

**Untersuchungen zur stereoselektiven
oxidativen Phenolkupplung von Cumarinen
in *Aspergillus niger***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Wolfgang Hüttel

aus

Bonn

Bonn, im August 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Erstgutachter:	Prof. Dr. Christian Wandrey
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Jörn Piel
Fachnahes Mitglied:	Prof. Dr. Klaus Wandelt
Fachangrenzendes Mitglied:	Prof. Dr. Michael Müller

Tag der Promotion: 21. Oktober 2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert (2005).

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Januar 2002 bis Dezember 2004 am Institut für Biotechnologie 2, Forschungszentrum Jülich GmbH, sowie von Januar bis Juli 2005 am Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Universität Freiburg, unter der fachlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. C. Wandrey und Herrn Prof. Dr. M. Müller angefertigt.

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. C. Wandrey für die hervorragenden Arbeitsbedingungen in Jülich, die großzügige finanzielle Unterstützung während meines Forschungsaufenthalts in Hannover sowie die freundliche Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. J. Piel für die freundliche Übernahme des Korreferats

Herrn Prof. Dr. K. Wandelt für die Mitwirkung im Promotionsausschuss.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Müller für die interessante Themenstellung, die anregenden Gespräche sowie die stets freundliche, hilfreiche und persönliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit. Seine stets motivierende Unterstützung während aller Phasen der Arbeit hat maßgeblich zum Erfolg beigetragen.

Herrn Dr. D. Drochner für die intensive Einarbeitung in die chemische Synthese und die vielen anregende Tipps während der Arbeit.

Frau Dipl. Chem. Silke Bode für die gute Kooperation bei der Bearbeitung des Phenol-kupplungsprojekts sowie gründliches Korrekturlesen.

Herrn Dr. Michael Richter für Korrekturlesen des molekularbiologischen Teils.

Frau Petra Geilenkirchen für die konstruktive Zusammenarbeit im Labor.

All meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe "Bioorganische Chemie" am Institut für Biotechnologie 2 in Jülich sowie am Institut für Pharmazeutische Wissenschaften in Freiburg möchte ich für das hervorragende Arbeitsklima, unterhaltsame Pausen und die Hilfsbereitschaft bei kleinen und größeren Problemen besonders herzlich danken.

Den Praktikanten Regina Schwering, Timo Koch und Kerstin Oellers für ihr außerordentliches Engagement.

Herrn Prof. Dr. K.-P. Stahmann und Mitarbeitern für eine erste Einführung in Biologie und Kultur von filamentösen Pilzen sowie die großzügige Nutzung von Geräten.

Frau Dr. Sandra Jonen für die Hilfestellung in molekularbiologischen Fragen und die Möglichkeit zur Nutzung der Ressourcen des IBT1.

Den Mitarbeitern der Infrastruktur des IBT, besonders Frau M. Heß, für ihre stets hilfsbereite und freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. A. Brakhage für die Kooperation in biologischen Fragestellungen und die gute Betreuung während meines Forschungsaufenthalts am Institut für Mikrobiologie der Universität Hannover.

Herrn Dr. Thorsten Heinekamp für die Einführung in molekularbiologische Arbeitstechniken sowie die Koordinierung der in Hannover durchgeführten Klonierungsarbeiten.

Der gesamten Arbeitsgruppe Brakhage, besonders den Mitarbeitern des Labors 001, für die herzliche und unvoreingenommene Aufnahme eines Chemikers in eine biologische Arbeitsgruppe.

Herrn Dr. Martin Nieger (Institut für Anorganische Chemie der Universität Bonn) für die Durchführung der Röntgenstrukturanalyse.

Den Mitarbeitern der analytischen Abteilungen des Kekulé-Institutes für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn.

Für Katrin

Lebenslauf

Wolfgang Hüttel

Geboren am 19. März 1975 in Bonn

- 1985 – 1994 Besuch des Tannenbuschgymnasiums Bonn
- Juni 1994 Abitur
- Nov.1996- Jan. 1996 Zivildienst in der Rheinischen Landeslinik Bonn
- Apr. 1996 Beginn des Chemiestudiums an der Universität Bonn
- Okt. 1998 Vordiplom in Chemie (Universität Bonn)
- Jul. – Nov. 2001 Diplom in Chemie, Titel der Arbeit: *"Ein neues Verfahren zur Totalsynthese der Cumarine Siderin, Kotanin, Isokotanin A und Desertorin C"*, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn
- Jan. 2002 – Dez.2004 Doktorand in der Arbeitsgruppe Bioorganik (Prof. M. Müller) am Institut für Biotechnologie 2 (Prof. C. Wandrey), Forschungszentrum Jülich;
Titel des Forschungsprojekts *"Untersuchungen zur stereoselektiven oxidativen Phenolkupplung von Cumarinen in Aspergillus niger"*.
- seit Jan. 2005 Fertigstellung der Promotion als Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Müller, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Universität Freiburg,

Publikationen aus dieser Arbeit

D. Drochner, W. Hüttel, M. Müller, Unselective Phenolic Coupling of Methyl 2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoate – A Valuable Tool for the Total Synthesis of Natural Product Families, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 961-963; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 931-933.

W. Hüttel, M. Nieger, M. Müller, A Short and Efficient Total Synthesis of the Naturally Occurring Coumarins Siderin, Kotanin, Isokotanin A and Desertorin C, *Synthesis* **2003**, 1803-1808.

Vortrag

W. Hüttel, S. Bode, A. Brakhage, M. Müller,
Studies on the Stereoselective Oxidative Phenol Coupling in Filamentous Fungi
3. Colloquium des Schwerpunktprogramms (SPP) 1152 "Evolution metabolischer Diversität",
DFG, Halle, 2.-4. Oktober 2004.

Posterpräsentationen

W. Hüttel, S. Bode, T. Heinekamp, A. Brakhage, M. Müller,
Research on the Stereoselektive Oxidative Phenol Coupling in Filamentous Fungi
17. Irseer Naturstofftage, Aktuelle Entwicklungen in der Naturstoff-Forschung, DECHEMA,
Irsee, 23-25 Februar 2005.

W. Hüttel, D. Drochner, M. Müller,
Studies on the Stereoselective Oxidative Phenol Coupling in *Aspergillus niger*
8. Symposium des Sonderforschungsbereichs (SFB) 380, "Asymmetrische Synthese mit
chemischen und biologischen Methoden", DFG, Jülich, 7.-8. Oktober 2004.

W. Hüttel, D. Drochner, M. Müller, A New Method for the Synthesis of the Dimeric
Coumarins Kotanin, Isokotanin A and Desertorin C, ORCHEM 2002, Bad Nauheim, 12.-14.
September 2002.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
3	Allgemeiner Teil.....	5
3.1	Synthese von Biarylverbindungen	5
3.1.1	Stereochemie von Biarylverbindungen	5
3.1.2	Prinzipien der Aromatenkupplung.....	7
3.1.3	Darstellung atropisomerenreiner Biaryle.....	13
3.2	Oxidative Phenolkupplungen in der Biosynthese	19
3.3	Metabolische Diversität durch oxidative Phenolkupplung	27
4	Spezieller Teil	30
4.1	Einleitung	30
4.1.1	Das System Siderin, Kotanin, Isokotanin und Desertorin	33
4.2	Chemische Synthesen.....	35
4.2.1	Zusammenfassung.....	35
4.2.2	Übersicht über Synthesen der Cumarine in der Literatur.....	35
4.2.3	Synthesestrategie	45
4.2.4	Präparative Arbeiten	48
4.3	Analytik.....	63
4.3.1	Zusammenfassung.....	63
4.3.2	Extraktion von Pilzkulturen und chromatographische Aufreinigung.....	63
4.3.3	Analyse von Rohextrakten durch HPLC.....	66
4.3.4	Methoden zur Bestimmung der Chiralität.....	72
4.3.5	Bestimmung der Kotaninkonzentration in Lösungen und Rohextrakten.....	76
4.3.6	Detektion über Fluoreszenz.....	78
4.4	Untersuchungen zur Cumarinbiosynthese in Aspergillen	80
4.4.1	Zusammenfassung.....	80
4.4.2	Zusammenfassung der Literatur	81
4.4.3	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 36626	85
4.4.4	Untersuchung anderer <i>Aspergillus</i> -Stämme.....	100
4.5	Molekularbiologische Arbeiten	110
4.5.1	Zusammenfassung.....	110
4.5.2	Konstruktion einer Cosmidbank von <i>Aspergillus niger</i> ATCC 36626.....	110
4.5.3	Konstruktion eines Cosmid-Shuttle Vektors mit dem <i>pyr4</i> -Gen als Selektionsmarker ..	116
4.5.4	Screening auf Polyketidsynthase-Gene	119
4.5.5	Versuche zur Transformation ausgewählter Cosmide in <i>A. niger</i> N 402	126

4.6	Ausblick.....	129
5	Experimenteller Teil	131
5.1	Chemische Synthesen.....	131
5.1.1	Synthesen der monomeren Cumarine	132
5.1.2	Synthesen der ¹³ C-markierten monomeren Cumarine.....	137
5.1.3	Synthese der dimeren Cumarine: Kotanin (2), Isokotanin A (7) und Desertorin C (8)...	142
5.1.4	Tabellarischer Anhang	161
5.2	Analytik.....	167
5.2.1	Verwendete Geräte und Materialien	167
5.2.2	HPLC-Analyse von Rohextrakten	169
5.2.3	Kultur- und Verfütterungsexperimente mit Aspergillen	170
5.2.4	Aufarbeitung und Analyse der Pilzmetabolite.....	173
5.3	Molekularbiologische Arbeiten	181
5.3.1	Allgemeine Anmerkungen	181
5.3.2	Klonierung in PCR [®] 2.1-TOPO [®]	181
5.3.3	Sequenzierung.....	181
5.3.4	DNA-modifizierende Enzyme.....	181
5.3.5	Isolierung und Aufreinigung von DNA	182
5.3.6	Konstruktion der <i>A. niger</i> Cosmidbank.....	183
5.3.7	Konstruktion eines Cosmid-Shuttle Vektors mit dem <i>pyr4</i> -Gen als Selektionsmarker ..	184
5.3.8	Screening auf Polyketidsynthase-Gene (PKS).....	184
5.3.9	Versuche zur Transformation ausgewählter Cosmide in <i>A. niger</i> N 402	185
5.3.10	Stämme	187
5.3.11	Medien und Puffer.....	188
6	Abkürzungsverzeichnis.....	191
7	Literaturverzeichnis	194

1 Zusammenfassung

Die Arbeit befasst sich mit der oxidativen Phenolkupplung des Siderins (**1**) und seiner Derivate in *Aspergillen*. Der Schwerpunkt liegt dabei in der Aufklärung der Biosynthese von Kotanin (**2**), dem 8,8'-Dimer des Siderins (**1**), das von *Aspergillus niger* regio- und stereoselektiv synthetisiert wird.

Es wurde ein chemischer Zugang sowohl zu den monomeren als auch den dimeren Cumarinen etabliert. Hierauf aufbauend wurde ein analytischer HPLC-Assay entwickelt, der die Analyse von Rohextrakten verschiedener Pilzstämme erlaubt. Durch Verimpfung von ^{13}C -markierten Monomeren konnte die oxidative Phenolkupplung in *A. niger* eindeutig bewiesen werden. Darüber hinaus gaben Verfütterungsexperimente mit Verbindungen, die sowohl an der Carbonylgruppe als auch an Methoxygruppen ^{13}C -markiert waren, einen Einblick in die Reihenfolge von *O*-Methylierungs- und Phenolkupplungsschritten bei der Kotaninbiosynthese.

Für die Identifizierung der entsprechenden enzymatischen Aktivität wurde eine Cosmidbank von *A. niger* angelegt, die in geeignete *Aspergillus*-Wirtsstämme transformiert und so auf Metabolitproduktion gescreent werden kann.

Ergebnisse

Chemische Synthese

Ausgehend von 4-*O*-Methylorsellinsäuremethylester (**3**) und seinen regioisomeren Dimeren (**4-6**), die leicht über eine oxidative Phenolkupplung des Orsellinsäureesters erhältlich sind, wurden die Cumarine Siderin (**1**), Kotanin (**2**), Isokotanin A (**7**) und Desertorin C (**8**) in einer neuen und hocheffizienten Dreistufenstrategie dargestellt. Zusätzlich wurden beide Atropisomere des Kotanins (**2**) aus den hochreinen Atropisomeren des entsprechenden dimeren Orsellinsäureesters erhalten.

Über diesen synthetischen Ansatz sind außerdem alle Hydroxyderivate von Siderin (**1**) leicht zugänglich. ^{13}C -Markierungen sowohl an den Methoxygruppen als auch am Kohlenstoffskelett (Carbonylisches C-Atom) können leicht und effektiv eingebaut werden.

Analytik

Unter Verwendung der chemisch hergestellten Verbindungen wurde ein optimierter HPLC-Assay etabliert, der eine schnelle und einfache Untersuchung von Rohextrakten verschiedener

Pilze auf Cumarine ermöglicht. Darüber hinaus wurde eine Methode entwickelt, die das Screenen einer Pilz-Genbank (mehrere tausend Stämme) in einem angemessenen Zeitrahmen erlaubt.

Die Cumarine wurden aus den Pilzen isoliert (Säulenchromatographie, präparative DC) und charakterisiert (NMR, MS, IR, UV). Die absolute Konfiguration der Bicumarine wurde durch CD-Spektroskopie verifiziert.

Biosyntheseuntersuchungen

Aus den ^{13}C -Markierungsexperimenten ergibt sich ein Biosyntheseweg für Kotanin (**2**) wie in Schema 1 dargestellt.

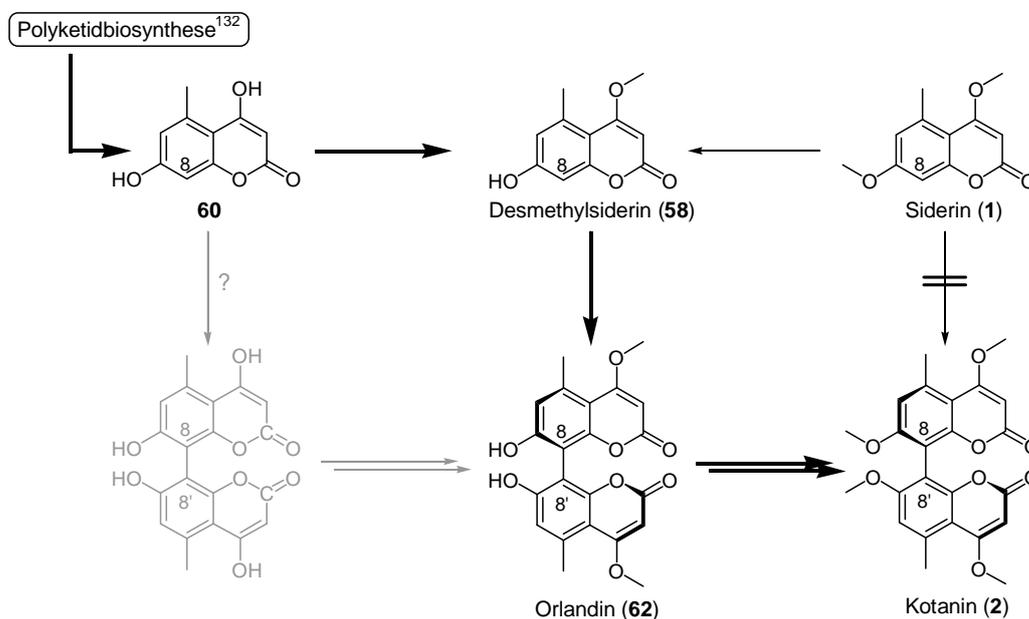


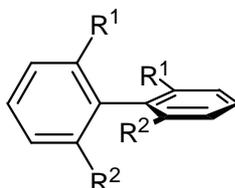
Abb. 1: Biosynthese des Kotanins (**2**) in *A. niger*.

Molekularbiologische Arbeiten

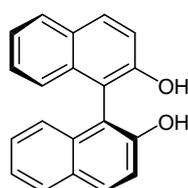
Zur Identifizierung des enzymatischen Systems, das die oxidative Phenolkupplung katalysiert, wurde zunächst eine Cosmidbank von *Aspergillus niger* erstellt. Der "Cosmid-Shuttle-Vektor" enthält ein Hygromycin-Resistenz-Gen, das eine Transformation in verschiedene Aspergillen und anschließendes Testen auf biosynthetische Aktivität erlaubt. Da die Cumarine polyketidischen Ursprungs sind und PKS-Gene in filamentösen Pilzen gewöhnlich geclustert vorliegen, wurde die Cosmidbank auf "nicht-reduzierende" PKS-Gene gescreent, um so gegebenenfalls einen Polyketid-Biosynthesecluster zu identifizieren, der die Aktivität zur Phenolkupplung kodiert.

2 Einleitung

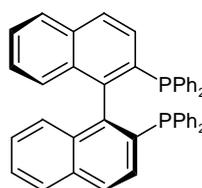
Biphenylverbindungen, die aus sterischen Gründen in ihrer Rotation um die Biarylachse gehindert sind und bei deren Substitutionsmuster die Bedingung $R^1 \neq R^2$ erfüllt ist, sind axial chiral.



Zahlreiche biarylische Naturstoffe mit unterschiedlichen Strukturen und biologischen Aktivitäten, darunter Polyketide, Terpene, Lignane, Cumarine, Flavonoide, Tannine und Peptide, verfügen über eine solche Chiralität.¹ Sie werden von unterschiedlichsten Organismen wie Pflanzen, Pilzen, Bakterien und marinen Lebewesen oft mit hoher Stereoselektivität synthetisiert. Daneben spielen chirale Biarylverbindungen, besonders die Binaphthylderivate BINOL (**9**)² und BINAP (**10**),³ eine herausragende Rolle als Metallliganden bei der enantioselektiven Katalyse organisch chemischer Reaktionen.⁴



(P)-BINOL (P-9)



(P)-BINAP (P-10)

Abb. 2: Wichtige axial-chirale Metallliganden für die enantioselektive Katalyse: BINOL (**9**),² BINAP (**10**).³

Eine Reihe von Verfahren zum stereoselektiven Aufbau von Biarylen sind bereits seit längerem bekannt.^{1, 5, 6} Trotzdem sind Synthesen derartiger Verbindungen, von den Binaphthylderivaten einmal abgesehen, meist aufwändig und wenig effektiv. Oft müssen Chiralitäts-induzierende Substituenten in mehreren Stufen aufgebaut und nach der Kupplung wieder abgespalten werden. Chirale Reagenzien werden dabei in stöchiometrischen Mengen benötigt. Wesentlich effizientere, katalytische Verfahren zur atropselektiven Aromatenkupplung wurden bisher nur selten im Rahmen von Binaphtholsynthesen publiziert (siehe S. 16ff). Trotz dieser ersten Erfolge ist ein breit anwendbares Verfahren noch nicht in Sicht. Auch oxidierende Enzyme wurden zur Aromatenkupplung eingesetzt. Allerdings blieb dabei die gewünschte Selektivität aus. Andererseits bauen zahlreiche Organismen Sekundärmetabolite über eine stereoselektive katalytische Aromatenkupplung auf. Dies beweist, dass es

entsprechende enzymatische Systeme gibt und diese durch Anpassung an entsprechende Substrate breit anwendbar sein sollten.

Der systematischen Aufklärung der Biosynthese axial-chiraler Biphenyle kommt daher eine besondere Bedeutung zu. Enzymsysteme, die einen regio- und stereoselektiven Aufbau von Biarylverbindungen katalysieren, werden daher nicht nur eine wertvolle Ergänzung zu den chemischen Verfahren darstellen, sondern auch ganz neue Möglichkeiten in der Synthese dieser Struktureinheit eröffnen.

Im *Allgemeinen Teil* werden zunächst die verschiedenen Methoden zur chemischen Synthese von Biarylen vorgestellt, wobei auf die biomimetischen Verfahren zur katalytischen, stereoselektiven oxidativen Phenolkupplung genauer eingegangen wird. Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit der Biosynthese von Biarylen und anderen Phenolkupplungsprodukten. Dabei werden in erster Linie neuere Arbeiten mit enzymologischen und molekulargenetischen Ansätzen diskutiert. Schließlich wird anhand einiger Beispiele auf die ungewöhnliche metabolische Diversität, die durch oxidative Phenolkupplung in der Biosynthese entsteht, eingegangen.

In *Speziellen Teil* wird zunächst das System des Cumarins Siderin (**1**) und seiner Phenolkupplungsprodukte vorgestellt. Anschließend werden die eigenen Arbeiten zur Aufklärung der Kotanin-Biosynthese in *A. niger* beschrieben.

3 Allgemeiner Teil

3.1 Synthese von Biarylverbindungen

Für die Beschreibung von Biarylsynthesen sind folgende begriffliche Unterscheidungen sinnvoll:

a) *Kupplung zu konstitutionell symmetrischen Biarylen:*

Beide Arylreste an der Biarylachse sind identisch.

b) *Kupplung zu konstitutionell unsymmetrischen Biarylen (Kreuzkupplungen):*

Die Arylreste sind unterschiedlich. Ein Spezialfall liegt dann vor, wenn zwei identische Aromaten an unterschiedlichen Kohlenstoffatomen des Phenylringes verknüpft werden.

c) *Stereoselektive (asymmetrische) Aromatenkupplung:*

Nur ein Stereoisomer wird gebildet.

d) *Intermolekulare oder intramolekulare Aromatenkupplung*

Bei der intramolekularen Kupplung sind die Aromaten bereits vor der Kupplung an einer Stelle verbrückt.

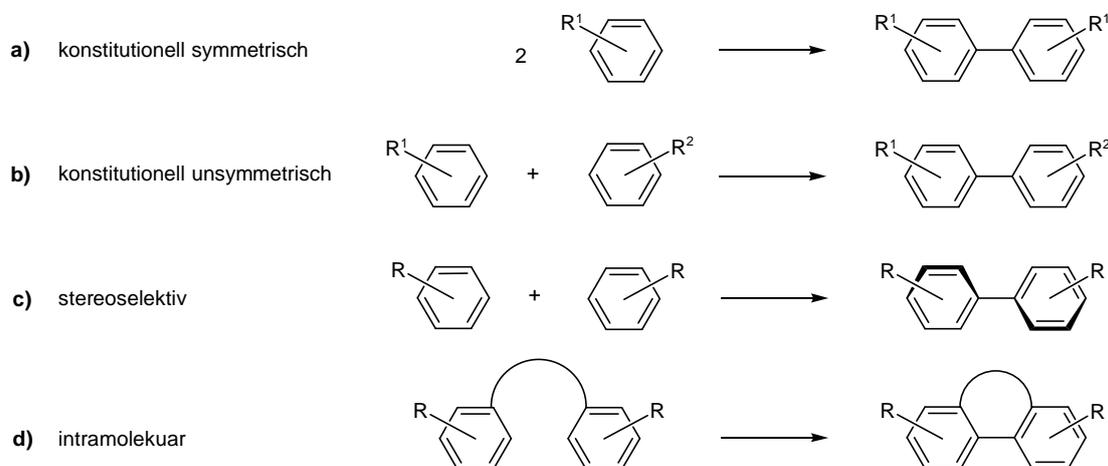


Abb. 3: Formen der Aromatenkupplung.

3.1.1 Stereochemie von Biarylverbindungen

Die axiale Chiralität an Biarylverbindungen wurde 1922 von CHRISTIE und KENNER entdeckt, denen es gelang, die Atropisomere von 2,2'-Dinitrobiphenyl-6,6'-dicarbonsäure durch diastereoselektive Kristallisation zu trennen.⁷

Biarylverbindungen sind dann chiral wenn,

1. für die Substituenten A, B, X und Y gilt: $A \neq B$ und $X \neq Y$ und
2. die Rotation um die Biarylachse aus sterischen Gründen gehindert ist.

Da die Stereoisomere allein durch Drehung um eine Bindung ineinander überführt werden können, kann diese Form der Enantiomerie als Spezialfall der Konformationsisomerie angesehen werden. 1933 führte KUHN hierfür den Begriff Atropisomerie (griech.: a = nicht, tropos = drehen) ein.⁸

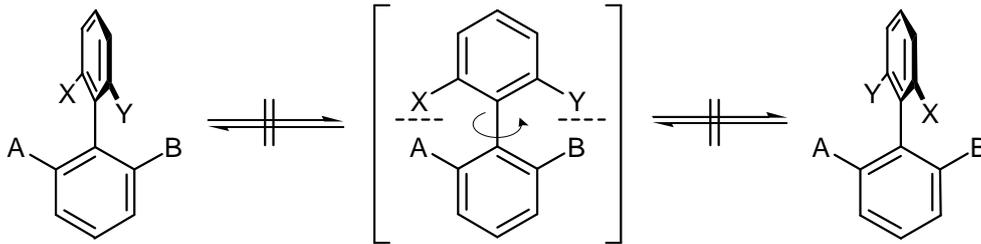


Abb. 4: Bei Atropisomeren ist die Rotation um die Biarylachse sterisch gehindert.

Eine sterische Hinderung der Rotation liegt bei in *ortho*-Stellung tetrasubstituierten Biarylen vor ($A, B, X, Y \neq H$) und auch bei trisubstituierten Biarylen, wenn die drei Substituenten groß genug sind. Disubstituierte Biaryle bilden nur dann stabile Atropisomere, wenn die Substituenten sterisch außerordentlich anspruchsvoll sind (z. B. 1,1'-Binaphthyl).⁹ Nach OKI liegt Atropisomerie dann vor, wenn die Halbwertszeit der Isomere mindestens 1000 s be-

trägt.¹⁰ Bei Raumtemperatur (300 K) entspricht dies einer Rotationsbarriere von 93.3 kJ/mol (22.3 kcal/mol). Bei den meisten tetrasubstituierten Biarylen ist die Energiebarriere aber wesentlich größer, so dass auch bei Erhitzen keine Racemisierung eintritt.

Für die Angaben der absoluten Konfiguration werden in dieser Arbeit die für helicale Verbindungen gebräuchlichen Deskriptoren *P* (plus) und *M* (minus) verwendet. Daneben können die von der zentralen Chiralität abgeleiteten Bezeichnungen *aS* und *aR* benutzt werden, wobei das "a" die axiale Chiralität anzeigt. Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration werden zunächst die Prioritäten der Substituenten

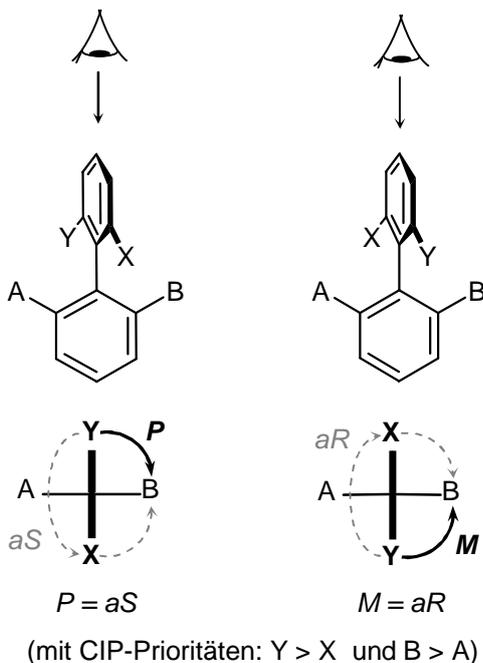


Abb. 5: Bestimmung der absoluten Konfiguration von Biarylen.

an beiden Seiten der Biarylachse gemäß den Cahn-Ingold-Prelog Regeln bestimmt.^{11, 12} Wenn bei Newman-Projektion die kürzeste Verbindung (eine 90°-Kurve) vom oberen Substituenten zum unteren (jeweils mit höchster Priorität) im Uhrzeigersinn verläuft, liegt die *P*-Konfiguration vor, im umgekehrten Fall die *M*-Konfiguration (Abb. 5). Bei der Bestimmung der Konfiguration gemäß *R/S*-Nomenklatur wird die Drehrichtung vom oberen Substituenten höchster Priorität über den mit niedrigerer Priorität zu dem unteren Substituenten mit höchster Priorität bestimmt. Ist diese rechtsdrehend liegt die *aR*-Konfiguration vor, andernfalls die *aS*-Konfiguration. Für axiale Chiralität gilt $P = aS$ und $M = aR$.

3.1.2 Prinzipien der Aromatenkupplung

Seit den frühen Anfängen in den letzten Jahrzehnten des neunzehnten Jahrhunderts¹³ hat sich der gezielte Aufbau von Aryl-Aryl-Bindungen zu einem wichtigen Syntheseschritt in der Darstellung von Wirkstoffen und chemischen Katalysatoren entwickelt. Allein im Zeitraum von 1991 - 2001 wurden über 700 Artikel zu diesem Thema veröffentlicht.^{14a} Die verschiedenen Ansätze wurden in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst.¹⁴ An dieser Stelle werden daher nur die Prinzipien, nach denen Biaryleinheiten aufgebaut werden können, vorgestellt. Reaktionen, bei denen die Biaryleinheit erst durch Aufbau eines zweiten Phenylringes an einem acyclischen Substituenten eines Aromaten gebildet wird, werden nicht berücksichtigt.

3.1.2.1 Übergangsmetall-vermittelte Aromatenkupplungen

Die meisten der in jüngerer Zeit publizierten Aromatenkupplungen erfolgten über Übergangsmetallkomplexe. Besonders die in den letzten drei Jahrzehnten entwickelten Verfahren, bei denen (Halb-)Metallaryle durch Übergangsmetallkatalyse schon bei milden Bedingungen mit Arylhalogeniden gekuppelt werden können, haben die Möglichkeiten der Biarylsynthese stark erweitert.^{14d} Von herausragender Bedeutung sind dabei Kreuzkupplungen mit Kupfer(I), Nickel (Negishi- und Kumada-Kupplung) und Palladium. Letzteres wird häufig mit Arylverbindungen der Elemente Magnesium, Zink, Zinn (Stille-Kupplung) und Bor (Suzuki-Kupplung) umgesetzt.

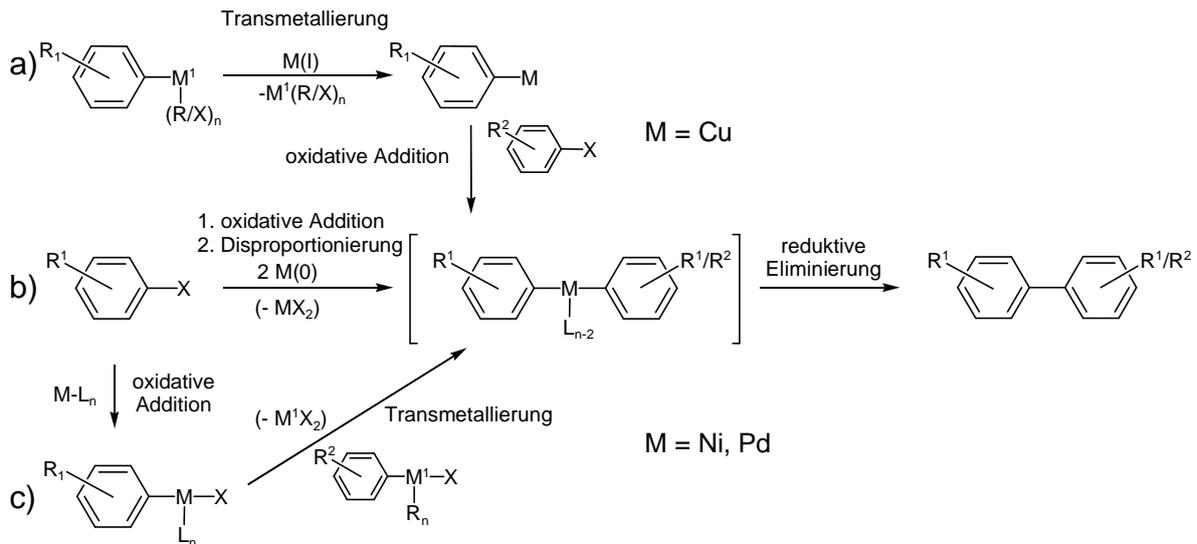


Abb. 6: Schematische Darstellung der Methoden zur Aromatenkupplung durch reduktive Eliminierung eines Diaryl-Übergangsmetallkomplexes. X = Halogenid, Triflat; M und M¹: siehe Tabelle 1.

Die Biarylachse wird durch eine reduktive Eliminierung eines intermediären Übergangsmetallkomplexes mit zwei aromatischen Liganden aufgebaut. Ein direkter Aufbau eines solchen Komplexes über oxidative Addition (z. B. von Arylhalogeniden) an ein Übergangsmetall M der Oxidationsstufe 0 mit anschließender Disproportionierung (Abb. 6, b) erfolgt wegen der geringen Reaktivität der Metalle meist mit geringen Ausbeuten beziehungsweise erst bei hohen Temperaturen (zum Beispiel Ullmannkupplung, Cu). Außerdem werden die Metalle oxidiert und müssen daher in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden, sofern kein Reduktionsmittel zugegeben wird. In den meisten Fällen wird daher einer der Arylliganden durch Austausch mit einem zweiten Metall-Aryl-Komplex eingeführt (Abb. 6, a und c). Wegen des schrittweisen Aufbaus des Diarylkomplexes können auch konstitutionell unsymmetrische Biaryle leicht erzeugt werden. Als Metalle (M¹) für diesen zweiten Komplex werden in der Regel gute Halogenid-Akzeptoren eingesetzt um den Ligandenaustausch zu erleichtern. Dies sind stark elektropositive Metalle (Li, Mg, Zn) oder auch Halbmetalle (B, Si, Sn). Für die eigentlichen aromatenkuppelnden Komplexe werden Elemente benötigt, die leicht die Oxidationsstufe wechseln können und gleichzeitig *semi*-stabile Metall-Organyl-Komplexe bilden. Diese Bedingungen erfüllen vor allem die Metalle Kupfer, Nickel und Palladium. In jüngster Zeit wurden auch Eisen und Cobalt eingesetzt.¹⁵ In Tabelle 1 werden die zur Kupplung von Aromaten verwendeten Metalle beziehungsweise Metallkombinationen zusammengefasst. Ein Nachteil der Nickel- oder Palladium-katalysierten Kreuzkupplungen war lange Zeit ihre geringe Reaktivität bei sterisch anspruchsvollen Systemen, wie zum Beispiel bei Kupplungen zu tetra-*ortho*-substituierten Biarylen. Erst in neuerer Zeit konnten

mit optimierten Liganden auch solche Verbindungen über Suzuki-¹⁶ und Negishi-Kupplungen¹⁷ erhalten werden.

M	M ¹	Namenreaktion
Cu	-	Ullmann-Kupplung ^{13b}
Cu (I)	Li / Mg / Si / Sn	
Ni	-	
Ni	Mg	Kumada-Kupplung ¹⁸
Ni	Zn	Negishi-Kupplung ¹⁹
Ni	B(OH) ₂ , Zr	
Pd	-	
Pd	Mg	
Pd	Zn	
Pd	Sn	Stille-Kupplung ²⁰
Pd	B(OH) ₂	Suzuki-Kupplung ²¹
Pd	Si / Mn / Cu / Ge / Zr / In / Sb / Hg / Pb / Bi	
Fe / Co	[ArCu(CN)MgCl]	(Knochel) ¹⁵

Tabelle 1: Aromatenkupplungen durch Übergangsmetallkomplexe (M), mit und ohne Transmetallierungsschritt von einem zweiten Metallkomplex (M¹).

3.1.2.2 Aromatenkupplungen mit radikalischem Mechanismus

Oxidative Phenolkupplungen

Die oxidative Phenolkupplung ist eine weitere wichtige Methode zu Darstellung von Biarylen. Sie ist die älteste Methode der Aromatenkupplung. Erste Reaktionen wurden bereits in den siebziger Jahren des neunzehnten Jahrhunderts publiziert,²² und schon 1925 zeigten PUMMERER *et al.*, dass die Oxidation von *para*-Kresol (**11**) zu einem *ortho-para* gekuppelten Produkt, dem "Pummerer Keton", über phenolische Radikale verläuft.²³ Der Reaktionsmechanismus sowie die Struktur des Produkts **12** wurden 1956 von BARTON *et al.* korrigiert (Abb. 7).²⁴

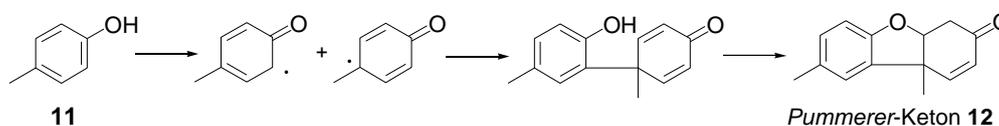


Abb. 7: Oxidative Phenolkupplung von *para*-Kresol (**11**) zum sogenannten Pummerer-Keton **12**.^{23, 24}

Da bei der oxidativen Phenolkupplung Phenole und Phenolether ohne vorherige Aktivierung, wie zum Beispiel Einführung von Halogensubstituenten, verknüpft werden können, ist diese Reaktion außerordentlich effizient. Schwierigkeiten bereitet allerdings häufig die Kontrolle von Reaktivität und Regioselektivität.

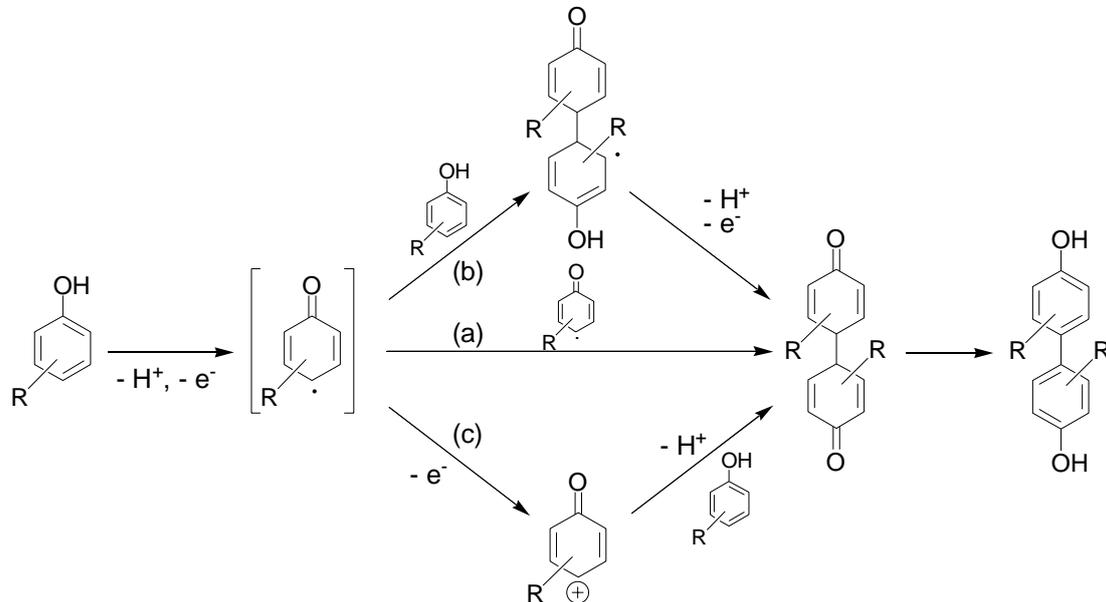


Abb. 8: Mechanismen der radikalischen, oxidativen Phenolkupplung.²⁵ Zur besseren Übersichtlichkeit werden nur die Reaktionswege des *para*-Radikals aufgeführt. (Schema modifiziert nach DROCHNER.)^{26a}

Bei der Reaktion wird zunächst dem Phenol durch ein Oxidationsmittel ein Elektron und ein Proton entzogen (Abb. 8). Das Phenoxyradikal kann auf verschiedene Weisen reagieren:

- Kombination mit einem zweiten Radikal.
- Kupplung mit einem Phenolmolekül, wobei intermediär ein Radikal-Dimer entsteht, das durch Elektronenentzug und Deprotonierung weiter oxidiert wird.
- Einelektronenoxidation zum Cyclohexadienon-Kation, das als Elektrophil mit einem Phenolmolekül reagiert.

In allen Fällen entsteht ein dimeres Cyclohexandienon, das in einer spontanen Protonenumlagerung zum Endprodukt rearomatisiert. Aus den mesomeren Grenzstrukturenⁱ geht hervor, dass Phenylradikale bevorzugt in *ortho*- und *para*-Position reagieren. Ohne weitere sterische oder elektronische Kontrolle der Selektivität kommt es zu Gemischen aus konstitutionell symmetrischen und unsymmetrischen Biphenolen (Abb. 9). In der Synthese

ⁱ Das Valence-Bond-(VB)-Modell gibt die physikalisch relevanten Elektronenspindichten qualitativ richtig wieder. Nur an den Sauerstoffatomen ist die Spindichte deutliche niedriger, weshalb Kupplungen über diese Atome benachteiligt sind.

werden oxidative Phenolkupplungen daher häufig intramolekular durchführt, wodurch Regioselektivität und gegebenenfalls auch Stereoselektivität vorgegeben werden.

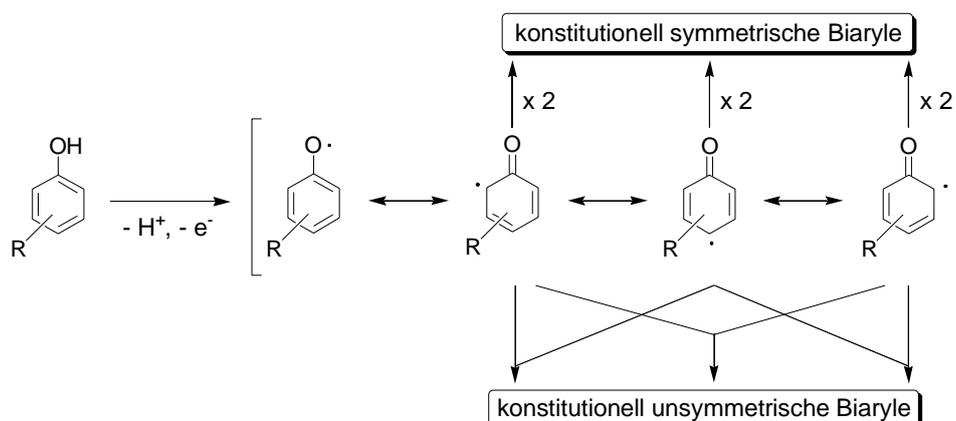


Abb. 9: Entstehung regioisomerer Biphenyle über mesomeriestabilisierte Phenoxy-Radikale. (Schema modifiziert nach BRINGMANN.)¹¹

Zahlreiche Oxidationsmittel wurden für oxidative Phenolkupplungen verwendet (Abb. 10). Unter den Metallen haben vor allem Verbindungen von V(V), Fe(III), Cu(II), Ag(I) und Tl(III) größere synthetische Bedeutung erlangt. Bei den nichtmetallischen Verbindungen wurden in jüngster Zeit hypervalente Iodverbindungen (PIFA) mit gutem Erfolg eingesetzt.^{14e, h} Auch enzymkatalysierte Aromatenkupplungen erfolgen über diesen Mechanismus.

Oxidationsmittel: ^{14e, f}	
a) Metallverbindungen:	V(IV und V), Cr(VI), Mo (V und VI), Mn (IV und VI), Fe(III), Ru (VIII), Co(III), Ni(IV), Rh(III), Cu(II), Ag (I), Tl(III), Pb(IV), Se(IV), Bi(V), Ce(IV)
b) organische Verbindungen:	Peroxide (di- <i>tert</i> -Butylperoxid, MCPBA), DDQ, hypervalente Iodverbindungen (PIFA), Fremys-Salz [ON(SO ₃ K) ₂], NH ₄ NO ₃ (CF ₃ CO) ₂ O,
d) Sauerstoff	in Verbindung mit Metallkatalysatoren oder Enzymen
f) anodische Oxidation ^{14g}	

Abb. 10: Übersicht über die zur oxidative Phenolkupplung verwendeten Oxidationsmittel.

Andere Aromatenkupplungsreaktionen mit radikalischem Mechanismus

Zu erwähnen sind: Radikal-induzierte, intramolekulare Arylumlagerungen (Abb. 11a), sowie die ebenfalls intramolekulare Pschorr-Reaktion.¹³ Bei dieser wird ein Diazonium-Salz mit Cu(I) reduziert. Nach Abspaltung von Stickstoff wird ein Aryl-Radikal erhalten, das eine Kupplungsreaktion eingeht (Abb. 11b). Schließlich können Arylradikale auch photochemisch erzeugt werden.^{14a, c}

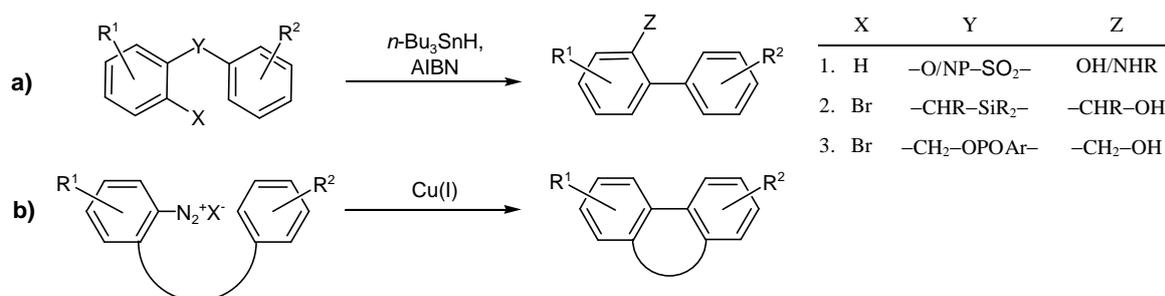


Abb. 11: a) intramolekulare radikalische Phenylumlagerung , b) Pschorr-Reaktion.

3.1.2.3 Aromatenkupplung durch nucleophile aromatische Substitution

Arylmetallverbindungen, in der Regel Aryl-Grignard- oder Aryllithiumverbindungen, reagieren mit Aromaten, die durch stark elektronenziehende Substituenten (Y) aktiviert sind (Abb. 12). Substituiert werden typischerweise Methoxygruppen. Als elektronenziehende Gruppen werden häufig Oxazoline nach MEYERS²⁷ verwendet. Daneben kommen Ester, Sulfinyle, Sulfonyle und Diphenylphosphine zum Einsatz.^{14a} Auch Chromcarbonyle können als elektronenziehende und gleichzeitig chiralitätsinduzierende Liganden genutzt werden.²⁸

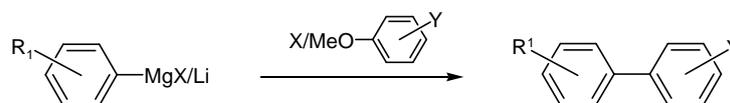


Abb. 12: Nucleophile Substitution mit Metall-Arylen an durch elektronenziehende Substituenten aktivierten Aromaten.

3.1.2.4 Aromatenkupplung über Arine

Bei der ursprünglich von WITTIG²⁹ und HUISGEN³⁰ entdeckten Reaktion findet an einer Aryl-Grignard beziehungsweise einer Aryllithiumverbindung mit Halogensubstituent in α -Stellung eine *syn*-Eliminierung statt, wodurch intermediär eine Dreifachbindung entsteht (Abb. 13). An diese wird eine weitere Aryl-Metallverbindung nucleophil addiert.³¹

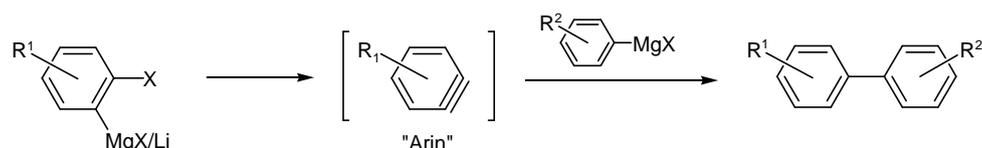


Abb. 13: Aromatenkupplung durch nucleophile Addition einer Arylgrignardverbindung an ein intermediär gebildetes Arin.

3.1.3 Darstellung atropisomerenreiner Biaryle

3.1.3.1 Racematspaltungen

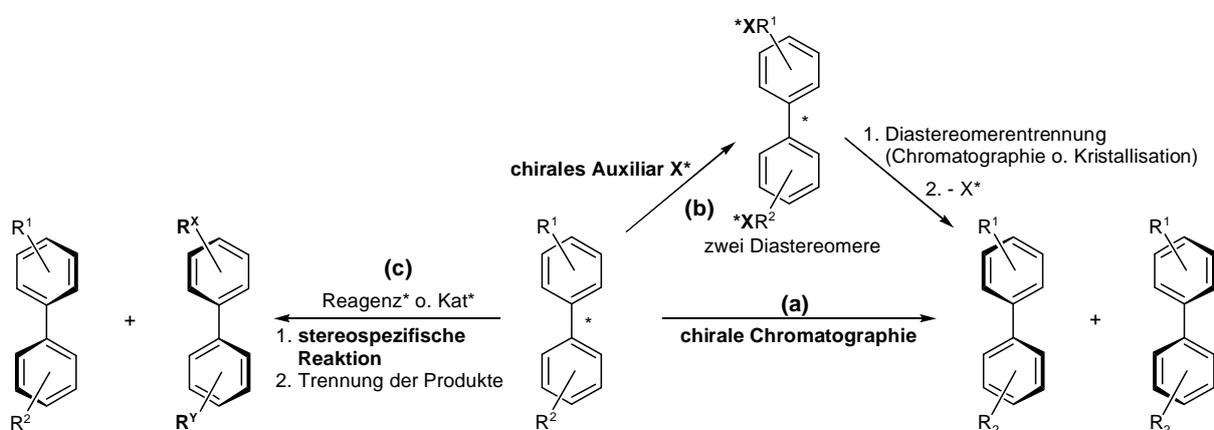
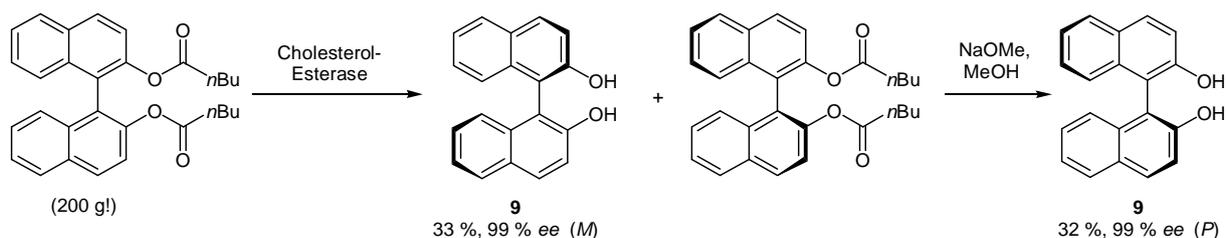


Abb. 14: Methoden zur Racematspaltung biarylischer Verbindungen.

Angesichts der Schwierigkeiten bei der atropselektiven Biarylsynthese ist es in vielen Fällen auch heute noch effizienter, Biaryle racemisch herzustellen und anschließend eine Racematspaltung durchzuführen. Die Methoden dazu gleichen denen bei Molekülen mit zentraler Chiralität. Es sind: a) Chromatographie an chiraler Phase (insbesondere HPLC), b) Derivatisierung mit chiralen Reagenzien und anschließende Diastereomerentrennung sowie c) stereospezifische Reaktion eines der Stereoisomere. Ein Beispiel für Weg b) ist die Trennung der Atropisomere des dimeren Orsellinsäureesters **4** im Rahmen der Kotaninsynthese (siehe Seite 47 im Speziellen Teil). Eine stereospezifische Reaktion wird bei der Lactonmethode nach BRINGMANN genutzt.⁶ Ein Beispiel ist die Synthese des Isokotanin A (**7**) (siehe Seite 41). Ein Lactonring, der die Biarylachse überspannt, wird mit chiralen Boranen reaktiv gespalten. Durch spontane, beziehungsweise thermisch induzierte Racemisierung der Lactone können theoretische Ausbeuten von 100 % erhalten werden (dynamische kinetische Racematspaltung). Auch Enzyme können zur Deracemisierung bzw. zur Desymmetrisierung von Biarylen eingesetzt werden (Abb. 15).³²

a) Kazlauskas 1989



b) Matsumoto 2001

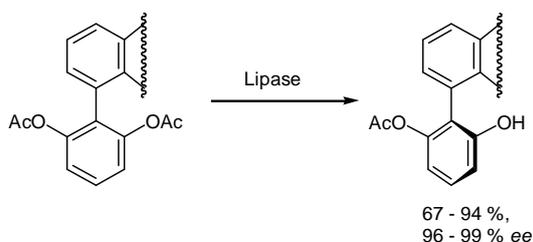


Abb. 15: Beispiele für eine enzymatische Racematspaltung (a) und eine Desymmetrisierung (b) von Biarylen.³²

3.1.3.2 Stereoselektive Aromatenkupplungen

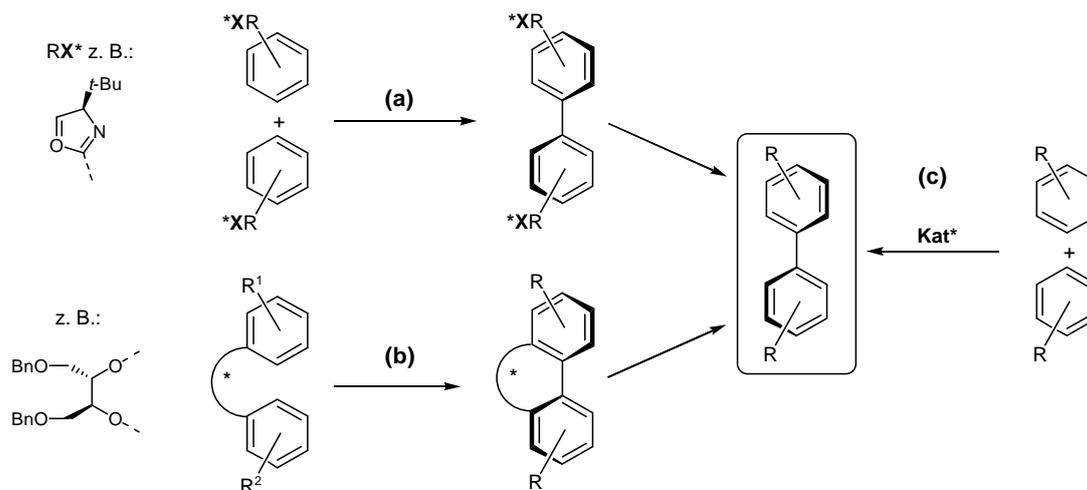


Abb. 16: Methoden zur stereoselektiven Biarylsynthese.

Zum atropselektiven Aufbau von Biarylverbindungen werden drei verschiedene Prinzipien angewendet:

Abb. 16 a) Kupplung mit chiralen Substituenten (Auxiliaren), die die Stereoselektivität steuern. Prominentestes Beispiel für derartige Auxiliare sind chirale Oxazolinone nach MEYERS²⁷ (siehe dazu auch die Synthesen von Isokotanin A (7) und Desertorin C (8), auf den Seiten 39 und 43 im Speziellen Teil.). UEMURA nutzte planar-chirale Chromcarbonyl-Komplexe zur stereoselektiven Aromatenkupplung (Abb. 17).³³ Diese sind in ihrer Elektrophilie so verstärkt, dass auch nucleophile aromatische Substitutionen möglich sind.²⁸

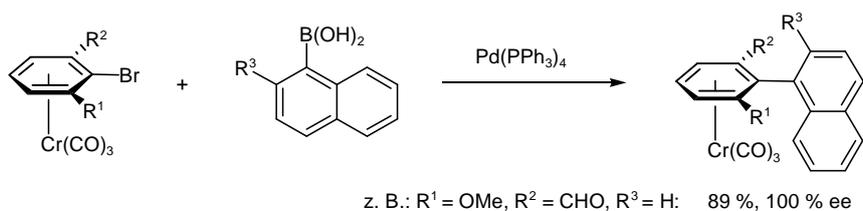


Abb. 17: Stereoselektive Aromatenkupplung von Chromcarbonylkomplexen nach UEMURA.³³

Abb. 16 b) Intramolekulare Kupplung von chiral verbrückten Biarylen

Bei dieser Methode werden die Vorteile der intramolekularen Kupplung – verbesserte Aktivität und praktisch vollständige Regioselektivität – mit einer chiralen Induktion gekoppelt. Das Verfahren ist daher auch für schwierige Fälle geeignet. Nachteil ist der oft recht hohe synthetische Aufwand für Aufbau und Abspaltung der Brücke. Beispiele sind die Methode nach LIPSHUTZ³⁴ (siehe dazu die Synthesen von Kotanin (**2**) und Desertorin C (**8**) im Speziellen Teil, Seiten 38 und 44) und der Aufbau von Ellagitannineinheiten nach FELDMAN³⁵ oder MARTIN³⁶ (Abb. 18), wobei die Chiralitäts-induzierende Brücke Bestandteil des Zielmoleküls ist.

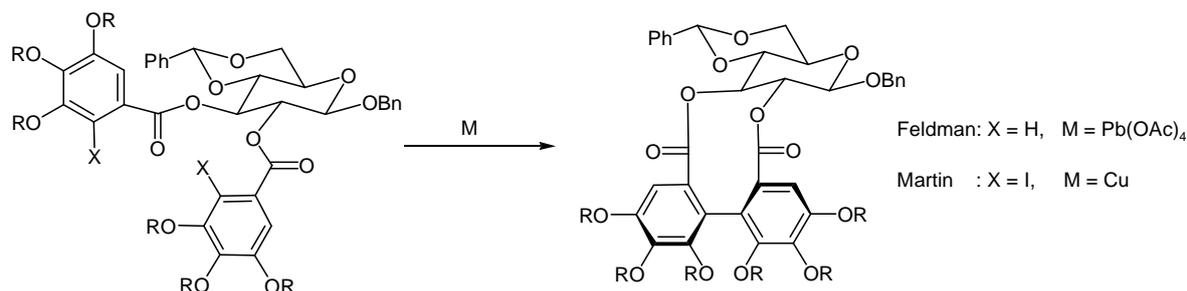


Abb. 18: Aufbau von Ellagitannineinheiten nach FELDMAN und MARTIN.^{35, 36}

Ein komplexes Beispiel ist die Synthese des Vancomycin-Aglycons (**13**) nach EVANS (Abb. 19).³⁷ Bei der intramolekularen oxidativen Phenokupplung von **14** entsteht hochselektiv das nicht-natürliche (*M*)-Isomer *M*-**15**. Nach Aufbau des zweiten Makrozyklus zu *M*-**16** ist dagegen die entgegengesetzte Konfiguration thermodynamisch bevorzugt. Da die sterische Hinderung an der Biarylachse in *M*-**16** relativ gering ist, kann eine thermische Atropisomerisierung in die gewünschte (*P*)-Konfiguration (*P*-**16**) durchgeführt werden.

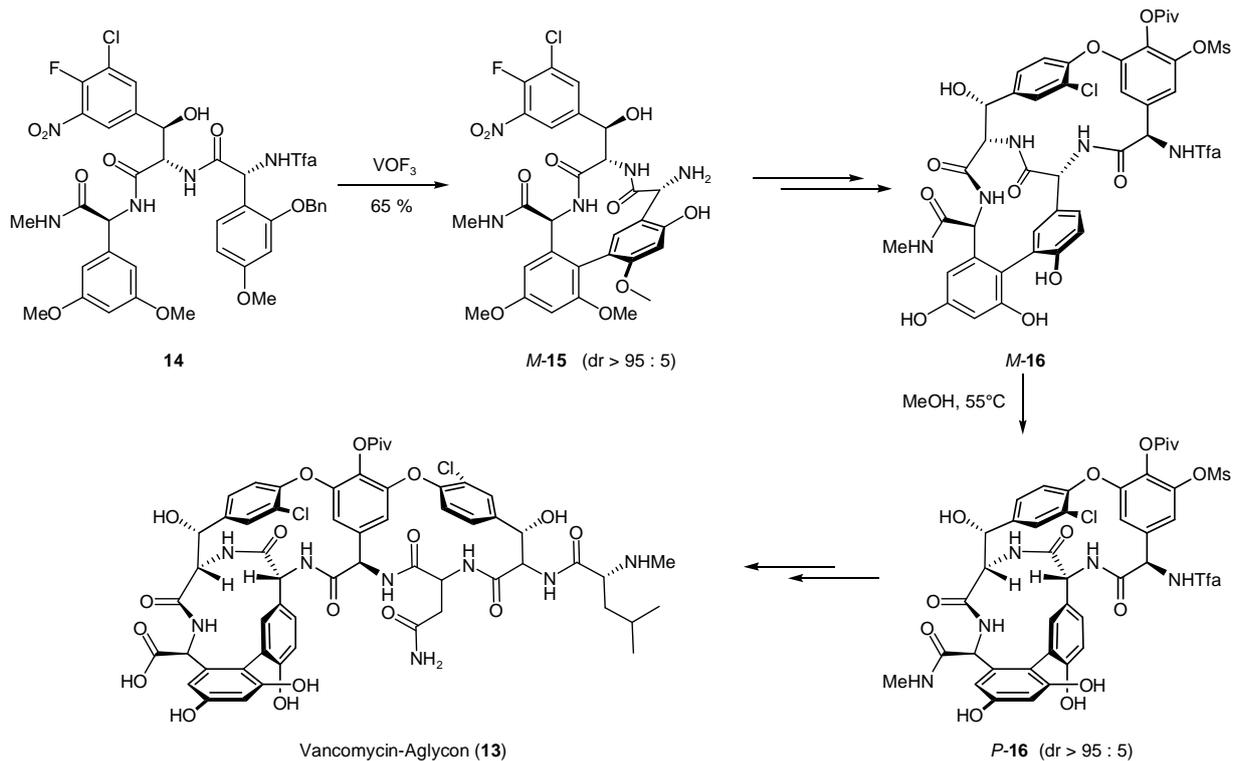
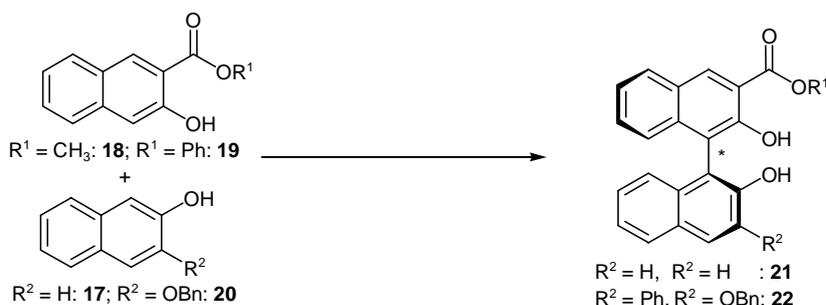


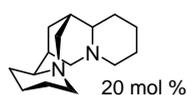
Abb. 19: Aufbau der Biarylachse bei der Synthese des Vancomycin-Aglycons (**13**) nach EVANS.³⁷

Abb. 16 c) Reagenzkontrollierte stereoselektive Phenolkupplungen

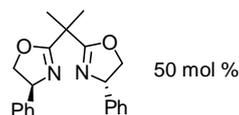
Bei diesem Verfahren bestimmt ein chirales Reagenz die Stereoselektivität bei der Aromatenkupplung. Dies hat den Vorteil, dass keine chiralen Substituenten an den Aromaten eingeführt werden brauchen. Gleichzeitig genügt es in vielen Fällen das Reagenz in katalytischen Mengen einzusetzen. Es handelt sich dabei um die mit Abstand effizientesten Verfahren zur Synthese von Biaryl-Atropisomeren. Allerdings beschränkt sich das Substratspektrum bisher hauptsächlich auf 2-Naphthol (**17**) und seine Derivate. Als Katalysatoren werden meist chirale Kupfer- oder Vanadium-Komplexe verwendet. Als Oxidationsmittel dient in der Regel Sauerstoff. In Abb. 20 und Abb. 21 sind die wichtigsten Reaktionen mit diesen Katalysatoren zusammengefasst.



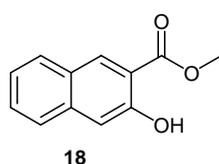
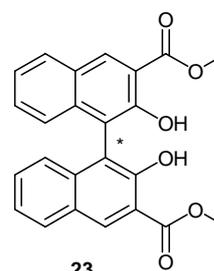
Kupfer-Katalysatoren:

**18 + 17**

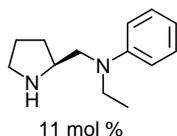
CuCl_2 (10 mol %), AgCl (1.1 eq.)
43 %, 32 % ee (*P-21*)

a) *Smrcina et al.* 1994**19 + 20**

CuCl (40 mol %), O_2
73 %, 65 % ee (*M-22*)

b) *Temma und Habaue* 2005Katalysator, O_2 

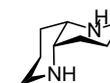
Kupfer-Katalysatoren:



CuCl (10 mol %)
85 %, 78 % ee (*P-23*)

c) *Nakajima et al.* 2001

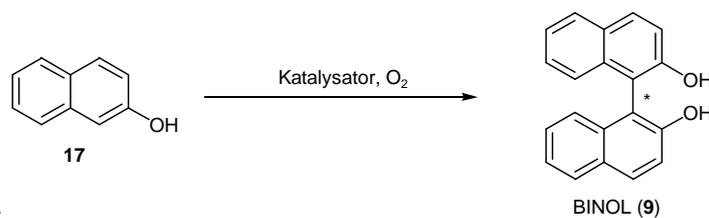
CuCl (9 mol %)
95 %, 94 % ee (*M-23*)

d) *Ha et al.* 2004

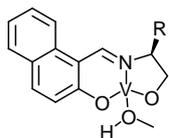
CuI (2.5 mol %)
81 %, 93 % ee (*M-23*)

e) *Kozlowski et al.* 2001

Abb. 20: Atropselektive katalytische Phenolkupplungen (oxidativ) mit Kupfer-Katalysatoren.³⁸ (Gezeigt werden aus den jeweiligen Studien die Systeme, die bei akzeptabler Ausbeute die besten Enantiomerenüberschüsse ergaben.)



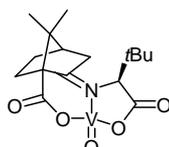
Vanadium-Katalysatoren:



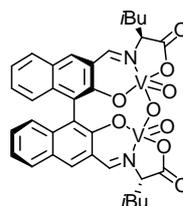
R = Bn, 2 mol %
82 %, 51 % ee (*M-9*)

a) *Uang et al.* 2001

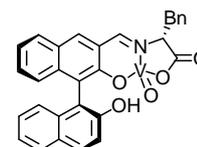
R = 2-Pr, 10 mol %
94 %, 62 % ee (*M-9*)

b) *Chen et al.* 2001

3 mol %
99 %, 84 % ee (*P-9*)

c) *Barhate u. Chen* 2002

10 mol %
93 %, 83 % ee (*M-9*)

d) *Gong et al.* 2002

5 mol %,
93 %, 54 % ee (*M-9*)

e) *Uang et al.* 2003

Abb. 21: Atropselektive 2-Naphtholkupplungen mit Vanadium-Katalysatoren.³⁹

Ewas aus dem Rahmen fallen BINOL-Synthesen über einen Ruthenium-Komplex,⁴⁰ eine mit TEMPO-beschichtete Anode in chiraler Umgebung,⁴¹ sowie eine Biotransformation mit *Camellia sinensis*-Zellen, die Peroxidasen exprimieren (Abb. 22).⁴²

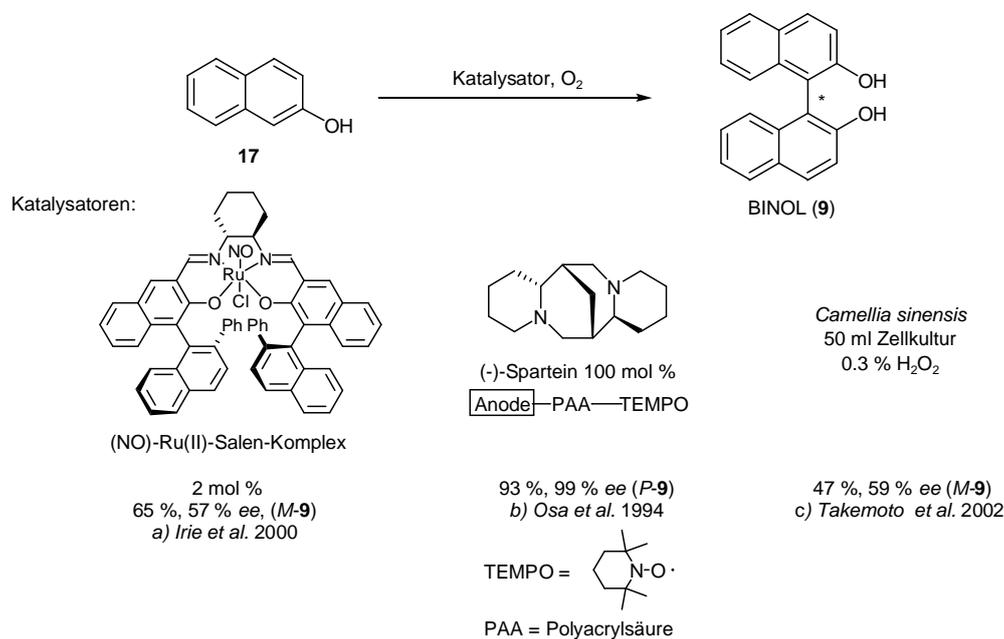


Abb. 22: Weitere stereoselektive BINOL-Synthesen: a) mit einem chiralen Ruthenium-Komplex,⁴⁰ b) elektrochemisch,⁴¹ c) durch Ganzzellbiotransformation.⁴²

Trotz dieser ersten Erfolge ist ein breit anwendbares katalytisches Verfahren zur asymmetrischen Biarylsynthese derzeit noch nicht in Sicht.

3.1.3.3 Enzymkatalysierte oxidative Phenolkupplungen

Auch mit isolierten Oxidoreduktasen lassen sich oxidative Phenolkupplungen gut durchführen und sind seit langem bekannt. Bereits 1896 berichtete BOURQUELOT über eine Dimerisierung von Eugenol mit oxidierenden Fermenten.⁴³

Während die Reaktion in lebenden Zellen (*in vivo*) oft mit hoher Regio- und Stereoselektivität abläuft, wurden bei Versuchen mit isolierten Enzymen (*in vitro*) bisher nur in wenigen Ausnahmefällen Selektivitäten beobachtet, die auf das Enzym zurückgeführt werden können (siehe dazu auch folgenden Abschnitt). Eine 1997 veröffentlichte, stereoselektive Kupplung von 2-Naphthol (**17**) mit Merrettich-Peroxidase⁴⁴ konnte nicht reproduziert werden.⁴⁵ In Abb. 23 sind einige unselektive Phenolkupplungen mit Laccasen⁴⁶ beziehungsweise einer Peroxidase,⁴⁷ die in neuerer Zeit veröffentlicht wurden, als Beispiele vorgestellt.

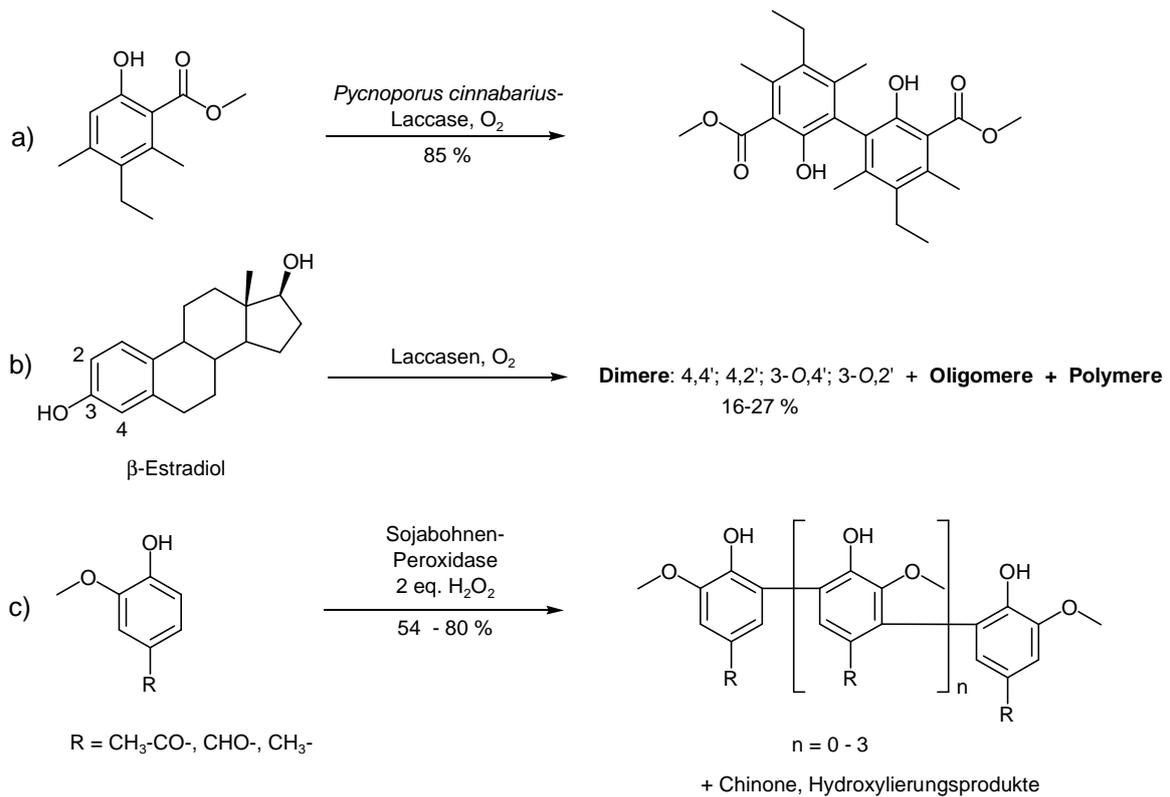


Abb. 23: Oxidative Phenolkupplungen, katalysiert durch Laccasen (a, b)⁴⁶ und Peroxidase (c).⁴⁷

3.2 Oxidative Phenolkupplungen in der Biosynthese

Eine kurze, allgemeine Übersicht zu diesem Themengebiet wurde vor kurzem von DROCHNER verfasst.²⁶ Aus diesem Grunde wird hier in erster Linie auf neuere Arbeiten eingegangen, in denen unter anderem auch ein molekulargenetischer Ansatz verfolgt wurde.

Angeregt von den Arbeiten von PUMMERER *et al.*²³ postulierten BARTON und COHEN 1957 einen radikalischen Phenolkupplungs-Mechanismus für die Biosynthese verschiedener biarylischer Naturstoffe, darunter Alkaloide (Morphin (**25**)), Dibenzofurane, biarylische Lactone und Chinone sowie Lignane.⁴⁸ Sie schufen damit die theoretische Grundlage zur Erforschung dieses Biosyntheseschritts.

Biosyntheseuntersuchungen können grundsätzlich auf drei Ebenen erfolgen:

1. *Auf metabolischer Ebene durch Verimpfungsexperimente am lebenden Organismus (in vivo):* Ein isotope markiertes, monomeres Substrat wird an den Organismus verimpft. Nach Extraktion und Aufreinigung werden im positiven Fall isotope angereicherte Kupplungsprodukte isoliert. Solche Verimpfungsexperimente erlauben auch in komplexen

biologischen Systemen einen schlüssigen Nachweis von Biosyntheseschritten wie der oxidativen Phenolkupplung. Allerdings werden nur wenige Informationen über die beteiligten Enzyme erhalten.

2. *Auf Proteinebene (in vitro)*. Aus dem Organismus werden Enzyme isoliert, die phenolische Substrate zu dem dimeren Naturstoff kuppeln. Da zahlreiche Oxidasen in der Lage sind Phenole zu oxidieren, ist dieser Ansatz nur dann beweiskräftig, wenn die Reaktion substratspezifisch ist oder selektiv zum Produkt führt. In Abb. 24 sind einige pflanzliche Naturstoffe gezeigt, bei denen es gelungen ist, die für einen oxidativen Phenolkupplungsschritt in der Biosynthese verantwortlichen Enzyme zu isolieren. Die Oxidasen, meist P-450 Enzyme, sind oft in hohem Maße substratspezifisch. Isolierte Enzyme erlauben nicht nur den Nachweis der Phenolkupplung sondern auch eine Charakterisierung der katalytischen Aktivität in Bezug auf Kinetik und Mechanismus.
3. *Auf DNA-Ebene*: Von einem Organismus werden Deletionsmutanten erzeugt, bei denen der oxidative Phenolkupplungsschritt unterbunden ist. Gelingt es durch homologe Transformation mit DNA-Sequenzen aus Genbanken die Deletionsmutante zu komplementieren, kann das entsprechende Gen charakterisiert werden. Alternativ dazu können DNA-Sequenzen des zu untersuchenden Organismus auch heterolog in einen geeigneten, biosynthetisch nicht aktiven Wirtstamm transformiert werden. Die Transformanten werden anschließend gezielt auf Phenolkupplungsaktivität untersucht. Sind die Gene einmal bekannt, kann deren Überexpression in einem geeigneten Wirtsorganismus versucht werden, wodurch enzymologische Untersuchungen erheblich erleichtert werden. Auch Modifikationen durch gerichtete Mutagenese sind möglich.

Zur vollständigen Charakterisierung der enzymatischen Aktivität erscheint ein kombinierter Ansatz auf allen drei Ebenen erfolgversprechend. Gerade die moderne Molekulargenetik hat sich bei der Erforschung von Biosynthesen als wirkungsvolles Werkzeug erwiesen. Im folgenden werden einige dieser kombinierten Ansätze bei der Untersuchung der Biosynthese von Phenolkupplungsprodukten vorgestellt, auch wenn noch nicht in allen Fällen die Aktivität zur Phenolkupplung bekannt ist.

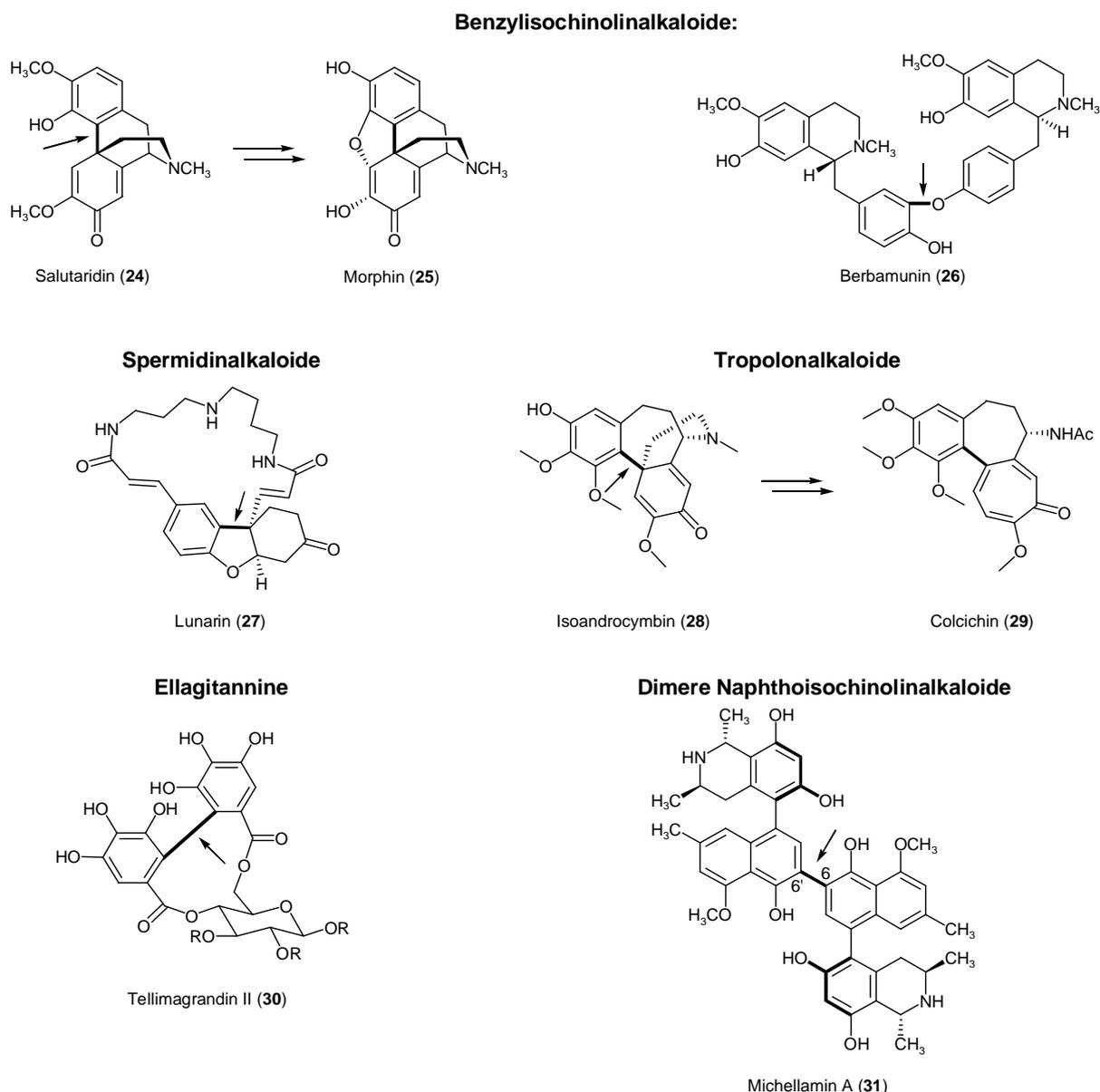


Abb. 24: Pflanzliche Naturstoffe, für deren Biosynthese eine oxidative Phenolkupplung über enzymologische Untersuchungen nachgewiesen ist.⁴⁹ Die Oxidationen werden durch P-450 Enzyme, im Fall von Michellamin (31) durch eine Peroxidase, katalysiert. Die nachweislich durch Phenolkupplung entstandenen Bindungen sind mit einem Pfeil markiert.

Geodin

1985 gelang es SANKAWA *et al.* zum ersten Mal mit einem isolierten Enzym eine intramolekulare oxidative Phenolkupplung regio- und stereoselektiv durchzuführen.⁵⁰ Die Dihydrogeodin-Oxidase (DHGO), ein mit Laccasen verwandtes Enzym, katalysiert die Kupplung von Dehydrogeodin (32) zum Geodin (33) in *Aspergillus terreus*.

