

Chemisch-molekularbiologische Studien
zu Pyransynthase-Domänen in
trans-AT-Polyketidsynthesen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Petra Karbaum

aus St. Annen

Bonn 2016

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

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jörn Piel
2. Prof. Dr. Andreas Gansäuer
3. Prof. Dr. Helmut Baltruschat
4. Prof. Dr. Gabriele M. König

Tag der Promotion: 03.06.2016

Erscheinungsjahr: 2016

Für meine Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. Jörn Piel angefertigt.

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Jörn Piel für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und für die interessante und anspruchsvolle Aufgabenstellung. Vielen Dank für die konstruktiven Ideen und Ratschläge, die eine erfolgreiche Durchführung ermöglichte. Außerdem möchte ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Ich danke den Professoren der Prüfungskommission für die Übernahme der Gutachten dieser Arbeit.

Ich danke Christoph Kohlhaas, René Richarz und Peter Karbaum für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Den Mitarbeitern der NMR-Abteilung, der Analytikabteilung der Massenspektrometrie und dem HPLC-Pool danke ich für die Vermessung und Aufreinigung der Substrate.

Ich bedanke mich bei dem gesamten AK Piel und AK Gulder für das angenehme Arbeitsklima, den regen Gedankenaustausch und die tolle Zusammenarbeit. Insbesondere gilt ein großer Dank meinen Exillaborkollegen Sarah Frank und Christoph Kohlhaas (Exillabor rulezzz!). Es war eine herrliche Zeit mit Euch, an die ich immer mit einem Schmunzeln zurückdenken werde. Ebenfalls bedanke ich mich bei dem AK Gansäuer für die Bereitstellung von Glasgeräten und Chemikalien, sowie einem Ehemann ;).

Weiterhin bedanke ich mich besonders bei meinen Kollegen Sarah Frank, Christoph Kohlhaas, Max Crüsemann, Frank Eggert, Fritzi Schäfers und René Richarz – meine liebenswerte Bagage - für viele einmalige Abende.

Ich danke Sarah Frank und Brandon Morinaka für die gute Zusammenarbeit an dem Pyransynthese-Projekt. Für die Durchführung der Cytotoxassays danke ich Frau Dr. Mihaela Gurgui. Für die Synthese eines Substrats bedanke ich mich bei der AG Kirschning. Ich danke der AG Piechulla für den Bakterienstamm *Serratia plymuthica* und Dr. Marco Kai (AG Piechulla) für die RT-Analysen des *Serratia plymuthica*-Genclusters. Weiterhin bedanke ich mich für die NMR-Messungen und -Analysen in Napoli bei Dr. Roberta Teta (AG Mangoni).

DANKSAGUNG

Vielen Dank an Dich, Peter. Für alles.

Ich danke den St. Annern und den Düsseldorfern für die Unterstützung und den Zusammenhalt, während all der Zeit und bin sehr froh, dass ich Euch habe.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	XII
Erläuterungen und Abkürzungen.....	XIII
Zusammenfassung.....	XVIII
Abstract.....	XXIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Polyketide.....	1
1.1.1 Biosynthese von Polyketiden.....	3
1.1.2 Klassifizierung von Polyketidsynthasen.....	6
1.2 Nichtribosomale Peptidsynthetasen.....	10
1.3 NRPS/PKS-Hybride.....	12
1.4 Biosynthesewege von Misakinolid A, Pederin und Psymberin mit putativer Pyransynthaseaktivität.....	13
1.4.1 Misakinolid A – Biosynthese.....	16
1.4.2 Pederin – Biosynthese.....	18
1.4.3 Psymberin – Biosynthese.....	21
1.5 Herkunft und Vorkommen der Bakteriengattungen <i>Serratia</i> - und <i>Dickeya</i>	22
1.5.1 Postulierte Biosynthese des Polyketids aus dem Biosyntheseweg von <i>S. plymuthica</i> 4Rx13 und <i>D. dadantii</i> Ech703.....	24
2 Zielsetzung.....	26
2.1 Untersuchung der PS-Domänen in <i>trans</i> -AT Polyketidsynthasen.....	26
2.2 Synthese von Substraten zur Untersuchung der Substratspezifität von KS- Domänen in der Misakinolidbiosynthese.....	31
2.3 Naturstoffextraktion von <i>Serratia plymuthica</i>	33
3 Ergebnisse und Diskussion.....	34
3.1 <i>In-vitro</i> -Studien zur Verifizierung der Pyransynthase-Aktivität in <i>trans</i> -AT- Polyketidsynthasen.....	34

3.1.1	Alignment und Klonierung von PS-Sequenzen und Expression der PS-Konstrukte	36
3.1.2	Synthese der Testsubstrate zur Untersuchung der Pyransynthaseaktivität.....	46
3.1.3	Aktivitätsassays und die Analyse der PS-Domänen mittels HPLC	58
3.1.3.1	Puffertest	59
3.1.3.2	HPLC-Untersuchungen der PS-Assays	59
3.2	Synthese von Substraten zur Untersuchung der KS Substratspezifität in der Misakinolidbiosynthese.....	74
3.3	Naturstoffextraktion von <i>Serratia plymuthica</i>	77
3.3.1	Oocydin A – Eigenschaften und Struktur	83
4	Material und Methoden.....	88
4.1	Molekularbiologischer Teil	88
4.1.1	Vektoren, Organismen und Primer	88
4.1.2	Zusätze und Medien	91
4.1.3	Kultivierung von Bakterien	93
4.1.4	Plasmidpräparation.....	93
4.1.5	Elektroporation von Plasmiden	94
4.1.6	Polymerase-Kettenreaktion	95
4.1.7	Agarose-Gelelektrophorese	96
4.1.8	Isolierung von DNA-Fragmenten	96
4.1.9	Desphosphorylierung.....	97
4.1.10	Ligation.....	97
4.1.11	Alignment und Sequenzierung.....	97
4.1.12	Restriktion	98
4.1.13	Proteinexpression, Proteinreinigung und Proteinanalytik	99
4.1.14	Naturstoffanalytik von <i>Serratia plymuthica</i>	104
4.2	Chemischer Teil	106
4.2.1	Arbeitsweise	106
4.2.2	Chemikalien und Lösungsmittel	106

4.2.3	Kernresonanzspektroskopie.....	106
4.2.4	Massenspektrometrie.....	106
4.2.5	Infrarotspektroskopie	107
4.2.6	Dünnschichtchromatographie	107
4.2.7	Säulenchromatographie.....	107
4.2.8	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	107
4.2.9	HPLC-HRMS	107
4.3	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV).....	108
4.3.1	AAV 1: Synthese der SNAC-Thioester mit EDC-HCl und HOBt als Kupplungsreagenzien	108
4.3.2	AAV 2: Basenkatalysierte Entschützung von Estern	108
4.3.3	AVV 3: Entschützung von Silylethern mit HF	108
4.4	Chemischer Teil.....	109
4.4.1	Pyran- und ζ -Hydroxy-abgeleitete Testsubstrate zur Analyse der PS Substratspezifität	109
4.4.2	Furan- und ϵ -Hydroxy-abgeleitete Testsubstrate zur Analyse der PS Substratspezifität	121
4.4.3	Substrate zur Analyse der Misakinolid KS 7 und KS 8 Substratspezifität	133
5	Literaturverzeichnis	141
6	Anhang.....	151
6.1	Alignment zur Bestimmung der PS-Sequenzen	151
6.2	Alignment von PS- und DH-Domänen	152
6.3	Vektorkarten.....	155
6.4	NMR-Spektren.....	156
6.4.1	NMR-Spektren Synthese	156
6.4.2	NMR-Spektren Naturstoffextraktion	194
6.5	LCMS-Daten.....	200
6.6	Biosynthese von Oocydin A (59a) nach Salmond	203
7	Publikationen.....	204

8	Selbstständigkeitserklärung.....	205
---	----------------------------------	-----

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiele von Polyketidwirkstoffen: Erythromycin (1), Bryostatin (2), Rapamycin (3), Amphotericin B (4) und Lovastatin (5).....	1
Abbildung 2: Beschreibung des „genome mining“-Ansatzes zur Entdeckung neuer Naturstoffe. .2	2
Abbildung 3: A) Bildung des Acyl-CoA Derivats 10 über die Aktivierung des Acylstarterbausteins 6; B) Starter- und Elongationseinheiten der FAS 11 und 12 und der PKS 11 – 17.	3
Abbildung 4: Posttranslationale Modifikation von ACP.	4
Abbildung 5: AT-katalysierte Beladung der <i>holo</i> -ACPs aufeinander folgender Module (ACP ₁ und ACP ₂) mit Starter- und Elongationseinheit 10 bzw. 12.....	4
Abbildung 6: KS-vermittelte Kondensationsreaktion zwischen Acyl- und Verlängerungsbaustein 5	
Abbildung 7: Reduktionszyklus für FAS und PKS.	5
Abbildung 8: Freisetzung des Polyketids durch eine TE.	6
Abbildung 9: Klassifizierung von PKS.	6
Abbildung 10: Beispiel der putativen Biosynthese von Lovastatin (5) durch iterative Typ-I PKS. .7	7
Abbildung 11: Biosynthese von Erythromycin A (1).	8
Abbildung 12: Pederin (27) und Leinamycin (28) als Beispiele für Polyketide, die durch <i>trans</i> -AT-PKS produziert werden.....	9
Abbildung 13: Daunorubicin (29)- und Doxorubicin (30)-vermittelte Typ II-PKS Biosynthese.	10
Abbildung 14: Typ III-PKS Biosynthese von Flaviolin (31).	10
Abbildung 15: Beispiele von NRP: Daptomycin (32), Penicillin G (33), Vancomycin (34).	11
Abbildung 16: A) A-Domänen katalysierte Aktivierung einer Aminosäure 35 unter ATP-Verbrauch (7) zum AMP-Derivat 36; B) Übertragung des AMP-Derivats 36 auf <i>holo</i> -PCP durch die A-Domäne.....	12
Abbildung 17: Peptidknüpfung zweier PCP-gebundenen Aminosäurebausteinen aufeinanderfolgender Module (PCP ₁ und PCP ₂).	12
Abbildung 18: Beispiele für NRP/PK-Hydrate Rapamycin (3), Epothilon A (37, R= H) bzw. B (38, R= CH ₃) und Bleomycin A ₂ (39).	13
Abbildung 19: Die Polyketide Misakinolid A (40), Pederin (27), Psymberin (41), Bryostatin (2) und Sorangicin (42) weisen als Strukturmerkmal Tetra- oder Dihydropyranreste auf, die wahrscheinlich durch eine Pyransynthese katalysiert werden.	14
Abbildung 20: Postulierte Bildung des Pyranrings am Beispiel der Pederin-PKS.	15
Abbildung 21: Postulierter Mechanismus der Bildung von (+)-Nonactat (44) und (-)-Nonactat <i>ent</i> -(44) katalysiert durch eine funktionell PS-ähnliche Domäne.	15
Abbildung 22: Marine Naturstoffe aus dem Steinschwamm <i>Theonella swinhoei</i> : Misakinolid A (40), Onnamid A (46) und Polytheonamid A (47) und B (48).	16
Abbildung 23: Putative Biosynthese von Misakinolid A (40).	17
Abbildung 24: Vertreter der Pederinfamilie: Pederin (27) und Psymberin (41).	18
Abbildung 25: Postulierter Biosyntheseweg von Pederin (27) durch ein PKS/NRPS Hybrid.....	19
Abbildung 26: PKS-NRPS-Hybrid Curacin A (51).	20

Abbildung 27: Mechanismus der β -Verzweigung in der Pederin- und Psymberinbiosynthese. ..	21
Abbildung 28: Postulierter Biosyntheseweg des Psymberins (41).	22
Abbildung 29: Postulierter <i>trans</i> -AT-PKS-Biosyntheseweg von <i>S. plymuthica</i> 4Rx13 und <i>D. dadantii</i> Ech703.	24
Abbildung 30: Putativer Mechanismus des Lademoduls aus der <i>trans</i> -AT-PKS von <i>S. plymuthica</i> 4Rx13 und <i>D. dadantii</i> Ech703.	25
Abbildung 31: Struktur von Oocydin A (59a).	26
Abbildung 32: Putativer Mechanismus der Bildung des Pyran- bzw. Furanrings.	27
Abbildung 33: Postulierte PS-katalysierte Ringschlussbildung der Testsubstrate des Typs X zu den Referenzsubstanzen des Typs Y.	27
Abbildung 34: Testsubstrate 60-73 für die Untersuchung der Pyransynthese-Aktivität aus den PKS von Pederin (27), Misakinolid A (40) und Psymberin (41).	28
Abbildung 35: Testsubstrate 74-85 für die Untersuchung der PS-Domäne aus dem Biosyntheseweg von Oocydin A (59a).	29
Abbildung 36: Retrosynthese der Pyran-abgeleiteten Testsubstrate 61-66.	29
Abbildung 37: Mögliche Syntheseroute des Thioesters 60.	30
Abbildung 38: Retrosynthese des SNAC-Thioesters 60.	30
Abbildung 39: Kurzkettensubstrate 97, 98 und <i>ent</i> -97, <i>ent</i> -98 zur Untersuchung der KS-Substratspezifität der Misakinolidbiosynthese.	31
Abbildung 40: Ausschnitt der Misakinolidbiosynthese für die Untersuchung der KS-Spezifität KS 7 und KS 8.	32
Abbildung 41: Retrosynthese der Diastereomere 97 und 98, sowie <i>ent</i> -97 und <i>ent</i> -98 zur Untersuchung der KS-Spezifität der Misakinolidbiosynthese.	33
Abbildung 42: Ausschnitte der <i>trans</i> -AT-PKS von Misakinolid A (40, MisF), Psymberin (41, PsyD), Pederin (27, PedF) und Oocydin A (59a, Ooc) mit den untersuchten PS-Domänen.	34
Abbildung 43: Vorgehensweise zur Überprüfung der Aktivität von PS-Domänen <i>in vitro</i>	35
Abbildung 44: Alignment von <i>trans</i> -AT-PKS mit der Modulabfolge KS-DH-PS-KR-ACP (OnnPS7-MisPS15, schwarz) und <i>trans</i> -AT-PKS mit der Modulabfolge KS-DH-KR-ACP (Ped-PSH1-Bry-PSB2, grün).	37
Abbildung 45: Phylogenetische Untersuchungen der Sequenzen von DH- und PS-Domänen. ..	37
Abbildung 46: Ausschnitte des Alignments der PS- und DH-Aminosäuresequenzen.	38
Abbildung 47: Agarosegel (1%) der PCR-Produkte für die PS-Domäne für Oocydin A (59a, A), Pederin (27, B), Misakinolid A (40, C) und Psymberin (41, D).	39
Abbildung 48: Restriktionsverdau mit <i>Apal</i> von pPP01 (A; 1528 bp/ 4710 bp) und pPP03 (B; 1473 bp/ 4710 bp) (Oocydin A-Plasmide).	41
Abbildung 49: Restriktionsverdau mit <i>XbaI</i> von pPP05 (A; 803bp/ 5398bp) und pPP07 (B; 761bp/ 5298 bp) (Pederin-Plasmide).	41
Abbildung 50: Restriktionsverdau mit <i>Apal</i> und <i>NcoI</i> von pPP09 (A; 1533 bp/ 4680 bp), pPP11 (B; 1503 bp/ 4608 bp) und pPP13 (C; 1503 bp/ 4680 bp) (Misakinolid-Plasmide).	42

Abbildung 51: Restriktionsverdau mit *Bgl*II von pPP015 (A; 462 bp/ 5611 bp) und pPP17 (B; 462 bp/ 5608 bp) (Psymberin-Plasmide)..... 42

Abbildung 52: SDS-PAGE-Gel der Expression mittels pPP02 (A) und pPP04 (B) mit den Inserts *ooc-PS1* und *ooc-PS2* 44

Abbildung 53: SDS-PAGE-Gel der Expression mittels pPP06 (A) und pPP08 (B) mit den Inserts *pedF-PS1* und *pedF-PS2*. 44

Abbildung 54: SDS-PAGE-Gel der Expression mittels pPP10 (A), pPP12 (B) und pPP14 (C) mit den Inserts *misF-PS1*, *misF-PS2* und *misF-PS3*. 45

Abbildung 55: SDS-PAGE-Gel der Expression mittels pPP16 (A) und pPP18 (B) mit den Inserts *psyD-PS1* und *psyD-PS2*. 45

Abbildung 56: SNAC-Thioester **107**, NAC (**108**) und CoA-gebundener Thioester **10**. 46

Abbildung 57: Beispiel der Testsubstrate des Typs **X** und **Y** zur Untersuchung der PS-Aktivität. 47

Abbildung 58: Darstellung der geschlossenen Testsubstrate **66-71**..... 49

Abbildung 59: Mechanismus der Doebner-Variante der Knoevenagel-Reaktion gegenüber der intramolekularen Ringschlussbildung. 50

Abbildung 60: Synthese des Ylens **88**..... 51

Abbildung 61: Darstellungsversuche von dem SNAC **60**. 52

Abbildung 62: Synthese des Methyl-SNACs **60**. 53

Abbildung 63: Allgemeiner Mechanismus der Wittig-Reaktion 54

Abbildung 64: Darstellung des Thioesters **72**..... 55

Abbildung 65: Synthese des Testsubstrates **73**. 55

Abbildung 66: Synthese der Furan-abgeleiteten Testsubstrate 56

Abbildung 67: A) Synthese der offenkettigen ϵ -Hydroxy-abgeleiteten Thioester **74** und **75**; B) Synthese der Ester- und Säurederivate **76-79**. 58

Abbildung 68: Puffertest am Beispiel von MisF-PS1..... 59

Abbildung 69: Erste Untersuchungen der einzelnen PS-Domänen. 60

Abbildung 70: HPLC-Untersuchung der Pederin-PS-katalysierten Reaktion mit dem primären Alkohol **61**. 62

Abbildung 71: HPLC-Untersuchung der PedF-PS2-katalysierten Reaktion mit dem sekundären Alkohol **60**. 63

Abbildung 72: 2D-NMR-NOESY-Auswertung von Signal I und II des Assays mit PedF-PS2 und dem Thioester **66**..... 64

Abbildung 73: Selektivitäten der PedF-PS2-katalysierten Reaktion. 64

Abbildung 74: HPLC-Untersuchung der PS-katalysierten Reaktion von Mis-PS1, Mis-PS2 und Mis-PS3 mit dem primären Thioester **72**. 66

Abbildung 75: HPLC-Untersuchung der PS-katalysierten Reaktion von Ooc-PS1 und Ooc-PS2 mit dem primären Thioester **81**..... 67

Abbildung 76: HPLC-Untersuchung der PS-katalysierten Reaktion von Ooc-PS1 und Ooc-PS2 mit dem sekundären Thioester **80**. 68

Abbildung 77: HPLC-Untersuchung des Assays von PedF-PS2 sowie MisF-PS2 mit der sekundären Säure 62	70
Abbildung 78: HPLC-Untersuchung des Assays von Ooc-PS1 sowie Ooc-PS2 und der sekundären Säure 76	71
Abbildung 79: HPLC-Untersuchung des Assays von PedF-PS2 mit dem sekundären Ester 64	72
Abbildung 80: HPLC-Untersuchung des Assays von Ooc-PS1 und dem primären Ester 79	72
Abbildung 81: HPLC-Untersuchung des Assays von MisF-PS1 und PedF-PS2 mit dem Keton 73	73
Abbildung 82: Inkubation von S-Crotonoyl-N-acetylcysteamin und KS 5 der Bacillaen-PKS.	74
Abbildung 83: Putative natürliche Intermediate der KS 7 und KS 8 der Misakinolidbiosynthese.	75
Abbildung 84: Synthese der SNAC-Testsubstrate 97 und 98 sowie <i>ent-97</i> und <i>ent-98</i> für die KS 7 und KS 8 innerhalb der Misakinolidbiosynthese.	76
Abbildung 85: Cytotoxizitätsassays des Rohextrakts von <i>S. plymuthica</i>	78
Abbildung 86: Graphische Auswertung der Cytotoxizitätstests des Rohextraktes von <i>S. plymuthica</i> und der säulenchromatographischen Fraktionen.....	79
Abbildung 87: Semipräparative Trennung des Zellextrakts von <i>S. plymuthica</i> bei 254 nm.	80
Abbildung 88: Auswertung der 2D-NMR-Spektren der Verbindung 137	81
Abbildung 89: Auswertung der HMBC-Daten mit verlängerter Messzeit der Verbindung 137	81
Abbildung 90: Putative Struktur von dem Naturstoff 137 und Zuordnung der Signale aus den NMR-Daten.	82
Abbildung 91: Struktur von Oocydin A (59a).....	83
Abbildung 92: Struktur der Haterumalide 59a-f und Biselide 59g-j	84
Abbildung 93: Putativer Biosyntheseweg von Oocydin A (59a) von Prof. Piel.	86
Abbildung 94: Verwendeter DNA-Marker.....	96
Abbildung 95: Proteinmarker der Firma <i>Roth</i> (links) und der Firma <i>Bio-Rad</i> (rechts).....	102
Abbildung 96: Alignments von <i>trans</i> -AT-PKS mit der Modulabfolge KS-DH-PS-KR-ACP (OnnPS7-MisPS15, schwarz) und <i>trans</i> -AT-PKS mit der Modulabfolge KS-DH-KR-ACP (Ped-PSH1-Bry-PSB2, grün)..	152
Abbildung 97: Alignment von PS- und DH-Aminosäuresequenzen.....	154
Abbildung 98: pET28b (-).....	155
Abbildung 99: pET29b (-).....	155
Abbildung 100: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Lactole 87a und 87b	156
Abbildung 101: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure <i>syn-68</i>	157
Abbildung 102: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters <i>syn-66</i>	157
Abbildung 103: ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters <i>syn-66</i>	158
Abbildung 104: ¹³ C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Ethylesters <i>syn-70</i>	158
Abbildung 105: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Lactols 90	159
Abbildung 106: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 69	159
Abbildung 107: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 71	160

Abbildung 108: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von dem Thioester 114	160
Abbildung 109: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von dem Wittig-Reagenz 88	161
Abbildung 110: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Esters 64	161
Abbildung 111: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 62	162
Abbildung 112: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Diols 91	162
Abbildung 113: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des zweifach geschützten Diols 92	163
Abbildung 114: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des einfach geschützten Diols 93	163
Abbildung 115: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Esters 94	164
Abbildung 116: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Esters 94	164
Abbildung 117: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 95	165
Abbildung 118: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 95	165
Abbildung 119: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des TBS-geschützten Thioesters 96	166
Abbildung 120: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des TBS-geschützten Thioesters 96	166
Abbildung 121: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 60	167
Abbildung 122: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 60	167
Abbildung 123: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 63	168
Abbildung 124: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 65	168
Abbildung 125: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Aldehyds 121	169
Abbildung 126: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Ketons 123	169
Abbildung 127: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Ketons 73	170
Abbildung 128: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Ketons 73	170
Abbildung 129: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 72	171
Abbildung 130: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Lactole 125a und 125b	171
Abbildung 131: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säuren 82a und 82b	172
Abbildung 132: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 80a	172
Abbildung 133: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 80a	173
Abbildung 134: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 80b	173
Abbildung 135: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 80b	174
Abbildung 136: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 85	174
Abbildung 137: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 81	175
Abbildung 138: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 81	175
Abbildung 139: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von dem Alkohol 133	176
Abbildung 140: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 134	176
Abbildung 141: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 135	177
Abbildung 142: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 136	177
Abbildung 143: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 136	178
Abbildung 144: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 75	178
Abbildung 145: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 79	179
Abbildung 146: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des <i>Bis</i> -TBS-Ethers 127	179
Abbildung 147: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkohols 128	180

Abbildung 148: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 129 .	180
Abbildung 149: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 130 .	181
Abbildung 150: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von 131 .	181
Abbildung 151: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) von 131 .	182
Abbildung 152: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 74 .	182
Abbildung 153: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 74 .	183
Abbildung 154: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 76 .	183
Abbildung 155: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 78 .	184
Abbildung 156: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von L-Valinol 100 .	184
Abbildung 157: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von dem cyclischen Produkt 102 .	185
Abbildung 158: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von dem cyclischen Produkt 103 .	185
Abbildung 159: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Imids 105a .	186
Abbildung 160: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Imids 105a .	186
Abbildung 161: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säuren 106a und 106b .	187
Abbildung 162: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 97 .	187
Abbildung 163: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 97 .	188
Abbildung 164: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 98 .	188
Abbildung 165: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 98 .	189
Abbildung 166: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von D-Valinol <i>ent</i> - 100 .	189
Abbildung 167: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von dem cyclischen Produkt <i>ent</i> - 102 .	190
Abbildung 168: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von dem cyclischen Produkt <i>ent</i> - 103 .	190
Abbildung 169: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Evans-Addukts <i>ent</i> - 105a .	191
Abbildung 170: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Evans-Addukts <i>ent</i> - 105a .	191
Abbildung 171: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säuren <i>ent</i> - 106a , <i>ent</i> - 106b .	192
Abbildung 172: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters <i>ent</i> - 97 .	192
Abbildung 173: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters <i>ent</i> - 97 .	193
Abbildung 174: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters <i>ent</i> - 98 .	193
Abbildung 175: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters <i>ent</i> - 98 .	194
Abbildung 176: ^1H -Spektrum des Überstand-Rohextrakts von <i>S. plymuthica</i> .	194
Abbildung 177: ^1H -Spektrum des Zellextrakts von <i>S. plymuthica</i> .	195
Abbildung 178: ^1H -Spektrum der säulenchromatographischen Aufreinigung (Fraktion 1) der Naturstoffextraktion von <i>S. plymuthica</i> .	195
Abbildung 179: ^1H -Spektrum der säulenchromatographischen Aufreinigung (Fraktion 2) der Naturstoffextraktion von <i>S. plymuthica</i> .	196
Abbildung 180: ^1H -Spektrum der säulenchromatographischen Aufreinigung (Fraktion 3) der Naturstoffextraktion von <i>S. plymuthica</i> .	196
Abbildung 181: ^1H -Spektrum der säulenchromatographischen Aufreinigung (Fraktion 4) der Naturstoffextraktion von <i>S. plymuthica</i> .	197
Abbildung 182: ^1H -Spektrum der säulenchromatographischen Aufreinigung (Fraktion 5) der Naturstoffextraktion von <i>S. plymuthica</i> .	197

Abbildung 183: ^1H -Spektrum der säulenchromatographischen Aufreinigung (Fraktion 6) der Naturstoffextraktion von <i>S. plymuthica</i>	198
Abbildung 184: ^1H -Spektrum der säulenchromatographischen Aufreinigung (Fraktion 7) der Naturstoffextraktion von <i>S. plymuthica</i>	198
Abbildung 185: ^1H -Spektrum von dem unbekanntem Naturstoff 137	199
Abbildung 186: HMBC-Spektrum von dem unbekanntem Naturstoff 137	199
Abbildung 187: HSQC-Spektrum von dem unbekanntem Naturstoff 137	200
Abbildung 188: Vergleich der UV-Spektren des Überstand-Rohextrakts von <i>S. plymuthica</i> -Wildtyp und Knock-Out-Mutante in LB-Medium (bei 30 °C).....	200
Abbildung 189: Vergleich der UV-Spektren des Zell-Rohextrakts von <i>S. plymuthica</i> -Wildtyp und Knock-Out-Mutante in LB-Medium (bei 30 °C).....	201
Abbildung 190: Vergleich der UV-Spektren des Überstand-Rohextrakts von <i>S. plymuthica</i> -Wildtyp und Knock-Out-Mutante in NB II-Medium (bei 30 °C).....	201
Abbildung 191: Vergleich der UV-Spektren des Zell-Rohextrakts von <i>S. plymuthica</i> -Wildtyp und Knock-Out-Mutante in NB II-Medium (bei 30 °C).....	202
Abbildung 192: LC-HRMS-Lauf des <i>S. plymuthica</i> -Wildtyps in EPM-Medium (bei 27 °C).....	202
Abbildung 193: Vergrößerter Ausschnitt der Massenverteilung des <i>D. dadantii</i> -Wildtyps in EPM-Medium (bei 27 °C) bei 18.9 min.....	202
Abbildung 194: LC-HRMS-Lauf des <i>D. dadantii</i> -Wildtyps in EPM-Medium (bei 27 °C).....	203
Abbildung 195: Vergrößerter Ausschnitt der Massenverteilung des <i>D. dadantii</i> -Wildtyps in EPM-Medium (bei 27 °C) bei 18.9 min.....	203
Abbildung 196: Postulierter Biosyntheseweg von Oocydin A (59a) nach Salmond.....	203

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Amplifizierte PS-Konstrukte.....	40
Tabelle 2: Beispiel zum Vergleich der Proteinkonzentrationen in LB-, 2xYT- und TB-Medium. ...	43
Tabelle 3: Übersicht der hergestellten Expressionsplasmide zur Überprüfung der PS-Aktivität. .	43
Tabelle 4: Dargestellte Testsubstrate 60-85	48
Tabelle 5: Haterumalide und Biselide 59g-j	84
Tabelle 6: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.	88
Tabelle 7: Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten Vektoren und ihre Beschreibung. ...	88
Tabelle 8: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Organismen und Bestandteile genomischer DNA-Bibliotheken.	89
Tabelle 9: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer.....	90
Tabelle 10: Verwendete Zusätze und ihre Endkonzentration.	91
Tabelle 11: Sequenzierprimer der Firma <i>GATC</i>	98
Tabelle 12: Verwendete Restriktionsenzyme.....	99
Tabelle 13: Puffer zur Aufreinigung von His-Tag Fusionsproteinen.	101
Tabelle 14: Verwendete Puffer für den Stabilitätstest der PS-Proteine.	103
Tabelle 15: Verwendete HPLC-Methoden zur Untersuchung der PS-Aktivität.....	104

Erläuterungen und Abkürzungen

Häufig genannte chemische Verbindungen sind im Text mit fett gedruckten arabischen Ziffern gekennzeichnet. Dieser Arbeit sind eine Zusammenfassung und ein Abstract in englischer Sprache vorangestellt, in der die Nummerierung von der im Hauptteil verwendeten Nummerierung abweicht. Deshalb wurden in diesen Abschnitten die Strukturen mit römischen Ziffern gekennzeichnet.

Literaturhinweise wurden mit hochgestellten arabischen Ziffern kenntlich gemacht. Das Literaturverzeichnis befindet sich am Ende der vorliegenden Arbeit und beinhaltet alle Literaturstellen.

Im experimentellen Teil werden die Kürzel PP-XX verwendet, um auf die entsprechenden Versuchsnummern im Laborjournal zu verweisen.

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

2D:	zweidimensional
4-DMAP:	4-(Dimethylamino)-pyridin
6-dEB	6-Deoxyerthronolid
ACN:	Acetonitril
AcOH:	Essigsäure
ACP:	Acylcarrierprotein
A-Domäne:	Adenylierungsdomäne
AG:	Arbeitsgruppe
AMP:	Adenosinmonophosphat
Asp:	Asparaginsäure
AT:	Acyltransferase
ATP:	Adenosintriphosphat
bp:	Basenpaar
br:	breit (engl.: broad)
Bu ₂ BOTf:	Di- <i>n</i> -butylboryltrifluormethansulfonat
bzw.:	beziehungsweise
c:	Konzentration (engl.: concentration)
CDI:	Carbonyldiimidazol
C-Domäne:	Kondensationsdomäne

CH:	Cyclohexan
CoA:	Coenzym A
COSY:	engl.: correlated spectroscopy
CR:	Crotonase
Cys:	Cystein
<i>D.</i> :	<i>Dickeya</i>
d:	Dublett
DCC:	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DH:	Dehydratase
DHP:	Dihydropyran
DMF:	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO:	Dimethylsulfoxid
dr:	Diastereomerenverhältnis
<i>E.</i> :	<i>Escherichia</i>
E:	Epimerisierungs-Domäne
EPB	engl.: enriched potato dextrose broth
ECH:	Enoyl-CoA-Hydratase
EDC-HCl:	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid
ee:	Enantiomerenüberschuss
engl.:	englisch
eq:	Äquivalente
ER:	Enoylreduktase
ESI:	Elektronensprayionisierung (engl.: electron spray ionization)
<i>et al.</i> :	und andere
Et ₂ O:	Diethylether
Et ₃ N:	Triethylamin
EtOAc:	Essigsäureethylester
EtOH:	Ethanol
FAS:	Fettsäuresynthetasen
FkbH:	Acyltransferase
FkbM:	O-Methyltransferase
GNAT:	GCN5-verwandte N-Acyltransferase

h:	Stunde
Hal:	Halogenase
HGMS:	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
His:	Histidin
HMBC:	engl.: heteronuclear multiple bond correlation
HOBt:	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC:	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high performance liquid chromatography)
HSQC:	engl.: heteronuclear single quantum coherence
Hz:	Hertz
IMAC:	immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
(<i>i</i> -Bu) ₂ AlH:	Diisobutylaluminiumhydrid
<i>i</i> -Pr ₂ EtN:	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
IPTG:	Isopropyl- β - <i>D</i> -thiogalactopyranosid
<i>J</i> :	Kopplungskonstante
KHMDS:	Kaliumhexamethyldisilazan
KO:	Knock-Out-Mutante
KR:	Ketoreduktase
KS:	β -Ketoacylsynthase
LB:	<i>Luria Bertani</i>
LCMS:	Flüssigkeitschromatographie Massenspektrometrie (engl.: Liquid chromatography mass spectrometry)
LM:	Lösungsmittel
<i>m/z</i> :	exakte Masse
M:	Molar
m:	Multipllett
MeOH:	Methanol
min:	Minuten
mRNA:	Boten-RNA (engl.: messenger RNA)
MT:	Methyltransferase
NAC:	<i>N</i> -Acetylcysteamin
NaOEt:	Natriumethanolat
NB II-Medium	Nährboullion II-Medium

<i>n</i> -BuLi:	<i>n</i> -Butyllithium
NMR:	Kernresonanzspektroskopie
NOESY:	engl.: nuclear overhauser effect spectroscopy
NRP:	Nicht-ribosomales Peptid
NRPS:	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase
OD:	optische Dichte
Ox:	Oxidase
PCC:	Pyridinium Chlorochromat
PCP:	Peptidyl-Carrierprotein
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PKS:	Polyketidsynthase
PMB:	<i>para</i> -Methoxybenzyl
PMB-Cl:	<i>para</i> -Methoxybenzylchlorid
PPant:	4' Phosphopantethintransferase
ppm:	parts per million
PPTase:	Phosphopantetheintransferase
PS:	Pyransynthase
q:	Quartett
r.t.:	Raumtemperatur
R:	Reduktase
<i>rac</i> :	racemisch
R _f :	Retentionsfaktor
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s.:	siehe
S:	<i>Serratia</i>
s:	Singulett
SDS-PAGE:	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser:	Serin
SNAC:	<i>N</i> -Acetylcysteamin-Thioester
t:	Triplett
TBAF:	Tetrabutylammoniumfluorid
TBS:	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl

TBS-Cl:	<i>tert</i> -Butyldimethylchlorsilan
TE:	Thioesterase
TESCl:	Triethylsilylchlorid
TFA:	Trifluoressigsäure (engl.: trifluoro acetic acid)
THF:	Tetrahydrofuran
THP:	Tetrahydropyran
TOCSY:	engl.: total correlation spectroscopy
t _r :	Retentionszeit
ü/N:	über Nacht
vgl.:	vergleiche
VOC:	flüchtige organische Verbindungen (engl.: volatile organic compound)
WT	Wildtyp
z.B.:	zum Beispiel

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde die postulierte katalytische Aktivität von Pyransynthase-Domänen (PS-Domänen) verschiedener *trans*-Acyltransferase-Polyketidsynthasen (*trans*-AT-PKS) *in vitro* getestet. Weiterhin wurden Derivate zur Analyse der Substratspezifität von *trans*-AT-Ketosynthasen (KS) synthetisiert. Zudem wurden zwei identische *trans*-AT-PKS-Gencluster von *Serratia plymuthica* und *Dickeya dadantii* mittels biochemischer und chemischer Methoden untersucht.

Polyketide bezeichnen Naturstoffe, die im Metabolismus von Bakterien, Pilzen und Pflanzen durch PKS biosynthetisiert werden. Eine Vielzahl an pharmakologischen Naturstoffen zählen zu dieser Verbindungsklasse, wie zum Beispiel Erythromycin A (I) (Abbildung I). Das Antibiotikum I wird von multimodularen *cis*-AT-PKS vom Typ I gebildet, in denen jedes Modul die wachsende Polyketidkette durch eine Claisen-artige Kondensationsreaktion um einen Acylbaustein verlängert. Die Minimal-PKS besteht aus einer KS, einer AT und einem Acylcarrierprotein (ACP). Die Struktur des prozessierten Polyketids kann anhand der strikten Colinearität zwischen Biosyntheseweg und Domänenarchitektur der PKS postuliert werden. Ebenso kann bei bekannter Struktur des Naturstoffs auf die Domänenabfolge geschlossen werden. Dieses Colinearitätsprinzip trifft jedoch nicht auf alle bekannten modularen Typ I-PKS zu. Piel *et al.* klassifizierten 2002 eine weitere Gruppe, in der die AT-Domänen nicht in den vorliegenden Modulen integriert sind. Die sogenannten *trans*-AT-PKS weisen freistehende AT-Enzyme auf, die mit den Modulen der PKS *in trans* agieren. Eine Besonderheit von *trans*-AT-PKS ist die große Moduldiversität aufgrund ungewöhnlicher Domänen und Domänenanordnungen im Gegensatz zu den bekannten *cis*-AT-PKS. Bedeutende Vertreter, die durch *trans*-AT-PKS biosynthetisiert werden, sind die biologisch aktiven Substanzen der Pederinfamilie, wie Pederin (II) aus den Käfern der Gattungen *Paederus* und *Paederidus* oder Psymberin (III) aus den Schwämmen *Psammocinia* aff. *bulbosa* und *Ircinia ramosa*.

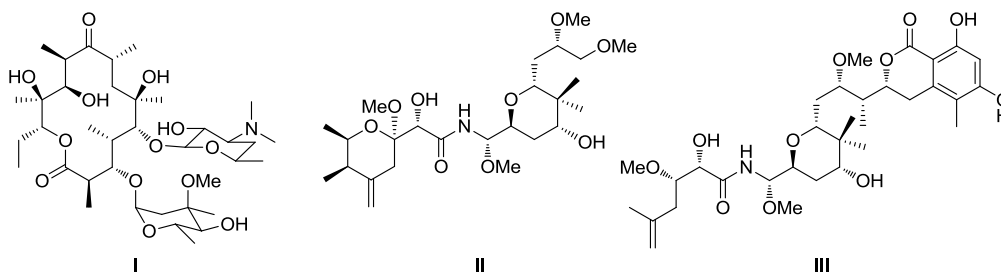


Abbildung I: Erythromycin A (I), Pederin (II) und Psymberin (III).

Ein Strukturmerkmal vieler *trans*-AT-PKS abgeleiteten Polyketide sind fünf- oder sechsgliedrige, cyclische Ethereinheiten. Nähere Untersuchungen der dazugehörigen *trans*-AT-PKS-Module zeigten, dass scheinbar eine einzigartige Domäne mit Proteinhomologie zu Dehydratase (DH)-Domänen an der Bildung dieser Ringsysteme beteiligt ist. Als Schlüsselschritt der Ringschlussreaktion wurde ein intramolekularer Angriff der ϵ ($n = 0$)- bzw. ζ ($n = 1$)-Hydroxygruppe auf die β -Position im Michael-Akzeptorsystem, katalysiert durch die PS, postuliert (Abbildung II). Alle *trans*-AT-PKS dieses Typs weisen die abgebildete Modulanordnung: KS-DH-PS-KR-ACP (KR: Ketoreduktase) auf. Dies lässt vermuten, dass den PKS ein allgemeiner biosynthetischer Mechanismus zur Ausbildung von Ringgrößen, Stereochemie und Substitutionsmuster zu Grunde liegt.

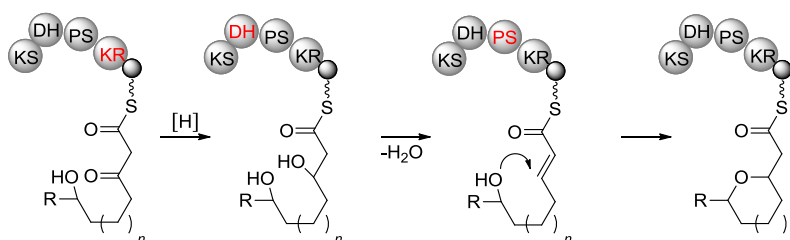


Abbildung II: Postulierter Mechanismus der PS-katalysierten Reaktion; $n = 0, 1$. Die agierenden Domänen sind rot markiert.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden PS-Konstrukte der *trans*-AT-PKS von Misakinolid A (**XVIII**), Pederin (**II**), Psymberin (**III**) und Oocydin A (**XXI**) amplifiziert und in zwei unterschiedliche Expressionsvektoren kloniert. Die Überexpression der PS-Domänen aus den verschiedenen *trans*-AT-PKS lieferte je zwei bis drei lösliche Proteine (Ooc-PS1, Ooc-PS2, PsyD-PS1, PsyD-PS2, PedF-PS1, PedF-PS2, MisF-PS1, MisF-PS2 und MisF-PS3). Anschließend wurden die offenkettigen ϵ - bzw. ζ -Hydroxy-Testsubstrate **IVa-IXb**, sowie die dazugehörigen Furan- bzw. Pyran-abgeleiteten Referenzsubstanzen **Xa-XVb** als HPLC-Standards (engl.: High-performance liquid chromatography) synthetisiert. Die Testsubstrate wurden als *N*-Acetylcysteamin-Thioester (SNAC) **IVa, IVb, Va, Vb, Xa, Xb, XIa** und **XIb**, Säuren **VIa, VIb, VIIa, XIIa, XIIb** und **XIIIa** und Ethylester **VIIIa, VIIIb, VIVa, VIVb, XIVa, XIVb, XVa** und **XVb** eingesetzt. Weiterhin wurde ein kurzkettiges Analogon **XVI** eines Intermediats aus der Misakinolidbiosynthese und ein Keto-Derivat **XVII** dargestellt (Abbildung III). Die ϵ -Hydroxy-Testsubstrate **Va, Vb, VIIa, IXa** und **IXb** sowie die Furan-abgeleiteten Referenzsubstanzen **XIa, XIb, XIIIa, XVa** und **XVb** wurden ausschließlich zur Untersuchung der PS-Domäne des Oocydin A-Genclusters synthetisiert, da Oocydin A (**XXI**) im Gegensatz zu den anderen Polyketiden als Strukturmotiv einen fünfgliedrigen cyclischen Etherring aufweist (vgl. Abbildung V).

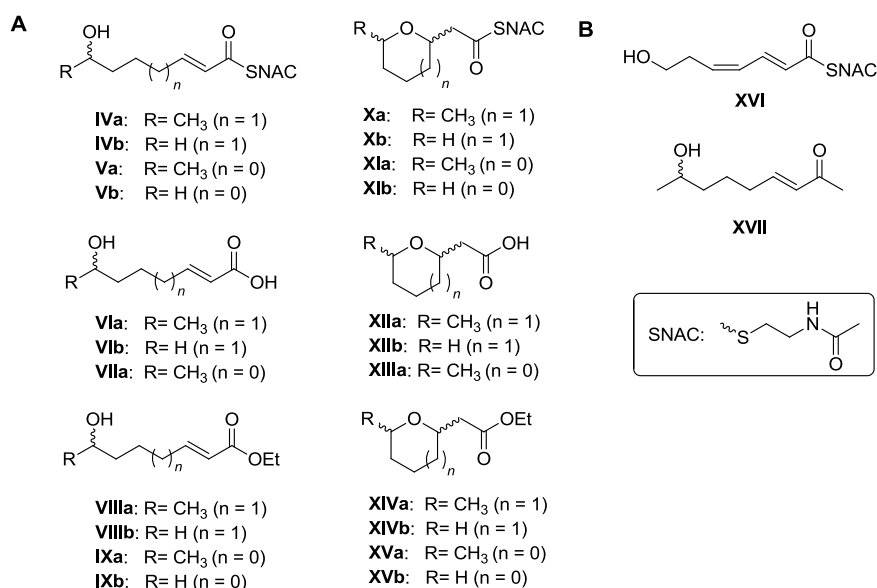


Abbildung III: Synthetisierte Testsubstrate **IVa-XVb**, **XVI** und **XVII** zur Überprüfung der PS-katalysierten Ringschlussreaktion. **A)** Offenkettige ϵ - bzw. ζ -Hydroxy-Testsubstrate **IVa-IXb**, sowie die dazugehörigen Furan- bzw. Pyran-abgeleiteten Referenzsubstanzen **Xa-XVb**; **B)** kurzketziges Analogon **XVI** eines Intermediats aus der Misakinolidbiosynthese sowie Keto-Substrat **XVII**.

Im Anschluss wurden die Enzyme in Aktivitätsassays mit den entsprechenden offenkettigen Testsubstraten **IVa-IXb**, **XVI** und **XVII** inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden extrahiert und mittels HPLC vermessen. Für die PS-Domänen der Gencluster von Misakinolid A (**XVIII**) und Pederin (**II**) wurde die katalytische Ringschlussreaktion mit den SNAC-Testsubstraten **IVa** und **IVb** zu den Pyran-abgeleiteten Produkten **Xa** und **Xb** anhand der Verschiebung der Wellenlänge, der exakten Masse und der Retentionszeit nachgewiesen. Für die Pederin-PS wurden weiterführende Analysen in Bezug auf die Stereoselektivität durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass der Ring stereoselektiv von der PS-Domäne geschlossen wird. Für die PS-Domänen der Psymberin- (**III**) und Oocydin A (**XXI**)-Gencluster wurde keine Reaktion mit den Thioestern **IVa** und **IVb** beobachtet. Eine Umsetzung der Oocydin A-PS mit den ϵ -Hydroxy-Testthioestern **Va** und **Vb** zu den Referenzsubstanzen **XIa** und **XIb** wurde detektiert. Allerdings konnten die Reaktionen nicht zweifelsfrei bestätigt werden, da sich auch die Negativkontrollen als positiv erwiesen. Alle dargestellten Säuren **VIa**, **VIb** und **VIIa** und Ethylester **VIIIa**, **VIIIb**, **IXa** und **IXb** zeigten im Assay mit den PS-Domänen keine Reaktion. Auch für die Substrate **XVI** und **XVII** in Abbildung III B wurden nach Inkubation mit den Proteinen in den HPLC-Chromatogrammen keine neuen Signale detektiert.

Zum ersten Mal wurde in der vorliegenden Arbeit die katalytische Aktivität der neuartigen PS-Domänen nachgewiesen. Es wurde damit ein neuer Reaktionstyp charakterisiert, der für die Erzeugung cyclischer Ethernheiten innerhalb der PKS-Kettenverlängerung verantwortlich ist. Einfache primäre und sekundäre SNAC-Substrate **IVa**, **IVb**, **Va** und **Vb**

wurden von den PS-Domänen akzeptiert. Das kurzkettenige Analogon **XVI** wurde zwar nicht von der Misakinolid-PS umgesetzt, aber in weiterführenden Studien sollte untersucht werden, ob andere SNAC-Derivate mit unterschiedlichen Substitutionsmustern zum Aufbau von komplexen fünf- und sechsgliedrigen, cyclischen Produkten führen. Der Vorteil, dass PS *in vitro* ohne die Beteiligung weiterer PKS-Komponenten in der Lage sind, oxacyclische Produkte stereoselektiv zu generieren, könnte Potential für die chemoenzymatische Synthese besitzen.

In einem weiteren Projekt der Arbeit wurden die Substrate **XIX** und **XX** sowie *ent*-**XIX** und *ent*-**XX** zur Analyse der KS-Spezifität von KS 7 und KS 8 in der Biosynthese von Misakinolid A (**XVIII**) synthetisiert. Phylogenetische Studien der Gensequenzen von KS führten zur Erstellung eines Regelwerks, das Strukturvorhersagen für Produkte von *trans*-AT-PKS ermöglicht, da die KS-Sequenz mit der Struktur des prozessierten Intermediats korreliert. Die putativen Intermediate in der Biosynthese wurden als Kurzkettensubstrate *ent*-**XIX** und **XX** dargestellt. Zur vollständigen Charakterisierung der KS-Substratspezifität wurden auch die Enantiomere **XIX** und *ent*-**XX** dargestellt (Abbildung IV). Bislang konnten die entsprechenden Enzyme von Dr. Agustinus Uria (AG Piel) noch nicht exprimiert werden, so dass erst in Folgestudien die Substratspezifität untersucht werden kann.

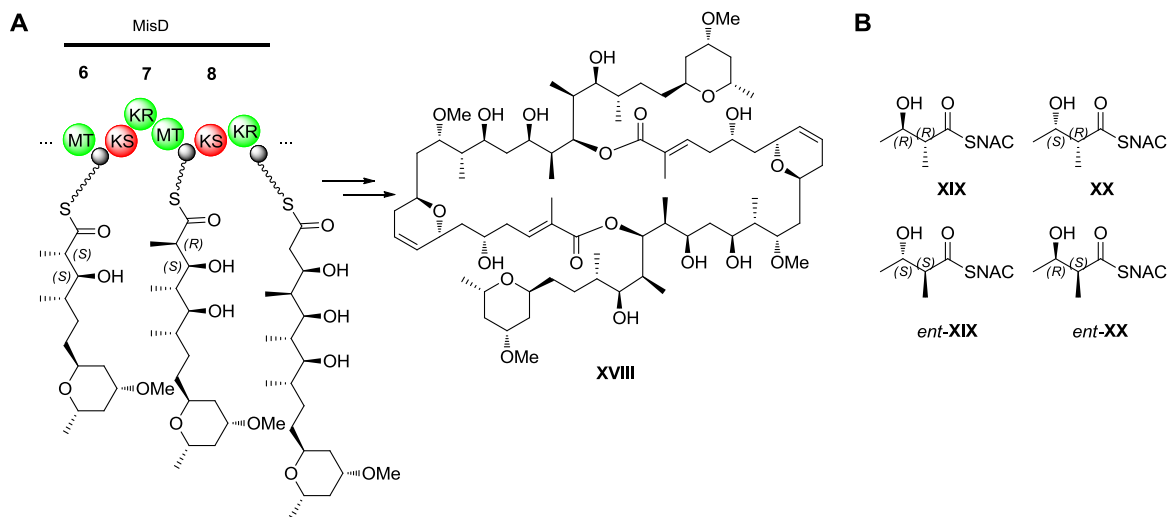


Abbildung IV: **A)** Ausschnitt aus der Biosynthese von Misakinolid A (**XVIII**), **B)** Substrate **XIX**, **XX**, *ent*-**XIX** und *ent*-**XX** für die Analyse der KS-Substratspezifität KS 7 und KS 8 (rot markiert).

Ein anderes Projekt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung zweier identischer *trans*-AT-PKS-Gencluster von *Serratia plymuthica* und *Dickeya dadantii*. Vorangegangene bioinformativ Studien der Genome beider Bakterienstämme von Prof. Piel lieferten einen bis dahin unbekannt, 76 kb großen PKS-Gencluster. Zur Identifizierung des Naturstoffs wurden Fermentationskulturen von *S. plymuthica* in

verschiedenen Medien angesetzt, extrahiert und säulenchromatographisch aufgereinigt. Die Untersuchung der Extrakte erfolgte mittels Cytotoxizitätsassays, LCMS (engl.: Liquid chromatography mass spectrometry)- und NMR (engl.: Nuclear magnetic resonance)-Analysen. Während dieser Arbeiten zeigte die Arbeitsgruppe um Salmond, dass es sich bei dem gesuchten Polyketid um Oocydin A (**XXI**) handelte (Abbildung V). Der Naturstoff **XXI** konnte unter den Bedingungen von Salmond *et al.* produziert werden und die postulierten Biosynthesen von Prof. Piel und Prof. Salmond wurden miteinander verglichen.

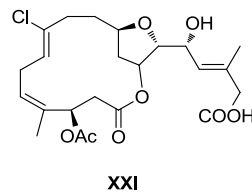


Abbildung V: Struktur von Oocydin A (**XXI**).

Abstract

Presented here are the results carried out on the *in vitro* investigation of the postulated catalytic activity of pyran synthase domains (PS domains) of different *trans*-acyltransferase polyketide synthases (*trans*-AT PKSs). Furthermore compounds for the analysis of substrate specificity in *trans*-AT ketosynthases (KS) were synthesized. Another project was the examination of two identical *trans*-AT PKS gene clusters of *Serratia plymuthica* and *Dickeya dadantii* with biochemical and chemical methods.

Polyketides are natural products that are biosynthesized by PKS in the metabolism of bacteria, fungi and plants. Some of these compounds show pharmacological activity, like erythromycin A (I) (figure I). The antibiotic I is generated by a type I, multi-modular *cis*-AT-PKS, in which each module extends the growing polyketide chain by one acyl building block via a Claisen-like condensation reaction. The minimal PKS consists of a KS, an AT and an acyl carrier protein (ACP). The structure of the processed polyketide can be predicted on the collinear relationship between biosynthetic pathway and domain organization of the PKS. According to this rule it is also possible to derive the sequence of the catalytic domains from a well-characterized polyketide structure. However, this collinearity principle does not apply to all known modular type I PKS. In 2002 Piel *et al.* classified another group of PKS where the AT domains are not integrated into these modules. These *trans*-AT PKSs interact with free-standing AT enzymes *in trans*. A special feature of *trans*-AT PKSs is the large module diversity due to unusual domains and domain arrangements contrary to the well-known *cis*-AT PKSs. Representatives of *trans*-AT derived polyketides are the biologically active substances of the pederin family, like pederin (II) from the beetle genera *Paederus* and *Paederidus* or psymbenin (III) from the sponges *Psammocinia* aff. *bulbosa* and *Ircinia ramosa*.

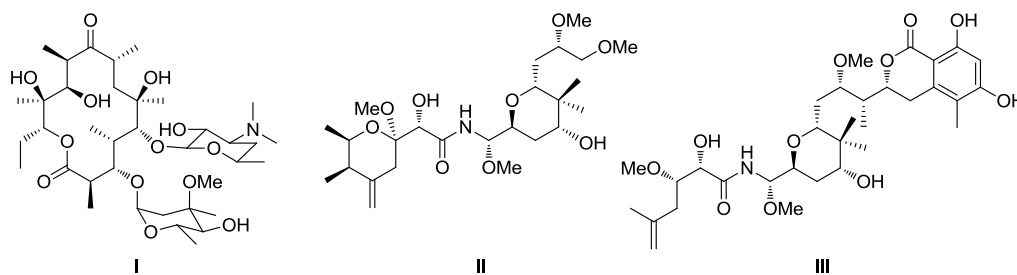


Figure I: Erythromycin A (I), pederin (II) and psymbenin (III).

Many *trans*-AT PKS derived metabolites contain five- or six-membered cyclic ether moieties. Further investigations of the related PKS modules suggested that a unique domain with similar protein homology to dehydratase (DH)-domains might be involved in

the formation of these ring systems. An intramolecular attack of the ϵ ($n = 0$)- or ζ ($n = 1$)-hydroxy group at the β -position of the Michael acceptor system catalyzed by a PS (figure II) is assumed to be the key step of the ring closure reaction. All known *trans*-AT PKSs of this type show the same module architecture: KS-DH-PS-KR-ACP (KR: ketoreductase) suggesting that a general biosynthetic strategy is used to form different ring sizes, stereochemistry and substitution pattern.

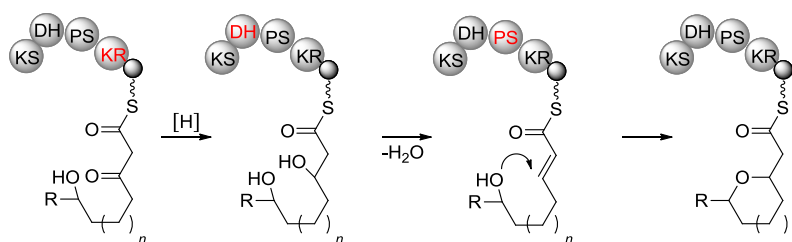


Figure II: Postulated mechanism of the PS catalyzed reaction; $n = 0, 1$. The acting domains are highlighted in red.

To test this hypothesis, the PS constructs of the *trans*-AT PKS from misakinolide A (**XVIII**), pederin (**II**), psymberin (**III**) and oocydin A (**XXI**) were amplified and cloned into two different expression vectors. The overexpression of the PS constructs resulted in two to three soluble proteins (Ooc-PS1, Ooc-PS2, PsyD-PS1, PsyD-PS2, PedF-PS1, PedF-PS2, MisF-PS1, MisF-PS2 und MisF-PS3). The open-chain ϵ - or ζ -hydroxy test substrates **IVa-IXb**, as well as the corresponding furan- or pyran-derived references **Xa-XVb** were synthesized for HPLC comparative measurements. The test substrates were generated as thioester (SNAC) **IVa**, **IVb**, **Va**, **Vb**, **Xa**, **Xb**, **XIa** and **XIb**, acids **VIa**, **VIb**, **VIIa**, **XIIa**, **XIIb** and **XIIIa** and ethylesters **VIIIa**, **VIIIb**, **VIVa**, **VIVb**, **XIVa**, **XIVb**, **XVa** and **XVb**. In addition an analogue **XVI** of an intermediate from the misakinolid A biosynthesis (**XVIII**) and a ketone derivative **XVII** were synthesized (figure III). The ϵ -hydroxy test substrates **Va**, **Vb**, **VIIa**, **IXa** and **IXb** as well as the furan-derived references **XIa**, **XIb**, **XIIIa**, **XVa** and **XVb** were synthesized exclusively for the examination of the oocydin A (**XXI**) PS, since the molecule **XXI** comprises a five-membered ring in contrast to the other *trans*-AT PKS derived polyketides (see figure V).

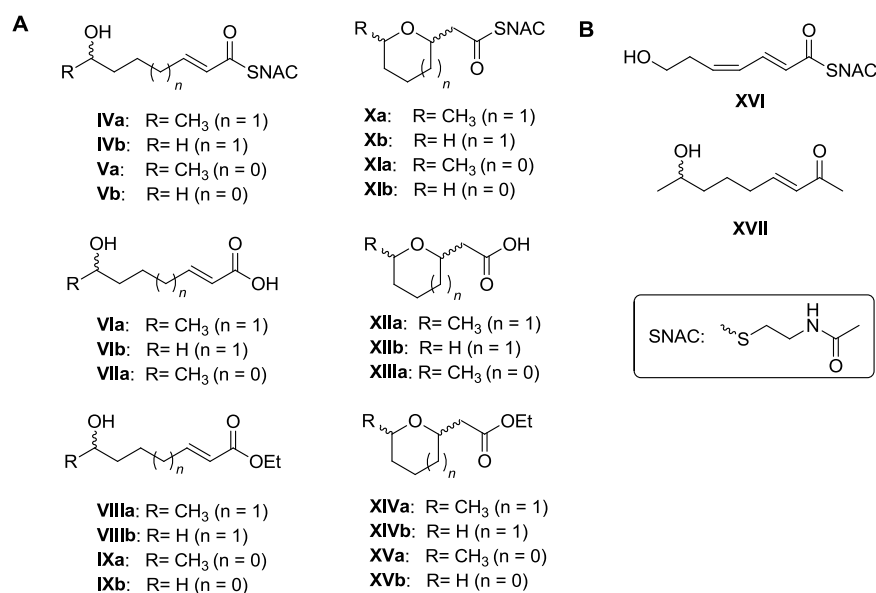


Figure III: Synthesized test substrates **IVa-XVb**, **XVI**, **XVII** to verify the PS catalyzed ring closure reaction. **A)** Open-chain ϵ - or ζ -hydroxy test substrates **IVa-IXb**, as well as the corresponding furan- and pyran-derived references **Xa-XVb**; **B)** Analogue **XVI** of the intermediate from the misakinolide A biosynthesis and ketone substrate **XVII**.

The enzymes were incubated in activity assays with the corresponding open-chain test substrates **IVa-IXb**, **XVI** and **XVII**. The reaction products were extracted and measured by HPLC. For the PS domains of the misakinolide A (**XVIII**) and pederin (**II**) gene clusters, a catalytic ring closure with the SNAC test substrates **Iva** and **Ivb** to the tetrahydropyran-containing products **Xa** and **Xb** was observed, analyzed by measurement the shift of the wavelength, the exact mass and the retention time. Additional experiments with the pederin PS showed a stereoselective ring closure, whereas no products were observed for the proteins of the psymbirin (**III**) and oocydin A (**XXI**) gene clusters with the thioesters **Iva** and **Ivb**. A conversion of the oocydin A PS with the ϵ -hydroxy test substrates **Va**, **Vb** to the reference substances **XIa** and **XIb** was detected. However, these reactions could not be confirmed without any doubt, since also negative controls proved to be positive. All represented acids **VIIa**, **VIIb** and **VIIa** and ethyl esters **VIIIa**, **VIIIb**, **IXa** and **IXb** did not show a reaction in the assays with PSs. Also for the substrates **XVI** and **XVII** in figure III B, no new HPLC signals were detected after incubation with the proteins.

In the present work the catalytic activity of the unique PS domains was proven for the first time. A new type of reaction was characterized to form five- and six-membered cyclic ether moieties during PKS chain elongation. Simple primary and secondary SNAC substrates **IVa**, **IVb**, **Va** and **Vb** were accepted by PS domains. The intermediate **XVI** was not converted by the misakinolide PS, but further efforts are necessary to show whether other SNAC derivatives with different substitution pattern are accepted and can

be converted to complex five- or six-membered cyclic products. However, a general advantage of PS domains to catalyze ring-closure reactions to stereodefined, oxacyclic products *in vitro* without requiring other PKS components could play an important role in the chemoenzymatic synthesis in the future.

In a separate project the substrates **XIX** and **XX** as well as *ent*-**XIX** and *ent*-**XX** were synthesized for the analysis of selectivity of KS 7 and KS 8 in the biosynthesis of misakinolide A (**XVIII**). Phylogenetic studies of KS gene sequences led to the development of basic rules that enable prediction of the structure of *trans*-AT PKS derived polyketides. Basically, the KS sequence correlates with the structure of the processed intermediate. The putative test substrates were synthesized as short-chain derivatives *ent*-**XIX** and **XX**. To obtain a comprehensive picture of the KS substrate specificity also the enantiomers **XIX** and *ent*-**XX** were synthesized (figure IV). Unfortunately so far the corresponding enzymes could not be expressed by Dr. Augustinus Uria yet (Piel group), so the substrate specificity will be investigated in follow-up studies.

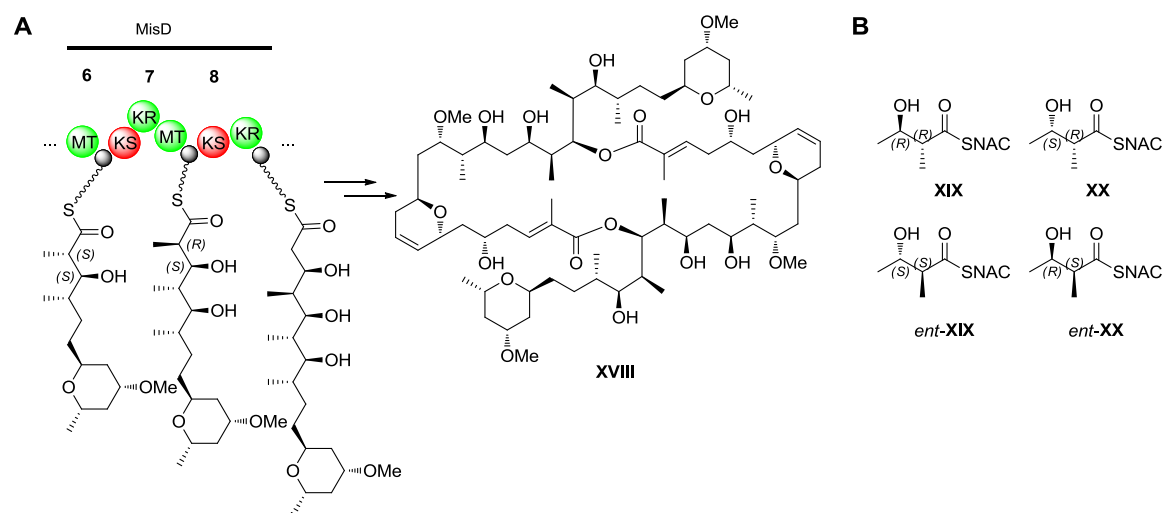
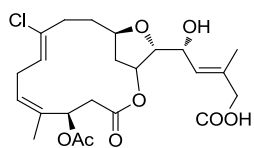


Figure IV: A) Part of the misakinolide A biosynthesis (**XVIII**), **B)** Substrates **XIX**, **XX** and *ent*-**XVII**, *ent*-**XVII** for the analysis of the KS substrate specificity of KS 7 and KS 8 (highlighted in red).

Another project of the present work was the investigation of two identical *trans*-AT PKS gene clusters from *Serratia plymuthica* and *Dickeya dadantii*. Previous bioinformatic studies in the Piel group on the genome of both bacterial strains revealed an unknown PKS gene cluster of 76 kb. To identify the natural product, fermentation cultures of *S. plymuthica* were prepared in different media. These cultures were extracted and purified via flash chromatography. The analysis of the extracts included cytotoxicity assays, LCMS and NMR measurements. At the same time Salmond *et al.* could show that the targeting structure oocydin A (**XXI**) (figure V) was. Natural product **XXI** was

produced under the conditions of Salmond *et al.* and the putative biosynthetic pathways, postulated by Prof. Piel and Prof. Salmond, were compared.



XXI

Figure V: Structure of oocydin A (XXI).

1 Einleitung

1.1 Polyketide

Polyketide weisen eine hohe strukturelle Diversität auf, die unter den Naturstoffen außergewöhnlich ist. Dieser Substanzklasse gehören unter anderem Polyether, Makrolide, Polyene, Polyphenole und Endiine an. Zu den natürlichen Produzenten der Polyketide zählen eine Vielfalt an Organismen, wie Bakterien, Pilze und Pflanzen. Die biologische Funktion dieser Wirkstoffe für den Produzenten ist häufig noch ungeklärt. Wahrscheinlich agieren sie als Abwehrstoffe gegen Fraßfeinde, Signalstoffe bei mikrobieller Kommunikation oder spielen eine Rolle bei Entwicklungsprozessen (z.B. als Radikalfänger).^{1,2,3} Besonders die häufig auftretende pharmakologische Aktivität bedingt ein hochinteressantes Forschungsgebiet für Wissenschaft und Industrie. Die therapeutische Vielseitigkeit reicht von Antibiotika (Erythromycin⁴ (1)), Zytostatika (Bryostatin⁵ (2)), Immunsuppressiva (Rapamycin⁶ (3)) über Antimykotika (Amphotericin B⁷ (4)) bis hin zu kardiovaskulär beeinflussenden Medikamenten (Lovastatin⁸ (5)) (Abbildung 1).

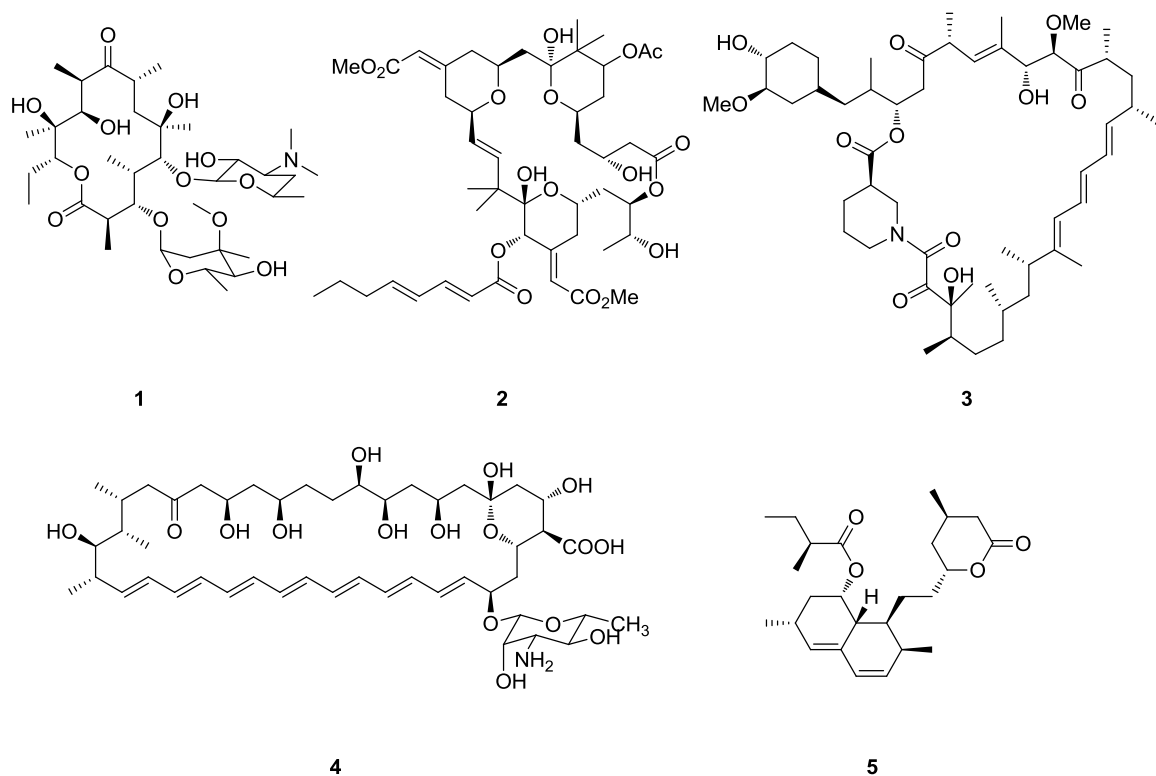


Abbildung 1: Beispiele von Polyketidwirkstoffen: Erythromycin (1), Bryostatin (2), Rapamycin (3), Amphotericin B (4) und Lovastatin (5).

Erste Untersuchungen der Biosynthese von Polyketiden wurden 1893 von Collie durchgeführt. Durch Fragmentierungsreaktionen von Dehydroessigsäure entdeckte er die aromatische Verbindung Orcinol.⁹ Seine Annahme zur Synthese dieser neuen Poly- β -keto-Derivate beruhte auf der Cyclisierung von zwei „CH₂-CO“-Einheiten.¹⁰ Birch belegte die Hypothese von Collie durch Isotopenmarkierungsexperimente mit 6-Methylsalicylsäure. Der Aufbau dieser Substanzklasse aus einzelnen Acetatbausteinen wurde so bewiesen. Birch prägte auch den Begriff der Polyketide.¹¹

Derzeit beträgt der jährliche Umsatz an Polyketid-basierenden Medikamenten etwa 35 Billionen US\$.¹² Das Interesse an neuen, bioaktiven Polyketiden in der Industrie steigt stetig. Zur Identifizierung pharmakologisch interessanter Substanzen wurden die traditionellen Screening-Verfahren durch molekulargenetische und bioinformatische Ansätze erweitert und verbessert. Beispielsweise ermöglicht die kombinatorische Biosynthese Sekundärmetabolite durch Kombination von Genen aus den Biosynthesewegen in „nicht-natürliche“ Derivate umzuwandeln. Diese können ihrerseits wieder völlig neue Aktivitäten zeigen.^{13,14} Zudem können Gene mit bekannter biochemischer Funktion inseriert werden, um eine Wirkstoffoptimierung zu realisieren.¹⁵ Ein weiterer Ansatz ist das „genome mining“, das sich mit der gezielten Voraussage von Genomsequenzen nach potenziellen Leitstrukturen befasst (Abbildung 2).^{16,17}

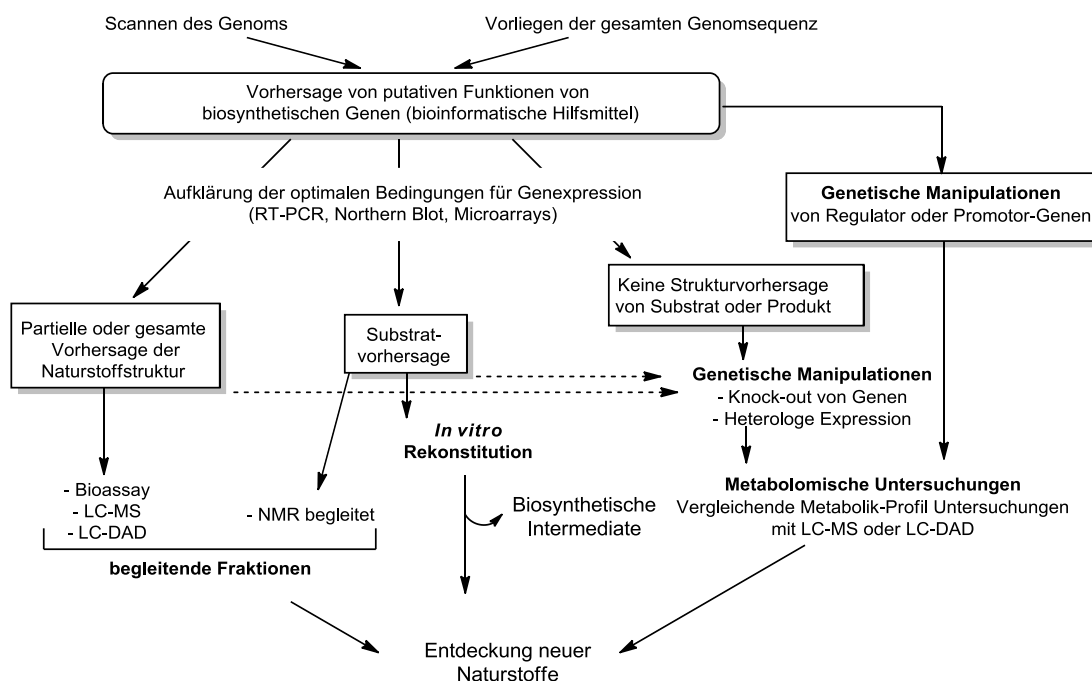


Abbildung 2: Beschreibung des „genome mining“-Ansatzes zur Entdeckung neuer Naturstoffe.¹⁶

1.1.1 Biosynthese von Polyketiden

Alle Polyketide werden trotz der großen Strukturdiversität über ein gemeinsames biosynthetisches Prinzip gebildet, das mit dem der Fettsäuren verwandt ist.^{18,19} In beiden Fällen wird die Kettenverlängerung mit kurzen Carbonsäureeinheiten durch Polyketidsynthasen (PKS) (beim Fettsäurebiosyntheseweg durch Fettsäuresynthetasen, FAS) katalysiert. Der zugrunde liegende Mechanismus sind aufeinander folgende Claisen-Thioester-Kondensationsreaktionen.²⁰ Dabei erfolgt zunächst die Aktivierung eines Acyl-Starterbausteins **6** (meistens Acetyl-CoA (**11**)) unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP, **7**) zum gemischten Phosphor-Carbonsäureanhydrid **8** (Abbildung 3 A). Im Anschluss findet ein nukleophiler Angriff von Coenzym A (CoA, **9**) auf das Anhydrid **8** statt und führt zur Bildung von dem Acyl-CoA-Derivat **10**.²¹ Im Fettsäurebiosyntheseweg werden ausschließlich Acetyl-CoA (**11**) und Malonyl-CoA (**12**) prozessiert, wohingegen PKS eine größere Substrattoleranz aufweisen und beispielsweise auch die Bausteine **11** – **17** akzeptieren (Abbildung 3 B).

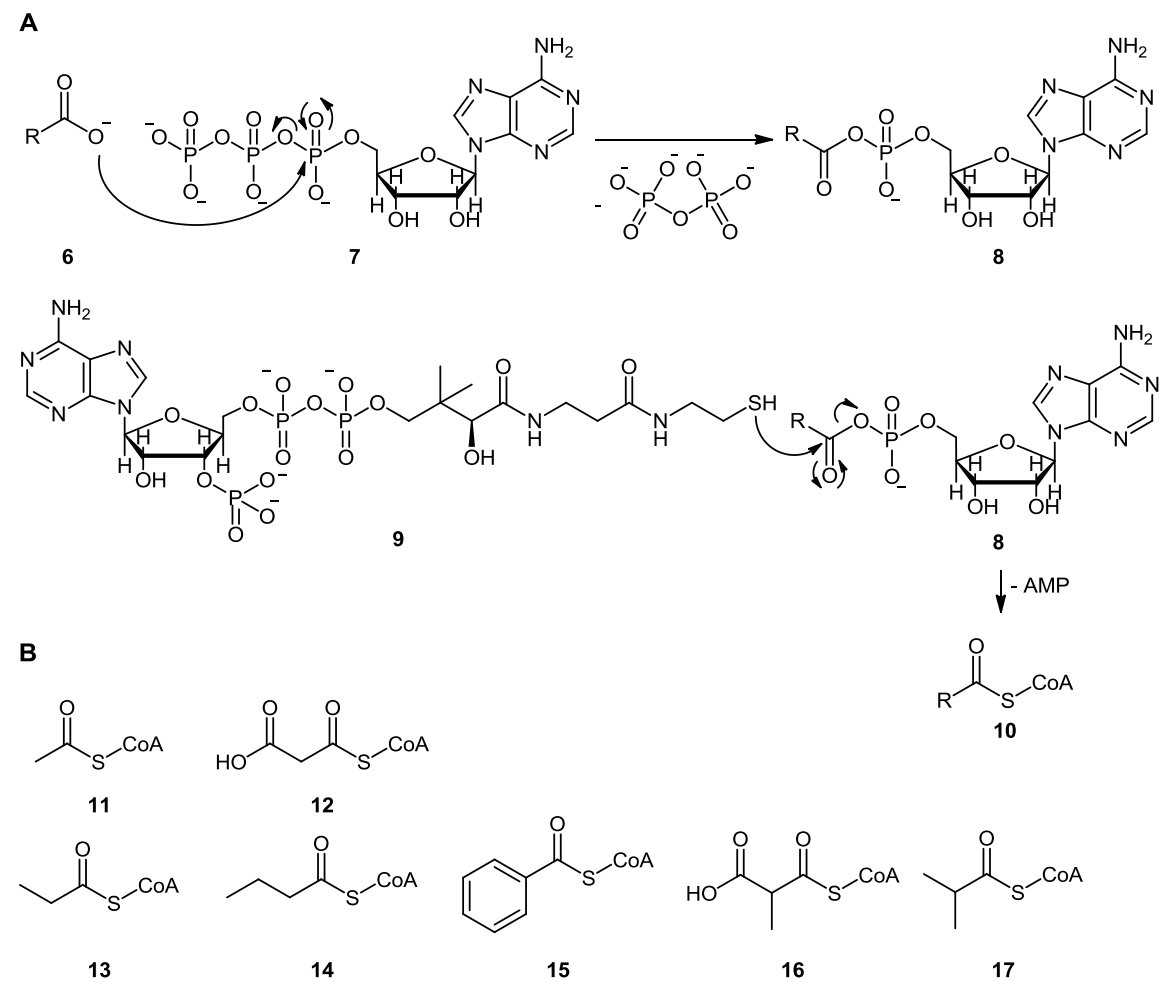


Abbildung 3: A) Bildung des Acyl-CoA Derivats **10** über die Aktivierung des Acylstarterbausteins **6**; **B)** Starter- und Elongationseinheiten der FAS **11** und **12** und der PKS **11** – **17**.

Das Acylrückgrat ist während der Biosynthese, mit Ausnahme der Typ III-PKS (vgl. Abschnitt 1.1.2.3), als Thioester über eine Phosphopantetheinyl-Gruppe an einem aktivierten Acylcarrierprotein (ACP) gebunden. Dafür erfolgt zunächst eine posttranslationale Modifikation der Carrierproteine unter Katalyse von 4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen). Der 4'-Phosphopantethein-Rest von CoA (**9**) wird auf einen hoch konservierten Serinrest übertragen und die inaktive *apo*-Form **18** des ACPs wird in ihre aktive *holo*-Form **19** umgewandelt (Abbildung 4).²²

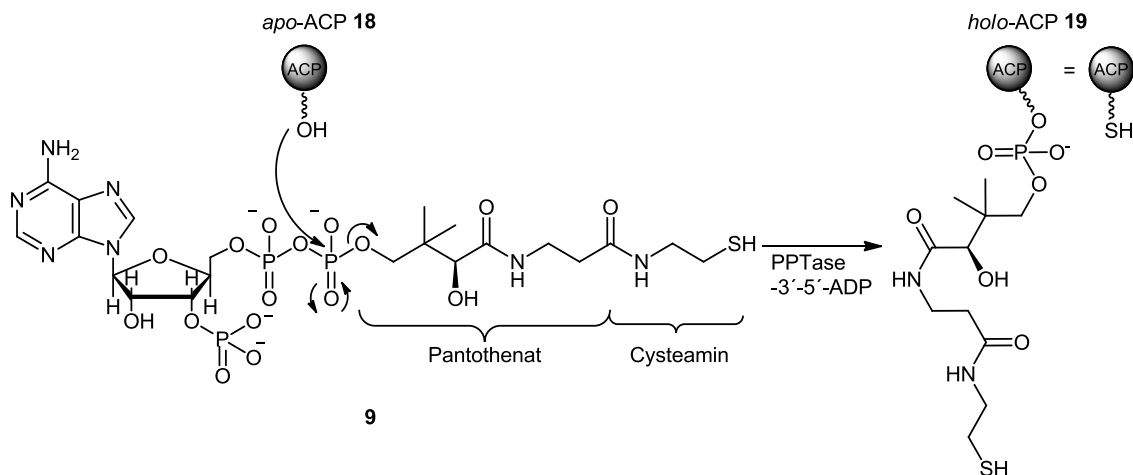


Abbildung 4: Posttranslationale Modifikation von ACP.

Für die Kettenverlängerung wählen Acyltransferasen (AT) sowohl die Acylstarter- als auch die Elongationseinheit (meistens Malonyl-CoA (**12**)) aus und übertragen die Substrate auf aktivierte *holo*-ACPs (Abbildung 5).

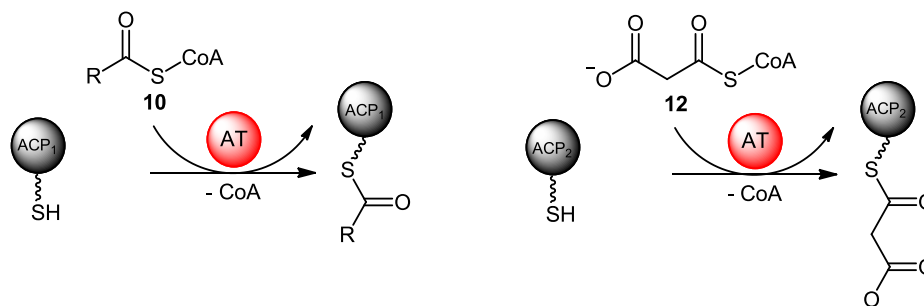


Abbildung 5: AT-katalysierte Beladung der *holo*-ACPs aufeinander folgender Module (ACP₁ und ACP₂) mit Starter- und Elongationseinheit **10** bzw. **12**.

Im nächsten Schritt wird die Startereinheit an das aktive Zentrum einer KS gebunden. Diese katalysiert eine Claisen-artige Kondensationsreaktion zwischen dem Substrat und der Verlängerungseinheit des folgenden ACPs unter Abspaltung von Kohlendioxid zum β -Ketothioester **20**. Die wachsende Kette ist nun am zweiten ACP lokalisiert und kann analog zum bereits beschriebenen Mechanismus weiter verlängert werden (Abbildung 6).²²

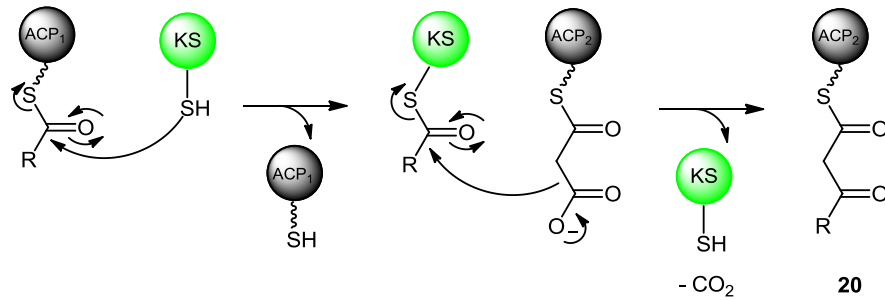


Abbildung 6: KS-vermittelte Kondensationsreaktion zwischen Acyl- und Verlängerungsbaustein.

Im Verlauf der Polyketidbiosynthese können weitere Enzymmodifikationen auftreten, die den Reduktionsgrad des prozessierten β -Ketothioester **20** beeinflussen (Abbildung 7). Ein vollständig reduktiver Reaktionszyklus in der Biosynthese besteht aus KR, DH und Enoylreduktase (ER). Die KR reduziert den β -Ketothioester **20** zum β -Hydroxythioester **21**. Im Folgenden wird Wasser durch die DH zum α,β -ungesättigten Thioester **22** eliminiert. Die ER wandelt die Doppelbindung zum gesättigten Produkt **23** um. Bei der Fettsäurebiosynthese wird diese Reduktionskaskade immer vollständig durchlaufen und führt normalerweise zu einer gesättigten freien Carbonsäure oder einem Acylester mit 14, 16 oder 18 Kohlenstoffatomen.⁹ Ungesättigte Fettsäuren werden im Allgemeinen nachträglich durch Desaturasen gebildet.²³ PKS sind hingegen in der Lage den Reduktionsgrad zu kontrollieren und können so alle Intermediate der Reduktionskaskade (vgl. Abbildung 7) synthetisieren. Weitere optionale Domänen, wie zum Beispiel Methyltransferasen (MT), die α -ständig zum Thioester das Substrat methylieren, erklären die enorme Strukturvielfalt von Polyketiden.⁹

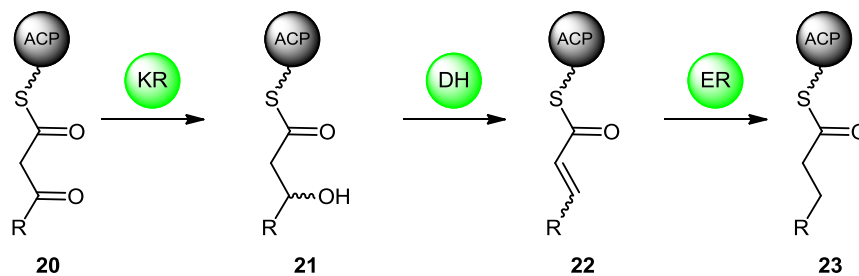


Abbildung 7: Reduktionszyklus für FAS und PKS. In der Fettsäurebiosynthese wird dieser Zyklus vollständig durchlaufen.

Die Freisetzung der erzeugten Polyketidkette erfolgt am C-terminalen Ende des letzten Moduls mithilfe von Thioesterasen (TE) durch Hydrolyse oder Cyclisierung (Abbildung 8).²⁴ Die TE besitzen eine konservierte Triade aus Serin (Ser), Histidin (His) und Asparaginsäure (Asp). Der Histidin-Rest wird durch den Asparaginsäure-Rest stabilisiert und agiert als Protonenakzeptor. Im nächsten Schritt erfolgt der nukleophile Angriff der Hydroxygruppe des Serins auf den Carbonylkohlenstoff des Polyketids.

Abhängig von der Art der TE kann im Anschluss entweder eine Makrocyclisierung durch einen intramolekularen Angriff einer Hydroxy- oder Aminogruppe erfolgen oder das Polyketid wird durch Hydrolyse als Säure freigesetzt.

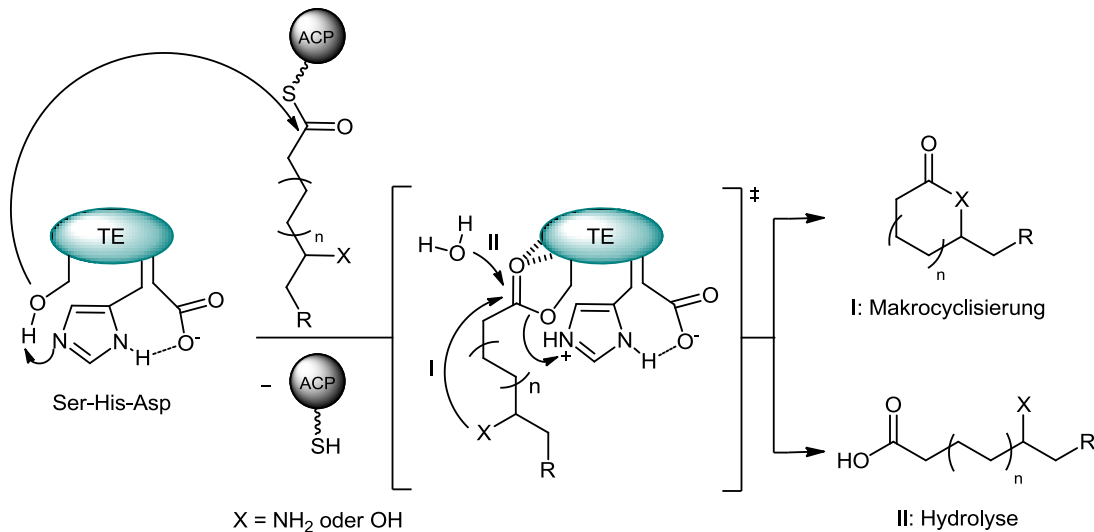


Abbildung 8: Freisetzung des Polyketids durch eine TE. Das Produkt kann entweder als Makrolacton oder -lactam (I) bzw. als freie Säure (II) erhalten werden.²⁴

Eine weitere Funktionalisierung der abgespaltenen Polyketide ist durch sogenannte „Tailoring-Enzyme“ möglich. Diese katalysieren von Oxidationsreaktionen, über Methylierungen von O-, N- oder C-Atomen, bis hin zu O-, N- oder C-Glykosylierungen.²⁵

1.1.2 Klassifizierung von Polyketidsynthasen

Polyketidsynthasen werden aufgrund von Variationen in der Biosynthese in drei Gruppen eingeteilt: Typ I-PKS, Typ II-PKS und Typ III-PKS. Bei PKS des Typs I wird zusätzlich noch unterschieden, wie häufig eine enzymatische Komponente während der Biosynthese verwendet wird, so dass eine Unterteilung in iterativ und nicht-iterativ vorgenommen wird. (Abbildung 9).^{2,9}

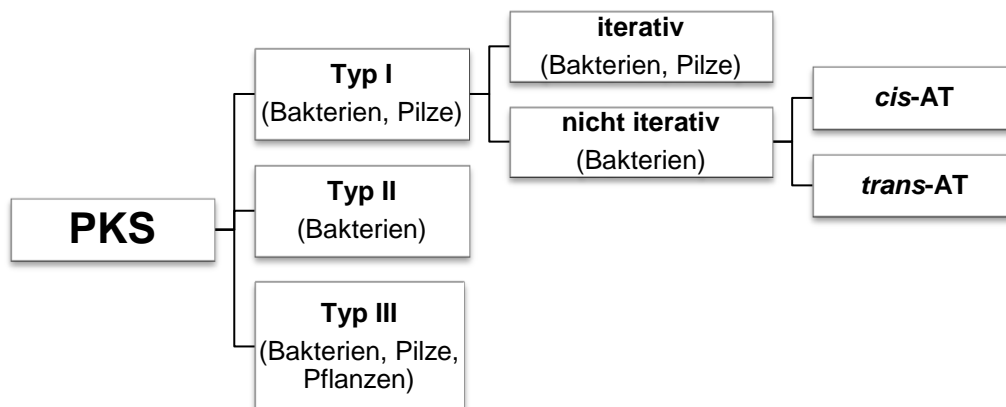


Abbildung 9: Klassifizierung von PKS.

1.1.2.1 Typ I-PKS

Typ I-PKS existieren hauptsächlich in Bakterien und Pilzen. Die modulare Anordnung der Enzyme ist sowohl den iterativen als auch den nicht-iterativen PKS gemein. Ein Modul ist aus einzelnen Domänen aufgebaut und besteht mindestens aus einer KS, einer AT und einem ACP. Weitere Beispiele für optionale Domänen sind die KR, DH, ER oder MT.

Iterativ prozessierte Polyketide werden durch das repetitive Durchlaufen eines Moduls erzeugt. Während der einzelnen Verlängerungsschritte muss jedoch nicht zwingend jede optionale Domäne des Moduls am Aufbau aktiv beteiligt sein, so dass der Reduktionsgrad der wachsenden Kette variabel ist. Der Mechanismus, nach dem Domänen bei der Verlängerung aktiv oder inaktiv sind, ist bislang noch wenig erforscht. Das cholesterinsenkende Lovastatin (**5**) ist ein Beispiel für einen pharmazeutisch wichtigen Wirkstoff, der durch iterative Typ I-PKS in *Aspergillus terreus* produziert wird (Abbildung 10).² Im ersten Schritt der putativen Biosynthese von Lovastatin (**5**) ist die PKS LovB und die *in trans* agierende ER (LovC) für die Bildung von Dihydromonacolin-L-säure (**24**) verantwortlich. Durch die TE (LovG) wird die Säure **24** von der PKS abgespalten. Bei der oxidativen Umwandlung von dem Metaboliten **24** zu Monacolin-L-säure (**25**) ist wahrscheinlich die Monooxygenase LovA beteiligt. Die zweite PKS LovF biosynthetisiert den Methylbutyrat-Rest, der unter Katalyse von LovD und Monacolin-L-säure (**25**) zu Lovastatin (**5**) umgesetzt wird.²⁶

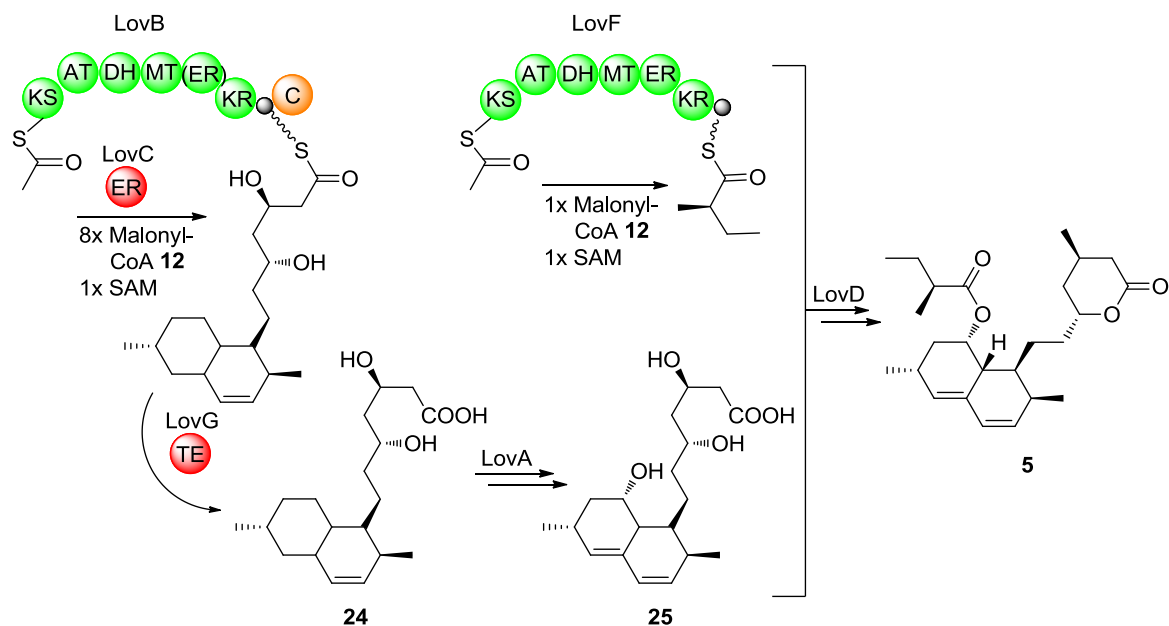


Abbildung 10: Beispiel der putativen Biosynthese von Lovastatin (**5**) durch iterative Typ-I PKS; LovB: KS-AT-DH-MT-(ER)-KR-ACP-C (C = Kondensationsdomäne, s. Abschnitt 1.2), LovC: ER, LovG: TE, LovF: KS-AT-DH-MT-ER-KR-ACP, LovA: Monooxygenase, LovD: Transesterase; ACP als schwarzer Kreis dargestellt; in Klammern: inaktive Domänen; SAM = S-Adenosylmethionin.²⁶

Nicht-iterative Typ I-PKS bestehen aus einer multimodularen Anordnung der Enzyme. In diesem Fall ist jedes aufeinander folgende Modul für den Einbau eines C_2 -Verlängerungsbausteins verantwortlich. 6-Deoxyerthronolid (6-dEB, **26**), eine Vorstufe von Erythromycin A (**1**), kann als Modell einer Synthese durch nicht-iterative Typ-I PKS gelten (Abbildung 11).^{27,28} Der strikte Zusammenhang zwischen Enzymarchitektur und der Struktur des produzierten Polyketids wurde anhand von 6-Deoxyerthronolid (**26**) eingehend untersucht. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde das Colinearitätsprinzip postuliert.²⁸ Dieses ermöglicht häufig eine Vorhersage der Struktur des Sekundärmetaboliten aufgrund der Modulabfolge der PKS. Ebenso kann anhand der Struktur des Polyketids auf die Modulordnung der PKS geschlossen werden.

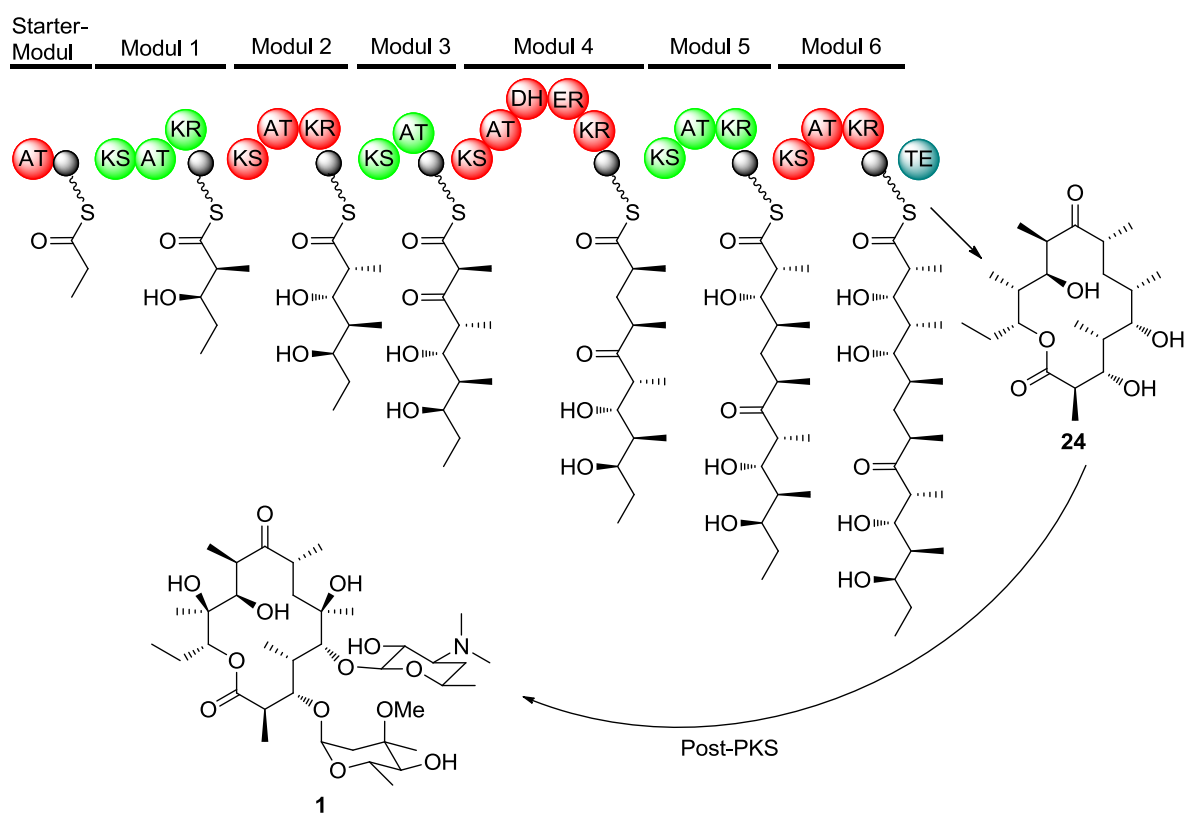


Abbildung 11: Biosynthese von Erythromycin A (**1**).

2002 wurden erstmals von *Piel et al.* modulare Typ I-PKS für ein Polyketid beschrieben, in denen die AT-Domänen nicht in den vorliegenden Modulen integriert sind.²⁹ In diesen Fällen werden die Module *in trans* durch freistehende Enzyme mit AT-Aktivität beladen. Daher wurde eine weitere Unterteilung innerhalb der nicht-iterativen Typ I-PKS in *cis*-AT und *trans*-AT vorgenommen (vgl. Abbildung 9).¹⁹ 6-dEB (**26**) (vgl. Abbildung 11) zählt zu den nicht-iterativen Typ I-*cis*-AT-PKS abgeleiteten Polyketiden. Beispiele für Sekundärmetaboliten, die durch *trans*-AT-PKS produziert werden, sind Pederin (**27**) (vgl.

Abschnitt 1.4.2) aus dem Käfer *Paederus fuscipes* und Leinamycin (**28**) aus *Streptomyces globisporus* (Abbildung 12).¹⁹

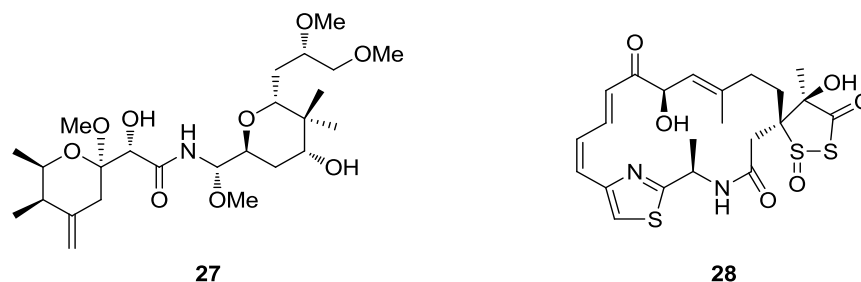


Abbildung 12: Pederin (**27**) und Leinamycin (**28**) als Beispiele für Polyketide, die durch *trans*-AT-PKS produziert werden.

Ein bemerkenswerter Unterschied von *trans*-AT-PKS zu *cis*-AT-PKS ist die große Modulvielfalt mit bislang mehr als 50 bekannten Modularchitekturen. Hingegen wurden bei *cis*-AT-PKS bisher nur acht verschiedene Modularten nachgewiesen (KS-AT-ACP, KS-AT-KR-ACP, KS-AT-DH-KR-ACP, KS-AT-DH-ER-KR-ACP und deren Analoga mit MT Domänen). Weiterhin treten in der Biosynthese von *trans*-AT-PKS ungewöhnliche Modulvariationen auf, in denen Module wiederholt durchlaufen werden oder inaktiv sind. Daher ist eine einfache Modularchitektur-Polyketidstruktur-Korrelation, wie die Colinearitätsregel bei *cis*-AT-PKS, meistens nicht möglich. Ebenso gestaltet sich die Zuordnung von Metaboliten zu den entsprechenden Genclustern häufig als schwierig.¹⁹

Phylogenetische Daten deuten darauf hin, dass sich *cis*- und *trans*-AT-PKS evolutionär unabhängig voneinander aus einfachen FAS entwickelt haben.³⁰ Anhand Untersuchungen der KS-Phylogenie von *trans*-AT-PKS wurde nachgewiesen, dass Vorhersagen zur Struktur des prozessierten Polyketids aufgrund der Substrattoleranz von KS-Domänen möglich sind. KS-Domänen gleicher Substratspezifität sind normalerweise in phylogenetischen Gruppen (Claden, wie zum Beispiel Doppelbindung, β -OH, α -verzweigt) geordnet. Aufgrund dieser Verwandtschaftsbeziehung kann anhand einer KS-Analyse der *trans*-AT-PKS das jeweilige prozessierte Intermediat vorhergesagt werden und somit auf die Struktur des produzierten Polyketid geschlossen werden.^{31,32}

1.1.2.2 Typ II-PKS

Iterative Typ II-PKS bestehen aus assoziierten Multienzymkomplexen, deren Minimalkonfiguration aus KS-ähnlichen Einheiten, KS_{α} und KS_{β} , sowie einem ACP aufgebaut sind. Als Startereinheit fungiert in der Regel Acetyl-CoA, das mit Malonyl-CoA verlängert wird.³³ Vermutlich können schon während der Biosynthese oder spätestens nach Abspaltung des Acyl-Rückgrates von der PKS weitere Modifikationen durch KR, Cyklasen, Aromatasen, Oxygenasen, Glycosyltransferasen und *N*-, *O*- und *C*-MT

aufzutreten.³⁴ Bekannte Beispiele der Typ II-PKS abgeleiteten Polyketide sind die Anthracycline Daunorubicin (**29**) und das Hydroxyderivat Doxorubicin (**30**), die als Interkalantien in der Chemotherapie eingesetzt werden (Abbildung 13).³⁵

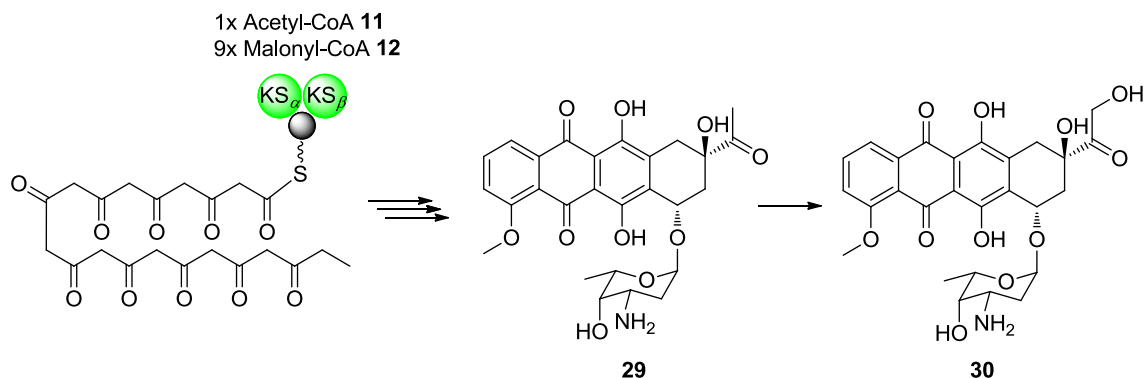


Abbildung 13: Daunorubicin (**29**)- und Doxorubicin (**30**)-vermittelte Typ II-PKS Biosynthese.

1.1.2.3 Typ III-PKS

Die iterativen Typ III-PKS werden auch Chalkon- oder Stilbensynthasen genannt. Sie liegen als homodimerer Komplex aus zwei identischen, voneinander unabhängig agierenden KS vor.³⁶ Im Gegensatz zu den Typ I- und Typ II-PKS erfolgt die Elongation ACP-unabhängig mit freien Acyl-CoA-Bausteinen. Die resultierenden Polyketide umfassen mono-, bi- und polycyclische Aromaten.³⁷ In Abbildung 14 ist beispielhaft die Biosynthese von Flaviolin (**31**) dargestellt.³⁸

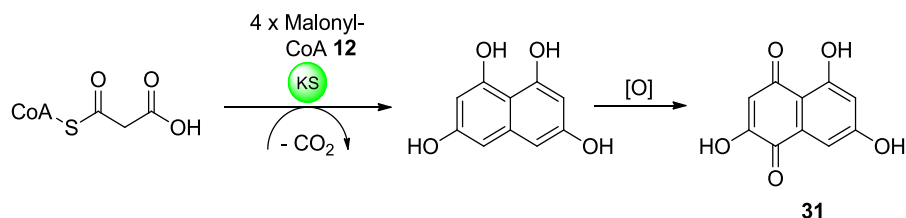


Abbildung 14: Typ III-PKS Biosynthese von Flaviolin (**31**).

