich, P. F. Leadlay, "Synthesis of complex intermediates for the study of a dehydratase from borrelidin biosynthesis", *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2014**, *10*, 634-640.
3. J.-N. Levy, C. M. Latham, L. Roisin, N. Kandziora, P. Di Fruscia, A. J. P. White, S. Woodward, M. J. Fuchter, "The design and synthesis of novel IBox- *N*-heterocyclic carbene ligands derived from substituted amino-indanols", *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, *10*, 512-515.

### Ausgewählte Wissenschaftliche Präsentationen

---

#### Vorträge:

1. The Chemistry and Biology of Natural Products Symposium VIII, 2014, Warwick (UK)  
"Uncovering the origin of *Z*-configured double bonds in polyketides: *in vitro* and *in vivo* confirmation of intermediate *E*-double bond formation during borrelidin biosynthesis"
2. MINAS meeting, 2014, Hannover  
"Uncovering the origin of *Z*-configured double bonds in polyketides: *in vitro* and *in vivo* confirmation of intermediate *E*-double bond formation during borrelidin biosynthesis"

#### Poster:

1. ORCHEM 2014, Weimar  
"Characterisation of Potent Biocatalysts by *in vitro* Studies on the Biosynthesis of the Ambruticin Western Fragment - Enzyme Expression and Precursor Synthesis"
2. 1<sup>th</sup> European Conference on Natural Products, 2013, Frankfurt  
"Stereoselectivity of isolated dehydratase domains of borrelidin polyketide synthase and their contribution to *Z*-double bond formation"