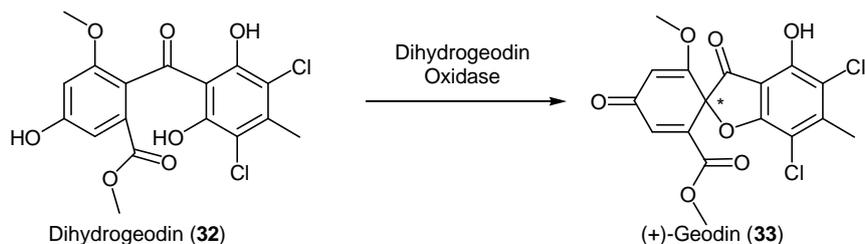


Abb. 25: Regio- und stereoselektive, intramolekulare oxidative Phenolkupplung von Dihydrogeodin (**32**) zu (+)-Geodin (**33**) in *Aspergillus terreus*.^{50, 51}

Durch Screenen einer c-DNA-Genbank von *A. terreus* mit DHGO-Antikörpern konnte das entsprechende Gen identifiziert und in *A. nidulans* heterolog expremiert werden.⁵¹

*Actinorhodin*⁵²

Bereits Anfang der 1980er Jahre untersuchten HOPWOOD *et al.* die Biosynthese des dimeren polyketidischen Naturstoffs Actinorhodin (**34**). Durch Komplementierung von Deletionsmutanten konnten die für die Biosynthese verantwortlichen Gene identifiziert und anschließend auch sequenziert werden.⁵³ Es stellte sich heraus, dass die Gene als "Biosynthesecluster", das heißt zusammen an einer Stelle des Genoms, lokalisiert sind. Trotz der gründlichen Untersuchung der Biosynthese des Polyketids – es handelt sich nach heutiger Klassifizierung um eine iterative Polyketidsynthese vom Typ II⁵⁴ – konnte die enzymatische Aktivität, die den Phenolkupplungsschritt katalysiert, bisher nicht identifiziert werden. Durch Deletion der Oxidoreduktase *ActVB* oder des ORF 5 von *ActVA* konnten die letzten beiden Schritte der Biosynthese von Actinorhodin (**34**), die Hydroxylierung und oxidative Phenolkupplung von Dihydrokalafungin (**35**), unterbunden werden. Stattdessen kam es zu einer Anreicherung von **35**.⁵⁵

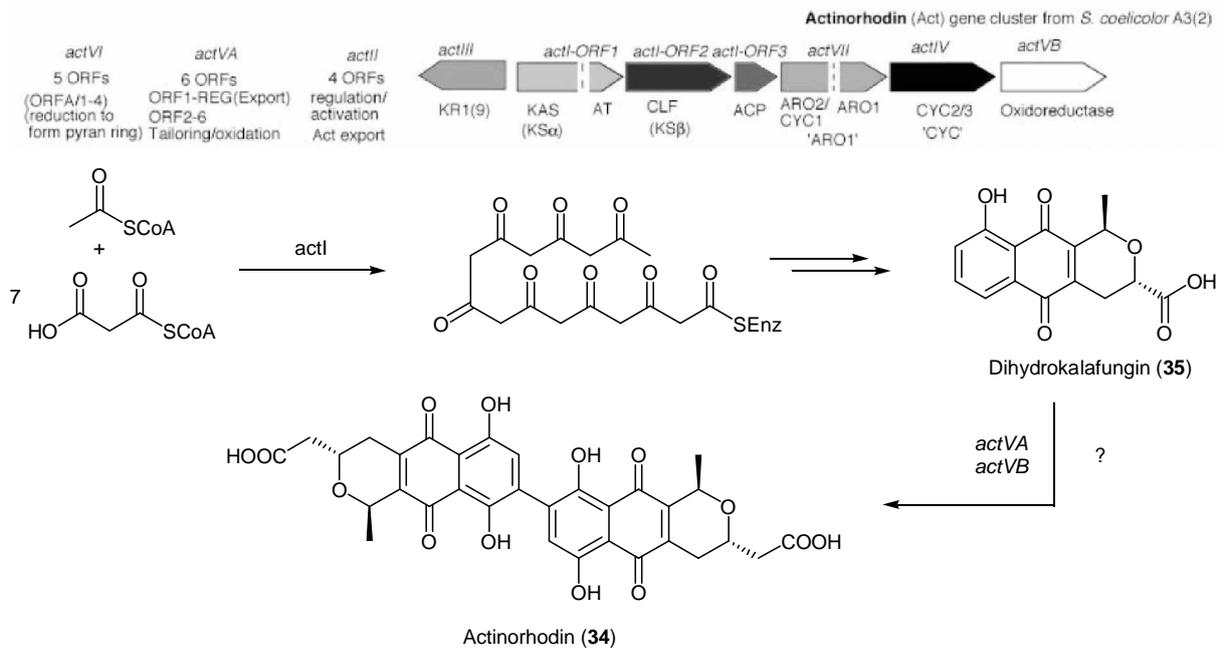


Abb. 26: Die Biosynthese von Actinorhodin (**34**) wird durch zwei Oxidationsschritte, die Hydroxylierung und die oxidative Phenolkupplung von Dihydrokalafungin (**35**), abgeschlossen. Durch Deletion von *actVA*-ORF 5 oder *actVB* können diese unterbunden werden. Oben: Schematische Darstellung des Actinorhodin-Biosyntheseklusters (übernommen von RAWLINGS).^{52c}

Neuere Untersuchungen zeigen, dass es sich bei *actVA*-ORF 5 um eine Flavin-abhängige Monooxygenase handelt, während *actVB* eine Flavin-Reduktase codiert, die den Cofaktor für die Monooxygenase regeneriert.⁵⁶ Da das natürliche Substrat **35** nur schwer erhältlich sei, wurde für *in vitro*-Versuche zur Oxidation mit dem System *actVA-actVB* Anthrachinon **36** eingesetzt. Im Massenpektrum des Extrakts wurde bei Umsetzung mit **36** ein mögliches Hydroxylierungsprodukt erkennbar. Allerdings gibt es bei der Versuchsbeschreibung Unstimmigkeiten.⁵⁷

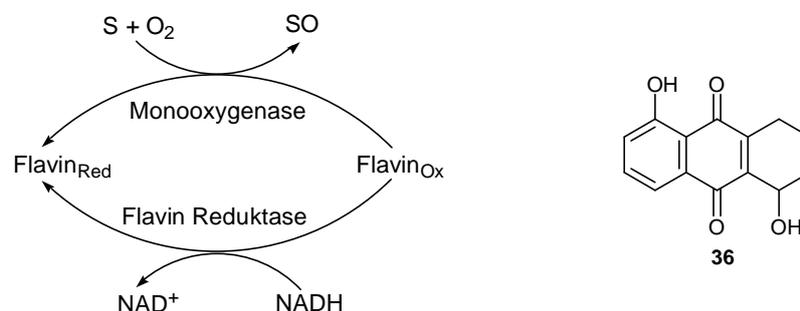
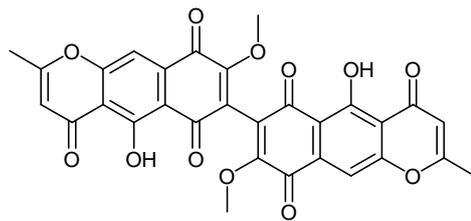
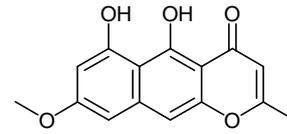


Abb. 27: Die Monooxidase *actVA*-ORF 5 ist zusammen mit der cofaktorregenerierenden Flavin-Reduktase *actVB* wahrscheinlich für die Oxidation von Dihydrokalafungin (**35**) verantwortlich.⁵⁶ (S = Substrat).

Aurofusarin

Aurofusarin (37)



Rubrofusarin (38)

Aurofusarin (37) ist ein biarylischer Sekundärmetabolit des für Getreide pathogenen Pilzes *Fusarium graminearum*. Der gold-gelbe Farbstoff gehört zur Substanzklasse der Naphthochinone und wird auf polyketidischem Weg synthetisiert. Soweit aus der Literatur bekannt, ist natürliches Aurofusarin (37) nicht optisch aktiv.⁵⁸ GIESE *et al.* identifizierten den zugehörigen Biosynthesecluster durch Komplementierung von Deletionsmutanten und führten eine Sequenzanalyse durch (Abb. 28).^{59, 60}

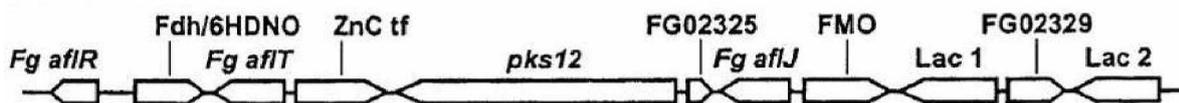


Abb. 28: Genkarte des Aurofusarin-Biosyntheseclusters. Fdh/6HDNO: FAD/FMN-abhängige Dehydrogenase / 6-Hydroxy-D-nicotin-Oxidase; ZnC tf: Transkriptionsfaktor; *pks*: Polyketidsynthase; FMO: Flavin Monoxygenase; Lac: Laccase; FG0232 / FG02329: hypothetische Gene; *Fg aflR*, *Fg aflT*, *Fg aflJ*; Homologien zu Aflatoxin-Regulator, -Efflux-Pumpe und -Co-Regulator.⁵⁹

Durch Sequenzvergleich wurden zwei Laccasen und eine Flavin-abhängige Monooxygenase innerhalb des Clusters identifiziert. Untersuchungen zur Funktion dieser Enzyme stehen noch aus. Unabhängig davon fanden KIM *et al.* ein Laccasegen (*Gip1*) in *Gibberella zeae*, einem teleomorphen⁶¹ Stamm zu *Fusarium graminearum*, das in die Biosynthese von Aurofusarin (37) involviert ist.⁶² Ein Sequenzvergleich mit dem Genom von *Fusarium graminearum* zeigte,⁶³ dass *Gip1* in der Nähe der auch von GIESE *et al.* identifizierten Polyketidsynthase *PKS12* lokalisiert ist.⁶⁰ Durch Deletion von *PKS12* konnte auch hier die Aurofusarinsynthese gestoppt werden. Da die Sequenz von *Gip1* bisher nicht veröffentlicht wurde, ist ein Vergleich mit den beiden von GIESE *et al.* gefundenen Laccasegenen nicht möglich.

Im HPLC-Assay des Wildstammes von *Gibberella zeae* wurde neben Aurofusarin (37) eine weitere Substanz identifiziert, die ebenfalls bei 360 nm absorbiert.⁶² Die Deletionsmutante Δ *PKS12* produzierte keine der beiden Substanzen. Bei der Deletionsmutante der Laccase Δ *Gip1* wurde hingegen der zweite Metabolit identifiziert, während Aurofusarin (37) auch hier nicht gefunden wurde. Leider wurde diese zweite Substanz nicht charakterisiert, so dass auch

nicht klar ist, ob es sich um ein Monomer - wie zum Beispiel das ebenfalls von *Fusarium graminearum* synthetisierte Rubrofusarin (**38**) - oder eine dimere Struktur handelt.

Pinoresinol

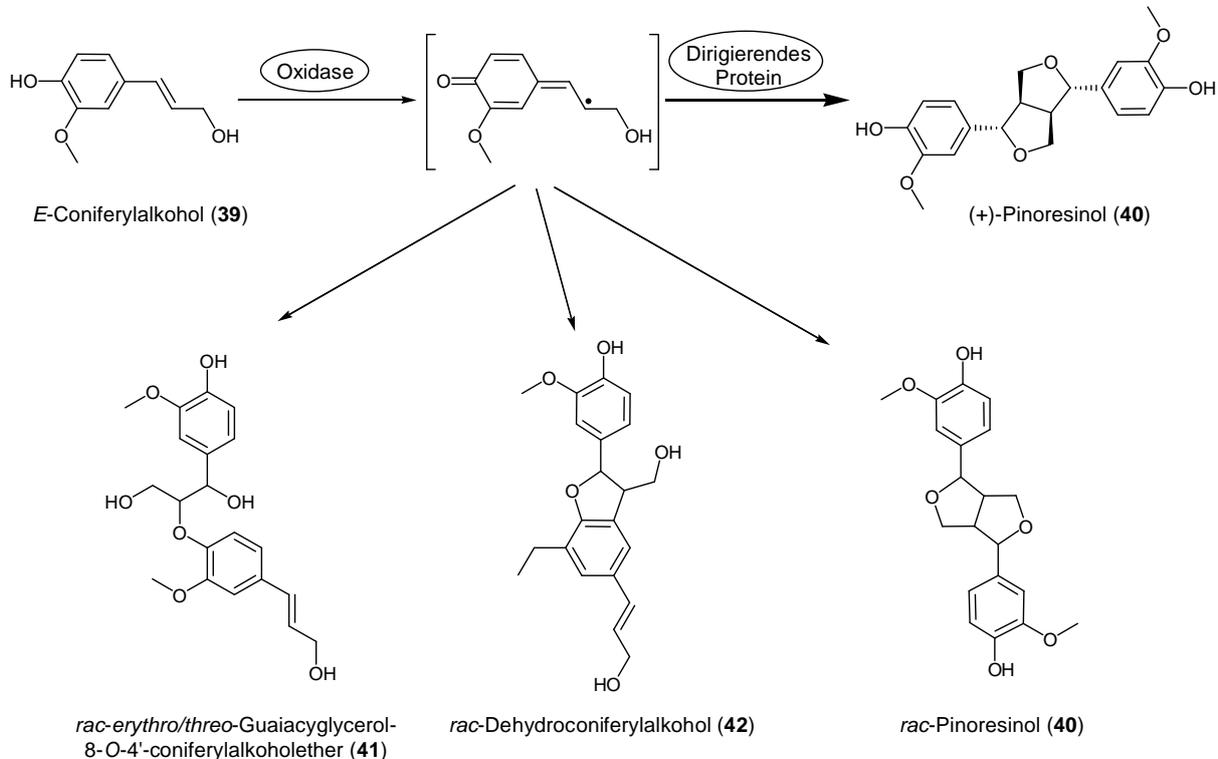


Abb. 29: *E*-Coniferylalcohol-Radikale können zu verschiedenen Produkten kuppeln. Bei Anwesenheit eines dirigierenden Proteins wird aber nur (+)-Pinoresinol (**40**) mit hoher Stereoselektivität gebildet.

Wird das Monolignol *E*-Coniferylalcohol (**39**) mit Oxidasen, die der Lignan-Biosynthese zugeordnet werden können, umgesetzt, entsteht über einen radikalischen Phenolkupplungsprozess ein Gemisch aus dimeren racemischen Lignanen **40-42** (Abb. 29). Diese Beobachtung führte schon früh zu der Annahme, dass die Biosynthese dieser Verbindungen über einen unselektiven Kupplungsschritt verläuft.⁶⁴ Allerdings konnte so nicht erklärt werden, wie das Lignan Pinoresinol (**40**) und andere mit hoher Regio- und Stereoselektivität erzeugt werden. LEWIS *et al.* gelang es durch Aufreinigung eines Rohextrakts aus *Forsythia suspensa* ein Protein zu isolieren, das zwar selber keine Oxidase-Aktivität zeigt, in dessen Anwesenheit aber enzymkatalysierte Oxidationen von *E*-Coniferylalcohol (**39**) mit hoher Selektivität zum (+)-Pinoresinol (**40**) führen.⁶⁵ Selbst bei Oxidation von **39** mit einem chemischen Oxidationsmittel (Ammoniumperoxodisulfat) wurde in Anwesenheit des Proteins die gleiche Selektivität beobachtet. Das das "Dirigierende Protein" codierende Gen konnte in einer cDNA-Genbank identifiziert und heterolog expremiert werden.⁶⁶ Über 50 weitere, zu dem Protein aus *Forsythia* homologe Sequenzen, konnten inzwischen in DNA- und elektronischen Genbanken

identifiziert werden.⁶⁷ Auffallend ist, dass sich die Funde auf höhere Pflanzen beschränken. Es ist davon auszugehen, dass Dirigierende Proteine dieser Form eine evolutive Besonderheit dieser Organismengruppe ist. Eine massenspektrometrische Untersuchung zeigte, dass es sich bei dem isolierten Protein um ein Homodimer von circa 50 kDa handelt.⁶⁸ Um mehr Informationen über den Mechanismus der stereoselektiven Pinoresinolsynthese zu erhalten, wurde die Katalyse mit dem Dirigierenden Protein kinetisch untersucht.⁶⁷ Dabei wurden folgende Beobachtungen gemacht:

1. Die Bildungsgeschwindigkeit von Dimerisierungsprodukten ist praktisch unabhängig von der Konzentration an Dirigierendem Protein. Das Dirigierende Protein hat also keinen Einfluss auf die Entstehung von Radikalen. Es kommt zur Konkurrenz zwischen unselektiver und mit Dirigierendem Protein katalysierter Phenolkupplung.
2. Die Bindung von *E*-Coniferylalkohol (**39**) an Dirigierendes Protein ist sehr schwach ($K_D \approx 370 \mu\text{M}$). Es muss daher davon ausgegangen werden, dass nicht **39** selber, sondern dessen Radikale als Substrat dienen.

Es wurde ein Mechanismus wie in Abb. 30 dargestellt postuliert. Durch Modellierung wurden die Reaktionskonstanten ermittelt, wobei eine gute Übereinstimmung mit den Messwerten erreicht wurde.

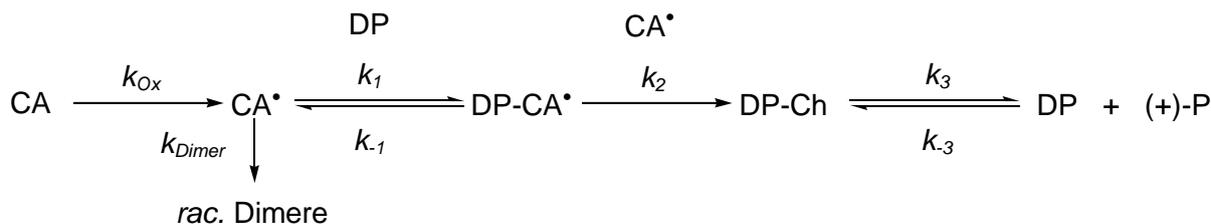
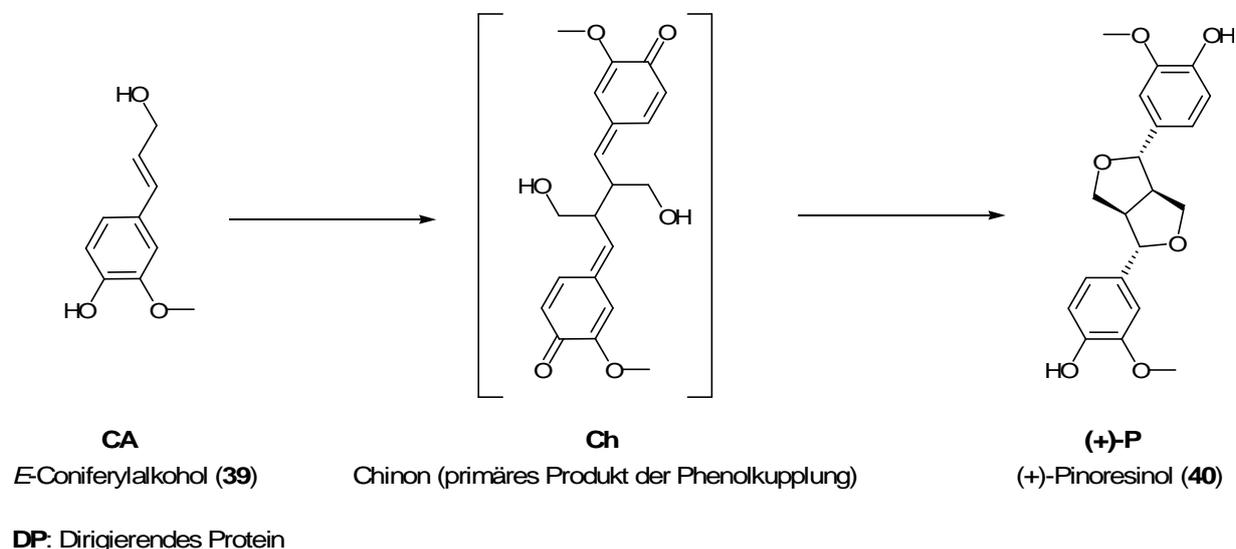


Abb. 30: Kinetisches Modell zur Biosynthese von (+)-Pinoresinol (**40**) unter dem Einfluss eines Dirigierenden Proteins. Geschwindigkeitskonstanten: $k_{Dimer} = 5.7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (gemessen); $k_1 \approx 1.7 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$; $k_2 \approx 2.1 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$; $k_3 \approx 0.27 \text{ s}^{-1}$ ($K_3 \sim 1.9$) (aus Modellierung).

Zunächst wird *E*-Coniferylalkohol (**CA**, **39**) durch Oxidation in das Radikal **CA**[•] überführt. Dieses kann sofort mit weiterem **CA** beziehungsweise **CA**[•] zu racemischen dimeren Lignanen reagieren oder an ein Dirigierendes Protein (**DP**) binden. Mit dem dadurch entstandenen Komplex (**DP-CA**[•]) reagiert ein weiteres *E*-Coniferylalkohol-Radikal (**CA**[•]). Durch Kupplung der Radikale entsteht zunächst ein dimeres Chinon (**Ch**), das noch an das dirigierende Protein gebunden ist (**DP-Ch**). Schließlich kommt es zur Umlagerung zu (+)-Pinoresinol ((+)-**P**, **40**) bei gleichzeitiger Dissoziation von dem Dirigierenden Protein. Dieser letzte Schritt verläuft sehr langsam ($k_3 \approx 0.27 \text{ s}^{-1}$) und erklärt die geringe Gesamtreaktionsrate mit $k_{kat} \approx 0.26 \text{ s}^{-1}$ pro Proteindimer.

Trotz dieser verschiedenen, vielversprechenden Forschungsansätze konnte aber bis heute nicht geklärt werden, wie in Organismen Biarylsynthesen, die über eine intermolekulare, stereoselektive oxidative Phenolkupplung verlaufen, katalysiert werden.

3.3 Metabolische Diversität durch oxidative Phenolkupplung

Oxidative Phenolkupplungen in der Biosynthese verlaufen häufig mit hoher Regio- und Stereoselektivität. Auffallend ist dabei, dass in unterschiedlichen biologischen Systemen auch die Selektivitäten unterschiedlich ausfallen. Von manchen biarylischen Sekundärmetaboliten wurden alle, beziehungsweise nahezu alle Regioisomere, die durch oxidative Phenolkupplung entstehen können, aus verschiedenen Organismen isoliert. Die biologischen Systeme können dabei nah verwandt sein, oder auch evolutiv weit voneinander entfernt liegen. Ein Beispiel ist das Torosachryson (**43**) mit seinen Kupplungsprodukten (Abb. 31). Aus den Wurzeln und Sämlingen der Pflanze *Cassia torosa* konnte das 7,10'-dimere Phlegmacin (**45**) isoliert werden.⁶⁹ In den Wurzeln wurde außerdem Sinqueanol I (**46**;10,10') gefunden,⁷⁰ während in den Blüten Torosaol III (**48**; 5,7') produziert wird.⁷¹ Andererseits konnten dimere Präanthraquinone wie Phlegmacin (**45**), Atrovirin (**49**) und Flavomannin (**50**) auch aus Ständerpilzen der Gattungen *Cortinarius*, *Dermocybe* und *Tricholoma* isoliert werden.⁷² *Cortinarius odorifer* produziert die Enantiomere der aus *Cassia torosa* isolierten Phlegmacine (*Cortinarius*: (*P,R,R*)-**45** und (*M,R,R*)-**45**; *Cassia*: (*P,S,S*)-**45** und (*M,S,S*)-**45**). Für die Biosynthese von Phlegmacin (**45**) in *Cortinarius odorifer* konnte eine stereospezifische oxidative Phenolkupplung nachgewiesen werden. Von ¹³C-markiertem Torosachryson (**43**),

das an Fruchtkörper des Pilzes verimpft wurde, wurde nur das (*R*)-Enantiomer in Phlegmacin (**45**) inkorporiert.⁷²

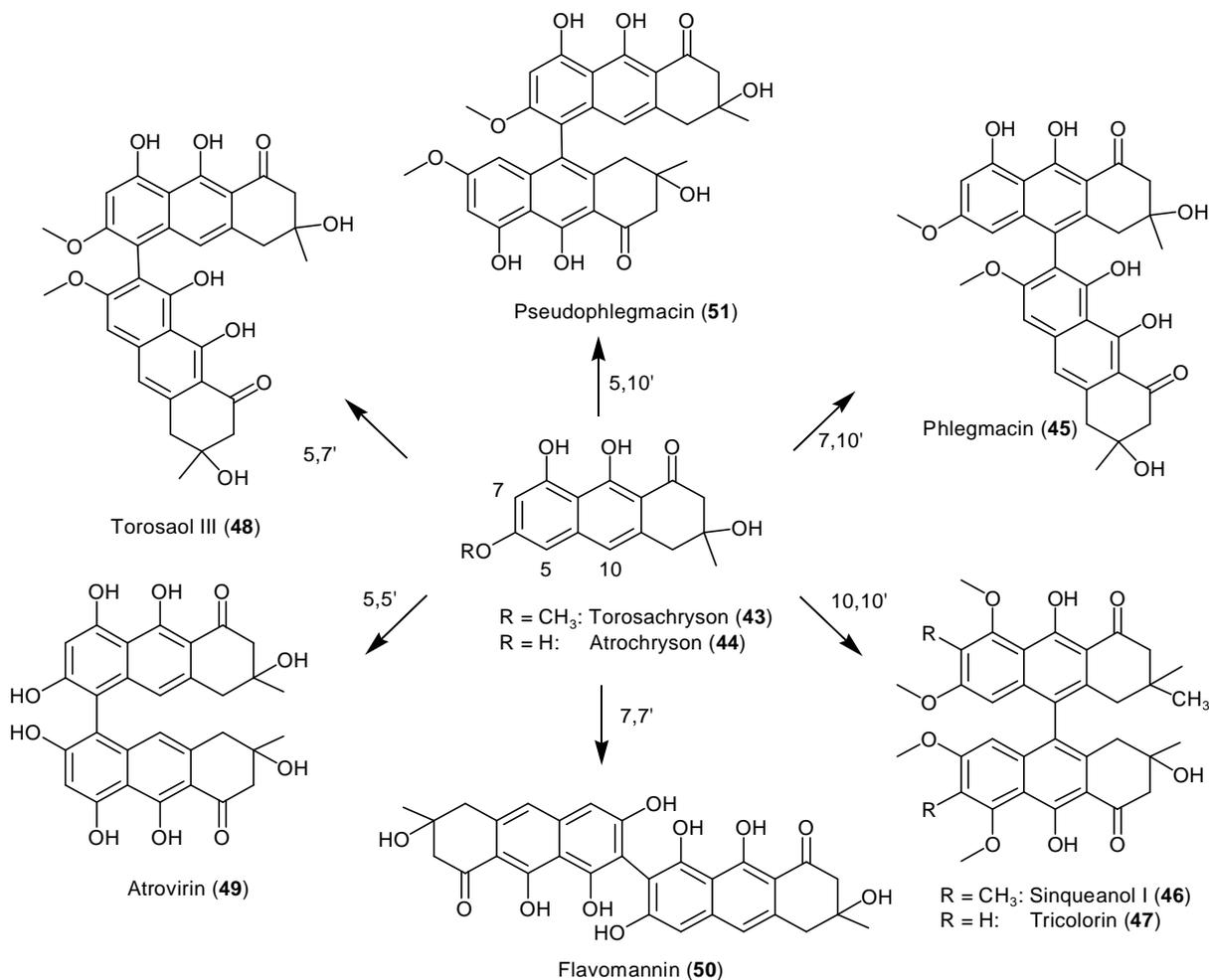


Abb. 31: Torosachryson (**43**) und Kupplungsprodukte werden sowohl von höheren Pflanzen als auch von Ständerpilzen synthetisiert.

Ein weiteres Beispiel ist das System des Cumarins Siderin (**1**) und seiner Kupplungsprodukte, das auf Seite 34 im speziellen Teil vorgestellt wird. Die Funde von regioisomeren Bisiderinen beschränken sich bisher auf filamentöse Pilze der Gattung *Aspergillus* und deren Teleomorphe,⁶¹ also nah verwandte Arten.

Auch von dem Dihydronaphthopyranon *semi*-Vioxanthin (**52**) sind strukturell nah verwandte Kupplungsprodukte als Sekundärmetabolite in verschiedenen Organismen bekannt (Abb. 32). Die oxidative Phenolkupplung zu dem 8,8'-dimeren Vioxanthin (**53**) in *Penicillium citreoviride* wurde durch Verimpfung von ¹³C-markiertem (*pro*)-*semi*-Vioxanthin (**54**) bewiesen.⁷³ Anders als bei der Phlegmacin-Biosynthese wurden hier beide Enantiomere des Substrats (**54**) inkorporiert, so dass auch Stereoisomere des natürlichen (*P,R,R*)-Vioxanthins (**53**) erhalten wurden, nämlich (*P,R,S*)-**53** und (*P,S,S*)-**53**.

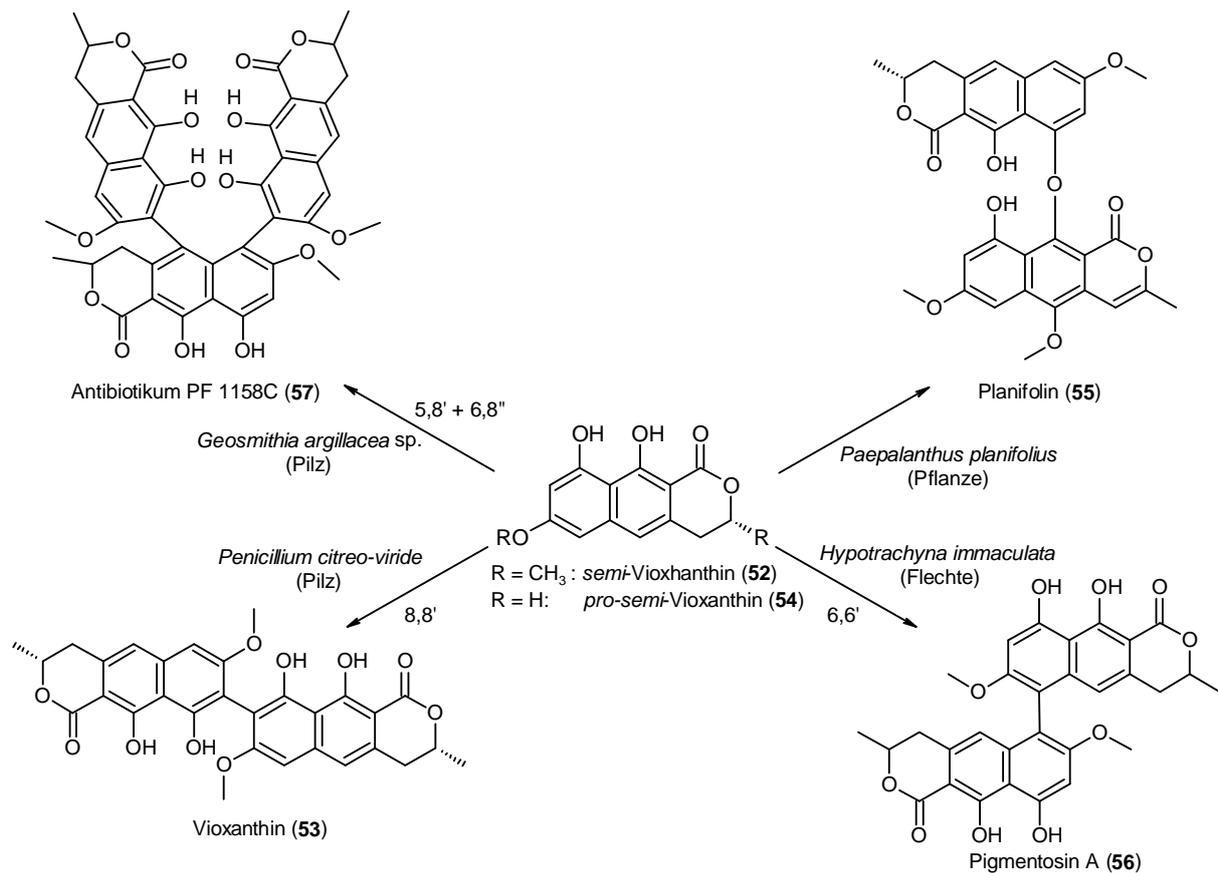


Abb. 32: Kupplungsprodukte des *semi-Vioxanthins* (52) werden in Pflanzen, Flechten und Pilzen gefunden.

Über die evolutiven Ursachen, die zu dieser ausgeprägten Diversität bei biarylischen Naturstoffen geführt haben, kann, wie bei vielen anderen Sekundärmetaboliten auch, nur spekuliert werden, da über die physiologischen Bedeutungen der Verbindungen zu wenig bekannt ist.⁷⁴ Der biosynthetische Schritt der oxidativen Phenolkupplung bietet jedenfalls eine Fülle von Möglichkeiten zur Untersuchung der Entstehung metabolischer Diversität.

Sollte es gelingen, die selektive oxidative Phenolkupplung zu Biarylverbindungen in einzelnen Organismen aufzuklären, dürfte es sowohl aus chemisch-synthetischer als auch aus evolutiver Sicht hochinteressant sein, Systeme mit unterschiedlichen Regio- und Stereoselektivitäten vergleichend zu untersuchen.

4 Spezieller Teil

4.1 Einleitung

Ziel des Projektes ist es ein Enzym beziehungsweise ein enzymatisches System zu identifizieren und zu charakterisieren, das eine regio- und stereoselektive oxidative Phenolkupplung katalysiert. Als Modellsystem wurde dazu das Cumarin Siderin (**1**) mit seinen Kupplungsprodukten gewählt, die von verschiedenen filamentösen Pilzen der Gattung *Aspergillus* mit unterschiedlichen Regio- und Stereoselektivitäten produziert werden. Der Schwerpunkt der Arbeiten wurde auf *Aspergillus niger* gelegt, einen Pilz der sich leicht kultivieren läßt und häufig für molekulargenetische Arbeiten und biotechnologische Anwendungen verwendet wird.⁷⁵ Die Vorgehensweise zur Identifizierung der gesuchten enzymatischen Aktivität ist zweistufig. Zunächst muss durch Verimpfungsexperimente mit ¹³C-markierten monomeren Cumarinen die oxidative Phenolkupplung in *A. niger* nachgewiesen werden. Erst wenn dieser Biosyntheseschritt eindeutig belegt ist, soll über einen molekulargenetischen Ansatz in Kombination mit Screening-Methoden mit der eigentlichen Suche nach der zugehörigen enzymatischen Einheit begonnen werden.

In dieser Arbeit sollen die methodischen Grundlagen, die die Identifizierung des enzymatischen Systems ermöglichen, geschaffen werden. Sie lässt sich in vier verschiedene, aufeinander aufbauende Themenbereiche unterteilen. Durch *chemische Synthese* sollen einerseits ¹³C-markierte monomere Cumarine für Verimpfungsexperimente und andererseits die monomeren und dimeren Naturstoffe als Referenzverbindungen hergestellt werden. Mit diesen sind *analytische Verfahren* zu etablieren, wobei die Analyse von Pilzrohextrakten mit HPLC-Technik eine zentrale Rolle spielen soll. Mit diesen Methoden können dann *Untersuchungen zur Cumarinbiosynthese in Aspergillen* durchgeführt werden. Gelingt der Nachweis der oxidativen Phenolkupplung kann mit *molekularbiologischen Arbeiten* zur Identifizierung des gesuchten Enzymsystems begonnen werden.

Im Folgenden wird die Aufgabenstellung der vier Arbeitsgebiete kurz umrissen. Kurze Zusammenfassungen der erzielten Ergebnisse befinden sich jeweils am Anfang der entsprechenden Unterkapitel.

Chemische Synthesen

Für den Aufbau eines analytischen Assays für Pilzextrakte werden Siderin (**1**) und seine Kupplungsprodukte, besonders Kotanin (**2**), Isokotanin A (**7**) und Desertorin C (**8**) als

Referenzverbindungen benötigt. Die chemischen Synthesen sollen möglichst effizient, einheitlich und flexibel sein. Zusätzlich werden für biologische Verimpfungsexperimente neben Siderin (**1**) auch dessen Desmethoxyderivate **58** - **60** in ^{13}C -markierter Form benötigt. Je nach Bedarf soll in weiteren Arbeiten sowohl ein Zugang zu den atropisomerenreinen Bicularinen, als auch zu den Derivaten Desmethylkotanin (**61**), Orlandin (**62**), Isokotanin B und C (**63** und **64**), sowie Desertorin B und A (**65** und **66**) ermöglicht werden.

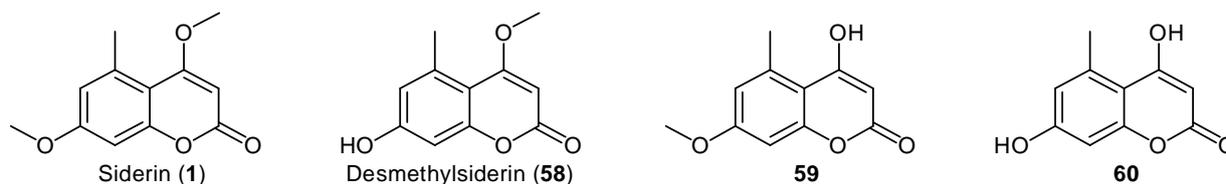


Abb. 33: Siderin (**1**) und Hydroxyderivate **58-60**. In Anlehnung an den Naturstoff Desmethylkotanin (**61**) wird das 7-Hydroxy-4-methoxycoumarin **58** hier "Desmethylsiderin" genannt.

Analytik

Für die geplanten Verimpfungsexperimente müssen Methoden zur Isolierung und Aufreinigung der Cumarine aus *A. niger* und anderen Aspergillen entwickelt werden. Bei der chromatographischen Aufreinigung ist zu beachten, dass unter Umständen sehr geringe Mengen an Bicularinen aus einem großen Überschuss verimpfter Monomere isoliert werden müssen. Unter den analytischen Verfahren kommen sensitiven Methoden zur Bestimmung von Chiralität wie CD-Spektroskopie und HPLC an chiraler Phase eine besondere Bedeutung zu, da die Stereoselektivität der Phenolkupplung auch bei sehr geringen Substanzmengen verifiziert werden soll.

Für eine effiziente Analyse von Pilzhextrakten sollen HPLC-Assays entwickelt werden, wobei natürliche und nicht natürliche, chemisch synthetisierte Cumarine als Referenzverbindungen verwendet werden sollen. Darüber hinaus soll ein Verfahren entwickelt werden, das die Untersuchung von Pilz-Genbanken mit mehreren tausend Stämmen ermöglicht.

Untersuchungen zur Cumarinbiosynthese in Aspergillen

Zunächst muss eine Kulturmethode für *A. niger* gefunden werden, bei der der Pilz in ausreichender und reproduzierbarer Menge Kotanin (**2**) beziehungsweise dessen Hydroxyderivate produziert. Anschließend soll über Verimpfungsexperimente mit ^{13}C -markierten, monomeren Cumarinen die oxidative Phenolkupplung nachgewiesen werden. Verlaufen diese Experimente positiv, ist zu ermitteln, welches monomere Coumarin unmittelbares Substrat des Phenolkupplungsschritts ist. Falls nötig kann versucht werden, die Phenolkupplung mit Pilzhextrakten beziehungsweise aufgereinigten Proteinen durchzuführen.⁷⁶ Für heterologe

Transformationen von *A. niger*-Genen werden Wirtsstämme benötigt, die *nicht* zu einer Phenolkupplung befähigt sind. Auch dies muss durch Verfütterungsexperimente verifiziert werden.

Molekularbiologische Arbeiten

Von *A. niger* soll eine Cosmid-Genbank erstellt werden, die das gesamte Genom repräsentiert. Zur Identifizierung der enzymatischen Aktivität können zwei Ansätze gewählt werden (Abb. 34).

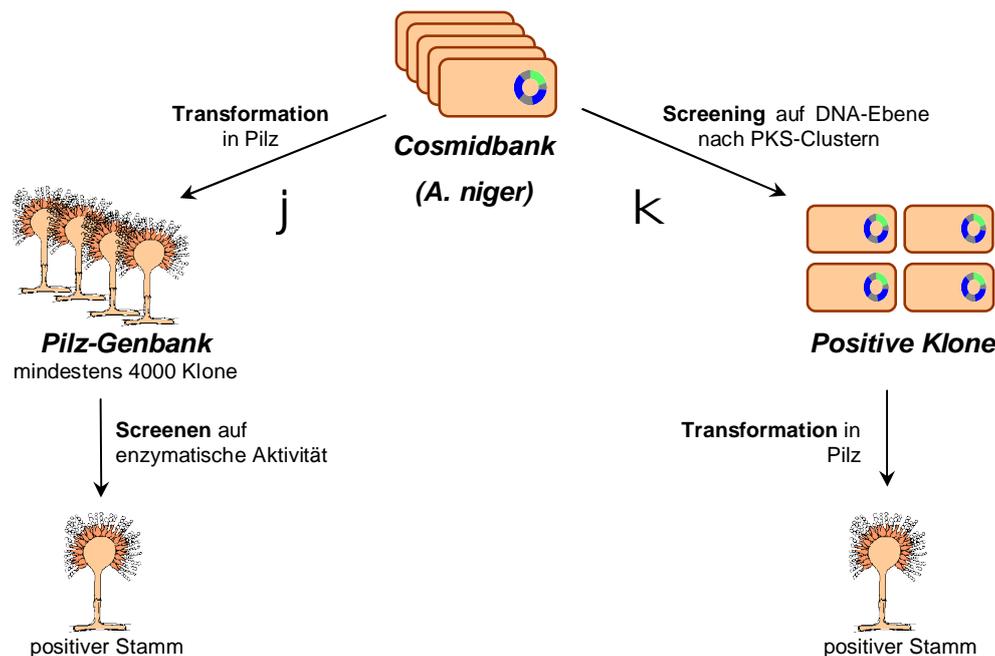


Abb. 34: Methoden zur Identifizierung der Phenolkupplungsaktivität über eine *A. niger*-Cosmidbank.

1. Die Cosmide der Genbank werden als Gesamtheit in einen geeigneten Wirtspilz transformiert, so dass eine pilzliche Genbank aus mehreren tausend Stämmen erhalten wird. Diese wird durch Verimpfungsexperimente auf biosynthetische Aktivität gescreent. Wird ein positiver Stamm gefunden, kann die Sequenz des Cosmids im Genom des Wirtspilzes identifiziert werden. Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass praktisch das gesamte Genom von *A. niger* getestet wird und somit die Gefahr, die gesuchte Aktivität zu "übersehen", gering ist. Nachteil ist der hohe technische und zeitliche Aufwand zur Durchführung des Screenings, insbesondere für die Erzeugung einer sehr großen Zahl von Transformanten.
2. Die Cosmide der Genbank werden auf DNA-Ebene auf Polyketid-Synthase (PKS)-Gene gescreent um Cumarin-Biosynthese-Cluster zu identifizieren. Die positiv getesteten Cosmide werden individuell in einen Wirtspilz transformiert und auf biosynthetische Aktivität getestet. Für das Gelingen dieses Ansatzes müssen zwei Voraussetzungen erfüllt

sein:

1. Die Cumarine müssen in ihrer Biosynthese einen polyketidischen Ursprung haben.
2. Im Genom des Pilzes liegen die Gene zur Synthese der Naturstoffe als "Cluster" gebündelt vor.

Wird die Phenolkupplung in einem transformierten Pilz nachgewiesen, kann das Gen direkt über das entsprechende Cosmid in *E. coli* isoliert werden. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Effizienz des Ansatzes. Nachteilig ist das erhöhte Risiko, das gesuchte Gen zu "übersehen", entweder weil der entsprechende Biosynthesecluster beim Screenen auf DNA-Ebene nicht identifiziert wurde, oder aber das Gen befindet sich gar nicht in einem solchen Cluster.

4.1.1 Das System Siderin, Kotanin, Isokotanin und Desertorin

Ein besonderes System unter den biarylischen Naturstoffen bilden das Siderin (**1**) und seine Dimerisierungsprodukte in filamentösen Pilzen der Gattung *Aspergillus* beziehungsweise deren Teleomorphe (Abb. 35). Auffallend ist, dass die verschiedenen Arten unterschiedlich verknüpfte Bicumarine jeweils mit hoher Regio- und Stereoselektivität erzeugen. Eine Ausnahme bildet lediglich *Petromyces alliaceus* (*Aspergillus alliaceus*), aus dem neben den Isokotaninen (**7**, **63** und **64**) auch Kotanin (**2**) und 7-*O*-Desmethyl-3,8'-bisiderin (**67**) in geringen Mengen isoliert wurden.

Auch wenn ein entsprechender Nachweis im Rahmen dieser Arbeit bisher nur für die 8,8'-verknüpften Bicumarine erbracht wurde, ist davon auszugehen, dass alle Bisiderine über oxidative Phenolkupplung *einer* monomeren Verbindung gebildet werden. Das System ist daher ein hervorragendes Beispiel für die Entstehung metabolischer Diversität. Es sollte möglich sein, neben den Atropselektivitäten auch die unterschiedlichen Regioselektivitäten bei der Biosynthese dieser Verbindungen vergleichend zu untersuchen.

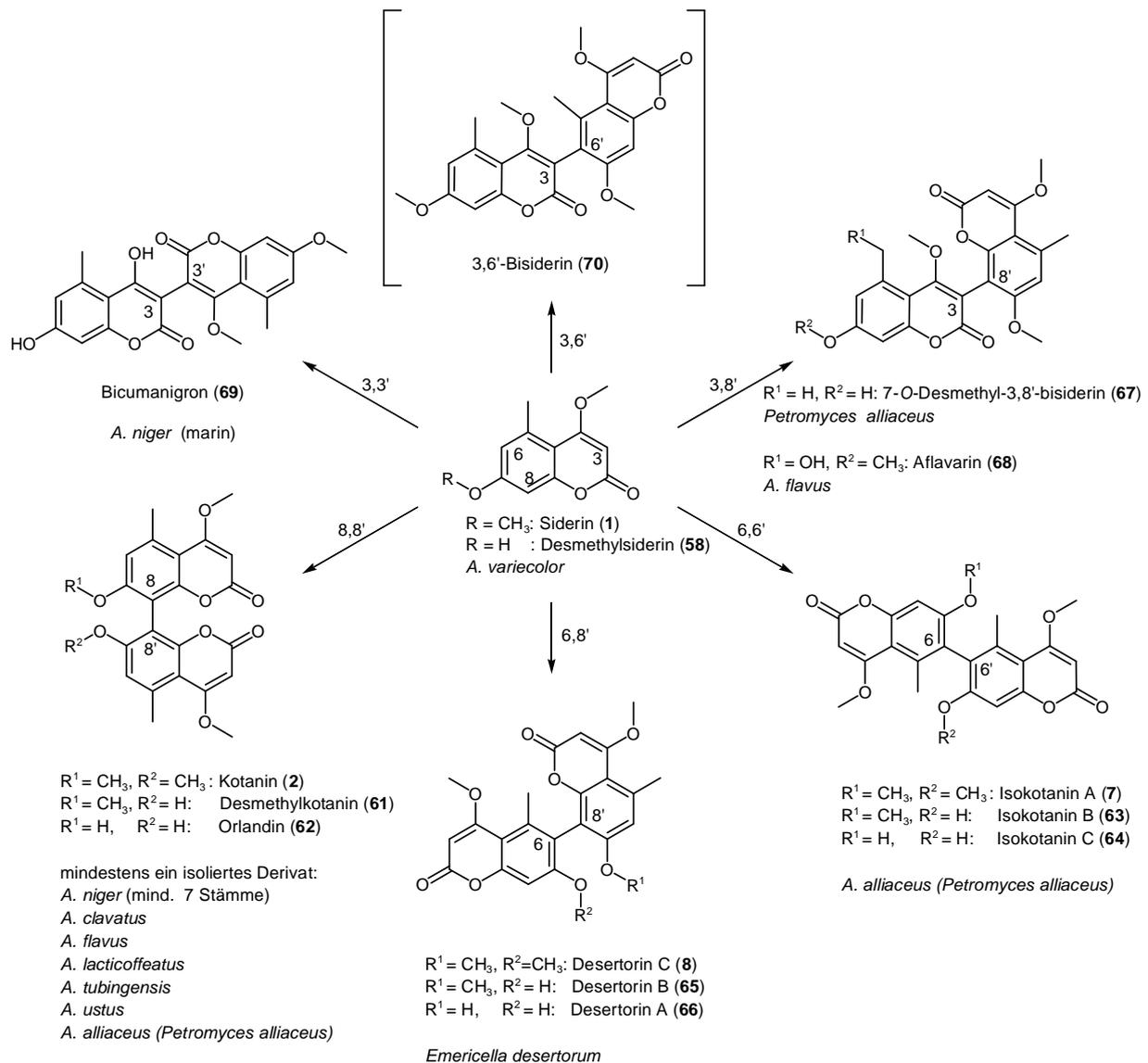


Abb. 35: Von Siderin (1) abgeleitete dimere Coumarine aus Aspergillen. Das von uns postulierte Dimer 3,6'-Bisiderin (70) wurde bisher noch nicht als Naturstoff nachgewiesen.

Aus chemischer Sicht ist die Biosynthese der konstitutiv unsymmetrischen Bicumarine wie Desertorin A-C (8, 65 und 66) oder Aflavarin (68) von besonderem Interesse, da hier die beiden an der Kupplung beteiligten Aromaten mit unterschiedlicher Regioselektivität reagieren. Sowohl konstitutionell als auch konfigurativ unsymmetrische Aromatenkupplungen sind in der chemischen Synthese aufwändig und meist nur auf intramolekularem Wege, durchführbar (vgl. Abb. 44).

Ein weiterer Vorteil von *Aspergillus* spp. ist, dass zumindest bei einigen Arten die Methoden zu Laborkultur und Molekulargenetik gut etabliert sind.

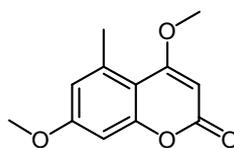
4.2 Chemische Synthesen

4.2.1 Zusammenfassung

Die Naturstoffe Siderin (**1**), Kotanin (**2**), Isokotanin A (**7**) und Desertorin C (**8**) wurden nach einem neuen einheitlichen und präparativ leicht durchführbaren Verfahren dargestellt. Von Kotanin (**2**) konnten beide Atropisomere in reiner Form dargestellt werden. Siderin (**1**) und seine Desmethylderivate **58** - **60** wurden in wenigen Schritten mit guten Ausbeuten erhalten. Dabei konnten nach Bedarf ^{13}C -Markierungen sowohl am Kohlenstoffgerüst (C-2) als auch an den Methoxygruppen eingefügt werden. Über einen neuartigen Demethylierungsschritt in ionischer Flüssigkeit konnte ein Zugang zu den natürlichen 7-Hydroxyderivaten der Bicularine aufgezeigt werden.

4.2.2 Übersicht über Synthesen der Cumarine in der Literatur

4.2.2.1 Siderin



Siderin (**1**)

In der Literatur werden drei Wege zur Darstellung von Siderin (**1**) beschrieben. Zwei davon basieren auf einer Friedel-Crafts Reaktion an Orcinol (**71**) mit anschließender Kondensation (Abb. 36, a⁷⁷ und b⁷⁸). Bei zweiten Verfahren (b) entsteht zunächst in einer Houben-Hoesch Synthese ein Cumarin-4-ketimid das erst mit Salzsäure zum 4,7-Dihydroxy-5-methylcumarin (**60**) hydrolysiert werden muss. Verfahren c) orientiert sich an der Kotaninsynthese von BÜCHL.^{79a} 2,4-Dimethoxy-6-methylacetophenon **72**⁸⁰ wird in *ortho*-Position zur Acetylgruppe demethyliert (**73**) und caboxyliert (**74**). **74** cyclisiert im Basischen zum 4-Hydroxycumarin **59** und wird anschließend zum Siderin (**1**) methyliert. Schließlich können 4-Hydroxycumarine auch über eine Tellurid-vermittelte, intramolekulare Reformatzki-Reaktion erzeugt werden (Abb. 36, d).⁸¹ Für die Synthese von Siderin (**1**) wurde dieses Verfahren noch nicht erprobt.

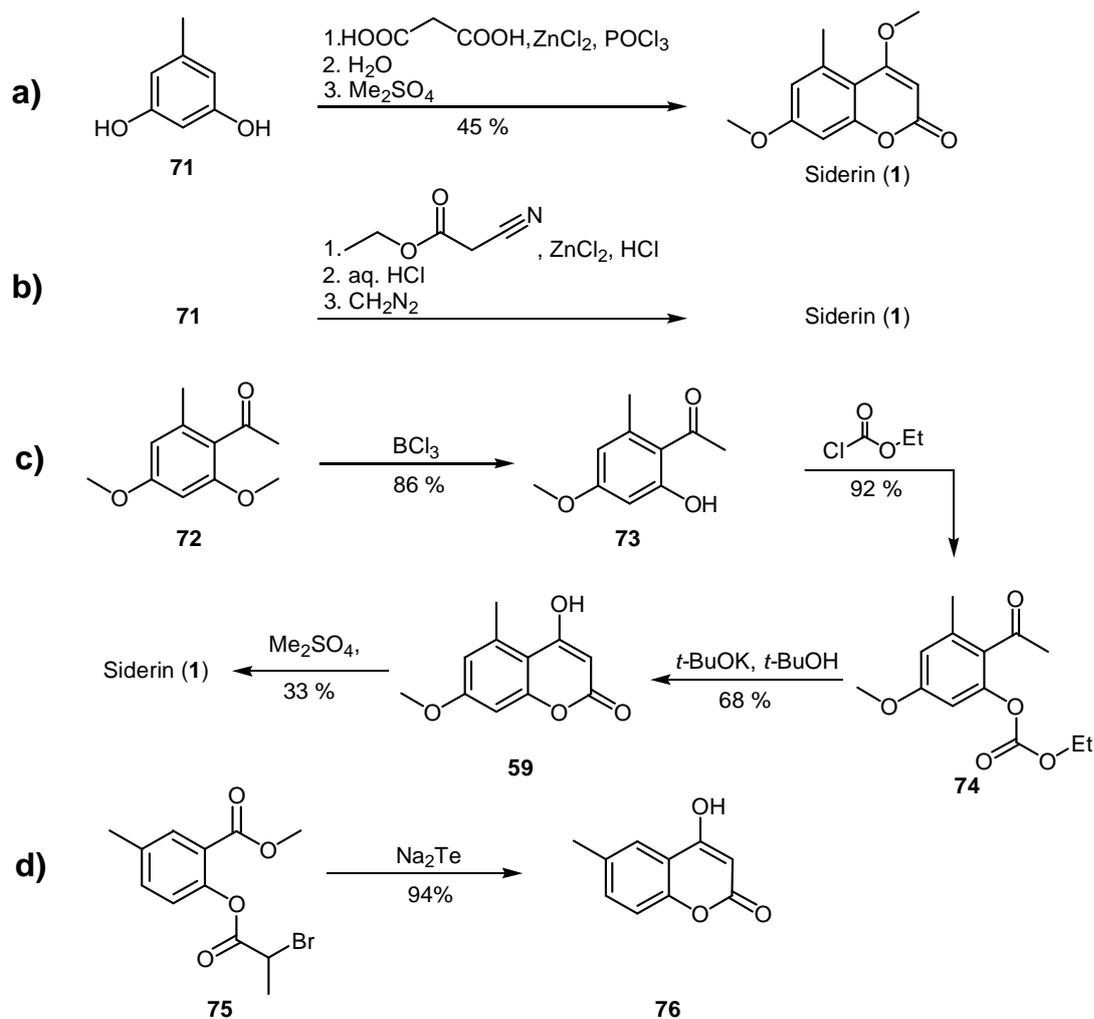
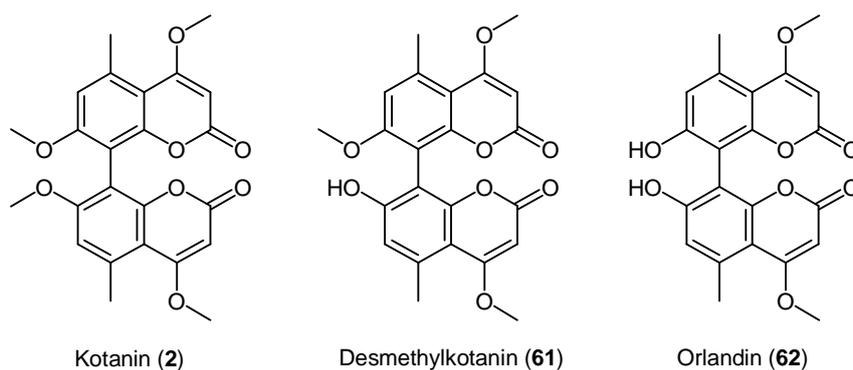


Abb. 36: Synthesewege für Siderin (1) und 4-Hydroxycumarin 76.^{77, 78, 80, 81}

4.2.2.2 Kotanin, Desmethylkotanin und Orlandin



Zur Synthese des racemischen Kotanins (2) nach BÜCHI *et al.*^{79a} wird von Orcinoldimethylether (77) ausgegangen, der regioselektiv in Position 2 lithiiert und anschließend oxidativ mit Kupfer(II)bromid zum Dimer 78 gekuppelt wird. 79 wird mit Essigsäureanhydrid und Titan-tetrachlorid acetyliert, wobei gleichzeitig die Methoxygruppen in *ortho*-Stellung zur Acetylgruppe demethyliert werden, so dass das Biphenol 79 entsteht. Der anschließende Aufbau des Lactonrings erfolgt wie bei der Siderinsynthese beschrieben (vgl. Abb. 36, c).

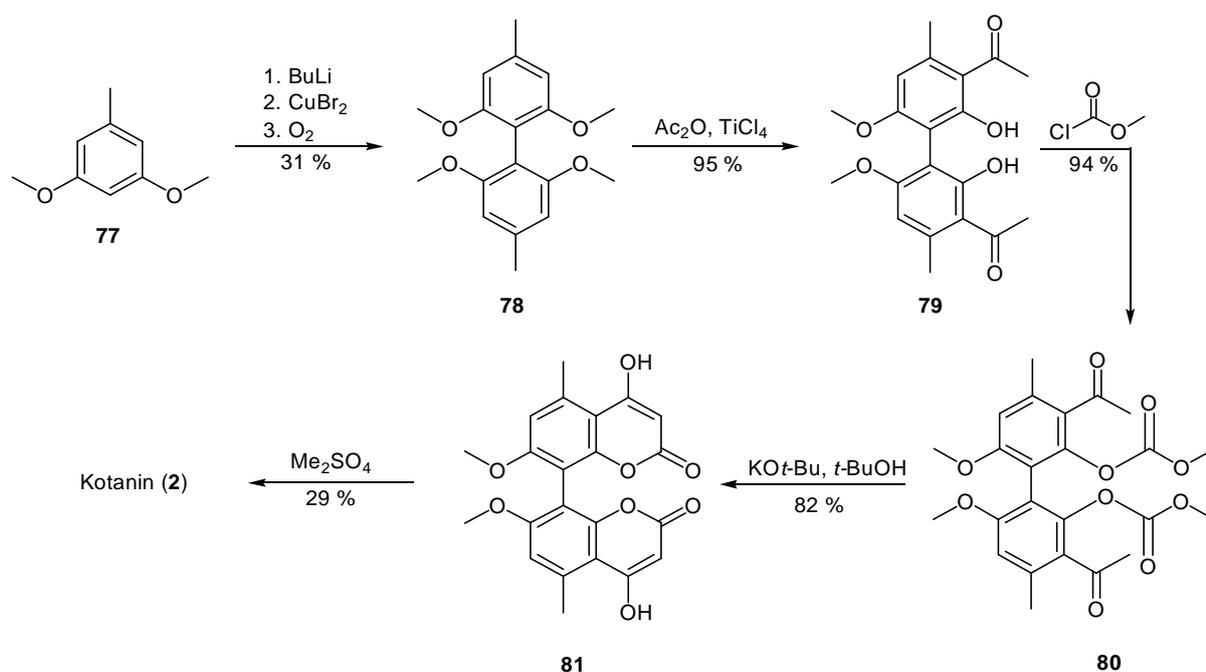


Abb. 37: Synthese des racemischen Kotanins (**2**) nach BÜCHI *et al.*^{79a}

Mittels der ersten atropselektiven Totalsynthese des natürlichen (+)-Kotanins (**2**) gelang es LIN und ZHONG, die absolute Konfiguration von **2** zu bestimmen (Abb. 38).⁸² Die wesentlichen Syntheseschritte sind dabei eine intramolekulare oxidative Phenolkupplung nach einem Verfahren von LIPSHUTZ³⁴ sowie eine Fries-Verschiebung zur Acetylierung des Biphenols **85**. Kommerziell erhältliche Ausgangsverbindungen sind das axial chirale 2,3-*O*-Isopropylidenthreit (**82**) sowie Orcinoldimethylether (**77**). Zunächst wird daraus Ether **83** aufgebaut. Dieser wird an den Aryleinheiten lithiiert und mit einem Kupfercyanid-TMEDA-Gemisch umgesetzt, wobei sich *in situ* ein Cyanocuprat höherer Ordnung bildet, das mit Sauerstoff intramolekular und stereoselektiv zum verbrückten Biaryl (*P*)-**84** kuppelt. Nach reduktivem Abbau der Threitbrücke und Acetylierung wird (*P*)-**85** erhalten. Durch Fries-Verschiebung der Acetylgruppen entsteht das dimere Acetophenon (*P*)-**79**, aus dem (*P*)-(+)-Kotanin (*P*)-**2** nach dem Verfahren von BÜCHI^{79a} aufgebaut wird (vgl. Abb. 37).

Der Enantiomerenüberschuss lag bei 82 % (¹H-NMR-Spektrum von *P*-**85**, (*S*)-Mosher-Ester an Stelle der Acetylgruppen). Durch Umkristallisation konnte die atropisomerenreine Verbindungen gewonnen werden. Die absolute Konfiguration der dargestellten Biaryle wurde anhand der Exciton-Couplings im CD-Spektrum des Acetophenons (*P*)-**79** bestimmt.

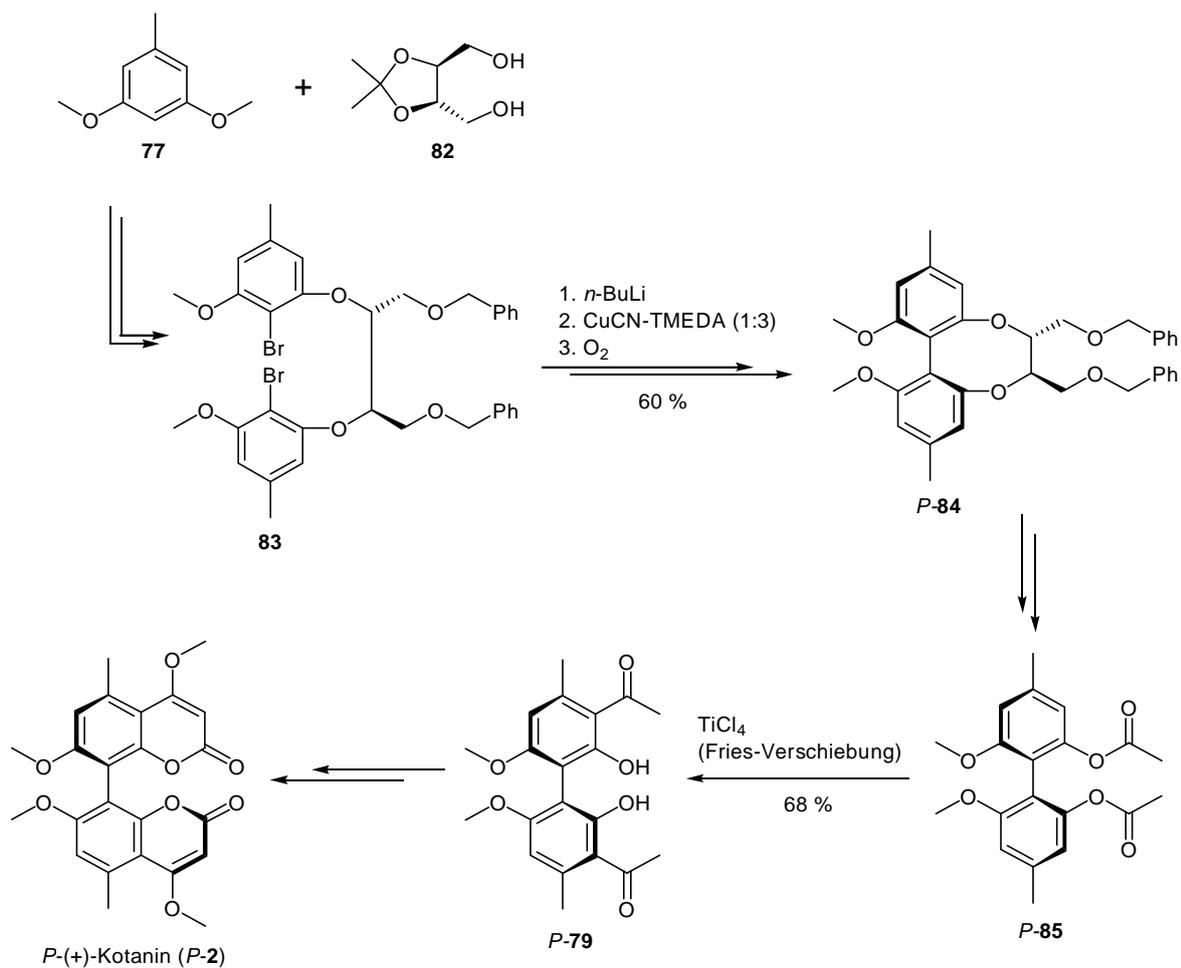
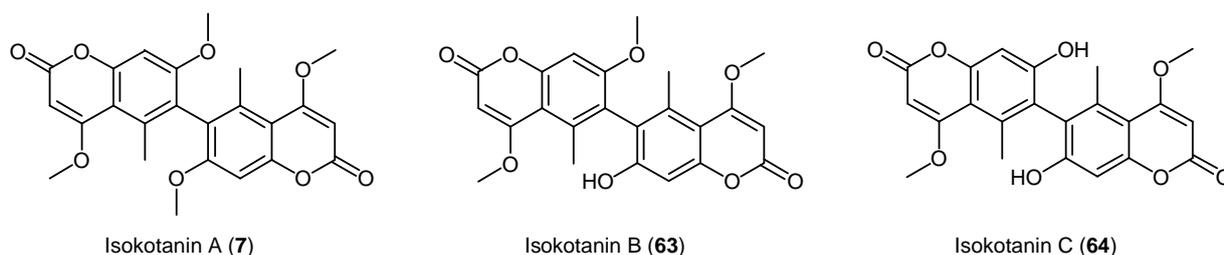


Abb. 38: Totalsynthese des *P*-(+)-Kotanins (*P*-2) nach LIN und ZHONG⁸²

4.2.2.3 Isokotanin A, Isokotanin B und Isokotanin C



Racemisches Isokotanin A (**7**) wurde erstmals 1996 von LIN und ZHONG auf chemischem Wege dargestellt.⁸³ Zunächst wird aus Orcinoldimethylether (**77**) das dimere Acetophenon **86** dargestellt, an dem dann die Lactonringe analog zur Kotaninsynthese nach BÜCHI aufgebaut wurden (vgl. Abb. 37).

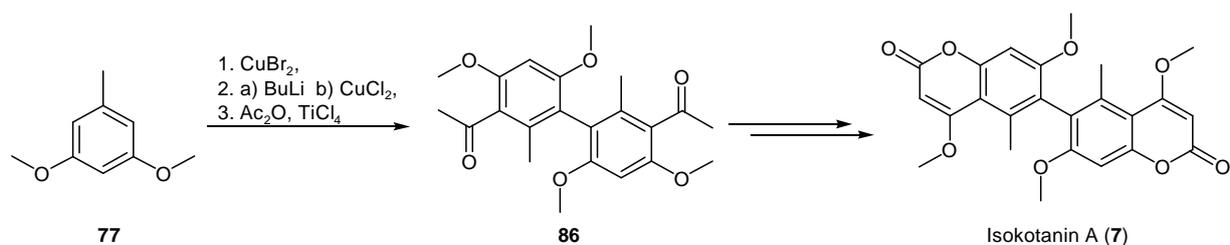


Abb. 39: Synthese des racemischen Isokotanin A (7) nach LIN und ZHONG.⁸³

Von denselben Autoren wurde 1996 die erste Totalsynthese des isomerenreinen (+)- und (-)-Isokotanin A (7) veröffentlicht.⁸⁴ Ausgehend von Oxazolin (*R*)-**88**, das in drei Stufen aus dem Ester **87** erhältlich ist, wird Biaryl (*M*)-**89** über eine atropselektive Ullmannkupplung nach MEYERS⁸⁵ dargestellt (**Abb. 40**). Eine Reduktion der durch Hydrolyse von (*M*)-**89** erhaltenen dimeren Benzoesäure führt zum Benzylalkohol (*M*)-**90**, der weiter zum dimeren Orcinol-dimethylether (*M*)-**91** umgesetzt wird. Aus (*M*)-**91** wird *M*-(+)-Isokotanin A (*M*-7) nach der Methode von BÜCHI (vgl. Abb. 37) aufgebaut. Das nicht natürliche (*P*)-Isomer von **7** ist über das (*S*)-Enantiomer von **88** erhältlich.

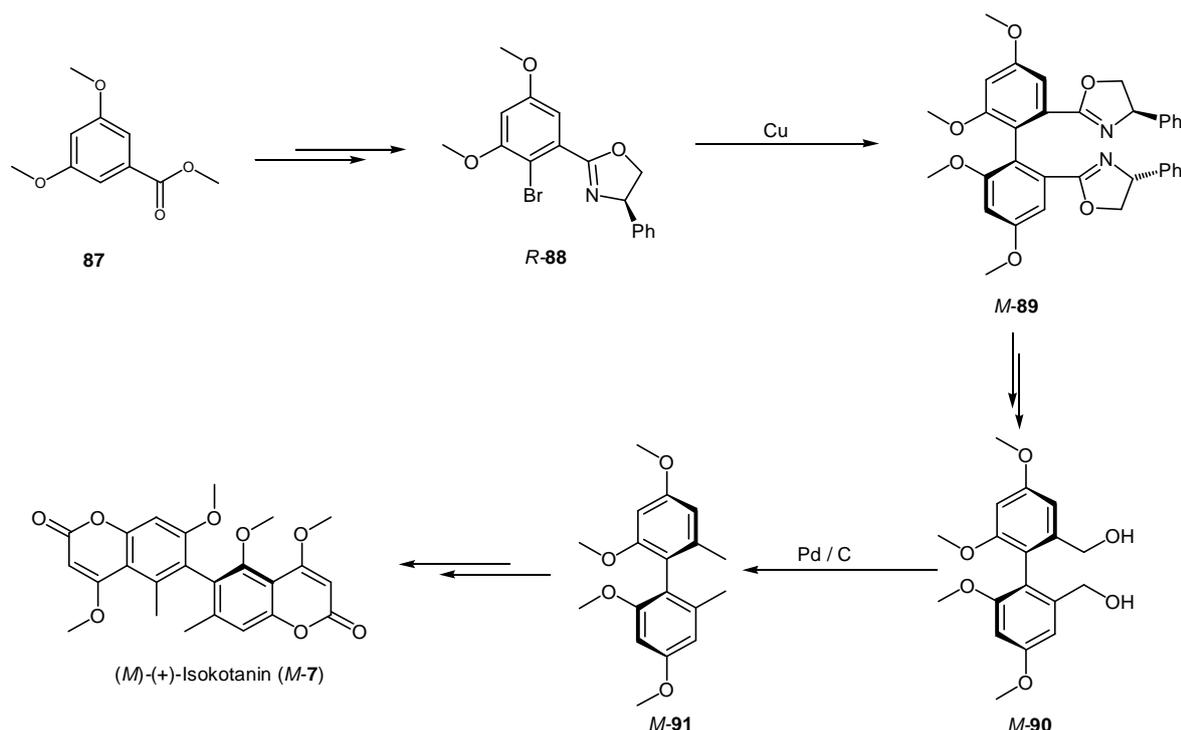


Abb. 40: Atropselektive Totalsynthese von (*M*)-Isokotanin A (*M*-7) nach LIN und ZHONG⁸⁴.

Die Bestimmung der Atropisomerenüberschüsse erfolgte anhand von ¹H-NMR-Spektren der entsprechenden (*S*)-Mosher-Ester von (*M*)-**90** und (*P*)-**90**. Sie lagen bei ee = 83 % für (*M*)-**90** und ee = 90 % für (*M*)-**90**. Die Isomerenreinen Verbindungen wurden durch Umkristallisation erhalten. Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde der dimere Orcinol-dimethylether (*M*)-**90** zum dimeren Orcinol demethyliert, dessen Drehwerte und zugehörige absolute Konfigurationen in der Literatur beschrieben sind.⁸⁶

Ein alternatives Verfahren zur Darstellung des atropisomerenreinen Bisorcinoldimethylethers **91** ist die von BRINGMANN etablierte Lactonmethode (Abb. 41).⁶ Dabei wird ein konfiguratив labiles Biaryllacton mit einem chiralen Reagenz atropselektiv gespalten. Da es zu einer dynamischen kinetischen Racematspaltung kommt, beträgt die maximale theoretische Ausbeute 100 %. Das für die Darstellung von Isokotanin A (**7**) relevante Lacton **93** kann durch eine palladiumkatalysierte intramolekulare Aromatenkupplung des Esters **92** dargestellt werden.^{87, 88} Die reduktive Spaltung von **93** mit einem chiralen Oxazaborolidin-Komplex [(*S*)-**94** bzw. (*R*)-**94**], sowie eine anschließende reduktive Abspaltung der benzyllischen Hydroxygruppe und Methylierung der Phenolfunktion führen zum isomerenreinen Orcinoldimethylether-Dimer (*M*)-**91** beziehungsweise (*P*)-**91**.

Alternativ dazu ist **91** auch durch selektive reduktive Spaltung eines Atropisomers des siebengliedrigen racemischen Lactons **97** mit den gleichen Oxazaborolidin-Komplexen möglich.^{6, 89} Da **97** konformativ fixiert ist, kommt es nicht zu einer *dynamischen* kinetischen Racematspaltung, so dass die maximale theoretische Ausbeute nur 50 % beträgt. Das zurückbleibende Atropisomer kann in einem separaten Arbeitsschritt thermisch racemisiert werden.⁸⁸ Die weitere Umsetzung von **91** zum Isokotanin (**7**) erfolgt wie beim racemischen Isokotanin (**7**) (vergl. Abb. 39 und Abb. 37).

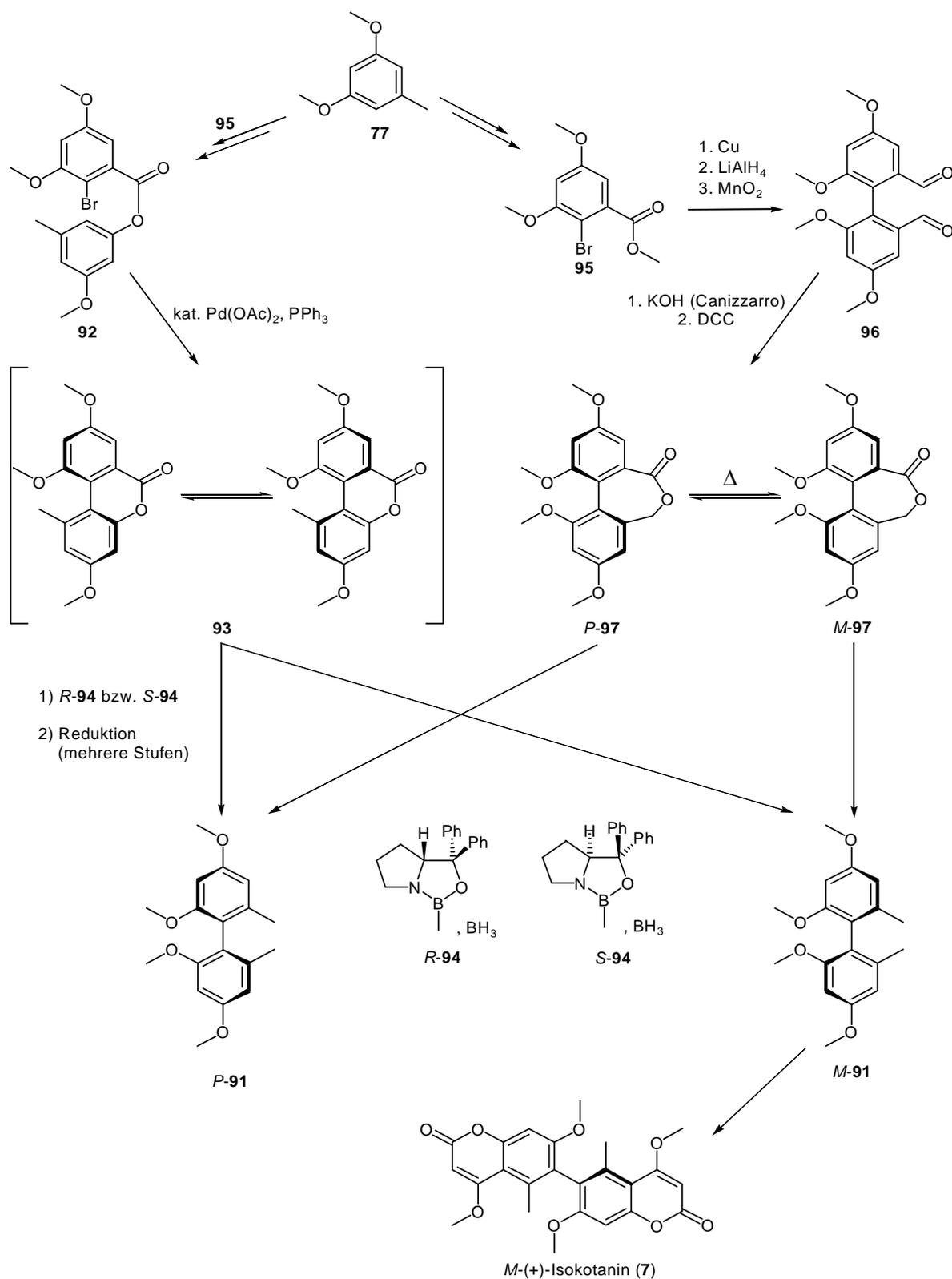
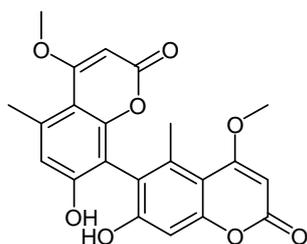
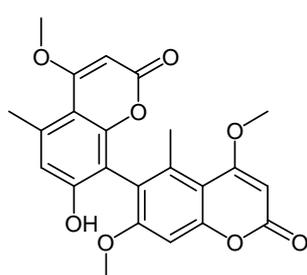


Abb. 41: Darstellung von atropisomerenreinem Isokotantin A (**7**) nach BRINGMANN *et al.*⁸⁸

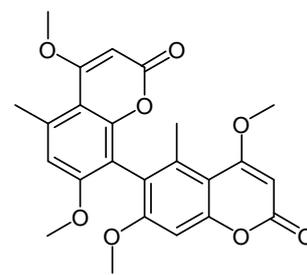
4.2.2.4 Desertorin A, Desertorin B und Desertorin C



Desertorin A (8)

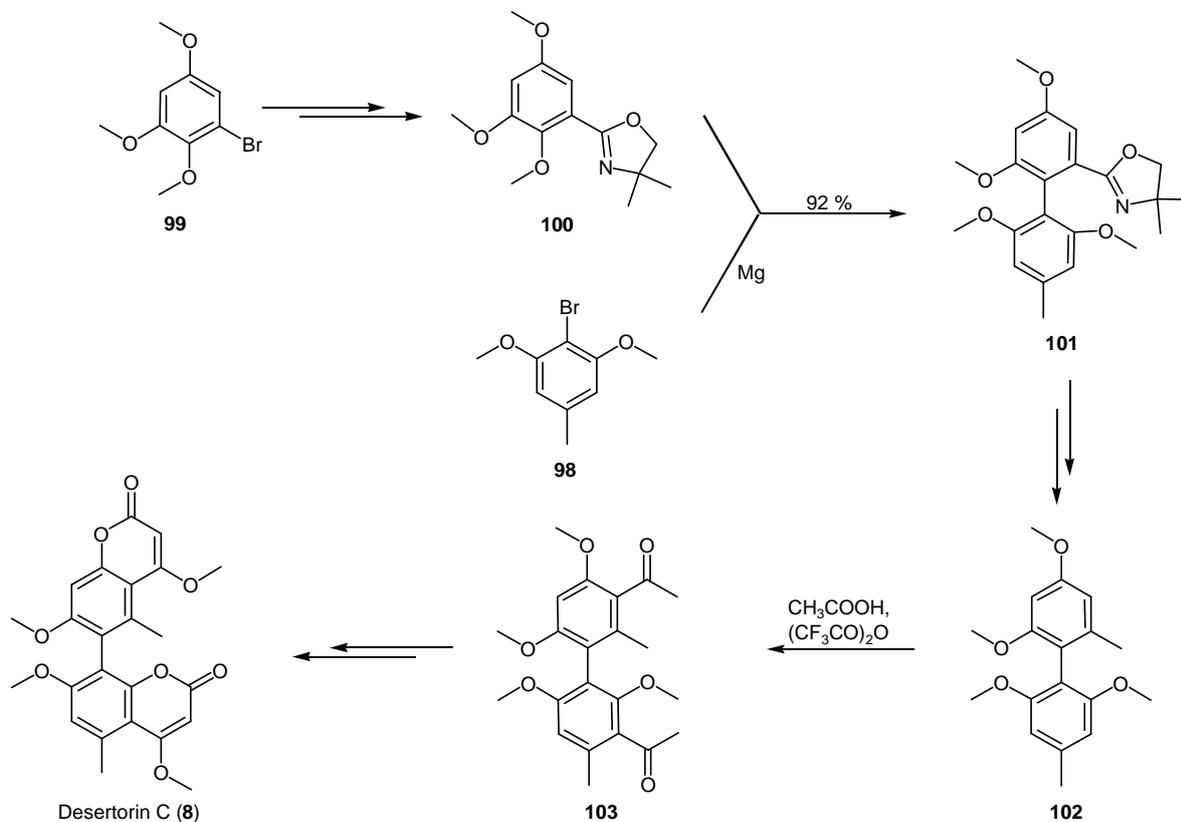


Desertorin B (65)



Desertorin C (66)

Die erste Totalsynthese des racemischen Desertorin C (**8**) wurde 1988 von SARGENT *et al.*⁹⁰ veröffentlicht. Schlüsselschritt war eine nicht stereoselektive Aromatenkupplung nach der Oxazolinmethode von MEYERS.²⁷ Als Ausgangsverbindungen dienen 2-Bromorcinoldimethylether (**98**) und 2,3,5-Trimethoxybrombenzen (**99**), das aus 5-Brom-Vanillin (**146**, Struktur vgl. Seite 62) dargestellt werden kann. **99** wird in das Dihydrooxazol **100** überführt und anschließend mit der Grignard-Verbindung von **98** regioselektiv zum Biaryl **101** gekuppelt. Der Dihydrooxazolring wird hydrolysiert und die Carboxylgruppe wird zur Methylgruppe reduziert. Die folgenden Schritte erfolgen nach dem gleichen Prinzip wie in den Synthesen von Kotanin (**2**) und Isokotanin A (**7**) (vgl. Abb. 37 und Abb. 39).

Abb. 42: Synthese des racemischen Desertorin C (**8**) nach SARGENT *et al.*⁹⁰

Der erste synthetische Zugang zu atropisomerenreinem Desertorin C (**8**) wurde zehn Jahre später ebenfalls von SARGENT *et al.*⁹¹ publiziert. Ein Versuch, die für racemisches Desertorin C (**8**) angewandte Methode auch für die stereoselektive Synthese zu nutzen, in dem chirale Oxazoline eingesetzt werden, führte nur zu geringen Atropisomerenüberschüssen.

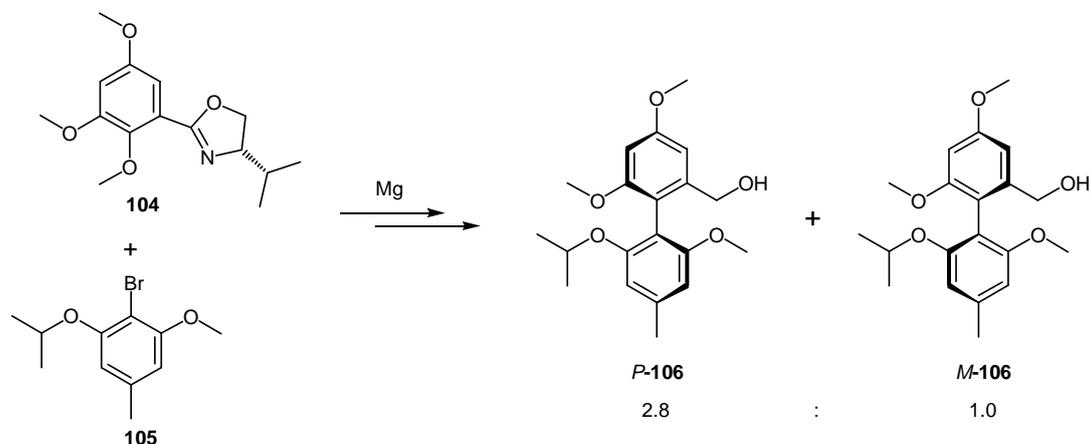


Abb. 43: Die Oxazolinmethode nach MEYERS ergab bei der Desertorinsynthese nur eine geringe Stereoselektivität.^{91b}

Bessere Ergebnisse wurden mit dem Verfahren nach LIPSHUTZ³⁴ analog zur Synthese des isomerenreinen (+)-Kotanins (**2**) (vergl. Abb. 38) erzielt (Abb. 44).⁸² Die unterschiedliche Regioselektivität, mit der die beiden Aromaten **107** und **108** in die Kupplungsreaktion eingehen, wurde auch hier über den Bromsubstituenten gesteuert. Allerdings verläuft die Acetylierung des 2-Propylethers (*P*)-**113** nicht regioselektiv. Es wird ein Gemisch der Regioisomeren (*P*)-**114** und (*P*)-**115** erhalten, die erst nach selektiver Entschützung mit Bortrichorid zu Triol (*M*)-**116** und Tetrol (*M*)-**117** getrennt werden können. Tetrol (*M*)-**117** wird zunächst vollständig methyliert und anschließend selektiv in *ortho*-Position zu den Acetylgruppen demethyliert [(*P*)-**118**]. Die folgenden drei Reaktionsschritte zur Umwandlung von (*P*)-**118** in *M*-(+)-Desertorin C [(*M*)-**8**] sind von der Synthese des racemischen Desertorin C (**8**) bekannt und wurden hier nicht durchgeführt. Mit Triol (*M*)-**116** wird in gleicher Weise verfahren wie mit (*M*)-**117**. Dabei wird (*M*)-**118** erhalten, aus dem *P*-(-)-Desertorin C [(*P*)-**8**] in drei Stufen dargestellt werden kann. Auf diese Weise konnte mit nur einer atropselektiven Aromatenkupplung ein formaler Zugang zu beiden Stereoisomeren des Desertorin C (**8**) erschlossen werden.

Eine Auswertung der ¹H- und ¹⁹F-NMR-Spektren des Mosher-Diesters von dem Diol, welches durch Abspaltung der 2-Propylgruppen von (*P*)-**113** erhalten wurde, ergab, dass dieses atropisomerenrein vorliegt. Zusätzlich wurde ein CD-Spektrum vom Dibenzoat dieser Verbindung aufgenommen, mit dem sich die erwartete (*M*)-Konfiguration des vorliegenden Isomers über die beobachteten Cotton Effekte bestätigen ließ. Diketon (*P*)-**118** schien

dagegen nicht völlig atropisomerenrein vorzuliegen,⁹² was nach Ansicht der Autoren auf eine teilweise Racemisierung der Tetrol-Vorstufe (*M*)-**117** zurückzuführen ist.