1.2 Nichtribosomale Peptidsynthetasen

Eine weitere Klasse von multimodularen Riesenenzymen, wie die Typ I-PKS, sind die nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS). Zu den nichtribosomalen Peptiden (NRP) zählen hoch potente Wirkstoffe, wie zum Beispiel die Antibiotika Daptomycin (**32**), Penicillin G (**33**) oder Vancomycin (**34**) (Abbildung 15).^{39,40,41}

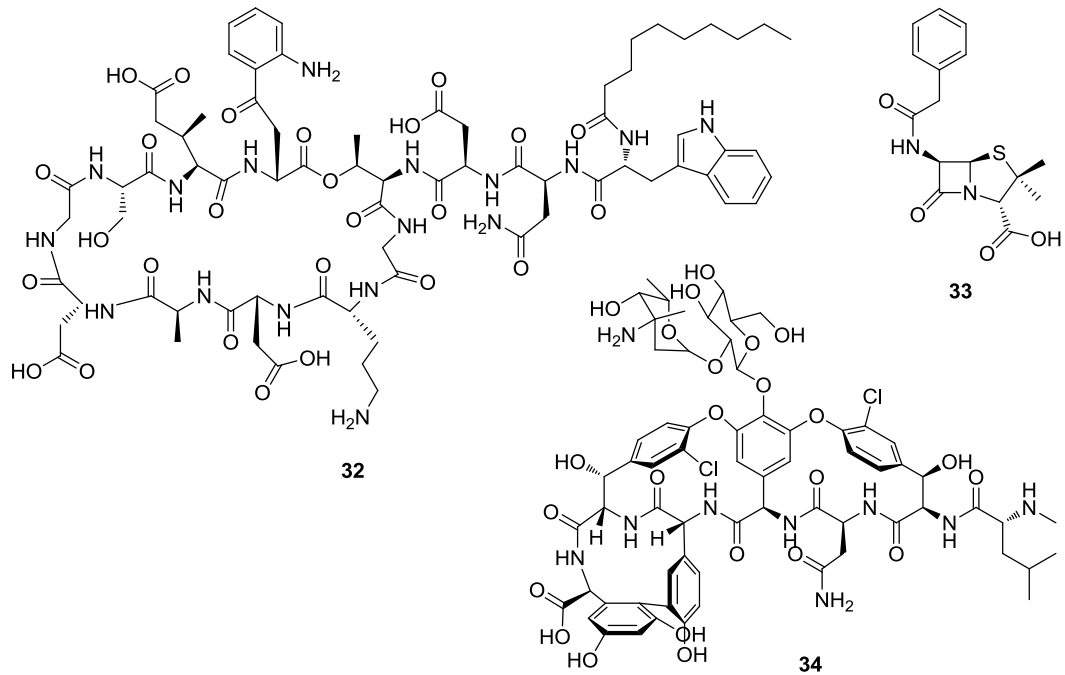


Abbildung 15: Beispiele von NRP: Daptomycin (**32**), Penicillin G (**33**), Vancomycin (**34**).

Die produzierten Sekundärmetabolite von NRPS treten in Pilzen und Bakterien auf.⁴² Bei der Biosynthese von NRP werden im Gegensatz zu ribosomalen Peptiden nicht nur proteinogene Aminosäuren, sondern zusätzlich nicht-proteinogene Aminosäuren von den NRPS verwendet. Weitere Modifizierungen durch den Einbau von Fettsäuren, Heterozyklen, Glycosyl- und Methylresten erklären die strukturelle Vielfalt von NRP.^{43,44} Der modulare Aufbau von NRPS ähnelt sehr der Architektur von Typ I-PKS. Anhand von Sequenz und Anzahl der Module innerhalb der NRPS kann auf die Abfolge und Zahl der Aminosäuren im resultierenden Polypeptid geschlossen werden. Dies entspricht wiederum einem Colinearitätsprinzip (s. Abschnitt 1.1.2.1).⁴⁵

Ein Minimalmodul von NRPS besteht aus einer Adenylierungs-Domäne (A-Domäne), einer Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne (PCP-Domäne) und einer Kondensations-Domäne (C-Domäne). Analog der ACP-Aktivierung in der PKS-Biosynthese (vgl. Abschnitt 1.1.1, Abbildung 4) wird in einer posttranslationalen Modifikation *apo*-PCP zum *holo*-PCP durch PPTase umgewandelt. Die selektive Auswahl und Aktivierung der Aminosäure erfolgt durch die A-Domäne. Unter Verbrauch von ATP (**7**) wird die Aminosäure **35** zum Aminoacyladenylat **36** aktiviert und im Anschluss auf das *holo*-PCP übertragen (Abbildung 16).

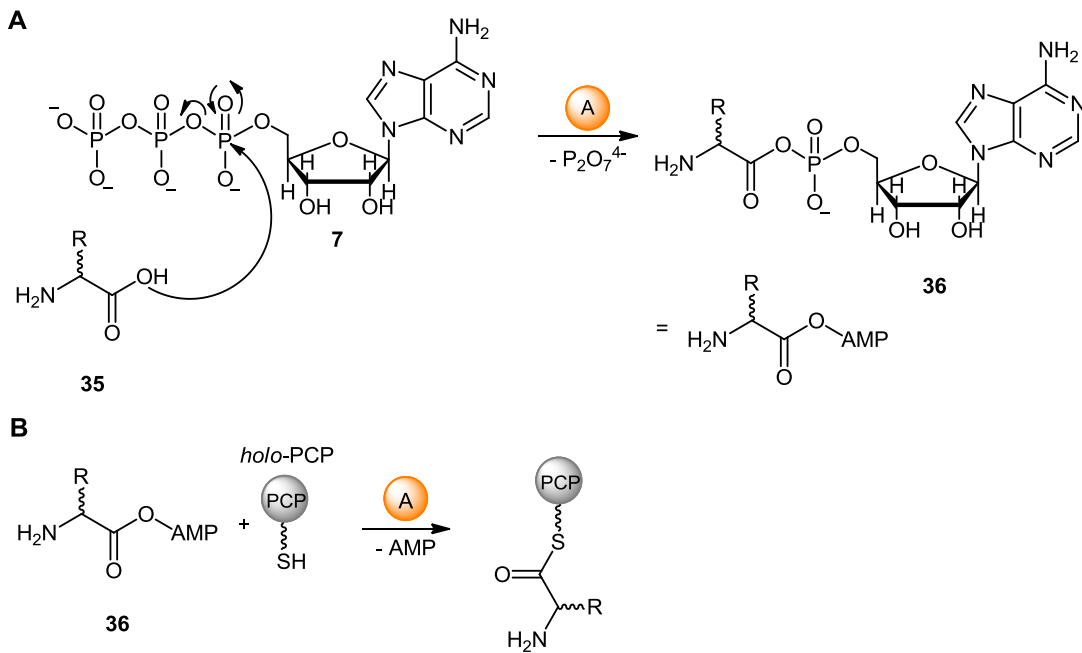


Abbildung 16: A) A-Domänen katalysierte Aktivierung einer Aminosäure **35** unter ATP-Verbrauch (**7**) zum AMP-Derivat **36**; **B)** Übertragung des AMP-Derivats **36** auf *holo*-PCP durch die A-Domäne, AMP = Adenosinmonophosphat.

Die Knüpfung der Peptidbindung zwischen zwei PCP-gebundenen Aminosäuren aufeinanderfolgender Module wird durch die C-Domäne katalysiert (Abbildung 17). Das prozessierte Polypeptid wird meistens durch eine TE als lineares Peptid oder Heterozyklus freigegeben.^{46,47}

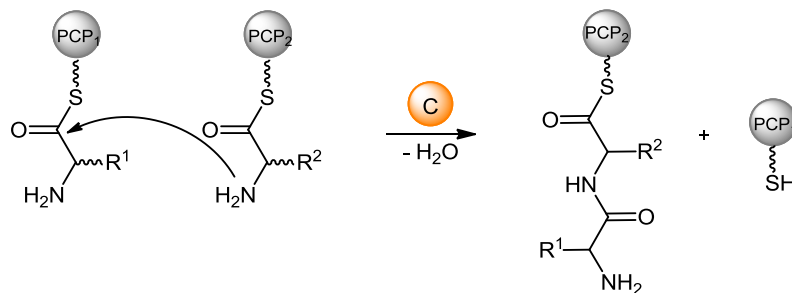


Abbildung 17: Peptidknüpfung zweier PCP-gebundenen Aminosäurebausteinen aufeinanderfolgender Module (PCP₁ und PCP₂).

Optionale Domänen, wie die Epimerisierungs-Domäne (E-Domäne), *N*-MT-, *C*-MT-, Reduktions- und Oxidations-Domänen, erhöhen die strukturelle Diversität im Peptidrückgrat.⁴⁸

1.3 NRPS/PKS-Hybride

Abgesehen von PKS und NRPS treten in der Natur auch multimodulare NRPS/PKS-Hybride auf. Die Metaboliten dieser Multienzymkomplexe zeichnen sich durch ihre komplexe Strukturvielfalt und häufig auftretende biologische Aktivität aus. Ein bekanntes

NRP/PKS abgeleitetes Hybrid ist das Immunsuppressivum Rapamycin (**3**) aus *Streptomyces hygroscopicus*. Weitere interessante Vertreter von NRPS/PKS-Hybriden sind zum Beispiel die Zytostatika, Epothilon A bzw. B (**37** bzw. **38**) sowie Bleomycin A₂ (**39**) (Abbildung 18).

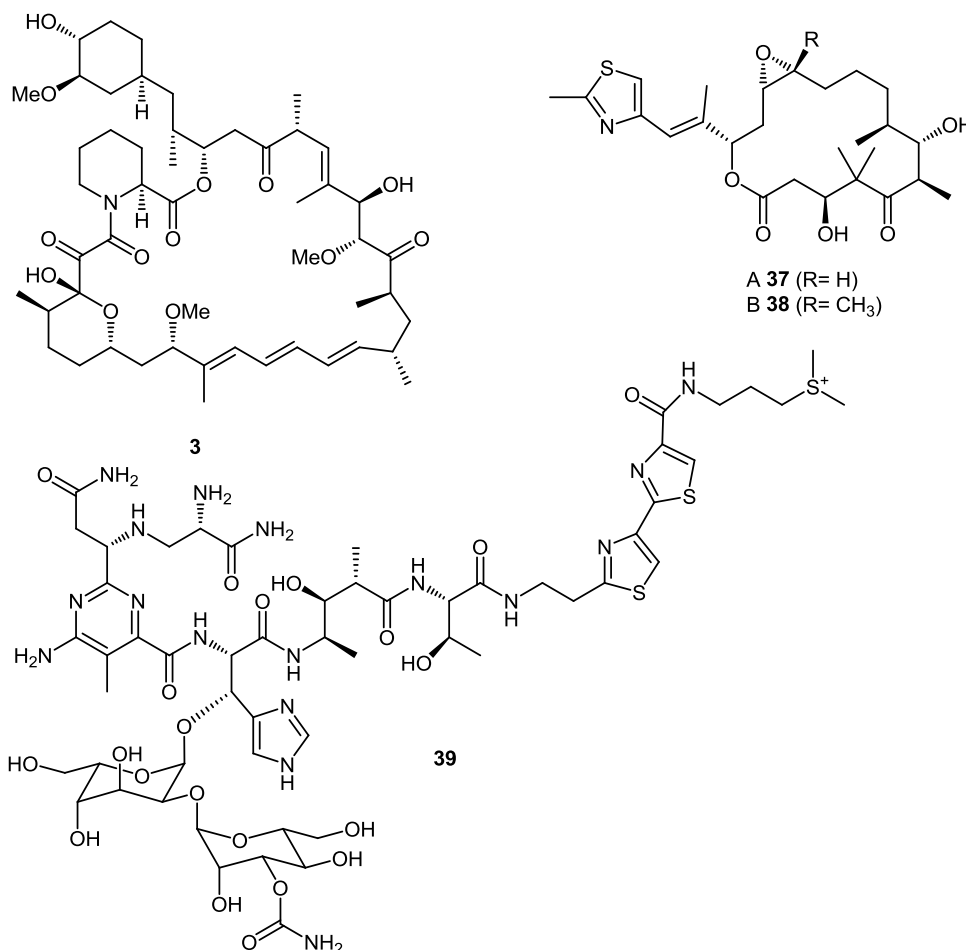


Abbildung 18: Beispiele für NRP/PK-Hybride: Rapamycin (**3**), Epothilon A (**37**, R= H) bzw. B (**38**, R= CH₃) und Bleomycin A₂ (**39**).

1.4 Biosynthesewege von Misakinolid A, Pederin und Psymberin mit putativer Pyransynthaseaktivität

Das Strukturmotiv von Tetra- oder Dihydropyranresten ist ein häufiges Merkmal in *trans*-AT abgeleiteten Polyketiden, wie zum Beispiel in Misakinolid A (**40**), Pederin (**27**), Psymberin (**41**), Bryostatin (**2**) oder Sorangicin (**42**) (Abbildung 19).

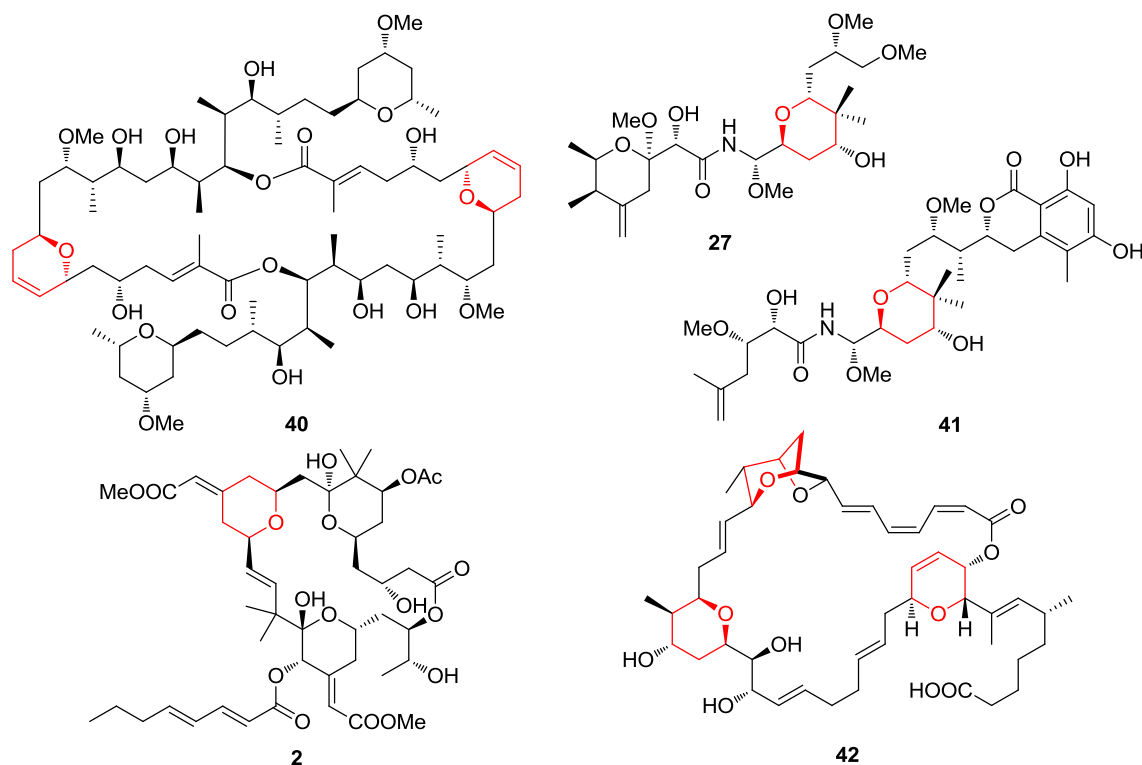


Abbildung 19: Die Polyketide Misakinolid A (**40**), Pederin (**27**), Psymberin (**41**), Bryostatin (**2**) und Sorangicin (**42**) weisen als Strukturmerkmal Tetra- oder Dihydropyranreste (rot markiert) auf, die wahrscheinlich durch eine Pyransynthese katalysiert werden.

2002 wurde erstmals die verantwortliche Domäne im Pederingencluster (s. Abschnitt 1.4.2), früher noch als DH (in Abbildung 20 mit DH* zur Verdeutlichung dargestellt) bezeichnet, charakterisiert.²⁹ Das *trans*-AT-PKS-Enzym PedF weist in Modul 7 die Domänenabfolge KS-DH-DH*-KR-ACP auf. Als putativer Mechanismus wurde vorgeschlagen, dass zunächst die KR-Domäne die Ketofunktion zum Alkohol reduziert. Im Anschluss katalysiert eine konventionelle DH-Domäne die Abspaltung von Wasser zum α,β -ungesättigten Intermediat. Die zweite DH*-Domäne könnte dann für die Bildung des Ringschluss durch den Angriff einer ζ -OH-Gruppe auf das Michael-Akzeptorsystem verantwortlich sein. Alle Biosynthesewege der *trans*-AT-PKS abgeleiteten Polyketide in Abbildung 19 weisen die Domänenabfolge KS-DH-DH*-KR-ACP analog des Pederingenclusters auf und besitzen diese spezielle Domäne. Die Arbeitsgruppe um Haygood bezeichnete die Domäne bei der Untersuchung des Bryostatin-PKS-Genclusters als Pyransynthese (PS)-Domäne.⁴⁹ Diese Bezeichnung wird im Folgenden verwendet.

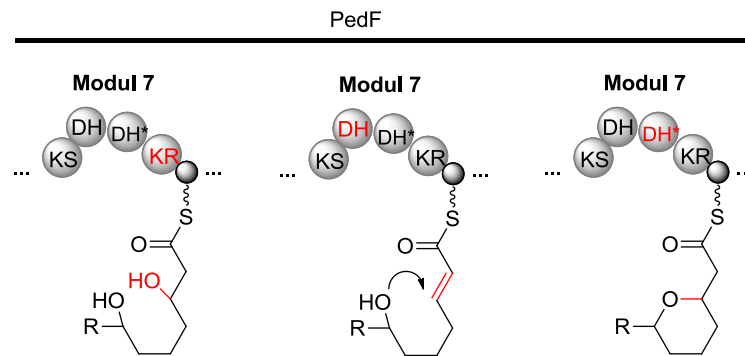


Abbildung 20: Postulierte Bildung des Pyranrings am Beispiel der Pederin-PKS. Die Teilschritte der einzelnen Domänen sind farbig hinterlegt.

In der Biosynthese des Makrolactons Nonactin (**45**) ist ebenfalls eine funktionell PS-ähnliche Domäne involviert, diese ist allerdings auf einem separaten Gen *nonS* kodiert und agiert vermutlich erst nach der Bildung der Polyketidkette (Abbildung 21). Aus Acetyl (**11**)- und/oder Malonyl (**12**)- und Succinat-CoA werden mithilfe einer Typ II-PKS die Intermediate (**43**) und *ent*-(**43**) gebildet. Die PS-ähnliche Domäne katalysiert den Angriff der ϵ -Hydroxyfunktion auf das α,β -ungesättigte System und bildet in diesem Fall anstatt eines Sechsrings die Fünfringe des Nonactats (**44**) und *ent*-(**44**) aus. Jeweils zwei Einheiten (**44**) und *ent*-(**44**) generieren Nonactin (**45**).^{50,51}

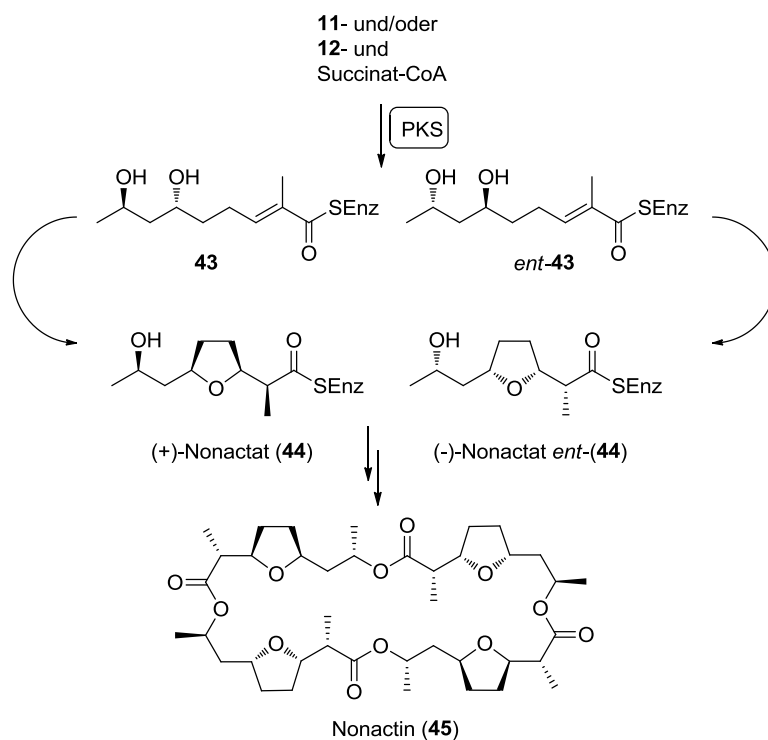


Abbildung 21: Postulierter Mechanismus der Bildung von (+)-Nonactat (**44**) und (-)-Nonactat *ent*-(**44**) katalysiert durch eine funktionell PS-ähnliche Domäne.

1.4.1 Misakinolid A – Biosynthese

Das cytotoxische Polyketid Misakinolid A (**40**) wurde aus dem marinen Schwamm *Theonella swinhoei* (Chemotyp WA) isoliert.⁵² Der Produzent von Misakinolid A (**40**) war zu Beginn dieser Arbeiten noch nicht bekannt. In kürzlich durchgeführten Studien wurde unter Verwendung von Single-Cell-Analysen und metagenomischen Untersuchungen des Schwamms *T. swinhoei* (Chemotyp Y) die Bakterien der Gattung *Entotheonella* als Naturstoffproduzenten unter anderem von Onnamid A (**46**) und Polytheonamid A (**47**) bzw. B (**48**) nachgewiesen (Abbildung 22).⁵³

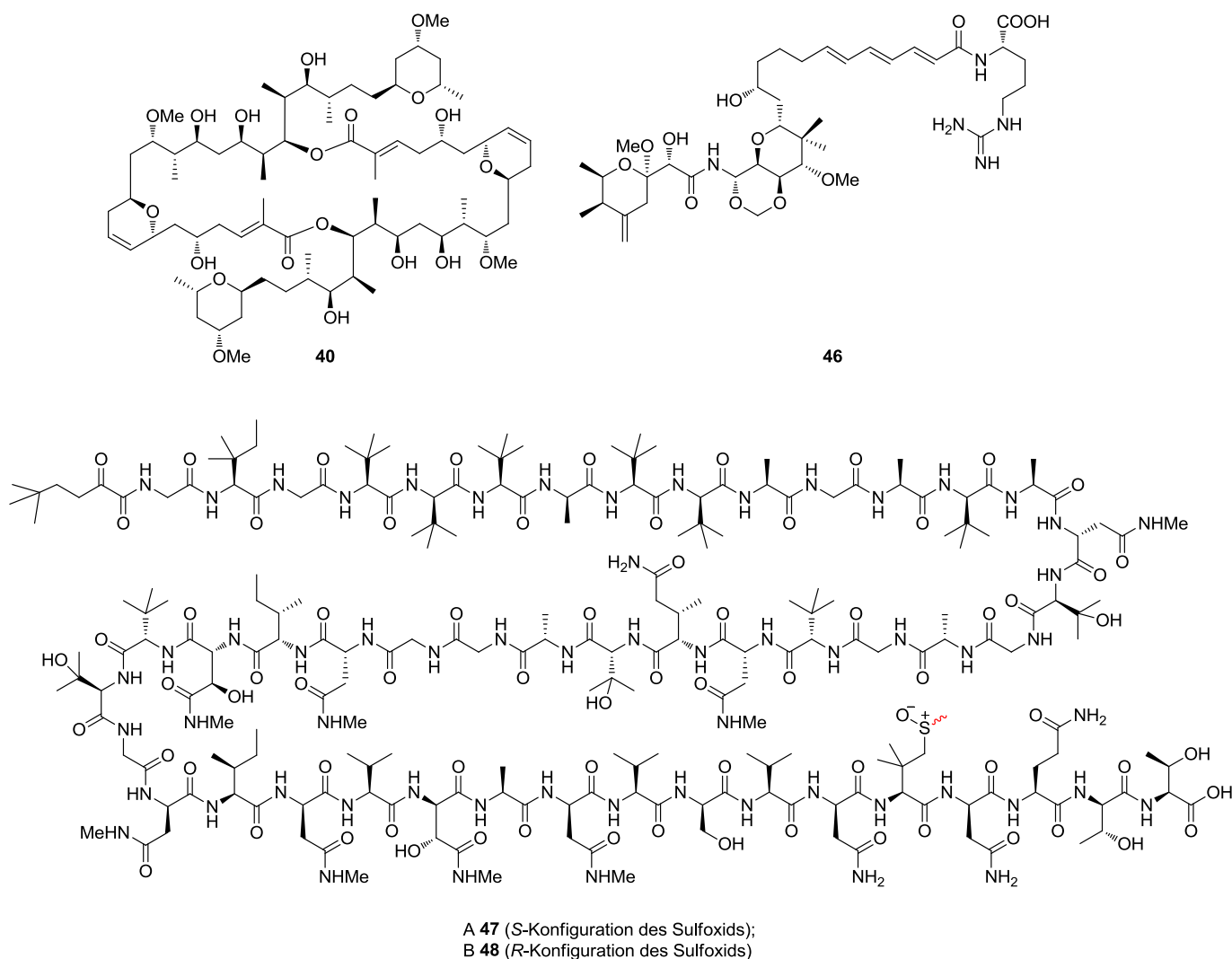


Abbildung 22: Marine Naturstoffe aus dem Steinschwamm *Theonella swinhoei*: Misakinolid A (**40**), Onnamid A (**46**) und Polytheonamid A (**47**) und B (**48**) (rot markiert: S-Konfiguration des Sulfoxids = Polytheonamid A (**47**); R-Konfiguration des Sulfoxids = Polytheonamid B (**48**)).

Dr. Agustinus Uria aus der AG Piel isolierte zunächst den vermuteten *trans*-AT-PKS-Gencluster von Misakinolid A (**40**) aus dem Metagenom des Schwamms *T. swinhoei* (Chemotyp WA) (Abbildung 23).⁵²

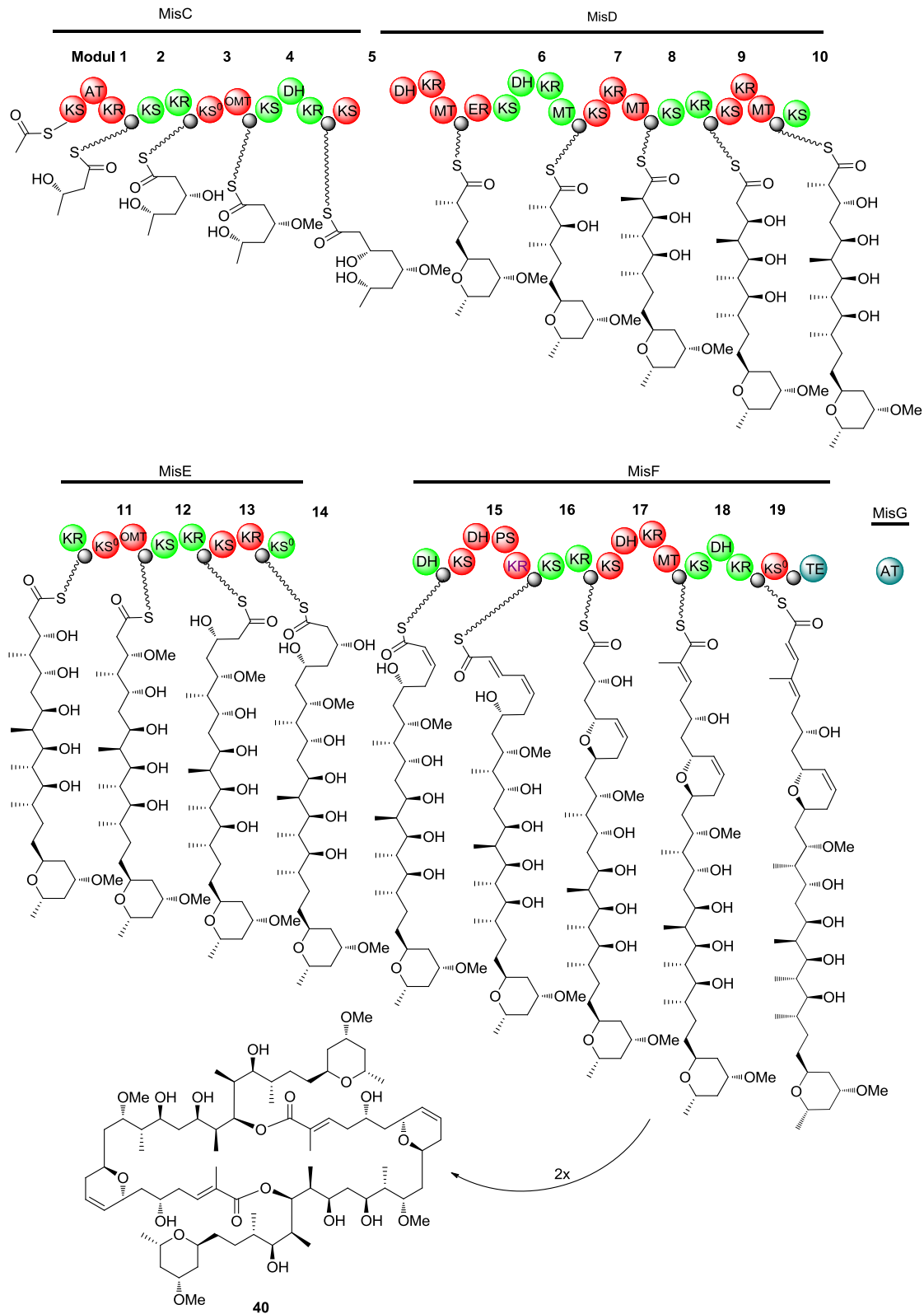


Abbildung 23: Putative Biosynthese von Misakinolid A (**40**); zur Unterscheidung der einzelnen Module wurden sie abwechselnd in grün und rot dargestellt, kleine schwarze Kreise ohne Beschriftung repräsentieren ACP.

Eine Beteiligung des Genclusters an der Biosynthese von Misakinolid A (**40**) war anhand der Modularchitektur der PKS wahrscheinlich und wurde kürzlich durch die Identifikation

des Produzenten innerhalb der metagenomischen DNA des Schwammes *T. swinhoei* (Chemotyp WA) bewiesen. Bei dem Symbionten handelt es sich um ‘*Candidatus Entotheonella factor*’ TSY1 / Phylum ‘Tectomicrobia’.⁵⁴ An dem putativen Biosyntheseweg von Misakinolid A (**40**) sind fünf *trans*-AT Typ I-PKS-Enzyme (MisC-MisG) beteiligt, wobei es sich bei MisG um die freistehende AT-Domäne handelt. Insgesamt ist die Biosynthese in 19 Module unterteilt. Ausgehend von Acetyl-CoA (**11**) wird das Polyketid-Monomer bis Modul 17 prozessiert und im Anschluss findet eine Dimerisierung mittels Makrolactonisierung zweier Intermediate statt. Modul 18 ist höchstwahrscheinlich inaktiv. In Modul 15 von MisF befindet sich die putative PS-Domäne, die vermutlich für die Bildung des Dihydropyranrings verantwortlich ist.

1.4.2 Pederin – Biosynthese

Pederin (**27**), ein hoch antitumoraler Wirkstoff und Namensgeber der Pederinfamilie, wurde erstmals 1952 aus den Käfern der Gattungen *Paederus* und *Paederidus* extrahiert.⁵⁵ Der eigentliche Produzent des Pederins (**27**) ist ein bakterieller Symbiont der Käfer.^{29,56} Weitere Vertreter dieser Familie sind das schon gezeigte Onnamid A (**46**) und Psymberin (**41**) (Abbildung 24).

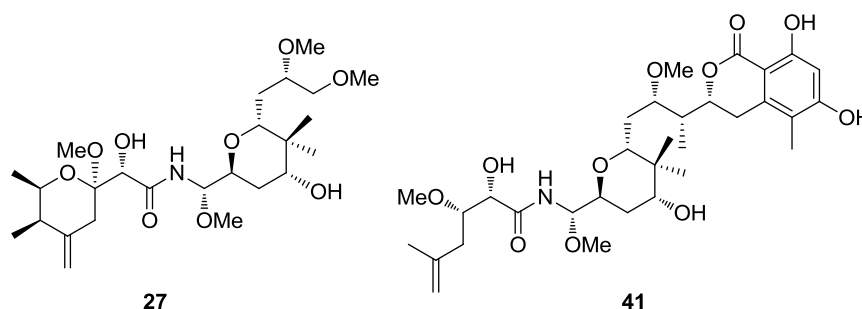


Abbildung 24: Vertreter der Pederinfamilie: Pederin (**27**) und Psymberin (**41**).

Die postulierte *trans*-AT-PKS/NRPS-Biosynthese von Pederin (**27**) wurde mithilfe metagenomischen DNA-Screenings von *Paederus fuscipes* und Sequenzierung des Symbiontengenoms weitestgehend analysiert (Abbildung 25).^{29,57,58} Es existieren drei voneinander getrennte Gencluster (*pedA-pedH*, *pedI-pedK* und *pedL-pedR*) innerhalb des Genoms, die ein Beispiel für nicht geclusterte Gene einer PKS darstellen.⁵⁸ Erstaunlicherweise schien zunächst das prozessierte Produkt **49** des letzten Enzyms PedH der Biosynthese in keiner Verbindung zu dem gesuchten Naturstoff zu stehen. Bei genauerer Betrachtung allerdings zeigte sich eine große strukturelle Analogie zu Onnamid A (**46**), das wie bereits erwähnt, ebenfalls der Pederinfamilie angehört. Deshalb wird eine nahe Verwandtschaft beider Biosynthesewege vermutet. Aufgrund der Biosynthese ergeben sich zwei alternative Hypothesen, wie Pederin (**27**) generiert wird. Entweder wird die Biosynthese bis zum Ende von PedF durchlaufen und im Anschluss

findet eine oxidative Spaltung in einer Baeyer-Villiger-Oxidation durch PedG (FAD-abhängige Monooxygenase) zum Intermediat **49** statt oder das Enzym PedH nimmt an der Biosynthese teil. Durch die TE-Domäne von PedH wird dann das Intermediat (**50**) freigesetzt, das ebenfalls durch PedG in einer Baeyer-Villiger-Oxidation zur Zwischenstufe **49** umgesetzt wird. Durch abschließende Methylierung wird das gewünschte Polyketid Pederin (**27**) erhalten.

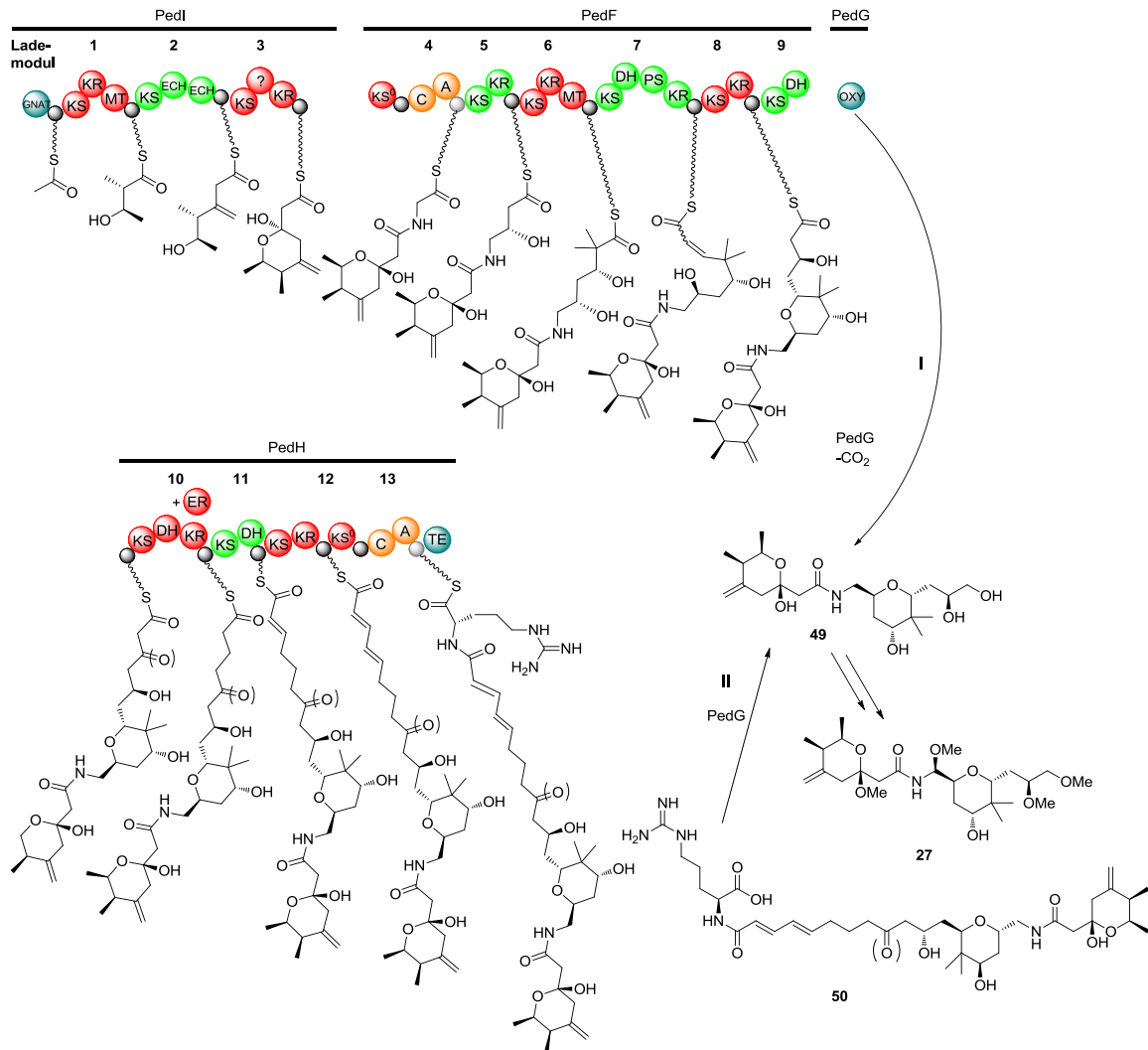


Abbildung 25: Postulierter Biosyntheseweg von Pederin (**27**) durch ein PKS/NRPS Hybrid. Zwei hypothetische Wege führen zur Bildung von Pederin (**27**). **I:** Biosynthese bis zum Intermediat von Modul PedF mit anschließender oxidativer Spaltung durch PedG (FAD-abhängige Monooxygenase) zu Produkt **49**; **II:** Komplette Biosynthese über PedH zu dem Intermediat **50** mit anschließender oxidativer Spaltung durch PedG zum Derivat **49** und anschließender Umwandlung in Pederin (**27**); zur Unterscheidung der einzelnen Module von PKS wurden sie abwechselnd in grün und rot dargestellt, orange Domänen zählen zu den NRPS, kleine schwarze Kreise ohne Beschriftung repräsentieren ACP.

Bei dem Lademodul in der Pederinbiosynthese handelt es sich um eine GCN5-verwandte *N*-Acetyltransferase (GNAT). Diese besondere Domäne tritt auch in anderen PKS auf, wie zum Beispiel in den Biosynthesewegen von Psymberein (**41**), Onnamid A (**46**) oder Curacin A (**51**) (Abbildung 26).

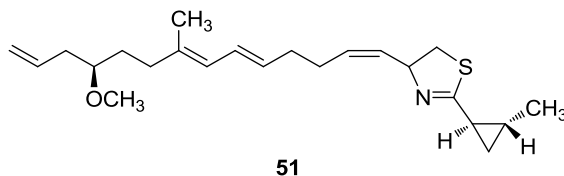


Abbildung 26: PKS/NRPS-Hybrid Curacin A (**51**).

Anhand von Untersuchungen der GNAT im Curacin A-Gencluster wurde gezeigt, dass die Enzyme die Übertragung von Acetyl-CoA (**11**) auf ACP ermöglichen. Auch Malonyl-CoA-Einheiten **12** können von GNAT unter Decarboxylierung in das Substrat **11** umgewandelt werden und so als Startereinheit für die Biosynthese genutzt werden.⁵⁹ Die große Ähnlichkeit dieser GNAT-Domäne mit den GNAT-Domänen der Pederinbiosynthese lässt vermuten, dass sie dieselbe Funktion ausführen.

Eine weitere interessante Domänenabfolge, bestehend aus einer KS und zwei aufeinanderfolgenden Enoyl-CoA-Hydratasen-Domänen (ECH oder Crotonase (CR) genannt) sowie einer ACP-Domäne, ist in Modul 2 des PedI-Enzyms lokalisiert. In Verbindung mit einem 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Synthase-ähnlichen Enzym (HMGS) konnte in früheren Studien der Bacillaen- und Curacin-A-Biosynthese belegt werden, dass die beteiligten Enzyme für die Umwandlung einer Ketofunktion in eine Kohlenstoffseitenkette verantwortlich sind.^{60,61}

Die Ausbildung dieser sogenannten β -Verzweigungen ist ein häufiges Strukturmerkmal in *trans*-AT-PKS prozessierten Polyketiden und verläuft über einen mehrstufigen Mechanismus (Abbildung 27). Zunächst wird Malonyl-CoA (**12**) durch eine AT auf ein freistehendes ACP-Protein übertragen. Eine freistehende, nicht verlängernde KS-Domäne katalysiert eine Decarboxylierung zu Acyl-ACP. Eine HMGS-vermittelte Aldolreaktion zwischen der wachsenden Kette und Acyl-ACP ergibt das β -Hydroxysäureintermediat **52**. Durch abschließende ECH-katalysierte Grob-Fragmentierung entsteht im Falle der Pederin- und Psymberinbiosynthese eine Exomethylengruppe. Im Gegensatz zu der Bacillaenbiosynthese treten zusätzlich zu einer freistehenden ECH zwei integrierte ECH im PKS-Gencluster von Pederin (**27**) und Psymberin (**41**) auf.

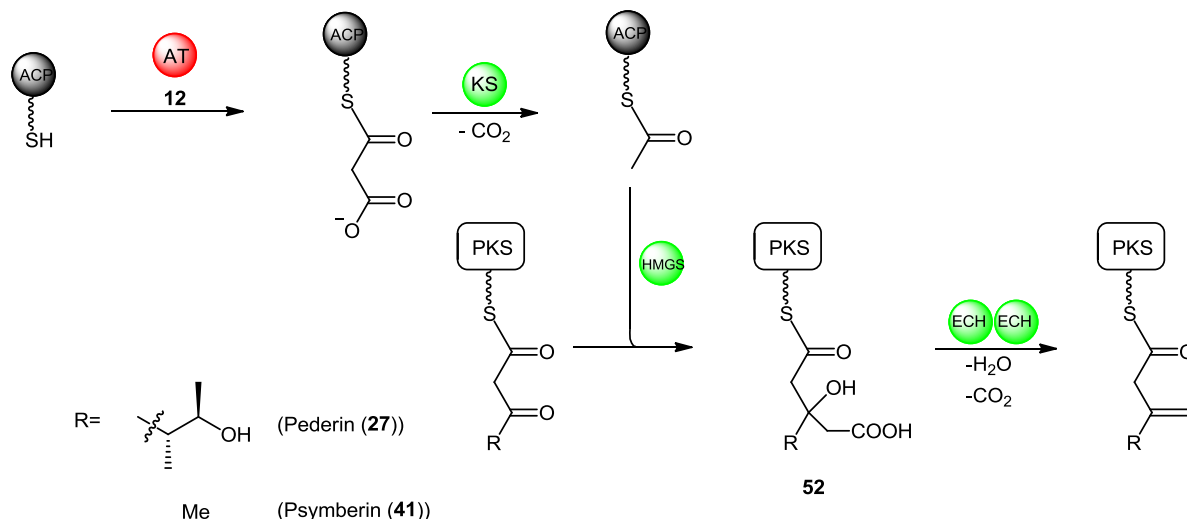


Abbildung 27: Mechanismus der β -Verzweigung in der Pederin- und Psymberinbiosynthese (vgl. Abschnitt 1.4.3, Abbildung 28).⁶⁰

Eine weitere interessante Domänenabfolge (KS-DH-PS-KR-ACP) der postulierten Biosynthese von Pederin (**27**) liegt in dem Enzym PedF vor (vgl. Abbildung 25). Vermutlich katalysiert eine Pyransynthase den Ringschluss, beim dem ein Angriff der Hydroxyfunktion auf das Michaelakzeptorsystem erfolgt.

1.4.3 Psymberin – Biosynthese

Psymberin (**41**), auch Irciniastin A genannt, wurde 2004 aus den Schwämmen der Gattungen *Psammocinia* aff. *bulbosa* und *Ircinia* *ramosa* von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen um Crews und Pettit isoliert.^{62,63} Der Naturstoff **41** besitzt eine hochselektive, zytostatische Wirkung gegen verschiedene Krebszelllinien. Die biologische Aktivität ist anhand Studien analoger Strukturen des Psymberins (**41**) wahrscheinlich vor allem der Dihydroisocoumarin-Einheit zuzuschreiben.⁶⁴ Der verantwortliche Produzent des PKS/NRPS-Hybrids ist ein symbiontisches Bakterium der Schwämme.⁶⁵ Anhand eines metagenomischen Ansatzes wurde der Psymberingencluster isoliert, da eine Kultivierung der Bakterien im Labor derzeit noch nicht möglich ist.⁶⁵ Die putative Psymberinbiosynthese beinhaltet zwei PKS-Enzyme PsyA und PsyD (Abbildung 28). PsyD ist mit zehn Modulen bislang eines der größten PKS/NRPS-Proteine. Die Besonderheiten der Psymberinbiosynthese, wie das GNAT-Lademodul und die β -Verzweigungskassette in PsyA, sowie die PS-Domäne in PsyD wurden in Abschnitt 1.4.2 erläutert.

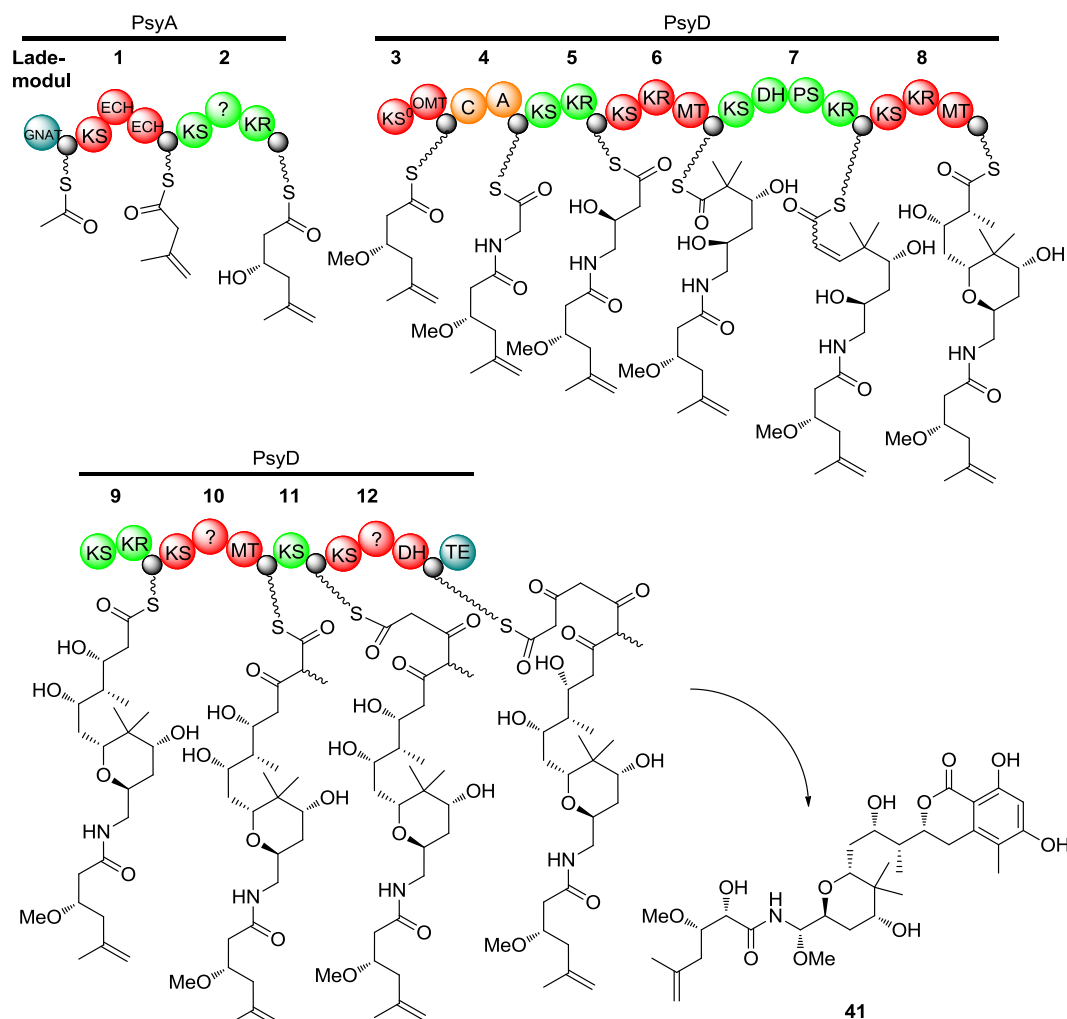


Abbildung 28: Postulierter Biosyntheseweg des Psymberins (**41**); zur Unterscheidung der einzelnen Module von PKS wurden sie abwechselnd in grün und rot dargestellt, orange Domänen zählen zu den NRPS, kleine schwarze Kreise ohne Beschriftung repräsentieren ACP.

1.5 Herkunft und Vorkommen der Bakteriengattungen *Serratia* und *Dickeya*

Die Bakteriengattung *Serratia* umfasst eine Gruppe Gram-negativer, peritrich begeißelter, fakultativ anaerober Stäbchenbakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Die Verbreitung von *Serratia*-Bakterien ist ubiquitär. So wurden Bakterien im Wasser, in und auf dem Erdboden, in Pflanzen, Insekten und Nahrungsmitteln entdeckt. Bislang wurden 15 Spezies der Gattung *Serratia* isoliert.⁶⁶ Ein bekannter Vertreter ist *S. marcescens*, das wie auch andere *Serratia*-Arten (z.B. *S. rubidaea* und *S. plymuthica*) in den Zellen einen roten Farbstoff, das Prodigiosin, bildet.⁶⁷ *S. odorifera* wurde erstmals 1987 von Grimont *et al.* charakterisiert.⁶⁸ Der Stamm *S. odorifera* 4Rx13 wurde von Berg *et al.* aus der Rhizosphäre des Winterraps, *Brassica napus* L. ssp. *Oleifera*, isoliert und erlangte in den letzten Jahren besondere Aufmerksamkeit durch die Emission von flüchtigen organischen Verbindungen (VOC,

engl.: Volatile organic compounds). Diese Naturstoffe wechselwirken mit Pflanzen, Pilzen, sowie anderen Bakterien und können sowohl positiv als auch negativ das Wurzel- und somit das Pflanzenwachstum beeinflussen. Beispielsweise wurde eine wachstumshemmende Wirkung auf *Arabidopsis thaliana* durch VOCs von *S. odorifera* beobachtet.⁶⁹ Ebenso wurde das Myzelwachstum des pflanzenpathogenen Pilzes *Rhizoctonia solani* inhibiert.⁷⁰ Kürzlich durchgeführte Untersuchungen der 16S-rRNA-Sequenzen verschiedener *Serratia*-Spezies ergaben, dass der Stamm 4Rx13 nicht wie bisher angenommen in der Clade *S. odorifera* eingeordnet wird, sondern der Gruppe *S. plymuthica* angehört, so dass im Folgenden von *S. plymuthica* 4Rx13 gesprochen wird.⁷¹

Anhand 16S-rRNA Analysen wurde 1995 eine Reklassifizierung der Stämme *Pectobacterium chrysanthemi* und *Brenneria paradisiaca* vorgenommen und die neue Bakteriengattung *Dickeya* gebildet. Neben *D. chrysanthemi* und *D. paradisiaca* wurden sechs weitere Spezies, *D. dadantii*, *D. dianthicola*, *D. dieffenbachiae*, *D. zaeae*, *D. solani* und *D. aquatica*, identifiziert.^{72,73,74} Bei der Bakteriengattung *Dickeya* handelt es sich, wie auch die Gattung *Serratia*, um Gram-negative, peritrich begeißelte, fakultative Anaerobier der Familie der *Enterobacteriaceae*. *D. dadantii* und die meisten anderen *Dickeya*-Spezies haben eine phytopathogene Wirkung auf viele Nutz- und Zierpflanzen, wie Kartoffeln, Mais, Nelken und Chrysanthemen. Die Erreger sind durch verschiedene Mechanismen in der Lage Pflanzen zu kolonisieren. Zum einen kann die pflanzliche Zellwand durch Pektinasen abgebaut werden, zum anderen können antimikrobielle Substanzen, die die Pflanzen freisetzen, inhibiert werden.^{75,76} Als Folge der Kolonisierung durch *D. dadantii* ist die systematische Nekrose unter der englischen Bezeichnung „soft rot disease“ kennzeichnend.⁷⁷ Da das Genom vollständig sequenziert ist, wird *D. dadantii* in Studien der Bakterien-Wirtspflanzen-Interaktion verwendet.⁷⁸

Ein bioinformatischer Vergleich der Genomsequenzen (AG Piel) von *D. dadantii* Ech703 und *S. plymuthica* 4Rx13 mithilfe eines *genome mining*-Ansatzes (vgl. Abschnitt 1.1.1) ergab, dass beide Bakterienstämme einen architekturell identischen *trans*-AT-PKS-Gencluster enthalten. Daher wird vermutet, dass dieser Gencluster kein evolutives Relikt ist, sondern einen Metaboliten produziert, der eine wichtige Aufgabe im Stoffwechsel der Organismen erfüllt. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von *Serratia* und *Dickeya* zu *E. coli* besteht das Potential beide Bakterienstämme als Modellgattungen für *trans*-AT-PKS-Gencluster zu nutzen. Die etablierten genetischen Methoden für *E. coli* könnten so auf die Modelle übertragen werden und zu einem besseren Verständnis von *trans*-AT-PKS-Systemen beitragen.

1.5.1 Postulierte Biosynthese des Polyketids aus dem Biosyntheseweg von *S. plymuthica* 4Rx13 und *D. dadantii* Ech703

Der putative Biosyntheseweg von *S. plymuthica* 4Rx13 und *D. dadantii* Ech703 wurde mittels bioinformatischer Untersuchungen von Prof. Piel hervorgesagt (Abbildung 29). Wie bereits in Abschnitt 1.1.2.1 erwähnt, ist die Analyse von *trans*-AT-PKS-Genclustern aufgrund der Vielfalt an Modulvariationen schwierig. In diesem Fall treten ein bislang unbekanntes Lademodul, eine Vielzahl von neuen Domänentypen, wiederholende Domänenanordnungen und ein neuer Terminus auf. Selbst mit den von Piel *et al.* entwickelten Methoden zur Vorhersage von *trans*-AT-PKS konnte die Struktur des Metaboliten zu diesem Zeitpunkt noch nicht zweifelsfrei postuliert werden.³⁰

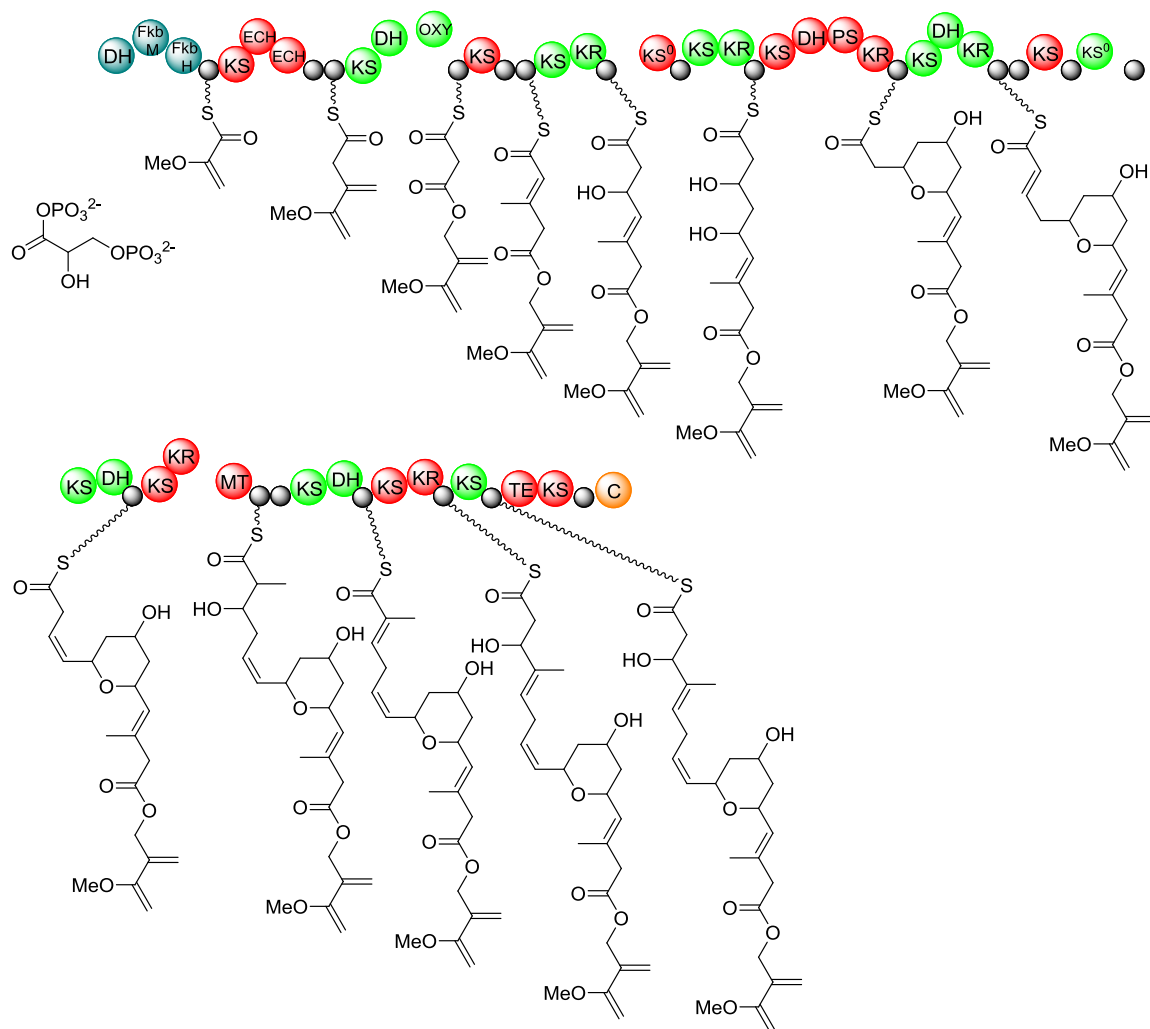


Abbildung 29: Postulierter *trans*-AT-PKS-Biosyntheseweg von *S. plymuthica* 4Rx13 und *D. dadantii* Ech703; zur Unterscheidung der einzelnen Module von PKS wurden sie abwechselnd in grün und rot dargestellt, orange Domänen zählen zu den NRPS, kleine schwarze Kreise ohne Beschriftung repräsentieren ACP.

Die Biosynthese beginnt putativ mit einem architekturell einzigartigen Lademodul bestehend aus DH-O-MT (FkbM)-AT (FkbH) (Abbildung 30). Als Startereinheit der

FkbH-Domäne fungiert wahrscheinlich das gemischte Säureanhydrid 1,3-Bisphosphoglycerat **55** aus dem Primärmetabolismus.⁷⁹ Die Aktivierung durch ACP liefert einen 2,3-Dihydroxypropylthioester **56**, der durch die O-MT in α -Position zu dem Zwischenprodukt **57** methyliert wird. Die DH-Domäne katalysiert die Bildung der Doppelbindung unter Eliminierung von Hydrogenphosphat zu dem Produkt **58**.¹⁹

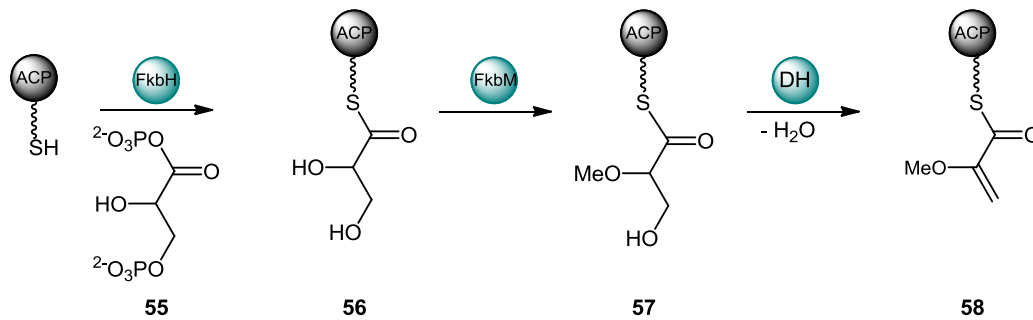


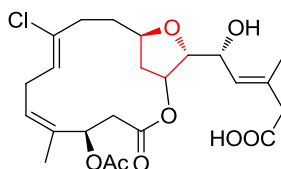
Abbildung 30: Putativer Mechanismus des Lademoduls aus der *trans*-AT-PKS von *S. plymuthica* 4Rx13 und *D. dadantii* Ech703.

Ein weiteres interessantes Merkmal des PKS-Genclusters ist das wiederholte Auftreten von Tandem-ACPs. Für diese direkt aufeinanderfolgenden ACPs wird angenommen, dass die Aufenthaltszeit der Polyketidintermediate an dem jeweiligen Enzym verlängert wird, so dass externe Proteine mit dem Substrat wechselwirken können.⁸⁰ Im zweiten Modul befindet sich eine β -Verzweigungskassette, wie sie auch im Pederin- oder Psymberingencluster (s. Abschnitt 1.4.2, Abbildung 27) beobachtet wird. Diese ist vermutlich für die Einführung der Exomethylengruppe in β -Position verantwortlich. Des Weiteren codiert der Gencluster im dritten Modul eine Oxygenase, für die in Analogie zu PedG im Pederingencluster (Abbildung 25) eine Baeyer-Villiger-Oxidation-Aktivität vermutet wird. Auch in diesem *trans*-AT-PKS-Gencluster wird die Domänenabfolge KS-DH-PS-KR-ACP beobachtet, wie bereits in Abschnitt 1.4 erwähnt. Die PS ist wahrscheinlich für die Ausbildung eines Ringsystems in Modul 8 verantwortlich. Das letzte Modul der Biosynthese mit der Domänenanordnung TE-KS-ACP-C ist bislang einmalig. Normalerweise spaltet die TE-Domäne das fertige Polyketid von der PKS (vgl. Abschnitt 1.1.1, Abbildung 8). Die Funktionen der nachfolgenden Domänen konnten mit heutigen bioinformatischen Methoden noch nicht analysiert werden.

2 Zielsetzung

2.1 Untersuchung der PS-Domänen in *trans*-AT Polyketidsynthasen

Eine Besonderheit von *trans*-AT-PKS ist die enorme Modulvielfalt in den Biosynthesewegen. Dabei werden Modulararten beobachtet, in denen ungewöhnliche Domänen auftreten, Module iterativ verwendet werden oder inaktiv sind. Zu dem ersten Beispiel zählen die postulierten Pyransynthese-Domänen. Diese bislang noch nicht untersuchten Domänen treten in einer Vielzahl von *trans*-AT-Biosynthesewegen auf, wie Bryostatin (**2**), Pederin (**27**), Misakinolid A (**40**), Psymberin (**41**) oder Sorangicin (**42**). Die Polyketide **2**, **27**, **40**, **41** und **42** (vgl. Abbildung 19), in deren Biosynthese eine charakteristische Anordnung der Domänen (KS-DH-PS-KR-ACP) vorliegt, weisen als cyclisches Strukturmotiv einen Tetra (THP)- oder Dihydropyranring (DHP) auf. Weiterhin wurde während der Promotionsarbeiten bekannt, dass es sich bei dem gesuchten Polyketid der *Dickeya dadantii*- und *Serratia plymuthica*-Gencluster um Oocydin A (**59a**) (Abbildung 31, vgl. Ergebnis- und Diskussionsteil Abschnitt 3.3.1) handelt. Auch diese Gencluster enthalten die gleiche Domänenabfolge. Hier allerdings ist das Strukturmerkmal des Macrocyclus' **59a** nicht, wie bei den anderen Naturstoffen **2**, **27**, **40**, **41** und **42** ein THP- oder DHP,- sondern ein Tetrahydrofuranring.



59a

Abbildung 31: Struktur von Oocydin A (**59a**). Als Strukturmerkmal liegt ein Furanring (markiert in rot) vor, der wahrscheinlich durch eine Pyransynthese katalysiert wird.

Wie in Abbildung 32 dargestellt, beginnt der postulierte Mechanismus der Ringbildung mit der Reduktion der Ketofunktion zum Alkohol. Im Anschluss wird das Intermediat unter Katalyse einer DH-Domäne zum α,β -ungesättigten Thioester umgewandelt. Eine PS-Domäne soll dann für den intramolekularen Angriff einer ζ - bzw. ε -OH-Gruppe auf die β -Position im Michael-Akzeptorsystem verantwortlich sein.¹⁹

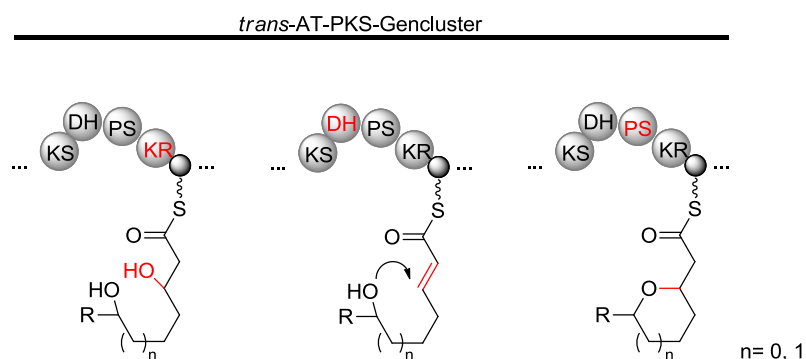


Abbildung 32: Putativer Mechanismus der Bildung des Pyran- bzw. Furanrings.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die postulierte biokatalytische Aktivität von PS-Domänen zu testen. Zu diesem Zweck sollte als Erstes ein Alignment der *trans*-AT-PKS-Gencluster von Pederin (**27**), Misakinolid A (**40**), Psymberin (**41**) und Oocydin A (**59a**) erstellt werden, die putative PS-Domänen (Modulabfolge: KS-DH-PS-KR-ACP) enthalten. Diese Sequenzen sollten dann mit *trans*-AT-PKS-Genclustern, die nur die Modulordnung: KS-DH-KR-ACP aufweisen, verglichen werden. Die identifizierten Genbereiche, die für putative PS kodieren, sollten mittels Polymerase-Kettenreaktionen (PCR, engl. polymerase chain reaction) amplifiziert und in zwei verschiedenen Expressionsvektoren (pET28b (-) und pET29b (-)) kloniert werden. Die folgenden heterologen Expressionen aller zu untersuchenden PS-Domänen sollten die entsprechenden Proteine liefern. Weiterhin sollten vereinfachte SNAC-Thioester des Typs **X** als Testsubstrate für die Aktivitätsassays mit den Enzymen synthetisiert werden. Diese kurzkettigen Modellsubstanzen des Typs **X** sollten als essentielle funktionelle Gruppen ein α,β -ungesättigtes System und eine primäre oder sekundäre Hydroxyfunktion aufweisen (Abbildung 33). Für die Untersuchung der PS-Domänen von Oocydin A (**59a**) sollte die Hydroxygruppe in ϵ -Position, für alle anderen Pyransynthesen in ζ -Position eingeführt werden. Da die Testsubstrate des Typs **X** nach der Umsetzung mit den Proteinen zu den geschlossenen Produkten des Typs **Y** keine Massendifferenz aufweisen, sollte die Analyse der Enzymassays mittels HPLC durchgeführt werden. Deshalb sollten weiterhin auch die Pyran- und Furan-abgeleiteten Thioester des Typs **Y** als Referenzsubstanzen dargestellt werden. Die Durchführung der Proteinassays sollte analog zu Analysen aus der Literatur vorgenommen werden.⁸¹

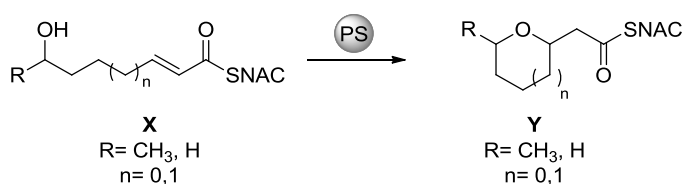


Abbildung 33: Postulierte PS-katalysierte Ringschlussbildung der Testsubstrate des Typs **X** zu den Referenzsubstanzen des Typs **Y**.

Für die Untersuchungen der PS-Domänen aus den Biosynthesen von Pederin (**27**), Misakinolid A (**40**) und Psymberin (**41**) sollten die sekundären und primären Thioester-Testsubstrate **60** und **61**, sowie die geschlossenen Referenzsubstanzen **66** und **67** dargestellt werden. Weiterhin sollten hinsichtlich der Substratspezifität der PS-Domänen auch die primären und sekundären Säure- und Ester-Analoga **62-65** und **68-71** synthetisiert und getestet werden (Abbildung 34 A). Außerdem sollte ein abgeleiteter Thioester **72** aus der Misakinolidbiosynthese und ein Keto-Substrat **73** dargestellt und untersucht werden (Abbildung 34 B). Diese Testsubstrate **72** und **73** sollten auch für die Analyse der PS-Substrattoleranz benutzt werden.

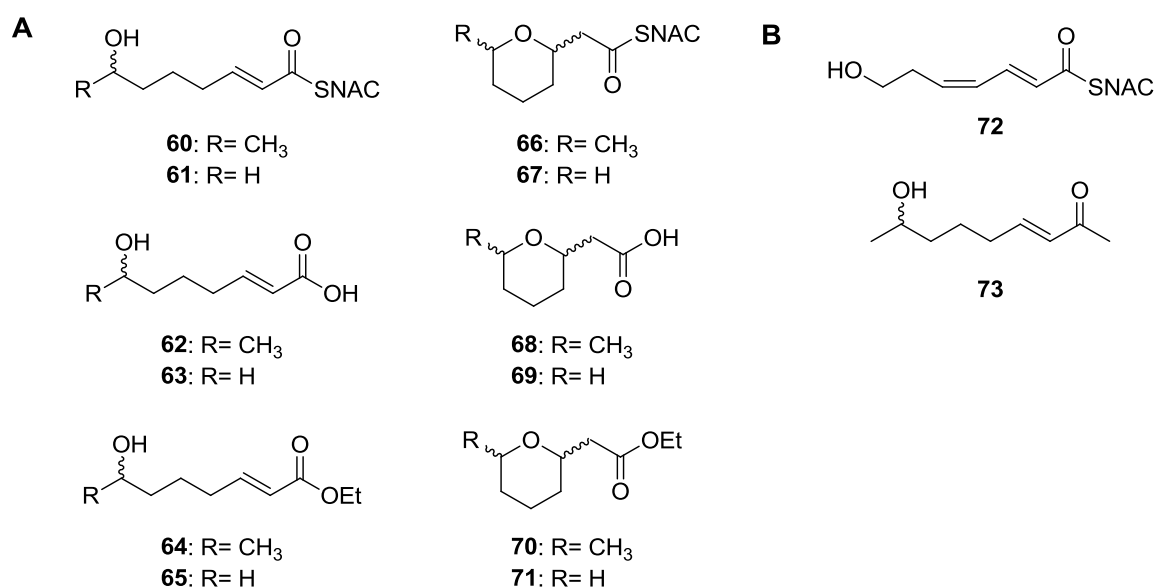


Abbildung 34: Testsubstrate **60-73** für die Untersuchung der Pyransynthese-Aktivität aus den PKS von Pederin (**27**), Misakinolid A (**40**) und Psymberin (**41**).

Für die Untersuchungen der PS-Domäne des Genclusters von Oocydin A (**59a**) sollten die entsprechenden ϵ -Hydroxythioester **74** und **75** sowie die Furan-abgeleiteten Referenzsubstraten **80** und **81** synthetisiert werden (Abbildung 35). Auch hier sollten die Säure- und Esterderivate als Testsubstrate **76-79** und **82-85** in Bezug auf die Substrattoleranz der PS-Domänen untersucht werden.

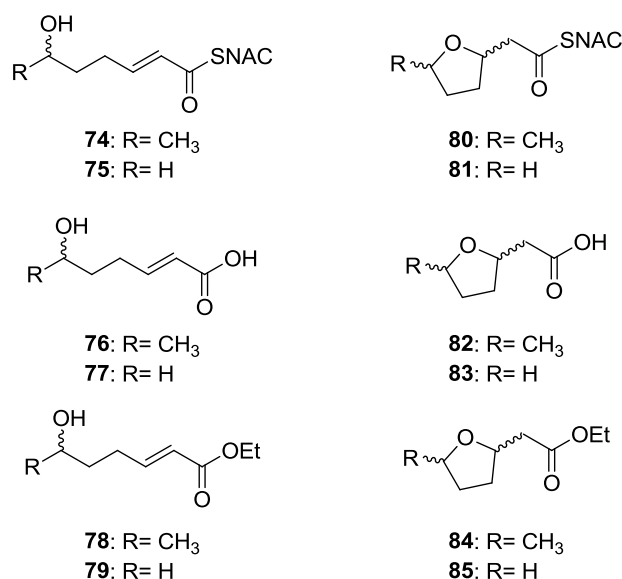


Abbildung 35: Testsubstrate **74-85** für die Untersuchung der PS-Domäne aus dem Biosyntheseweg von Oocydin A (**59a**).

Exemplarisch ist der Retrosyntheseplan für die Darstellung der geschlossenen methylierten Pyran-abgeleiteten Referenzsubstrate **66**, **68** und **70** aufgeführt (Abbildung 36). Das Lacton **86** sollte zunächst zum Lactol **87** reduziert werden. Eine anschließende Kondensationsreaktion des Lactols **87** sollte die Säure **68** generieren. Die Säure **68** sollte durch Standardmethoden zum Ester **70** und SNAC-Substrat **66** derivatisiert werden. Die nicht methylierten Pyran-derivate **67**, **69** und **71**, sowie die Furananaloge **80-85** sollten über die gleiche Reaktionssequenz synthetisiert werden.

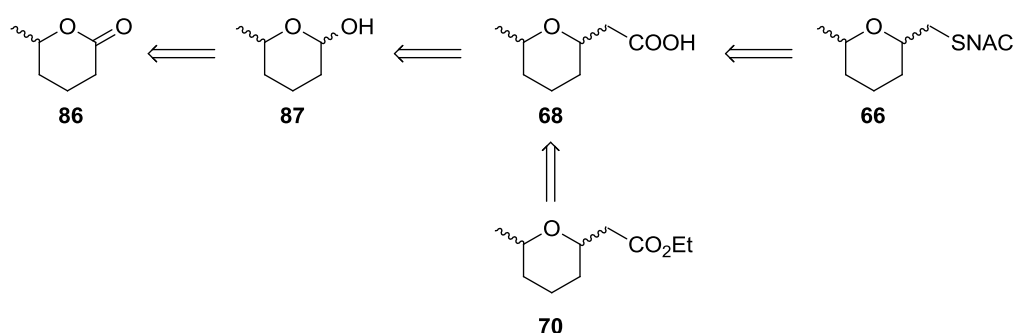


Abbildung 36: Retrosynthese der Pyran-abgeleiteten Testsubstrate **61-66**.

Die Retrosynthese für die offenkettigen sekundären ζ -Hydroxy-Testderivate **60**, **62** und **64** ist beispielhaft in Abbildung 37 dargestellt. Zunächst sollte eine direkte Cycloaddition mit dem Lactol **87** und dem modifizierten Ylid **88** erfolgen (Abbildung 37, Weg A). Alternativ sollte ausgehend von dem Lactol **87** eine Wittig-Reaktion den Ester **64** ergeben, der anschließend zur Säure **62** verseift werden sollte. Durch eine Kupplungsreaktion sollte der gewünschte Thioester **60** dargestellt werden (Abbildung 37, Weg B).

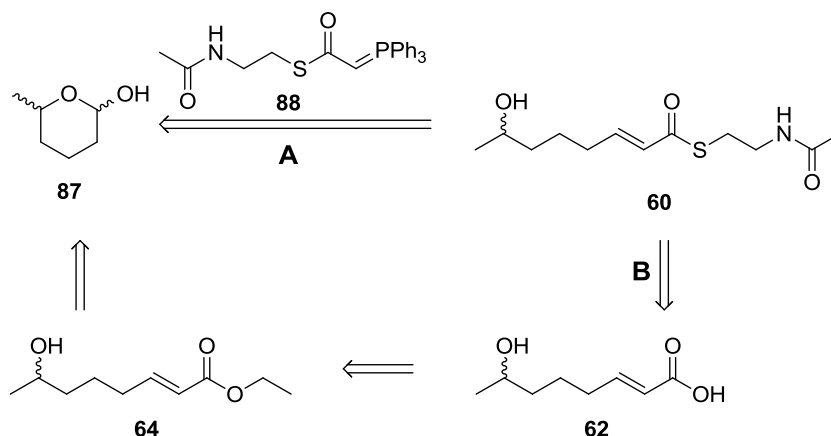


Abbildung 37: Mögliche Syntheseroute des Thioesters **60**.

Eine andere Syntheseroute sollte ausgehend von Dihydropyran (**89**) das ζ-Hydroxyderivat **60** in einer linearen, siebenstufigen Sequenz ergeben (Abbildung 38). Dafür sollte zunächst das Pyransubstrat **89** durch eine Additionsreaktion in das Lactol **90** umgewandelt werden. Eine folgende Grignardreaktion sollte das Diol **91** generieren. Im Anschluss sollten die Hydroxygruppen mit Silylether zum *Bis-tert*-Butyldimethylsilyl-Produkt (*Bis*-TBS-Produkt) **92** geschützt werden. Eine Flusssäure-vermittelte selektive Entschützung der primären Hydroxygruppe sollte zum Alkohol **93** führen. Die Kombination aus Swern- und Wittigolefinierung sollte dann den ungesättigten Ester **94** liefern. Dieser sollte zur Säure **95** verseift werden und die Kupplungsreaktion mit *N*-Acetylcysteamin (**108**, NAC) sollte den geschützten Thioester **96** ergeben. Der letzte Schritt sollte die Entschützung der Hydroxyfunktion zum gewünschten SNAC-Testsubstrat **60** sein.

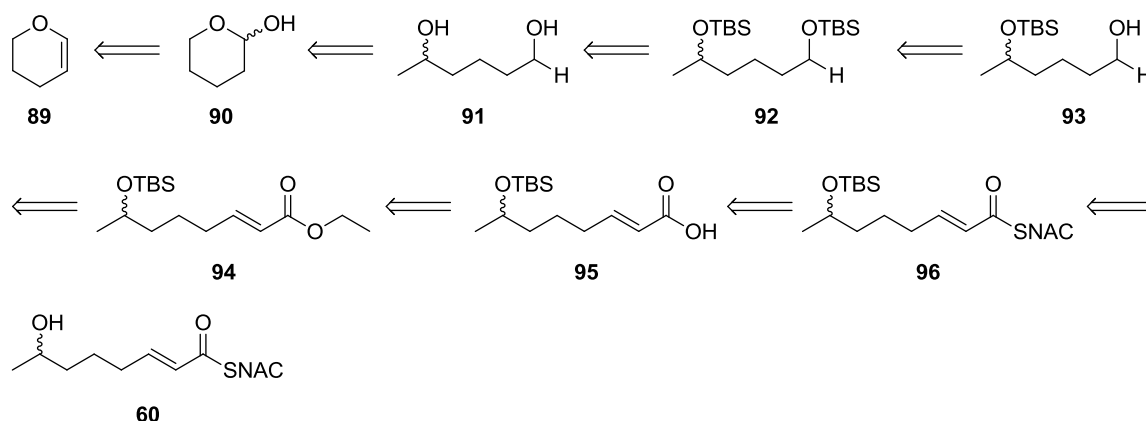


Abbildung 38: Retrosynthese des SNAC-Thioesters **60**.

Der primäre ζ-Hydroxythioester **61** sollte von *Dr. Sarah Frank* (AG Piel) synthetisiert werden. Die abgeleitete Säure **63** und der Ester **65** sollten nach dem Weg B in Abbildung 37 dargestellt werden. Für die offenkettigen ε-Hydroxy-abgeleiteten

Testsubstrate **74-79** sollte die gleiche Synthesestrategie verfolgt werden wie in Abbildung 38.

2.2 Synthese von Substraten zur Untersuchung der Substratspezifität von KS-Domänen in der Misakinolidbiosynthese

Trans-AT-PKS wurden 2002 erstmals von der Arbeitsgruppe Piel beschrieben.²⁹ Sie weisen im Gegensatz zu *cis*-AT-PKS freistehende AT-Domänen auf. Das Colinearitätsprinzip kann auf diese modularen Multienzymkomplexe aufgrund der Vielzahl an Modulvarianten, unbekanntem Domänen und einzigartigen Modularanordnungen nur schwer übertragen werden.¹⁹ Allerdings wurde für diese neuartigen Typ I-PKS ein Regelwerk auf der Basis von *in-silico*-Untersuchungen erstellt.³¹ Hierbei zeigte sich, dass die Proteinsequenz einer *trans*-AT-KS mit der Struktur des prozessierten Polyketids korreliert.³¹ Daraufhin wurde die Spezifität von KS-Domänen in *trans*-AT-PKS *in vitro* untersucht.⁸² Die Studien belegten die Hypothese, dass die Spezifität der KS-Domänen bis zur β -Position stark ausgeprägt ist und danach abnimmt.⁸³ Diese Erkenntnis sollte zukünftig die Vorhersage neuer Metaboliten von *trans*-AT-PKS vereinfachen.

Für weitere Einsichten in die KS-Spezifität von *trans*-AT-PKS sollten in dieser Arbeit die Kurzkettensubstrate **97**, **98** und *ent*-**97**, *ent*-**98** für *in-vitro*-Untersuchungen der KS-Domänen des Misakinolidgenclusters synthetisiert werden (Abbildung 39). Die entsprechenden Proteine sollten von Dr. Agustinus Uria (AG Piel) exprimiert werden.

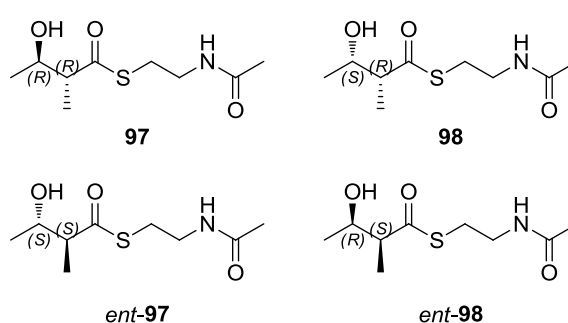


Abbildung 39: Kurzkettensubstrate **97**, **98** und *ent*-**97**, *ent*-**98** zur Untersuchung der KS-Substratspezifität der Misakinolidbiosynthese.

Die Testsubstrate **97**, **98** und *ent*-**97**, *ent*-**98** zur Untersuchung der KS-Spezifität sollten sich von den putativen natürlichen Intermediaten in der Misakinolidbiosynthese (Enzym MisD) ableiten (Abbildung 40). Für die KS 7 sollte der (2*S*,3*S*)-3-Hydroxy-2-methyl-Thioester *ent*-**97** und für die KS 8 der (2*R*,3*S*)-3-Hydroxy-2-methyl-Thioester **98**

synthetisiert werden. Weiterhin sollten für die vollständige Analyse der KS-Spezifität auch die entsprechenden Enantiomere **97** und *ent*-**98** dargestellt werden.

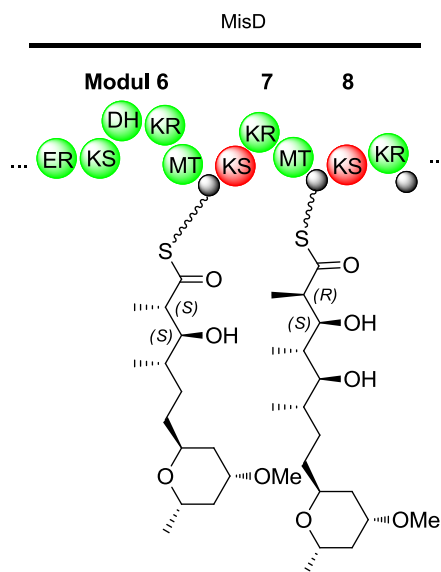


Abbildung 40: Ausschnitt der Misakinolidbiosynthese für die Untersuchung der KS-Spezifität KS 7 und KS 8; die KS 7 sollte das Intermediat *ent*-**97** und die KS 8 sollte das Substrat **98** prozessieren; rot = untersuchte KS.

Der Aufbau der Stereochemie sollte über eine *anti*-selektive Evans-Aldolreaktion erfolgen (Abbildung 41). Das hierfür benötigte chirale Auxiliar sollte von L-Valin (**99**) bzw. D-Valin *ent*-(**99**) abgeleitet werden. Zu Beginn sollten die Aminosäuren **99** bzw. *ent*-**99** zu L-Valinol (**100**) bzw. D-Valinol *ent*-(**100**) reduziert werden. Die Addition von Kohlensäurediethylester (**101**) sollte die Produkte **102** bzw. *ent*-**102** ergeben. Die Acylierung des Stickstoffs der Amidfunktion sollten die chiralen Auxiliare **103** bzw. *ent*-**103** liefern. Durch die anschließende *anti*-selektive Evans-Aldolreaktion mit Acetaldehyd (**104**) sollten die Intermediate **105a** und **105b** bzw. *ent*-**105a** und *ent*-**105b** dargestellt werden. Nachfolgende oxidative Spaltung sollten die Säuren **106a** und **106b** bzw. *ent*-**106b** und *ent*-**106b** ergeben, die abschließend die in Thioester **97** und **98** bzw. *ent*-**97** und *ent*-**98** überführt werden sollten.

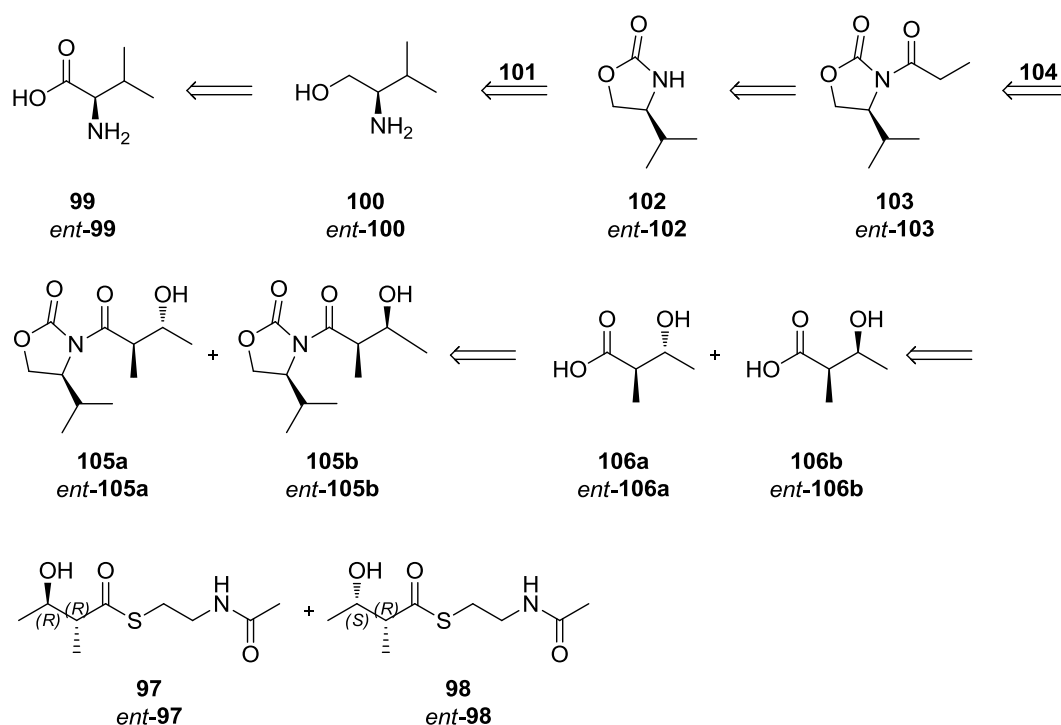


Abbildung 41: Retrosynthese der Diastereomere **97** und **98**, sowie *ent-97* und *ent-98* zur Untersuchung der KS-Spezifität der Misakinolidbiosynthese.

2.3 Naturstoffextraktion von *Serratia plymuthica*

Anhand bioinformativer Studien wurden zwei identische *trans*-AT-Gencluster in den Bakterienstämmen von *Dickeya dadantii* und *Serratia plymuthica* identifiziert. In dieser Arbeit sollte der bislang unbekannte Naturstoff mithilfe von Fermentationsuntersuchungen bestimmt und charakterisiert werden. Zu diesem Zweck sollten Bakterienkulturen von *Serratia plymuthica* in unterschiedlichen Medien angezogen, extrahiert und säulenchromatographisch aufgereinigt werden. Im Anschluss sollten Cytotoxizitätsassays der einzelnen Fraktionen von Dr. Mihaela Gurgui (AG Van Echten-Deckert) durchgeführt werden und mithilfe von LCMS- und NMR-Analysen untersucht werden. In Zusammenarbeit mit Dr. Roberta Teta (AG Mangoni) sollten 2D-NMR-Experimente mit einem 700 MHz NMR-Spektrometer erfolgen. Weiterhin sollten vergleichende HPLC-Untersuchungen von *Serratia plymuthica*-Extrakten anhand von Fermentationskulturen des Wildtyps (WT) und einer Knock-Out-Mutante (KO von Dr. Katja Jensen (AG Piel) angefertigt) analysiert werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 *In-vitro*-Studien zur Verifizierung der Pyransynthese-Aktivität in *trans*-AT-Polyketidsynthasen

Trans-AT-PKS weisen eine Vielzahl von neuen, ungewöhnlichen Domänen auf. Diese Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Pyransynthese-Domänen in den Genclustern von Misakinolid A (**40**, MisF, Modul 15), Psymberin (**41**, PsyD, Modul 6), Pederin (**27**, PedF, Modul 7) und dem Oocydin A (**59a**, Ooc, Modul 7) (Abbildung 42).

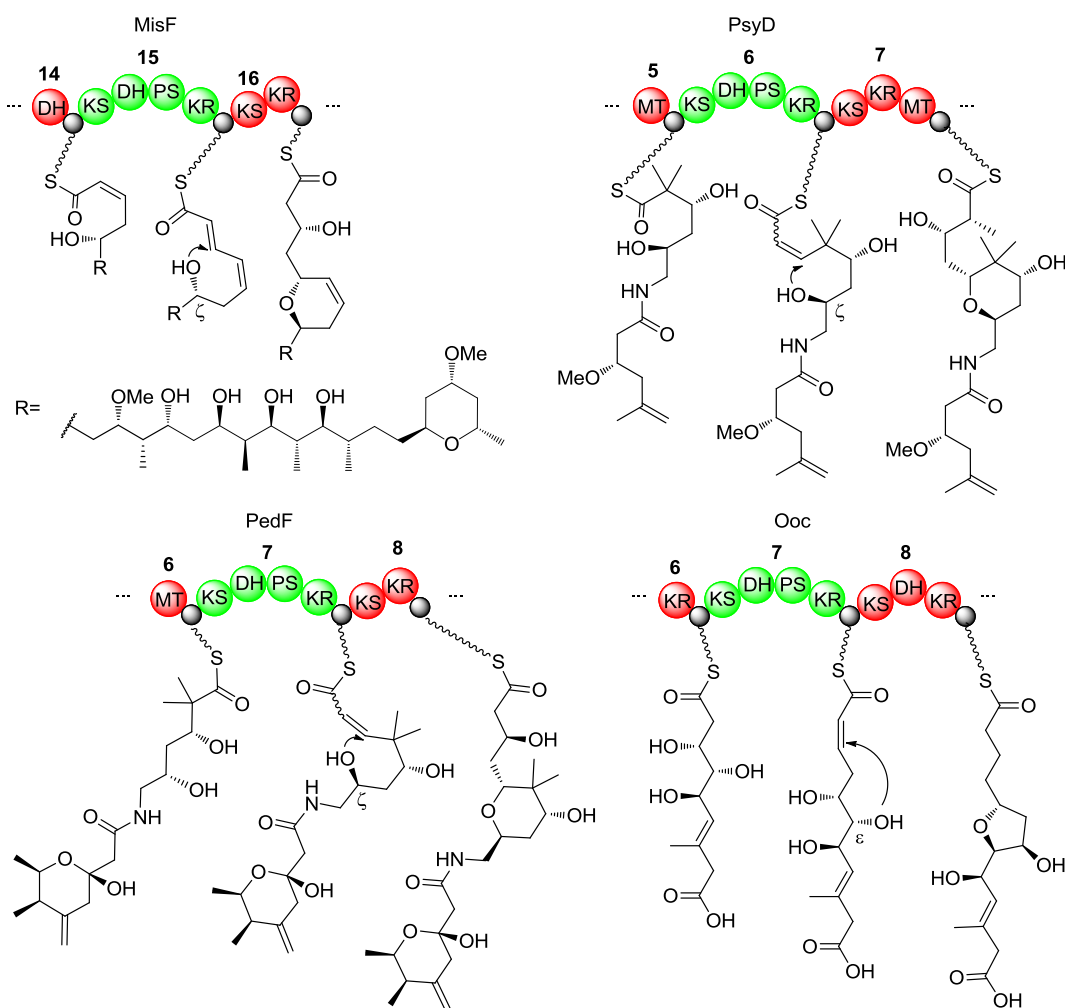


Abbildung 42: Ausschnitte der *trans*-AT-PKS von Misakinolid A (**40**, MisF), Psymberin (**41**, PsyD), Pederin (**27**, PedF) und Oocydin A (**59a**, Ooc) mit den untersuchten PS-Domänen (grün markierte Module; andere biosynthetische Bestandteile der PKS sind rot markiert). Dargestellt sind außerdem die Ringschlussreaktionen nach dem postulierten Mechanismus (vgl. Abbildung 32).

Es wird postuliert, dass zunächst eine konventionelle DH einen α,β -ungesättigten Thioester generiert. Im Anschluss katalysiert die Pyransynthese eine intramolekulare Ringschlussbildung durch Angriff einer ζ -Hydroxygruppe auf das Michael-

Akzeptorsystem (vgl. Abbildung 32).¹⁹ Bei Oocydin A (**59a**) aus *Dickeya dadantii* und *Serratia plymuthica* wird ebenfalls ein Ringschluss beobachtet. Hier allerdings wird ein Fünfring anstatt eines Sechsrings gebildet, wie bei Nonactin (**43**) (vgl. Abbildung 21).⁸⁴

Zur Übersicht wird hier kurz die Vorgehensweise (Abbildung 43) zur Überprüfung dieser Hypothese vorgestellt und nachfolgend in den Abschnitten (3.1.1, 3.1.2 und 3.1.3) ausführlich erklärt. Zunächst wurden die kodierenden Sequenzen der PS (durch ein Alignment ermittelt, vgl. Abschnitt 3.1.1) aus den biosynthetischen Genclustern aller in Abbildung 42 aufgeführten Naturstoffe **27**, **40**, **41** und **59a** durch PCR amplifiziert und in die Expressionsvektoren pET28b (-) und pET29b (-) kloniert. Die Überexpression der resultierenden Konstrukte lieferte für jede *trans*-AT-PKS zwei bis drei unterschiedliche, lösliche Proteine (Ooc-PS1, Ooc-PS2, PsyD-PS1, PysD-PS2, PedF-PS1, PedF-PS2, MisF-PS1, MisF-PS2 und MisF-PS3). Im Anschluss wurden verschiedene Testsubstrate des Typs **X** und **Y** synthetisiert (s. Abbildung 43, vgl. Abschnitt 3.1.2). Die Edukte des Typs **X** wurden als vereinfachtes Modell mit einem α,β -ungesättigten System, sowie einer primären oder sekundären Alkoholfunktion in ϵ - oder ζ -Position dargestellt. Das α,β -ungesättigte System wurde als Thioester **60**, **61**, **74** und **75**, Säure **62**, **63**, **76** und **77** und Ester **64**, **65**, **78** und **79** eingesetzt. Weiterhin wurden ein Derivat, das dem putativen, natürlichen Intermediat **72** aus der Misakinolidbiosynthese entspricht, und ein Keto-Substrat **73** getestet. Als HPLC-Standards wurden zusätzlich von allen offenkettigen Testsubstraten **60-65** und **72-79** des Typs **X** die geschlossenen Produkte **66-71** und **80-85** des Typs **Y** synthetisiert (vgl. Abschnitt 3.1.2). Die offenkettigen Testsubstrate des Typs **X** wurden in einem PS-Assay mit den Enzymen umgesetzt. Als Analyseverfahren des Assays wurden HPLC-Untersuchungen gewählt, da sich die Masse bei der Umsetzung von Edukt des Typs **X** zu Produkt des Typs **Y** nicht unterscheidet und die eingesetzten Mengen für NMR-Messungen zu gering waren (vgl. Abschnitt 3.1.3).

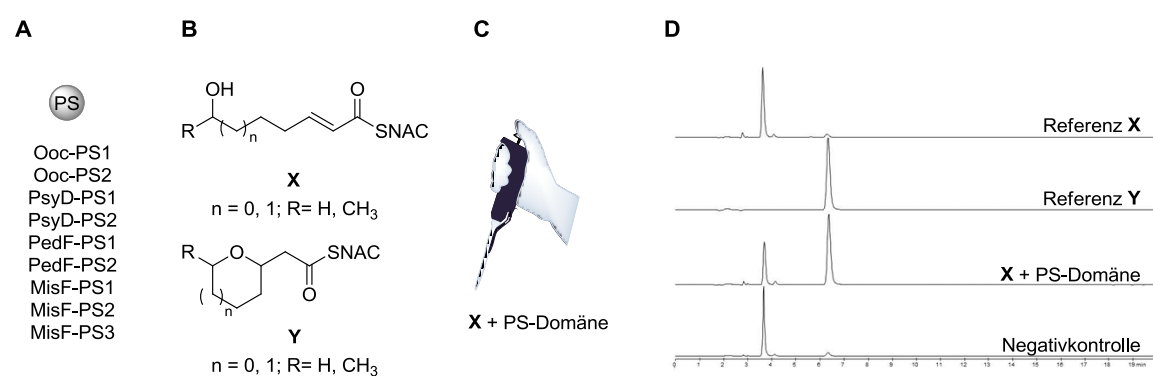


Abbildung 43: Vorgehensweise zur Überprüfung der Aktivität von PS-Domänen *in vitro*. **A)** Proteinexpression der PS-Domänen, **B)** Synthese der Testsubstrate am Beispiel von SNAC-Derivaten, **C)** Durchführung der PS-Assays mit den offenkettigen Testsubstraten, **D)** Analyse der Proteinassays per HPLC.

3.1.1 Alignment und Klonierung von PS-Sequenzen und Expression der PS-Konstrukte

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde ein ClustalW-Multiple-Alignment mittels Bioedit erstellt (vgl. Anlage 6.1).^{85,86} Dabei wurden Aminosäuresequenzen von *trans*-AT-PKS-Modulen, die die putative PS-Domänen (Modulabfolge: KS-DH-PS-KR-ACP) enthalten mit Sequenzen von *trans*-AT-PKS-Modulen mit der Domänenarchitektur: KS-DH-KR-ACP verglichen. So konnten die Sequenzen der einzelnen PS-Domänen ermittelt werden. Für beide Modultypen wurden die Gencluster von Misakinolid A (**40**), Pederin (**27**), Psymberin (**41**), Onnamid (**46**), Bryostatin (**2**) und Oocydin (**59a**) verwendet (Abbildung 44).

```

OnnPS7:      CDKQGVVAVSLRGFSSRVVEKIETFRHSLQLTLHADG-----MGKQGTATFTGSEFFLRDH
BryPS5:      CDEQGNISVSMKGLScriFNENAHSSSEYSSTVVKDKEDRLEHPLINI IKENKYPVEKAHYISCFTGNESEFLLDH
OocPS7:      CDDQGRICVSLRGFSTRMLPLSHPAENDVAPGSVTAVDTTAS-----AAMAVGITSKALRGTEYFLQDH
PedPS7:      CTKEGEVVCVALRGFTSRSLPPSGATESRASASAAASSTL-----VSTEGVSRFKGEEFFLRDH
PsyPS6:      CDETGVRVSMKGLASRPVETGPATT-----ATHFSGREHCLVDH
MisPS15:     CDRGKICVLMRGFSSRI FHAQASPCFAETLLP----SQLHPLLHQHVPSEN---PVHDQFIAQFTGEEFFLRDH
Ped-PSH1:    CDVHGRVCIRLRGFSSRALEAEQA-----
Onn-PSI2:    CDEQGHICIRLRKFSSR-----
Bry-PSB1:    LDAQGVKVCVRMRGFLSRVLPNN-----
Ooc-PS8:     YDDAGQLCVYLRGFSARTPEQATT-----
Ped-PSH2:    LCGPGLTRFKSRFEGTEFFLDDHR-----
Bry-PSX1:    YKYKSYIQLQHIAWATPFFIQKKT-----
Onn-PSI1:    FEPSLGLTLPRMQVAVVLELAAQ-----
Bry-PSB2:    FERSLGLVLPDIEVAVLLEAVEGT-----

OnnPS7:      GHVTPGALYLEMAYAAG----TFGQEKQVTGLRNVISKPMIVQG-KLDVTLRLEP-EGDHYRYVISVFN---RD
BryPS5:      GHVLPGVILEIICAAT----KIFTNQDVII IKNIWVWPKIKIE-SDREVSIIYLNK-INDCYEQITTLN--SVQ
OocPS7:      GGVLPGLSLEWMRELAESQRLTEDSEAVVGLNAVIWHQFVIVGEAGADIDLALHR---DEQGYHCVISR-----
PedPS7:      SGMLPAAVYLEMVRFAFA---EGKHERKITGLSHVWPKVLLVSGEGREVRTCLT-NVDRSSAFLISACE---QS
PsyPS6:      GGMLPVAIHPAMIYQVE---MAR-DRLLSGLHQVWVPAFKVDEHGPAIRVEMT-ADEGAAPTFFELVSE---GA
MisPS15:     QQVMLGMAYLEMAHRAG---QHRASQKILGLKNVWVWVQLLFIAGQAREVSVHVQN-EVLQHRFRITTONEDSLQ
Ped-PSH1:    -----
Onn-PSI2:    -----ALNDPVQTGE-----
Bry-PSB1:    -----VNSLAEEFPFTALN-----
Ooc-PS8:     -----
Ped-PSH2:    -----
Bry-PSX1:    -----
Onn-PSI1:    -----
Bry-PSB2:    -----

OnnPS7:      GQIV--QPETCCQGHII TAEQE-PNVAERLDLDAIQARCGSAKNTDACNQIMQS-THGPSLLSITQLHYNGHEAL
BryPS5:      G-----DVLHSQKILVGSRSNIKPPSDLKIEDIQSRCTVSI EPEKCDELISKNDQGP S ILS IENLCHNDCQML
OocPS7:      -----QQQIHAQGRVMTGVVG-AAAPQPLPLEDIELRCRQRSSHACAEFFGI-AIGPRL LGIT EYQQGDHEAL
PedPS7:      SEGP--QEVTYCQGNLLLP EVM-EEPGAALAEIAYRCP SVLEAKQC DRLLQSTHG PALMSVQQLRYS DREALA
PsyPS6:      G-----QRIVHAQQGVSYGPPP-KIS--AIAWQDVQARCLASYDWAACDHLMQH-THGESLLSIESLACGDGEAL
MisPS15:     N-----IHCQGLVVDQALYPERPDQLNIQDIQSRCSASIE TTECDQLLQYT-HGPSLLTIKQLWHNEHEAL
Ped-PSH1:    -----
Onn-PSI2:    -----
Bry-PSB1:    -----
Ooc-PS8:     -----
Ped-PSH2:    -----
Bry-PSX1:    -----
Onn-PSI1:    -----
Bry-PSB2:    -----

OnnPS7:      AELVLP TVLGGDLQGYLLHPSMLNGAILSSVIFSLIQEPASP-LPMPFSLDQLVIHQTL PQRAYVHVKASPPGHN
BryPS5:      ARLKIPSSFEKENKQYLLCPSLMHGAVLSTVALSLIQEGKKR-GVLFYSMKSMHIYAELSEVDYAYVRKSK----
OocPS7:      VTLAVHQEVVGVGEVQALHPALMNGAVLAAIMLAVGGERQGAR-PLMFSLDTLRIYQPLPASVLA YIRQKPSDTG
PedPS7:      LLQLPDELQMGWDDYGWHP SLLNGAILASVWCLARAPRSRAGLPMFPFSLDRRLRVFPFERQMQAYVRRHGSARS
PsyPS6:      ARLKQPGVSDDWGA EVAVQ PAMNGAILA AVLLAMTEDKRDR-LPMPFSLTSMWLYRAIPDRAVAVHKRLREGVG
MisPS15:     ALLQLPDGMRSGREDTLHPSMMNGAILTSVLFSLNNGPQEH-LPMPFALDELWYQEMPERAYAVVSMSS----
Ped-PSH1:    -----
Onn-PSI2:    -----
Bry-PSB1:    -----

```



```

Ooc-PS8: -----
Ped-PSH2: -----
Bry-PSX1: -----
Onn-PSI1: -----
Bry-PSB2: -----

OnnPS7: PQSHAHMKRYDMDICDANGNLAVSFKGFTTIFP-----TDRPYRRLTATPQWQNQPLSQPQTAP---VA
BryPS5: ---VEHAKKYDIDLISAEGKVIVSIKELTLLSL----KNKLEKNVIHASVKWQEHPLPKKIDAS---IY
OocPS7: SEQEHRVHCDIWFTDHHGQILVEMKGLSMIGAQ----ASPAASLVFARPQWIMQRVGSVKERDRAPDAL
PedPS7: LG--ENLEKVDIDLDSQGRCLASLEGFTLVF-----APDANRLVYAI PQWVEQALPARVAASAPLAVQ
PsyPS6: T---QPVATFNVTIADLDGQVLA TLTELTLVFPQ----APEHDRLVYAKPVWTPCPLAVSPSDSD----V
MisPS15: -----ANNHDIELVDITGKCI VLFKGF TAAIQGAWQS QAPQNNVIYASTQWRESVLSGDEHANT--AAS-
Ped-PSH1: -----PDSATTVLCEPLWNERSDSSAQVLWARH
Onn-PSI2: -----NGQTLCYKPLWQEKAVTV---TARRLEDA
Bry-PSB1: -----NSSTLLFHPVWRSQTLSS---GNN-LPN
Ooc-PS8: -----QGKGTLMMLVPQWLRKPVVNTVAPYSYAS
Ped-PSH2: -----
Bry-PSX1: -----
Onn-PSI1: -----
Bry-PSB2: -----PGK--DADMETWAQD-----
    
```

Abbildung 44: Alignment von *trans*-AT-PKS mit der Modulabfolge **KS-DH-PS-KR-ACP** (OnnPS7-MisPS15, schwarz) und *trans*-AT-PKS mit der Modulabfolge **KS-DH-KR-ACP** (Ped-PSH1-Bry-PSB2, grün); Beschriftung: Gencluster (erste drei Buchstaben: Onn, Onnamid (46); Bry, Bryostatin (2); Ooc, Oocydin A (59a); Ped, Pederin (27); Psy, Psymberein (41); Mis, Misakinolid A (40), PS für Pyransynthese, Ziffer für die Modulnummer entsprechend der Reihenfolge im vorliegenden Gencluster.