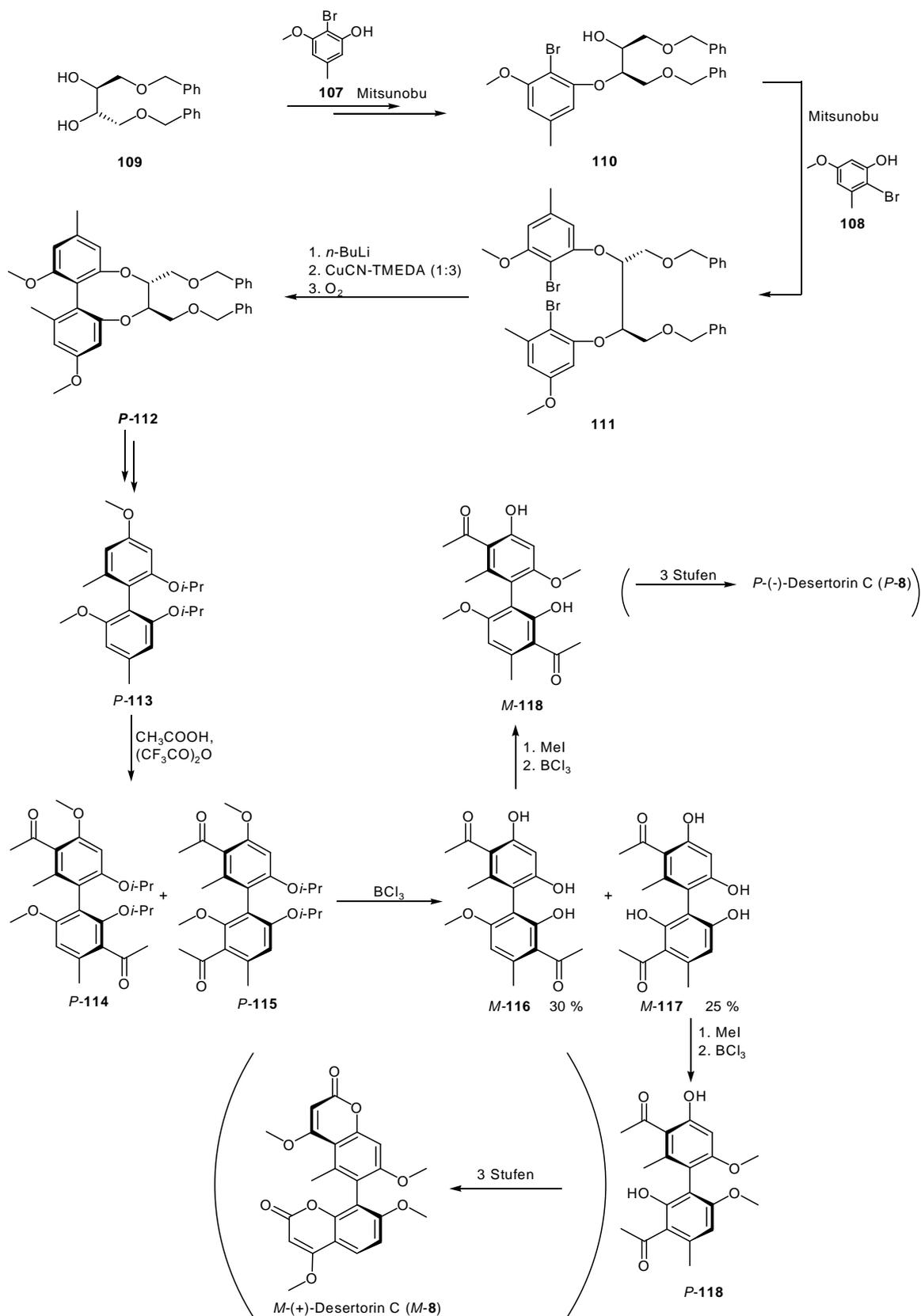


Abb. 44: Formale atropselektive Synthese des Desertorin C (**8**) nach SARGENT *et al.*⁹¹

4.2.2.5 Zusammenfassung

Nahezu alle in der Literatur beschriebenen Synthesen der Naturstoffe Siderin (**1**), Kotanin (**2**), Isokotanin A (**7**) und Desertorin C (**8**) gehen von Orcinoldimethylether (**77**) beziehungsweise dessen Derivaten aus. Diese werden nach unterschiedlichen Verfahren zunächst regioselektiv und zum Teil auch stereoselektiv gekuppelt, dann mit Essigsäureanhydrid acetyliert und in *ortho*-Position zu den Acetylgruppen regioselektiv demethyliert. Der Aufbau des Lactonringes erfolgt in allen Fällen nach dem erstmals von BÜCHI beschriebenen Verfahren durch Carboxylierung der Hydroxygruppe, basenkatalysierten Ringschluss und *O*-Methylierung des Enols.^{79a}

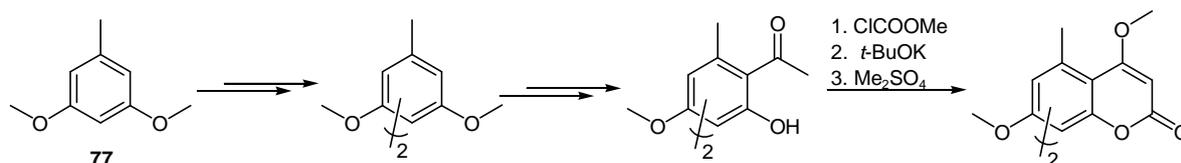


Abb. 45: Allgemeine Darstellung der bisher beschriebenen Bicumarinsynthesen.

Für die stereoselektive Synthese der Bicumarine wurden dabei folgende Verfahren angewandt: Die intramolekulare Kupplung chiral verbrückter Phenolderivate nach LIPSHUTZ³⁴ [Kotanin (**2**), Desertorin C (**8**)], die Oxazolinmethode nach MEYERS⁹¹ [Desertorin C (**8**)], die Ullmannkupplung von MEYERS' Oxazolin⁸⁴ [Isokotanin A (**7**)], sowie die Lactonmethode nach BRINGMANN⁶ [Isokotanin A (**7**)].

4.2.3 Synthesestrategie

Nach den in der Literatur beschriebenen Verfahren lassen sich racemisches Kotanin (**2**) und Isokotanin A (**7**) in 5 beziehungsweise 6 Synthesestufen und befriedigenden Gesamtausbeuten von 7 - 13 % darstellen.^{79a, 83} Die Synthese des racemischen Desertorin C (**8**) nach SARGENT⁹⁰ ist dagegen mit insgesamt 16 Stufen relativ aufwändig und entspricht nicht den Kriterien eines einfachen und flexiblen Verfahrens. Die Schwierigkeit bei der Desertorinsynthese, ein konstitutionell unsymmetrisches Biaryl darzustellen, könnte durch eine nicht regioselektive Kupplungsreaktion umgangen werden. Ob eine Ullmannkupplung der Bromide **98** und **119** zu einem Gemisch der drei verwertbaren Regioisomere **78**, **91**, und **102** führt und ob sich diese dann voneinander trennen lassen, ist aber nicht bekannt (Abb. 46).

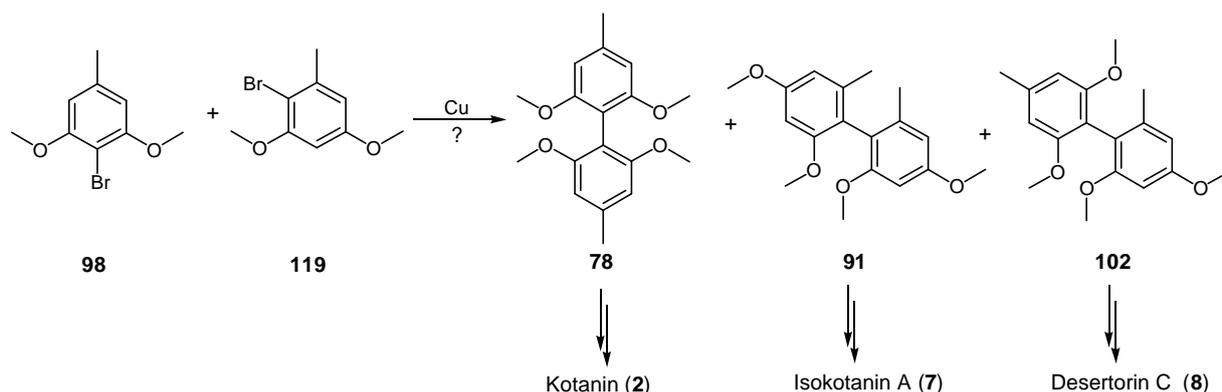


Abb. 46: Mögliche Synthese der Bicomarine über eine unselektive Ullmannkupplung der Bromide **98** und **119**.

Neben den von Orcinoldimethylether (**77**) ausgehenden Verfahren sollte es auch möglich sein, Cumarine aus Orsellinsäurederivaten zu erzeugen. Orsellinsäuremethylester (**121**) kann leicht über eine Kaskade basenkatalysierter Aldolkondensationen aus Acetessigsäuremethylester (**120**) dargestellt^{93, 26a} und anschließend in guten Ausbeuten regioselektiv zum 4-Methoxy-2-hydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**3**) *O*-methyliert werden (Abb. 47). Allerdings gelang es nicht, das Enolat des Essigsäure-*tert*-butylesters mit **3** zum β -Ketoester **122** umzusetzen.⁹⁴ **122** hätte über eine säurekatalysierte Hydrolyse in das 4-Hydroxycumarin **59** überführt werden können, welches zum Siderin (**1**) methyliert werden kann.

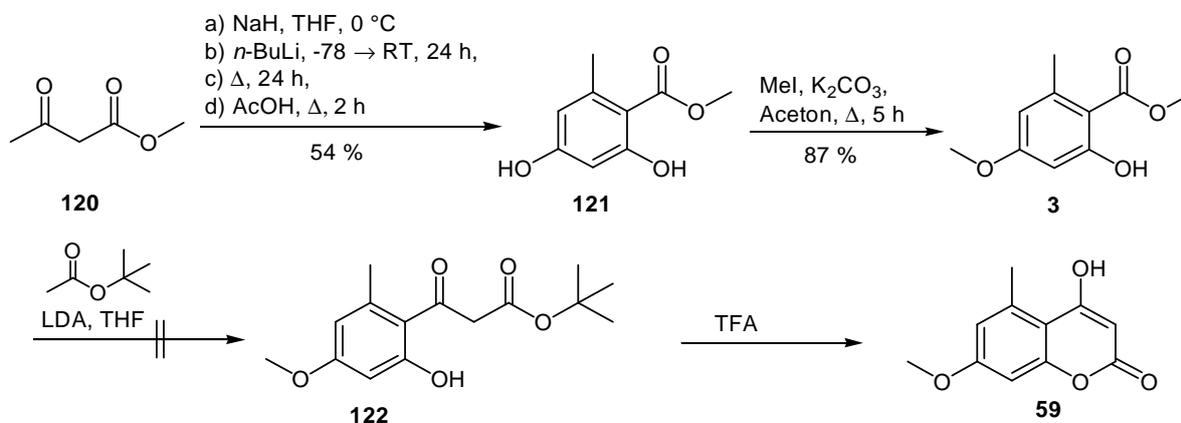


Abb. 47: Darstellung des 4-*O*-Methylorsellinsäureesters (**3**) und dessen geplante Kettenverlängerung und Lactonisierung zu Hydroxycumarin **59**.

Wesentlicher Vorteil von 4-*O*-Methylorsellinsäuremethylester (**122**) gegenüber den in der Literatur beschriebenen Ausgangsverbindungen ist, dass alle drei regioisomeren Dimere leicht erhältlich sind. Nach einem von DROCHNER^{26a, 95} etablierten Verfahren der oxidativen Phenolkupplung⁹⁶ wird **3** in einer Festphasenreaktion mit Eisen(III)chlorid an Kieselgel erhitzt (Abb. 48). Bei der Aufarbeitung können die drei Regioisomere **4** - **6** durch Kristallisation und Säulenchromatographie leicht voneinander getrennt werden. Die in Abb. 48 angegebenen Ausbeuten können auch bei größeren Ansätzen (2.5 g **3**) leicht erzielt werden. (In Klammern

sind die maximalen Ausbeuten von DROCHNER bei einer Ansatzgröße von 146 mg **3** angegeben).

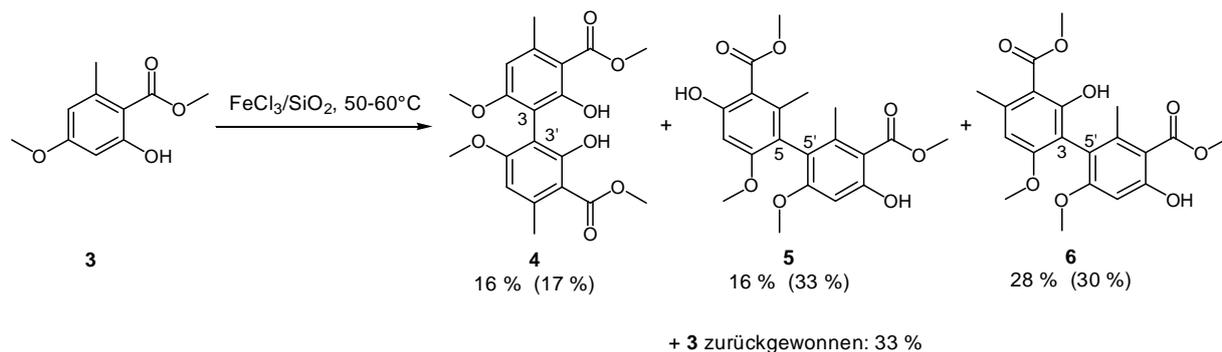


Abb. 48: Oxidative Phenolkupplung nach DROCHNER.^{26a, 95}

Von 3,3'-Dimer **4** können beide Atropisomere in reiner Form erhalten werden, in dem racemisches **4** mit (1*S*,4*R*)-(-)-Camphansäurechlorid zu **123** verestert wird, die dabei entstandenen Diastereomere von **123** auf säulenchromatographischem Wege getrennt, und anschließend zu atropisomerenreinem (*M*)- und (*P*)-**4** hydrolysiert werden.^{95, 96b}

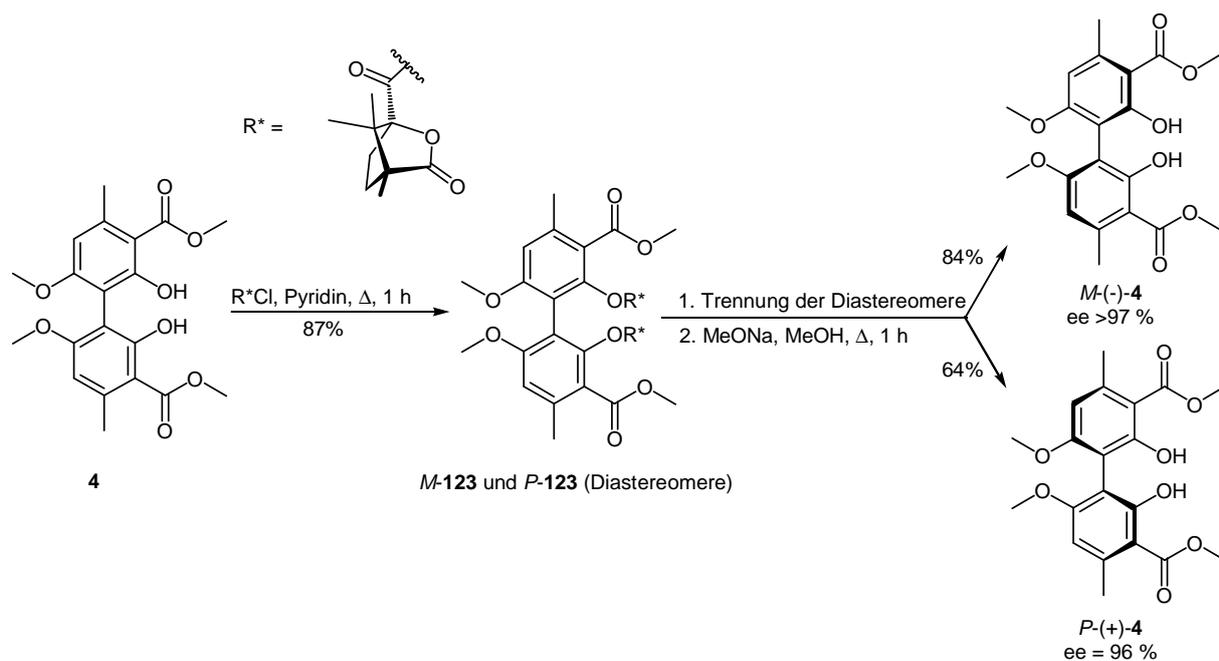


Abb. 49: Atropisomerentrennung von **4** nach DROCHNER^{26a, 95}

Zusammenfassend ist anzumerken, dass bei der Entwicklung eines Syntheseverfahrens der Cumarine ausgehend vom Orcinoldimethylether (**77**) vor allem die regiochemisch unsymmetrische Dimerisierung von **77** die Hauptschwierigkeit darstellt. Ansätze zu einer effizienteren regio- und atropselektiven Synthese der Bicumarine gibt es bisher nicht.

Geht man hingegen vom 4-*O*-Methylorsellinsäuremethylester (**3**) aus, muss ein neues Verfahren zum Aufbau des Lactonringes entwickelt werden. Da aber alle dimeren Orsellinsäure-

ester **4 - 6** in *einem* Ansatz erhalten werden können und **4** atropisomerenrein erhältlich ist, fiel die Entscheidung zugunsten von **3** als Ausgangsverbindung.

4.2.4 Präparative Arbeiten

Zunächst wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem aus 4-*O*-Methylorsellinsäuremethylester (**3**) leicht das monomere Cumarin Siderin (**1**) aufgebaut werden kann. Diese Methode wurde dann auf die Synthesen der entsprechenden Dimere **4 - 6** angewandt.

4.2.4.1 Verwendung von Acetonitril als Essigsäureesteräquivalent: Synthese des Siderins

Acetonitril als Essigsäureester-Äquivalent

Nitrile können in sauren oder basischen wässrigen Lösungen zur Carbonsäure hydrolysiert werden. Aus diesem Grunde werden sie in der organischen Synthese auch als Carbonsäurebeziehungswise Carbonsäureesteräquivalente eingesetzt. Da das Enolat von Essigsäure-*tert*-butylester nicht mit Orsellinsäureester **3** reagiert (vgl. Abb. 47), könnte die Synthese der Cumarine über Acetonitril als C₂-Baustein eine Alternative darstellen. Das bei der Addition eines Acetonitril-Anions an den Ester **3** als Produkt erwartete β -Ketonitril **124** sollte nach saurer Hydrolyse direkt das 4-Hydroxycumarin **59** bilden, das dann noch zum Siderin (**1**) methyliert werden muss. Dieser Syntheseweg ist mit drei Stufen nicht länger als die ursprünglich geplante Synthese unter Verwendung eines Essigsäureesters.

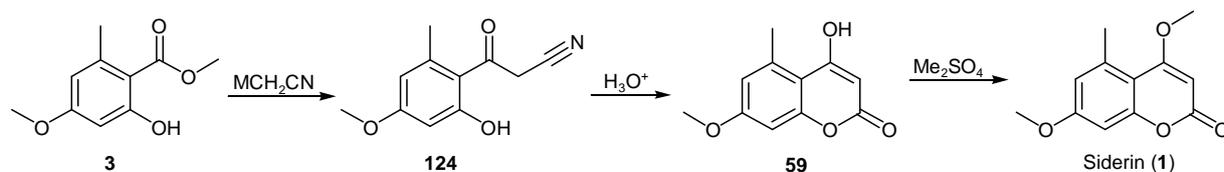


Abb. 50: Cumarinsynthese mit einem Acetonitrilsalz als C₂-Baustein.

Reaktionen von Benzoesäureestern mit dem Acetonitril-Anionen als Nucleophil werden in der Literatur mehrfach beschrieben. Als Basen werden dabei Natriumalkoholate,⁹⁷ Natriumamid,⁹⁸ Natriumhydrid⁹⁹ und elementares Natrium¹⁰⁰ eingesetzt. Während bei den meisten Verfahren höhere Temperaturen und längere Reaktionszeiten benötigt werden, können mit einer Lösung aus Natriumamid in flüssigem Ammoniak¹⁰¹ auch bei milden Bedingungen gute Ausbeuten erzielt werden. Das hochreaktive Lithiumsalz des Acetonitrils wurde bisher nur mit aktivierten Benzoesäurederivaten (Säurechlorid,¹⁰² Weinrebamid¹⁰³) umgesetzt.¹⁰⁴

Mit einem in der Literatur beschriebenen Substrat **125**, das mit Orsellinsäuremethylester **3** vergleichbar ist, wurde bei Verwendung von Acetonitril in einer Natriumsuspension als Reagenz eine Ausbeute von nur 4.6 % **126** erzielt.¹⁰⁰

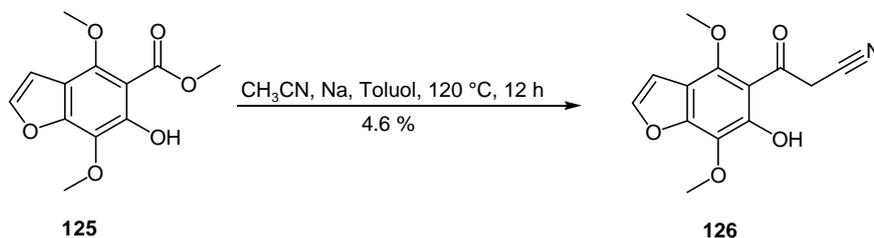
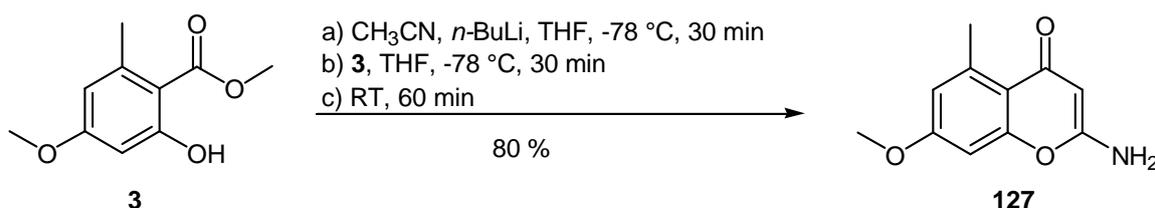


Abb. 51: Acetonitriladdition nach EIDEN und SCHÜNEMANN.¹⁰⁰

Für die Reaktionen mit Orsellinsäureestern wird daher α -Lithiumacetonitril ausgewählt, ein Reagenz, das sowohl hochreaktiv, als auch präparativ leicht zugänglich ist.

Durchführung der Synthese:

a) Umsetzung des Orsellinsäuremethylesters **3 mit dem Lithiumsalz des Acetonitrils**



α -Lithiumacetonitril wird nach einer Vorschrift von GRUPTA *et al.* in absolutem THF bei -78 °C dargestellt und bei gleicher Temperatur mit Orsellinsäureester **3** umgesetzt.¹⁰⁵ Nach Aufarbeitung beträgt die Produktausbeute 80 %. Im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum der erhaltenen Verbindung sind weder eine CH_2 -Gruppe noch ein quartäres Kohlenstoffatom, das einem Nitril zugeordnet werden könnte, erkennbar. Stattdessen werden Signale einer olefinische CH-Gruppe (^1H : 5.04 ppm, ^{13}C : 85.8 ppm) und von zwei Protonen bei 7.18 ppm gefunden. Dies zeigt, dass es sich bei dem Produkt nicht um das zunächst vermutete β -Ketonitril **124** handeln kann, sondern ein cyclisches Kondensationsprodukt (**127**) vorliegen muss (Abb. 52).

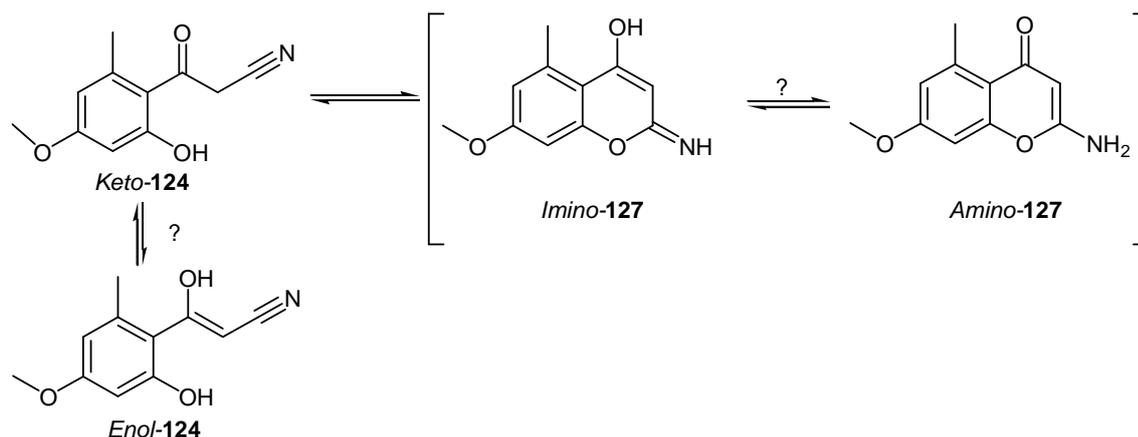


Abb. 52: Mögliche Strukturen für das Acetonitril-Additionsprodukt an Orsellinsäureester **3**.

SZABO *et al.* fanden bei ähnlichen Systemen ein pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen β -Ketonitrilen und deren Cyclisierungsprodukten, die als Cumarin-Imine vorgestellt wurden.¹⁰⁶ Andere Autoren schlagen die dazu tautomere Aminochromenonstruktur vor.¹⁰⁷ Das Signal von zwei Protonen bei 7.18 ppm im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Produkts **127** spricht für eine Aminogruppe. Darüber hinaus werden bei Umsetzungen von **127** mit elektrophilen Derivatisierungsreagenzien (MOM-Cl, (Boc) $_2$ CO, Dimethylsulfat) stets mono- oder disubstituierte Amine erhalten. Einen eindeutigen Beweis für die Existenz von **127** in der Aminochromenonstruktur brachte, zumindest für die feste Phase, eine Kristallstrukturanalyse (Abb. 53).¹⁰⁸

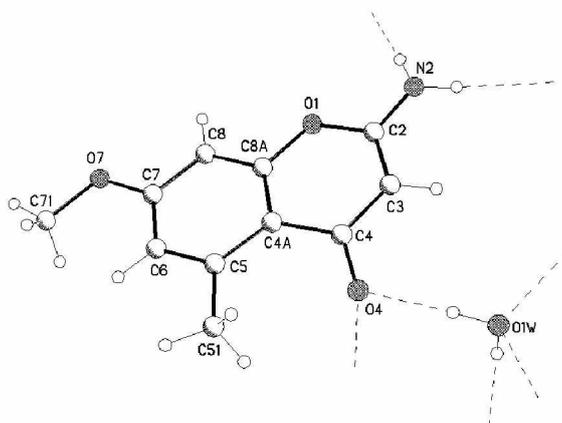


Abb. 53: Kristallstrukturanalyse von Aminochromenon **127** nach Rekrystallisation aus Wasser / Methanol.

b) Hydrolyse von Aminochromenon 127 zum 4-Hydroxycumarin 59

Die Hydrolyse des mit **127** vergleichbaren 2-Aminochromenons **128** zum Cumarin **129** gelang CZABO¹⁰⁶ durch einstündiges Erhitzen in verdünnter Salzsäure mit 87 % Ausbeute (Abb. 54). Auch *N,N*-disubstituierte Aminochromenone wurden unter ähnlichen Bedingungen hydrolysiert.¹⁰⁹

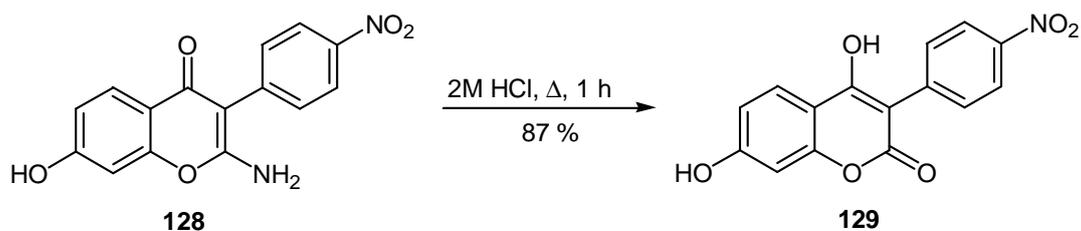


Abb. 54: Hydrolyse eines Aminochromenons nach SZABO *et al.*¹⁰⁶

Die Hydrolyse von **127** gelingt durch fünfstündiges Erhitzen in einer Mischung aus Salzsäure (30 %) und Methanol im Verhältnis 1:1 mit 90 % Ausbeute. Das Produkt wird in verdünnter Salzsäure ausgefällt und aus Methanol umkristallisiert.

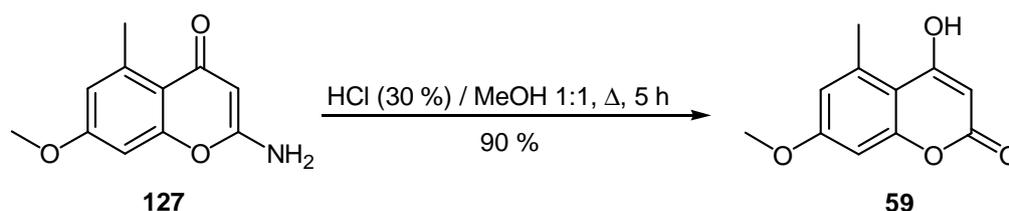
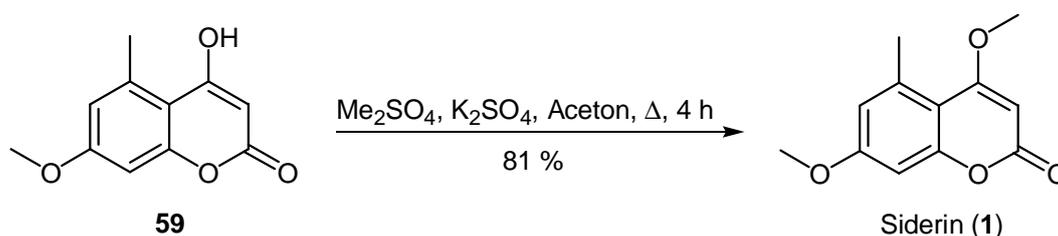


Abb. 55: Hydrolyse von Aminochromenon **127**.

c) Methylierung von **59** zum Siderin



Die Hydroxygruppe in **59** wird unter Standardbedingungen mit Dimethylsulfat methyliert.⁷⁷ Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung wird **1** in 81 % Ausbeute erhalten. Das Produkt stimmt in allen physikalischen Eigenschaften mit den Literaturangaben überein.^{77, 130}

4.2.4.2 Synthese der 7-Hydroxyderivate des Siderins

Die Synthese von 4,7-Dihydroxycumarin **60** und Desmethylsiderin (**58**) kann ausgehend von Orsellinsäuremethylester (**121**) analog zu den entsprechenden 7-Methoxycumarinen durchgeführt werden (Abb. 56). Die Addition des α -Lithiumacetonitrils gelingt in dabei in vergleichbarer Ausbeute. Die zusätzliche phenolische Hydroxygruppe an Position C-7 wird durch einen großen Basenüberschuss kompensiert. Bei der anschließenden Hydrolyse in einer Mischung aus Salzsäure und Methanol wird ein Teil des Dihydroxycumarins **60** bereits regioselektiv zum Desmethylsiderin (**58**) methyliert.¹¹⁰ Die Produkte können auf säulenchromatographischem Wege (RP-18) getrennt werden. Durch Verwendung von verdünnter

Salzsäure ohne Zusatz von Methanol zur Hydrolyse und von Chlorwasserstoff (1.25 M) in wasserfreiem Methanol zur anschließenden Methylierung können beide Reaktionsschritte auch separat in guten bis sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden (Abb. 56).

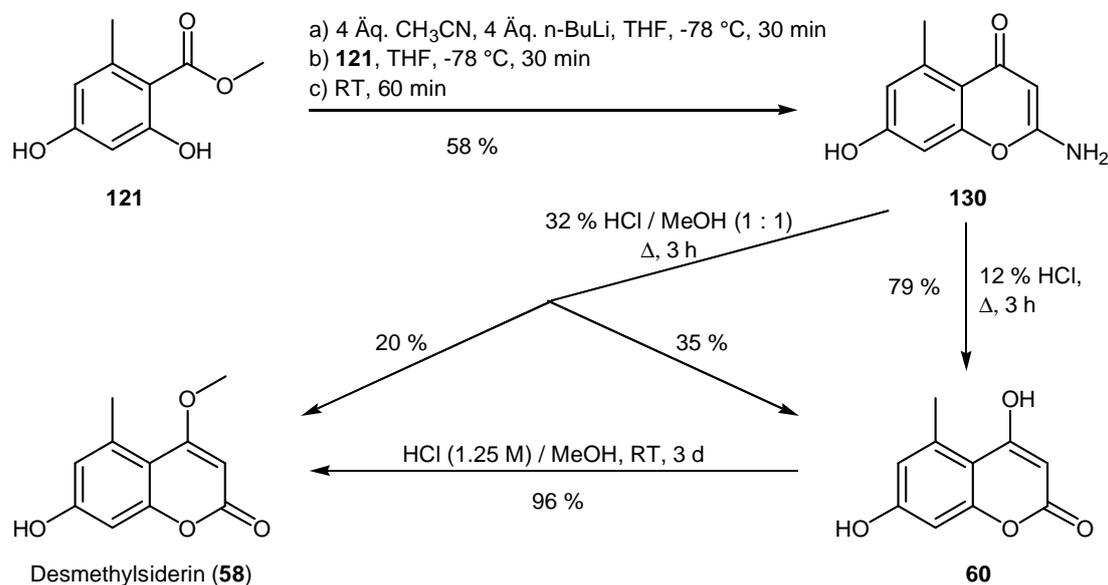


Abb. 56: Synthese von 4,7-Dihydroxycoumarin **60** und Desmethylsiderin (**58**).

4.2.4.3 Synthese der ^{13}C -markierten monomeren Verbindungen

Die ^{13}C -Markierung wird durch Verwendung von $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -Acetonitril am carbonylischen Kohlenstoffatom (C-2) der Coumarine eingeführt. Im Rahmen der biologischen Experimente erwies es sich als notwendig zusätzliche Markierungen an den Methoxygruppen einzufügen. Hierfür werden $[^{13}\text{C}]$ -Methyliodid und $[^{13}\text{C}]$ -Methanol verwendet. Da diese Reagenzien aus ökonomischen Gründen weder als Base (Überschuss α -Lithium-acetonitril) noch als Lösungsmittel (HCl / Methanol) eingesetzt werden sollten, muss die Durchführung der entsprechenden Synthesestufen modifiziert werden. Bei der Addition von α -Lithium- $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -acetonitril an Orsellinsäuremethylester (**121**) werden mit der sterisch anspruchsvollen Base Lithiumdiisopropylamin (LDA) gute Ausbeuten erhalten (Abb. 57). Die Chlorwasserstoffkatalysierte *O*-Methylierung in $[^{13}\text{C}]$ -Methanol wird in einem minimalen Volumen $[^{13}\text{C}]$ -Methanol durchgeführt (0.4 ml / 100 mg Dihydroxycoumarin **60**). Chlorwasserstoff wird *in situ* durch Reaktion von Bortrichlorid mit Methanol erzeugt. Da Bortrichlorid als 1 M Lösung in Dichlormethan vorliegt, dient dieses gleichzeitig als zweites Lösungsmittel im Reaktionsansatz. Obwohl die Coumarine dabei nur sehr unvollständig gelöst werden, wird eine Ausbeute von 81 % erzielt. Durch Variation von ^{13}C -angereicherten und nicht angereicherten Reagenzien können auf diese Weise ^{13}C -Markierungen in beliebiger Kombination an den entsprechenden Positionen in den Coumarinen eingeführt werden.

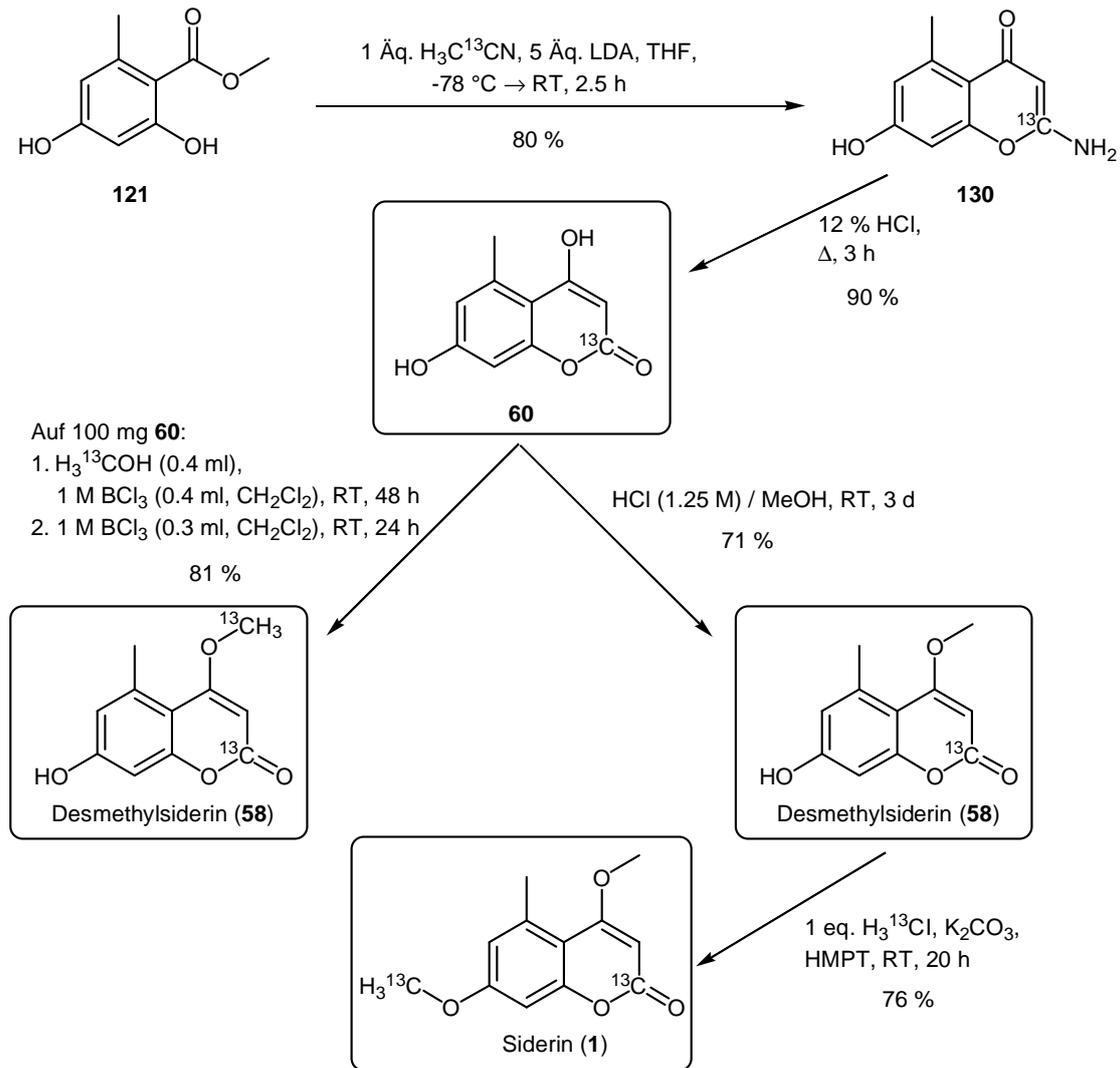


Abb. 57: Synthesen der ^{13}C -markierten monomeren Coumarine. Die umrahmten Verbindungen wurden für Verimpfungsexperimente an *Aspergillus niger* eingesetzt.

4.2.4.4 Synthese der Dimeren: Kotanin, Isokotanin A und Desertorin C

Die Synthese der dimeren Coumarine gelingt analog zur Siderinsynthese ausgehend von den dimeren Orsellinsäureestern **4** - **6** (Abb. 58).

Versuche, die Synthesen durch oxidativen Phenolkupplung der monomeren Coumarine abzukürzen, blieben dagegen selbst mit dem stark oxidierend wirkenden System Eisen(III)chlorid an Kieselgel erfolglos. Desmethylsiderin (**58**) wird zum Beispiel selbst nach einstündigem Erhitzen auf $85\text{ }^\circ\text{C}$ (kurzfristig sogar bis auf $150\text{ }^\circ\text{C}$) quantitativ zurückerhalten.

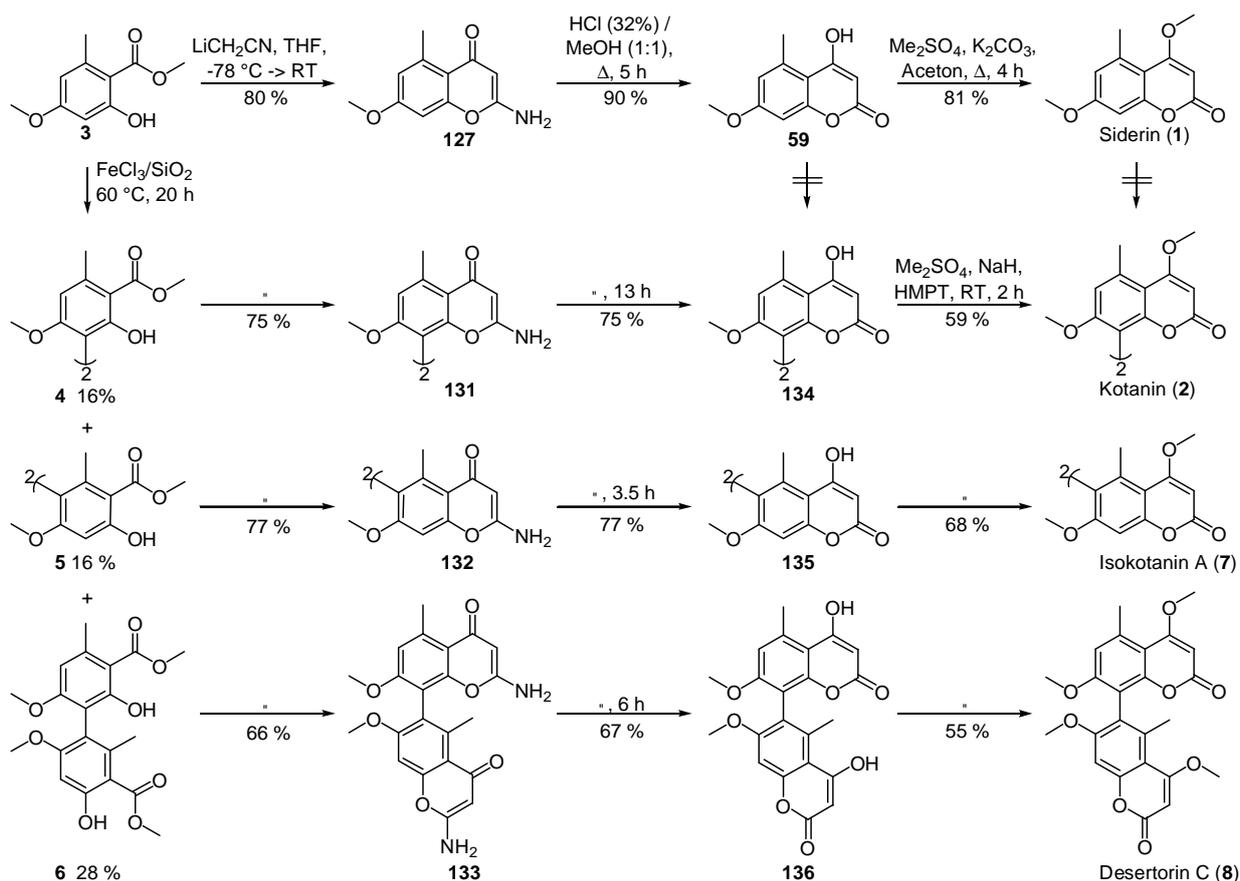


Abb. 58: Synthese der racemischen Bicumarine Kotanin (**2**), Isokotanin A (**7**) und Desertorin C (**8**) im Vergleich mit der Synthese des Monomers Siderin (**1**).

a) Umsetzung der dimeren Orsellinsäuremethylester 4 - 6 mit α -Lithiumacetonitril

Die dimeren Orsellinsäureester **4 - 6** lassen sich in der gleichen Weise mit α -Lithiumacetonitril umsetzen wie für das Monomer **3** beschrieben. Nach säulenchromatographischer Reinigung der Rohprodukte werden die dimeren Chromenone in guter Ausbeute erhalten.

b) Hydrolyse von 131 - 133 zu den dimeren 4,4'-Dihydroxycumarinen 134 - 136

Die Hydrolyse der dimeren Aminochromenone **131 - 133** gelingt, wie auch beim Monomer, durch Erhitzen in einem Gemisch aus Salzsäure (32 %) und Methanol im Verhältnis 1 : 1. Auf die Aufreinigung der Rohprodukte wird verzichtet, da die sehr polaren Verbindungen in allen gängigen Lösungsmitteln einschließlich Wasser nahezu unlöslich sind.

Bei der Reaktion macht sich die unterschiedliche Reaktivität der Dimere deutlich bemerkbar. Löslichkeit und Reaktivität nehmen von den 6,6'-dimeren über die 6,8'- zu den 8,8'-dimeren Verbindungen deutlich ab. Die höchsten Ausbeuten an Hydrolyse-Rohprodukten werden bei folgenden Reaktionszeiten erzielt:

6,6'-Dimer 132	3.5 h	68 % 135
6,8'-Dimer 133	6.0 h	59 % 136
8,8'-Dimer 131	10 h	67 % 134

Eine Reaktionskontrolle über DC oder HPLC ist wegen schlechten Löslichkeit der Verbindungen nicht möglich.ⁱ Auch NMR-spektroskopische Untersuchungen von hochreinem **134** und **136** gestalten sich schwierig, da diese Verbindungen nur in Basen oder heißem DMSO löslich sind.

c) Methylierung von **134** - **136** zu *Kotanin*, *Isokotanin A* und *Desertorin C*

Mit dem für die Siderinsynthese verwendeten Methylierungsverfahren (Erhitzen mit Dimethylsulfat in Aceton über Kaliumcarbonat als Base) werden die gewünschten Produkte nur in Spuren erhalten. Nach dem Verfahren von SUZUKI *et al.*,¹¹¹ das bereits zur Synthese von *Kotanin* (**2**) und *Isokotanin A* (**7**) erfolgreich angewandt wurde,^{82, 83, 84} werden die Bicularine **134** - **136** mit Natriumhydrid und einem geringen Überschuss Dimethylsulfat in wenig HMPT bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung können die Produkte neben großen Mengen an Verunreinigungen, die bei der vorherigen Hydrolyse entstanden sind, isoliert werden (Abb. 58).

Die Methode nach SUZUKI¹¹¹ ist außerordentlich effizient, hat aber den Nachteil, dass hochgiftige Reagenzien (HMPT, Dimethylsulfat) verwendet werden. Alternativ dazu wurde auch die bereits bei der Synthese der Siderinderivate verwendete säurekatalysierte *O*-Methylierung mit Chlorwasserstoff (1.25 M) in Methanol erprobt. Wegen der geringen Reaktivität der enolischen Hydroxygruppen der Bicularine **134** - **136** müssen hier drastischere Reaktionsbedingungen (Erhitzen unter Rückfluss) gewählt werden um zufriedenstellende Ausbeuten zu erhalten. Bei dieser Methode wird außerdem keine Zersetzung der Cumarine zu den entsprechenden Acetophenonen beobachtet, eine Nebenreaktion, die sich bei Hydrolyse im wässrigen Medium störend bemerkbar macht. Am Beispiel des 6,8'-Aminochromenons **133** wurden saure Hydrolyse und *O*-Methylierung in einstufiger Durchführung demonstriert, wobei eine ähnliche Gesamtausbeute wie bei der zuvor beschriebenen Methode erzielt wurde.

ⁱ Die Aminochromenone bilden in Salzsäure sehr stabile Hydrochloride, die den Produkten in Polarität und Löslichkeitseigenschaften sehr ähnlich sind, so dass die Trennung dieser Substanzen sehr schwierig ist.

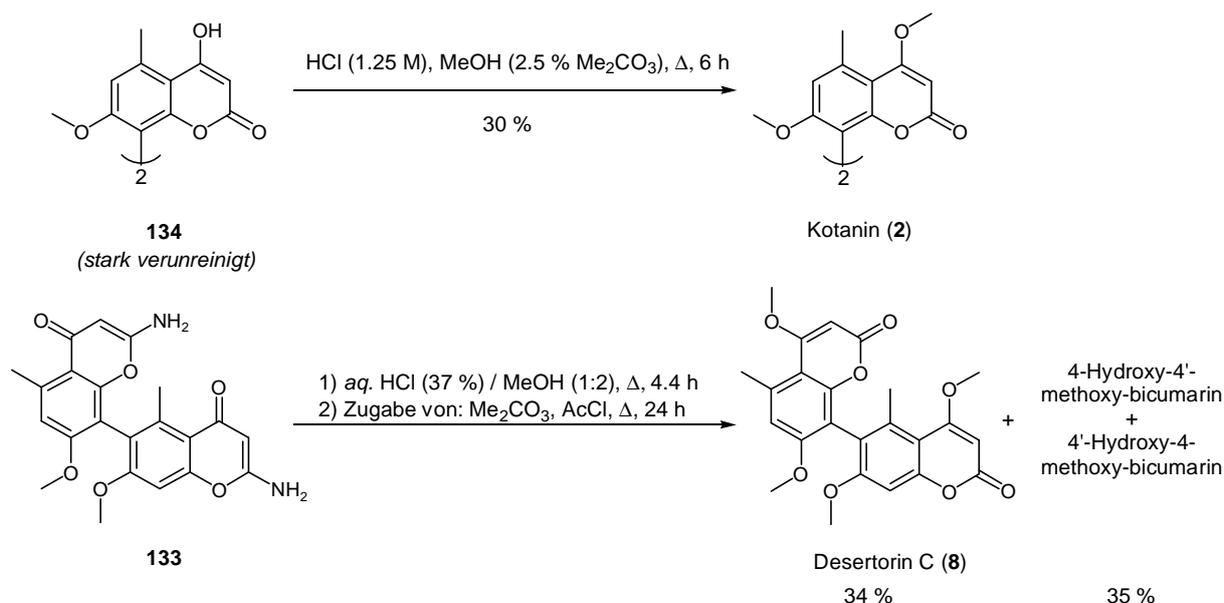


Abb. 59: *O*-Methylierung zu Kotanin (**2**) und Desertorin C (**8**) durch säurekatalysierte Etherbildung. (Dimethylcarbonat und Acetylchlorid bewirken durch Hydrolysereaktionen eine chemische Entwässerung des Lösungsmittelsystems. Die Chlorwasserstoffkonzentration (≈ 1 Mol / l) wird über Acetylchlorid eingestellt).

4.2.4.5 Synthese des atropisomerenreinen Kotanins

Die Darstellung der Atropisomere von Kotanin (**2**) gelingt entsprechend der Synthese von racemischen Kotanin (**2**) ausgehend von den atropisomerenreinen dimeren Orsellinsäureestern (*M*)-**4** und (*P*)-**4** (Abb. 49, S. 47 und Abb. 60). Anhand der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der diastereomeren Ester wird für (*M*)-**123** ein Enantiomenüberschuss von $> 97\%$ und für (*P*)-**123** von 96% ermittelt (Abb. 49, S. 47). Die folgenden Schritte zur Umwandlung von (*M*)- und (*P*)-**4** in (*M*)- und (*P*)-Kotanin [(*M*)-**2**, (*P*)-**2**] erfolgen wie für racemisches Kotanin (**2**) beschrieben. HPLC-Analysen der Produkte an chiraler Phase zeigen, dass es im Verlauf der Synthese nicht zur Racemisierung kommt. Die CD-Spektren sind im Analytik-Teil abgebildet (Abschnitt 4.3.4.2, S. 73).

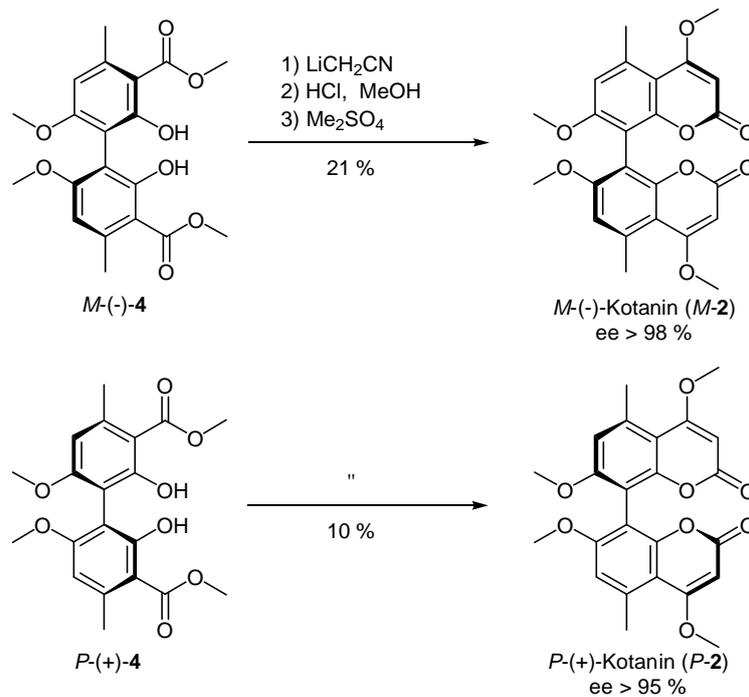


Abb. 60: Atropisomerenreine Synthese von *P*-(+)- und *M*-(-)-Kotantin [(*P*)-2 und (*M*)-2].

Analog zu **123** werden auch die Camphansäureester **137** - **139** der Regioisomere **5** und **6** sowie des 5,5'-Tetraphenols **141** dargestellt. Eine dünnschichtchromatographische Trennung der Diastereomere gelingt hier aber nicht. Weitere Untersuchungen zur Trennung der Atropisomere wurden nicht durchgeführt.

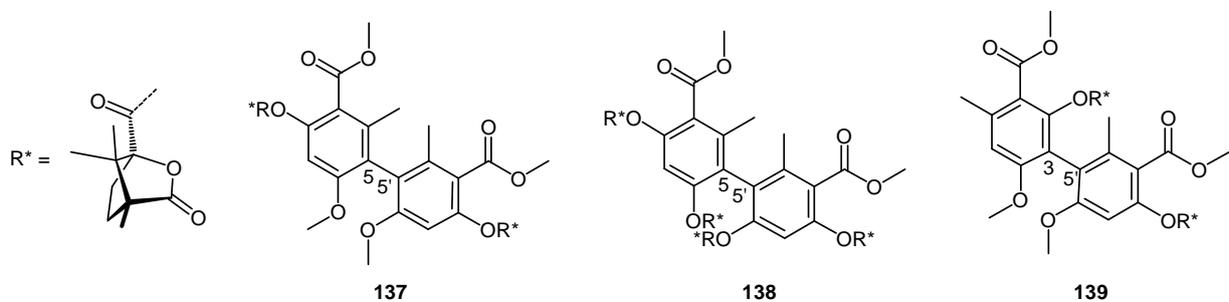


Abb. 61: Camphansäureester, deren Diastereomere sich nicht über Dünnschichtchromatographie trennen lassen.

4.2.4.6 Strategien zur Darstellung der natürlichen Hydroxybicumarine - erste Synthese von Desertorin A

Zum exakten Nachweis der Cumarin-Metabolite in Rohextrakten mit HPLC-Methoden ist es unter Umständen notwendig auch die chemisch bisher nicht zugänglichen Hydroxyderivate der dimeren Cumarine als Referenzverbindungen einzusetzen. Daher wurde ein chemischer Zugang am Beispiel der 6,8'-dimeren Cumarine (Desertorin A und C) entwickelt. Prinzipiell sind dazu mehrere Wege möglich (Abb. 62):

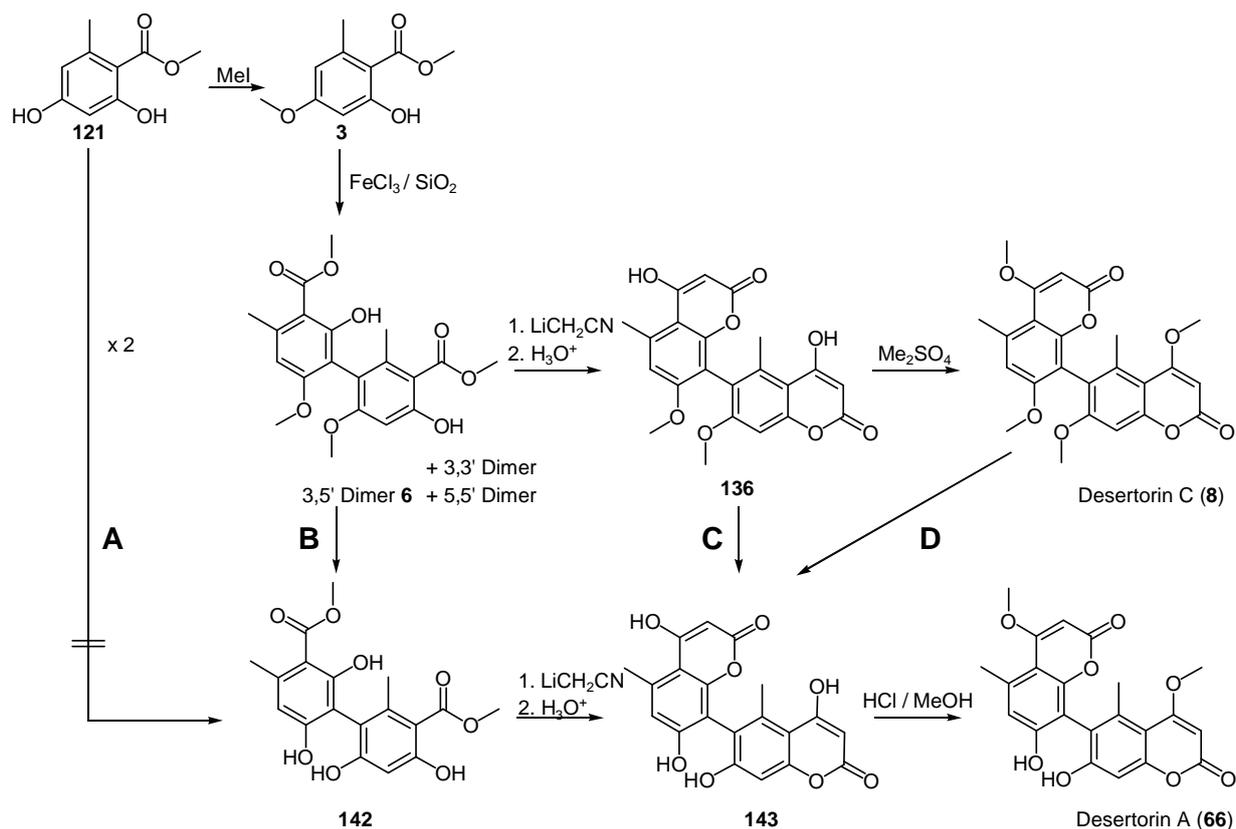


Abb. 62: Strategien zur Synthese von Desertorin A (66).

Am effizientesten erscheint Weg A, nach dem Desertorin A (66) in vier Stufen über eine oxidative Phenolkupplung von Orsellinsäuremethylester (121) zugänglich wäre. Allerdings schlugen alle Versuche¹¹² zu einer Phenolkupplung von 121 fehl. Eine Demethylierung des dimeren Esters 3 mit Bortribromid (Weg B) sollte dagegen möglich sein. Mit dem 5,5'-dimeren Orsellinsäureester 5 wurde dabei eine Ausbeute von 51 % erzielt (Abb. 63). Allerdings bereiten bei 3,3'-Dimer 4 die geringen Löslichkeiten der einfach und doppelt demethylierten Produkte erhebliche Schwierigkeiten. Bei den hier zu Demethylierung erforderlichen drastische Reaktionsbedingungen (Rückfluss) kommt es zur Esterhydrolyse, so dass nur geringe bis mäßige Ausbeuten erzielt werden.

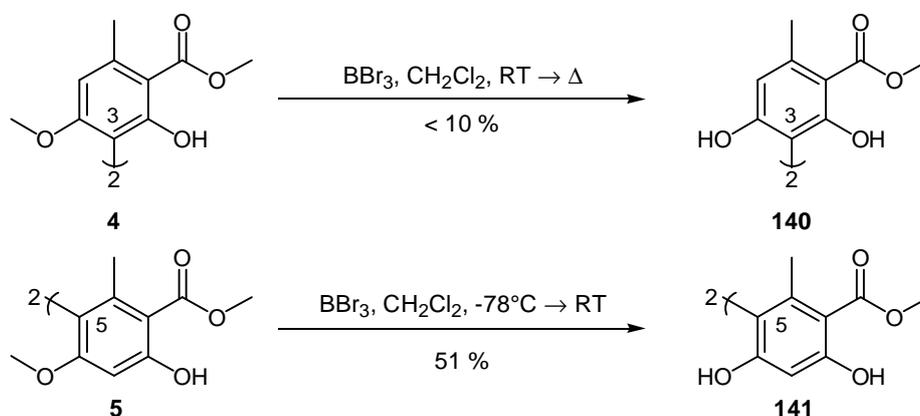


Abb. 63: Versuche zu Demethylierung der 5,5'- und 3,3'-dimeren Orsellinsäureester 4 und 5.

Das Problem der Esterhydrolyse kann durch Demethylierung erst auf der Stufe des dimeren Cumarins **136** (Weg **C**) vermieden werden. Allerdings können hier Standardreaktionsbedingungen nicht verwendet werden, da **136** in Dichlormethan unlöslich ist. Desertorin C (**8**) ist zwar in Dichlormethan löslich, nicht aber die zahlreichen möglichen Demethylierungsprodukte (Weg **D**). Um das Problem der Unlöslichkeit von **136** in Dichlormethan zu umgehen wird ein stark polares Lösungsmittel benötigt, das gleichzeitig inert gegenüber starken Lewissäuren ist. Geeignet sind hier ionische Flüssigkeiten mit komplexen Chloroaluminaten als Anionen, die gleichzeitig als Demethylierungsreagenz wirksam sind. Eine Umsetzung von **136** in der ionischen Flüssigkeit Methyl-octylimidazoliumchloridⁱ mit einem großen Überschuss Aluminiumchlorid ergibt nach Aufarbeitung ein Gemisch des gewünschten Produkts **143** mit den monomethyl-Regiosomeren **144** und **145** im Verhältnis 9 : 2 (¹H-NMR-Spektrum). Spuren der ionischen Flüssigkeit können auch über Säulenchromatographie nicht abgetrennt werden, weshalb die Ausbeute nicht exakt bestimmt werden können (> 90 %, ¹H-NMR). Das Tetrahydroxyprodukt **143** kann durch viertägiges Rühren in methanolischer Chlorwasserstofflösung zu geringen Mengen (ca. 10 %) in Desertorin A (**66**) umgewandelt werden. Daneben werden an C-4 bzw. C-4' einfach *O*-methylierte Produkte erhalten. Möglicherweise können bei dieser Stufe durch Erhitzen noch deutlich bessere Ausbeuten erzielt werden (vgl. säurekatalysierte *O*-Methylierung von **134** zu Kotanin (**2**), Abb. 59, S. 56).

ⁱ Methyl-octylimidazoliumchlorid ist sowohl in Wasser als auch in manchen organischen Lösungsmitteln wie zum Beispiel Chloroform löslich. Dies erleichtert die Rückgewinnung der relativ teuren Verbindung (siehe Experimenteller Teil).

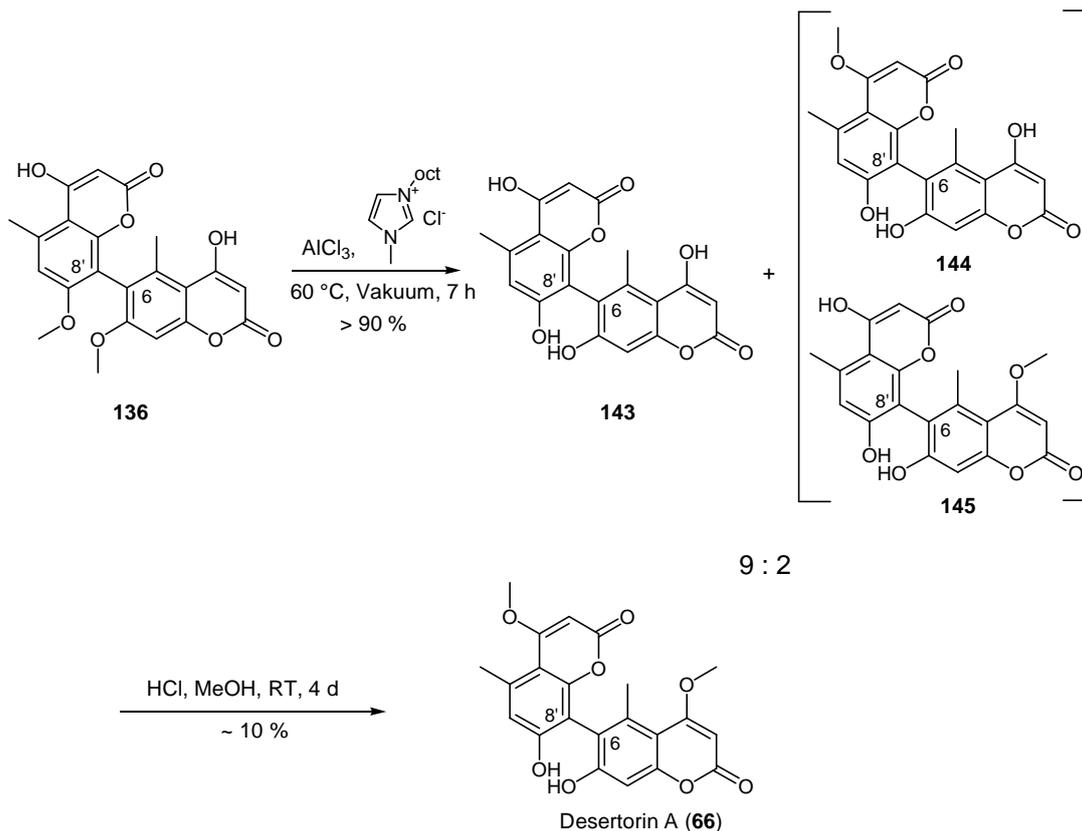


Abb. 64: Synthese von Desertorin A (66) über einen Demethylierungsschritt in einer ionischen Flüssigkeit.

Kurz nach Durchführung dieser Experimente wurde eine erste systematische Studie zur Spaltung von aromatischen Methylethern in ionischen Flüssigkeiten vom Typ der Dialkylimidazolium-aluminiumchloride veröffentlicht.¹¹³ Sehr gute Ergebnisse wurden dabei mit $[\text{BMIM}][\text{Al}_2\text{Cl}_7]$ und dem sehr preiswerten $[\text{TMAH}][\text{Al}_2\text{Cl}_7]$ erzielt (Abb. 65). Die relativ große Hydrophilie dieser Salze im Vergleich zu Octylimidazoliumchlorid sollte ihre Abtrennung von den organischen Produkten deutlich erleichtern, so dass ihre Anwendung zur Demethylierung von Bicomarinen lohnenswert erscheint.

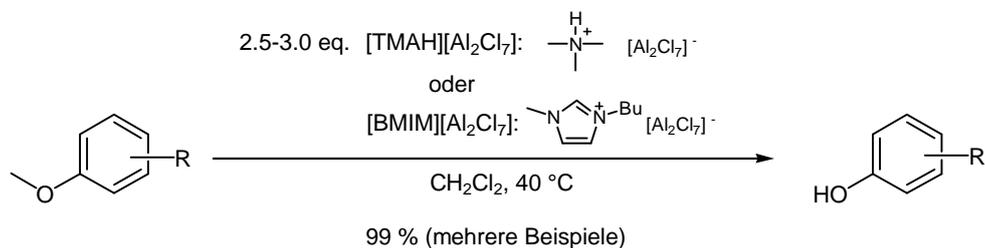
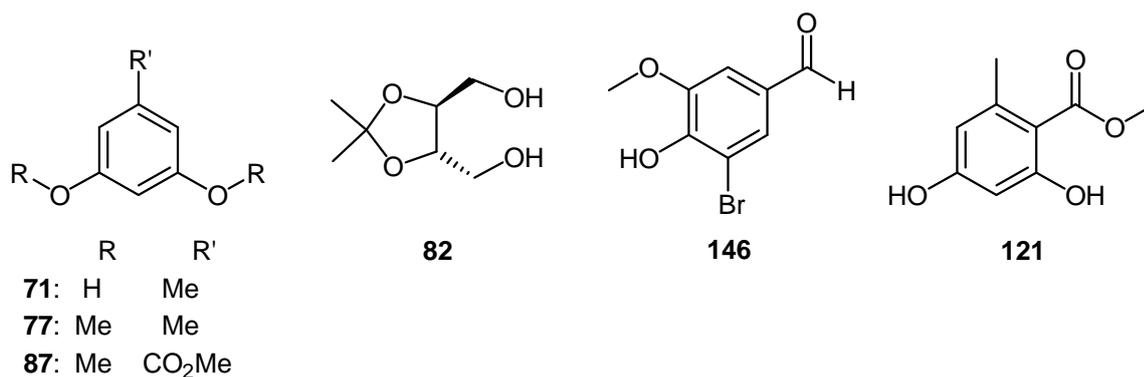


Abb. 65: Demethylierung von aromatischen Methylethern mit ionischen Flüssigkeiten nach KEMPERMANN *et al.*¹¹³

4.2.4.7 Vergleich der eigenen Synthesestrategie mit den literaturbekannten Verfahren

In Tabelle 2 sind die Gesamtzahl der Synthesestufen sowie die Ausbeuten, ausgehend von den angegebenen, kommerziell erhältlichen Verbindungen aufgeführt. Auch wenn viele dieser Angaben sicherlich eher Größenordnungen als exakt reproduzierbare Werte darstellen, erlauben sie doch einen ungefähren Vergleich der Effizienz der Verfahren.

Soll jeweils nur *ein* dimeres Cumarin in racemischer Form dargestellt werden, sind die Kotanin- und Isokotaninsynthese nach BÜCHI^{79a} und LIN⁸³ in Bezug auf die Ausbeute überlegen. Die Synthese von racemischem Desertorin C (**8**) nach SARGENT⁹⁰ ist hingegen trotz guter Ausbeuten wegen der zahlreichen Stufen und langen Reaktionszeiten ineffizient. Die vom Orsellinsäureester **121** ausgehenden Synthesen erweisen sich dann als besonders vorteilhaft, wenn, wie bei dieser Arbeit, alle drei Naturstoffe **2**, **7** und **8** hergestellt werden sollen. In diesem Fall kommt der Vorteil der oxidativen Phenolkupplung des 4-*O*-Methylorsellinsäureesters **3**, dass alle drei Regioisomere nebeneinander in *einem* Ansatz erzeugt werden, zum tragen. Auf diese Weise lassen sich alle Bicumarine in 11 Synthesestufen mit einer Gesamtausbeute von circa 8 % darstellen. Nach den literaturbekannten Verfahren würden dafür 27 Stufen benötigt. Auch die atropisomerenreine Darstellung des Kotanin A aus Orsellinsäuremethylester **121** ist trotz der fehlenden Selektivität bei der oxidativen Phenolkupplung ökonomischer als das atropselektive Verfahren nach LIN.⁸² Dies gilt besonders dann, wenn *beide* Isomere benötigt werden.



Produkt	Autor	Edukt	Gesamtzahl der Stufen	Gesamtausbeute [%]
Siderin (11)	VENTURELLA ⁷⁷	71	2	45
	CHEXAL ¹¹⁹	77	5	<17
	diese Arbeit	121	4	51
rac. Kotanin (20)	BÜCHI ^{79a}	77	5	6.6*
	diese Arbeit	121	5	4.6
isomerenreines 20 (ein Isomer)	LIN ⁸²	77 + 82	18	2.6
	diese Arbeit	121	7	1.7
(beide Isomere)	LIN ⁸²	77 + 82	34	3.0 + 3.0
	diese Arbeit	121	12	1.7 + 1.7
rac. Isokotanin A (38)	LIN ⁸³	77	7	13
	diese Arbeit	121	5	5.6
isomerenreines 38	LIN ⁸⁴	77 + 87	13	6-7
rac. Desertorin C (54)	SARGENT ⁹⁰	77 + 146	16	8*
	diese Arbeit	121	5	5.9
isomerenreines 54	SARGENT ⁹¹	77 + 82	22	< 0.4

Tabelle 2: Vergleich der in der Literatur beschriebenen Synthesen der Cumarine **1**, **2**, **7** und **8** mit den eigenen Arbeiten. *Die Ausbeute kann möglicherweise durch *O*-Methylierung nach SUZUKI¹¹¹ in der letzten Stufe verdoppelt werden.

4.3 Analytik

4.3.1 Zusammenfassung

Zunächst wurden Methoden zur Extraktion von Pilzkulturen etabliert. Aus den Rohextrakten wurden die enthaltenen Cumarine mit dünn- beziehungsweise säulenchromatographischen Methoden isoliert und mit den gängigen analytischen Verfahren, einschließlich chiraler Analytik (HPLC, CD, Drehwert) untersucht. Für eine schnelle und effektive Identifizierung der Metabolite in Rohextrakten wurden mit chemisch synthetisierten Referenzverbindungen HPLC-Assays entwickelt, mit denen unter anderem die regioisomeren Bicumarine Kotanin (**2**), Isokotanin A (**7**) und Desertorin C (**8**) nebeneinander identifiziert werden können. Diese konnten so optimiert werden, dass eine Analyse innerhalb von 2 - 3 Minuten durchgeführt werden kann. Dies erlaubt auch Studien mit großen Probenaufkommen, wie zum Beispiel ein Screening einer *Aspergillus*-Genbank aus mehreren tausend Stämmen.

4.3.2 Extraktion von Pilzkulturen und chromatographische Aufreinigung

Die verwendeten Methoden zur Extraktion von Pilzkulturen und Aufarbeitung der Rohextrakte werden in Kapitel 5.2.4 des Experimentellen Teils (S. 173ff) detailliert besprochen. Im folgenden werden daher nur die verwendeten Extraktions- beziehungsweise Laufmittel kurz diskutiert.

4.3.2.1 Extraktionsmittel

Die Extraktion der Pilzkulturen gelingt im Allgemeinen ohne Schwierigkeiten. Wegen der hohen thermischen und chemischen Stabilität der Cumarine ist Erhitzen möglich, aber zur Extraktion nicht notwendig. Während Hydroxycumarine wie das verfütterte Desmethylsiderin (**58**) in reiner Form in Lösungsmitteln wie Chloroform, Essigsäureethylester und sogar Methanol kaum löslich sind, lassen sich aus den "unreinen" Rohextrakten erhebliche Mengen in Lösung bringen. Bei wiederholter Extraktion können diese Verbindungen daher quantitativ isoliert werden. Schwierigkeiten bereitet lediglich die Phasentrennung, wobei sich besonders fein zerkleinertes Myzel als störend erweist. Eine Filtration des wässrigen Gemischs ist nur mit Miracloth[®] (CALBIOCHEM, San Diego, USA) möglich. Alle anderen Filtermedien

verstopfen sofort. Eine Alternative stellt die vorherige Abtrennung des wässrigen Mediums dar (vgl. Kap. 5.2.4.1, S. 174).

Eigenschaften verschiedener Extraktionsmittel:

Chlorform: Relativ gute Löslichkeit der Cumarine; Hydroxycumarine fallen nur bei höheren Konzentrationen aus. Es werden erhebliche Mengen lipophiler Verbindungen mitextrahiert.

Essigsäureethylester: Die Löslichkeit der Hydroxycumarine ist eingeschränkt, reicht aber aus um von *Aspergillus niger* synthetisiertes Orlandin (**62**) quantitativ zu extrahieren. Schwarzbraune Sporen(pigmente) werden mitextrahiert.

Methanol: Sehr gute Löslichkeit der Hydroxycumarine. Keine Flüssig-Flüssig-Extraktion möglich. Viele unerwünschte Stoffe werden mitextrahiert. Daher nur als Vorstufe zu einem weiteren Extraktionsschritt empfehlenswert.

Essigsäureethylester / Chloroform / Methanol (3 : 1 : 1): Gute Löslichkeit aller Cumarine. Die Anreicherung störender Nebenprodukte fällt moderat aus.

Andere (unpolarere) Lösungsmittel kommen wegen der geringen Löslichkeit der Cumarine nicht zum Einsatz.

4.3.2.2 Laufmittel

Bei den untersuchten Cumarinen handelt es sich um sehr polare, jedoch nicht wasserlösliche Verbindungen. Besonders die Hydroxycumarine bilden in hochreiner Form sehr stabile kristalline Aggregate, die in allen gängigen Lösungsmitteln einschließlich Methanol und DMSO kaum noch oder nur unter Erhitzen löslich sind. Eine eingeschränkte Löslichkeit wird dagegen im System Chloroform / Methanol (z. B. 1 : 1) beobachtet. Trotz dieser Schwierigkeiten ist eine chromatographische Aufreinigung der Cumarine im Allgemeinen gut möglich. Aufgrund ihrer UV-Absorption bei 254 nm sind sie leicht auf DC-Platten detektierbar. Soweit nicht anders beschrieben, wird als stationäre Phase Kieselgel verwendet. Da aus den Rohextrakten in der Regel nur sehr geringe Mengen an Cumarinen isoliert wurden (zum Teil < 1 mg), die bei Säulenchromatographie aufgrund der Verdünnung leicht übersehen werden, erfolgt die Aufreinigung meist über präparative Dünnschichtchromatographie (DC). Diese

Methode hat auch den Vorteil, die Trennung der Substanzen verfolgen und gegebenenfalls mehrere Läufe durchführen zu können, ohne die Substanzen zwischenzeitlich aus dem Kieselgel zu extrahieren und neu aufzutragen. Säulenchromatographische Schritte wurden nur zur Vorreinigung eingesetzt. Als Laufmittel für präparative DC wurden folgende Systeme eingesetzt:

Chloroform: Kotanin (**2**) hat einen extrem kleinen R_f -Wert. Nach mehren Läufen ist eine Bande kurz über der Basislinie erkennbar. Da die meisten anderen Substanzen im Rohextrakt ein deutlich anderes Laufverhalten zeigen, ist Chloroform zur vorherigen Abtrennung von Kotanin (**2**) aus Rohextrakten in schwierigen Fällen gut geeignet. Andere Cumarine (Siderin (**1**), Hydroxycumarine) können dann in späteren Aufreinigungsschritten mit einem der folgenden, polarerer Laufmittel isoliert werden sollen.

Essigsäureethylester: Kotanin hat einen R_f -Wert von circa 0.30. Andere Cumarine (außer Siderin (**1**)) liegen geringfügig darunter. Da die meisten störenden Verbindungen deutlich größere R_f -Werte haben, ist Essigsäureethylester zur Abrennung von Cumarinen von anderen Verbindungen auch bei säulenchromatographischer Durchführung hervorragend geeignet. Bei großen Mengen an Hydroxycumarinen (zum Beispiel Verfütterungsexperimente mit Desmethylsiderin (**58**)) kommt es wegen der geringen Löslichkeit dieser Verbindungen zu Schmiereffekten.

Toluol / Essigsäureethylester / Ameisensäure (6 : 5 : 1): Kotanin (**2**), Desmethylkotanin (**58**), und Orlandin (**62**) werden gut voneinander getrennt. Die meisten anderen Verbindungen haben deutlich größere R_f -Werte. Nur bei großen Mengen von Hydroxycumarinen kommt es, wie bei Essigsäureethylester, zu Schmiereffekten.

Chloroform / Methanol (40 : 1 - 10 : 1): Sehr scharfe Auftrennung der Cumarine und vieler anderer Substanzen in diskrete Banden. Allerdings kann es zu Überlagerungen kommen. So fällt die Kotaninbande mit geringen Mengen eines gelben Farbstoffs zusammen. Anders als bei den vorher beschriebenen Laufmitteln kann die Polarität hier durch Variation des Methanolanteils verändert werden, ohne dass es zu grundlegenden Änderungen der Laufmitteleigenschaften kommt, wie Verschmieren der Cumarinbanden oder Verlust der Trenneigenschaften.

Chloroform / Methanol / Ameisensäure (40 : 1 : 1 - 20 : 1 : 1): Die Zugabe geringer Mengen Ameisensäure erhöht besonders bei Hydroxycumarinen die Schärfe der Banden. Sonst ähnlich Chloroform-Methanol-Mischungen.

4.3.3 Analyse von Rohextrakten durch HPLC

Über einen HPLC-Assay soll eine Möglichkeit geschaffen werden, Cumarine ohne weitere Aufreinigungsschritte aus Rohextrakten semiquantitativ zu detektieren. Wichtig ist dabei, die regioisomeren Verbindungen Kotanin (**2**), Isokotanin A (**7**) und Desertorin C (**8**) voneinander unterscheiden zu können, da die Regioselektivität der oxidativen Phenolkupplung untersucht werden soll. Als Referenzsubstanzen für die Entwicklung eines solchen Assaysystems stehen die chemisch synthetisierten monomeren und dimeren Cumarine sowie Rohextrakte von *Aspergillus niger*, die Kotanin (**2**), Desmethylkotanin (**58**) und Orlandin (**62**) enthalten, zur Verfügung. Wegen ihrer UV-Absorption bei relativ großen Wellenlängen (>300 nm) können die 4-Hydroxy- beziehungsweise 4-Methoxycumarine leicht und mit guter Selektivität über einen Wellenlängendetektor (DAD) detektiert werden. Da die verschiedenen Verbindungen im UV-Bereich sehr ähnlich absorbieren, reicht es aus bei *einer* Wellenlänge (308 nm) zu messen.

4.3.3.1 Reversed-Phase (RP-18) HPLC-Assay

Als Grundlage diente ein von DROCHNER zur Detektion von Vioxanthin (**53**) und verwandten Verbindungen in Pilzrohextrakten verwendeter Reversed-Phase-Assay.^{26a} Es wurden eine Reversed-Phase(RP-18)-Chromatographiesäule (250 × 3 mm, LICHROSPHER[®] 100 RP-18-EC) mit einem Acetonitril / Wasser-Gradienten als Elutionsmittel verwendet. Durch Optimierung

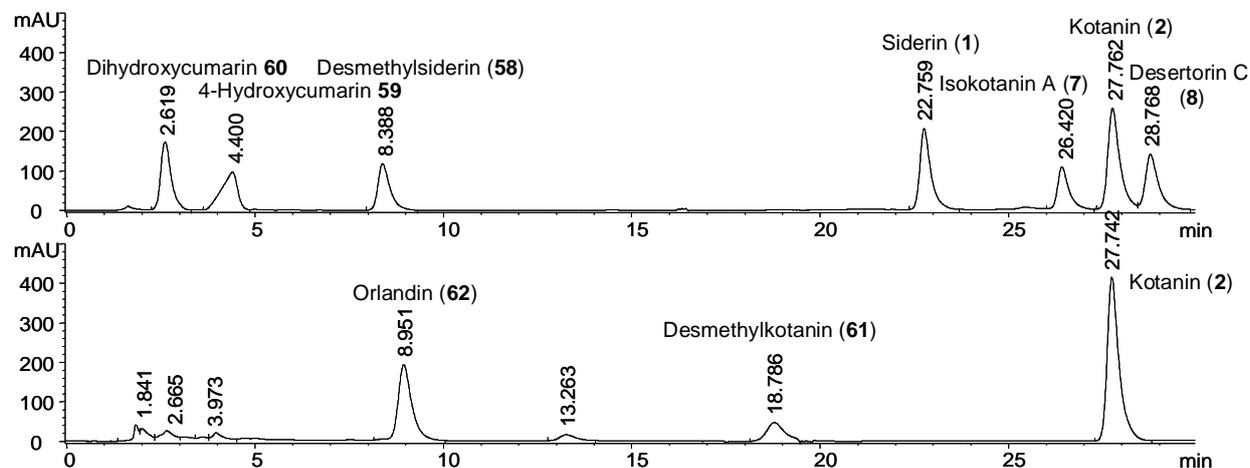


Abb. 66: RP-18-HPLC-Assay; **oben:** Chemisch synthetisierte Cumarine; **unten:** *A. niger*-Rohextrakt.

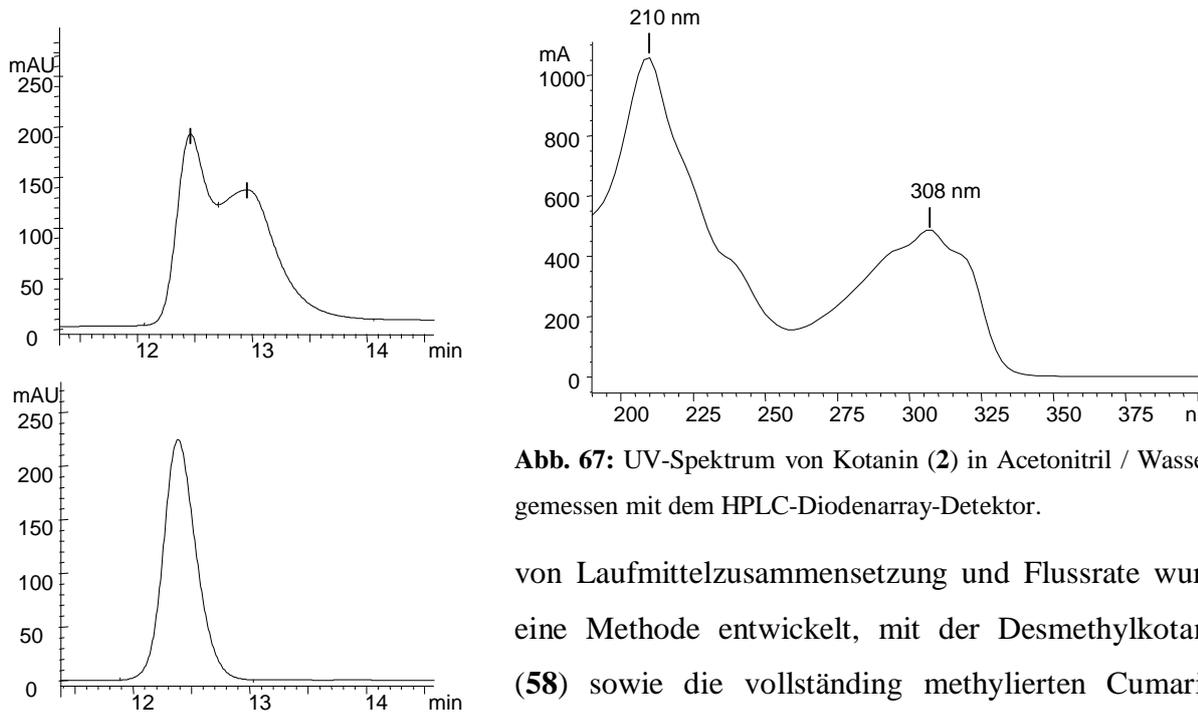


Abb. 67: UV-Spektrum von Kotanin (2) in Acetonitril / Wasser gemessen mit dem HPLC-Diodenarray-Detektor.

Abb. 68: Kotaninpeaks im RP-HPLC-Assay; **oben:** Doppelpeak bei Injektion einer Chloroformlösung **unten:** Peak bei Injektion einer Acetonitril / Methanol-Lösung.

von Laufmittelzusammensetzung und Flussrate wurde eine Methode entwickelt, mit der Desmethylkotanin (58) sowie die vollständig methylierten Cumarine Siderin (1), Kotanin (2), Isokotanin A (7) und Desertorin C (8) gut getrennt werden (Abb. 66).

Die Trennung der übrigen Hydroxycumarine bleibt allerdings wegen ihrer hohen Polarität schwierig. Die Retentionszeit von 4-Hydroxycumarin 59 variiert stark

in Abhängigkeit von bei vorherigen Mesungen verwendeten Elutionsmitteln. Schon kleinste Veränderungen an der stationären oder mobilen Phase führen zu deutlichen Veränderungen. Desweiteren sind die Peaks von Desmethylsiderin (58) und dessen Kupplungsprodukt Orlandin (62) teilweise überlagert (siehe dazu auch Abb. 89, S. 93). Auffällig ist auch, dass es bei Injektion von Rohextrakten in Chloroform zu Peakverbreiterungen oder Doppelpeaks kommt (Abb. 68). Chloroformextrakte werden daher nach Abdampfen des Lösungsmittels in einem heißen Acetonitril / Methanol-Gemisch (2 : 1) gelöst. Beim Abkühlen fallen lipophile Substanzen als flockiger Niederschlag aus, welcher durch Abdekantieren oder Filtration leicht abgetrennt werden kann. Eine Mitfällung von Cumarinen wird nicht beobachtet. Umgekehrt können Acetonitril / Methanol-Lösungen wegen ähnlicher Doppelpeak-Effekte nicht mit dem im folgenden Abschnitt beschriebenen Chloroform-Assay analysiert werden.

4.3.3.2 Normalphase-Assay (Kieselgel)

Die Probleme bei der Trennung der Hydroxycumarine, besonders die Überlagerung der Peaks von Desmethylsiderin (58) und Orlandin (62) bei der Chromatographie an Reversed Phase waren Anlass zur Entwicklung einer weiteren analytischen HPLC-Methode. Dazu wurden

Systeme erprobt, die bei der dünn-schichtchromatographischen Aufreinigung der *A. niger*-Rohextrakte an Kieselgel die besten Trennungen ergeben. Entsprechend wurde eine Kieselgelsäule mit Normalphase verwendet (250 × 3 mm, LICHROSPHER® Si60). Mit dem System Isohexanⁱ / Essigsäureethylester / Ameisensäure (6 : 5 : 1) als mobiler Phase wurden sehr große Unterschiede in den Retentionszeiten zwischen den vollständig methylierten Cumarinen und den Hydroxyderivaten beobachtet, was die Entwicklung einer geeigneten Methode stark erschwerte. Durch Eistellung eines Gradienten im Laufmittelsystem Chloroform (1 % Ameisensäure) / Methanol konnte hingegen eine Methode entwickelt werden, bei der alle eingesetzten Cumarine als einzelne Fraktionen innerhalb von 10 min eluiert werden (Abb. 69). Die teilweise Überlagerung der Peaks von 4,7-Dihydroxycumarin **60** und Orlandin (**62**) ist in der praktischen Anwendung nicht störend, da **60** bei den Biosyntheseuntersuchungen von untergeordneter Bedeutung ist. UV-Spektren können bei diesem Assay erst ab Wellenlängen >250 nm aufgenommen werden, da Chloroform im kurzwelligen UV-Bereich absorbiert. Das für die hier untersuchten Cumarine typische Bandenmuster von 260 nm - 340 nm wird davon aber nicht beeinträchtigt.

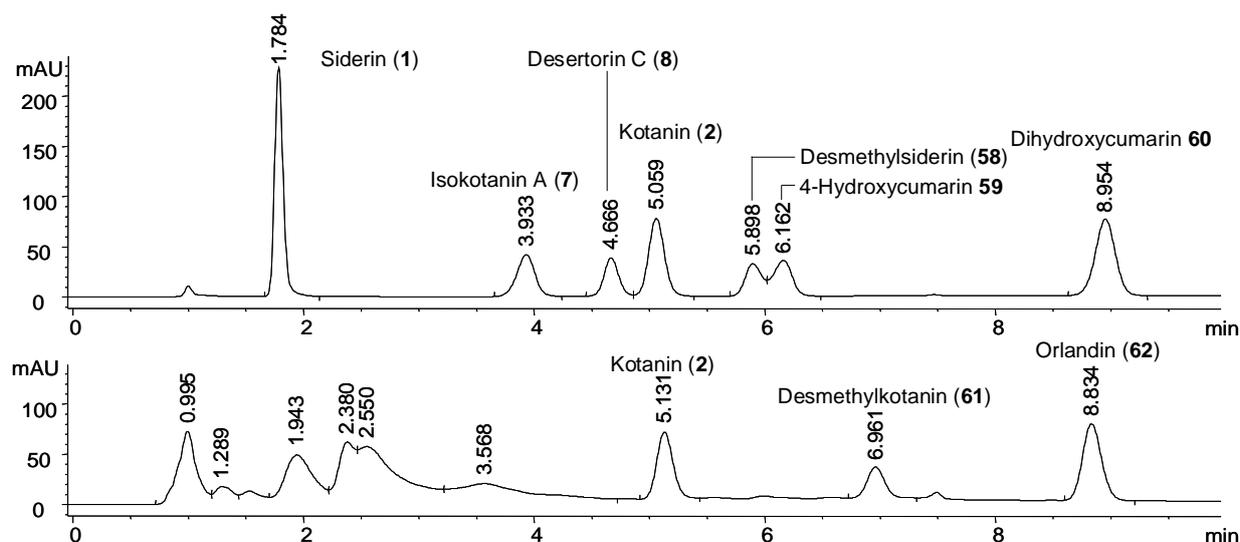


Abb. 69: SiO₂-HPLC-Assay; **oben:** Chemisch synthetisierte Cumarine; **unten:** *A. niger*-Rohextrakt. (Säule: 250 × 3 mm, LiChrospher® Si60, 5 µm Partikelgröße; mobile Phase: Chloroform (1 % Ameisensäure) / Methanol-Gradient).

4.3.3.3 Methoden zum Screenen von Pilz-Genbanken

Mit 28 min je Probe ist die Laufzeit des RP-18-HPLC-Assays relativ lang. Der Normalphasen-Assay erlaubt mit 10 min je Probe schon die Analyse einer Serie von Proben

ⁱ Toluol kann wegen der UV-Absorption im Detektionsbereich nicht eingesetzt werden.

innerhalb weniger Stunden. Um eine Pilz-Genbank aus mehreren tausend Proben in wenigen Wochen zu screenen werden aber wesentlich kürzere Laufzeiten benötigt. Für eine zeitliche Optimierung wurden daher die in beiden Assays verwendeten 25 cm langen Säulen durch 6 cm lange Säulen mit gleicher stationärer Phase ersetzt. Die 2 cm langen Vorsäulen wurden zum Schutz der Hauptsäulen und zur Vortrennung der Verbindungen beibehalten. Durch die Verkürzung der Säulenlänge ist der Flusswiderstand im System erheblich vermindert, so dass bei der Optimierung der mobilen Phase die Flussrate deutlich vergrößert werden konnte. Das Potential zur Retentionszeitverkürzung war besonders beim RP-18 System eindrucksvoll (Abb. 70). Obwohl die Methode von 28 min auf 2 min verkürzt wurde, werden die vollständig methylierten Cumarine sowie Desmethylokotanin (**61**) im Chromatogramm als einzelne Peaks aufgelöst (Abb. 71, links). Nur bei den Hydroxycumarinen **58** - **60** und **62** kommt es zu Überlagerungen.

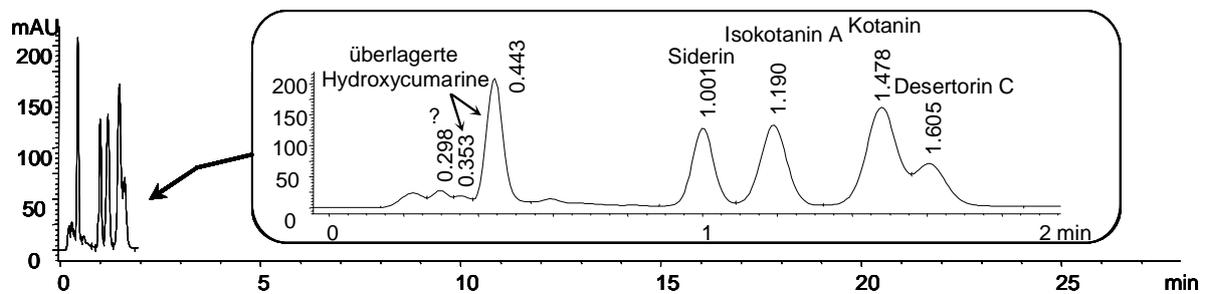


Abb. 70: Durch Verkürzen der Säule und Optimierung des Laufmittelgradienten konnte die Methode des RP-18-Assays von 25 min auf 2 min reduziert werden. (Zum Injizieren einer Probe wird eine weitere Minute benötigt).

Die Methode des Normalphasen-Assays wurde von 10 min auf 2.5 min verkürzt. Hier werden nach wie vor alle Verbindungen des Referenzgemischs aufgelöst (Abb. 71, rechts). Allerdings eluieren die einzelnen Peaks relativ breit.

Gleichzeitig wurden miniaturisierte *Aspergillus*-Kulturmethoden (1 ml, auch in "Deep-Well"-Mikrotiterplatten möglich) und ein vereinfachtes Extraktionssystem (16 h Inkubation mit 0.5 ml Essigsäureethylester, Injektion in HPLC ohne weitere Aufarbeitung) erprobt (vgl. Abschnitt 5.2.3.1, S. 170). Die Analyse eines solchen Extrakts von *A. niger* ist in Abb. 71, rechts unten, gezeigt. Auch wenn die Intensität der einzelnen Peaks etwas geringer ist als bei den aufkonzentrierten Extrakten, sind die Peaks der Cumarine gut aufgelöst.

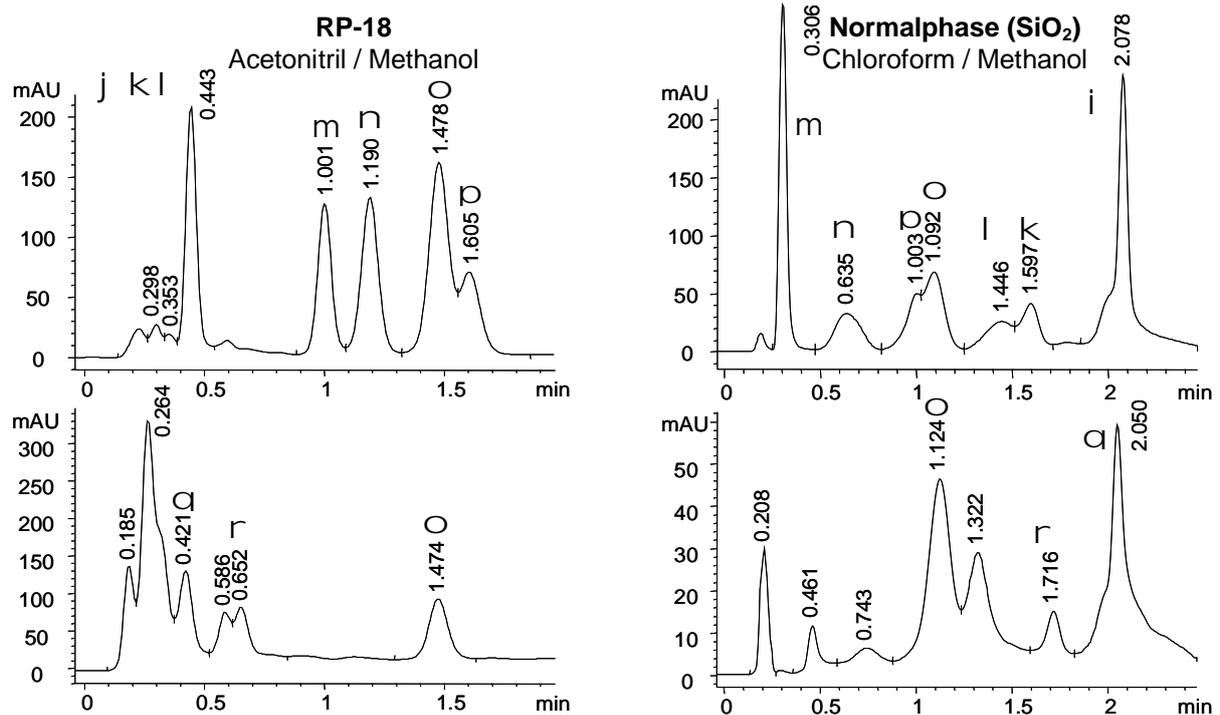


Abb. 71: RP-18- und Normalphasen-HPLC-Assays für Screening mit 6 cm Säulen; **oben:** Chemische Referenzsubstanzen; **unten:** *A. niger*-Rohextrakte, *links:* ca. 10 × aufkonzentriert; *rechts:* direkte Injektion eines 0.5 ml-Essigsäureethylester-Extrakts (Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen der Intensitätsachsen). **Substanzen:** j Dihydroxycumarin **60**, k 4-Hydroxycumarin **59**, l Desmethylsiderin (**58**), m Siderin (**1**), n Isokotanin A (**7**), o Kotanin (**2**), p Desertorin C (**8**), q Orlandin (**62**), r Desmethylkotanin (**61**).

Mit dem hier vorgestellten analytischen Assay sollte es möglich sein ein hohes Probenaufkommen von mehreren tausend Stämmen in einer angemessenen Zeit zu screenen (Abb. 72). Werden 4000 Stämme analysiert, ergibt sich mit dem Normalphasen-Assay eine reine Messzeit von $4000 \times (2.5 + 1.0_{(\text{Injektion})}) \text{ min} = 14\,000 \text{ min} \approx 10 \text{ Tage}$. Für einen sicheren Nachweis der Phenolkupplung muss wahrscheinlich ein Verfütterungsexperiment mit dem Hydroxycumarin Desmethylsiderin (**58**) durchgeführt werden. Wird der Normalphasen-Assay verwendet, kann der Rohextrakt direkt analysiert werden. Beim RP-18-Assay sollten Hydroxycumarine zuvor vollständig methyliert werden, da diese sonst nicht eindeutig zugeordnet werden können.

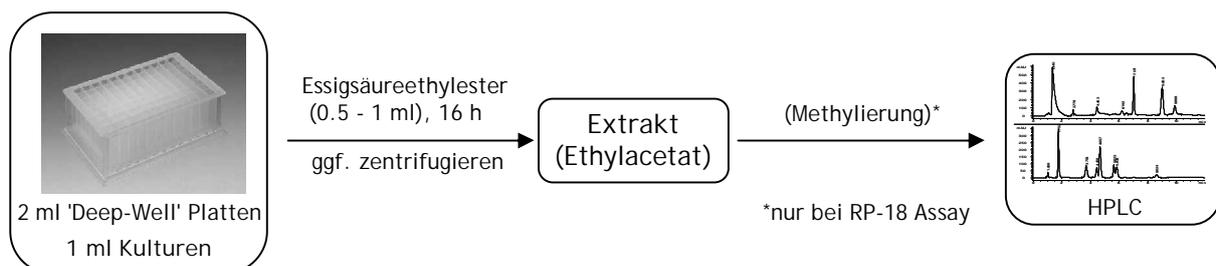


Abb. 72: Schematische Darstellung des geplanten Screenings.

4.3.3.4 Vergleichende Übersicht über die HPLC-Assays

Säule*	25 cm, RP-18 (LiChrospher® 100 RP-18-EC, 250 × 3 mm; 5 µm Partikelgröße)	25 cm Normalphase (SiO₂) (LiCHROSPHER® Si60, 250 × 3 mm; 5 µm Partikelgröße)
Laufmittel	Acetonitril / Wasser - Gradient	Chloroform (1 % Ameisensäure) / Methanol - Gradient
Flussrate	0.5 - 0.6 ml / min	1.5 ml / min
Probenlaufzeit**	28 min	10 min
Trennung	Basislinientrennung für vollständig methylierte Cumarine und Desmethylkotanin (61). Problematisch bei Hydroxycumarinen, besonders Orlandin (62) und Desmethylsiderin (58)	Teilweise Überlagerungen von Desmethylsiderin (58) und 7-Methoxycumarin 59 sowie Dihydroxycumarin 60 und Orlandin (62) stören in der Regel nicht. Basislinientrennung für die anderen Cumarine im Test.
Trennstufenzahl***	3500 (Orlandin 62) - 50000 (Desertorin C 8)	2700 (Siderin 1) - 13500 (Orlandin 62)
Reproduzierbarkeit	Ausreichend Säule benötigt lange Vorlaufzeit zum Einstellen des Gleichgewichts. Trotzdem kann es zu unterschiedlichen Retentionszeiten kommen. Referenzlauf immer notwendig. Retentionszeit von 4-Hydroxycumarin 59 ist nicht reproduzierbar	Gut
Säule*	6 cm, RP-18 (LiChrospher® 100 RP-18-EC, 60 × 3 mm; 5 µm Partikelgröße)	6 cm Normalphase (SiO₂) (LiCHROSPHER® Si60, 60 × 3 mm; 5 µm Partikelgröße)
Laufmittel	Acetonitril (45 %) / Wasser	Chloroform (1 % Ameisensäure) / Methanol - Gradient
Flussrate	1.8 ml / min	2.5 ml / min
Probenlaufzeit**	2 min	2.5 min
Trennung	Keine Trennung bei Hydroxycumarinen außer Desmethylkotanin (61). Teilweise Überlagerung von Kotanin (2) - Desertorin C (8).	Alle Peaks sind aufgelöst. Teilweise Überlagerung von: Desertorin C (8) - Kotanin (2); Desmethylsiderin (58) - 4-Hydroxycumarin 59; Orlandin (62) - Dihydroxycumarin 60.
Trennstufenzahl***	550 (Orlandin 62) - 1500 (Desertorin C 8)	245 (Siderin 1) - 2180 (Orlandin 62)
Reproduzierbarkeit	Gut	Gut

Tabelle 3: *Bei allen Methoden wird eine Vorsäule von 20×3 mm mit der gleichen stationären Phase wie in der Hauptsäule vorgeschaltet. **Für die Injektion einer Probe wird eine zusätzliche Minute benötigt. Bei den 25 cm Säulen wird zwischen den Probenläufen eine Spülzeit von fünf Minuten eingerichtet. ***Maß für die Trennleistung. Gibt das Verhältnis von Gesamtretentionszeit t_{m+s} und Halbwertsbreite des Peaks $b_{0,5}$ wieder (Trennstufenzahl $n = 5.54 \cdot [t_{m+s} / b_{0,5}]^2$).¹¹⁴

4.3.4 Methoden zur Bestimmung der Chiralität

Die Besonderheit der oxidativen Phenolkupplung in filamentösen Pilzen und anderen Organismen ist ihre hohe Regio- und Stereoselektivität. Für die korrekte Auswertung von Versuchen zur oxidativen Phenolkupplung ist es daher essentiell, nicht nur die katalytische Aktivität, sondern auch die Selektivität leicht und schnell bestimmen zu können. Die *Regioselektivität* kann im Falle der vollständig methylierten Cumarine Kotanin, Isokotanin A und Desertorin C bereits über die im vorigen Abschnitt besprochenen HPLC-Methoden bestimmt werden. Möglicherweise können die Assays auch um weitere Regioisomere ergänzt werden. Kompliziertere Einzelfälle können NMR-spektroskopisch aufgeklärt werden.

Für die Bestimmung der *Stereoselektivität* stehen HPLC an chiraler Phase und chiroptische Methoden wie Polarmetrie und Circular dichroismus zur Verfügung. Die Drehwertbestimmung spielt dabei eine eher untergeordnete Rolle, da bei Verwendung gewöhnlicher Polarimeter relativ große Substanzmengen ($>10^3 \mu\text{g}$) benötigt werden. Für CD-Spektroskopie liegt die benötigte Substanzmenge etwa im einstelligen μg -Bereich, für HPLC an chiraler Phase liegt sie etwa eine Größenordnung darunter.ⁱ

4.3.4.1 HPLC an chiraler Phase am Beispiel von Kotanin

Die beste Trennung der Atropisomere von Kotanin (**2**) wird mit einer CHIRAPAK[®] AD-H Säule (DAICEL) bei leichter Kühlung ($10 \text{ }^\circ\text{C}$) erreicht. Als Laufmittel wird Isohexan / 2-Propanol im Verhältnis 75 : 25 verwendet. Da die Peaks trotz der großen Breiteⁱⁱ und des leichten "Tailing"-Effekts Basislinien-aufgelöst sind, können Enantiomerenüberschüsse von Kotanin (**2**) präzise bestimmt werden.

ⁱ Zugrundeliegende Annahmen (für Bicumarine): CD-Spektroskopie: 2 ml Probe ($5 \times 10^{-6} \text{ mol / l}$); HPLC: 50 μl Probe ($5 \times 10^{-5} \text{ mol / l}$).

ⁱⁱ Trotz der großen Retentionszeiten von 54 min und 69 min für *P*-(+)- und *M*-(-)-Kotanin (**2**) betragen die Trennstufenzahlen n nur 1800 und 1600.

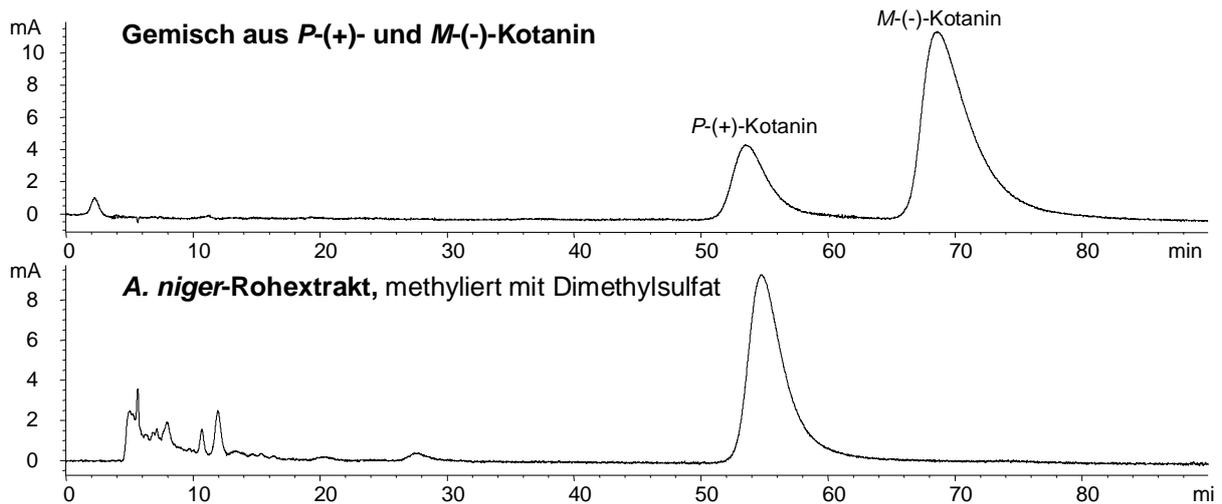


Abb. 73: Analyse von Kotantinproben mit HPLC an chirler Phase. Der Enantiomerenüberschuss für natürliches (+)-Kotantin (**2**) aus *A. niger* ist $\geq 98\%$.

4.3.4.2 CD-Spektroskopie

Circulardichroismus wird hauptsächlich zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von organischen Molekülen und Naturstoffen sowie zur Konformationsanalyse von Proteinen verwendet.^{26b, 115} Stehen zwei Chromophore in einer Nachbarschaft ohne direkte Kopplung in einer chiralen Umgebung – Bei chialen Biarylen sind das $\pi - \pi^*$ - Systeme – kommt es zu einer Excitonen Kopplung. Basis ist eine Dipol-Dipol Wechselwirkung der elektrischen Übergangsdipolmomente der beteiligten Chromophore. Die Kopplung verursacht im CD-Spektrum zwei benachbarte Banden von hoher Intensität mit unterschiedlichem Vorzeichen. Je nach absoluter Konfiguration des Moleküls wird mit zunehmender Wellenlänge erst ein Minimum und dann ein Maximum durchlaufen (positiver Cotton Effekt) oder umgekehrt (negativer Cotton Effekt). Wegen der hohen Intensität des CD-Effekts können Biaryle ohne weitere Derivatisierung CD-spektroskopisch untersucht werden. Darüber hinaus kann über den Cotton-Effekt die absolute Konfiguration an der Biarylachse in der Regel leicht bestimmt werden. Im CD-Spektrum von Kotantin (**2**) sind allerdings mehrere Banden überlagert (Abb. 74). Da die absolute Konfiguration zuvor durch chemische Synthese und Vergleich mit den Drehwerten aus der Literatur bekannt war, war eine genauere Betrachtung beziehungsweise Berechnung der Spektren nicht erforderlich.

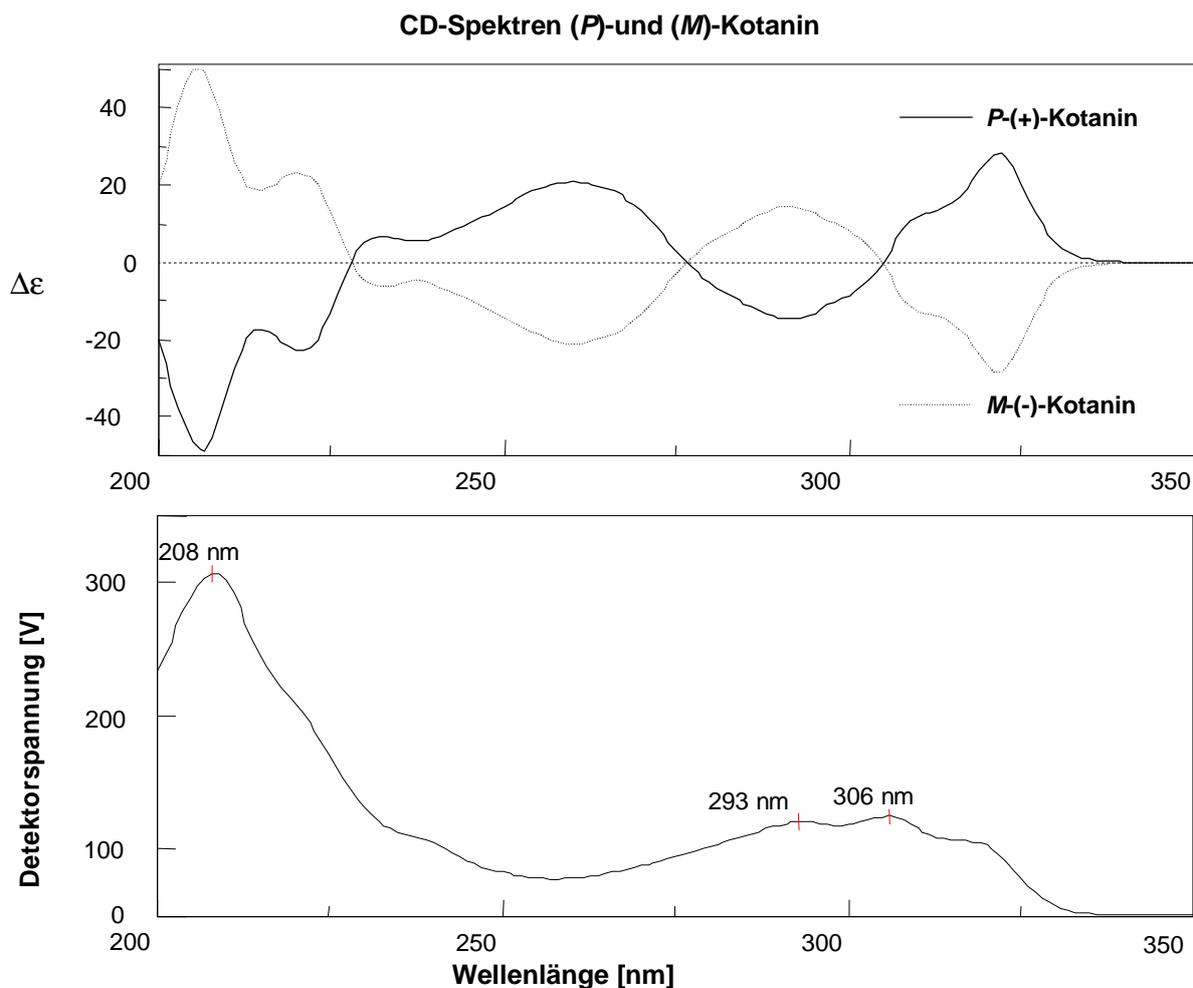


Abb. 74: Oben: CD-Spektren von chemisch hergestelltem (*P*)- und (*M*)-Kotanin (**2**). Gezeigt wird der molare Circular dichroismus $\Delta\epsilon$ [$\text{deg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{dezimol}^{-1}$]. **Unten:** UV-Spektrum, simultan zum CD-Spektrum von (*P*)-Kotanin gemessen.

Die außerordentliche Ähnlichkeit der CD-Spektren der aus *A. niger* isolierten Bicomarine Orlandin (**62**), Desmethylkotanin (**61**) und Kotanin (**1**) zeigt, dass diese Verbindungen homochiral sind (Abb. 75). Dies wurde zusätzlich durch Methylierung von **62** und **61** zu Kotanin (**2**) belegt.

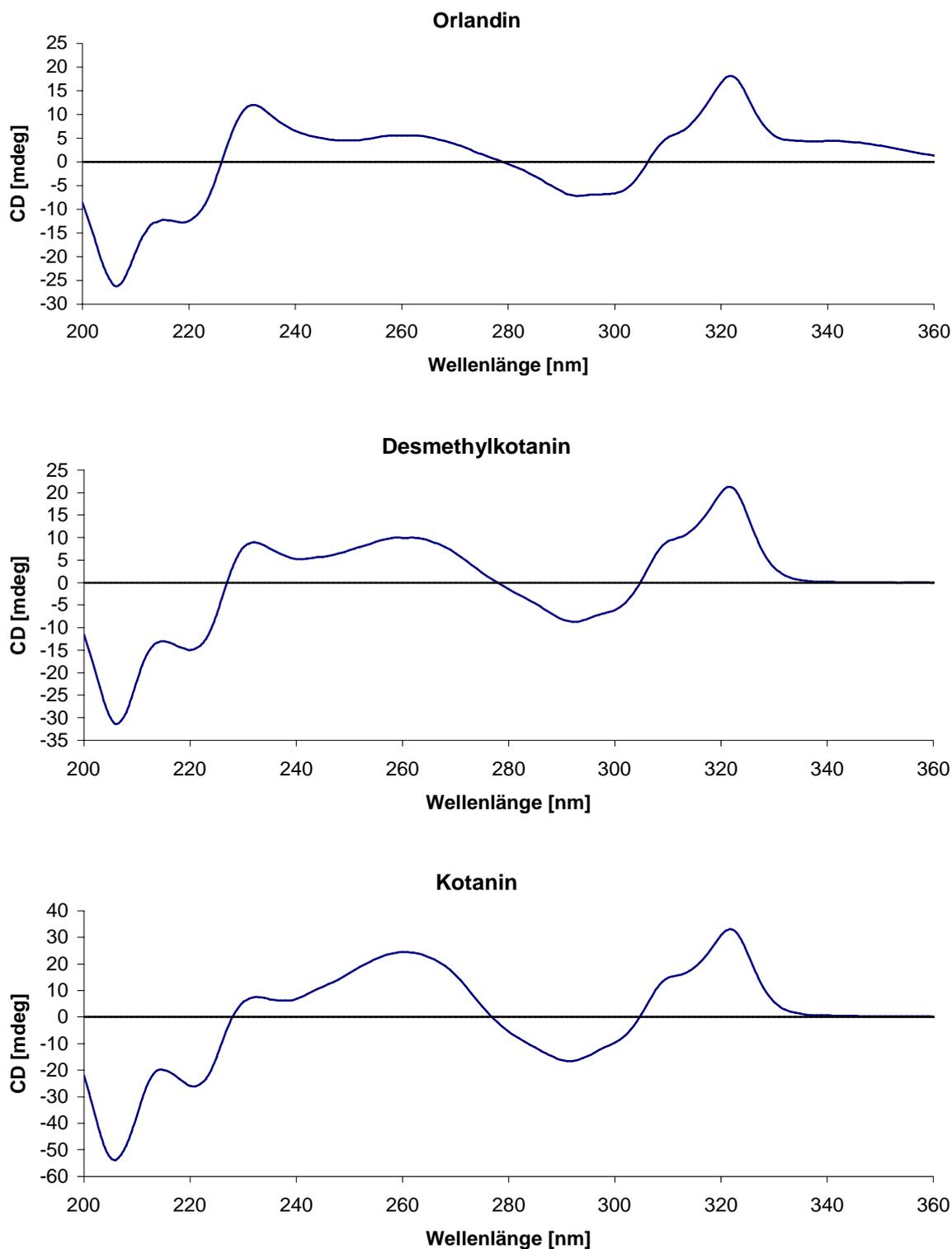


Abb. 75: CD-Spektren der aus *A. niger* isolierten Bicomarine Orlandin (**62**), Desmethylkotanin (**61**) und Kotanin (**2**), aufgenommen in Acetonitril, bei Orlandin (**62**) mit Methanolbeimischung (1 %). Die Intensitätsachse zeigt eine gerätespezifische Einheit. Eine Umrechnung in molare Einheiten ist wegen der eingeschränkten Möglichkeiten zur Bestimmung der Konzentrationen von Orlandin (**62**) und Desmethylkotanin (**61**) nicht sinnvoll. Alle Verbindungen liegen in der *P*-Konfiguration vor.

4.3.5 Bestimmung der Kotaninkonzentration in Lösungen und Rohextrakten

Wegen der geringen Ausbeuten und der zahlreichen Aufreinigungsschritte ist die Bestimmung der Bicumarin-Ausbeute aus Pilzkulturen durch Auswiegen aufwändig und ungenau, oftmals wegen der geringen Substanzmengen sogar unmöglich. Um bessere quantitative Aussagen über die Cumarinbiosynthese machen zu können, werden die analytischen HPLC-Assays mit Kotanin-Stammlösungen kalibriert. Da bisher nur diese Verbindung chemisch synthetisiert wurde, ist eine analoge Kalibrierung mit Desmethylkotanin (**61**) und Orlandin (**62**) nicht möglich. Die Bicumarine zeigen jedoch ein sehr ähnliches UV-Absorptionsverhalten mit Maximum bei 308 nm (HPLC-Dioden-Array-Detektor), so dass in Einzelfällen die Kalibrierung mit Kotanin (**2**) zur Abschätzung der Konzentration dieser Verbindungen verwendet werden kann. Der dabei entstehende Fehler lässt sich nur schwer abschätzen, dürfte aber in vielen Fällen geringer ausfallen als bei Ausbeutebestimmung durch Wägung.

Aus 20 mg hochreinem Kotanin (**2**) wird eine Verdünnungsreihe in Acetonitril beziehungsweise Chloroform angelegt und mit dem oben beschriebenen RP-18- bzw. Normalphasen-Assay vermessen (25 cm Säulen, vgl. Tabelle 1). Die Kotaninpeaks in den Chromatogrammen werden integriert. Die Integrale werden gegen die Konzentration aufgetragen, und es wird eine lineare Regression durchgeführt (Abb. 76). Da für die Umrechnung der CD-Spektren in molare Größen ebenfalls exakte Konzentrationen benötigt werden, wird auch hier die UV-Absorption (\propto Detektorspannung) bei 306 nm kalibriert. Für die Berechnung der Konzentration aus einem gemessenen Integral (Detektorspannung) ergibt sich:

$$c = k \cdot I$$

c: Konzentration [mol / l]

k: Proportionalitätsfaktor

I : Integral (HPLC) beziehungsweise Detektorspannung (CD) [V]

	HPLC RP-18	HPLC Normalphase	Circulardichroismus*
Koeffizient (k)	$4.93 \cdot 10^{-8} \text{ mol / l}$	$1.79 \cdot 10^{-7} \text{ mol / l}$	$4.92 \cdot 10^{-8} \text{ mol / (l} \cdot \text{V)}$
Standardabweichung	$\pm 0.029 \cdot 10^{-8} \text{ mol / l}$ ($\pm 0.59 \%$)	$\pm 0.005 \cdot 10^{-7} \text{ mol / l}$ ($\pm 0.32 \%$)	$\pm 0.058 \cdot 10^{-8} \text{ mol / (l} \cdot \text{V)}$ ($\pm 1.2 \%$)
Linearitätsbereich [mol / l]	$1.0 \cdot 10^{-6} - 5.1 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \cdot 10^{-6} - 3.0 \cdot 10^{-4}$	$2.0 \cdot 10^{-6} - 4.2 \cdot 10^{-4}$

Tabelle 4: Proportionalitätsfaktoren zur Berechnung von Kotaninkonzentrationen. * 1 cm Küvette, Acetonitril.

Da die Streuung der Messwerte nur gering ist, kann die Konzentration von Kotanin (2) in Rohextrakten und anderen Lösungen mit dieser Kalibrierung bis auf etwa 1 % genau bestimmt werden. Allerdings ist bei Rohextrakten zu berücksichtigen, dass der Kotaninpeak von Spuren anderer Verbindungen überlagert sein kann, so dass je nach Beschaffenheit der Probe auch größere Fehler auftreten können. Es bleibt anzumerken, dass die Kalibrierung spezifisch ist, sowohl für den verwendeten Detektor als auch die HPLC-Methode und Säule.

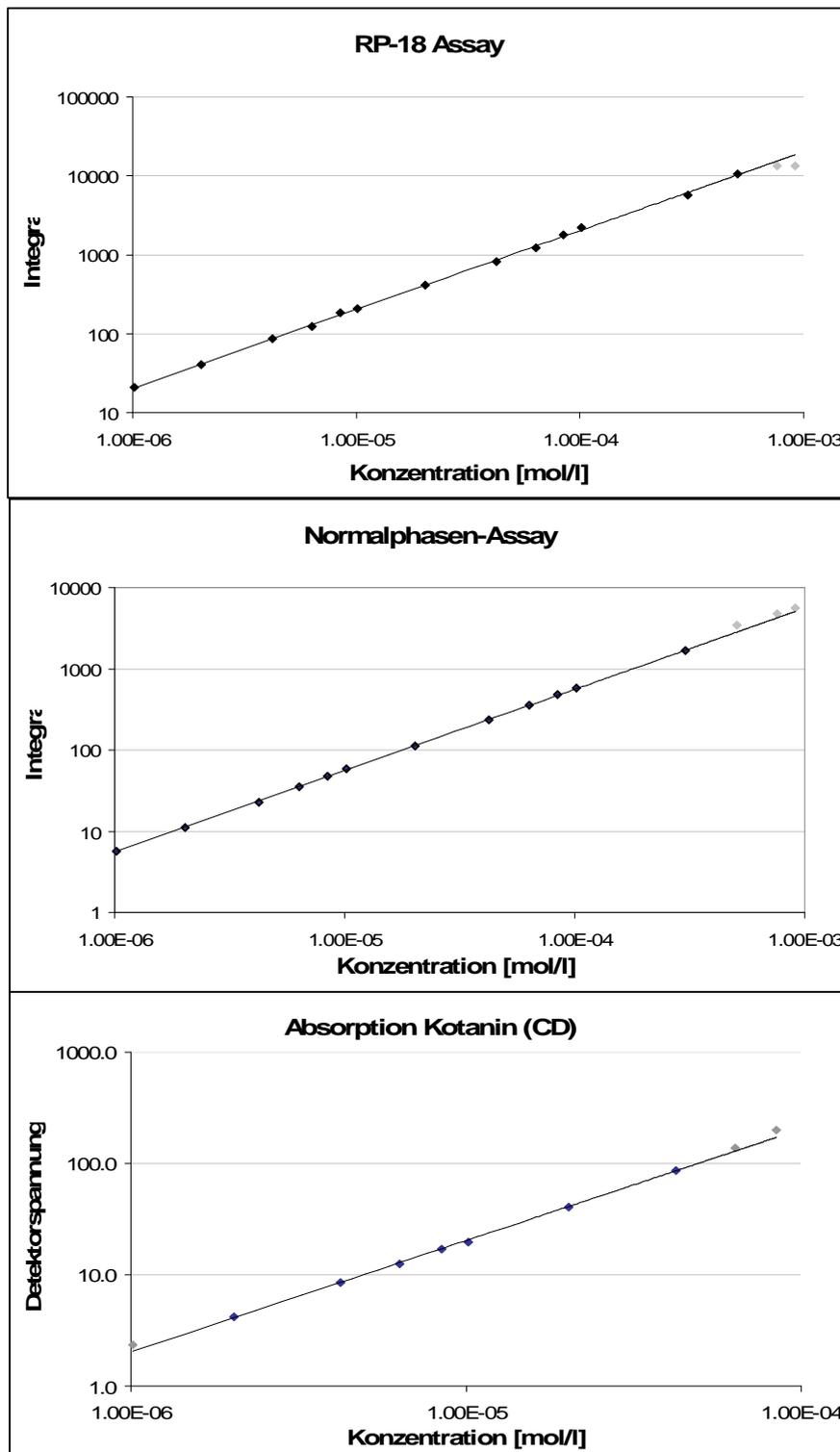


Abb. 76: Auftragung der HPLC-Peakintegrale (308 nm) bzw. der Detektorspannung am CD-Gerät (306 nm) gegen die Kotaninkonzentrationen der Verdünnungsreihe.

Oben: RP-18 Assay;

Mitte: Normalphasen-Assay.

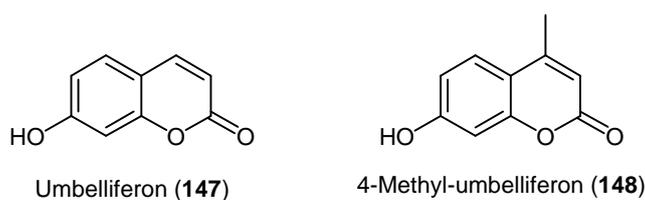
Unten: UV-Absorption im CD-Gerät (1 cm Küvette, Acetonitril).

Um den gesamten Messbereich darstellen zu können, wurde eine doppelt logarithmische Darstellung verwendet.

Besonders bei hohen Konzentrationen kam es zu deutlichen Abweichungen von der Linearität. Um Verfälschungen zu vermeiden, wurden diese Werte (grau) aus der linearen Regression herausgenommen.

4.3.6 Detektion über Fluoreszenz

Fluoreszierende Verbindungen können durch Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge leicht detektiert werden. Die Nachweismethoden sind in der Regel außerordentlich sensitiv und hochselektiv, da unter den gegebenen Bedingungen nur wenige Verbindungen fluoreszieren. Die Fluoreszenzdetektion ist daher den Absorptionsmethoden oftmals überlegen. Auch Cumarine werden standardmäßig als Fluoreszenzsonden für Screenings eingesetzt, wobei besonders die mit den Siderinen verwandten Umbelliferone Verwendung finden.¹¹⁶



Mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors an der HPLC-Anlage wurde daher getestet, ob Fluoreszenzdetektion auch für die hier behandelten Cumarine vorteilhaft ist. In Abb. 77 oben sind Chromatogramme der als Referenz verwendeten Cumarine im Absorptions- und Fluoreszenzmodus übereinander dargestellt, wobei jeweils die vom Gerät vorgegebenen Intensitätseinheiten übernommen wurden. Obwohl eine für die Fluoreszenzdetektion von Kotanin (2) optimierte Einstellung von Anregungs- und Emissionswellenlänge gewählt wurde, sind die Fluoreszenzpeaks der Cumarine bei dieser Skalierung kaum aufgelöst. Völlig anders sieht es bei dem als Fluoreszenzfarbstoff bekannten Umbelliferon (147) aus. In Abb. 77 unten wird das Chromatogramm eines Rohextrakts von *A. niger* NRRL 3122, nach Verfütterung von Umbelliferon (147) gezeigt. Hier ist der Fluoreszenzpeak im selben Skalensystem deutlich intensiver als die Absorptionspeaks. Selbst Spuren von Metabolisierungsprodukten des Cumarins, die im Absorptionschromatogramm nicht mehr aufgelöst sind, sind noch als schwache Peaks erkennbar. Dies zeigt, dass Cumarine von Siderin-Typ, wahrscheinlich sogar alle 4-Hydroxycumarine, im Vergleich zu den strukturell verwandten Umbelliferonen nur sehr schwach fluoreszieren und als Farbstoffe ungeeignet sind. Erst wenn es gelingen sollte, durch Verfütterungsexperimente mit stark fluoreszierenden, nicht natürlichen Cumarinen die entsprechenden Dimere stereoselektiv zu erzeugen, dürfte die Fluoreszenzpektroskopie auch für dieses Projekt an Bedeutung gewinnen. Eine mögliche Anwendung wäre Fluoreszenz-detektierter Circular dichroismus (FD CD), welcher einen hochempfindlichen und hochselektiven Nachweis geeigneter chiraler Verbindungen erlaubt.^{26b, 117}

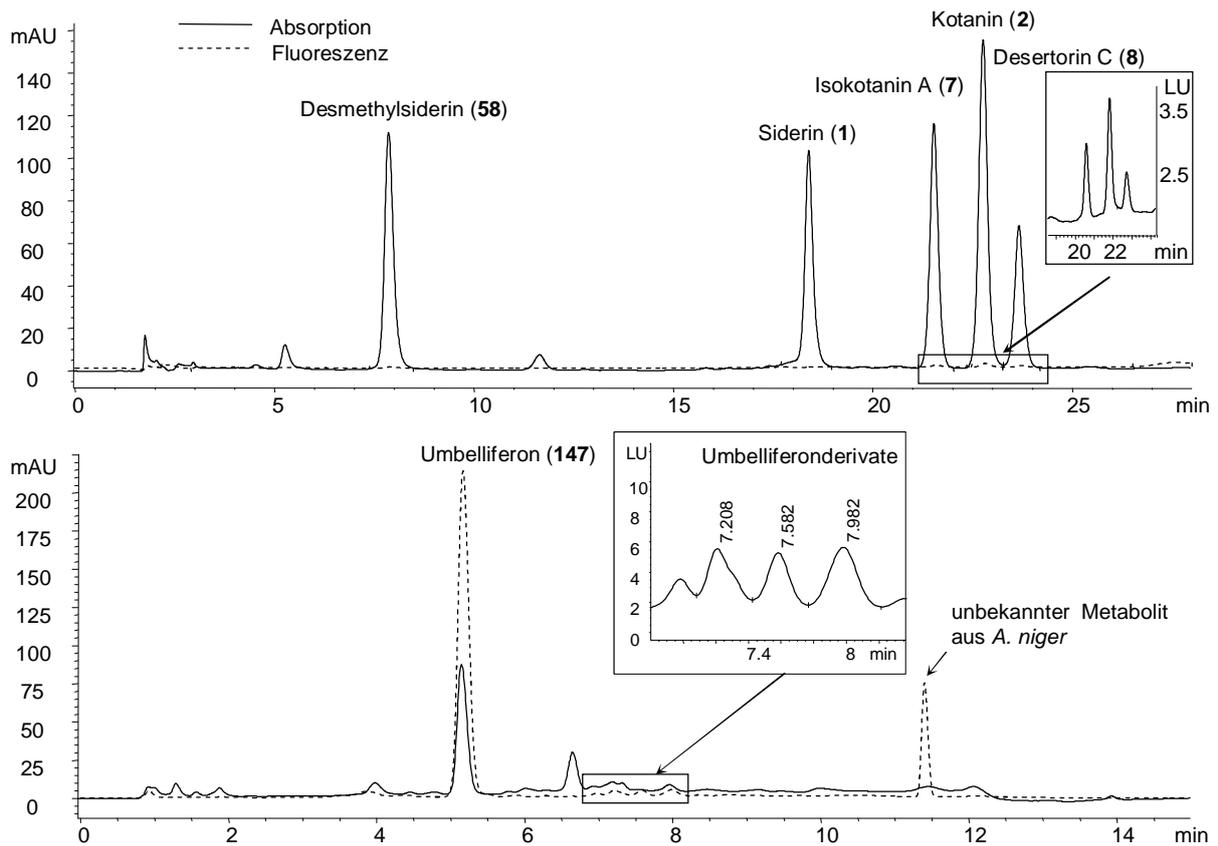


Abb. 77: HPLC-Chromatogramme im Absorptions- und Fluoreszenzmodus überlagert. **Oben:** Coumarine vom Siderin-Typ im RP-18 Assay (Absorption: 308 nm; Fluoreszenz: Anregung: 250 nm, Emission ges. Wellenlängenbereich). **Unten:** Rohextrakt von *A. niger* NRRL 3122 nach Verfütterung von Umbelliferon (147) im Normalphasen Assay (modifiziert). (Absorption: 308 nm; Fluoreszenz: Anregung: 340 nm, Emission: 391 nm).

4.4 Untersuchungen zur Cumarinbiosynthese in Aspergillen

4.4.1 Zusammenfassung

Durch ^{13}C -Verimpfungsexperimente konnte die regio- und stereoselektive oxidative Phenolkupplung in *Aspergillus niger* ATCC 36626 eindeutig bewiesen werden. Als monomeres Vorläufer für den Phenolkupplungsschritt wurde das als natürlicher Metabolit nicht nachweisbare Desmethylsiderin (**58**) identifiziert. Die Stämme *A. niger* "3014" und N 492 produzierten die 8,8'-Bicumarine in ähnlicher Weise wie ATCC 36626. Sie reagierten auf Verfütterung von Desmethylsiderin (**58**) mit stark erhöhter Kotaninproduktion, was einen Einbau des Monomers nahe legt. *A. niger* NRRL 3122 produzierte keine Cumarine, kuppelte aber verimpftes Desmethylsiderin (**58**) stereoselektiv zu Orlandin (**62**). Eine *O*-Methylierung zum Kotanin (**2**) findet jedoch nicht statt. In *A. niger* N 402 wurde dagegen weder eine Produktion von Cumarinen noch eine oxidative Phenolkupplung beobachtet. Ebenfalls negative Ergebnisse wurden bei Versuchen mit *A. nidulans* (R 21, FGSC A26, und WG 355) sowie *A. fumigatus* (ATCC 46645 und FGSC A1100) erzielt. Alle getesteten Aspergillen sind in der Lage, von Siderin (**1**) die Methoxygruppe an Position 7 zu hydrolysieren. Die Ergebnisse sind in Abb. 78 schematisch zusammengefasst.

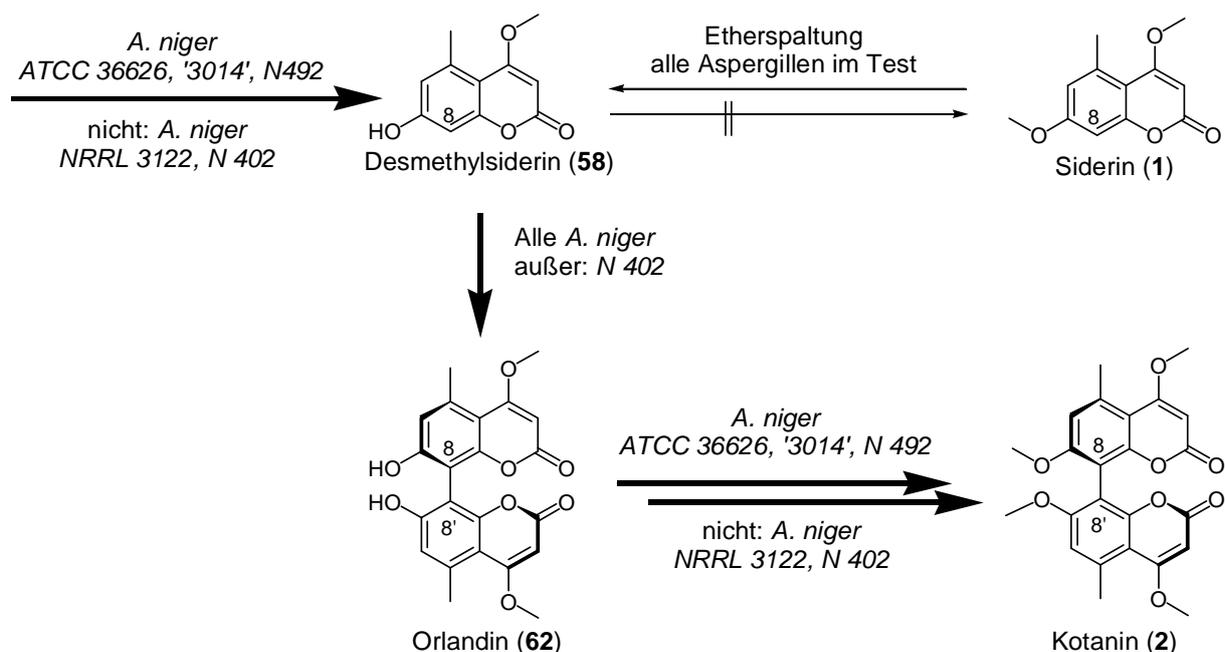


Abb. 78: Übersicht über die von verschiedenen Aspergillen katalysierten Biosyntheseschritte. (Fette Pfeile: Biosyntheseweg)

4.4.2 Zusammenfassung der Literatur

4.4.2.1 Isolierung von Cumarinen aus Aspergillen

Siderin (**1**) und seine Kupplungsprodukte konnten in vielen Aspergillen nachgewiesen werden. Am häufigsten tritt dabei das 8,8'-dimere Kotanin (**2**) auf. (Siehe dazu auch die grafische Übersicht in Abb. 35, S. 34)

Siderin (1)

Siderin (**1**) wurde erstmals 1972 von GONZÁLEZ *et al.*¹¹⁸ als Metabolit der Pflanze *Sideritis canariensis* isoliert. CHEXAL *et al.* gewannen Siderin (**1**) aus dem Pilz *Aspergillus varicolor* IMI 53749.¹¹⁹

8,8'-Bisiderine: Kotanin (2), Desmethylkotanin (61) und Orlandin (62)

Kotanin (**2**) und Desmethylkotanin (**61**) wurden erstmals 1971 von BÜCHI *et al.* aus *Aspergillus clavatus* MIT-M-18 isoliert.⁷⁹ CUTLER *et al.* entdeckten 1979 Orlandin (**62**) in *A. niger* ATCC 36626.¹²⁰ Aus *A. flavus* NRRL 13462 wurden, neben Aflavarin (**68**) auch Kotanin (**2**) und Desmethylkotanin (**61**) isoliert.¹²¹ In *Aspergillus alliaceus* NRRL 315 wurden Kotanin (**2**) und Desmethylkotanin (**61**) neben den Isokotaninen A - C (**7**, **63** und **64**) nachgewiesen.¹²² Ähnlich fiel eine Analyse der Ascostromata⁶¹ des telemorphen Stammes *Petromyces alliaceus* FA 0030 aus, bei der Kotanin (**2**) zusammen mit Isokotanin B (**63**) und 7-O-Desmethyl-3,8'-bisiderin (**67**) gefunden wurde.¹²³ Folgende Stämme wurden ebenfalls als Produzenten von Kotanin (**2**) und Derivaten beschrieben: *A. niger* CBS 101698,¹²⁴ CBS 101705,¹²⁴ CBS 139.52,¹²⁵ CBS 618.78,^{124, 125} und IBT 16066,¹²⁶ *A. lacticoffeatus*¹²⁴ CBS 101884, CBS 101886, CBS 101883, *A. tubingensis* CBS 643.92,¹²⁵ *A. ustus* IBT 14925,^{126, 127} *A. vadensis* CBS 113365 ("Orlandin-ähnliche Verbindung").¹²⁴ *A. niger* Stämme, die einen Test auf 8,8'-Bicumarine durchlaufen haben, ohne dass diese Verbindungen nachgewiesen wurden, sind: CBS 101699,¹²⁴ CBS 120.49 (= N 400),^{124, 125} CBS 420.64,¹²⁴ CBS 557.65,¹²⁴ IBT 15952.¹²⁶

6,6'-Bisiderine: Isokotanin A (7), Isokotanin B (63), Isokotanin C (64),

Die Isokotanine A, B und C (**7**, **63** und **64**) wurden erstmals 1994 von GLOER *et al.*¹²² aus den Sklerotien⁶¹ von *Aspergillus alliaceus* NRRL 315 isoliert. Daneben wurden auch Kotanin (**2**) und Desmethylkotanin (**61**) gefunden. Alle drei Isokotanine (**7**, **63** und **64**) waren optisch aktiv. Eine Methylierung von isoliertem Isokotanin B (**63**) ergab (+)-Isokotanin A [(+)-**7**],

also dieselbe Konfiguration, die auch aus *A. alliaceus* isoliert worden war. Die Methylierung von Isokotanin C (**64**) ergab hingegen (-)-Isokotanin A [(-)-7]. Das bedeutet, dass Isokotanin C (**64**) in der entgegengesetzten Konfiguration zu den Isokotaninen A und B (**7** und **63**) vorliegt. Als eine mögliche Erklärung für diese unerwartete Beobachtung vermuten die Autoren, dass bei der Biosynthese zunächst beide Atropisomere des Isokotanin C (**64**) gebildet werden. Eine stereospezifische Methylierung von **64** führe dann dazu, dass die Isokotanine A und B (**7**, **63**) in der einen Konfiguration vorliegen, während das nicht umgesetzte Isokotanin C (**64**) der entgegengesetzten Konfiguration angereichert wird.

Unabhängig davon fanden NOZAWA *et al.*¹²³ im selben Jahr Isokotanin B (**63**), Kotanin (**2**) und 7-*O*-Desmethyl-3,8'-bisiderin (**67**) nebeneinander in den Ascstromata des teleomorphen *Petromyces alliaceus*.

3,3'-Bisiderin: Bicumanigron (69)

Bicumanigron (**69**) wurde aus einem *A. niger*-Stamm extrahiert, der aus dem marinen Schwamm *Axinella damicornis* isoliert worden war.¹²⁸ **69** ist das einzige natürliche Bisiderin, für das keine optische Aktivität festgestellt werden konnte ($[\alpha]_D^{20} = 0$).

6,8'-Bisiderine: Desertorin A (66), Desertorin B (65) und Desertorin C (8)

Desertorin C (**8**), das 6,8'-Dimer des Siderins (**1**), sowie dessen demethylierte Derivate Desertorin A (**66**) und Desertorin B (**65**) wurden im Jahre 1986 von KAWAI *et al.*¹²⁹ aus *Emericella desertorum* CBS 653.73 (Anamorph: *Aspergillus*) isoliert.

3,8'-Bisiderine: Aflavarin (68) und 7-*O*-Desmethyl-3,8'-bisiderin (67)

Aflavarin (**68**), ein 3,8'-Bisiderin, das an einer der (5,5')-Methylgruppen hydroxyliert ist (Abb. 35, S. 34), wurde aus Sklerotien⁶¹ von *A. flavus*. NRRL 13462 zusammen mit Kotanin (**2**) isoliert.¹²¹ 7-*O*-Desmethyl-3,8'-bisiderin (**67**) wurde neben Kotanin (**2**) und Isokotanin B (**63**) als Sekundärmetabolit in den Ascstromata von *Petromyces alliaceus* FA 0030 identifiziert.¹²³

4.4.2.2 Physiologische Bedeutung der Cumarine

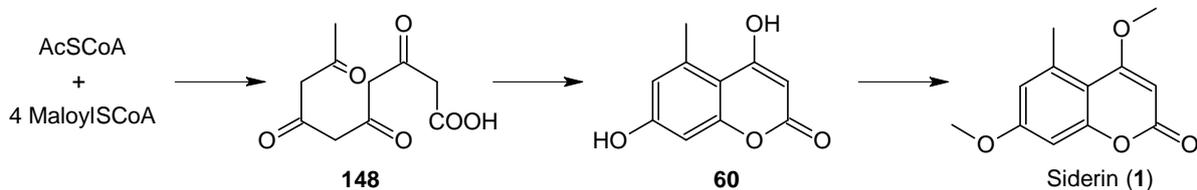
Über die physiologische Bedeutung der Cumarine in Aspergillen ist bisher wenig bekannt. Aflavarin (**68**) und in geringerem Maße auch die Isokotanine B und C bieten Schutz gegen den fungivoren Käfer *Carpophilus hemipterus*.^{121, 122} Bei Kotanin (**2**), Desmethylkotanin (**61**) und Isokotanin A (**7**) sind erheblich höhere Dosen erforderlich um eine nachweisbare

Wirkung zu erzielen. Toxikologische Untersuchungen ergaben, dass Orlandin (**62**) auf Weizen wachstumshemmend wirkt, aber ungiftig für Hühnerküken ist. Bei Kotanin (**2**) ist die Wirkung genau umgekehrt ($LD_{100} = 62.5 \text{ mg / kg}$). Im Ratten-Assay ist Kotanin (**2**) ungiftig.¹²⁰

4.4.2.3 Untersuchungen zur Biosynthese

Als möglichen biosynthetischen Ursprung von Siderin (**1**) schlug LAPPER¹³⁰ vor: a) die Transformation der fünfgliedrigen Polyketidkette **148** zu 4,7-Dihydroxycumarin **60** und anschließende Methylierung zu Siderin (**1**), oder b) den Shikimat-Biosyntheseweg, wobei Siderin (**1**) aus Prephensäure (**149**) über Umbelliferon (**147**) gebildet wird.

a) Polyketidbiosyntheseweg:



b) Shikimat Biosyntheseweg:

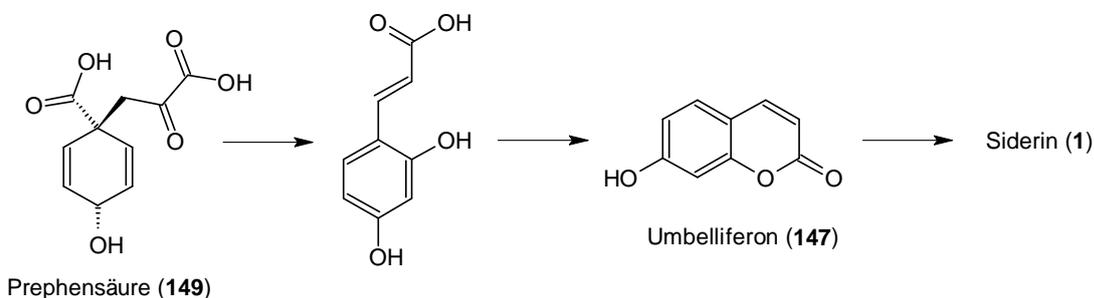


Abb. 79: Mögliche Biosynthesewege des Siderins (**1**) nach LAPPER.¹³⁰

Während Weg b) für den Sekundärmetabolismus von Pilzen von eher geringer Bedeutung sei, widerspreche Weg a) der Regel von TURNER,¹³¹ nach der es Voraussetzung für die Cyclisierung einer Poliketidkette sei, dass die vom Methylende ausgehenden acyclischen Restgruppen nicht kürzer sind, als die Restgruppen am Carboxylende.

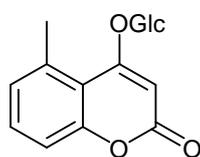
In einem Markierungsexperiment zur Bestimmung des Biosyntheseweges wurde $[2-^{14}\text{C}]$ -Acetat von *A. varicolor* zu 0.75 % in Siderin (**1**) eingebaut.¹³⁰ Kuhn-Roth-Oxidation des markierten Metaboliten ergab Essigsäure, die als *p*-Bromphenylacetat isoliert und untersucht wurde. Die dabei gemessene Radioaktivität lag bei 25.8 % der des Ausgangsmaterials. Würde $[2-^{14}\text{C}]$ -Acetat gleichmäßig in ein Pentaketid eingebaut, ist für jede Acetat-Einheit eine Aktivität von 20 % zu erwarten. Die erhöhte Radioaktivität im Experiment lasse sich dadurch

erklären, dass bei der Abbaureaktion nur die erste Acetatgruppe der Kette freigesetzt werde, bei der die Radioaktivität häufig erhöht sei. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren, dass Siderin (**1**) über den Polyketid-Biosyntheseweg erzeugt wird.

STOTHERS und STOESSL¹³² führten ¹³C- und ¹⁴C-Einbauxperimente an dem Kotanin-produzierenden Pilz *Aspergillus niger* ATCC 36626 durch, der auch für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Biosyntheseuntersuchungen verwendet wurde. Verimpft wurden [1,2-¹³C₂]-Acetat und L-[1-¹⁴C]-Phenylalanin in relativ hoher Konzentration (jeweils 5 mM). Trotz Optimierung des Mediums wurde für Acetat nur eine Einbaurrate von 0.18 % in Kotanin (**2**) erzielt. Das ¹³C-NMR-Spektrum belegte, dass die Acetat-Einheiten unzersetzt inkorporiert wurden. Daneben wurde allerdings auch eine schwache Radioaktivität des Produkts festgestellt, die etwa einer spezifischen Einbaurrate von 0.05 % ¹⁴C-Phenylalanin entsprach. Als Einbaueffizienzen ergeben sich damit bei Acetat 0.01 % für jede der 20 möglichen Positionen und bei Phenylalanin 0.003 % für jede der beiden Positionen. Aufgrund der geringen Substanzmenge und der geringen Einbauraten war es nicht möglich festzustellen, ob Phenylalanin unzersetzt in Kotanin (**2**) eingebaut wurde. Die Autoren vermuten, dass die Aminosäure vom Pilz zunächst zu Essigsäure abgebaut und dann in Kotanin (**2**) inkorporiert wurde.

Auch wenn mit diesem Experiment sicher gezeigt werden konnte, dass Acetat unzersetzt in Kotanin (**2**) eingebaut wird, erlauben die außerordentlich geringen Inkorporationsraten keine eindeutige Antwort auf die Frage, ob Kotanin (**2**) hauptsächlich, beziehungsweise ausschließlich über einen Polyketidbiosyntheseweg synthetisiert wird.

In Pflanzen findet die Cumarinbiosynthese gewöhnlich über den Shikimat-Biosyntheseweg statt.¹³³ Die 4-Hydroxycumarine, zu denen auch Siderin (**1**) gehört, bilden aber offensichtlich eine Ausnahme. INOUE *et al.* wiesen für die Biosynthese des Glucosids von 4-Hydroxy-5-methylcumarin (**150**) in *Gerbera jamesonii* einen polyketidischen Ursprung nach, in dem sie radioaktiv markiertes Acetat, Malonat und L-Phenylalanin verimpften.¹³⁴ Während bei den Substraten für eine polyketidische Biosynthese eine Inkorporation trotz sehr geringer Einbauraten ([1-¹⁴C]-Acetat: 0.015 %, [2-¹⁴C]-Malonat: 0.066 %) eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurde bei L-[U-¹⁴C]-Phenylalanin keine Inkorporation festgestellt (Einbaurrate < 0.001 %).



4-Hydroxy-5-methylcumarin-glucosid (**150**)

aus *Gerbera jamesonii*

In Streptomyceten werden 4,7-Dihydroxycumarine auch aus der aromatischen Aminosäuren Tyrosin (**151**) synthetisiert (Abb. 80).¹³⁵

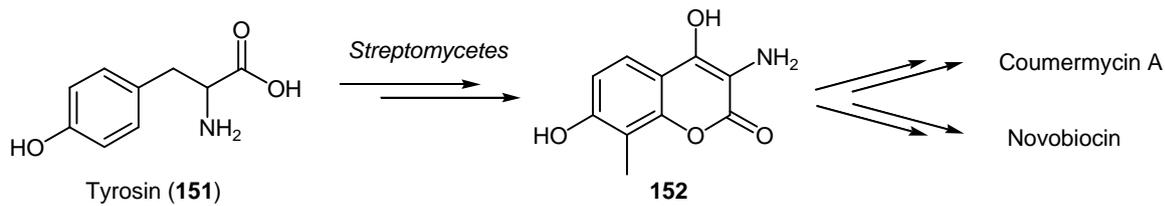


Abb. 80: Cumarinbiosynthese aus Tyrosin in *Streptomyces*.

Die Frage der oxidativen Phenolkupplung bei der Biosynthese der Bicumarine wurde in der Literatur bisher nicht behandelt.

4.4.3 *Aspergillus niger* ATCC 36626

A. niger ist ein in der Natur weit verbreiteter Schimmelpilz, der auch häufig an Lebensmitteln wie Reis, Getreide, Nüssen oder Trockenfrüchten gefunden wird.^{136b} Trotzdem geht für den Menschen durch *A. niger* nur eine geringe Gefahr aus, da der Pilz für gesunde Menschen nicht pathogen ist und die meisten Stämme keine giftigen Sekundärmetabolite produzieren.ⁱ *A. niger* wird daher der Risikogruppe 1 zugeordnet.¹³⁷ Definierte Stämme wie *A. niger* NRRL 3122 sind als GRAS (Generally Regarded As Safe) eingestuft und werden biotechnologisch eingesetzt.¹³⁶ *A. niger* ist Gegenstand zahlreicher molekularbiologischer und biotechnologischer Untersuchungen.

4.4.3.1 Kultur von *A. niger* ATCC 36626

Für eigene Verfütterungsexperimente wurde das von STOTHERS und STOESSL¹³² für Verimpfungsexperimente eingesetzte Medium (Czapek Dox Medium, angereichert mit 2 % Corn Steep Liquor) übernommen, das im folgenden als "Standardmedium" bezeichnet wird. Anders als von den Autoren behauptet, war die Produktion der dimeren Cumarine damit gut reproduzierbar.

Für die Anzucht von *A. niger* wurde zunächst eine Kombination aus Schüttel- und Stehendkultur verwendet. Dabei werden die Kulturen zunächst für zwei Tage bei 30 °C geschüttelt, um die Myzelbildung zu beschleunigen. Anschließend wird, analog zu der Methode von STOTHERS und STOESSL, bei Raumtemperatur stehend inkubiert. Innerhalb

ⁱ Ein "geringer Prozentsatz" der Stämme verfügt über die Fähigkeit Ochratoxin A zu produzieren.^{136b}

weniger Tage bildet sich an der Oberfläche eine geschlossene Myzelschicht aus, Sporen werden gebildet und Bicumarine können nachgewiesen werden. Unter diesen Kulturbedingungen wurde das erste Verfütterungsexperiment erfolgreich durchgeführt. Weitere Untersuchungen zeigten aber, dass die Biosynthese von Bicumarinen deutlich gesteigert wird, wenn die Kultur von Anfang an auf eine erhöhte Sporenbildung ausgerichtet ist. Daher wurde auf die Schüttelphase verzichtet und in Zellkulturflaschen (siehe Fotos in Abb. 82) inkubiert, die eine maximale Oberfläche gewährleisten (Abb. 81). Für die Cumarinausbeute ist es unwesentlich, ob die Kulturen bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) oder bei 30 °C inkubiert wurden. Allerdings ist das Wachstum bei höherer Temperatur stark beschleunigt. Typische Produktkonzentrationen sind: Kotanin (**2**) 10 mg / l, Desmethylkotanin (**61**) 1 mg / l, Orlandin (**62**) 5 mg / l. Wegen der geringen Konzentrationen und mangels eines exakten UV-Essays ist eine exakte Bestimmung der Ausbeuten für Desmethylkotanin (**61**) und Orlandin (**62**) allerdings nur schwer möglich.

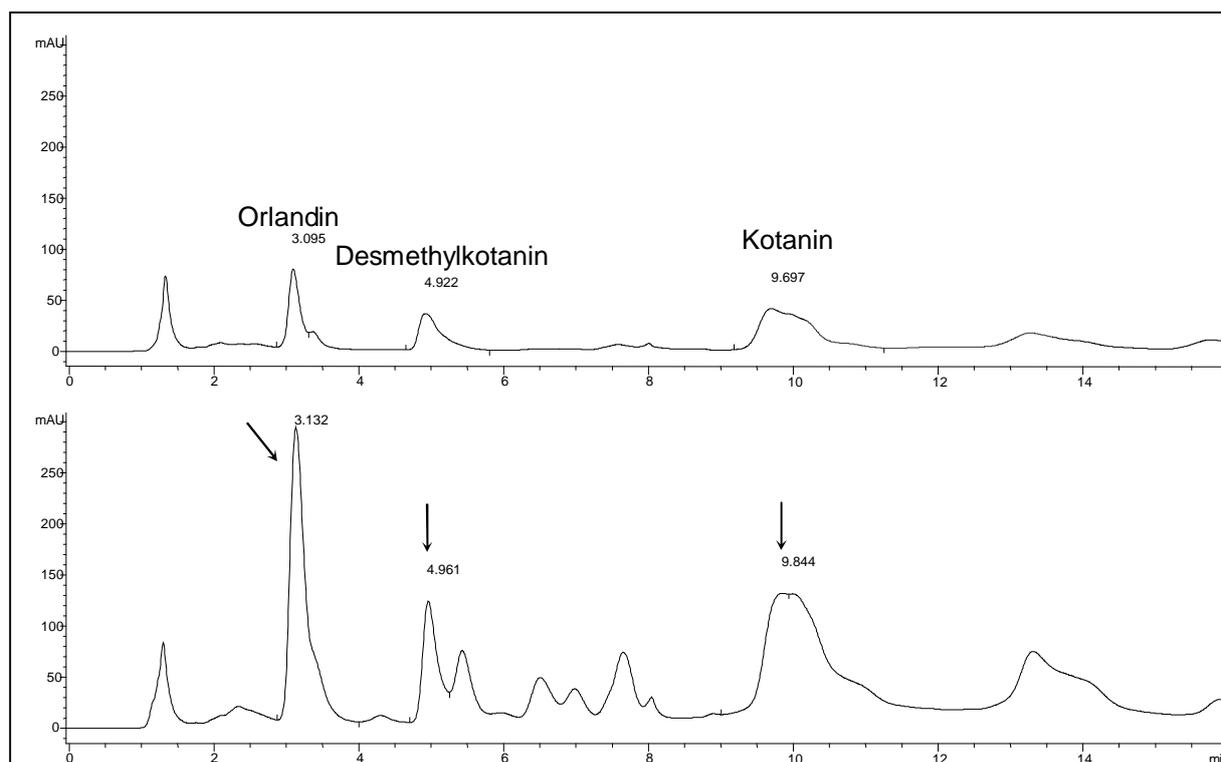


Abb. 81: Vergleich der Cumarinausbeuten. **Oben:** Stehendkultur in Erlenmeyerkolben mit vorgeschalteter zweitägiger Schüttelphase (2 d 30 °C, anschließend 8 d Raumtemperatur). **Unten:** Stehendkultur in Zellkulturflaschen (10 d, 30 °C).

Für Stehendkulturen wurde der zeitliche Verlauf der Cumarinproduktion untersucht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Bicumarinbiosynthese mit der Bildung der schwarzbraunen Konidien assoziiert ist, und nicht proportional zum Myzelwachstum verläuft (Abb. 82).¹³⁸ Die Produktion der Cumarine setzt nach zwei Tagen ein und ist nach vier Tagen so gut

wie abgeschlossen, während die Myzelmasse schon nach etwa zwei Tagen konstant bleibt. Auf eine Zugabe der monomeren Cumarine kann daher während der ersten Kulturphase verzichtet werden, wenn nicht auszuschließen ist, dass die Substanzen chemisch instabil sind, sich am Gefäßrand abscheiden, von den Pilzen zersetzt werden oder deren Wachstum stören. Die Aufarbeitung kann frühestens dann erfolgen, wenn keine äußerliche Veränderung des Myzels mehr zu beobachten ist, also nach etwa fünf Tagen.

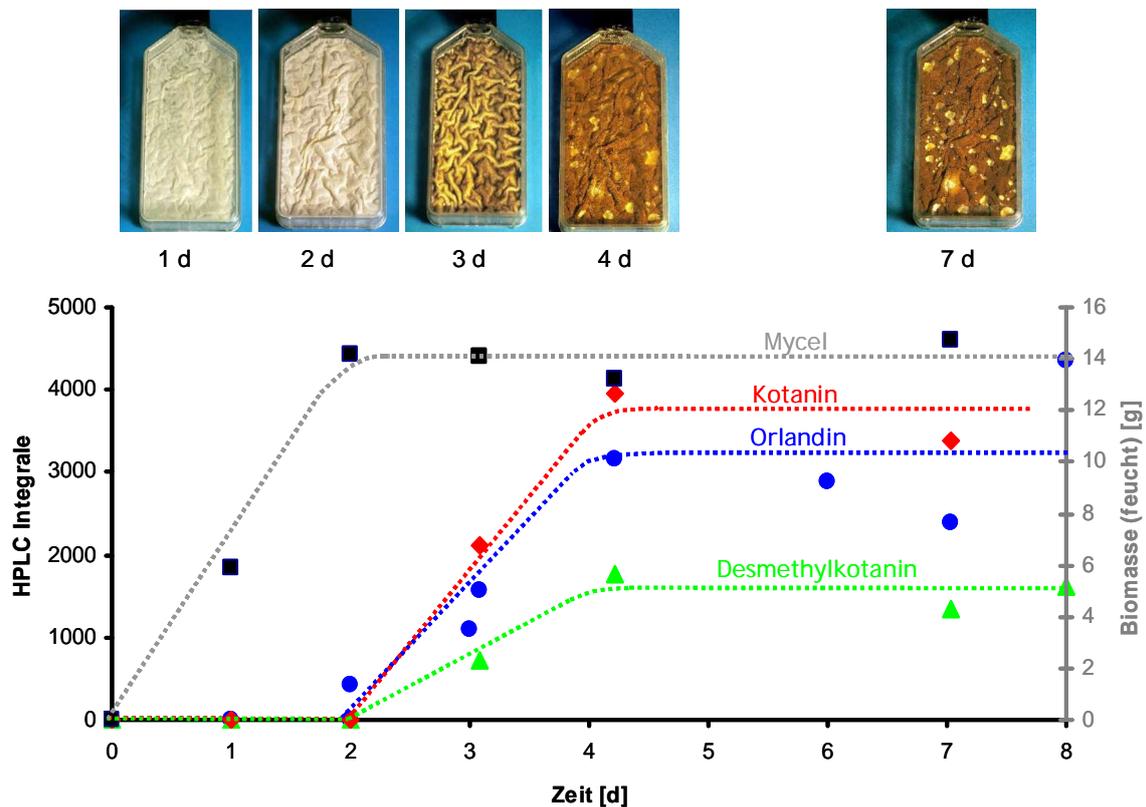
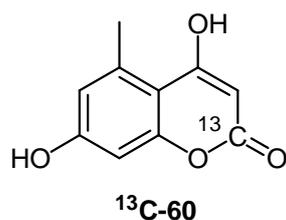


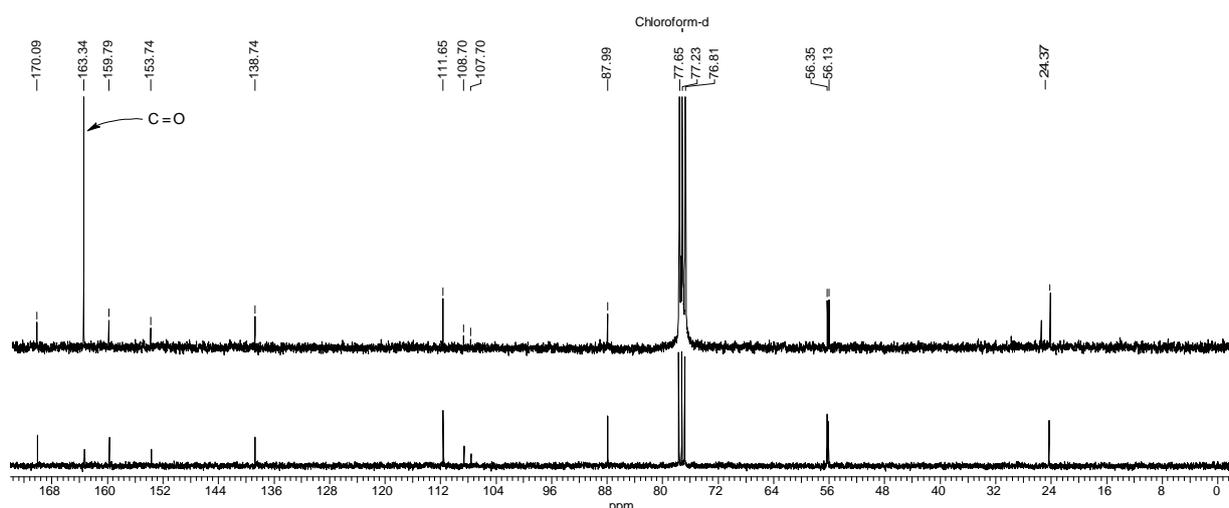
Abb. 82: Wachstum und Cumarinproduktion von *A. niger* Stehendkulturen in Zellkulturflaschen bei 30 °C.

Bei den monomeren Cumarinen, die an Aspergillen verimpft werden sollen, handelt es sich um kaum wasserlösliche Feststoffe. Um eine gleichmäßige Verteilung im Medium und eine Aufnahme durch den Pilz zu ermöglichen wird ein Löslichkeitsvermittler benötigt. Eine gängige Verbindung hierfür ist das stark polare, wasserlösliche und nicht toxische Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO). Kulturen mit 2 % DMSO zeigen, dass weder Pilzwachstum noch Cumarinbiosynthese durch den Zusatz des Lösungsmittels signifikant beeinflusst werden. Allerdings wird die Pigmentierung der Konidien teilweise inhibiert, so dass die Kulturen hellbraun statt braunschwarz gefärbt sind. Eine deutliche Geruchsentwicklung zeigt außerdem, dass DMSO teilweise metabolisiert wird. Auch die Anwesenheit von erheblichen Mengen Dihydroxycumarin **60** (50 mg / 100 ml Medium), gelöst in 2 ml DMSO, wirkt sich nicht negativ auf das Wachstum von *A. niger* aus.

4.4.3.2 Erstes Verfütterungsexperiment: [2-¹³C]-Dihydroxycumarin



[2-¹³C]-Dihydroxycumarin **¹³C-60**ⁱ wurde als Substrat für ein erstes Verimpfungsexperiment an *A. niger* ausgewählt, weil es metabolischer Vorläufer aller Bicomarine sein sollte, wenn ein polyketidischer Ursprung vorausgesetzt wird. Darüber hinaus verfügt es über die beste Wasserlöslichkeit von allen Siderinderivaten. In Anlehnung an die Experimente von STOTHERS und STOESSL¹³² wurde die Verbindung nicht von Beginn an zum Medium zugegeben, sondern in zwei Schritten unmittelbar vor und während der Cumarinbiosynthese verimpft. Da die verimpfte Substanz **¹³C-60** leicht verfügbar und für *A. niger* nicht toxisch ist, konnte eine relativ hohe Gesamtkonzentration im Medium von 15 mg / 100 ml (0.78 mM) eingestellt werden. Es wurden vier 100 ml-Kulturen angelegt, so dass insgesamt 60 mg Substrat in 400 ml Medium verfüttert wurden. Durch die Anzucht in Schüttelkultur konnte, zumindest nach der ersten Verimpfung, eine vollständige Verteilung des Substrats im Medium gewährleistet werden. Zum Zeitpunkt dieses ersten Experiments war nur eine Methode zur Isolierung von Kotanin (**2**), nicht aber der Derivate Desmethylkotanin (**61**) und Orlandin (**62**) etabliert. Um eine möglichst hohe Ausbeute an Kotanin (**2**) zu erhalten wurden die Hydroxyderivate im Rohextrakt vor der Aufreinigung mit Dimethylsulfat methyliert. Es wurden 1.8 mg Kotanin (**2**) isoliert und NMR-spektroskopisch untersucht (Abb. 83).



ⁱ Alle ¹³C-markierten Substrate wurden mit Reagenzien mit einem ¹³C-Gehalt > 99 % dargestellt.

Abb. 83: ^{13}C -NMR-Spektren von Kotanin (**2**) aus *A. niger* bei Verfütterung mit ^{13}C -Dihydroxycumarin ^{13}C -**60** (oben) und ohne Verfütterung (unten); CDCl_3 , 75 MHz.

Die stark erhöhte Intensität des ^{13}C -NMR-Signals der Carbonylgruppe von Kotanin (**2**) aus dem Verfütterungsexperiment belegt eindeutig den selektiven Einbau der verimpften Substanz ^{13}C -**60**. Auch im Massenspektrum ist eine erhöhte Intensität für die Isotopenpeaks M+1 und M+2 erkennbar (Abb. 84).