Wie bereits in Abschnitt 1.4 erwähnt, wurde zunächst postuliert, dass es sich bei PS um keinen eigenständigen Typ von Domänen handelt, sondern dass sie vielmehr homolog zu den DH-Domänen sind. Nähere bioinformatische Untersuchungen zeigen jedoch klare Unterschiede zu klassischen DH-Domänen. Zum einen ergaben phylogenetische Untersuchungen der Sequenzen von DH- und PS-Domänen, dass sie in zwei unterschiedliche Claden fallen (Abbildung 45).⁸⁷

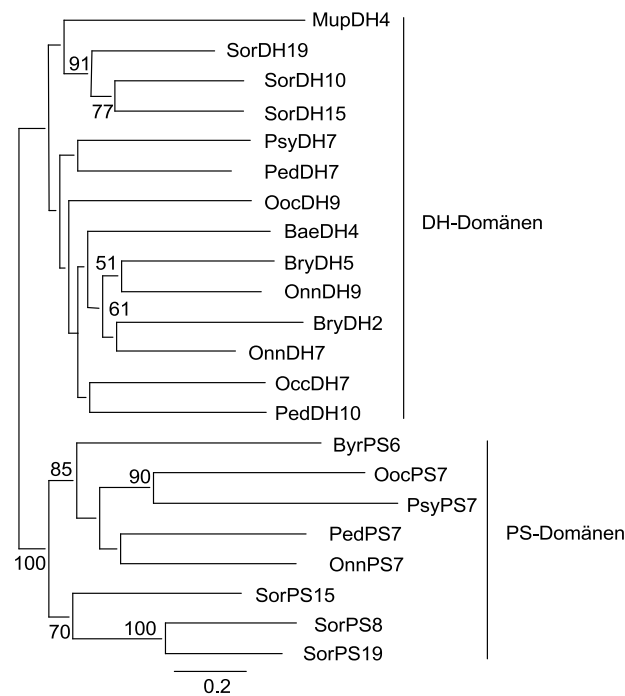


Abbildung 45: Phylogenetische Untersuchungen der Sequenzen von DH- und PS-Domänen. Algorithmus-Werte des „Neighbor-joining“-Verfahrens größer als 50% sind abgebildet. Es liegen zwei unterschiedliche Claden vor. Beschriftung: Gencluster (vgl. Abbildung 44 und Bae, Bacillaen; Mup, Mupirocin; Sor, Sorangicin (42)), Ziffer für die Modulnummer entsprechend der Reihenfolge im vorliegenden Gencluster.

Zum anderen konnte anhand von Sequenzvergleichen (vgl. Anhang 6.2) im Gegensatz zu den zwei katalytisch bedeutsamen Histidin- (HXXXGXXXP in Abbildung 46 durch * gekennzeichnet) und Aspartat-haltigen Motiven (DXXX(Q/H) in Abbildung 46 durch # markiert) bei DH-Domänen, nur ein Histidin-haltiges Motiv mit folgender Aminosäureabfolge: HXXXP in den PS-Sequenzen gefunden werden.^{87,88} Das Aspartat-haltige Motiv tritt gar nicht in den Aminosäuresequenzen der PS-Domänen auf.

```

OnnPS7:      -HSL-----QTLHADGMGK--QGTATFTGSEFFLRDH-----GHVTPGALYLEMAYAAGTF [...]
BryPS5:      -HPLINIKNENKYPVEKA--HYISCFGTNESFLLDH-----GHVLPGVIYLEIICAATKI [...]
OocPS7:      -TAVD-----TTASAAMAVG--ITSKALRGTEYFLQDH-----GGVLPGMLSLEWMRELAES [...]
PedPS7:      -STLV-----ST-----EGVSRFKGEEFFLRDH-----SGMLPAAVYLEMVRFAEAG [...]
PsyPS6:      -RPVE-----TGPAT-----TATHFSGREHCLVDH-----GGMLPVAIHPAMIYQ-VEM [...]
SorPS15:     -LPVL-----RASAATAEGE--SFVQQLSGDEFFLRDH-----DQLLPGVVHLEMARAAAAM [...]
SorPS8:      -HPLV-----HREVADAEGRR-AFAAVFDGAEPFLMDH-----EQLFPAVAYLEMARAAEA [...]
SorPS19:     -HPLV-----HRDVSTPEQR--EFSSAFSGAEWFLKEH-----GQLFPPAPAYLEMARVAGET [...]
MupDH4:      -HPLL-----SRQITAGDSQ--QFEVQFCGDEFFLDHHRVNGRKVLPGVVYLEMALAALS [...]
BaeDH4:      -HPLL-----HENVSNMSGV--RFRSSFSGGEFFLKDHVVKNERTLPGAAYLEMVRAAVEH [...]
OocDH8:      -HPLV-----HRNTSDMTSL--CFTSWFDGREFFLADHLMVGKLLPGVAYLEMARAAVEQ [...]
PsyDH6:      -HPLV-----QRNVSTLGCQ--RFVSSFSGREFFADHHIIGEALLPGMAFMEMARAAFA [...]
OocDH7:      -HPLL-----QENASTLAEL--RFRSEFSGEEFFLADHQIHGQKVLPVSYLEMARAAATY [...]
BryDH2:      -HPLL-----HRNTSDFSCQ--RFSSTFNGSEFFLTDHLILGKKILPGAAYFEMVREAIKQ [...]
PedDH10:     -YPLL-----QRTVADPAKR--CYGCVLTGEEFFLTDHQVKGNKVLPVAYLEMARAAVER [...]
SorDH10:     -HPLV-----QRNTSSFDGL--RFSSTLRGSEFFLSDHVVQGGKVLPVAYLEMARAAAARA [...]
SorDH15:     -HPLV-----QRNTSTLQQ--RFSTTSLSGDELFLRDHRVQGGKVVPVAYLEMARAAVMA [...]
SorDH19:     -HPLL-----HRNTSTFEEQ--RFSSTLSGAEGFLKDHVIIGGHKVLPVAYLEMARAAVMA [...]
BryDH5:      -HPLL-----HKNTSDWYGQ--KFTSIFNGEEFFLRDHVVQGGKMLPGVTYLEMARAAVQQ [...]
PedDH7:      -HPLV-----QRNTSTLDRH--CFESSFDGSEFFFRDHRVQGGPLLPVAYLEWARAAAQI [...]
OnnDH7:      -HPLL-----HQNTSTLFQQ--RFGSSFSGEEFFLADHQVNGRRTLPVAYLEMACAAATY [...]
OnnDH9:      -HPLL-----HQNTSDLKGO--RFSSTFSGQEEFFLADHVVKGQKVLPVAYLEMARAAVLR [...]
#
OnnPS7:      [...]VLGGDLQGYLLHPSMLNGAILSSVIFSLI-----QEPAS--PLPMPFSLDQL [...]
BryPS5:      [...]SFEKENKQYLLCPSLMHGAVLSTVALSLI-----QEGKKR-GVLFPPYSMKSM [...]
OocPS7:      [...]EVVGVGEVQALHPALMNGAVLAAIMLAVG-----GERQGA-RPLMPFSLD [...]
PedPS7:      [...]ELQMGWDDYGWHPSSLNGAILASVVWCLA-----RAPRSRAGLPMPFSLD [...]
PsyPS6:      [...]VSDDWGAEVAVQPAMLNAILAALLAMT-----EDKDRD--LMPFSLTSM [...]
SorPS15:     [...]GLGEANGGCVLHPSVMHGAVTAAIALGLL-----QDGRPS-QLRFPYALEQV [...]
SorPS8:      [...]A--PGDEAFLLDPNLGNSVLPVPAIFSLI-----QDGERE--WRFPPYTLAL [...]
SorPS19:     [...]G---DGGDYVLHHPVGNISILEPAVFFSLV-----QDQQRQ--WRFPPYSLDAL [...]
MupDH4:      [...]FLKPG-DEFRLHPCLLDSALQAAMGFTTG-----SESSQ-GPQVPPFSL [...]
BaeDH4:      [...]SISHTKDQFVLHPSLLDAAFHATIGLMLD-----RDGTDI-RPMLPFAL [...]
OocDH8:      [...]TLSETLGDYVLHPSLMDAALQATLGLSRE-----H-RLGLPFD [...]
PsyDH6:      [...]DITDTAADYVLHPALLDAAMQASIGLALH-----ANEQNGVARFPAPFAL [...]
OocDH7:      [...]T--APSSAFGLHPSLMDAALQTSLGLNHS-----GLQPG-AAYVPFAL [...]
BryDH2:      [...]IAGDLDKCFVLHPSMDSALQATLGITSDINDIMLADRQADYILTPKSTL [...]
PedDH10:     [...]WAQEGAAAFVLHPGLIDSGLQACIGLIVGAGHELPTAEASEISGM-TATL [...]
SorDH10:     [...]GVRATAQQYVLHPSVLSALQSLVAFRLA-----DTGDGRAASRPV [...]
SorDH15:     [...]CASKGSESYVLHPSVLDGALQASIGIALA-----EGDPNGEHASVR [...]
SorDH19:     [...]GSVDTREPFVVHPSVLSAFQASLGLVLA-----QPSATGSANPTL [...]
BryDH5:      [...]CVKDTQTQFVLHPSMDSALQASIGLSTV----IDINETDQPTPT [...]
PedDH7:      [...]ETVGEASAYVLHPAILDAALQASIALTLR--DDEVEPSPETS [...]
OnnDH7:      [...]AVADTAGQFMLHPSMDSALQASIGLTLG-----NRQTS [...]
OnnDH9:      [...]SVAQTLNQLEAHPSLLDAALQAFIFGALG-----LGDQGTQ [...]

```

Abbildung 46: Ausschnitte des Alignments der PS- und DH-Aminosäuresequenzen. Beschriftung: wie in Abbildung 45. Konservierte Motive in rot dargestellt. *: Erste Aminosäure des Histidin-Motivs; #: Erste Aminosäure des Aspartat-Motivs (nur in der Aminosäuresequenz der DH-Domänen).

Der nächste Schritt war die Generierung von PS-spezifischen Primern für jeden biosynthetischen Cluster. Um die Chancen einer erfolgreichen Expression zu erhöhen,

wurden jeweils zwei Vorwärtsprimer entworfen, die in der vorhergehenden Linkerregion zwischen DH- und PS-Sequenzen binden und circa 20-50 bp voneinander entfernt waren. Weiterhin wurden jeweils vier Rückwärtsprimer entwickelt, die in der nachfolgenden Linkerregion zwischen PS- und KR-Domäne binden und ebenfalls circa 20-50 bp voneinander entfernt waren. Hierbei wurden je zwei Rückwärtsprimer ohne Stopcodon für einen Vektor mit C-terminalen His-Tag entworfen und jeweils zwei Rückwärtsprimer mit Stopcodon für einen Vektor mit N-terminalen His-Tag generiert (s. Tabelle 9). Die Vorwärtsprimer wurden dabei mit Schnittstellen für die Endonuklease *NdeI* und die Rückwärtsprimer mit Schnittstellen für *XhoI* versehen (s. Tabelle 9). Nach der Amplifizierung der PS-Sequenzen (s. Abschnitt 4.1.6) mit den in der Tabelle 1 angegebenen Primerkombinationen und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (s. Abschnitt 4.1.7) wurden die DNA-Fragmente aus dem Gel extrahiert (s. Abschnitt 4.1.8). Die erfolgreiche Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mittels Gelelektrophorese (1% Agarosegel) überprüft (Abbildung 47).

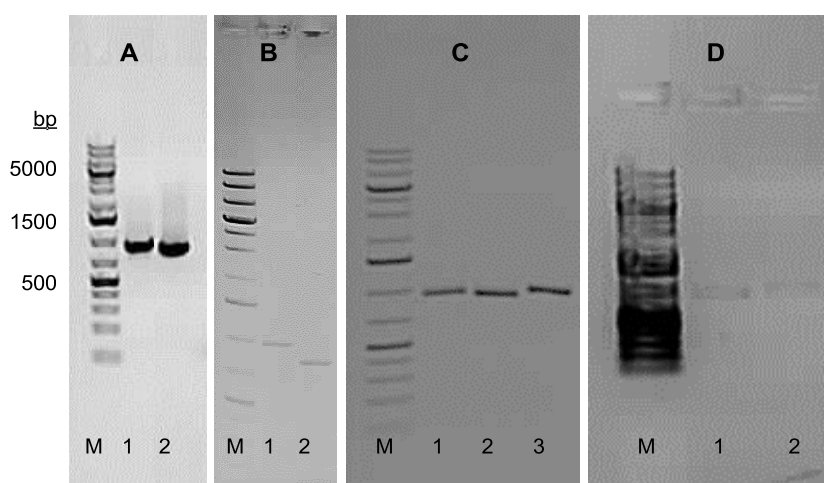


Abbildung 47: Agarosegel (1%) der PCR-Produkte für die PS-Domäne für Oocydin A (**59a**, **A**), Pederin (**27**, **B**), Misakinolid A (**40**, **C**) und Psymberin (**41**, **D**); **A**) 1 = *ooc-PS1* (1002 bp), 2 = *ooc-PS2* (942 bp); **B**) 1 = *pedF-PS1* (960 bp), 2 = *pedF-PS2* (818 bp), **C**) 1 = *misF-PS1* (972 bp), 2 = *misF-PS2* (870 bp), 3 = *misF-PS3* (942 bp), **D**) 1 = *psy-PS2* (774 bp), 2 = *psy-PS1* (777 bp), M: Marker (vgl. Tabelle 1).

Die PS-PCR-Produkte zeigten für Oocydin A (**59a**), Pederin (**27**) und Psymberin (**41**) jeweils zwei positive Konstrukte (*ooc-PS1*, *ooc-PS2*, *pedF-PS1*, *pedF-PS2*, *psyD-PS1* und *psyD-PS1*) und für die PS-Domäne der Misakinolid-PKS drei positive Konstrukte (*misF-PS1*, *misF-PS2* und *misF-PS3*) mit den jeweils erwarteten Größen (vgl. Tabelle 1) und ausreichender Reinheit für die Klonierung.

Tabelle 1: Amplifizierte PS-Konstrukte (für detaillierte Auflistung der Primer vgl. Tabelle 9).

Konstrukt	Primerkombination	Produktgröße [bp]	Plasmid (Ausgangsvektor)
<i>ooc-PS1</i>	Dic-F1/Dic-R3chis	1002	pPP01 (pET29b (-))
<i>ooc-PS2</i>	Dic-F3/Dic-R3chis	942	pPP03 (pET29b (-))
<i>pedF-PS1</i>	Ped-F1/Ped-R1chis	960	pPP05 (pET29b (-))
<i>pedF-PS2</i>	Ped-F3/Ped-R3chis	818	pPP07 (pET29b (-))
<i>misF-PS1</i>	Mis-F1/Mis-R3chis	972	pPP09 (pET29b (-))
<i>misF-PS2</i>	Mis-F3/Mis-R1chis	870	pPP11 (pET29b (-))
<i>misF-PS3</i>	Mis-F3/Mis-R3chis	942	pPP13 (pET29b (-))
<i>psyD-PS1</i>	Psy-F3/Psy-R1	777	pPP15 (pET28b (-))
<i>psyD-PS2</i>	Psy-F3/Psy-R1chis	774	pPP17 (pET28b (-))

Die PCR-Produkte wurden in Folge unter der Verwendung der beiden Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* in die entsprechend präparierten Expressionsvektoren pET28b (-) (N-terminaler His-Tag) und pET29b (-) (C-terminaler His-Tag) kloniert (s. Abschnitt 4.1.9, 4.1.10, 4.1.12). Die Verwendung von zwei Vektoren für die Klonierung ermöglichte die Aufreinigung der Proteine über einen N-terminalen oder alternativ über einen C-terminalen His-Tag. Die Positionierung des His-Tags kann eine entscheidende Rolle bei der Expression, der Proteinfaltung, der Aufreinigung sowie der Aktivität des Enzyms spielen. Der Einsatz von *NdeI* als Restriktionsenzym, das im stromaufwärts-liegenden Überhang der PCR-Produkte schneidet, integriert unmittelbar vor der Insert-Sequenz das Startcodon ATG in den Zielvektor. So kann eine Translation des gewünschten Proteins in C-terminalen-His-Tag-Vektoren, wie pET29b (-), begünstigt werden. Die anschließende Transformation (s. Abschnitt 4.1.5.2) der Ligationsansätze in elektrokompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen lieferte eine Vielzahl von Klonen, von denen fünf bis sieben Klone in Flüssigmedium kultiviert (s. Abschnitt 4.1.3.1), die Plasmide extrahiert (s. Abschnitt 4.1.4) und mittels Restriktionsverdau (s. Abschnitt 4.1.12, vgl. Tabelle 12) überprüft wurden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Enzyme sowohl im Vektor als auch im Insert jeweils einmal schneiden.

Die Resultate sind in den Abbildungen 48-51 dargestellt. Der Testverdau von pPP01 und pPP03 (vgl. Tabelle 1) der Oocydin A-Plasmide mit *ApaI* lieferte fünf positive Klone mit den Bandengrößen von 1528 bp und 4710 bp für pPP01 sowie drei positive Klone mit 1473 bp und 4710 bp für pPP03 (Abbildung 48).

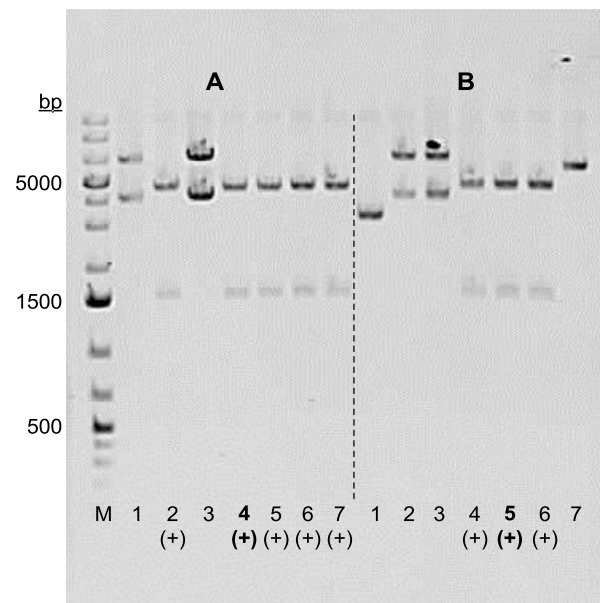


Abbildung 48: Restriktionsverdau mit *Apal* von pPP01 (**A**; 1528 bp/ 4710 bp) und pPP03 (**B**; 1473 bp/ 4710 bp) (Oocydin A-Plasmide); erwartete Bandengröße in Klammern angegeben; 1-7: getestete Klone; positive Klone mit (+) gekennzeichnet; sequenzierte Klone als: **Zahl (+)** markiert; M = Marker.

Die Restriktion mit *XbaI* der Plasmide pPP05 und pPP07 (vgl. Tabelle 1) aus den Pederin-Konstrukten lieferte fünf positive Klone mit den Größen von 803 bp und 5389 bp für pPP05 sowie drei positive Klone mit 761 bp und 5298 bp für pPP07 (Abbildung 49).

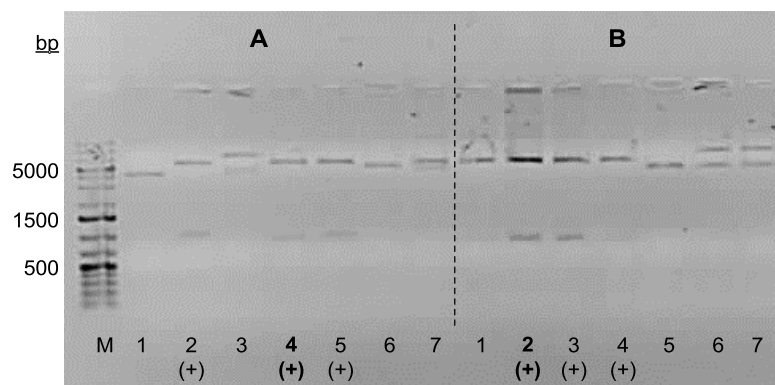


Abbildung 49: Restriktionsverdau mit *XbaI* von pPP05 (**A**; 803bp/ 5398bp) und pPP07 (**B**; 761bp/ 5298 bp) (Pederin-Plasmide); erwartete Bandengröße in Klammern angegeben; 1-7: Klone; positive Klone mit (+) gekennzeichnet; sequenzierte Klone als: **Zahl (+)** markiert; M = Marker.

Die Restriktionsverdaue mit *Apal* und *NcoI* von pPP09, pPP11 und pPP13 (vgl. Tabelle 1) der Misakinolid-Plasmide sind in Abbildung 50 dargestellt. Für pPP09 ergab sich ein positiver Klon mit den Banden 1533 bp und 4680 bp. Der Testverdau für pPP11 lieferte zwei Klone bei den erwarteten Banden von 1503 bp und 4608 bp. Für pPP13 wurden fünf positive Klone mit 1503 bp und 4680 bp erhalten.

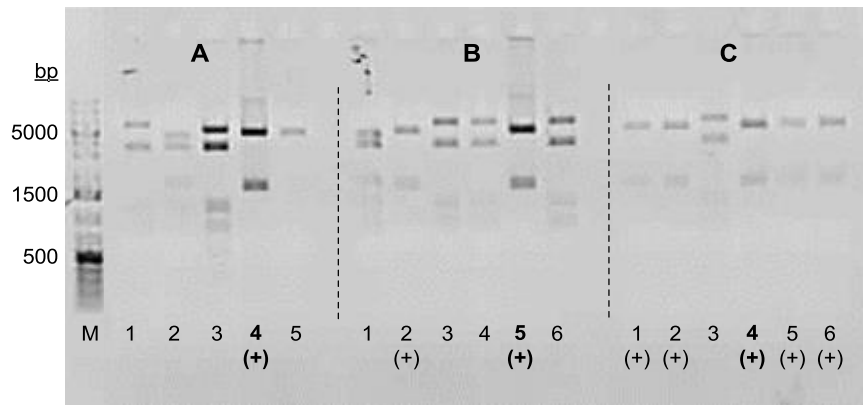


Abbildung 50: Restriktionsverdau mit *Apal* und *NcoI* von pPP09 (**A**; 1533 bp/ 4680 bp), pPP11 (**B**; 1503 bp/ 4608 bp) und pPP13 (**C**; 1503 bp/ 4680 bp) (Misakinolid-Plasmide); erwartete Bandengröße in Klammern angegeben; 1-5 für **A** bzw. 1-6 für **B** und **C**) getestete Klone; positive Klone mit (+) gekennzeichnet; sequenzierte Klone als: **Zahl (+)** markiert ; M = Marker.

Die Restriktionsverdaue mit *BglII* der Psymberin-Plasmide (vgl. Tabelle 1) pPP15 und pPP17 erwiesen sich ebenfalls als positiv. Für pPP15 wurden vier Klone mit den gesuchten Banden bei 462 bp und 5611 bp erhalten sowie zwei positive Klone mit 462 bp und 5608 bp für pPP17 (Abbildung 51).

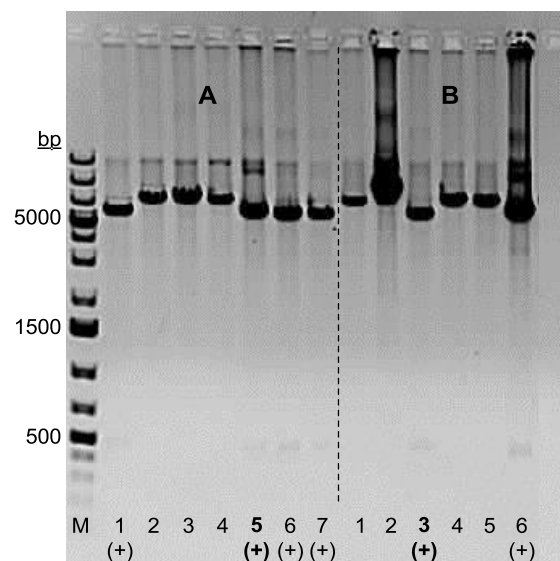


Abbildung 51: Restriktionsverdau mit *BglII* von pPP015 (**A**; 462 bp/ 5611 bp) und pPP17 (**B**; 462 bp/ 5608 bp) (Psymberin-Plasmide); erwartete Bandengröße in Klammern angegeben; 1-7 für **A** bzw. 1-6 für **B** getestete Klone; positive Klone mit (+) gekennzeichnet; sequenzierte Klone als: **Zahl (+)** markiert M = Marker.

Die Sequenzanalyse der Firma *GATC* war für alle mit (+)-gekennzeichneten Konstrukte (vgl. Abbildungen 48-51) erfolgreich und zeigte, dass keine Mutationen durch die PCR eingeführt wurden (s. Abschnitt 4.1.11). Im Anschluss wurden die sequenzierten Plasmide in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert (4.1.5.2). Die Proteinproduktion wurde mit IPTG induziert, das die Transkription der Inserts über das T7-Promotorsystem der Vektoren reguliert (s. Abschnitt 4.1.13.1). Als

Kultivierungsmedien wurden LB-, 2xYT- und TB-Medium getestet. So lieferte zum Beispiel eine Proteinproduktion für das Expressionsplasmid pPP08 der Misakinolid-PKS in TB-Medium eine mehr als dreifach höhere Proteinkonzentration wie in LB-Medium (Tabelle 2). Die verbesserte Ausbeute ist dabei vermutlich auf eine erhöhte Zelldichte kurz vor der Induktionsphase zurückzuführen, die aufgrund der gesteigerten Nährstoffversorgung im Vergleich zu LB auch bei höheren Zellzahlen möglich ist.

Tabelle 2: Beispiel zum Vergleich der Proteinkonzentrationen in LB-, 2xYT- und TB-Medium (mittels *IMPLEN Nanophotometers™ P-330* gemessen), bezogen auf jeweils 1 L-Kultur nach dem Entsalzen mit 3.5 mL Lagerungspuffer (s. Abschnitt 4.1.13).

Protein (vgl. Tabelle 3)	LB (mg/mL)	2xYT (mg/mL)	TB (mg/mL)
MisF-PS1	0.46	0.94	1.47

Der His-Tag am C-terminalen Ende (pET29b (-)) bzw. am N-Terminus (pET28b (-)) der Proteine diente zur Aufreinigung durch Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) an einer Nickel-NTA Matrix. Die Ausbildung eines Nickel-Chelat-Komplexes mit dem His-Tag der Pyransynthaseenzyme ermöglichte im folgenden Schritt die Elution der Proteine durch Ligandenaustausch mithilfe ansteigender Imidazolkonzentration (s. Abschnitt 4.1.13.2). Die einzelnen Fraktionen wurden aufgefangen und anhand SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert (s. Abschnitt 4.1.13.3). Eine Übersicht der exprimierten Proteine liefert Tabelle 3.

Tabelle 3: Übersicht der hergestellten Expressionsplasmide zur Überprüfung der PS-Aktivität.

Protein	Expressionsplasmid in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Proteingröße (kDa)
Ooc-PS1	pPP02	35.3
Ooc-PS2	pPP04	37.3
PedF-PS1	pPP06	36.1
PedF-PS2	pPP08	31.5
MisF-PS1	pPP10	37.8
MisF-PS2	pPP12	34.3
MisF-PS3	pPP14	36.7
PsyD-PS1	pPP16	30.4
PsyD-PS2	pPP18	31.4

Alle Proteine in den Abbildungen 52-55 zeigten Doppelbanden in den SDS-PAGE-Gelen. Diese Doppelbanden wurden vermutlich durch eine proteolytische Spaltung der Proteine während der Aufreinigung verursacht. Für die Expressionsplasmide pPP02 und pPP04 mit den Inserts *ooc-PS1* und *ooc-PS2* wurden die korrekten Banden mit einer Größe von 35.3 kDa und 37.3 kDa nachgewiesen (s. Abbildung 52).

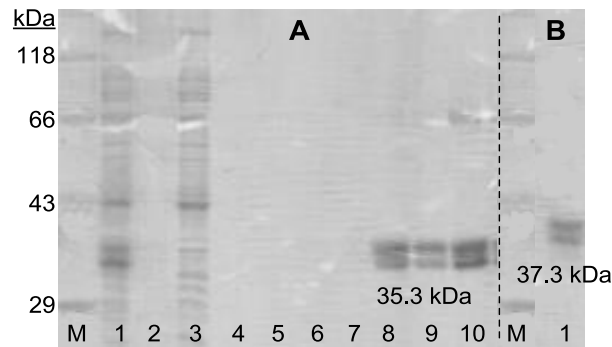


Abbildung 52: SDS-PAGE-Gel der Expression mittels pPP02 (**A**) und pPP04 (**B**) mit den Inserts *ooc-PS1* und *ooc-PS2*; M = Marker; **A**) 1 = Überstand, 2 = Pellet, 3 = Durchfluss, 4 = Waschfraktion, 5 = Waschfraktion mit 30 mM Imidazol, 6 = 50 mM Imidazol, 7 = 100 mM Imidazol, 8 = 150 mM Imidazol, 9 = 200 mM Imidazol, 10 = 250 mM Imidazol. **B**) 1 = Elutionsfraktion mit 200 mM Imidazol.

Die Expression mittels pPP06 und pPP08 lieferte die erwarteten Größen von 36.1 kDa und 31.5 kDa für die Proteine PedF-PS1 und PedF-PS2 (s. Abbildung 53).

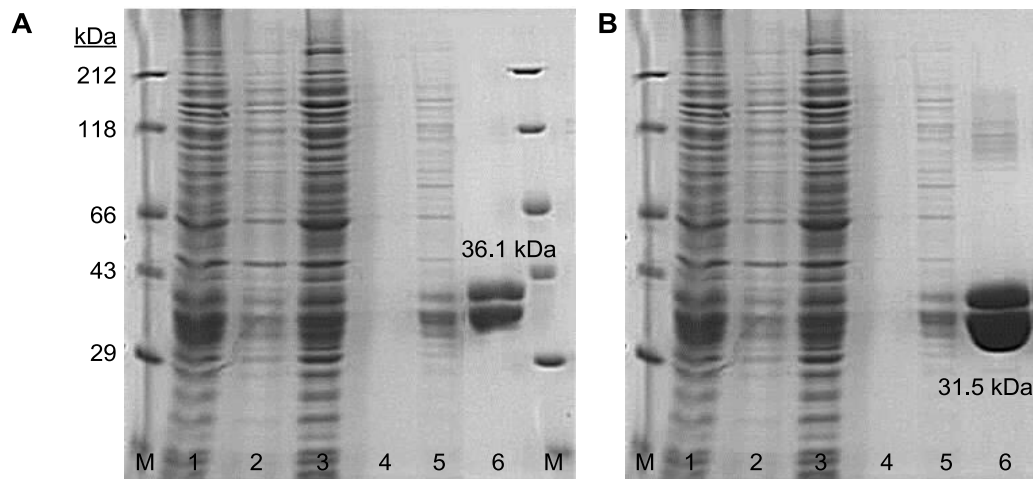


Abbildung 53: SDS-PAGE-Gel der Expression mittels pPP06 (**A**) und pPP08 (**B**) mit den Inserts *pedF-PS1* und *pedF-PS2*; **A**) M = Marker, 1 = Überstand, 2 = Pellet, 3 = Durchfluss, 4 = Waschfraktion, 5 = Waschfraktion mit 30 mM Imidazol, 6 = Elutionsfraktion mit 300 mM Imidazol; **B**) M = Marker, 1 = Überstand, 2 = Pellet, 3 = Durchfluss, 4 = Waschfraktion, 5 = Waschfraktion mit 30 mM Imidazol, 6 = Elutionsfraktion mit 300 mM Imidazol.

Für die Proteine Mis-PS1, Mis-PS2 und Mis-PS3 wurden mittels Expression von pPP10, pPP12 und pPP14 die korrekten Bandengrößen von 37.7 kDa, 34.3 kDa und 36.7 kDa erhalten (s. Abbildung 54).

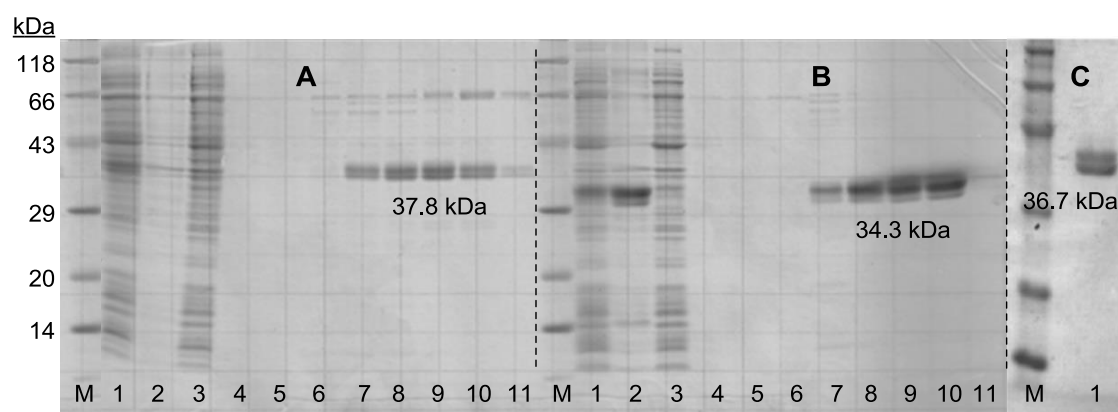


Abbildung 54: SDS-PAGE-Gel der Expression mittels pPP10 (A), pPP12 (B) und pPP14 (C) mit den Inserts *misF-PS1*, *misF-PS2* und *misF-PS3*; M = Marker; A, B) 1 = Überstand, 2 = Pellet, 3 = Durchfluss, 4 = Waschfraktion, 5 = Waschfraktion mit 30 mM Imidazol, 6 = 50 mM Imidazol, 7 = 100 mM Imidazol, 8 = 150 mM Imidazol, 9 = 200 mM Imidazol, 10 = 250 mM, 11 = 300 mM Imidazol; C) 1 = Elutionsfraktion mit 300 mM Imidazol.

Die Expressionsplasmide pPP14 und pPP16 mit den Inserts *psyD-PS1* und *psyD-PS2* lieferten zwei Enzyme PsyD-PS1 und PsyD-PS2 mit den zutreffenden Größen von 30.4 kDa und 31.4 kDa (s. Abbildung 55).

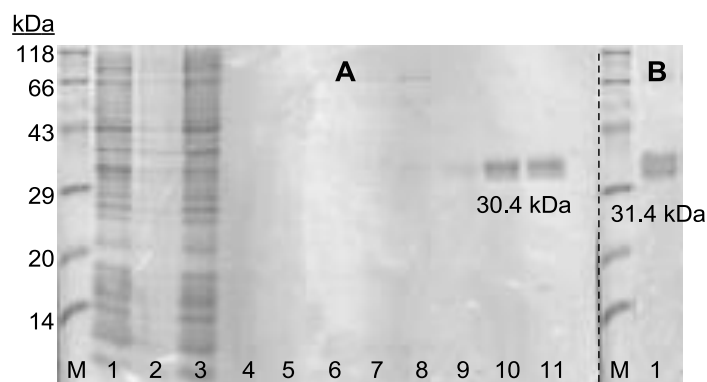


Abbildung 55: SDS-PAGE-Gel der Expression mittels pPP16 (A) und pPP18 (B) mit den Inserts *psyD-PS1* und *psyD-PS2*; M = Marker; A) 1 = Überstand, 2 = Pellet, 3 = Durchfluss, 4 = Waschfraktion, 5 = Waschfraktion mit 30 mM Imidazol, 6 = 50 mM Imidazol, 7 = 100 mM Imidazol, 8 = 150 mM Imidazol, 9 = 200 mM Imidazol, 10 = 250 mM, 11 = 300 mM Imidazol. B) 1 = Elutionsfraktion mit 250 mM Imidazol.

Fazit: Die Überproduktion der Pyransynthase-Domänen aus den trans-AT-PKS von Oocydin A (59a), Pederin (27), Misakinolid A (40) und Psymberin (41) war erfolgreich. PCRen der kodierenden Regionen der PS-Domänen für Oocydin A (59a), Pederin (27) und Psymberin (41) lieferten jeweils zwei positive Konstrukte (ooc-PS1, ooc-PS2, pedF-PS1, pedF-PS2, psyD-PS1 und psyD-PS2). Durch die Amplifizierung der kodierenden Bereiche der PS-Domäne der Misakinolid-PKS wurden drei positive Konstrukte (misF-PS1, misF-PS2 und misF-PS3) erhalten. Nach erfolgreicher Klonierung und Transformation wurden die entsprechenden Expressionsplasmide (pPP02, pPP04, pPP06, pPP08, pPP10, pPP12 und pPP14) für die PS-Domänen der trans-AT-PKS von

Oocydin A (**59a**), Pederin (**27**) und Misakinolid A (**38**) aus dem Ursprungsvektor pET29b (-) erhalten. Für die PS-Domäne der trans-AT-PKS von Psymberin (**41**) wurden zwei Expressionsplasmide (pPP16 und pPP18) aus pET28b (-)-Vektor generiert. Die gewonnenen Proteine (Ooc-PS1-2, PedF-PS1-2, MisF-PS1-3, PsyD-PS1-2) zeigten bei der Analyse mittels SDS-PAGE die erwarteten Größen. Anhand einer semiquantitativen Auswertung der Proteingele konnte bestimmt werden, dass die Proteinausbeuten der Pyransynthasen für Pederin (**27**)- und Misakinolid A (**40**) generell höher waren als die Ausbeuten der PS für Oocydin A (**59a**) und Psymberin (**41**). Der Vergleich untereinander zeigte die höchsten Ausbeuten für Ooc-PS1, PedF-PS2 und PsyD-PS1 im Gegensatz zu Ooc-PS2, Ped-PS1 und PsyD-PS2. Für die Proteine MisF-PS1 und MisF-PS3 war die Überproduktion gleich gut, für MisF-PS2 war die Ausbeute geringer. Eine Steigerung der Proteinkonzentration wurde durch den Gebrauch von TB-Medium anstatt von LB-Medium während der Überproduktion erzielt. Zukünftig soll eine Kooperation mit einer Münchener Arbeitsgruppe angestrebt werden, um durch Kristallstrukturuntersuchungen der PS-Domänen weitere Erkenntnisse zum aktiven Zentrum der PS zu erfahren.

3.1.2 Synthese der Testsubstrate zur Untersuchung der Pyransynthaseaktivität

Als Testsubstrate zur Untersuchung der PS-Aktivität dienten SNAC-Thioester **107**. In der Biosynthese von Polyketiden werden, wie in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, CoA-Thioester **10** als natürliche Intermediate prozessiert (Abbildung 56). Frühere Studien belegten, dass SNAC-Analoga erfolgreich von den Organismen akzeptiert und prozessiert werden.^{89,90} Ein großer Vorteil der SNAC-Thioester **107** im Vergleich zu den CoA-gebundenen Substraten **10** ist das kostengünstige Ausgangsmaterial NAC (**108**) anstatt CoA (**9**) und die Membrangängigkeit der Thioester **107**. Des Weiteren sind die SNAC-Derivate **107** stabiler und einfacher handhabbar.

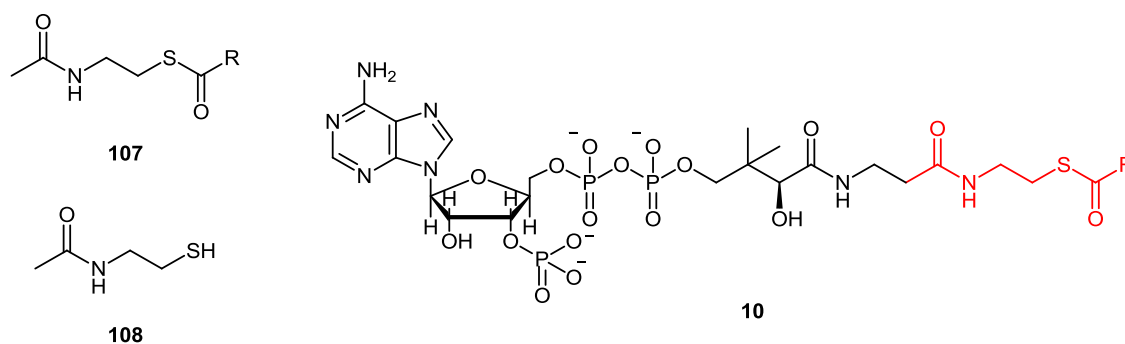


Abbildung 56: SNAC-Thioester **107**, NAC (**108**) und CoA-gebundener Thioester **10**.

Die offenkettigen SNAC-Testsubstrate des Typs **X** wurden als vereinfachte Kurzkettenintermediate (vgl. Tabelle 4) dargestellt. Diese Modellssubstrate des Typs **X** weisen als essentielle funktionelle Gruppen ein α,β -ungesättigtes System und eine primäre oder sekundäre Hydroxyfunktion auf. Anhand der KR-Stereospezifität innerhalb der Module wurde von einer *E*-konfigurierten Doppelbindung ausgegangen. Dazu wurden KR-Analysen von Prof. Piel (nicht veröffentlicht) herangezogen, um die Stereochemie des generierten β -Hydroxythioesters **21** (vgl. Abbildung 7) zu postulieren und daraus die Konfiguration der Doppelbindung abzuleiten. Ist ein Aspartat-haltiges Motiv in der KR-Sequenz enthalten, wird als Biosyntheseintermediat ein *D*-konfigurierter β -Hydroxythioester angenommen, der darauf unter Katalyse einer DH zu einer α,β -(*E*)-Doppelbindung führt. Im Gegensatz dazu wird bei der Abwesenheit eines Aspartat-haltigen Motivs ein *L*-konfigurierter β -Hydroxythioester postuliert, der im Anschluss durch die DH zu einer α,β -(*Z*)-Doppelbindung reduziert wird.^{91,92} Für die Untersuchung der Oocydin A-PS wurde die Hydroxygruppe in ε -Position, für alle anderen exprimierten Pyransynthasen in ζ -Position, eingeführt. Als Referenzsubstanzen für anschließende HPLC-Untersuchungen wurden ebenfalls die abgeleiteten Furan- und Pyranderivate des Typs **Y** dargestellt (s. Abbildung 57).

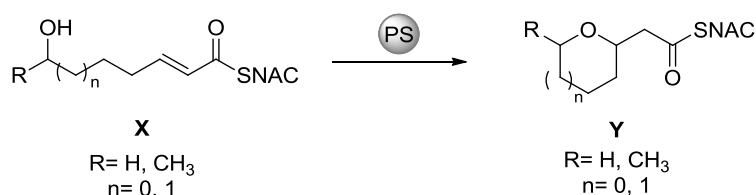


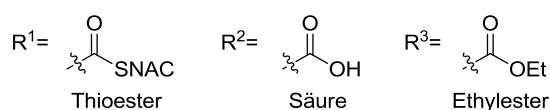
Abbildung 57: Beispiel der Testsubstrate des Typs **X** und **Y** zur Untersuchung der PS-Aktivität.

Weiterhin wurden die offenkettigen Säuren **62** und **63** und Ester **64** und **65** als Testsubstrate sowie die cyclischen Analoga **68**, **69**, **70** und **71** als Referenz synthetisiert. Ebenfalls wurde ein offenkettiges Keto-Substrat **73** und ein Derivat **72** des putativen, natürlichen Intermediats für die Misakinolid-PS mit der Hilfe von Dr. Kohlhaas (AG Piel) synthetisiert.⁸³ Alle dargestellten Verbindungen **60-85** sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Zu Beginn der chemischen Arbeiten wurden zunächst die offenkettigen, ungesättigten ζ -Hydroxythioester des Typs **X** ($n=1$) und die Pyran-abgeleiteten geschlossenen Referenzen des Typs **Y** ($n=1$) synthetisiert. Diese wurden aus den putativen Biosynthesen der Naturstoffe Misakinolid A (**40**), Pederin (**27**) und Psymberein (**41**) abgeleitet. Die ungesättigten ε -Hydroxythioester des Typs **X** ($n=0$) sowie die Furan-abgeleiteten geschlossenen Referenzsubstanzen des Typs **Y** ($n=0$) wurden erst nach der Strukturaufklärung des natürlichen Metaboliten **59a** der *D. dadantii*- bzw. *S. plymuthica*-PKS synthetisiert. Das Strukturmotiv von Oocydin A (**59a**) wies nicht wie

zuvor angenommen ebenfalls einen Pyran- sondern einen Furanring auf. Deshalb wurden diese Testsubstrate **74-85** erst am Ende dieses Promotionsvorhabens, nachdem die Struktur von Oocydin A (**59a**) aufgeklärt wurde, dargestellt. Die sekundären Testsubstrate **60, 62, 64, 72, 73, 74, 76, 78, 80, 82** und **84** wurden als racemisches Gemisch synthetisiert. Die geschlossenen Referenzsubstrate **66, 68** und **70** wurden hauptsächlich als *syn*-Derivate erhalten.

Tabelle 4: Dargestellte Testsubstrate **60-85**. *a*: Die Thioester **61** und **67** wurden von Dr. Sarah Frank (AG Piel) synthetisiert; *b*: Der Thioester **109** wurde von Dr. Christoph Kohlhaas (AG Piel) synthetisiert; *c*: Die Säure **77** konnte nicht dargestellt werden; *d*: Käuflich erworben bei der Firma *Sigma Aldrich*. **xx** = Substratnummern **60-85** und **109**.



Offenes Testsubstrat	R (xx)	Geschlossenes Testsubstrat	R (xx)
	CH ₃ : 60 H: 61^a		CH ₃ : 66 H: 67^a
	CH ₃ : 62 H: 63		CH ₃ : 68 H: 69
	CH ₃ : 64 H: 65		CH ₃ : 70 H: 71
	72		109^b
	73		
	CH ₃ : 74 H: 75		CH ₃ : 80 H: 81
	CH ₃ : 76 H: 77^c		CH ₃ : 82 H: 83^d
	CH ₃ : 78 H: 79		CH ₃ : 84 H: 85

3.1.2.1 Synthese der Pyran- und ζ-Hydroxy-abgeleiteten Testsubstrate

Für die methylsubstituierten Testderivate **66, 68** und **70** wurde das Lacton **86** mit Diisobutylaluminiumhydrid zum Lactol **87** mit quantitativer Ausbeute reduziert (Abbildung 58).⁹³ Im Anschluss wurde das Lactol **87** in einer Kondensationsreaktion mit Malonsäure (**110**) und katalytischen Mengen Piperidiniumacetat in die Säure *syn*-**68** mit einem Diastereomerenverhältnis (dr) von *syn:anti* 20:1 und einer vergleichbaren

Ausbeute zur Literatur von 66% überführt.⁹⁴ Die Säurefunktion wurde im weiteren Verlauf der Synthese zum einen in den Ester **70**, zum anderen in das SNAC-Substrat **66** umgewandelt. Die Funktionalisierung zum Ester **70** erfolgte über die Aktivierung der Säurefunktion mit Thionylchlorid zum Carbonsäurechlorid in Ethanol als Lösungsmittel.⁹⁵ Das Produkt **70** wurde in einer guten Ausbeute von 82% erhalten. Die Kupplung der Säurefunktion und NAC (**108**) mittels EDC-HCl und katalytischen Mengen 4-DMAP ergab das SNAC-Derivat **66** in einer moderaten Ausbeute von 53%.⁸⁷ Beide Produkte **66** und **70** wurden ebenfalls als *syn*-Substrate erhalten.

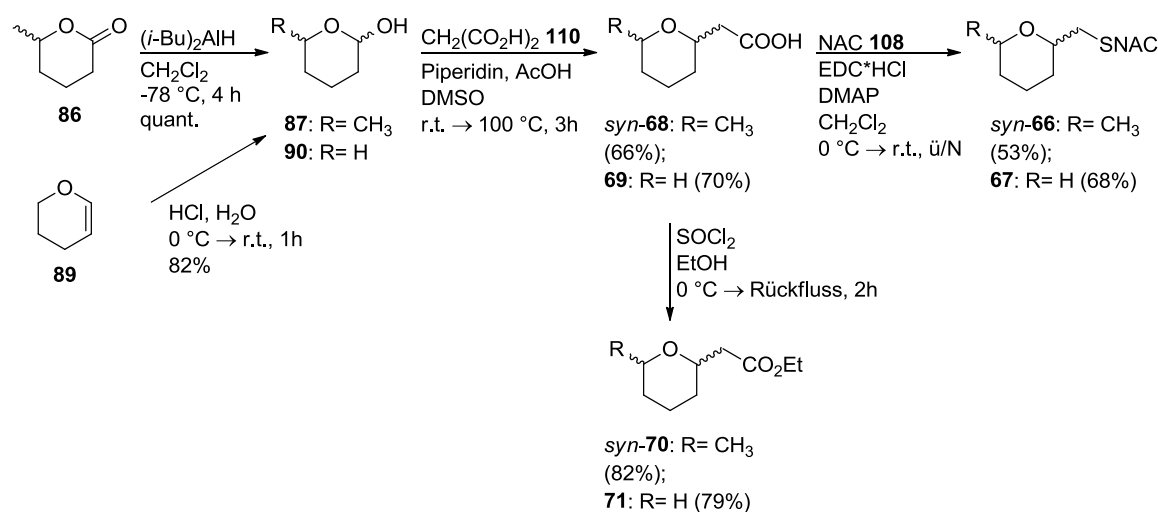


Abbildung 58: Darstellung der geschlossenen Testsubstrate **66-71**. (*i*-Bu)₂AlH: Diisobutylaluminiumhydrid, CH₂(CO₂H)₂: Malonsäure (**110**), AcOH: Essigsäure, EDC·HCl: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid, DMAP: 4-(Dimethylamino)-pyridin, DMSO: Dimethylsulfoxid.

Die Darstellung der nicht methylierten, geschlossenen Testsubstrate **69** und **71** erfolgte zunächst über die säurevermittelte Addition von H₂O an Dihydropyran (**89**) zum Lactol **90** in einer Ausbeute von 82%.⁹⁶ Die geringere Ausbeute im Gegensatz zur Literatur ist auf den größeren Maßstab zurückzuführen. Die NMR-Analyse zeigte noch einen Anteil an Edukt **89**, so dass eine erhöhte Reaktionszeit wahrscheinlich zu einem vollständigen Umsatz geführt hätte. Die Kondensation des Lactols **90** mit Malonsäure (**110**) verlief unter katalytischer Zugabe von Piperidiniumacetat in literaturvergleichbarer Ausbeute von 70% zur Säure **69**.⁹⁴ Die anschließende Veresterung wurde mithilfe von Thionylchlorid in Ethanol durchgeführt und ergab den Ester **71** in einer Ausbeute von 79%.⁹⁵ Das freie SNAC-Substrat **67** wurde von Dr. Sarah Frank (AG Piel) in einer Ausbeute von 68% synthetisiert.⁸⁷

Der Einsatz von Piperidiniumacetat in DMSO bei der Synthesesequenz war entscheidend für die Ausbildung der cyclischen Verbindungen **68** und **69** (Abbildung 59, Weg II). Wie am Beispiel des Methylderivats **87** veranschaulicht, reagierte die

offenkettige Form des Lactols **111** unter Addition der Malonsäure (**110**) zum Dihydroxydicarbonsäure-Intermediat **112**. Unter den schwach sauren Bedingungen mithilfe von Piperidiniumacetat ist die Ringschlussbildung durch Protonierung der basischeren Hydroxyfunktion und Eliminierung von Wasser bevorzugt. Im Anschluss erfolgt die Decarboxylierung zur Säure **68**. Bei der Verwendung von einer Pyridin-Piperidin-Lösung wird das Lactol **87** in einer Doebner-Variante der Knoevenagel-Reaktion in die entsprechende α,β -ungesättigte Säure **62** (Abbildung 59, Weg I) überführt.⁹⁷ Im basischen Milieu erfolgt die Eliminierungsreaktion schneller als die Ringschlussreaktion.

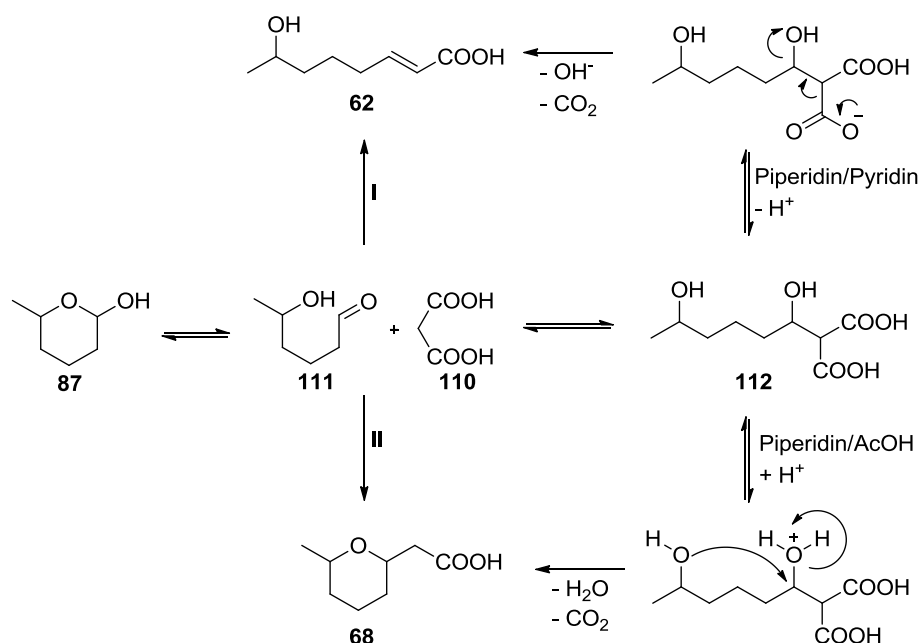


Abbildung 59: Mechanismus der Doebner-Variante der Knoevenagel-Reaktion gegenüber der intramolekularen Ringschlussbildung.

Zur Synthese der offenkettigen Methyl-Testsubstrate **60**, **62** und **64** wurde das Lactol **87** (s. Abbildung 58) aus der vorangegangenen Reaktion und ein modifiziertes Wittig-Reagenz **88** für die direkte Darstellung des SNAC-Derivats **60** in einer Wittig-Olefinierung benötigt. Das Wittig-Reagenz **88** wurde von der Arbeitsgruppe Kirschning über zwei Stufen synthetisiert und der AG Piel überlassen.⁹⁸ Nach Verbrauch des Wittig-Reagenz **88** wurde die Substanz **88** zu weiteren Versuchszwecken selbst dargestellt. Ausgehend von Bromessigsäure (**113**) wurde mittels EDC-HCl eine Kupplung mit *N*-Acetylcysteamin (**108**) in einer üblichen Ausbeute von 63% durchgeführt.^{89b} Das Produkt **114** wurde mit Triphenylphosphan umgesetzt und unter basischen Bedingungen zum Ylen **88** in einer guten Ausbeute von 81% umgewandelt (Abbildung 60).⁹⁹

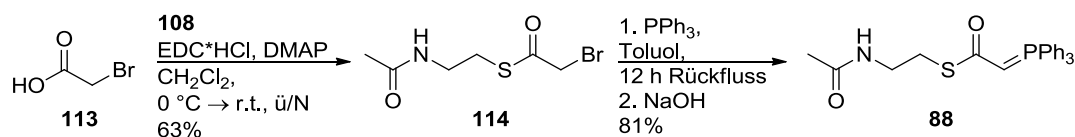


Abbildung 60: Synthese des Ylens **88**.

Die Reaktion beider Edukte **87** und **88** in Chloroform unter Rückfluss führte allerdings nicht zum gewünschten offenkettigen Produkt **60** (Abbildung 61).⁹⁹ Die NMR-Analysen ergaben, dass keine Reaktion stattgefunden hatte. Nur die Edukte **87** und **88** wurden reisoliert. Auch die Verlängerung der Reaktionszeit auf 48 Stunden führte nicht zu dem gewünschten Ergebnis. In der Literatur wurde die Synthese bisweilen nur mit Aldehyden durchgeführt. Vermutlich ist die Reaktivität des Halbacetals **87** unter den gegebenen Bedingungen zu gering, um eine Umsetzung mit dem Ylid **88** einzugehen.

Zur Synthese der offenkettigen methylsubstituierten ζ -Hydroxy-Testsubstrate **60**, **62** und **64** wurde ausgehend vom offenkettigen Ester **64** das Lactol **87** in einer Wittig-Reaktion mit Ethyl-(triphenylphosphoranyliden)-acetat (**115**) in einer literaturvergleichbaren Ausbeute von 86% dargestellt.¹⁰⁰ Der Ester **64** wurde zur Säure **62** in einer Ausbeute von 67% verseift.¹⁰¹ Als Nebenprodukt wurde ein Diastereomergemisch des geschlossenen Säure-Derivats **68** erhalten. Die nicht methylierten Produkte **63** und **65** wurden ebenfalls über diese Synthesesequenz dargestellt. Es ergaben sich für den Ester **65** eine sehr gute Ausbeute von 90% und für die Säure **63** eine Ausbeute von nur 32%. Die verminderten Ausbeuten sind vermutlich sowohl auf die Ringbildungstendenz im basischen Milieu als auch auf die Polarität der kurzkettigen Hydroxysäuren **62** und **63** und der daraus resultierenden Hydrophilie zurückzuführen. Bei der wässrigen Aufarbeitung verblieb deshalb vermutlich ein Teil der Substrate **62** und **63** in der wässrigen Phase.

Die anschließende initiierte Kupplung der freien Säure **62** mit EDC-HCl, 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), 4-DMAP und NAC (**108**) führte allerdings nicht zum gewünschten Produkt **60** (Abbildung 61, Methode A). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurden nur die cyclischen Diastereomere des Thioesters **66** und nicht umgesetztes NAC (**108**) identifiziert. Somit wurde zwar eine Reaktion zwischen der Säurefunktion **62** und NAC (**108**) möglich, jedoch erfolgte der Ringschluss unmittelbar und es wurde kein offenkettiges Produkt **60** erhalten. Aufgrund dessen wurde versucht die freie Hydroxyfunktion zu schützen und im Anschluss die Kupplung mit NAC (**108**) durchzuführen. Als Schutzgruppe wurde die *p*-Methoxybenzylgruppe gewählt, die oxidativ gespalten werden kann. Ausgehend von der Säure **62** wurde *p*-Methoxybenzylchlorid bei 0 °C vorgelegt und dann Natriumhydrid hinzugegeben

(Abbildung 61, Methode B).¹⁰² Die Auswertung der NMR-Daten lieferte nur die cyclischen Diastereomere der Säure **68** und wies keine Doppelbindungssignale mehr auf. Als letzter Versuch dieser Synthesestrategie wurde zu einer milderen Base (Imidazol) übergegangen. Als Schutzgruppe sollte Triethylsilyl dienen (Abbildung 61, Methode C), die mit Hilfe von Essigsäure oder Flusssäure gespalten werden kann.¹⁰³ Nach einer Stunde Rühren wurde *in situ* NAC (**108**) hinzugegeben. Auch dieser Ansatz lieferte leider nicht das gewünschte Produkt **60**, sondern nur den cyclisierten Thioester **66** und nicht umgesetztes NAC (**108**).

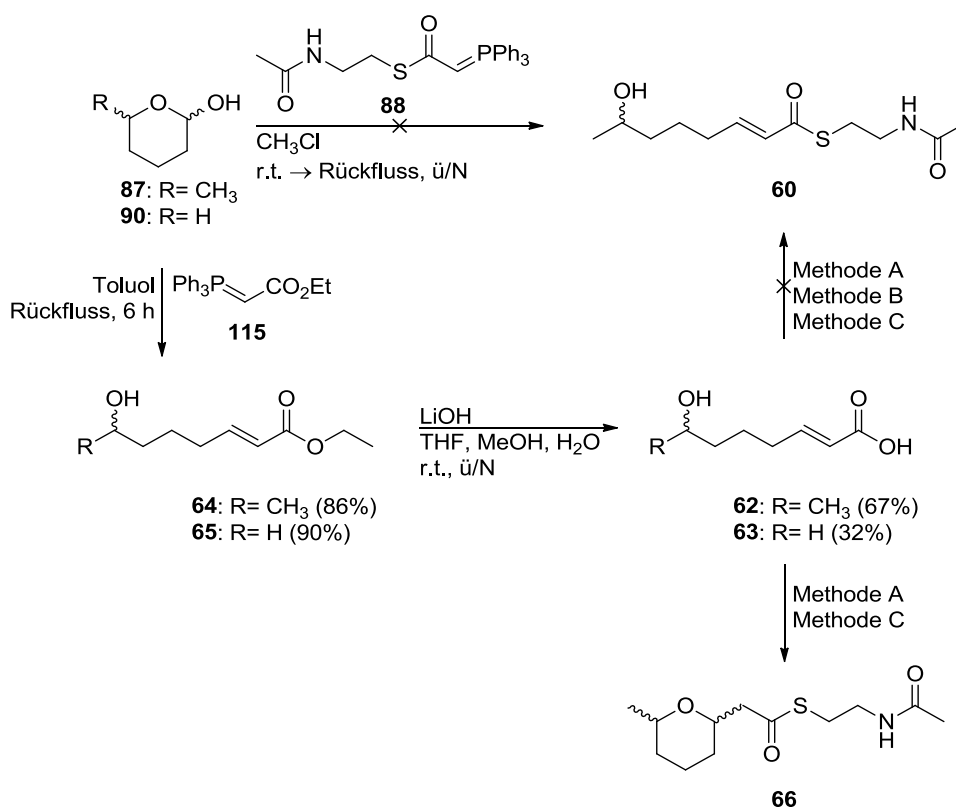


Abbildung 61: Darstellungsversuche von dem SNAC **60**. Methode A) NAC (**108**), EDC-HCl, HOBT, DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C → r.t., ü/N; Methode B) PMBCl, dann NaH, 0 °C, DMF; Methode C) 1) TESCl, Imidazol, CH₂Cl₂, 0 °C → r.t., 1 h, 2) NAC (**108**), EDC-HCl, DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C → r.t., ü/N; PMBCl: *p*-Methoxybenzylchlorid, TESCl: Triethylsilylchlorid, DMF: Dimethylformamid, THF: Tetrahydrofuran.

Um das offenkettige Testprodukt **60** zu erhalten, wurde eine neue Synthesestrategie entwickelt (Abbildung 62). In Anbetracht der vorherigen Ansätze war es notwendig die freie ζ-Hydroxyfunktion schon zu Beginn der Synthese vor der Einführung des α,β-ungesättigten Systems zu schützen, da die Cyclisierungstendenz unter basischen Bedingungen zu stark ausgeprägt war. Zunächst wurde Dihydropyran (**89**) säurevermittelt in das Lactol **90** mit einer Ausbeute von 82% umgewandelt.^{96a} Das Lactol **90** wurde in einer Grignard-Reaktion mit Methylmagnesiumbromid in üblicher Ausbeute von 72% in das Diol **91** überführt.¹⁰⁴ Hierzu wurde die Grignardlösung im Überschuss eingesetzt, da ein Äquivalent zur Deprotonierung der Alkoholfunktion von 5-

Hydroxypentanal verbraucht wurde und erst im Anschluss einen nukleophiler Angriff der Methylgruppe auf die Aldehydfunktion stattfinden konnte. Nach der quantitativen Umsetzung mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid zum geschützten *Bis*-Silylether **92** wurde selektiv die primäre Alkoholfunktion mithilfe von Fluorwasserstoffsäure in einer guten Ausbeute von 68% zum Substrat **93** wieder entschützt.^{105,106} Im Anschluss ergab die Kombination aus Swern-Oxidation und Wittig-Olefinierung den (*E*)-konfigurierten ungesättigten Ethylester **94** in einer guten Ausbeute von 81% mit einer Diastereoselektivität von 98:2.¹⁰⁷ Der Ester **94** wurde mit 79% in guter Ausbeute zur Säure **95** verseift.¹⁰¹ Die EDC-HCl vermittelte Thioesterbildung ergab das SNAC-Substrat **96** mit 53% in moderater Ausbeute.¹⁰⁸ Die Spaltung der Silyletherbindung unter milden Bedingungen mit Fluorwasserstoffsäure lieferte den primären Alkohol **60** mit 67% in vergleichbarer Ausbeute zur Literatur.¹⁰⁹

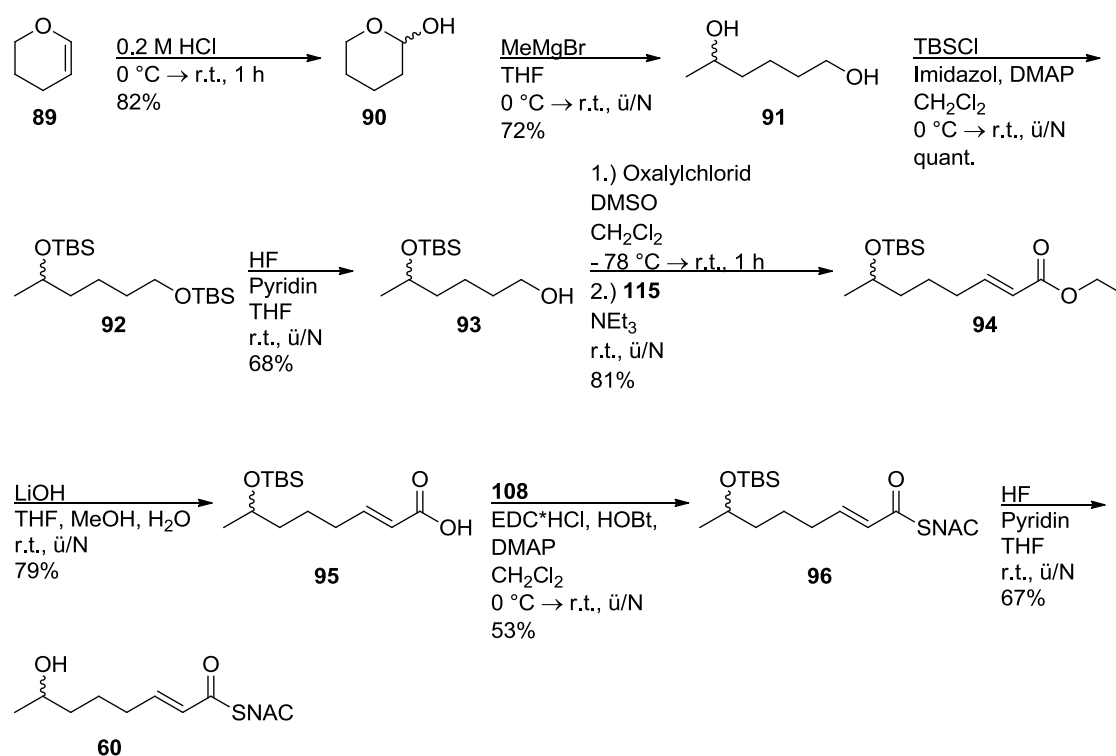


Abbildung 62: Synthese des Methyl-SNACs **60**; TBSCl: *tert*-Butyldimethylsilylchlorid.

Die Diastereoselektivität ist mit 98:2 für das (*E*)-Produkt auf die thermodynamische Reaktionskontrolle durch das stabile Phosphorylid **115** mit dem *-M*-Effekt der Esterfunktion ($-R_2$) zurückzuführen.¹¹⁰ Bei der Wittig-Olefinierung reagieren die Carbonylfunktion **116** und das Phosphorylid **117** zu beiden Oxaphosphetanen **118a** und **118b** vermutlich in einer [2+2]-Cycloaddition, allerdings ist die Bildung des *cis*-Isomers **118a** sterisch ungünstig und reversibel. In diesem Fall wurden nur 2% des (*Z*)-

Olefins **119a** dargestellt. Die Reaktion des *trans*-Produktes **118b** hingegen verläuft irreversibel und eliminiert zum (*E*)-Olefin **119b** (Abbildung 63).¹¹¹

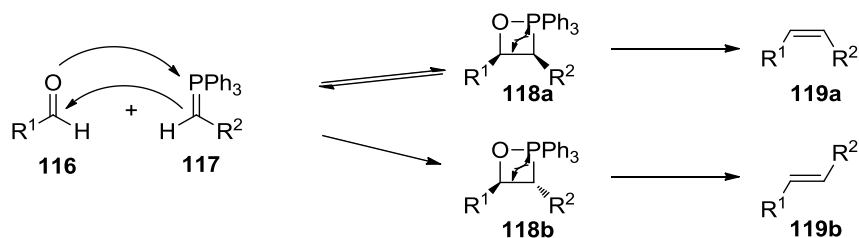


Abbildung 63: Allgemeiner postulierter Mechanismus der Wittig-Reaktion. Die [2+2]-Cycloaddition des Aldehyds **116** mit dem Phosphorylid **117** führt zu den Oxaphosphetanen **118a** und **118b**, die dann zu den jeweiligen Olefinen **119a** oder **119b** eliminieren.¹¹¹

Fazit: Die von Pyran-abgeleiteten Testsubstrate **66-71** wurden in einer einfachen, linearen Syntheseroute dargestellt. Im Fall der methylsubstituierten Produkte **66**, **68** und **70** wurden die syn-Substrate über eine Kondensationsreaktion mit Malonsäure (**110**) mit einem dr von 20:1 generiert. Die Gesamtausbeute betragen für die Säurederivate syn-**68** 0.14 g (66%) und **69** 0.09 g (70%). Für die Ethylester betrug die Gesamtausbeute syn-**70** 0.96 g (54%) und **71** 0.12 g (55%). Der Thioester syn-**66** lieferte eine Gesamtausbeute von 0.54 g (35%). Der nicht methylierte Thioester **67** wurde von Dr. Sarah Frank (AG Piel) in einer Gesamtausbeute von 0.58 g (30%) synthetisiert.¹¹²

Die offenkettigen ζ-Hydroxy-abgeleiteten Säuren **62** und **63** und Thioester **60** und **61** waren aufgrund der Ringschlusstendenz zu den Pyran-abgeleiteten Testsubtraten **66-69** schwieriger darzustellen. Die Ethylester **64** und **65** wurden in guten Ausbeuten von 0.69 g (86% für **64**) und 1.31 g (90% für **65**) mittels Wittig-Olefinierung dargestellt. Hierbei war die Bildung des Pyranringsystems unterdrückt, da keine Base in der Reaktion zugegeben werden musste. Bei der Verseifung zu den Säurederivaten **62** und **63** wurden die geschlossenen Nebenprodukte **68** und **69** bereits beobachtet. Die Gesamtausbeuten betragen für die methylsubstituierte Säure **62** 0.17 g (58%) und für die primäre Säure **63** 0.12 (29%). Über den direkten Weg war der Thioester **60** mithilfe des modifizierten Ylids **88** nicht zugänglich. Die EDC-vermittelte SNAC-Kupplung mit der freien Hydroxysäure führte direkt zum geschlossenen Produkt **66**. Auch der Versuch einer Schützung der freien ζ-Hydroxygruppe scheiterte. Eine erfolgreiche Darstellung des Thioester **60** wurde über sieben lineare Stufen in einer Gesamtausbeute von 0.09 g (9%) erzielt. Hierbei wurde die freie ζ-Hydroxyfunktion schon zu Beginn der Synthese vor der Einführung des α,β-ungesättigten Systems geschützt. Das nicht methylierte offenkettige SNAC-Testsubstrat **61** wurde von Dr. Sarah Frank (AG Piel) in einer Gesamtausbeute von 0.07g (3%) synthetisiert.⁸⁷

Zur Untersuchung der PS-Substrattoleranz wurde der offenkettige Thioester **72** dargestellt, der dem natürlichen kurzkettigen Intermediat (vgl. Abbildung 23) aus der Misakinolidbiosynthese ähnelt (Abbildung 64). Das Substrat **72** wurde bereits von Dr. Christoph Kohlhaas (AG Piel) synthetisiert.⁸³ Zum Zeitpunkt der PS-Aktivitätsassays lag das Substrat **72** allerdings nicht mehr vor, so dass die Synthese wiederholt wurde. Die HF-vermittelte Entschützung des Substrats **120** (von Dr. Christoph Kohlhaas (AG Piel) zur Verfügung gestellt) lieferte den Thioester **72** in einer Ausbeute von 24%.¹⁰⁹ Die geringe Ausbeute im Gegensatz zu der Literatur ist auf die Instabilität des elektronenarmen Diens zurückzuführen. Als Nebenreaktionen, die die Ausbeute mindern, sind nukleophile Additionen in 4-Position oder 6-Position bekannt.^{113,114}

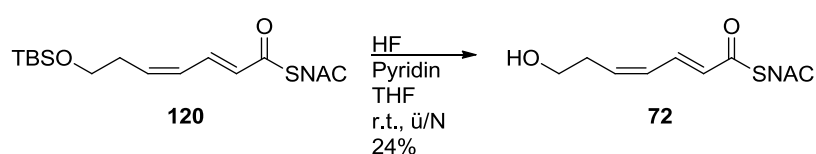


Abbildung 64: Darstellung des Thioesters **72**.

Weitere Einsichten in die PS-Spezifität sollte die Synthese des Keto-Testsubstrates **73** (Abbildung 65) liefern. Die primäre Alkoholfunktion des Diols **93** (vgl. Abbildung 62) wurde zum Aldehyd **121** mithilfe von Pyridiniumchlorochromat (PCC) in einer sehr guten Ausbeute von 92% oxidiert. Die Wittig-Reaktion mit 1-(Triphenylphosphoranyliden)-2-propanon (**122**) ergab das geschützte (*E*)-konfigurierte α,β -ungesättigte-Keton **123** in einer Ausbeute von 72%.¹¹⁵ In der NMR-Analyse wurde nicht umgesetztes Ylid **122** beobachtet. Im Anschluss wurde die Silylether-Gruppe mit Flusssäure in einer guten Ausbeute von 79% zum Testsubstrat **73** entfernt.¹⁰⁹

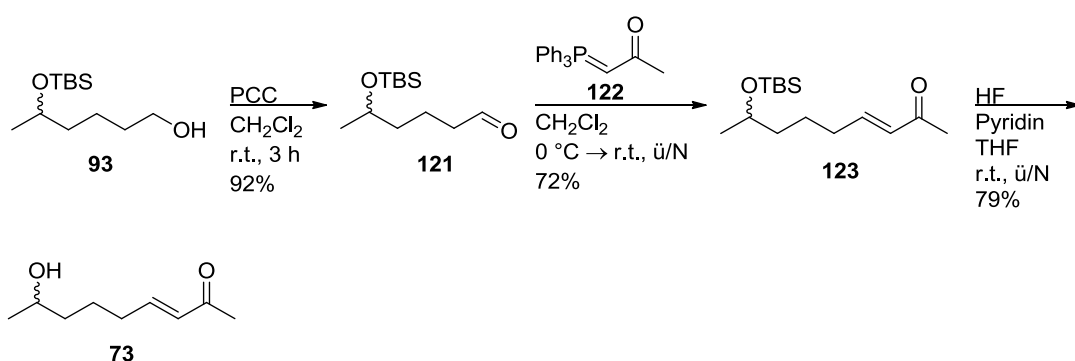


Abbildung 65: Synthese des Testsubstrates **73**.

Fazit: Der Thioester **72** wurde nach dem Protokoll von Dr. Christoph Kohlhaas (AG Piel) in einer Ausbeute von 0.09 g (24%) synthetisiert. Das Keto-Testsubstrat **73** wurde in einer Gesamtausbeute von 0.07 g (21%) dargestellt.

3.1.2.2 Synthese der Furan- und ϵ -Hydroxy-abgeleiteten Testsubstrate

Analog zu dem in Abschnitt 3.1.2.1 durchgeführten Reaktionen wurde für die methylierten Furan-abgeleiteten Testderivate **80**, **82** und **84** eine Reduktion ausgehend von γ -Valerolacton (**124**) zum Lactol **125** in einer Ausbeute von 78% durchgeführt.⁹³ Die anschließende Kondensationsreaktion mit Malonsäure (**110**) führte in einer Ausbeute von 52% zu einem racemischen Gemisch der Säure **82**.⁹⁴ Die Säurefunktion wurde anschließend EDC-HCl-vermittelt in den Thioesters **80** mit einer guten Ausbeute von 73% umgewandelt. Weiterhin wurde der Ethylester **84** durch die Aktivierung der Säure **82** mit Thionylchlorid in einer Ausbeute von 85% generiert. Für die freien Testsubstrate **85** und **81** ist die Säure **83** kommerziell verfügbar und wurde analog wie oben beschrieben umgesetzt. Die Ausbeute des Esters **85** betrug 79%. Das SNAC-Derivat **81** wurde in einer Ausbeute von 69% gewonnen (Abbildung 66).

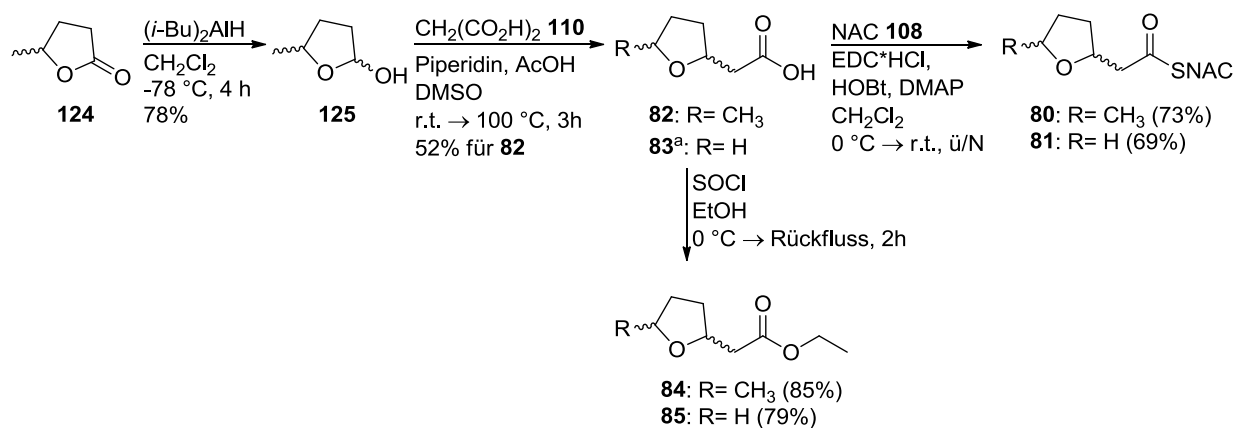


Abbildung 66: Synthese der Furan-abgeleiteten Testsubstrate; ^a: kommerziell erhältlich bei der Firma Sigma Aldrich.

Fazit: Für die methylierten Furantestderivate **80**, **82** und **84** ergaben sich die Gesamtausbeuten über zwei bzw. drei lineare Stufen von **80** 0.34 (30%), **82** 0.43 (41%) und **84** 0.16 g (34%). Die nicht methylierte Säure **83** wurde kommerziell erworben und in einer guten Ausbeute von 79% in den Ethylester **85**, sowie mit 69% Ausbeute in den Thioester **81** umgewandelt.

Analog zu dem in Abschnitt 3.1.2.1 beschriebenen Synthesen wurde für die Darstellung (Abbildung 67) des sekundären ϵ -Hydroxy-abgeleiteten Thioesters **74** das kommerziell erhältliche 1,4-Pentandiol (**126**) zunächst quantitativ in das Bis-TBS-Derivat **127** mit TBSCl umgewandelt. Im nächsten Schritt wurde selektiv die primäre Hydroxyfunktion mit HF in einer moderaten Ausbeute von 54% zum Alkohol **128** entschützt. Die Kaskade aus Swern- und Wittig-Reaktion ergab den ungesättigten Ester **129** in einer guten Ausbeute von 82%. Die Verseifung mit Lithiumhydroxid lieferte die Säure **130** in einer Ausbeute

von 54%. Die Säure **131** wurde in einer Kupplung mit NAC zum Thioester **74** in einer Ausbeute von 54% umgesetzt. Die Abspaltung der TBS-Gruppe mit Flusssäure ergab das SNAC-Substrat in einer sehr guten Ausbeute von 89%. Für das primäre SNAC-Testsubstrat **75** wurde 1,4-Butandiol (**132**) aufgrund der Symmetrie einfach mit TBSCl mit einer Ausbeute von 85% geschützt. Der Alkohol **133** wurde unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben weiter zum Ester **134** mit einer Ausbeute von 88% umgesetzt. Die Säure **135** wurde in einer Ausbeute von 66% gewonnen. Die SNAC-Kupplung erfolgte mit einer Ausbeute von 31% zum Thioester **136**. Die abschließende Entschützung ergab das SNAC-Testsubstrat **75** in einer Ausbeute von 35% (Abbildung 67 A). Die freien Säure **76**- und Esteranaloga **78** und **79** wurden über die HF-vermittelte Entschützung der TBS-geschützten Edukte **129**, **130** und **134** dargestellt (Abbildung 67 B). Die Synthese der Ethylester **78** und **79** verlief in guten Ausbeuten mit 72% für **78** und 83% für **79**. Die methylierte Säure **76** wurde mit einer geringen Ausbeute von 21% generiert. Die freie Säure **77** konnte auf diesem Weg nicht hergestellt werden. Schon bei der Synthese der ζ -Hydroxysäuren **62**, **63** waren deutliche Einbußen in der Ausbeute nach der Reaktion zu verzeichnen. Die ϵ -Hydroxysäuren **76** und **77** sind wahrscheinlich aufgrund der fehlenden CH_2 -Gruppe noch hydrophiler, so dass bei der wässrigen Aufarbeitung von der Säure **76** ein Großteil der Verbindung in der wässrigen Phase verblieb. Die Umsetzung des TBS-geschützten Eduktes **131** ergab überhaupt keine Ausbeute der freien Säure **77**.

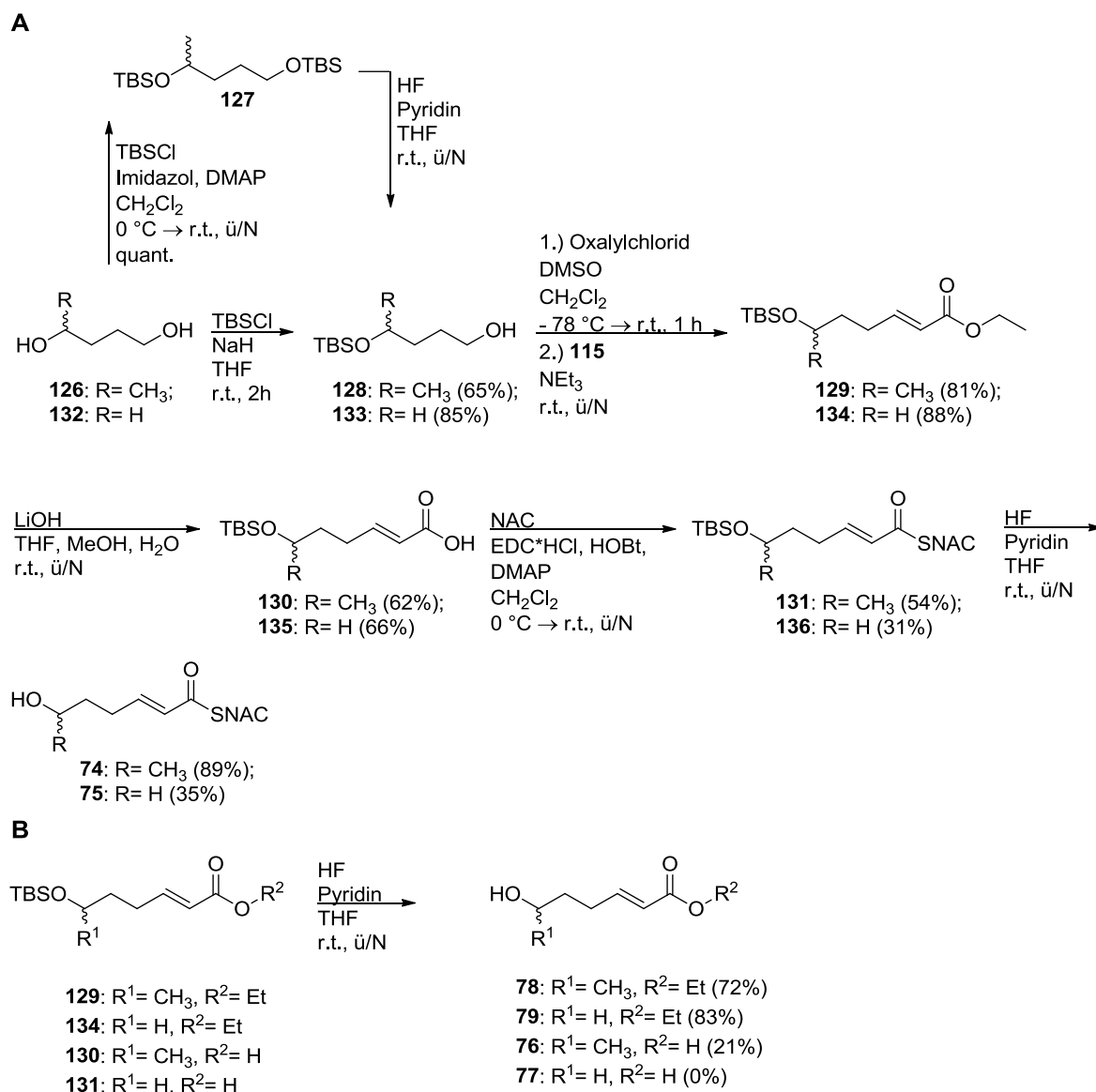


Abbildung 67: A) Synthese der offenkettigen ϵ -Hydroxy-abgeleiteten Thioester **74** und **75**; **B)** Synthese der Ester- und Säurederivate **76-79**.

Fazit: Für die offenkettigen ϵ -Hydroxy-abgeleiteten Thioester **74** und **75** wurde eine Gesamtausbeute von 0.08 g (0.16% für **74**) und 0.02 g (0.05% für **75**) erhalten. Die Ethylester **78** und **79** wurden in einer Gesamtausbeute von und 0.18 g (38% für **78**) und 0.14 g (62% für **79**) dargestellt. Die methylierte Säure **76** wurde in einer Gesamtausbeute von 0.02 g (0.07%) synthetisiert. Die freie Säure **77** konnte nicht dargestellt werden.

3.1.3 Aktivitätsassays und die Analyse der PS-Domänen mittels HPLC

Zur Untersuchung der PS-Aktivität wurden die exprimierten Proteine zunächst hinsichtlich ihrer Stabilität in unterschiedlichen Reaktionspuffern analysiert (vgl. Abschnitt 4.1.13.5). Im Anschluss erfolgte die Umsetzung der jeweiligen Enzyme mit den

dazugehörigen Testsubstraten **60-65**, **72-76** und **78-79**. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Proteine (MisF-PS1, MisF-PS3, PedF-PS2, PsyD-PS1 und Ooc-PS1; vgl. Fazit 3.1.1) mit den höchsten Proteinausbeuten verwendet. Als Negativkontrolle diente das jeweilige zuvor durch Hitze denaturierte Protein unter den gleichen Reaktionsbedingungen, wie das aktive Enzym. Die Reaktionsansätze wurden im Folgenden extrahiert und mittels HPLC untersucht (s. Abschnitt 4.1.13.6). Als Referenzsubstanzen wurden die offenkettigen ζ - bzw. ϵ -Hydroxy-Testsubstrate (**60-65**, **72-76** und **78-79**) und die Pyran- bzw. Furan-abgeleiteten Testderivate (**66-71** bzw. **80-82** und **84-85**) ebenfalls während der HPLC-Untersuchungen vermessen.

3.1.3.1 Puffertest

Zur Durchführung der PS-Assays wurde zunächst die Stabilität der einzelnen Proteine in unterschiedlichen Puffern untersucht, um ein geeignetes Reaktionsmedium während der Inkubation der Proteine mit den offenkettigen Testsubstraten zu finden (s. Abschnitt 4.1.13.5). Als Beispiel wurde das SDS-Gel von MisF-PS1 mit einer erwarteten Größe von 37.8 kDa in Abbildung 68 dargestellt. Unter den verwendeten Puffern (vgl. Tabelle 14) wurde nur für den HEPES-Puffer pH 7.5 (25 mM) die korrekte Bande beobachtet. Der MES-Puffer pH 6.5 (50 mM) lieferte ebenfalls eine Bande, allerdings handelt es sich nicht um das gewünschte Protein, da die Größe nicht 37.8 kDa entspricht. Die Untersuchung der anderen Enzyme lieferte für deren Stabilität ebenfalls in HEPES-Puffer pH 7.5 (25 mM) die besten Ergebnisse (nicht abgebildet), so dass dieser Puffer als Reaktionsmedium für die PS-Assay verwendet wurde.

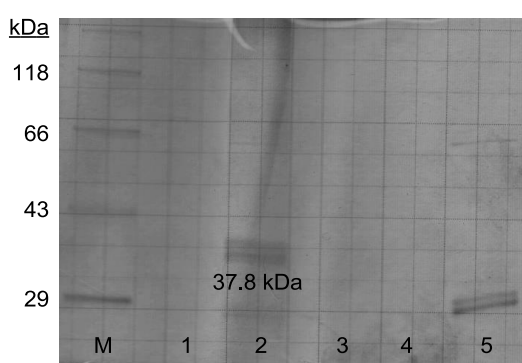


Abbildung 68: Puffertest am Beispiel von MisF-PS1; M = Marker; 1 = HEPES pH 8.2 (25 mM), 2 = HEPES pH 7.5 (25 mM), 3 = Kp, pH 7.0 (50 mM), 4 = MOPS pH 7.0 (50 mM), 5 = MES pH 6.5 (50 mM) (vgl. Tabelle 14).

3.1.3.2 HPLC-Untersuchungen der PS-Assays

3.1.3.3 PS-Assays der SNAC-Testsubstrate

Zur Validierung einer geeigneten Methode für die Analyse der PS-Assays wurden zu Beginn der Arbeiten die ersten synthetisierten SNAC-Testsubstrate **60** und *syn-66*

hinsichtlich ihres Trennverhaltens in der HPLC näher untersucht. Als isokratisches Eluentengemisch wurde 50% MeOH in H₂O und eine RP-C18 Säule verwendet (s. Abschnitt 4.1.13.7, Methode A). Das offenkettige Testsubstrat **60** wurde bei einer Retentionszeit von $t_r = 14.9$ min mit zwei Absorptionsmaxima von 224 nm und 260 nm erhalten. Die geschlossene Referenzsubstanz *syn-66* wurde bei einer Retentionszeit von $t_r = 24.8$ min und einem Absorptionsmaximum von 230 nm detektiert (Abbildung 69: **1** und **2**).

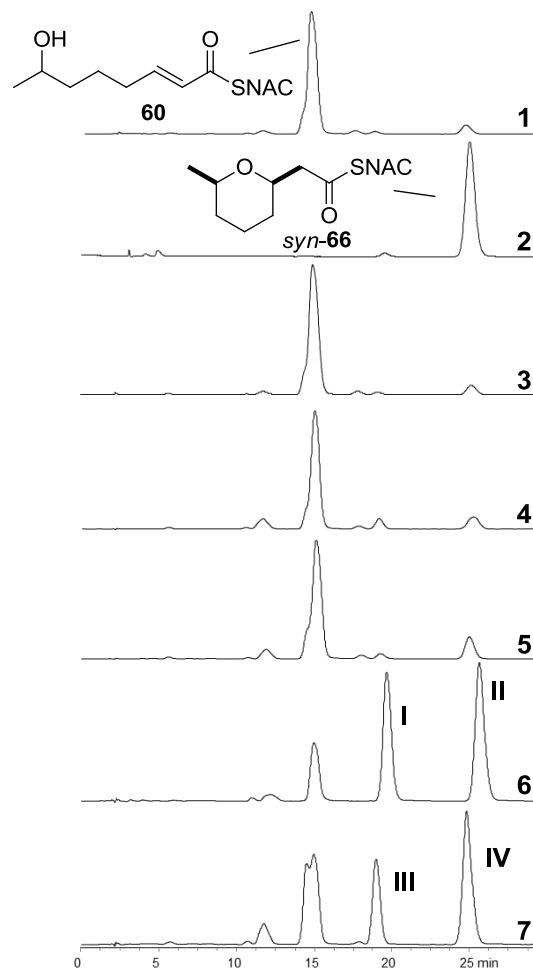


Abbildung 69: Erste Untersuchungen der einzelnen PS-Domänen; **1:** offenkettiger Test-SNAC **60**, **2:** geschlossenes Referenzsubstrat **66**, **3:** Negativkontrolle mit denaturiertem Mis-PS1 und **60**, **4:** Assay mit Ooc-PS1 und **60**, **5:** Assay mit Psy-PS1 und **60**, **6:** Assay mit Mis-PS1 und **60**, **7:** Assay mit Mis-PS3 und **60**. Peak **I-IV** wurden massenspektroskopisch untersucht.

Nach der Durchführung der Assays mit den putativen PS-Proteinen (Ooc-PS1, PsyD-PS1, MisF-PS1 und MisF-PS3) und dem Thioester **60** zeigte ein Vergleich der einzelnen Spektren, dass die Proteine Ooc-PS1 und PsyD-PS1 keinen oder nur einen sehr geringen Unterschied zu der Negativkontrolle aufwiesen (als Beispiel ist die Negativkontrolle von MisF-PS1 dargestellt, die anderen Negativkontrollen waren identisch, Abbildung 69: **3-5**). Im Falle von Ooc-PS1 war nach Aufklärung der Struktur

von Oocydin A (**59a**) ersichtlich, dass die PS-Domäne wahrscheinlich nicht in der Lage ist, das ζ -Hydroxy-Testderivat **60** zu dem Pyran-abgeleiteten Thioester **66** umzusetzen. Bei den anfänglichen Untersuchungen war noch nicht bekannt, dass es sich bei dem natürlichen Intermediat um einen ε -Hydroxythioester handelt. So wurde ausgeschlossen, dass die PS-Domäne für Oocydin A (**59a**) auch ζ -Hydroxy-Testsubstrate toleriert. Das Expressionsplasmid pPP16 mit dem Insert *psyD-PS1* des PsyD-PS1-Proteins liegt in dem Vektor pET28b (-) vor. Für die Klonierung der Konstrukte in den pET29b (-)-Vektor wurden keine positiven Klone erhalten. Möglicherweise ist die Faltung der Proteine nicht korrekt, so dass der ζ -Hydroxythioester **60** nicht umgesetzt werden kann. Im Gegensatz dazu wurden für den Assay von MisF-PS1 sowie MisF-PS3 mit dem Thioester **60** je zwei neue Signale **I-IV** und die Abnahme des ersten Signals **60** beobachtet. Die Peaks **I-IV** wurden nach der Detektion aufgefangen und massenspektroskopisch untersucht. Alle Substanzen hatten eine Masse m/z von 282.11 ($C_{12}H_{21}NO_3SNa$), die sowohl dem Edukt **60** als auch dem Produkt **66** der Reaktion entspricht. Die Untersuchung der UV-Spektren ergab für alle Signale **I-IV** ein Absorptionsmaximum von 230 nm (Abbildung 69), was für eine Umsetzung zu dem geschlossenen System als Resultat einer konjugierten Addition und nicht einer *E/Z*-Isomerisierung der Doppelbindung spricht. Diese Hinweise ließen vermuten, dass eine PS-katalysierte Ringschlussreaktion stattgefunden hat. Allerdings waren die Retentionszeiten nicht konsistent und einer Verbreiterung der Signale mit zunehmender Zeit wurde beobachtet, so dass die vorliegende Methode nicht geeignet war, um die Signale den Referenzsubstanzen eindeutig zuzuordnen. Die Verwendung von einem Eluentengemisch aus Methanol und Wasser führte wahrscheinlich bei längerer Benutzung, da alle Proben hintereinander gemessen worden sind und zwischen jeder neuen Probe ein Spülgang und eine Equilibrierung durchgeführt werden musste, zum Überhitzen der HPLC-Säule durch das relativ viskose Gemisch. Alle nachfolgenden Messungen wurden deshalb mit einem Eluentengemisch aus Acetonitril und Wasser (vgl. Tabelle 15) durchgeführt. Dadurch wurde die Problematik der abweichenden Retentionszeiten und der Unschärfe der Signale umgangen.

Die PS-Proteine von Pederin PedF-PS1 und PedF-PS2 wurden zu einem späteren Zeitpunkt exprimiert und PedF-PS2 wurde in dem Aktivitätsassay mit dem sekundären Thioester **60** direkt nach der neuen Methode B (vgl. Tabelle 15) untersucht. Weiterhin wurden auch die von Dr. Sarah Frank (AG Piel) synthetisierten primären Testsubstrate **61** und **67** mit PedF-PS2 im PS-Assay mittels Methode B getestet. Für das primäre offenkettige ζ -Hydroxy-Testsubstrat **61** wurde eine Retentionszeit von $t_r = 3.8$ min mit zwei Absorptionsmaxima von 224 nm und 260 nm erhalten. Die geschlossene

Referenzsubstanz **67** wurde bei einer Retentionszeit von $t_r = 6.3$ min und einem Absorptionsmaximum von 230 nm gemessen (Abbildung 70: **1** und **2**).

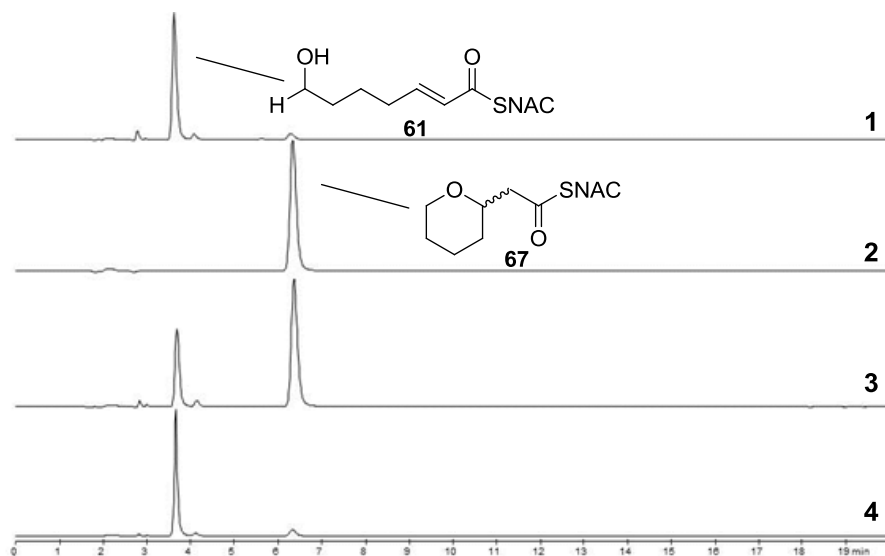


Abbildung 70: HPLC-Untersuchung der Pederin-PS-katalysierten Reaktion mit dem primären Alkohol **61**; **1** = offenes Testsubstrat **61** als Referenz, **2** = geschlossenes Testsubstrat **67**, **3** = Assay mit Ped-PS2 und **61**, **4** = Negativkontrolle (gekochtes Ped-PS2) mit **61**.

Nach Inkubation und Vermessung des Assays wurde im HPLC-Lauf ein neues Signal mit einer Retentionszeit von $t_r = 6.3$ min und einem Absorptionsmaximum von 230 nm detektiert, das in der Negativkontrolle nicht beobachtet wurde (Abbildung 70: **3** und **4**). Die exakte Masse des Signals erwies sich mit $m/z = 246.1158$ als identisch mit dem eingesetzten Substrat **61** und der Referenzsubstanz **67** ($C_{11}H_{20}NO_3S$: $m/z =$ ber. 246.1158). Anhand der übereinstimmenden Retentionszeit, der Veränderung der Absorptionsmaxima und der exakten Masse des neuen Signals wurde geschlossen, dass die PS-Domäne PedF-PS2 für die vorausgesagte katalytische Ringschlussreaktion des primären offenkettigen ζ -Hydroxy-Testsubstrats **61** zum geschlossenen Referenzsubstrat **67** verantwortlich war.

Als Nächstes wurde der sekundäre ζ -Hydroxy-Test-SNAC **60** mit Ped-PS2 inkubiert. Für Methode B lieferten die Testsubstrate Retentionszeiten von $t_r = 4.9$ min für das offene Substrat **60** mit zwei Absorptionsmaxima von 224 nm sowie 260 nm und $t_r = 11.4$ min für das geschlossene *syn*-Produkt **66** mit einem Absorptionsmaximum von 230 nm (Abbildung 71: **1** und **2**). Das Spektrum für den durchgeführten Assay mit PedF-PS1 und dem Thioester **60** lieferte, wie in Abbildung 69 für MisF-PS1 und MisF-PS3, zwei neue Signale ($t_r = 8.6$ min für **I** und $t_r = 11.4$ min für **II**) mit einem Absorptionsmaximum von je 230 nm, die nicht in der Negativkontrolle beobachtet wurden (s. Abbildung 71: **3** und **4**). Die Signale wurden mit hochauflösender Massenspektrometrie untersucht und die exakte Masse m/z betrug 282.1139 für **I** und 282.1144 für **II**, die mit den Testsubstraten

60 und *syn-66* ($C_{12}H_{21}NO_3SNa$: m/z = ber. 282.1140) übereinstimmten. Die Retentionszeit des Signals **II** war identisch mit der Retentionszeit des cyclisierten Testsubstrats *syn-66*.

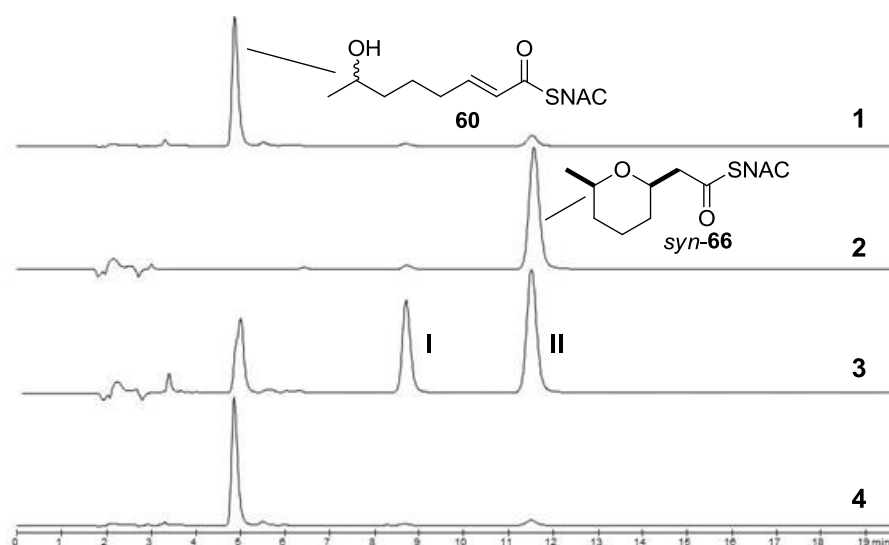


Abbildung 71: HPLC-Untersuchung der PedF-PS2-katalysierten Reaktion mit dem sekundären Alkohol **60**; **1** = offenes Testsubstrat **60** als Referenz, **2** = geschlossenes Testsubstrat *syn-66*, **3** = Assay mit PedF-PS2 und **60**, **4** = Negativkontrolle (gekochtes PedF-PS2) mit **60**.

Die übereinstimmende Retentionszeit für *syn-66*, die Verschiebung der Absorptionsmaxima und die exakten Massen der Signale **I** und **II** deuteten darauf hin, dass die PS-Domäne Ped-PS2 ebenfalls den sekundären ζ -Hydroxythioester **60** zu den entsprechenden geschlossenen Systemen **66** katalytisch umwandeln konnte. Da als Referenz nur das *syn*-Produkt *syn-66* zur Verfügung stand, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Signal **I** um das *anti*-Diastereomer *anti-66* handelt. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde der Assay in präparativen Maßstab zwecks NMR-Untersuchungen wiederholt. Die Analyse wurde von Dr. Brandon Morinaka (AG Piel) vorgenommen.⁸⁷ Aus den spektralen Daten der semipräparativen Aufreinigung des Assays per HPLC wurde das Signal **II** dem bereits synthetisierten *syn*-Testsubstrat *syn-66* eindeutig zugeordnet. Die NMR-spektroskopische Auswertung für Signal **I** ergab ebenfalls den Pyran-abgeleiteten Thioester, der anhand von 2D-NOESY (engl.: nuclear overhauser effect spectroscopy)-Experimenten als *anti*-Diastereomer *anti-66* charakterisiert wurde (Abbildung 72).

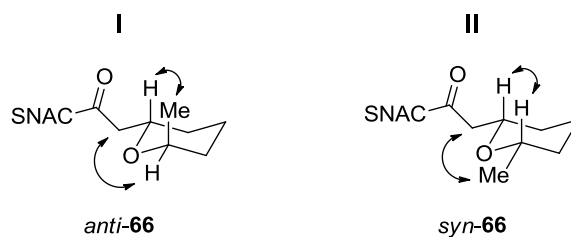


Abbildung 72: 2D-NMR-NOESY-Auswertung von Signal **I** und **II** des Assays mit PedF-PS2 und dem Thioester **66**.

Im Zuge der Strukturaufklärung von den geschlossenen Produkten *syn-66* und *anti-66* stellte sich die Frage hinsichtlich der Selektivität der PS-katalysierten Reaktion, da der eingesetzte Thioester **60** als racemisches Gemisch vorlag. Das Auftreten zweier Diastereomere könnte drei mögliche Ursachen haben. Zum einem könnte die Bildung auf eine hohe Substrat-, aber niedrige Produktselektivität zurückzuführen sein. Die Folge wären zwei angereicherte Enantiomere mit gleicher Konfiguration an C7 des Rings. Zum anderen könnte eine niedrige Substrat-, aber hohe Produktselektivität vorliegen, so dass zwei angereicherte Diastereomere mit gleicher Konfiguration in C3-Position entstehen. Als letzte mögliche Theorie überwiegt keine der beiden zuvor genannten Selektivitäten und es würde ein Produktgemisch aller vier Stereoisomere gebildet. Um diese Fragestellung zu adressieren, wurden die Thioester *syn-66* und *anti-66* der Assayreaktion mittels HPLC an einer chiralen Säule aufgereinigt. Die Trennung der Substanzen *syn-66* und *anti-66* lieferte je ein Haupt- und ein Mindermengenenantiomer, was gegen den letzten beschriebenen Fall sprach. Für das *syn*-Enantiomerengemisch wurde Enantiomerenüberschuss (*ee*) von 66.8% erhalten. Das *anti*-Enantiomerengemisch lieferte sogar einen *ee*-Wert von 88.6%. Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wurden die Signale **I** und **II** des Proteinassays in die entsprechenden Carbonsäuren umgewandelt, für die Drehwerte in der Literatur bekannt sind.⁸⁷ Die Untersuchungen ergaben, dass die Hauptenantiomere der Produkte *syn-66* und *anti-66* eine (3*S*)-Konfiguration an der gebildeten C-O-Bindung aufwiesen (Abbildung 73). Die gleiche Konfiguration tritt auch bei der C14-THP-Einheit von Pederin (**27**) auf (vgl. Abbildung 12).