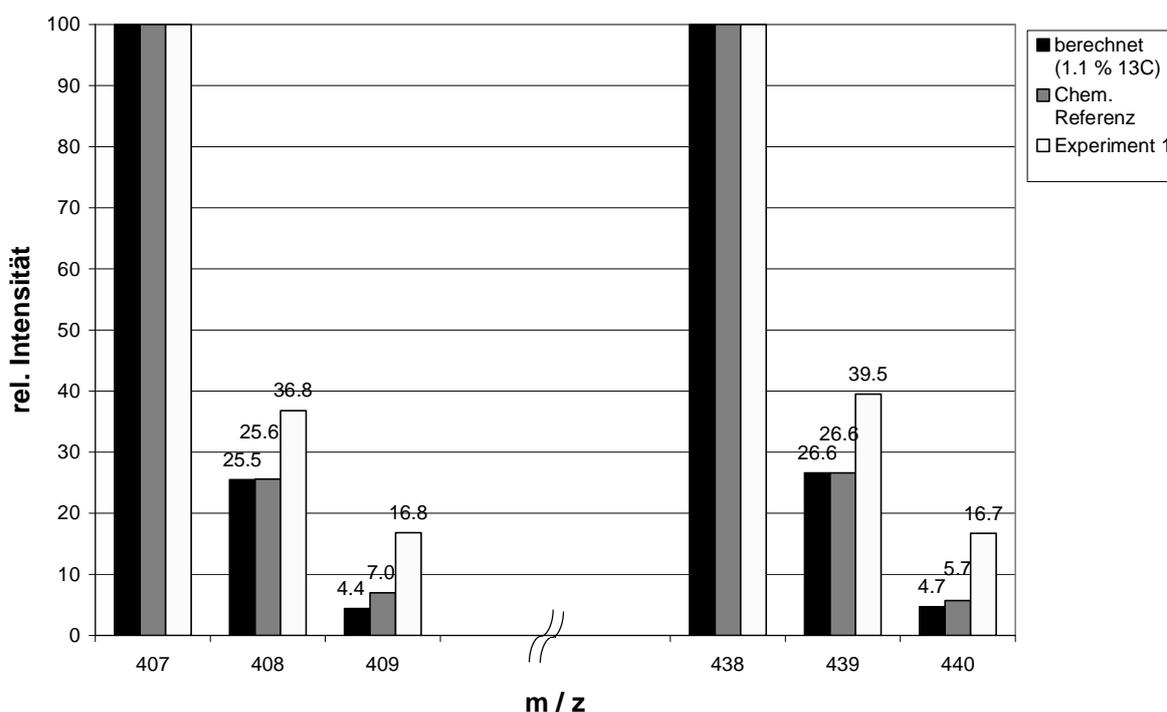
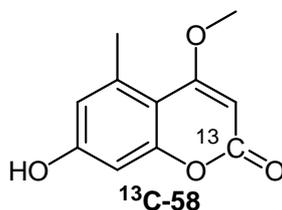


Abb. 84: Schematische Darstellung der Peaks M^+ (438) und $\text{M}^+ - \text{OCH}_3$ (407) sowie der zugehörigen Isotopenpeaks M+1, M+2 aus den Massenspektren von Kotanin (**2**). Es wurden die Höhen der Linien im Massenspektrum bestimmt. Den Hauptpeaks (438 und 407) wurde dabei jeweils die Intensität 100 zugeordnet.

4.4.3.3 Zweites Verfütterungsexperiment: $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ -Desmethylsiderin



Als zweite Verbindung wurde $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ -Desmethylsiderin (^{13}C -**58**) an *A. niger* verfüttert. Hierfür wurde die Inkubation in Zellkulturflaschen bei konstant 30 °C durchgeführt, bei der eine deutlich bessere Ausbeute an Cumarinen erzielt wird. Sonst wurde das Experiment analog zum ersten durchgeführt. Auf eine Methylierung des Rohextrakts wurde verzichtet. Durch Aufreinigen wurden 4.5 mg einer nicht ganz reinen Kotaninfraktion erhalten, die NMR-spektroskopisch untersucht wurde. Auch hier belegt die stark erhöhte Intensität des

Carbonylsignals den Einbau des verfütterten Monomers. Die Einbaurrate ist geringfügig geringer als beim ersten Experiment (siehe zu Einbauraten auch S. 97).

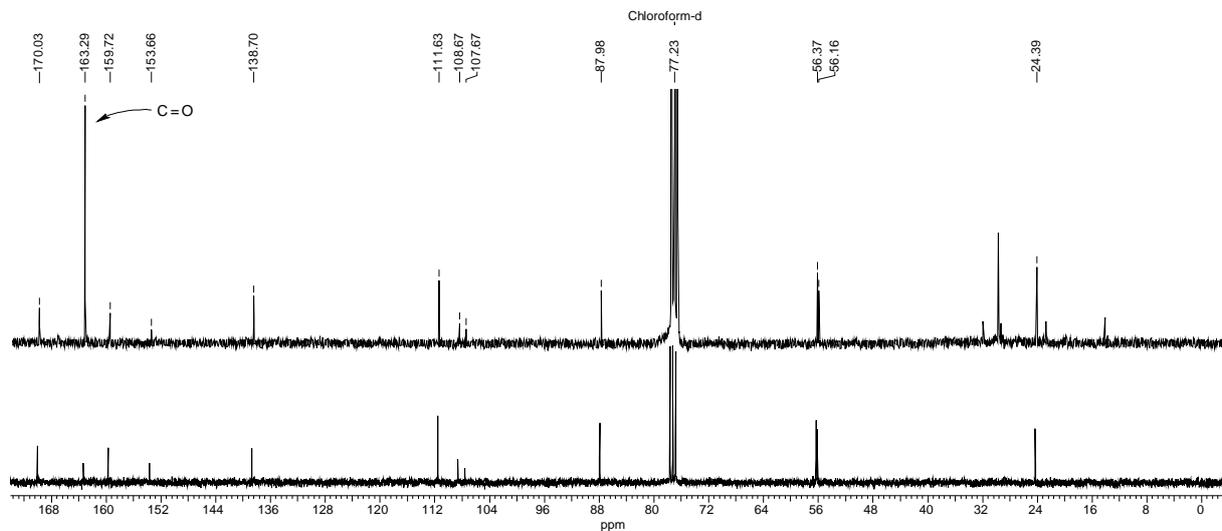
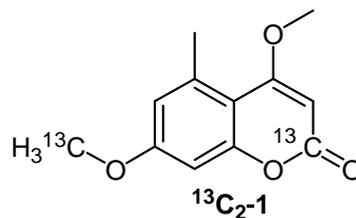


Abb. 85: ^{13}C -NMR-Spektren von Kotanin (**2**) aus *A. niger* bei Verfütterung mit $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ -Desmethylsiderin (^{13}C -58) (oben) und ohne Verfütterung (unten); CDCl_3 , 75 MHz.

4.4.3.4 Drittes Verfütterungsexperiment: $[2\text{-}^{13}\text{C}, 7\text{-O}^{13}\text{CH}_3]$ -Siderin



Die ersten beiden Markierungsexperimente belegen, dass *A. niger* in der Lage ist mehr als nur ein Substrat in Kotanin (**2**) zu inkorporieren. Für spätere Untersuchungen an genetisch veränderten Pilzen ist es aber notwendig zu wissen, welches der Cumarine unmittelbares Substrat des Phenolkupplungsschritts ist, das heißt ohne vorherige biosynthetische Modifikation dimerisiert werden kann. Um hierüber Informationen zu erhalten, wurden Experimente mit doppelt markierten Verbindungen durchgeführt. In diesem Experiment wurde Siderin verfütterte, das an C-2 und zusätzlich an der Methoxygruppe an C-7 ^{13}C -markiert ist ($^{13}\text{C}_2\text{-1}$). Die Durchführung erfolgte analog zu Experiment 2. Durch eine verbesserte Methode zu Aufreinigung der Rohextrakte war es diesmal prinzipiell möglich alle drei Bicumarine nebeneinander zu isolieren, allerdings blieben die Ausbeuten außerordentlich gering. Insgesamt wurden 0.5 mg Kotanin (**2**) und 0.3 mg Orlandin (**62**) isoliert; Desmethylkotanin (**61**) konnte nicht identifiziert werden. Die Bestimmung der Ausbeuten erfolgte durch Messung der UV-Absorption in Lösungen. Die geringen Ausbeuten lassen sich zum einen durch die deutlich erschwerte Aufreinigung der Verbindungen neben großen

Mengen an verimpften Siderin ($^{13}\text{C}_2\text{-1}$) erklären, zum anderen ist aber auch eine inhibierende Wirkung des Substrats $^{13}\text{C}_2\text{-1}$ auf die Synthese von Bicumarinen nicht auszuschließen. Neben den in *A. niger* natürlich vorkommenden Bicumarinen wurden auch erhebliche Mengen an ^{13}C -markiertem Desmethylsiderin ($^{13}\text{C}\text{-58}$) isoliert, welches durch regioselektive Demethylierung der Methoxygruppe an C-7 des Siderins ($^{13}\text{C}_2\text{-1}$) entstanden ist (17 mg $^{13}\text{C}\text{-58}$, 30 % des verimpften Siderins ($^{13}\text{C}_2\text{-1}$)). Die Hydrolyse aromatischer Ether durch *A. niger* ist aus der Literatur¹³⁹ bekannt und wurde sogar schon für eine Racematspaltung eingesetzt.¹⁴⁰ Prinzipiell lassen sich natürliche Metabolite, die wegen ihrer geringen Konzentration bei der Aufreinigung leicht übersehen werden könnten, durch Verfütterung der isotopenmarkierten Verbindung nachweisen, in dem nach der Aufreinigung eine "Verdünnung" des Isotopengehalts festgestellt wird. Ein Nachweis von Desmethylsiderin (**58**) als Sekundärmetabolit in *A. niger* war aber wegen der sehr großen Mengen an ^{13}C -markiertem Desmethylsiderin ($^{13}\text{C}\text{-58}$) (^{13}C -Gehalt > 99 %) nicht möglich. Zusätzlich wurden 38 mg (63 %) des verimpften Siderins ($^{13}\text{C}_2\text{-1}$) unverändert zurückerhalten. Die Bicumarine wurden NMR-spektroskopisch untersucht (Abb. 86 und Abb. 87).

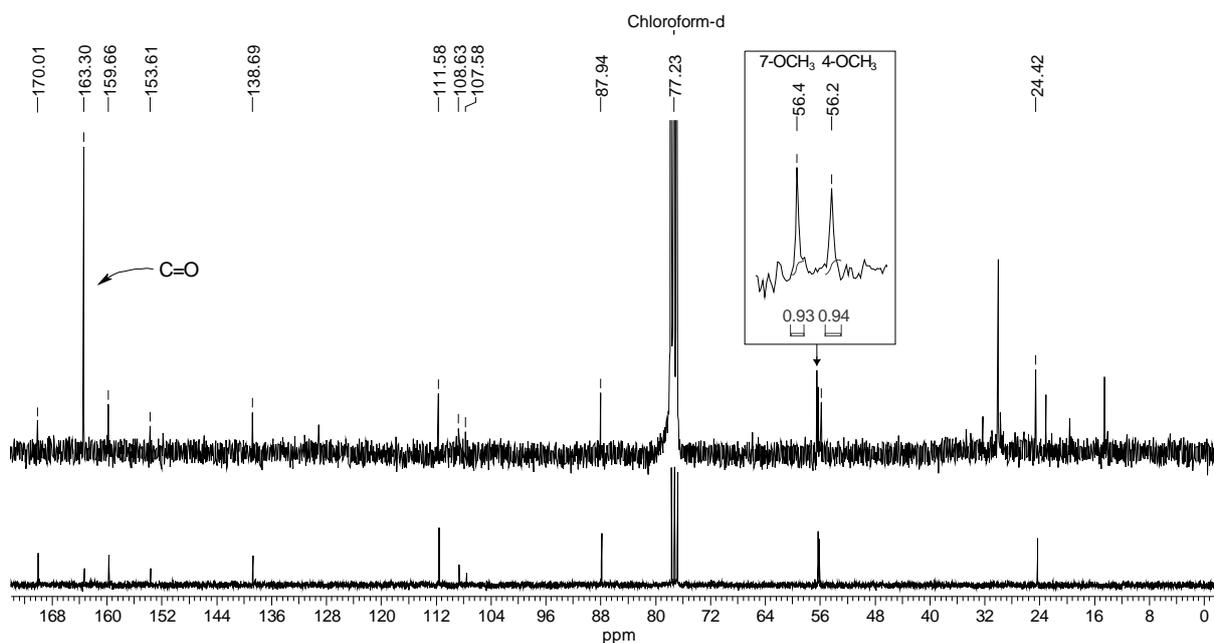


Abb. 86: ^{13}C -NMR-Spektren von Kotanin (**2**) aus *A. niger* bei Verfütterung von $[2\text{-}^{13}\text{C}, 7\text{-O}^{13}\text{CH}_3]$ -Siderin ($^{13}\text{C}_2\text{-1}$) (oben) und ohne Verfütterung (unten); CDCl_3 , 75 MHz.

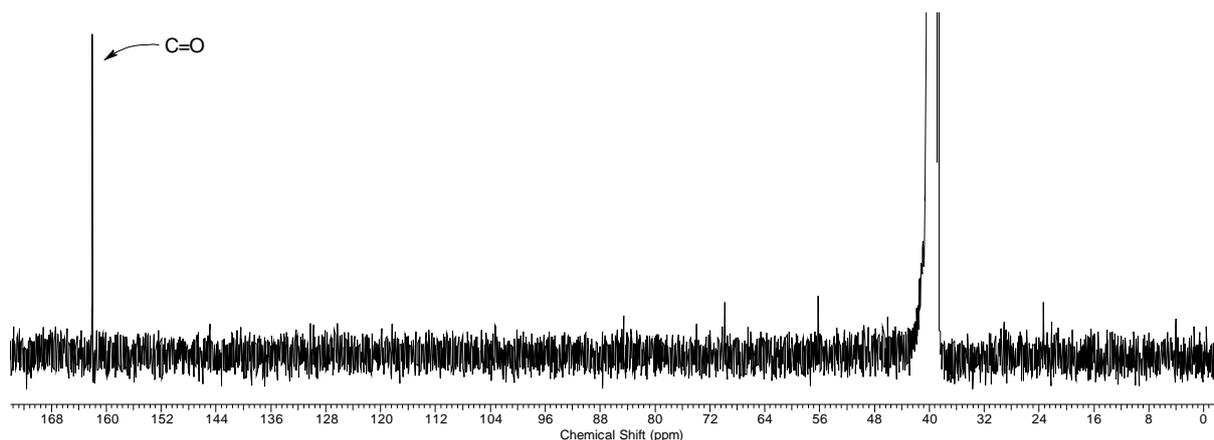


Abb. 87: ^{13}C -NMR-Spektrum von Orlandin (**62**) aus *A. niger* bei Verfütterung mit $[2-^{13}\text{C}, 7\text{-O}^{13}\text{CH}_3]$ -Siderin ($^{13}\text{C}_2\text{-1}$); DMSO- d_6 , 75 MHz.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum von Kotanin (**2**) aus Experiment 3 fällt auf, dass die Intensität nur für das Carbonylsignal, nicht aber für das Signal der Methoxygruppe bei 56.4 ppm signifikant erhöht ist, obwohl beim verimpften Siderin ($^{13}\text{C}_2\text{-1}$) die entsprechende Methoxygruppe ebenfalls ^{13}C -markiert ist. Das bedeutet, dass nicht Siderin ($^{13}\text{C}_2\text{-1}$) selber, sondern ein 7-Hydroxyderivat in die dimeren Cumarine inkorporiert wurde (Abb. 88). Unklar ist dabei, ob Desmethylsiderin ($^{13}\text{C-58}$) zum Orlandin (**62**) dimerisiert wird, oder ob der Weg über Dihydroxycumarin $^{13}\text{C-60}$ und dessen Kupplungsprodukt **153** gegangen wird.

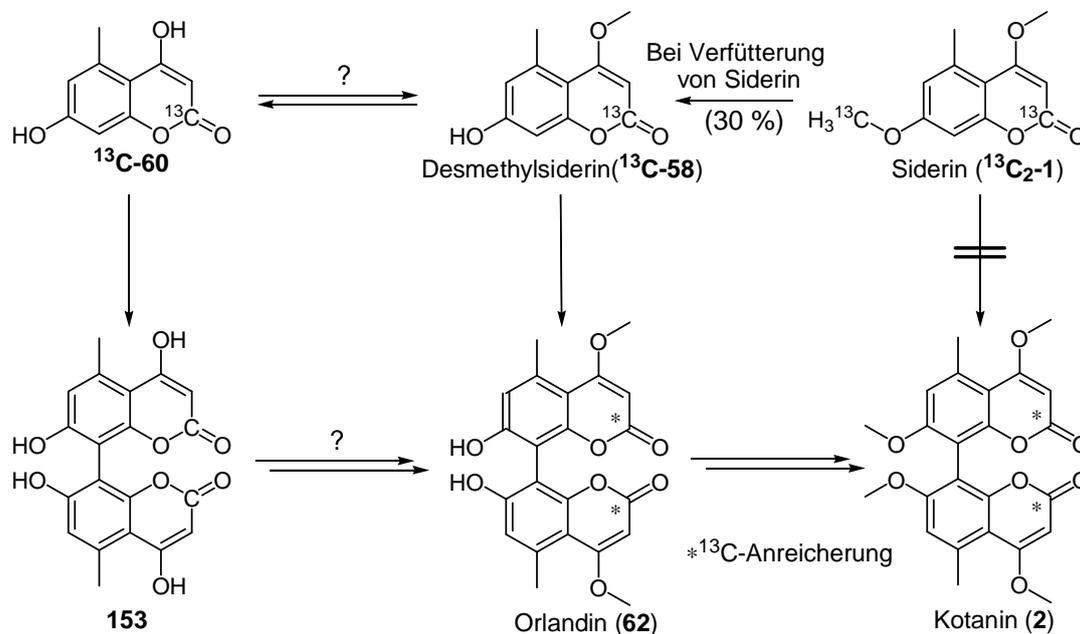
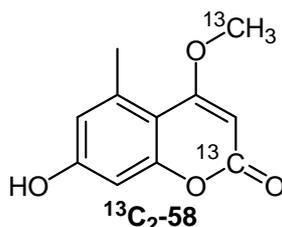


Abb. 88: Mögliche Biosynthesewege für Kotanin (**2**).

4.4.3.5 Viertes Verfütterungsexperiment: [2-¹³C, 4-O¹³CH₃]-Desmethylosterin



Um weitere Klarheit über das in Abb. 88 skizzierte Biosynthesemuster zu erhalten wurde ein Verimpfungsexperiment mit Desmethylosterin durchgeführt, welches an C-2 und zusätzlich an der Methoxygruppe an C-4 ¹³C-markiert war (¹³C₂-58). Die Durchführung erfolgte analog zum vorherigen Versuch. Der Rohextrakt wurde über HPLC analysiert. Durch Integration der Peaks wurde der Gehalt an Bicomarinen zu 1.7 mg Kotanin (**2**) und 0.8 mg Desmethylosterin (**61**) in 400 ml Kulturmedium bestimmt (der letzte Wert ist aufgrund der indirekten Kalibrierung nur ein Schätzwert).

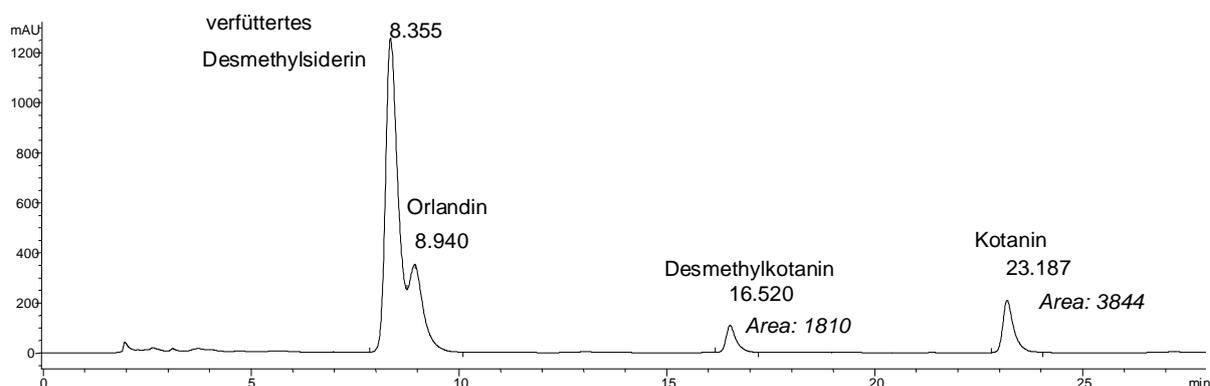


Abb. 89: HPLC-Analyse des Rohextrakts aus Verfütterungsexperiment 4 (Volumen Rohextrakt (Chloroform) = 20 ml aus 400 ml Kulturmedium).

Nach Aufreinigung wurden 1.4 mg Kotanin (**2**), 0.4 mg Desmethylosterin (**61**) und 1.9 mg Orlandin (**62**) erhalten (Mengenbestimmung über UV-Absorption), die NMR-spektroskopisch untersucht wurden. Anders als beim vorherigen Experiment, wurde diesmal eine ¹³C-Anreicherung sowohl in der Carbonylgruppe als auch in der Methoxygruppe an C-4 beobachtet (Abb. 90). Für diese konnte durch Integration des ¹J_{CH}-gekoppelten Signals im ¹H-NMR-Spektrum die Einbaurate bestimmt werden (Abb. 91).ⁱ Es wurden folgende Einbauraten bestimmt: Kotanin (**2**) 16 %, Desmethylosterin (**61**) 30 % und Orlandin (**62**) 40 %.

ⁱ Die ²J_{CH}-Kopplung des Wasserstoffs an C-3 mit dem carbonylischen Kohlenstoff ist wegen der geringen Kopplungskonstante bei keinem der untersuchten Coumarine aufgelöst.

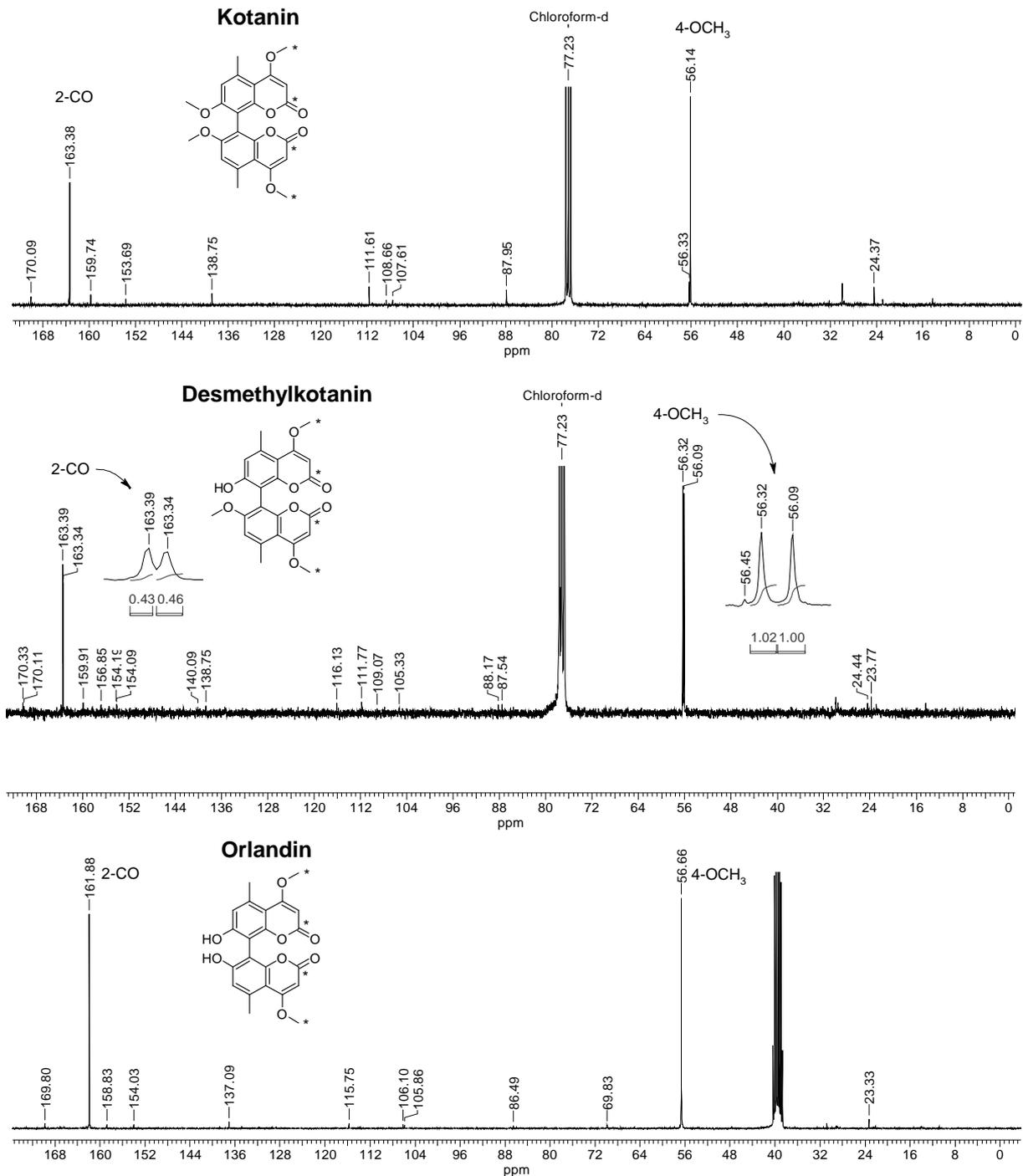


Abb. 90: NMR-Spektren der ^{13}C -markierten 8,8'-Bicumarine aus Verimpfungsexperiment 4; 75 MHz, CDCl_3 beziehungsweise DMSO-d_6 bei Orlandin (**62**).

Die für Sekundärmetabolite sehr großen Werte lassen sich zum Teil durch die hohe Substratkonzentration (0.72 mmol / l) erklären. Bemerkenswert ist, dass die Einbaurrate vom Orlandin (**62**) zum Kotanin (**2**) hin abnimmt. Schließt man andere Biosynthesewege zu Kotanin (**2**) und Desmethylkotanin (**61**) als eine Dimerisierung von **58** (oder auch **60**) und anschließende Methylierung aus, kann diese Beobachtung wie folgt erklärt werden: In der frühen Phase der Orlandinsynthese wird hauptsächlich endogenes Monomer **58** umgesetzt,

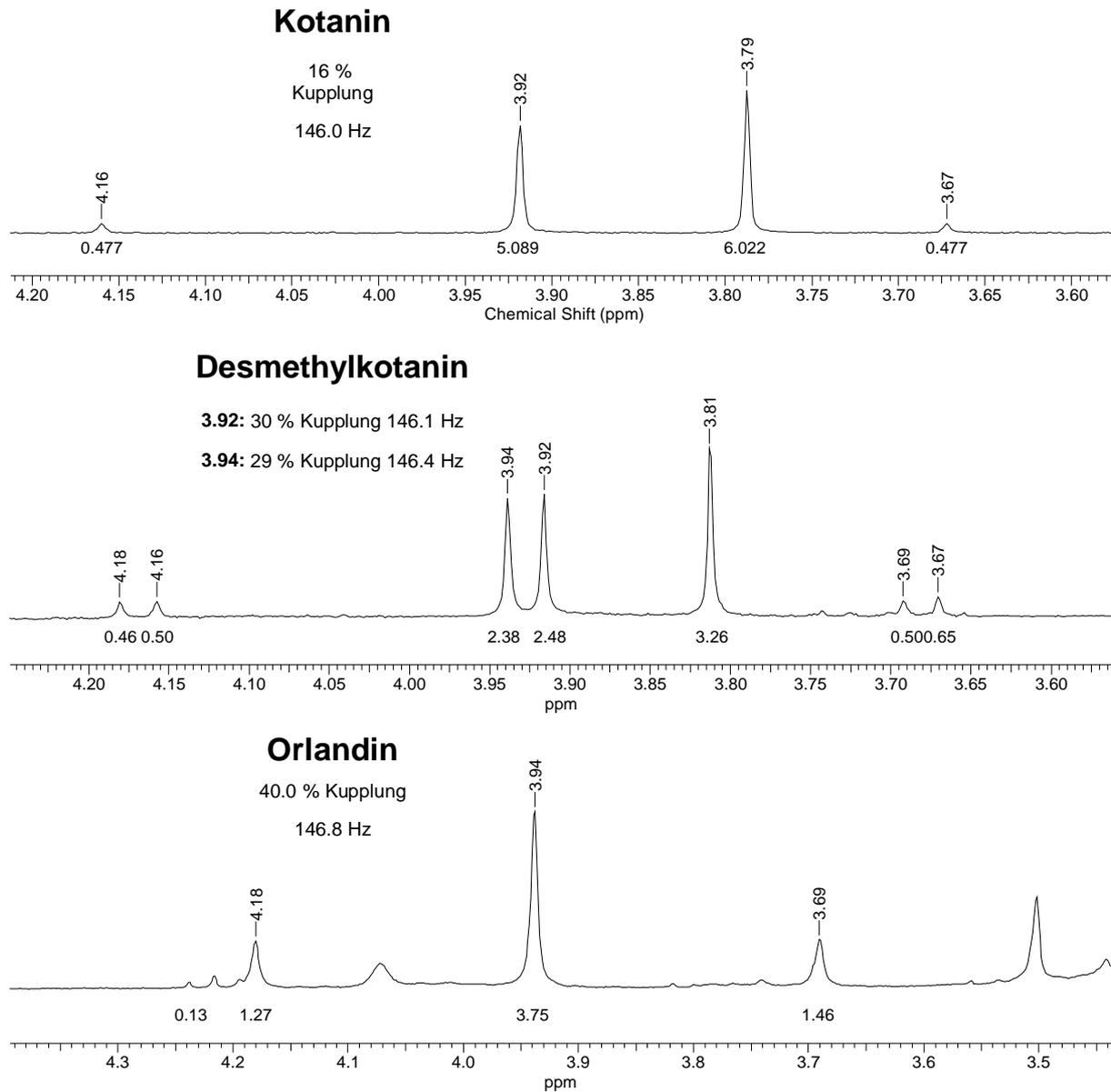


Abb. 91: ^1H -NMR-Spektren der ^{13}C -markierten 8,8'-Bicumarine aus Verimpfungsexperiment 4; 75 MHz, CDCl_3 beziehungsweise DMSO-d_6 bei Orlandin (**62**).

möglicherweise weil das markierte Substrat aufgrund von Transportbarrieren die Kompartimente der Zelle, in denen die Katalyse stattfindet, noch nicht erreicht hat. Das wenig ^{13}C -angereicherte Orlandin (**62**) wird weiter zu Desmethylokotantin (**61**) und Kotantin (**2**) umgesetzt, während es gleichzeitig aus inzwischen stärker ^{13}C angereichertem Monomer **58** nachgebildet wird. Die Beobachtung zeigt außerdem, dass zwischen den drei dimeren Metaboliten kein schnelles, dynamisches Gleichgewicht vorliegen kann.

Die Experimente 3 und 4 belegen eindeutig, dass Desmethylosiderin (**58**) oxidativ zum Orlandin (**62**) gekuppelt wird. Es bleibt die Frage, ob nicht parallel dazu auch eine oxidative Phenolkupplung des Dihydroxycumarins **60** stattfindet. Wäre dies in größerem Maßstab der

Fall, wäre die ^{13}C -Einbaurrate für die 4-Methoxygruppe durch "Verdünnung" mit nicht markierten, endogenen Methylgruppen geringer als die des Carbonylkohlenstoffs. Das heißt, die Intensität des ^{13}C -NMR-Signals der 4-Methoxygruppe wäre im Vergleich zu dem der Carbonylgruppe verringert. Für nicht markiertes Kotanin (**2**) beträgt unter den standardmäßigen ^{13}C -Messbedingungen (Relaxationszeit $D_2 = 2$ s) das Verhältnis der Integrale I dieser Signale $I_{4\text{-OMe}} / I_{\text{CO}} = 2.6$. Bei Kotanin (**2**) aus diesem Verimpfungsexperiment liegt der Wert trotz zahlreicher Messungenauigkeiten mit $I_{4\text{-OMe}} / I_{\text{CO}} = 2.5$ im selben Bereich. Nimmt man an, dass 15 % des an der Carbonylgruppe markierten Kotanins (**2**) über Dihydroxycumarin **60** biosynthetisiert würde, läge der Wert mit $I_{4\text{-OMe}} / I_{\text{CO}} = 2.2$ bereits deutlich geringer (ausgehend von $I_{4\text{-OMe}} / I_{\text{CO}} = 2.6$ für identische ^{13}C -Anteile). Es kann daher ausgeschlossen werden, dass größere Anteile des Bicumarins über diesen Weg synthetisiert wurden. Andererseits kann der Biosyntheseweg auch nicht vollständig widerlegt werden. Unklar bleibt in diesem Zusammenhang auch, ob *A. niger* überhaupt über eine enzymatische Aktivität verfügt, um das verfütterte Desmethylsiderin ($^{13}\text{C}_2$ -**58**) zum Dihydroxycumarin ^{13}C -**60** zu hydrolysieren (vgl. Abb. 88).

Von allen drei Bicumarinen wurde die absolute Konfiguration CD-spektroskopisch als (*P*) identifiziert (siehe dazu auch Abschnitt 4.3.4.2, S. 73). Damit wurde gezeigt, dass bei der Biosynthese der Bicumarine in *A. niger* der Phenolkupplungsschritt – und nicht etwa wie bei *A. alliaceus* die anschließende *O*-Methylierung – die Stereoselektivität bestimmt.

4.4.3.6 Schlussfolgerungen aus den Markierungsexperimenten 1 – 4

Biosyntheseweg von Kotanin

Aus den Verimpfungsexperimenten 1 - 4 kann unter Berücksichtigung der Arbeiten von STOTHERS und STOESSL,¹³² die für Kotanin (**2**) einen polyketidischen Ursprung nachgewiesen haben, ein Biosyntheschema wie Abb. 92 in erstellt werden. Dihydroxycumarin **60** ist primäres Produkt des Polyketid-Biosyntheseschritts und wird zu Desmethylsiderin (**58**) *O*-methyliert. Es folgt ein stereoselektiver oxidativer Phenolkupplungsschritt zum Orlandin (**62**), das über Desmethylkotanin (**61**) zu Kotanin (**2**) methyliert wird.

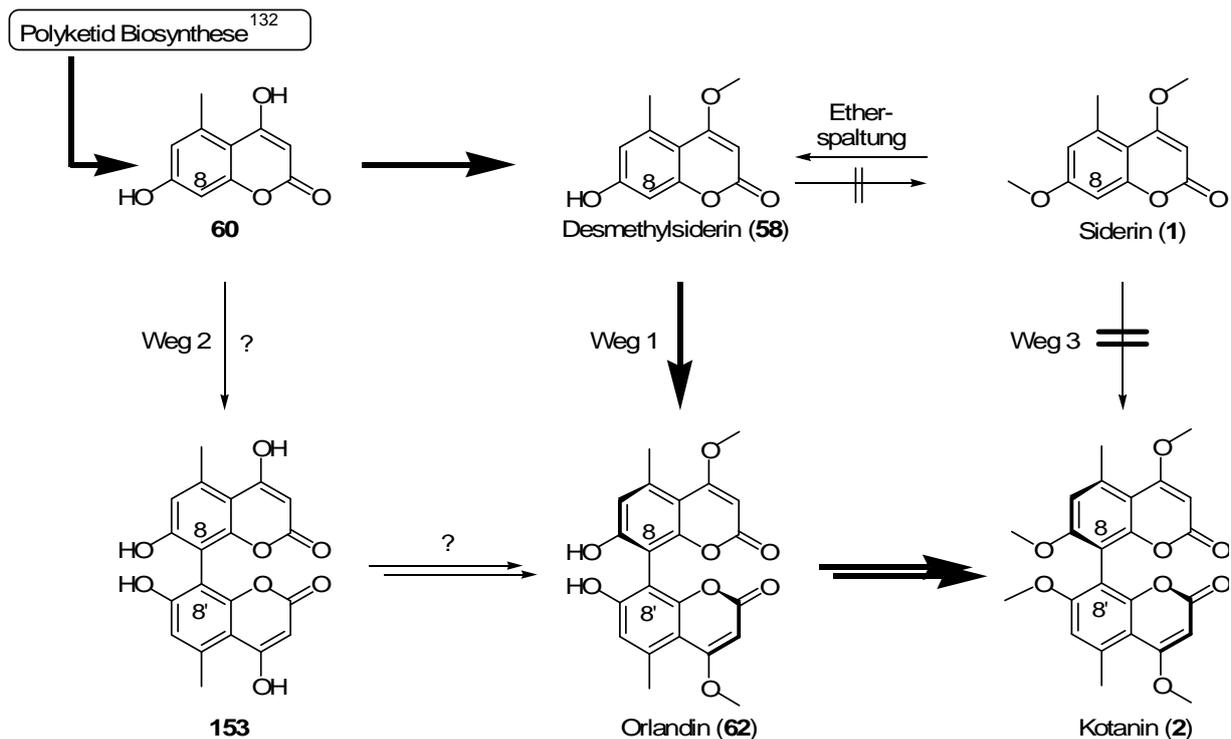


Abb. 92: Aus den Markierungsexperimenten 1 - 4 und Arbeiten von STOTHERS und STOESSL¹³² postulierter Biosyntheseweg für Kotanin (2).

Alle drei monomeren Cumarine **60**, **58** und **1** werden in die Dimere inkorporiert. Siderin (**1**) allerdings erst nach Hydrolyse der Methoxygruppe an C-7, weshalb Weg 3 ausgeschlossen werden kann (Experiment 3). Desmethylsiderin (**58**) wird unzersetzt in Orlandin (**62**) und die anderen Bicumarine, **61** und **2**, eingebaut, wodurch Weg 1 bewiesen wurde (Experiment 4). Die oxidative Kupplung von Dihydroxycumarin **60** (Weg 1) kann nicht völlig ausgeschlossen werden. Allerdings kann weder das Monomer **60** noch das entsprechende Bicumarin **153** nachgewiesen werden. Von den Monomeren ist nur Desmethylsiderin (**58**), das nach Verimpfung von Siderin (**1**) in größerer Menge durch regioselektive Demethylierung entsteht, nachweisbar. Es ist anzunehmen, dass diese in vielen Aspergillen nachweisbare Reaktion nicht in die natürliche Biosynthese der Bicumarine involviert ist. Verfüttertes Desmethylsiderin (**58**) wird in nachweisbarer Menge weder zu Siderin (**1**) methyliert, noch zu Dihydroxycumarin **60** hydrolysiert (HPLC, vgl. Abb. 89).

Bestimmung der ¹³C-Einbauraten

Die Intensität der einzelnen Signale in den ¹³C-NMR-Spektren hängt außer von der ¹³C-Konzentration in der Probe noch in hohem Maße von der chemischen Umgebung der Kerne sowie den Meßbedingungen (Relaxationszeit D2) ab. Bei Messung unter Standardbedingungen kann daher, anders als bei ¹H-NMR-Spektren, nicht durch Messung der Integrale direkt auf die Konzentration geschlossen werden. Zum Vergleich von ¹³C-Einbauraten in

verschiedenen Proben müssen außerdem die unterschiedlichen Substanzkonzentrationen in den Proben mit Hilfe eines internen Standards kompensiert werden. Dazu wurde dem Integral des Signals der Methylgruppe (C-10), für die kein ^{13}C -Einbau zu erwarten ist, in jedem Spektrum willkürlich der Wert 1 zugeordnet. In Abb. 93 sind die so erhaltenen relativen Intensitäten (Integrale) der NMR-Spektren von Kotanin (**2**) aus den Experimenten 1-4 grafisch dargestellt.

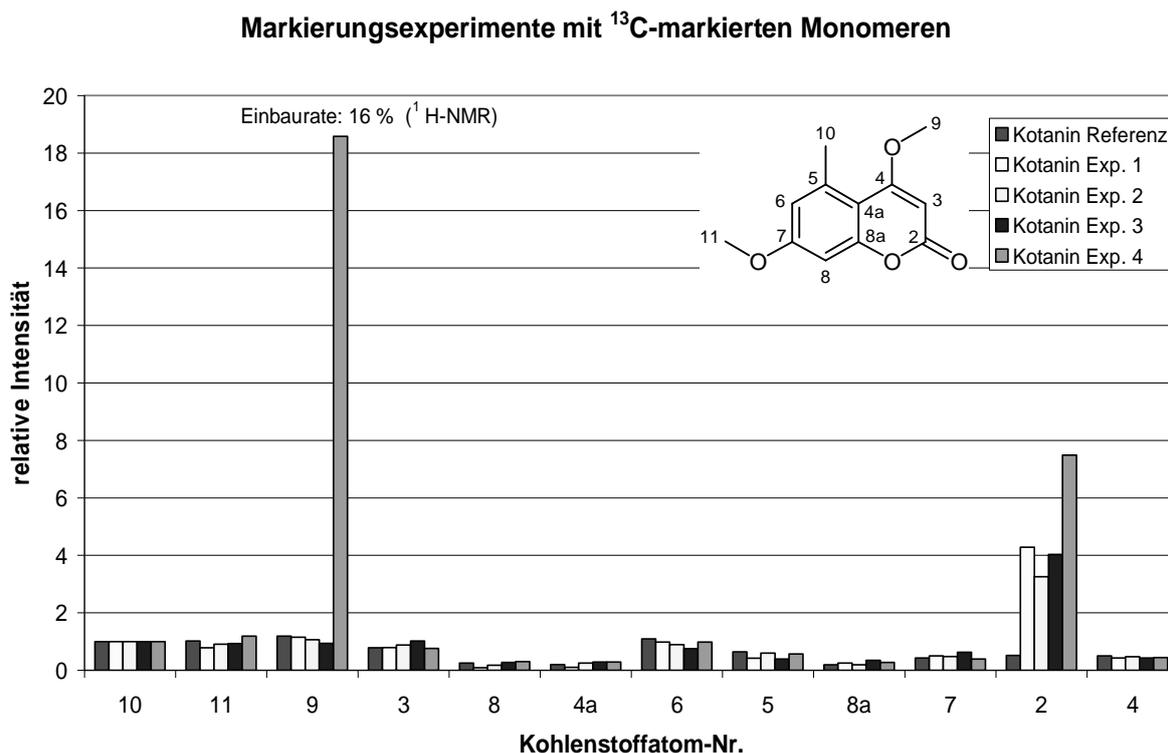


Abb. 93: Relative Intensitäten der Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum von Kotanin (**2**) aus den Markierungsexperimenten 1-4. Die Signale sind nach der chemischen Verschiebung geordnet. Die entsprechenden Zahlenwerte sind im Experimentellen Teil auf Seite 163 aufgeführt.

Im Vergleich der Carbonylgruppen (C-2) fällt die besonders hohe Intensität bei Experiment 4 auf. Die Ursache dafür ist nicht ganz klar. Möglicherweise war das Myzel zum Zeitpunkt der Verimpfung bei diesem Experiment noch nicht so weit entwickelt wie sonst, so dass eine bessere Verteilung des Substrats im Medium und damit ein besserer Einbau möglich war.ⁱ

In Experiment 4 konnte über die im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum gut aufgelöste $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung an der Methylgruppe von C-9 die ^{13}C -Einbaurrate zu 16 % für Kotanin (**2**) bestimmt werden. Mit diesem Wert, dem natürlichen ^{13}C Anteil (1.1 %) bei nicht markiertem **2** sowie der Nullstelle

als Fixpunkt kann eine lineare Regression für die gemessenen Signalintensitäten vorgenommen werden. Dies führt aber zu nur zu korrekten Werten, wenn folgende Voraussetzungen erfüllt sind:

1. In Experiment 4, das als Referenz dient, muss die ^{13}C -Einbauraten an der Carbonylgruppe identisch mit der Einbauraten an der Methoxygruppe sein (siehe dazu auch die Diskussion im Abschnitt 4.4.3.5, S. 96).
2. Die Beziehung zwischen ^{13}C -Konzentration an einer Position und relativer Signalintensität muss linear sein.

Darüber hinaus bieten zwei Messpunkte zuzüglich Nullpunkt keine ausreichende Möglichkeit zur Bestimmung von statistischen oder systematischen Fehlern. Wegen dieser Unsicherheiten dürfen über Regression bestimmte Einbauraten nur als Schätzwerte betrachtet werden.

Die Einbauraten ergeben sich damit wie folgt:

	Kotanin (2)	Desmethylkotanin (61)	Orlandin (62)
Experiment 1	9 % [*]	-	-
Experiment 2	7 % [*]	-	-
Experiment 3	9 % [*]	-	11 % [*]
Experiment 4	16 %	30 %	40 %

Tabelle 5: Einbauraten aus den Verimpfungsexperimenten mit ^{13}C -markierten, monomeren Cumarinen, ermittelt aus ^{13}C -NMR-Spektren. Die mit * gekennzeichneten Werte wurden über lineare Regression ermittelt und dürfen wegen zahlreicher Fehlerquellen nur als Schätzwerte betrachtet werden. (Kotanin: $E [\%] = 2.14 \cdot I$; Orlandin: $E [\%] = 1.78 \cdot I$. Mit E : Einbauraten für Carbonyl-C, I = relatives Integral.)

4.4.3.7 Verfütterung von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -Acetat an *A. niger* ATCC 36626

STOTHERS und STOESSL¹³² haben einen Einbau von $[1,2-^{13}\text{C}]$ -Acetat in Kotanin (2) nachweisen können und daraus auf einen polyketidischen Ursprung des Bicumarins geschlossen. Allerdings waren die beobachteten Einbauraten so gering, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Inkorporation nur durch eine biosynthetische Nebenaktivität stattgefunden hat. Aus diesem Grunde sollte der Einbau durch eigene Experimente überprüft werden. Die Durchführung erfolgte analog zu den Verfütterungsexperimenten 2-4 und unterschied sich damit nur geringfügig von dem in der Literatur

ⁱ Eine relativ frühe Verimpfung (nach 24 h) führt auch bei 1 ml-Kulturen zu sehr hohen Kotanin-Konzentrationen, die wahrscheinlich durch verstärkten Einbau erreicht werden.

beschriebenen Experiment.ⁱ Verfüttert wurde nach 24 h und 48 h Kultur jeweils 1 ml einer 200 mM Natrium-[1,2-¹³C₂]-Acetatlösung, so dass die Endkonzentration im Medium 4 mM war. Nach Aufarbeitung wurde das isolierte Kotanin (**2**) (≈ 6 mg) NMR-spektroskopisch untersucht. Im ¹³C-NMR-Spektrum konnte weder eine ²J_{cc}-Kupplung noch eine Intensitätszunahme einzelner Signale im Vergleich zur Referenz festgestellt werden. Auch ein CC-INADEQUATE-Experimentⁱⁱ zeigte keine C-C-Kopplung auf. Eine Wiederholung des Verfütterungsexperiments führte zum selben Ergebnis. Zusätzlich wurden einige der von *A. niger* in großen Mengen produzierten grün-gelben Farbstoffe isoliert und NMR-spektroskopisch untersucht. Geht man davon aus, dass zumindest einzelne dieser Verbindungen polyketidischen Ursprungs sind, kann eine Aufnahme von Acetat durch *A. niger* unter Umständen über einen Einbau in diese Sekundärmetabolite nachgewiesen werden. Allerdings wurden auch hier keine auffälligen Signale gefunden, so dass nicht auszuschließen ist, dass *A. niger* unter den gewählten Kulturbedingungen kein oder nur äußerst geringe Mengen Acetat aufnimmt. Für weitere Versuche sind folgende Möglichkeiten denkbar:

1. Variation der Kulturbedingungen, zum Beispiel niedrigere Temperatur oder Kultur in Minimalmedium.
2. Verfütterung von ¹³C-markiertem Malonat anstelle von Acetat.
3. Versuche zu alternativen Biosyntheseschritten wie der Methylierung. Methionin wird im Organismus unter anderem zu *S*-Adenosylmethionin (SAM) umgewandelt, das in der Biosynthese als Methylierungsmittel dient. Bei einer Verimpfung von ¹³C-markiertem Methionin sollte ein Einbau nur in die Methoxygruppen, nicht aber die Methylgruppen an C-5 und C-5' von Kotanin (**2**) erfolgen, da diese bei einer Polyketid-Biosynthese aus Acetat-Einheiten gebildet werden.

4.4.4 Untersuchung anderer *Aspergillus*-Stämme

Für molekularbiologische Arbeiten ist es notwendig einen mit *Aspergillus niger* nah verwandten Wirtstamm zu finden, der nicht in der Lage ist Cumarine zu synthetisieren, beziehungsweise den oxidativen Phenolkupplungsschritt zu katalysieren. Dazu wurden

ⁱ Die Autoren geben dabei allerdings keine Temperatur an. Aus der Beschreibung des Wachstums von *A. niger* kann aber gefolgert werden, dass die Kultur bei Raumtemperatur erfolgte. Der eigene Versuch wurde bei 30 °C durchgeführt.

ⁱⁱ 75 MHz, aufgenommen an einem Varian Unity-300 NMR-Spektrometer der Universität Freiburg.

Stämme der Spezies *A. niger*, *A. nidulans* und *A. fumigatus* untersucht. Daneben wurde der in der Literatur als Desertorin-Produzent beschriebene Stamm von *Emericella desertorum* auf Cumarinbiosynthese untersucht.¹²³ Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Kultur- und Verimpfungsexperimente wie bei *A. niger* ATCC 36626 durchgeführt. Die Rohextrakte wurden über HPLC analysiert.

4.4.4.1 *Aspergillus niger*

A. niger NRRL 3122 (= ATCC 22343)

A. niger NRRL 3122 ist von besonderem Interesse, weil er als Ausgangsstamm der von der Firma DSM, Niederlande, verwendeten Produktionsstämme gut untersucht ist und das Genom vollständig sequenziert wurde (vgl. Abschnitt 4.5.4.1, S. 119).

Die aus Experimenten mit *A. niger* NRRL 3122 erhaltenen HPLC-Chromatogramme sind in Abb. 94 gezeigt. Im Rohextrakt ohne Verimpfung konnten keine Cumarine nachgewiesen werden. Bei Inkubation mit Desmethylsiderin (58) wurde neben der verimpften Substanz ein weiterer intensiver Peak mit ähnlicher Retentionszeit und ähnlichem UV-Spektrum beobachtet. Die Vermutung, dass es sich hierbei um Orlandin (62) handelt, ließ sich durch Behandlung des Extrakts mit Dimethylsulfat belegen. Im HPLC-Chromatogramm des teilweise

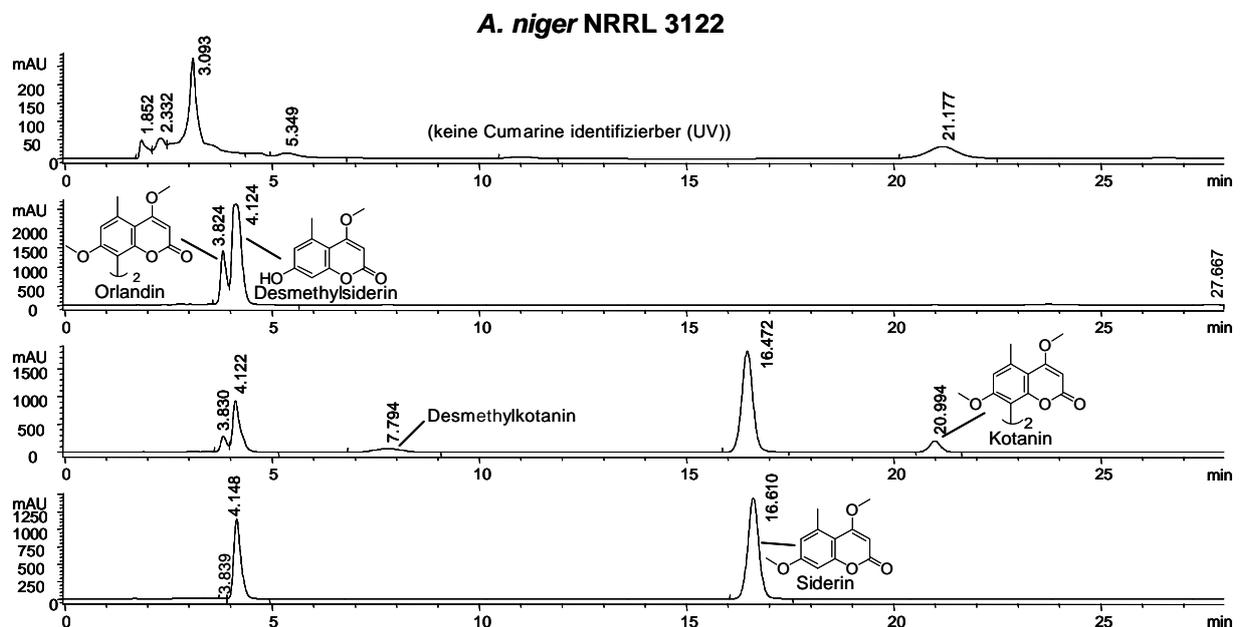


Abb. 94: HPLC-Chromatogramme aus Verfütterungsexperimenten mit *A. niger* NRRL 3122 (100 ml-Kulturen). Von oben: 1. Rohextrakt ohne Verimpfung; 2. Verimpfung von Desmethylsiderin (58); 3. Verimpfung von Desmethylsiderin (58) und teilweise Methylierung des Rohextrakts; 4. Verimpfung von Siderin (1). (Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen auf der Intensitätsachse, besonders bei der Analyse des Rohextrakts ohne Verfütterung).

methylierten Produktgemischs sind neben Siderin (**1**) auch zusätzlich Desmethylkotanin (**61**) und Kotanin (**2**) erkennbar. Kotanin (**2**) wurde über präparative Dünnschichtchromatographie isoliert (ca. 0.2 mg, Konzentrationsbestimmung über UV) und $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch überprüft. Ein CD-Spektrum belegt eindeutig die *P*-(+)-Konfiguration, die auch bei Kotanin (**2**) aus *A. niger* ATCC 36626 gefunden wurde (Abb. 95). Bei Verfütterung von Siderin (**1**) wurde eine Etherspaltung an der Methoxygruppe an C-7 beobachtet, so dass erhebliche Mengen Desmethylsiderin (**58**) entstanden. Orlandin (**62**) konnte nur in minimaler Menge gefunden werden.

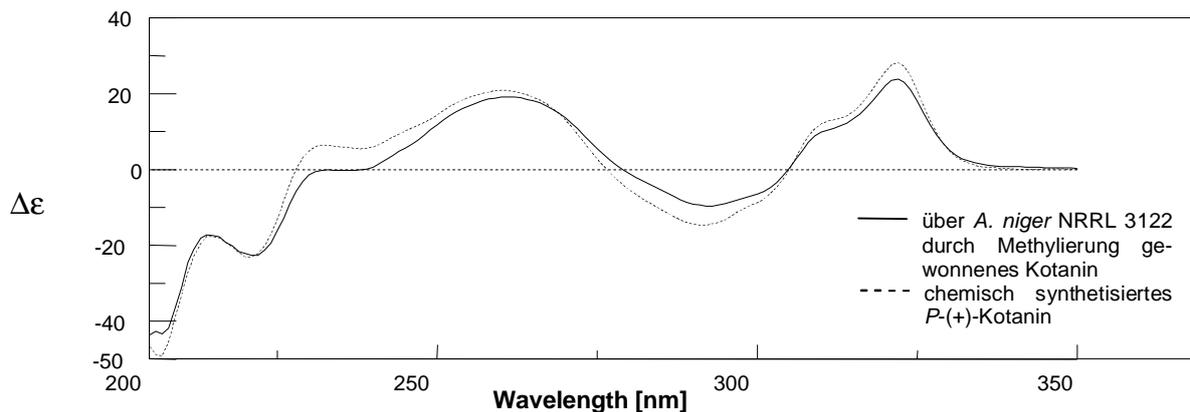


Abb. 95: Vergleich der CD-Spektren von Kotanin (**2**), das über eine Biotransformation mit *A. niger* NRRL 3122 erzeugt wurde, mit chemisch synthetisiertem *P*-(+)-Kotanin (**2**). Die Abweichungen im Kurvenverlauf sind möglicherweise auf Verunreinigungen zurückzuführen.

Die Versuche belegen eindeutig, dass *A. niger* NRRL 3122 über enzymatische Aktivität zur stereoselektiven oxidativen Phenolkupplung von Cumarinen verfügt, obwohl diese monomeren Cumarine weder biosynthetisiert noch im Anschluss an die Phenolkupplung methyliert werden. Darüber hinaus stützen diese Ergebnisse die Beobachtung aus den Versuchen mit *A. niger* ATCC 36626, dass die oxidative Phenolkupplung auf der Stufe des Desmethylsiderins (**2**) erfolgt. Bei Verimpfung des monomeren Dihydroxycumarins **60** an *A. niger* NRRL 3122 wurden keine dimerisierten oder methylierten Cumarine identifiziert.

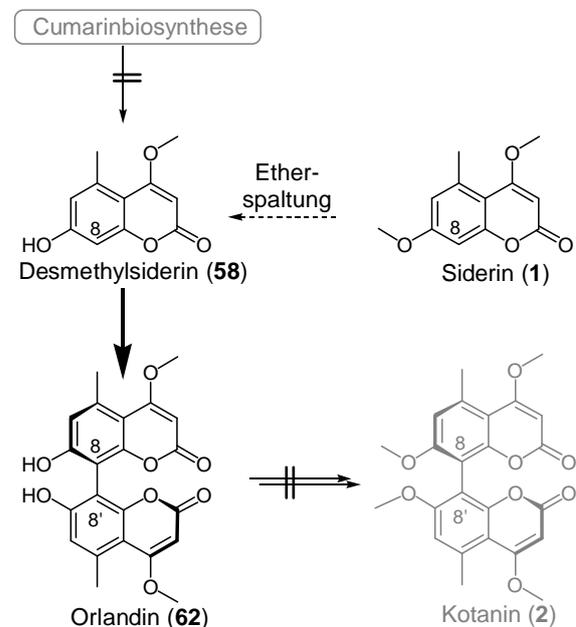


Abb. 96: Biosynthetische Schritte in *A. niger* NRRL 3122.

***A. niger* N 402, N 492 und "3014"**

Für die geplanten Transformationen von Cosmiden aus der *A. niger* ATCC 36626-Genbank wird ein möglichst nah verwandter Wirtstamm benötigt, der weder zur Produktion von Cumarinen noch zur oxidativen Phenolkupplung befähigt ist. Daher wurden die Stämme *A. niger* N 402, N 492 und "3014"¹⁴¹ in 1 ml Kulturen auf biosynthetische Aktivität getestet.¹⁴² Rohextraktanalysen zeigten, dass N 492 und "3014" die bekannten 8,8'-Bicumarine in ähnlicher Weise produzieren wie ATCC 36626 (Abb. 97). Im Rohextrakt von N 402 werden hingegen keine Cumarine gefunden. Auch die Konzentration an anderen Sekundärmetaboliten, die bei 308 nm absorbieren, ist hier außerordentlich gering.

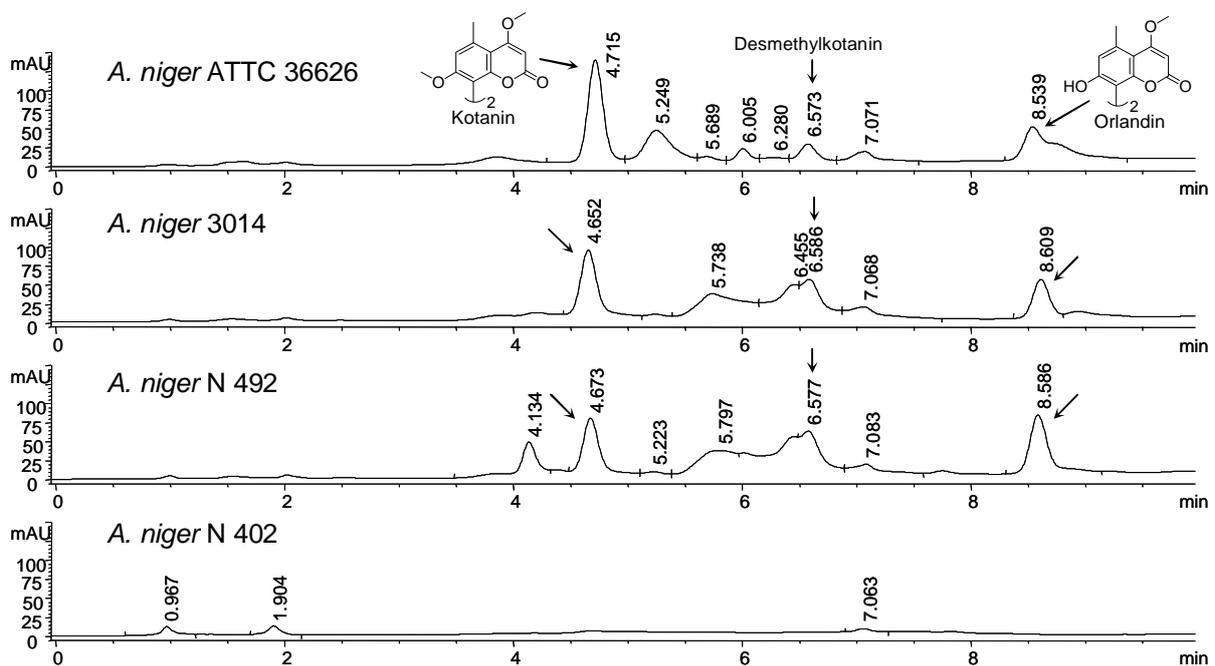


Abb. 97: Rohextrakte verschiedener *A. niger*-Stämme im Vergleich; *A. niger* N 402 produziert keine Cumarine.

Zusätzlich wurden mit allen Stämmen Verimpfungsexperimente mit Desmethylsiderin (**58**) und Siderin (**1**) im 1 ml Maßstab durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 98 - Abb. 100 dargestellt.

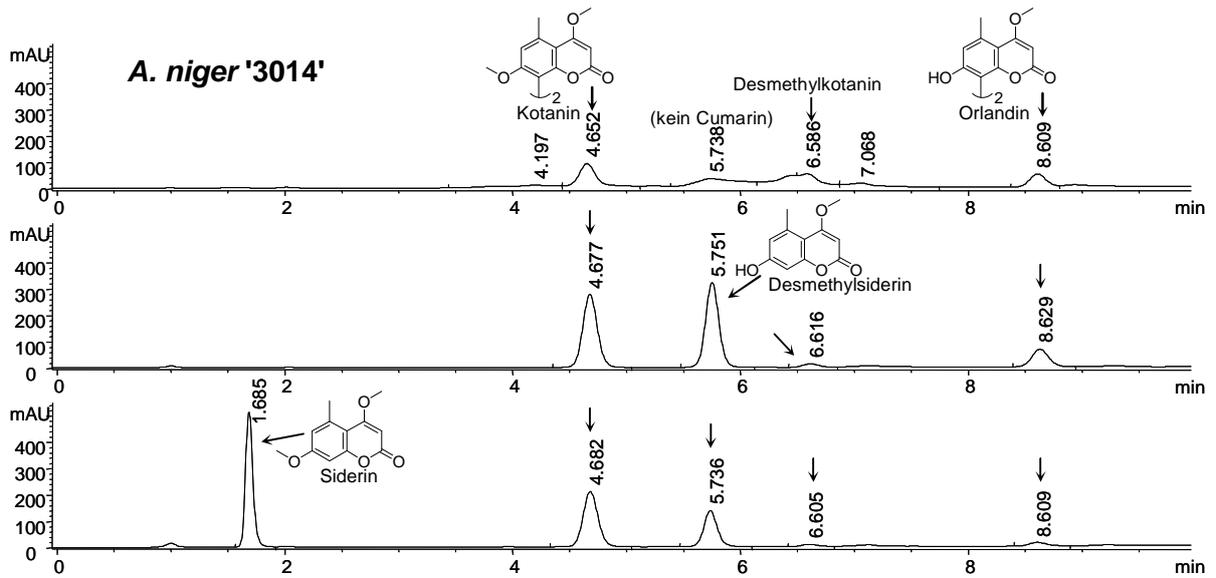


Abb. 98: Experimente mit *A. niger* "3014"; **oben:** Rohextrakt ohne Verfütterung; **Mitte:** Verfütterung von Desmethylsiderin (**58**); **unten:** Verfütterung von Siderin (**1**).

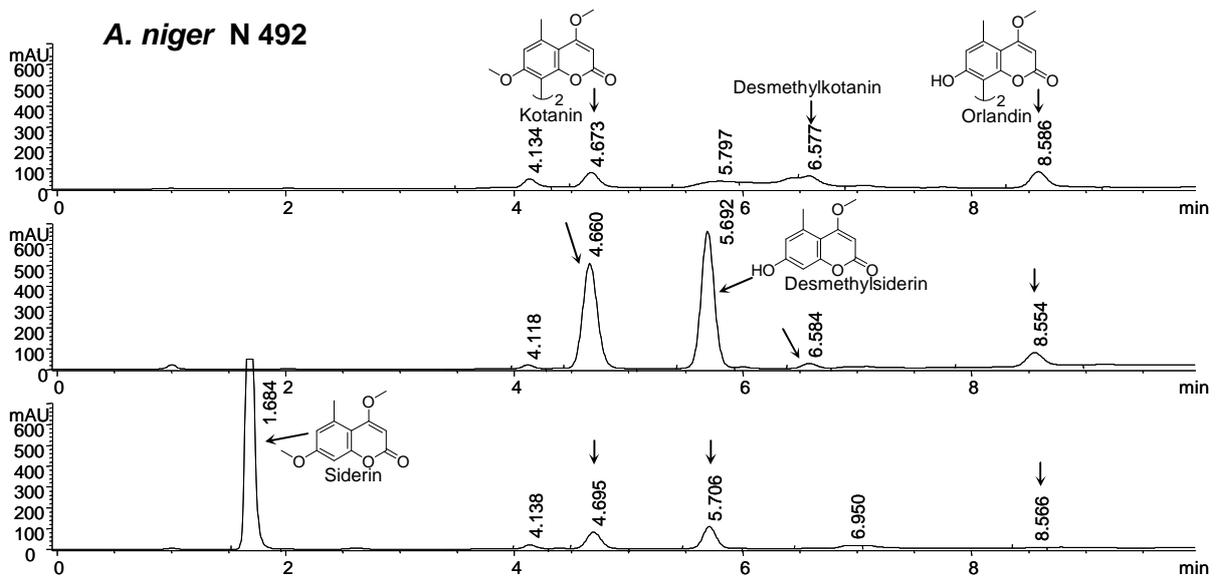


Abb. 99: Experimente mit *A. niger* N 492; **oben:** Rohextrakt ohne Verfütterung; **Mitte:** Verfütterung von Desmethylsiderin (**58**); **unten:** Verfütterung von Siderin (**1**).

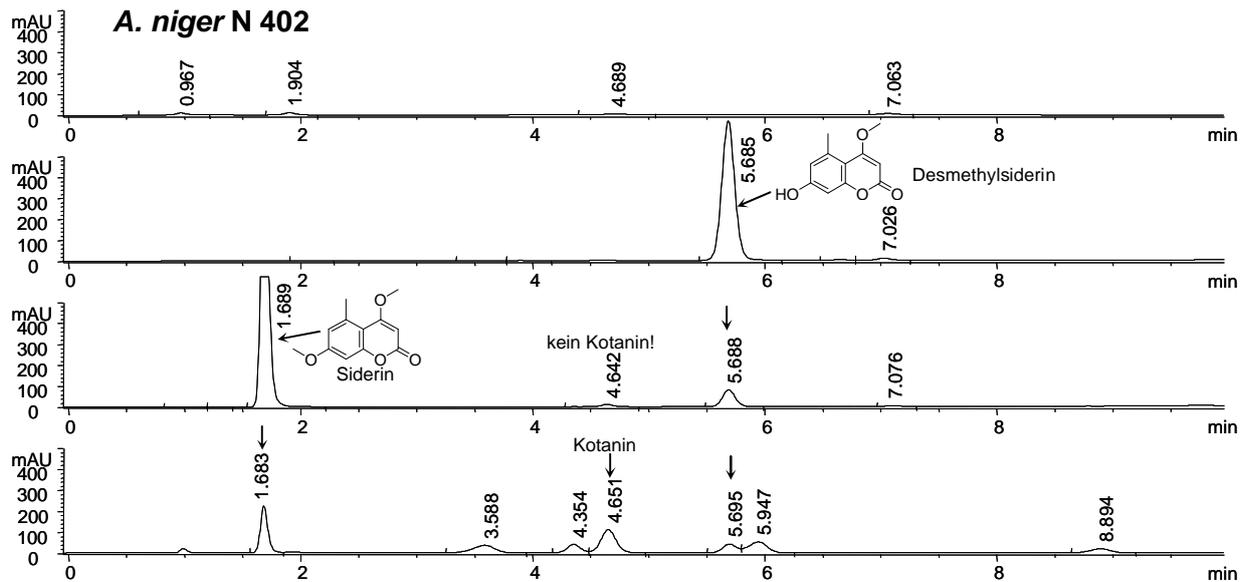
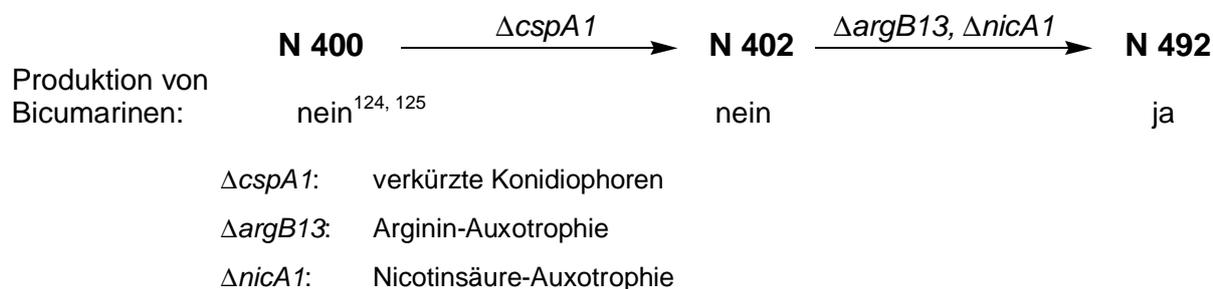


Abb. 100: Experimente mit *A. niger* N 402; von oben: **1.** Rohextrakt ohne Verfütterung; **2.** Verfütterung von Desmethylsiderin (**58**); **3.** Verfütterung von Siderin (**1**); **4.** Referenz [min]: Siderin (**1**) [1.7]; Isokotanin A (**7**) [3.6]; Desertorin C (**8**) [4.4]; Kotanin (**2**) [4.7]; Desmethylsiderin (**58**) [5.7]; 4-Methoxy-7-hydroxycumarin **59** [5.9]; 4,7-Dihydroxycumarin **60** [8.9].

Bei der Verfütterung von Desmethylsiderin (**58**) wurde für die Stämme "3014" und N 492 eine erhebliche Zunahme der Kotaninkonzentration beobachtet. Eine quantitative Auswertung dieser Beziehung ist schwierig, da bei den unterschiedlichen Experimenten die Werte stark schwankten und der analytische Assay nicht immer einheitlich war. Während sich ohne Verfütterung die Konzentrationen in den Rohextrakten bei den Cumarin-produzierenden Stämmen nicht signifikant unterschieden, führte eine Verfütterung von Desmethylsiderin (**58**) bei ATCC 36626 zu einem Anstieg der Konzentration etwa um den Faktor drei, während bei N 492 vier- bis siebenfach erhöhte Werte zu beobachten waren. Bei allen Verfütterungsexperimenten, die einen direkten Vergleich erlaubten (darunter zwei im 10 ml Maßstab), war die Kotaninkonzentration im Verimpfungsexperiment bei N 492 zwei- bis dreimal höher als bei ATCC 36626. Für "3014" wurde in einem Verfütterungsexperiment eine Konzentrationszunahme um den Faktor 3.3 gegenüber dem natürlichen Extrakt beobachtet. Die Experimente zeigen, dass die verschiedenen Stämme unterschiedlich auf die Verfütterung von Monomer **58** reagieren, obwohl ihre endogene Cumarinproduktion sehr ähnlich ist. Ein direkter Beweis für einen Einbau des Monomers, zum Beispiel über ^{13}C -Markierungsexperimente, wurde bisher nicht erbracht.

Auffällig ist *A. niger* N 402. Dieser Stamm produziert keine Cumarine und ist im Gegensatz zu *A. niger* NRRL 3122 auch nicht in der Lage, verimpftes Desmethylsiderin (**58**) oxidativ zu kuppeln. Dieses Ergebnis stimmt mit Angaben von SAMSON et al.^{124, 125} überein, die bei dem

zugehörigen Wildstamm zu *A. niger* N 402, *A. niger* N 400 (= CBS 120.49, = ATCC 9029), ebenfalls keine Bicumarinproduktion feststellten. Umso verwunderlicher ist, dass *A. niger* N 492, eine Deletionsmutante von N 402, Cumarine synthetisiert.¹⁴³



Eine befriedigende Erklärung für die einsetzende Cumarinproduktion bei N 492 wurde noch nicht gefunden. Offensichtlich besteht in allen Stämmen das Potential zur Cumarinbiosynthese, doch erst in Deletionsmutante N 492 kommt es zur Expression. Trotz der verbleibenden Unsicherheiten wurde Stamm N 402 als nicht produzierender Wirtsstamm für Transformationsexperimente ausgewählt.

4.4.4.2 *Aspergillus nidulans*

Bei *A. nidulans* (Risikogruppe 1)¹³⁷ wird neben der ungeschlechtlichen Fortpflanzung über Konidien auch ein sexueller Fortpflanzungszyklus beobachtet (Teleomorph: *Emericella nidulans*). Dies erlaubte schon früh klassische genetische Untersuchungen, die in neuerer Zeit durch zahlreiche molekulargenetische Arbeiten ergänzt wurden. Eine detaillierte Genomkarte,¹⁴⁴ die vollständige Genomsequenz von *A. nidulans* FSGC-4A¹⁴⁵ sowie zahlreiche weitere Informationen sind mittlerweile über das Internet frei zugänglich.¹⁴⁶

Analog zu den vorherigen Experimenten mit *A. niger* wurden die Stämme *A. nidulans* FGSC A26, R 21 und WG 355 untersucht. Die Rohextrakte dieser Stämme ergaben im HPLC-Chromatogramm ein ähnliches Muster. Die Ergebnisse für FGSC A26 sind in Abb. 101 dargestellt. Endogene Cumarine konnten nicht nachgewiesen werden. Auch bei Verfütterung von Desmethylsiderin (**58**) wurde keine Metabolisierung festgestellt. Lediglich vom Siderin (**1**) wurde, wie bei anderen *Aspergillen* auch, die Methoxygruppe an Position 7 teilweise hydrolysiert. *A. nidulans* ist daher als inaktiver Wirtsstamm für Transformationsexperimente prinzipiell geeignet.

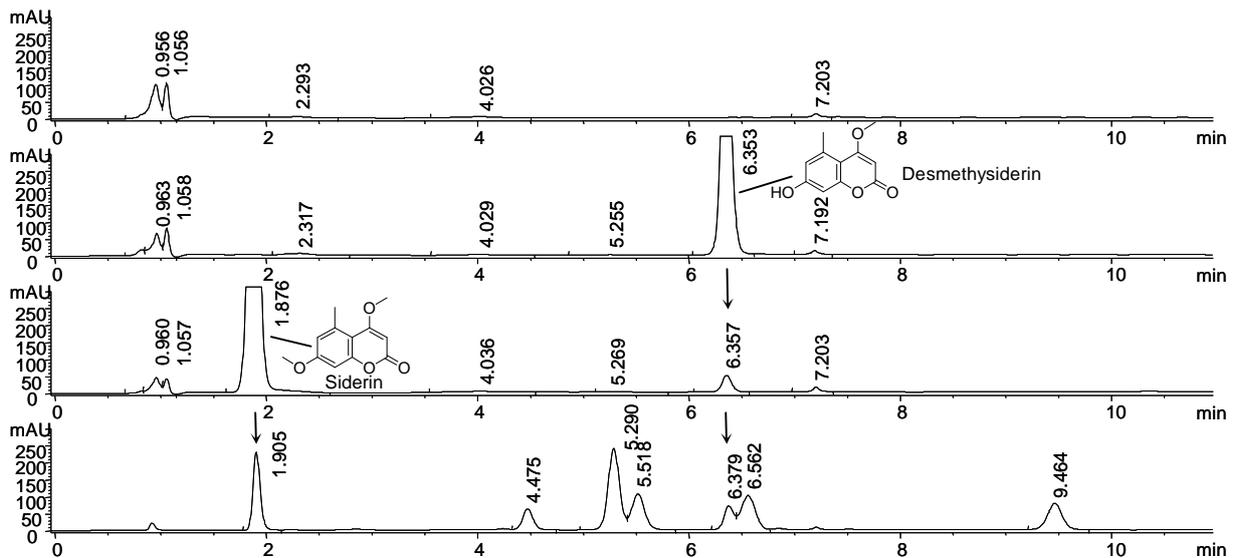


Abb. 101: Rohextrakte von *A. nidulans* FGSC A26; von oben: **1.** Rohextrakt ohne Verfütterung; **2.** Verfütterung von Desmethylsiderin (**58**); **3.** Verfütterung von Siderin (**1**); **4.** Referenz [min]: Siderin (**1**) [1.9]; Isokotantin A (**7**) [4.5]; Desertorin C (**8**) [5.3]; Kotanin (**2**) [5.5]; Desmethylsiderin (**58**) [6.4]; 4-Methoxy-7-hydroxycumarin **59** [6.6]; 4,7-Dihydroxycumarin **60** [9.5].

4.4.4.3 *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus ist ein in der Natur häufig vorkommender filamentöser Pilz, der beim Menschen besonders im Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen Beschwerden verursachen kann. Bei starker Immunsuppression kann es zu lebensgefährlichen Infektionen (Aspergillosen) kommen. *A. fumigatus* wird daher gemäß Biostoffverordnung der Risikogruppe 2 zugeordnet, und Arbeiten dürfen nur in Laboren der Schutzstufe 2 (S2) durchgeführt werden.¹³⁷ Wegen seiner klinischen Relevanz war *A. fumigatus* Gegenstand zahlreicher genetischer Studien und ist für molekularbiologische Untersuchungen gut erschlossen.¹⁴⁷ Derzeit wird das Genom von *A. fumigatus* AF 293 (= FGSC A1100) sequenziert. Bereits bekannte Sequenzen sind über das Internet frei zugänglich.¹⁴⁸

Analog zu den vorherigen Experimenten wurden die Stämme *A. fumigatus* ATCC 46645 und AF 293 untersucht. Die Kultur erfolgte bei 37 °C und konnten daher schon nach sieben Tagen beendet werden. Die Rohextrakte der beiden Stämme zeigen im HPLC-Chromatogramm ein vergleichbares Muster. Die Ergebnisse für ATCC 46645 sind in Abb. 102 dargestellt. Wie zuvor bei *A. nidulans* konnten auch bei *A. fumigatus* weder endogene Cumarine noch eine Kupplung verfütterter Monomere nachgewiesen werden. Lediglich bei Verimpfung von Siderin (**1**) wurde die bekannte Spaltung der Methoxygruppe an Position 7 beobachtet. *A. fumigatus* ist daher als inaktiver Wirtstamm ebenfalls für Transformationsexperimente geeignet.

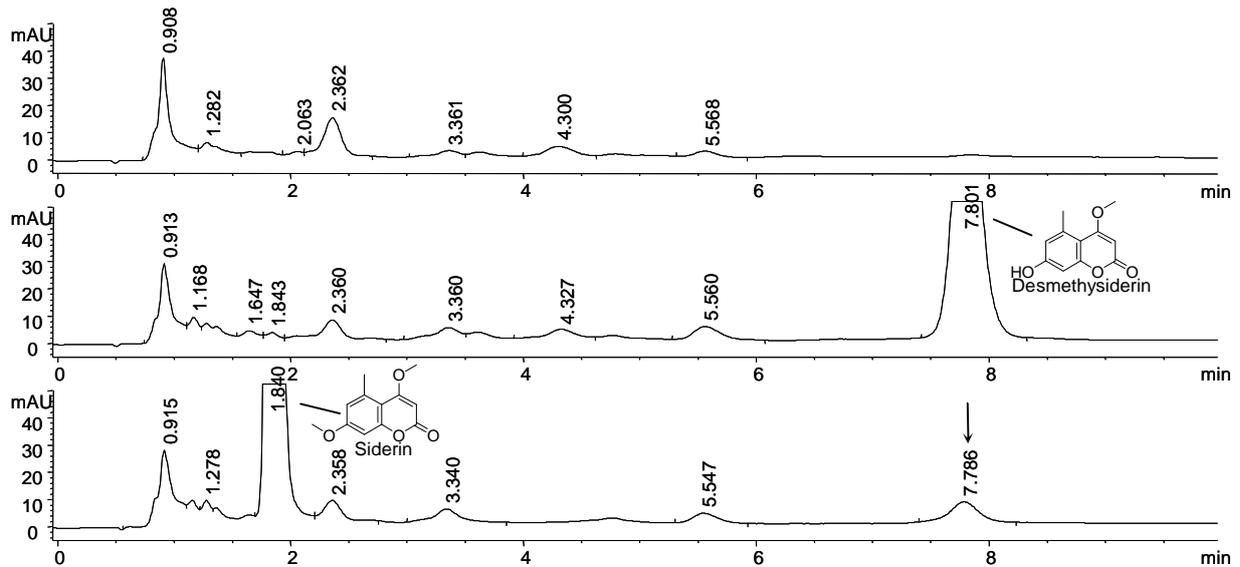


Abb. 102: Rohextrakte von *A. fumigatus* ATCC 46645. **Oben:** ohne Verfütterung; **Mitte:** Verfütterung von Desmethylerin (**58**); **unten:** Verfütterung von Siderin (**1**).

4.4.4.4 *Emericella desertorum*

Emericella desertorum CBS 653.73 wird in der Literatur als Produzent der Desertorine A, B und C beschrieben.¹²⁹ Für eigene Untersuchungen wurde der Stamm analog zu *A. niger* in 1 ml Ansätzen kultiviert und anschließend analysiert (Abb. 103).

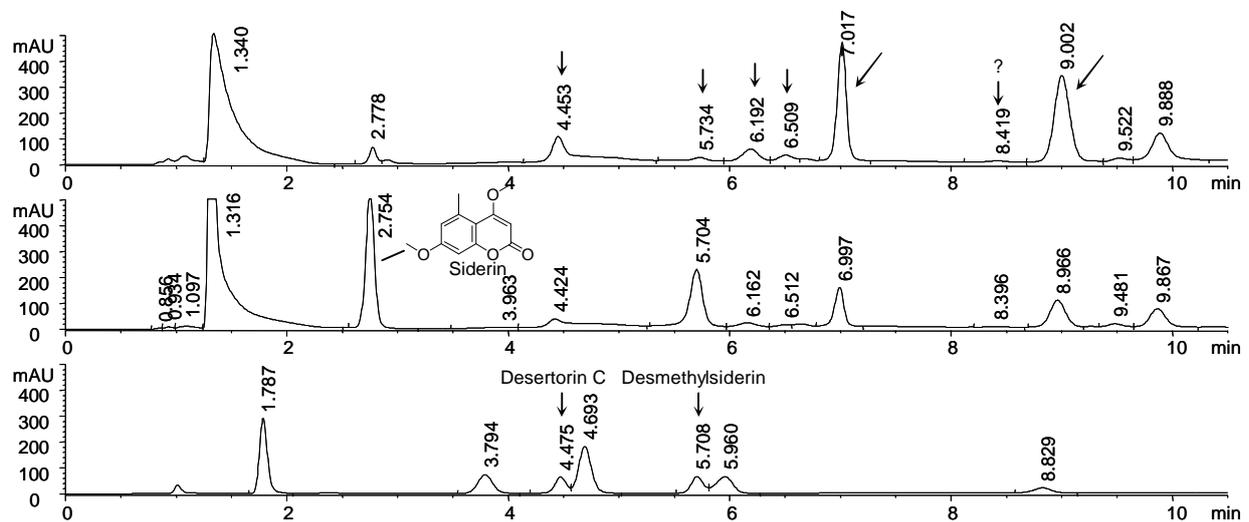


Abb. 103: Extrakte aus *E. desertorum*. **Oben:** Rohextrakt ohne Verimpfung (Banden, deren UV-Spektren denen der bekannten Cumarine gleichen, wurden mit Pfeilen markiert.); **Mitte:** Verimpfung von Siderin (**1**); **unten:** Referenz [min]: Siderin (**1**) [1.8]; Isokotanin A (**7**) [3.8]; Desertorin C (**8**) [4.5]; Kotanin (**2**) [4.7]; Desmethylerin (**58**) [5.7]; 4-Methoxy-7-hydroxycumarin **59** [6.0]; 4,7-Dihydroxycumarin **60** [8.8].

Im HPLC-Chromatogramm des Rohextrakts ist ein relativ schwacher Peak bei der Retentionszeit von Desertorin C (**8**) (4.5 min) zu erkennen sowie zwei weitere intensive

Peaks, die wahrscheinlich den Desertorinen B (**65**) (7.0 min) und A (**66**) (9.0 min) zuzuordnen sind. Auffällig ist, dass daneben noch mindestens drei weitere Cumarinpeaks auftreten. Einer davon hat die Retentionszeit von Desmethylsiderin (**58**) (5.7 min).ⁱ Weitere Untersuchungen mit größeren Kulturen, die eine Isolierung und Identifizierung dieser Substanzen erlauben sind hier erforderlich. Bei Verfütterung von Desmethylsiderin (**58**) konnte keine signifikante Änderung der Cumarinkonzentrationen beobachtet werden. Bei Verfütterung von Siderin (**1**) kam es, wie bei anderen Aspergillen auch, zur Anreicherung von Desmethylsiderin (**58**), während die Konzentrationen der anderen Cumarine eher gering blieben. Ob es zu einem Einbau in die Bicumarine kommt, kann erst durch ¹³C-Markierungsexperimente ermittelt werden.