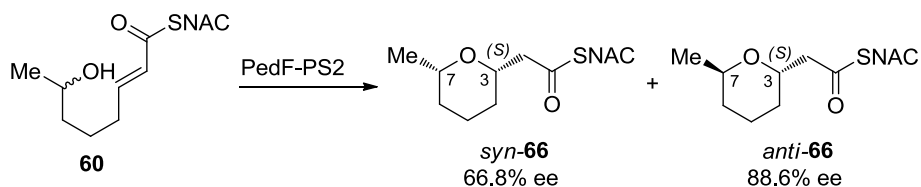


Abbildung 73: Selektivitäten der PedF-PS2-katalysierten Reaktion.

Für die Entstehung der beiden Diastereomere *syn*-**66** und *anti*-**66** wird daher vermutet, dass der Substituent in C7-Position keinen signifikanten Einfluss auf die Reaktion nimmt und eine niedrige Substratkontrolle vorliegt, der Ringschluss aber stereoselektiv erfolgt.

Die Versuchsreihe mit den Testsubstrate **61** und **67**, sowie **60** und *syn*-**66** wurde für MisF-PS1 aus dem oberen Beispiel (s. Abbildung 69) mit der neuen Methode B (vgl. Tabelle 15) wiederholt. Die Auswertung der Spektren führte zu den gleichen Ergebnissen wie für den PS-Assay mit Ped-PS2. Die Signale wurden den jeweiligen Testsubstraten eindeutig zugewiesen und eine Abweichung der Retentionszeiten wie nach Methode A war nicht mehr zu beobachten. Als Schlussfolgerung wurde bewiesen, dass auch die PS-Domäne der Misakinolid A-Biosynthese in der Lage ist, die Ringschlussreaktion der Testsubstrate **61** und **67** zu den cyclischen Produkten **60** und **66** zu katalysieren (Spektren nicht abgebildet).

Die Proteine MisF-PS1 und MisF-PS3 zeigten bereits, dass die PS-katalysierte Umwandlung von einfachen primären und sekundären ζ -Hydroxythioester **61** und **60** zu den geschlossenen Produkten **67** und **66** möglich ist. Deshalb wurde im Anschluss der Test-SNAC **72**, der ein natürliches, putatives Intermediat aus der Misakinolidbiosynthese imitiert, in PS-Assays nach Methode C (vgl. Tabelle 15) mit MisF-PS1-3 untersucht. Das offenkettige Testsubstrat **72** lieferte zwei Signale mit den Retentionszeiten von $t_r = 10.2$ min sowie $t_r = 11.2$ min und einem Absorptionsmaximum von je 280 nm. Das Auftreten von zwei Signalen wurde vermutlich durch eine Isomerisierung zum stabileren *E,E*-Doppelbindungsisomer hervorgerufen. In den NMR-Daten waren Spuren des Isomers zu beobachten. Die Dihydropyran-Referenz **109** wurde bei einer Retentionszeit von $t_r = 11.2$ min und einem Absorptionsmaximum von 230 nm detektiert (Abbildung 74: **1** und **2**). Die Auswertung der HPLC-Spektren zeigte für alle drei Proteine (MisF-PS1-3) nach der Reaktion mit dem Thioester **72** keinen Unterschied zur Negativkontrolle, nur das nicht umgesetzte Edukt **72** wurde detektiert. (Abbildung 74: **3-6**). Komplexere Substrate, wie das Dien **72**, scheinen unter den gegebenen Bedingungen *in vitro* nicht von den Proteinen toleriert zu werden.

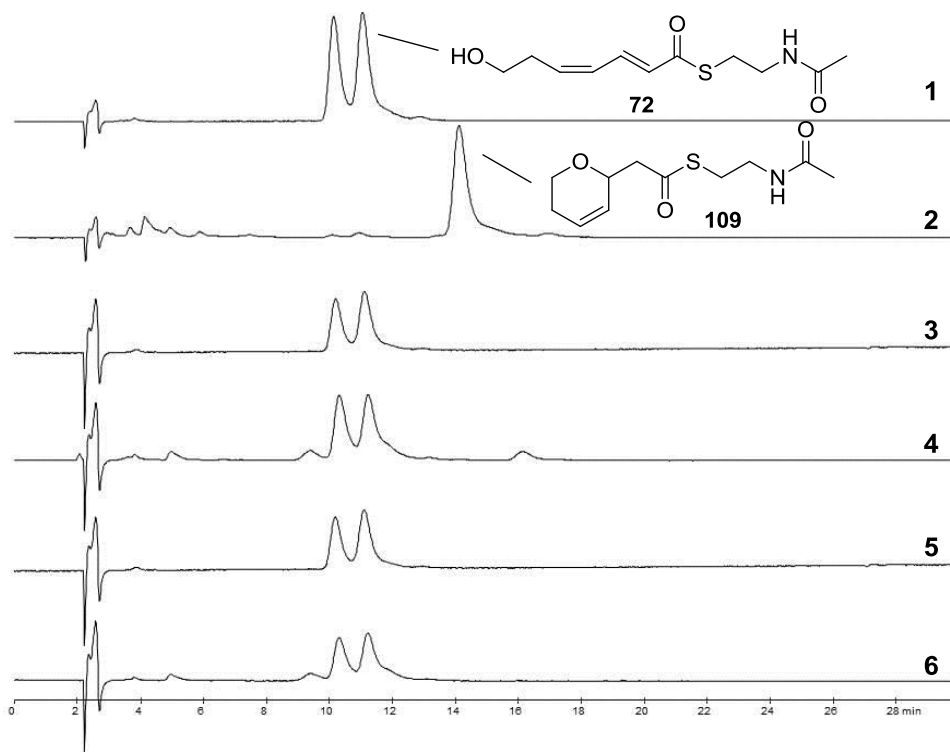


Abbildung 74: HPLC-Untersuchung der PS-katalysierten Reaktion von Mis-PS1, Mis-PS2 und Mis-PS3 mit dem primären Thioester **72**. **1** = offenes Testsubstrat **72** als Referenz, **2** = geschlossenes Testsubstrat **109**, **3** = Assay mit Mis-PS1 und dem Dien **72**, **4** = Assay mit Mis-PS2 und dem Dien **72**, **5** = Assay mit Mis-PS3 und dem Dien **72**, **6** = Negativkontrolle (gekochtes Mis-PS1) mit dem Thioester **72**.

Wie bereits erwähnt, wurde keine Reaktion für die PS-Domäne der Oocycin A (**59a**)-Biosynthese mit dem ζ -Hydroxythioester **60** beobachtet (vgl. Abbildung 69). Als natürliches Intermediat in der Biosynthese wurde nach der Strukturaufklärung des Polyketids **59a** ein ϵ -Hydroxysubstrat angenommen. Zur Untersuchung dieser PS-katalysierten Reaktion wurden die SNAC-Testsubstrate **74** und **75** mit den Proteinen Ooc-PS1 sowie Ooc-PS2 inkubiert und im Anschluss nach Methode B (vgl. Tabelle 15) mittels HPLC untersucht. Für das primäre offenkettige Testsubstrat **75** wurde eine Retentionszeit von $t_r = 3.7$ min und zwei Absorptionsmaxima von 224 nm und 260 nm detektiert. Die geschlossene Referenzsubstanz **81** lieferte eine Retentionszeit von $t_r = 4.5$ min und ein Absorptionsmaximum von 230 nm (Abbildung 75: **1** und **2**). Für die Proteine Ooc-PS1 und Ooc-PS2 wurde in den HPLC-Spektren eine Abnahme des Signals für den offenkettigen Thioester **74** beobachtet und ein neues Signal mit der Retentionszeit von $t_r = 4.5$ min und einer Wellenlänge von 230 nm für das Furan-abgeleitete Substrat **81** detektiert. Die exakte Masse des zweiten Signals von 254.0819 ($C_{10}H_{17}NO_3SNa$: $m/z = \text{ber. } 254.0821$) entsprach der Masse des Edukts **74** sowie des Produkts **81** (Abbildung 75: **3** und **4**). Allerdings konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob eine PS-katalysierte Reaktion erfolgte. Die Auswertung der Spektren von Ooc-PS1 sowie Ooc-PS2 und dem Testsubstrat **74** zeigten zwar ein deutliche Zunahme des

zweiten Signals **81**, allerdings wurde auch für die Negativkontrolle ein neues, im Gegensatz zu den Positivkontrollen, weniger intensives Signal mit einer exakten Masse von $m/z = 254.0821$ beobachtet. Die Retentionszeit weicht mit $t_r = 4.9$ min von der Referenzsubstanz **81** ab, jedoch wurde auch hier eine Verschiebung der Wellenlänge zu 230 nm detektiert.

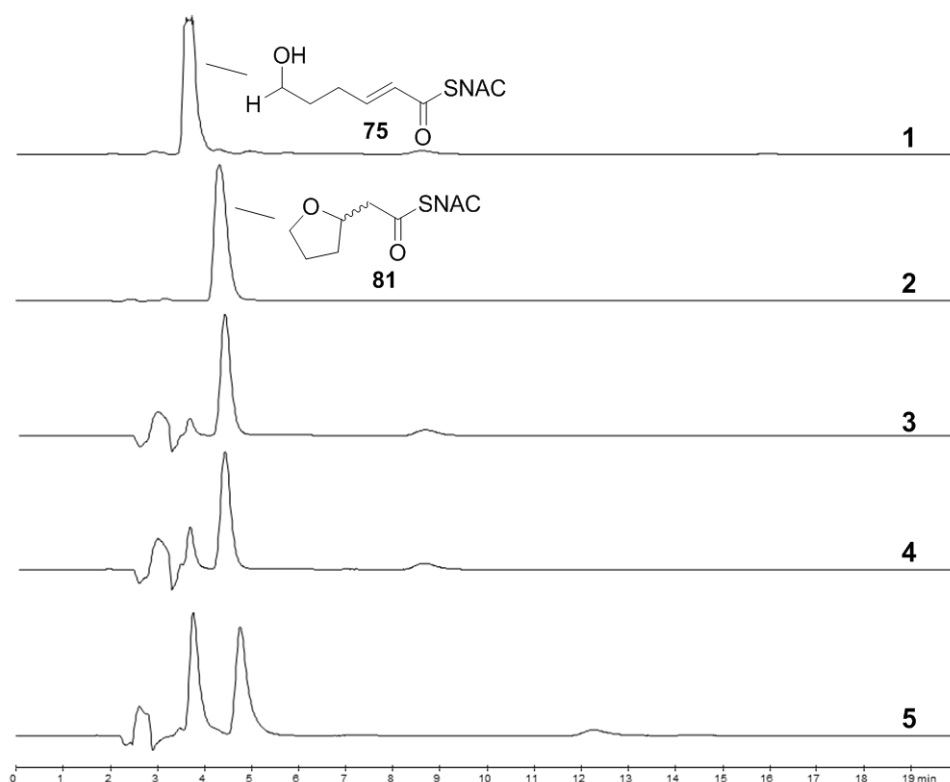


Abbildung 75: HPLC-Untersuchung der PS-katalysierten Reaktion von Ooc-PS1 und Ooc-PS2 mit dem primären Thioester **81**; **1** = offenes Testsubstrat **75** als Referenz, **2** = geschlossenes Testsubstrat **81**, **3** = Assay mit Ooc-PS1 und **75**, **4** = Assay mit Ooc-PS2 und **75**, **5** = Negativkontrolle (gekochtes Ooc-PS1) mit **75**.

Als Nächstes wurde die Umsetzung der Enzyme Ooc-PS1 sowie Ooc-PS2 mit dem sekundären Testsubstrat **74** untersucht. Der offenkettige Thioester **74** wurde bei einer Retentionszeit von $t_r = 4.8$ min mit zwei Absorptionsmaxima von 224 nm und 260 nm detektiert. Die Furan-abgeleiteten Referenzsubstanzen *syn*-**80** und *anti*-**80** ergaben Retentionszeiten von $t_r = 6.1$ min (für den Thioester *syn*-**80**) und $t_r = 6.2$ min (für den SNAC *anti*-**80**) mit jeweils einem Absorptionsmaximum von 230 nm (Abbildung 76: **1** und **2**). Die Analyse der HPLC-Spektren von Ooc-PS1 und Ooc-PS2 mit dem offenkettigen Test-SNAC **74** ergab eine deutliche (für Ooc-PS1) bis nahezu vollständige Umsetzung (für Ooc-PS2) zu der geschlossenen Referenz *anti*-**80**. Bemerkenswerterweise wurde jeweils nur ein neues Signal im Gegensatz zu den Ergebnissen mit dem ζ -Hydroxythioester **60** in den Spektren beobachtet, das mit einer exakten Masse von 268.0975 ($C_{11}H_{19}NO_3SNa$: $m/z = \text{ber. } 268.0978$) identisch mit der des Edukts **74** sowie

des Produkts **80** war. Die Negativkontrolle erwies sich jedoch, wie bei den Assays der Ooc-PS mit dem primären Thioester **75**, ebenfalls als positiv. Neben dem offenkettigen Thioester **75** wurde ein neues verbreitertes Signal mit einer Schulter in dem Spektrum nachgewiesen. Die Wellenlängen der beiden Maxima betrug jeweils 230 nm, was auf die beiden geschlossenen Derivate *syn*-**80** und *anti*-**80** hindeutet. Die Retentionszeiten waren allerdings nicht konsistent mit den zuvor detektierten Signalen für die geschlossenen Referenzsubstanzen *syn*-**80** und *anti*-**80**. In weiterführenden NMR-spektroskopische Studien ist es zwingend erforderlich die Ergebnisse der PS-Assays mit den Ooc-PS näher zu untersuchen und eine stereochemische Analyse der Reaktionen durchzuführen.

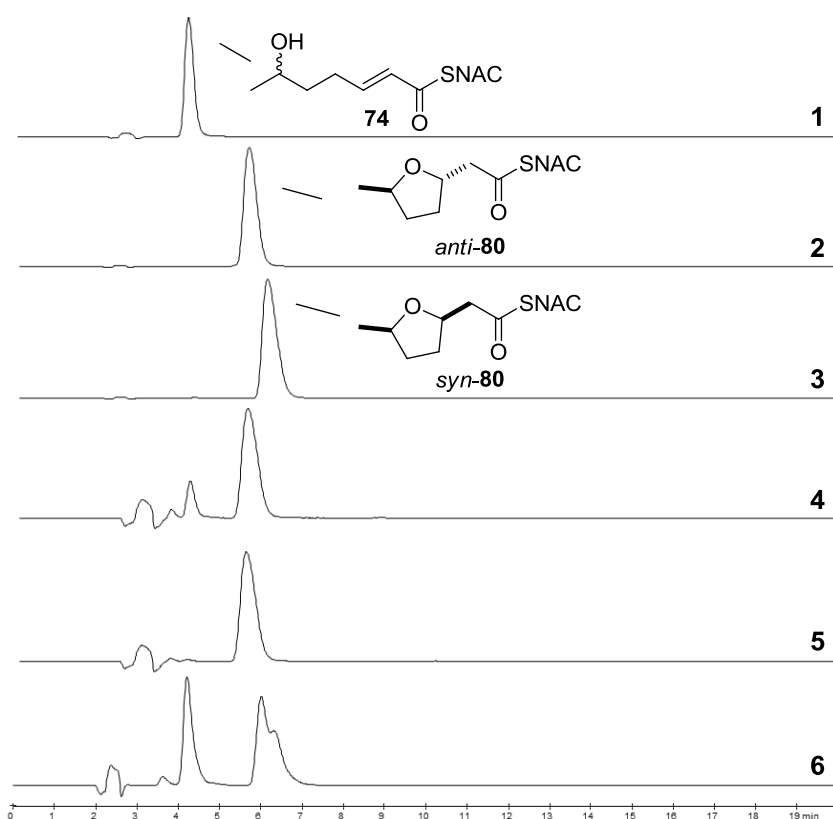


Abbildung 76: HPLC-Untersuchung der PS-katalysierten Reaktion von Ooc-PS1 und Ooc-PS2 mit dem sekundären Thioester **80**; **1** = offenes Testsubstrat **74** als Referenz, **2** = geschlossenes Testsubstrat *anti*-**80**, **3** = geschlossenes Testsubstrat *syn*-**80**, **4** = Assay mit Ooc-PS1 und dem Thioester **74**, **5** = Assay mit Ooc-PS2 und dem Thioester **74**, **6** = Negativkontrolle (gekochtes Ooc-PS1) mit dem SNAC **74**.

Fazit: Die Auswertung der Enzymassays der ζ -Hydroxy-Testsubstrate **60** und **61** mit den PS-Domänen für Pederin und Misakinolid A lieferten nach Validierung einer geeigneten HPLC-Methode den Beweis für eine PS-katalysierte Ringschlussreaktion zu den Pyran-abgeleiteten Referenzsubstanzen **66** und **67**. Das HPLC-Profil für den primären Thioester **61** zeigte ein neues Signal, während für das sekundäre Testsubstrat **60** zwei neue Signale beobachtet wurden. Die Verschiebung der Wellenlänge, die exakten

Massen und die übereinstimmenden Retentionszeiten der cyclischen Testsubstraten syn-**66** und **67** mit den neuen Signalen deuteten auf die Bildung eines Ringsystems hin. Durch weiterführende NMR-Untersuchungen für die Ped-PS2 in einem präparativen Maßstab wurden die neuen Signale eindeutig den synthetisierten Testsubstraten syn-**66** und **67** zugeordnet. Bei dem zweiten Signal der PS-katalysierten Reaktion mit dem sekundären Thioester **60** handelte es sich um das Diastereomer anti-**66**. Die stereochemische Analyse des racemischen ζ -Hydroxy-Testsubstrats **60** zu den cyclisierten Produkten syn-**66** und anti-**66** zeigte, dass jeweils ein Hauptmengenenantiomere mit einem definierten Stereozentrum an der C3-Position des THP-Rings während der Reaktion gebildet wurde. Diese Ergebnisse bestätigen die Ausbildung von sechsgliedrigen Ethereinheiten, die durch die PS-Domäne während der Biosynthese von Polyketiden katalysiert wird. Zudem liefert die einfache Handhabung des Assays, in denen PS-Domänen in vitro ohne weitere PKS-Komponenten einfache, offenkettige Hydroxythioester zu stereodefiniten cyclischen Produkten umsetzen, ein möglicherweise aussichtsreiches Hilfsmittel in der chemoenzymatischen Synthese. In weiterführenden Arbeiten sollte untersucht werden, ob auch komplexere Substrate mit unterschiedlichen Substitutionsmustern von den PS-Domänen akzeptiert und prozessiert werden. Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit bereits das Kurzkettenintermediat **72** aus der Misakinolidbiosynthese näher untersucht. Die Auswertung der HPLC-Spektren lieferte für das Dien **72** keine Umsetzung zu der geschlossenen Referenzsubstanz **109**.

Die Untersuchung der PS-Assays der ϵ -Hydroxy-Testsubstrate **74** und **75** mit der PS-Domäne für Oocydin A zu den Furan-abgeleiteten Testsubstraten **80** und **81** ergab für beide Fälle eine Verschiebung der Wellenlänge, sowie eine übereinstimmende exakte Masse der Testsubstrate **80** und **81** mit den jeweiligen Edukten **74** und **75**. Jedoch konnte für die Negativkontrollen eine zunehmende spontane Ringschlussbildung im Gegensatz zu den ζ -Hydroxythioester **60** und **61** beobachtet. Ebenfalls wurden in den Spektren abweichende Retentionszeiten für die Signale der Negativkontrollen beobachtet. Möglicherweise ist auch hier ein Überhitzen der Säule für diese Abweichungen verantwortlich. Weiterhin sollte eine bessere Trennung der einzelnen Signale durch die Verwendung eines polarereren Lösungsmittelgemisches erzielt werden. Die Wiederholung der Assays mit den Ooc-PS in zukünftigen Studien würde zu weiteren Erkenntnissen der potentiellen Möglichkeiten von PS-katalysierten Reaktionen, wie die Umsetzung von ϵ -Hydroxy-Testsubstraten zu fünfgliedrigen Ethereinheiten, führen. Dazu ist es zwingend erforderlich auch eine stereochemische Analyse der Reaktion durchzuführen.

3.1.3.4 PS-Assays der Säure-, Ester- und Keto-Testsubstrate

Die Detektion der Ester- und Keto-Testsubstrate erfolgte ebenfalls nach Methode B (vgl. Tabelle 15), für die Säure-Testderivate wurde Methode D (Zugabe von Trifluoressigsäure, vgl. Tabelle 15) verwendet. Generell waren die UV-Aktivitäten und somit auch die Signalintensitäten für diese Testsubstrate sehr viel geringer als für die entsprechenden SNAC-Analoga. Weiterhin wurde sowohl für die offenkettigen als auch die cyclischen Referenzsubstanzen, wenn nicht anders beschrieben, nur ein Absorptionsmaximum von 212 nm erhalten, so dass eine Unterscheidung von Edukt und Produkt anhand der Retentionszeiten vorgenommen wurde (Die HPLC-Untersuchungen zu den Testsubstraten **63**, **65** und **78** mit den jeweiligen Enzymen wurden nicht abgebildet, da die Ergebnisse den vorgestellten Spektren entsprachen).

Als Beispiele wurden die Auswertungen der PS-Assays der sekundären ζ -Hydroxysäure **62** mit PedF-PS2 und MisF-PS1 sowie das ε -Hydroxy-Testsubstrat **76** mit Ooc-PS1 und Ooc-PS2 ausgewählt (Abbildung 77 und Abbildung 78). Die ζ -Hydroxysäure **62** wurde bei einer Retentionszeit von $t_r = 2.9$ min detektiert. Das cyclische Produkt **68** ergab eine Retentionszeit von $t_r = 4.7$ min (Abbildung 77: **1** und **2**). Die Analyse der PS-Assays mit aktiven und denaturierten Proteinen zeigte keinen Unterschied. In diesen HPLC-Profilen konnte allerdings auch kein Signal für das nicht umgesetzte Edukt **62** detektiert werden (Abbildung 77: **3-5**).

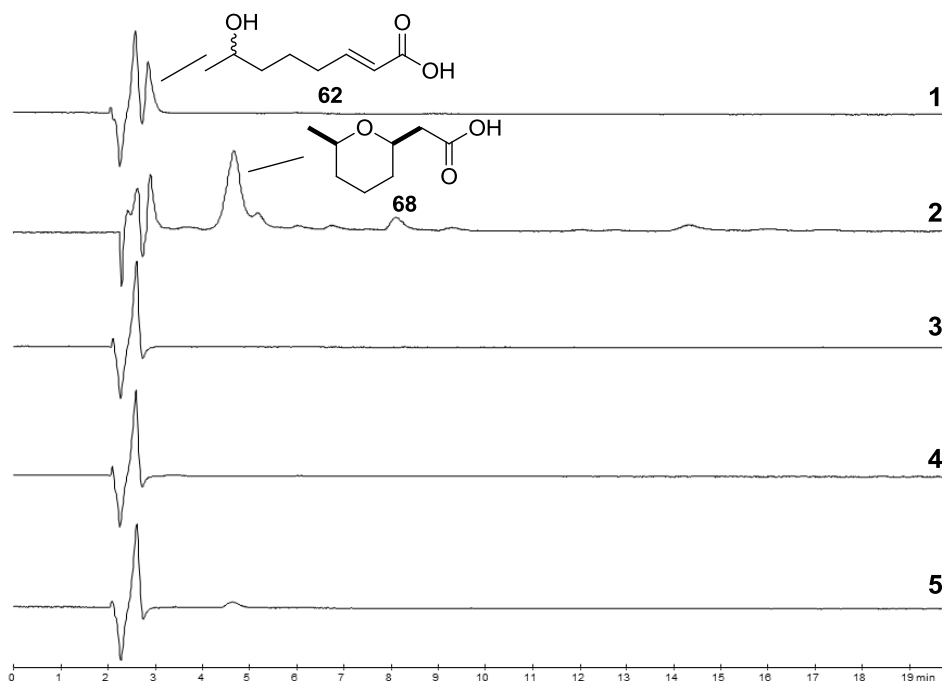


Abbildung 77: HPLC-Untersuchung des Assays von PedF-PS2 sowie MisF-PS2 mit der sekundären Säure **62**; **1** = offenes Testsubstrat **62** als Referenz, **2** = geschlossenes Testsubstrat **68**, **3** = Assay mit PedF-PS2 und der Säure **62**, **4** = Assay mit MisF-PS2 und der Säure **62** = Negativkontrolle (gekochtes PedF-PS2) mit der Säure **62**.

Die Retentionszeiten für das ϵ -Hydroxy-Testsubstrat **76** wurden bei $t_r = 3.0$ min und für die entsprechende cyclisierte Referenzsubstanz **82** bei $t_r = 3.6$ min detektiert (Abbildung 78: **1** und **2**). Die Auswertung des PS-Assays für das ϵ -Hydroxy-Testsubstrat **76** mit der PS-Domäne für Oocydin A führte zu dem gleichen Ergebnis, wie bei den PS-Assays der mit der ζ -Hydroxysäure **62** und PedF-PS2 oder MisF-PS1. Es wurde in der Positiv- sowie Negativkontrolle weder ein Edukt- **76** noch ein Produktsignal **82** erhalten (Abbildung 78: **3-5**). Vermutlich reagieren die Säurefunktionen der Testsubstrate **62** und **76** mit den freien Aminogruppen der Proteine in Folge einer Säure-Base-Reaktion zu den entsprechenden Ammoniumcarboxylaten und können dadurch nicht mehr aus der organischen Phase extrahiert und detektiert werden.

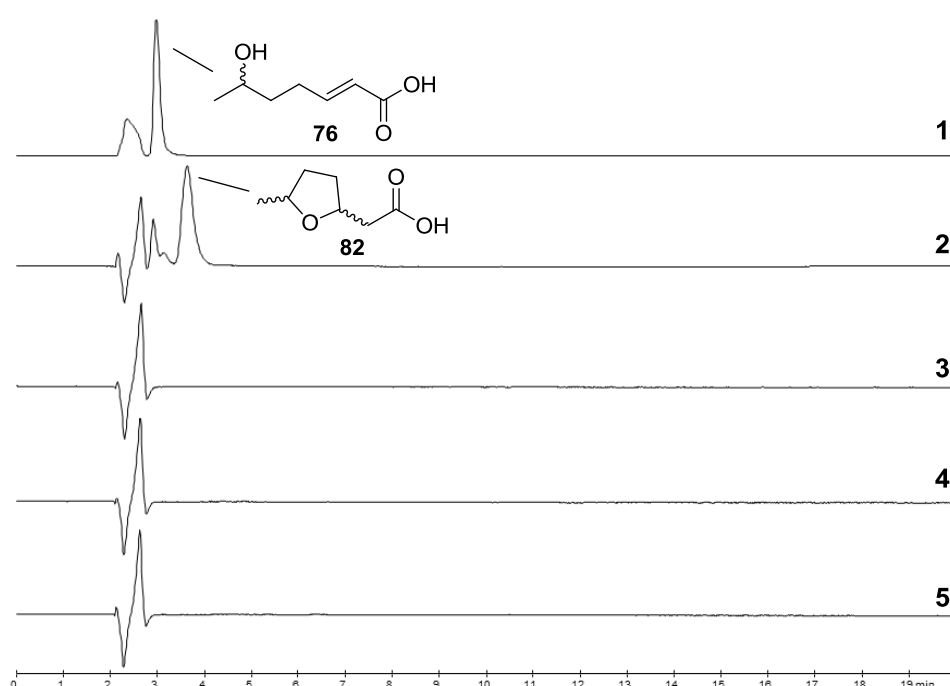


Abbildung 78: HPLC-Untersuchung des Assays von Ooc-PS1 sowie Ooc-PS2 und der sekundären Säure **76**; **1** = offenes Testsubstrat **76** als Referenz, **2** = geschlossenes Testsubstrat **82**, **3** = Assay mit Ooc-PS1 und der Säure **76**, **4** = Assay mit Ooc-PS2 und der Säure **76**, **5** = Negativkontrolle (gekochtes Ooc-PS1) mit der Säure **76**.

Für die Untersuchungen der PS-Assays wurden beispielhaft die Esteranaloga **64** und **79** mit den PS-Domänen PedF-PS2 sowie Ooc-PS1 dargestellt (Abbildung 79 und Abbildung 80). Die Retentionszeiten wurden für das sekundäre ζ -Hydroxy-Testsubstrat **64** bei $t_r = 8.3$ min und für die Pyran-abgeleitete Testsubstanz **70** bei $t_r = 9.0$ min detektiert (Abbildung 79: **1** und **2**). Die Auswertung des HPLC-Spektrums zeigte nur ein Signal in der Positivprobe, das mit der Retentionszeit des nicht umgesetzten Edukts **70** übereinstimmt und keine Abweichung zur Negativkontrolle aufwies (Abbildung 79: **3** und **4**).

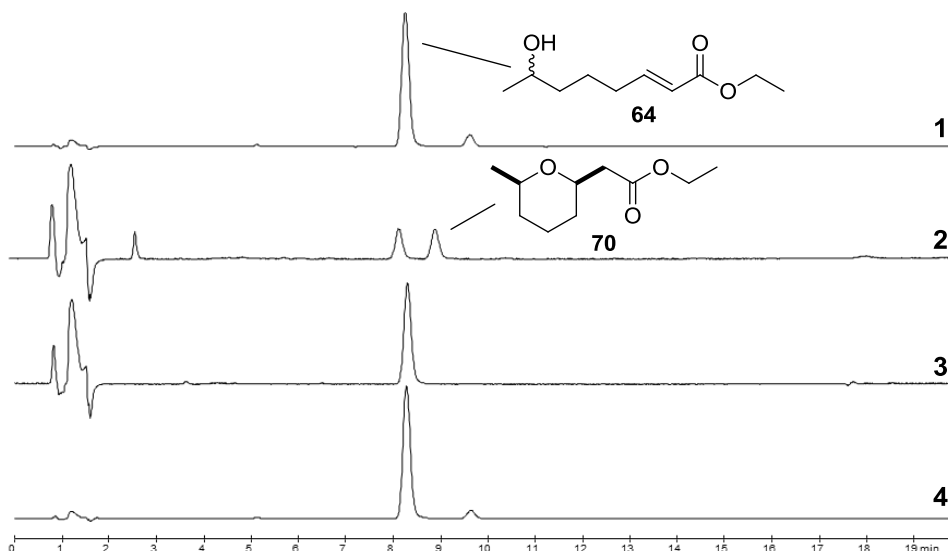


Abbildung 79: HPLC-Untersuchung des Assays von PedF-PS2 mit dem sekundären Ester **64**; **1** = offenes Testsubstrat **64** als Referenz, **2** = geschlossenes Testsubstrat **70**, **3** = Assay mit PedF-PS2 und **64**, **4** = Negativkontrolle (gekochtes PedF-PS2) mit **64**.

Der primäre ϵ -Hydroxyester **79** wurde bei einer Retentionszeit von $t_r = 4.9$ min, das dazugehörige cyclische Produkt **85** bei einer Retentionszeit von $t_r = 6.0$ min erhalten (Abbildung 80: **1** und **2**). Auch hier wurde keine Umsetzung des offenkettigen Edukts **79** zur geschlossenen Referenzsubstanz **85** in der Positivprobe beobachtet. Nur ein Signal, das mit der Retentionszeit von $t_r = 4.9$ min dem offenkettigen Testester **79** entsprach, wurde in dem Assay mit aktiven und denaturiertem Protein detektiert (Abbildung 80: **3** und **4**).

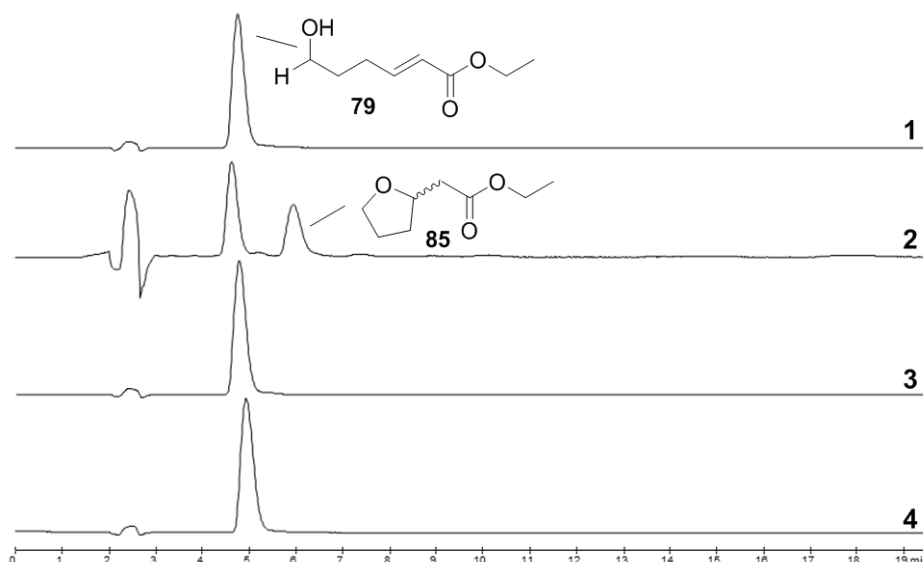


Abbildung 80: HPLC-Untersuchung des Assays von Ooc-PS1 und dem primären Ester **79**; **1** = offenes Testsubstrat **79** als Referenz, **2** = geschlossenes Testsubstrat **85**, **3** = Assay mit Ooc-PS1 und **79**, **4** = Negativkontrolle (gekochtes Ooc-PS1) mit **79**.

Die Detektion des Testsubstrates **73** erfolgte nach Methode B (vgl. Tabelle 15) bei $t_r = 3.9$ min und einem Absorptionsmaximum von 224 nm. Für das Keto-Derivat **73** und wurde keine geschlossene Referenzsubstanz synthetisiert. Allerdings zeigten die Spektren mit dem Testsubstrat **73** und MisF-PS1 sowie PedF-PS2 in dem PS-Assays (Abbildung 81: **2** und **3**) kein neues Signal, das dem Pyran-abgeleiteten Testsubstrat entsprechen könnte.

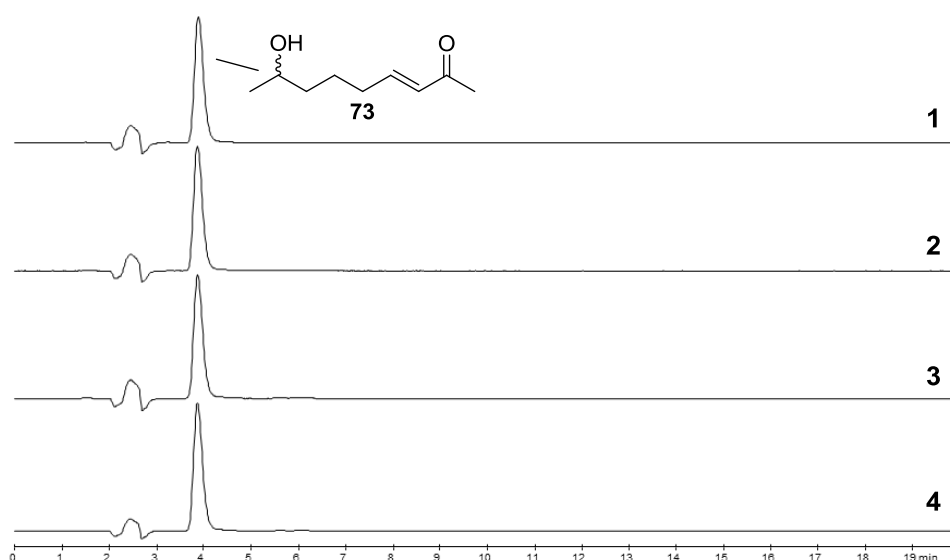


Abbildung 81: HPLC-Untersuchung des Assays von MisF-PS1 und PedF-PS2 mit dem Keton **73**; **1** = offenes Testsubstrat **73** als Referenz, **2** = Assay mit Mis-PS1 und **73**, **4** = Assay mit PedF-PS2 und **73**, **5** = Negativkontrolle (gekochtes MisF-PS1) mit **73**.

Fazit: In den HPLC-Spektren für die PS-Assays der Säure-Testsubstrate **62** und **76** mit den Proteinen MisF-PS1, PedF-PS2 sowie Ooc-PS1 wurden keine Umsetzung zu den geschlossenen Referenzen **68** und **82** beobachtet. Im Gegensatz zu allen anderen Auswertungen wurde in diesen Spektren, sowie in den Negativkontrollen kein Signal für nicht umgesetztes Edukt **62** und **76** detektiert. Deshalb wurde angenommen, dass die Extraktion der Reaktionsprodukte aus der organischen Phase nicht möglich war. Die Auswertung der PS-Assays für die Esteranaloga **64** und **79** mit den Enzymen PedF-PS2 sowie Ooc-PS1 ergab ebenfalls keine Reaktion zu den cyclisierten Produkten **70** und **85**. Es wurde nur nicht umgesetztes Edukt **64** und **79** in den HPLC-Spektren der Assays und in der Negativkontrolle detektiert. In allen HPLC-Profilen der geschlossenen Referenzsubstanzen **68**, **70**, **82** und **85** wurde neben den eigentlichen Produkten ein zweites Signal detektiert, das wahrscheinlich den offenkettigen Edukten **62**, **64**, **76** und **79** zugeordnet werden kann. Obwohl die NMR-Daten belegen, dass nur sehr geringe Spuren als Verunreinigungen vorliegen, wurde dennoch ein weiteres Signal detektiert. Die Untersuchung der HPLC-Spektren der PS-Assays mit dem Keto-Testsubstrat **73** und MisF-PS1 sowie PedF-PS2 ergaben kein neues Signal für das potenzielle cyclisierte

Produkt. Nur die offenkettige Referenzsubstanz **73** wurde in den PS-Assays sowie in der Negativkontrolle beobachtet.

3.2 Synthese von Substraten zur Untersuchung der KS Substratspezifität in der Misakinolidbiosynthese

Die Vorhersage von Polyketiden aus Sequenzen von *trans*-AT-PKS ist aufgrund der ungewöhnlichen Modulvarianten und neuartigen Domänen erschwert. *In-silico*-Untersuchungen zeigten, dass die Gensequenz einer *trans*-AT-KS mit der Struktur des prozessierten Polyketids korreliert.³¹ Dieser Ansatz ermöglichte die Erstellung eines Regelwerks zur Identifizierung der prozessierten Biosyntheseintermediate. Erste Studien zur Überprüfung der Hypothese der Spezifität von *trans*-AT-KS-Domänen *in vitro* wurden von Piel *et al.* in Kooperation mit Oldham *et al.* durchgeführt.⁸² Hierzu wurden zunächst vier KS-Domänen aus dem Psymberin- und Bacillaengencluster heterolog exprimiert und mit verschiedenen SNAC-Substraten inkubiert. Als Thioester-Substrate wurden aliphatische, α,β -ungesättigte, β -Hydroxy-, β -Keto- und β -Kohlenstoff-verzweigte Verbindungen ausgewählt. Während des Proteinassays waren die KS-Domänen in der Lage, spezifisch in ihrer Auswahl, Substrate kovalent als Thioester zu binden. Über einen Beobachtungszeitraum von 50 min wurde die Acylierungsreaktion zu verschiedenen Zeitpunkten säurekatalytisch gestoppt, entsalzt und im Anschluss massenspektroskopisch mittels Elektronensprayionisierungs-Massenspektrometrie analysiert. Bei Substratakzeptanz des Enzyms wurde eine zeitaufgelöste Massenänderung von unbeladener zu beladener KS-Domäne beobachtet (Abbildung 82, Beispiel: Inkubation von S-Crotonoyl-N-Acetylcysteamin und der KS 5 Bacillaen-PKS).

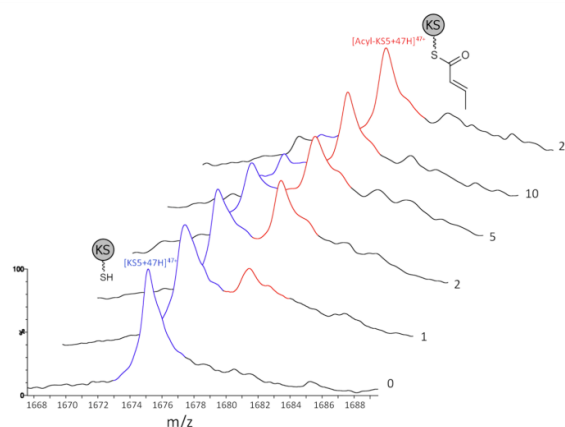


Abbildung 82: Inkubation von S-Crotonoyl-N-acetylcysteamin und KS 5 der Bacillaen-PKS; Auftragung relative Intensität (%) gegen Massenänderung (m/z) zu verschiedenen Zeitpunkten.

Die Substratspezifität der einzelnen KS-Domänen wurde mithilfe dieser neuen Methode ausführlich und reproduzierbar untersucht. Es wurde gezeigt, dass abhängig von der

jeweiligen KS die Substratspezifität unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Zwei der untersuchten KS-Domänen von Psymberin (KS 1 und KS 2) akzeptierten zwar alle eingesetzten Substrate, jedoch mit unterschiedlichen Acylierungsgeschwindigkeiten. Die KS 3 aus dem Psymberingencluster, sowie die KS 5 aus dem Bacillaengencluster wurden hingegen nicht von kohlenstoffverzweigten Verbindungen in β -Position acyliert.

Um weitere Erkenntnisse über die Substratspezifität von KS-Domänen zu erlangen, wurden die KS 7 und KS 8 der Misakinolidbiosynthese im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die Vorhersage ergab für die absolute Konfiguration der Intermediate von KS 7 einen (2*S*,3*S*)-3-Hydroxy-2-methyl-Thioester und für die KS 8 ein (2*R*,3*S*)-3-Hydroxy-2-methyl-Thioester (Abbildung 83). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die Kurzkettensubstrate *ent*-**97** und **98** synthetisiert. Zur vollständigen Untersuchung hinsichtlich der Substratspezifität der KS-Domänen wurden auch die entsprechenden Enantiomere **97** und *ent*-**98** dargestellt (Abbildung 39). Die Klonierung und Überproduktion der dazugehörigen KS-Domänen wurde von Dr. Agustinus Uria (AG Piel) durchgeführt. Bislang gelang es allerdings noch nicht die Proteine in löslicher Form zu erhalten. Daher wird hier nur die Synthese der Substrate **97**, **98**, *ent*-**97** und *ent*-**98** vorgestellt und diskutiert.

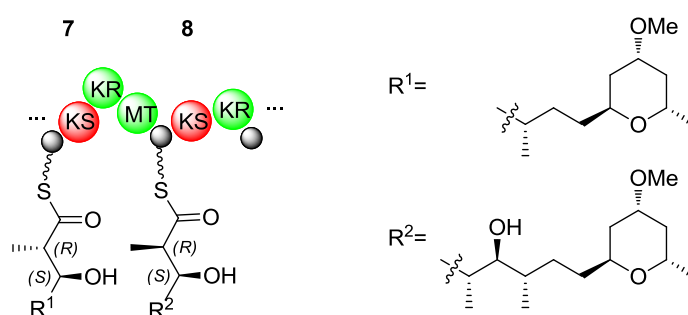


Abbildung 83: Putative natürliche Intermediate der KS 7 und KS 8 der Misakinolidbiosynthese; rot = untersuchte KS.

Zur Darstellung der Verbindungen **97** und **98** sowie *ent*-**97** und *ent*-**98** wurde jeweils eine *anti*-selektive Evans-Aldol-Reaktion mit dem Imid **103** bzw. *ent*-**103** und Acetaldehyd (**104**) nach Heathcook durchgeführt.¹¹⁶ Abweichend von der Literatur wurde nicht das Norephedrin-Derivat (nicht zugänglich aufgrund der Chemikalienverbotsordnung) als chirales Auxiliar verwendet, sondern auf die von L-(**99**) bzw. D-Valin *ent*-(**99**) abgeleiteten Isopropyl-Derivate zurückgegriffen. Im Folgenden wird die Synthese von den Thioestern **97** und **98** beschrieben. Die Darstellung der Enantiomere *ent*-**97** und *ent*-**98** erfolgte analog (in Klammern werden die Ausbeuten der Enantiomere aufgeführt, sowie das Diastereomerenverhältnis dr).

Die Synthese (Abbildung 84) des chiralen Auxiliars **103** wurde durch die Reduktion von L-Valin (**99**) mit Lithiumaluminiumhydrid zu L-Valinol (**100**) in 85% Ausbeute (*ent*-**100**: 88%) eingeleitet. Der Alkohol **100** wurde mit Kohlensäurediethylester (**101**) unter Abspaltung von Ethanol zu dem Produkt **102** in literaturbekannter Ausbeute von 79% (*ent*-**102**: 82%) umgesetzt. Im Anschluss wurde die Amid-Funktion des Carbamats **102** mit Propionylchlorid (**107**) am Stickstoff zu dem chiralen Auxiliar **103** mit einer Ausbeute von 65% (*ent*-**103**: 75%) acyliert. Die darauffolgende *anti*-selektive Evans-Aldolreaktion mit Acetaldehyd (**104**) lieferte die Addukte **105a** und **105b** in Ausbeuten von 78% (*ent*-**105a** und *ent*-**105b**: 88%) und einem dr von 11:1 (*ent*-**105a**:*ent*-**105b** = dr: 16:1). Nach der oxidativen Spaltung mit Lithiumhydroperoxid wurden die Säuren **106a** und **106b** in sehr guten Ausbeuten von 96% (*ent*-**106a** und *ent*-**106b**: 96%) erhalten, die unter der Kupplung mit NAC (**108**) und *N,N'*-Carbonyldiimidazol (CDI) zu den Thioestern **97** und **98** in guten Ausbeuten von 70% (*ent*-**97** und *ent*-**98**: 72%) umgewandelt worden sind. Das *dr* verringerte sich nach der oxidativen Aufarbeitung auf 4:1.

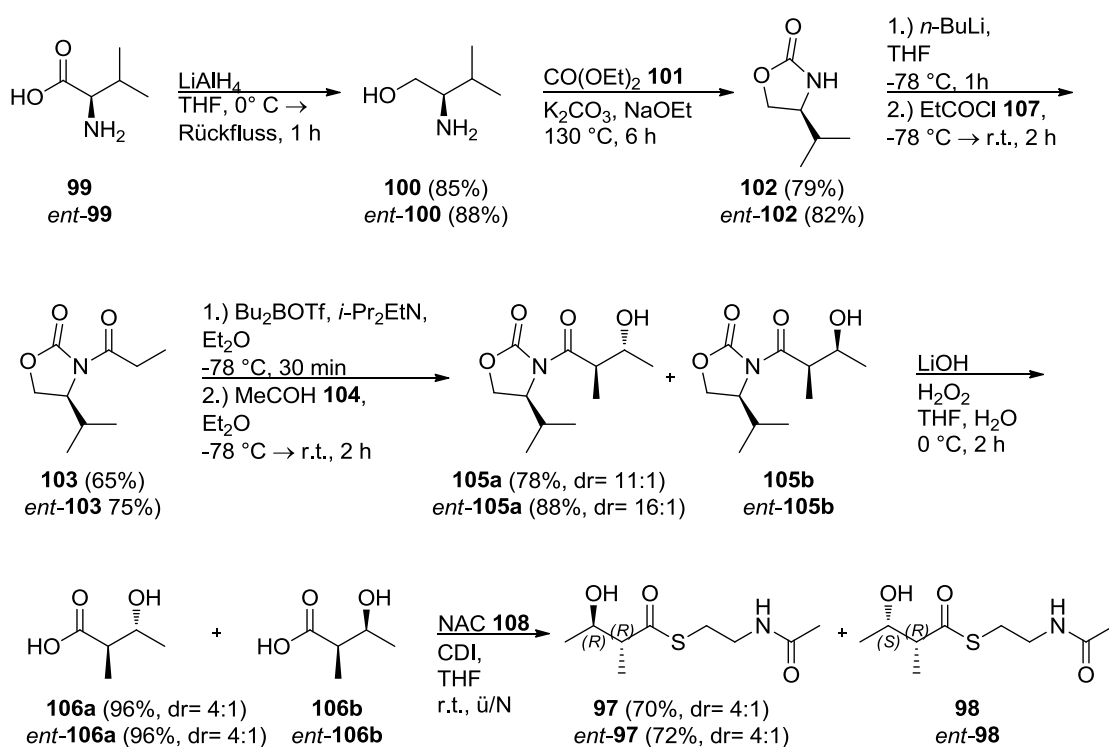


Abbildung 84: Synthese der SNAC-Testsubstrate **97** und **98** sowie *ent*-**97** und *ent*-**98** für die KS 7 und KS 8 innerhalb der Misakinolidbiosynthese, Bu₂BOTf: Di-*n*-butylboryltrifluormethansulfonat, *i*-Pr₂EtN: *N,N*-Diisopropylethylamin, CDI: *N,N'*-Carbonyldiimidazol.

Fazit: Im Gegensatz zu der bekannten *syn*-selektiven Evans-Aldol-Reaktion mit Acetaldehyd (**104**), die Ausbeuten von 70% und sehr gute Diastereoselektivitäten erzielen, wurde sich in diesem Fall für eine *anti*-selektive Evans-Aldol-Reaktion entschieden.¹¹⁷ Der Grund dafür sind die literaturbekannten höheren Ausbeuten im Falle

der Addition des chiralen Auxiliars **103** bzw. ent-**103** mit Acetaldehyd **104**. Die Diastereoselektivität für diese Reaktion war mit 11:1 bzw. 16:1 für das anti-Produkt **105a** bzw. ent-**105a** geringer als bei entsprechender syn-selektiver Evans-Aldolreaktion. Da aber alle vier Diastereomere **97** und **98** sowie ent-**97** und ent-**98** getestet werden sollten, wurde zugunsten der Ausbeute entschieden. Für die Thioester **97** und **98** wurde eine Gesamtausbeute von 0.26 g (23%) erhalten. Die Enantiomere ent-**97** und ent-**98** wurden in einer Gesamtausbeute von 0.65 g (33%) erhalten.

3.3 Naturstoffextraktion von *Serratia plymuthica*

Bereits in früheren Studien wurden Extraktionsexperimente der Bakterienstämme von *Dickeya dadantii* und *Serratia plymuthica* durchgeführt.¹¹⁸ Die Auswertung der HPLC-, LCMS- und NMR-Daten lieferte für diese Extrakte in LB-Medium keinen Naturstoff, der mit einer vorhersagten Struktur von Prof. Piel (nicht veröffentlicht) korrelierte. Aus den Negativergebnissen wurde geschlossen, dass das gesuchte Polyketid entweder nicht unter den gewählten Bedingungen von einem oder beiden Bakterienstämmen produziert wird oder keine ausreichende Menge an dieser Verbindung in den Rohextrakten vorliegt, um hinreichend große Signale in den Auswertungsdaten zu erhalten.

Aus diesen Gründen wurde als Nährmedium für weitere Untersuchungen Nährboullion II-Medium (NB II) gewählt. Piechulla *et al.* isolierten mittels NB II zahlreiche Naturstoffe, wie die VOCs (vgl. Abschnitt 1.5), aus dem Bakterienstamm *S. plymuthica*. Der Stamm wurde der AG Piel von der AG Piechulla überlassen und hauptsächlich in dieser Arbeit näher untersucht. Weiterhin wurden von Dr. Marko Kai (AG Piechulla) Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion-Analysen (RT-PCR) des *trans*-AT-PKS-Genclusters von *S. plymuthica* in diesem Medium vorgenommen, um auszuschließen, dass ein ‚stiller‘ Gencluster vorliegt. Ein Teil des Clusters wurde untersucht und die Auswertung ergab, dass die mRNA (engl.: messenger ribonucleic acid) in dem Medium transkribiert wird (nicht veröffentlicht). Für die Extraktion wurden zunächst 1 L-Kulturen in NB II-Medium angesetzt und später ein *Minifors*-Fermentor der Firma *Infors HT* mit einem 3 L-Fassungsvermögen verwendet. Die Bakterienkulturen wurden im Anschluss zentrifugiert, die Zellen wurden gefriergetrocknet und der Rückstand wurde über Nacht in Methanol gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Zellrohextrakt mit *n*-Hexan ausgeschüttelt, um Lipide aus dem Gemisch zu entfernen. Der Überstand der Bakterienkulturen wurde ebenfalls mit *n*-Hexan entfettet. Die Extraktion erfolgte mit Ethylacetat, wie in Abschnitt 4.1.14.1 beschrieben. Erste NMR-Untersuchungen der Rohextrakte des Überstands und der Zellen zeigten, dass sich die NMR-Profile ähnelten. Die Signalintensität für den Überstand war allerdings deutlich geringer als für die der

Zellen (vgl. Abbildung 176, Abbildung 177). Aus diesem Grund wurde der Zellextrakt näher analysiert, indem eine säulenchromatographische Trennung durchgeführt wurde.

Der Rohextrakt und die einzelnen Fraktionen wurden von Dr. Mihaela Gurgui (AG Van-Echten-Deckart) hinsichtlich ihrer Cytotoxizität an Rattenneuroblasten der Zelllinie B104 und HeLa-Zellen (Krebszellen) geprüft. Zu diesem Zweck wurden die getesteten Zellen mit den einzelnen Proben inkubiert und nach 24 h der prozentuale Zelltod erfasst. Die mikroskopischen Aufnahmen der Neuroblasten B104 nach Behandlung mit dem Rohextrakt von *S. plymuthica* sind beispielhaft in Abbildung 85 dargestellt.

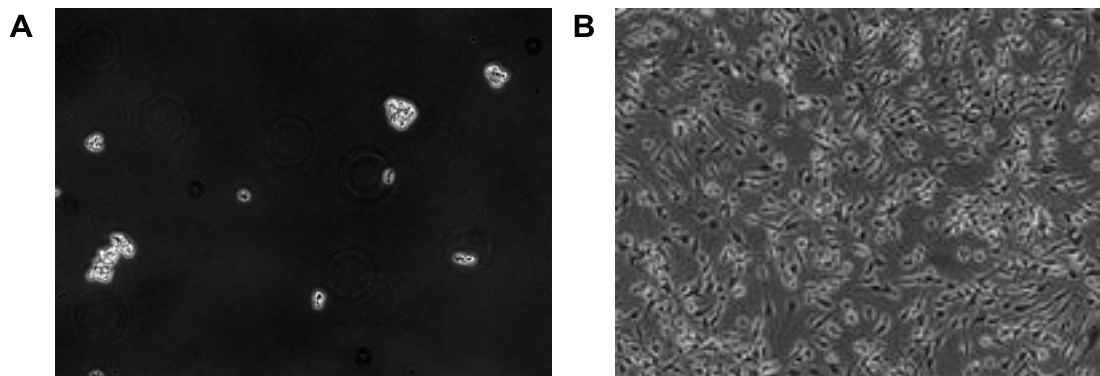


Abbildung 85: Cytotoxizitätsassays des Rohextrakts von *S. plymuthica*; **A)** Mikroskopische Aufnahme der Neuroblasten B104 nach Behandlung mit dem Rohextrakt der Zellen von *S. plymuthica*, **B)** Mikroskopische Aufnahme der Neuroblasten B104 der Negativkontrolle.

Die graphische Auswertung der Assays lieferte für den Rohextrakt eine letale Wirkung von 50% für die HeLa-Krebszellen, während für die Neuroblasten B104 sogar eine Letalität von 59% nachgewiesen wurde. Für die einzelnen Fraktionen wurde nur eine verminderte Sterberate von 20% für die HeLa und 14% für die B104-Zellen in Fraktion 1 (*n*-Hexan) und eine starke Cytotoxizität von nahezu 100% für beide untersuchten Zelllinien in der Fraktion 7 (Methanol) diagnostiziert (Abbildung 86). Das gesuchte Polyketid (nicht veröffentlicht) sollte Hydroxy-, Methoxygruppen und Doppelbindungen aufweisen und wurde somit als mäßig polar eingestuft. Daher sollte der Naturstoff wahrscheinlich in einer der Ethylacetat-Phasen vorliegen. Als Fazit wurde geschlossen, dass das Polyketid entweder keine cytotoxische Wirkung gegen die untersuchten Zellen besitzt oder die Substanzmenge in den einzelnen Fraktionen zu gering war, um einen Zelltod zu bewirken.

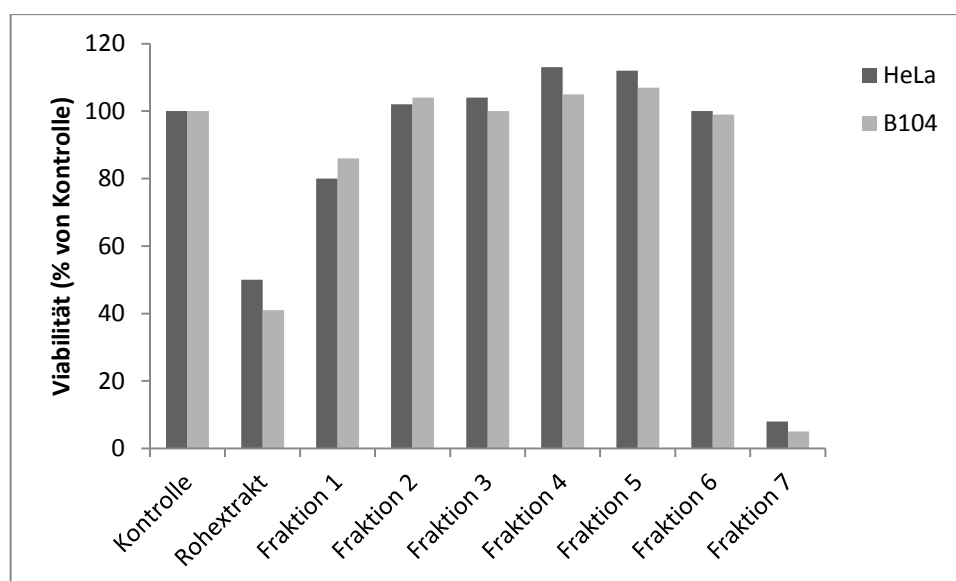


Abbildung 86: Graphische Auswertung der Cytotoxizitätstests des Rohextraktes von *S. plymuthica* und der säulenchromatographischen Fraktionen.

Parallel zu den Cytotoxizitätstests wurden NMR- und massenspektroskopische Untersuchungen der einzelnen Fraktionen durchgeführt (s. Anhang 6.4.2, Massenspektren nicht abgebildet). Für die Strukturvorhersage von Prof. Piel (nicht veröffentlicht) wurden aliphatische Signale im Bereich 1.0-2.8 ppm erwartet. Weiterhin sollte ein Methoxysignal im Bereich von 3.5-3.8 ppm im Spektrum zu sehen sein. Die ^1H -Protonen der Doppelbindung sollten im Bereich von 4.0-6.0 ppm auftreten. Der erwartete Massenbereich wurde aufgrund einiger unbekannter Strukturelemente zwischen $m/z = 400-500$ angesetzt. Aufgrund der geringen Substanzmengen und das Vorliegen von Substanzgemischen war die Auswertung der NMR-Daten am Bonner Institut erschwert. Keines der vorliegenden Spektren konnte dem gesuchten Naturstoff zugeordnet werden und auch die Massenauswertung ergab keine MS-Ionen, die der erwarteten Masse entsprach. Als nächster Schritt wurde für die Extraktion der *Minifors*-Fermentor verwendet. Durch die optimierten Bedingungen wie die Zufuhr von Luftsauerstoff und Regelung des pH-Wertes wurde eine drei- vierfach erhöhte Produktion an Zellmasse im Gegensatz zu den zuvor verwendeten Erlenmeyerkolben erzielt. Die Zellen wurden wie zuvor gefriergetrocknet, über Nacht in Methanol gerührt und dreimal mit *n*-Hexan extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden die verbliebenen Lipide mittels *n*-Hexan säulenchromatographisch entfernt und die restliche Substanz mit Ethylacetat von der Säule gespült. Der evaporierte Rückstand wurde direkt mit Hilfe von semipräparativer HPLC aufgetrennt (Abbildung 87).

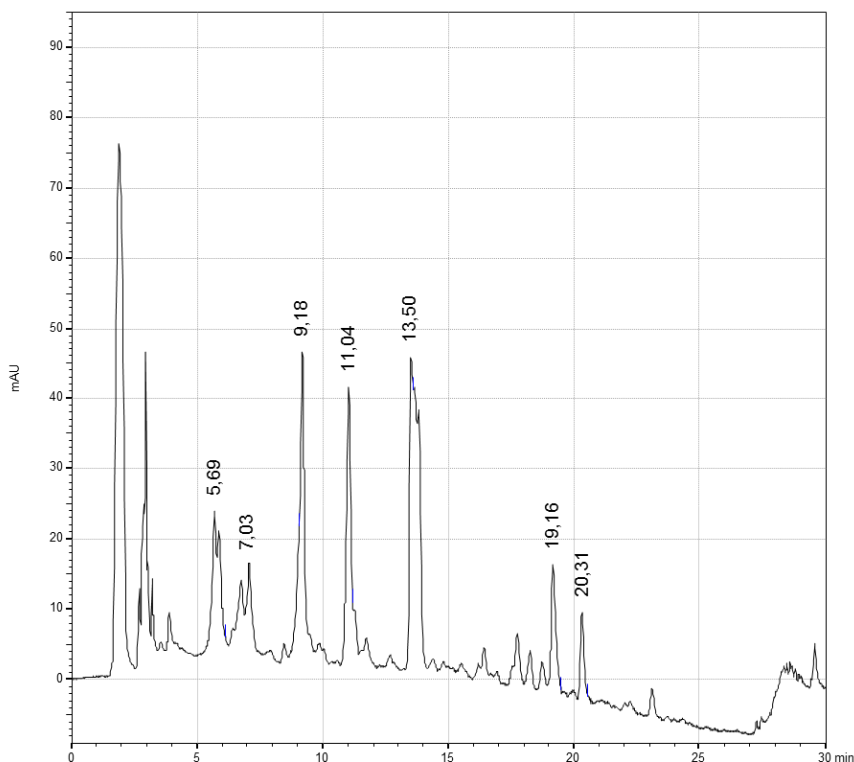


Abbildung 87: Semipräparative Trennung des Zellextrakts von *S. plymuthica* bei 254 nm. Die einzelnen Fraktionen mit folgenden Retentionszeiten von 5.69 min (Fr. SO.1), 7.03 min (Fr. SO.2), 9.18 min (Fr. SO.3), 11.04 min (Fr. SO.4), 13.50 min (Fr. SO.5), 19.16 min (Fr. SO.6), 20.31 min (Fr. SO.7) wurden näher analysiert.

Die einzelnen Fraktionen (SO.1-SO.7) wurden in Kooperation mit der AG Mangoni der Universität in Napoli an einem 700 MHz-NMR-Spektrometer näher untersucht. Auch in diesem Fall wurde der gesuchte Naturstoff in den einzelnen Fraktionen nicht detektiert. Allerdings lieferte die Analyse der NMR-Daten für die Fraktion SO.5 eine vorläufige Verbindung **137**, die zwar nicht mit dem vorliegenden *trans*-AT-Gencluster von *S. plymuthica* korreliert, aber trotzdem einen bislang unbekanntem Naturstoff **137** darstellt (s. Abbildung 90). Die Auswertung wurde von Mangoni *et al.* durchgeführt und soll hier zusammenfassend erläutert werden. Die Strukturvorhersage ist allerdings noch nicht zweifelsfrei geklärt, da aus den ^1H -NMR-Spektren hervorgeht, dass die untersuchte Substanz **137** in einem Substanzgemisch vorlag und eine Trennung der Komponenten aufgrund der geringen Substanzmenge nicht durchgeführt werden konnte.

Zu Beginn wurden zwei ähnliche Fragmente mit jeweils einer Isopropylgruppe und zwei Heteroatomen (X_{1-4}) mithilfe von COSY (engl.: correlated spectroscopy)-, TOCSY (engl.: total correlation spectroscopy)-, HMBC (engl.: heteronuclear multiple bond correlation)- und HSQC (engl.: heteronuclear single quantum coherence)-Experimenten nachgewiesen (Abbildung 88). Anhand der chemischen Verschiebung der Heteroatome von X_1 und X_2 bei 61.0 ppm bzw. 62.0 ppm wurde angenommen, dass es sich um

Sauerstoffatome handelt. Aus der HMBC-Auswertung wurde eine Korrelation zwischen einer Carbonylgruppe bei 165.1 ppm und dem Proton bei 3.48 ppm detektiert.

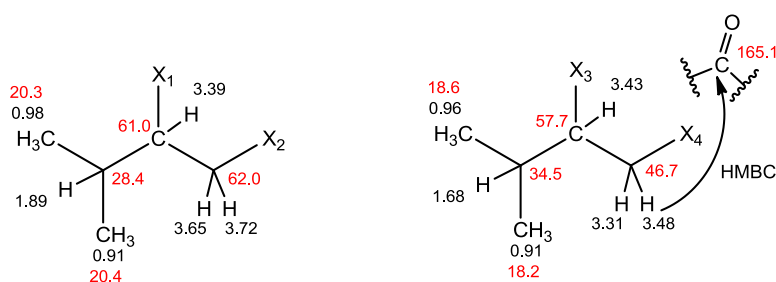


Abbildung 88: Auswertung der 2D-NMR-Spektren der Verbindung **137**; X_{1-4} = Heteroatome.

Die HMBC-Daten ergaben zunächst keine Korrelation zwischen beiden Fragmenten. Nach erhöhter Messzeit von 48 h wurde jedoch im HMBC-Spektrum eine Kupplung zwischen dem Proton bei 3.39 ppm und dem Kohlenstoffatom bei 46.7 ppm detektiert. Aus diesem Resultat wurde geschlossen, dass es sich bei den Heteroatomen X_1 und X_4 um dasselbe Atom handelte (Abbildung 89).

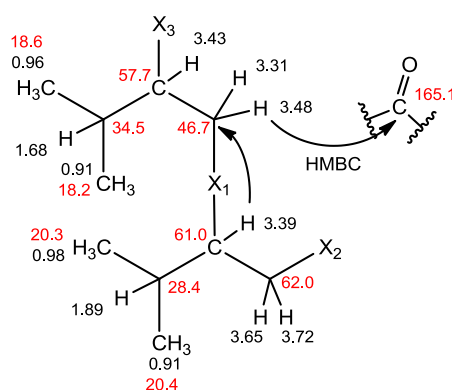
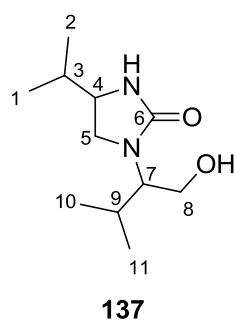


Abbildung 89: Auswertung der HMBC-Daten mit verlängerter Messzeit der Verbindung **137**.

Hochauflösende Massenspektrometrie lieferte für die Fraktion SO.5 mehrere Signale, so dass nicht eindeutig geklärt werden konnte, welches Signal dem Hauptprodukt **137** entspricht. Für die Verbindung **137** wurde als mögliche Summenformel $C_{11}H_{22}N_2O_2$ ($m/z = 237.1571$) vorgeschlagen, die anhand der exakten Masse, der Detektion einer Carbonylgruppe und der Zuordnung der Heteroatome ($X_1 = N$, $X_2 = O$ und $X_3 = N$) ein cyclische Produkt **137** bildet (Abbildung 90).



Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
1	0.91	18.2	7	3.39	61.0
2	0.96	18.6	8a	3.65	62.0
3	1.68	34.5	8b	3.72	
4	3.43	57.7	9	1.89	28.4
5a	3.31	47.7	10	0.98	20.3
5b	3.48		11	0.91	20.4
6	-	165.1			

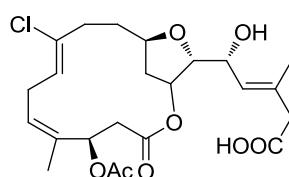
Abbildung 90: Putative Struktur von dem Naturstoff **137** und Zuordnung der Signale aus den NMR-Daten.

Als Nebenprodukt wurde in der massenspektroskopischen Auswertung eine bis dahin ebenfalls unbekannte Verbindung mit der Summenformel $C_{10}H_{15}NO_2S$ ($m/z = 213.0823$) detektiert. Die Struktur dieser Verbindung ist allerdings ungeklärt, da sie nur in Spuren in der Fraktion vorlag und nicht näher analysiert werden konnte. Um diese unbekannte Substanz näher zu analysieren und die hypothetische Struktur **137** eindeutig zu belegen, wurde die Extraktion von *S. plymuthica* in Erlenmeyerkolben wiederholt, da der *Minifors*-Fermentor nicht mehr zur Verfügung stand. Das HPLC-Profil aus der vorangegangenen Extraktion konnte mit der Standard-Methode jedoch nicht reproduziert werden, so dass in Folgestudien die Extraktion mit dem Fermentor zur Strukturaufklärung dieser neuen Verbindungen durchgeführt werden sollte.

Zur Isolierung des Polyketids wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit vergleichende HPLC- und LCMS-Untersuchungen des Wildtyps und einer Knock-Out-Mutante (angefertigt von Dr. Katja Jensen (AG Piel)) von *S. plymuthica* durchgeführt. In den Spektren für die Extraktion des Wildtyps sollte ein zusätzliches Signal für das gesuchte Polyketid erscheinen. Zu diesem Zweck wurden 1 L-Kulturen in LB- sowie NB II-Medium unter den gleichen Bedingungen (vgl. Abschnitt 4.1.3.2) angezogen. Im Anschluss wurde der Überstand und die Zellen separiert und mit *n*-Hexan entfettet. Die Extraktion erfolgte mit Ethylacetat (vgl. Abschnitt 4.1.14.1). Die Rohextrakte wurden mittels HPLC und LCMS untersucht (vgl. Abschnitt 6.5, Abbildung 188-191). Die HPLC-Profile des Wildtyps entsprachen den Spektren der Mutante und es wurden keine neuen Signale detektiert. Auch in den Massenspektren wurde kein Signal detektiert, das der erwarteten Masse entsprach. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass das

gesuchte Polyketid in nur sehr geringen Mengen vorliegt oder es nicht von *S. plymuthica* in LB oder NB II-Medium produziert wird.

Nun wurde dazu übergegangen, die RT-PCR-Ergebnisse von Dr. Marco Kai (AG Piechulla) für den *trans*-AT-Gencluster von *S. plymuthica* zu überprüfen, indem eigene RT-PCR-Analysen zum gesamten PKS-Gencluster durchgeführt werden sollten. Diese Untersuchungen wurden allerdings vorzeitig abgebrochen, da parallel die AG Salmond aus Cambridge den gesuchten Naturstoff (Abbildung 91) aus den Gencluster von *S. plymuthica* und *D. dadantii* als Oocydin A (**59a**) identifizieren konnte.⁸⁴



59a

Abbildung 91: Struktur von Oocydin A (**59a**).

3.3.1 Oocydin A – Eigenschaften und Struktur

Das 14-gliedrige Makrolacton Oocydin A (**59a**) zählt zu der Familie der Haterumalide **59a-f** und Biselide **59g-j**, die strukturell eng miteinander verwandt sind (Abbildung 92, Tabelle 5). Es ist auch unter dem Namen Haterumalid NA (**59a**) bekannt. 1999 wurde von Ueda und Hu aus einer Seescheide der Gattung *Lissoclinum* Haterumalid B (**59f**) isoliert.¹¹⁹ Zeitgleich wurden von Uemura *et al.* aus einem Schwamm der Gattung *Ircinia* die Haterumalide NA (**59a**), NB (**59b**), NC (**59c**), ND (**59d**), und NE (**59e**) nachgewiesen.¹²⁰ Die Aufklärung der Konstitution und relativen Konfiguration erfolgte mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie (2D-NMR). Anhand einer Derivatisierung der C15-OH-Gruppe als Mosher-Ester wurde die absolute Konfiguration bestimmt.¹²¹ Sowohl die relative als auch die absolute Konfiguration stellten sich allerdings als fehlerhaft heraus und wurden erst durch die Totalsynthese von Uemura *et al.* revidiert.¹²² Weiterhin wurde Oocydin A (**59a**) auch in zwei Bakterienarten *S. marcescens* und *S. liquefaciens* nachgewiesen.^{123,124} Es besitzt eine cytotoxische Wirkung gegen P388-Leukämie- und Brustkrebszellen, sowie eine hohe pflanzenpathogene Wirkung gegen Pilze und Oomyceten.^{120,123,125}

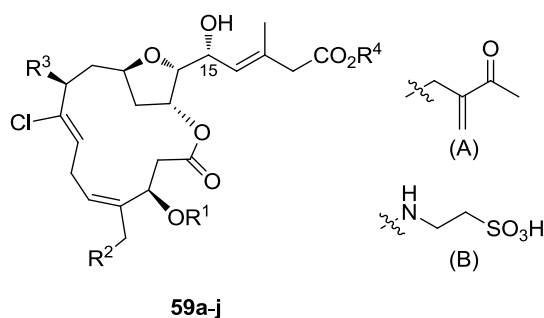


Abbildung 92: Struktur der Haterumalide **59a-f** und Biselide **59g-j**.

Tabelle 5: Haterumalide und Biselide **59g-j**.¹²⁶

Struktur	Makrolid	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Ascidian	Schwamm	Bakterium
59a	Oocydin A/H _{NA}	Ac	H	H	H	<i>Didemnidae</i> sp.	<i>Ircinia</i> sp.	<i>Serratia</i> sp.
59b	H _{NB}	Ac	H	H	<i>n</i> -Bu		<i>Ircinia</i> sp.	
59c	H _{NC}	Ac	H	OH	<i>n</i> -Bu		<i>Ircinia</i> sp.	
59d	H _{ND}	Ac	H	OH	H		<i>Ircinia</i> sp.	
59e	H _{NE}	H	H	H	H		<i>Ircinia</i> sp.	<i>Serratia</i> sp.
59f	H _B	Ac	H	H	(A)	<i>Lissoclinum</i> sp.		<i>Serratia</i> sp.
59g	B _A	Ac	Ac	H	OH	<i>Didemnidae</i> sp.		
59h	B _B	Ac	Ac	H	(A)	<i>Didemnidae</i> sp.		
59i	B _C	Ac	Ac	H	OH	<i>Didemnidae</i> sp.		
59j	B _D	Ac	Ac	H	(B)	<i>Didemnidae</i> sp.		

Die Extraktion von Oocydin A (**59a**) wurde von Salmond *et al.* in EPB-Medium (engl.: enriched potato dextrose broth) durchgeführt. Zur Untersuchung, ob die vorliegenden Bakterienstämme von *S. plymuthica* und *D. dadantii* generell in der Lage sind, Oocydin A (**59a**) zu produzieren, wurden die Ergebnisse von der AG Salmond unter den gleichen Bedingungen reproduziert.⁸⁴ Die LCMS-Auswertungen lieferten für beide Wildtypen von *S. plymuthica* und *D. dadantii* in EPB-Medium die exakte Masse von Oocydin A (**59a**) mit $m/z = 493.1605$ (vgl. Anhang 6.5, Abbildungen 192-195) und das Isotopenmuster einer monochlorierten Verbindung im Verhältnis von 3:1 für ³⁵Cl und ³⁷Cl. Die Signalintensität für den *Dickeya*-Wildtyp war gegenüber dem *Serratia*-Wildtyp um den Faktor 10 vermindert. In den bisherigen LCMS-Experimenten für LB- und NB II-

Medium wurden ebenfalls nach dieser Masse gesucht. Die LCMS-Auswertungen ergaben für diese Medien kein Signal für Oocydin A (**59a**).

Im Folgenden sollen die putativen Biosynthesewege des Polyketids **59a** von Salmond *et al.* mit der Vorhersage von Prof. Piel verglichen werden (vgl. Anhang 6.6 und Abbildung 93).⁸⁴ Wie in Abbildung 29 dargestellt, wurde auch nach der Strukturaufklärung des Metaboliten **59a** keine Veränderung zu Beginn der Biosynthese von Prof. Piel vorgenommen. Die Startereinheit 1,3-Bisphosphoglycerat **55** aus dem Primärmetabolismus reagiert unter Einwirkung des Lademoduls zu dem Thioester **58** (s. Abbildung 30). Im Anschluss führt eine β -Verzweigungskassette in Modul 1 die Exomethylengruppe ein (s. Abbildung 27). Darauf wird vermutet, dass durch eine FAD-abhängige Monooxygenase in Modul 2 eine oxidative Spaltung in einer Baeyer-Villiger Oxidation, wie im Pederinbiosynthese (vgl. Abbildung 25), zur Bildung der Säure in Modul 3 und dem Spaltprodukt **138** führt. Um diese Reaktion zu überprüfen wurden bereits die LCMS-Daten der EPB-Extraktionen nach der exakten Masse von $m/z = 137.0573 [M+Na^+]$ untersucht. Bislang konnte allerdings das Spaltprodukt **138** noch nicht identifiziert werden, was wahrscheinlich auf die instabile Struktur mit zwei endständigen Doppelbindungen zurückzuführen ist. Salmond *et al.* hingegen postuliert, dass das Lademodul inaktiv ist und die Biosynthese erst in Modul 1 durch eine in *trans* stehende AT-Domäne mit Malonyl-CoA beginnt. Im nächsten Schritt wird ebenfalls eine HMGS-vermittelte Aldolreaktion angenommen, die direkt zu der Säure in Modul 3 führen soll. Im dritten Modul codiert der Gencluster eine Oxygenase. Salmond *et al.* nehmen jedoch keine Beteiligung der Monooxygenase in der Biosynthese von Oocydin A (**59a**) an. Für Modul 4 wird in beiden Biosynthesen postuliert, dass eine Hydroxygruppe durch eine freistehende Hydroxylase eingefügt wird. Diese Hydroxyfunktion in ϵ -Position vollzieht vermutlich in Modul 7 den Angriff, katalysiert durch die PS-Domäne, auf das Michael-Akzeptorsystem und bildet einen Fünfring aus. Modul 8 sollte für die Verlängerung der wachsenden Polyketidkette und für die Umwandlung einer Ketofunktion in eine Doppelbindung verantwortlich sein. Anhand der Struktur von Oocydin A (**59a**) ist ersichtlich, dass die Doppelbindung im Zielmolekül **59a** sich in Modul 10 in β,γ -Position befinden muss. Hierbei wird von Salmond *et al.* ein zweifaches Durchlaufen von Modul 8 angenommen, das zur Ausbildung eines $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -konjugierten Diens führen soll. Dieses soll dann durch eine freistehende Enoylreduktase zum Substrat mit einer β,γ -Doppelbindung reduziert und umgelagert werden. In der Biosynthese, die von Prof. Piel postuliert wurde, wird die Verbindung aus Modul 8 zum gesättigten Produkt reduziert. Die Einführung der Doppelbindung in β,γ -Position ist noch nicht geklärt, da eine KR-Domäne in der darauffolgenden Domänenfolge fehlt und stattdessen auch ein α,β -

System ausbilden würde. Bekannt sind solche Isomerisierungen der Doppelbindungen sowohl aus der Bacillaen-PKS als auch der Rhizoxin-PKS mit einer Domänenanordnung: KS^0 -DH-ACP, wie sie in Modul 10 auftritt.¹³⁵ Der weitere Verlauf der Biosynthesen ist identisch und das Macrolacton **139** soll durch Angriff der Hydroxyfunktion des Furanrings gebildet werden und im Anschluss durch eine Halogenase chloriert sowie weiterhin zum Naturstoff **59a** acetyliert werden.

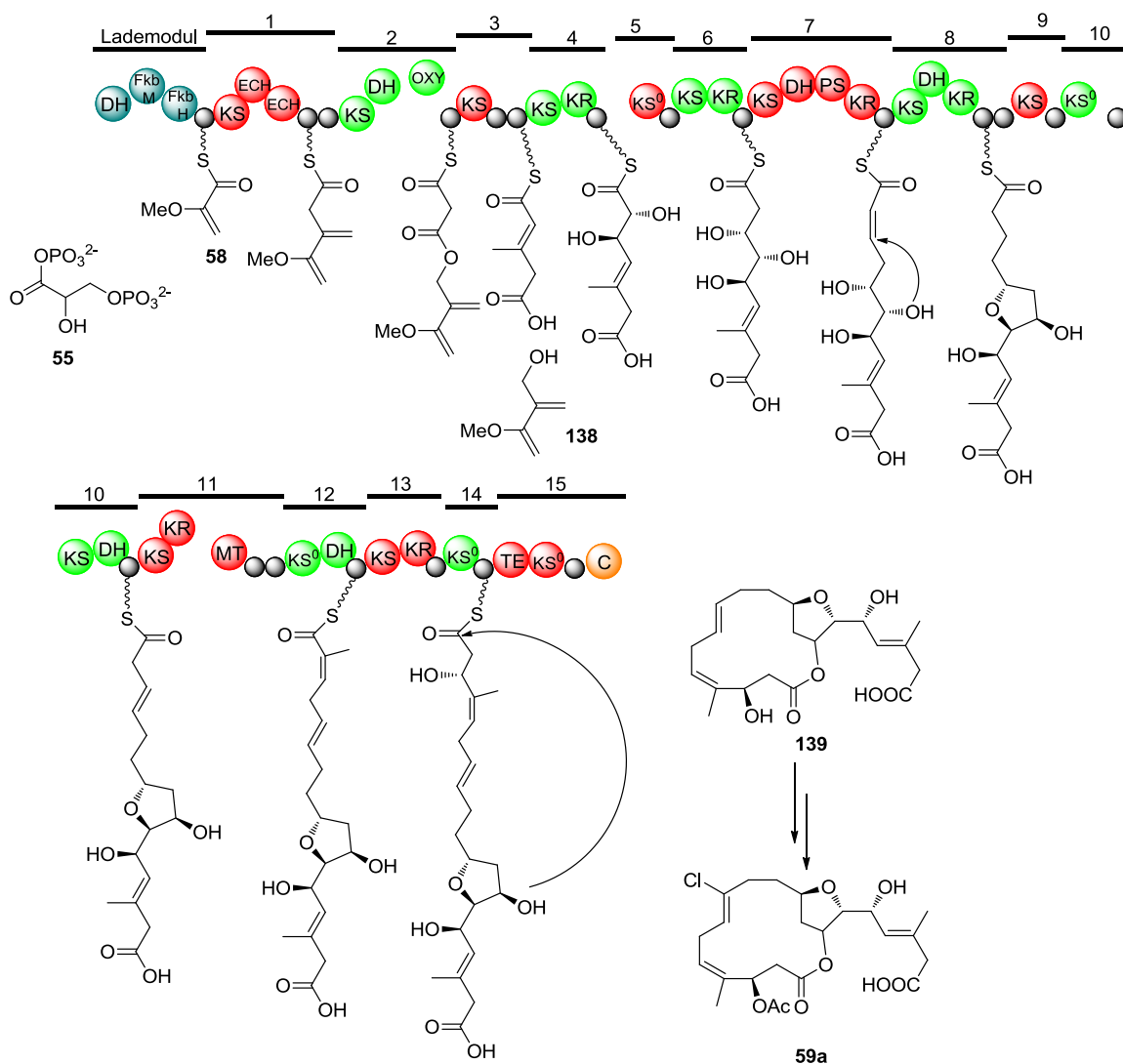


Abbildung 93: Putativer Biosyntheseweg von Oocydin A (**59a**) von Prof. Piel. Zur Unterscheidung der einzelnen Module von PKS wurden sie abwechselnd in grün und rot dargestellt, orange Domänen zählen zu den NRPS, kleine schwarze Kreise ohne Beschriftung repräsentieren ACP.

*Fazit: Die Extraktion von S. plymuthica in NB II-Medium führte zwar nicht zum gesuchten Polyketid **59a**, allerdings konnte ein bislang noch unbekannter Naturstoff **137** in einer Fraktion nachgewiesen und teilweise aufgeklärt werden. Nur die Bakterienkulturen des Minifors-Fermentor zeigten dabei in der HPLC-Auswertung hinreichend große Signale, um NMR-spektroskopische Untersuchungen von Mangoni et al. durchführen zu lassen.*

*Salmond et al. isolierten den Naturstoff **59a** aus EPB-Medium und identifizierten ihn als Oocydin A (**59a**). Die Kulturen in LB- und NB II-Medium wurden nachträglich massenspektroskopisch auf Oocydin A (**59a**) untersucht und es wurde kein Naturstoff **59a** in diesen Medien produziert. Ein Vergleich beider putativen Biosynthesen von Piel und Salmond zeigte eine deutliche Abweichung zu Beginn des PKS-Genclusters. Hierbei soll in der Vorhersage von Prof. Piel eine FAD-Monooxygenase, wie im Pederingencluster, für die Ausbildung von einer Säure und dem Spaltprodukt **138** verantwortlich sein. Die Extrakte der EPB-Bakterienkulturen wurden hinsichtlich dieser Verbindung **138** massenspektroskopisch untersucht, bislang konnte das Substrat **138** noch nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich wird das Produkt **138** aufgrund seiner Struktur mit zwei endständigen Doppelbindungen relativ schnell umgewandelt und kann nicht mehr detektiert werden. Als Lösung könnte ein elektronenarmes Dienophil während der Fermentation zur Bakterienkultur gegeben werden und anschließend nach dem Diels-Alder-Addukt massenspektroskopisch gesucht werden.*

4 Material und Methoden

4.1 Molekularbiologischer Teil

Auszüge von Kapitel 4 wurden aus der Diplomarbeit *Pöplau* übernommen und sind mit der Literaturstelle [¹¹⁸] gekennzeichnet.

4.1.1 Vektoren, Organismen und Primer

4.1.1.1 Vektoren

Tabelle 6: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.

Plasmid	Herkunft	Verwendung	Resistenz
pET28b (-)	EMD Biosciences	Expressionsplasmid Tag: N-His Promotor: T7 Induktion: 1 mM IPTG	Kanamycin
pET29b (-)	EMD Biosciences	Expressionsplasmid Tag: C-His Promotor: T7 Induktion: 1 mM IPTG	Kanamycin

Tabelle 7: Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten Vektoren und ihre Beschreibung.

Plasmid	Funktion	Beschreibung
pPP01	Sequenzierung	<i>ooc-PS1</i> (Dic-F1/Dic-R3chis) in pET29b (-): <i>E. coli</i> XL1-Blue
pPP02	Expression	<i>ooc-PS1</i> (Dic-F1/Dic-R3chis) in pET29b (-): <i>E. coli</i> BL21 (DE3)
pPP03	Sequenzierung	<i>ooc-PS2</i> (Dic-F3/Dic-R3chis) in pET29b (-): <i>E. coli</i> XL1-Blue
pPP04	Expression	<i>ooc-PS2</i> (Dic-F3/Dic-R3chis) in pET29b (-): <i>E. coli</i> BL21 (DE3)
pPP05	Sequenzierung	<i>pedF-PS1</i> (Ped-F1/Ped-R1chis) in pET29b (-): <i>E. coli</i> XL1-Blue
pPP06	Expression	<i>pedF-PS1</i> (Ped-F1/Ped-R1chis) in pET29b (-): <i>E. coli</i> BL21 (DE3)
pPP07	Sequenzierung	<i>pedF-PS2</i> (Ped-F3/Ped-R3chis) in pET29b (-): <i>E. coli</i> XL1-Blue

Fortsetzung Tabelle 7:

pPP08	Expression	<i>pedF-PS2</i> (Ped-F3/Ped-R3chis) in pET29b (-): <i>E. coli</i> BL21 (DE3)
pPP09	Sequenzierung	<i>misF-PS1</i> (Mis-F1/Mis-R3chis) in (pET29b (-): <i>E. coli</i> XL1-Blue
pPP10	Expression	<i>misF-PS1</i> (Mis-F1/Mis-R3chis) in (pET29b (-): <i>E. coli</i> BL21 (DE3)
pPP11	Sequenzierung	<i>misF-PS2</i> (Mis-F3/Mis-R1chis) in (pET29b (-): <i>E. coli</i> XL1-Blue
pPP12	Expression	<i>misF-PS2</i> (Mis-F3/Mis-R1chis) in (pET29b (-): <i>E. coli</i> BL21 (DE3)
pPP13	Sequenzierung	<i>misF-PS3</i> (Mis-F3/Mis-R3chis) in (pET29b (-): <i>E. coli</i> XL1-Blue
pPP14	Expression	<i>misF-PS3</i> (Mis-F3/Mis-R3chis) in (pET29b (-): <i>E. coli</i> BL21 (DE3)
pPP15	Sequenzierung	<i>psyD-PS1</i> (Psy-F3/Psy-R1) in (pET29b (-): <i>E. coli</i> XL1-Blue
pPP16	Expression	<i>psyD-PS1</i> (Psy-F3/Psy-R1) in (pET29b (-): <i>E. coli</i> BL21 (DE3)
pPP17	Sequenzierung	<i>psyD-PS2</i> (Psy-F3/Psy-R1chis) in (pET29b (-): <i>E. coli</i> XL1-Blue
pPP18	Expression	<i>psyD-PS2</i> (Psy-F3/Psy-R1chis) in (pET29b (-): <i>E. coli</i> BL21 (DE3)

4.1.1.2 Organismen und Bestandteile genomischer DNA-Bibliotheken**Tabelle 8:** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Organismen und Bestandteile genomischer DNA-Bibliotheken.

Stamm / Vektor	Genotyp / Quelle	Referenz / Herkunft
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac^r ZΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>]	Firma Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F- <i>ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm</i> (DE3)	Firma Invitrogen
Cosmid pPD9F12 (aus heterologer Genbibliothek)	<i>Pseudomonas</i> sp. Symbiont von <i>Paederus fuscipes</i>	Piel <i>et al.</i> ¹²⁷

Fortsetzung Tabelle 8 :

Fosmid pTSW-AU5 (aus heterologer Genbibliothek)	Genomische DNA von <i>Theonella swinhoei</i> , Chemotyp W	AG Piel ⁵²
pPSKF1 (aus heterologer Genbibliothek)	<i>Psammocinia aff.</i> <i>bulbosa</i> sp. (heterologe Genbibliothek)	Piel <i>et al.</i> ⁶⁵
<i>Serratia plymuthica</i> 4Rx13	Wildtyp	Isoliert aus der Rhizosphäre von <i>Brassica napus</i> L. subsp. <i>oleifera</i> Arbeitsgruppe Berg (ehemals Universität Rostock, jetzt TU Graz). Der Stamm wurde uns überlassen von Piechulla, Universität Rostock.
<i>Dickeya dadantii</i> 703 (syn. <i>Erwinia</i> <i>chrysanthemii</i> , <i>Pectobacterium</i> <i>chrysanthemii</i>)	Wildtyp	Arbeitsgruppe von Perna, University of Wisconsin, Madison, USA

4.1.1.3 Primer

Die in Tabelle 9 aufgelisteten Primer wurden in lyophilisierter Form von der Firma *Invitrogen* bezogen. Zu den Primern wurde ein definiertes Volumen an MilliQ-Wasser gegeben, um eine 100 µM Lösung zu erhalten. Für die Verwendung wurde die Stammlösung mit MilliQ-Wasser 1:10 verdünnt, so dass die Primer eine Endkonzentration von 10 µM aufwiesen.

Tabelle 9: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Primernamen	Primersequenz (5' → 3'), T _m in [°C]	Verwendung
Dic-F1	CAAGTCATATGTTGCCGCTATCTCACCCCTGC T _{m1} / T _{m2} : 68.2/61.1	pPP01 und pPP02
Dic-F3	CTTGACATATGGATACGACGGCGAGCGC T _{m1} / T _{m2} : 69.0/54.9	pPP03 und pPP04
Dic-R3chis	GACAATCTCGAGCGCCTCATTCTCATCCGA T _{m1} / T _{m2} : 70.6/51.5	pPP01- pPP04
Ped-F1	CAAGTCATATGTCGGGGGCTACCGAAAGC T _{m1} / T _{m2} : 68.1/57.3	pPP05 und pPP06
Ped-F3	CAAGTCATATGTCGACTTTGGTGAGTACGGAAGGC T _{m1} / T _{m2} : 69.3/60.3	pPP07 und pPP08

Fortsetzung Tabelle 9:

Ped-R1chis	<u>A</u> ACTATCTCGAGGGCACCGGCAAGGATAAAGAC T _{m1} / T _{m2} : 69.7/57.3	pPP05 und pPP06
Ped-R3chis	<u>A</u> ACTATCTCGAGCACAAGCCGGTTAGCATCAGG T _{m1} / T _{m2} : 69.9/57.0	pPP07 und pPP08
Mis-F1	<u>C</u> AAGTCATATGTCGCCTTGT TTTT GCTGAAACG T _{m1} / T _{m2} : 67.9/57.7	pPP09 und pPP10
Mis-F3	<u>C</u> AAGTCATATGTCCTCAGCTGCATCCCTTATTGCAT T _{m1} / T _{m2} : 68.2/ 58.8	pPP11- pPP14
Mis-R1chis	<u>A</u> ACTATCTCGAGGCTTTCTCGCCATTGTGTGCT T _{m1} / T _{m2} : 69.7/ 56.7	pPP11 und pPP12
Mis-R3chis	<u>G</u> ACTATCTCGAGCGGATTGTCTTGTGCAAGCAT T _{m1} / T _{m2} : 69.4/55.1	pPP09, pPP10, pPP13, pPP14
Psy-F3	<u>C</u> AAGACATATGACCGCGACGCATTTCTCG T _{m1} / T _{m2} : 69.0/56.9	pPP15- pPP18
Psy-R1	<u>C</u> ACTATCTCGAGTCACAGGCGATCATGTTTCAGG T _{m1} / T _{m2} : 69.2/49.1	pPP15 und pPP16
Psy-R1chis	<u>C</u> ACTATCTCGAGCAGGCGATCATGTTTCAGG T _{m1} / T _{m2} : 67.9/49.1	pPP17 und pPP18

In Tabelle 9 sind nur die Primer aufgeführt, die zu positiven Expressionsplasmiden führten. Überhänge kursiv, Schnittstelle unterstrichen, T_{m1}/ T_{m2} = berechnete Schmelztemperatur der Primer mit (T_{m1}) und ohne (T_{m2}) Überhänge mittels *VectorNTI*, Stopcodon fett.

4.1.2 Zusätze und Medien

Alle Medien wurden vor Benutzung autoklaviert und bei Bedarf im Anschluss mit folgenden steril filtrierten Zusätzen versetzt (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Verwendete Zusätze und ihre Endkonzentration.

Zusatz	Endkonzentration [µg/mL]		
	<i>E. coli</i>	<i>D. dadantii</i> WT/KO	<i>S. plymuthica</i> WT/KO
Ampicillin (Carbenicillin)	100	- / 25	- / 25
Kanamycin	25	25	25

4.1.2.1 LB Medium (Luria Bertani)

10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
10 g	NaCl
ad 1000 mL	H ₂ O _{dest}

Es wurde auf pH 7.0 eingestellt und für Kulturplatten 1,5% Agar hinzugegeben.

4.1.2.2 2xYT-Medium (speziell für die Proteinexpression, s. Abschnitt 4.1.13.1)

16 g	Trypton
10 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
ad 1000 mL	H ₂ O _{dest}

4.1.2.3 TB-Medium (speziell für die Proteinexpression, s. Abschnitt 4.1.13.1)

12 g	Trypton
24 g	Hefeextrakt
4 mL	Glycerin
ad 900 mL	H ₂ O _{dest}
ad 100 mL	Kaliumphosphatpuffer (170 mM KH ₂ PO ₄ , 720 mM K ₂ HPO ₄)

4.1.2.4 NB II Medium (Nährmedium für *Dickeya dadantii* und *Serratia plymuthica*)

3.5 g	Caseinpepton
2.5 g	Fleischpepton
2.5 g	Gelantinepepton
1.5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
ad 1000mL	H ₂ O _{dest}
pH 7.2	

4.1.2.5 EPB (Nährmedium für *Dickeya dadantii* und *Serratia plymuthica*)⁸⁴

24 g	Potato Dextrose Broth
6 g	Bactopepton
4 g	Hefeextrakt
100 mg	NaCl

ad 1000 mL H₂O_{dest}

pH 7.0

4.1.3 Kultivierung von Bakterien

4.1.3.1 *E. coli*-Kultivierung¹¹⁸

Für die Anzucht von *E. coli*-Bakterien wurden LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika aus Tabelle 10 imprägniert und bei 37 °C inkubiert. Zur Flüssigkultivierung wurde Zellmaterial einer Einzelkolonie in 5 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm schüttelnd inkubiert. Für größere Ansätze wurde mit dieser Übernachtskultur die benötigte LB-, 2xYT- oder TB-Menge im Verhältnis 1/100 in einem Erlenmeyerkolben angeimpft und bis zu der gewünschten Zelldichte bei 37 °C und 200 rpm schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand und die Zellen für 45 min bei 6000 rpm voneinander separiert.

4.1.3.2 *Dickeya dadantii*-/ *Serratia plymuthica*-Kultivierung

Die Flüssigkultivierung von *D. dadantii*- und *S. plymuthica*-Stämmen, sowie ihren Mutanten erfolgte in LB-, NB II- und EPB-Medium bei 27 °C oder 30 °C und 200 rpm für zwei bis vier Tage. Für größere Ansätze bis zu 3 L wurde der Fermentor *Minifors* von der Firma *Infors HT* verwendet. Die Kultivierung wurde in NB II-Medium bei 30 °C und 300 rpm mit einem Sauerstoffpartialdruck von 20% bei pH 7.0 durchgeführt. Nach einem Tag wurden die Zellen 30 min bei 6000 rpm abzentrifugiert und gefriergetrocknet.

4.1.3.3 Anlegen von Gefrierkulturen¹¹⁸

Zur Lagerung von Bakterienstämmen wurden Gefrierkulturen angefertigt. Hierzu wurden 750 µL einer Übernachtskultur mit 750 µL 30%igem (v/v) Glycerin in einem 2 mL-Kryoröhrchen vermischt und anschließend mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

4.1.4 Plasmidpräparation¹¹⁸

Zur Herstellung von Plasmidpräparaten wurden zunächst 3-5 mL LB-Medium mit einer Einzelkolonie bzw. mit Zellmaterial aus einer Gefrierkultur und dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (200 rpm). 1.5 mL der Übernachtskultur wurden in ein 1.5 mL Gefäß überführt und 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 µL kalten Puffer 1 resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 µL Puffer 2 wurde die Reaktionsmischung mehrmals invertiert und unmittelbar 200 µL von Puffer 3 hinzugegeben. Es fiel ein farbloser Niederschlag aus, der für 3 min bei 13000 rpm abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde mit 500 µL Chloroform versetzt, geschüttelt und für 5 min bei

13000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde die wässrige Phase separiert und zu 350 μ L Isopropanol hinzu zugegeben. Zur Verbesserung der Präzipitation wurde die Reaktionsmischung für 20 min bei -20 °C inkubiert und schließlich für 20 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und für 20 min in einer Speedvac getrocknet. Schließlich wurde die Plasmid-DNA in 30-50 μ L MilliQ-Wasser aufgenommen.

Puffer 1:	50 mM	Tris-HCl (pH 8)
	10 mM	EDTA (pH 8)
	100 μ g/mL	RNase in TE-Puffer*
Puffer 2:	200 mM	NaOH
	1% (w/v)	SDS
Puffer 3:	3 M	Kaliumacetat (pH 5,5)
TE:	10 mM	Tris-HCl (pH 8)
	1 mM	EDTA (pH 8)

* 10 mg RNase wurden in 1 mL TE-Puffer gelöst, 2 min bei 100 °C erhitzt und anschließend zum autoklavierten Puffer 1 (100 mL Endvolumen) gegeben.

4.1.5 Elektroporation von Plasmiden¹¹⁸

4.1.5.1 Herstellung elektrisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Erzeugung elektrisch-kompetenter Zellen wurde zunächst 4 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Stamm versetzt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 400 mL LB-Medium mit der Übernachtskultur versetzt und wiederum bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4-0.5 geschüttelt. Die Zellsuspension wurde bei 5000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Danach wurde das Pellet auf Eis vorsichtig in 10%igem (v/v) gekühlten Glycerin resuspendiert und wiederum bei 5000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Im Folgenden wurden die stets auf Eis gelagerten Zellen nacheinander mit 30 mL, 25 mL und 15 mL 10%igem (v/v) Glycerin gewaschen. Die Resuspension erfolgte in 1 mL 10%igem (v/v) Glycerin und wurde zu je 50 μ L Aliquote aufgeteilt. Nach dem Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff wurden die elektrokompenten Zellen bei -80 °C gelagert.

4.1.5.2 Elektroporation

Bei dieser Methode wurde ein elektrisches Feld von 2-2,5 kV für \geq 4 ms erzeugt, wodurch die Permeabilität der Zellmembran gegenüber Fremd-DNA erhöht wurde. Hierzu wurden 1.5 μ L der ligierten DNA zu den auf Eis aufgetauten, kompetenten Zellen

gegeben und in eine Elektroporationsküvette überführt. Unter der Programmeinstellung *Ec2* wurden die Zellen elektroporiert und umgehend mit 1 mL kaltem LB-Medium versetzt. Nach der Überführung in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß wurde die Bakteriensuspension eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Dann wurden 200-300 µL des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Fünf bis sieben Klone wurden gepickt und in Übernachtkulturen überführt. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA isoliert (Abschnitt 4.1.4).

4.1.6 Polymerase-Kettenreaktion

Zur selektiven Amplifizierung von DNA-Segmenten wurde die *Phusion®-High-Fidelity*-Polymerase der Firma *NEB* (Frankfurt/Main) verwendet. Es wurde ein 50 µL Ansatz zur Amplifizierung der PS-Domänen verwendet.

10 µL	Puffer (5 x)
1.0 µL	dNTP (10 mM)
2.5 µL	DMSO
1.0 µL	Vorwärtsprimer (10 µM)
1.0 µL	Rückwärtsprimer (10 µM)
1.0 µL	DNA
0.5 µL	<i>Phusion®</i> -Polymerase
33 µL	MilliQ-H ₂ O _{dest}

Es wurde eine Zwei-Stufen-PCR durchgeführt. Die Polymerase wurde erst zu den Proben hinzugefügt wurde, als die Heizdeckeltemperatur erreicht worden ist. Zunächst wurden zwei Zyklen bei der niedrigen Temperatur T_{anneal1} durchgeführt, die der Annealingtemperatur ohne Überhänge entspricht. Die darauffolgenden Zyklen verliefen bei der höheren Annealingtemperatur (T_{anneal2}). Die verwendeten Primer-Hybridisierungstemperaturen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Denaturierung	98 °C	5 min	} 2 Cyclen
Denaturierung	98 °C	15 sec	
Annealing	T_{anneal1} ($T_{m1}-0.5$ °C)	20 sec	
Elongation	72 °C	20 sec	
Denaturierung	98 °C	15 sec	}

Annealing	$T_{\text{anneal}2}$ ($T_{m2}-0.5$ °C)	20 sec	29 Cyclen
Elongation	72 °C	20 sec	
Elongation	72 °C	7 min	
Abkühlen	4 °C		

4.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden 1%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Zur Herstellung wurde 1 g Agarose in 100 mL 1x TAE-Puffer (0,12% (v/v) Eisessig, 0,48% (w/v) Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) unter Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurde 0.1 µg/mL Ethidiumbromid hinzugegeben. Daraufhin wurde ein Gel gegossen und nach dem Erhärten in eine mit 1x TAE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer überführt. Zum Beladen der Gelkammern wurden die Proben mit 2 µL 10x Ladepuffer versetzt. Zur Größenbestimmung der einzelnen DNA-Segmente wurden als Referenz 6 µL des 1 kb-DNA-Markers Marker (Firma *Fermentas*, Abbildung 94) aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 120 V für 20-30 min angelegt und die Banden unter UV-Licht detektiert. Für die DNA-Isolierung (4.1.8) wurde kein Ethidiumbromid verwendet. Die Banden wurden in einem *GelGreen*-Bad (Firma *Biotium*, 10000x in H₂O) für 30 min angefärbt und unter Blaulicht detektiert.

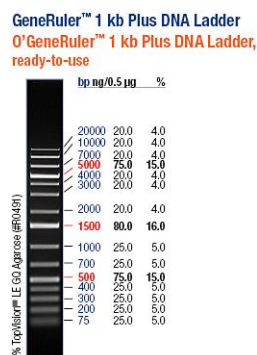


Abbildung 94: Verwendeter DNA-Marker (Firma *Fermentas*).

4.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur Isolierung der DNA-Banden wurde ein 50 µL PCR-Ansatz gewählt. Durch das Anfärben des Agarosegels mit *GelGreen* konnten die Banden mit einem Blaulicht-Transilluminator (Arbeitsspektrum von 420-490 nm) detektiert werden. *GelGreen* interkaliert laut Hersteller nicht in die DNA, wie Ethidiumbromid. Die DNA-Fragmente wurden direkt ausgeschnitten und anschließend nach dem Protokoll des Gelextraktionskits der Firma *Fermentas*, Firma *PeqLab* oder Firma *Jena Bioscience* aufgereinigt.

4.1.9 Desphosphorylierung

Bei der Verwendung von gleichen klebrigen Enden an beiden Seiten der DNA musste eine Religation des Vektors verhindert werden. Dies geschah durch Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors (Abschnitt 4.1.12) mit *Antarctic Phosphatase* (Firma *NEB*). Es wurde ein 140 μL Ansatz verwendet.

120 μL	DNA
14 μL	<i>Antarctic Phosphatase</i> (5 u/ μL)
6 μL	Puffer <i>Antarctic Phosphatase</i> (10x)

Die Inkubation erfolgte für 3.5 h bei 37 °C. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte 5 min bei 65 °C. Die Vektoren konnten so für die Ligation (Abschnitt 4.1.10) eingesetzt werden.

4.1.10 Ligation

Zur Ligation von PCR-Fragmenten in die Expressionsvektoren pET28b (-) und pET29b (-) wurde zunächst eine semiquantitative Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Hierzu wurde nach dem Lauf eines Agarosegels ein Intensitätsvergleich von DNA-Marker zu Probe und Vektor vorgenommen. Es wurde ein 10 μL Ansatz mit folgenden Konditionen gewählt.

7 μL	PCR-Produkt
1 μL	Vektor
1 μL	T4 DNA-Ligase-Puffer (5 x)
1 μL	T4 Ligase
ad 10 μL	MilliQ-Wasser

Die Negativkontrolle für beide Vektoren wurde mit MilliQ-Wasser anstatt PCR-Produkt durchgeführt. Die Inkubation des Ligatonsansatzes erfolgte über Nacht bei 16 °C. Daraufhin wurde die Ligase für 20 min bei 70 °C inaktiviert und das Klonierungsprodukt mittels Elektroporation in elektrokompente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert (Abschnitt 4.1.5.2).

4.1.11 Alignment und Sequenzierung

Sequenz-Alignments zur Bestimmung von Anfang und Ende der PS-Sequenzen wurden mit ein ClustalW-Multiple-Alignment berechnet und mittels BioEdit erstellt (vgl. Anlage 6.1).^{85,86} Die Sequenzierung der PCR-Fragmente (DNA-Konzentration von 30-100 ng/ μL) wurden von der Firma *GATC* mit folgenden Standardprimern (Tabelle 11)

durchgeführt. Die Daten wurden mit FinchTV 1.4.0, VecScreen (NCBI) und BioEdit 7.0.9.0 ausgewertet.

Tabelle 11: Sequenzierprimer der Firma GATC.

Primer Name	Primer Sequenz (5'→ 3')
T7 Forward	TAATACGACTCACTATAGGG
pET-RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG

4.1.12 Restriktion

Für eine gerichtete Klonierung (4.1.10) wurden sowohl die Vektoren als auch die einzelnen PCR-Fragmente zunächst mit *NdeI* und *XhoI* geschnitten (Firma *NEB*). Hierzu wurde folgender Ansatz (100 µL) gewählt.

20 µL	DNA
10 µL	<i>NEBuffer 4</i>
10 µL	BSA
je 3 µL	<i>NdeI</i> und <i>XhoI</i>
54 µL	MilliQ-Wasser

Der Restriktionsverdau wurde für 5 h bei 37 °C durchgeführt. Im Anschluss wurde das Gemisch mit einem PCR-Purification-Kit (Firma *Fermentas*) aufgereinigt. Die Vektoren wurden darauf noch dephosphoryliert (Abschnitt 4.1.9).

Zur Überprüfung von klonierten Plasmiden wurden die folgenden Endonukleasen verwendet. Die gewählten Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 12 aufgeführt. Es wurde ein 10 µL Ansatz gewählt und für 3-4 h inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde anschließend durch Agarose-Gel-Elektrophorese (Abschnitt 4.1.7) kontrolliert.

0.75 µL	DNA (von Plasmidpräparation, vgl. Abschnitt 4.1.4)
1 µL	Puffer (s. Tabelle 12)
1 µL	BSA (s. Tabelle 12)
0.50 µL bzw. je 0.25 µL	Enzym bzw. Enzym 1 und Enzym 2 (s. Tabelle 12)
ad 10 µL	MilliQ-Wasser

Tabelle 12: Verwendete Restriktionsenzyme.

Plasmid	Restriktionsenzyme (Sequenz (5'→ 3'); Reaktionsbedingungen)	Bandengröße (bp)
pPP01-pPP04	<i>Apal</i> (GGGCC [~] C; BSA, <i>NEBuffer</i> 4, 25 °C)	1528/4710 für pPP01-pPP02; 1473/4710 für pPP03-pPP04
pPP05-pPP08	<i>XbaI</i> (T [~] CTAGA; BSA, <i>NEBuffer</i> 4, 37 °C)	803/5398 für pPP05-pPP06; 761/5298 für pPP07-pPP08
pPP09-pPP14	<i>Apal</i> (GGGCC [~] C)/ <i>NcoI</i> (C [~] CATTG); BSA, <i>NEBuffer</i> 4, 2h <i>Apal</i> bei 25 °C, dann Zugabe <i>NcoI</i> für 2 h bei 37 °C)	1533/4680 für pPP09-pPP10; 1503/4608 für pPP11-pPP12; 1503/4680 für pPP13-pPP14
pPP15-pPP18	<i>BglII</i> (A [~] GATCT; <i>NEBuffer</i> 3, 37 °C)	462/5611 für pPP15-pPP16; 462/5608 für pPP17-pPP18

4.1.13 Proteinexpression, Proteinreinigung und Proteinanalytik

4.1.13.1 Proteinexpression

Für die Proteinexpression wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21 DE3 verwendet. Zunächst wurden 2 µL der jeweiligen Plasmidpräparation mittels Elektroporation in die Zellen transformiert (vgl. Abschnitt 4.1.5.2). Von den erhaltenen Klonen wurde eine 5 mL Übernachtkultur mit 5 µL 25µg/mL Kanamycin (Kn²⁵) in LB-Medium angesetzt. Zur Expression der Proteine wurde das Inokulum und 200 µL Kn²⁵ zu 200 mL LB-Medium gegeben. Die Inkubation erfolgte schüttelnd bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5. Die anschließende Induktion erfolgte mit 200 µL 1M IPTG-Lösung bei 16 °C über Nacht. Nach der Proteinexpression wurden die Zellen bei 4 °C und 6000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zum Zellaufschluss bei -80 °C gelagert. Diese Ansätze wurden ausschließlich für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. Abschnitt 4.1.13.3) verwendet. Um größere Mengen Protein zu erhalten, wurde das Protokoll für 1 L Kulturen leicht verändert. Hierzu wurde eine 10 mL LB-Übernachtkultur mit 10 µL Kn²⁵ als Inokulum verwendet. Für höhere Ausbeuten wurden 2xYT oder TB als Expressionsmedium benutzt. Nach der Induktion mit 1 mL 1M IPTG-Lösung wurden die Kulturen bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8 (2xYT) bzw. 1.5-1.8 (TB) angezogen. Im Anschluss

wurden die Zellen ebenfalls abzentrifugiert und mit Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C bis zum Zellausschluss.

4.1.13.2 Aufreinigung von Histidin-Tag Proteinen

Die eingefrorenen Zellen wurden in kalten Lysepuffer (4 mL pro g Zellen) gelöst. Der Aufschluss wurde auf Eis mit einem Ultraschallhomogenisator bei 50 W und einer Frequenz von 40 Hz für 10 s fünfmal wiederholt. Daraufhin wurde für 30-45 min je nach Ansatzgröße bei 11.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Als nicht induzierte Kontrolle wurden 20 µL vom Überstand des Zellaufschlusses entnommen. Der restliche Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500-1000 µL je nach Ansatzgröße Ni-NTA-Agarose versetzt und 1 h schüttelnd auf Eis inkubiert. Bei größeren Ansätzen wurde im Anschluss 5 min bei 300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert und auf eine Poly-Prep Säule gegeben (Polyprep Chromatography Columns, Firma *BioRad*) gegeben. Das verbliebene Pellet wurde in 1 mL Lysepuffer resuspendiert, wovon ebenfalls 20 µL als Kontrolle abpipettiert wurden. Es wurde zweimal mit je 1-5 mL Waschpuffer (Tabelle 13) je nach Ansatzgröße gespült und der Durchfluss wurde aufgefangen. Für die SDS-Gelelektrophore wurde über eine ansteigende Imidazolkonzentration (50 bis 300 mM) fraktioniert mit jeweils 1 mL Elutionspuffer (Tabelle 13) eluiert. Jeweils 20 µL der einzelnen Fraktionen, sowie Lysat-, Pellet-, Durchfluss- und Waschfraktionsprobe wurden zur weiteren Analytik mit 2x SDS-Ladepuffer (Tabelle 13) im Verhältnis 1:1 versetzt und für 1 min bei 95 °C denaturiert. Für größere Ansätze wurde nach dem Waschen mit 1 mL 50mM Elutionspuffer gespült und das gewonnene Protein direkt mit 2.5 mL 300 mM Elutionspuffer auf eine equilibrierte *PD-10 Desalting column* (Firma *GE Healthcare*) zum Entsalzen gegeben. Nach dem Herstellerprotokoll wurde 3.5 mL Lagerungspuffer (Tabelle 13) für die Elution verwendet. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels eines IMPLEN Nanophotometers™ P-330. Hierbei galt das Lambert-Beersche Gesetz:

$$E = \epsilon c d$$

mit: E = Extinktion, ϵ = Extinktionskoeffizient, c = Konzentration, d = Dicke der Küvette
Aus dem Gesetz folgt, dass die Extinktion sich linear proportional zur Konzentration der Lösung verändert, da die Parameter ϵ und d konstant bleiben. Die benötigten Extinktionskoeffizienten wurden anhand der einzelnen Aminosäuresequenzen der PS-Konstrukte mittels *ProteinCalculator v3.3* bestimmt.¹²⁸ Für die Proteinassays (s. Abschnitt 4.1.13.6) wurde eine Proteinkonzentration von ca. 3 mg/mL benötigt, so dass die Proteinlösung durch Vivaspin®-Säulen mit einer Membrandichte von 10.000 MWCO (engl.: molecular weight cut off) bis zur gewünschten Konzentration eingengt wurde.

Tabelle 13: Puffer zur Aufreinigung von His-Tag Fusionsproteinen.

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	20 mM Tris, 0.5 NaCl, 10 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerin, pH = 8.0 (HCl)
Waschpuffer	20 mM Tris, 0.5 NaCl, 30 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerin, pH = 8.0 (HCl)
Elutionspuffer	20 mM Tris, 0.5 NaCl, 50-300 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerin, pH = 8.0 (HCl)
2x SDS-Ladepuffer	100 mM Tris, 200 mM DTT, 4 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 20 % (v/v) Glycerin
Lagerungspuffer	25 mM HEPES, 100mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, pH = 7.5 (NaOH)

Die Puffer wurden so gewählt, dass der pH-Wert des Puffers immer mindestens eine Einheit vom isoelektrischen Punkt entfernt lag.

4.1.13.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)¹¹⁸

Die Trennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE in einem vertikalen Gelelektrophoresesystem Multigel (Firma *Biometra*). Die verwendeten Konzentrationen betragen beim Sammelgel 5%-, beim Trenngel 12%-(v/v) Polyacrylamid:Bisacrylamid. Zwischen zwei fixierten Glasplatten wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit Isopropanol zur Erhaltung einer horizontalen Grenzschicht überschichtet. Innerhalb von 30 min war die Polymerisation vollständig und das Isopropanol wurde entfernt, danach konnte das Sammelgel auf das Trenngel gegeben und ein Kamm eingeführt werden.¹²⁹ Nach Aushärtung des Sammelgels wurden die Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit SDS-Laufpuffer (25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS) befüllt. Jeweils 10 µL der Proben wurden in die Taschen überführt, als Referenz dienten 7 µL der Proteinmarker *Roti-Mark-Standard* (Firma *Roth*) oder *Precision Plus Protein™ Prestained Standards* (Firma *Bio-Rad*) (Abbildung 95).

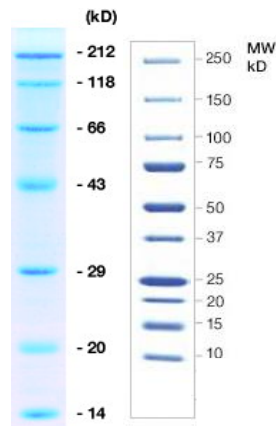


Abbildung 95: Proteinmarker der Firma *Roth* (links) und der Firma *Bio-Rad* (rechts).

Anfänglich wurde eine Spannung von 120 V angelegt bis sich an der Grenzschicht von Sammel- und Trenngel eine Bromphenolblau-Lauffront bildete. Im Anschluss wurde die Spannung auf 150 V erhöht, wodurch die Trennung der Proteine entsprechend ihrer Größe erfolgte. Daraufhin wurden die Proteinbanden durch eine Coomassie Färbelösung (4.1.13.4) sichtbar gemacht.

4.1.13.4 SDS-PAGE Coomassie-Färbung¹¹⁸

Zum Anfärben der SDS-PAGE Gele nach elektrophoretischer Trennung wurde eine Coomassie Färbelösung (10 % (v/v) Eisessig; 30 % (v/v) Methanol; 0,25 % (w/v) Brilliant-Blau R250) benutzt. Danach wurden die Gele für mindestens 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt und im Anschluss mit destilliertem Wasser gespült. Zur Entfärbung wurde eine Entfärber-Lösung (10 % (v/v) Eisessig; 30 % (v/v) Methanol) auf das Gel gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Mittels zweier Cellophan-Folien, die mit 1-2 mL Glycerin versetzt wurden, konnten die Gele getrocknet werden.

4.1.13.5 Stabilitätstest der PS-Domänen

Um die Stabilität der Proteine während der Aktivitätsassays (s. Abschnitt 4.1.13.6) zu gewährleisten, wurde ein Stabilitätstest mit unterschiedlichen Puffern (Tabelle 14) durchgeführt. Hierbei wurden die Proteine exprimiert und aufgereinigt (s. Abschnitt 4.1.13.1 und 4.1.13.2). Es wurde in verschiedenen Puffern (Tabelle 9) umgepuffert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 14: Verwendete Puffer für den Stabilitätstest der PS-Proteine.

Puffer	Molarität (mM)	pH-Wert
HEPES	25	7.5
HEPES	25	8.0
KPi	50	7.0
MOPS	50	7.0
MES	50	6.5

Es wurde 30 Minuten bei 11.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und es wurden 350 µL 72% TFA zugegeben und gut durchmischt. Dann wurde für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert, für weitere 30 Minuten bei 11.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgetrennt. Die denaturierten Proteine wurden mit 100 µL 1 M Tris-Puffer pH 8 wieder in Lösung gebracht und anschließend auf einem SDS-Gel (s. Abschnitt 4.1.13.3) überprüft.

4.1.13.6 Aktivitätsassay der PS-Proteine⁸¹

Der Aktivitätsassay wurde analog der Literatur für DH-Domänen des Borrelidingenclusters durchgeführt. Der Assay wurde in einem Gesamtvolumen von 200 µL nach folgendem Ansatz durchgeführt.

12 mM	offenkettiges Testsubstrat gelöst in H ₂ O mit 2% DMSO
25 mM	HEPES pH 7.5
100 mM	NaCl
10%	Glycerin
2-4 mg/mL	PS-Domäne

Die Reaktion wurde über Nacht bei 37 °C für 16 Stunden inkubiert. Als Negativkontrolle wurde das Enzym bei 95 °C für 5 min denaturiert und ebenfalls mit dem Testsubstrat unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Im Anschluss wurde zweimal mit 1 mL Ethylacetat extrahiert und das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 750 µL Methanol gelöst und mittels HPLC untersucht.

4.1.13.7 Analyse der PS-Assays

Die analytischen HPLC-Messungen zur Untersuchung der PS-Domänen wurden mit dem *Jasco LC-2000 Plus Series HPLC*-System gekoppelt an einen MD-2015 PDA-Detektor aufgenommen. Es wurde eine *Knauer Eurospher II 100-5 C18*-Säule (250 × 4 mm mit

Vorsäule 30 x 4 mm, Flussrate: 1.0 mL/min) verwendet. Die verwendeten Methoden zur Analyse der PS-Assays sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Verwendete HPLC-Methoden zur Untersuchung der PS-Aktivität.

Methoden	Eluentengemisch	TFA (V-%)	Laufzeit [min]
A	50% MeOH/ 50% H ₂ O	-	30
B	30% ACN/ 70% H ₂ O	-	20
C	20%ACN/ 80% H ₂ O	-	30
D	30% ACN/ 70% H ₂ O	0.01 %	20

4.1.14 Naturstoffanalytik von *Serratia plymuthica*

4.1.14.1 Extraktion

Serratia plymuthica wurde wie in Abschnitt (4.1.3.2) kultiviert. Die gefriergetrockneten Zellen wurden über Nacht in Methanol gerührt, evaporiert und in Methanol/ Wasser (10:1) aufgenommen. Der Rohextrakt wurde zweimal mit *n*-Hexan oder Cyclohexan extrahiert, um überschüssige Lipide zu entfernen. Darauf wurde die wässrige Phase mit zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Weiterhin wurde die wässrige Phase auf pH 3 (HCl) angesäuert und wiederum zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Im Anschluss wurden die organischen Phasen vereint und säulenchromatographisch nach folgenden Bedingungen aufgereinigt.

Gradient:

<i>n</i> -Hexan	100 %	(Fraktion 1)
<i>n</i> -Hexan / Ethylacetat	70%:30%	(Fraktion 2)
<i>n</i> -Hexan/ Ethylacetat	30%:70%	(Fraktion 3)
Ethylacetat	100 %	(Fraktion 4)
Ethylacetat/Methanol	70%:30%	(Fraktion 5)
Ethylacetat/Methanol	30%:70%	(Fraktion 6)
Methanol	100 %	(Fraktion 7)

Bei Untersuchungen des Zellüberstands wurde ebenfalls zweimal mit *n*-Hexan oder Cyclohexan extrahiert und die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Weiterhin wurde die wässrige Phase auf pH 3 (HCl) angesäuert und wiederum zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wurde unter vermindertem Druck entfernt.

4.1.14.2 Cytotoxizitätsassays

Die Cytotoxizitätstests der Naturstoffextrakte an Rattenneuroblasten der Zelllinie B104, sowie HeLa-Zellen (Krebszellen) wurden von Dr. Mihaela Gurgui (AG Van-Echten-Deckart) durchgeführt.¹³⁰ Die präparierten Zellen wurden mit den Naturstoffextrakten (2.5 mg Extrakt in 500 µL Methanol gelöst, davon wurden 7 µL verwendet) und Methanol enthaltene Medium als Negativkontrolle versetzt. Zur Quantifizierung des Zelltodes der kultivierten Zellen wurde der CellTiter-Blue Zellviabilitäts-Assay der Firma *BD Bioscience Pharmingen* (Heidelberg) benutzt, der auf Konversion von Resazurin in das fluoreszierende Resorufin basiert. Die metabolische Umwandlung wird nur von lebenden Zellen durchgeführt. Nach Herstellerangaben wurden zu jeder Zellkultur 100 µL CellTiter-Blue Reagenz addiert und nach 24 h wurde die Fluoreszenz des Resorufin mit einem Fluorometer der Firma *Dynex Hybaid Labsystems* (Frankfurt) bei 544EX/590EM gemessen.

4.1.14.3 LCMS-Bedingungen der Rohextrakte in NB II

Die LCMS-Spektren (vgl. Anhang 6.5) der Rohextrakte in EPB-Medium wurden von Frau Peters-Pflaumenbaum mit der LCMS-Anlage unter Abschnitt 4.2.9 nach folgenden Bedingungen aufgenommen (A = Acetonitril + 0.1% TFA; B = Wasser + 0.1% TFA):

Start	20% A + 80% B
2 min	20% A + 80% B
25 min	70% A + 30% B
26 min	100% A
35 min	100% A

4.1.14.4 LCMS-Bedingungen der Rohextrakte in EPB

Die LCMS-Spektren (vgl. Anhang 6.5) der Rohextrakte in EPB-Medium wurden von Frau Peters-Pflaumenbaum mit der LCMS-Anlage unter Abschnitt 4.2.9 nach folgenden Bedingungen aufgenommen (A = Acetonitril + 0.1% TFA; B = Wasser + 0.1% TFA, 50 min Laufzeit, Detektion von Oocydin A (**59a**) bei 18.9 min):

Start	5% A + 95% B
50 min	95% A + 5% B

4.2 Chemischer Teil

4.2.1 Arbeitsweise

Alle Reaktionen mit sauerstoff- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden in unter Vakuum ausgeheizten und mit Argon gespülten Reaktionsgefäßen durchgeführt. Mittels Argon gefluteten Plastikspritzen wurden absolute LM und flüssige Substanzen, sowie Feststoffe im Argongegenstrom, sofern erforderlich, hinzugeben.

4.2.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Alle kommerziell erworbenen Chemikalien wurden im Allgemeinen ohne weitere Aufreinigung verwendet, andernfalls wurde die Aufreinigung in der entsprechenden Synthesvorschrift beschrieben. Alle Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen: *Alfa Aesar* (Karlsruhe), *Acros Organics* (Nidderau), *ASM Research Chemicals* (Hannover), *Sigma Aldrich* (Taufkirchen), *TCI* (Eschborn), *Carbolution* (Saarbrücken) und *VWR* (Darmstadt).

Die Reinigung und Trocknung der Lösungsmittel erfolgte nach gängigen Methoden.¹³¹

4.2.3 Kernresonanzspektroskopie

¹H-NMR: Folgende Geräte der Firma *Bruker* standen zur Verfügung: *DP300* (300 MHz), *DP400* (400 MHz) und *DRX 500* (500 MHz). Als interne Standards dienen bei den Messungen die nicht vollständig deuterierten Lösungsmittel (LM): CHCl_3 ($\delta = 7.26$ ppm), DMSO ($\delta = 2.50$ ppm), MeOH ($\delta = 3.31$ ppm), H_2O ($\delta = 4.79$ ppm).¹³² Charakterisierung der Signal-aufspaltung: s = Singulett, d = Duplett, t = Triplet, q = Quartett, h = Heptett, m = Multiplet, br = verbreitertes Signal.

¹³C-NMR: Die Messungen erfolgten auf folgenden Geräten: *Bruker DP300* (75 MHz), *Bruker DP400* (100 MHz). Als interne Standards wurden die nachstehenden LM verwendet: CDCl_3 ($\delta = 77.16$ ppm), d_6 - DMSO ($\delta = 39.52$ ppm), MeOD ($\delta = 49.00$).¹³²

Allgemein galt: Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Kopplungskonstanten (J) wurden in Hertz (Hz) und chemische Verschiebungen (δ) in parts per million (ppm) angegeben. Die Zuordnung der Signale erfolgte entsprechend den Nummerierungen der angegebenen Skizze.

4.2.4 Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden von Frau Sondag und Frau Dr. Engeser am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn aufgenommen. Für die

Elektrosprayionisation-Spektren (ESI) und die High-Resolution-MS-Spektren (HRMS) wurde ein *Bruker* micrOTOF-Q Flugzeitspektrometer verwendet.

4.2.5 Infrarotspektroskopie

Die IR-Spektren wurden mit einem FT-IR-ATR-Spektrometer *Nicolet 380* der Firma *Thermo* aufgenommen. Die Angabe der Wellenzahlen erfolgte in gerundeten, ganzen Zahlen.

4.2.6 Dünnschichtchromatographie

Als stationäre Phase dienten mit Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten (*Merck*, Kieselgel 60 F₂₅₄). Es wurden folgende Anfärbereagenzien verwendet: Seebach-Reagenz (12.50 g Molybdätophosphorsäure, 5.00 g Cer(IV)sulfat Tetrahydrat, 16 mL konz. Schwefelsäure, 450 mL Wasser) und Kaliumpermanganat-Reagenz (3.00 g Kaliumpermanganat, 20.00 g Kaliumcarbonat, 0.25 g Natriumhydroxid, 300 mL Wasser).¹⁰⁸ Die Entwicklungen erfolgten bei 250 °C im Heißluftstrom.

4.2.7 Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel der Firma *Merck* (Korngröße 0.040 – 0.063 mm, 230 – 400 mesh, ASTM) verwendet. Die jeweils verwendeten Eluentengemische wurden in den entsprechenden Synthesevorschriften aufgeführt.

4.2.8 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die HPLC-Messungen zur Aufreinigung von Syntheseprodukten wurden von Herrn Schneider am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn aufgenommen. Die semipräparative HPLC-Reinigung wurde mittels eines *Knauer Eurospher II 100-5 C18*-Systems (250 × 16 mm mit Vorsäule 30 × 16 mm, Flussrate: 16.0 mL/min) durchgeführt. Die Detektion erfolgte über einen Photodiodenarraydetektor bei 190-600 nm Wellenlänge. Die Bedingungen für die HPLC-Aufreinigung wurden bei den entsprechenden Synthesevorschriften vermerkt.

4.2.9 HPLC-HRMS

Die HPLC-HRMS-Messungen wurden von Frau Peters-Pflaumbaum am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn aufgenommen. Für die HPLC-massenspektrometrischen Untersuchungen (HPLC-HRMS) war ein micrOQ-TOF-Flugzeitspektrometer der Firma *Bruker Daltonik GmbH* (Bremen) mit Apollo-ESI-Quelle mit einer HPLC-Anlage Agilent-1200-Serie gekoppelt. Die Kalibrierung erfolgte intern mit Natriumformiat. Die Genauigkeit der Massenbestimmung lag bei 5 ppm (exakte Masse).

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software *Data Analysis* der Firma Bruker.

4.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

4.3.1 AAV 1: Synthese der SNAC-Thioester mit EDC-HCl und HOBt als Kupplungsreagenzien¹⁰⁸

EDC-HCl (1.2 eq) und HOBt (1.2 eq) wurden zu einer Lösung aus der Säure (1.0 eq) in absolutem CH₂Cl₂ bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre hinzugegeben. Nach 30 min wurden *N*-Acetylcysteamin (**108**, 1.2 eq) und katalytische Mengen an 4-DMAP zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt und mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an SiO₂ aufgereinigt.

4.3.2 AAV 2: Basenkatalysierte Entschützung von Estern¹⁰¹

LiOH (25 eq.) wurde zu einer Lösung aus dem Ester (1.0 eq) in THF/ Methanol (MeOH)/ H₂O (2:2:1, v/v/v) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen der organischen LM unter vermindertem Druck wurde die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit NaHSO₄ (c= 0.1 M in H₂O) auf pH= 2 angesäuert und mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des LM unter vermindertem Druck wurde das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an SiO₂ aufgereinigt.

4.3.3 AVV 3: Entschützung von Silylethern mit HF¹⁰⁹

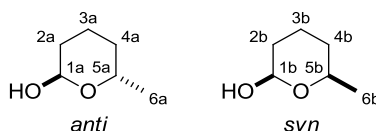
Eine Lösung aus HF (c= 2.65 M, 65-70% HF in Pyridin), Pyridin und absolutem THF wurde angesetzt und zu dem Silylether-geschützten Edukt in absolutem THF bei r.t. unter Ar-Atmosphäre getropft. Nach 6 h Rühren wurde die Reaktionslösung mit EtOAc verdünnt, und mit wässriger gesättigter NH₄Cl-Lösung, HCl (c= 1.2 M in H₂O), wässriger gesättigter NaHCO₃-Lösung und wässriger gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und die LM wurden unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Alkohol wurde entsprechend den Synthesevorschriften in Abschnitt 4.4 aufgereinigt.

4.4 Chemischer Teil

4.4.1 Pyran- und ζ -Hydroxy-abgeleitete Testsubstrate zur Analyse der PS Substratspezifität

4.4.1.1 *rac*-6-Methyltetrahydro-2H-pyran-2-ol (**87**) [PP 02]⁹³

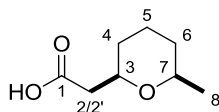
Zu einer Lösung aus 6-Methyl-2H-tetrahydropyran-2-on (**86**) (2.00 g, 17.54 mmol) in absolutem THF (60 mL) bei -78 °C unter Ar-Atmosphäre wurde Diisobutylaluminiumhydrid (21,05 mL, 1.00 M in Hexan) hinzugetropft, und für 4 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Natriumtartratlösung (20 mL) abgebrochen und auf r.t. erwärmt. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit EtOAc (3x 20 mL) extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (2x 20 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch Aufreinigung des Rohproduktes mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc/CH₂Cl₂, 1/1, v/v, R_F= 0.37) wurden die Lactole **87a** und **87b** in einem *anti:syn*-Verhältnis von 1:1.8 als farbloses Öl (2.00 g, quant.) erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): **87a** δ = 1.13 (d, ³J= 6.3 Hz, 3H, H-6a), 1.15 – 1.90 (m, 6H, H-2a, H-3a, H-4a), 2.82 (br s, 1H, OH_{*anti*}), 4.07 – 4.12 (m, 1H, H-5a), 5.30 (br s, 1H, H-1a); **87b** δ =1.22 (d, ³J= 6.2 Hz, 3H, H-6b), 1.15 – 1.90 (m, 6H, H-2b, H-3b, H-4b), 3.39 (br s, 1H, OH_{*syn*}), 3.58 (dq, ³J= 12.5, 6.2 Hz, ⁴J= 2.2 Hz, 1H, H-5b), 4.69 – 4.74 (m, 1H, H-1b).



4.4.1.2 *rac*-*syn*-2-(6-Methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-essigsäure *syn*-(**68**) [PP 07]⁹⁴

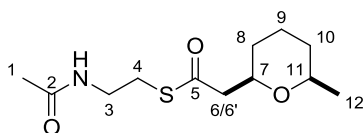
Zu einer Lösung aus Piperidin (0.02 mL, 0.18 mmol) und Essigsäure (0.01 mL, 0.18 mmol) in DMSO (6 mL) wurde Malonsäure (**110**, 1.87 g, 18.00 mmol) gegeben. Danach wurde *rac*-6-Methyltetrahydro-2H-pyran-2-ol (**87**) (1.07 g, 9.00 mmol) hinzugegeben und 30 min bei r.t. gerührt. Im Anschluss wurde 3 h unter Rückfluss erhitzt, und die Reaktion wurde mit Wasser (20 mL) abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde mit EtOAc (3x 10 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen, und über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Aufreinigung mittels Destillation (121 °C, 1.2 mbar) ergab die Säure *syn*-(**68**) (0.96 g, 66%) als farbloses Öl; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.12 (d, ³J= 6.2 Hz, 3H, H-8), 1.23 – 1.28 (m, 2H, H-4*/H-6*), 1.48 – 1.66 (m,

3H, H-4*/H-5*/H-6*), 1.81 – 1.86 (m, 1H, H-4*/H-6*), 2.50 (dd, $^2J= 15.8$ Hz, $^3J= 4.9$ Hz, 1H, H-2*/H-2'*), 2.57 (dd, $^2J= 15.8$ Hz, $^3J= 7.7$ Hz, 1H, H-2*/H-2'*), 3.55 (dq, $^3J= 12.4$, 6.2 Hz, $^4J= 2.0$ Hz, 1H, H-7), 3.70 – 3.84 (m, 1H, H-3). * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.1.3 rac-syn-S-(2-Acetamidoethyl)-2-(6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-ethanthioat syn-(66) [PP 08]

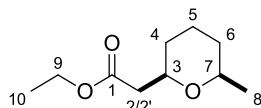
Analog zu AAV 1 wurde EDC-HCl (0.91 g, 4.72 mmol) zu einer Lösung aus der Säure *syn*-**68** (0.62 g, 3.93 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (40 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre hinzugegeben. Nicht entsprechend der AVV 1 wurde kein HOBt hinzugefügt. Nach 30 min wurden *N*-Acetylcysteamin (**108**, 0.50 mL, 4.72 mmol) und katalytische Mengen 4-DMAP hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt und mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (40 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (2x 10 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (10 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung an SiO₂ (EtOAc, R_f= 0.35) ergab den Thioester *syn*-**66** (0.54 g, 53%) als farbloses Öl; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.12 (dd, $^3J= 6.2$ Hz, $^4J= 1.4$ Hz, 3H, H-12), 1.13 – 1.24 (m, 2H, H-8*/H-10*), 1.44 – 1.59 (m, 3H, H-8*/H-9*/H-10*), 1.77 – 1.81 (m, 1H, H-8*/H-10*), 1.94 (s, 3H, H-1), 2.60 (ddd, $^2J= 14.8$ Hz, $^3J= 5.4$ Hz, $^4J= 1.3$ Hz, 1H, H-6*/H-6'*), 2.80 (ddd, $^2J= 14.8$ Hz, $^3J= 7.6$ Hz, $^4J= 1.5$ Hz, 1H, H-6*/H-6'*), 2.96 – 3.07 (m, 2H, H-4), 3.39 – 3.47 (m, 3H, H-3, H-11), 3.75 – 3.81 (m, 1H, H-7), 5.99 (br s, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 22.3 (C-12), 23.4 (C-1), 23.7 (C-9), 28.8 (C-4), 31.2 (C-8*), 33.1 (C-10*), 39.9 (C-3), 51.1 (C-6), 74.4 (C-7*), 74.6 (C-11*), 170.7 (C-2), 198.0 (C-5); HR-MS (ESI, 10 ev, *m/z*): C₁₂H₂₁NO₃SNa 282.1142 [M+Na]⁺; gemessen: 282.1134 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹]: ν_{max}= 986, 1044, 1068, 1231, 1371, 1546, 1651, 1658, 2859, 2932, 3291. * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.1.4 2-syn-(6-Methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)essigsäureethylester *syn*-(70) [PP 50]⁹⁵

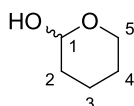
Thionylchlorid (0.08 mL, 1.14 mmol) wurde langsam zu einer Lösung aus der Säure *syn*-**68** (0.15 g, 0.95 mmol) in absolutem Ethanol (2 mL) bei 0 °C unter Argonatmosphäre

hinzugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 min bei 0 °C gerührt und im Anschluss 2 h unter Rückfluss gekocht. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Ester *syn*-**70** (0.14 g, 82%) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.14 (d, ³J= 6.2 Hz, 3H, H-8), 1.25 (t, ³J= 7.1 Hz, 3H, H-10), 1.46 – 1.88 (m, 6H, H-4, H-5, H-6), 2.36 (dd, ³J= 15.0, 6.0 Hz, 1H, H-2*/H-2'*), 2.53 (dd, ³J= 15.0, 7.4 Hz, 1H, H-2*/H-2'*), 3.41 – 3.51 (m, 1H, H-7), 3.73 – 3.80 (m, 1H, H-3), 4.14 (q, ³J= 7.1 Hz, 2H, H-9). * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.1.5 *rac*-Tetrahydro-2H-pyran-2-ol (**90**) [PP 19]⁹⁶

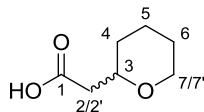
Salzsäure (25 mL, c= 0.2 M) wurde bei 0 °C zu 3,4-Dihydro-2H-pyran (**89**) (10 g, 118,90 mmol) hinzugetropft und für 15 min gerührt. Danach wurde für 1 h bei r.t. gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit CH₂Cl₂ (5x 50 mL) extrahiert, die organische Phase wurde mit wässriger gesättigter NaHCO₃-Lösung (50 mL) und wässriger gesättigter NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das LM wurde unter verminderten Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (SiO₂, EtOAc/ CH, 1.25/1 zu EtOAc, v/v, R_f= 0.35) ergab das Lactol **90** (9.96 g, 82%) als farblose Flüssigkeit; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.41 – 1.50 (m, 4H, H-3, H-4), 1.67 – 1.80 (m, 2H, H-2), 3.41 – 3.49 (m, 1H, H-5), 4.06 (br s, 1H, OH), 4.73 – 4.89 (m, 1H, H-1).



4.4.1.6 *rac*-2-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-essigsäure (**69**) [PP 69]⁹⁴

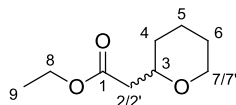
Wie in Abschnitt 4.4.1.2 beschrieben, wurde zu einer Lösung aus Piperidin (0.05 mL, 0.51 mmol) und Essigsäure (0.03 mL, 0.51 mmol) in DMSO (17 mL) wurde Malonsäure (**110**, 5.32 g, 51,12 mmol) gegeben. Danach wurde das Lactol **90** (2.60 g, 25.56 mmol) hinzugegeben und 30 min bei r.t. gerührt. Im Anschluss wurde 3 h unter Rückfluss erhitzt, und die Reaktion wurde mit Wasser (50 mL) abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde mit EtOAc (3x 20 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen, und über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Aufreinigung mittels Destillation (114 °C, 1.2 mbar) ergab die Säure **69** (2.58 g, 70%) als farblosen Feststoff; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.15 – 1.85 (m, 6H, H-4, H-5, H-6), 2.37 (dd, ²J= 15.5 Hz, ³J= 4.9 Hz, 1H, H-

2*/H-2'*), 2.47 ($^2J = 15.5$ Hz, $^3J = 7.8$ Hz, 1H, H-2*/H-2'*), 3.35 – 3.46 (m, 1H, H-7*/H-7'*), 3.62 – 3.71 (m, 1H, H-7*/H-7'*), 3.88 – 3.40 (m, 1H, H-3). * Zuordnung nicht gesichert.



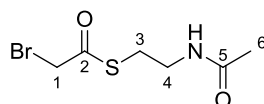
4.4.1.7 rac-2-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-essigsäureethylester (**71**) [PP 69]⁹⁵

Wie in Abschnitt 4.4.1.4 beschrieben wurde Thionylchlorid (0.06 mL, 0.83 mmol) langsam zu einer Lösung aus der Säure **69** (0.10 g, 0.69 mmol) in absolutem Ethanol (1.5 mL) bei 0 °C unter Argonatmosphäre hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 min bei 0 °C gerührt und im Anschluss 2 h unter Rückfluss gekocht. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Ester **71** wurde (0.09 g, 79%) als farblose Flüssigkeit erhalten; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.38$ (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, H-9), 1.45 – 1.80 (m, 6H, H-4, H-5, H-6), 2.31 (dd, $^3J = 15.2$, 6.1 Hz, 1H, H-2*/H-2'*), 2.52 (dd, $^3J = 15.2$, 7.8 Hz, 1H, H-2*/H-2'*), 3.64– 3.68 (m, 1H, H-7*/H-7'*), 3.74 – 3.78 (m, 1H, H-7*/H-7'*), 4.18 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, H-9), 4.21 – 4.26 (m, 1H, H-3). * Zuordnung nicht gesichert.



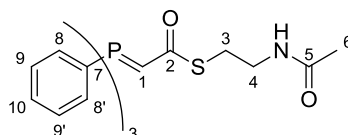
4.4.1.8 S-(2-Acetamidoethyl)-2-bromo-ethanthioat (**114**) [PP 04]^{89b}

Analog zu AAV 1 wurden EDC-HCl (0.84 g, 4.35 mmol) und HOBt (0.59 g, 4.35 mmol) zu einer Lösung aus Bromessigsäure (**113**) (0.50 g, 3.81 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (25 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre hinzugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min gerührt. Anschließend wurden *N*-Acetylcysteamin (**108**, 0.46 mL, 4.35 mmol) und katalytische Mengen 4-DMAP hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt und mit gesättigter wässriger NH_4Cl -Lösung (20 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 (2x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (15 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an SiO_2 (EtOAc, $R_f = 0.36$) aufgereinigt. Es wurde ein farbloser Feststoff **114** (0.58 g, 63%) erhalten; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.98$ (s, 3H, H-6), 3.11 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, H-3), 3.44 – 3.49 (m, 2H, H-4), 4.20 (s, 2H, H-1), 5.87 (br s, 1H, NH).



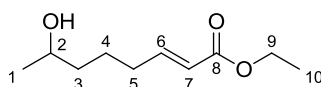
4.4.1.9 S-(2-Acetamidoethyl)-2-(triphenylphosphoranyliden)-ethanthioat (**88**) [PP 06]^{98,99}

Der Thioester **114** (0.55 g, 2.30 mmol) wurde in Toluol (15 mL) vorgelegt und auf 80 °C erhitzt. Sukzessiv wurde Triphenylphosphan (0.60 g, 2.30 mmol) hinzugegeben und über Nacht gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und mit Toluol (3x 5 mL) gewaschen. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde ein gelblicher zähflüssiger Feststoff (0.91 g, 79%) erhalten. Ohne weitere Aufarbeitung wurde das Wittig-Salz (0.75 g, 1.49 mmol) in Wasser (10 mL) gelöst und NaOH (2 mL, $c = 0.5$ M in H₂O) hinzugegeben bis ein pH-Wert von 10 erreicht wurde. Das Gemisch wurde für 10 min gerührt und im Anschluss wurde ein gelblicher Feststoff abfiltriert, mit Wasser (5 mL, pH = 10) und Toluol (2x 5 mL) gewaschen. Der verbliebene Feststoff wurde in Dichlormethan gelöst und das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Ylid wurde als leicht gelblicher Feststoff **88** (0.51 g, 81%) erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.69$ (s, 3H, H-6), 2.97 – 3.00 (m, 2H, H-3), 3.35 – 3.38 (m, 2H, H-4), 3.82 (br s, 1H, H-1), 7.49 – 7.66 (m, 15H, H-8, H-8', H-9, H-9', H-10).



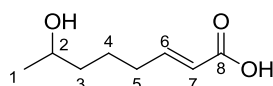
4.4.1.10 (E)-7-Hydroxyoct-2-en-essigsäureethylester (**64**) [PP 10]¹⁰⁰

Ethyl-(triphenylphosphoranyliden)-acetat (**115**) (1.65g, 4.70 mmol) wurde zu dem Lactol **87** (0.50 g, 4.30 mmol) in absolutem Toluol (15 mL) gegeben und unter Rückfluss 6 h erhitzt. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in Et₂O aufgenommen. Nach Zugabe von Petrolether wurde ausgefallenes Triphenylphosphanoxid abfiltriert und die LM wurden unter vermindertem Druck abdestilliert. Säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes an SiO₂ (EtOAc/CH₂Cl₂, 1/1, v/v, R_f = 0.46) ergab den Ester **64** (0.69 g, 86%) als farblose Flüssigkeit; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.18$ (d, ³J = 6.2 Hz, 3H, H-1), 1.27 (t, ³J = 7.2 Hz, 3H, H-10), 1.42 – 1.61 (m, 4H, H-3, H-4), 2.19 – 2.24 (m, 2H, H-5), 3.76 – 3.86 (m, 1H, H-2), 4.17 (q, ³J = 7.2 Hz, 2H, H-9), 5.81 (dt, ³J = 15.6 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H-7), 6.94 (dt, ³J = 15.6 Hz, ³J = 6.9 Hz, 1H, H-6).

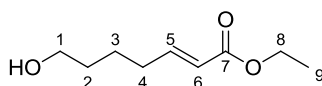


4.4.1.11 (E)-7-Hydroxyoct-2-en-säure (62) [PP 11]¹⁰¹

Analog zu AAV 2 wurde LiOH (0.98 g, 40.72 mmol) zu einer Lösung aus dem Ester **64** (0.30 g, 1.61 mmol) in THF/ MeOH/ H₂O (2/2/1, v/v/v, 55 mL) hinzugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen der organischen LM unter vermindertem Druck wurde die wässrige Phase mit EtOAc (15 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit NaHSO₄ (c= 0.1 M in H₂O) auf pH= 2 angesäuert und mit EtOAc (2x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde unter vermindertem Druck und säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes an SiO₂ (EtOAc + 1 Vol% AcOH, R_f= 0.22) ergab die Säure **62** (0.17 g, 67%) als farblosen Feststoff; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.20 (dd, ³J= 6.2 Hz, ⁴J= 2.1 Hz, 3H, H-1), 1.47 - 1.52 (m, 4H, H-3, H-4), 2.26 (dtd, ³J= 6.9 Hz, ³J= 6.8 Hz, ⁴J= 1.4 Hz, 2H, H-5), 3.78 – 3.86 (m, 1H, H-2), 5.84 (dt, ³J= 15.6 Hz, ⁴J= 1.4 Hz, 1H, H-7), 7.07 (dt, ³J= 15.6 Hz, ³J= 6.9 Hz, 1H, H-6).

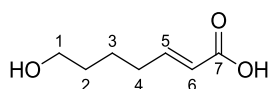
**4.4.1.12 (E)-7-Hydroxyhept-2-en-essigsäureethylester (65) [PP 49]¹⁰⁰**

Wie in Abschnitt 4.4.1.10 beschrieben, wurde Ethyl-(triphenylphosphoranylidene)-acetat (**115**) (3.25 g, 9.32 mmol) wurde zu dem Lactol **90** (1.00 g, 8.47 mmol) in absolutem Benzol (30 mL) gegeben und unter Rückfluss 6 h erhitzt. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in Et₂O aufgenommen. Nach Zugabe von Petrolether wurde ausgefallenes Triphenylphosphanoxid abfiltriert und die LM wurden unter vermindertem Druck abdestilliert. Säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes an SiO₂ (EtOAc/CH, 1/1, v/v, R_f= 0.46) ergab den Ester **65** (1.31 g, 90%) als farblose Flüssigkeit; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.24 (t, ³J= 7.1 Hz, 3H, H-9), 1.50 – 1.58 (m, 4H, H-2, H-3), 2.18 – 2.21 (m, 2H, H-4), 3.57 – 3.61 (m, 2H, H-1), 4.13 (q, ³J= 7.1 Hz, 2H, H-8), 5.78 (dt, ³J= 15.6 Hz, ⁴J= 1.5 Hz, 1H, H-6), 6.92 (dt, ³J= 15.6 Hz, ³J= 6.9 Hz, 1H, H-5).

**4.4.1.13 (E)-7-Hydroxyhept-2-en-essigsäure (63) [PP 51]**

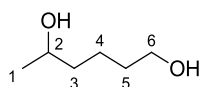
Analog zu AAV 2 wurde LiOH (1.60 g, 67.10 mmol) zu einer Lösung aus dem Ester **65** (0.50 g, 2.70 mmol) in THF/ MeOH/ H₂O (2/2/1, v/v/v, 100 mL) hinzugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen der organischen

LM unter vermindertem Druck wurde die wässrige Phase mit EtOAc (30 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit NaHSO₄ (c= 0.1 M in H₂O) auf pH= 2 angesäuert und mit EtOAc (2x 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes an SiO₂ (EtOAc/ *c*-Hexan, 1/3 + 1 Vol% AcOH, R_f= 0.10) ergab die Säure **63** (0.12 g, 32%) als farblosen Feststoff; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.52 – 1.62 (m, 4H, H-2, H-3), 2.25 – 2.32 (m, 2H, H-4), 3.65 – 3.69 (m, 2H, H-1), 5.83 (dt, ³J= 15.6 Hz, ⁴J= 1.6 Hz, H-6), 7.07 (dt, ³J= 15.6, 6.9 Hz, H-5).



4.4.1.14 *rac*-Hexan-1,5-diol (**91**) [PP 20]^{96a,104}

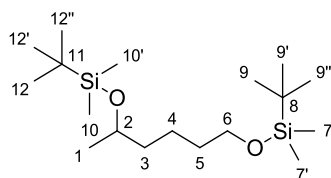
Das Lactol **90** (1.00 g, 9.79 mmol) in absolutem THF (10 mL) wurde zu Methylmagnesiumbromid (29,40 mL, 29.37 mmol, 1 M in THF) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre hinzuge tropft und über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktion wurde mit wässriger gesättigter NH₄Cl-Lösung (10 mL) abgebrochen, die wässrige Phase wurde mit EtOAc (2x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wässriger gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurden die LM unter verminderten Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes (SiO₂, EtOAc/ CH, 4/1, v/v, R_f= 0.35) ergab das Diol **91** (0.83 g, 72%) als farblose Flüssigkeit; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.19 (d, ³J= 6.2 Hz, 3H, H-1), 1.38 – 1.63 (m, 6H, H-3, H-4, H-5), 1.72 (br s, 1H, OH_{C-2}), 1.82 (br s, 1H, OH_{C-6}), 3.65 (t, ³J= 6.4 Hz, 2H, H-6), 3.77 – 3.84 (m, 1H, H-2).



4.4.1.15 *rac*-1,5-Bis[*tert*-butyldimethylsilyloxy]-hexan (**92**) [PP 21]¹⁰⁵

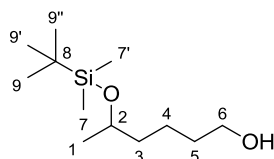
Imidazol (1.50 g, 21.90 mmol) wurde zu einer Lösung aus dem Diol **91** (0.52 g, 4.38 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre hinzugegeben und 10 min gerührt. *tert*-Butyldimethylsilylether (1.99 g, 13.14 mmol) und katalytische Mengen an 4-DMAP wurden hinzugegeben und die Reaktion wurde bei r.t. über Nacht gerührt. Nach Zugabe von H₂O (5 mL) wurde die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wässriger gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO₂,

EtOAc/ *c*-Hexan, 1/9, *v/v*, $R_f = 0.64$) wurde das *Bis*-TBS geschütztes Produkt **92** (1.52 g, quant.) als farbloses Öl erhalten; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.04$ (s, 12 H, H-7, H-7', H-10, H-10'), 0.88 (s, 9H, H-9*, H-9'', H-9'''/H-12*, H-12'', H-12'''), 0.89 (s, 9H, H-9*, H-9'', H-9'''/H-12*, H-12'', H-12'''), 1.11 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 3H, H-1), 1.26 – 1.53 (m, 6H, H-3, H-4, H-5), 3.60 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, H-6), 3.72 – 3.82 (m, 1H, H-2). * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.1.16 *rac*-5-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)hexan-1-ol (**93**) [PP 22]¹⁰⁶

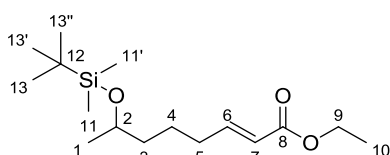
HF (0.25 mL, 65-70% HF in Pyridin) wurde zu einer Lösung aus dem geschützten Diol **92** (1.00 g, 2.88 mmol) in absolutem THF (9 mL) und Pyridin (1.53 mL, 18.96 mmol) gegeben. Nach dem Rühren über Nacht bei r.t. wurde das Reaktionsgemisch mit Et_2O (15 mL) verdünnt und mit HCl (10 mL, $c = 0.5$ M) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Et_2O (2 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wässriger gesättigter Kupfersulfatlösung (10 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (SiO_2 , CH/ EtOAc, 3/1, *v/v*, $R_f = 0.28$) ergab das einfach geschützte Diol **93** (0.46 g, 68%) als farblose Flüssigkeit; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 0.04$ (s, 6H, H-7, H-7'), 0.88 (s, 9H, H-9, H-9', H-9''), 1.11 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 3H, H-1), 1.36 – 1.46 (m, 4H, H-3*/H-4*/H-5*), 1.54 – 1.58 (m, 2H, H-3*/H-4*/H-5*), 3.63 (t, $^3J = 6.6$ Hz, 2H, H-6), 3.75 – 3.82 (m, 1H, H-2). * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.1.17 *rac*-(*E*)-7-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]oct-2-en-essigsäureethylester (**94**) [PP 27]¹⁰⁷

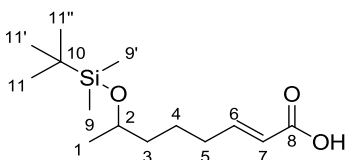
Oxalylchlorid (0.31 mL, 3.62 mmol) wurde langsam zu einer Lösung aus DMSO (0.39 mL, 5.43 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (5 mL) bei -78 °C unter Ar-Atmosphäre hinzugegeben. Nach 15 min wurde der Alkohol **93** (0.42 g, 1.81 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (0.40 mL) hinzugefügt, und das Reaktionsgemisch wurde für 1 h bei -78 °C gerührt. Triethylamin wurde (1.05 mL, 7.24 mmol) hinzugegeben und auf r.t. erwärmt. Nach Zugabe von Ethoxycarbonylmethylen-triphenylphosphoran (**115**) (1.26 g,

3.62 mmol) wurde die Reaktionslösung über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite® 545 filtriert, und der Filterkuchen wurde mit EtOAc/ *c*-Hexan (20 mL, 1/9, *v/v*) gewaschen. Die LM der vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck entfernt, und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc/ *c*-Hexan, 1/9, *v/v*, R_f = 0.36) aufgereinigt. Erhalten wurde der Ethylester **94** (0.44 g, 81%) als gelbliches Öl; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.04 (s, 6H, H-11, H-11'), 0.88 (s, 9H, H-13, H-13', H-13''), 1.11 (d, ³J = 6.1 Hz, 3H, H-1), 1.28 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H, H-10), 1.37 – 1.56 (m, 4H, H-3, H-4), 2.16 – 2.22 (m, 2H, H-5), 3.75 – 3.82 (m, 1H, H-2), 4.18 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H, H-9), 5.81 (d, ³J = 15.6 Hz, 1H, H-7), 6.95 (dt, ³J = 15.6, 6.9 Hz, 1H, H-6); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = -4.4 (C-11, C-11'), 14.4 (C-10), 18.3 (C-12), 24.0 (C-1), 24.3 (C-4), 26.0 (C-13), 32.4 (C-5), 39.2 (C-3), 60.3 (C-9), 68.4 (C-2), 121.5 (C-7), 149.3 (C-6), 166.9 (C-8); HR-MS (ESI, 10 ev, *m/z*): C₁₆H₃₂O₃SiNa 323.2013 [M+Na]⁺; gemessen: 323.2010 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹]: ν_{max} = 984, 1042, 1165, 1255, 1462, 1654, 1721, 2857, 2930.



4.4.1.18 *rac*-(*E*)-7-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]oct-2-en-säure (**95**) [PP 29]¹⁰¹

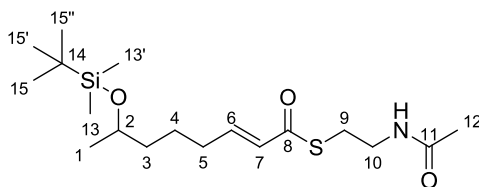
Analog zu AAV 2 wurde LiOH (0.64 g, 26.80 mmol) zu einer Lösung aus dem Ester **94** (0.32 g, 1.06 mmol) in THF/ MeOH/ H₂O (2/2/1, *v/v/v*, 58 mL) hinzugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen der organischen LM unter vermindertem Druck wurde die wässrige Phase mit EtOAc (20 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit NaHSO₄ (c = 0.1 M in H₂O) auf pH = 2 angesäuert und mit EtOAc (2x 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde unter vermindertem Druck und säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes an SiO₂ (EtOAc/ *c*-Hexan, 1/3 + 1 Vol% AcOH, R_f = 0.25) ergab die Säure **95** (0.54 g, 79%) als farblosen Feststoff; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 0.04 (s, 6H, H-9, H-9'), 0.88 (s, 9H, H-11, H-11', H-11''), 1.12 (d, ³J = 6.1 Hz, 3H, H-1), 1.37 – 1.62 (m, 4H, H-3, H-4), 2.20 – 2.26 (m, 2H, H-5), 3.76 – 3.83 (m, 1H, H-2), 5.83 (dt, ³J = 15.6 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, H-7), 7.08 (dt, ³J = 15.6, 6.9 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = -4.4 (C-9, C-9'), 18.3 (C-10), 24.0 (C-1), 24.2 (C-4), 26.0 (C-11, C-11', C-11''), 32.5 (C-5), 39.2 (C-3), 68.4 (C-2), 120.8 (C-7), 152.3 (C-6), 171.8 (C-8); HR-MS (ESI, 10 ev, *m/z*): C₁₄H₂₇O₃Si 271.1735 [M+H]⁺; gemessen: 271.1733 [M+H]⁺; IR [cm⁻¹]: ν_{max} = 938, 1052, 1136, 1253, 1374, 1462, 1652, 1704, 2857, 2929.



4.4.1.19 *rac*-(*E*)-*S*-(2-Acetamidoethyl)-7-[(*tert*-butyl(dimethyl)silyloxy)oct-2-enthioat (**96**) [PP 30]

Analog zu AAV 1 wurden EDC-HCl (0.27 g, 1.38 mmol) und HOBt (0.19 g, 1.38 mmol) zu einer Lösung aus der Säure **95** (0.31 g, 1.15 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (10 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre hinzugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min gerührt. Anschließend wurden *N*-Acetylcysteamin (**108**, 0.15 mL, 1.15 mmol) und katalytische Mengen 4-DMAP hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt und mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (10 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (2x 10 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (10 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an SiO₂ (EtOAc, R_f = 0.40) aufgereinigt. Es wurde ein gelblich viskoses Öl **96** (0.45 g, 53%) erhalten; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.04 (s, 6H, H-13, H-13'), 0.88 (s, 9H, H-15, H-15', H-15''), 1.12 (d, ³J = 6.0 Hz, 3H, H-1), 1.38 – 1.58 (m, 4H, H-3, H-4), 1.96 (s, 3H, H-12), 2.18 – 2.23 (m, 2H, H-5), 3.09 (t, ³J = 6.4 Hz, 2H, H-9), 3.40 – 3.48 (m, 2H, H-10), 3.75 – 3.82 (m, 1H, H-2), 5.97 (br s, 1H, NH), 6.12 (d, ³J = 15.5 Hz, 1H, H-7), 6.92 (dt, ³J = 15.5, 6.9 Hz, 1H, H-6); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = - 4.1 (C-13, C-13'), 18.6 (C-14), 23.7 (C-1*), 24.3 (C-12*), 24.5 (C-4), 26.4 (C-15, C-15', C-15''), 28.7 (C-9), 32.7 (C-5), 39.5 (C-3), 40.7 (C-10), 68.7 (C-2), 128.8 (C-7), 147.0 (C-6), 170.9 (C-11), 190.9 (C-8); HR-MS (ESI, 10 ev, *m/z*): C₁₈H₃₆NO₃SSi 374.2180 [M+H]⁺; gemessen: 374.2178 [M+H]⁺; IR [cm⁻¹]: ν_{max} = 1004, 1095, 1287, 1373, 1462, 1548, 1655, 2856, 2929, 3292.

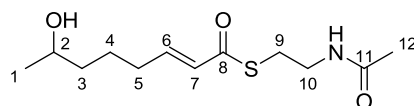
* Zuordnung nicht gesichert.



4.4.1.20 *rac*-(*E*)-*S*-(2-Acetamidoethyl)-7-hydroxyoct-2-enthioat (**60**) [PP 33]¹⁰⁹

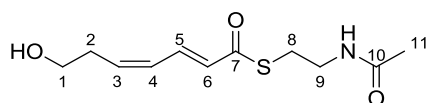
Analog zu AVV3 wurde eine Lösung aus HF (1.31 mL, *c* = 2.65 M, 65-70% HF in Pyridin), Pyridin (4.59 mL) und absolutem THF (13.10 mL) angesetzt und zu dem Thioester **96** (0.15 g, 0.50 mmol) in absolutem THF (2 mL) bei r.t. unter Ar-Atmosphäre getropft. Nach 6 h Rühren wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (30 mL) verdünnt, und mit wässriger

gesättigter NH_4Cl -Lösung (15 mL), HCl (15 mL, $c= 1.2 \text{ M}$), wässriger gesättigter NaHCO_3 -Lösung (15 mL) und wässriger gesättigter NaCl -Lösung (15 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und die LM wurden unter vermindertem Druck entfernt. Der entsprechende Alkohol **60** (0.09 g, 67%) wurde als gelbliches Öl erhalten und ohne weitere Aufarbeitung verwendet; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 1.20$ (dd, $^3J= 6.2 \text{ Hz}$, $^4J= 1.1 \text{ Hz}$, 3H, H-1), 1.40 – 1.50 (m, 4H, H-3, H-4), 1.94 (s, 3H, H-12), 2.13 – 2.23 (m, 3H, H-5, OH), 3.06 (t, $^3J= 6.4 \text{ Hz}$, 2H, H-9), 3.38 – 3.45 (m, 2H, H-10), 3.73 – 3.83 (m, 1H, H-2), 6.08 – 6.14 (m, 2H, H-7, NH), 6.90 (dt, $^3J= 15.5$, 6.9 Hz, H-6); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 23.3$ (C-12*), 23.7 (C-1*), 24.2 (H-4), 28.3 (C-9), 32.2 (C-5), 38.7 (C-3), 39.9 (C-10), 67.7 (C-2), 128.6 (C-6), 146.3 (C-7), 170.6 (C-11), 190.5 (C-8); HR-MS (ESI, 10 ev, m/z): $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{SNa}$ 282.1134 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 282.1139 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR [cm^{-1}]: $\nu_{\text{max}}= 1043, 1239, 1286, 1372, 1548, 1631, 1640, 2930, 2965, 3289$.



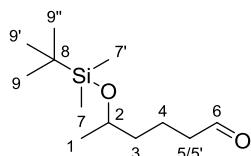
4.4.1.21 (2E,4Z)-S-(2-Acetamidoethyl)-7-hydroxyhepta-2,4-dienthioat (**72**) [PP 66]¹⁰⁹

Analog zu AVV 3 wurde HF (2.60 mL, 65-70% HF in Pyridin) zu einer Lösung aus (2E,4Z)-S-(2-Acetamidoethyl)-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-hepta-2,4-dien-thioat (**120**)⁸³ (0.31 g, 0.87 mmol) in absolutem THF (26 mL) und Pyridin (9.20 mL) bei r.t. unter Ar-Atmosphäre gegeben. Nach 6 h Rühren wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (50 mL) verdünnt, und mit wässriger gesättigter NH_4Cl -Lösung (30 mL), HCl (30 mL, $c= 1.2 \text{ M}$), wässriger gesättigter NaHCO_3 -Lösung (30 mL) und wässriger gesättigter NaCl -Lösung (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und die LM wurden unter vermindertem Druck entfernt. Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc, $R_f= 0.52$) ergab den Thioester **72** (0.09 g, 24%) als wachsartigen, weißen Feststoff; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta= 1.97$ (s, 3H, H-11), 2.00 (br s, 1H, OH), 2.55 – 2.63 (m, 2H, H-2), 3.11 (t, $^3J= 6.3 \text{ Hz}$, 2H, H-8), 3.42 – 3.50 (m, 2H, H-9), 3.73 (t, $^3J= 6.4 \text{ Hz}$, 2H, H-2), 5.97 – 6.27 (m, 4H, H-3, H-4, H-6, NH), 7.55 (ddd, $^3J= 15.1 \text{ Hz}$, $^3J= 11.6 \text{ Hz}$, $^5J= 0.9 \text{ Hz}$, 1H, H-5).



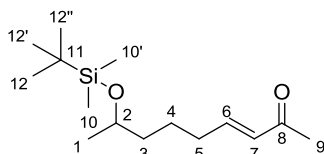
4.4.1.22 5-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-hexanal (**121**) [PP 75]¹¹⁵

Zu einer Lösung aus Alkohol **93** (2.97 g, 12.78 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (41 mL) wurde bei r.t. unter Ar-Atmosphäre Pyridiniumchlorochromat (4.14 g, 19.17 mmol) hinzugegeben und für 3 h bei r.t. gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde abfiltriert und mit Et₂O (3x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Silica filtriert. Die LM wurden unter vermindertem Druck entfernt, und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc, R_f= 0.78) aufgereinigt. Erhalten wurde der Aldehyd **121** (1.65 g, 92%) als farblose Flüssigkeit; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.04 (s, 6H, H-7, H7'), 0.88 (s, 9H, H-9, H-9', H-9''), 1.13 (d, ³J= 6.1 Hz, 3H, H-1), 1.40 – 1.47 (m, 2H, H-4), 1.59 – 1.74 (m, 2H, H-3), 2.43 (ddd, ³J= 7.3 Hz, ⁴J= 1.8 Hz, ⁴J= 1.8 Hz, 2 H, H-5/H-5'), 3.77 – 3.85 (m, 1H, H-2), 9.76 (dd, ³J= 1.8 Hz, ³J= 1.8 Hz, 1H, H-6).



4.4.1.23 (*E*)-8-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)non-3-en-2-on (**123**) [PP 76]¹¹⁵

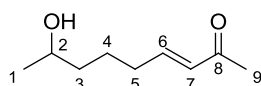
Zu einer Lösung aus dem Aldehyd **121** (0.50 g, 2.17 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (8 mL) wurde bei 0 °C 1-(Triphenylphosphoranyliden)-2-propanon (**122**) (0.69 g, 2.17 mmol) hinzugefügt. Die Reaktion wurde auf r.t. erwärmt und ü/N gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (SiO₂, EtOAc/*c*-Hexan, 1/19, R_f= 0.13) ergab das Keton **123** (0.42 g, 72%) als gelbliche Flüssigkeit; δ= 0.04 (s, 6H, H-10, H-10'), 0.88 (s, 9H, H-12, H-12', H-12''), 1.12 (d, ³J= 6.1 Hz, 3H, H-1), 1.30 – 1.67 (m, 5H, H-3*/H-4*/H-5*), 2.17 – 2.23 (m, 1H, H-3*/H-4*/H-5*), 2.24 (s, 3H, H-9), 3.72 – 3.87 (m, 1H, H-2), 6.06 (dt, ³J= 15.9 Hz, ⁴J= 1.5 Hz, 1H, H-7), 6.79 (dt, ³J= 15.9 Hz, ³J= 6.8 Hz, 1H, H-6); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = - 4.4 (C-10, C-10'), 18.1 (C-11), 23.8 (C-1), 24.2 (C-4), 25.9 (C-15, C-15', C-15''), 26.8 (C-9), 32.5 (C-5), 39.1 (C-3), 68.2 (C-2), 131.4 (C-7), 148.3 (C-6), 198.7 (C-8); HR-MS (ESI, 10 ev, *m/z*): C₁₅H₃₀O₂SiNa 293.1907 [M+Na]⁺; gemessen: 293.1910 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹]: ν_{max}= 980, 1094, 1217, 1463, 1472, 1627, 1700, 1736, 2342, 2360, 2857, 2928, 2954.



4.4.1.24 (*E*)-8-Hydroxynon-3-en-2-on (**73**) [PP 80]

Analog zu AVV3 wurde HF (1.69 mL, *c*= 2.65 M, 65-70% HF in Pyridin) zu dem geschützten Keton **123** (0.15 g, 0.55 mmol) in absolutem THF (17 mL) und Pyridin

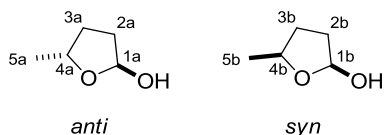
(6.00 mL) bei r.t. unter Ar-Atmosphäre gegeben. Nach 6 h Rühren wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (30 mL) verdünnt, und mit wässriger gesättigter NH_4Cl -Lösung (15 mL), HCl (15 mL, $c = 1.2 \text{ M}$), wässriger gesättigter NaHCO_3 -Lösung (15 mL) und wässriger gesättigter NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und die LM wurden unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes an SiO_2 (EtOAc/CH, 1/1, v/v, $R_f = 0.33$) ergab den Alkohol **73** (0.07 g, 79%) als gelbliches Öl; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 1.20$ (d, $^3J = 6.2 \text{ Hz}$, 3H, H-1), 1.40 – 1.69 (m, 6H, H-3, H-4, H-5), 2.23 (s, 3H, H-9), 3.81 (ddq, $^3J = 6.0 \text{ Hz}$, $^3J = 6.2 \text{ Hz}$, $^3J = 6.2 \text{ Hz}$, 1H, H-2), 6.08 (dt, $^3J = 15.6 \text{ Hz}$, $^4J = 1.6 \text{ Hz}$, H-7), 6.79 (dt, $^3J = 15.6$, 6.9 Hz, H-6); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 23.6$ (C-1), 24.2 (C-9), 26.9 (H-4), 32.3 (C-5), 38.6 (C-3), 67.8 (C-2), 131.5 (C-7), 148.0 (C-6), 198.6 (C-8); HR-MS (ESI, 10 ev, m/z): $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_2\text{Na}$ 179.1043 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 179.1047 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR [cm^{-1}]: $\nu_{\text{max}} = 962, 1016, 1045, 1148, 1203, 1259, 1278, 1356, 1371, 1442, 1713, 2361, 2855, 2929$.



4.4.2 Furan- und ϵ -Hydroxy-abgeleitete Testsubstrate zur Analyse der PS Substratspezifität

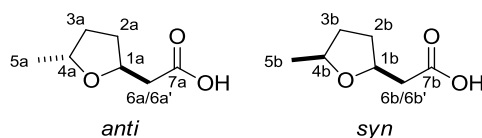
4.4.2.1 *rac*-5-Methyltetrahydro-2H-furan-2-ol (**125**) [PP 39]⁹³

Wie in Abschnitt 4.4.1.1 beschrieben, wurde zu einer Lösung zu γ -Valerolacton (**124**) (1.00 g, 9.99 mmol) in absolutem THF (30 mL) bei $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Ar-Atmosphäre wurde Diisobutylaluminiumhydrid (10.90 mL, 1.10 M in Cyclohexan) hinzugegeben, und für 4 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Natriumtartrat-Lösung (15 mL) abgebrochen und auf r.t. erwärmt. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit EtOAc (3x 10 mL) extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (2x 10 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch Aufreinigung des Rohproduktes mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/CH, 1/1, v/v, $R_f = 0.42$) wurden die Lactole **125a** und **125b** in einem *anti:syn*-Verhältnis von 1:1.4 als farblose Flüssigkeit (0.80 g, 78%) erhalten; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): **125a**: $\delta = 1.17$ (d, $^3J = 6.2 \text{ Hz}$, 3H, H-5a), 1.35 – 2.16 (m, 4H, H-2a, H-3a), 4.25 – 4.35 (m, 1H, H-4a), 5.51 (br s, 1H, H-1a); **125b**: $\delta = 1.30$ (d, $^3J = 6.2 \text{ Hz}$, 3H, H-5b), 1.35 – 2.16 (m, 4H, H-2b, H-3b), 4.03 – 4.12 (m, 1H, H-4b), 5.42 (br s, 1H, H-1b).



4.4.2.2 2-(rac-5-Methyltetrahydrofuran-2-yl)-essigsäure (**82**) [PP 40]⁹⁴

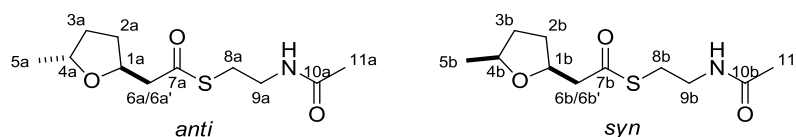
Wie in Abschnitt 4.4.1.2 beschrieben, wurde zu einer Lösung aus Piperidin (0.11 mL, 0.11 mmol) und Essigsäure (0.06 mL, 0.11 mmol) in DMSO (4 mL) Malonsäure (**110**, 1.18 g, 11.36 mmol) gegeben. Danach wurde das Lactol **125** (0.58 g, 5.68 mmol) hinzugegeben und 30 min bei r.t gerührt. Im Anschluss wurde 3 h unter Rückfluss erhitzt, und die Reaktion wurde mit Wasser (15 mL) abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde mit EtOAc (3x 10 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen, und über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung ergab die Säuren **82a** und **82b** in einem *anti:syn*-Verhältnis von 1:1.3 (0.43 g, 52%) als farbloses Öl; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): **82a**: δ=1.23 (d, ³J= 6.1 Hz, 3H, H-5b), 1.46 – 1.56 (m, 2H, H-2b*/H-3b*), 1.97 – 2.22 (m, 2H, H-2b'*/H-3b'*), 2.48 – 2.67 (m, 2H, H-6b, H-6b'), 4.12 – 4.18 (m, 1H, H-4b), 4.38 – 4.45 (m, 1H, H-1b); **82b**: 1.25 (d, ³J= 6.1 Hz, 3H, H-5a), 1.58 – 1.68 (m, 2H, H-2a*/H-3a*), 1.97 – 2.22 (m, 2H, H-2a'*/H-3a'*), 2.48 – 2.67 (m, 2H, H-6a, H-6a'), 3.99 – 4.07 (m, 1H, H-4a), 4.20 – 4.27 (m, 1H, H-1a). * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.2.3 S-(2-Acetamidoethyl)-2-(rac-5-methyltetrahydrofuran-2-yl)-ethanthioat (**80**) [PP 43]

EDC-HCl (0.45 g, 2.26 mmol) wurde zu einer Lösung aus der Säure **82** (0.27 g, 1.89 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (20 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre hinzugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min gerührt. Anschließend wurden *N*-Acetylcysteamin (**108**, 0.25 mL, 1.89 mmol) und katalytische Mengen 4-DMAP hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt und mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (15 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (2x 15 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (15 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an SiO₂ (EtOAc, R_f= 0.21) aufgereinigt. Es wurde eine farblose Flüssigkeit (0.34 g, 73%) aus den Thioestern **80a** und **80b** mit einem dr von *anti:syn* = 1:1 erhalten. Die Trennung erfolgte mittels HPLC (Knauer, Eurospher II

100-5, C18, 250 × 16 mm + Vorsäule 30 × 16 mm, Flussrate: 16.0 mL/min, mobile Phase: 20% CH₃CN/H₂O; λ = 230 nm, **80a**: *r*_t = 15.50 min, **80b**: *r*_t = 17.05 min); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) **80a**: δ = 1.19 (d, ³*J* = 6.1 Hz, 3H, H-5a), 1.40 – 1.66 (m, 2H, H-2a*/H-3a*), 1.94 (s, 3H, H-11a), 1.99 – 2.17 (m, 2H, H-2a*/H-3a*), 2.66 (dd, ²*J* = 14.5 Hz, ³*J* = 5.6 Hz, 1H, H-6a*/H-6a**), 2.83 (dd, ²*J* = 14.5 Hz, ³*J* = 7.6 Hz, 1H, H-6a*/H-6a**), 3.01 – 3.06 (m, 2H, H-8a), 3.38 – 3.45 (m, 2H, H-9a), 4.06 – 4.16 (m, 1H, H-4a), 4.37 – 4.46 (m, 1H, H-1a), 6.00 (br s, 1H, NH); **80b**: δ = 1.21 (d, ³*J* = 6.1 Hz, 3H, H-5b), 1.40 – 1.67 (m, 2H, H-2b*/H-3b*), 1.94 (s, 3H, H-11b), 1.99 – 2.15 (m, 2H, H-2b*/H-3b*), 2.70 (dd, ²*J* = 14.6 Hz, ³*J* = 5.8 Hz, 1H, H-6b*/H-6b**), 2.85 (dd, ²*J* = 14.6 Hz, ³*J* = 7.3 Hz, 1H, H-6b*/H-6b**), 3.00 – 3.06 (m, 2H, H-8b), 3.38 – 3.45 (m, 2H, H-9b), 3.91 – 4.02 (m, 1H, H-4b), 4.20 – 4.28 (m, 1H, H-1b), 6.01 (br s, 1H, NH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) **80a**: δ = 21.3 (C-5a), 23.3 (C-11a), 28.7 (C-8a), 32.1 (C-2a*), 33.5 (C-3a*), 39.6 (C-9a), 50.4 (C-6a), 75.20 (C-1a*), 75.21 (C-4a*), 170.5 (C-10a), 197.7 (C-7a); **80b**: δ = 21.5 (C-5b), 23.3 (C-11b), 28.7 (C-8b), 31.3 (C-2b*), 32.6 (C-3b*), 39.6 (C-9b), 50.7 (C-6b), 75.6 (C-1b*), 76.0 (C-4b*), 170.5 (C-10b), 197.6 (C-7b); HR-MS (ESI, 10 ev, *m/z*): C₁₁H₁₉NO₃SNa 268.0978 [M+Na]⁺; gemessen: **80a**: 268.0973 [M+Na]⁺; **80b**: 268.0980; IR [cm⁻¹]: **80a**: *v*_{max} = 416, 669, 880, 915, 1194, 1235, 1284, 1442, 2343, 2361, 2870, 2931, 3292; **80b**: *v*_{max} = 422, 681, 903, 1197, 1236, 1285, 1440, 2872, 2969, 3294. * Zuordnung nicht gesichert.



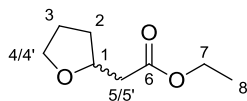
4.4.2.4 S-(2-Acetamidoethyl)-2-(rac-5-methyltetrahydrofuran-2-yl)-essigsäureethylester (**84**) [PP 42]

Wie in Abschnitt 4.4.1.4 beschrieben wurde Thionylchlorid (0.10 mL, 1.33 mmol) langsam zu einer Lösung aus der Säure **82** (0.16 g, 1.11 mmol) in absolutem Ethanol (3 mL) bei 0 °C unter Argonatmosphäre hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 min bei 0 °C gerührt und im Anschluss 2 h unter Rückfluss gekocht. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Ethylester wurde **84** (0.16 g, 85%) mit einem *anti:syn* = 1:1 als farblose Flüssigkeit erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): **84a**: δ = 1.22 (d, ³*J* = 7.1 Hz, 3H, H-5a), 1.24 (t, ³*J* = 7.1 Hz, 3H, H-8a), 1.46 – 1.58 (m, 2H, H-2a*/H-3a*), 1.97 – 2.23 (m, 2H, H-2a*/H-3a*), 2.45 – 2.65 (m, 2H, H-6a*/H-6a**), 4.14 – 4.23 (m, 3H, H-4a, H-8a), 4.38 – 4.46 (m, 1H, H-1a); **84b**: δ = 1.25 (d, ³*J* = 6.1 Hz, 3H, H-5b), 1.27 (t, ³*J* = 7.1 Hz, 3H, H-8), 1.46 – 1.58 (m, 2H, H-2b*/H-3b*), 1.97 – 2.23 (m, 2H, H-2b*/H-3b*), 2.45 – 2.65 (m, 2H, H-6b*/H-6b**), 4.00 – 4.05 (m, 3H, H-4b, H-8b), 4.19 – 4.27 (m, 1H, H-1b). * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.2.5 S-(2-Acetamidoethyl)-2-(tetrahydrofuran-2-yl)-essigsäureethylester (**85**) [PP 73]

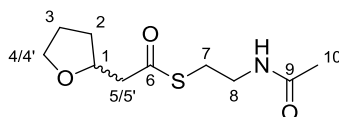
Wie in Abschnitt 4.4.1.4 beschrieben wurde Thionylchlorid (0.06 mL, 0.83 mmol) langsam zu einer Lösung aus Tetrahydro-2-furanylessigsäure **83** (0.10 g, 0.69 mmol) in absolutem Ethanol (1.5 mL) bei 0 °C unter Argonatmosphäre hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 min bei 0 °C gerührt und im Anschluss 2 h unter Rückfluss gekocht. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Ester **85** wurde (0.09 g, 79%) als farblose Flüssigkeit erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.25 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H, H-8), 1.49 – 1.60 (m, 1H, H-2*, H-3*), 1.83 – 1.95 (m, 2H, H-2*/H-3*), 2.01 – 2.13 (m, 1H, H-2*/H-3*), 2.44 (dd, ²J = 14.8 Hz, ³J = 6.0 Hz, 1H, H-5*/H-5**), 2.57 (dd, ²J = 14.8 Hz, ³J = 7.2 Hz, 1H, H-5*/H-5**), 3.73 (m, 1H, H-4*/H-4**), 3.78 – 3.95 (m, 1H, H-4*/H-4**), 4.14 (q, ³J = 7.1 Hz, 2H, H-7), 4.19 – 4.28 (m, 1H, H-1). * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.2.6 S-(2-Acetamidoethyl)-2-(tetrahydrofuran-2-yl)-ethanthioat (**81**) [PP 57]

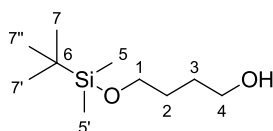
Analog zu AVV 1 wurden EDC-HCl (0.05 g, 0.37 mmol) und HOBt (0.05 g, 0.37 mmol) zu einer Lösung aus der Säure **83** (0.04 g, 0.31 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (2 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre hinzugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min gerührt. Anschließend wurden N-Acetylcysteamin (**108**, 0.39 mL, 0.37 mmol) und katalytische Mengen 4-DMAP hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt und mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (2 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (2x 2 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (2 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an SiO₂ (EtOAc, R_f = 0.24) aufgereinigt. Erhalten wurde eine farblose Flüssigkeit des Thioesters **81** (0.06 g, 69%); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.50 – 1.59 (m, 1H, H-2*/H-3*), 1.80 – 1.95 (m, 2H, H-2*/H-3*), 1.97 (s, 3H, H-10), 2.02 – 2.10 (m, 1H, H-2*/H-3*), 2.70 (dd, ²J = 14.6 Hz, ³J = 5.1 Hz, 1H, H-5*/H-5**), 2.81 (²J = 14.6 Hz, ³J = 7.9 Hz, 1H, H-5*/H-5**), 2.98 – 3.09 (m, 2H, H-7), 3.41 – 3.45 (m, 2H, H-8), 3.70 – 3.76 (m, 1H, H-4*/H-4**), 3.84 – 3.89 (m, 1H, H-4*/H-4**), 4.23 – 4.30 (m, 1H, H-1), 6.27 (br s, 1H, NH);

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ = 23.0 (C-10), 25.5 (C-3), 28.6 (C-7), 31.3 (C-2), 39.8 (C-8), 50.0 (C-5), 68.2 (C-4), 75.7 (C-1), 171.4 (C-9), 197.7 (C-6); HR-MS (ESI, 10 ev, m/z): $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{SNa}$ 254.0821 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 254.0819 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR [cm^{-1}]: ν_{max} = 473, 669, 814, 1200, 1290, 1435, 1545, 1684, 1737, 2342, 2361, 2874, 2970, 3294. * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.2.7 4-((*tert*-Butyldimethylsilyloxy)butan-1-ol (133) [PP 52]¹³³

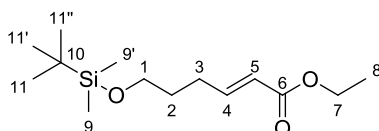
Zu einer Lösung aus NaH (1.56 g, 39.67 mmol, 60% in Mineralöl, w/v) in THF (10 mL) wurden langsam Butan-1,4-diol (**132**, 5.00 g, 55.54 mmol) in absolutem THF (16 mL) und *tert*-Butyldimethylsilylether (5.86 g, 39.67 mmol) unter Argonatmosphäre bei r.t. hinzugegeben. Nach 2h Rühren bei r.t. wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Et_2O (30 mL) aufgenommen gerührt und mit gesättigter wässriger K_2CO_3 -Lösung (15 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 getrocknet wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (SiO_2 , $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 1/4, v/v, R_F = 0.35) ergab den einfach geschützten Silylether **133** (9.55 g, 85%) als farblose Flüssigkeit; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 0.06 (s, 6H, H-5, H-5'), 0.89 (s, 9H, H-7, H-7', H-7''), 1.57 – 1.70 (m, 4H, H-2, H-3), 2.56 (br s, 1H, OH), 3.63 (t, 3J = 5.6 Hz, 2H, H-4), 3.67 (t, 3J = 5.8 Hz, 2H, H-1).



4.4.2.8 (*E*)-6-((*tert*-Butyldimethylsilyloxy)hex-2-en-essigsäureethylester (134) [PP 54]¹⁰⁷

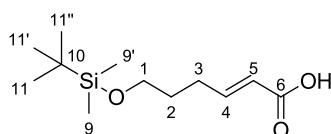
Oxalylchlorid (1.66 mL, 19.60 mmol) wurde langsam zu einer Lösung aus DMSO (2.10 mL, 29.40 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (24 mL) bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ unter Ar-Atmosphäre hinzugegeben. Nach 15 min wurde der Alkohol **133** (2.00 g, 9.79 mmol) in absolutem CH_2Cl_2 (2 mL) hinzugefügt, und das Reaktionsgemisch wurde für 1 h bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Triethylamin wurde (5.71 mL, 39.20 mmol) hinzugegeben und auf r.t. erwärmt. Nach Zugabe von Ethyl-(triphenylphosphoranyliden)-acetat (**115**, 6.80 g, 19.60 mmol) wurde die Reaktionslösung über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde durch Celite[®] 545 filtriert, und der Filterkuchen wurde mit $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (20 mL, 1/9, v/v) gewaschen. Die LM der vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem

Druck entfernt, und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc/*c*-Hexan, 1/9, v/v, R_f= 0.24) aufgereinigt. Erhalten wurde der Ethylester **134** (2.36 g, 88%) als gelbliches Öl; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.04 (s, 6H, H-9, H-9'), 0.88 (s, 9H, H-11, H-11', H-11''), 1.28 (t, ³J= 7.1 Hz, 3H, H-8), 1.63 – 1.70 (m, 2H, H-2), 2.24 – 2.30 (m, 2H, H-3), 3.75 – 3.82 (m, 1H, H-2), 3.62 (t, ³J= 6.2 Hz, 2H, H-1), 4.18 (q, ³J= 7.1 Hz, 2H, H-7), 5.82 (dt, ³J= 15.6 Hz, ⁴J= 1.6 Hz, 1H, H-5), 6.98 (dt, ³J= 15.6, 6.9 Hz, 1H, H-4).



4.4.2.9 (E)-6-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)hex-2-en-essigsäure (**135**) [PP 55]

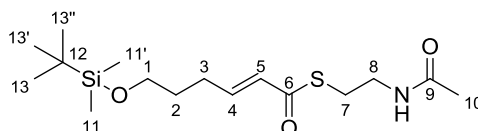
Analog zu AAV 2 wurde LiOH (2.09 g, 87.27 mmol) zu einer Lösung aus dem Ester **134** (0.95 g, 3.49 mmol) in THF/ MeOH/ H₂O (2/2/1, v/v/v, 125 mL) hinzugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen der organischen LM unter vermindertem Druck wurde die wässrige Phase mit EtOAc (40 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit NaHSO₄ (c= 0.1 M in H₂O) auf pH= 2 angesäuert und mit EtOAc (2x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (30 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes an SiO₂ (EtOAc/CH, 1/4 + 1 Vol% AcOH, R_f= 0.26) ergab die Säure **135** (0.56 g, 66%) als farblosen Feststoff; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.04 (s, 6H, H-9, H-9'), 0.89 (s, 9H, H-11, H-11', H-11''), 1.60 – 1.74 (m, 2H, H-2), 2.25 – 2.35 (m, 2H, H-3), 3.62 (t, ³J= 6.1 Hz, 2H, H-1), 5.84 (dt, ³J= 15.6 Hz, ⁴J= 1.6 Hz, 1H, H-5), 7.10 (dt, ³J= 15.6, 7.0 Hz, 1H, H-4).



4.4.2.10 (E)-S-(2-Acetamidoethyl)-6-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)hex-2-enthioat (**136**) [PP 64]

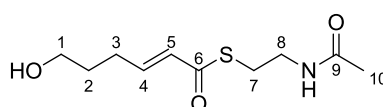
Analog zu AAV 1 wurden EDC-HCl (0.15 g, 0.77 mmol) und HOBt (0.10 g, 0.77 mmol) zu einer Lösung aus der Säure **135** (0.16 g, 0.64 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (6 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre hinzugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min gerührt. Anschließend wurden *N*-Acetylcysteamin (**108**, 0.08 mL, 0.77 mmol) und katalytische Mengen 4-DMAP hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt und mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (10 mL) versetzt. Die wässrige

Phase wurde mit CH_2Cl_2 (2x 10 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (10 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an SiO_2 (EtOAc, $R_f = 0.33$) aufgereinigt. Es wurde ein farbloses viskoses Öl **136** (0.07 g, 31%) erhalten; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 0.04$ (s, 6H, H-11, H-11'), 0.89 (s, 9H, H-13, H-13', H-13''), 1.64 – 1.71 (m, 2H, H-2), 1.96 (s, 3H, H-10), 2.26 – 2.32 (m, 2H, H-3), 3.09 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, H-7), 3.39 – 3.52 (m, 2H, H-8), 3.63 (t, $^3J = 6.1$ Hz, 2H, H-1), 5.90 (br s, 1H, NH), 6.12 (dt, $^3J = 15.5$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, H-5), 6.95 (dt, $^3J = 15.5$, 6.9 Hz, 1H, H-4); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) $\delta = -5.4$ (C-11, C-11'), 18.3 (C-12), 23.2 (C-10), 25.9 (C-13, C-13', C-13''), 28.2 (C-3), 28.8 (C-7), 31.0 (C-2), 39.9 (C-8), 62.1 (C-1), 128.4 (C-5), 146.4 (C-4), 170.3 (C-9), 190.4 (C-6); HR-MS (ESI, 10 ev, m/z): $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{NO}_3\text{SSiNa}$ 368.1686 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 368.1690 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR [cm^{-1}]: $\nu_{\text{max}} = 1056, 1099, 1144, 1199, 1233, 1287, 1363, 1436, 1545, 1655, 2341, 2361, 2929, 3084, 3296$.



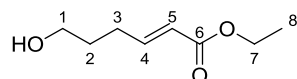
4.4.2.11 (E)-S-(2-((2-Acetamidoethyl)-6-hydroxyhex-2-en-thioat (75) [PP 67]

Analog zu AVV3 wurde HF (0.80 mL, $c = 2.65$ M, 65-70% HF in Pyridin) zu dem geschützten Thioester **136** (0.07 g, 0.27 mmol) in absolutem THF (8 mL) und Pyridin (2.88 mL) bei r.t. unter Ar-Atmosphäre gegeben. Nach 6 h Rühren wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (10 mL) verdünnt, und mit wässriger gesättigter NH_4Cl -Lösung (10 mL), HCl (10 mL, $c = 1.2$ M), wässriger gesättigter NaHCO_3 -Lösung (10 mL) und wässriger gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und die LM wurden unter vermindertem Druck entfernt. Der entsprechende Thioester **75** (0.02 g, 35%) wurde als gelbliches Öl erhalten; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 1.68 - 1.78$ (m, 2H, H-2), 1.96 (s, 3H, H-10), 2.27 – 2.40 (m, 2H, H-3), 3.09 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, H-7), 3.38 – 3.51 (m, 2H, H-8), 3.68 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, H-1), 5.96 (br s, 1H, NH), 6.16 (dt, $^3J = 15.5$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, H-5), 6.94 (dt, $^3J = 15.5$, 6.9 Hz, H-4); HR-MS (ESI, 10 ev, m/z): $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{SNa}$ 254.0821 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 254.0826 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR [cm^{-1}]: $\nu_{\text{max}} = 1052, 1203, 1260, 1288, 1365, 1436, 1488, 1542, 1635, 1654, 1739, 2342, 2361, 2957, 3078, 3294$.

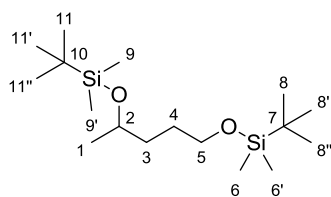


4.4.2.12 (E)-6-Hydroxyhex-2-en-essigsäureethylester (79) [PP 61]¹⁰⁹

Analog zu AVV3 wurde HF (2.62 mL, $c = 2.65$ M, 65-70% HF in Pyridin) zu dem Thioester **136** (0.30 g, 1.10 mmol) in absolutem THF (27 mL) und Pyridin (9.18 mL) bei r.t. unter Ar-Atmosphäre gegeben. Nach 6 h Rühren wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (40 mL) verdünnt, und mit wässriger gesättigter NH_4Cl -Lösung (20 mL), HCl (20 mL, $c = 1.2$ M), wässriger gesättigter NaHCO_3 -Lösung (20 mL) und wässriger gesättigter NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und die LM wurden unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an SiO_2 (EtOAc/CH, 1/1, v/v, $R_f = 0.23$) aufgereinigt. Der Ethylester **79** (0.14 g, 83%) wurde als gelbliches Öl erhalten; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 1.28$ (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, H-8), 1.64 – 1.90 (m, 3H, H-2, OH), 2.23 – 2.36 (m, 2H, H-3), 3.66 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, H-1), 4.17 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, H-7), 5.84 (dd, $^3J = 15.6$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, H-5), 6.97 (dt, $^3J = 15.6, 6.9$ Hz, H-4).

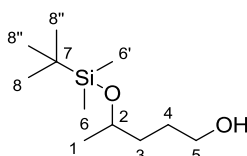
**4.4.2.13 rac-1,4-Bis[tert-butyldimethylsilyloxy]-pentan (127) [PP 56]¹⁰⁵**

Wie in Abschnitt 4.4.1.15 beschrieben wurde Imidazol (7.30 g, 107.26 mmol) zu einer Lösung aus 1,4-Pentandiol (**126**, 2.23 g, 21.45 mmol) in CH_2Cl_2 (50 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre hinzugegeben und 10 min gerührt. *tert*-Butyldimethylsilylether (9.70 g, 64.35 mmol) und katalytische Mengen an 4-DMAP wurden hinzugegeben und die Reaktion wurde bei r.t. über Nacht gerührt. Nach Zugabe von H_2O (25 mL) wurde die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wässriger gesättigter NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO_2 , EtOAc/CH, 1/9, v/v, $R_f = 0.58$) wurde der TBS-Ether **127** (1.52 g, quant.) als farbloses Öl erhalten; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.04$ (s, 12 H, H-6, H-6', H-9, H-9'), 0.88 (s, 9H, H-8*, H-8**, H-8***), 0.89 (s, 9 H, H-11*, H-11**, H-11***), 1.12 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 3H, H-1), 1.39 – 1.65 (m, 4H, H-3, H-4), 3.57 – 3.63 (m, 2H, H-5), 3.75 – 3.85 (m, 1H, H-2). * Zuordnung nicht gesichert.

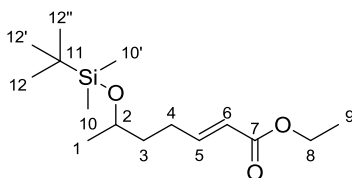


4.4.2.14 rac-4-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)pentan-1-ol (128) [PP 58]¹⁰⁶

Wie in Abschnitt 4.3.1.11 beschrieben wurde HF (0.78 mL, 65-70% HF in Pyridin) zu einer Lösung aus des TBS-Ethers **127** (3.00 g, 9.02 mmol) in absolutem THF (28 mL) und Pyridin (4.81 mL, 59.38 mmol) gegeben. Nach dem Rühren über Nacht bei r.t. wurde das Reaktionsgemisch mit Et₂O (30 mL) verdünnt und mit HCl (20 mL, c= 0.5 M) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Et₂O (2 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wässriger gesättigter Kupfersulfatlösung (20 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (SiO₂, CH/EtOAc, 3/1, v/v, R_f= 0.25) ergab das einfach geschützte Diol **128** (1.28, 65%) als farblose Flüssigkeit; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.06 (s, 6H, H-6, H-6'), 0.89 (s, 9H, H-8, H-8', H-8''), 1.15 (d, ³J= 6.1 Hz, 3H, H-1), 1.46 – 1.57 (m, 2H, H-3*/H-4*), 1.57 – 1.70 (m, 2H, H-3*/H-4*), 2.04 (br s, 1H, OH), 3.54 – 3.70 (m, 2H, H-5), 3.84 – 3.94 (m, 1H, H-2). * Zuordnung nicht gesichert.

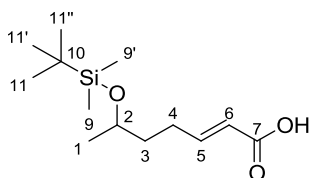
**4.4.2.15 rac-(E)-6-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)hept-2-en-essigsäureethylester (129) [PP 72]¹⁰⁷**

Oxalylchlorid (0.78 mL, 9.15 mmol) wurde langsam zu einer Lösung aus DMSO (0.99 mL, 13.74 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (12 mL) bei -78 °C unter Ar-Atmosphäre hinzugegeben. Nach 15 min wurde der Alkohol **128** (1.00 g, 4.58 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (1 mL) hinzugefügt, und das Reaktionsgemisch wurde für 1 h bei -78 °C gerührt. Triethylamin wurde (2.66 mL, 18.32 mmol) hinzugegeben und auf r.t. erwärmt. Nach Zugabe von Ethyl-(triphenylphosphoranyliden)-acetat (**115**, 3.19 g, 9.15 mmol) wurde die Reaktionslösung über Nacht bei r.t. gerührt. Die Reaktionslösung wurde durch Celite[®] 545 filtriert, und der Filterkuchen wurde mit EtOAc/CH (20 mL, 1/9, v/v) gewaschen. Die LM der vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck entfernt, und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EtOAc/CH, 1/9, v/v, R_f= 0.30) aufgereinigt. Erhalten wurde der Ethylester **129** (1.06 g, 81%) als gelbliches Öl; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.04 (s, 6H, H-10, H-10'), 0.88 (s, 9H, H-12, H-12', H-12''), 1.13 (d, ³J= 6.1 Hz, 3H, H-1), 1.28 (t, ³J= 7.1 Hz, 3H, H-9), 1.47 – 1.68 (m, 2H, H-3*/H-4*), 2.13 – 2.34 (m, 2H, H-3*/H-4*), 3.71 – 3.91 2 (m, 1H, H-2), 4.18 (q, ³J= 7.1 Hz, 2H, H-8), 5.81 (dt, ³J= 15.6 Hz, ⁴J= 1.6 Hz, 1H, H-6), 6.97 (dt, ³J= 15.6, 6.9 Hz, 1H, H-5). * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.2.16 *rac*-(*E*)-6-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]hept-2-en-säure (**130**) [PP 60]¹⁰¹

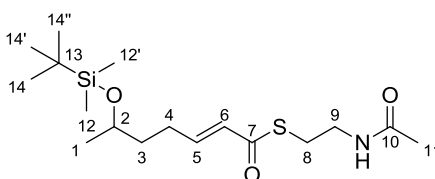
Analog zu AAV 2 wurde LiOH (1.67 g, 69.70 mmol) zu einer Lösung aus dem Ester **129** (0.76 g, 2.79 mmol) in THF/ MeOH/ H₂O (2/2/1, v/v/v, 100 mL) hinzugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Nach dem Entfernen der organischen LM unter vermindertem Druck wurde die wässrige Phase mit EtOAc (40 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit NaHSO₄ (c= 0.1 M in H₂O) auf pH= 2 angesäuert und mit EtOAc (2x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde unter vermindertem Druck und säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes an SiO₂ (EtOAc/CH, 1/4 + 1 Vol% AcOH, R_f= 0.12) ergab die Säure **130** (0.47 g, 62%) als farblosen Feststoff; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 0.05 (s, 6H, H-9, H-9'), 0.88 (s, 9H, H-11, H-11', H-11''), 1.14 (d, ³J= 6.1 Hz, 3H, H-1), 1.50 – 1.62 (m, 2H, H-3*/H-4*), 2.15 – 2.40 (m, 2H, H-3*/H-4*), 3.77 – 3.90 (m, 1H, H-2), 5.83 (dt, ³J= 15.6 Hz, ⁴J= 1.6 Hz, H-6), 7.10 (dt, ³J= 15.6, 6.9 Hz, H-5). * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.2.17 *rac*-(*E*)-*S*-(2-Acetamidoethyl)-6-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]hept-2-en-thioat (**131**) [PP 62]

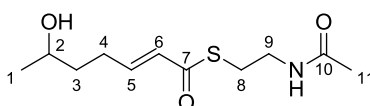
Analog zu AAV 1 wurden EDC-HCl (0.18 g, 0.93 mmol) und HOBt (0.13 g, 0.93 mmol) zu einer Lösung aus der Säure **130** (0.20 g, 0.77 mmol) in absolutem CH₂Cl₂ (7 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre hinzugegeben, und die Reaktionslösung wurde für 30 min gerührt. Anschließend wurden *N*-Acetylcysteamin (**108**, 0.10 mL, 0.93 mmol) und katalytische Mengen 4-DMAP hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt und mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung (10 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (2x 10 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (10 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an SiO₂ (EtOAc, R_f= 0.53) aufgereinigt. Es wurde ein gelblich viskoses Öl **131** (0.14 g, 54%) erhalten; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.04 (s, 6H, H-12, H-12'), 0.88 (s, 9H, H-14, H-

14', H-14''), 1.13 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 3H, H-1), 1.50 – 1.62 (m, 2H, H-3), 1.97 (s, 3H, H-11), 2.13 – 2.39 (m, 2H, H-4), 3.09 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, H-8), 3.37 – 3.51 (m, 2H, H-9), 3.75 – 3.90 (m, 1H, H-2), 5.97 (br s, 1H, NH), 6.13 (dd, $^3J = 15.5$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, H-6), 6.95 (dt, $^3J = 15.5$, 6.9 Hz, 1H, H-5); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) $\delta = -4.1$ (C-12, C-12'), 18.2 (C-13), 23.3 (C-1), 23.9 (C-11), 26.0 (C-14, C-14', C-14''), 28.4 (C-4), 28.6 (C-8), 37.8 (C-3), 40.1 (C-9), 67.9 (C-2), 128.3 (C-6), 147.0 (C-5), 170.6 (C-10), 190.6 (C-7); HR-MS (ESI, 10 ev, m/z): $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{NO}_3\text{SSiNa}$ 382.1848 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 382.1845 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR [cm^{-1}]: $\nu_{\text{max}} = 653, 940, 1229, 1288, 1373, 1437, 1558, 1653, 2342, 2970, 3304$.
* Zuordnung nicht gesichert.



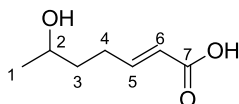
4.4.2.18 *rac*-(*E*)-*S*-(2-Acetamidoethyl-6-hydroxy)hept-2-en-thioat (**74**) [PP 63]¹⁰⁹

Wie in Abschnitt 4.3.1.11 beschrieben wurde HF (0.03 mL, 65-70% HF in Pyridin) zu einer Lösung aus dem TBS-Ether **131** (0.13 g, 0.35 mmol) in absolutem THF (2 mL) und Pyridin (0.18 mL, 2.31 mmol) gegeben. Nach dem Rühren über Nacht bei r.t. wurde das Reaktionsgemisch mit Et_2O (5 mL) verdünnt und mit HCl (5 mL, $c = 0.5$ M) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Et_2O (2 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit wässriger gesättigter Kupfersulfatlösung (5 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an SiO_2 (CH/EtOAc, 3/1, v/v, $R_f = 0.17$) und im Anschluss mittels HPLC (Knauer, Eurospher II 100-5, C18, 250 x 16 mm + Vorsäule 30 x 16 mm, Flussrate: 15.0 mL/min, mobile Phase: 20% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$; $\lambda = 230$ nm, $r_t = 9.98$ min) aufgereinigt. Erhalten wurde der Thioester **74** (0.08 g, 89%) als farblose Flüssigkeit; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 1.22$ (d, $^3J = 6.2$ Hz, 3H, H-1), 1.55 – 1.65 (m, 3H, H-3, OH), 1.96 (s, 3H, H-11), 2.22 – 2.44 (m, 2H, H-5), 3.09 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 2H, H-8), 3.42 – 3.49 (m, 2H, H-9), 3.78 – 3.87 (m, 1H, H-2), 5.92 (br s, 1H, NH), 6.15 (dt, $^3J = 15.5$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, H-6), 6.90 (dt, $^3J = 15.5$, 6.9 Hz, H-5); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) $\delta = 23.4$ (C-11*), 23.9 (C-1*), 28.4 (H-4), 28.7 (C-8), 37.3 (C-3), 40.0 (C-9), 67.4 (C-2), 128.6 (C-6), 146.2 (C-5), 170.4 (C-10), 190.5 (C-7); HR-MS (ESI, 10 ev, m/z): $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{SNa}$ 268.0978 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 268.0976 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR [cm^{-1}]: $\nu_{\text{max}} = 669, 1018, 1090, 1260, 1286, 1380, 1558, 1638, 1655, 2962, 3280$.

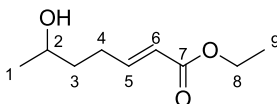


4.4.2.19 (E)-6-Hydroxyhept-2-en-essigsäure (76) [PP 79]

Analog zu AVV3 wurde HF (1.78 mL, $c = 2.65$ M, 65-70% HF in Pyridin) zu dem TBS-Ether **130** (0.15 g, 0.58 mmol) und Pyridin (6.30 mL) in absolutem THF (18 mL) bei r.t. unter Ar-Atmosphäre gegeben. Nach 6 h Rühren wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (10 mL) verdünnt, und mit wässriger gesättigter NH_4Cl -Lösung (10 mL), HCl (20 mL, $c = 1.2$ M), wässriger gesättigter NaHCO_3 -Lösung (10 mL) und wässriger gesättigter NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und die LM wurden unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an SiO_2 (EtOAc/CH, 1/1, v/v, $R_f = 0.06$) aufgereinigt. Der entsprechende Säure **76** (0.02 g, 21%) wurde als kristalliner Feststoff erhalten; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) $\delta = 1.19$ (d, $^3J = 6.3$ Hz, 3H, H-1), 1.58 – 1.68 (m, 2H, H-3), 2.20 – 2.34 (m, 2H, H-4), 3.80 – 3.92 (m, 1H, H-2), 5.88 (dt, $^3J = 15.7$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, H-6), 6.83 (dt, $^3J = 15.7$, 7.0 Hz, H-5).

**4.4.2.20 (E)-Ethyl-6-hydroxyhept-2-en-essigsäureethylester (78) [PP 77]**

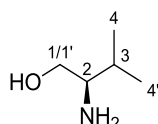
Analog zu AVV3 wurde HF (4.50 mL, $c = 2.65$ M, 65-70% HF in Pyridin) zu dem TBS-Ether **129** (0.42 g, 1.47 mmol) in absolutem THF (45 mL) und Pyridin (15.90 mL) bei r.t. unter Ar-Atmosphäre gegeben. Nach 6 h Rühren wurde die Reaktionslösung mit EtOAc (40 mL) verdünnt, und mit wässriger gesättigter NH_4Cl -Lösung (20 mL), HCl (20 mL, $c = 1.2$ M), wässriger gesättigter NaHCO_3 -Lösung (20 mL) und wässriger gesättigter NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und die LM wurden unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an SiO_2 (EtOAc/CH, 1/1, v/v, $R_f = 0.44$) aufgereinigt. Der entsprechende Ethylester **78** (0.18 g, 72%) wurde als gelbliches Öl erhalten; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 1.20$ (d, $^3J = 6.2$ Hz, 3H, H-1), 1.27 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H, H-9), 1.54 – 1.65 (m, 2H, H-3), 2.17 – 2.43 (m, 2H, H-4), 3.66 (m, 1H, H-2), 4.17 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H, H-8), 5.83 (dt, $^3J = 15.6$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, H-6), 6.97 (dt, $^3J = 15.6$, 6.9 Hz, H-5).



4.4.3 Substrate zur Analyse der Misakinolid KS 7 und KS 8 Substratspezifität

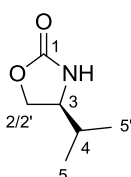
4.4.3.1 L-Valinol (**100**) [PP 13]¹³⁴

Lithiumaluminiumhydrid (2.22 g, 55.51 mmol) wurde in absolutem THF (150 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre vorgelegt und sukzessiv mit L-Valin (**99**, 5.0 g, 46.70 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h unter Rückfluss erhitzt und auf 0 °C gekühlt. Eine KOH-Lösung (4.20 mL, $c = 4.4$ M in H₂O) wurde vorsichtig hinzugegeben und weitere 30 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Filtration des Rückstandes wurde der Filterkuchen mit THF (20 mL) extrahiert, das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde ein gelbliches Öl **100** (4.09 g, 85%) erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.87$ (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, H-4*/H-4*), 0.88 (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, H-4*/H-4*), 1.54 (dh, ³J = 6.4, 6.8 Hz, 1H, H-3), 2.26 (br s, 2H, NH₂), 2.52 (ddd, ³J = 8.7, 6.4, 3.9 Hz, 1H, H-2), 3.26 (dd, ²J = 10.6 Hz, ³J = 8.7, 2H, H-1*/H-1*), 3.59 (dd, ²J = 10.6 Hz, ³J = 3.9, H-1*/H-1*). * Zuordnung nicht gesichert.