ⁱ Im RP-18-Assay ist dies ebenfalls der Fall. Wegen der sehr geringen Konzentration war eine eindeutige Identifizierung der Substanz über UV-Spektren nicht möglich.

4.5 Molekularbiologische Arbeiten

4.5.1 Zusammenfassung

Zur Identifizierung des enzymatischen Systems, das die oxidative Phenolkupplung katalysiert, wurde zunächst eine Cosmidbank von *Aspergillus niger* ATCC 36626 erstellt. Die Cosmide enthalten ein Hygromycin-Resistenz-Gen, das als Selektionsmarker bei Transformationen in verschiedene Aspergillen, darunter *A. niger*- und *A. fumigatus*-Wildstämme dient, die anschließend auf biosynthetische Aktivität getestet werden können.

Zudem wurde mit der Klonierung eines weiteren "Cosmid-Shuttle-Vektors" mit dem *pyr4*-Gen als Selektivitätsmarker begonnen. Dieses erlaubt die Komplementierung von Uridin-beziehungsweise Pyrimidin-auxotrophen Deletionsmutanten von verschiedenen Aspergillen, wie zum Beispiel *A. nidulans*. Da die Cumarine wahrscheinlich polyketidischen Ursprungs sind (vergl. Abschnitt 4.4.2.3, S. 83) und PKS-Gene in filamentösen Pilzen gewöhnlich als Cluster vorliegen, wurde die Cosmidbank auf "nicht-reduzierende" PKS-Gene gescreent, um so einen Biosynthesecluster zu identifizieren, der die Aktivität zur Phenolkupplung enthält. Es wurden 52 Cosmide positiv getestet, die in hohem Maße divers sind und möglicherweise mehrere PKS-Gene codieren. Versuche zur Transformation ausgewählter Cosmide in *A. niger* N 402 blieben bisher allerdings erfolglos.

4.5.2 Konstruktion einer Cosmidbank von *Aspergillus niger* ATCC 36626¹⁴⁹

Als Basis für molekulargenetische Arbeiten an *A. niger* ATCC 36626 wurde eine Cosmidbank aufgebaut. Eine solche Genbank ist eine Sammlung rekombinanter DNA-Moleküle in einem Vektor, die zusammen die gesamte genetische Information eines Organismus repräsentieren.¹⁵⁰ Als Basis wurde der Cosmidvektor gewählt, da dieser gegenüber anderen Klonierungsvektoren entscheidende Vorteile aufweist. Einerseits kann auf die Klonierung großer DNA-Moleküle selektioniert werden (37-52 kb). Andererseits kann die DNA *in vitro* in infektiöse Phagenpartikel eingebaut werden. Dies erlaubt eine hocheffiziente Transformation in Wirtszellen durch Infektion. Die Ausbeute an nicht-rekombinanten Kolonien ist dabei verschwindend gering, da selbst Dimere des Cosmidvektors zu klein sind um in Phagen verpackt zu werden.

In dieser Arbeit wurde der "Shuttle"-Cosmidvektor pANsCos1¹⁵¹ verwendet (Abb. 104), der eine effiziente Konstruktion einer repräsentativen genomischen Bank aus nur 15-20 µg genomischer DNA erlaubt. Zudem enthält er ein funktionelles Hygromycin B-Phosphotransferase (*hph*)-Gen aus *E. coli* als selektierbaren Marker,¹⁵² der Wirtspilzen eine Hygromycin B-Resistenz verleiht.

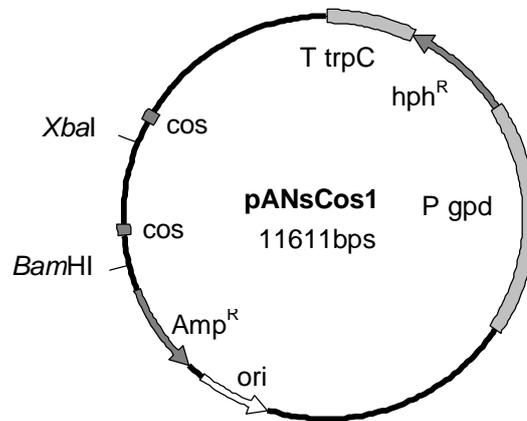


Abb. 104: Physikalische Karte des Cosmidvektors pANsCos1. *ori*: ColE1 Replikationsursprung; *Bam*HI, *Xba*I: singuläre Restriktionsschnittstellen; *cos*: Sequenzen der kohäsiven Enden des Bakteriophagen λ ; *Amp*^R: Ampicillin-Resistenzgen; *hph*^R, (*P gdp*, *T trpC*): Hygromycin B-Phosphotransferasegen (= Hygromycin B - Resistenzgen unter Kontrolle des Promotors des Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gens (*gdp*) und des Transkriptionsterminators des *trpC*-Gens, beide aus *A. nidulans*).¹⁵²

Der Aufbau der Cosmidbank ist in Abb. 105 schematisch dargestellt. Zunächst wird der Shuttle-Vektor (pANsCos1) mit *Xba*I linearisiert und an der *Bam*HI-Restriktionsstelle ein weiteres Mal gespalten. In diese Schnittstelle wird ein Fragment partiell verdauter, genomischer DNA aus *A. niger* inseriert. Die Ligationsprodukte werden *in vitro* in infektiöse Phagenpartikel verpackt. Schließlich werden *E. coli*-Wirtszellen mit den Phagen infiziert, über den Selektionsmarker (Ampicillin-Resistenz) selektiert und gepoolt.

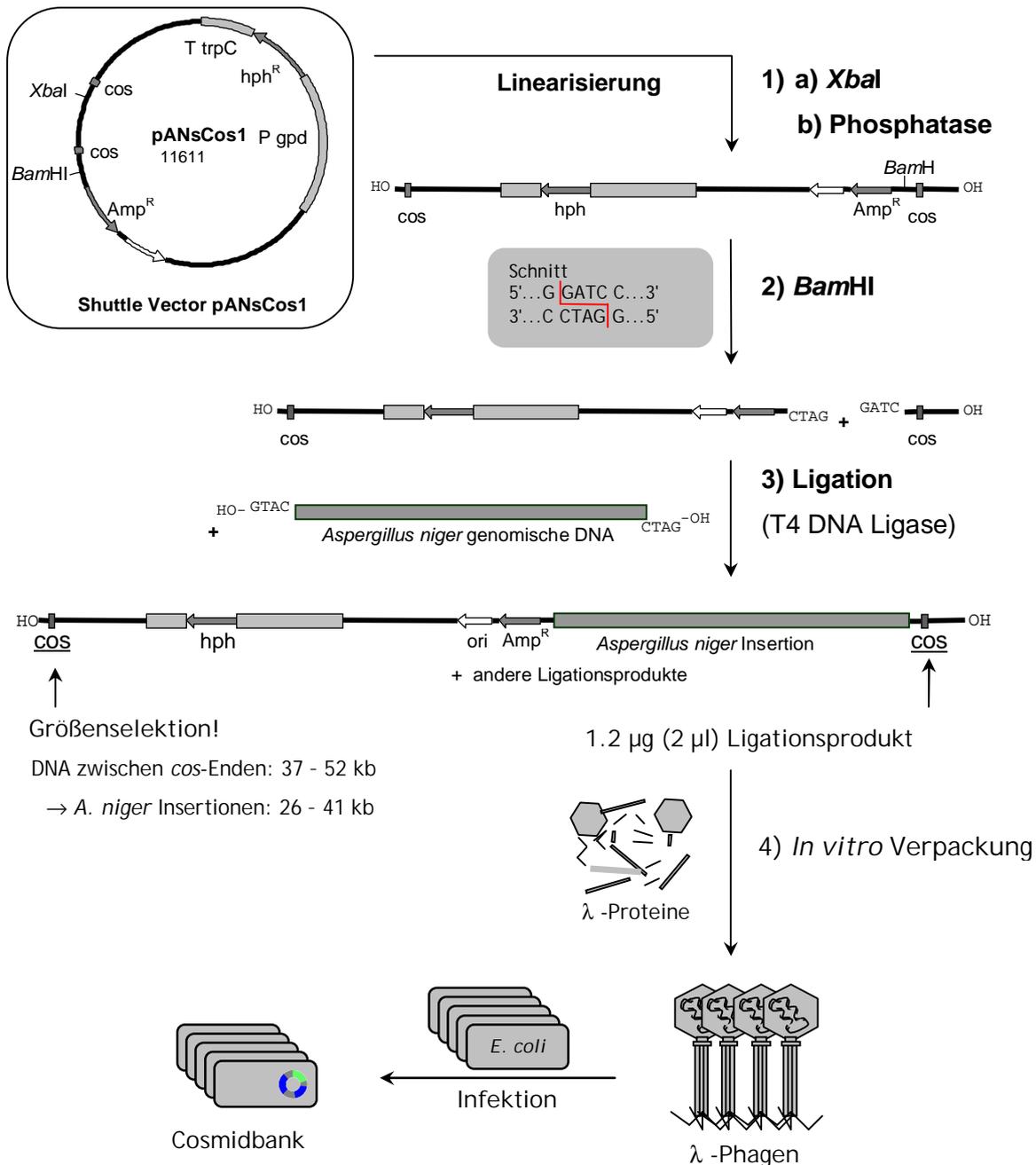


Abb. 105: Schematische Darstellung des Aufbaus der *A. niger* Cosmidbank mit dem Shuttle-Vektor pANsCos1.

4.5.2.1 Präparation genomischer DNA aus *A. niger*

Um eine adäquate Menge genomischer DNA aus *A. niger* zu erhalten wurde hochmolekulare DNA im 100 µg Maßstab nach Literaturvorschriften aus Myzel isoliert.^{149, 153} Anders als in diesen Protokollen vorgesehen, mußte der Phenol-Chloroform-Reinigungsschritt mehrmals wiederholt werden um verdaubare DNA zu erhalten, was wahrscheinlich zu einer Aufspaltung in kleinere Fragmente führte. Die erhaltene DNA war trotzdem für den Aufbau einer Cosmidbank gut geeignet. Zunächst wurden analytische Partialrestriktionen mit *Sau3AI* durchgeführt, wobei ermittelt wurde, unter welchen Bedingungen ein Maximum der

gewünschten Fragmentgrößen von 20-40 kb entsteht (Abb. 106, rechts). Anschließend wurden in einem präparativen Ansatz 50 µg DNA über 90 s mit 14 Uⁱ *Sau3AI* bei 37 °C restringiert. Nach Aufreinigung der DNA wurde mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert um eine Religation der genomischen DNA bei Einbau in pANsCos1 zu vermeiden (Abb. 106, links).

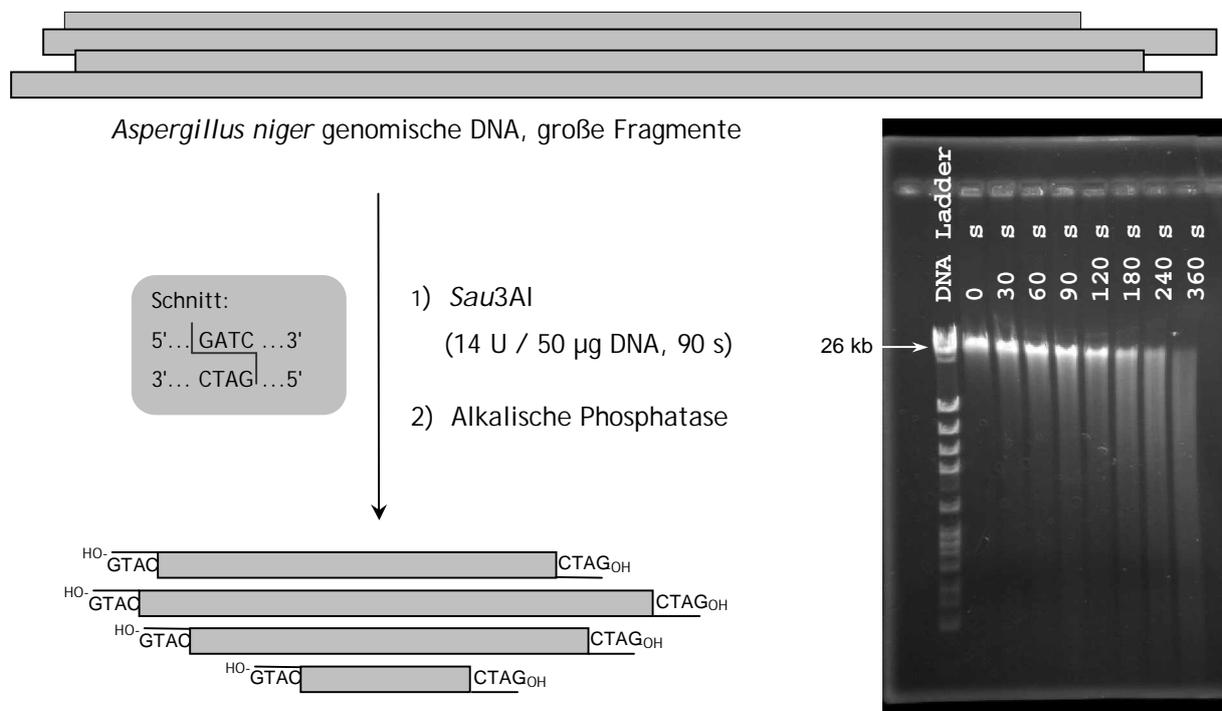


Abb. 106: Partielle Restriktion von hochmolekularer genomischer *Aspergillus niger*-DNA mit *Sau3AI* und Dephosphorylierung. Rechts: Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Restriktion über Gelelektrophorese (DNA-Ladder: größtes Fragment: 26 kb (*MluI* / *Eco130I*-λ-DNA)).

4.5.2.2 Präparation des Cosmidvektors pANsCos1 und Aufbau der Cosmidbank

15 µg des Vektors wurden durch Verdau mit *XbaI* linearisiert und dephosphoryliert um eine Religation zu vermeiden. Anschließend wurde mit *BamHI* restringiert, wodurch eine Insertionsstelle für genomische DNA-Fragmente geschaffen wurde.

Zur kovalenten Verknüpfung der DNA-Einheiten wurden 2 µg des so präparierten Cosmidvektors und 10 µg partiell verdaute und dephosphorylierte DNA aus *A. niger* mit T4 DNA-Ligase umgesetzt. Aus den drei Fragmenten (die unterschiedlichen *A. niger*-DNA-Einheiten werden hierbei als *ein* Fragment angesehen) können 6 Ligationsprodukte entstehen,

ⁱ 1 U = 1 Unit, Restriktion von 1 µg λ-DNA · h⁻¹ (37 °C, 50 µl Reaktionsvolumen).

von denen aber nur das in Abb. 105 gezeigte Insertionsprodukt in pANsCosA1 für den Aufbau der Cosmidbank von Bedeutung ist.ⁱ

Die für die *in vitro* Verpackung der DNA benötigten Phagenköpfe, Verpackungsfaktoren und Schwänze der λ -Phagen waren in Form von zwei Lysaten kommerziell erhältlich, von denen jedes in einem anderen Schritt der Morphogenese der λ -Phagen defekt war. Der Phage λ verpackt von einer *cos*-Einheit zur nächsten auf einem DNA-Abschnitt. Da sich auf dem Vektor pANsCos1 bereits zwei *cos*-Einheiten befinden, entfällt die normalerweise erforderliche Bildung von Konkatameren,¹⁵⁴ wodurch die Effizienz der Verpackung erheblich gesteigert wird.

Titration der Cosmidbank

Zur Bestimmung der Phagenkonzentration im Verpackungsansatz und der Effizienz der Infektion wurden geringe Mengen der Phagen-Lösung zur Infektion mit *E. coli* inkubiert und anschließend auf Agarplatten unter Selektion auf Ampicillinresistenz ausplattiert.

V: Volumen ausplattiert [μ l]	50	200	50	200	250	500
F: Gesamtverdünnungsfaktor der Phagenlösung	100	100	500	500	500	500
N_{gez}: Zahl der gezählten Kolonien	90	304	10	54	58	89
N_{ges}: Zahl der zu erwartenden Kolonien bei 500 μ l Phagenlösung ($N_{ges} = V^{-1} \cdot F \cdot N_{gez} \cdot 500 \mu$ l)	90000	76000	50000	67500	58000	44500

Die Titration ergibt eine Gesamtzahl von 45000 bis 90000 Cosmiden für die gesamte Genbank. Die Zahl der Cosmide (**N**), die notwendig sind, um das gesamte Genom mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von **P** abzudecken, berechnet sich wie folgt.

$$\mathbf{N} = \frac{\ln(1 - \mathbf{P})}{\ln(1 - \mathbf{f})}$$

mit: **f** = Größenverhältnis der Insertion zum Gesamtgenom

Ausgehend von einer Insertionsgröße von durchschnittlich 30 kb zu einer Genomgröße von 34.5 Mb ($\mathbf{f} = 8,695 \cdot 10^{-4}$) und einer Wahrscheinlichkeit von **P** = 99.9 % ergibt sich eine Zahl

ⁱ Die drei möglichen Ligationsprodukte, die aus zwei Fragmenten von pANsCos1 *ohne* Insertion genomischer DNA gebildet werden, sind zu klein für einen Einbau in λ -Phagen. Ligationsprodukte *mit* Einbau von *A. niger*-DNA, aber ohne oder mit zwei *ori*-Einheiten, können nach Infektion in *E. coli* nicht korrekt repliziert werden.

N von rund 8000 Klonen. Die durch in vitro Verpackung erhaltenen Phagenlösung ist also zur Amplifikation der Cosmidbank gut geeignet.

Amplifikation der Cosmidbank

Nach erfolgreicher Titration wurden *E. coli* Kulturen mit der Phagenlösung infiziert und auf 20 Agarplatten mit Ampicillin als Selektionsmarker ausplattiert.

Stichprobenartiges Auszählen der Kolonien ergab eine Gesamtzahl von über 40000 Cosmiden. Die Kolonien wurden durch Abwaschen der Platten mit Nährmedium gepoolt, mit Glycerin versetzt, in 180 Eppendorff-Gefäße mit je 0.5 ml aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Titration der Keimdichte

Eine Bestimmung der Keimdichte durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe ergab einen Wert von ca. 1.5 Millionen Keimen pro μl .

Überprüfung der Cosmidbank auf Diversität

Um zu überprüfen, ob in den erhaltenen Cosmiden unterschiedliche DNA-Einheiten inkorporiert sind, wurde bei 25 Klonen durch Restriktionsverdau mit *HindIII* geprüft, ob für die einzelnen Cosmide unterschiedliche Bandenmuster zu erkennen sind. Wie Abb. 107 zeigt ist dies der Fall.

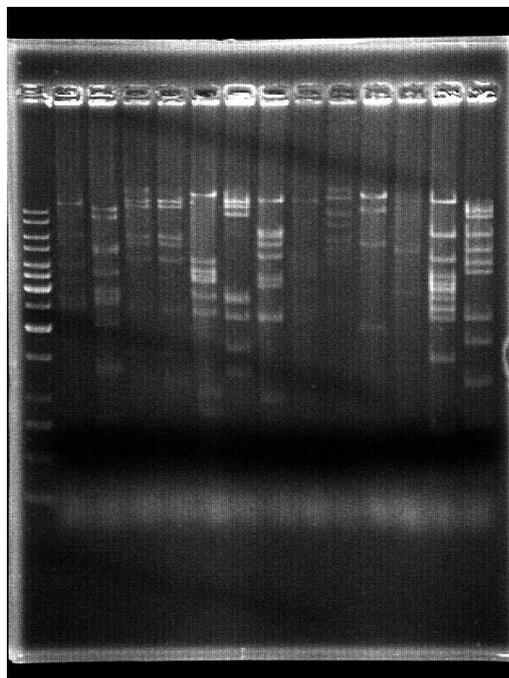


Abb. 107: Unterschiedliche Bandenmuster beim Restriktionsverdau zufällig ausgewählter Cosmide mit *HindIII* belegen deren Diversität (1. Spur: "DNA Ladder Mix" 10 kb - 100 bp, anschließend 13 der 25 getesteten Cosmide).

4.5.3 Konstruktion eines Cosmid-Shuttle Vektors mit dem *pyr4*-Gen als Selektionsmarker

Da die Hygromycinresistenz als Selektionsmarker für *Aspergillus nidulans* ungeeignet ist,ⁱ sollte eine analoge Cosmidbank mit dem *pyr4*-Gen als Selektionsmarker erstellt werden.

pyr4 (NCBI-Accession Nr.: M13448) codiert die Orotidin-5'phosphat-Decarboxylase in *Neurospora crassa*, die die Umwandlung von Orotidinmonophosphat zum Uridinmonophosphat in der Pyrimidinbiosynthese katalysiert.¹⁵⁵ Deletionsmutanten dieses Gens sind entsprechend Uridin- beziehungsweise Pyrimidin-auxotroph. Durch heterologe Expression von *pyr4* können Auxotrophien in verschiedenen Organismen, darunter *E. coli*,¹⁵⁵ *A. nidulans*¹⁵⁶ und *A. fumigatus*,¹⁵⁷ komplementiert werden. *pyr4* ist daher als Selektionsmarker vielseitig einsetzbar. Die Strategie zum Aufbau des Cosmid-Shuttle Vektors pANsCos2 mit *pyr4* als Selektionsmarker ist in Abb. 108 schematisch dargestellt.

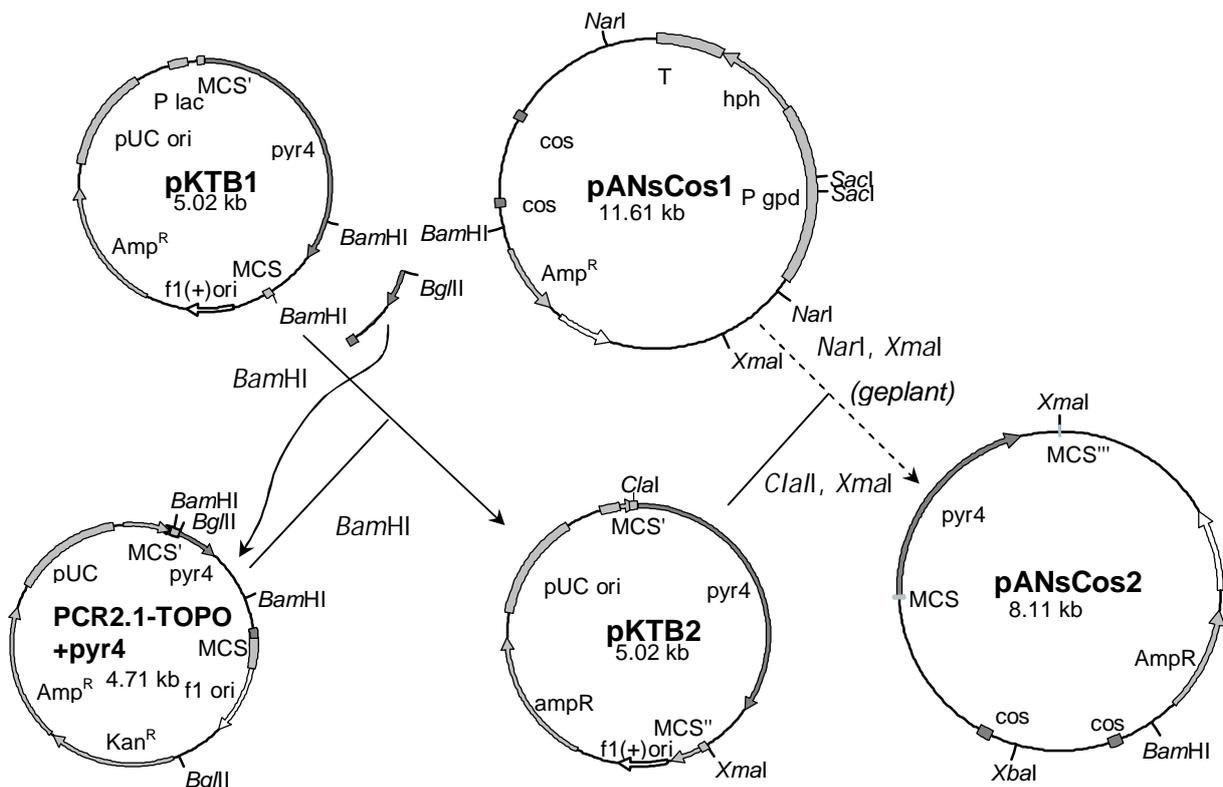


Abb. 108: Aufbau eines zweiten Cosmid-Shuttle Vektors pANsCos2 mit dem *pyr4*-Gen als Selektionsmarker. (Die Ligation des modifizierten *pyr4* Gens aus pKTB2 mit dem Produkt eines *NarI*-*XmaI*-Restriktionsverdaus von pANsCos1 zu pANsCos2 wurde noch nicht durchgeführt.)

ⁱ *A. nidulans* verfügt über eine eingeschränkte natürliche Resistenz gegen Hygromycin B.

Bei den Klonierungsarbeiten diente der von BRAKHAGE zur Verfügung gestellte Vektor pKTB1 als Quelle für *pyr4*.¹⁵⁸ Da dieses Gen eine *Bam*HI-Schnittstelle enthält, die bei der Restriktion des Shuttle Vektors für den Aufbau der Cosmidbank stören würde, kann die Sequenz nicht direkt in pANsCos1 eingebaut werden, sondern muss erst durch gerichtete Mutagenese modifiziert werden. Dazu wurde mit den Primern M13-forwardⁱ und pKTB/*Bgl*II ein Fragment des *pyr4*-Gens von der *Bam*HI-Schnittstelle bis zur "Multiple Cloning Site" (MCS) amplifiziert, wobei anstelle der *Bam*HI- eine *Bgl*II-Schnittstelle entstand (Abb. 109).

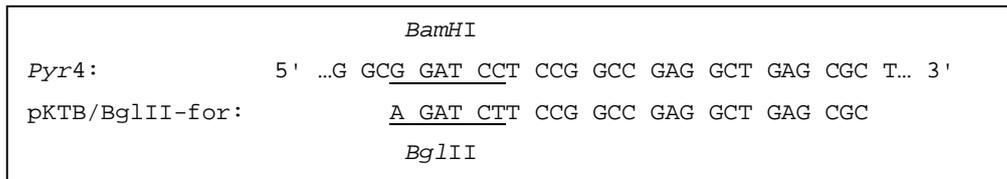


Abb. 109: Sequenz von pKTB1 an der *Bam*HI Schnittstelle im *pyr4*-Gen im Vergleich mit dem Primer pKTP/*Bgl*II-for.

Das so modifizierte Basentriplett codiert Lysin anstelle von Prolin. Das circa 570 bp lange PCR-Produkt wurde zunächst in PCR[®]2.1-TOPO[®] (INVITROGEN) kloniert und anschließend mit *Bgl*II und *Bam*HI ausgeschnitten. Das Fragment wurde daraufhin in pKTB1, aus dem die analoge Sequenz zuvor mit *Bam*HI entfernt worden war, ligiert. Die korrekte Orientierung bei der Ligation wurde durch "Colony-PCR" an 10 Transformanten überprüft (Primer: M13 forward und pKTB/*Bgl*II), von denen 3 positiv getestet wurden.

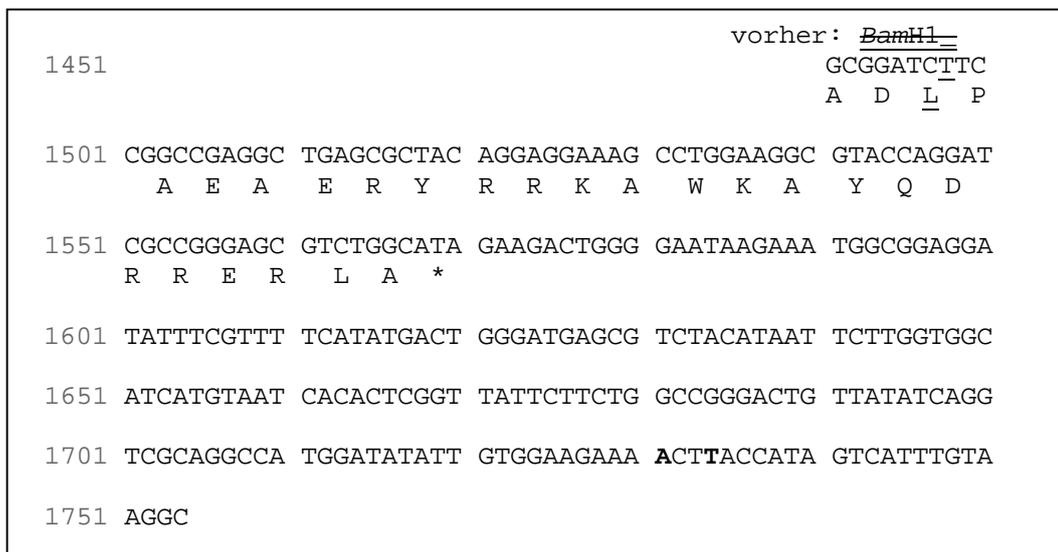


Abb. 110: Durch PCR-modifiziertes Ende des *pyr4*-Gens in pKTB2; unterstrichen: Austausch 'T' gegen 'C' beziehungsweise 'L' (Leucin) gegen 'P' (Prolin), fett: zusätzliche Basenpaare; Zählweise der Basenpaare bis 1730 wie in *pyr4*, NCBI-Accession Nr.: M13448.

ⁱ M13 Forward (-20) Universalprimer: 5'- GTA AAA CGA CGG CCA GT -3'

Aus einer dieser Kolonien wurde der rekombinante Vektor (pKTB2) isoliert und der eingefügte Abschnitt wurde sequenziert.ⁱ Ein Sequenzvergleich mit *pyr4* ergab zwei Fehler: ein zusätzliches 'A' hinter Position 1730 und ein zusätzliches 'T' hinter Position 1752 des *pyr4*-Gens. Die Fehler liegen am Ende des Gens außerhalb des codierenden Bereiches, weshalb die Expression nicht beeinträchtigt sein sollte (Abb. 110).

Für den Einbau von *pyr4* in pANsCos1 wurde der Vektor pKTB2 mit *Cla*I und *Xma*I restringiert und das *pyr4*-enthaltende 2.06 kb-Fragment isoliert. Daneben wurde pANsCos1 mit *Nar*I und *Xma*I geschnitten, wodurch ein circa 6 kb großes Fragment entsteht, welches die *cos*-Einheiten, die Ampicillin-Resistenz sowie den Replikations-Ursprung enthält, und mit dem zuvor isolierten *pyr4*-Fragment ligiert werden kann.

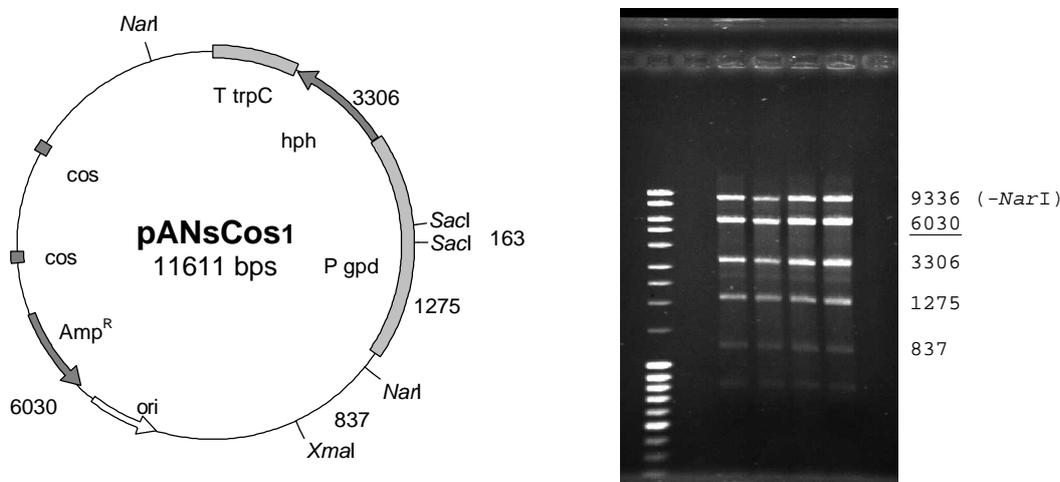


Abb. 111: pANsCos1-Karte und Gelelektrophorese nach kombinierter Restriktion mit *Nar*I, *Xma*I und *Sac*I. (Der Verdau mit *Nar*I verlief auch unter optimierten Bedingungen nur unvollständig. Um die dadurch bedingte Entstehung eines 5.6 kb Fragments, welches sich unter Umständen nur schwer vom gewünschten 6.0 kb Abschnitt abtrennen lässt, zu vermeiden, wurde zusätzlich mit *Sac*I geschnitten.)

Bei der Isolierung des 6 kb-Abschnitts von pANsCos1 kam es zu unerwarteten Schwierigkeiten. Weder durch klassische Verfahren ("Freeze and Squeeze") noch durch Verwendung von Gelextraktions-Kits verschiedener Anbieter konnte DNA isoliert werden. Die Arbeiten wurden daher aus zeitlichen Gründen eingestellt.

ⁱ Aus technischen Gründen wurde die Sequenzierung erst jetzt und nicht bereits auf der Stufe des rekombinanten PCR2.1-TOPO-Vektors durchgeführt.

4.5.4 Screening auf Polyketidsynthase-Gene

Untersuchungen von LAPPER¹³⁰ sowie STOTHERS und STOESSL¹³² (siehe auch Abschnitt 4.4.2.3, S. 83) legen einen polyketidischen Ursprung für die Cumarine Siderin (**1**) und Kotanin (**2**) nahe. Auch wenn dabei nur geringe Einbauraten erzielt wurden und sich die ¹³C-Acetat Einbauexperimente in eigenen Versuchen nicht reproduzieren ließen, wurde der postulierte polyketidische Ursprung der Cumarine als Ansatzpunkt für die Identifizierung der Phenolkupplungsaktivität gewählt. Wie auch in Bakterien liegen Polyketid-Synthase-Gene (PKS) auch in Pilzen in der Regel als Cluster vor.¹⁵⁹ Darüber hinaus können sie im Genom leicht über DNA-Sonden (Primer) identifiziert werden.¹⁶⁰ Es sollte daher möglich sein durch Identifizierung eines Polyketid-Biosynthese-Clusters den genetischen Code für die Phenolkupplungsaktivität zu finden. Dieser Ansatz erspart das aufwändige Transformieren und Screenen der gesamten Genbank. Er birgt allerdings auch die Gefahr des Scheiterns, falls sich das gesuchte Gen nicht in einem PKS-Cluster befindet. Einen Hinweis hierauf liefert *A. niger* NRRL 3122, der keine Cumarine produziert, aber die enzymatische Aktivität zur oxidativen Phenolkupplung expremiert. Um abschätzen zu können, ob ein DNA-Screening erfolgversprechend ist, wurde zunächst das *A. niger*-Genom *in silico* gescreent. Da von der Firma DSM der Stamm N 3122 sequenziert wurde, konnte dabei allerdings nicht davon ausgegangen werden, dass direkt ein Gen gefunden wird, das die Cumarinbiosynthese codiert.

Anschließend wurde die Cosmidbank von *A. niger* ATCC 36626 auf DNA-Ebene gescreent.

4.5.4.1 *In silico*-Screening auf PKS-Gene

Für die Firma DSM, Niederlande, ist *A. niger* ein Schlüsselorganismus zur Massenproduktion von Enzymen und anderen Proteinen.¹³⁶ In Zusammenarbeit mit den deutschen Firmen GENE ALLIANCE und BIOMAX wurde von Juni 2000 bis Oktober 2001 das 34.5 Mb große Genom von *A. niger* NRRL 3122, dem Basisstamm der DSM-Produktionsstämme, vollständig sequenziert. Seit Januar 2002 können akademische Einrichtungen nach vorheriger Anmeldung kostenlos online auf die Datenbank zugreifen.

Ausgangspunkt für die Suche nach PKS-Genen war das von BINGLE et al.^{160a} veröffentlichte Primer-Paar LC1 und LC2c für nicht reduzierende (NR) PKS aus je 2 × 7 Aminosäuren. Da in der *A. niger*-Genbank nicht mit kurzen Sequenzen nach Homologien gesucht werden kann, musste zunächst eine geeignete virtuelle DNA-Sonde erstellt werden. LC1 und LC2c wurden

daher in eine NCBI-BLAST-Suche ("short and nearly exact matches") eingesetzt.¹⁶¹ Es wurden 23 PKS-Gene mit guter Übereinstimmung (Score = 29-26, E = 0.31-3.1)ⁱ gefunden. Vier davon waren Genfragmente (β -Ketosynthase(KS)-Domänen). Beste Übereinstimmung mit dem Consensus der vollständigen Gene zeigte eine *Nodulisporium* sp.-PKS, die an der 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin (THN)-Synthese beteiligt ist. Sie wurde als Sonde für eine BLASTp-Suche in der *A. niger*-Datenbank verwendet.¹⁶² Die ersten 8 "Hits" wurden mit BLASTp in NCBI auf Homologien untersucht (Tabelle 6).

Hit	Datenbank-eintrag	Homologie zu Organismus	Gen	E	Ident.	Anmerkungen
1	An00g10363	<i>A. fumigatus</i>	alb1 u. pksP	0.0	67 %	Naphthopyron Synthase
		<i>E. nidulans</i>	wA	0.0	68 %	
2.	An00g10365	<i>A. terreus</i>	at4	0.0	46 %	Naphthopyron Synthase
		<i>A. fumigatus</i>	alb1 u. pksP	0.0	42 %	Naphthopyron Synthase
		<i>E. nidulans</i>	wA	0.0	43 %	
3	An00g10387	<i>A. terreus</i>	at5	0.0	41 %	Melanin Synthase
		<i>Glarea lozoyensis</i>	pks1	0.0	40 %	
4	An00g09691	<i>A. terreus</i>	at5	0.0	46 %	Melanin Synthase
		<i>Glarea lozoyensis</i>	pks1	0.0	38 %	
5	An00g10364	<i>E. nidulans</i>	wA	e-126	25 %	Naphthopyron Synthase vermutete Dehydrogenase Domäne e-16
		<i>A. fumigatus</i>	alb1	e-124	27 %	
6	An00g10388	<i>A. fumigatus</i>	alb1 u. pksP	e-116	27 %	vermutete Dehydrogenase Domäne e-20
		<i>Glarea lozoyensis</i>	pks1	e-115	28 %	
7	An00g10333	<i>Streptomyces natalensis(!)</i>	pimS2	0.0	41 %	
		Pilz: <i>A. terreus</i>	at1	e-112	30 %	
8	An00g09690	<i>Monascus purpureus</i>	pks1	e-101	25 %	vermutete Dehydrogenase Domäne e-22
		<i>Glarea lozoyensis</i>	pks1	e-100	30 %	

Tabelle 6: *A. niger* NRRL 3122-PKS und Homologien zu bekannten Enzymen.

Die Übereinstimmung der gefundenen *A. niger*-Sequenzen mit den Primern LC1 und LC2c kann aus Abbildung Abb. 112 entnommen werden.

ⁱ **Score:** Maß für die Übereinstimmung von Sequenzen

E-Wert: Erwartungswert; Wahrscheinlichkeit, mit der der gefundene Score durch Zufall beim Durchsuchen einer Datenbank der verwendeten Größe auftritt. $E \geq 1$: Man muss damit rechnen, dass die gute Übereinstimmung Zufall ist; $E = 0.02 - 1$: Homologie nicht auszuschließen; $E \leq 0.02$: Die Sequenzen sind vermutlich homolog. (Siehe auch: A. M. Lesk, *Bioinformatik, Eine Einführung*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2002.)

Gen		Sequenz								Primer LC2c						
Primer	LC1	GAC	CCN	AGN	TTC	TTC	AAC	ATG		GAA	ATG	CAC	GGN	ACN	GGN	AC
		T		C	T	T	T			G		T				
1.	An00g10363	GAC	CCC	CGA	TTC	TTC	AAC	ATG	...	GAA	ATG	CAT	GGC	ACT	GGA	AC
2.	An00g10365	GAT	GCT	CGC	TTC	TTC	AAT	ATG	...	GAA	ATG	CAC	GGC	ACT	GGA	AC
4.	An00g09691	GAT	GCT	AGC	TTC	TTT	GAC	ATG	...	GAG	ATG	CAC	GGC	ACA	GGC	AC
5.	An00g10364	GAC	CAC	AAA	TTC	TTT	AAG	AAG	...	GAG	GCC	CAT	GGC	ACG	GGA	AC
6.	An00g10388	GAT	CAC	AAG	TTC	TTC	AAA	AAG	...	GAG	GCG	CAT	GGC	ACG	GGT	AC
8.	An00g09690	GAC	CAT	CGA	TTT	TTT	AAA	CGC	...	GAG	GCT	CAC	GGG	ACA	GGC	AC
7.	An00g10333	-AT	CAC	AGC	TCA	CGC	GGA	TAT	...	AAG	TCC	TAC	AGC	ACT	GGC	GG
													GGG			

Abb. 112: Vergleich der Primer LC1 und LC2c mit den entsprechenden Sequenzen geordnet nach Stringenz. Abweichungen sind schattiert dargestellt.

Die Untersuchungen zeigen, dass je nach Stringenz des PCR-Experiments mit LC1 und LC2c drei oder mehr Gen-Fragmente von *A. niger* NRRL 3122 amplifiziert werden können. Bei Genen mit Dehydrogenase-Domänen (5,6,8) ist die Stringenz der Primer für nicht-reduzierte PKS erwartungsgemäß deutlich geringer.

4.5.4.2 Screening der Cosmidbank auf PKS-Gene

Für die Erstellung einer DNA-Sonde wurde zunächst über PCR ein circa 720 bp langes PKS-Fragment amplifiziert. Als Sonde diente dabei wieder das Primerpaar LC1 / LC2c, das Experiment verlief sowohl mit chromosomaler DNA, als auch mit einem Cosmidgemisch aus der Genbank positiv (Abb. 113, links). Auch wenn die *in silico*-Untersuchungen des Genoms von *A. niger* NRRL 3122 gezeigt haben, dass je nach Spezifität der Reaktion drei und mehr PCR-Produkte mit einer Länge von 720-723 bp zu erwarten sind, ergab eine Sequenzierung von 7 Fragmenten aus dem PCR-Experiment, die in PCR[®]2.1-TOPO[®] (INVITROGEN) kloniert wurden, nur *eine* Sequenz für alle Proben. Diese ist praktisch identisch zu dem entsprechenden Abschnitt eines Gens von *A. niger* NRRL 3122 (Nr. 1, An00g10363, Identität > 99 %, 67 % Identität zu *A. fumigatus* pksP).

Um mehrere Gene zu amplifizieren wurde das PCR-Experiment bei niedrigerer Annealing-Temperatur wiederholt (Abb. 113, rechts). Im Agarose-Gel ist die verminderte Spezifität der Reaktion deutlich erkennbar. Trotzdem wurde bei der Sequenzierung von vier in PCR[®]2.1-TOPO[®] klonierten Fragmenten nur die schon bekannte Sequenz gefunden.

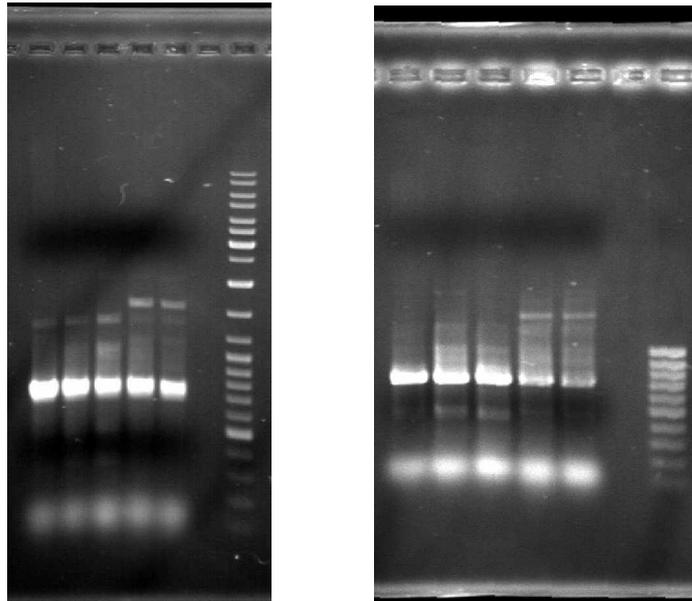


Abb. 113: PCR-Experimente zur Amplifikation von PKS-Fragmenten. **Links:** 1. Versuch: Spuren: 1) chromosomale DNA (70 ng, jeweils 25 μ l), 2) chromosomale DNA (14 ng), 3) mit *Sau3AI* partiell restringierte DNA (9 ng), 4) Cosmidgemisch (ca. 18 ng), 5) Cosmidgemisch (ca. 2 ng), 6) "DNA Ladder Mix"; LC1 und LC2c je 2 μ M, $MgCl_2$ 1.5 mM, (95 °C, 5 min) \times 1; (50 °C, 1 min; 70 °C, 1 min; 94 °C, 45 s) \times 33; (70 °C, 10 min) \times 1; **Rechts:** 2. Versuch: wie 1. Versuch mit $T_{\text{Annealing}} = 45$ °C, 30 Zyklen, rechte Spur: "100 bp DNA Ladder".

Mit den PCR-Produkten als Template wurden Fluorescein-markierte DNA-Sonden nach Standardmethoden angefertigt. Mit diesen wurden Cosmid-Kolonien durch "Colony Blotting" auf Membranen und anschließende Hybridisierung mit der Sonde gescreent. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Nr.	$\frac{N_{\text{positive Kolonien}}}{N_{\text{Membranen}}}$	Sonde aus PCR-Nr.	T_{Hybr} [°C]	Bemerkung
1	2/6	1	60	
2	5/5	1	55	
3	6/5	2	55	ursprünglich bis zu 13 positive Kolonien, die auf der Masterplatte z. T. nicht wiedergefunden wurden
4	39/10	2	55	gegenüber vorherigen Experimenten höhere Koloniedichte auf den Agarplatten

Tabelle 7: Übersicht über die Ergebnisse von 4 DNA-Screeningversuchen zur Detektion von PKS-Genen in *A. niger*-Cosmiden.

Aus der Übersicht ist zu entnehmen, dass insgesamt 52 positiv getestete Cosmide erhalten wurden.ⁱ

Untersuchung der positiven Cosmide auf Diversität

Im Hinblick auf spätere Transformationen einzelner Cosmide, zum Beispiel in *A. niger* N402, wurde durch Restriktionsverdau mit *Hind*III und *Eco*RI ermittelt, welche der gefundenen Cosmide identisch oder ähnlich sind. Es zeigte sich, dass die Cosmide in hohem Maße divers sind. Identische Bandenmuster kommen nur relativ selten vor. Vier Cosmide können eindeutig als doppelt, eines als dreifach vorhanden identifiziert werden. Bei der Größe der Cosmid-Bank ist eine derartige Diversität nicht überraschend. Bei schätzungsweise 40000 Klonen mit durchschnittlich 30 kb Insertion ist ein Genom von 34.5 Mb statistisch rund 35 mal in der Genbank enthalten. Entsprechend können bei einem Screening zahlreiche unterschiedliche Cosmide gefunden werden, auch wenn nur ein Gen detektiert wurde. Auffallend sind eine Reihe von Banden, die viele der untersuchten Cosmide gemeinsam haben. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um *ein* Gen, das in unterschiedlichen DNA-Abschnitten in die Cosmide insertiert wurde.

ⁱ Von den positiven Cosmiden befindet sich jeweils eine Kopie in Jena, Hans Knöll Institut (Abteilung A. A. Brakhage) und in Freiburg, Institut für pharmazeutische Chemie (Abteilung M. Müller). Die Cosmidbank wird in Jena gelagert.

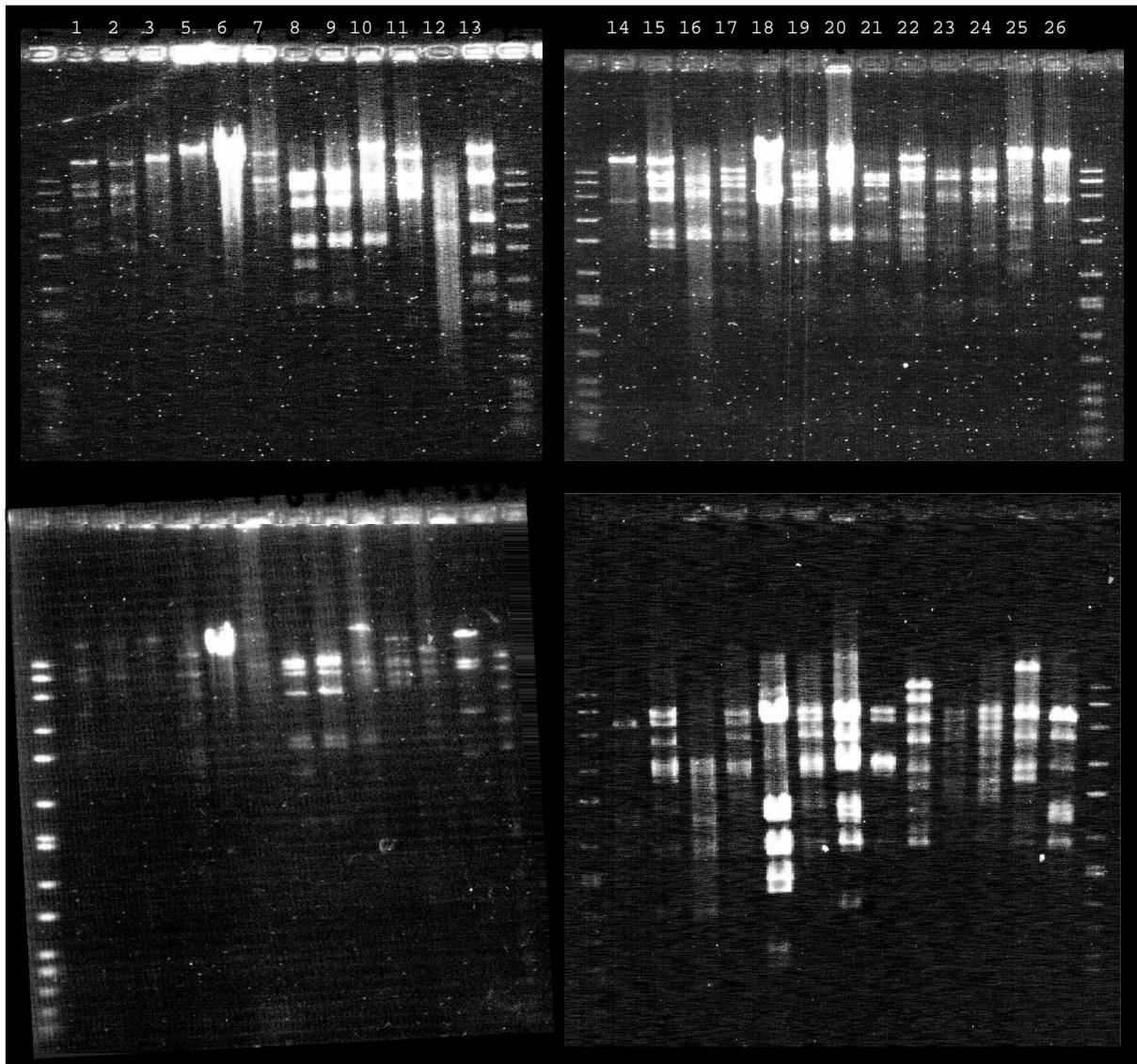


Abb. 114: Restriktionsverdau der positiv getesteten Cosmide mit *Hind*III (obere Reihe; unten links ein weiterer Versuch zum *Hind*III-Verdau der Cosmide 1-13) und *Eco*RI (unten rechts). Gezeigt werden die Cosmide 1-26 sowie "DNA Ladder Mix" (links und rechts außen bei jedem Gel, 10 kb - 100 bp). Die schlechte Auflösung ist fototechnisch bedingt. Identische Cosmide: 18 = 33, 23 = 24.

Orientiert man sich bei der Klassifizierung an der Doppelbande zwischen 6 kb und 8 kb können dieser Gruppe 28 Cosmide zugeordnet werden. 21 davon weisen zusätzlich noch eine Doppelbande zwischen 3.0 kb und 3.5 kb auf. Die Unterteilung der übrigen Cosmide in Klassen gestaltet sich besonders wegen der schlechten Auflösung der Gelbilder der Cosmide 1-26 schwierig. Gleichgroße Fragmente, die besonders beim *Eco*RI-Verdau auftreten, deuten aber auch bei vielen dieser Cosmide auf eine nahe Verwandtschaft zu der großen Gruppe hin. Zur exakteren Klassifizierung der Cosmide ist eine Wiederholung des Experiments unter verbesserten technischen Bedingungen notwendig. Für die folgenden Transformationsversuche ist dies allerdings nicht erforderlich.

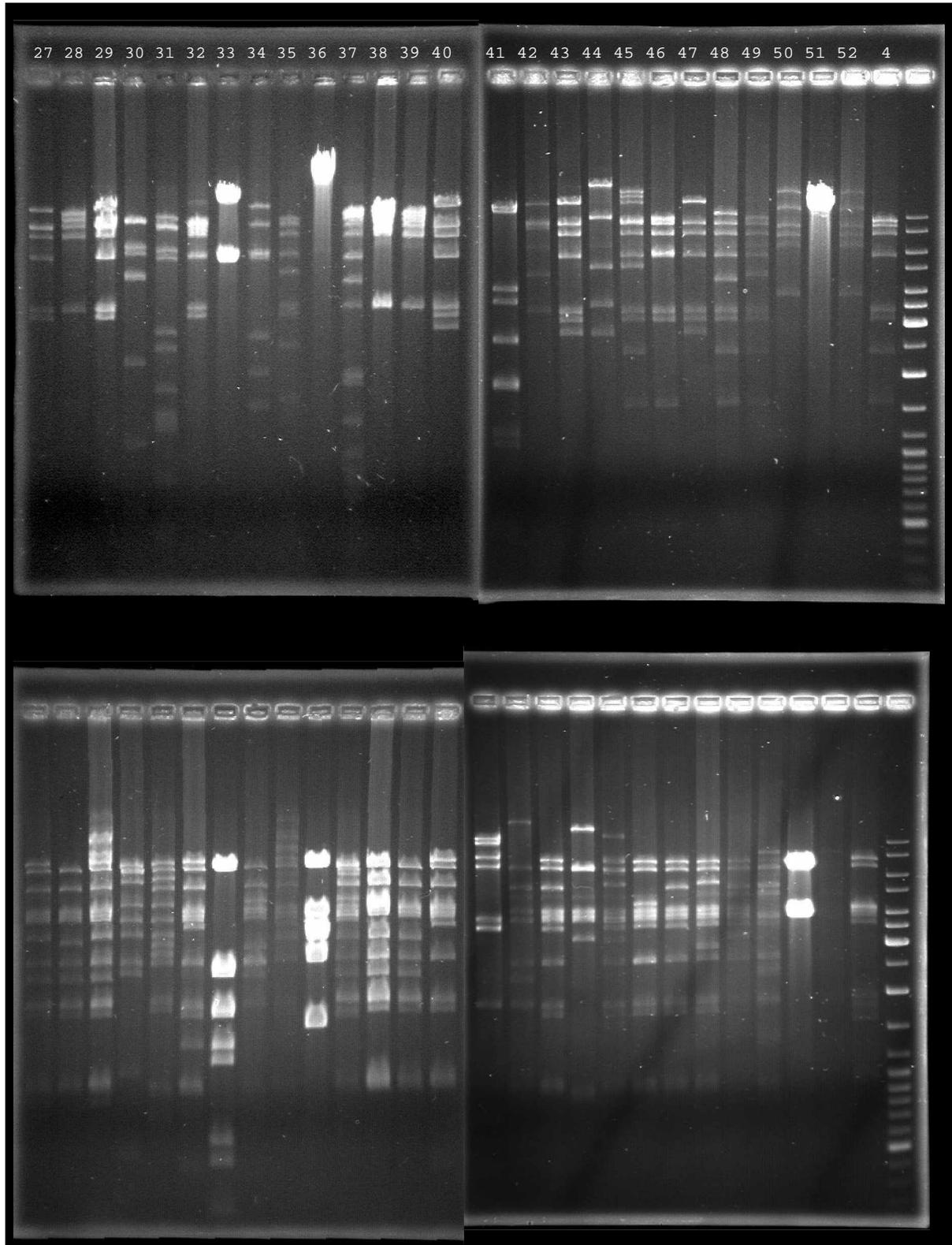


Abb. 115: Restriktionsverdau der positiv getesteten Cosmide mit *Hind*III (obere Reihe) und *Eco*RI (untere Reihe). Gezeigt werden die Cosmide 27-52, Cosmid Nr. 4 und 'DNA Ladder Mix' (rechts, 10 kb - 100 bp). Identische Cosmide: 18 = 33, 38 = 39, 50 = 52, 40 = 43 = 47.

4.5.5 Versuche zur Transformation ausgewählter Cosmide in *A. niger* N 402

Ob die PKS-Cosmide tatsächlich Enzyme codieren, die die oxidative Phenolkupplung beziehungsweise die Cumarinbiosynthese katalysieren, sollte durch Transformation ausgewählter Cosmide in *A. niger* N 402 überprüft werden.

Präparation der Cosmid-DNA

Für die geplanten Transformationsexperimente wurden die Cosmide Nr. 20, 29, 30, 33, 41, 44 und 45 ausgewählt. Diese unterscheiden sich deutlich in den Bandenmustern der Restriktionsanalyse, so dass davon ausgegangen werden kann, dass zumindest einige unterschiedliche Gene enthalten. Für die Präparation der Cosmid-DNA im "Midi"-Maßstab ($\approx 10^2 \mu\text{g}$) wurden kommerziell erhältliche "Kits" der Firma QIAGEN mit Anionen-Austausch-Chromatographiesäulen verwendet. Die Ausbeuten fielen dabei je nach Cosmid sehr unterschiedlich aus (13 μg (Nr. 44) - 143 μg (Nr. 33) / 500 ml Medium) und lagen in einigen Fällen mehr als eine Größenordnung unter den vom Hersteller angegebenen Mengen (200 μg Cosmid-DNA). Nachforschungen über die Ursachen dieser geringen Ausbeuten ergaben, dass der Fehler wahrscheinlich nicht in der Aufarbeitungsmethode liegt. Eine gelelektrophoretische Untersuchung des Zell-Lysats zeigte, dass bereits dort die DNA-Konzentrationen einiger Cosmide verschwindend gering waren. Die Aufreinigung eines kleineren "high-copy"-Plasmids (pHelp1) gelang außerdem nach der gleichen Methode ohne Schwierigkeiten (208 μg / 50 ml Medium). Da die alkalische Lyse von *E. coli* im allgemeinen unproblematisch ist und auch bei einigen der ausgewählten Cosmide zu guten Ausbeuten führte, ist davon auszugehen, dass die Zahl der pro Zelle erzeugten Cosmide bereits außerordentlich gering war. Es ist dabei nicht klar, ob die Anzahl der Kopien in den Zellen bei einzelnen Cosmidspezies ungewöhnlich gering ist ("very low copy plasmids" < 10 / Zelle) oder ob in einem Teil der Zellen die Cosmide während der Kultur abgebaut werden, ohne dass dabei die Ampicillinresistenz verloren geht.

Das Plasmid pHelp1

Die Transformation eines filamentösen Pilzes erfolgt über eine Rekombination der zugegebenen DNA mit der chromosomalen DNA der Zelle. Dies kann über homologe Sequenzen oder, wenn diese fehlen, durch zufällige Integration in das Genom geschehen (ektopische Transformation).^{147, 163} Die erhaltenen Transformanten sind daher in der Regel genetisch

stabil. Allerdings ist die Effizienz der Transformationen gering, das heißt es wird eine relativ große Menge DNA benötigt um eine ausreichende Zahl von Transformanten zu erhalten.

Selbstreplizierende, natürliche Plasmide sind aus Aspergillen bisher nicht bekannt. Allerdings wurde im Genom von *A. nidulans* eine DNA-Sequenz, AMA1, entdeckt, die, in ein Plasmid integriert, eine Replikation des Vektors in *A. nidulans* und anderen filamentösen Pilzen

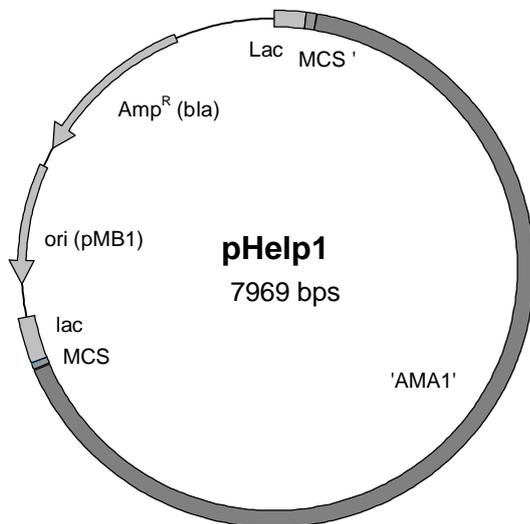


Abb. 116: 'Helfersplasmid' pHelp1 mit der selbst-replizierenden Sequenz AMA1.

ermöglicht.¹⁶⁴ Sowohl Transformationen mit Plasmiden, die die AMA1-Sequenz enthalten, als auch Cotransformationen von AMA1 mit anderen Vektoren sind bei *A. nidulans* rund 200 mal effektiver als ohne AMA1. Neben *A. nidulans* ist AMA1 auch bei verschiedenen anderen filamentösen Pilzen wirksam, darunter *A. fumigatus*,¹⁴⁷ *A. niger*,^{164a} *A. oryzae*,^{164a} *A. parasiticus*,¹⁶⁵ *Penicillium chrysogenum*¹⁶⁶ und *Gibberella fujikuroi*.¹⁶⁷ Ein Standard-Clonierungs-Vektor, der die AMA1-Sequenz enthält, ist pHelp1.^{164b} Eine

Cotransformation von Cosmiden (*A. fumigatus*) mit pHelp1 in *A. fumigatus* ergab eine etwa zehnfach verbesserte Transformantenausbeute gegenüber Experimenten ohne "Helfersplasmid".¹⁶⁸ Möglicherweise kann dieser Effekt durch Rekombination von Cosmid und Plasmid erklärt werden. Allerdings kommt es bei den Cotransformationen auch zu Umlagerungen innerhalb der Cosmid-DNA, wodurch eine spätere genetische Analyse der Transformanten erheblich erschwert wird.¹⁴⁷ Für die hier geplanten Transformationen einzelner Cosmide spielt dies aber keine Rolle, da die Cosmide bekannt sind und die Sequenzen direkt aus der Cosmid-DNA ermittelt werden können.

Transformation

Die Transformation erfolgte nach einem für *A. niger* im Internet publizierten Protokoll.¹⁶⁹ Dieses entspricht weitgehend der in der Arbeitsgruppe Prof. BRAKHAGE für *A. nidulans* und *A. fumigatus* verwendeten Methode, wobei die Transformation in einem Puffer aus 1 M Sorbitol / 50 mM CaCl₂ anstelle von 0.6 M KCl / 50 mM CaCl₂ durchgeführt wurde.

Zunächst werden mit dem Zellwand-lyosierenden Enzym Glucanex[®] (Glucanase aus *Trichoderma harzianum*, SIGMA-ALDRICH) Protoplasten generiert. Diese werden zusammen mit Cosmid-DNA und pHelp1 im Verhältnis 1 : 1.2 inkubiert.¹⁴⁷ Eine Zugabe von PEG-8000 soll durch Ausfällen der DNA auf der Zelloberfläche beziehungsweise Änderungen der

Beschaffenheit der Zelloberfläche die Aufnahme der DNA erleichtern.^{150, 163} Anschließend werden die Protoplasten in flüssigem "Top"-Agar mit Hygromycin B (150 mg / l Medium) als Selektionsmarker aufgenommen und ausplattiert.

Nach dreitägigem Inkubieren bei 30 °C waren auf den Platten kleine Pilzkolonien von etwa 1 mm Durchmesser erkennbar, die nach Senken der Temperatur auf Raumtemperatur zu einem größeren Geflecht aus farblosem Mycel heranwuchsen. Konidienbildung wurde zu keinem Zeitpunkt beobachtet, weshalb der Pilz nicht charakterisiert werden konnte. Auf Komplexmedium ohne Hygromycin B verlief das Wachstum in gleicher Weise. Diese von *A. niger* sehr unterschiedlichen Eigenschaften und die Tatsache, dass die Kolonienzahl auf allen Platten etwa gleich groß war, unabhängig davon, welche und wieviel DNA zur Transformation eingesetzt wurde, lassen vermuten, dass es sich um eine Kontamination während eines der zahlreichen Schritte der Protoplastenpräparation handelt.¹⁷⁰

Die Transformation über Protoplasten ist die gängigste Methode zum Gentransfer bei filamentösen Pilzen und wird auch bei *A. niger* seit vielen Jahren erfolgreich angewandt.¹⁷¹ Es sollte daher in weiteren Experimenten versucht werden Transformationen mit modifiziertem Protokoll durchzuführen. Als weitere Möglichkeiten kommen Elektroporation¹⁷² oder die erst in jüngerer Zeit entwickelte Methode der *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Transformation in Frage.¹⁷³

4.6 Ausblick

Für den weiteren Fortschritt des Projekts ist die Transformation von Cosmiden in *A. niger* beziehungsweise andere Aspergillen von essentieller Bedeutung. Nur so kann getestet werden, ob ein Cosmid ein Gen zur oxidativen Phenolkupplung enthält. Es ist dabei noch nicht klar, ob dafür die in ersten Versuchen erfolglose Methode der Protoplastierung angewendet werden kann, oder ob ein alternatives Verfahren etabliert werden muss. Gegebenenfalls kann die Klonierung des Cosmid-Shuttle-Vektors mit *pyr4* als Selektionsmarker abgeschlossen werden, so dass damit eine weitere Cosmidbank erstellt werden kann. Die Cosmide könnten dann in entsprechende *A. nidulans* Deletionsmutanten transformiert werden. Nicht völlig sicher ist allerdings, ob *A. nidulans* die gesuchten Gene auch wirklich expremiert.

Bei auf Phenolkupplung positiv getesteten transformierten Pilzstämmen sind zwei Szenarien denkbar: Im Idealfall verläuft die Bicomarinsynthese mit derselben Regio- und Stereoselektivität wie in *A. niger* ATCC 36626. Es ist aber auch möglich, dass nur eine unselektive Phenolkupplung beobachtet wird. Da anzunehmen ist, dass nur wenige Oxidasen in der Lage sind die unreaktiven Siderinderivate zu dimerisieren, ist auch ein solcher Fund als Fortschritt zu betrachten. Allerdings muss in diesem Fall mit der Suche nach Selektivitätsfaktoren fortgefahren werden, zum Beispiel durch Transformation weiterer Cosmide in den positiven Stamm oder durch einen enzymologischen Ansatz wie bei LEWIS *et al.*⁶⁵

Sollte bereits die Untersuchung der auf Polyketid-Synthase-Gene gescreenten Cosmide ein positives Ergebnis bringen, kann direkt mit der Sequenzierung und Analyse des PKS-Biosynthese-Clusters begonnen werden. Es ist ratsam, schon zu einem frühen Zeitpunkt Stämme zu erzeugen, die entsprechende Proteine überexpremieren, um eine Basis für enzymologische Untersuchungen zu erhalten. Dafür kommen nicht nur filamentöse Pilze sondern auch Hefen und sogar *E. coli* in Frage.¹⁷⁴

Bleibt ein Erfolg über den PKS-Ansatz aus, muss die gesamte Cosmidbank in einen geeigneten Wirtspilz transformiert werden. Für den Erfolg eines solch umfangreichen Unternehmens sind effiziente Transformationstechniken von entscheidender Bedeutung. Darüber hinaus ist es notwendig Cosmide auch im Gemisch in etwa gleichen Anteilen amplifizieren zu können. Nur so kann gewährleistet werden, dass die Pilzgenbank über die gleiche Diversität verfügt, wie die ursprüngliche Cosmidbank.

Im Bereich Analytik ist die praktische Umsetzung des geplanten Screenings eine Hauptaufgabe. Während die Methoden zu den HPLC-Läufen bereits weitgehend etabliert

sind, muss die bisher nur prinzipiell gezeigte Durchführung von Massenkulturen mit anschließender Injektion in das HPLC-System noch erprobt werden. Es ist zu erwägen, ob ein Syntheseroboter eingesetzt werden kann, oder ob die Experimente manuell durchgeführt werden sollen. Gegebenenfalls kann die HPLC mit weiteren wichtigen analytischen Verfahren gekoppelt werden, zum Beispiel HPLC-MS und HPLC-CD.

Weitere chemische Synthesen erscheinen derzeit nicht zur Fortsetzung des Projekts erforderlich, da die vorhandenen Cumarine als Referenzsubstanzen für *A. niger*-Assays ausreichen. Zur Vervollständigung der Cumarinsynthesen sind jedoch einige Ansätze hochinteressant: Die Darstellung der natürlichen 7-Hydroxycumarine im präparativen Maßstab, die Synthese von atropisomerenreinen Isokotaninen beziehungsweise Desertorinen, neuartige Verfahren zur Darstellung der an Position C-3 verknüpften Bicumarine (Bicumanigrone (**69**, 3,3') oder die 3,8'-Bisiderine **67** und **68**) sowie die Gewinnung nicht natürlicher, monomerer Cumarine für Verfütterungsexperimente.

5 Experimenteller Teil

Allgemeine Anmerkungen

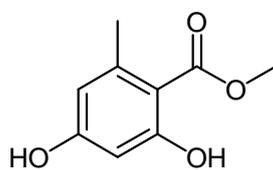
Chemikalien wurden von den Firmen SIGMA-ALDRICH (Seelze), und MERCK (Darmstadt) bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Lösungsmittel wurden, falls angegeben, nach den literaturüblichen Methoden getrocknet.

2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**3**) wurde nach Vorschriften von CHIARELLO⁹³ und DROCHNER^{26a} aus 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**121**) dargestellt.

Die NMR-Spektren der chemisch synthetisierten und aus *Aspergillus niger* isolierten Cumarine werden im Tabellarischen Anhang dieses Kapitels (Abschnitt 5.1.4) aufgeführt.

5.1 Chemische Synthesen

2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**121**)^{93, 26a}



121

Optimierte Methode zur Darstellung im 10 g-Maßstab:

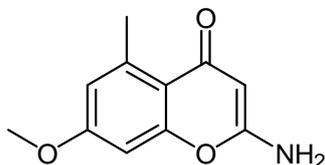
Zu einer Suspension aus 16.0 g (400 mmol) Natriumhydrid (60 % in Öl) in 450 ml abs. THF werden bei 0 °C 23.2 g (200 mmol) Acetessigsäuremethylester getropft. Anschließend werden bei -78 °C 100 ml (160 mmol) *n*-Butyllithium (1.6 M in Hexan) zugetropft. Die Suspension wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und 16 h gerührt. Nach weiteren 24 h Rühren unter Rückfluss wird das tiefrote Reaktionsgemisch auf 0 °C gekühlt und unter kräftigem Rühren mit 32 ml (560 mmol) Eisessig vorsichtig neutralisiert. Nach 2 h Erhitzen unter Rückfluss wird die Suspension mit Wasser (400 ml) hydrolysiert und mit Salzsäure angesäuert (pH 1-2). Die Phasen werden getrennt, und die wässrige Phase wird dreimal mit je 200 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels bei vermindertem Druck und Trocknen im Vakuum wird das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel

aufgereinigt (Isohexan / Essigsäureethylester = 4 : 1). Es werden 12.4 g (68 %) Orsellinsäuremethylester (**121**) in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. Hochreines Produkt wird durch Umkristallisation aus Essigsäureethylester erhalten.

Die analytischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein.^{26a}

5.1.1 Synthesen der monomeren Cumarine

2-Amino-7-methoxy-5-methylchromen-4-on (**127**)



127

Unter Argon werden zu einer Lösung aus 1.13 ml (20.4 mmol) abs. Acetonitril in 50 ml abs. THF bei -78 °C 8.16 ml (20.4 mmol) *n*-Butyllithiumlösung (2.5 M in Toluol) getropft. Nach 30 min Rühren bei gleicher Temperatur werden zu der farblosen Suspension des Acetonitrilsalzes 1.00 g (5.10 mmol) 2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**3**), gelöst in 20 ml abs. THF, langsam zugetropft. Es wird zunächst weitere 30 min bei -78 °C und anschließend 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Die rötliche Suspension wird mit 120 ml halbgesättigter Ammoniumchlorid-Lösung hydrolysiert und mit 120 ml Essigsäureethylester verdünnt. Nach Trennung der Phasen wird die wässrige Phase noch dreimal mit je 70 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Essigsäureethylester / 2-Propanol = 10 : 1). Dabei wird das Produkt zusammen mit Spuren eines gelben Farbstoffs eluiert. Zu dessen Abtrennung wird aus Essigsäureethylester umkristallisiert. Es werden 833 mg (80 %) Produkt in Form farbloser Nadeln erhalten.

R_f: 0.26 (EE / 2-PrOH = 40 : 1)

Smp.: 225 – 226 °C

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , 20 °C), δ = 2.68 (s, 3 H; CH_3), 3.79 (s, 3 H; OCH_3), 5.04 (s, 1 H; CH), 6.62 ("s", 2 H; ar-H), 7.18 (s, 2 H; NH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$: (75.5 MHz, CDCl_3 , 20 °C), δ = 22.4 (CH_3), 55.5 (OCH_3), 85.8 (CH), 98.5 (CH), 114.56 (C_q), 114.65 (CH), 140.7, 156.3, 160.7, 163.4 (C_q), 177.5 (C=O).

MS (EI): m/z = 205.2 (M^+ , 100 %), 164.2 ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_2\text{N}$, 10 %).

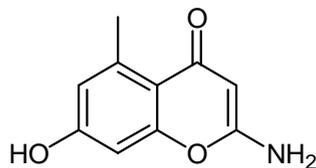
HRMS: gem.: 205.0741 ber.: 205.0739

IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3347 (s), 3117 (m), 1655 (s), 1616 (ss).

Die Daten zur Kristallstruktur dieser Verbindung sind im Tabellarischen Anhang dieses Kapitels aufgeführt (Abschnitt 5.1.4).

$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ 205.21

2-Amino-7-hydroxy-5-methylchromen-4-on (**130**)



130

Unter Argon werden zu einer Lösung aus 1.83 ml (32.9 mmol) Acetonitril in 140 ml trockenem THF bei -78 °C 13.2 ml (32.9 mmol) *n*-Butyllithiumlösung (2.5 M in Toluol) getropft. Nach 30 min Rühren bei gleicher Temperatur werden zu der farblosen Suspension des Acetonitrilsalzes 1.00 g (5.49 mmol) 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**121**), gelöst in 20 ml abs. THF, langsam zugetropft. Es wird weitere 30 min bei -78 °C und anschließend 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Die rötliche Suspension wird mit 120 ml halbgesättigter Ammoniumchlorid-Lösung hydrolysiert und mit 120 ml Essigsäureethylester verdünnt. Nach Trennung der Phasen wird die wässrige Phase noch dreimal mit je 70 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Essigsäureethylester /

2-Propanol = 40 : 1 \rightarrow 1 : 1). Es werden 911 mg (86 %) Produkt in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

R_f: 0.13 (EE / 2-PrOH = 40 : 1)

Smp.: 272 – 275 °C (Zers.)

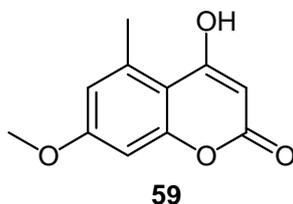
¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, 20 °C), δ = 2.63 (s, 3 H; CH₃), 4.95 (s, 1 H; CH), 6.47 ("s", 2 H; ar-H), 7.07 (s, 2 H; NH₂), 10.23 (br, 1 H; OH).

¹³C- NMR: (75.5 MHz, DMSO-d₆, 20 °C), δ = 22.3 (CH₃), 85.4 (CH), 100.1 (CH), 113.4 (C_q), 115.6 (CH), 140.7, 156.3, 159.4, 163.2 (C_q), 177.5 (C=O).

MS (EI): m/z = 191 (M⁺, 100 %), 163 (M⁺ - CO, 4 %), 150 (M⁺ - C₂H₃N, 18 %).

C₁₀H₉NO₃ 191.18

4-Hydroxy-7-methoxy-5-methylcumarin (**59**)



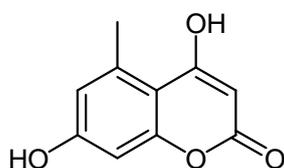
500 mg (2.44 mmol) 2-Amino-7-methoxy-5-methyl-chromen-4-on (**127**) werden in einer Mischung aus 25 ml Methanol und 25 ml Salzsäure (32 %) gelöst und 5 h unter Rückfluss erhitzt. Dabei bildet sich eine farblose Suspension, aus der das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt wird. Der Rückstand wird in 20 ml Wasser aufgenommen und so lange mit Natronlauge (2 M) versetzt, bis sich eine klare Lösung gebildet hat. Diese wird mit Chloroform gewaschen und anschließend mit Salzsäure (32 %) auf pH 1-2 angesäuert, wobei ein voluminöser, farbloser Niederschlag ausfällt. Dieser wird über eine Nylonmembran (0.4 μ m Porendurchmesser) abfiltriert und mit Salzsäure (0.1 M) gewaschen. Nach dem Trocknen werden 455 mg (90 %) Produkt in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. Zur weiteren Aufreinigung kann aus Methanol umkristallisiert werden (75 % Gesamtausbeute). Das Produkt liegt dann in Form farbloser Nadeln vor.

Smp. 289 – 293 °C (Zers.)

MS (EI): $m/z = 206$ (M^+ , 97 %), 178 ($M^+ - CO$, 6 %), 164 ($M^+ - C_2H_2O$, 100 %), 136 ($M^+ - C_3H_2O_2$, 24 %).

$C_{11}H_{10}O_4$ 206.19

4,7-Dihydroxy-5-methylcumarin (**60**)



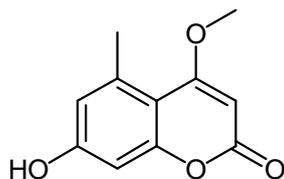
60

300 mg (1.57 mmol) 2-Amino-7-hydroxy-5-methyl-chromen-4-on (**130**) werden für 3 h in 30 ml Salzsäure (12 %) unter Rückfluss erhitzt, wobei sich ein voluminöser Niederschlag ausbildet. Das Gemisch wird mit 60 ml Wasser verdünnt und für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Niederschlag wird über eine Nylonmembran (0.4 μ m Porendurchmesser) abfiltriert, mit verdünnter Salzsäure (0.1 M) gewaschen und getrocknet. Es werden 239 mg (79 %) Rohprodukt in Form eines beigen Feststoffs erhalten, das für weitere Synthesen eingesetzt werden kann. Zur weiteren Aufreinigung kann aus Ethylacetat / Methanol umkristallisiert werden. Das Produkt liegt dann in Form farbloser Nadeln vor.

Smp. 269 – 270 °C (Zers.)

MS (EI): $m/z = 192$ (M^+ , 88 %), 164 ($M^+ - CO$, 5 %), 150 ($M^+ - C_2H_2O$, 100 %), 122 ($M^+ - C_3H_2O_2$, 30 %).

$C_{10}H_8O_4$ 192.17

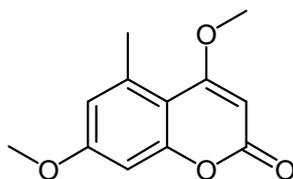
7-Hydroxy-4-methoxy-5-methylcumarin (Desmethylosterin) (**58**)**58**

100 mg (0.520 mmol) 4,7-Dihydroxy-5-methylcumarin (**60**) werden in 10 ml methanolischer Chlorwasserstofflösung (1.25 M) gelöst und 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Es fällt ein farblos Niederschlag aus. Bei vermindertem Druck wird bis fast zur Trockene eingedampft, der Rückstand wird in wenig Methanol / Wasser (1 : 1) aufgenommen und säulenchromatographisch gereinigt (RP-18 Kieselgel; Methanol / Wasser = 1 : 1 (RT) → Methanol (60 °C)). Es werden 103 mg (96 %) Produkt in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Smp. 309 – 311 °C (Zers.)

MS (EI): $m/z = 206$ (M^+ , 100 %), 178 ($M^+ - CO$, 42 %), 164 ($M^+ - C_2H_2O$, 30 %), 148 (10 %), 136 ($M^+ - C_3H_2O_2$, 10 %).

$C_{11}H_{10}O_4$ 206.19

4,7-Dimethoxy-5-methylcumarin (Siderin) (**1**)**1**

a) aus 4-Hydroxy-7-methoxy-5-methylcumarin (**59**)

1)

250 mg (1.21 mmol) Cumarin **59**, 610 mg (4.41 mmol) Kaliumcarbonat und 0.32 ml (3.41 mmol) Dimethylsulfat werden in 50 ml Aceton suspendiert und 4 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird mit 100 ml Wasser verdünnt und viermal mit je 75 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird

säulenchromatographisch an Kieselgel (Chloroform / Essigsäureethylester = 10 : 1) gereinigt. Es werden 216 mg (81 %) Produkt in Form farbloser Nadeln erhalten.

2)

100 mg (0.485 mmol) Cumarin **59** werden in 5 ml methanolischer Chlorwasserstofflösung (1.25 M) suspendiert und 14 Tage bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels und Trocknen im Vakuum wird ein Rohprodukt in Form eines farblosen Feststoffs erhalten, der nach dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zu 16 % aus Produkt und 84 % aus Ausgangsverbindung **59** besteht.

b) aus Desmethylsiderin (**58**) (7-Hydroxy-4-methoxy-5-methylcumarin): siehe ^{13}C -markiertes Siderin (**1**)

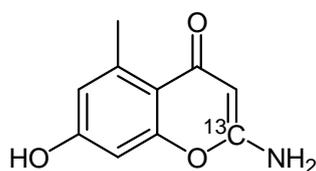
R_f : 0.45 (CHCl_3 / EE = 10 : 1)

MS (ED): m/z = 220 (M^+ , 100 %), 205 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$, 3 %), 192 ($\text{M}^+ - \text{CO}$, 43 %), 177 ($\text{M}^+ - \text{CO}, \text{CH}_3$, 28 %)

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_4$ 220.22

5.1.2 Synthesen der ^{13}C -markierten monomeren Cumarine

[2- ^{13}C]-2-Amino-7-hydroxy-5-methylchromen-4-on (^{13}C -**130**)



^{13}C -**130**

Unter Argon werden zu einer Lösung aus 8.33 ml (59.5 mmol) Diisopropylamin in 250 ml abs. THF bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 23.8 ml (59.5 mmol) *n*-Butyllithiumlösung (2.5 M in Toluol) getropft. Nach 60 min Rühren bei gleicher Temperatur wird die Lösung mit 500 mg (11.9 mmol) [1- ^{13}C]-Acetonitril versetzt und erneut 60 min bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Anschließend werden 2.18 g (11.9 mmol) des durch Rekristallisation aus Essigsäureethylester gereinigten 2,4-Dihydroxy-6-methylbenzoesäuremethylesters (**121**), gelöst 2 ml THF, langsam zugetropft. Es

wird zunächst weitere 60 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließend 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Die gelbliche Suspension wird mit 250 ml halbgesättigter NH_4Cl -Lösung hydrolysiert und mit 200 ml Essigsäureethylester verdünnt. Nach Trennung der Phasen wird die wässrige Phase noch dreimal mit je 100 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Essigsäureethylester / 2-Propanol = 40 : 1 \rightarrow 10 : 1). Es werden 1.34 g (58 %) Produkt in Form eines leicht bräunlich gefärbten Feststoffs erhalten.

R_f: 0.13 (EE / 2-PrOH = 40 : 1)

Smp.: 271 – 273 $^{\circ}\text{C}$ (Zers.)

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, DMSO- d_6 , 20 $^{\circ}\text{C}$), δ = 2.63 (s, 3 H; CH_3), 4.95 (d, $^2J_{\text{CH}} = 4.9\text{ Hz}$, 1 H; CH), 6.48 ("s", 2 H; ar-H), 7.07 (s, 2 H; NH_2), 10.25 (br, 1 H; OH).

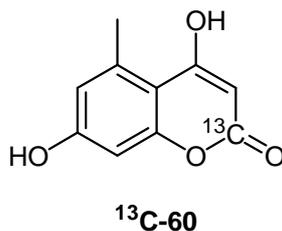
$^{13}\text{C-NMR}$: (75.5 MHz, DMSO- d_6 , 20 $^{\circ}\text{C}$), δ = 22.4 (CH_3), 85.4 (d, $^1J_{\text{CC}} = 73.1\text{ Hz}$; CH), 100.1 (CH), 113.5 (C_q), 115.6 (CH), 140.7, 156.3, 159.4 (C_q), 163.2 ($^{13}\text{C}_q$), 177.5 (C=O).

MS (EI): m/z = 192 (M^+ , 100 %), 151 ($\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_3\text{N}$, 11 %), 150 ($\text{M}^+ - ^{13}\text{CCH}_3\text{N}$, 13 %), 122 ($\text{M}^+ - ^{13}\text{CC}_2\text{H}_3\text{NO}$, 7 %).