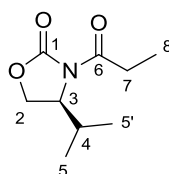
4.4.3.2 (S)-4-Isopropylloxazolidin-2-on (**102**) [PP 14]^{135,136}

In einem Dreihalskolben mit Vigreuxkolonne wurden L-Valinol (**100**, 4.00 g, 38.80 mmol), Kohlensäurediethylester (**101**, 14.00 mL, 117.00 mmol), Kaliumcarbonat (0.80 g, 5.82 mmol) und Natriumethanolat (0.05 g, 0.70 mmol) für 6 h bei 131 °C unter Ar-Atmosphäre erhitzt. Ethanol wurde destillativ entfernt. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit wässriger gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (2x 20 mL) extrahiert. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wurde mit eiskaltem Et₂O (2x 3 mL) gewaschen, nach dem Trocknen im Exsikkator wurden farblose Kristalle **102** (3.96 g, 79%) erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.89$ (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, H-5*/H-5*), 0.96 (d, ³J = 6.8 Hz, 3H, H-5*/H-5*), 1.72 (dh, ³J = 6.8 Hz, ³J = 6.8 Hz, 1H, H-4), 3.61 (ddd, ³J = 6.3, 6.8, 8.7 Hz, 1H, H-3), 4.09 (dd, ²J = 8.7 Hz, ³J = 6.3 Hz, 1H, H-2*/H-2*), 4.43 (dd, ²J = 8.7 Hz, ³J = 8.7 Hz, 1H, H-2*/H-2*), 6.78 (br s, 1H, NH). * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.3.3 (S)-4-Isopropyl-3-propionyloxazolidin-2-on (**103**) [PP 15]^{81,137}

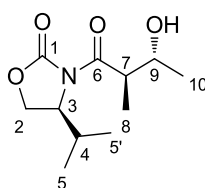
N-Butyllithium (3.03 mL, 7.59 mmol, $c = 2.5$ M in Hexan) wurde zu einer Lösung aus dem cyclisierten Produkt **102** (1.00 g, 7.74 mmol) in absolutem THF (20 mL) bei -78 °C unter Ar-Atmosphäre hinzugetropft und 1 h gerührt. Danach wurde Propionylchlorid (**107**, 0.74 mL, 8.51 mmol) in THF (6.20 mL) hinzugegeben und 1 h gerührt. Im Anschluss wurde 1 h bei r.t. gerührt und die Reaktion mit wässriger gesättigter NH_4Cl (10 mL) abgebrochen. Die LM wurden unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit CH_2Cl_2 (2x 15 mL) extrahiert, die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und das LM wurde unter verminderten Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (SiO_2 , EtOAc/CH, 0.15/1, v/v , $R_f = 0.17$) ergab das Imid **103** (0.97 g, 68%) als gelblichen Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.85$ (d, $^3J = 6.9$ Hz, 3H, H-5*/H-5*), 0.90 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3H, H-5*/H-5*), 1.14 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 3H, H-8), 2.32 – 2.40 (m, 1H, H-4), 2.87 – 2.97 (m, 2H, H-7), 4.17 – 4.27 (m, 2H, H-2), 4.39 – 4.43 (m, 1H, H-3). * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.3.4 (S)-3-((2R,3R)-3-Hydroxy-2-methylbutanoyl)-4-isopropylloxazolidin-2-on (**103**) [PP 16]^{138,116}

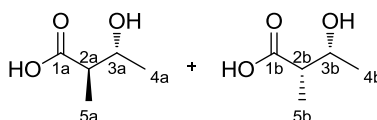
Di-*n*-butylboryltrifluormethansulfonat (13.28 mL, 13.28 mmol, 1 M in Et_2O) wurde zu eine Lösung aus dem chiralen Auxiliar **103** (1.23 g, 6.64 mmol) in absolutem Et_2O (20 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre hinzugetropft, gefolgt von Diisopropylethylamin (1.30 mL, 7.64 mmol). Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min gerührt und dann auf -78 °C gekühlt. Frisch destilliertes vorgekühltes Acetaldehyd (**104**, 0.47 mL, 8.30 mmol) in Et_2O (7 mL) wurde langsam hinzugetropft und nach 30 min wurde mit Et_2O verdünnt (8 mL). Die Reaktion wurde bei -78 °C durch Zugabe von Weinsäure (5 g) abgebrochen, auf r.t. erwärmt und für weitere 2 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser (15 mL) versetzt und die wässrige Phase mit Et_2O (2x 15 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit wässriger gesättigter NaHCO_3 -Lösung (2x 15 mL) gewaschen, auf 0 °C gekühlt und mit $\text{MeOH}/30\% \text{H}_2\text{O}_2$ (17 mL) versetzt. Nach 30 min bei r.t. wurde das Reaktionsgemisch mit Et_2O (2x 10 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit wässriger gesättigter NaHCO_3 -Lösung (10 mL), wässriger gesättigter NaCl -Lösung (10 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt, nach säulenchromatographische Aufreinigung (SiO_2 , EtOAc/CH, 1/1, v/v , $R_f = 0.39$) ergab sich ein dr von 11:1 aus den Produkten **105a** und

105b als gelbliche Flüssigkeit (1.19 g, 78%); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): **105a**: δ = 0.89 (d, 3J = 6.9 Hz, 3H, H-5*/H-5'*), 0.92 (d, 3J = 7.1 Hz, 3H, H-5*/H-5'*), 1.17 (d, 3J = 6.6 Hz, 3H, H-8), 1.27 (d, 3J = 6.1 Hz, 3H, H-10), 2.34 – 2.45 (m, 1H, H-4), 3.80 – 3.91 (m, 2H, H-7, H-9), 4.20 – 4.30 (m, 2H, H-2), 4.43 – 4.47 (m, 1H, H-3); $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.5 (C-5 *), 14.7 (C-5' *), 18.1 (C-8), 21.5 (C-10), 28.6 (C-4), 44.9 (C-7), 59.0 (C-3), 63.5 (C-2), 71.0 (C-9), 154.4 (C-6), 176.7 (C-1); HR-MS (ESI, 10 ev, m/z): $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{Na}$ 252.1206 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gemessen: 252.1204 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; IR [cm^{-1}]: ν_{max} = 517, 639, 669, 708, 914, 953, 1057, 1144, 1301, 1384, 1456, 2342, 2361, 2877, 3933, 2967, 3468.
* Zuordnung nicht gesichert. (**105b** nicht aufgeführt, da zu geringe Signalintensität).



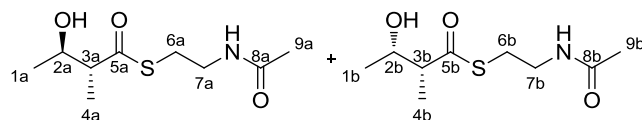
4.4.3.5 (2R,3R)-3-Hydroxy-2-methyl-butansäure (**106a**) und (2S,3R)-3-Hydroxy-2-methyl-butansäure (**106b**) [PP 28]¹³⁷

H_2O_2 (1.74 mL, 17.44 mmol, 30% in H_2O , w/w) wurde zu einer Lösung aus dem Evans-Addukt **105** (1.00 g, 4.36 mmol) in THF/ H_2O (22 mL, 4/1, v/v) bei 0 °C hinzugegeben, gefolgt von LiOH (0.17 g, 6.98 mmol) in H_2O (6 mL). Nach 1 h wurde Natriumsulfit (2.20 g, 17.44 mmol) in H_2O (13 mL) bei 0 °C hinzugefügt und 1 h gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt, Die entstandene Suspension wurde mit CH_2Cl_2 (3x 15 mL) extrahiert, um das chirale Auxiliar zu entfernen. Die wässrige Phase wurde mit HCl (c= 6 M) bei 0 °C auf pH 1 angesäuert und mit EtOAc (5x 15 mL) extrahiert. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Es wurde ein farbloser Feststoff aus einem dr von 4:1 der Säuren **106a** und **106b** (0.49 g, 96%) erhalten; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): **106a**: δ = 1.14 (d, 3J = 7.2 Hz, 3H, H-5a), 1.19 (d, 3J = 6.4 Hz, 3H, H-4a), 2.43 (dq, 3J = 7.2 Hz, 3J = 7.2 Hz, 1H, H-2a), 3.87 (dq, 3J = 6.4, 7.2 Hz, 1H, H-3a); **106b**: δ = 0.84 (d, 3J = 6.8 Hz, 3H, H-5b), 0.89 (d, 3J = 6.7 Hz, 3H, H-4b), 2.52 (dq, 3J = 3.6, 6.8 Hz, 1H, H-2b), 4.08 (m, 1H, H-3b).



4.4.3.6 (2R,3R)-S-(2-Acetamidoethyl)-3-hydroxy-2-methylbutanthioester (97) und (2S,3R)-S-(2-Acetamidoethyl)-3-hydroxy-2-methylbutanthioester (98) [PP 31]¹³⁹

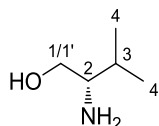
Carbonyldiimidazol (CDI) (0.47 g, 2.87 mmol) wurde zu einer Lösung aus der Säure (0.20 g, 1.69 mmol) in absolutem THF (6 mL) unter Ar-Atmosphäre bei r.t. zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde *N*-Acetylcysteamin (**108**, 0.25 mL, 2.36 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert, und der Rückstand wurde in EtOAc (10 mL) und H₂O (10mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit NaCl gesättigt und mit EtOAc (3x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt, und das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an SiO₂ (EtOAc/CH₂Cl₂, 2/1, v/v, R_f= 0.08) aufgereinigt. Erhalten wurde ein dr von 4:1 aus den Thioestern **97** und **98** (0.26 g, 70%) als farblose Flüssigkeit. Die Trennung erfolgte per HPLC (Knauer, Eurospher II 100-5, C18, 250 × 16 mm + Vorsäule 30 x 16 mm, Flussrate: 16.0 mL/min, mobile Phase: 25% MeOH/H₂O; λ = 230 nm, **97** r_t= 14.72 min, **98** r_t= 14.67 min); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): **97** δ= 1.13 (d, ³J= 7.1 Hz, 3H, H-4a), 1.18 (d, ³J= 6.3 Hz, 3H, H-1a), 1.91 (s, 3H, H-9a), 2.65 (dq, ³J= 7.1 Hz, ³J= 7.1 Hz, H-3a), 2.91 – 3.07 (m, 3H, 6a, OH_a), 3.30 – 3.47 (m, 2H, H-7a), 3.91 (dq, ³J= 6.3, 7.1 Hz, H-2a), 6.44 (br s, 1H, NH_a); **98** δ= 1.18 (d, ³J= 6.4 Hz, 3H, H-1b), 1.21 (d, ³J= 7.1 Hz, 2H, H-4b), 1.95 (s, 3H, H-9b), 2.43 (br s, 1H, OH_b), 2.68 (dq, ³J= 4.1, 7.1 Hz 1H, H-3b), 2.94 – 3.10 (m, 2H, 6b), 3.34 – 3.49 (m, 2H, H-7b), 4.09 (dq, ³J= 4.1, 6.4 Hz, H-2b), 6.04 (br s, 1H, NH_b); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): **97** δ= 14.7 (C-4a), 21.0 (C-1a), 23.1 (C-9a), 28.6 (C-6a), 39.3 (C-7a), 56.1 (C-3a), 69.9 (C-2a), 171.0 (C-8a), 203.8 (C-5a); **98** δ= 11.7 (C-1b), 20.3 (C-4b), 23.3 (C-9b), 28.7 (C-6b), 39.5 (C-7b), 54.7 (C-3b), 68.5 (C-2b), 170.7 (C-8a), 204.2 (C-5a); HR-MS (ESI, 10 ev, *m/z*): C₉H₁₇NO₃SNa 242.0821[M+Na]⁺; gemessen: **97** 242.0822 [M+Na]⁺; **98** 242.0825; IR [cm⁻¹]: **97** ν_{max}= 449, 753, 911, 1044, 1111, 1291, 1374, 1438, 1683, 2342, 2362, 3292; **98** ν_{max}= 423, 430, 450, 760, 996, 1041, 1093, 1375, 1437, 1683, 2342, 2362, 3295.



4.4.3.7 D-Valinol (ent-100) [PP ent-13]¹³⁴

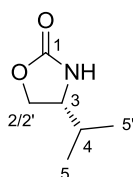
Wie in Abschnitt 4.4.3.1 beschrieben, wurde Lithiumaluminiumhydrid (2.22 g, 55.51 mmol) in absolutem THF (150 mL) bei 0 °C unter Ar-Atmosphäre vorgelegt und sukzessiv mit D-Valin (*ent*-**99**, 5.0 g, 46.70 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h unter Rückfluss erhitzt und auf 0 °C gekühlt. Eine KOH-Lösung (4.20 mL, c=

4.4 M in H₂O) wurde vorsichtig hinzugetropft und weitere 30 min unter Rückfluss erhitzt. Nach Filtration des Rückstandes wurde der Filterkuchen mit THF (20 mL) extrahiert, das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde ein gelbliches Öl des Alkohols *ent*-**100** (4.24 g, 88%) erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.89 (d, ³J= 6.8 Hz, 3H, H-4*/H-4'*), 0.90 (d, ³J= 6.8 Hz, 3H, H-4*/H-4'*), 1.56 (dh, ³J= 6.4, 6.8 Hz, 1H, H-3), 2.05 (br s, 3H, OH, NH₂), 2.45 (ddd, ³J= 3.9, 6.4, 8.7 Hz, H-2), 3.28 (dd, ²J= 10.5 Hz, ³J= 8.7, H-1*/H-1'*), 3.62 (dd, ²J= 10.5 Hz, ³J= 3.9, H-1*/H-1'*). * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.3.8 (R)-4-Isopropylloxazolidin-2-on (*ent*-**102**) [PP *ent*-**14**]^{135,136}

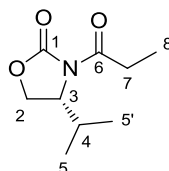
Wie in Abschnitt 4.4.3.2 beschrieben, wurde in einem Dreihalskolben mit Vigreuxkolonne D-Valinol (*ent*-**100**, 4.00 g, 38.80 mmol), Kohlensäurediethylester (**101**, 14.00 mL, 117.00 mmol), Kaliumcarbonat (0.80 g, 5.82 mmol) und Natriumethanolat (0.05 g, 0.70 mmol) für 6 h bei 131 °C unter Ar-Atmosphäre erhitzt, Ethanol wurde destillativ entfernt. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit wässriger gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (2x 20 mL) extrahiert. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wurde mit eiskaltem Et₂O (2x 3 mL) gewaschen, nach dem Trocknen im Exsikkator wurden farblose Kristalle *ent*-**102** (4.11 g, 82%) erhalten; ¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.88 (d, ³J= 6.8 Hz, 3H, H-5*/H-5'*), 0.94 (d, ³J= 6.7 Hz, 3H, H-5*/H-5'*), 1.73 (dh, ³J= 13.5, 6.8 Hz, 1H, H-4), 3.59 (ddd, ³J= 13.5, 8.7, 6.3 Hz, 1H, H-3), 4.08 (dd, ²J= 8.7 Hz, ³J= 6.3 Hz, 1H, H-2*/H-2'*), 4.42 (dd, 1H, ²J= 8.7 Hz, ³J= 8.7 Hz, 1H, H-2*/H-2'*), 6.22 (br s, 1H, NH). * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.3.9 (R)-4-Isopropyl-3-propionylloxazolidin-2-on (*ent*-**103**) [PP *ent*-**15**]^{81,137}

Wie in Abschnitt 4.4.3.3 beschrieben, wurde *N*-Butyllithium (9.09 mL, 22.77 mmol, c= 2.5 M in Hexan) zu einer Lösung aus dem cyclisierten Produkt *ent*-**102** (3.00 g, 23.22 mmol) in absolutem THF (60 mL) bei -78 °C unter Ar-Atmosphäre hinzugetropft und 1 h gerührt. Danach wurde Propionylchlorid (**107**, 2.22 mL, 25.53 mmol) in THF (18.60 mL) hinzugegeben und 1 h gerührt. Im Anschluss wurde 1 h bei r.t. gerührt und die Reaktion mit wässriger gesättigter NH₄Cl (30 mL) abgebrochen. Die LM wurden unter

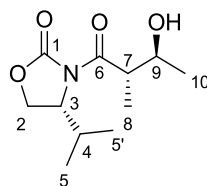
vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit CH₂Cl₂ (2x 45 mL) extrahiert, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (SiO₂, EtOAc/CH₂Cl₂, 0.15/1, v/v, R_f= 0.17) ergab das Imid *ent*-**105** (3.23 g, 75%) als gelblichen Feststoff; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.86 (d, ³J= 6.9 Hz, 3H, H-5*/H-5*), 0.90 (d, ³J= 7.0 Hz, 3H, H-5*/H-5*), 1.15 (t, ³J= 7.4 Hz, 3H, H-8), 2.31 – 2.42 (m, 1H, H-4), 2.82 – 3.03 (m, 2H, H-7), 4.17 – 4.28 (m, 2H, H-2), 4.39 – 4.44 (m, 1H, H-3). * Zuordnung nicht gesichert.



4.4.3.10 (R)-3-((2S,3S)-3-Hydroxy-2-methylbutanoyl)-4-isopropylloxazolidin-2-on (*ent*-105a) [PP 32]¹⁶

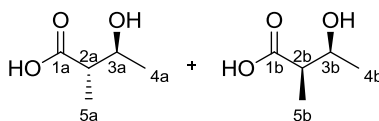
Wie in Abschnitt 4.4.3.4 beschrieben, wurde Di-*n*-butylboryltrifluoromethansulfonat (16.20 mL, 16.20 mmol, 1 M in Et₂O) eine Lösung aus dem chiralen Auxiliar *ent*-**103** (1.50 g, 8.10 mmol) in absolutem Et₂O (29 mL) bei 0 °C unter Ar-Atomosphäre hinzugegossen, gefolgt von Diisopropylethylamin (1.67 mL, 9.32 mmol). Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min gerührt und dann auf -78 °C gekühlt. Frisch destilliertes vorgekühltes Acetaldehyd (**104**, 0.57 mL, 10.13 mmol) in Et₂O (7 mL) wurde langsam hinzugegossen und nach 30 min wurde mit Et₂O verdünnt (10 mL). Die Reaktion wurde bei -78 °C durch Zugabe von Weinsäure (6,10 g) abgebrochen, auf r.t. erwärmt und für weitere 2 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser (20 mL) versetzt und die wässrige Phase mit Et₂O (2x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit wässriger gesättigter NaHCO₃-Lösung (2x 20 mL) gewaschen, auf 0 °C gekühlt und mit MeOH/ 30% H₂O₂ (20 mL) versetzt. Nach 30 min bei r.t. wurde das Reaktionsgemisch mit Et₂O (2x 15 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit wässriger gesättigter NaHCO₃-Lösung (15 mL), wässriger gesättigter NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt, nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO₂, EtOAc/CH₂Cl₂, 3/7 zu 1/1, v/v, R_f= 0.39) ergab sich ein dr von 16:1 aus den Produkten *ent*-**105a** und *ent*-**105b** als farbloser Feststoff (1.63 g, 88%); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): *ent*-**105a**: δ= 0.89 (d, ³J= 6.9 Hz, 3H, H-5*/H-5*), 0.92 (d, ³J= 7.1 Hz, 3H, H-5*/H-5*), 1.17 (d, ³J= 6.6 Hz, 3H, H-8), 1.27 (d, ³J= 6.1 Hz, 3H, H-10), 2.33 – 2.46 (m, 1H, H-4), 3.78 – 3.93 (m, 2H, H-7, H-9), 4.19 – 4.31 (m, 2H, H-2), 4.42 – 4.48 (m, 1H, H-3); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ= 14.6 (C-5*), 14.9 (C-5*), 18.2 (C-8), 21.6 (C-10), 28.7 (C-4), 45.0 (C-7), 59.1 (C-3), 63.6 (C-2), 71.1 (C-9), 154.5 (C-6), 176.8 (C-1); HR-MS (ESI, 10 ev, *m/z*): C₁₁H₁₉NO₄Na

252.1206 [M+Na]⁺; gemessen: 252.1207 [M+Na]⁺; IR [cm⁻¹]: ν_{\max} = 642, 668, 710, 916, 954, 1057, 1146, 1303, 1385, 1458, 2343, 2361, 2878, 3934, 2969, 3466. * Zuordnung nicht gesichert. (*ent*-**105b** nicht aufgeführt, da zu geringe Signalintensität).



4.4.3.11 (2*S*,3*S*)-3-Hydroxy-2-methyl-butansäure (*ent*-**106a**) und (2*R*,3*S*)-3-Hydroxy-2-methyl-butansäure (*ent*-**106b**) [PP 28]¹³⁷

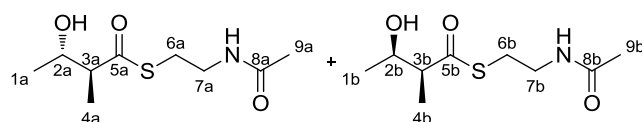
Wie in Abschnitt 4.4.1.3 beschrieben, wurde H₂O₂ (2.82 mL, 28.36 mmol, 30% in H₂O, w/w) zu einer Lösung aus dem Evans-Addukt *ent*-**105** (1.63 g, 7.09 mmol) in THF/ H₂O (36 mL, 4/1, v/v) bei 0 °C hinzugegeben, gefolgt von LiOH (0.27 g, 11.17 mmol) in H₂O (10 mL). Nach 1 h wurde Natriumsulfit (3.52 g, 27.90 mmol) in H₂O (20 mL) bei 0 °C hinzugefügt und 1 h gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt, die entstandene Suspension wurde mit CH₂Cl₂ (3x 20 mL) extrahiert, um das chirale Auxiliar zu entfernen. Die wässrige Phase wurde mit HCl (c= 6 M) bei 0 °C auf pH 1 angesäuert und mit EtOAc (5x 20 mL) extrahiert. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurde das LM unter vermindertem Druck abdestilliert. Es wurde ein farbloser Feststoff der Säuren *ent*-**106a** und *ent*-**106b** mit einem dr von 4:1 (0.80 g, 96%) erhalten; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): *ent*-**106a**: δ = 1.22 (d, ³J= 7.2 Hz, 3H, H-5a), 1.26 (d, ³J= 6.4 Hz, 3H, H-4a), 2.50 (dq, ³J= 7.2 Hz, ³J= 7.2 Hz, 1H, H-2a), 3.90 – 3.97 (m, 1H, H-3a); *ent*-**106b**: δ = 0.91 (d, ³J= 6.8 Hz, 3H, H-5b), 0.96 (d, ³J= 6.7 Hz, 3H, H-4b), 2.57 – 2.63 (m, 1H, H-2b), 4.10 – 4.19 (m, 1H, H-3b).



4.4.3.12 (2*S*,3*S*)-*S*-(2-Acetamidoethyl)-3-hydroxy-2-methylbutanthioat (*ent*-**97**) und (2*R*,3*S*)-*S*-(2-Acetamidoethyl)-3-hydroxy-2-methylbutanthioat (*ent*-**98**) [PP 35]

Wie in Abschnitt 4.4.3.6 beschrieben, wurde Carbonyldiimidazol (CDI) (1.14 g, 7.04 mmol) wurde zu einer Lösung aus der Säure *ent*-**106** (0.49 g, 4.14 mmol) in absolutem THF (15 mL) unter Ar-Atmosphäre bei r.t. zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde *N*-Acetylcysteamin (**108**, 0.62 mL, 5.80 mmol) zugegeben, und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei r.t. gerührt. Das LM wurde unter vermindertem Druck abdestilliert, und der Rückstand wurde in EtOAc (20 mL) und H₂O (20mL) aufgenommen. Die wässrige

Phase wurde mit NaCl gesättigt und mit EtOAc (3x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt, und das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an SiO₂ (EtOAc/CH₂Cl₂, 3/1, v/v, R_f= 0.15) aufgereinigt. Erhalten wurde ein dr aus den Thioestern *ent-97* und *ent-98* (0.65 g, 72%, dr= 4:1) als farblose Flüssigkeit. Die Trennung erfolgte per HPLC (Knauer, Eurospher II 100-5, C18, 250 × 16 mm + Vorsäule 30 × 16 mm, Flussrate: 16.0 mL/min, mobile Phase: 25% MeOH/H₂O; λ = 230 nm, *ent-97* r_t= 14.74 min, *ent-98* r_t= 14.68 min); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): *ent-97* δ= 1.17 (d, ³J= 7.1 Hz, 3H, H-4a), 1.22 (d, ³J= 6.3 Hz, 3H, H-1a), 1.94 (s, 3H, H-9a), 2.68 (dq, ³J= 7.1 Hz, ³J= 7.1 Hz, H-3a), 2.96 – 3.09 (m, 2H, 6a), 3.36 – 3.49 (m, 2H, H-7a), 3.91 (dq, ³J= 6.3 Hz, ³J= 6.3 Hz, H-2a), 6.06 (br s, 1H, NH_a); *ent-98* δ= 1.19 (d, ³J= 6.4 Hz, 3H, H-1b), 1.22 (d, ³J= 7.0 Hz, 2H, H-4b), 1.96 (s, 3H, H-9b), 2.22 (br s, 1H, OH_b), 2.69 (dq, ³J= 4.1, 7.0 Hz 1H, H-3b), 2.93 – 3.14 (m, 2H, 6b), 3.35 – 3.49 (m, 2H, H-7b), 4.09 (dq, ³J= 4.1, 6.4 Hz, H-2b), 5.94 (br s, 1H, NH_b); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): *ent-97* δ= 14.7 (C-4a), 21.0 (C-1a), 23.1 (C-9a), 28.6 (C-6a), 39.3 (C-7a), 56.1 (C-3a), 69.9 (C-2a), 171.0 (C-8a), 203.8 (C-5a); *ent-98* δ= 11.5 (C-1b), 20.2 (C-4b), 23.2 (C-9b), 28.6 (C-6b), 39.4 (C-7b), 54.5 (C-3b), 68.3 (C-2b), 170.5 (C-8a), 203.9 (C-5a); HR-MS (ESI, 10 ev, *m/z*): C₉H₁₇NO₃SNa 242.0821[M+Na]⁺; gemessen: *ent-97* 242.0822 [M+Na]⁺; *ent-98* 242.0825; IR [cm⁻¹]: *ent-97* ν_{max}= 449, 753, 911, 1044, 1111, 1291, 1374, 1438, 1683, 2342, 2362, 3292; *ent-98* ν_{max}= 423, 430, 450, 760, 996, 1041, 1093, 1375, 1437, 1683, 2342, 2362, 3295.



5 Literaturverzeichnis

1. Weissman, K. J.; Leadlay, P. F., Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nat Rev Microbiol* **2005**, 3 (12), 925-36.
2. Hertweck, C., The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew Chem Int Ed* **2009**, 48 (26), 4688-4716.
3. Sahm, H. A., G.; Stahmann, K.-P.; Takors, R. *Industrielle Mikrobiologie*. Springer Berlin Heidelberg, **2013**.
4. Katz, L.; Ashley, G. W., Translation and protein synthesis: macrolides. *Chem Rev* **2005**, 105 (2), 499-528.
5. Berkow, R. L.; Kraft, A. S., Bryostatin, a non-phorbol macrocyclic lactone, activates intact human polymorphonuclear leukocytes and binds to the phorbol ester receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **1985**, 131 (3), 1109-16.
6. Schwecke, T.; Aparicio, J. F.; Molnar, I.; Konig, A.; Khaw, L. E.; Haydock, S. F.; Oliynyk, M.; Caffrey, P.; Cortes, J.; Lester, J. B., The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92 (17), 7839-43.
7. Lemke, A.; Kiderlen, A. F.; Kayser, O., Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol* **2005**, 68 (2), 151-62.
8. Folkers, K.; Langsjoen, P.; Willis, R.; Richardson, P.; Xia, L. J.; Ye, C. Q.; Tamagawa, H., Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, 87 (22), 8931-4.
9. Staunton, J.; Weissman, K. J., Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep* **2001**, 18 (4), 380-416.
10. Cane, D. E., Introduction: Polyketide and nonribosomal polypeptide biosynthesis. From Collie to Coli. *Chem Rev* **1997**, 97 (7), 2463-2464.
11. Birch, A. J., Biosynthesis of polyketides and related compounds. *Science* **1967**, 156 (3772), 202-6.
12. Dubey, N. C.; Tripathi, B. P.; Stamm, M.; Ionov, L., Smart core-shell microgel support for acetyl coenzyme A synthetase: A step toward efficient synthesis of polyketide-based drugs. *Biomacromolecules* **2014**, 15 (7), 2776-2783.
13. Khosla, C., Harnessing the biosynthetic potential of modular polyketide synthases. *Chem Rev* **1997**, 97 (7), 2577-2590.
14. Rawlings, B. J., Biosynthesis of polyketides (other than actinomycete macrolides). *Nat Prod Rep* **1999**, 16 (4), 425-84.
15. Kirschning, A.; Taft, F.; Knobloch, T., Total synthesis approaches to natural product derivatives based on the combination of chemical synthesis and metabolic engineering. *Org Biomol Chem* **2007**, 5 (20), 3245-59.
16. Corre, C.; Challis, G. L., New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. *Nat Prod Rep* **2009**, 26 (8), 977-86.
17. Challis, G. L., Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology* **2008**, 154, 1555-69.

18. Liou, G. F.; Khosla, C., Building-block selectivity of polyketide synthases. *Curr Opin Chem Bio* **2003**, 7 (2), 279-284.
19. Piel, J., Biosynthesis of polyketides by trans-AT polyketide synthases. *Nat Prod Rep* **2010**, 27 (7), 996-1047.
20. Heath, R. J.; Rock, C. O., The Claisen condensation in biology. *Nat Prod Rep* **2002**, 19 (5), 581-96.
21. Hopwood, D. A., Cracking the polyketide code. *PLoS Biol* **2004**, 2 (2), 17.
22. Lai, J. R.; Koglin, A.; Walsh, C. T., Carrier protein structure and recognition in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Biochemistry* **2006**, 45 (50), 14869-79.
23. Voet, D. J. V., J.G.; Pratt, *Lehrbuch der Biochemie* Wiley-VCH Verlag, **2002**.
24. Du, L.; Lou, L., PKS and NRPS release mechanisms. *Nat Prod Rep* **2010**, 27 (2), 255-278.
25. Rix, U.; Fischer, C.; Remsing, L. L.; Rohr, J., Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis. *Nat Prod Rep* **2002**, 19 (5), 542-80.
26. Guo, C. J.; Wang, C. C., Recent advances in genome mining of secondary metabolites in *Aspergillus terreus*. *Front Microbiol* **2014**, 5 (717).
27. Rawlings, B. J., Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A-erythromycin biosynthesis). *Nat Prod Rep* **2001**, 18 (2), 190-227.
28. Khosla, C.; Tang, Y.; Chen, A. Y.; Schnarr, N. A.; Cane, D. E., Structure and mechanism of the 6-deoxyerythronolide B synthase. *Annu Rev Biochem* **2007**, 76, 195-221.
29. Piel, J., A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99 (22), 14002-7.
30. Piel, J.; Hui, D.; Fusetani, N.; Matsunaga, S., Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. *Environ Microbiol* **2004**, 6 (9), 921-7.
31. Nguyen, T.; Ishida, K.; Jenke-Kodama, H.; Dittmann, E.; Gurgui, C.; Hochmuth, T.; Taudien, S.; Platzer, M.; Hertweck, C.; Piel, J., Exploiting the mosaic structure of *trans*-acyltransferase polyketide synthases for natural product discovery and pathway dissection. *Nat Biotechnol* **2008**, 26 (2), 225-33.
32. Moffitt, M. C.; Neilan, B. A., Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. *J Mol Evol* **2003**, 56 (4), 446-57.
33. Dreier, J.; Khosla, C., Mechanistic analysis of a type II polyketide synthase. Role of conserved residues in the beta-ketoacyl synthase-chain length factor heterodimer. *Biochemistry* **2000**, 39 (8), 2088-95.
34. Zhang, W.; Tang, Y., In vitro analysis of type II polyketide synthase. *Methods Enzymol* **2009**, 459, 367-93.
35. Chan, Y. A.; Podevels, A. M.; Kevany, B. M.; Thomas, M. G., Biosynthesis of polyketide synthase extender units. *Nat Prod Rep* **2009**, 26 (1), 90-114.
36. Austin, M. B.; Noel, J. P., The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep* **2003**, 20 (1), 79-110.

37. Weissman, K. J., Introduction to polyketide biosynthesis. *Methods Enzymol* **2009**, *459*, 3-16.
38. Shen, B., Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* **2003**, *7* (2), 285-95.
39. Fleming, A., On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Bull World Health Organ* **2001**, *79* (8), 780-90.
40. Hubbard, B. K.; Walsh, C. T., Vancomycin assembly: nature's way. *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, *42* (7), 730-65.
41. Robbel, L.; Marahiel, M. A., Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery. *J Biol Chem* **2010**, *285* (36), 27501-8.
42. Hur, G. H.; Vickery, C. R.; Burkart, M. D., Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Nat Prod Rep* **2012**, *29* (10), 1074-98.
43. Schwarzer, D.; Finking, R.; Marahiel, M. A., Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep* **2003**, *20* (3), 275-87.
44. Walsh, C. T.; O'Brien, R. V.; Khosla, C., Nonproteinogenic amino acid building blocks for nonribosomal peptide and hybrid polyketide scaffolds. *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, *52* (28), 7098-124.
45. Marahiel, M. A., Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics. *Chem Biol* **1997**, *4* (8), 561-7.
46. Fischbach, M. A.; Walsh, C. T., Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem Rev* **2006**, *106* (8), 3468-96.
47. Sattely, E. S.; Fischbach, M. A.; Walsh, C. T., Total biosynthesis: *in vitro* reconstitution of polyketide and nonribosomal peptide pathways. *Nat Prod Rep* **2008**, *25* (4), 757-93.
48. Finking, R.; Marahiel, M. A., Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu Rev Microbiol* **2004**, *58*, 453-88.
49. Sudek, S.; Lopanik, N. B.; Waggoner, L. E.; Hildebrand, M.; Anderson, C.; Liu, H.; Patel, A.; Sherman, D. H.; Haygood, M. G., Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from "*Candidatus Endobugula sertula*", the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *J Nat Prod* **2007**, *70* (1), 67-74.
50. Woo, A. J.; Strohl, W. R.; Priestley, N. D., Nonactin biosynthesis: the product of *nonS* catalyzes the formation of the furan ring of nonactic acid. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**, *43* (7), 1662-8.
51. Kwon, H.-J.; Smith, W. C.; Xiang, L.; Shen, B., Cloning and heterologous expression of the macrotetrolide biosynthetic gene cluster revealed a novel polyketide synthase that lacks an acyl carrier protein. *J Am Chem Soc* **2001**, *123* (14), 3385-3386.
52. Uria, A. R., Investigating natural product biosynthesis in uncultivated symbiotic bacteria of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Dissertation* Universität Bonn, **2012**.
53. Wilson, M. C.; Mori, T.; Ruckert, C.; Uria, A. R.; Helf, M. J.; Takada, K.; Gernert, C.; Steffens, U. A. E.; Heycke, N.; Schmitt, S.; Rinke, C.; Helfrich, E. J. N.; Brachmann, A. O.; Gurgui, C.; Wakimoto, T.; Kracht, M.; Crüsemann, M.; Hentschel, U.; Abe, I.; Matsunaga, S.; Kalinowski, J.; Takeyama, H.; Piel, J., An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature* **2014**, *506* (7486), 58-62.

54. Ueoka, R.; Uria, A. R.; Reiter, S.; Mori, T.; Karbaum, P.; Peters, E. E.; Helfrich, E. J.; Morinaka, B. I.; Gugger, M.; Takeyama, H.; Matsunaga, S.; Piel, J., Metabolic and evolutionary origin of actin-binding polyketides from diverse organisms. *Nat Chem Biol* **2015**, *3* (10).
55. Pavan M., B. G., Ricerche sulla differenziabilità, natura e attività del principio tossico di *Paederus fuscipes*. *Mem Soc Ento Ital* **1952**, *31* (67-82).
56. Kellner, R. L., Molecular identification of an endosymbiotic bacterium associated with pederin biosynthesis in *Paederus sabaeus* (Coleoptera: Staphylinidae). *Insect Biochem Mol Biol* **2002**, *32* (4), 389-95.
57. Piel, J.; Butzke, D.; Fusetani, N.; Hui, D.; Platzer, M.; Wen, G.; Matsunaga, S., Exploring the chemistry of uncultivated bacterial symbionts: antitumor polyketides of the pederin family. *J Nat Prod* **2005**, *68* (3), 472-9.
58. Piel, J.; Wen, G.; Platzer, M.; Hui, D., Unprecedented diversity of catalytic domains in the first four modules of the putative pederin polyketide synthase. *ChemBioChem* **2004**, *5* (1), 93-8.
59. Gu, L.; Geders, T. W.; Wang, B.; Gerwick, W. H.; Hakansson, K.; Smith, J. L.; Sherman, D. H., GNAT-like strategy for polyketide chain initiation. *Science* **2007**, *318* (5852), 970-4.
60. Calderone, C. T.; Kowtoniuk, W. E.; Kelleher, N. L.; Walsh, C. T.; Dorrestein, P. C., Convergence of isoprene and polyketide biosynthetic machinery: isoprenyl-S-carrier proteins in the *pkcX* pathway of *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (24), 8977-82.
61. Gu, L.; Jia, J.; Liu, H.; Hakansson, K.; Gerwick, W. H.; Sherman, D. H., Metabolic coupling of dehydration and decarboxylation in the curacin A pathway: functional identification of a mechanistically diverse enzyme pair. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (28), 9014-5.
62. Cichewicz, R. H.; Valeriote, F. A.; Crews, P., Psymberin, a potent sponge-derived cytotoxin from *Psammocinia* distantly related to the pederin family. *Org Lett* **2004**, *6* (12), 1951-4.
63. Pettit, G. R.; Xu, J. P.; Chapuis, J. C.; Pettit, R. K.; Tackett, L. P.; Doubek, D. L.; Hooper, J. N.; Schmidt, J. M., Antineoplastic agents. Isolation and structure of irciniastatins A and B from the Indo-Pacific marine sponge *Ircinia ramosa*. *J Med Chem* **2004**, *47* (5), 1149-52.
64. Jiang, X.; Williams, N.; De Brabander, J. K., Synthesis of psymberin analogues: probing a functional correlation with the pederin/mycalamide family of natural products. *Org Lett* **2007**, *9* (2), 227-30.
65. Fisch, K. M.; Gurgui, C.; Heycke, N.; van der Sar, S. A.; Anderson, S. A.; Webb, V. L.; Taudien, S.; Platzer, M.; Rubio, B. K.; Robinson, S. J.; Crews, P.; Piel, J., Polyketide assembly lines of uncultivated sponge symbionts from structure-based gene targeting. *Nat Chem Biol* **2009**, *5* (7), 494-501.
66. (a) Grimont, P. A.; Grimont, F., The genus *Serratia*. *Annu Rev Microbiol* **1978**, *32*, 221-48; (b) Ashelford, K. E.; Fry, J. C.; Bailey, M. J.; Day, M. J., Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* Grimont et al. 1983 to *Serratia quinivorans* corrig., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **2002**, *52*, 2281-9; (c) Bhadra, B.; Roy, P.; Chakraborty, R., *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea-utilizing species. *Int J Syst Evol Microbiol* **2005**, *55*, 2155-8; (d) Zhang, C. X.; Yang, S. Y.; Xu, M. X.; Sun, J.; Liu, H.; Liu, J. R.; Kan, F.; Lai, R.; Zhang, K. Y., *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *Int J Syst*

- Evol Microbiol* **2009**, *59*, 1603-8; (e) Geiger, A.; Fardeau, M. L.; Falsen, E.; Ollivier, B.; Cuny, G., *Serratia glossinae* sp. nov., isolated from the midgut of the tsetse fly *Glossina palpalis gambiensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **2010**, *60*, 1261-5; (f) Sabri, A.; Leroy, P.; Haubruge, E.; Hance, T.; Frere, I.; Destain, J.; Thonart, P., Isolation, pure culture and characterization of *Serratia symbiotica* sp. nov., the R-type of secondary endosymbiont of the black bean aphid *Aphis fabae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **2011**, *61*, 2081-8.
67. Williams, R. P., Biosynthesis of prodigiosin, a secondary metabolite of *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol* **1973**, *25* (3), 396-402.
68. Grimont, P. A. D.; Grimont, F.; Richard, C.; Davis, B. R.; Steigerwalt, A. G.; Brenner, D. J., Deoxyribonucleic acid relatedness between *Serratia plymuthica* and other *Serratia* species, with a description of *Serratia odorifera* sp. nov.. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1987**, *28*, 453-463.
69. Vespermann, A.; Kai, M.; Piechulla, B., Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Appl Environ Microbiol* **2007**, *73* (17), 5639-5641.
70. Kai, M.; Effmert, U.; Berg, G.; Piechulla, B., Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Arch Microbiol* **2007**, *187* (5), 351-360.
71. Weise, T.; Thürmer, A.; Brady, S.; Kai, M.; Daniel, R.; Gottschalk, G.; Piechulla, B., VOC emission of various *Serratia* species and isolates and genome analysis of *Serratia plymuthica* 4Rx13. *FEMS Microbiol Lett* **2014**, *352* (1), 45-53.
72. Samson, R.; Legendre, J. B.; Christen, R.; Fischer-Le Saux, M.; Achouak, W.; Gardan, L., Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **2005**, *55*, 1415-27.
73. Van der Wolf, J. M.; Nijhuis, E. H.; Kowalewska, M. J.; Saddler, G. S.; Parkinson, N.; Elphinstone, J. G.; Pritchard, L.; Toth, I. K.; Lojkowska, E.; Potrykus, M.; Waleron, M.; de Vos, P.; Cleenwerck, I.; Pirhonen, M.; Garland, L.; Helias, V.; Pothier, J. F.; Pfluger, V.; Duffy, B.; Tsror, L.; Manulis, S., *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *Int J Syst Evol Microbiol* **2014**, *64*, 768-74.
74. Parkinson, N.; DeVos, P.; Pirhonen, M.; Elphinstone, J., *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways. *Int J Syst Evol Microbiol* **2014**, *64*, 2264-6.
75. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Condemine, G.; Nasser, W.; Reverchon, S., Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu Rev Microbiol* **1996**, *50*, 213-57.
76. Barabote, R. D.; Johnson, O. L.; Zetina, E.; San Francisco, S. K.; Fralick, J. A.; San Francisco, M. J., *Erwinia chrysanthemi tolC* is involved in resistance to antimicrobial plant chemicals and is essential for phytopathogenesis. *J Bacteriol* **2003**, *185* (19), 5772-8.
77. Wu, X.; Zeng, Q.; Koestler, B. J.; Waters, C. M.; Sundin, G. W.; Hutchins, W.; Yang, C. H., Deciphering the components that coordinately regulate virulence factors of the soft rot pathogen *Dickeya dadantii*. *Mol Plant Microbe Interact* **2014**, *27* (10), 1119-31.
78. Glasner, J. D.; Yang, C. H.; Reverchon, S.; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Condemine, G.; Bohin, J. P.; Van Gijsegem, F.; Yang, S.; Franza, T.; Expert, D.; Plunkett, G., San Francisco, M. J.; Charkowski, A. O.; Py, B.; Bell, K.; Rauscher, L.; Rodriguez-Palenzuela, P.; Toussaint, A.; Holeva, M. C.; He, S. Y.; Douet, V.; Boccara, M.; Blanco, C.; Toth, I.; Anderson, B. D.; Biehl, B. S.; Mau, B.; Flynn, S. M.; Barras, F.; Lindeberg, M.; Birch, P. R.; Tsuyumu, S.; Shi, X.; Hibbing, M.; Yap, M. N.; Carpentier, M.; Dassa, E.; Umehara,

- M.; Kim, J. F.; Rusch, M.; Soni, P.; Mayhew, G. F.; Fouts, D. E.; Gill, S. R.; Blattner, F. R.; Keen, N. T.; Perna, N. T., Genome sequence of the plant-pathogenic bacterium *Dickeya dadantii* 3937. *J Bacteriol* **2011**, *193* (8), 2076-7.
79. Dorrestein, P. C.; Van Lanen, S. G.; Li, W.; Zhao, C.; Deng, Z.; Shen, B.; Kelleher, N. L., The bifunctional glyceryl transferase/phosphatase OzmB belonging to the HAD superfamily that diverts 1,3-bisphosphoglycerate into polyketide biosynthesis. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (32), 10386-7.
80. Calderone, C. T.; Bumpus, S. B.; Kelleher, N. L.; Walsh, C. T.; Magarvey, N. A., A ketoreductase domain in the PksJ protein of the bacillaene assembly line carries out both *alpha*- and *beta*-ketone reduction during chain growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105* (35), 12809-14.
81. Vergnolle, O.; Hahn, F.; Baerga-Ortiz, A.; Leadlay, P. F.; Andexer, J. N., Stereoselectivity of isolated dehydratase domains of the borrelidin polyketide synthase: Implications for *cis* double bond formation. *ChemBioChem* **2011**, *12* (7), 1011-1014.
82. Jenner, M.; Frank, S.; Kampa, A.; Kohlhaas, C.; Pöplau, P.; Briggs, G. S.; Piel, J.; Oldham, N. J., Substrate specificity in ketosynthase domains from *trans*-AT polyketide synthases. *Angew Chem Int Ed* **2013**, *52* (4), 1143-1147.
83. Kohlhaas, C., Chemisch-Molekularbiologische Studien zur Substratspezifität von Ketosynthase-Domänen in *trans*-AT-Polyketidsynthasen. *Dissertation* Universität Bonn, **2013**.
84. Matilla, M. A.; Stockmann, H.; Leeper, F. J.; Salmond, G. P., Bacterial biosynthetic gene clusters encoding the anti-cancer haterumalide class of molecules: biogenesis of the broad spectrum antifungal and anti-oomycete compound, oocydin A. *J Biol Chem* **2012**, *287* (46), 39125-38.
85. Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* **1994**, *22* (22), 4673-80.
86. Hall, T. A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Se* **1999**, *41*, 95-98.
87. Pöplau, P.; Frank, S.; Morinaka, B. I.; Piel, J., An enzymatic domain for the formation of cyclic ethers in complex polyketides. *Angew Chem Int Ed* **2013**, *52* (50), 13215-8.
88. Keatinge-Clay, A., Crystal structure of the erythromycin polyketide synthase dehydratase. *J Mol Biol* **2008**, *384* (4), 941-53.
89. (a) Less, S. L.; Handa, S.; Leadlay, P. F.; Dutton, C. J.; Staunton, J., Biosynthesis of tetronasin: Novel fluorinated and non-fluorinated analogues of tetronasin via intact incorporation of di-, tri- and tetraketide analogue precursors. *Tetrahedron Lett* **1996**, *37* (20), 3511-3514; (b) Less, S. L.; Handa, S.; Millburn, K.; Leadlay, P. F.; Dutton, C. J.; Staunton, J., Biosynthesis of tetronasin: Preparation of structural analogues of the diketide and triketide biosynthetic precursors to tetronasin. *Tetrahedron Lett* **1996**, *37* (20), 3515-3518; (c) Less, S. L.; Leadlay, P. F.; Dutton, C. J.; Staunton, J., Biosynthesis of tetronasin: Preparation of structural analogues of the tetraketide biosynthetic precursor to tetronasin. *Tetrahedron Lett* **1996**, *37* (20), 3519-3520.
90. Khosla, C.; Gokhale, R. S.; Jacobsen, J. R.; Cane, D. E., Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annu Rev Biochem* **1999**, *68*, 219-53.
91. Caffrey, P., Conserved amino acid residues correlating with ketoreductase stereospecificity in modular polyketide synthases. *ChemBioChem* **2003**, *4* (7), 654-7.

92. Caffrey, P., The stereochemistry of ketoreduction. *Chem Biol* **2005**, *12* (10), 1060-2.
93. (a) Rosillo, M.; Arnáiz, E.; Abdi, D.; Blanco-Urgoiti, J.; Domínguez, G.; Pérez-Castells, J., Combination of RCM and the Pauson–Khand reaction: One-step synthesis of tricyclic structures. *Eur J Org Chem* **2008**, *2008* (23), 3917-3927; (b) Chen, G.; Franck, R. W.; Yang, G.; Blumenstein, M., Anomeric effects of sulfones. *Can J Chem* **2002**, *80* (8), 894-899.
94. Ragoussis, V.; Theodorou, V., Stereoselective access to tetrahydropyranylacetic acid derivatives. Simple synthesis of (+)-(S,S)-(cis-6-Methyltetrahydropyran-2-yl)acetic acid. *Synthesis* **1993**, *01* (01), 84-86.
95. Dutta, S.; Kim, S.-K.; Patel, D. B.; Kim, T.-J.; Chang, Y., Some new DTPA-N,N'-bis(amides) functionalized by alkyl carboxylates: Synthesis, complexation and stability properties. *Polyhedron* **2007**, *26* (14), 3799-3809.
96. (a) Oishi, T.; Kanemoto, M.; Swasono, R.; Matsumori, N.; Murata, M., Combinatorial synthesis of the 1,5-Polyol system based on cross metathesis: Structure revision of amphidinol 3. *Org Lett* **2008**, *10* (22), 5203-5206; (b) Murphy, P. J.; Harri Lloyd, W.; Hibbs, D. E.; Hursthouse, M. B.; Abdul Malik, K. M., Biomimetic model studies towards ptilomycin A. *Tetrahedron* **1996**, *52* (24), 8315-8332.
97. Ragoussis, N.; Ragoussis, V., Improvement on the synthesis of (E)-alk-3-enoic acids. *J Chem Soc, Perkin Trans 1* **1998**, (21), 3529-3534.
98. Taft, F.; Brünjes, M.; Knobloch, T.; Floss, H. G.; Kirschning, A., Timing of the $\Delta_{10,12}$ - $\Delta_{11,13}$ double bond migration during ansamitocin biosynthesis in *Actinosynnema pretiosum*. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (11), 3812-3813.
99. Kubota, T.; Brünjes, M.; Frenzel, T.; Xu, J.; Kirschning, A.; Floss, H. G., Determination of the cryptic stereochemistry of the first PKS chain-extension step in ansamitocin biosynthesis by *Actinosynnema pretiosum*. *ChemBioChem* **2006**, *7* (8), 1221-1225.
100. Sabitha, G.; Reddy, S. S. S.; Raju, A.; Yadav, J. S., A concise stereoselective total synthesis of synargentolide A from 3,4,6-Tri-O-acetyl-d-glucal. *Synthesis* **2011**, *2011*, 1279-1282.
101. Smith, A. B.; Chen, S. S. Y.; Nelson, F. C.; Reichert, J. M.; Salvatore, B. A., Total syntheses of (+)-acutiphycin and (+)-trans-20,21-didehydroacutiphycin. *J Am Chem Soc* **1997**, *119* (45), 10935-10946.
102. (a) Dong, L.; Roosenberg, J. M.; Miller, M. J., Total synthesis of desferrisalmycin B. *J Am Chem Soc* **2002**, *124* (50), 15001-15005; (b) Swarts, B. M.; Guo, Z., Synthesis of a glycosylphosphatidylinositol anchor bearing unsaturated lipid chains. *J Am Chem Soc* **2010**, *132* (19), 6648-6650.
103. Wohlfahrt, M.; Harms, K.; Koert, U., Asymmetrische Allylborierung von vic-Tricarbonylverbindungen: Totalsynthese von (+)-Awajanomycin. *Angew Chem* **2011**, *123* (36), 8554-8556.
104. Marco-Contelles, J.; de Opazo, E.; Arroyo, N., Synthesis of higher-carbon sugars by addition of organometallic reagents to aldehydes or lactols derived from carbohydrates. *Tetrahedron* **2001**, *57* (22), 4729-4739.
105. Feixas, J.; Capdevila, A.; Guerrero, A., Utilization of neutral alumina as a mild reagent for the selective cleavage of primary and secondary silyl ethers. *Tetrahedron* **1994**, *50* (28), 8539-8550.
106. Kiren, S.; Williams, L. J., Configuration of the psymberin amide side chain. *Org Lett* **2005**, *7* (14), 2905-2908.

107. Caron, P.-Y.; Deslongchamps, P., Versatile strategy to access tricycles related to quassinoids and triterpenes. *Org Lett* **2010**, *12* (3), 508-511.
108. Moldenhauer, J. Synthese von Polyketidvorstufen zum Studium der Pederinbiosynthese. *Diplomarbeit*, Universität Bonn, **2006**.
109. Lebel, H.; Jacobsen, E. N., Enantioselective total synthesis of taurospongins A. *J Org Chem* **1998**, *63* (26), 9624-9625.
110. Schlosser, M.; Christmann, K. F., Olefinierungen mit Phosphor-Yliden, Mechanismus und Stereochemie der Wittig-Reaktion. *Liebigs Annalen der Chemie* **1967**, *708* (1), 1-35.
111. Brückner, R., *Reaktionsmechanismen*. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, **2007**.
112. Frank, S. Chemische und molekularbiologische Studien am Psymberin-Gencluster. *Dissertation* Universität Bonn, **2014**.
113. Csaky, A. G.; de la Herran, G.; Murcia, M. C., Conjugate addition reactions of carbon nucleophiles to electron-deficient dienes. *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (11), 4080-102.
114. Gilbert, I. H.; Ginty, M.; O'Neill, J. A.; Simpson, T. J.; Staunton, J.; Willis, C. L., Synthesis of β -keto and α,β -unsaturated *N*-acetylcysteamine thioesters. *Bioorg Med Chem Lett* **1995**, *5* (15), 1587-1590.
115. Lifchits, O.; Mahlau, M.; Reisinger, C. M.; Lee, A.; Farès, C.; Polyak, I.; Gopakumar, G.; Thiel, W.; List, B., The cinchona primary amine-catalyzed asymmetric epoxidation and hydroperoxidation of α,β -unsaturated carbonyl compounds with hydrogen peroxide. *J Am Chem Soc* **2013**, *135* (17), 6677-6693.
116. Raimundo, B. C.; Heathcock, C. H., Further studies on the *anti*-selective aldol reaction of chiral imides. *Synlett* **1995**, (12), 1213-1214.
117. C. Harris, R.; L. Cutter, A.; J. Weissman, K.; Hanefeld, U.; C. Timoney, M.; Staunton, J., Enantiospecific synthesis of analogues of the diketide intermediate of the erythromycin polyketide synthase (PKS). *J Chem Res, Synop* **1998**, (6), 283-283.
118. Pöplau, P. Chemische, genetische und biochemische Strategien zur Identifizierung von Polyketiden in *Serratia odorifera* und einem bakteriellen Symbionten von *Paederus fuscipes*-Käfern. *Diplomarbeit* Universität Bonn, **2010**.
119. Ueda, K.; Hu, Y., Haterumalide B: A new cytotoxic macrolide from an Okinawan ascidian *Lissoclinum* sp. *Tetrahedron Lett* **1999**, *40* (34), 6305-6308.
120. Takada, N.; Sato, H.; Suenaga, K.; Arimoto, H.; Yamada, K.; Ueda, K.; Uemura, D., Isolation and structures of haterumalides NA, NB, NC, ND, and NE, novel macrolides from an Okinawan sponge *Ircinia* sp. *Tetrahedron Lett* **1999**, *40* (34), 6309-6312.
121. Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H., High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids. *J Am Chem Soc* **1991**, *113* (11), 4092-4096.
122. Kigoshi, H.; Kita, M.; Ogawa, S.; Itoh, M.; Uemura, D., Enantioselective synthesis of 15-epi-haterumalide NA methyl ester and revised structure of haterumalide NA. *Org Lett* **2003**, *5* (6), 957-960.
123. Strobel, G.; Li, J. Y.; Sugawara, F.; Koshino, H.; Harper, J.; Hess, W. M., Oocydin A, a chlorinated macrocyclic lactone with potent anti-oomycete activity from *Serratia marcescens*. *Microbiology* **1999**, *145* (12), 3557-64.

124. Sato, B.; Nakajima, H.; Fujita, T.; Takase, S.; Yoshimura, S.; Kinoshita, T.; Terano, H., FR177391, a new anti-hyperlipidemic agent from *Serratia*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties, structure elucidation and biological activities. *J Antibiot* **2005**, *58* (10), 634-9.
125. Thaning, C.; Welch, C. J.; Borowicz, J. J.; Hedman, R.; Gerhardson, B., Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* apothecial formation by the soil bacterium *Serratia plymuthica*: identification of a chlorinated macrolide as one of the causal agents. *Soil Biol Biochem* **2001**, *33* (12-13), 1817-1826.
126. Totalsynthese von Haterumalid NA (Oocydin A). *Nachrichten aus der Chemie* **2006**, *54* (11), 1091-1095.
127. Li, A.; Piel, J., A gene cluster from a marine *Streptomyces* encoding the biosynthesis of the aromatic spiroketal polyketide griseorhodin A. *Chem Biol* **2002**, *9* (9), 1017-26.
128. Gill, S. C.; von Hippel, P. H., Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **1989**, *182* (2), 319-26.
129. Sambrook, J.; Russell, D. W., Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, C. S. H.*, New York, **2000**.
130. Nakabachi, A.; Ueoka, R.; Oshima, K.; Teta, R.; Mangoni, A.; Gurgui, M.; Oldham, N. J.; van Echten-Deckert, G.; Okamura, K.; Yamamoto, K.; Inoue, H.; Ohkuma, M.; Hongoh, Y.; Miyagishima, S. Y.; Hattori, M.; Piel, J.; Fukatsu, T., Defensive bacteriome symbiont with a drastically reduced genome. *Curr Biol* **2013**, *23* (15), 1478-84.
131. Hünig, S., Kreitmeier, P., Märkl, G., Sauer, J., *Arbeitsmethoden in der organischen Chemie*. Verlag Lehmanns: Berlin, **2006**.
132. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A., NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J Org Chem* **1997**, *62* (21), 7512-7515.
133. Dieckmann, M.; Kretschmer, M.; Li, P.; Rudolph, S.; Herkommer, D.; Menche, D., Total synthesis of rhizopodin. *Angew Chem Int Ed* **2012**, *51* (23), 5667-5670.
134. Sarabia, F.; Vivar-García, C.; García-Castro, M.; Martín-Ortiz, J., Cyclic sulfur ylides derived from Gleason-type chiral auxiliaries for the asymmetric synthesis of epoxy amides. *J Org Chem* **2011**, *76* (9), 3139-3150.
135. Rein, K.; Goicoechea-Pappas, M.; Anklekar, T. V.; Hart, G. C.; Smith, G. A.; Gawley, R. E., Chiral dipole-stabilized anions: experiment and theory in benzylic and allylic systems. Stereoselective deprotonations, pyramidal inversions, and stereoselective alkylations of lithiated (tetrahydroisoquinolyl)oxazolines. *J Am Chem Soc* **1989**, *111* (6), 2211-2217.
136. Benoit, D.; Coulbeck, E.; Eames, J.; Motevalli, M., On the structure and chiroptical properties of (S)-4-isopropyl-oxazolidin-2-one. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19* (9), 1068-1077.
137. James R. Gage, D. A. E., Diastereoselective Aldol condensation using a chiral oxazolidinone auxiliary: (2S*,3S*)-3-hydroxy-3-phenyl-2-methylpropanoic-acid. *Org Synth* **1990**, *68*, 83.
138. Walker, M. A.; Heathcock, C. H., Acyclic stereoselection. Extending the scope of the Evans asymmetric aldol reaction: preparation of anti and "non-Evans" syn aldols. *J Org Chem* **1991**, *56* (20), 5747-5750.

139. Deska, J.; Hähn, S.; Kazmaier, U., Stereoselective synthesis of deuterated β -cyclohexenylserine, a biosynthetic intermediate of the salinosporamides. *Org Lett* **2011**, *13* (12), 3210-3213.

6 Anhang

6.1 Alignment zur Bestimmung der PS-Sequenzen

```

OnnPS7:      CDKQGVVAVSLRGFSSRVVEKIETFRHSLQLTHADG-----MGKQGTATFTGS
BryPS5:      CDEQGNISVSMKGLSCRIFNENAHSSSEYSSTVVVKDKEDRLEHPLINI IKNENKYPVEKAHYISCFTGN
OocPS7:      CDDQGRICVSLRGFSTRMLPLSHPAENDVAPGSVTAVDTAS-----AAMAVGITSKALRGT
PedPS7:      CTKEGEVCVALRGFTSRSLPPSGATESRASASAASSTL-----VSTEGVSRFKGE
PsyPS6:      CDETGRVVRVSMKGLASRPVETGPATT-----ATHFSGR
MisPS15:     CDDRGIKCVLMRGFSSRIFHAQASPCFAETLLP----SQLHPLLHQHVPSEN---PVHDQFIAQFTGE
Ped-PSH1:    CDVHGRVCIRLRGFSSRALEAEQA-----
Onn-PSI2:    CDEQGHICIRLKRFSR-----
Bry-PSB1:    LDAQGVKCVRMRGFLSRVLPNN-----
Ooc-PS8:     YDDAGQLCVYLRGFSARTPEQATT-----
Ped-PSH2:    LCGPGLTRFKSRFEGTEFFLDDHR-----
Bry-PSX1:    YKYKSYIQLQHIAWATPFFIQKKT-----
Onn-PSI1:    FEPSTGLTLPQMVAVVLRELAQA-----
Bry-PSB2:    FERSLGLVLPDIEVAVLLEAVEGT-----
    
```

```

OnnPS7:      EFFLRDHGHVTPGALYLEMAYAAG----TFGQEKQVTGLRNVIWSKPMIVQG-KLDVTLRLEP-EGDH
BryPS5:      ESFLLDHGHVLPGVIYLEIICAAT----KIFTNQDVII IKNIVWNKPIKIE-SDREVSIIYLNK-INDC
OocPS7:      EYFLQDHGGVLPGMLSLEWMRELAESQRLTEDSEAVVGLNAVIWHQPVIIVGEAGADIDLALHR---DE
PedPS7:      EFFLRDHSGMLPAAVYLEMVRAFA----EGKHERKITGLSHVVWPKVLLVSGEGREVRTCLT-NVDRS
PsyPS6:      EHCLVDHGGMLPVAIHPAMIYQVE----MAR-DRLLSGLHQVWVWPAFKVDEHGPAIRVEMT-ADEGA
MisPS15:     EFFLRDHQQVMLGMAYLEMAHRAG----QHRASQKILGLKNVWVWSQLLFIAGQAREVSVHVQN-EVLQ
Ped-PSH1:    -----ALNDPVQTGE-----
Onn-PSI2:    -----VNSLAEEPFTALN-----
Bry-PSB1:    -----
Ooc-PS8:     -----
Ped-PSH2:    -----
Bry-PSX1:    -----
Onn-PSI1:    -----
Bry-PSB2:    -----
    
```

```

OnnPS7:      YRYVISVFN---RDGQIV--QPETCCQGHIIITAEQE-PNVAERLDLDAIQARCGSAKNTDACCQIMQS
BryPS5:      YEYQITTLN--SVQG-----DVLHSQGKILVGSRSNIKPPSDLKIEDIQSRCTVSIEPEKDELISK
OocPS7:      QGYHCVISR-----QGQIHAQGRVMTGVVG-AAAPQPLPLEDIELRCRQRSSHACAEFFGI
PedPS7:      SAFLISACE---QSSEGP--QEVTYCQGNLLPEVM-EEPGAALAIEAIAIRCPSVLEAKQCDRLQ
PsyPS6:      APTFELVSE---GAG-----QRIVHAQQGVSYGPPP-KIS--AIAWQDVQARCLASYDWAACDHLMQH
MisPS15:     HRFRITTONEDSLQN-----IHCQGLMVDQALYPERPDQLNIQDIQSRCSASIETTECDQLLQY
Ped-PSH1:    -----
Onn-PSI2:    -----
Bry-PSB1:    -----
Ooc-PS8:     -----
Ped-PSH2:    -----
Bry-PSX1:    -----
Onn-PSI1:    -----
Bry-PSB2:    -----
    
```

```

OnnPS7:      -THGPSLLSITQLHYNGHEALAEVLVPTVLGGDLQGYLLHPSMLNGAILSSVIFSLIQEPASP-LPMP
BryPS5:      NDQGPSILSIENLCHNDQMLARLKI PSSFEKENKQYLLCPSLMHGAVLSTVALSLIQEGKKR-GVLF
OocPS7:      -AIGPRLLGITEYQQGDHEALVTLAVHQEVVGVGEVQALHPALMNGAVLAAIMLAVGGERQGAR-PLM
PedPS7:      THGPALMSVQQLRYSRDREALALLQLPDELQMGWDDYGWHPSSLNGAILASVVWCLARAPRSRAGLPMP
PsyPS6:      -THGESLLSIESLACGDGEALARLKPQVSDDWGAEVAVQPAMLNAILAAVLLAMTEDKRDR-LPMP
MisPS15:     T-HGPSLLTIKQLWHNEHEALALLQLPDGMRSGREDYTLHPSMMNGAILTSVLFSLNNGPQEH-LPMP
Ped-PSH1:    -----
Onn-PSI2:    -----
Bry-PSB1:    -----
Ooc-PS8:     -----
Ped-PSH2:    -----
Bry-PSX1:    -----
Onn-PSI1:    -----
Bry-PSB2:    -----
    
```

```

OnnPS7:      FSLDQLVIHQTLQRAYVHVKASPPGHNPOSHAHMKRYDMDICDANGNLAVSFKGFTTIFP-----TD
BryPS5:      YSMKSMHIYAELSEVDYAYVRKSK-----VEHAKKYDIDLISAEGKVIIVSIKELTLLSL-----KNK
OocPS7:      FSLDTRLRIYQPLPASVLAYIRQKPSDTGSEQEHRVHCDIWFTDHHGQILVEMKGLSMIGAQ----AS
PedPS7:      FSLDRLRVFPFERQMQAYVRRHGSARSLG--ENLEKVIDLDDSQGRCLASLEGFTLVF-----AP
PsyPS6:      FSLTSMWLYRAIPDRAVAHVKRLREGVGT---QPVATFNVTIADLDGQVLATLTELTLVFPQ-----AP
MisPS15:     FALDELWMYQEMPERAYAYVSMSS-----ANNHDIELVDITGKCIVLFKGFATAIQGAWQSQA
Ped-PSH1:    -----
Onn-PSI2:    -----
Bry-PSB1:    -----
Ooc-PS8:     -----
Ped-PSH2:    -----
Bry-PSX1:    -----
Onn-PSI1:    -----
Bry-PSB2:    -----

OnnPS7:      RPYRRLTATPQWQNPQLSQPQTPAP---VA
BryPS5:      LEKNVIHASVKWQEHPLPDKKIDAS---IY
OocPS7:      PAASLVFARPQWIMQRVGSVKERDRAPDAL
PedPS7:      DANRLVYAIPOWVEQALPARVAASAPLAVQ
PsyPS6:      EHDRLVYAKPVWTPCPLAVSPSDSD----V
MisPS15:     PQNNVIYASTQWRESVLSGDEHANT--AAS
Ped-PSH1:    -PDSATTVLCEPLWNERSVDSQAQVLWARH
Onn-PSI2:    -NGQTLCYKPLWQEKAVTV---TARRLEDA
Bry-PSB1:    -NSSTLLFHPVWRSQTLSS---GNN-LPN-
Ooc-PS8:     -QKGTLMLVPQWLRKPVVNTVAPYSYAS
Ped-PSH2:    -----
Bry-PSX1:    -----
Onn-PSI1:    -----
Bry-PSB2:    -PGK--DADMETWAQD-----

```

Abbildung 96: Alignments von *trans*-AT-PKS mit der Modulabfolge **KS-DH-PS-KR-ACP** (OnnPS7-MisPS15, schwarz) und *trans*-AT-PKS mit der Modulabfolge **KS-DH-KR-ACP** (Ped-PSH1-Bry-PSB2, grün); Beschriftung: Gencluster (erste drei Buchstaben: Onn, Onnamid (**46**); Bry, Bryostatin (**2**); Ooc, Oocydin A (**59a**); Ped, Pederin (**27**); Psy, Psymberin (**41**); Mis, Misakinolid A (**40**), PS für Pyransynthese, Ziffer für die Modulnummer entsprechend der Reihenfolge im vorliegenden Gencluster..

6.2 Alignment von PS- und DH-Domänen

```

*
OocPS7:      -TAVD----TTASAAMAVG--ITSKALRGTEYFLQDH----GGVLPGMLSLEWMRELAES
PsyPS6:      -RPVE----TGPAT-----TATHFSGREHCLVDH----GGMLPVAIHPAMIYQ-VEM
SorPS15:     -LPVL----RRSAATAEGE--SFVQGQLSGDEFFLRDH----DQLLPGVVHLEMARAAAAM
SorPS8:      -HPLV----HREVADAEGRR-AFAAVFDGAEPFLMDH----EQLFPVAVAYLEMARAAEA
SorPS19:     -HPLV----HRDVSTPEQR--EFSSAFSGAEWFLKEH----GQLFPAPAYLEMARVAGET
BryPS5:      -HPLINI IKNENKYPVEKA--HYISCF TGNESFLLDH----GHVLP GVIYLEIICAATKI
PedPS7:      -STLV----ST-----EGVSRFKGEEFFLRDH----SGMLPAAVYLEMVRFAEAG
OnnPS7:      -HSLV----QTLHADGMGK--QGTATFTGSEFFLRDH----GHVTPGALYLEMAYAAGTF
MupDH4:      -HPLL----SRQITAGDSQ--QFEVQFCGDEFFLDHHRVNGRKVLP GVVYLEMALAALSRS
BaeDH4:      -HPLL----HENVSNMSGV--RFRSFSFGGEEFFLKD H VVKNER TLP GAAYLEMVRAAVEH
OocDH8:      -HPLV----HRNTSDMTSL--CFTSWFDGREFFLAD H LVMGKKLLP GVAYLEMARA AVEQ
PsyDH6:      -HPLV----QRNVSTLGCQ--RFVSSFSGREFF FAD H HIGGEALLP GMAFEMARAA FVA
OocDH7:      -HPLL----QENASTLAEL--RFRSEFSGEEFFLAD H QIHGQK VLP GVSYLEMARA AYT Y
BryDH2:      -HPLL----HRNTSDFSCQ--RFSSTFNGSEFFLTD H LILGKKILP GAAYFEMVREAIKQ
PedDH10:     -YPLL----QRTVADPAKR--CYGCVL TGEFFLTD H QVKG NKVLP GVAYLEMARA AVER
SorDH10:     -HPLV----QRNTSSFDGL--RFSSTLRGSEFFLSD H VVQGK K VLP GACYLEMARA AARA
SorDH15:     -HPLV----QRNTSTLQQ--RFSTT LSGDELFLRD H RVQGK P VVP GVAYLEMARA AVMA
SorDH19:     -HPLL----HRNTSTFEEQ--RFSSTLSGAEGFLKD H VI GGHKVLP GVCYLEMARA AVMA
BryDH5:      -HPLL----HKNTSDWYGQ--KFTSIFNGEEFFLRD H VVQGGKMLP GVTYLEMARA AVQQ
PedDH7:      -HPLV----QRNTSTLDRH--CFESSFDGSEFFFRD H RVQGQ P L L P AVAYLEWARAAAQI
OnnDH7:      -HPLL----HQNTSTLFQQ--RFGSSFSGEEFFLAD H QVNGRRTLP GVAYLEMACA AATY
OnnDH9:      -HPLL----HQNTSDLKGQ--RFSSTFSGQEF : FLAD H VVKG QK VLP GVAYLEMARA AVL R

OocPS7:      QRL---TEDSEAVVGLNAVIWHQPVI VGEAGAD-----IDLALHRDEQG-----
PsyPS6:      ARD-----RLLSGLHQVVWPQAFK VDEHGPA-----IRVEMTADEGAP-----
SorPS15:     SRG-----RPVSALKNVVWLDALMVAAGART-----LQIALSAERDGA-----
SorPS8:      ADL-----SIAGIRNALWISPLVIRDRACE-----LRVVLSDAESGR-----

```

SorPS19: GSG-----VKVVGIRNALWVAPLVIQERPCE-----VRVRLATAKDGW-----
 BryPS5: FTN-----QDVI I IKNIVWNKPIKIESDR-E-----VSIYLNKINDCY-----
 PedPS7: KHE-----RKITGLSHVWVWPKVLLVSGEGRE-----VRTCLTNVDRSA-----
 OnnPS7: GQE-----KQVTGLRNVIWSKPMIVQGKL-D-----VTLRLEPEGDHY-----
 MupDH4: VSG-----QADLALNSILWVRPFECFNDPVT-----LTLAVEQARKGS-----
 BaeDH4: AAE-----TKEEGTVRLKHVVWIRPFTAADDESAD-----LYLRLYDEENGE-----
 OocDH8: VVG-----VGLHLQLTQIVWVRPFIAEHQGAAPSTSTESYPLTVKLLPQSAKV-----
 PsyDH6: SLE-----PAEATPVRLSHIVWLRPLMAGESGCT-----VHVDLQLGAGGT-----
 OocDH7: ASSLSMSASQPPHFSLKQVLWLQPVIAATQQTTT-----IYLGLEYQENGL-----
 BryDH2: ACG--FLDNSEVVIQLNDIVWTKVIAVDDDIKE-----VHIDLFEVNGSESECLTH
 PedDH10: ISA--HDARDKAPLYLKNVWVARPLMVNGATS-----LYISLAPEQDGR-----
 SorDH10: CLE--LGVEAEGRLSLRNVVWMPAVVERPQ-E-----IHVRLRAEPDGE-----
 SorDH15: SLE--TEHQRSARLHLTSVVWRRPLVVSAP-E-----VHVRLRAAGDGE-----
 SorDH19: SSG--DLAEVYVRLSVVWARPVVDQPSA-----VHVRLTARDGGD-----
 BryDH5: SIG--LCEDKKISIQLNNVWIKSPIEIGFNQQE-----VNIRFYRDKQIP-----
 PedDH7: ALG--NACPDVALKLSNVVWIGPLLAEQPIVG-----TITLQAREDRG-----
 OnnDH7: ASE--AADQTGLQLQNTWLRPLHVDDRQAD-----VSIRLLAEAPGR-----
 OnnDH9: AGG--TPDAQTAMRLRNIVWTQPVLIBEQAKE-----VHIRLFAQEQGR-----

OocPS7: -----YHCVI-----SRQGG--IHAQGRVMTGVVGAAPQP-----LPLEDIE
 PsyPS6: -----TFELVS-----EGAGQRIVHAQQQVSYGPPPKISA-----IAWQDVQ
 SorPS15: -----TFKVSA-----DDALTPAKVLAQGTVLFDRGSEAPR-----VDLDALR
 SorPS8: -----AYEVSS-----SRGVHARGLLVFDEPPAQPAPRP-----ALDIEAVR
 SorPS19: -----AYTVET--AATTGGDARRSIHAQGLLILEGVAERPAPP-----ALDIEAIR
 BryPS5: -----EYQITT-----LNSVQGDVLHSQGGKILVGSRSNIKPPSD-----LKIEDIQ
 PedPS7: -----FLISA--CEQSSEGPQEVTYCQGNLLLPEVMEEPAA-----LAIEAIA
 OnnPS7: -----RYVISV--PNRDGQIVQPETCCQGHII TAEQEPNVAER-----LDLDAIQ
 MupDH4: -----GWEFEFFAWLTREPGGEPVVRQVYCRGQASVPAEPAPLAH-----LDVNALA
 BaeDH4: -----MGFTVYS--ESASSEEEPVLYAQGSAAVFRAGEPAK-----IEIDKLR
 OocDH8: -----IRFDICS-----LMADGQTQVHCQGKVLVIDPLSDDGER-----LDLSVAM
 PsyDH6: -----ARFAICS-----GDELVHVQGGAEQVHATDAEM-----LDLAAALQ
 OocDH7: -----IDYQIYS-----ENELQQRTHGQGIIDPCMNALTENKALAQGYLDLDDLK
 BryDH2: EFDRQNISLNYEVYTQNSEGNRQNKKI IHNHGMVTLSSLNTTEV-----VDLDELRL
 PedDH10: -----VAYRIYS-----EGEGESTEILHSQGSAILRGESESGSEVAT---ARLDLDELRL
 SorDH10: -----IEFEIGA-----ADAHEGGVLAKGIVVLDGAFAPDR-----IDLQAYR
 SorDH15: -----IDFEIFT--VSSADEQTVVHVQGRAVLTEERASAS-----IDVGALR
 SorDH19: -----IDFEIVT-----AGAGDDVVHAQGRAALIERLRGEAGE-----VDVAALL
 BryDH5: IRESIDEQITYEITY--GPADPSDLKTSLRQGVATFSCDKYSAINI--EKSLDIPHLK
 PedDH7: -----IDYQISS--VSAAGQQPVVHCQGIATTEETEKEAAPV-----LDLDALR
 OnnDH7: -----IRYDIYT--QGGADETALCIHNQGTAILSGEDHQPV-----LDLAGLR
 OnnDH9: -----IQYDIYT--MPDATSDQEPVVHSLGSATFFDTPDVER-----LDIPELQ

OocPS7: LRC-RQRRSHHA-----CAEFF--GIAIGPRLLGITEYQQGD-----HEALVTLAVHQ
 PsyPS6: ARC-LASYDWAA-----CDHLMQH---THGESLLSIESLACGD-----GEALARLKQPG
 SorPS15: ARC-TKQLDGVA-----CDRIV---GAAHGPSMRTIEWLSHGD-----REGLARVTLPA
 SorPS8: TRC-AIEVDART-----RNEAM--GMPASYDKLWIASLVHSD-----HEALASLQAPS
 SorPS19: ARC-RTTADAKA-----RAATMQ---MAAYDHSRIESLVHSG-----KEALAAALRLSE
 BryPS5: SRC-TVSIEPEK-----CDELISKN--DQGPSILSIENLCHND-----CQMLARLKI PS
 PedPS7: YRC-PSVLEAKQ-----CDRLLOS---THGPALMSVQQLRYS-----REALALLQLPD
 OnnPS7: ARC-GSAKNTDA-----CNQIMQS---THGPSLLSITQLHYNG-----HEALAEVLVPT
 MupDH4: ALA-QGAASTE-----FYRHFAAVGIEYGPQHGLHALRGA-----EQVLGHVRLPD
 BaeDH4: ES--RRLITPDA-----CYQAYKQMGIEYGDHAKAVTEIYAKD-----SKVLAKLSLPS
 OocDH8: AEHQQGIMDKLE-----CYQAFRELGIVYGPQHGGIERLYLAK-----GRVLARLTLPE
 PsyDH6: ERVAEYVFSADR-----CYAAYERVGSYGLTHRGLLVQQTARWGT--GVEVLAQVRLPD
 OocDH7: KQMTGPEYPAAY-----CYQTFLDMGLNYGEAFQOGIEQLLTGE-----RQVLARISLPD
 BryDH2: SHINQASLNAEQ-----CYLAFESIGVQYGRHRCIDTVYIGE-----HQVLAKLSMPE
 PedDH10: ERITGGAPNAQRLESARCYEAFRAMGIDYGPAHRCLESVYFSAKEALPAPEVLAKLVLPA
 SorDH10: SRC-ERSIDVGL-----CYEAFRAMGLDYGPAHRGLSSVDVGVAD--GRRFVLAARVELPD
 SorDH15: ATC-TRLVPVER-----LYALGDSSGVTLPAPHRVTSMRVGVVDVE--GRRCVLAEVTLPD
 SorDH19: ARR-EQTIAVDR-----LYEAFASMGIAYPAPHRGVRVSVGVGRDAG--GGAYVVAEVTLP
 BryDH5: SLSQESLQIKQ-----CYEHFKQTMGYGLSHQAI DALYIGD-----YQVLAKLSLPE
 PedDH7: SRLTQKEIGVER-----CYAALEAAGVNHGPAMRGLQAVSRNA-----EEVLATLRLPA
 OnnDH7: TAS-QLELSVEQ-----CYAAFREKGI IYGPGRHGIQAVYAGH-----RQVLAKLAIPA
 OnnDH9: ARLSWQSFGSAA-----CYAAFESIGIHYGPQHGLETVYLGHGED--DEAQILAKLSLPA

```

#
OocPS7:      EVVGVGEVQALHPALMNGAVLAAIMLAVG-----GERQGA-RPLMPFSLDTRLIY
PsyPS6:      VSDDWGAIEVAVQPAMLNGAILAAVLLAMT-----EDKRDR--LPMFSLTSMWLY
SorPS15:     GLGEANGGCVLHPSVMHGAVTAAIALGLL-----QDGRPS-QLRFPYALEQVWIH
SorPS8:      A--PGDEAFLLDPNLGNSVLVPAIFLSLI-----QDGERE--WRFPHYTLEALWIY
SorPS19:     G---DGGDYVLHPHVGNLSILEPAVFFSLV-----QDGQRQ--WRFPYSLDALWIY
BryPS5:      SFEKENKQYLLCPSLMHGAVLSTVALSLI-----QEGKKR-GVLFPHYSMKSMHIY
PedPS7:      ELQMGWDDYGWHPSSLNGAILASVVWCLA-----RAPRSRAGLPMFSLDRLRVF
OnnPS7:      VLGDDLQGYLLHPSMLNGAILSSVIFSLI-----QEPAS--PLMPFSLDQLVHI
MupDH4:      FLKPG-DEFRLHPCLLDSALQAAMGFTTG-----SESSQ-GPQVFPFSLQTLTG
BaeDH4:      SISHTKDQFVLHPSLLDAAFHATIGLMLD-----RDGTDI-RPMLPFALEQIDVL
OocDH8:      TLSETLGDYVLHPSLMDAALQATLGLSRE-----H-RLGLPFDMESMDIL
PsyDH6:      DITDTAADYVLHPALLDAAMQASIGLALH-----ANEQNGVARPFAPFALDELTIIY
OocDH7:      T--APSSAFGLHPSLMDAALQTSGLNHS-----GLQPG-AAYVFPFALEQLDVF
BryDH2:      IAGDLKCFVLHPGMVDSALQATLGLTSDINDIMLADRQADYILTPKSTLPFALEKLEII
PedDH10:     WAQEGAAAFVLHPGLIDSGLQACIGLIVGAGHELPTAESEISGM-TATLPFALDSLTL
SorDH10:     GVRATAQQYVLHPSVLDGALQASIGIALA-----DTGDGRAASRPVFPFALETLEFV
SorDH15:     CASKGESEYVLHPSVLDGALQASIGIALA-----EGDPNGEHASVRPLPFALETLEIL
SorDH19:     GSVDTREPFVHPSVLDQAFQASLGLVLA-----QPSATGSANPTLPFALESIDIL
BryDH5:      CVKDTQTQFVLHPSLMDSALQASIGLSTV----IDINETDQPTPTFTSALPFALENIDI
PedDH7:      ETVGEASAYVLHPAILDAALQASIALTLR---DDEVEPSPETSPR-PVLLPFALESRLVY
OnnDH7:      AVADTAGQFMLHPSLMDSALQASIGLTLG-----NRQTS AEDR-RTLLPFALERLKIT
OnnDH9:      SVAQTLNQLAEHPSLLDAALQAFIFGALG-----LGDQGTQNLSLPFAVEEVDII

OocPS7:      QPLPASVLAYIRQKPSDTGSEQEH---RVVHCDIWFTDHHGQILVEMKGLSMIGA
PsyPS6:      RAIPDRAVAHVKRL--REGVGTQP----VATFNVTIADLDGQVLATLTELTLVFP
SorPS15:     SRTPDIAYVYVRES--ADSR-GEK----VRKYDLDIVDESGRCAVALRGFTAVAA
SorPS8:      SDPRRGAYVHARRA--AEDGQAAR----FGRYDVLDVDASGNCLMAFRGLTAVPA
SorPS19:     SEIPERPYYVYVRES--AGAG-SAR----ARKYDIDVDERGRCAIIRGFMAVSA
BryPS5:      AELSEVDYAYVRKS--KVEH-----AKKYDIDLI SAEGKVIIVSIKELTLSSL
PedPS7:      QPFERQMAYVRRH-GSARSLGEN----LEKVDIDLDSQGRCLASLEGFTLVFA
OnnPS7:      QTLPQRAYVHVKAS--PPGHNPQS-HAHMKRYDMDICDANGNLAVSFKGFTTIFP
MupDH4:      RSRRTPAWVRLTAH--TSGG-GRG----SFAFDVEVFDAQGEPVHHLGLRSRVM
BaeDH4:      KSCKSDMWVSIAYS--GESKPEDA----VQKLDIDVCDEQGNVCKMTGYSAREI
OocDH8:      HRCTSAMWACITYDGGIEPDPQAK----VQRLTIKLYDDAGQLCVYLRGFSARTP
PsyDH6:      GSCATSAAVWIR---AERPPSTE----HHRFDLMLCDETRVVRVSMKGLASRPV
OocDH7:      GEVDTQLWVWLRV--STANPADE---VQKMDIDLCDQGRICVSLRGFSTRML
BryDH2:      GKCTDSMWVWIRNSLSTDQKSPRSVAVNDIQHLDIDLDAQKVCVVRMGRGFLSRVL
PedDH10:     APPSDILWVWVRYA--DGSSTSDK----VQKLDIDFCDVHGRVCIRLRGFSSRAL
SorDH10:     DRSPSRAWVLARPA--AGEGGGTG---GAHRWNIDIGDETGRVCVRLAGLAARAL
SorDH15:     DRSPPEAIVRVQA---RETGAARD----LRRLDVDICDEAGKVCVVRMRNFTFRSL
SorDH19:     AERSPERSYVYIRSR--TDGQQAER-SQVQKLDLVDCAQGRVCLRLRGLTSRVL
BryDH5:      KECTASMWAVVRTS--KVYTDTSK----IRKLDIDLCEQGNISVSMKGLSCRIF
PedDH7:      APCCASMWAWIRLV--AVEHAGQA----LQRLDVDICTKEGEVVCVALRGFTSRSL
OnnDH7:      GHCATEMWAWIRFS--KDSVPGDS----IQKLDIDLCDKQGVVAVSLRGFSSRV

```

Abbildung 97: Alignment von PS- und DH-Aminosäuresequenzen. Beschriftung: Gencluster (Bae, Bacillaen; Bry, Bryostatin; Mup, Mupirocin; Onn, Onnamid; Ooc, Oocydin; Ped, Pederin; Psy, Psymberin; Sor, Sorangicin), Ziffer für die Modulnummer entsprechend der Reihenfolge im vorliegenden Gencluster. Konservierte Motive in rot dargestellt. * = Erste Aminosäure des Histidin-Motivs; # = Erste Aminosäure des Aspartat-Motivs (nur in der Aminosäuresequenz der DH-Domänen).

6.3 Vektorkarten

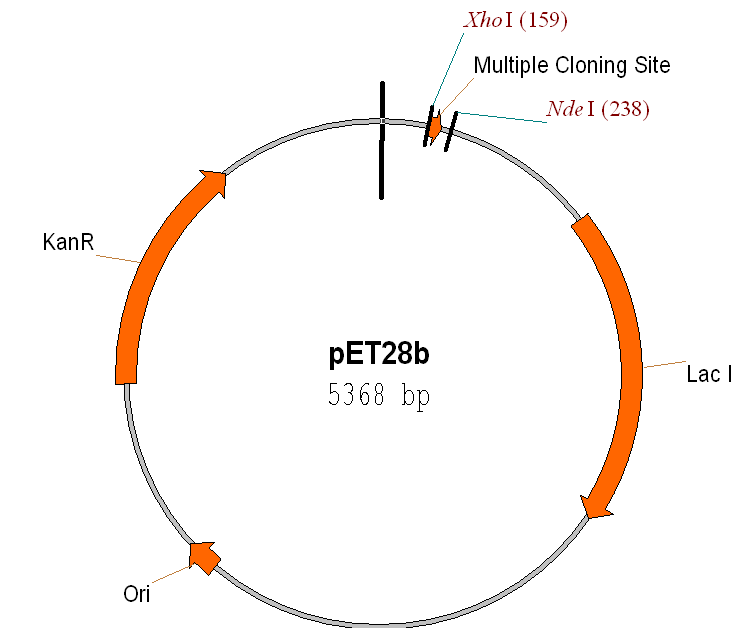


Abbildung 98: pET28b (-).

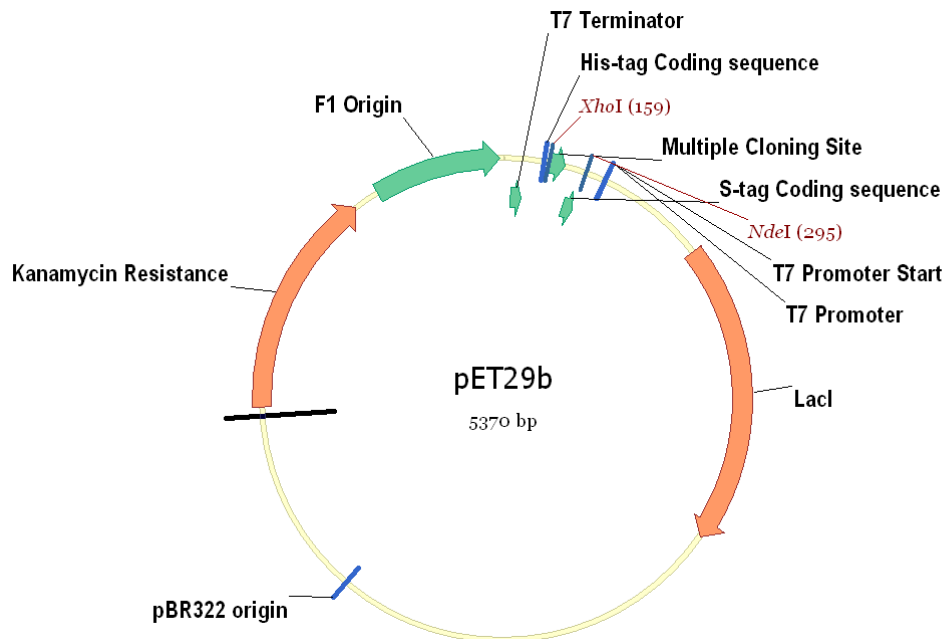


Abbildung 99: pET29b (-).

6.4 NMR-Spektren

6.4.1 NMR-Spektren Synthese

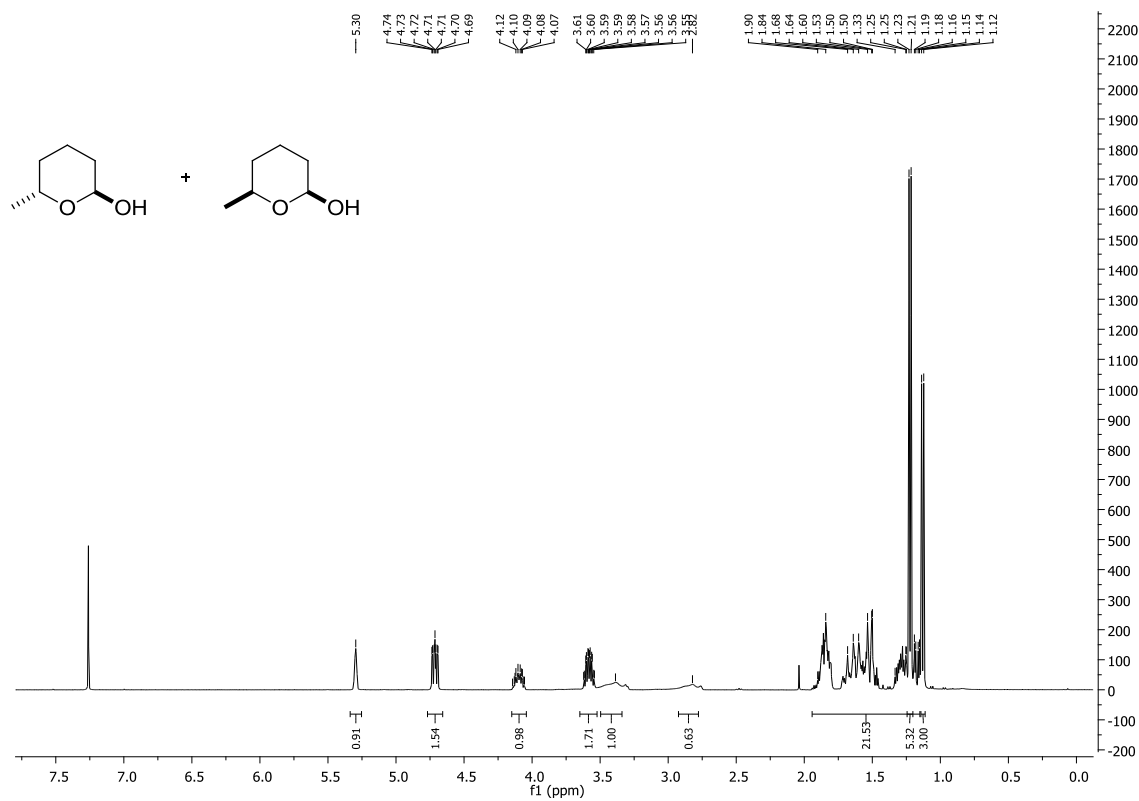


Abbildung 100: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Lactole **87a** und **87b**.

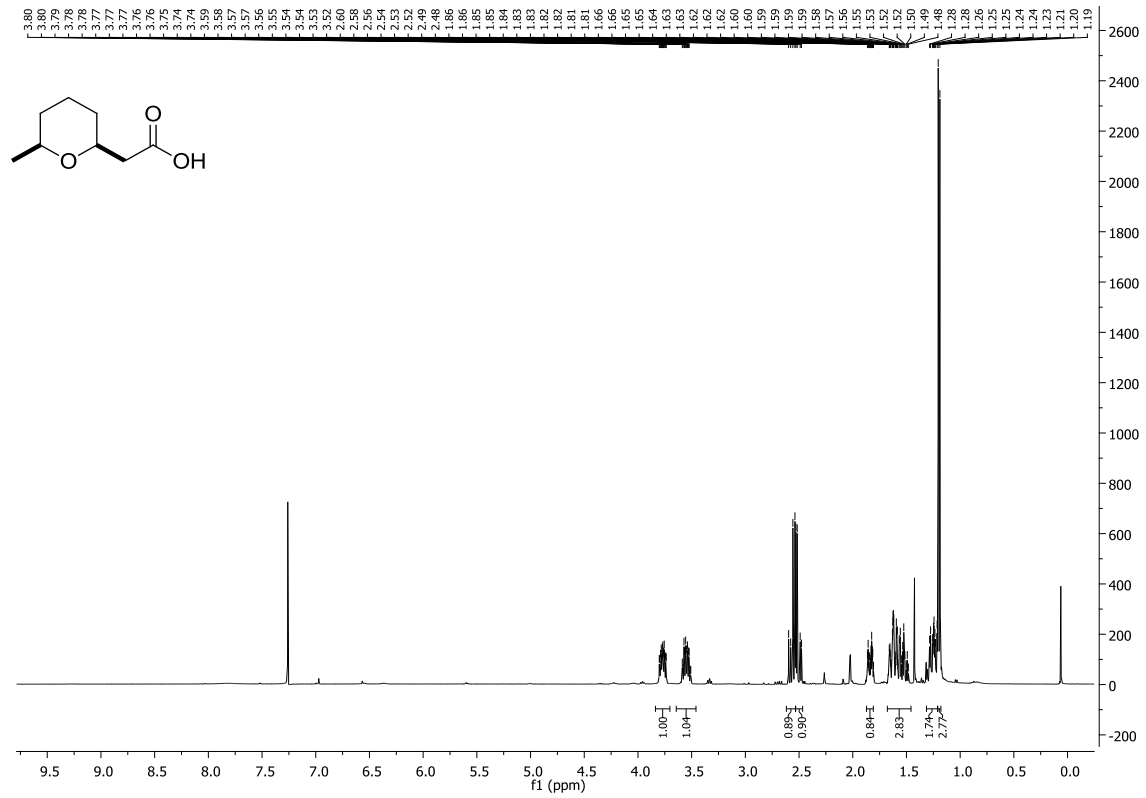


Abbildung 101: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure *syn*-68.

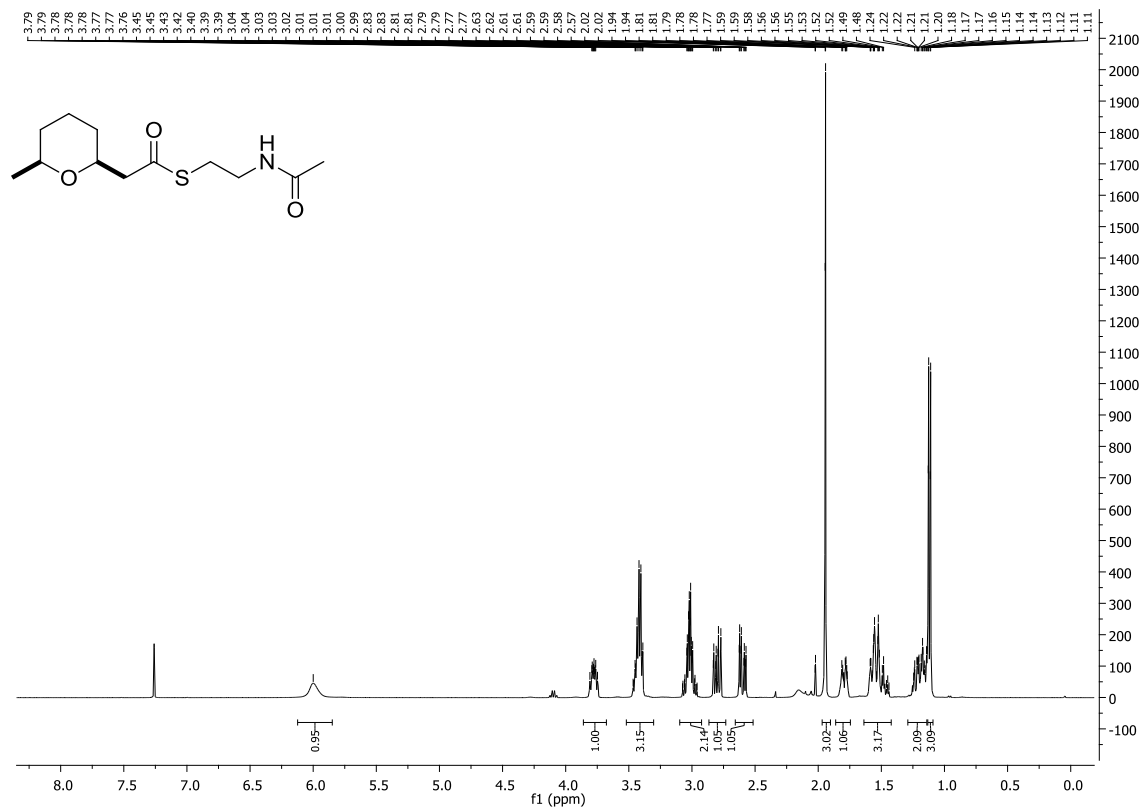
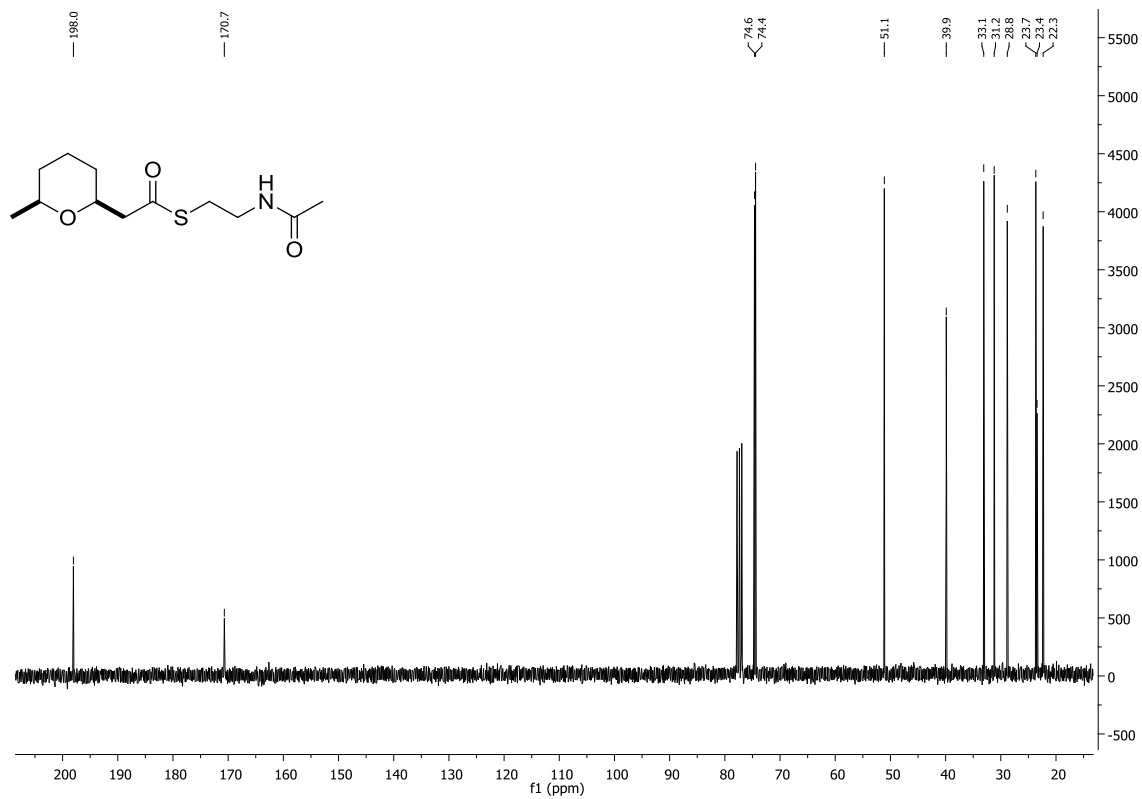
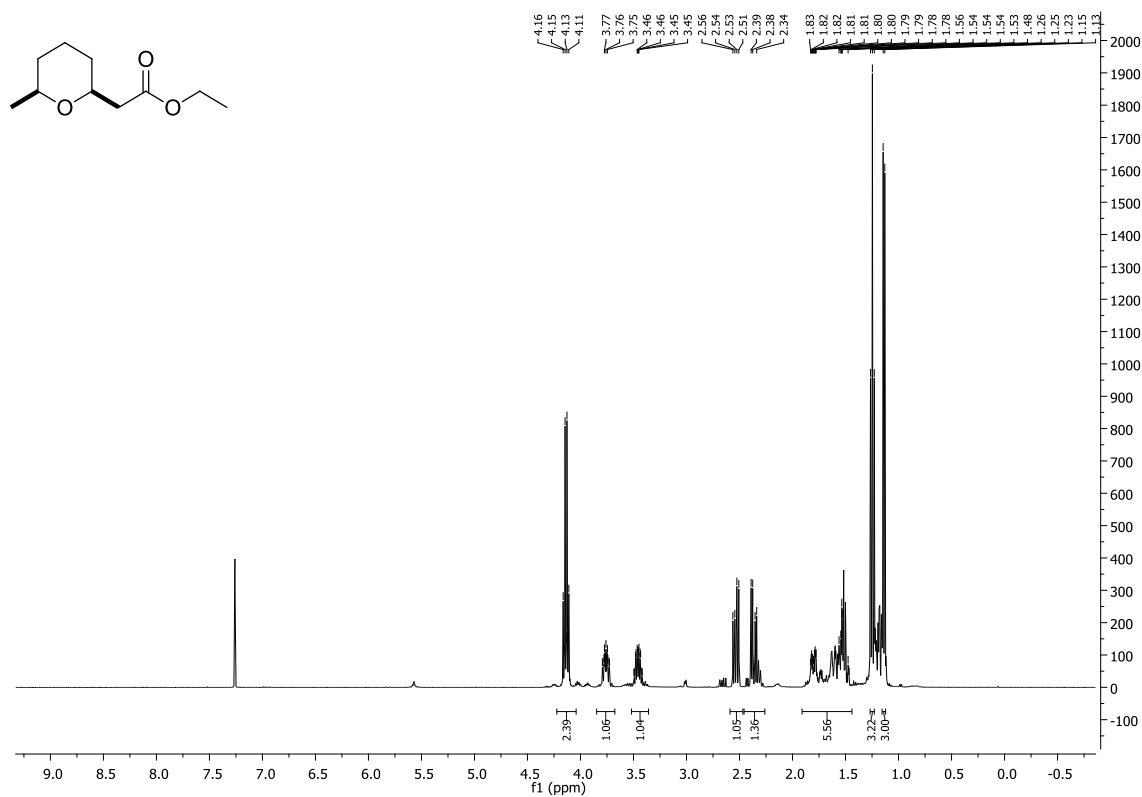


Abbildung 102: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters *syn*-66.

Abbildung 103: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters *syn*-66.Abbildung 104: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Ethylesters *syn*-70.

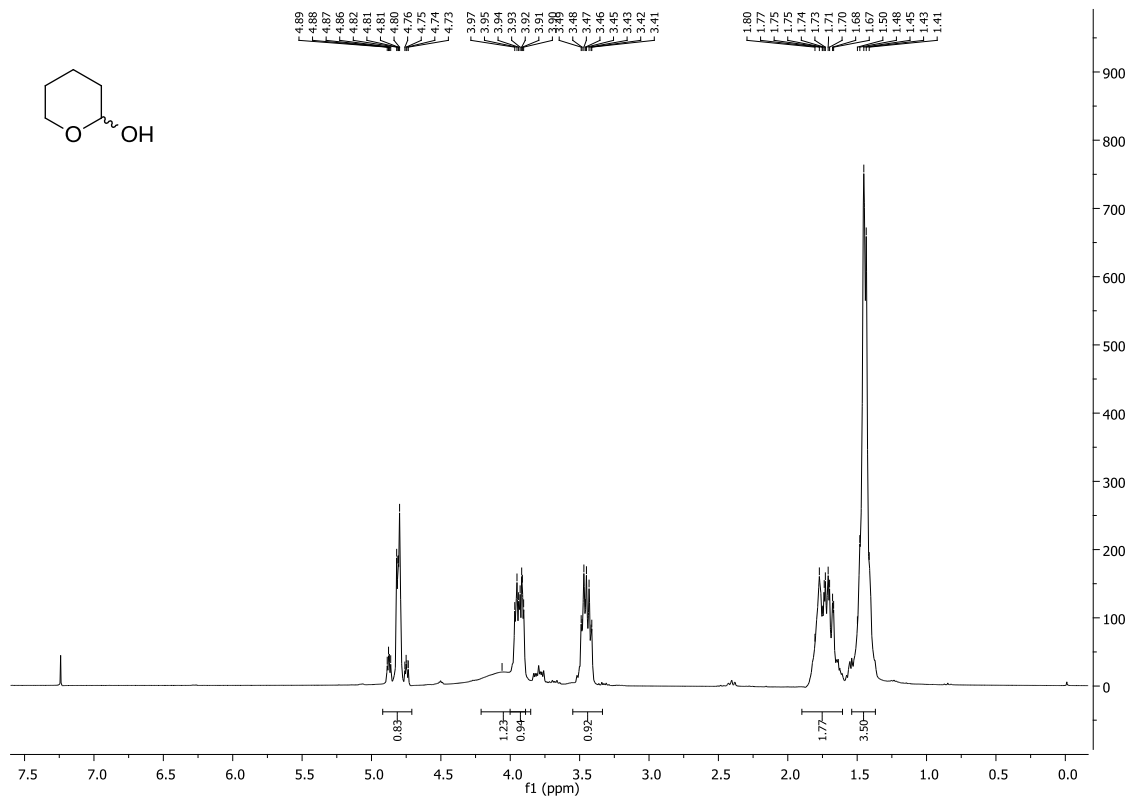


Abbildung 105: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Lactols 90.