HRMS: gem.: 192.0621 ber.: 192.0616

$^{13}\text{CC}_9\text{H}_9\text{NO}_3$ 192.17

[2- ^{13}C]-4,7-Dihydroxy-5-methylcumarin ($^{13}\text{C-60}$)



1.34 g (6.97 mmol) [2-¹³C]-2-Amino-7-hydroxy-5-methylchromen-4-on (¹³C-130) werden 3 h in 45 ml Salzsäure (12 %) unter Rückfluss erhitzt, wobei sich ein voluminöser Niederschlag ausbildet. Das Gemisch wird mit 55 ml Wasser verdünnt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wird über eine Nylonmembran (0.4 µm Porendurchmesser) abfiltriert, mit verdünnter Salzsäure (0.1 M) gewaschen und getrocknet. Es werden 1.21 g (90 %) Rohprodukt in Form eines beigen Feststoffs erhalten, das für weitere Synthesen eingesetzt werden kann. Zur weiteren Aufreinigung kann aus Ethylacetat / Methanol umkristallisiert werden. Das Produkt liegt dann in Form farbloser Nadeln vor.

Smp. 267 – 269 °C (Zers.)

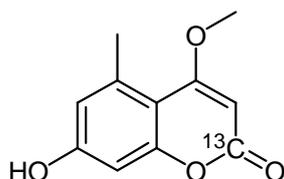
¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, 20 °C), δ = 2.55 (s, 3 H; CH₃), 5.33 (d, ²J_{CH} = 2.6 Hz, 1 H; CH), 6.50 (d, 1 H, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz; ar-H), 6.53 (d, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, 1 H; ar-H), 10.39 (br, 1 H; OH), 12.06 (br, 1 H; OH).

¹³C- NMR: (75.5 MHz, DMSO-d₆, 20 °C), δ = 22.9 (CH₃), 88.1 (d, ¹J_{CC} = 78.6 Hz; CH), 100.5 (d, ³J_{CC} = 3.0 Hz, CH), 106.5 (d, ³J_{CC} = 3.0 Hz, C_q), 115.7 (CH), 138.8, 157.1 (d, ²J_{CC} = 1.5 Hz; C_q), 160.5 (d, ⁴J_{CC} = 6.3 Hz; C_q), 162.0 (¹³C_q), 169.2 (d, ³J_{CC} = 3.0 Hz; C_q).

MS (EI): m/z = 193 (M⁺, 93 %), 164 (M⁺ - ¹³CO, 6 %), 150 (M⁺ - ¹³CCH₂O, 100 %), 122 (M⁺ - ¹³CC₂H₂O₂, 35 %).

¹³C₁C₉H₈O₄ 193.16

[2-¹³C]-7-Hydroxy-4-methoxy-5-methylcumarin (Desmethyلسiderin) (¹³C-58)



¹³C-58

577 mg (2.99 mmol) [2-¹³C]-4,7-Dihydroxy-5-methylcumarin (¹³C-60) werden in 25 ml methanolischer Chlorwasserstofflösung (1.25 M) gelöst und 2.5 d bei Raumtemperatur gerührt. Es fällt ein farbloser, voluminöser Niederschlag aus. Anschließend wird bei

vermindertem Druck bis fast zur Trockene eingedampft, der Rückstand wird in Methanol (100 ml) aufgenommen und kurz unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser / Methanol 1 : 1 gewaschen und getrocknet. Es werden 376 mg (61 %) Produkt in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. Durch Einengen des Filtrats und erneute Fällung können weitere 64 mg (10 %) Produkt isoliert werden.

Smp. 307 – 309 °C (Zers.)

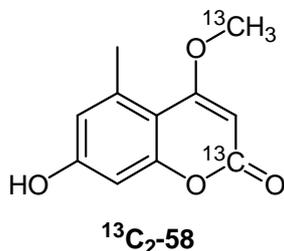
$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, DMSO- d_6 , 20 °C), δ = 2.56 (s, 3 H; CH_3), 3.90 (s, 3 H; OCH_3), 5.56 (d, $^3J_{\text{CH}} = 1.2$ Hz, 1 H; CH), 6.52 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2.3$ Hz, 1 H; ar-H), 6.55 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2.3$ Hz, 1 H; ar-H), 10.50 (s, 1 H; OH).

$^{13}\text{C-NMR}$: (75.5 MHz, DMSO- d_6 , 20 °C), δ = 23.1 (CH_3), 56.6 (OCH_3), 86.7 (d, $^1J_{\text{CC}} = 77.1$ Hz; CH), 100.5 (d, $^3J_{\text{CC}} = 3.1$ Hz; CH), 106.1 (d, $^3J_{\text{CC}} = 3.9$ Hz; C_q), 116.1 (CH), 138.3, 156.2, 160.4 (C_q), 161.9 ($^{13}\text{C}_q$), 169.5 (d, $^2J_{\text{CC}} = 3.9$ Hz; C_q).

MS (EI): m/z = 207 (M^+ , 100 %), 178 ($\text{M}^+ - ^{13}\text{CO}$, 47 %), 164 ($\text{M}^+ - ^{13}\text{CCH}_2\text{O}$, 30 %), 148 (10 %), 136 ($\text{M}^+ - ^{13}\text{CC}_2\text{H}_2\text{O}_2$, 11 %).

$^{13}\text{CC}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ 207.18

[2- ^{13}C ,4- O^{13}CH_3]-7-Hydroxy-4-methoxy-5-methylcumarin (Desmethyلسiderin) ($^{13}\text{C}_2$ -58)



Zu 0.4 ml [^{13}C]-Methanol (15.4 mmol) werden 0.4 ml (0.4 mmol) Bortrichlorid (1 M in Dichlormethan) gegeben. Nach 5 min Rühren bei Raumtemperatur wird mit 100 mg (0.518 mmol) [2- ^{13}C]-4,7-Dihydroxy-5-methylcumarin (^{13}C -130) versetzt. Nach 48 h Rühren bei Raumtemperatur beträgt der Umsatz etwa 50 % (DC-Kontrolle). Es werden 0.3 ml (0.3 mmol) Bortrichlorid (1 M in CH_2Cl_2) nachdosierte. Nach weiteren 24 h Rühren bei

Raumtemperatur wird das Lösungsmittel abdestilliert. Das Produkt wird in heißem Methanol / Chloroform (1 : 1) gelöst, auf RP-18-Kieselgel aufgezogen und säulenchromatographisch gereinigt (RP-18-Kieselgel, Wasser / Methanol = 1 : 1 → Methanol, 60 °C). Es werden 88 mg (81 %) Produkt in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. Daneben werden 15 mg (15 %) der Ausgangsverbindung ¹³C-130 zurückgewonnen.

Smp: 306 – 307 °C (Zers.)

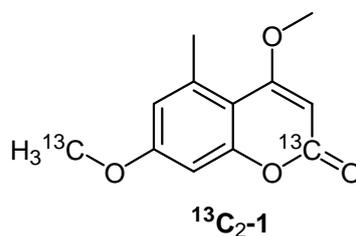
R_f: 0.20 (MeOH / H₂O = 1 : 1)

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, 20 °C), δ = 2.51 (s, 3 H; CH₃), 3.90 (d, ¹J_{CH} = 147.1 Hz, 3 H, OCH₃), 5.56 (d, ²J_{CH} = 0.83 Hz, 1 H; CH), 6.52 (d, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, 1 H; ar-H), 6.56 (d, 1 H, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz; ar-H), 10.50 (br, 1 H; OH).

¹³C-NMR: (75.5 MHz, DMSO-d₆, 20 °C), δ = 23.1 (CH₃), 56.6 (O¹³CH₃), 86.7 (dd, ¹J_{CC} = 77.8 Hz, ³J_{CC} = 6.1 Hz; CH), 100.5 (d, ³J_{CC} = 3.8 Hz; CH), 106.1 ("t", ³J_{CC}, ³J_{CC} = 3.1 Hz; C_q), 116.1 (CH), 138.3 (C_q), 156.2 (d, ²J_{CC} = 1.5 Hz; C_q), 160.5 (C_q), 161.9 (¹³C_q), 169.5 (dd, ²J_{CC}, ²J_{CC} = 3.8, 2.3 Hz; C_q).

¹³C₂C₉H₁₀O₄ 208.17

[2-¹³C,7-O¹³CH₃] 4,7-Dimethoxy-5-methylcumarin (Siderin) (¹³C₂-1)



75 mg (0.362 mmol) [2-¹³C]-7-Hydroxy-4-methoxy-5-methylcumarin (¹³C-58), 80 mg (0.579 mmol) Kaliumcarbonat und 22.5 µl (0.362 mmol) [¹³C]-Methyliodid werden in 2 ml HMPT suspendiert und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 8 ml Salzsäure (1 M) verdünnt und viermal mit je 10 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit 30 ml Salzsäure (0.1 M) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Toluol /

Essigsäureethylester / Ameisensäure = 10 : 5 : 1 → 40 : 15 : 3). Es werden 61 mg (76 %) Produkt in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. Daneben werden 13 mg (17 %) Ausgangsmaterial ^{13}C -**58** zurückgewonnen.

R_f : 0.40 (Toluol / EE / Ameisensäure = 10 : 5 : 1)

^1H -NMR: (300 MHz, CDCl_3 , 20 °C), δ = 2.55 (s, 3 H; CH_3), 3.79 (d, $^1J_{\text{CH}} = 144.6$ Hz, 3 H; OCH_3), 3.89 (s, 3 H; OCH_3), 5.48 (s, 1 H; CH), 6.55 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2.6$ Hz, 1 H; ar-H), 6.59 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2.6$ Hz, 1 H; ar-H).

^{13}C - NMR: (75.5 MHz, CDCl_3 , 20 °C), δ = 23.6 (CH_3), 55.7 (O^{13}CH_3), 56.1 (OCH_3), 87.6 (d, $^1J_{\text{CC}} = 77.8$ Hz, CH), 98.8 ("t", $^3J_{\text{CC}}$, $^3J_{\text{CC}} = 4.2$ Hz; CH), 108.0 (d, $^4J_{\text{CC}} = 3.8$ Hz; C_q), 115.7 (d, $^3J_{\text{CC}} = 3.8$ Hz; CH), 138.6, 156.7, 162.0 (C_q), 163.3 ($^{13}\text{C}_q$), 169.9 (d, $^3J_{\text{CC}} = 3.8$ Hz; C_q).

MS (EI): m/z = 222 (M^+ , 100 %), 192 ($\text{M}^+ - ^{13}\text{CO}$, 37 %), 178 ($\text{M}^+ - ^{13}\text{CO}$, CH_3 , 16 %), 177 ($\text{M}^+ - ^{13}\text{CO}$, $^{13}\text{CH}_3$, 8 %).

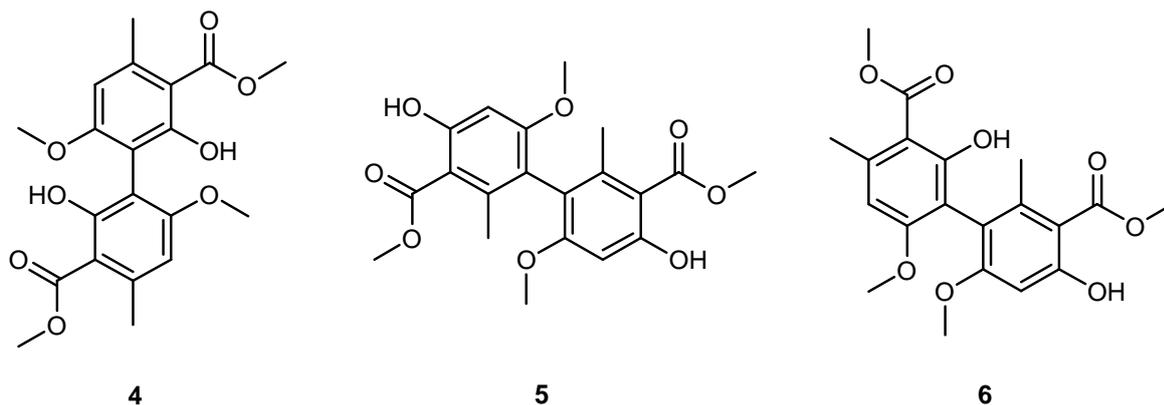
$^{13}\text{C}_2\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$ 222.20

5.1.3 Synthese der dimeren Cumarine: Kotanin (2), Isokotanin A (7) und Desertorin C (8)

2-2'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäure-dimethylester (**4**)⁹⁵

4,4'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-2,2'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäure-dimethylester (**5**)⁹⁵

4,2'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-2,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäure-dimethylester (**6**)⁹⁵



a) Präparation des Trägermaterials

Eine Lösung aus 14.0 g Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat in Diethylether (360 ml) und Methanol (40 ml) wird mit 29.0 g Kieselgel versetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck wird das gelbe Pulver für 8 h bei 70 °C und 0.4 mbar getrocknet, wobei es sich orange-gelb und an der Oberfläche grünlich-braun färbt.

b) oxidative Kupplung, für größere Ansätze optimierte Methode:

Eine Lösung aus 2.47 g (12.6 mmol) 2-Hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoesäuremethylester (**3**) in 40 ml Dichlormethan wird mit 16 g Trägermaterial versetzt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer bei 60 °C Wasserbadtemperatur langsam abdestilliert. Das Vakuum wird stufenweise bis auf 70 mbar erhöht. Schließlich wird das Gemisch kurz im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird erneut mit 40 ml Dichlormethan versetzt und eingedampft. Der Vorgang des Eindampfens wird solange wiederholt (etwa vier Mal), bis erhebliche Mengen der Produkte entstanden sind, ohne dass Nebenprodukte in größeren Umfang auftreten (DC-Kontrolle). Gegebenenfalls kann Oxidationsmittel nachdosiert werden (16 g). Das trockene, schwarze Pulver wird auf eine Chromatographiesäule gegeben und die dimeren Orsellinsäureester werden zusammen mit der Ausgangsverbindung mit Chloroform eluiert. Das Produktgemisch wird in soviel Essigsäureethylester zum Sieden erhitzt, dass es gerade gelöst wird. Durch Versetzen der warmen Lösung mit dem dreifachen Volumen Isohexan kristallisiert **4** in 2-3 Tagen quantitativ aus. Um teilweise in die kristalline Phase übergegangene Produkte **5** und **6** abzutrennen, wird **4** ein zweites Mal umkristallisiert. Die vereinigten Mutterlaugen werden vollständig eingedampft und die Produkte **5** und **6** werden säulenchromatographisch isoliert (Isohexan / Essigsäureethylester = 3 : 1, Kieselgel: Körnung 15-40 µm). Die Produkte werden in Form farbloser Feststoffe erhalten.

Ausbeuten: **4:** 407 mg (16 %),
 5: 413 mg (16 %),
 6: 707 mg (29 %),

3: 809 mg (33 %) zurückgewonnene Ausgangsverbindung.

4 (3,3'-Dimer des Orsellinsäureesters 3):

R_f: 0.20 (Isohexan / EE = 3 : 1)

Smp.: 246 °C

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃, 20 °C), δ = 2.59 (s, 6 H; 2 × CH₃), 3.78 (s, 6 H; 2 × OCH₃), 3.91 (s, 6 H; 2 × OCH₃), 6.41 (s, 2 H; 2 × ar-H), 11.81 (s, 2 H; 2 × OH).

¹³C- NMR: (75.5 MHz, CDCl₃, 20 °C), δ = 25.1 (2 × CH₃), 52.0, 56.1 (4 × OCH₃), 106.2 (2 × C_q), 107.0 (2 × CH), 108.2, 143.3, 161.8, 162.2 (8 × C_q), 172.6 (2 × C=O).

MS (EI): m/z = 390 (M⁺, 49 %), 358 (M⁺ - CH₄O, 15 %), 327 (C₁₈H₁₅O₆⁺, 100 %), 326 (C₁₈H₁₄O₆⁺, 5 %).

5 (5,5'-Dimer des Orsellinsäureesters 3):

R_f: 0.29 (Isohexan / EE = 3 : 1):

Smp.: 183 °C

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃, 20 °C), δ = 2.10 (s, 6 H; 2 × CH₃), 3.67 (s, 6 H; 2 × OCH₃), 3.91 (s, 6 H; 2 × OCH₃), 6.41 (s, 2 H, 2 × ar-H), 11.77 (s, 2 H; 2 × OH).

¹³C- NMR: (75.5 MHz, CDCl₃, 20 °C), δ = 19.6 (2 × CH₃), 52.1, 56.0 (4 × OCH₃), 97.6 (CH), 105.9, 119.4, 141.7, 162.5, 164.7 (10 × C_q), 172.8 (2 × C=O).

MS (EI): m/z = 390 (M⁺, 59 %), 358 (M⁺ - CH₄O, 66 %), 326 (C₁₈H₁₄O₆⁺, 100 %).

6 (3,5'-Dimer des Orsellinsäureesters **3):**

R_f: 0.24 (Isohexan / EE = 3 : 1)

Smp.: 190 °C

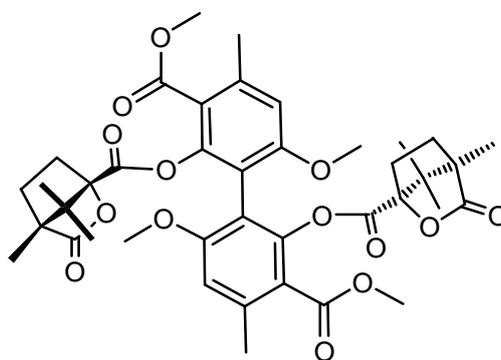
¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃, 20 °C), δ = 2.22 (s, 3 H; CH₃), 2.60 (s, 3 H; CH₃), 3.70 (s, 3 H; OCH₃), 3.75 (s, 3 H; OCH₃), 3.90 (s, 3 H; OCH₃), 3.93 (s, 3 H; OCH₃), 6.39 (s, 1 H; ar-H), 6.44 (s, 1 H; ar-H), 11.77 (s, 1 H; OH), 11.81 (s, 1 H; OH).

¹³C- NMR: (75.5 MHz, CDCl₃, 20 °C), δ = 19.9, 25.1 (CH₃), 51.97, 52.09, 55.91, 56.01 (OCH₃), 97.7 (CH), 105.9, 106.1 (C_q), 106.7 (CH), 111.4, 116.0, 143.0, 161.6, 162.1, 162.6 (C_q), 165.0 (2 C_q), 172.6, 172.8 (C=O).

MS (EI): m/z = 390 (M⁺, 88 %), 358 (M⁺ - CH₄O, 77 %), 327 (C₁₈H₁₅O₆⁺, 68 %), 326 (C₁₈H₁₄O₆⁺, 30 %), 295.1 (100 %).

C₂₀H₂₂O₈ 390.38

2,2'-Bis[(-)-Camphanat]-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (**123**)



123

540 mg (1.38 mmol) des racemischen, dimeren Orsellinsäureesters **4**, 2.40 g (11.1 mmol) (1*S*,4*R*)-(-)-Camphansäurechlorid und 57 mg (0.467 mmol) Dimethylaminopyridin werden in 30 ml abs. Pyridin gelöst und 60 min unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit 200 ml Dichlormethan verdünnt, zweimal mit je 200 ml Salzsäure (2 M), einmal

mit 100 ml gesättigter Ammoniumcarbonatlösung und einmal mit 100 ml Wasser gewaschen. Anschließend wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die beiden diastereomeren Produkte werden säulenchromatographisch (Isohexan / Essigsäureethylester = 1 : 1; Kieselgel: Körnung 15-40 μm) getrennt. Es werden 437 mg (42 %) (*M*)-(-)-**123** und 466 mg (45 %) (*P*)-(+)-**123** in Form farbloser Feststoffe erhalten.

(*M*)-(-)-**123**:

$[\alpha]_D^{25}$ -16.2 (c = 1.1, CHCl_3)

de > 97 % ($^1\text{H-NMR-Spektrum}$)

R_f: 0.38 (Isohexan / EE = 1 : 1)

Smp.: 209 °C

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3 , 20 °C), δ = 0.49 (s, 6 H; 2 \times CH_3), 0.85 (s, 6 H; 2 \times CH_3), 1.02 (s, 6 H; 2 \times CH_3), 1.50 (ddd, J = 13.0 Hz, J = 9.2 Hz, J = 4.0 Hz, 2 H; 2 \times CH), 1.75 (ddd, J = 13.0 Hz, J = 10.7, J = 4.4 Hz, 2 H; 2 \times CH), 1.87 (ddd, J = 13.5 Hz, J = 9.2 Hz, J = 4.4 Hz, 2 H; 2 \times CH), 2.11 (ddd, J = 13.5 Hz, J = 10.7 Hz, J = 4.0 Hz, 2 H; 2 \times CH), 2.44 (s, 6 H; 2 \times CH_3), 3.79 (s, 6 H; 2 \times OCH_3), 3.80 (s, 6 H; 2 \times OCH_3), 6.69 (s, 2 H; 2 \times ar-H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (75.5 MHz, CDCl_3 , 20 °C), δ = 9.5, 15.1, 15.9, 21.3 (8 \times CH_3), 28.7, 30.9 (4 \times CH_2), 52.0 (2 \times OCH_3), 53.9, 54.7 (4 \times C_q), 56.2 (2 \times OCH_3), 90.8 (2 \times C_q), 111.3 (2 \times ar-CH), 113.4, 118.5, 140.5, 147.6, 159.6, (10 \times C_q), 164.6, 166.2, 178.1 (6 \times C=O).

(*P*)-(+)-**123**:

$[\alpha]_D^{25}$ + 15.0 (c = 1.3, CHCl_3)

de 96 % ($^1\text{H-NMR-Spektrum}$)

R_f: 0.31 (Isohexan / EE = 1 : 1)

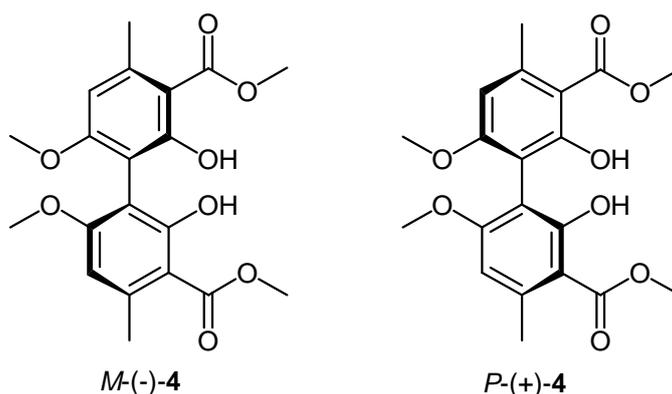
Smp: 223 °C

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃, 20 °C), δ = 0.82 (s, 6 H; 2 × CH₃), 0.88 (s, 6 H; 2 × CH₃), 1.03 (s, 6 H; 2 × CH₃), 1.46-1.57 (m, 4 H; 4 × CH), 1.77-1.85 (m, 2 H; 2 × CH), 2.11-2.18 (m, 2 H; 2 × CH), 2.44 (s, 6 H; 2 × CH₃), 3.74 (s, 6 H; 2 × OCH₃), 3.80 (s, 6 H; 2 × OCH₃), 6.70 (s, 2 H; 2 × ar-H)

¹³C- NMR: (75.5 MHz, CDCl₃, 20 °C), δ = 9.8, 16.17, 16.26, 21.5 (8 × CH₃), 29.0, 30.6 (4 × CH₂), 52.4 (2 × OCH₃), 54.3, 55.1 (4 × C_q), 56.4 (2 × OCH₃), 91.2 (2 × C_q), 111.4 (2 × CH), 113.6, 119.4, 140.2, 147.6, 159.7, (10 × C_q), 164.8, 166.7, 178.4 (6 × C=O)

C₄₀H₄₆O₁₄ 750.78

Methanolyse der dimeren Camphansäureester *M*-(-)-**123** und *P*-(+)-**123** zu den 2,2'-Dihydroxy-6,6'-dimethoxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylestern (*P*-**4** und *M*-**4**)



Eine Lösung aus 437 mg (0.582 mmol) Camphansäureester **123** und 316 mg (5.82 mmol) Natriummethylat in 10 ml abs. Methanol wird 60 min unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird mit 20 ml Salzsäure (2 M) versetzt und dreimal mit 30 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch

an Kieselgel (Chloroform / 2-Propanol = 40 : 1) gereinigt. Es werden 192 mg (84 %) Produkt in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

Anstelle der säulenchromatographischen Aufarbeitung kann das Produkt auch durch Umkristallisieren isoliert werden. Dazu wird das Rohprodukt in wenig siedendem Essigsäure-ethylester gelöst und anschließend mit dem dreifachen Volumen Isohexan versetzt, worauf **76** als kristalliner Niederschlag ausfällt (Ausbeute: 67 %).

(P)-(+)-4:

Smp: 223 °C

$[\alpha]_D^{25}$ + 51.6 (c = 1.0, CHCl₃)

CD: (Acetonitril) λ ($\Delta\epsilon$) [nm] = 209 (+77.8), 227 (-44.6), 262 (+30.4), 279 (-13.4), 297 (+1.1), 314 (-5.6).

(M)-(-)-4:

Smp: 227-228 °C

$[\alpha]_D^{25}$ - 50.3 (c = 1.0, CHCl₃)

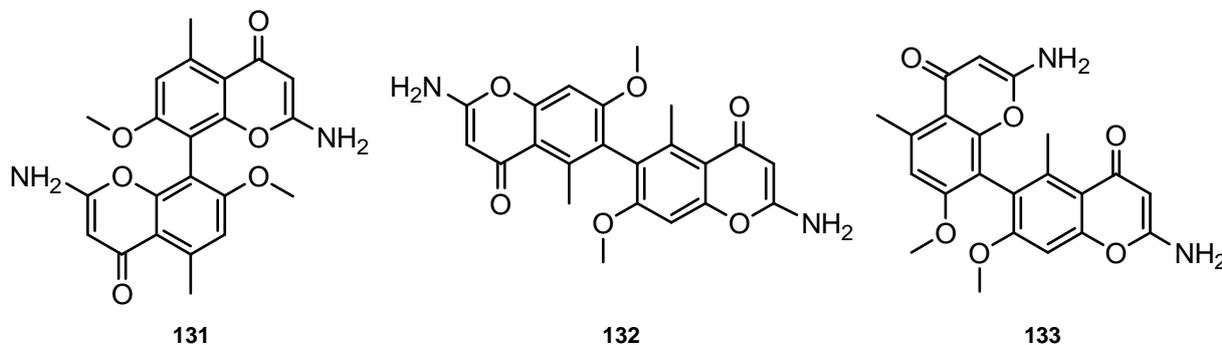
CD: (Acetonitril) λ ($\Delta\epsilon$) [nm] = 209 (-67.6), 227 (+39.3), 262 (-26.2), 279 (+13.7), 297 (-0.3), 314 (+5.2).

Alle übrigen physikalischen Daten der Produkte (M)-(-)-4 und (P)-(+)-4 stimmen mit denen der racemischen Verbindung überein

2,2'-Diamino-7,7'-dimethoxy-5,5'-dimethyl-[8,8']-bichromenyl-4,4'-dion (**131**)

2,2'-Diamino-7,7'-dimethoxy-5,5'-dimethyl-[6,6']-bichromenyl-4,4'-dion (**132**)

2,2'-Diamino-7,7'-dimethoxy-5,5'-dimethyl-[6,8']-bichromenyl-4,4'-dion (**133**)



Arbeitsvorschrift zur Synthese der dimeren Chromenone **131** - **133**:

Unter Argon werden zu einer Lösung aus 84 mg (2.05 mmol) Acetonitril in 10 ml abs. THF bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 0.82 ml (2.05 mmol) einer Butyllithiumlösung (2.5 M in Toluol) getropft. Nach 30 min Rühren bei gleicher Temperatur werden zu der farblosen Suspension des Acetonitrilsalzes 100 mg (0.256 mmol) des jeweiligen dimeren Orsellinsäureesters (**5** und **6** gelöst in 5 ml abs. THF, **4** suspendiert) getropft. Es wird zunächst 30 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, dann weitere 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die rötliche Suspension auf 50 ml halbgesättigte Ammoniumchloridlösung gegeben. Die organische Phase wird mit 75 ml Essigsäureethylester verdünnt und abgetrennt. Die wässrige Phase wird noch dreimal mit je 50 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck entfernt. Die Rohprodukte werden säulenchromatographisch an Kieselgel (Essigsäureethylester / 2-Propanol = 3 : 1) gereinigt. Die Produkte werden als farblose Feststoffe erhalten.

Ausbeuten: **131**: 79 mg (75 %),

132: 75 mg (72 %),

133: 84 mg (80 %).

a) **131**:

R_f : 0.41 (EE / 2-PrOH = 3 : 1)

Smp. 335 – 338 $^{\circ}\text{C}$ (Zers.)

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, DMSO- d_6 , 20 °C), δ = 2.80 (s, 6H; 2 \times CH₃), 3.74 (s, 6H; 2 \times OCH₃), 4.98 (s, 2H; 2 \times CH), 6.88 (s, 2H; 2 \times ar-H), 6.89 (s, 4H; 2 \times NH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$: (75.5 MHz, DMSO- d_6 , 20 °C), δ = 22.9 (2 \times CH₃), 55.9 (2 \times OCH₃), 85.4 (CH), 107.0 (2 \times C_q), 111.3 (2 \times CH), 114.8, 140.1, 153.1, 158.3, 163.3 (10 \times C_q), 177.7 (2 \times C=O).

MS (EI): m/z = 408 (M⁺, 100 %), 393 (M⁺ - CH₃, 58 %), 377 (M⁺ - OCH₃, 19 %).

HRMS: gem.: 408.1330 ber.: 408.1321

IR (KBr) ν (cm⁻¹) = 3475 (br, ss), 1648 (ss), 1619 (ss), 1581 (ss).

b) 132:

R_f: 0.36 (EE / 2-PrOH = 3 : 1)

Smp.: 262 – 265 °C (Zers.)

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, DMSO- d_6 , 20 °C), δ = 2.30 (s, 6H; 2 \times CH₃), 3.69 (s, 6H; 2 \times OCH₃), 5.07 (s, 2H; 2 \times CH), 6.79 (s, 2H; 2 \times ar-H), 7.17 (s, 4H; 2 \times NH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$: (75.5 MHz, DMSO- d_6 , 20 °C), δ = 17.4 (2 \times CH₃), 55.9 (2 \times OCH₃), 86.1 (2 \times CH), 97.0 (2 \times CH), 114.4, 123.0, 138.9, 155.8, 158.9, 163.1 (12 \times C_q), 177.8 (2 \times C=O).

MS (EI): m/z = 408 (M⁺, 30 %), 393 (M⁺ - CH₃, 100 %), 377 (M⁺ - OCH₃, 26 %).

IR (KBr) ν (cm⁻¹) = 3386 (s), 3152 (m), 1654 (ss), 1602 (ss), 1547 (s).

c) 133:

R_f: 0.38 (EE / 2-PrOH = 3 : 1)

Smp.: 264 – 267 °C (Zers.)

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, 20 °C), δ = 2.38 (s, 3H; CH₃), 2.79 (s, 3H; CH₃), 3.70 (s, 3H; OCH₃), 3.72 (s, 3H; OCH₃), 4.96 (s, 1H; CH), 5.06 (s, 1H; CH), 6.79 (s, 1H; ar-H), 6.84 (s, 1H; ar-H), 6.86 (s, 2H; NH₂), 7.14 (s, 2H; NH₂).

¹³C- NMR: (75.5 MHz, DMSO-d₆, 20 °C), δ = 17.8, 22.8 (CH₃), 55.85, 55.88 (OCH₃), 85.4, 86.0 (CH), 97.0 (CH), 110.5 (C_q), 111.0 (CH), 114.5, 114.8, 119.3, 139.4, 140.0, 153.1, 156.0, 157.9, 159.3, 163.0, 163.3 (C_q), 177.64, 177.72 (C=O).

MS (EI): m/z = 408 (M⁺, 100 %), 393 (M⁺ - CH₃, 21 %), 377 (M⁺ - OCH₃, 70 %).

HRMS: gem.: 408.1330 ber.: 408.1321

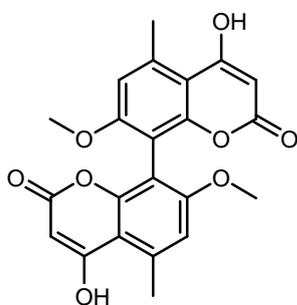
IR (KBr) v (cm⁻¹) = 3386 (s), 3152 (m), 1655 (ss), 1604 (ss), 1546 (s).

C₂₂H₂₀N₂O₆ 408.40

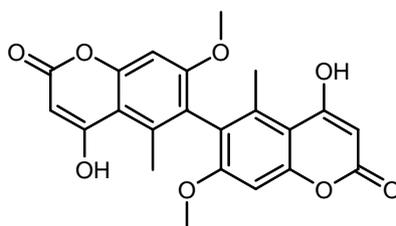
4,4'-Dihydroxy-7,7'-dimethoxy-5,5'-dimethyl-8,8'-bicumarin (**134**)

4,4'-Dihydroxy-7,7'-dimethoxy-5,5'-dimethyl-6,6'-bicumarin (**135**)

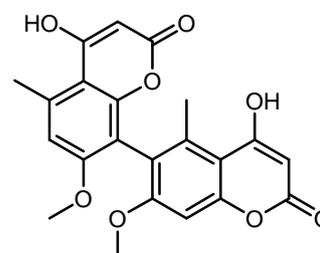
4,4'-Dihydroxy-7,7'-dimethoxy-5,5'-dimethyl-6,8'-bicumarin (**136**)



134



135



136

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Hydrolyse der dimeren Chromenone **131** - **133**:

Das Chromenon wird in einer Mischung aus 5 ml Methanol und 5 ml Salzsäure (30 %) gelöst und unter Rückfluss erhitzt (**131**: 12 h, **132**: 3.5 h, **133**: 6 h). Anschließend wird das Gemisch mit 10 ml Wasser verdünnt, wobei ein flockiger Niederschlag ausfällt. Das Methanol wird unter vermindertem Druck aus dem Gemisch abdestilliert. Anschließend wird der Niederschlag über eine Nylonmembran (0.4 µm) abfiltriert und mit stark verdünnter Salzsäure (0.1 M) gewaschen. Nach dem Trocknen liegt das Produkt als farbloser Feststoff vor.

a) **134**:

Ansatz: 8,8'-Chromenon (**131**): 67 mg (0.164 mmol)

Ausbeute: 45 mg (67 %)

Analytische Daten:

Smp.: > 370 °C

MS (EI): m/z = 424 (M⁺ + CH₂,ⁱ 58 %), 410 (M⁺, 100 %), 369 (98 %), 327 (93 %), 295 (83 %), 269 (75 %).

b) **135**:

Ansatz: 6,6'-Chromenon (**132**): 69 mg (0.169 mmol)

Ausbeute: 73 mg (72 %),

Analytische Daten:

Smp.: 206 – 208 °C

ⁱ In der stark salzsauren, methanolischen Lösung wurde ein geringer Anteil (15 %, ¹H-NMR) der 4- bzw. 4'-Hydroxygruppen methyliert.

c) 136:

Ansatz: 6,8'-Chromenon (**133**): 99 mg (0.242 mmol).

Ausbeute: 58 mg (59 %)

Analytische Daten:

Smp.: > 370 °C

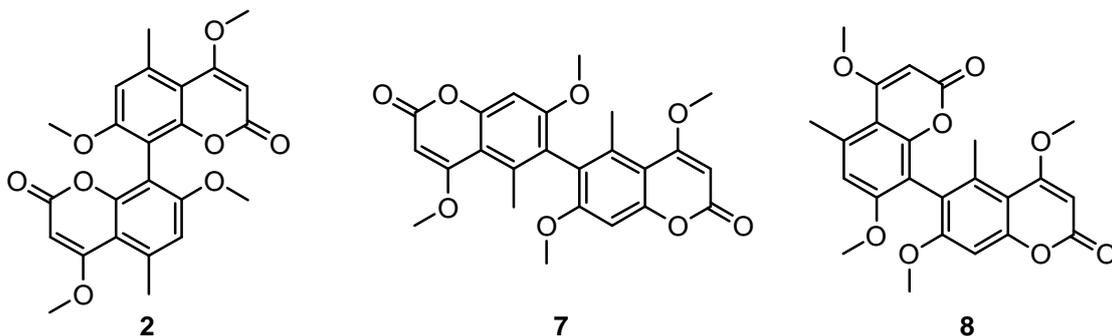
MS (ED): $m/z = 424$ ($M^+ + CH_2$, ⁱ 100 %), 410 (M^+ , 68 %), 382 ($M^+ - CO$, 31 %), 368 (61 %), 351 (64 %).

$C_{22}H_{18}O_8$ 410.37

4,4',7,7'-Tetramethoxy-5,5'-dimethyl-8,8'-bicumarin (**2**) (Kotanin)

4,4',7,7'-Tetramethoxy-5,5'-dimethyl-6,6'-bicumarin (**7**) (Isokotanin A)

4,4',7,7'-Tetramethoxy-5,5'-dimethyl-6,8'-bicumarin (**8**) (Desertorin C)



1) Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Methylierung der dimeren Cumarine 134 - 136:

Bicumarin und Natriumhydrid werden unter Argon in HMPT gelöst. Sobald keine Wasserstoffentwicklung mehr zu beobachten ist, wird mit Dimethylsulfat versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Gemisch mit 10 ml Essigsäureethylester verdünnt und zweimal mit 15 ml Salzsäure (1 M) sowie einmal 15 ml ges. Natriumchlorid-

lösung gewaschen. Die Natriumchloridlösung wird anschließend mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Chloroform / Essigsäureethylester = 3 : 1).

2) Säurekatalysierte Methylierung von **134** zu Kotanin (**2**)

102 mg (0.248 mmol) Bicularin **134** werden in 20 ml methanolischer Chlorwasserstofflösung (1.25 M) und 0.5 ml Dimethylcarbonat suspendiert und 6 d unter Argon bei 65 °C gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Chloroform / Essigsäureethylester = 3 : 1). Ausbeute: 36 mg (33 %).

3) Kotanin (**2**) durch Methylierung von biologisch gewonnenem Orlandin (**62**) oder Desmethylkotanin (**61**)

Siehe Seite 176.

4) Desertorin C (**8**) aus Aminochromenon **133**:

30 mg (0.073 mmol) Aminochromenon **133** werden in einer Mischung aus 2 ml Methanol und 1 ml Salzsäure (37 %) gelöst und 4.5 h unter Rückfluss erhitzt. Das Gemisch wird mit 2 ml Methanol und 2.7 ml (32 mmol) Dimethylcarbonat verdünnt, und 0.38 ml (5.4 mmol) Acetylchlorid werden zugetropft. Nach weiteren 24 h Erhitzen unter Rückfluss wird das Gemisch auf 30 ml Wasser gegeben und dreimal mit 15 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wird dünnschichtchromatographisch aufgereinigt (Chloroform / Methanol / Ameisensäure = 30 : 2 : 1). Es werden 11 mg (34 %) Desertorin C als farbloser Feststoff erhalten.

a) Kotanin (**2**):

Ansatz (Methode 1): 8,8'-Bicularin (**134**): 55 mg (0.134 mmol); NaH (60 %): 14 mg (0.342 mmol); Me₂SO₄: 38 µl (0.402 mmol); HMPT: 0.8 ml.

Ausbeute: 35 mg (59 %)

Analytische Daten:

R_f: 0.31 (CHCl₃/ EE = 3 : 1)

Smp.: 359 – 362 °C (Zers.)

MS (EI): m/z = 438 (M⁺, 57 %), 421 (C₂₄H₂₁O₇⁺, 15 %), 407.1 (C₂₃H₁₉O₇⁺, 100 %).

P-(+)-Kotanin (P-2)

ee: 96 % (chirale HPLC, CHIRALPAK[®] AD-H)

[α]_D²⁵: +27.6ⁱ (c = 0.38, CHCl₃)

CD: (Acetonitril) λ (Δε) [nm] = 207 (-49.2), 214 (-17.6), 220 (-23.0), 232 (+6.5),
238 (+5.5), 260 (+20.9), 291 (-14.7), 322 (+28.2).

M-(-)-Kotanin (M-2)

ee ≥ 98 % (chirale HPLC, CHIRALPAK[®] AD-H):

[α]_D²⁵: -35.7 (c = 0.43, CHCl₃)

CD: (Acetonitril) λ (Δε) [nm] = 205 (+49.9), 215 (+18.7), 220 (+23.2), 233 (-6.4),
237 (-4.9), 260 (-21.2), 291 (+14.4), 322 (-28.7).

b) Isokotanin A (7):

ⁱ Dieser Wert ist möglicherweise aufgrund der geringen Konzentration und Messungenauigkeiten mit einem erheblichen Fehler belastet.

Ansatz (Methode 1): 6,6'-Bicumarin (**135**): 55 mg (0.171 mmol) (stark verunreinigt); NaH (60 %): 14 mg (0.342 mmol); Me₂SO₄: 39 µl (0.412 mmol), HMPT: 0.8 ml.

Ausbeute: 40 mg (68 %)

Analytische Daten:

R_f 0.37 (CHCl₃ / EE = 3 : 1)

Smp. 321 – 324 (Zers.)

MS (EI): m/z = 438 (M⁺, 100 %), 410 (C₂₃H₂₂O₇⁺, 8 %).

c) Desertorin C (**8**):

Ansatz (Methode 1): 6,8'-Bicumarin (**136**): 150 mg (0.366 mmol) (verunreinigt); NaH (60 %): 30 mg (0.750 mmol); Me₂SO₄: 83 µl (0.587 mmol), HMPT: 2.0 ml.

Ausbeute: 88 mg (55 %)

Analytische Daten:

R_f: 0.34 (CHCl₃ / EE = 3 : 1)
0.57 (CHCl₃ / MeOH / Ameisensäure = 30 : 2 : 1)

Smp. 188 – 190 °C

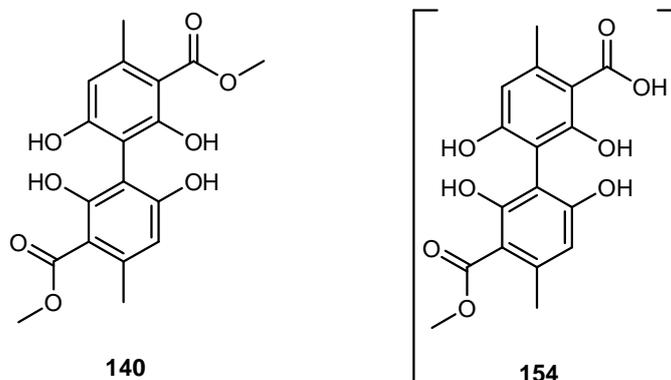
MS (EI): m/z = 438 (M⁺, 100 %), 407 (C₂₃H₁₉O₇⁺, 23 %).

C₂₄H₂₂O₈ 438.43

5.1.3.1 Demethylierungen, Desertorin A

2,2',6,6'-Tetrahydroxy-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (**140**)

[2,2',6,6'-Tetrahydroxy-3'-(methoxycarbonyl)-4,4'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3-carbonsäure (**154**)]



Zu einer Lösung aus 100 mg (0.256 mmol) des 3,3'-dimeren 4-*O*-Methylorsellinsäuremethylesters **4** in 4.0 ml abs. Dichlormethan werden bei -78 °C 1.0 ml (1.0 mmol) einer Bortribromidlösung (1.0 M in Dichlormethan) getropft. Nach 20 min Rühren bei -78 °C wird auf Raumtemperatur erwärmt. Der Reaktionsverlauf wird über DC kontrolliert bis die Ausgangsverbindung **4** nach 2 Tagen Rühren bei Raumtemperatur nahezu vollständig umgesetzt ist. Das Reaktionsgemisch wird auf 10 ml Salzsäure (2 M) gegeben und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wird zunächst säulenchromatographisch (Chloroform / Methanol = 4 : 1) und anschließend dünnschichtchromatographisch (Chloroform / Methanol = 30 : 1) aufgereinigt. Es werden 5.4 mg (5.8 %) Produkt in Form eines farblosen Feststoffs erhalten. Unter den Nebenprodukten befinden sich zahlreiche Carbonsäuren die durch Esterhydrolysen gebildet werden. Benzoesäure **154** bildet davon mit 47 mg (53 %) den größten Anteil.

Produkt **140**

R_f : 0.21 (CHCl₃ / MeOH = 30 : 1):

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, 20 °C), δ = 2.36 (s, 6H; 2 × CH₃), 3.75 (s, 6H; 2 × OCH₃), 6.28 (s, 2H; 2 × ar-H), 8.30 (s, 2H; 2 × OH), 11.88 (s, 2H; 2 × OH).

^{13}C -NMR: (75.5 MHz, CDCl_3 , 20 °C), δ = 24.3 (2 \times CH_3), 51.7 (2 \times OCH_3), 104.5, 105.4 (4 \times C_q), 111.6 (2 \times CH), 142.8, 160.1, 163.0 (6 \times C_q), 172.5 (2 \times $\text{C}=\text{O}$).

$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_8$ 362.33

Nebenprodukt **154**

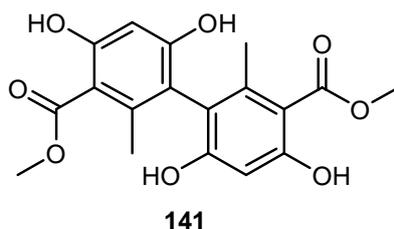
R_f : 0.29 (CHCl_3 : MeOH = 4 : 1):

^1H -NMR: (300 MHz, DMSO-d_6 , 20 °C), δ = 2.41 (s, 3H; CH_3), 2.50 (s, 3H; CH_3), 3.62 (br; OH), 3.82 (s, 3H; OCH_3), 6.14 (s, 1H; ar-H), 6.33 (s, 1H; ar-H), 9.24 (br, 1H; OH), 11.26 (br, 1H; OH).

^{13}C -NMR: (75.5 MHz, CDCl_3 , 20 °C), δ = 23.4, 23.7 (CH_3), 51.9 (OCH_3), 104.6, 105.9, 107.6, 108.4 (C_q), 109.0, 111.1 (CH), 139.8, 141.2, 158.3, 160.5, 161.9, 164.0 (C_q), 171.9, 174.6 ($\text{C}=\text{O}$).

$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_8$ 348.30

4,4',6,6'-Tetrahydroxy-2,2'-dimethyl-1,1'-biphenyl-3,3'-dicarbonsäuredimethylester (**141**)



Zu einer Lösung aus 120 mg (0.307 mmol) des 5,5'-dimeren 4-*O*-Methylorsellinsäuremethylesters **5** in 1.5 ml abs. Dichlormethan werden bei -78 °C 1.2 ml (1.2 mmol) einer Bortribromidlösung (1 M in Dichlormethan) getropft. Nach 20 min Rühren bei -78 °C wird auf Raumtemperatur erwärmt. Die Suspension wird mit 2 ml Wasser hydrolysiert und dreimal mit 4 ml eines Gemisches aus Essigsäureethylester und Methanol (5 : 1) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und vollständig eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch aufgereinigt (RP-18-Kieselgel, Wasser / Methanol = 1 : 1 \rightarrow Methanol). Es werden 57 mg (51 %) Produkt in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

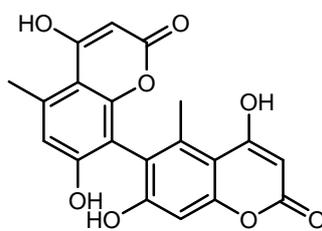
R_f (RP-18): 0.24 (MeOH : H₂O = 1 : 1):

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆, 20 °C), δ = 1.80 (s, 6H; 2 × CH₃), 3.75 (s, 6H; 2 × OCH₃), 6.31 (s, 2H; 2 × ar-H), 9.39 (s, 2H; 2 × OH), 10.02 (s, 2H; 2 × OH).

¹³C- NMR: (75.5 MHz, CDCl₃, 20 °C), δ = 17.5 (2 × CH₃), 51.7 (2 × OCH₃), 100.2 (CH), 111.0, 116.3, 137.6, 156.8, 157.9 (10 × C_q), 169.8 (2 × C=O).

C₁₈H₁₈O₈ 362.33

4,4',7,7'-Tetrahydroxy-5,5'-dimethyl-6,8'-bicumarin (**143**)



143

50 mg (0.122 mmol) 6,8'-Bicumarin **136** werden in 0.8 ml 1-Methyl-3-octyl-1*H*-imidazoliumchlorid gelöst und bei 50 °C im Hochvakuum getrocknet, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wird. Anschließend wird mit einem Überschuss Aluminiumchlorid (1.0 g) versetzt und erneut vorsichtig evakuiert. Es wird 7 h auf 60 °C erhitzt, zuerst bei leichtem Unterdruck, später unter Argonatmosphäre. Die Suspension wird vorsichtig mit Wasser hydrolysiert, in 50 ml Salzsäure (1 M) aufgenommen und viermal mit 40 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit verdünnter Salzsäure (1 M) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und vollständig eingedampft. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Toluol / Essigsäureethylester / Ameisensäure = 6 : 5 : 1). Es werden 49 mg eines Gemisches aus Produkt **143** und den einfach demethylierten Produkten **144** und **145** im Verhältnis 9 : 2 (¹H-NMR) sowie Spuren der ionischen Flüssigkeit eluiert.

Rückgewinnung der ionischen Flüssigkeit:

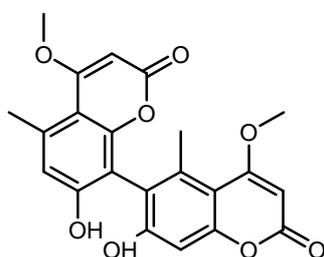
Aus der wässrigen Phase der Extraktion mit Essigsäureethylester werden die Aluminiumsalze mit Ammoniak ausgefällt und über eine Nylonmembran (0.4 µm) abfiltriert. Das Filtrat wird vollständig eingedampft und der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen. Nach

Abfiltrieren der unlöslichen Salze und Abdestillieren des Lösungsmittels wird Methyloctylimidazoliumchlorid in ausreichender Reinheit zurückerhalten um erneut verwendet zu werden.

R_f : 0.35 (Toluol / EE / Ameisensäure = 6 : 5 : 1)

$C_{20}H_{14}O_8$ 382.32

7,7'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxy-5,5'-dimethyl -6,8'-bicumarin (Desertorin A) (**66**)



66

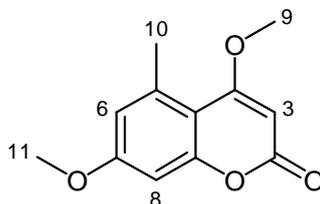
30 mg des (stark verunreinigten) Tetrahydroxybicumarins **143** werden in 5 ml einer methanolischen Chlorwasserstofflösung (1.25 M) gelöst und 4 d unter Luftausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit 25 ml Wasser verdünnt und dreimal mit 20 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wird dünnschichtchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Chloroform / Essigsäureethylester / Ameisensäure = 30 : 2 : 1). Es wird eine Fraktion mit 4 mg leicht verunreinigtem Produkt erhalten.ⁱ

R_f : 0.25 (Chloroform / EE / Ameisensäure = 30 : 2 : 1):

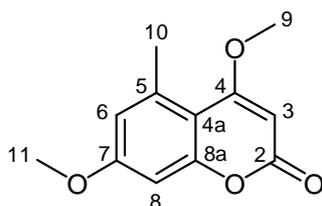
$C_{22}H_{18}O_8$ 410.37

ⁱ Bei einem weiteren dünnschichtchromatographischen Aufreinigungsschritt kam es zu einer starken Anreicherung von Weichmacher, da die DC-Platte aus einer fehlerhaften Produktionscharge stammte. Auf eine erneute Aufreinigung wurde wegen der geringen Substanzmenge verzichtet

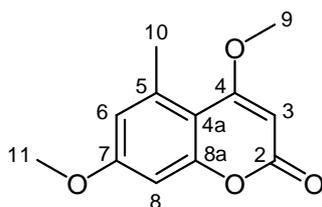
5.1.4 Tabellarischer Anhang

5.1.4.1 ¹H-NMR-Signale der Cumarine

Verbindung	Position							
	10	11	9	3	6	8	7-OH	4-OH
Siderin (1) ^{1,C}	2.56	3.79	3.89	5.48	6.55 (d, ⁴ J = 2.6 Hz) 6.60 (d, ⁴ J = 2.6 Hz)	-	-	
Desmethylsiderin (58) ^{2,C}	2.52	-	3.91	5.58	6.53 (d, ⁴ J = 2.3 Hz) 6.57 (d, ⁴ J = 2.3 Hz)	10.48 (br)	-	
4-Hydroxy-7-methoxy- cumarin 59 ^{2,C}	2.60	3.80	-	5.39	6.69 (d, ⁴ J = 2.6 Hz) 6.74 (d, ⁴ J = 2.6 Hz)	-	12.20	
4,7-Dihydroxycumarin 60 ^{2,C}	2.57	-	-	5.34	6.50 (d, ⁴ J = 2.3 Hz) 6.55 (d, ⁴ J = 2.3 Hz)	10.45 (br)	12.13	
Kotanin (2) ^{1,A,C}	2.70	3.79	3.92	5.50	6.71	-	-	
Desmethylkotanin (61) ^{1,A}	2.46 2.71	3.80 -	3.91 3.94	5.49 5.53	6.67 6.75	-	?	-
Orlandin (62) ^{2,A}	2.59	-	3.94	5.57	6.73	-	10.27 (br)	-
4,4'-Dihydroxy-6,8'- bicumarin 134 ^{2,C}	2.75	3.75	-	5.38	6.97	-	-	12.27
Isokotanin A (7) ^{1,C}	2.22	3.71	3.93	5.58	-	6.77	-	-
4,4'-Dihydroxy-6,6'- bicumarin 135 ^{2,C}	2.22	3.70	-	5.47	-	6.94	-	12.30
Desertorin C (8) ^{1,C}	2.26 2.71	3.68 3.77	3.88 3.92	5.50 5.53	6.70, 6.73	-	-	
Desertorin A (66) ^{2,C}	2.22 2.56	- -	3.92 (6 H)	5.53 5.60	6.68, 6.71	?	-	
Tetrahydroxy-6,8'- bicumarin 143 ^{2,C}	2.36 2.67	5.00 (br, 2 H)	-	-	6.57, 6.61	?	?	
4,4'-Dihydroxy-6,8'- bicumarin 136 ^{2,C}	2.26 2.74	3.68 3.76	-	5.40 5.48	6.94, 6.97	-	12.30 (br, 2H)	

5.1.4.2 ^{13}C -NMR-Signale der Cumarine

Verbindung	Position											
	10	11	9	3	8	4a	6	5	8a	7	2	4
Siderin (1) ^{1, C}	23.6	55.7	56.1	87.6	98.8	108.0	115.7	138.5	156.8	162.0	163.3	169.9
Desmethylsiderin (58) ^{2, C}	23.0	-	56.5	86.7	100.5	106.1	116.0	138.2	156.1	160.4	161.8	169.4
4-Hydroxy-7-methoxycumarin 59 ^{2, C}	22.8	55.7	-	88.7	98.7	107.6	114.8	138.2	157.0	161.7, 161.8		168.9
4,7-Dihydroxycumarin 60 ^{2, C}	22.8	-	-	88.0	100.4	106.4	115.6	138.7	157.1	160.4	161.9	169.1
Kotanin (2) ^{1, C, A}	24.3	56.3	56.1	87.9	107.6, 108.6		111.6	138.7	153.7	159.7	163.3	170.1
Desmethylkotanin (61) ^{1, A}	23.7 24.4	56.5 -	56.1 56.3	87.5 88.1	105.4, 108.1 106.1, 109.1		111.9 116.2	138.7 140.0	154.14 154.17	157.2 160.0	163.5 163.6	170.3 170.4
Orlandin (62) ^{2, A}	23.3	-	56.7	86.5	105.9, 106.1		115.7	137.8	154.0	158.8	161.9	169.8
4,4'-Dihydroxy-8,8'-bicumarin 134 ^{2, C}	23.2	56.1	-	88.6	106.4, 107.9		111.2	138.6	153.7	159.3	161.6	169.1
Isokotanin A (7) ^{1, C}	18.9	56.2	56.2	88.1	97.6	108.3	123.6	137.4	156.5	160.3	163.3	170.3
4,4'-Dihydroxy-6,6'-bicumarin 135 ^{2, C}	18.2	56.1	-	89.1	97.6	107.6	122.7	136.8	156.6	159.9	161.7	169.1
Desertorin C (8) ^{1, C}	19.4 24.3	56.09, 56.15 56.17, 56.21		87.9 88.0	97.7(C ⁸), 108.3 108.6, 111.5		111.3 119.5	137.8 138.4	153.5 156.7	159.4 160.5	163.1 163.4	169.9 170.4
Desertorin A (66) ^{2, C}	19.4 23.3	- -	56.48 56.52	85.9 86.4	100.7, 105.2, 105.4, 110.0, ?, ?		136.4 137.2	153.9 155.4	157.2 ?	161.97 162.02		169.9 (2C)
Tetrahydroxy-6,8'-bicumarin 143 ^{2, C}	18.5 23.1	- -	- -	86.3 86.4	99.9(C ⁸), 109.7, 110.1		114.4 118.5	137.1 138.3	155.0, 156.4 157.4, 158.0		163.6 (2C)	174.8? 175.5?
4,4'-Dihydroxy-6,8'-bicumarin 136 ^{2, C}	18.6 23.3	56.07 56.14	- -	88.7 89.0	97.6(C ⁸), 107.6 108.0, 110.3		111.1 119.5	137.1 138.5	153.5 156.7	159.0 160.3	161.67 161.72	169.1 (2C)

¹³C-NMR: relative Signalintensitäten der Cumarine

Verbindung	Position											
	10	11	13	3	8	4a	6	5	8a	7	2	4
Siderin (1) ^{1,C}	1.00	0.90	0.95	0.96	1.01	0.19	1.02	0.33	0.25	0.36	0.32	0.28
2× ¹³ C-Siderin (¹³ C ₂ -1) ^{1,C}	1.00	97.98	2.21*	0.88	0.98	0.21	1.02	0.42	0.29	0.41	29.99	0.34
2× ¹³ C-Siderin (¹³ C ₂ -1) ^{1,A}	1.00	98.52	2.15*	0.87	1.02	0.17	0.96	0.37	0.28	0.39	27.53	0.30
Desmethylsiderin (58) ^{2,C}	1.00	-	1.02	0.76	0.91	0.30	0.85	0.45	0.34	0.58	0.58	0.44
¹³ C-Desmethylsiderin (¹³ C-58) ^{2,C}	1.00	-	0.88	0.86	1.01	0.32	0.93	0.54	0.52	0.65	44.62	0.40
¹³ C-Desmethylsiderin (¹³ C-58) Exp. 3 ^{2,A}	1.00	-	1.71*	0.69	0.83	0.36	0.85	0.62	0.52	0.65	44.45	0.53
2× ¹³ C-Desmethylsiderin (¹³ C ₂ -58) ^{2,C}	1.00	-	109.78	0.87	1.08	0.43	1.07	0.57	0.56	0.65	50.09	0.53
Kotantin (2) ^{1,C}	1.00	0.96	1.04	1.03	0.20	0.32	1.02	0.52	0.25	0.45	0.40	0.46
Kotantin (2) ^{1,A} Exp. 1	1.00	0.78	1.15	0.79	0.09	0.10	0.98	0.42	0.25	0.50	4.28	0.43
Kotantin (2) ^{1,A} Exp. 2	1.00	0.91	1.06	0.88	0.18	0.25	0.89	0.60	0.19	0.48	3.26	0.47
Kotantin (2) ^{1,A} Exp. 3	1.00	0.93	0.94	1.02	0.27	0.29	0.75	0.39	0.35	0.63	4.03	0.43
Kotantin (2) ^{1,A} Exp. 4	1.00	1.19	18.58	0.76	0.30	0.29	0.98	0.57	0.27	0.39	7.49	0.44
Kotantin (2) ^{1,A} 2× ¹³ C-Acetat 1	1.00	0.98	1.11	1.00	0.24	0.35	1.02	0.53	0.28	0.46	0.45	0.49
Kotantin (2) ^{1,A} 2× ¹³ C-Acetat 2	1.00	0.96	0.96	0.91	0.19	0.26	0.91	0.49	0.27	0.50	0.46	0.52
Kotantin (2) ^{1,A} Referenz	1.00	1.02	1.19	0.78	0.25	0.20	1.09	0.64	0.19	0.43	0.52	0.50
Desmethylkotantin (61) ^{1,A}	1.00 0.95	0.73 -	1.13 0.91	0.73 0.80	0.26 0.28	0.21 0.34	0.82 0.81	0.29 0.34	0.21 0.38	0.45 0.56	0.43 0.25	0.31 0.29
Desmethylkotantin (61) ^{1,A} Exp. 4	1.00 0.69	1.43 -	25.37 26.90	0.49 0.47	? ?	? ?	0.91 0.64	0.40 0.21	0.50 0.50	0.47 0.94	12.28 11.45	0.57 0.24
Orlandin (62) ^{2,A}	1.00	-	0.93	0.86	0.45	0.30	0.73	0.47	0.32	0.56	0.40	0.42
Orlandin (62) ^{2,A} Exp. 3	1.00	-	0.77	?	?	?	?	?	?	?	6.34	?
Orlandin (62) ^{2,A} Exp. 4	1.00	-	43.48	0.42	0.42	0.42	0.85	0.63	0.35	0.62	23.55	0.51

(1) CDCl₃, (2) DMSO-d₆, (A) aus *Aspergillus niger* isoliert, (C) aus chemischer Synthese, (*) geringfügige ¹³C-Anreicherung an C-13 durch säurekatalysierten Methylgruppenaustausch während der chemischen Synthese.

5.1.4.3 Kristallstrukturdaten zu Aminochromenon 127¹⁷⁵

(Darstellung der Struktur in Abb. 53, S. 50)

C₁₁H₁₃NO₄: Colorless crystals obtained through recrystallisation from a water / ethanol mixture.

Table 1. Crystal data and structure refinement for mm12.

Empirical formula	C11 H13 N O4
Formula weight	223.22
Temperature	123(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system, space group	Monoclinic, P2(1)/c (No.14)
Unit cell dimensions	a = 10.6943(4) Å alpha = 90 deg. b = 8.1814(3) Å beta = 114.006(2) deg. c = 12.9573(5) Å gamma = 90 deg.
Volume	1035.63(7) Å ³
Z, Calculated density	4, 1.432 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.110 mm ⁻¹
F(000)	472
Crystal size	0.40 x 0.30 x 0.15 mm
Diffractometer	Nonius KappaCCD
Theta range for data collection	3.03 to 25.02 deg.
Limiting indices	-12<=h<=10, -9<=k<=9, -15<=l<=15
Reflections collected / unique	4804 / 1824 [R(int) = 0.0288]
Completeness to theta = 25.02	99.7 %
Absorption correction	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	1824 / 4 / 158
Goodness-of-fit on F ²	0.982
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0354, wR2 = 0.0830
R indices (all data)	R1 = 0.0513, wR2 = 0.0884
Largest diff. peak and hole	0.142 and -0.200 e.Å ⁻³

Table 2. Atomic coordinates (x 10⁴) and equivalent isotropic displacement parameters (Å² x 10³) for mm12. U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized Uij tensor.

	x	y	z	U(eq)
O(1)	1719(1)	3722(1)	5794(1)	19(1)
C(2)	1265(1)	4654(2)	6438(1)	16(1)
N(2)	738(1)	3763(2)	7008(1)	21(1)
H(2N1)	430(15)	4260(17)	7463(12)	25
H(2N2)	644(16)	2686(15)	6898(12)	25
C(3)	1361(2)	6331(2)	6441(1)	19(1)
C(4)	1892(2)	7169(2)	5768(1)	17(1)
O(4)	1873(1)	8720(1)	5702(1)	21(1)
C(4A)	2451(1)	6162(2)	5114(1)	16(1)
C(5)	3109(1)	6771(2)	4438(1)	18(1)
C(51)	3453(2)	8557(2)	4408(1)	24(1)
C(6)	3499(1)	5688(2)	3800(1)	20(1)
C(7)	3299(2)	4009(2)	3831(1)	19(1)
O(7)	3687(1)	2893(1)	3232(1)	24(1)
C(71)	4244(2)	3497(2)	2471(1)	26(1)
C(8)	2707(2)	3384(2)	4511(1)	20(1)
C(8A)	2299(1)	4458(2)	5133(1)	16(1)
O(1W)	146(1)	10337(1)	6423(1)	23(1)
H(1W1)	766(15)	9825(19)	6243(13)	34
H(1W2)	-508(15)	10530(20)	5798(11)	34

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [deg] for mm12.

O(1)-C(2)	1.3568(15)
O(1)-C(8A)	1.3831(16)
C(2)-N(2)	1.3174(18)
C(2)-C(3)	1.3760(19)
N(2)-H(2N1)	0.883(12)
N(2)-H(2N2)	0.891(12)
C(3)-C(4)	1.3985(19)
C(4)-O(4)	1.2710(16)
C(4)-C(4A)	1.4729(19)
C(4A)-C(8A)	1.405(2)
C(4A)-C(5)	1.4191(19)
C(5)-C(6)	1.386(2)
C(5)-C(51)	1.511(2)
C(6)-C(7)	1.393(2)
C(7)-O(7)	1.3671(17)
C(7)-C(8)	1.376(2)
O(7)-C(71)	1.4311(17)
C(8)-C(8A)	1.378(2)
O(1W)-H(1W1)	0.892(13)
O(1W)-H(1W2)	0.842(13)
C(2)-O(1)-C(8A)	119.91(11)
N(2)-C(2)-O(1)	112.06(12)
N(2)-C(2)-C(3)	126.76(13)
O(1)-C(2)-C(3)	121.18(12)
C(2)-N(2)-H(2N1)	118.7(10)
C(2)-N(2)-H(2N2)	120.2(10)
H(2N1)-N(2)-H(2N2)	120.9(14)
C(2)-C(3)-C(4)	122.37(13)
O(4)-C(4)-C(3)	122.15(12)
O(4)-C(4)-C(4A)	121.24(12)
C(3)-C(4)-C(4A)	116.59(13)
C(8A)-C(4A)-C(5)	116.72(13)
C(8A)-C(4A)-C(4)	117.90(12)
C(5)-C(4A)-C(4)	125.37(13)
C(6)-C(5)-C(4A)	119.25(14)
C(6)-C(5)-C(51)	117.87(12)
C(4A)-C(5)-C(51)	122.85(13)
C(5)-C(6)-C(7)	121.77(14)
O(7)-C(7)-C(8)	116.12(13)
O(7)-C(7)-C(6)	123.83(13)
C(8)-C(7)-C(6)	120.03(13)
C(7)-O(7)-C(71)	117.88(11)
C(7)-C(8)-C(8A)	118.38(14)
C(8)-C(8A)-O(1)	114.40(13)
C(8)-C(8A)-C(4A)	123.78(12)
O(1)-C(8A)-C(4A)	121.83(12)
H(1W1)-O(1W)-H(1W2)	104.7(14)

Table 4. Torsion angles [deg] for mm12.

C(8A)-O(1)-C(2)-N(2)	179.69(12)
C(8A)-O(1)-C(2)-C(3)	0.51(19)
N(2)-C(2)-C(3)-C(4)	-177.40(14)
O(1)-C(2)-C(3)-C(4)	1.6(2)
C(2)-C(3)-C(4)-O(4)	174.00(13)
C(2)-C(3)-C(4)-C(4A)	-4.7(2)
O(4)-C(4)-C(4A)-C(8A)	-173.06(13)
C(3)-C(4)-C(4A)-C(8A)	5.63(18)
O(4)-C(4)-C(4A)-C(5)	5.4(2)
C(3)-C(4)-C(4A)-C(5)	-175.91(13)
C(8A)-C(4A)-C(5)-C(6)	3.1(2)
C(4)-C(4A)-C(5)-C(6)	-175.34(13)
C(8A)-C(4A)-C(5)-C(51)	-174.73(12)
C(4)-C(4A)-C(5)-C(51)	6.8(2)
C(4A)-C(5)-C(6)-C(7)	-2.0(2)
C(51)-C(5)-C(6)-C(7)	176.02(13)
C(5)-C(6)-C(7)-O(7)	-178.89(13)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	-0.4(2)
C(8)-C(7)-O(7)-C(71)	176.93(12)
C(6)-C(7)-O(7)-C(71)	-4.5(2)
O(7)-C(7)-C(8)-C(8A)	179.98(12)
C(6)-C(7)-C(8)-C(8A)	1.3(2)
C(7)-C(8)-C(8A)-O(1)	-179.81(12)
C(7)-C(8)-C(8A)-C(4A)	0.0(2)
C(2)-O(1)-C(8A)-C(8)	-179.44(12)
C(2)-O(1)-C(8A)-C(4A)	0.73(18)
C(5)-C(4A)-C(8A)-C(8)	-2.2(2)
C(4)-C(4A)-C(8A)-C(8)	176.35(13)
C(5)-C(4A)-C(8A)-O(1)	177.56(12)
C(4)-C(4A)-C(8A)-O(1)	-3.84(19)

Table 5. Hydrogen bonds for mm12 [Å and deg.].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(2)-H(2N1)...O(1W)#1	0.883(12)	1.991(13)	2.8726(16)	176.0(14)
N(2)-H(2N2)...O(1W)#2	0.891(12)	2.022(13)	2.9051(17)	170.6(14)
O(1W)-H(1W1)...O(4)	0.892(13)	1.839(13)	2.7267(14)	173.0(15)
O(1W)-H(1W2)...O(4)#3	0.842(13)	1.994(13)	2.8283(14)	171.0(16)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x,y-1/2,-z+3/2 #2 x,y-1,z #3 -x,-y+2,-z+1

5.2 Analytik

5.2.1 Verwendete Geräte und Materialien

NMR-Spektren wurden mit dem Spektrometer AMX der Fa. BRUKER (Rheinstetten) aufgenommen (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75.5 MHz). Angegeben werden die chemischen Verschiebungen δ in ppm sowie Kopplungskonstanten in Hz. Multiplizitäten: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), sep (Septett), m (Multipllett). Als Lösungsmittel wurden Chloroform- d_1 (CDCl_3 ; $^1\text{H} \equiv 7.25$ ppm, $^{13}\text{C} \equiv 77.25$ ppm) und Dimethylsulfoxid- d_6 ($\text{DMSO}-d_6$; $^1\text{H} \equiv 2.50$ ppm, $^{13}\text{C} \equiv 39.51$ ppm) verwendet.

GC/MS-Spektren wurden mit dem HP 6890 Series GC-System sowie dem HP 5973 Mass Selective Detector der Fa. AGILENT (HP) (Palo Alto, USA) aufgenommen. Es wurde die Säule HP-5MS (5 % Phenyl Methyl Siloxan / Kapillare 30.0 m \times 250 μm) der Fa. AGILENT (HP) verwendet. T_{GC} (Injektor) = 250 $^\circ\text{C}$, T_{MS} (Ionenquelle) = 200 $^\circ\text{C}$, Zeitprogramm (Ofen): $T_{0\text{min}} = 60$ $^\circ\text{C}$, $T_{3\text{min}} = 60$ $^\circ\text{C}$, $T_{14\text{min}} = 280$ $^\circ\text{C}$ (Aufheizrate: 20 $^\circ\text{C} / \text{min}$), $T_{19\text{min}} = 280$ $^\circ\text{C}$.

MS-Spektren wurden in der Zentralanalytik der Chemischen Institute der Universität Bonn aufgenommen.

IR-Spektren wurden mit dem Infrarot-Spektrometer AVATAR 360 FT-IR der Fa. NICOLET (THERMO) aufgenommen. Die Substanzen wurden als KBr-Presslinge vermessen. Angegeben werden die Wellenzahl in cm^{-1} ; die Intensitäten als ss (sehr stark), s (stark), m (mittel), w (schwach).

Optische Drehwerte wurden mit dem Polarimeter P-1020 der Firma JASCO INTERNATIONAL CO. LTD. (Tokyo, Japan) bestimmt. Alle Werte wurden mit der D-Linie einer Natrium-Lampe gemessen.

CD-Spektren wurden mit einem Spectralpolarimeter J-810 der Firma JASCO INTERNATIONAL CO. LTD. (Tokyo, Japan), mit folgenden Parametern

gemessen: Länge der Zelle = 1.0 cm, Empfindlichkeit = Standard, Messgeschwindigkeit = 100 nm / min, Data Pitch = 1 nm, Bandbreite 1 nm, Response = 2 s, Accumulation = 3.

Schmelzpunkte wurden mit der Schmelzpunktapparatur B-540 der Fa. BÜCHI (Flawil, Schweiz), gemessen.

Analytische

Dünnschichtchromatographie erfolgte auf DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ der Fa. MERCK (Darmstadt).

Präparative

Dünnschichtchromatographie erfolgte auf DC-Alufolien beziehungsweise Glasplatten (20 × 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm) und DC-Glasplatten (20 × 20 cm, Schichtdicke 1.0 mm), mit Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firmen MERCK (Darmstadt) und MACHEREY-NAGEL (Düren).

Säulenchromatographie erfolgte an Kieselgel 60 und Kieselgel RP-18 der Fa. MERCK (Darmstadt). Soweit in den Versuchsbeschreibungen nicht anders angegeben betrug die Korngrösse 40 – 60 µm.

5.2.2 HPLC-Analyse von Rohextrakten

5.2.2.1 HPLC-Methoden

Assay	25 cm, RP-18		
Säule*	LiChrospher® 100 RP-18-EC, 250 × 3 mm; 5 µm Partikelgröße; CS CHROMATOGRAPHIE SERVICE GMBH (Langerwehe)		
Laufmittel	Acetonitril / Wasser - Gradient (RT)		
Methode:***	Zeit [min]	Acetonitril [%]	Flussrate [ml / min]
	0 - 10	35	0.5
	10 - 13	35 → 45	0.5 → 0.6
	13 - 25	45 → 52.5	0.6
	25 - 28	52.5 → 35	0.6 → 0.5
Assay	25 cm Normalphase (SiO₂)		
Säule*	LiCHROSPHER® Si60, 250 × 3 mm, 5 µm Partikelgröße; CS CHROMATOGRAPHIE SERVICE GMBH (Langerwehe)		
Laufmittel	Chloroform (1 % Ameisensäure) / Methanol - Gradient		
Methode:***	Zeit [min]	Methanol [%]	Flussrate [ml / min]
	0 - 10	0 → 5	1.5
Assay	6 cm, RP-18		
Säule*	LiChrospher® 100 RP-18-EC, 60 × 3 mm; 5 µm Partikelgröße; CS CHROMATOGRAPHIE SERVICE GMBH (Langerwehe)		
Laufmittel	Acetonitril / Wasser (RT)		
Methode	Zeit [min]	Acetonitril [%]	Flussrate [ml / min]
	0 - 2	45	1.8
Assay	6 cm Normalphase (SiO₂)		
Säule*	LiCHROSPHER® Si60, 60 × 3 mm, 5 µm Partikelgröße; CS CHROMATOGRAPHIE SERVICE GMBH (Langerwehe)		
Laufmittel	Chloroform (1 % Ameisensäure) / Methanol - Gradient (RT)		
Methode	Zeit [min]	Methanol [%]	Flussrate [ml / min]
	0.0 - 1.3	0.1 → 2.0	2.5
	1.3 - 1.4	2.0 → 8.0	
	1.4 - 1.8	8.0 → 10.0	
1.8 - 2.3	10.0 → 0.1		

Chirale Phase

Assay	Kotantin (2) (chiral)		
Säule **	CHIRALPAK® AD-H 250 × 4.6 mm; 5 µm Partikelgröße; DAICEL - CHIRAL TECHNOLOGIES EUROPE SAS (Illkirch, Frankreich)		
Laufmittel	Isohexan / <i>iso</i> -Propanol (10°C)		
Methode:	Zeit [min]	Isopropanol [%]	Flussrate [ml / min]
	0 - 90	25	0.8

*Es wurde eine Vorsäule (20 × 3 mm, CS CHROMATOGRAPHIE SERVICE GMBH) mit der gleichen stationären Phase wie in der Hauptsäule vorgeschaltet. **Es wurde eine Vorsäule (10 × 4 mm, DAICEL - CHIRAL TECHNOLOGIES EUROPE SAS) mit der gleichen stationären Phase wie in der Hauptsäule vorgeschaltet. *** Bei den 25 cm Säulen wurden zwischen die Probenläufe Spülzeiten von 5 Minuten eingerichtet.

Die Messungen erfolgten auf einem HP-Serie 1100 System der Firma AGILENT (HP) (Palo Alto, USA). Das Injektionsvolumen betrug 5 µl.

5.2.3 Kultur- und Verfütterungsexperimente mit Aspergillen

5.2.3.1 Pilzkulturen

Allgemeine Anmerkungen

Abgesehen von den im Abschnitt "Kulturgefäße" angegebenen Ausnahmen wurden alle für Pilzkulturen eingesetzten Geräte und Behälter vor Gebrauch autoklaviert (121 °C, 20 min) beziehungsweise über der Flamme sterilisiert. Die Arbeiten mit Pilzen wurden in einer Sterilbank durchgeführt.

Kulturgefäße

Für 100 ml Stehendkulturen wurden Zellkulturflaschen aus Polystyrol (162 cm², Costar® traditionell, gerade Phenolkappe, SIGMA-ALDRICH) verwendet, die vom Hersteller steril geliefert wurden. Die Versorgung der Kulturen mit Sauerstoff erfolgte über einen nicht luftdicht schließenden Schraubverschluss. Die gebrauchten Kulturflaschen konnten nach gründlicher Reinigung und Sterilisation wiederverwendet werden. Dazu wurden die gereinigten Flaschen gründlich mit Ethanol gespült und anschließend bei (nicht luftdicht) aufgesetztem Deckel bei 60 °C getrocknet. Die Sterilität wurde stichprobenartig durch mehrtägige Inkubation mit sterilem Standardmedium überprüft.

10 ml Kulturen wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen durchgeführt. Zur Versorgung der Kulturen mit Sauerstoff wurden in die Deckel Löcher gebohrt, die mit Watte ausgestopft wurden. Die Sterilisation erfolgte wie bei Zellkulturflaschen beschrieben. Zur Erhöhung der Oberfläche der Mediums wurden die Gefäße während der Kultur schräg gelagert.

Für 1 ml Kulturen wurden GC / HPLC-Probenglässchen aus Glas mit 1.8 ml Fassungsvermögen verwendet, die mit einem Septum (Teflon / Silikon) verschlossen werden. Um die Sauerstoffversorgung der Kulturen zu gewährleisten wurden in die Septen Löcher gebohrt, die mit einer Nylon-Membran abgedeckt wurden. Die Sterilisation der Gefäße erfolgte wie für Zellkulturflaschen beschrieben.

Für 1 ml Kulturen auf einer Mikrotiterplatte (Deep Well Block, 96-well, Polypropylen, 2.0 ml) wurde diese mit Nylonmembran abgedeckt und wie oben beschrieben mit Ethanol sterilisiert.

Herstellung von Sporensuspensionen

Eine Agarplatte mit einer ausgereiften Pilzkolonie wird mit 10 ml einer wässrigen Lösung aus Kochsalz (0.9 %) und Tween 80 (0.1 %) versetzt. Mit einem Drigalski-Spatel wird solange vorsichtig über die Oberfläche gerieben, bis eine homogene Suspension entstanden ist, die abpipetiert wird. Die Sporensuspension ist bei 4 °C mehrere Wochen haltbar.

Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgt auf Kartoffel-Dextrose-Agar (SIGMA-ALDRICH), wobei die Kulturen alle zwei Monate erneuert werden. Bei auxotrophen Stämmen wird das Medium entsprechend supplementiert. Die Platten werden mit Sporen angeimpft und 10 Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend werden die Kulturen mit Parafilm versiegelt und bei Raumtemperatur gelagert.

Für eine Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden von allen Stämmen Sporensuspensionen hergestellt, die mit mit einem gleichen Volumen Glycerin (80 %) versetzt und bei -70 °C eingefroren wurden. Die verwendeten Stämme werden in Abschnitt 5.3.10, S. 187 aufgeführt.

Stehendkulturen im 100 ml-Maßstab

100 ml Standardmedium (vgl. Abschnitt 5.3.11, Medien und Puffer) in einer Zellkulturflasche werden durch Auftragen von Sporen auf die Oberfläche angeimpft und bei 30 °C inkubiert. In den ersten zwei Tagen bildet sich auf der Oberfläche eine geschlossene Schicht aus farblosem Myzel. Danach werden zunehmend braun-schwarze Konidien und Farbstoffe gebildet. Nach etwa 6 Tagen ist äußerlich kein Wachstum mehr erkennbar. Die Kulturen werden nach 10 Tagen aufgearbeitet.

Verimpfungsexperimente 2 - 4 mit monomeren, ¹³C-markierten Cumarinen

Für ein Experiment werden insgesamt 5 Kulturen angelegt, von denen eine als Referenz dient. Nach zweitägiger Inkubation werden pro Flasche 10 mg ¹³C-markiertes Cumarin, gelöst in 1 ml DMSO, mit Hilfe einer Spritze auf dem Myzel und im Medium verteilt. Durch vorsichtiges Schwenken des Gefäßes wird das Medium kurz durchmischt. Nach 6 Tagen Kultur wird erneut mit jeweils 5 mg Cumarin in 1 ml DMSO verimpft. Die Referenzkultur wird mit jeweils 1 ml DMSO ohne Cumarin versetzt.

Verimpfung von [1,2-¹³C]-Acetat

Die Experimente werden analog zu denen mit ¹³C-markierten Cumarinen durchgeführt. Verimpft wurde eine 200 mM wässrige Lösung aus [1,2-¹³C]-Acetat wie folgt:

1. Experiment: nach 24 h Kultur: 1 ml (2 mM im Medium)
 nach 48 h Kultur: 1 ml (2 mM im Medium, insges.: 4 mM im Medium)
2. Experiment: nach 24 h Kultur: 2 ml (4 mM im Medium)

100 ml-Stehendkulturen mit Anzucht im Schüttler

In einem 500 ml Schüttelkolben mit Schikanen werden 100 ml Standardmedium mit Sporen angeimpft und bei 30 °C geschüttelt (120 rpm). Innerhalb von 2 d entwickelt sich eine voluminöse Masse aus farblosem Myzel. Die Kultur wird daraufhin bei Raumtemperatur stehend fortgeführt. Während der nächsten Tage bildet sich an der Oberfläche eine Schicht aus farblosem Myzel, auf der im weiteren Verlauf in großer Zahl schwarz-braune Sporen ausgebildet werden. Die Aufarbeitung erfolgt nach 12 Tagen.

Verimpfungsexperiment 1 mit ¹³C-markiertem Dihydroxycumarin ¹³C-60

Es werden insgesamt 5 Kulturen angelegt, von denen eine als Referenz dient. Nach 24 h werden pro Schüttelkolben 10 mg ¹³C-markiertes Cumarin, gelöst in 1 ml DMSO, zugegeben.

Die zweite Verimpfung erfolgt nach 6 Tagen mit jeweils 5 mg Cumarin in 1 ml DMSO. Die Referenzkultur wird mit je 1 ml DMSO ohne Cumarin versetzt.

100 ml-Schüttelkulturen

In einem 500 ml Schüttelkolben mit Schikanen werden 100 ml Standardmedium mit Sporen angeimpft und 10 Tage bei 30 °C geschüttelt (120 rpm). Innerhalb von 2 Tagen entwickelt sich eine voluminöse Masse aus farblosem Myzel. In den folgenden Tagen werden zusätzlich rotbraune Farbstoffe gebildet. Die Aufarbeitung erfolgt nach 10 Tagen.

Kulturen in kleinerem Maßstab

Kulturen im 1 ml und 10 ml Maßstab werden analog zu den 100 ml Stehendkulturen durchführt. Die Aufarbeitung erfolgt auch hier nach 10 Tagen.

Verimpfung von monomeren Cumarinen

Da zum Animpfen in der Regel eine höhere Sporenzahl pro Volumen Medium verwendet wird als bei den 100 ml Kulturen, bildet sich die Myzelschicht schneller aus. Daher kann die Verimpfung in machen Fällen bereits nach 24 h durchgeführt werden. Die 1 ml Kulturen werden mit 150 µg monomerem Cumarin, gelöst in 20 µl DMSO, versetzt und durch vorsichtiges Schwenken durchmischt (Für 10 ml Kulturen: 1.5 mg Cumarin in 0.2 ml DMSO). Ein zweiter Verimpfungstermin entfällt.

5.2.4 Aufarbeitung und Analyse der Pilzmetabolite

5.2.4.1 Herstellung von Rohextrakten

Die getrennte Aufarbeitung von Biomasse und Fermentationsüberstand zeigt, dass sich Cumarine nur im Myzel in nachweisbarer Menge befinden. Dies kann daran liegen, dass diese Verbindungen nur sehr eingeschränkt wasserlöslich sind, oder sie werden von den Zellen nicht sekretiert. Bei den im folgenden beschriebenen Aufarbeitungen wird jeweils das gesamte Medium extrahiert. Dadurch ist sichergestellt, dass bei Markierungsexperimenten auch die verfütterte Verbindung quantitativ zurückerhalten wird.

Aus 100 ml-Kulturen

Es wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewandt, die sich in erster Linie im Arbeitsaufwand unterscheiden, da in beiden Fällen die Cumarine quantitativ extrahiert werden. Die

Kulturen zu den Verimpfungsexperimenten mit monomeren Cumarinen sowie den Untersuchungen zur Metabolitproduktion wurden nach Methode 1 aufgearbeitet. Die Ansätze zur Inkorporation von ^{13}C -Acetat wurden nach der vereinfachten Methode 2 behandelt.

Methode 1) Der Fermentationsüberstand wird vorsichtig vom Myzel abdekantiert und dreimal mit Chloroform extrahiert. Das Myzel wird in einen Rundkolben überführt, mit 100 ml Methanol / 100 ml-Kultur versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wird über eine Nylon-Membran (0.4 μm) abfiltriert. Das Filtrat wird bei vermindertem Druck bis zur Trockene eingengt, in verdünnter Salzsäure (0.5 %) aufgenommen und dreimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformextrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird ein braunschwarzer Rückstand erhalten (30-60 mg / 100 ml-Kultur). Für HPLC-Untersuchungen wird dieser in heißer HPLC-Auftragslösung (siehe unten) gelöst. Sollte beim Abkühlen ein Niederschlag ausfallen, wird dieser durch Filtration über eine Nylonmembran oder Watte abfiltriert. Es wird eine klare gelbliche Lösung erhalten.

Methode 2) Myzel und Fermentationsüberstand werden in einen Glaskolben überführt und mit einem Gemisch aus Essigsäureethylester, Chloroform und Methanol versetzt (3 : 1 : 1, 100 ml / 100 ml-Kultur). Nach 16 h Rühren bei Raumtemperatur wird das Gemisch über Miracloth[®], CALBIOCHEM (San Diego, USA) abfiltriert. Aus dem Filtrat wird die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird mit Salzsäure leicht angesäuert und dreimal mit einem Gemisch aus Essigsäureethylester / Chloroform (3 : 1) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und bei vermindertem Druck vollständig eingedampft. Die weitere Aufarbeitung für HPLC-Analytik erfolgt wie oben beschrieben.

Aus 1 ml-(10 ml-)Kulturen

Die Kulturen werden mit 1 ml (10 ml) Essigsäureethylester versetzt, luftdicht verschlossen und 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Gelegentliches Schütteln der Gefäße fördert die Durchmischung der Phasen. Um auch schwerlösliche, monomere Cumarine besser aufzuschließen, kann anstelle von reinem Essigsäureethylester ein Gemisch aus Essigsäureethylester, Chloroform und Methanol (3 : 1 : 1) als Extraktionsmittel verwendet werden. Der organische Extrakt kann entweder direkt dem HPLC-Assay zugeführt oder zunächst aufkonzentriert werden. Dazu wird die organische Phase vorsichtig abpipettiert. Die wässrige Phase wird durch Schütteln mit 250 μl (2.5 ml) Extraktionsmittel ein weiteres Mal extrahiert. Die

vereinigten organischen Phasen werden vollständig eingedampft und in 100 µl HPLC-Auftragslösung gelöst beziehungsweise suspendiert. Im Falle eines Niederschlags wird über Watte filtriert. Es werden 80-90 µl klare Extraktionslösung erhalten.

Für **Screeningexperimente** werden die Kulturen mit 0.5 ml Essigsäureethylester luftdicht für 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Gelegentliches vorsichtiges Schütteln der Gefäße erleichtert die Extraktion. Die organische Phase kann in der Regel direkt in das HPLC-System injiziert werden (gegebenenfalls zentrifugieren).

Extraktion von Sporen (A. niger ATCC 36626)

5 Agarplatten aus Standardmedium (15 g Agar / l Medium) werden mit Sporen angeimpft und 5 Tage bei 30 °C und anschließend 10 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten werden zunächst 2 h an der Luft getrocknet und dann über ein Becherglas mit gleichem Durchmesser gestülpt und geklopft, bis keine Sporen mehr losgelöst werden. Die Sporen werden in 50 ml Chloroform aufgenommen, 16 h bei Raumtemperatur gerührt und dann über eine Nylonmembran (0.45 µm) filtriert. Der Extrakt wird eingengt und mittels HPLC untersucht, beziehungsweise dünnschichtchromatographisch aufgearbeitet.

HPLC-Auftragslösungen

RP-18-Assay: Acetonitril / Methanol = 3 : 1

Normalphasen(SiO₂)-Assay: Chloroform / Methanol = 3 : 1 (In Abwesenheit von verimpften Hydroxycumarinen kann auch reines Chloroform verwendet werden)

5.2.4.2 Isolierung der Cumarine

Allgemeine Methode zur Isolierung der Bicumarine aus Aspergillus-Rohextrakten

Die Methode erweist sich zur Isolierung der 8,8'-Bicumarine in Abwesenheit von Monomeren als besonders effektiv.

1. Säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel (EE), $R_f \approx 0.3$, alle Bicumarine werden in einer Fraktion eluiert. Es werden 3-5 mg gelblicher Feststoff / 100 ml-Kultur erhalten.

2. Präparative DC (0.2 mm, Toluol / EE / Ameisensäure = 6 : 5 : 1), Kotanin (**2**) $R_f = 0.34$ (≈ 1.3 mg / 100 ml-Kultur), Desmethylkotanin (**61**) $R_f = 0.28$ (≈ 0.4 mg / 100 ml-Kultur), Orlandin (**62**) $R_f = 0.23$ (≈ 0.5 mg / 100 ml-Kultur)

Isolierung der Cumarine aus den Rohextrakten der Verimpfungsexperimente 1-4

1. Experiment

1. Methylierung des Rohextrakts

Der Rohextrakt wird in 5 ml abs. Aceton gelöst, mit 100 μ l Dimethylsulfat und einer Spatelspitze Kaliumcarbonat versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges Dimethylsulfat wird durch einstündiges Rühren nach Zugabe von 1 ml Methanol hydrolysiert. Anschließend wird das Lösungsmittel bei vermindertem Druck abdestilliert, der Rückstand in verdünnter Salzsäure (0.5 %) aufgenommen und dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und vollständig eingedampft.

2. Säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel (EE), $R_f = 0.30$; Es werden 14 mg einer Kotanin (**2**) enthaltenden Fraktion eluiert.
3. Präparatives DC (20×20 cm, 0.2 mm, 2 Läufe mit CHCl_3 , Kotanin (**2**) bildete die unterste Fraktion $R_f \approx 0.1$) Ausbeute: ≈ 1.8 mg Kotanin (**2**) (Bestimmung durch Wiegen).

2. Experiment

1. Präparatives DC (20×20 cm, 1.0 mm, EE, Kotanin (**2**) $R_f \approx 0.3$).
2. Präparatives DC (20×20 cm, 0.2 mm, 2 Läufe mit CHCl_3 , $R_f \approx 0.1$) Ausbeute: 4.5 mg Kotanin (**2**) (Bestimmung durch Wiegen, Substanz ist verunreinigt).

3. Experiment

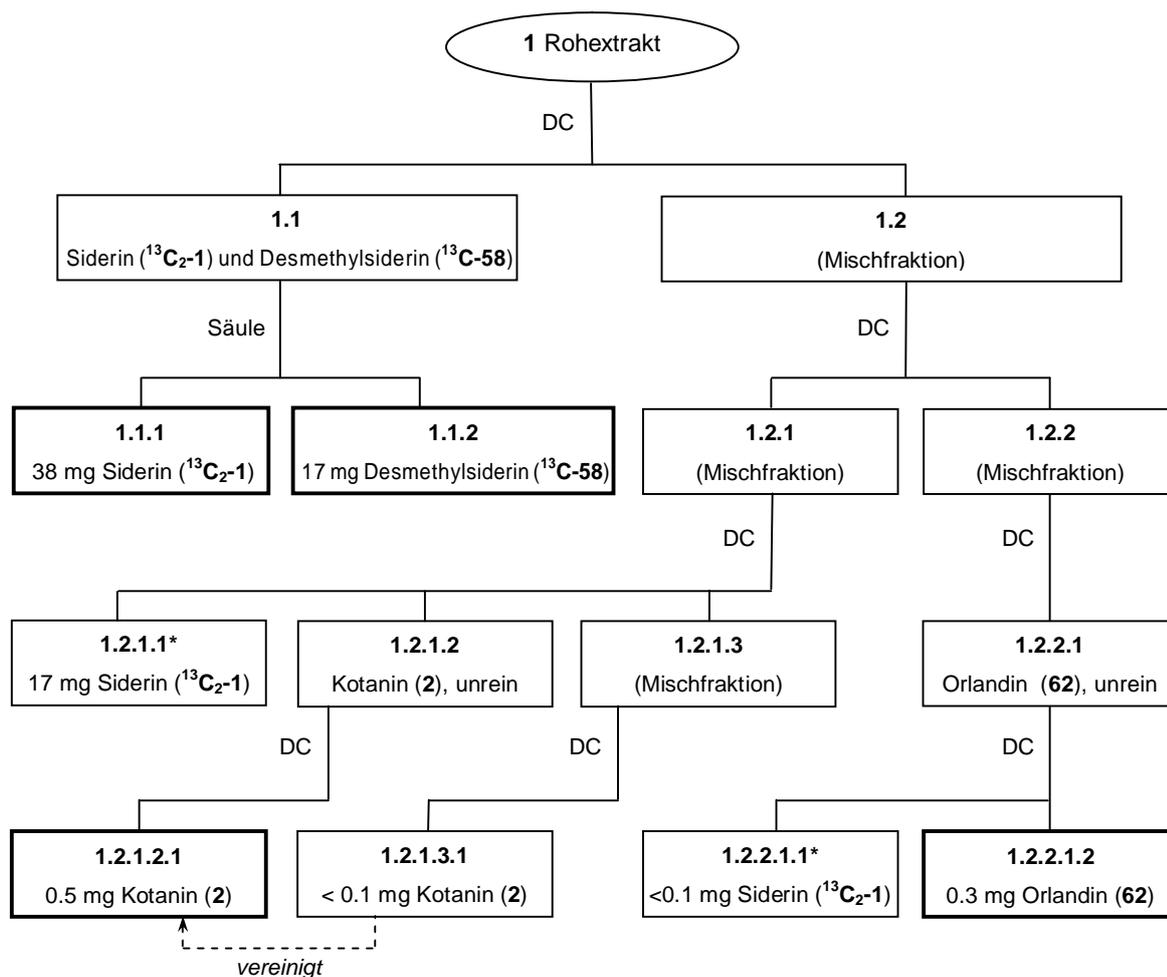


Abb. 117: Fließschema zur Isolierung der Cumarine in Experiment 3. fett umrandet: ^{13}C -NMR-spektroskopisch charakterisierte Verbindungen. * Mit Fraktion 1.1 vereinigt.

1. Präparative DC (20×20 cm, 1.0 mm, Toluol / EE / Ameisensäure = 6 : 5 : 1)

- 1.1 oberste Fraktion Siderin ($^{13}\text{C}_2\text{-1}$) + Desmethyلسiderin ($^{13}\text{C-58}$)
- 1.2 alle übrigen Fraktionen (zahlreiche Verbindungen)

1.1 vereinigt mit 1.2.3.1 und 1.2.2.1.1 (beide Siderin). Säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel, 1. CHCl_3 / EE = 10 : 1, 2. Toluol / EE / Ameisensäure = 6 : 5 : 1)

- 1.1.1 38 mg Siderin ($^{13}\text{C}_2\text{-1}$) (63 % der verimpften Substanz)
- 1.1.2 17 mg Desmethyلسiderin ($^{13}\text{C-58}$) (30 % der verimpften Substanz)

1.2 Präparative DC (20×20 cm, 1.0 mm, Toluol / EE / Ameisensäure = 6 : 5 : 1)

- 1.2.1 $R_f = 0.69 - 0.46$ Mischfraktion
- 1.2.2 $R_f = 0.41 - 0.23$ Mischfraktion

1.2.1 Präparative DC (2 Platten, 20 × 20 cm, 0.2 mm, 3 × eluieren mit CHCl₃, dann 1 × CHCl₃ / MeOH = 40 : 1)

1.2.1.1 $R_f = 0.63 - 0.49$ 11 mg Siderin (¹³C₂-**1**) (vereinigt mit 1.1.1)

1.2.1.2 $R_f = 0.35 - 0.29$ Kotanin (**2**) (verunreinigt)

1.2.1.3 $R_f = 0.29 - 0.18$ Mischfraktion

1.2.2 Präparative DC (20 × 20 cm, 0.2 mm, Toluol / EE / Ameisensäure = 6 : 5 : 1)

1.2.2.1 $R_f = 0.28$ Orlandin (**62**) (verunreinigt)

1.2.1.2 Präparative DC (20 × 20 cm, 0.2 mm, EE)

1.2.1.2.1 $R_f = 0.50$ 0.5 mg Kotanin (**2**) (UV aus CD-Assay, einschließlich Fraktion 1.2.1.3.1)

1.2.1.3 Präparative DC (20 × 20 cm, 0.2 mm, 2 × eluieren mit Chloroform / Methanol = 20 : 1)

1.2.1.3.1 $R_f = 0.62$ Kotanin (**2**) (Spur vereinigt mit 1.2.1.2.1)

1.2.4.1 Präparative DC (20 × 20 cm, 0.2 mm, Toluol / EE / Ameisensäure = 6 : 5 : 1)

1.2.2.1.1 $R_f = 0.50$ Siderin (¹³C₂-**1**) (<0.1 mg vereinigt mit 1.1.1)

1.2.2.1.1 $R_f = 0.26$ 0.3 mg Orlandin (**62**) (UV aus CD-Assay)

4. Experiment

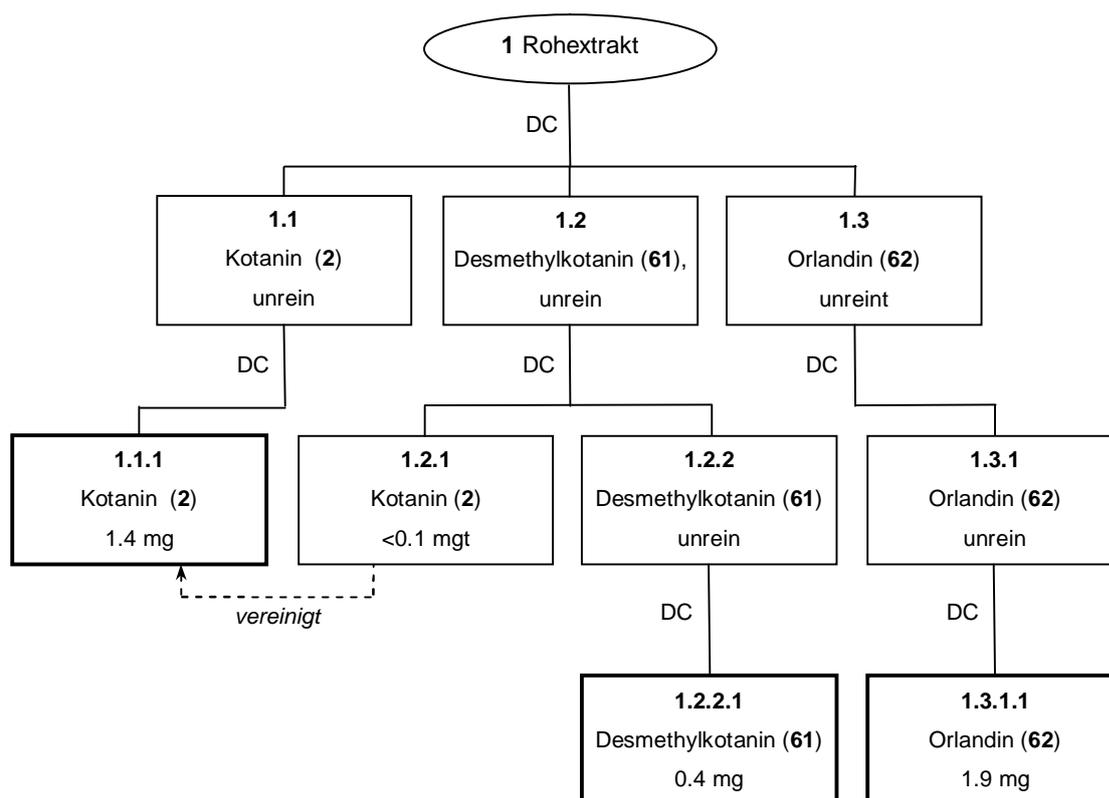


Abb. 118: Fließschema zur Isolierung der Coumarine in Experiment 4. fett umrandet: ^{13}C -NMR-spektroskopisch charakterisierte Verbindungen.

1. Präparative DC (20×20 cm, 1.0 mm, $3 \times$ eluieren mit CHCl_3 , $1 \times \text{CHCl}_3 / \text{MeOH} = 40 : 1$, nur bis $R_f = 0.53$: $1 \times \text{Toluol} / \text{EE} / \text{Ameisensäure} = 6 : 5 : 1$)

1.1	$R_f = 0.59 - 0.52$	Kotanin (2) unrein
1.2	$R_f = 0.52 - 0.39$	Desmethylkotanin (61) unrein
1.3	$R_f = 0.35 - 0.18$	Orlandin (62) unrein

1.1 Präparative DC (20×20 cm, 0.2 mm, EE)

1.1.1	$R_f = 0.30$	<u>1.4 mg Kotanin (1)</u> (einschließlich Fraktion 1.2.1, UV aus CD-Assay)
-------	--------------	---

1.2 Präparative DC (20×20 cm, 0.2 mm, $1 \times$ eluieren mit CHCl_3 , $1 \times$ mit $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} = 40 : 1$)

1.2.1	$R_f = 0.62$	Kotanin (2) (Spur, mit 1.1.1 vereinigt)
1.2.2	$R_f = 0.42$	Desmethylkotanin (61) verunreinigt

1.3 Präparative DC (20 × 20 cm, 0.2 mm, 1 × CHCl₃ / MeOH = 40 : 1, 1 × Toluol / EE / Ameisensäure = 6 : 5 : 1)

1.3.1 $R_f = 0.38 - 0.16$ Orlandin (**62**) + Desmethylkotanin (**61**)

1.2.2 Präparative DC (20 × 20 cm, 0.2 mm, Toluol / EE / Ameisensäure = 12 : 5 : 1)

1.2.2.1 $R_f = 0.20$ 0.4 mg Desmethylkotanin (**61**) (UV, CD-Assay)

1.3.1 Präparative DC (20 × 20 cm, 0.2 mm, 1 × eluieren mit Toluol / EE / Ameisensäure = 12 : 5 : 1, Toluol / EE / Ameisensäure = 6 : 5 : 1,)

1.3.1.1 $R_f = 0.40 - 0.18$ 1.9 mg Orlandin (**62**) (UV aus CD-Assay)

Zur Abtrennung von Kieselgelspuren wurden alle Produktfraktionen über eine Kieselgelkartusche mit CHCl₃ / MeOH = 10 : 1 [Kotanin (**2**)] beziehungsweise 2 : 1 [Desmethylkotanin (**61**), Orlandin(**62**)] eluiert.

[1,2-¹³C]-Acetat Einbauexperimente

Die Rohextrakte wurden nach der allgemeinen Methode zur Isolierung von Bicomarinen aufgereinigt.

Ausbeuten (bestimmt durch Auswiegen):

	Kotanin (2)	Desmethylkotanin (61)	Orlandin (62)
Experiment 1	6 mg	2 mg	2 mg
Experiment 2	4 mg	nicht bestimmt	nicht bestimmt

5.3 Molekularbiologische Arbeiten

Mit Ausnahme der Versuche zur Transformation von Cosmiden in *Aspergillus niger* wurden alle Arbeiten am Institut für Mikrobiologie (Abteilung Prof. Brakhage) der Universität Hannover durchgeführt.

5.3.1 Allgemeine Anmerkungen

Alle Geräte und Behälter wurden vor Gebrauch autoklaviert (121 °C, 20 min) beziehungsweise über der Flamme sterilisiert. Die Arbeiten mit Pilzen und Bakterien wurden an einer Sterilbank durchgeführt.

5.3.2 Klonierung in PCR[®]2.1-TOPO[®]

Für Klonierungen von PCR-Produkten wurde ein TOPO TA Cloning[®] Kit der Firma INVITROGEN (Paisley, GB) gemäß Anleitung des Herstellers verwendet. Pro Ansatz wurden dabei entgegen der Empfehlung des Herstellers nur 0.5 µl statt 1.0 µl der Vektor-Lösung eingesetzt.

5.3.3 Sequenzierung

Es wurde ein "ABI PRISM[®] BigDye[™] Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" der Firma APPLIED BIOSYSTEMS (Warrington, GB) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die Analyse des Sequenzierungsgemischs erfolgte über einen APPLIED BIOSYSTEMS ABI 310 Sequencer. Die Sequenzdaten wurden mit den Programmen Sequence Navigator und Auto Assembler (APPLIED BIOSYSTEMS) editiert.

Die Sequenzierungen erfolgten in einer Richtung unter Verwendung des Primers M13-forward.

5.3.4 DNA-modifizierende Enzyme

Die für diese Arbeit verwendeten *Restriktionsenzyme* und *T4-DNA-Ligase* wurden von der Firma NEW ENGLAND BIOLABS (Beverly (USA) / Frankfurt a. M.) bezogen. Sie wurden mit den mitgelieferten Puffern gemäß den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt.

Für *Dephosphorylierungen* wurde Shrimpp Alkalische Phosphatase (SAP) der Firma ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (Basel (CH) / Mannheim), verwendet. Für *PCR-Experimente* wurde, soweit nicht anders beschrieben, Moltaq^{Red} Taq-DNA-Polymerase der Firma MOLZYM GMBH & Co.KG (Bremen) mit dem mitgelieferten Puffer verwendet.

5.3.5 Isolierung und Aufreinigung von DNA

*Präparation genomischer DNA aus *Aspergillus niger**^{149, 176}

A. niger ATCC 36626 wird 2 Tage in mit Biotin supplementiertem *Aspergillus*-Minimalmedium im Schüttler kultiviert (28 °C, 120 rpm). Das Myzel wird über Miracloth[®], CALBIOCHEM (San Diego, USA), abfiltriert, mit Wasser gewaschen und vorsichtig ausgewrungen. Es werden 4.1 g feuchtes Myzel erhalten, die in einem Mörser mit flüssigem Säckstoff übergossen und gründlich zerrieben werden. 2.0 g des zerkleinerten Myzels werden in 50 ml Extraktionspuffer aufgenommen und 24 h geschüttelt (28 °C, 120 rpm, eine Verlängerung der Schüttelphase auf bis zu 4 Tage führt ebenfalls zu guten Ergebnissen). Die Suspension wird mit einem gleichen Volumen Phenol / Chloroform versetzt (1 : 1, 1 % Isoamylalkoholzusatz), kurz geschüttelt und zentrifugiert (15 min, 15 °C, 4500 × g). Die wässrige Phase wird abgetrennt, mit einem gleichen Volumen Chloroform (1 % Isoamylalkoholzusatz) versetzt, kurz geschüttelt und erneut zentrifugiert (5 min, 15 °C, 4500 × g). Die wässrige Phase wird abgetrennt, mit 1.1 Volumina abs. Ethanol versetzt und 45 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugieren (15 min, 15 °C, 4500 × g) wird der Überstand über dem DNA-Pellet abdekantiert. Das Pellet wird in 2 ml TE-Puffer gelöst und mit 100 µg RNase 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µg Proteinase K wird für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wird dreimal mit dem gleichen Volumen Phenol / Chloroform versetzt, kurz geschüttelt, zentrifugiert (10 min, Raumtemperatur, 2700 × g) und von der organischen Phase befreit. Anschließend werden 0.1 Volumina Natriumacetatlösung (3 M, pH 5.2) und 1.1 Volumina abs. Ethanol zugegeben. Die ausgefallene DNA wird abzentrifugiert (1 min, Raumtemperatur, 1000 × g), mit 400 µl Ethanol / TE-Puffer gewaschen und in 400 µl Tris / HCl (5 mM, pH 8.5) gelöst. Ist die DNA noch nicht rein genug (UV oder Restriktionskontrolle) wird die Ethanol-Präzipitation zweimal wiederholt. Dazu wird das Volumen der DNA-Lösung auf 1 ml erhöht und LiCl (Endkonzentration = 0.2 M) wird als Salzquelle eingesetzt.

Es wurden 286 µg chromosomale DNA erhalten (UV-Assay, $I_{260} / I_{280} = 1.81$).

Präparation von Plasmid-DNA

Die Darstellung von Plasmiden erfolgte mit Hilfe eines E.Z.N.A[®] Plasmid Miniprep Kit I, PEQLAB-BIOTECHNOLOGIE GMBH (Erlangen), gemäß den Angaben des Herstellers. Cosmide wurden im analytischen Maßstab (5 ml Kulturen) über eine Plasmid-Minipräparation nach Standardprotokoll (alkalische Lyse und Ethanolpräzipitation) oder mit einem QIAGEN[®]

Plasmid Mini Kit, QIAGEN (Hilden), nach Anweisung des Herstellers isoliert. Die Eluierung der DNA von der Silica-Säule erfolgte dabei bei 70 °C. Für Transformationen wurde Cosmid-DNA in größerem Maßstab mit Hilfe eines QIAGEN[®] Large-Construct Kits isoliert, wobei aber nur bei Cosmid 33 der im Protokoll optionale Endonucleaseverdau durchgeführt wurde, oder es wurde ein QIAGEN[®] HiSpeed Plasmid Midi Kit nach der Anleitung des Herstellers verwendet.

Gelextraktionen

Agarosegele wurden mit Hilfe eines E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit, PEQLAB-Biotechnologie GmbH (Erlangen), nach den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Bei PCR-Produkten wurde ein E.Z.N.A.[®] Cycle-Pure Kit der selben Firma verwendet.

5.3.6 Konstruktion der *A. niger* Cosmidbank

Partielle Restriktion von hochmolekularer chromosomaler Aspergillus niger-DNA mit Sau3AI

Analytischer Ansatz: 5-10 µg DNA werden mit *Sau3A1* (2 U) in einem Gesamtvolumen von 100 µl bei 37 °C verdaut. Vor Zugabe des Enzyms und nach 30, 60, 90, 120, 180, 240 und 360 Sekunden werden 10 µl Probe entnommen und zur Inaktivierung des Enzyms sofort in Gel-Auftragspuffer überführt. Anschließend werden die Proben Gel-elektrophoretisch (0.5 % Agarose) analysiert.

Präparativer Ansatz: Der analytische Ansatz wird um den Faktor 7 vergrößert und auf zwei Reaktionsgefäße mit je 350 µl verteilt. Nach der aus den analytischen Experimenten als optimal eingeschätzten Zeit (90 s) wird die Reaktion durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Zugabe von EDTA-Lösung (200 µl, 0.1 M) abgebrochen. Die aufgetauten Proben werden mit Phenol / Chloroform (1 : 1) extrahiert, vereinigt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 4 ml gebracht. Nach Zugabe von LiCl-Lösung (4 M, 400 µl) und Ethanol (4 ml) wird 30 min bei -70 °C inkubiert. Nach Zentrifugieren (15 min, 15 °C, 4500 × g) wird das DNA-Pellet mit Ethanol (70 %) gewaschen und erneut 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert, und das Pellet wird in 80 µl Tris / HCl (5 mM, pH 8.0) gelöst. Anschließend wird mit Alkalischer Phosphatase (SAP) (6 U, 1 h, 37 °C, 200 µl Gesamtvolumen) dephosphoryliert. Durch Extraktion mit Phenol / Chloroform 1 : 1 und Fällung in Ethanol werden 14 µg DNA erhalten (UV-Assay, $I_{260} / I_{280} = 1.89$).

Präparation des Cosmidvektors pANsCos1

15 µg pANsCos1 werden mit *Xba*I in zwei parallelen Ansätzen mit je 100 µl Gesamtvolumen für 16 h restringiert (2×30 U, 37 °C) und anschließend 3 h mit Alkalischer Phosphatase (SAP) dephosphoryliert (2×1.5 U, 37 °C). Die Ansätze werden vereinigt und aufgereinigt (Phenol / Chloroform-Extraktion, ethanolische DNA-Fällung). Die Restriktion mit *Bam*H1 erfolgt in zwei parallelen 100 µl-Ansätzen (2×30 U, 37 °C, 16 h). Nach erneuter Aufreinigung werden 3.3 µg DNA erhalten (UV-Assay, $I_{260} / I_{280} = 1.54$)

Ligation von chromosomaler Aspergillus niger-DNA mit pANsCos1

10 µg chromosomale *Aspergillus niger*-DNA und 2 µg des geöffneten pANsCos1-Vektors werden in einem Volumen von 22 µl mit T4-DNA Ligase (800 U) für 16 h bei 4 °C und weitere 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Ligase durch 10 min Erhitzen auf 65 °C denaturiert.

Verpackung in infektiöse Phagen

Es wurde der Gigapack[®] III XL Packaging Extract der Firma STRATAGENE (La Jolla, USA) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

5.3.7 Konstruktion eines Cosmid-Shuttle Vektors mit dem *pyr4*-Gen als Selektionsmarker

PCR-Amplifikation des *pyr4*-Fragments: pKTP/BglIII und M13-forward je 4 µM, MgCl₂ 5 mM, (95 °C, 5 min) \times 1; (50 °C, 1 min; 70 °C, 1 min; 94 °C, 45 s) \times 30; (70 °C, 10 min) \times 1; Als DNA-Polymerase wurde "BIO-X-ACT Short DNA Polymerase" (1 U) der Firma BIOLINE (London (GB) / Luckenwalde) verwendet.

"Colony-PCR" an 10 Transformanten: pKTP/BglIII und M13-forward je 4 µM, MgCl₂ (5 mM, (95°C, 5') \times 1; (50 °C, 1 min; 70 °C, 1 min; 94 °C, 45 s) \times 30; (70 °C, 10 min) \times 1.

5.3.8 Screening auf Polyketidsynthase-Gene (PKS)

DNA-Abdrücke der Cosmid-Kolonien wurden auf Hybond-N+-Membranen der Firma AMERSHAM BIOSCIENCES (GE-HEALTHCARE) (Buckinghamshire (GB) / Freiburg) gemäß Gebrauchsanweisung angefertigt. Für die Herstellung der Fluorescein-DNA-Sonde und die

Hybridisierung wurde ECL™ Random prime labelling and detection systems, Version II (AMERSHAM LIFE SCIENCES) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten auf Kodak X-Omat AR XAR-5 Papier, 24 × 30 cm (SIGMA-ALDRICH). Die Koloniedichte auf den Agarplatten betrug 200-300 / Platte in den Versuchen 1-3 und 500-1000 / Platte im Versuch 4. Sie lag damit teilweise deutlich über dem im Protokoll angegebenen Werten (≤ 200 / Platte). Um positive Kolonien trotzdem sicher identifizieren zu können wurden alle Kolonien in der Umgebung eines Spots auf dem Fotofilm auf eine weitere Agarplatte (Masterplate) transferiert und und erneut gescreent.

5.3.9 Versuche zur Transformation ausgewählter Cosmide in *A. niger* N 402

Die Experimente erfolgten in Anlehnung an ein im Internet veröffentlichtes Protokoll für Transformationen von *A. niger*¹⁶⁹ sowie dem von der Arbeitsgruppe Prof. BRAKHAGE verwendeten Protokoll für *A. nidulans*.¹⁷⁷

Vier Schüttelkolben (1 l) mit jeweils 250 ml *Aspergillus*-Komplex-Medium, supplementiert mit Biotin, werden mit jeweils 250 μ l *Aspergillus niger* N 402-Sporenlösung angeimpft und 16-20 h inkubiert (30 °C, 120 rpm). Das Myzel wird über Miracloth® abfiltriert, mit 0.7 M KCl-Lösung gewaschen und vorsichtig ausgewrungen. 8-10 g des feuchten Myzels werden in 20 ml Lysepuffer suspendiert und bei 30 °C geschüttelt (150-180 rpm). Bei einem Überschuss an Myzel kann dieses auf zwei 20 ml-Ansätze verteilt werden. Nach 1 h und anschließend alle 30 min wird eine Probe mikroskopisch untersucht. Sind bei 400-facher Vergrößerung 50-100 Protoplasten als farblose, runde Zellen in einem Gesichtsfeld zu erkennen, kann mit der Aufarbeitung begonnen werden. Insgesamt sollte der Protoplastierungsvorgang nicht länger als 4 h dauern. Gegebenenfalls kann das Myzel durch Aufziehen und Ablassen mit einer Pipette mit großer Öffnung vorsichtig aufgespalten werden. Die Zellsuspension wird über Miracloth abfiltriert. Das Filtrat wird mit Eis gekühlt (die Protoplasten werden im folgendem grundsätzlich auf Eis gelagert) und zentrifugiert (5 min, 4 °C, 2100 × g). Das Zellpellet wird durch vorsichtiges Aufziehen und Ablassen mit einer Pipette in 0.7 M KCl-Lösung (4 °C) suspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend werden die Protoplasten vorsichtig in 10 ml S/C-Puffer (4 °C) suspendiert. Es wird eine Probe entnommen (10 μ l), die mit S/C-Puffer (90 μ l) verdünnt wird. Während die Zellen erneut zentrifugiert werden, wird die Zelldichte der Probe mikroskopisch mittels einer Thoma-Kammer bestimmt. Es gilt:

$$\text{Zellkonzentration [ml}^{-1}\text{]} = \frac{\text{Durchschnittliche Zahl der Zellen pro Großquadrat}}{\text{Kammervolumen [ml]}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{Durchschnittliche Zahl der Zellen pro Großquadrat}}{4 \cdot 10^{-6} \text{ [ml]}} \cdot 10 \cdot \text{Lösungsvolumen [ml]}$$

Typischerweise werden Gesamtausbeuten in Größenordnungsbereichbereich von 10^8 Zellen erzielt. Die erneut zentrifugierten und vom Überstand befreiten Protoplasten werden in so viel S/C-Puffer (4 °C) suspendiert, dass die Konzentration etwa 10^8 Zellen / ml beträgt. Je 200 µl der Suspension werden in 15 ml-Zentrifugenröhrchen aliquotiert und mit der zu transformierenden DNA, die in maximal 20 µl Wasser gelöst ist, versetzt. Eine der Proben wird als Referenz "0-DNA" aufbewahrt. Es werden 1-10 µg DNA pro Ansatz empfohlen. In den eigenen Experimenten wurden 5-20 µg Cosmid-DNA zuzüglich 1.2 Massenäquivalenten pHelp1 eingesetzt. Besteht die Gefahr, dass durch den DNA-Puffer das osmotische Gleichgewicht gestört wird (größere Volumina, Salzkontamination), kann die DNA-Lösung zunächst mit doppelt konzentrierterem S/C-Puffer verdünnt werden. Zu den Transformationsansätzen werden 50 µl PEG-Lösung gegeben; es wird vorsichtig geschüttelt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird mit weiteren 2 ml PEG-Lösung versetzt, durch Schwenken des Röhrchens kurz gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml S/C-Puffer und erneutem Schwenken wird 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert ($3000 \times g$). Das Zellpellet wird in 400 µl S/C-Puffer resuspendiert. Für die Vitalitätskontrolle der Protoplasten werden aus 10 µl der Suspension mit S/C-Puffer Verdünnungen mit Faktor 100 und 10 000 angelegt. Zum Ausplattieren werden 100 µl der Zellsuspension zu 5 ml flüssigen Top-Agar (40 °C) in einem Reagenzglas gegeben, mit dem Vortex kurz vermischt und sofort auf eine Bottom-Agarplatte gegossen. Für die Transformationsexperimente enthalten Top- und Bottom-Agar als Selektionsmarker (Hygromycin B, 150 mg / l). Für die Vitalitätskontrollen der Protoplasten werden Platten ohne Marker verwendet. Die fertigen Platten werden bei 30 °C inkubiert. Kolonien von Transformanten sollten nach drei Tagen erkennbar sein.

5.3.10 Stämme

Pilze:

Organismus	Stamm	Genotyp	Literatur
<i>A. niger</i>	ATCC 36626		120
<i>A. niger</i>	NRRL 3122 (ATCC 22343)		178
<i>A. niger</i>	N 402 (FGSC A733)	<i>cspA1</i>	179
<i>A. niger</i>	N 492 (FGSC A888)	<i>cspA1, argB13, nicA1</i>	179
<i>A. niger</i>	"3014"	<i>Uri</i>	141
<i>Emericella desertorum</i>	CBS 653.73		180
<i>A. nidulans</i>	FGSC A 26	<i>biA1</i>	181
<i>A. nidulans</i>	R 21	<i>pabaA1, yA2</i>	182
<i>A. nidulans</i>	WG 355	<i>biA1, bga0, argB2</i>	182, 183
<i>A. fumigatus</i>	ATCC 46645		184
<i>A. fumigatus</i>	AF 293 (FGSC A1100)		185, 148

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA (USA); **CBS:** Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande; **FGSC:** Fungal Genetics Stock Center, School of Biological Sciences, University of Missouri, Kansas City (USA); **NRRL:** Northern Regional Research Center, Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois (USA).

Bakterien:

Für Standard-Kloierungsarbeiten wurden der Stamm *E. coli* TOP 10F' verwendet. (pHelp1 wurde in *E. coli* DH5 α transformiert). Die Transfektion der *A. niger*-Cosmide erfolgte in *E. coli* XL-Blue MRA.

Organismus	Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i>	DH5 α	F ⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i>	INVITROGEN; Carlsbad (Kalifornien, USA) / Karlsruhe;186
<i>E. coli</i>	Top10F'	F ['] { <i>lacI</i> ^q , Tn10(Tet ^R)} <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 <i>recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	INVITROGEN; Carlsbad (Kalifornien, USA) / Karlsruhe
<i>E. coli</i>	XL1-Blue MRA	Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac</i>	STRATAGENE, La Jolla, (Kalifornien, USA)

5.3.11 Medien und Puffer

5.3.11.1 Kulturmedien

Für E. coli

LB-Medium¹⁸⁷

Trypton	10 g / l
Natriumchlorid	10 g / l
Hefeextrakt	5 g / l
<i>Für Platten:</i> Agar	15 g / l

auf pH 7 einstellen (NaOH) und autoklavieren

Selektionsmarker Ampicillin 100 mg / l

Für Aspergillen

Standardmedium¹³²

Czapek-Dox-Medium (SIGMA-ALDRICH):

Saccharose	30.0 g / l
NaNO ₃	3.0 g / l
K ₂ PO ₄	1.0 g / l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g / l
KCl	0.5 g / l
Fe(II)SO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g / l
Corn Seep Liquor	20.0 ml / l

autoklavieren

Aspergillus Minimal Medium¹⁸⁸

NaNO ₃	6.0 g
KH ₂ PO ₄	1.52 g
KCl	0.52 g
<i>Für Platten:</i> Agar	15.0 g
Wasser	956 ml

auf pH 6.5 einstellen und autoklavieren

20 % Glucose (autoklaviert)	40.0 ml
20 % MgSO ₄ (autoklaviert)	2.5 ml
Spurenelementlösung	1.0 ml

Aspergillus Komplex Medium (Top und Bottom Agar):

Wie Aspergillus Minimal Medium. Zusätzlich in die Salzlösung:

Bactopeptone	2.0 g
Hefeextrakt	1.0 g
'Casamio Acids'	1.0 g

(auf Vitaminzugabe wurde verzichtet)

Spurenelementelösung:

ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	8.8 g / l
EDTA, Dinatriumsalz	4.0 g / l
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	1.0 g / l
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0.4 g / l
MnSO ₄ × 1 H ₂ O	0.15 g / l
Na ₂ B ₂ O ₇	0.1 g / l
(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₇ × 4 H ₂ O	0.05 g / l
Auf pH 3.5 – 4.0 (HCl) einstellen und sterilfiltrieren	

Selektionsmarker Hygromycin B: 1.0 ml / 1 Medium (= 100 µg / ml)
 Fertiglösung (bei – 20 °C) 100 mg / 1 ml

Supplemente:

PABA: 4-Aminobenzoessäure, Vitamin H₁ 0.1 g / 100 ml sterilfiltriert
 Zugabe: 3 ml / 1 Medium

Biotin: 2 mg / 100 ml sterilfiltriert
 Zugabe: 3 ml / 1 Medium

Nicotinsäure: 0.2 g / 100 ml sterilfiltriert
 Zugabe: 1 ml / 1 Medium

Arginin: 8.7 g / 100 ml (0.5 M) sterilfiltriert
 Zugabe: 20 ml / 1 Medium (10 mM)

Uridin: 24.4 g / 100 ml (1 M) sterilfiltriert
 Zugabe: 4 ml / 1 Medium (4 mM)

5.3.11.2 Puffer**Extraktionspuffer (DNA-Präparation)**

NaCl	150 mM (8.77 g / l)
EDTA	100 mM (29.2 g / l)
Tris/HCl (pH 8.0)	50 mM
Toluol	20 Vol %
SDS	20 g / l

TE-Puffer

Tris/HCl (pH 8.0)	10 mM
EDTA	1 mM (2.92 g / l)

TAE-Puffer (für Gelelektrophorese)

Tris/HCl (pH 8.0)	40 mM
EDTA	1 mM (2.92 g / l)
<i>Für Gele:</i> Agarose	
Chromosomale DNA	0.3-0.5 %
Plasmide (Standardanwendungen)	1.0 %

Kleine Fragmente, PCR-Produkte 2.0 %

Osmotische Lösung

KCl 0.6 M (44.7 g / l)
NaH₂PO₄ 10 mM (1.05 g / l)
auf pH 5.8 einstellen und autoklavieren

S/C-Puffer

Sorbitol 1.0 M (180.2 g / l)
CaCl₂ · 2H₂O 50 mM (7.35 g / l)
autoklavieren

PEG-Lösung

PEG 8000 250 g / l
CaCl₂ · 2H₂O 50 mM (7.35 g / l)
Tris/HCl (pH 7.5) 10 mM
autoklavieren

6 Abkürzungsverzeichnis

Symbole für verwendete Größen

C	[mol · l]	Konzentration
<i>de</i>	[%]	Diastereomerenüberschuss
E	[%]	¹³ C-Einbaurate
<i>ee</i>	[%]	Enantiomerenüberschuss
<i>g</i>	[9.807 m · s ⁻²)	Erdbeschleunigung (Einheit bei Zentrifugieren)
I	[1]	(relative) Intensität (= Integral) eines Signals oder Peaks
<i>J</i>	[Hz]	Kopplungskonstante
$\Delta\epsilon$	[deg · cm ⁻² · dezimol ⁻¹]	Molarer Circulardichroismus
<i>t</i>	[s, min, h, d]	Zeit
T	[°C]	Temperatur
$[\alpha]_{\lambda}^T$	[10 · deg · cm ² · g ⁻¹]	Spezifischer Drehwert bei Temperatur T und Wellenlänge λ
δ	[ppm]	chemische Verschiebung
λ	[nm]	Wellenlänge

Abkürzungen

abs.	absolutiert
Äq.	Äquivalent(e)
Ac	Acetylgruppe
ar.	aromatisch
ber.	berechnet
Boc	<i>t</i> -Butoxycarbonyl
BINOL	1,1'-Binaphthalen-2,2'-diol
BINAP	2,2'-Bis(diphenylphosphanyl)-1,1'-binaphthyl
BMIM	1-Butyl-3-methylimidazolium
Bn	Benzylgruppe
CD	Circulardichroismus
CIP	Cahn-Ingold-Prelog
CoA	Coenzym A
DAD	Diodenarraydetektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzochinon
DHGO	Dihydrogeodin-Oxidase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigsäureethylester
EI	Elektronenstoßionisation
Enz	Enzym
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid

FDCD	Fluoreszenz-detektierter Circular dichroismus
FMN	Flavin-Mononucleotid
GCMS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
gem.	gemessen
ges.	gesättigt
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
2-Pr	<i>iso</i> -Propylgruppe
2-PrOH	2-Propanol
IR	Infrarotspektroskopie, -spektrum
kat.	in katalytischer Menge
kb	Kilobasenpaare (= 10^3 Basenpaare)
LDA	Lithiumdiisopropylamid
M	Metall
m/z	Masse / Ladung - Verhältnis
M ⁺	Molekülion
Mb	Megabasenpaare (= 10^6 Basenpaare)
MCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
Me	Methylgruppe
MeOH	Methanol
MOM	Methoxymethyl
MS	Massenspektrometrie, -spektrum
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
ORF	Offenes Leseraster; Sequenz, die ein Gen darstellt oder darstellen könnte (<i>Open Reading Frame</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PIFA	Phenylod(III)bis(trifluoracetat)
PKS	Polyketidsynthase
ppm	<i>parts per million</i>
<i>rac.</i>	racemisch
R _f	Retentionsfaktor
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
R _t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Smp	Schmelzpunkt
sp / spp	Spezies / Spezies (Mehrzahl)
<i>t</i> -Bu	<i>t</i> -Butylgruppe
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy-Radikal
TFA / Tfa	Trifluoressigsäure / Trifluoracetylgruppe
THF	Tetrahydrofuran
TMAH	Trimethylammonium

TMEDA	Tetramethylethyldiamin
Tris/HCl	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol Hydrochlorid
U	enzymatische Einheit (<i>Unit</i>)
UV	Ultraviolettpektroskopie (-Spektrum)
Vis	Sichtbares Licht (-Spektrum) (<i>visible</i>)
Zers.	Zersetzung
Δ	erhitzen

7 Literaturverzeichnis

- 1 G. Bringmann, R. Walter, R. Weirich, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1006-1019.
- 2 a) J. M. Brunel, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 857-897;
b) M. Shibasaki, N. Yoshikawa, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2187-2210.
- 3 a) <http://nobelprize.org/chemistry/laureates/2001/noyori-lecture.pdf>; R. Noyori, *Asymmetric Catalysis: Science and Opportunities*, Nobel Lecture, December 8, **2001**, (Mai 2005);
b) S. Akutagawa, *Appl. Catal. A-Gen.* **1995**, *128*, 171-207.
- 4 C. Rossini, L. Franzini, A. Raffaeli, P. Salvadori, *Synthesis* **1992**, 503-517.
- 5 K. Kamikawa, T. Watanabe, M. Uemura, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1375-1384.
- 6 a) G. Bringmann, M. Breuning, S. Tasler, *Synthesis* **1999**, 525-558;
b) G. Bringmann, J. Hinrichs, T. Pabst, P. Henschel, K. Peters, E.-M. Peters, *Synthesis* **2001**, 155-167.
- 7 G. Christie, J. Kenner, *J. Chem. Soc.* **1922**, *121*, 614-620.
- 8 R. Kuhn, *Molekulare Asymmetrie*; in: *Stereochemie*, K. Freudenberg (Ed.), Franz Deutike Verlag Leipzig-Wien, **1933**, 803-824.
- 9 E. L. Eliel, S. H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, Wiley & Sons New York, **1994**, Kapitel 14.
- 10 a) M. Oki, G. Yamamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1971**, *44*, 266;
b) M. Oki, *Top. Stereochem.* **1984**, *14*, 1-81.
- 11 G. Bringmann, C. Günther, M. Ochse, O. Schupp and S. Tasler, in *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, W. Herz, H. Falk, G. W. Kirby, R. E. Moore C. Tamm (Ed.), Springer Wien, **2001**, Band 82, (Stereochemie: S. 72-74).
- 12 www.iupac.org/reports/provisional/abstract04/BB-prs310305/Chapter9.pdf, *IUPAC Provisional Recommendations*, Preferred IUPAC Names, **2004**, Kapitel 9, S. 31-33, (Mai 2005).
- 13 a) R. Pschorr, *Chem. Ber.* **1896**, *29*, 496;
b) F. Ullmann, J. Bielecki, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 2174-2184;
c) H. Musso, *Phenol coupling*, in: W. I. Taylor, A. R. Battersby (Ed.), *Oxidative coupling of phenols*, Marcel Dekker New York, **1967**, S. 1-94 und Ref. darin.
- 14 Übersichtsartikel zum Thema Aromatenkupplung:
Allgemeine Übersichten:
a) J. Hassan, M. Sévignon, C. Gozzi, E. Schulz, M. Lemaire, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1359-1496;
b) G. Bringmann, R. Walter, R. Weirich, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1006-1019;
c) M. Sainsbury, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3327-3359.
Übergangsmetall-katalysierte Kupplungen:
d) S. P. Stanforth, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 263-303.
Oxidative Phenolkupplungen:

- e) S. Steenken, P. Neta, *Transient phenoxy radicals: Formation and properties in aqueous solution*; und S. Yamamura, *Oxidation of phenols*; in: Z. Rappoport (Ed.): *The Chemistry of Phenols*, John Wiley & Sons, **2003**, Kap. 16 und 17, S. 1107-1346;
- f) D. A. Whiting, *Oxidative Coupling of Phenols and Phenol Ethers*; in: B. M. Trost (Ed.), *Comprehensive Organic Synthesis: Selectivity, Strategy, and Efficiency in Modern Organic Chemistry. Carbon-Carbon σ -Bond formation*, Vol. 3, Pergamon Press, New York, **1991**, S. 659-703 und Ref. darin;
- g) Anodische Oxidationen: S. Yamamura, S. Nishiyama, *Synlett* **2001**, 533-543; sowie Ref. [14e, f].
- h) Hypervalente Iodverbindungen: T. Wirth, *Angew. Chem.*, publiziert online 12. 4. **2005**; sowie Ref. [14e].
- 15 a) Eisen: I. Sapountzis, W. Lin, C. C. Kofink, C. Despotopoulou, P. Knochel, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1682-1685; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1654-1658;
- b) Cobalt: T. J. Korn, P. Knochel, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3007-3010; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2947-2951.
- 16 J. Jin, M. P. Rainka, X.-X. Zhang, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *124*, 1162-1163.
- 17 J. E. Milne, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13028-13032.
- 18 K. Tamao, K. Sumitani, M. Kumada, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4374 - 4376.
- 19 a) E. I. Negishi, A. O. King, N. J. Okukado, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1821;
- b) E. I. Negishi, *Acc. Chem. Res.* **1982**, *15*, 340-348.
- 20 D. Milstein, J. K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4992-4998.
- 21 N. Miyaoura, T. Yanagi, A. Suzuki, *Synth. Commun.* **1981**, *11*, 513-519.
- 22 *ortho-ortho* und *para-para* gekuppelte Dimere von 1-Naphthol: H. Danin, *Chem. Ber.* **1873**, *6*, 1252; siehe auch Zitate in [13c, 14f].
- 23 R. Pummerer, H. Puttfarcken, P. Schopflocher, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1925**, *58*, 1808-1810.
- 24 D. H. R. Barton, A. M. Deflorin, O. E. Edwards, *J. Chem. Soc.* **1956**, 530-534.
- 25 P. D. McDonald, G. A. Hamilton, *Mechanisms of Phenolic Oxidative Coupling Reactions*; in: *Oxidation in Organic Chemistry*, W. S. Trahanovsky (Ed.), Academic Press London, **1973**, S. 97-134.
- 26 a) D. Drochner, *Untersuchungen zur Biosynthese von Biaryl-naturstoffen in dem filamentösen Pilz Penicillium citreo-viride*, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **2003**;
- b) Eine Einführung zur CD- und FDCD-Spektroskopie befindet sich in derselben Arbeit, Kap. 5.4, S. 102-123.
- 27 G. J. Gant, A. I. Meyers, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2297-2360.
- 28 K. Kamikawa, M. Uemura, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6359-6362.
- 29 G. Wittig, G. Piper, G. Fuhrmann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1940**, *73*, 1193.
- 30 R. Huisgen, H. Rist, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1955**, *594*, 137.
- 31 Eine neuere Arbeit zu dem Thema: F. Leroux, M. Schlosser, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4447-4450.
- 32 a) R. J. Kazlauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4953-4959;
- b) T. Matsumoto, T. Konegawa, T. Nakamura, K. Suzuki, *Synlett* **2002**, 122-124.
- 33 K. Kamikawa, T. Watanabe, M. Uemura, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1375-1384.
- 34 B. H. Lipshutz, F. Kaiser, Z.-P. Liu, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1962-1964; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1842-1844.

- 35 a) K. S. Feldman, S. M. Ensel, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3357-3366;
b) S. Quideau, K. S. Feldman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 475-503.
- 36 D. Dai, O. R. Martin, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7628-7635.
- 37 a) D. A. Evans, M. R. Wood, B. W. Trotter, T. I. Richardson, J. C. Barrow, J. L. Katz, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2864-2868; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2700-2704;
b) D. A. Evans, C. J. Dinsmore, P. S. Watson, M. R. Wood, B. W. Trotter, T. I. Richardson, J. L. Katz, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2864-2868; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2704-2708;
- 38 a) M. Smrčina, J. Poláková, Š. Vyskočil, P. Kočovský, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4534-4538;
b) T. Temma, S. Habaue, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5655-5657;
c) M. Nakajima, I. Miyoshi, K. Kanayama, S-i. Hashimoto, M. Noji, K. Koga, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2264-2271;
d) K. H. Kim, D.-W. Lee, Y.-S. Lee, D.-H. Ko, D.-C. Ha, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 9037-9042;
e) X. Li, J. Yang, M. C. Kozłowski, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1137-1140;
f) Binaphthol Polymere: X. Xie, P.-W. Phuan, M. C. Kozłowski, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2218-2220; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *43*, 2168-2170.
- 39 a) C.-Y. Chu, D.-R. Hwang, S.-K. Wang, B.-J. Uang, *Chem. Commun.* **2001**, 980-981;
b) S.-W. Hon, C.-H. Li, J.-H. Kuo, N. B. Barhate, Y.-H. Liu, Y. Wang, C.-T. Chen, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 869-872;
c) N. B. Barhate, C.-T. Chen, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2529-2532;
f) Z. Luo, Q. Liu, L. Gong, X. Cui, A. Mi, Y. Jiang, *Chem. Commun.* **2002**, 914-915; siehe auch: Z. Luo, Q. Liu, L. Gong, X. Cui, A. Mi, Y. Jiang, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4714-4717; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4532-4535; sowie C.-Y. Chu, B.-J. Uang, *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, *14*, 53-55.
- 40 R. Irie, K. Masutani, T. Katsuki, *Synlett* **2000**, 1433-1436.
- 41 T. Osa, Y. Kashiwagi, Y. Yanagisawa, J. M. Bobbitt, *Chem. Commun.* **1994**, 2535-2537.
- 42 M. Takemoto, Y. Suzuki, K. Tanaka, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8499-8501.
- 43 E. Bourquelot, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. C*, **1896**, *123*, 317.
- 44 M. Sridhar, S. K. Vadivel, U. T. Bhalearo, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5695-5696.
- 45 M. M. Schmitt, E. Schuler, M. Braun, D. Haring, P. Schreier, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2945-2946.
- 46 a) S. Ciecholewski, E. Hammer, K. Manda, G. Bose, V. T. H. Nguyen, P. Langer, F. Schauer, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4615-4619 und Ref. darin;
b) S. Nicotra, A. Intra, G. Ottolina, S. Riva, B. Danieli, *Tetrahedron Asymmetry*, **2004**, *15*, 2927-2931.
- 47 S. Antoniotti, L. Santhanam, D. Ahuja, M. G. Hogg, J. S. Dordick, *Organic Lett.* **2004**, *6*, 1975-1978.
- 48 D. H. R. Barton, T. Cohen, *Festschrift Prof. A. Stoll zum siebzigsten Geburtstag*, Birkhäuser, Basel, **1957**.
- 49 Salutaridin, Morphin:
a) T. Amann, M. H. Zenk, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3675-3678;
b) R. Gerardy, M. H. Zenk, *Phytochemistry* **1993**, *32*, 79-86;
c) T. A. P. H. Roos, H. Huh, M. H. Zenk, *Heterocycles* **1995**, *40*, 425-440.
- Berbamunin:
d) M. H. Zenk, R. Gerardy, R. Stadler, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1989**, 1725-1727;

- e) R. Stadler, M. H. Zenk, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 823-831.
- Isoandrocymin, Colchicin:
- f) U. H. Maier, M. H. Zenk, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7357-7360;
- g) E. McDonald, R. Ramage, R. N. Woodhouse, E. W. Underhill, L. R. Wetter, A. R. Battersby, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 2979-2987.
- Lunarin:
- h) S. Sagner, Z.-W. Shen, B. Deus-Neumann, M. H. Zenk, *Phytochemistry* **1998**, 47, 375-387;
- i) L. Nezbedová, M. Hesse, K. Drandarov, C. Werner, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 7859-7862;
- j) L. Nezbedová, M. Hesse, K. Drandarov, L. Bigler, C. Werner, *Planta* **2001**, 213, 411-417.
- Michellamin:
- k) J. Schlauer, M. Rückert, B. Wiesen, M. Herderich, L. Ake Assi, R. D. Haller, S. Bär, K.-U. Fröhlich, G. Bringmann, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, 350, 87-94.
- Tellimagrandin II:
- l) R. Niemetz, G. Schilling, G. G. Gross, *Chem. Commun.* **2001**, 35-36.
- 50 a) I. Fujii, H. Iijima, S. Tsukita, Y. Ebizuka, U. Sankawa, *J. Biochem.* **1987**, 101, 11-18;
- b) I. Fujii, Z. G. Chen, Y. Ebizuka, U. Sankawa, *Biochem. Int.* **1991**, 25, 1043-1049;
- c) I. Fujii, Y. Ebizuka, U. Sankawa, *J. Biochem.* **1988**, 103, 878-883;
- d) Z. G. Chen, I. Fujii, Y. Ebizuka, U. Sankawa, *Phytochemistry* **1995**, 38, 373-380;
- e) Z. G. Chen, I. Fujii, Y. Ebizuka, U. Sankawa, *Arch. Microbiol.* **1992**, 158, 29-34.
- 51 K.-X. Huang, I. Fujii, Y. Ebizuka, K. Gomi, U. Sankawa, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 21495-21502.
- 52 Übersichten zur Biosynthese von Actinorhodin:
- a) D. A. Hopwood, D. H. Sherman, *Annu. Rev. Genet.* **1990**, 24, 37-67;
- b) D. A. Hopwood, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 2465-2497;
- c) B. J. Rawlings, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 425-484.
- 53 F. Malpartida, D. A. Hopwood, *Nature* **1984**, 309, 462-464.
- 54 Zur Klassifizierung von Polyketidsynthasen siehe z. B.: B. Shen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 285-295.
- 55 a) S. P. Cole, B. A. Rudd, D. A. Hopwood, J. C. Chang, H. G. Floss, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1987**, 40, 340-347;
- b) J. L. Callabaro, E. Martinez, F. Malpartida, D. A. Hopwood, *Mol. Gen. Genet.* **1991**, 230, 401-412.
- 56 J. Valton, L. Filisetti, M. Fontecave, V. Nivière, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 44362-44369.
- 57 1) Die Autoren [56] geben an 1,5-Dihydroanthrachinon DHAQ als Substrat eingesetzt zu haben. Die angegebene Strukturformel zeigt aber 1,5-Dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-anthrachinon (**36**). Die für **36** angegebene Masse $m/z = 239$, die auch im Spektrum als Hauptpeak gemessen wurde, entspricht keiner der beiden möglichen Strukturen. (**36**: $m/z = 244$; DHAQ: $m/z = 210$). Allein die Differenz zum Substratpeak von 16 Masseneinheiten (= O) deutet auf eine Oxidation hin.
- 58 S. Shibata, E. Morishita, T. Tadeka, K. Sakata, *Tetrahedron Lett.* **1966**, 40, 4855-4860.
- 59 S. Malz, M. N. Grell, C. Thrane, F. J. Maier, P. Rosager, A. Felk, K. S. Albertsen, S. Salomon, L. Bohn, W. Schäfer, H. Giese, *Fungal Genet. Biol.* **2005**, 42, 420-433.

- 60 Das Polyketidsynthase-Gen PKS12 wurde bereits vorher in einer phylogenomischen Studie *in silico* identifiziert. S. Kroken, N. L. Glass, John W. Taylor, O. C. Yoder, B. G. Turgeon, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 15670-15675.
- 61 Erläuterung einiger mycologischer Fachausdrücke:
Teleomorph - Anamorph - Holomorph
 Pilze werden nach ihren Strukturen zur geschlechtlichen Fortpflanzung, den **Teleomorphen**, klassifiziert. Viele Stämme bilden allerdings keine Teleomorphe aus. Die Klassifizierung erfolgt dann nach ungeschlechtlichen Fortpflanzungsstrukturen, den **Anamorphen** (z. B. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*). Anamorph und Teleomorph zusammen werden als **Holomorph** bezeichnet. Diese Einteilung hat zur Folge, dass viele Pilzarten über zwei Namen verfügen, je nachdem ob ein Stamm Teleomorphe ausbildet oder nicht. *Gibberellae zae* bezeichnet zum Beispiel einen Holomorph mit Ascosporen und Konidien. *Fusarium graminearum* entspricht einem *G. zae*-Stamm, der nur Konidien ausbildet.^a
Ascosporen: Sporen der *Ascomycetes* bei geschlechtlicher Fortpflanzung.^a
Konidien: Sporen aus ungeschlechtlicher Fortpflanzung.^a
Sklerotien: durch eine derbe Rindenschicht geschützte Strukturen aus Myzel, die der Überdauerung, teilweise auch der vegetativen und Nährstoffspeicherung dienen.^b
Ascostromata: Sammelfruchtkörper, fruchtkörperartige Strukturen aus Myzel der *Ascomycetes*, in denen die eigentlichen Fruchtkörperchen der geschlechtlichen Fortpflanzung, die **Ascoma**, gebildet werden. Bei *Petromyces alliaceus* werden Ascostomata aus Sklerotien gebildet.^b
 a) <http://www.botany.utoronto.ca/ResearchLabs/MallochLab/Malloch/Moulds/Moulds.html>, Online Ausgabe 1997 von: D. Malloch, *Moulds, Isolation, Cultivation, Identification*, University of Toronto Press **1981**, Kanada, (Mai 2005);
 b) H. Dörfelt, G. Jetschke (Ed.), *Wörterbuch der Mycologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg / Berlin, 2. Auflage **2001**.
- 62 J.-E. Kim, K.-H. Han, J. Jin, H. Kim, J.-C. Kim, S.-H. Yun, Y.-W. Lee, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1701-1708.
- 63 <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fusarium/index.html>, *Fusarium graminearum* Database, Broad Institute, Cambridge (MA), USA, (Mai 2005).
- 64 K. Freudenberg, *Science* **1965**, *148*, 595-600.
- 65 L. B. Davin, H.-B. Wang, A. Crowell, D. L. Bedgar, D. M. Martin, S. Sarkanen, N. G. Lewis, *Science* **1997**, *275*, 362-366.
- 66 D. R. Gang, M. A. Costa, M. Fujita, A. T. Dinkova-Kostova, H.-W. Wang, V. Burlat, W. Martin, S. Sarkanen, L. B. Davin, N. G. Lewis, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 143-151.
- 67 S. C. Halls, L. D. Davin, D. M. Kramer, N. G. Lewis, *Biochem.* **2004**, *43*, 2587-2595.
- 68 S.C. Halls, N. G. Lewis, *Biochem.* **2002**, *41*, 9455-9461.
- 69 S. Kitanaka, M. Takido, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 2588-2590.
- 70 S. Kitanaka, M. Takido, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 1292-1294.
- 71 a) M. Gill, *Nat. Prod. Rep.* **1994**, *11*, 67;
 b) M. Gill, *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13*, 513-528;

- c) M. Gill, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 301-317.
- 72 M. Müller, K. Lamottke, W. Steglich, S. Busemann, M. Reichert, G. Bringmann, P. Spiteller, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4850-4855, und Referenzen darin.
- 73 S. Bode, *Dissertation*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, in Vorbereitung.
- 74 Zur Entstehung metabolischer Diversität siehe auch:
- a) R. D. Finn, C. G. Jones, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 3882-391.
- b) M. Müller, *Curr. Opin. Biotech.* **2004**, *15*, 591-598.
- 75 zum Beispiel: DSM Food Specialties, Delft, Niederlande.
- 76 Wegen der zahlreichen Risikofaktoren, zum Beispiel geringe Proteinkonzentrationen, ungeeignete Pufferung, Membranständigkeit der Proteine und geringe Löslichkeit der Substrate in wässriger Lösung, wurde dieser Ansatz nach einem ersten, negativ verlaufenem Versuch nicht weiter verfolgt.
- 77 P. Venturella, A. Bellino, F. Piozzi, *Tetrahedron Lett.* **1974**, *12*, 979-981.
- 78 S. Iguchi, N. Utsugi, *J. Pharm. Soc.* **1953**, *73*, 1292.
- 79 a) G. Büchi, D. H. Klaubert, R. C. Shank, S. M. Weinreb, G. N. Wogan, *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 1143-1147; der extrahierte Pilz wurde fälschlicherweise als *A. glaucus* klassifiziert. Die Korrektur erfolgte in:
- b) G. Büchi, K. C. Luk, B. Kobbe, J. M. Townsend, *J. Org. Chem.* **1977**, *2*, 244-246;
- c) *A. clavatus* Stamm MIT-M-18: MIT = Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts, USA; Eintrag in einer registrierten Datenbank nicht ermittelbar.
- 80 K. Hoesch, *Chem. Ber.* **1915**, *48*, 1122-1133.
- 81 D. C. Dittmer, Q. Li, D. V. Avilov, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4682-4686.
- 82 G.-Q. Lin, M. Zhong, *Tetrahedron Asymm.* **1997**, *8*, 1369-1372.
- 83 G.-Q. Lin, M. Zhong, *Huaxue Xuebao* (= *Acta Chim. Sinica*) **1997**, *55*, 97-101.
- 84 G. Q. Lin, M. Zhong, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3015-3018.
- 85 a) T. D. Nelson, A. I. Meyers, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2577-2580;
- b) T. D. Nelson, A. I. Meyers, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2655-2658.
- 86 H. Musso, W. Steckelberg, *Chem. Ber.* **1968**, *101*, 1510-1518.
- 87 G. Bringmann, R. Walter, C. L. J. Ewers, *Synlett* **1991**, 581-583.
- 88 G. Bringmann, D. Menche, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 615-624.
- 89 G. Bringmann, J. Hinrichs, P. Henschel, J. Kraus, K. Peters, E.-M. Peters, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1096-1106.
- 90 M. A. Rizzacasa, M. V. Sargent, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1988**, 2425-2428.
- 91 a) R. V. Rekha, M. V. Sargent, *Chem. Commun.* **1998**, 2713-2714;
- b) R. W. Baker, R. V. Kyasnoor, M. V. Sargent, B.W. Skelton, A. H. White, *Aust. J. Chem.* **2000**, *53*, 487-506.
- 92 Drehwerte: *M-118*: $[\alpha]_D^{20} = -53.0$; *P-118*: $[\alpha]_D^{20} = +34.0$.
- 93 J. Chiarello, M. M. Joullie, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 41-48.
- 94 D. Drochner, mündliche Mitteilung.
- 95 a) D. Drochner, W. Hüttel, M. Nieger, M. Müller, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 961-963; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 931-933;

- b) D. Drochner, U. Karl, M. Nieger, M. Müller, W. Steglich, *Chem. Eur. J.*, Manuskript in Vorbereitung.
- 96 a) T. C. Jemty, L. L. Miller, Y. Mazur, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 751-752;
b) H.-Y. Li, T. Nehira, M. Hagiwara, N. Harada, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7222-7227.
- 97 R. S. Long, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 990-995.
- 98 F. Bruni, S. Selleri, A. Constanzo, G. Guerini, G. Ciciani, *Farmaco* **1997**, *52*, 639-644.
- 99 P. Seneci, M. Nicola, M. Inglesi, E. Vanotti, G. Resnati, *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 311-342.
- 100 F. Eiden, J. Schünemann, *Arch. Pharm.* **1985**, *318*, 1096-1100.
- 101 A. I. Eby, R. Hauser, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 723-725.
- 102 E. B. Sjogren, M. A. Rider, P. H. Nelson, S. Bingham, A. L. Poulton, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3295-3301.
- 103 J. A. Turner, W. S. Jacks, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4229-4231.
- 104 Erstmals beschrieben in: a) D. N. Crouse, D. Seebach, *Chem. Ber.* **1968**, *101*, 3113-3121;
b) E. M. Kaiser, C. R. Hauser, *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 3402-3404.
- 105 A. K. Grupta, H. Ila, H. Junjappa, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 2561-2572.
- 106 V. Szabo, J. Borda, E. Theisz, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1980**, *103*, 271-279.
- 107 W. Basinski, *Polish J. Chem.* **1995**, *69*, 376-384.
- 108 M. Nieger, Zentralanalytik der chemischen Institute der Universität Bonn. Siehe auch Angaben im Experimentellen Teil.
- 109 J. Morris, G. P. Luke, G. Donn, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3218-3220.
- 110 a) Die *O*-Methylierung des Dihydroxycumarins **60** mit konz. Salzsäure / Methanol (Rückfluss, 50 % Ausbeute) wird auch beschrieben in: V. K. Ahluwalia, D. Kumar, *Ind. J. Chem.* **1976**, *14B*, 589-591;
b) *O*-Methylierung ähnlicher Cumarine mit gleicher Methode: Y. Fall, L. Santana, E. Uriarte, *J. Heterocyclic Chem.* **2001**, *38*, 1231-1232.
- 111 E. Suzuki, B. Katsuragawa, S. Inoue, *Synthesis* **1978**, 144-146.
- 112 Mündl. Mitteilung D. Drochner; eigene Versuche zur oxidativen Phenolkupplung von **121** mit Eisen(III)-chlorid in Lösungsmittel und an Kieselgel ergaben ebenfalls keine Kupplungsprodukte in nachweisbarer Menge.
- 113 G. J. Kempermann, T. A. Roeters, P. W. Hilbrink, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1681-1686.
- 114 G. Rücker, M. Neugebauer, G. G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, Wissenschaftliche Verlagshandlung mbH Stuttgart, 2. Auflage **1992**, S. 250-251.
- 115 G. Snatzke, *Circular Dichroism: An Introduction in Circular Dichroism* (Ed.: K. Nakanishi, N. Berova, R. W. Woody), VCH, Weinheim, New York, **1994**, S. 1-38.
- 116 a) J. P. Goddard, J.-L. Reymond, *Curr. Opin. Biotech.* **2004**, *15*, 314-322 und Ref. darin;
b) F. Badalassi, D. Wahler, G. Klein, P. Crotti, J.-L. Reymond, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 3211-3228;
c) D. Wahler, F. Badalassi, P. Crotti, J.-L. Reymond, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4233-4236.
- 117 J.-Q. Dong, A. Wada, T. Takakuwa, K. Nakanishi, N. Berova, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12024-12025.
- 118 A. G. González, B. M. Fraga, M. G. Hernández, J. G. Luis, *Phytochem.* **1972**, *11*, 2115-2016.
Die fehlerhaft beschriebene Struktur wurde später durch VENTURELLA *et al.* korrigiert [77].
- 119 K. K Chexal, C. Fouweather, J. S. E. Holker, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1974**, 554-556;

- IMI: The Genetic Resource Collection, CABI BIOSCIENCE UK CENTRE (Egham, Großbritannien), ehem. IMI. Der Stamm IMI 53749 wird dort allerdings nicht aufgeführt.
- 120 H. G. Cutler, F. G. Crumley, R. H. Cox, O. Hernandez, R. J. Cole, J. W. Dorner, *J. Agric. Food. Chem.* **1979**, *27*, 592-595.
- 121 M. R. PeTaske, J. B. Gloer, D. T. Wicklow, P. F. Dowd, *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1080-1086.
- 122 J. A. Laakso, E. D. Narske, J. B. Gloer, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 128-133.
- 123 K. Nozawa, S. Nakajima, K.-I. Kawai, S.-I. Udagawa, M. Miyaji, *Phytochem.* **1994**, *35*, 1049-1051.
Petromyces alliaceus FA 0030: Eintrag in einer registrierten Datenbank nicht ermittelbar.
- 124 R. A. Samson, J. A. M. P. Houbraken, A. F. A. Kuijpers, J. M. Frank, J. C. Frisvad, *Stud. Mycol.* **2004**, *50*, 45-61.
- 125 L. Pařenicová, P. Skouboe, J. Frisvad, R. A. Samson, L. Rossen, M. ten Hoor-Suykerbuyk, J. Visser, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 521-527.
- 126 IBT = IBT Culture Collection of Fungi, Mycology Group, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark.
Lit.: K. F. Nielsen, S. Gravesen, P. A. Nielsen, B. Andersen, U. Thrane, J. C. Frisvad, *Mycopathologia* **1999**, *145*, 43-56.
- 127 In vier weiteren Stämmen von *A. ustus* konnten keine Bicumarine identifiziert werden.
- 128 J. Hiort, *Neue Naturstoffe aus schwamm-assoziierten Pilzen des Mittelmeeres - Isolierung, Struktur-aufklärung und Evaluierung der biologischen Aktivität*, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2002**. Für *A. niger* (E99/3-341) ist noch kein Eintrag in einer registrierten Datenbank bekannt.
- 129 K. Nozawa, H. Seye, S. Nakajima, S.-I. Udagawa, K.-I. Kawai, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 1735-1738.
- 130 R. D. Lapper, *Tetrahedron Lett.* **1974**, *15*, 4293-4296.
- 131 W. B. Turner, *Fungal Metabolites*, Academic Press, London, **1971**, S. 198.
- 132 J. B. Stothers, A. Stoessl, *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 2816-2818.
- 133 U. Matern, P. Lüer, D. Keusch, *Biosynthesis of Coumarins*, in: *Polyketides and other Secondary Metabolites including Fatty Acids and their derivatives*, U. Sankava (Ed.), *Comprehensive Natural Products Chemistry* **1999**, *1*, 623-637.
- 134 T. Inoue, T. Toyonaga, S. Nagumo, M. Nagai, *Phytochem.* **1989**, *28*, 2329-2330.
- 135 H. Chen, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 301-312.
- 136 a) http://www.dsm.com/en_US/html/dfs/genomics_aniger.htm, Genomics: *Aspergillus niger*, DSM Food Specialties, Delft, Niederlande (Mai 2005).
b) P. W. M. van Dijck, G. C. M. Selten, R. A. Hempenius, *Reg. Toxicol. Pharmacol.* **2003**, *38*, 27-35.
- 137 Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA), TRBA 310, Arbeitsmedizinische Vorsorge nach Anhang VI Gentechnik-Sicherheitsverordnung, BArbBl. 7-8/97, S. 87, 1. Ergänzung: BArbBl. 3/98, S. 67.
- 138 Eine Verknüpfung von Sporulation und Sekundärmetabolitproduktion wird bei Pilzen häufig beobachtet. Vgl.: A. M. Calvo, R. A. Wilson, J. W. Bok, N. P. Keller, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 447-459.
- 139 K. A. Kumar, B. S. V. Kumar, B. Laxminarayana, S. Anathanarayanan, *Stud. Surf. Sci. Catal.* **1998**, *113*, 541-546.

- 140 H. Kasahara, M. Miyazawa, H. Kameoka, *Phytochem.* **1997**, *44*, 1479-1482.
- 141 Bei "3014" handelt es sich um einen Uridin-auxotrophen Stamm aus der Abteilung Prof. Brakhage, Institut für Mikrobiologie, Universität Hannover. Die ursprüngliche Quelle konnte nicht ermittelt werden.
- 142 Die Stämme wurden von Prof. Brakhage, Institut für Mikrobiologie, Universität Hannover, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
- 143 *Aspergillus niger* mutants, <http://www.fgsc.net/niger.html>, Fungal Genetics Stock Center, School of Biological Sciences, University of Missouri, Kansas City, USA, (Mai 2005).
- 144 <http://www.gla.ac.uk/Acad/IBLS/molgen/aspergillus/>, *The Aspergillus nidulans Linkage Map, Linkage Data, Maps, Locus Lists, Strainlist and Annual Bibliography*, Compiled by John Clutterbuck, Division of Molecular Genetics, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow, UK, (Mai 2005).
- 145 <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>, *Aspergillus nidulans Database*, Broad Institute, Cambridge, MA, USA, (Mai 2005).
- 146 <http://www.fgsc.net/>, *Fungal Genetics Stock Center*, Übersicht über Mutanten und Wildstämme, Links zu zahlreichen weiteren Informationsquellen, School of Biological Sciences, University of Missouri, Kansas City, USA, (Mai 2005).
- 147 A. A. Brakhage, K. Langenfelder, *Annu. Rev. Microbiol.* **2002**, *56*, 433-455 und Ref. darin.
- 148 a) http://www.sanger.ac.uk/Projects/A_fumigatus/, *Aspergillus fumigatus genome project*, Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, CB10 1SA, UK, (Mai 2005); in Kooperation mit:
b) <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/afu1/>, *The Aspergillus fumigatus Genome Database*, The Institute for Genomic Research, Rockville, MD, USA, (Mai 2005).
- 149 Die Arbeiten wurden in weiten Teilen analog zur Konstruktion einer Cosmidbank von *Aspergillus fumigatus* durchgeführt. H. Geringer (A. Brakhage), *Molekulargenetische Untersuchungen an dem opportunistisch humanpathogenen Pilz Aspergillus fumigatus*, Diplomarbeit, **1997**, Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl für Mikrobiologie.
- 150 T. A. Brown, *Gentechnologie für Einsteiger*, Spektrum Akademischer Verlag, 3. Auflage **2002**, Heidelberg u. Berlin, S. 138-140.
- 151 H. D. Osiewacz, *Curr. Genet.* **1994**, *26*, 87-90.
- 152 P. J. Punt, R. J. Dingenmansee, P. H. Pouwels, C. A. M. J. J. van den Hondel, *Gene* **1987**, *56*, 117-124.
- 153 R. C. Ullrich, B. D. Kohorn, C. A. Specht, *Chromosoma* **1980**, *81*, 371-378.
- 154 Kokatamere: längere lineare DNA-Einheiten mit sich wiederholenden, identischen Sequenzabschnitten wie zum Beispiel cos-Einheiten.
- 155 a) F. P. Buxton, A. Radford, *Mol. Gen. Genet.* **1983**, *190*, 403-405;
b) Sequenz: S. F. Newbury, J. A. Glazebrook, A. Radford, *Gene* **1986**, *43*, 41-58.
- 156 a) D. J. Ballance, F. P. Buxton, G. Turner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *112*, 284-289;
b) D. J. Ballance, G. Turner, *Gene* **1985**, *36*, 321-331.
- 157 J. Jadoun, Y. Shadchan, N. Osherov, *Curr. Genet.* **2004**, *45*, 235-241.
- 158 Dieser wurde durch Herausschneiden von *pyr4* aus pXEP7 über *EcoRI-PstI*-Restriktion und Ligation in den Klonierungsvektor pBluescript® II KS (+) (STRATAGENE) erhalten.

- Zu pXEP7: A. A. Brakhage, P. Browne, G. Turner, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 3789-3799.
- 159 a) B. A. Pfeifer, C. Khosla, *Microbiol. Biol. Rev.* **2001**, 106-118.
b) G. S. Sidhu, *Eur. J. Plant Pathol.* **2002**, *108*, 705-711.
- 160 a) L. E. Bingle, T. J. Simpson, C. M. Lazarus, *Fungal Genet. Biol.* **1999**, *26*, 209-223.
b) T. Lee, S. I. Yun, K.T. Hodge, R. A. Humber, S. B. Krasnoff, G. B. Turgeon, O. C. Yoder, D. M. Gibson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56*, 181-187.
c) T. P. Nicholson, B. A. M. Rudd, M. Dawson, C. M. Lazarus, T. J. Simpson, R. J. Cox, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 157-158.
- 161 <http://www.ncbi.nih.gov/>, NCBI National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD (USA) (Juni 2005)
- 162 Von den zahlreichen "Hits" sind nur die ersten drei direkt mit einem Link zu dem entsprechenden Datenbankeintrag versehen. Bei allen anderen erscheint nur ein nicht weiter verwertbarer Bezeichnercode, wodurch die Einsicht in weitere Datensätze erheblich erschwert, beziehungsweise unmöglich wird. Um die Relevanz der übrigen "Hits" besser beurteilen zu können wurde die gleiche Suchmethode auch für die teilweise reduzierenden (PR) PKS, ausgehend von den Primern LC3 und LC5c,^{160a} durchgeführt. Typischerweise werden dabei PKS vom 6-MSAS-Typ (6-Methylsalicylsäure-Synthase) erhalten. Eine BLASTp-Suche in der *A. niger*-Datenbank und Vergleich mit den "Hits" der NR-PKS Suche ergab, dass mit Ausnahme der ersten 9 Treffer praktisch alle Gene der NR-Suche auch gute bis sehr gute Übereinstimmung mit PR-Genen haben. Tatsächlich finden sich hier – soweit einsehbar – vorwiegend PKS, die teilweise reduzierte Produkte synthetisieren. Die Zahl der möglicherweise für die Cumarinbiosynthese codierenden Gene lässt sich daher auf nicht mehr als acht einschränken.
- 163 J. R. S. Fincham, *Microbiol. Rev.* **1989**, *53*, 148-170.
- 164 a) D. H. Gems, I. L. Jonstone, A. J. Clutterbuck, *Gene* **1991**, *98*, 61-68.
b) D. H. Gems, A. J. Clutterbuck, *Curr. Genet.* **1993**, *24*, 520-524.
- 165 M. A. Moreno, C. Pascual, A. Gibello, S. Ferrer, C. J. Bos, A. J. M. Debets, G. Suarez, *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *124*, 35-41.
- 166 F. Fierro, K. Kosalkova, S. Gutierrez, J. F. Martin, *Curr. Genet.* **1996**, *29*, 482-489.
- 167 B. Bruckner, S. E. Unkles, K. Weltring, J. R. Kinghorn, *Curr. Genet.* **1992**, *22*, 313-316.
- 168 a) K. Langenfelder, B. Jahn, H. Geringer, A. Schmidt, G. Wanner, A. A. Brakhage, *Med. Microbiol. Immunol.* **1998**, *187*, 79-89.
b) J. R. Lucas, A. I. Dominguez, Y. Higuero, O. Martinez, B. Romero, *Arch. Microbiol.* **2001**, *176*, 106-113.
- 169 a) <http://clone/concordia.ca/aspergillus/protocols/nigtransf.html>, *Transformation of Aspergillus niger*, Concordia *Aspergillus niger* Group (P. Storms), Concordia University, Montreal, Quebec, Kanada, (Mai 2005);
b) Für Protoplastierung siehe auch: A. J. M. Debets, C. J. Bos, *Fungal. Genet. Biol.* **1986**, *33*, 24.
- 170 Eine Ursache für das Scheitern der Transformation trotz zweifacher Wiederholung des Experiments ist bisher nicht bekannt. Anzahl und Vitalität der Protoplasten wurden in Referenzversuchen ohne DNA und Selektionsmarker überprüft. Die Größe der Cosmide kann nicht als ausschlaggebender Grund angeführt

- werden, da ein Kontrollversuch mit dem Shuttle-Vektor pANsCos1 (11.6 kb) ebenfalls negativ verlief. Die für die Transformationen eingesetzte Menge Cosmid-DNA wurde von 5-20 µg variiert und entsprach damit den in der Literatur angegebenen Mengen oder lag deutlich darüber. Ein kritischer Punkt ist die Reinheit der DNA. Die Cosmide sollten weder mit chromosomaler DNA verunreinigt sein, noch darf der Puffer eine zu hohe Salzkonzentration enthalten um osmotischen Stress auf die Protoplasten zu vermeiden. Da wegen der oben beschriebenen Schwierigkeiten bei der Cosmidpräparation in einigen Fällen Aufreinigungsschritte vereinfacht wurden und Puffer sehr stark eingengt werden mussten, um für Transformationen geeignete DNA-Konzentrationen zu erhalten, waren diese Bedingungen nicht immer erfüllt. Dies erklärt aber nicht, warum Transformationen aus vorschriftsmäßigen Cosmidpräparationen ebenfalls fehlschlügen.
- 171 Eine aktuelle Übersicht bietet: V. Lakshmi Prabha, N. S. Puneekar, *Indian J. Biochem. Bio.* **2004**, *41*, 205-215.
- 172 K. Ozeki, F. Kyoya, K. Hizume, A. Kanda, M. Hamachi, Y. Nunokawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 2224-2227.
- 173 M. J. de Groot, P. Bundock, P. J. Hooykaas, A. G. Beijersbergen, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 839-842.
- 174 J. T. Kealey, L. Liu, D. V. Santi, M. C. Betlach, P. J. Barr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 505-509.
- 175 Die Kristallographischen Daten (Strukturfaktoren ausgenommen) wurden am Cambridge Crystallographic Data Centre unter der Publikationsnummer CCDC-215646 hinterlegt und sind erhältlich unter:
www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html (oder Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; Fax: +44-1223/336-033; e-Mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).
- 176 R. C. Ullrich, B. D. Kohorn, C. A. Specht, *Chromosoma* **1980**, *81*, 371-378.
- 177 A. A. Brakhage, mündliche Mitteilung.
- 178 J. M. van Lanen, M.B. Smith, US Patent 3,418,211, **24.12.1968**.
- 179 <http://www.fgsc.net/niger.html>, *A. niger mutants*, Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, USA, (Juni 2005).
- 180 R. A. Samson, J. Mouchacca, *Antonie van Leeuwenhoek* **1974**, *40*, 121-131.
- 181 E. Kafer, *Genetics* **1965**, *52*, 217-232.
- 182 P. A. Fantès, C. F. Roberts, *J. Gen. Microbiol.* **1973**, *77*, 471-486.
- 183 R. F. M. van Gorcom, P. H. Pouwels, T. Goosen, J. Visser, H. W. J. van den Broek, J. E. Hamer, W. E. Timberlake, C. A. M. J. J. van den Hondel, *Gene* **1985**, *40*, 99-106.
- 184 V. M. Hearn, D. W. Mackenzie, *Mykosen* **1980**, *23*, 549-562.
- 185 a) <http://www.aspergillus.man.ac.uk/indexhome.htm?homepagenew/mainindex.htm~main>, *Aspergillus fumigatus* isolate AF293 (NCPF 7367), *The Aspergillus Website*, Fungal Research Trust (Juni 2005).
- 186 D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557-580.
- 187 J. H. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbour Laboratory Press **1972**, New York, USA, S. 352-355.
- 188 a) G. Pontecorvo, J. A. Roper, L. M. Hemmons, K. D. MacDonald, A. W. J. Bufton, *Adv. Genet.* **1953**, *5*, 141-238;
b) A. A. Brakhage, J. Van den Brulle, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 2781-2788.