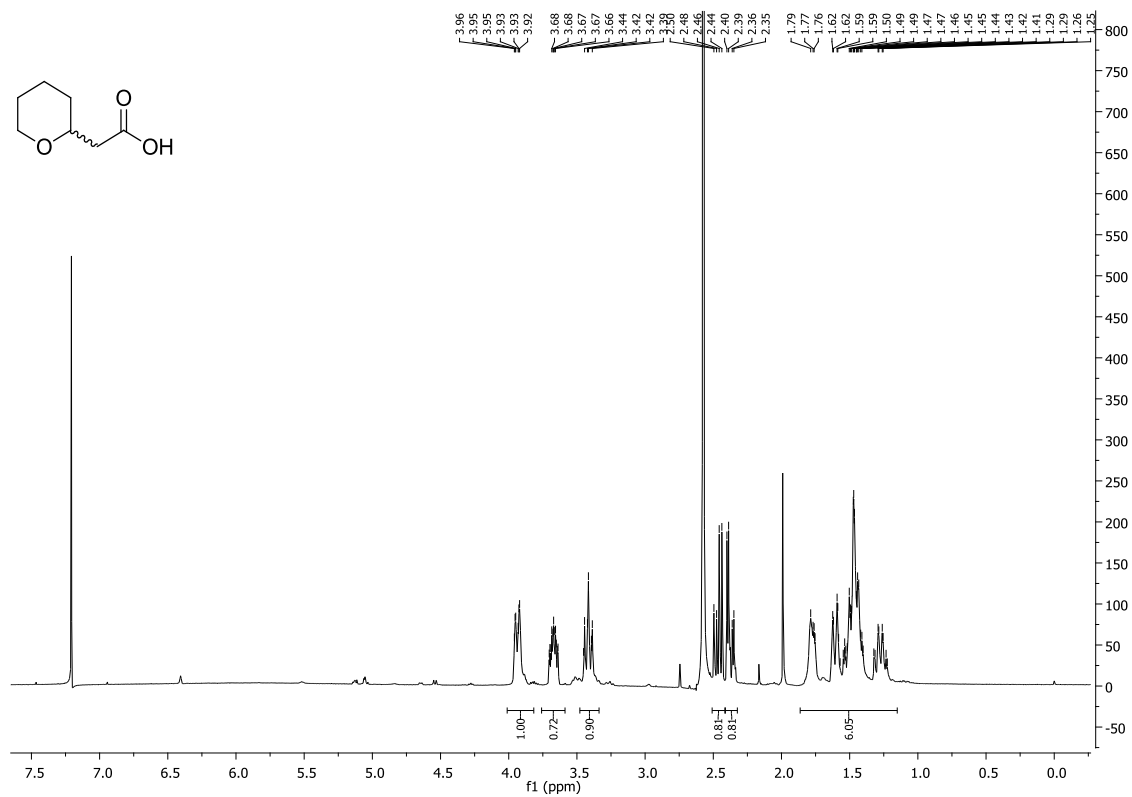
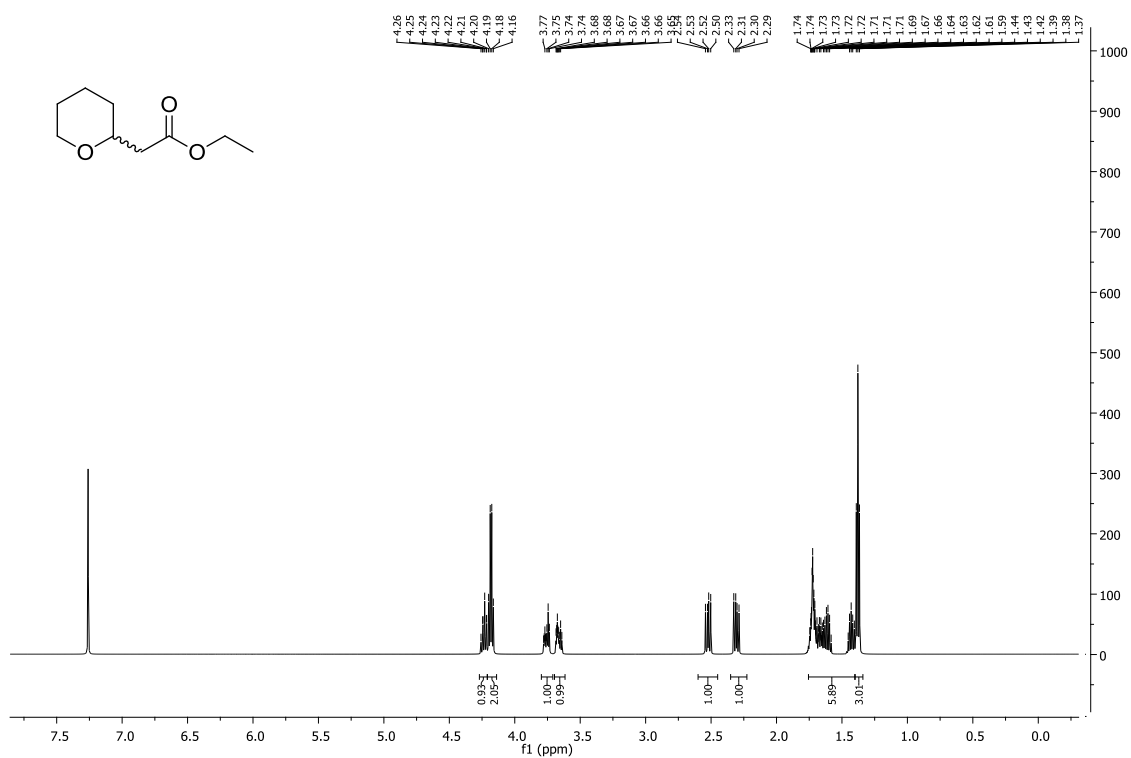
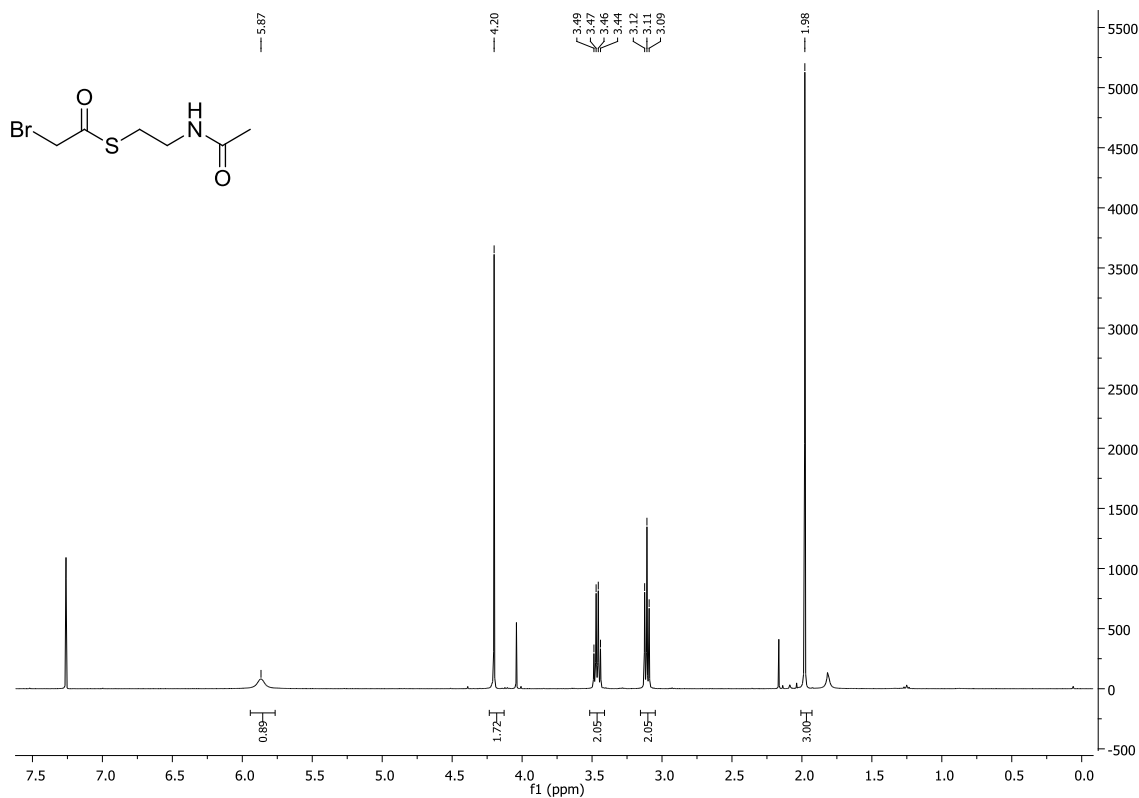


Abbildung 106: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 69.

Abbildung 107: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 71.Abbildung 108: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) von dem Thioester 114.

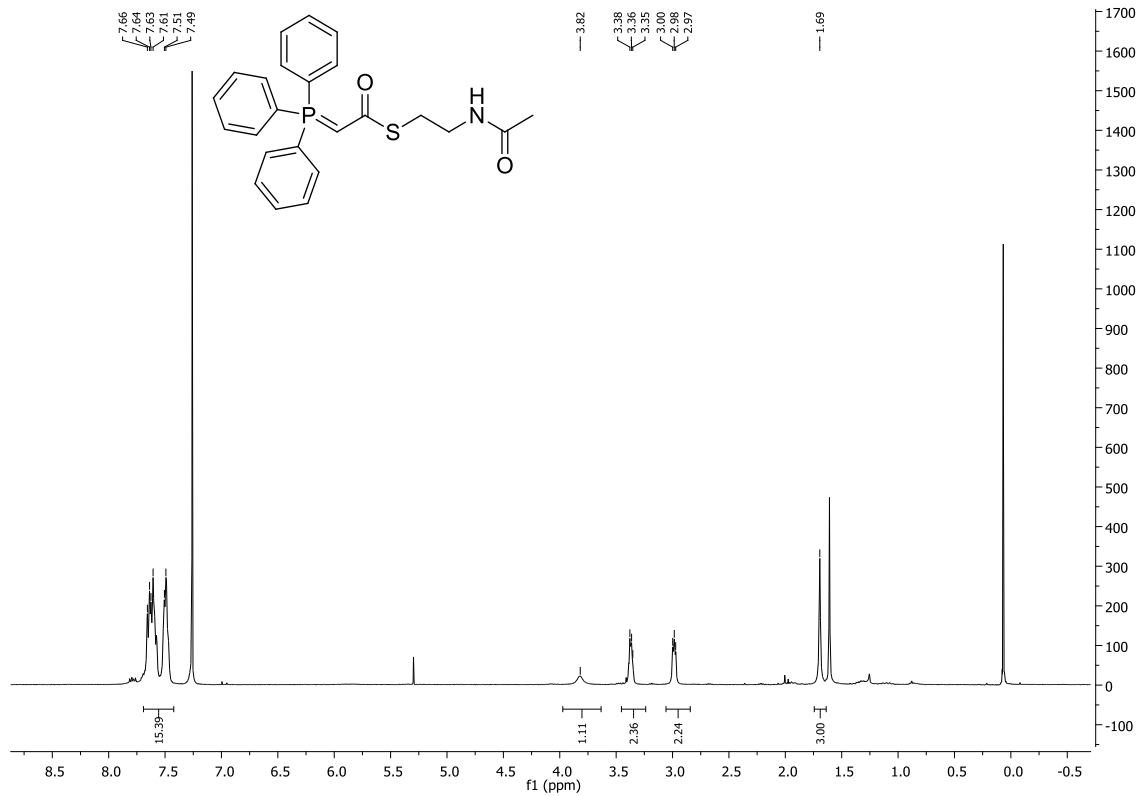


Abbildung 109: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) von dem Wittig-Reagenz **88**.

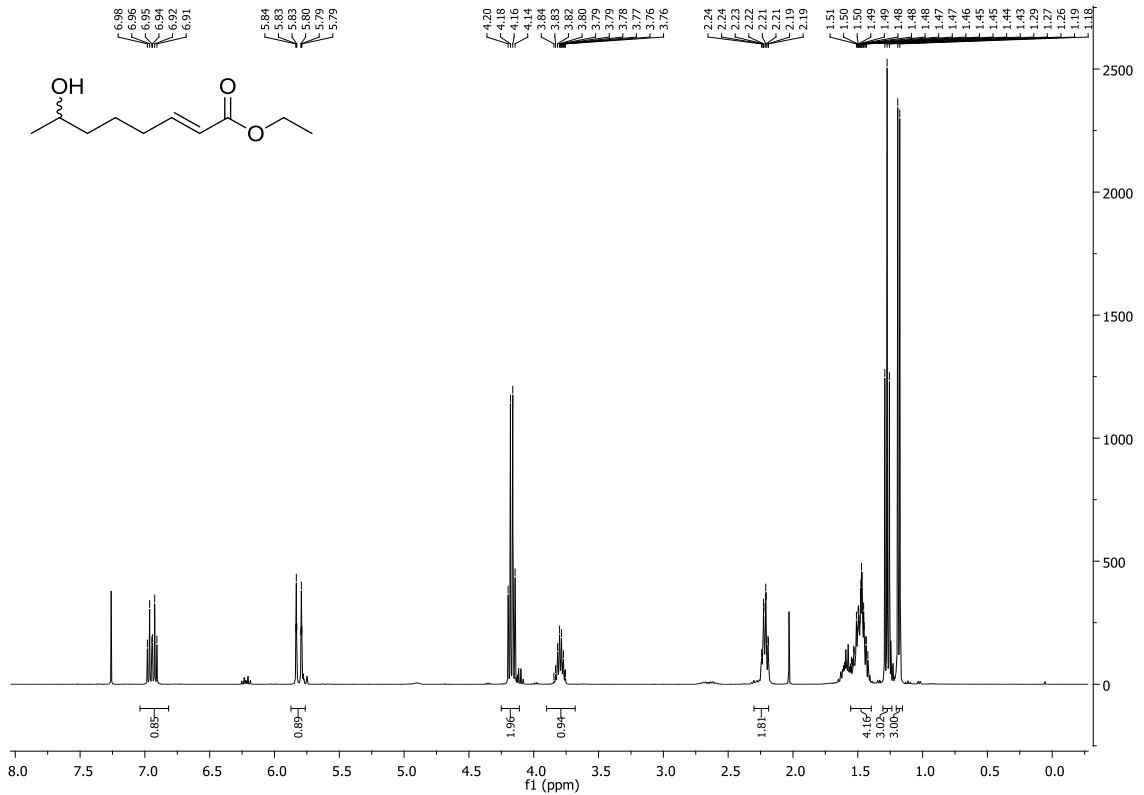
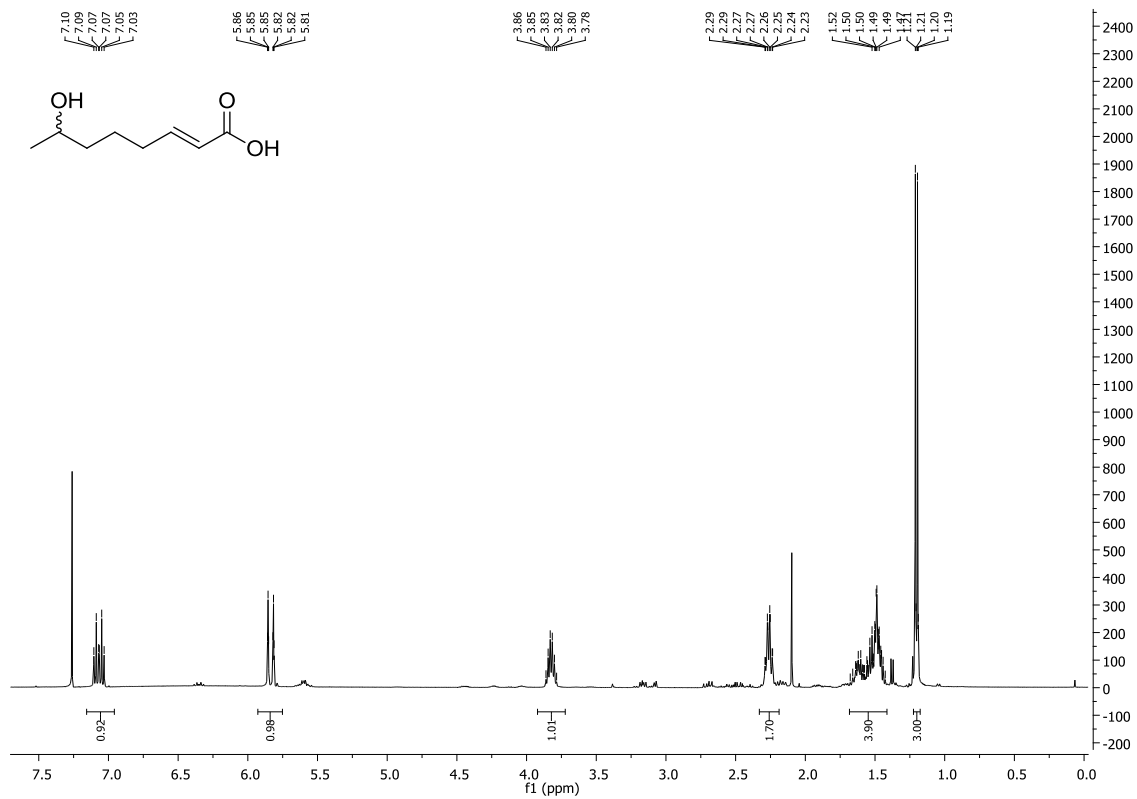
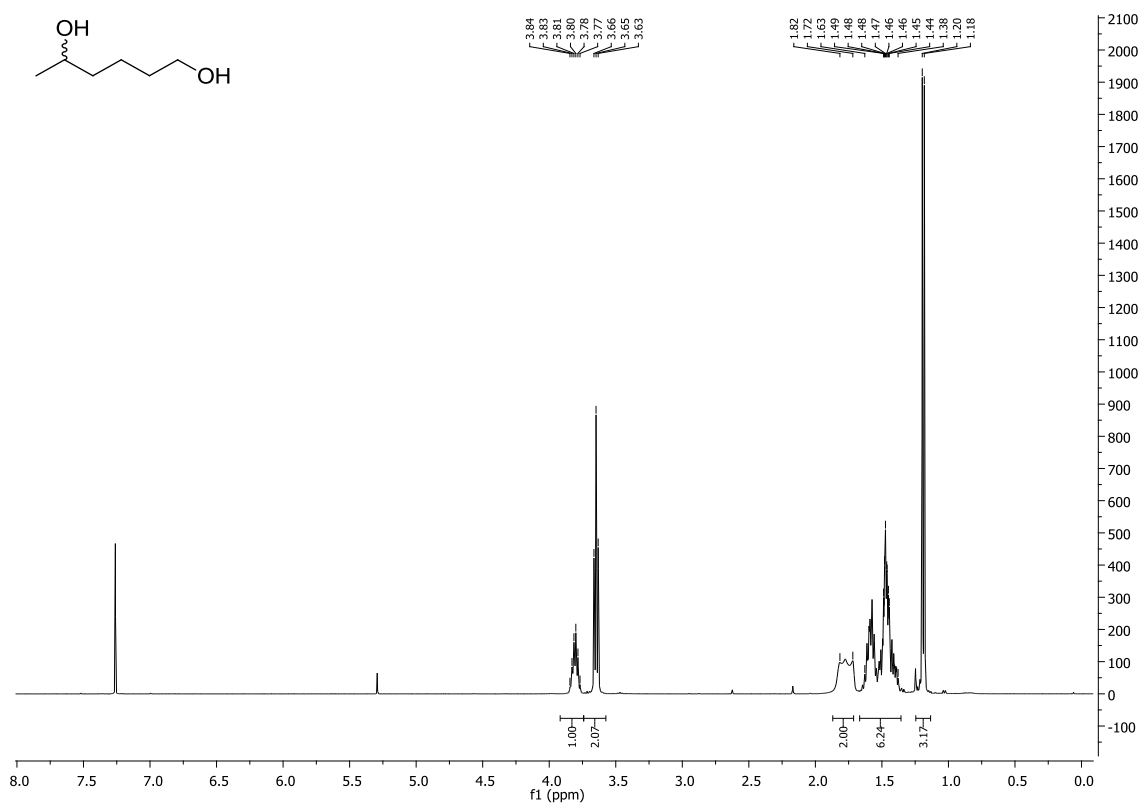


Abbildung 110: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Esters **64**.

Abbildung 111: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 62.Abbildung 112: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Diols 91.

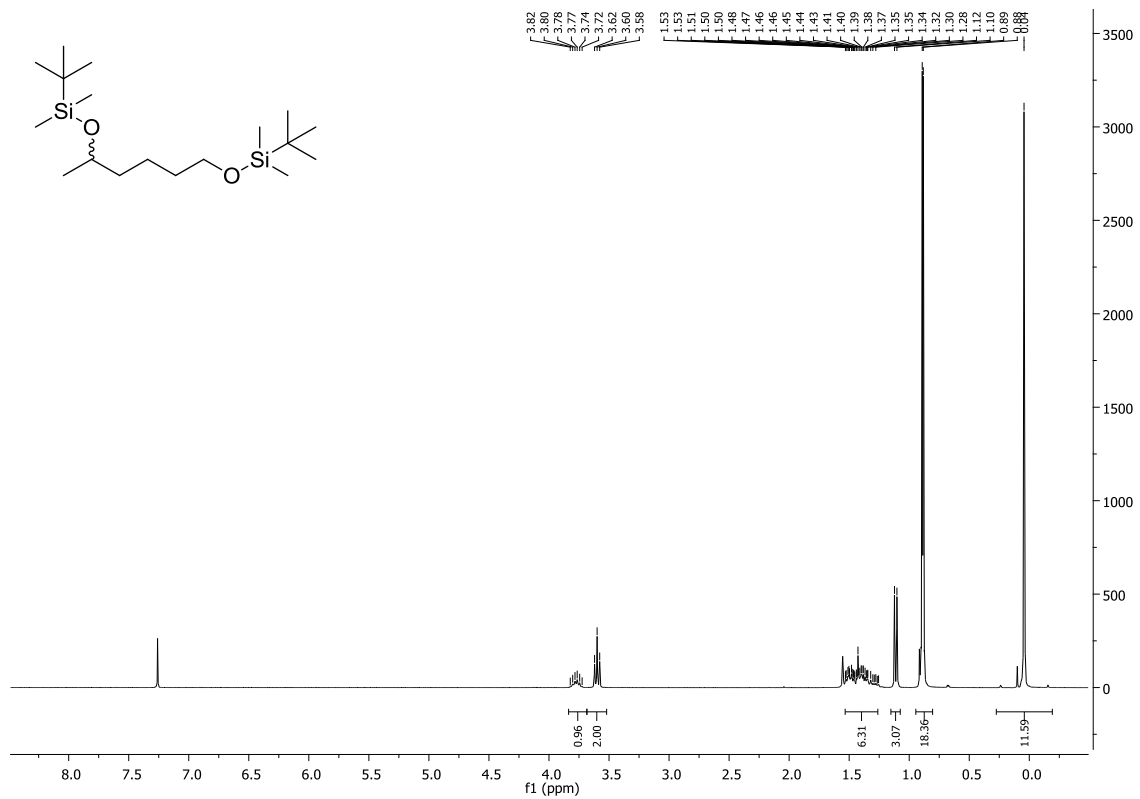


Abbildung 113: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des zweifach geschützten Diols **92**.

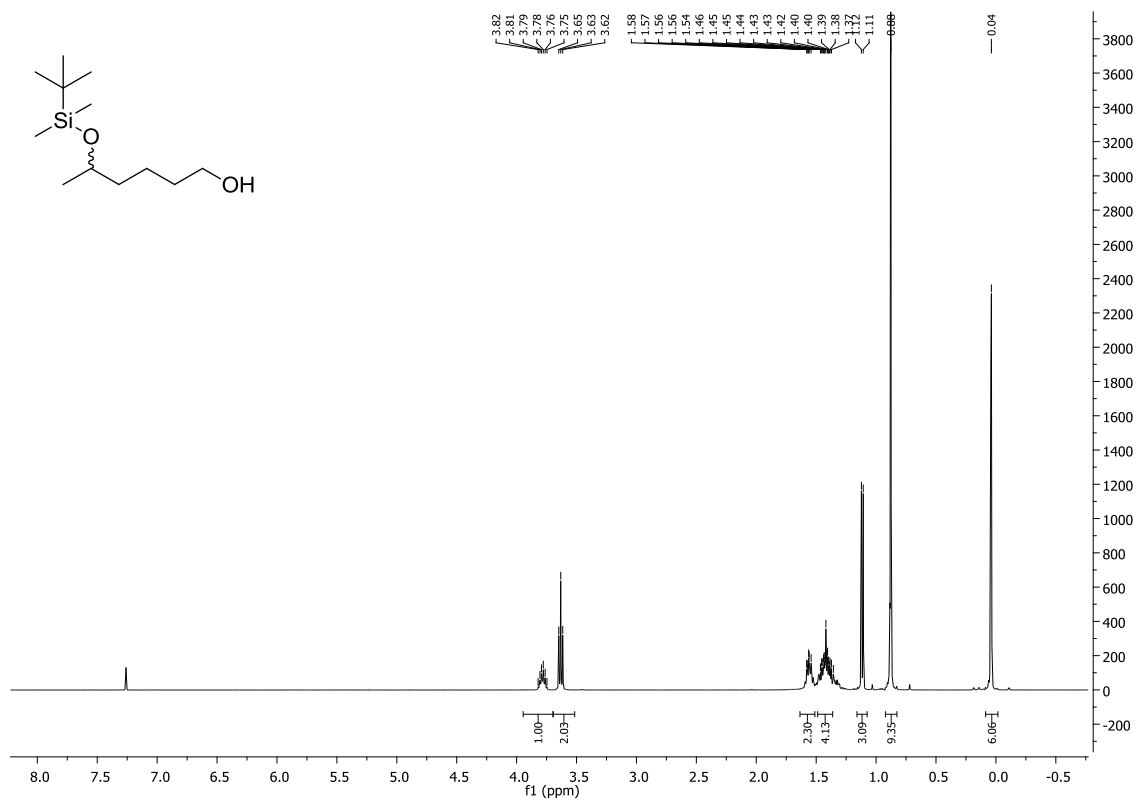
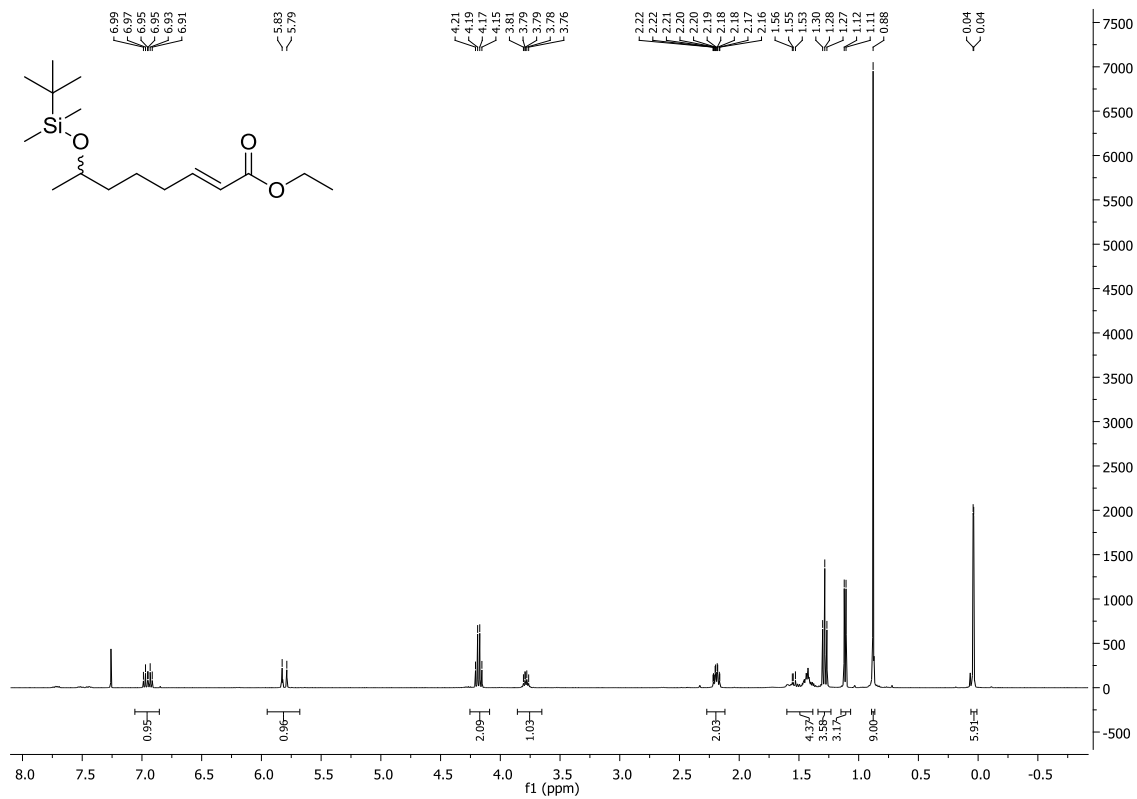
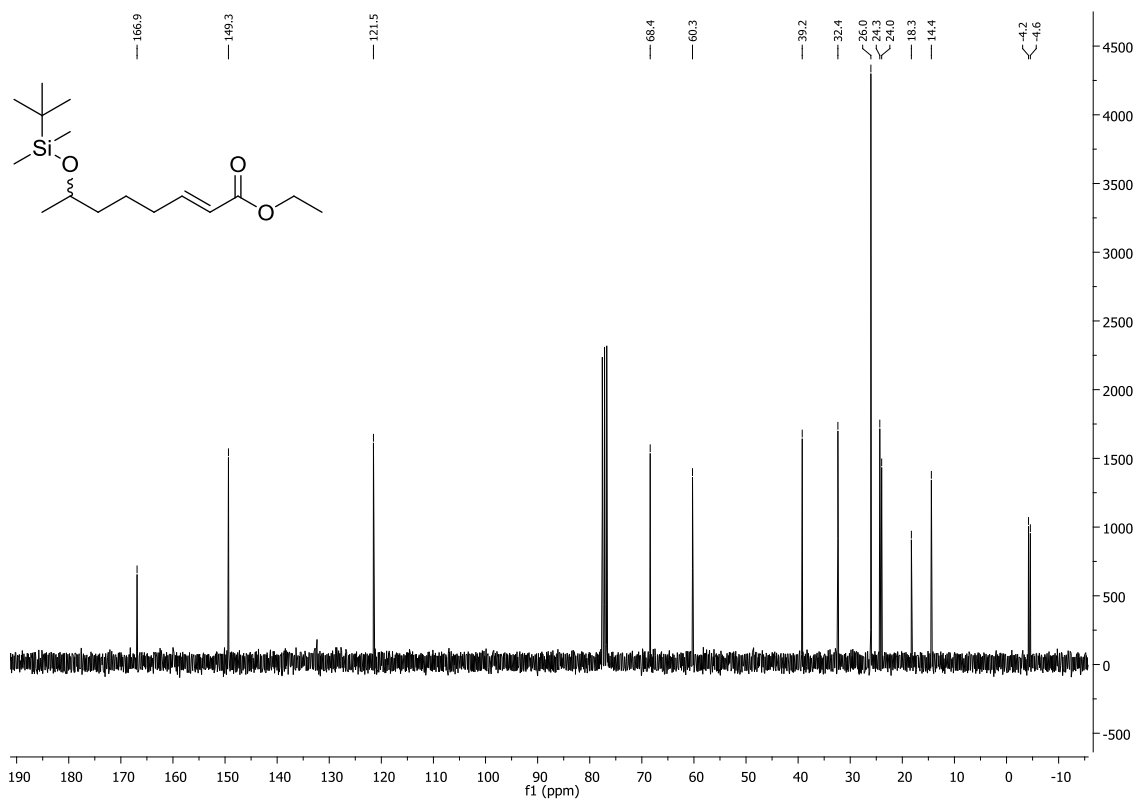


Abbildung 114: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des einfach geschützten Diols **93**.

Abbildung 115: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Esters 94.Abbildung 116: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Esters 94.

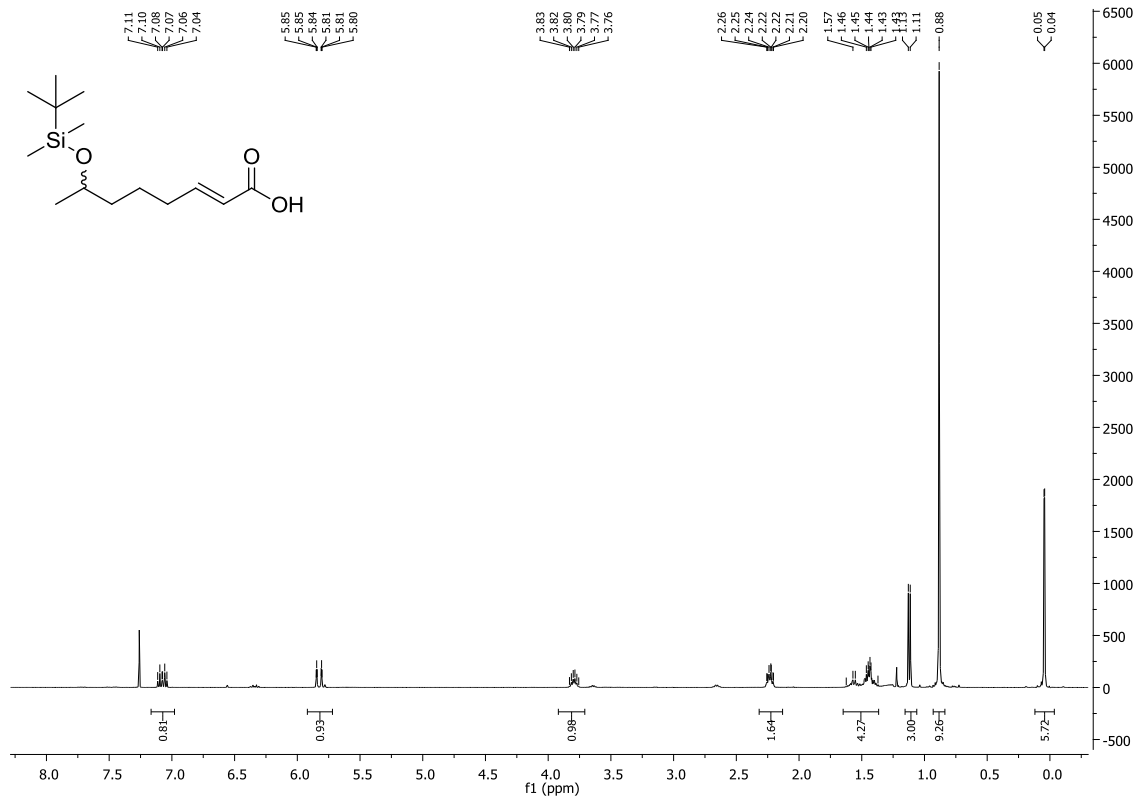


Abbildung 117: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 95.

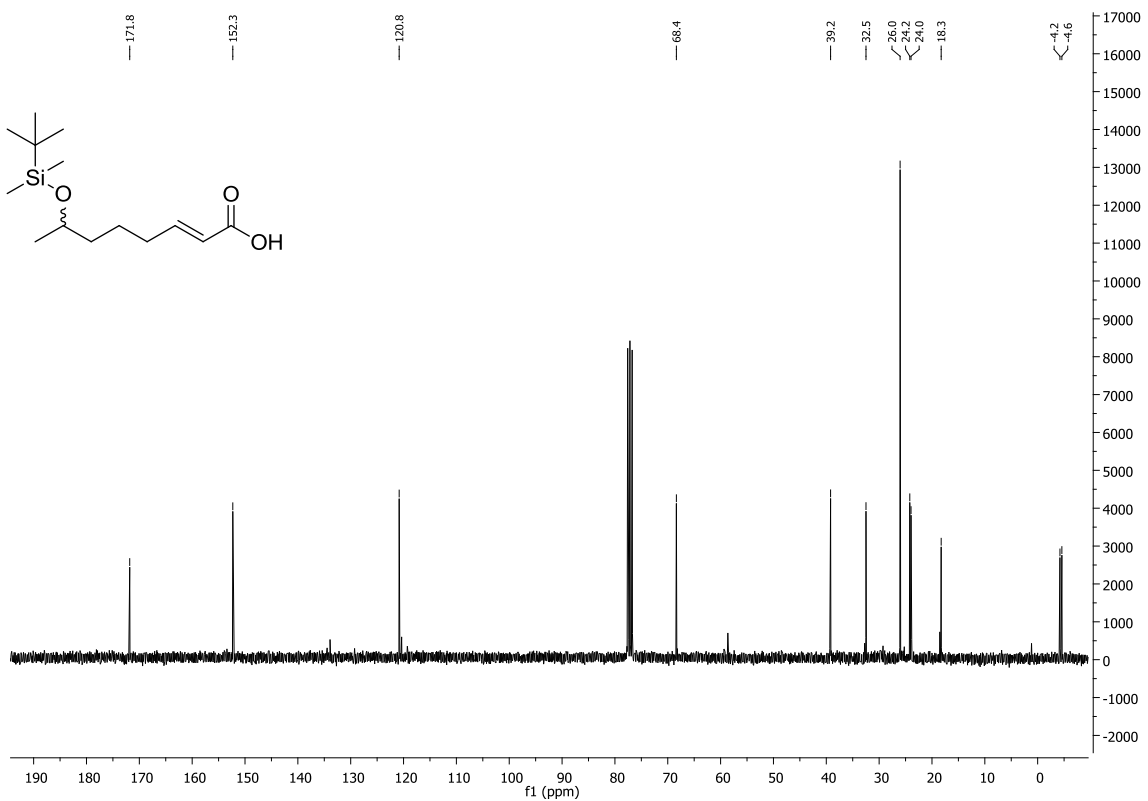


Abbildung 118: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) der Säure 95.

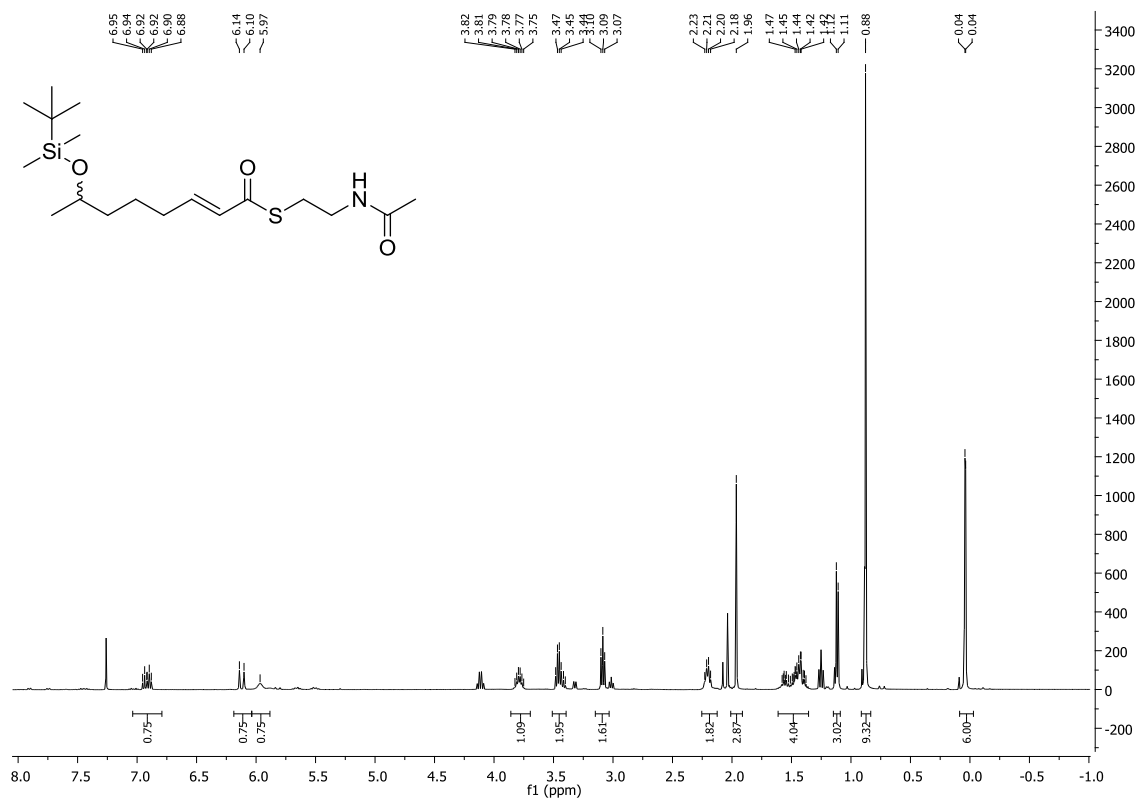


Abbildung 119: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des TBS-geschützten Thioesters **96**.

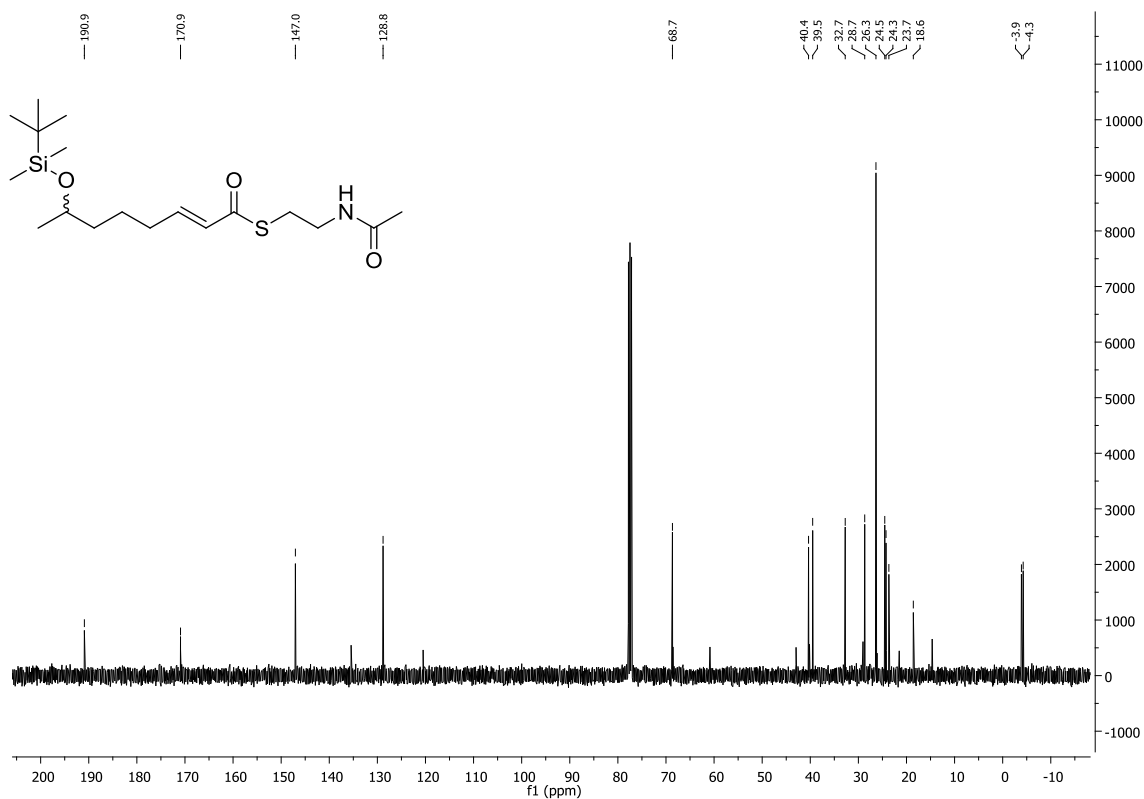


Abbildung 120: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des TBS-geschützten Thioesters **96**.

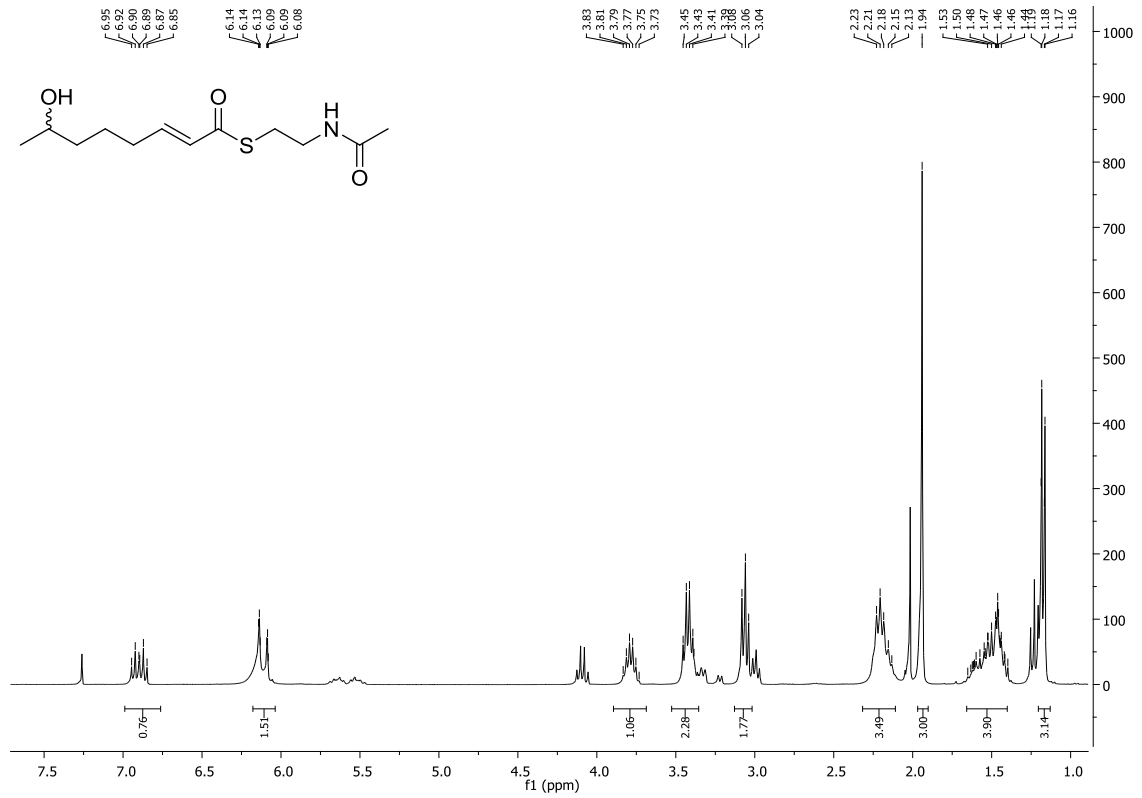


Abbildung 121: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 60.

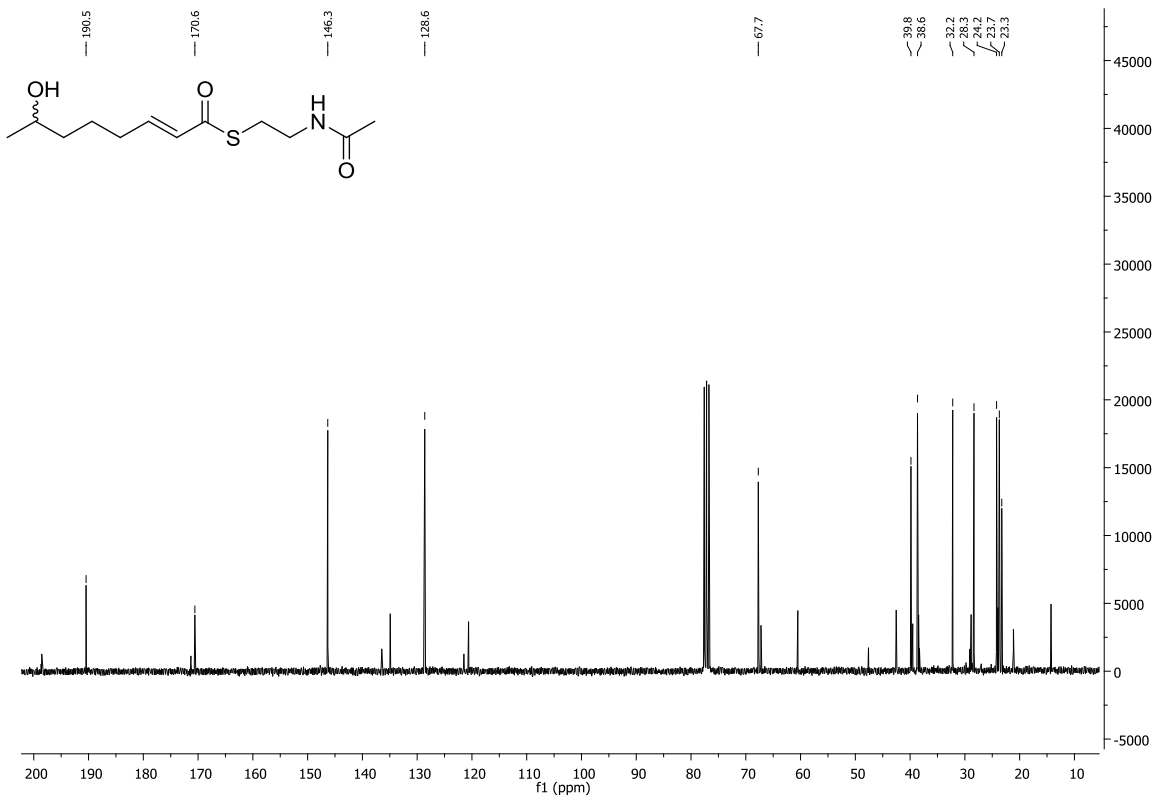
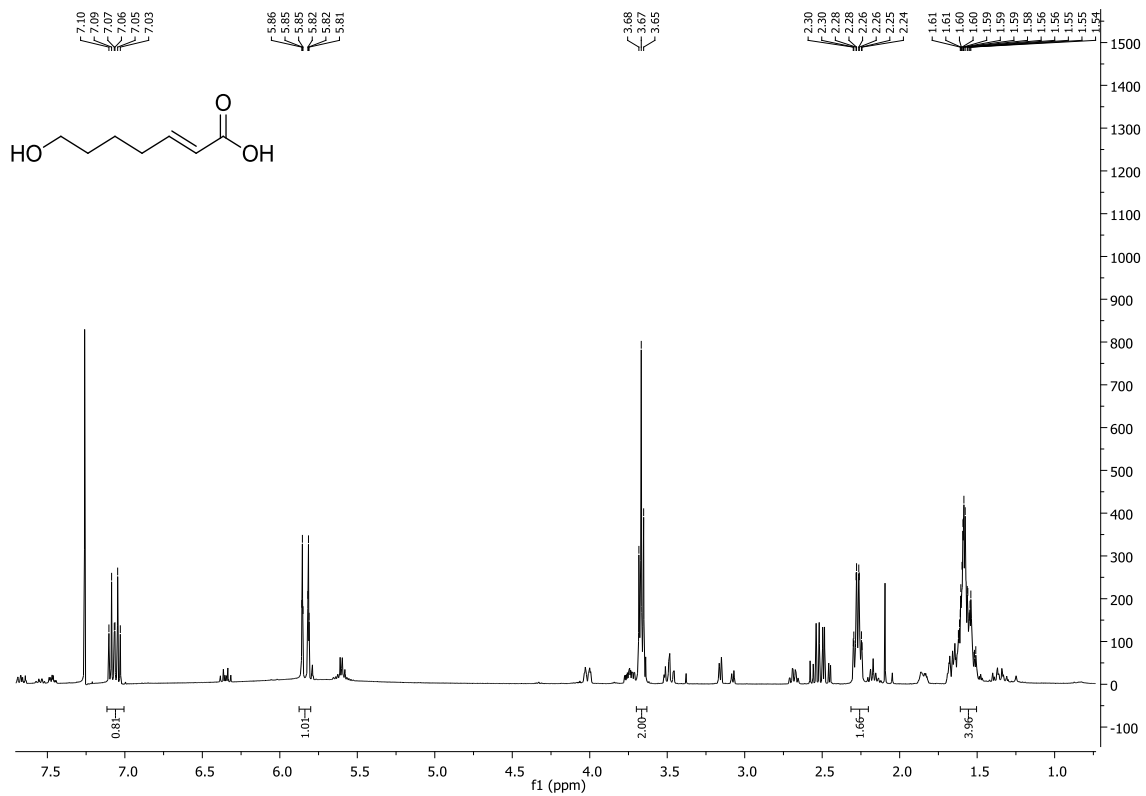
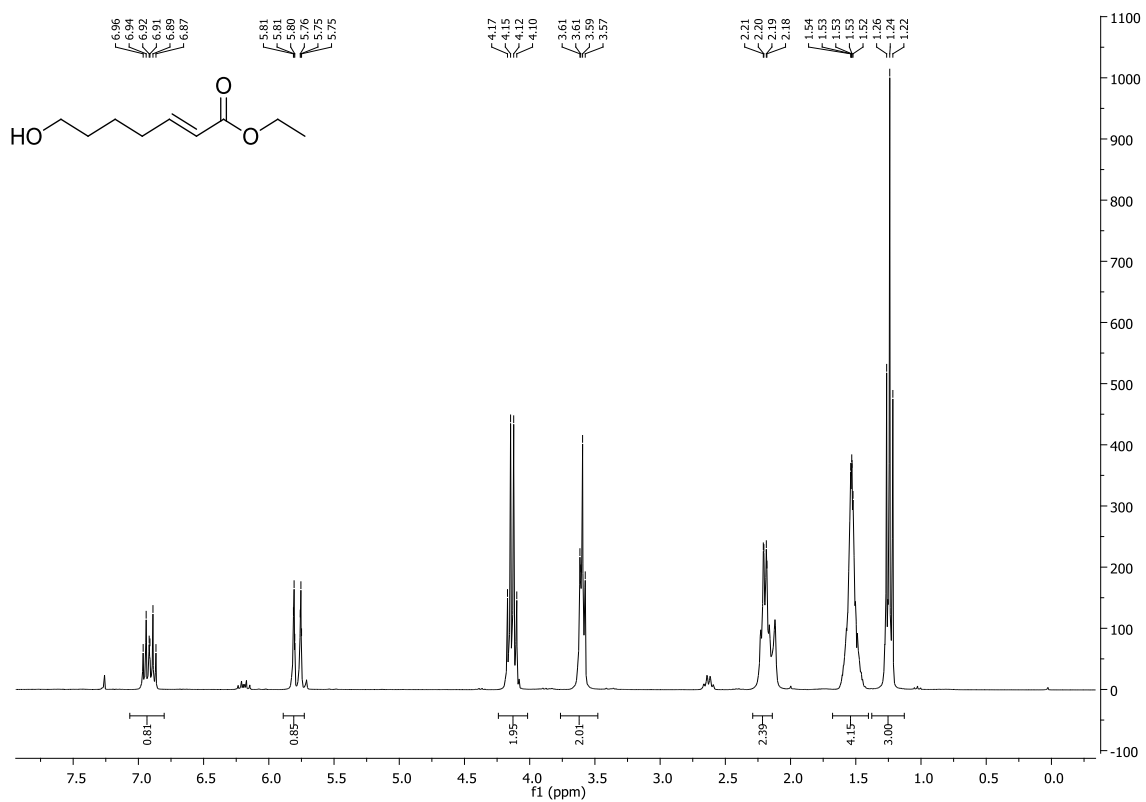


Abbildung 122: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 60.

Abbildung 123: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 63.Abbildung 124: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 65.

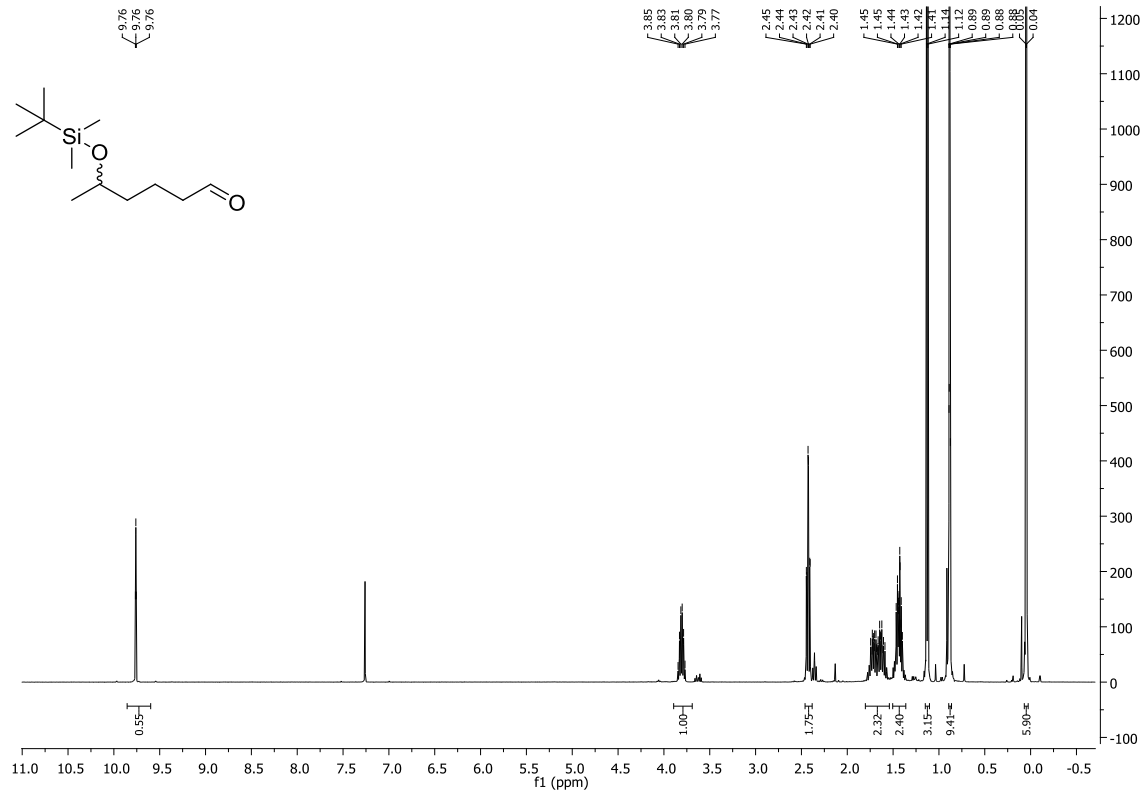


Abbildung 125: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Aldehyds 121.

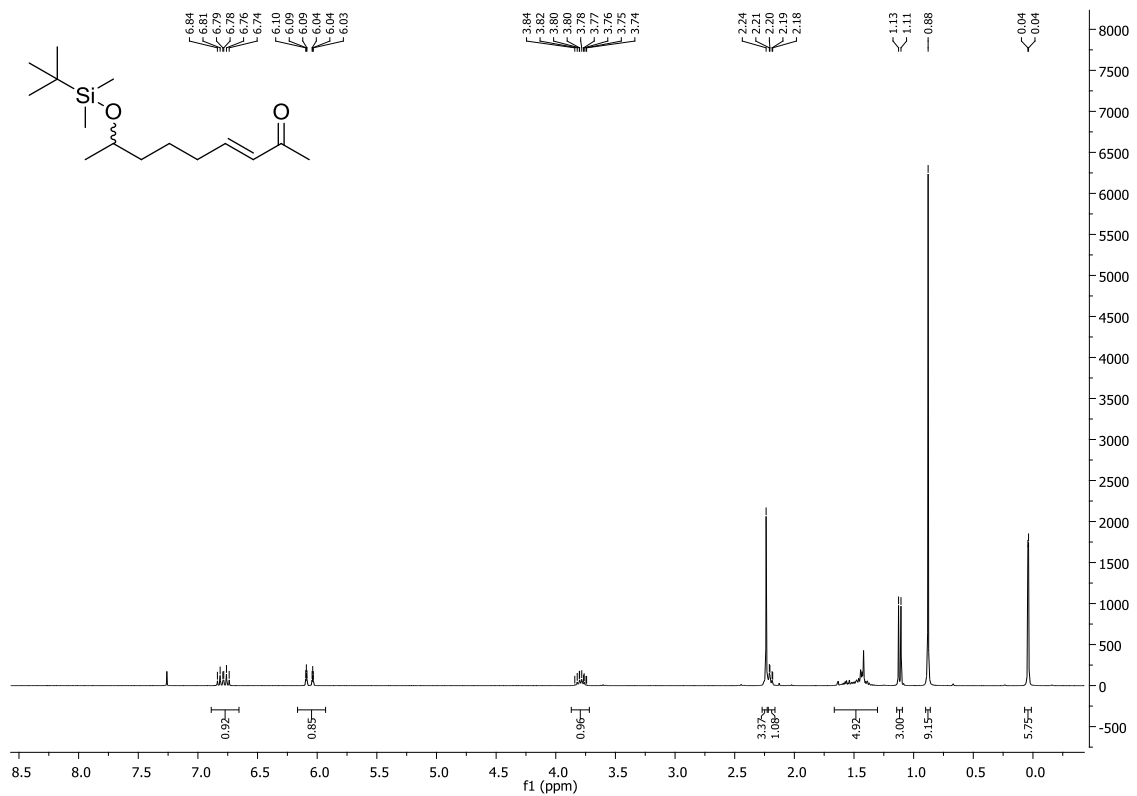
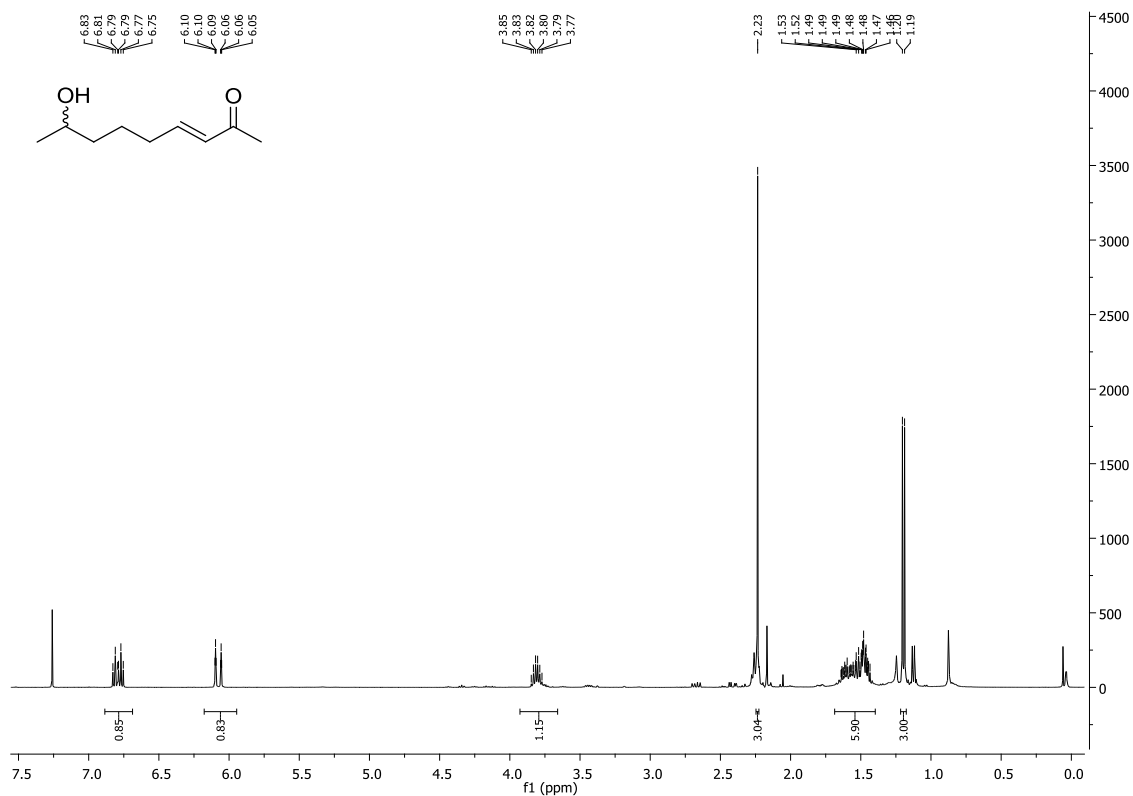
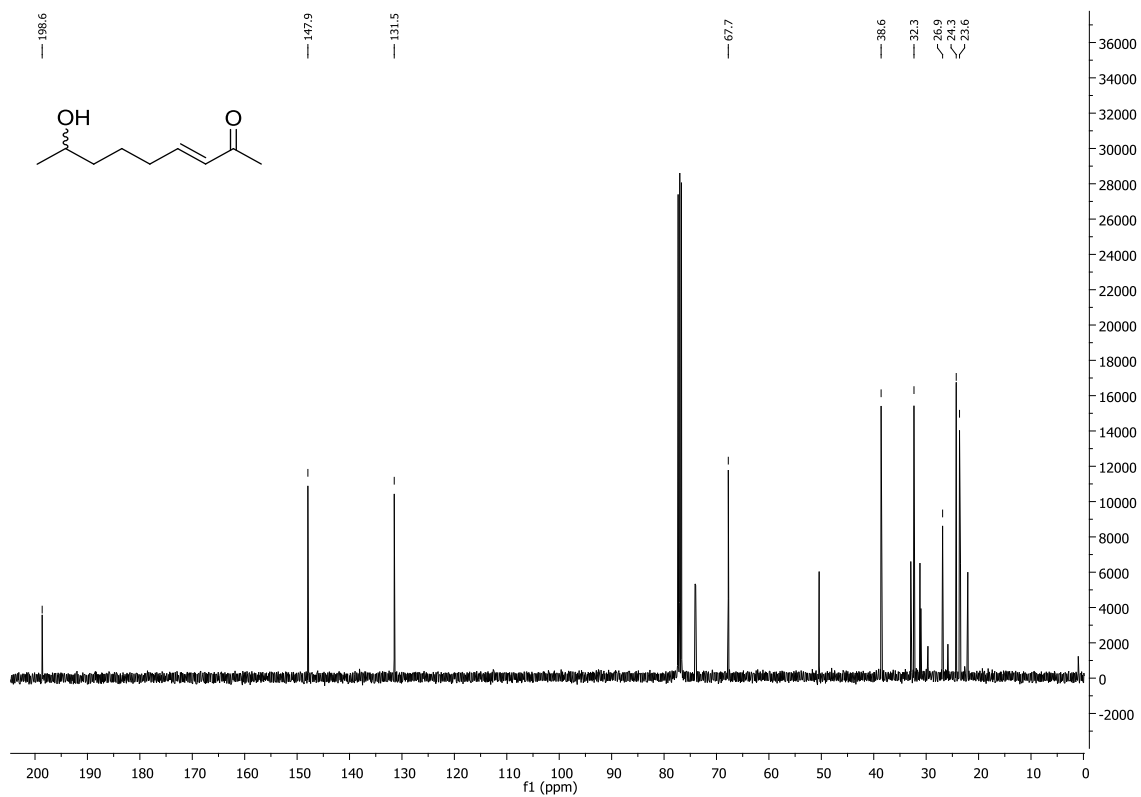


Abbildung 126: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Ketons 123.

Abbildung 127: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz) des Ketons 73.Abbildung 128: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75 MHz) des Ketons 73.

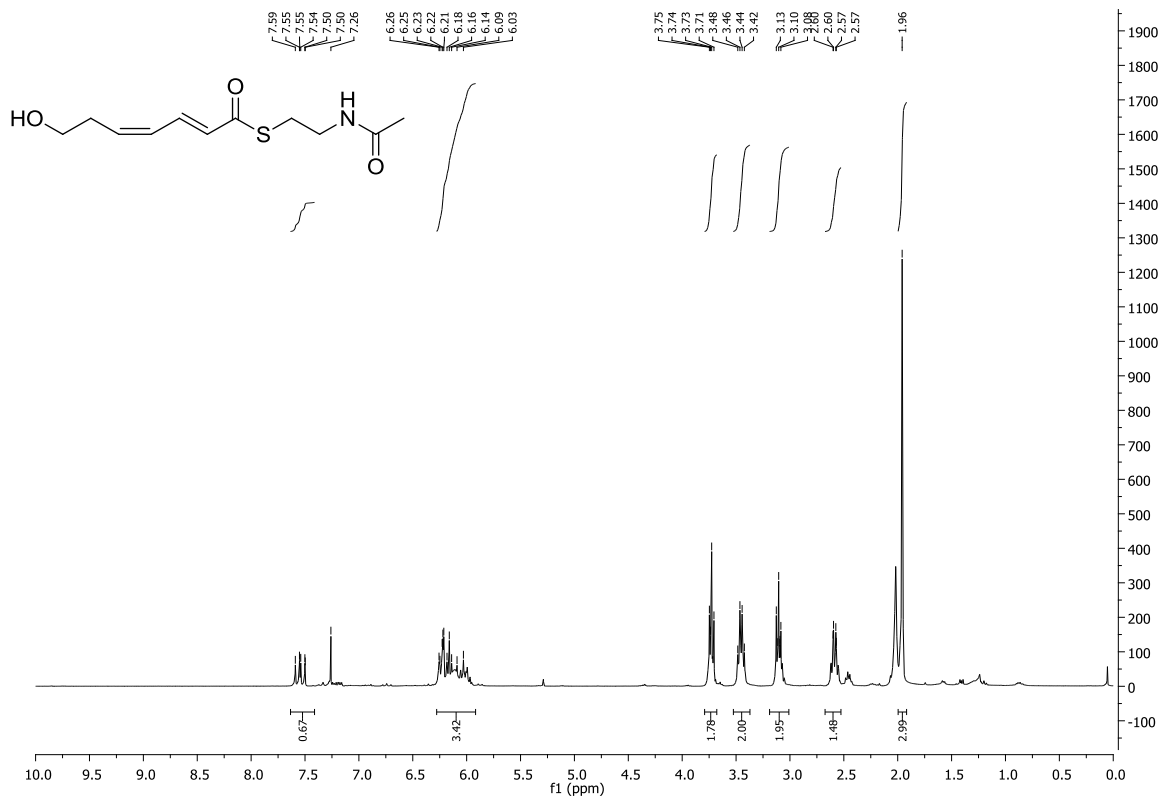


Abbildung 129: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 72.

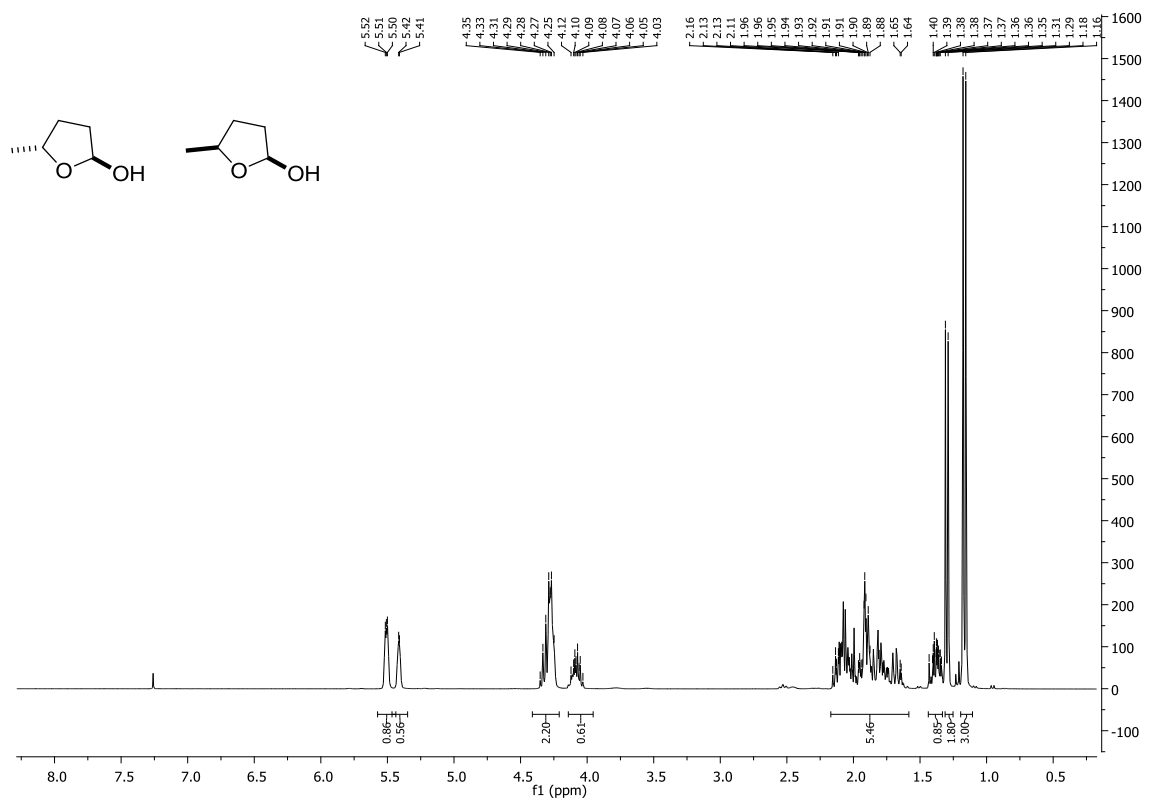
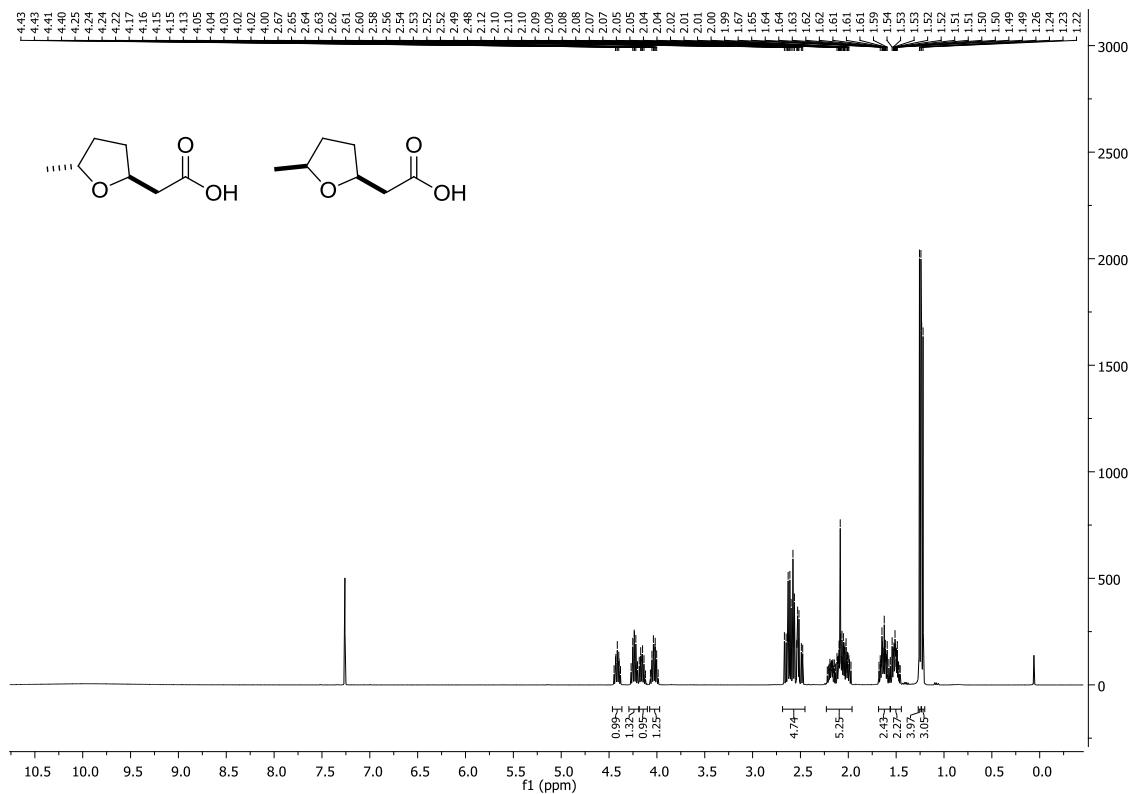
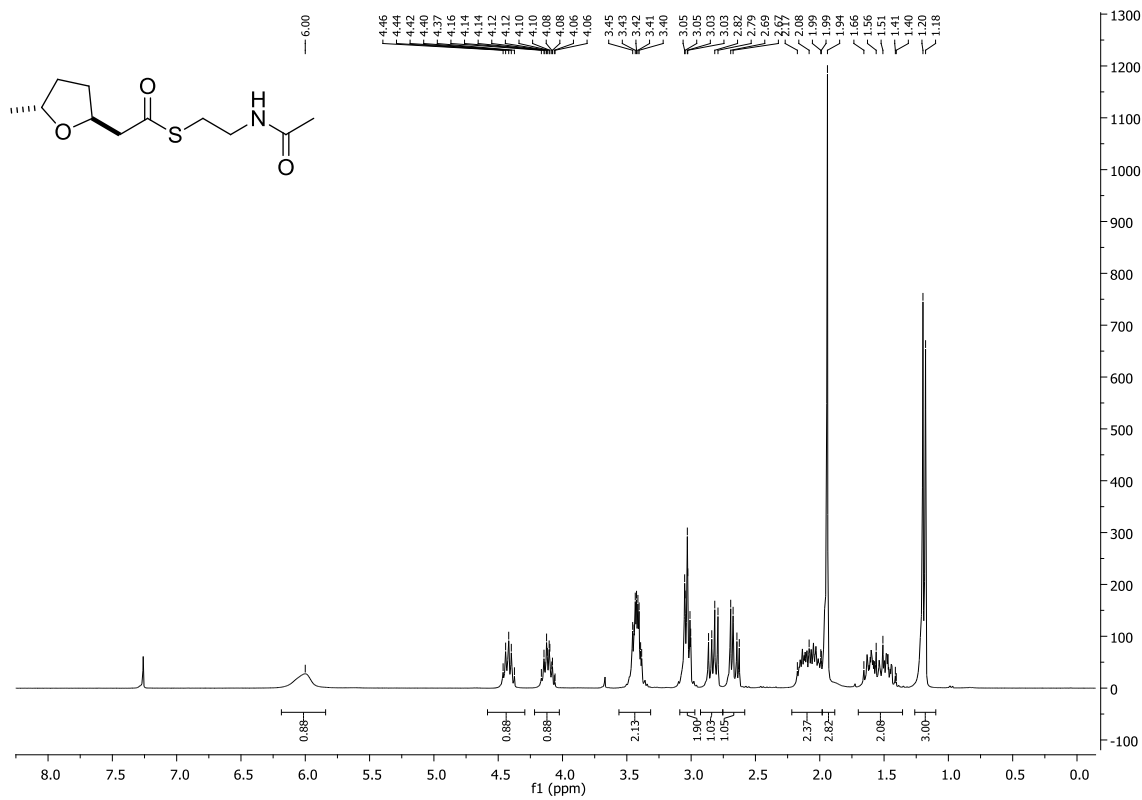


Abbildung 130: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Lactole 125a und 125b.

Abbildung 131: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz) der Säuren **82a** und **82b**.Abbildung 132: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz) des Thioesters **80a**.

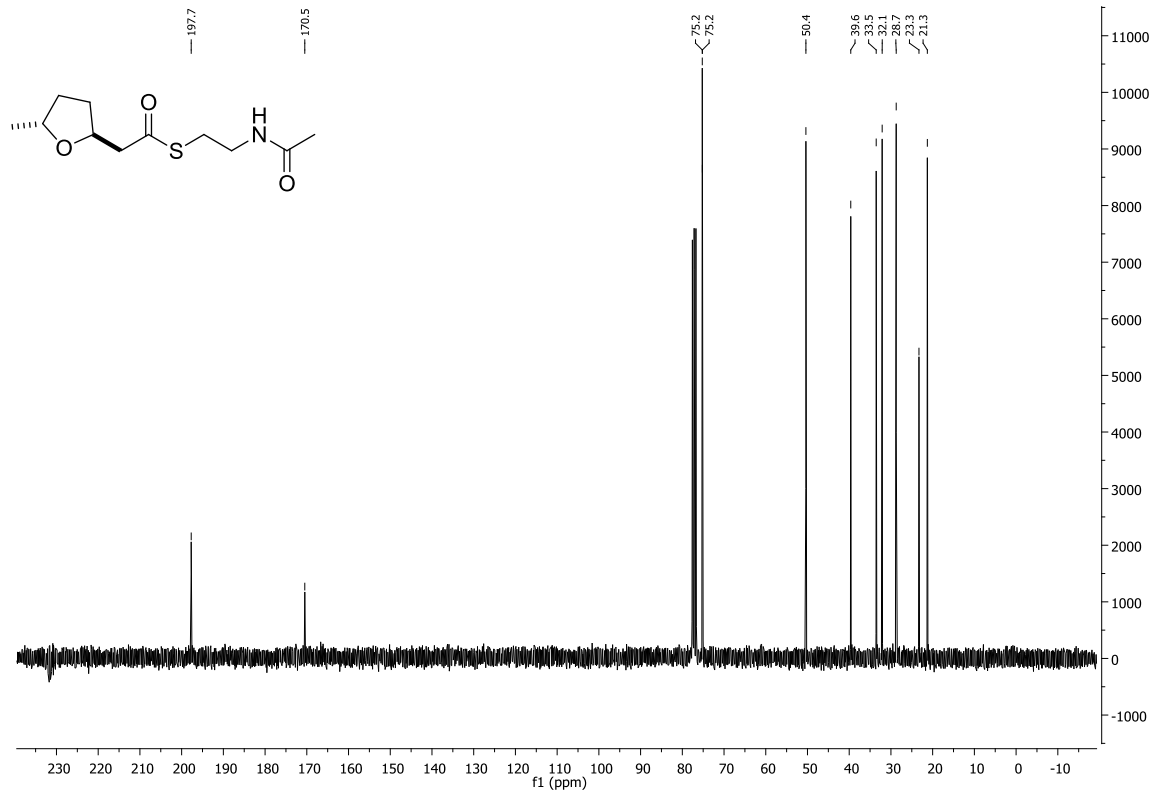


Abbildung 133: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75 MHz) des Thioesters **80a**.

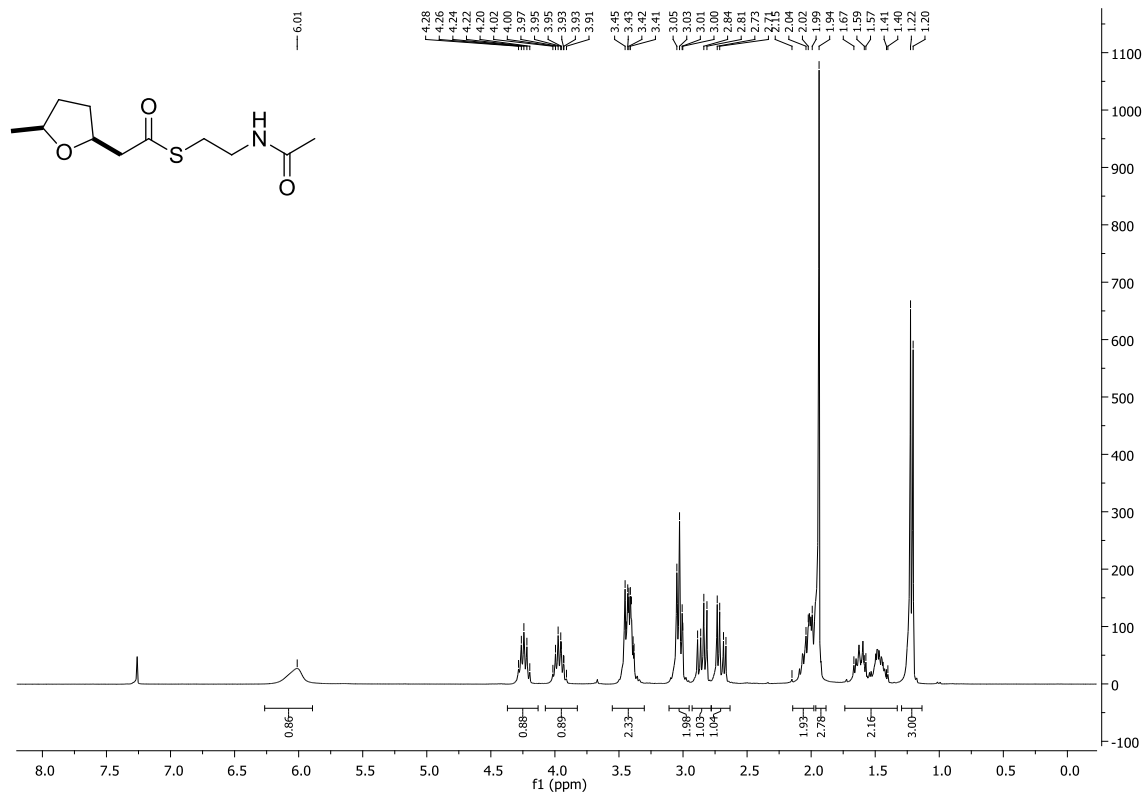


Abbildung 134: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz) des Thioesters **80b**.

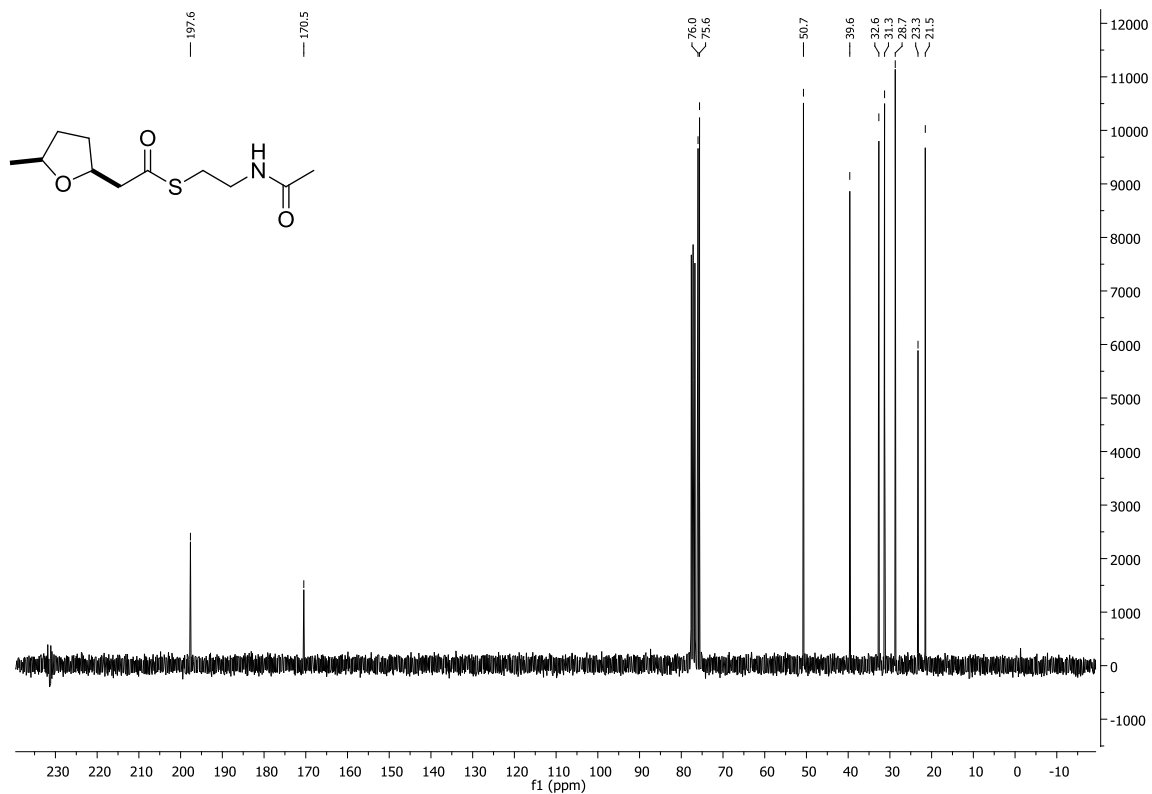


Abbildung 135: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **80b**.

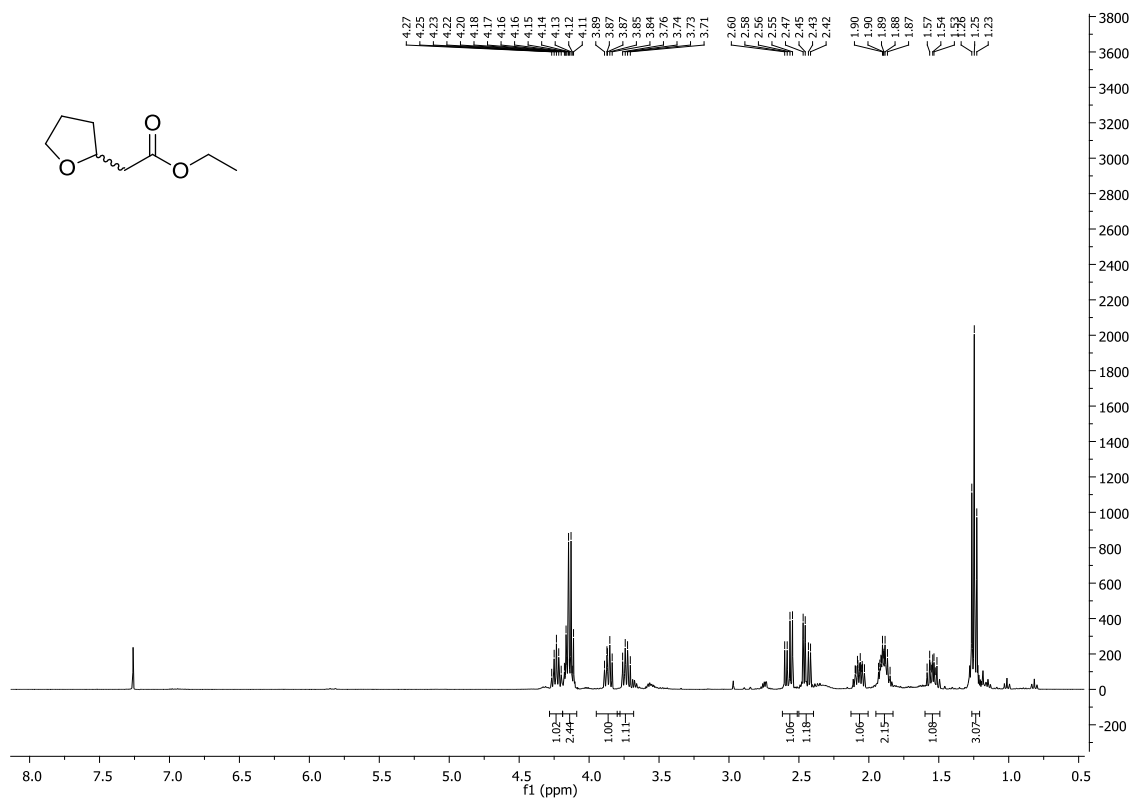


Abbildung 136: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters **85**.

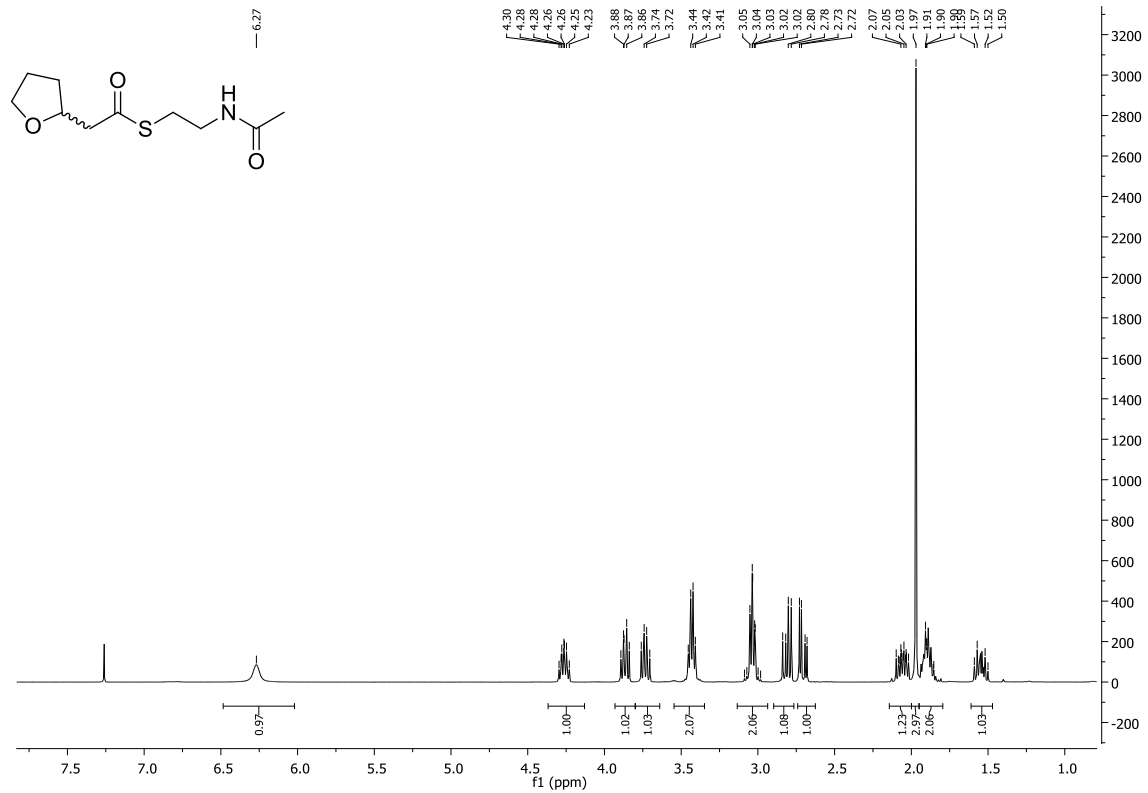


Abbildung 137: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters **81**.

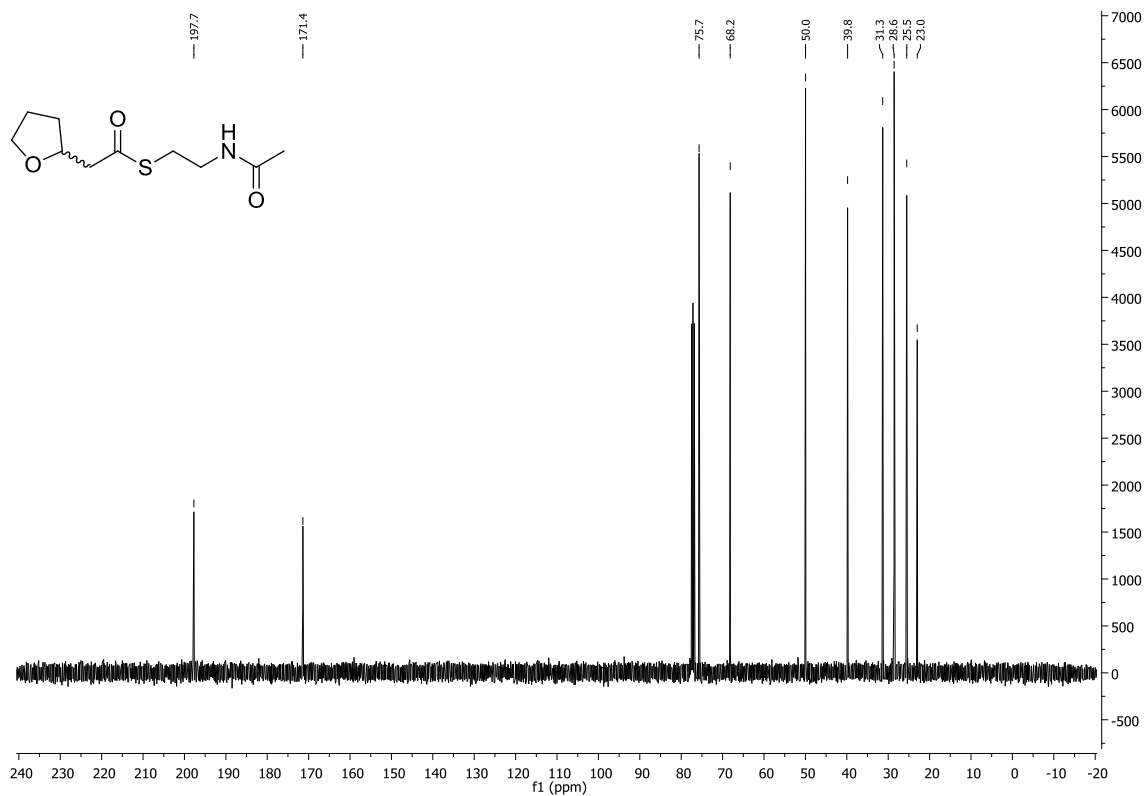


Abbildung 138: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **81**.

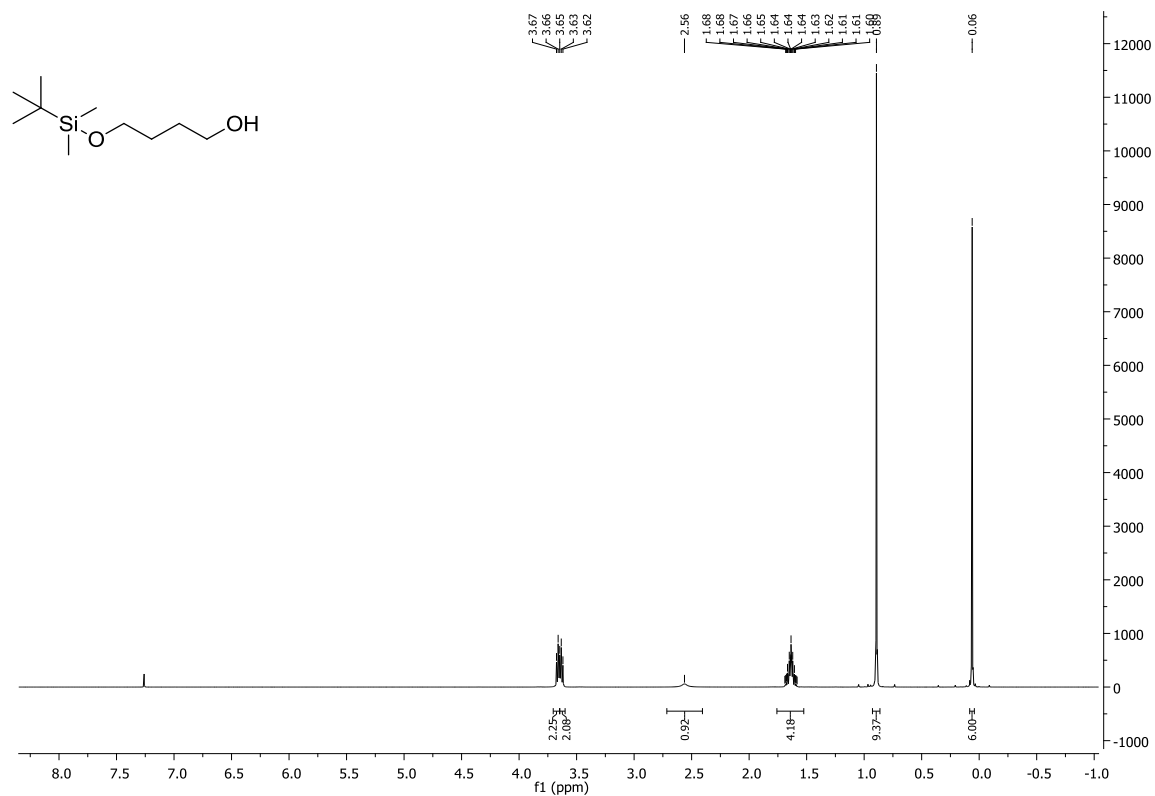


Abbildung 139: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) von dem Alkohol 133.

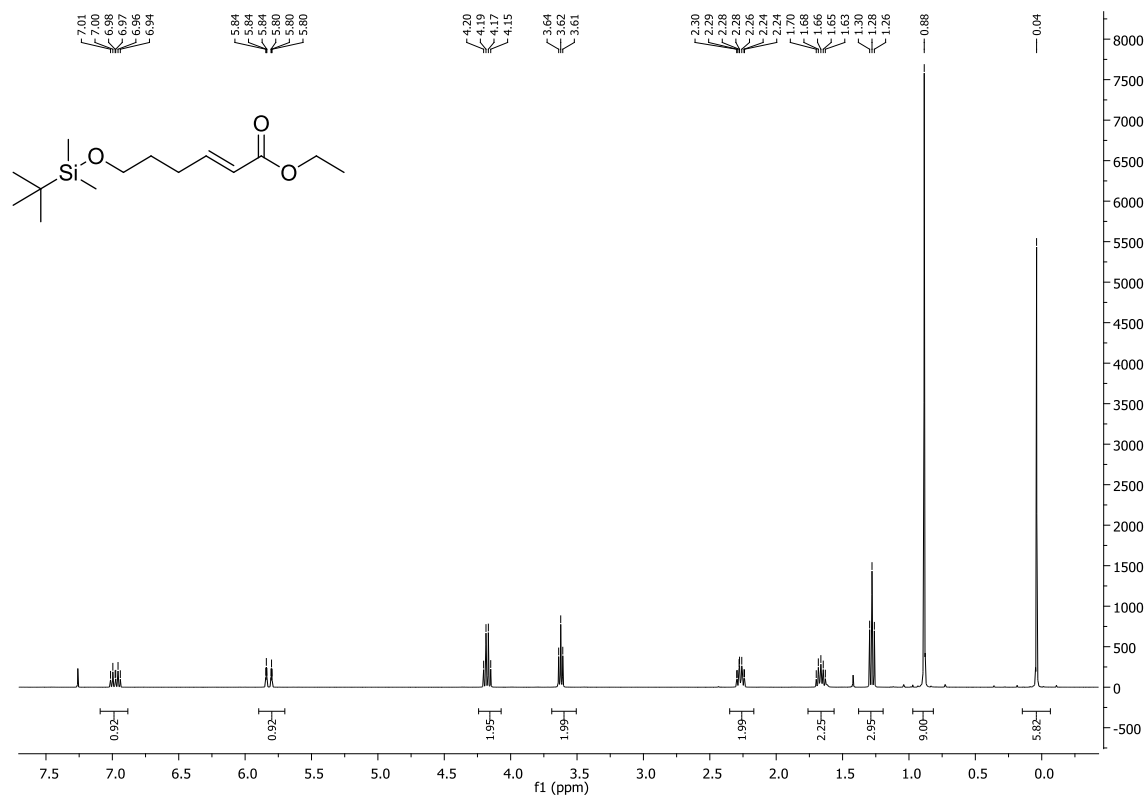


Abbildung 140: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 134.

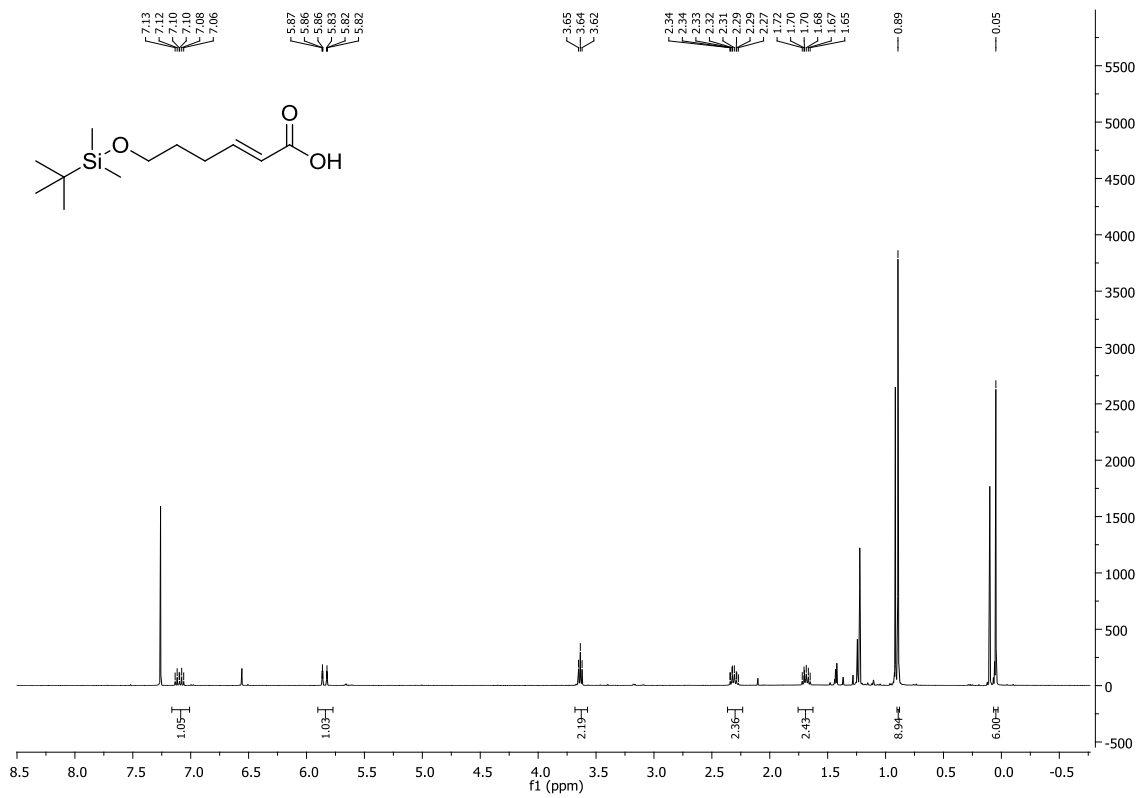


Abbildung 141: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 135.

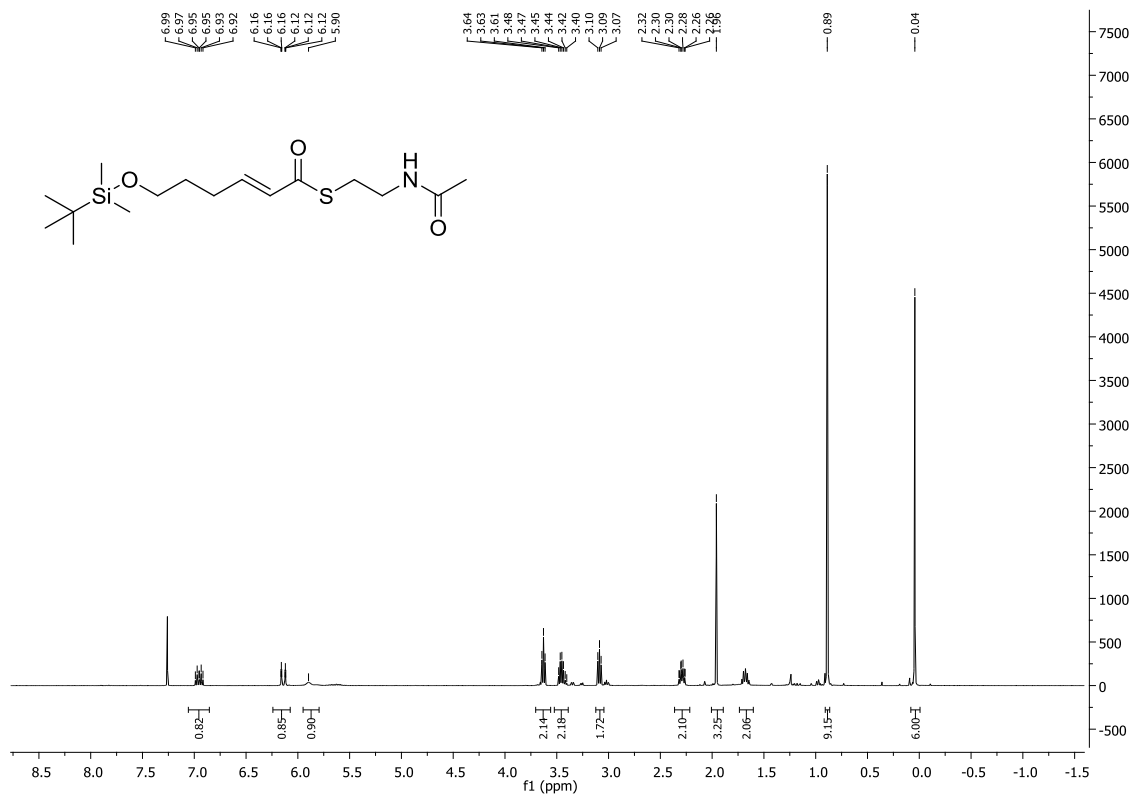
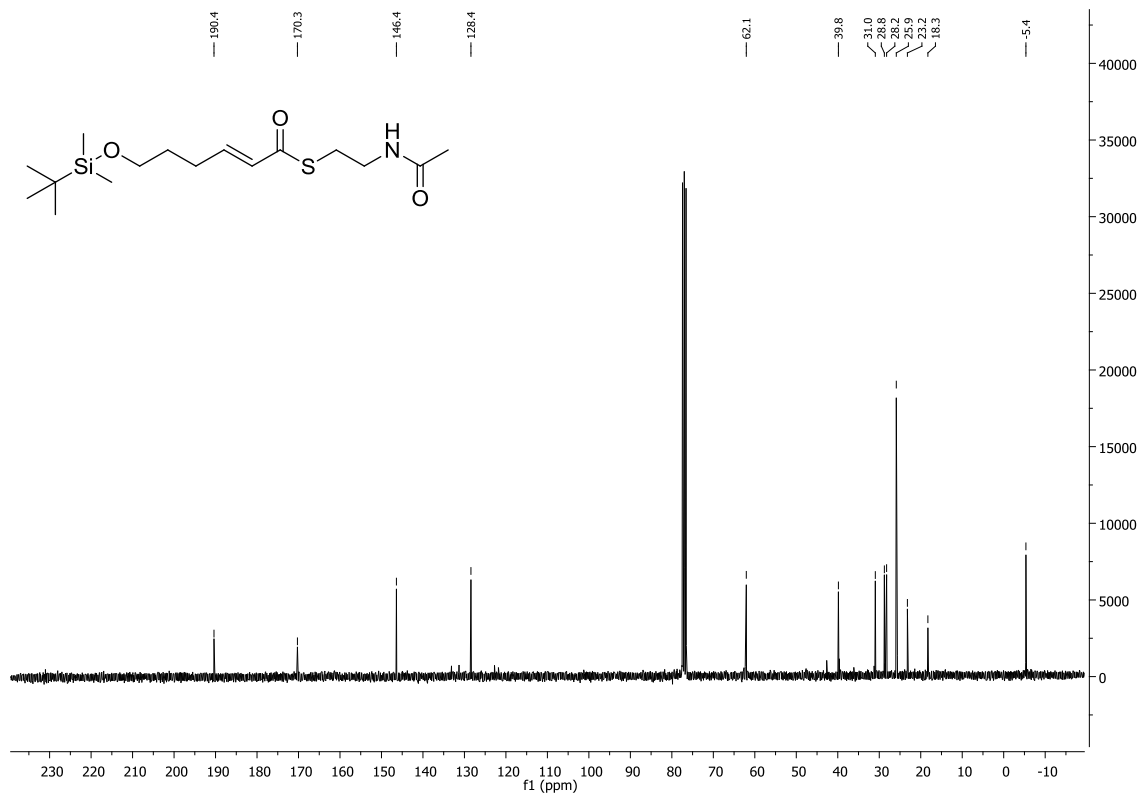
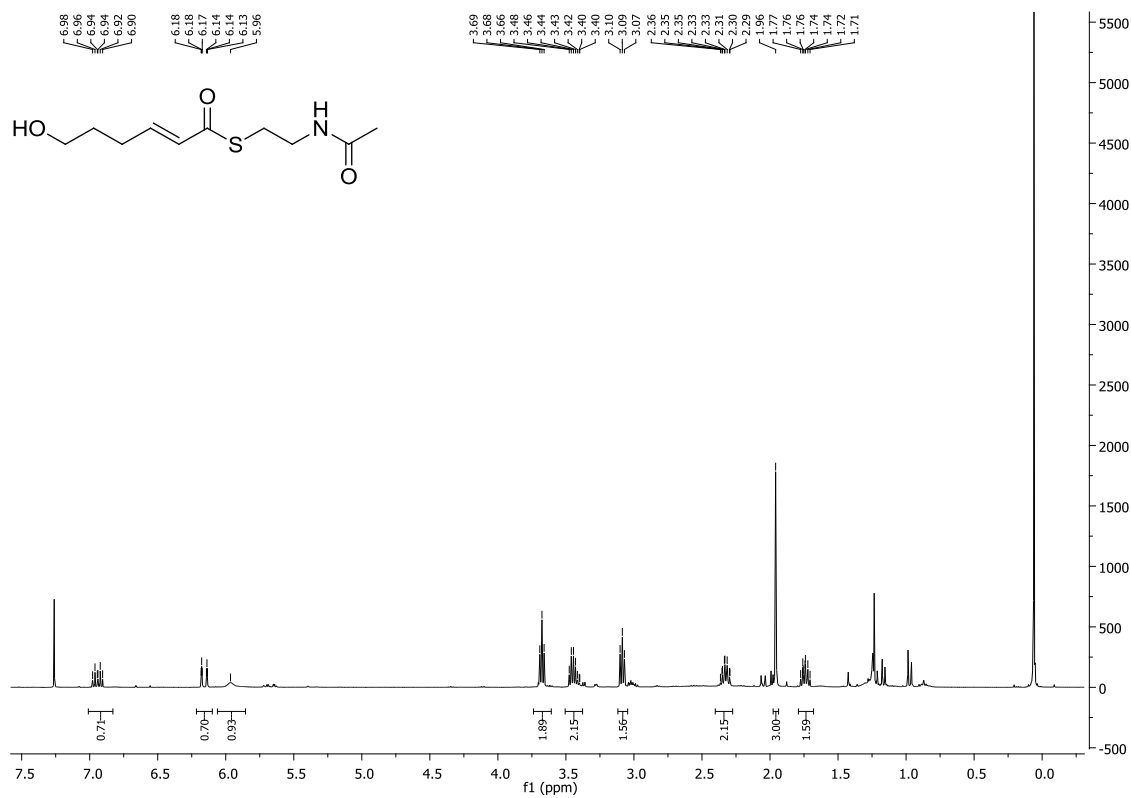


Abbildung 142: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 136.

Abbildung 143: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 136.Abbildung 144: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 75.

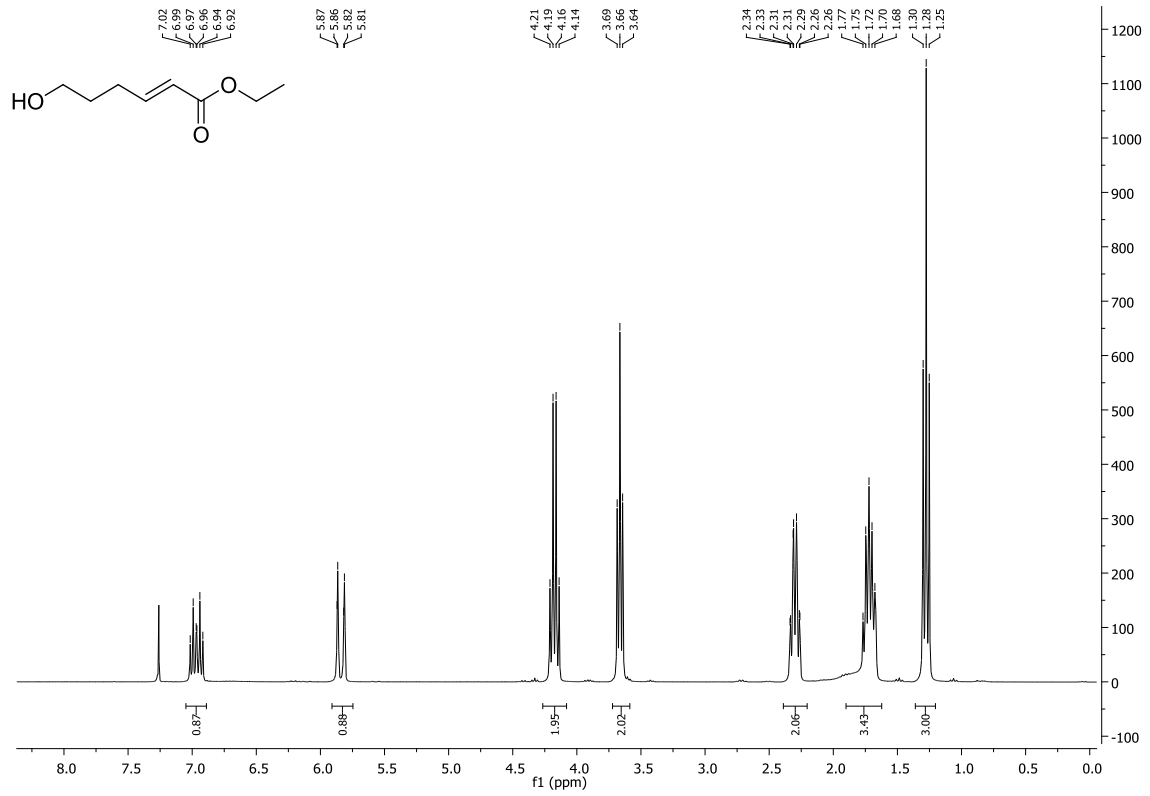


Abbildung 145: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 79.

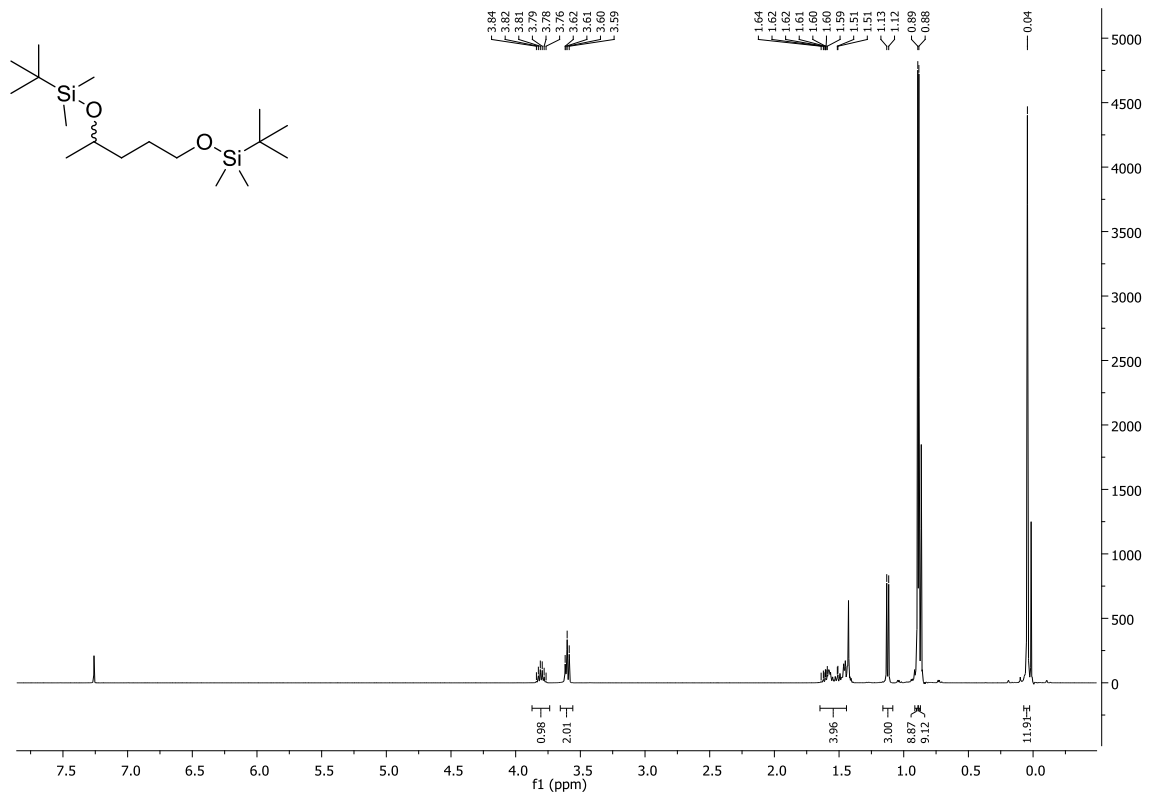
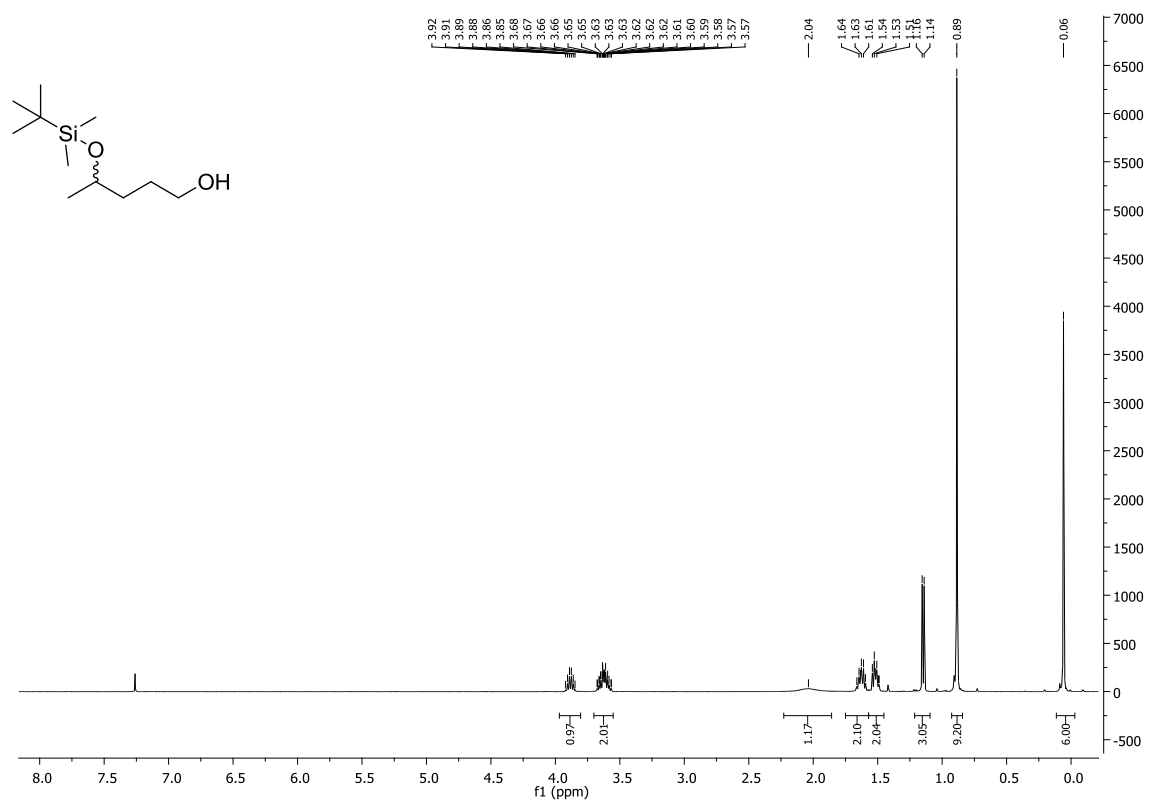
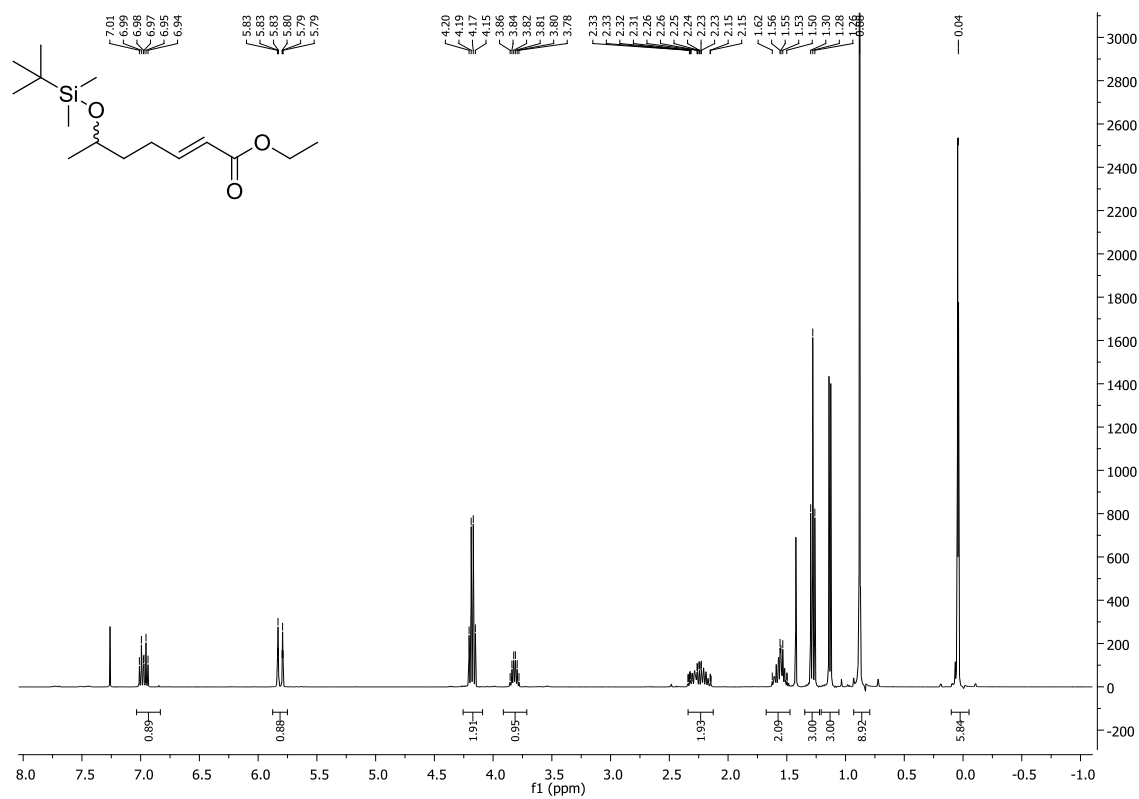


Abbildung 146: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Bis-TBS-Ethers 127.

Abbildung 147: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Alkohols 128.Abbildung 148: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters 129.

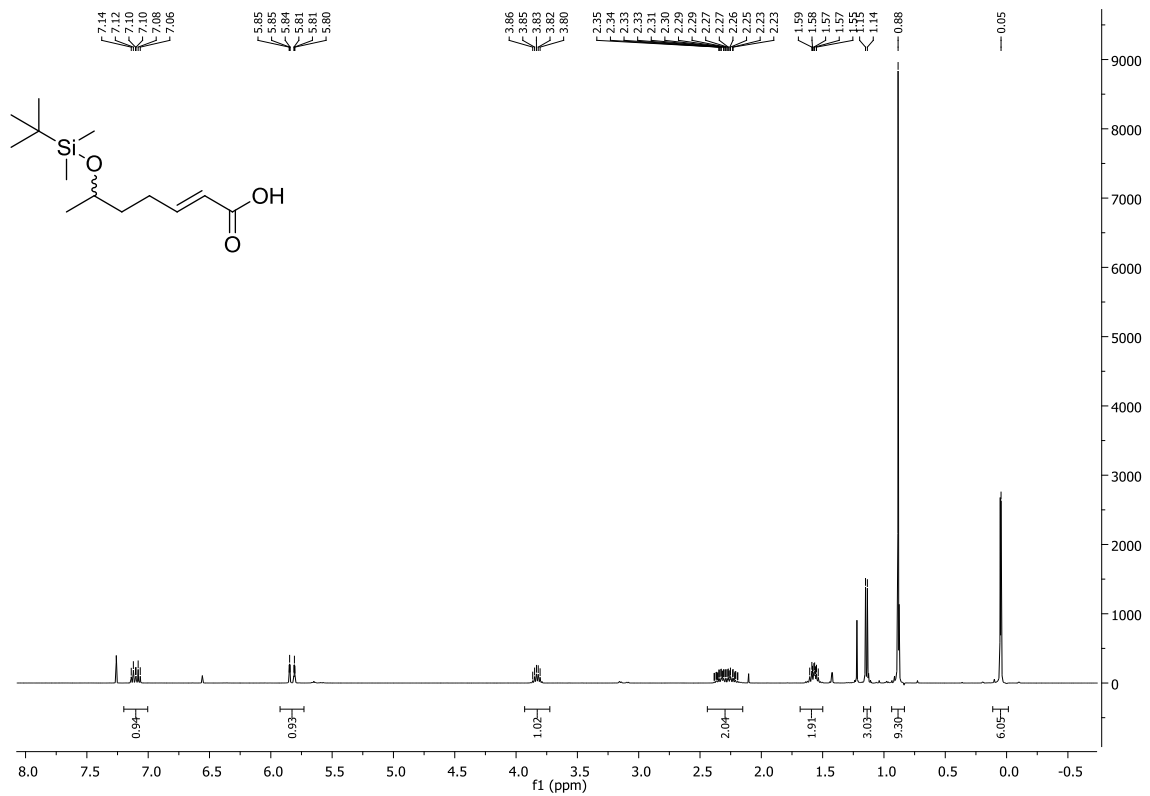


Abbildung 149: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säure 130.

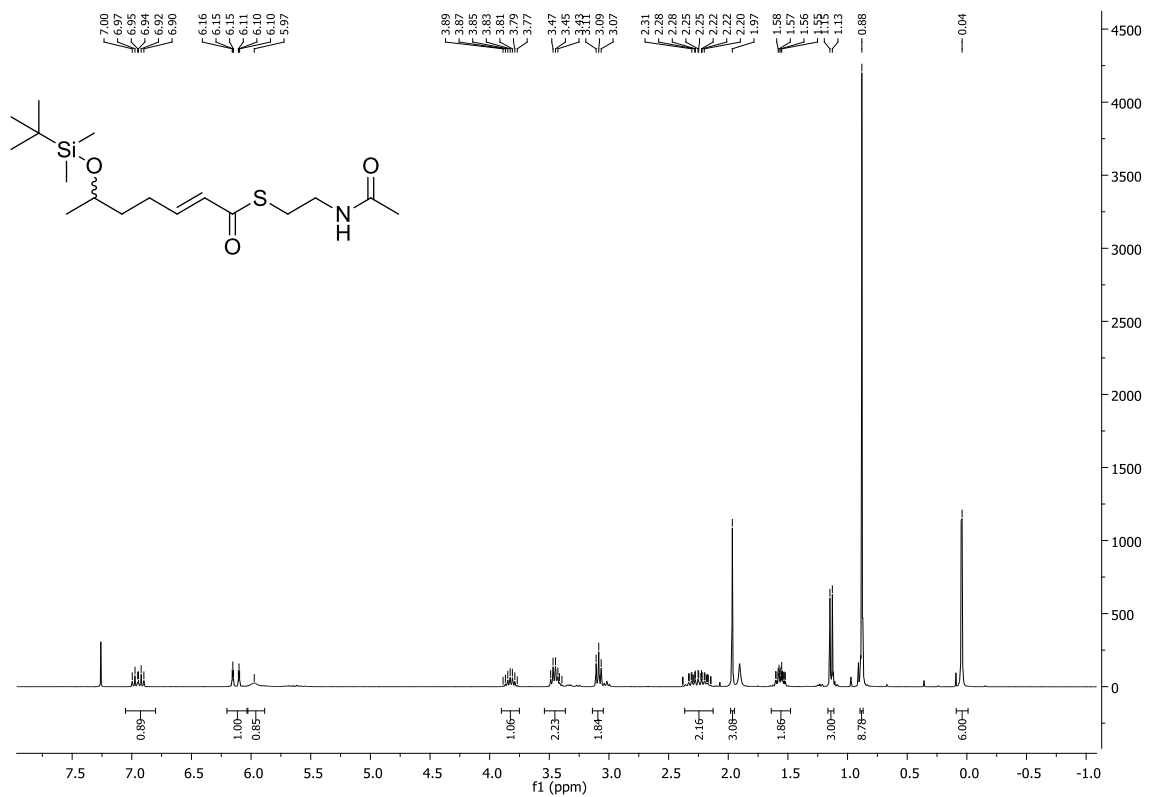
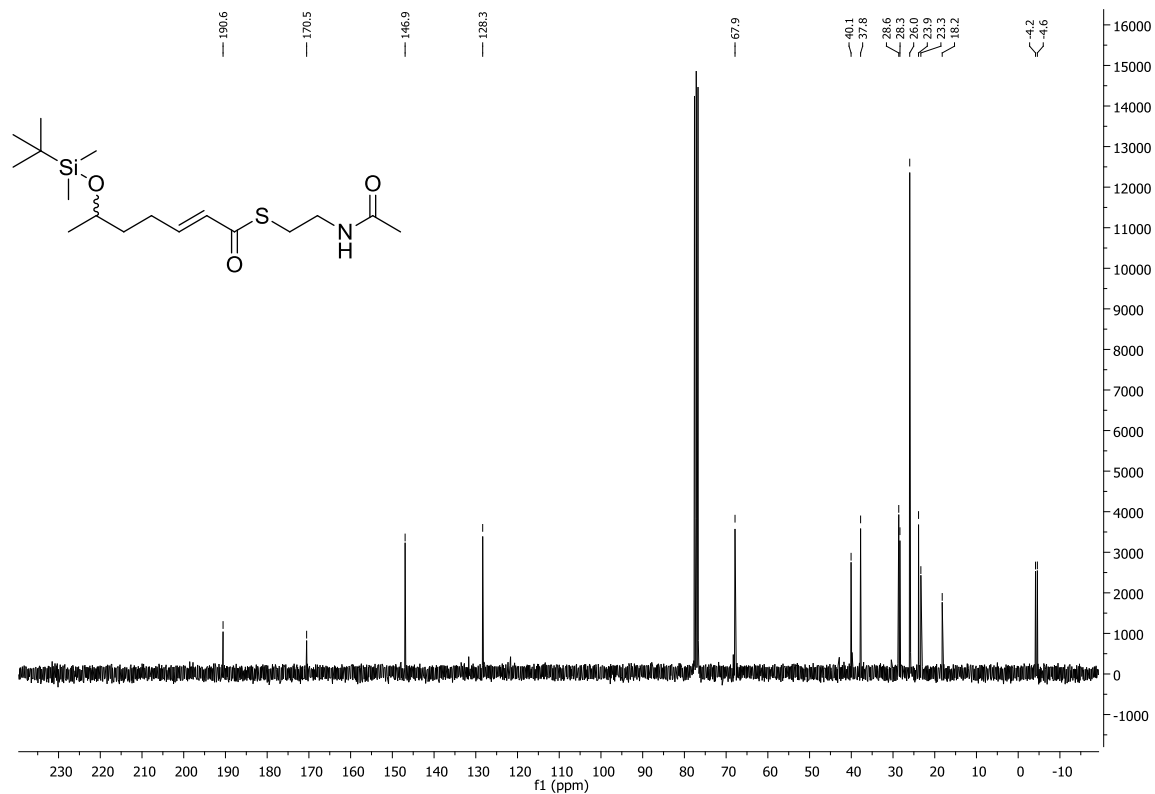
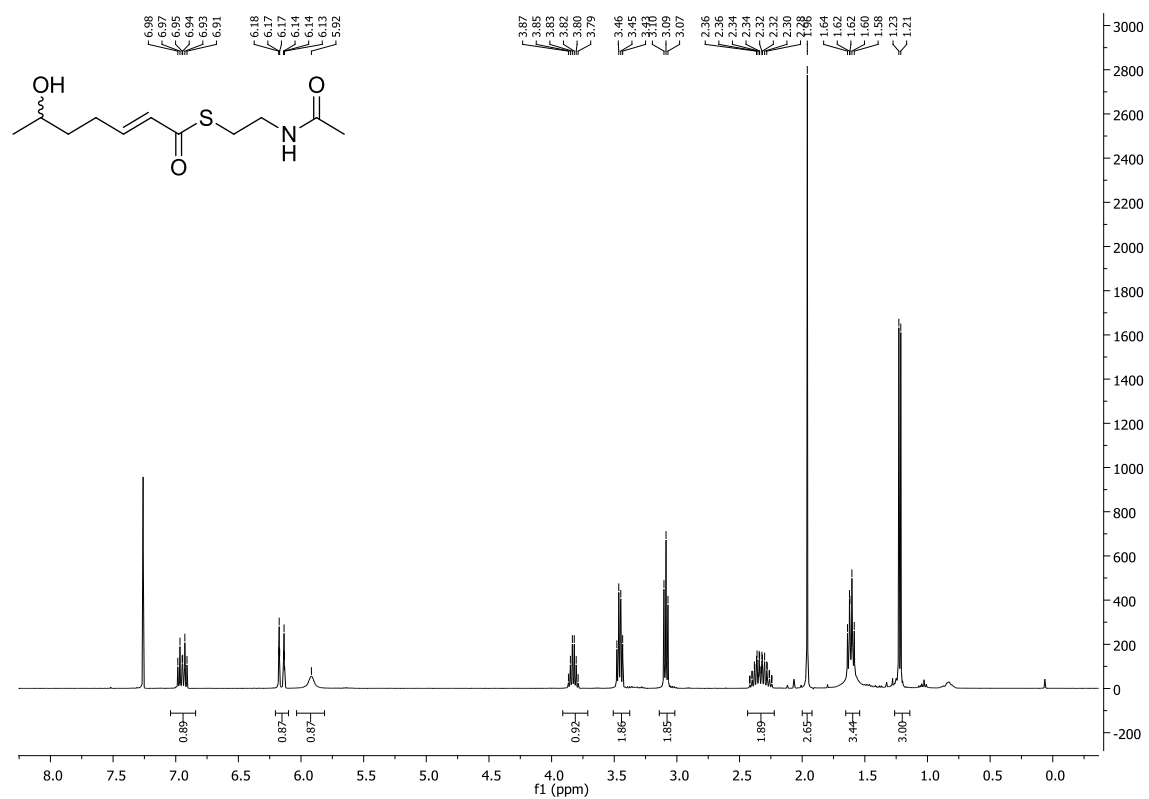


Abbildung 150: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) von 131.

Abbildung 151: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75 MHz) von 131.Abbildung 152: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz) des Thioesters 74.

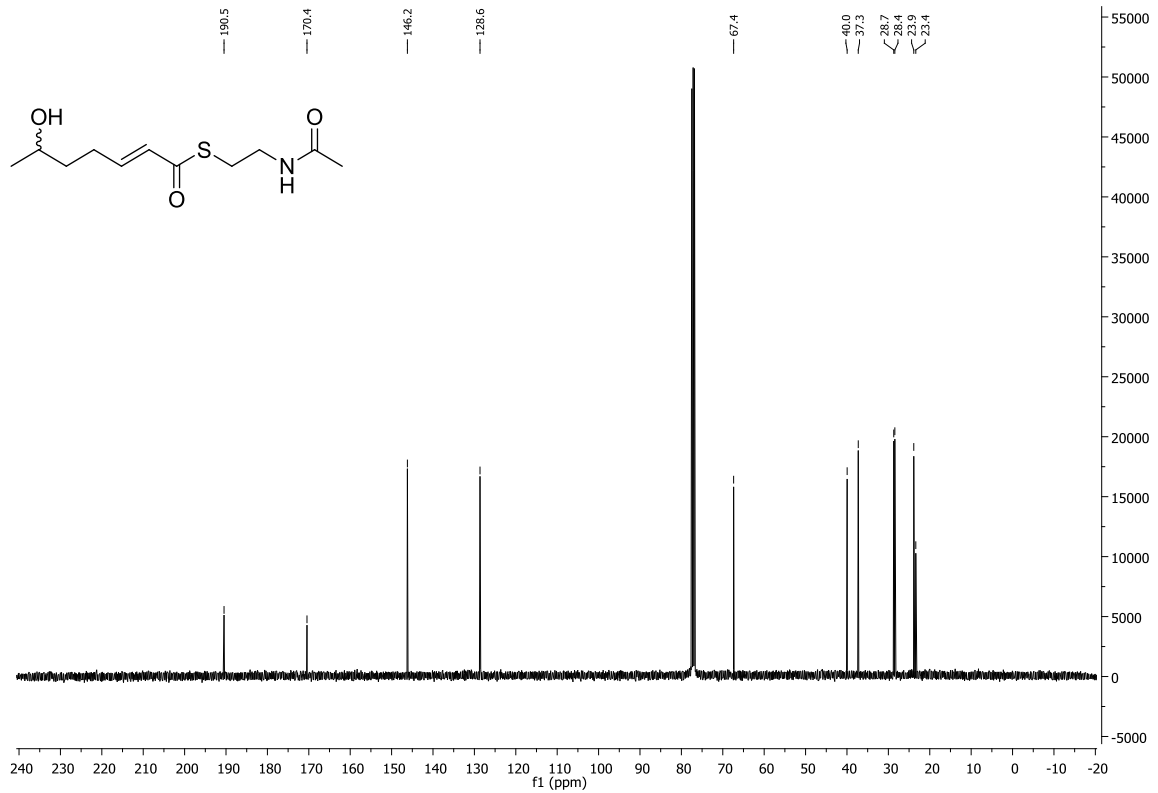


Abbildung 153: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75 MHz) des Thioesters 74.

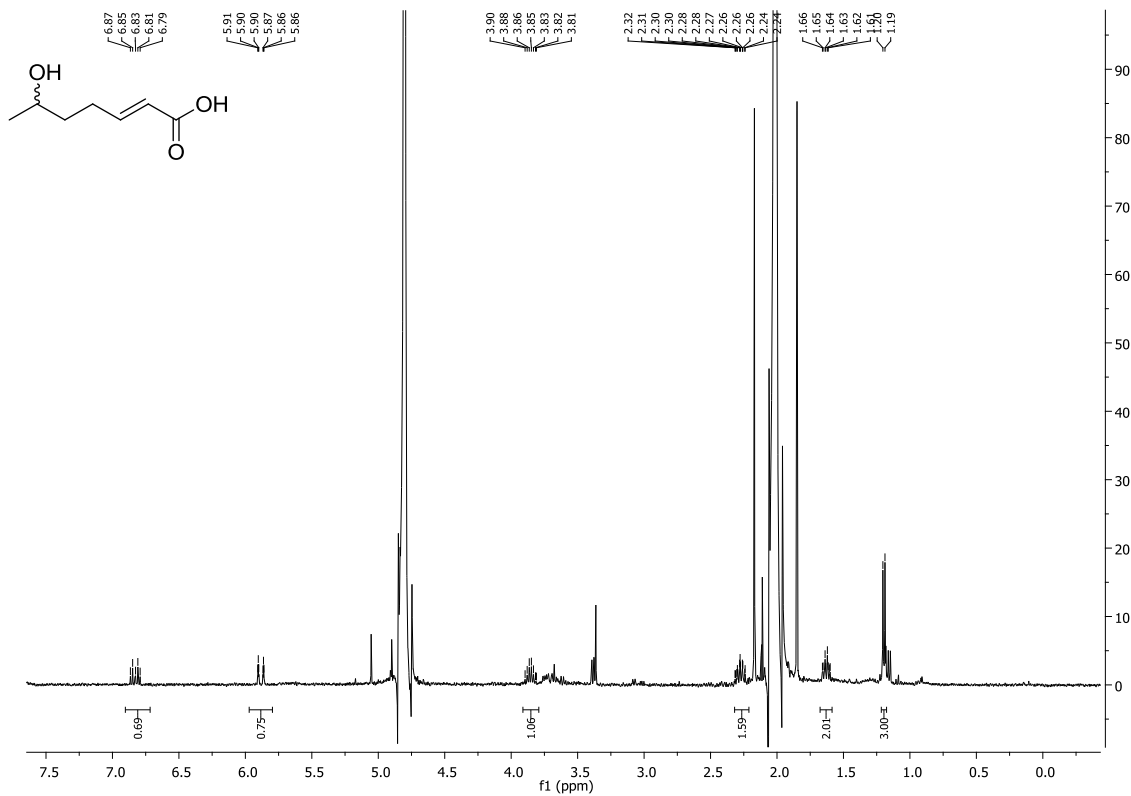
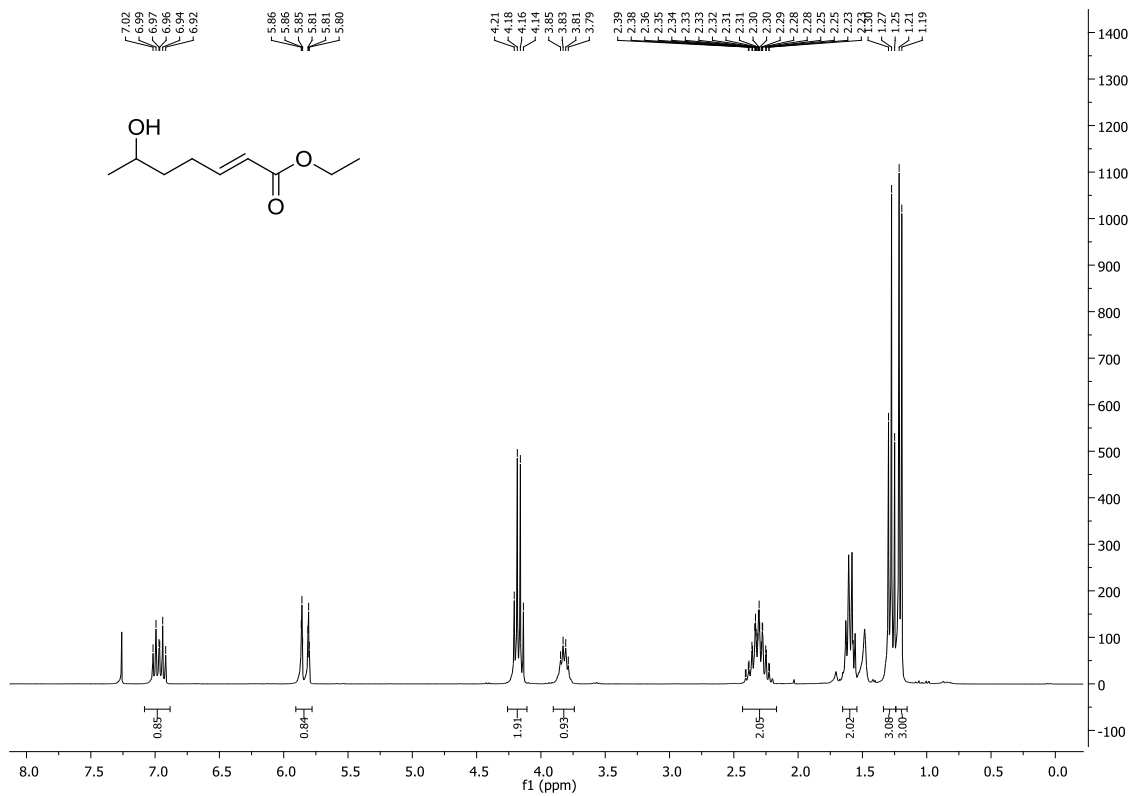
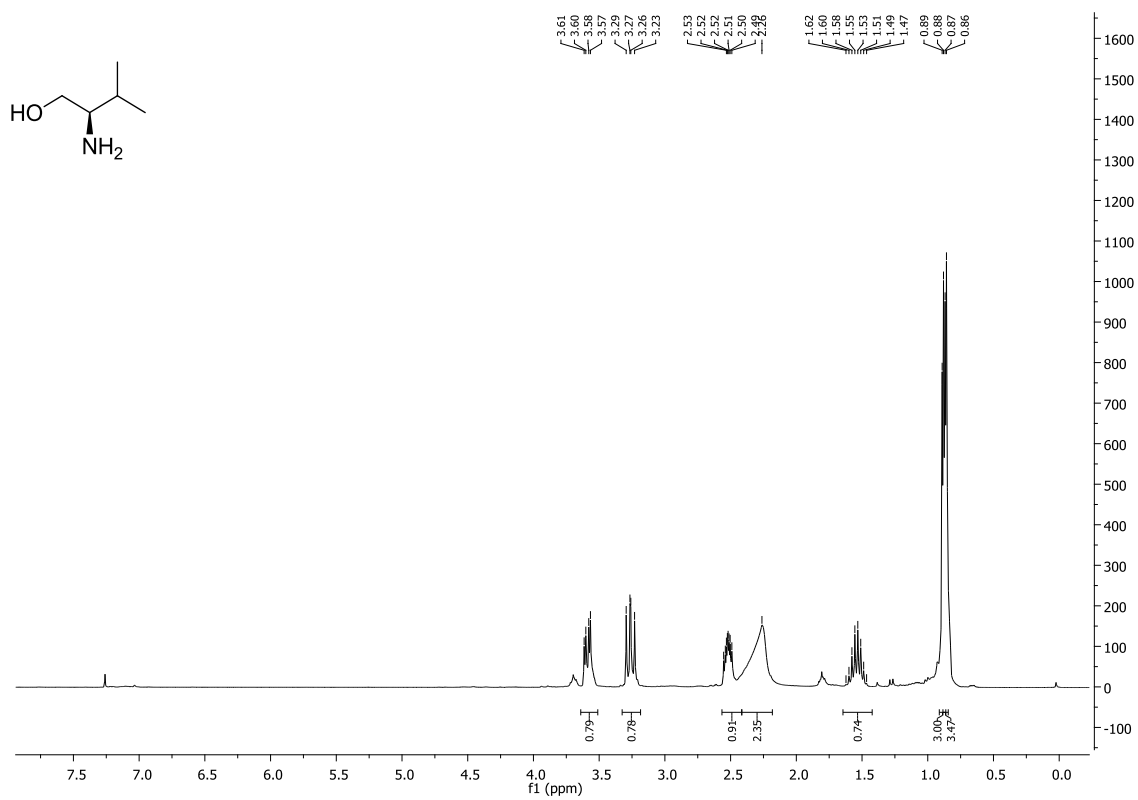


Abbildung 154: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz) der Säure 76.

Abbildung 155: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Ethylesters **78**.Abbildung 156: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) von L-Valinol **100**.

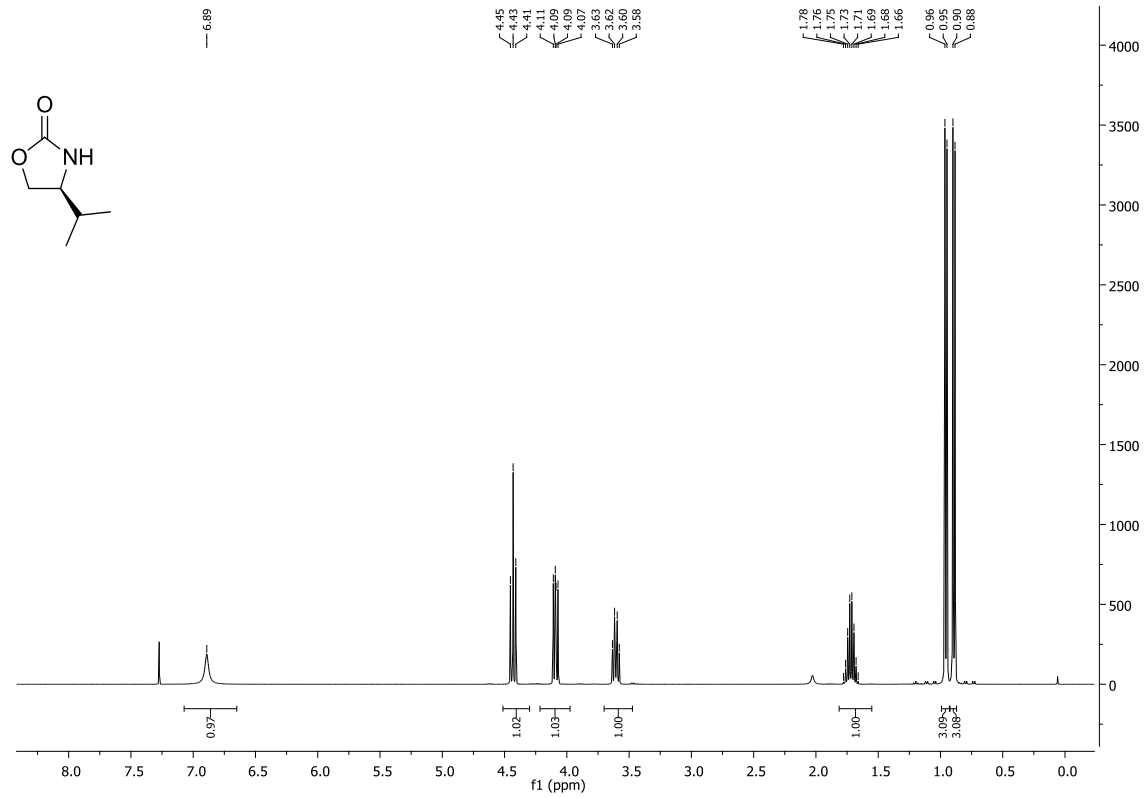


Abbildung 157: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz) von dem cyclischen Produkt **102**.

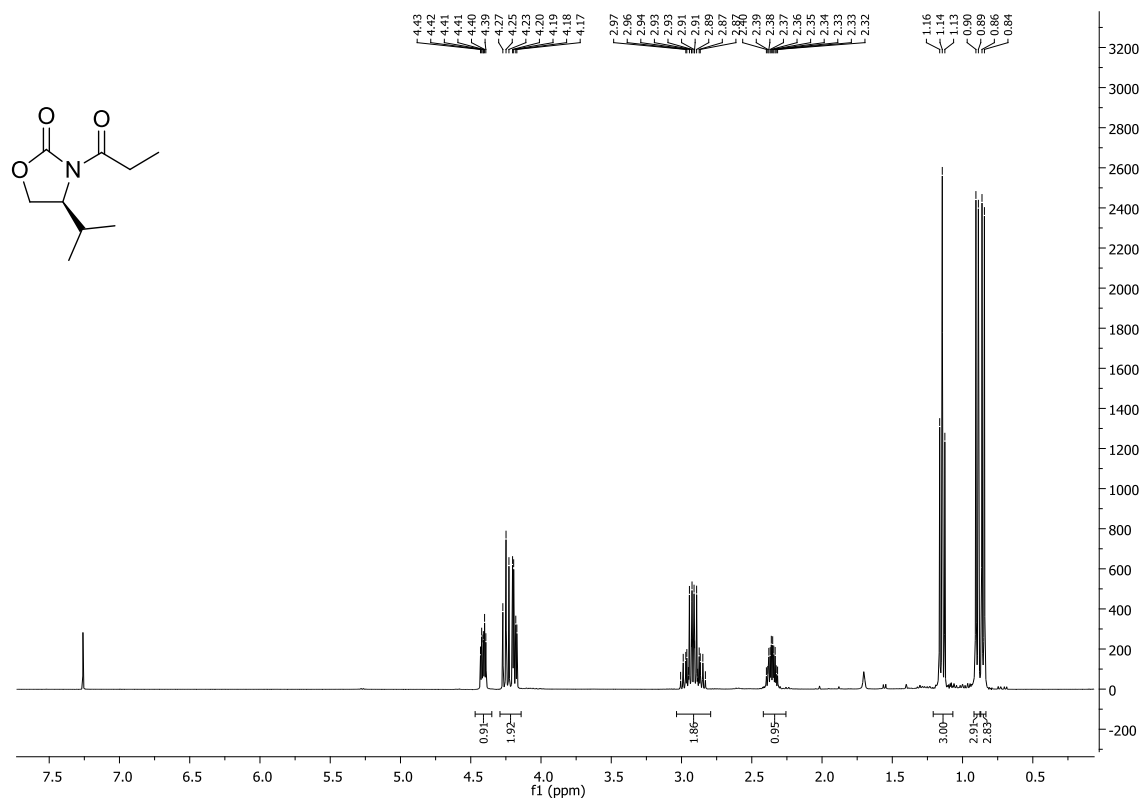


Abbildung 158: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz) von dem cyclischen Produkt **103**.

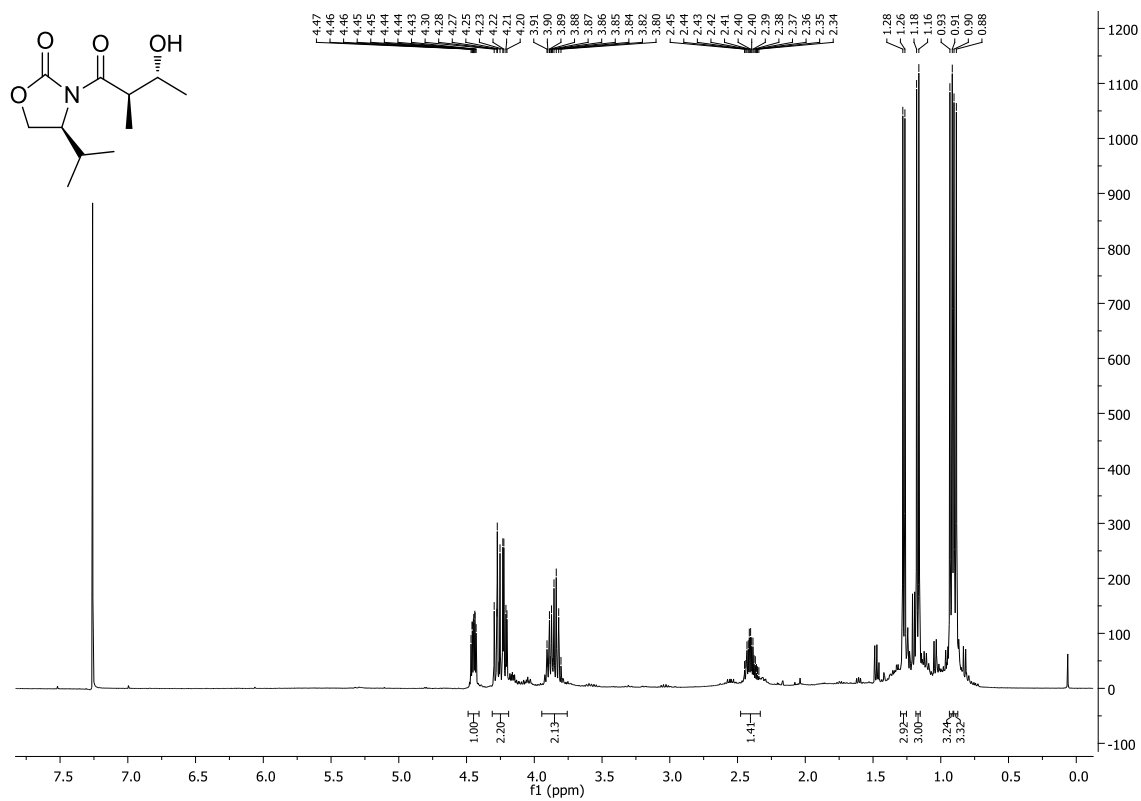


Abbildung 159: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Imids 105a.

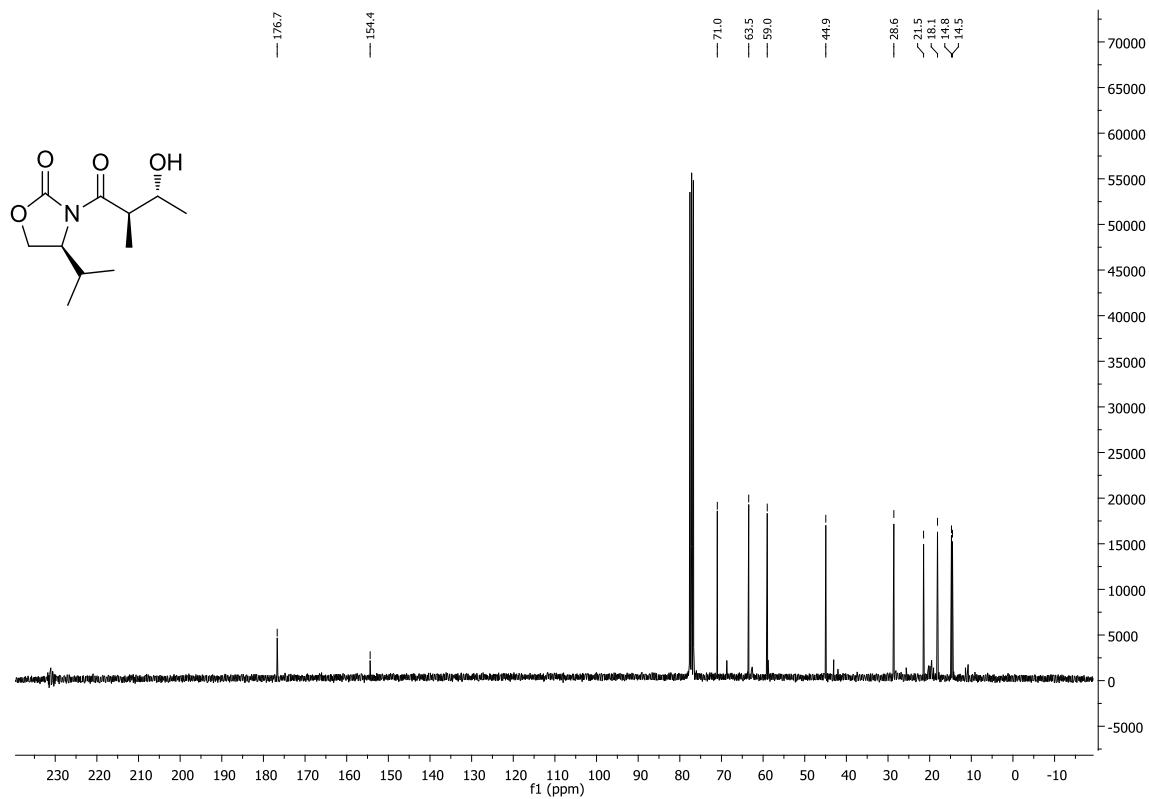


Abbildung 160: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Imids 105a.

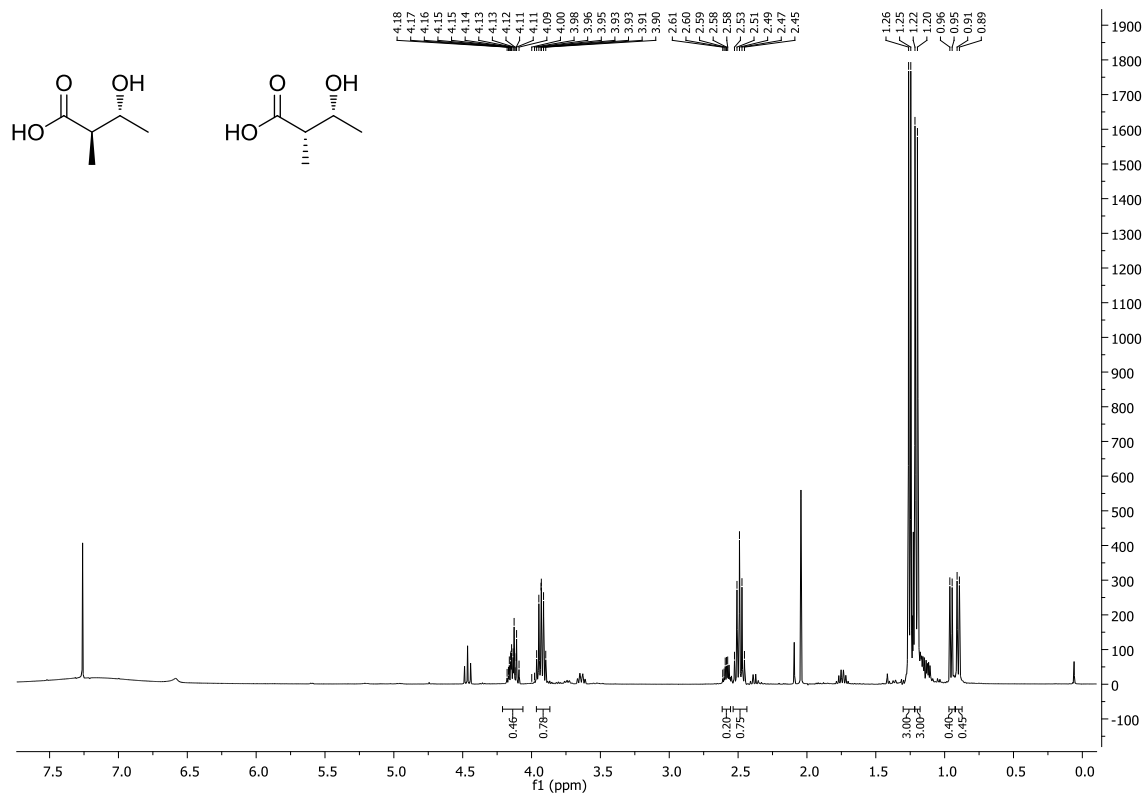


Abbildung 161: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) der Säuren 106a und 106b.

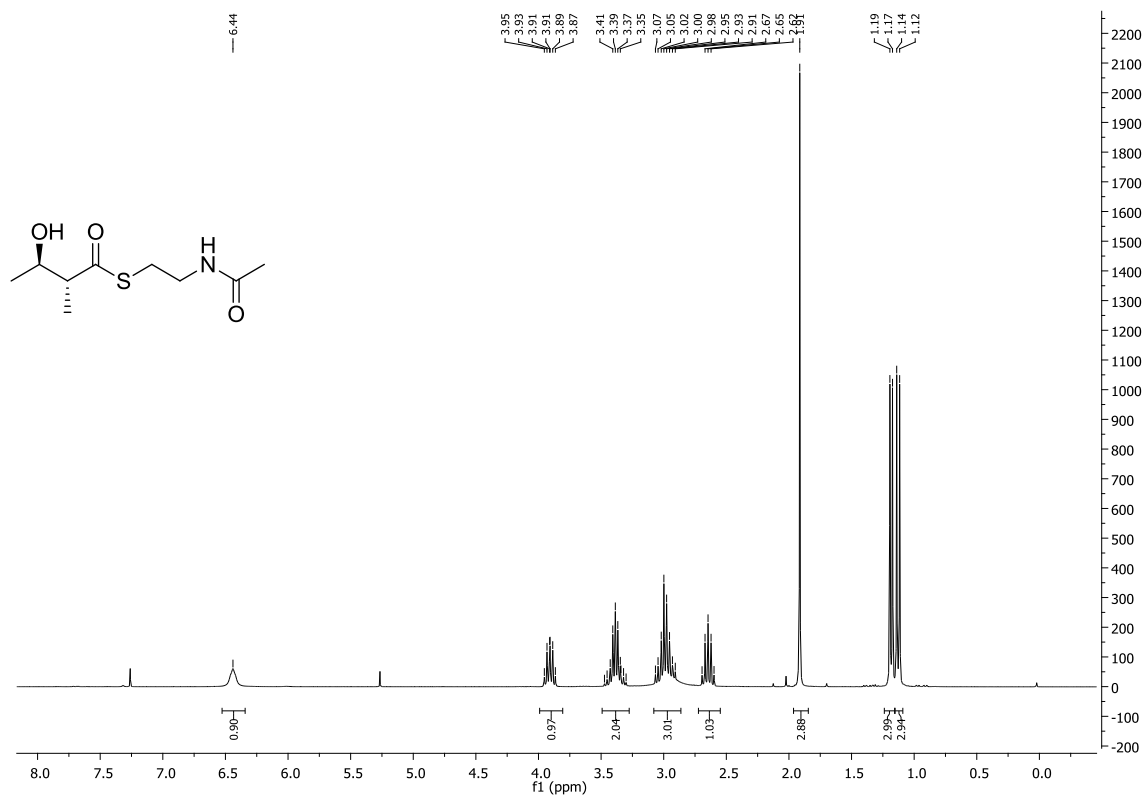
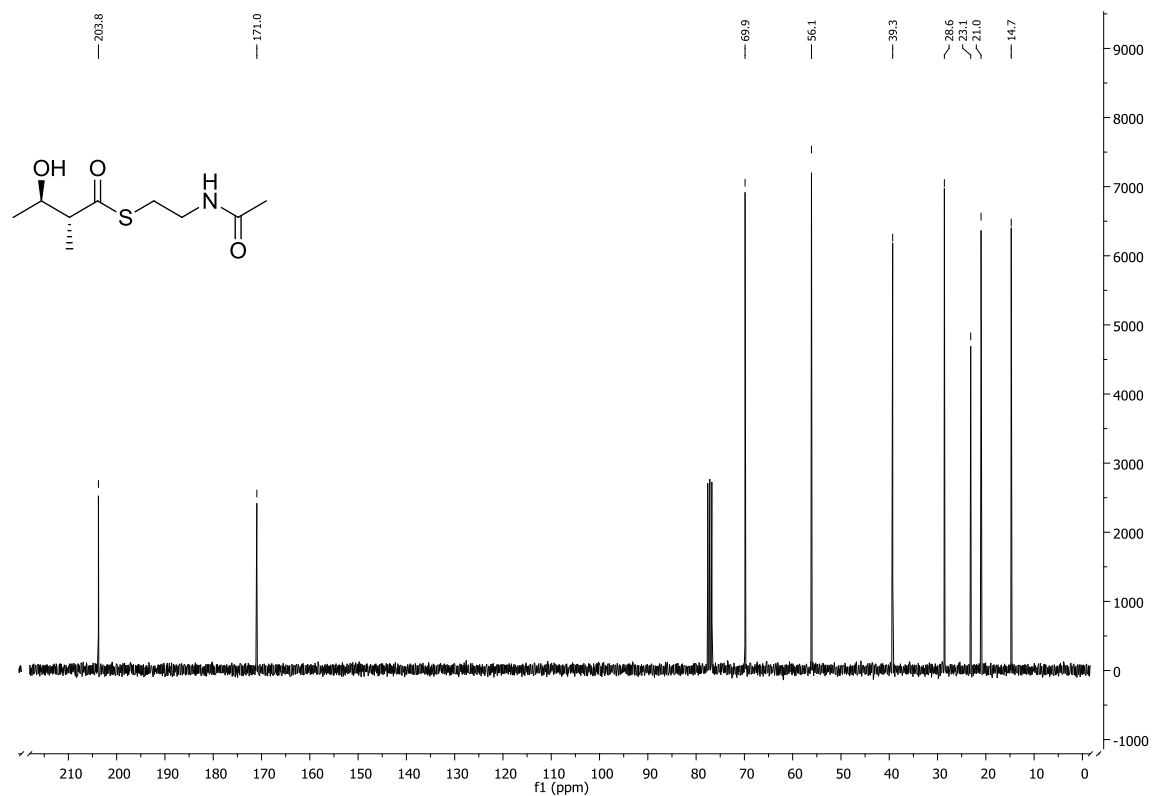
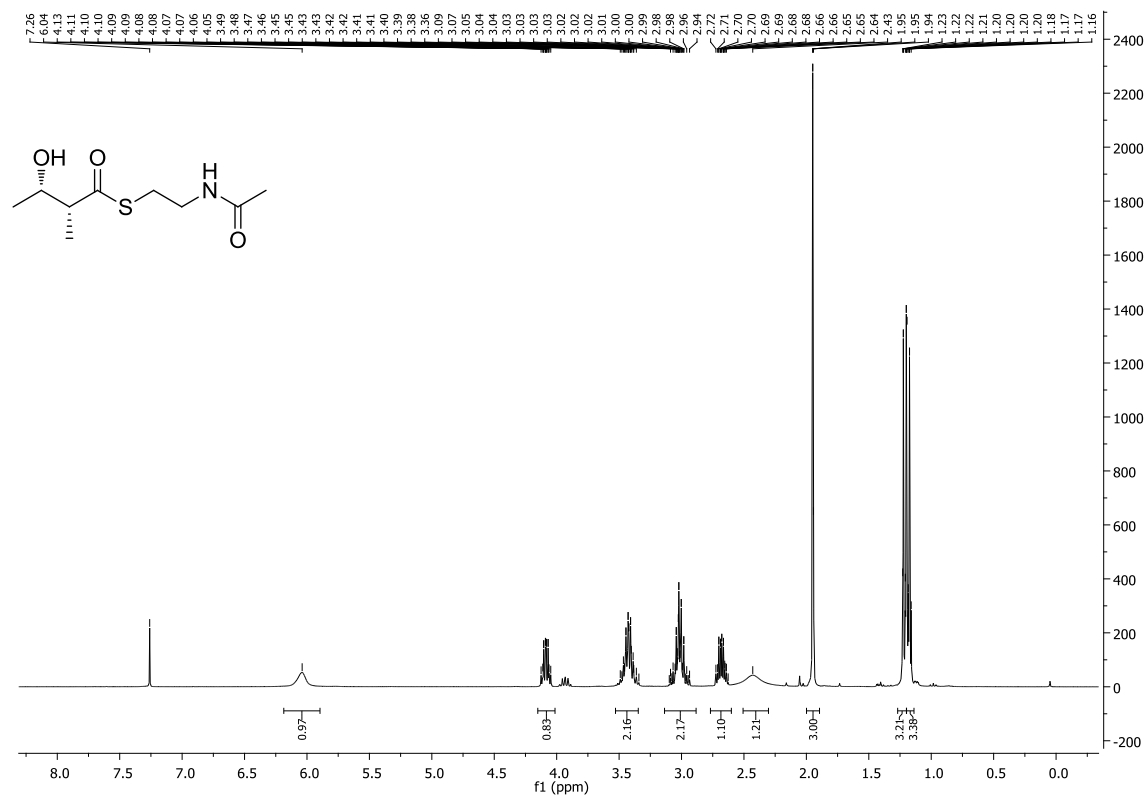


Abbildung 162: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 97.

Abbildung 163: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters 97.Abbildung 164: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters 98.

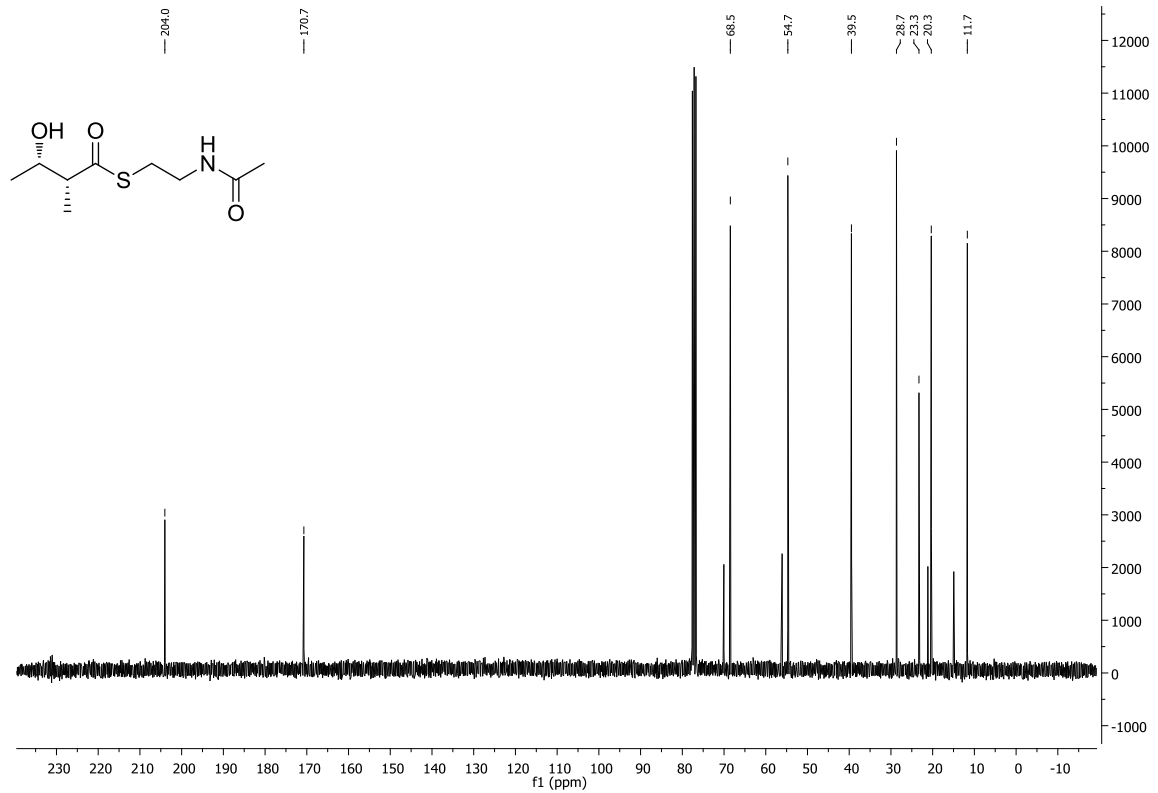


Abbildung 165: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters **98**.

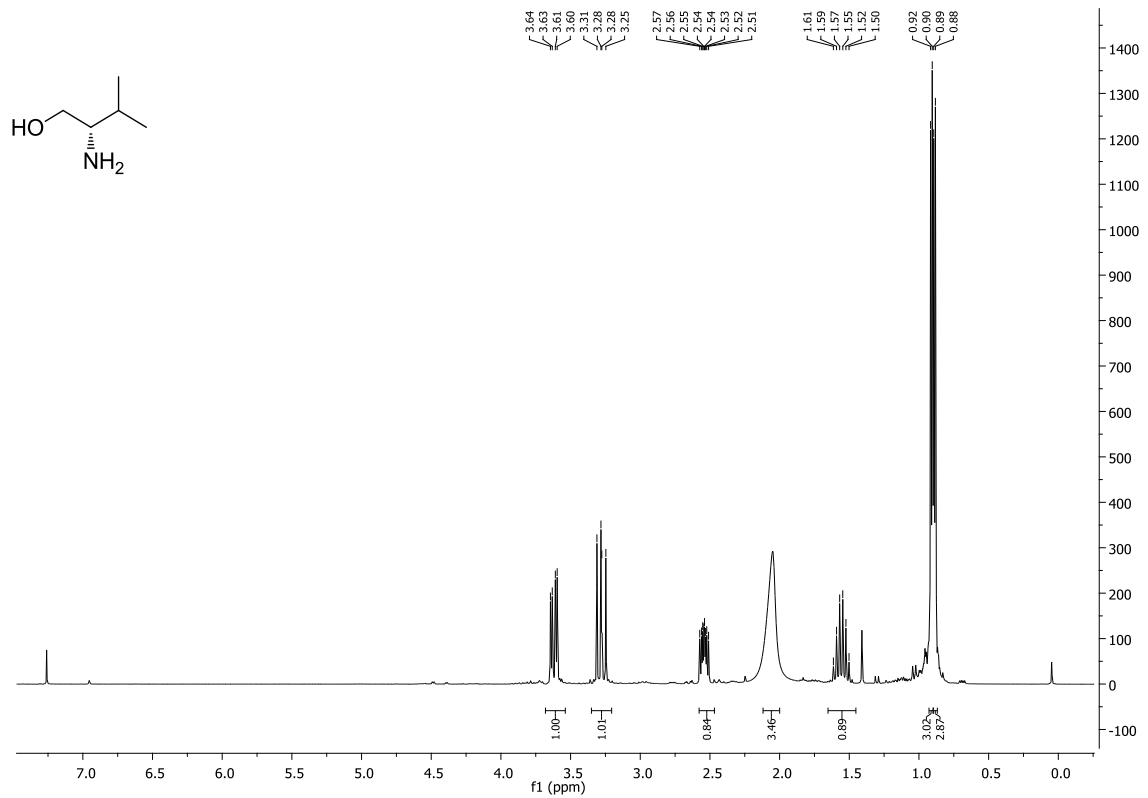


Abbildung 166: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) von D-Valinol *ent*-**100**.

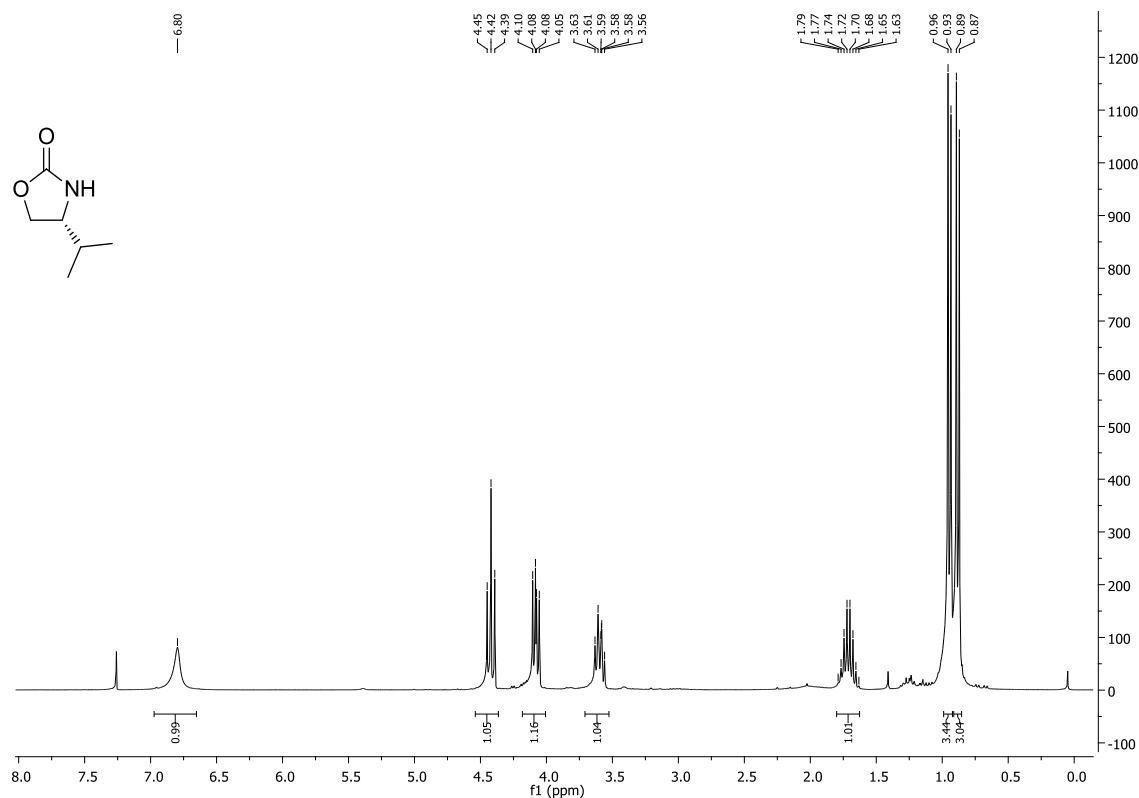


Abbildung 167: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz) von dem cyclischen Produkt *ent*-102.

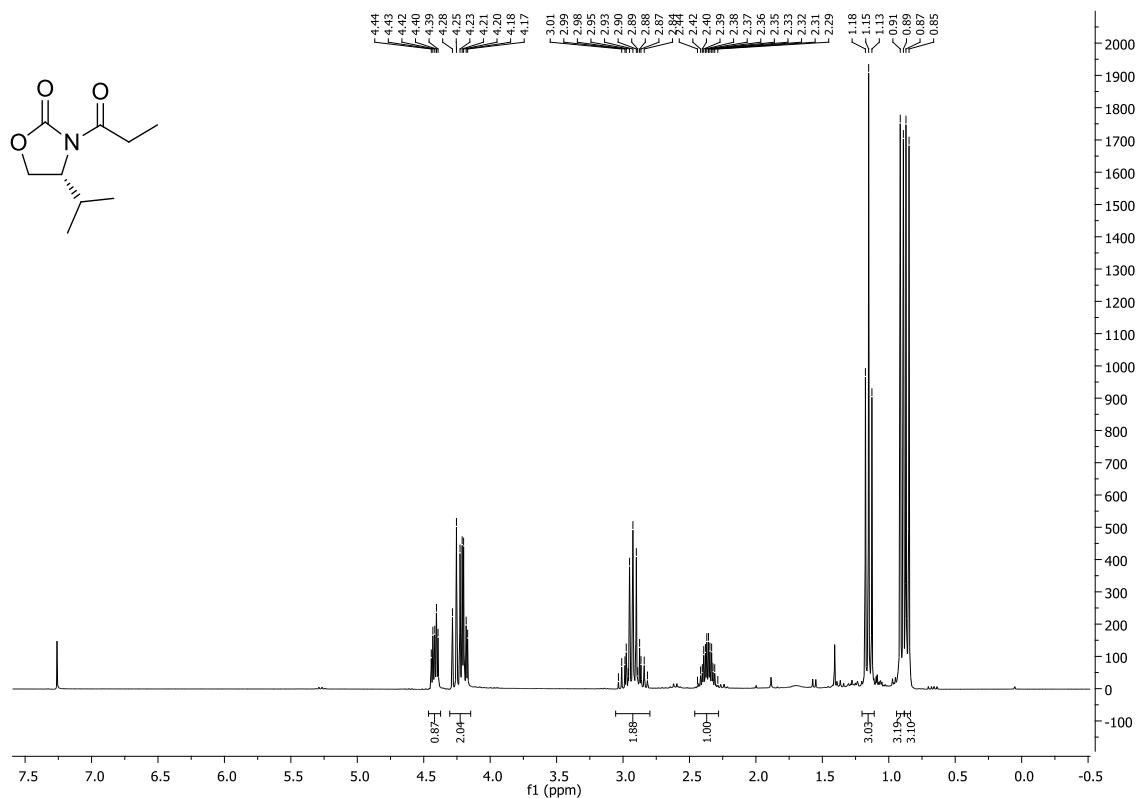


Abbildung 168: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz) von dem cyclischen Produkt *ent*-103.

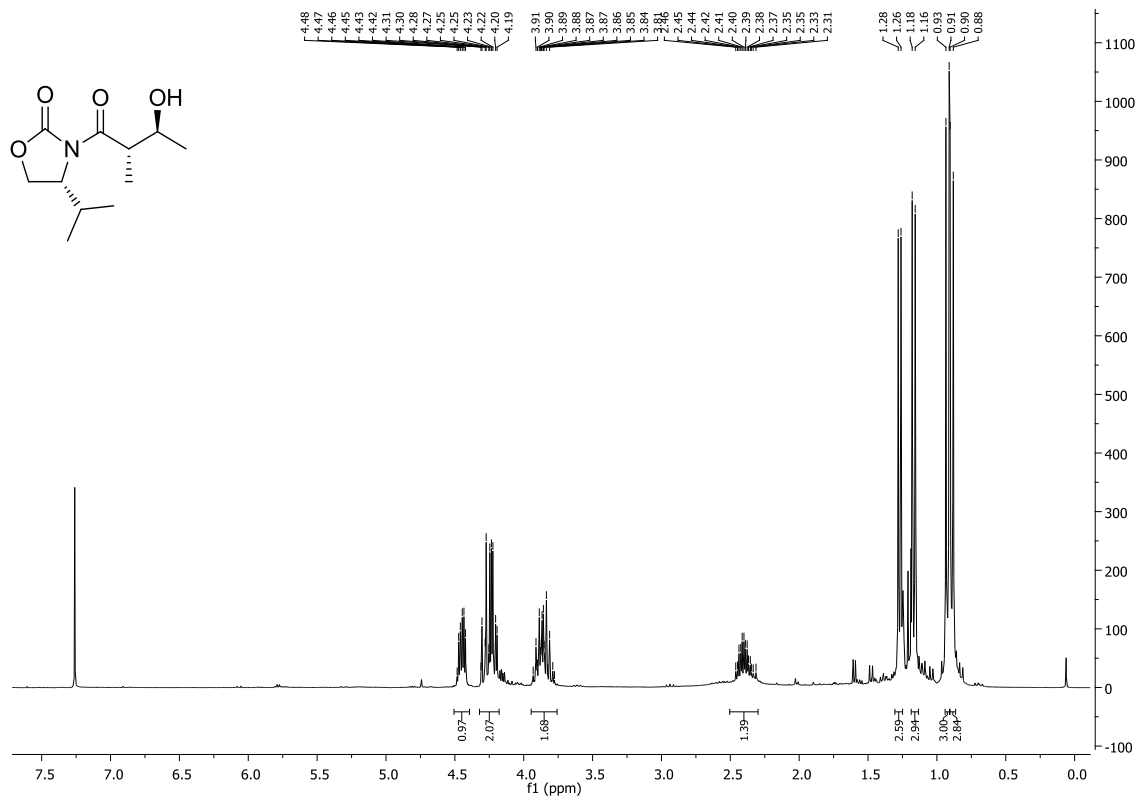


Abbildung 169: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Evans-Addukts *ent*-105a.

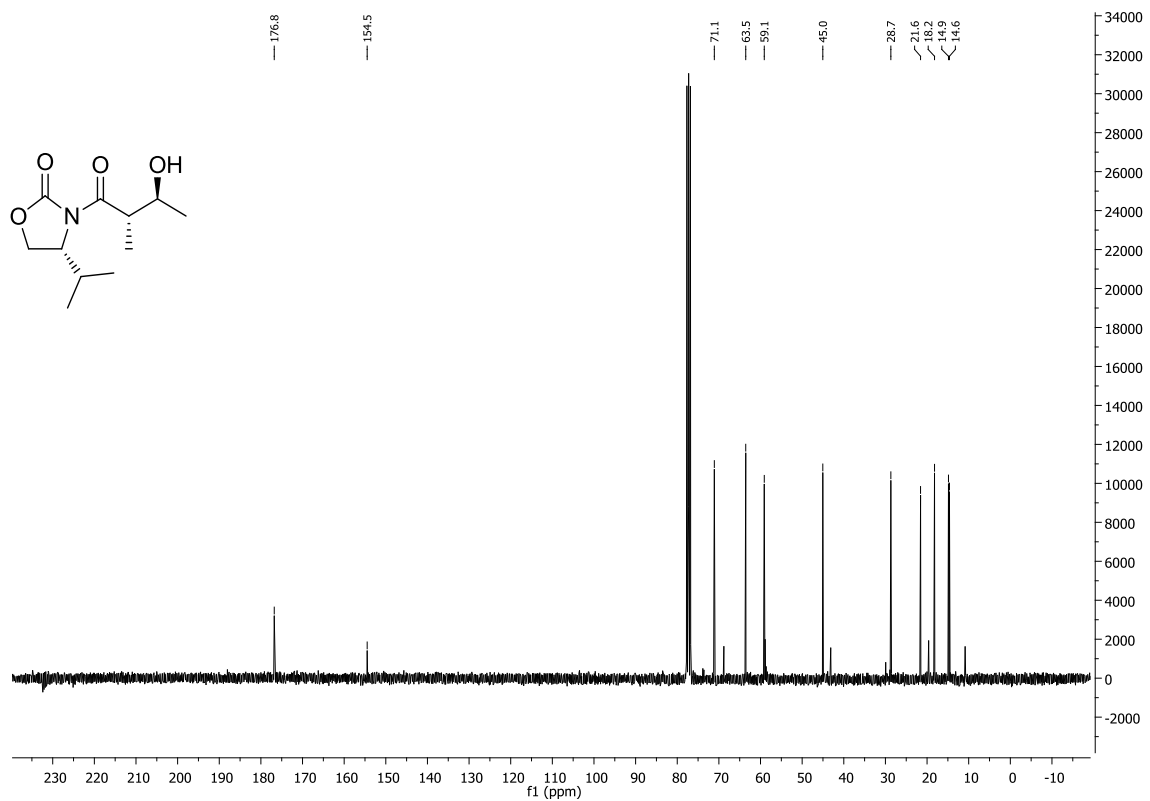


Abbildung 170: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Evans-Addukts *ent*-105a.

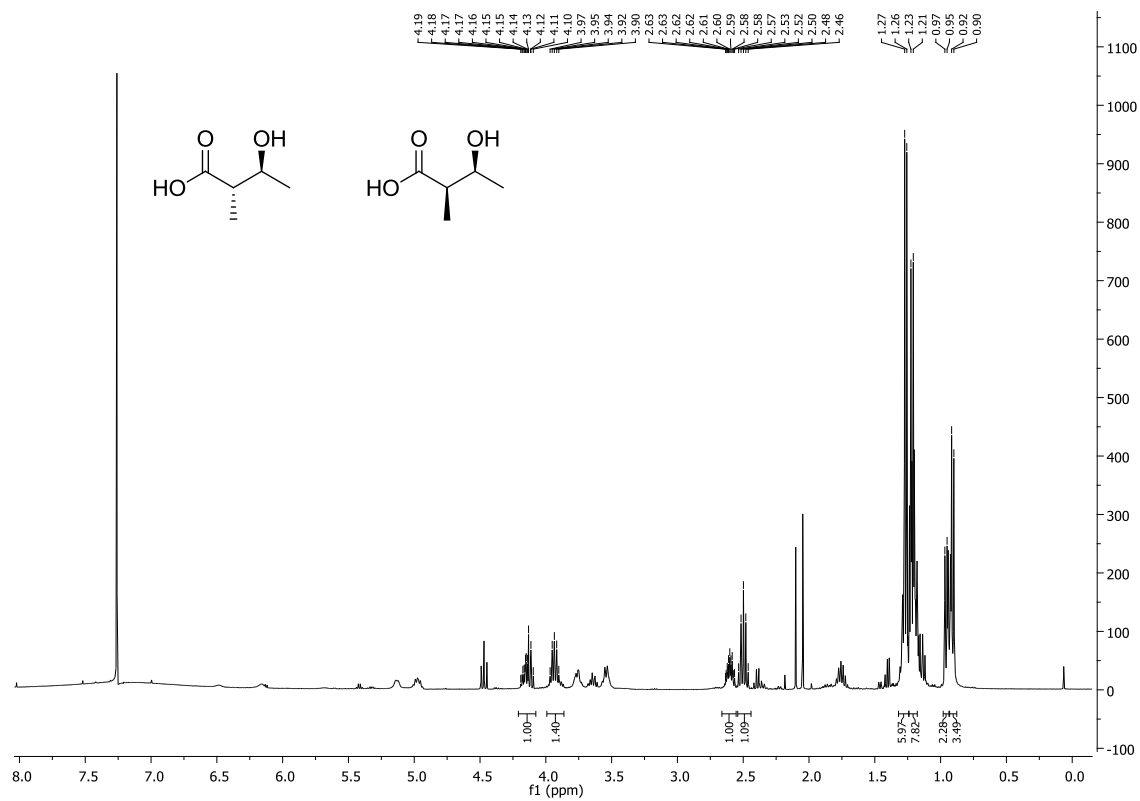


Abbildung 171: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) der Säuren *ent*-106a, *ent*-106b.

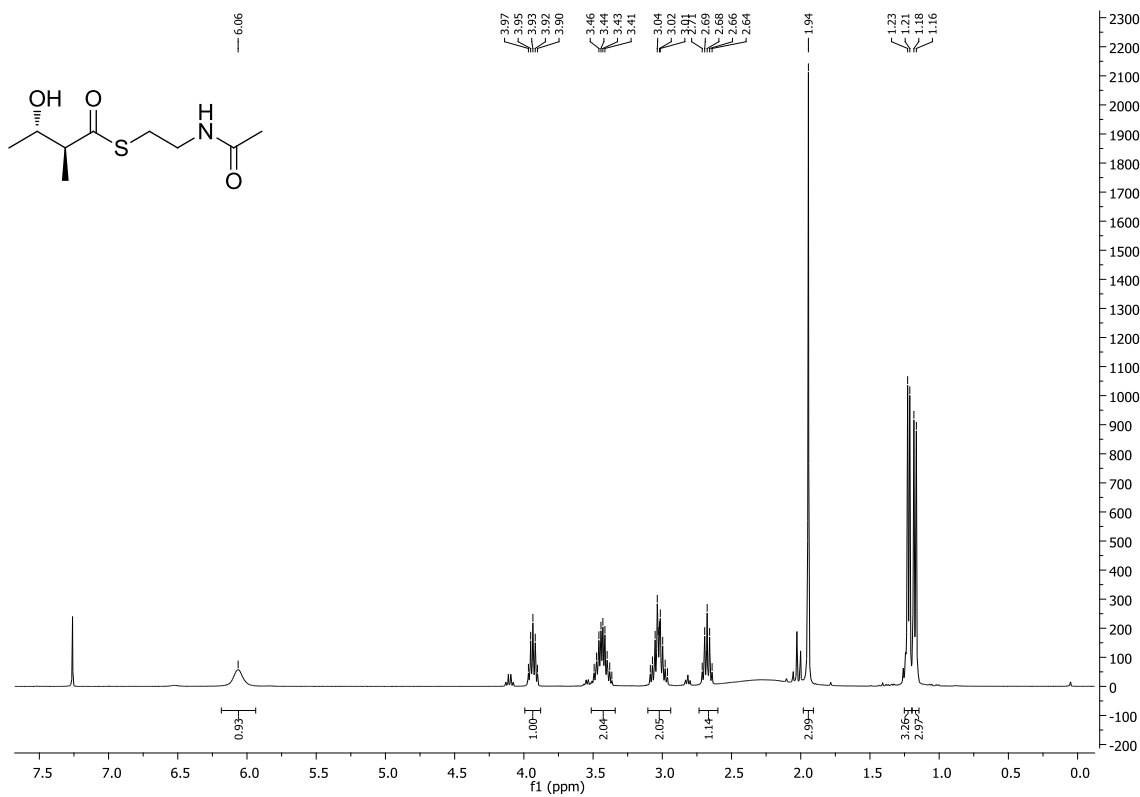


Abbildung 172: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters *ent*-97.

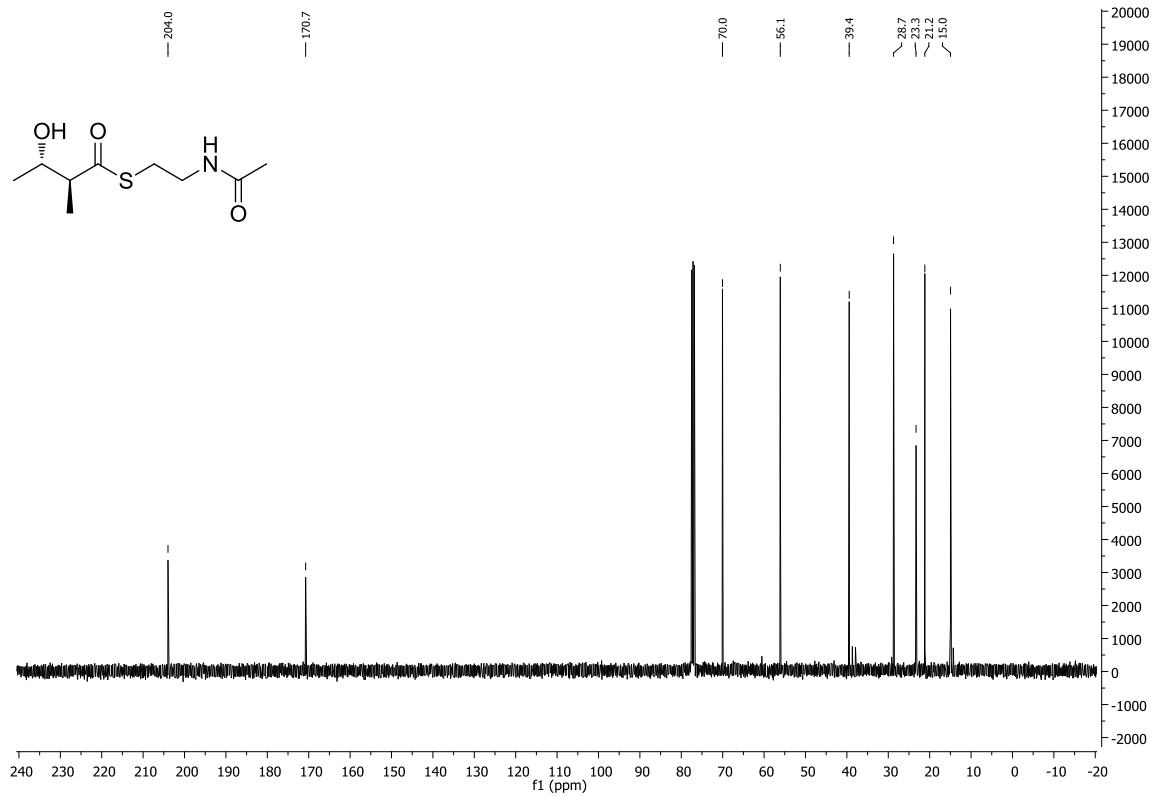


Abbildung 173: ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters *ent*-97.

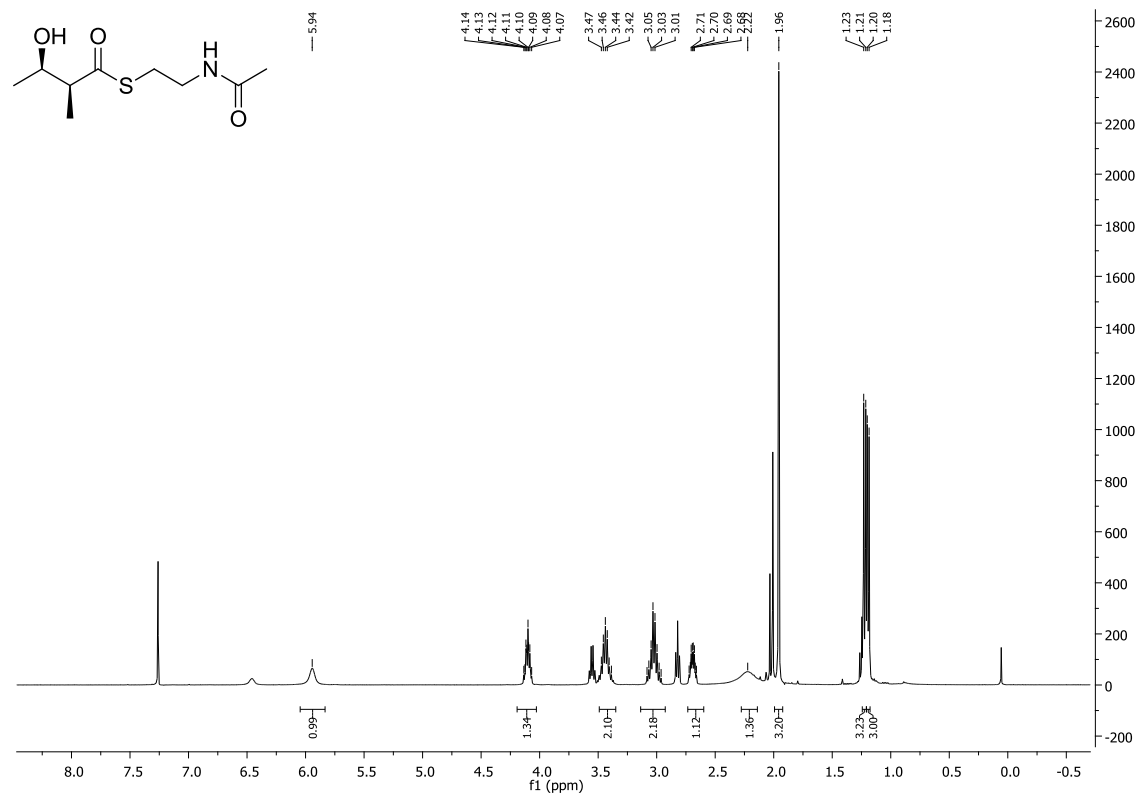


Abbildung 174: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Thioesters *ent*-98.

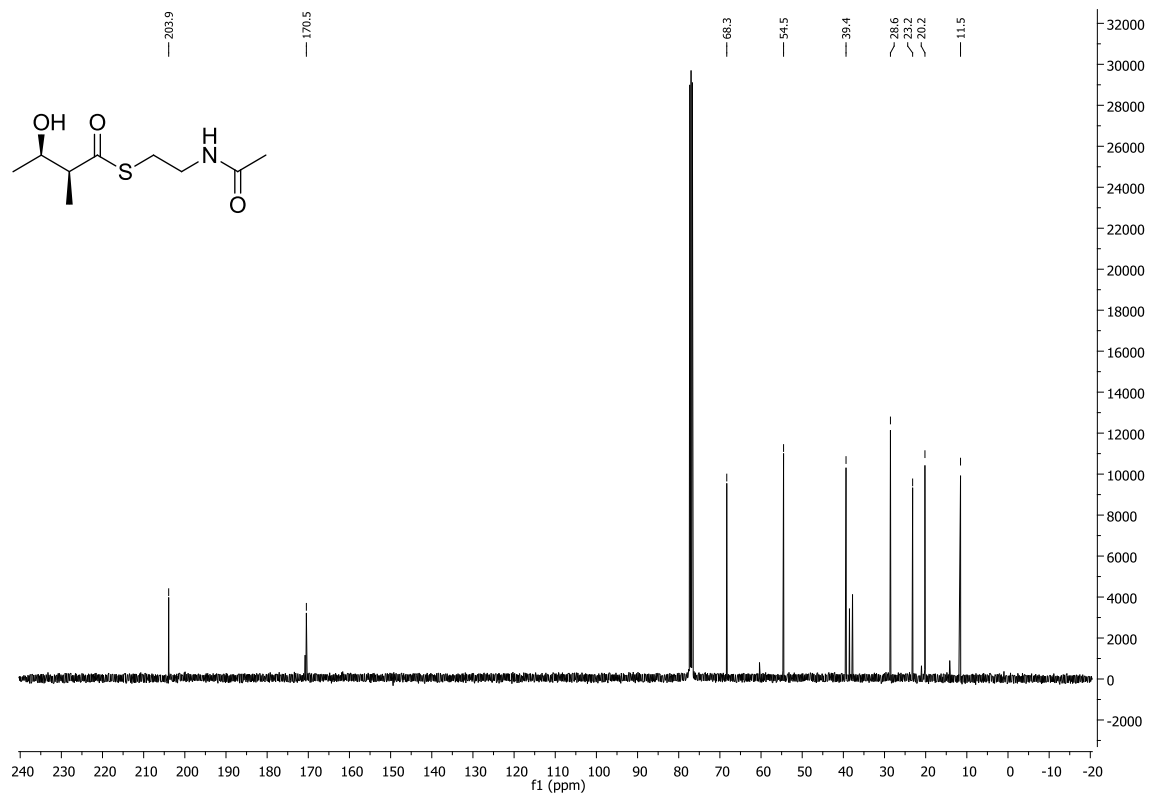


Abbildung 175: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) des Thioesters *ent-98*.

6.4.2 NMR-Spektren Naturstoffextraktion

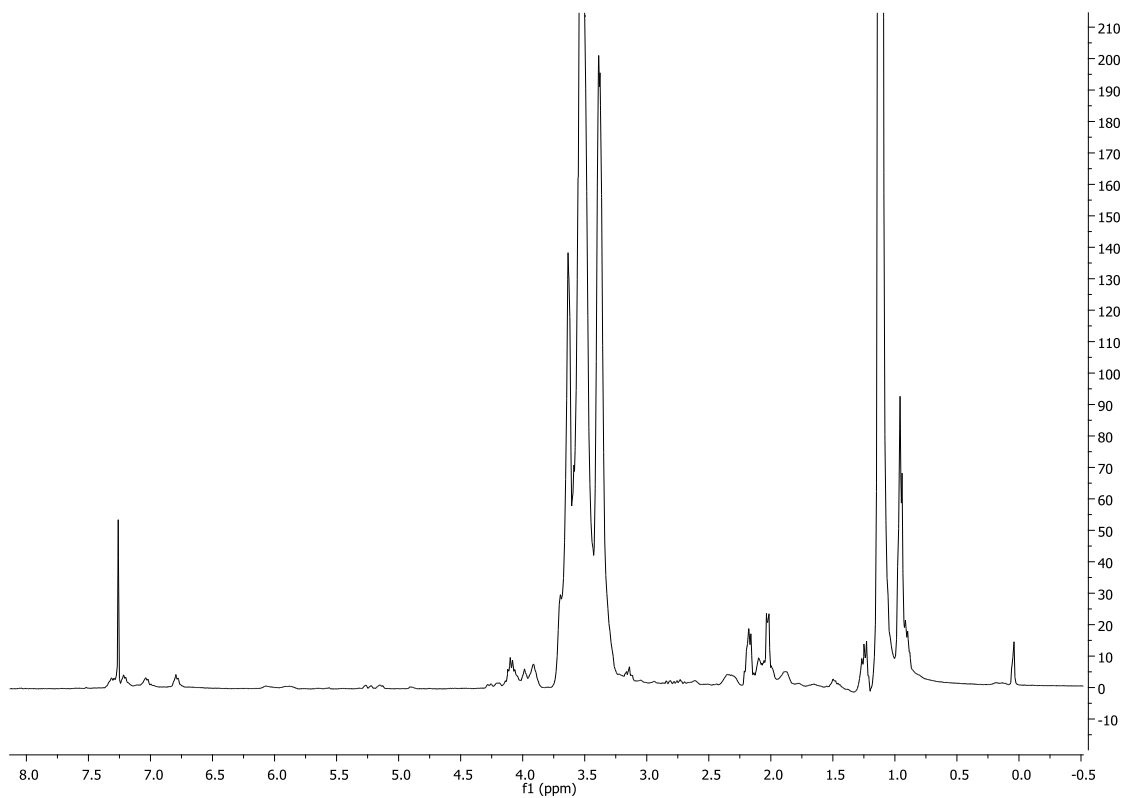


Abbildung 176: ^1H -Spektrum des Überstand-Rohextrakts von *S. plymuthica*.

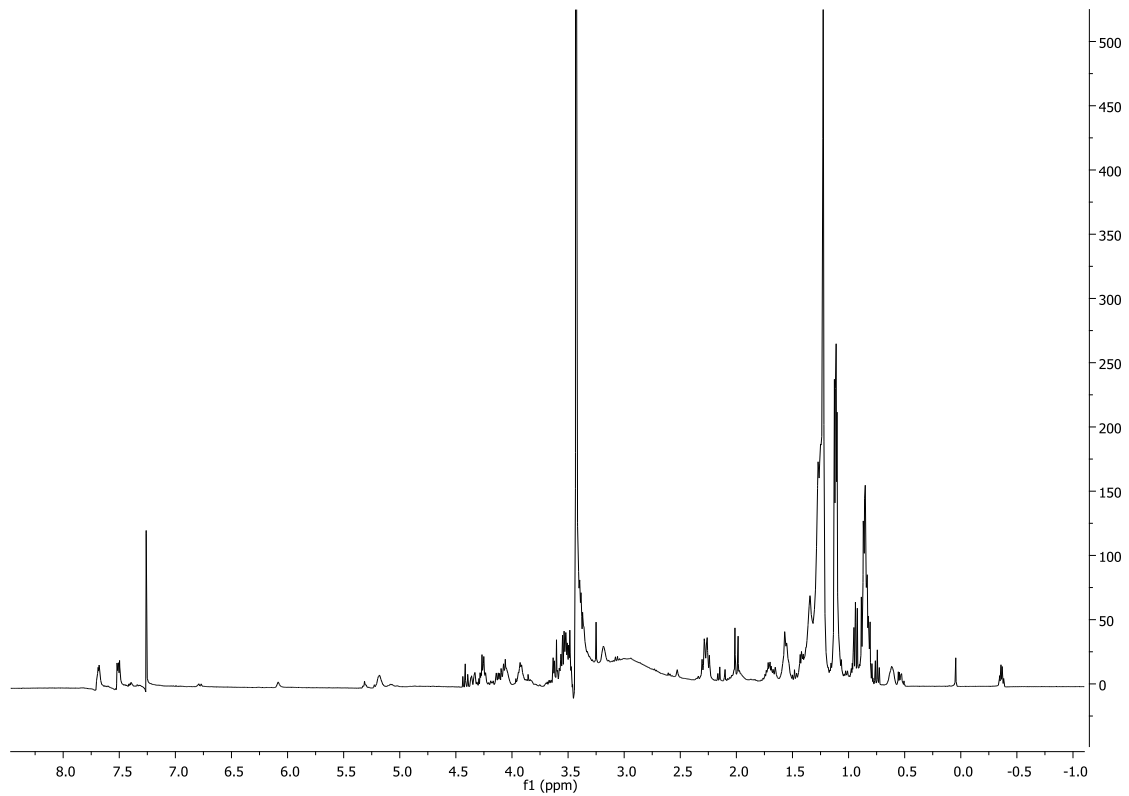


Abbildung 177: ^1H -Spektrum des Zellextrakts von *S. plymuthica*.

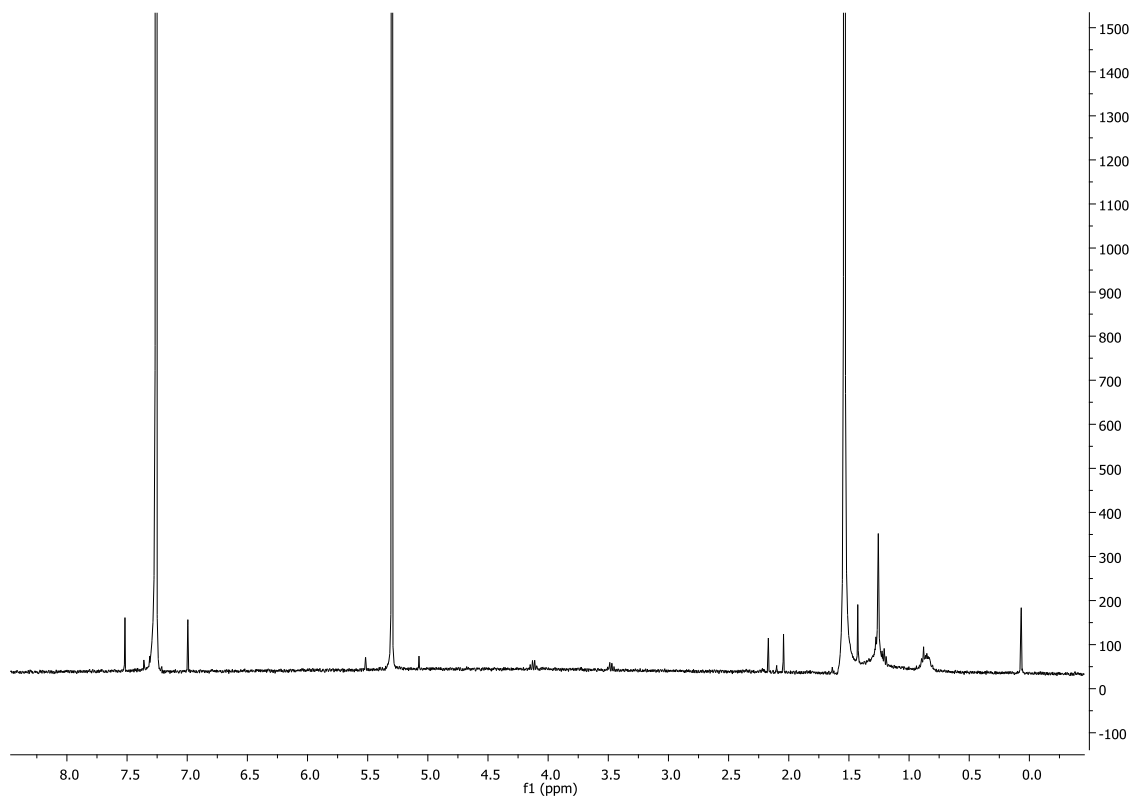


Abbildung 178: ^1H -Spektrum der säulenchromatographischen Aufreinigung (Fraktion 1) der Naturstoffextraktion von *S. plymuthica*.

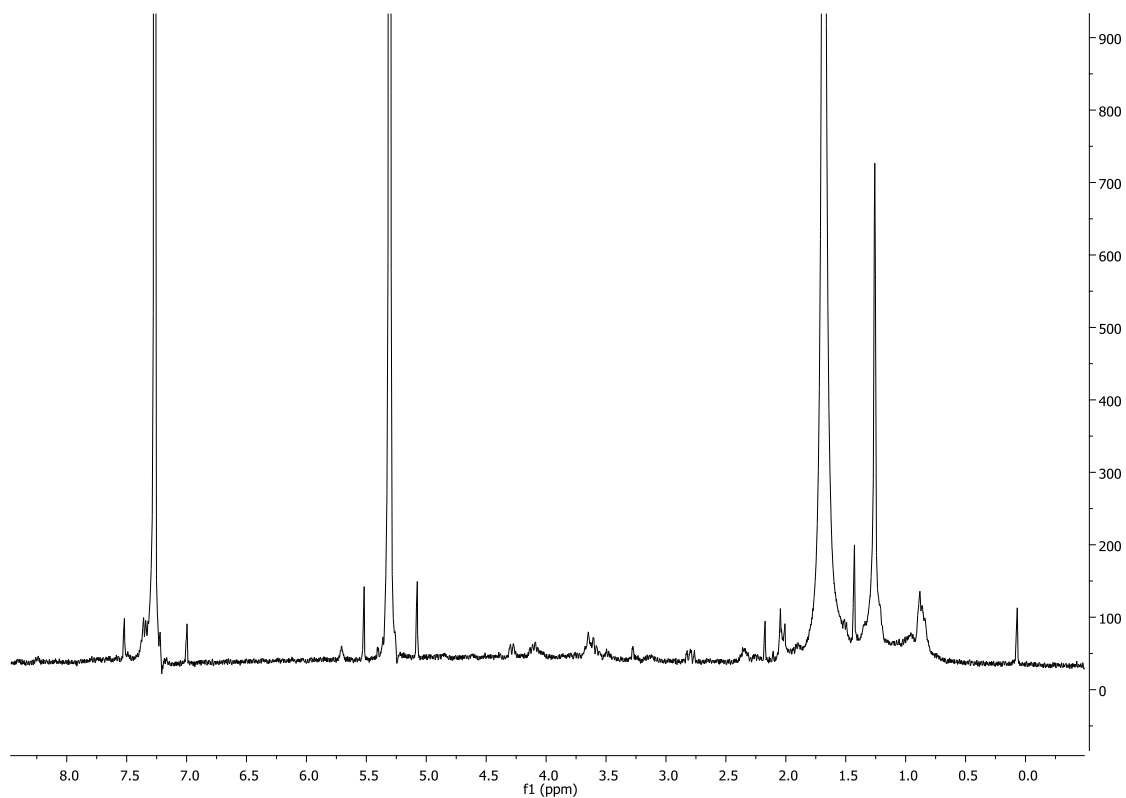


Abbildung 179: ^1H -Spektrum der säulenchromatographischen Aufreinigung (Fraktion 2) der Naturstoffextraktion von *S. plymuthica*.

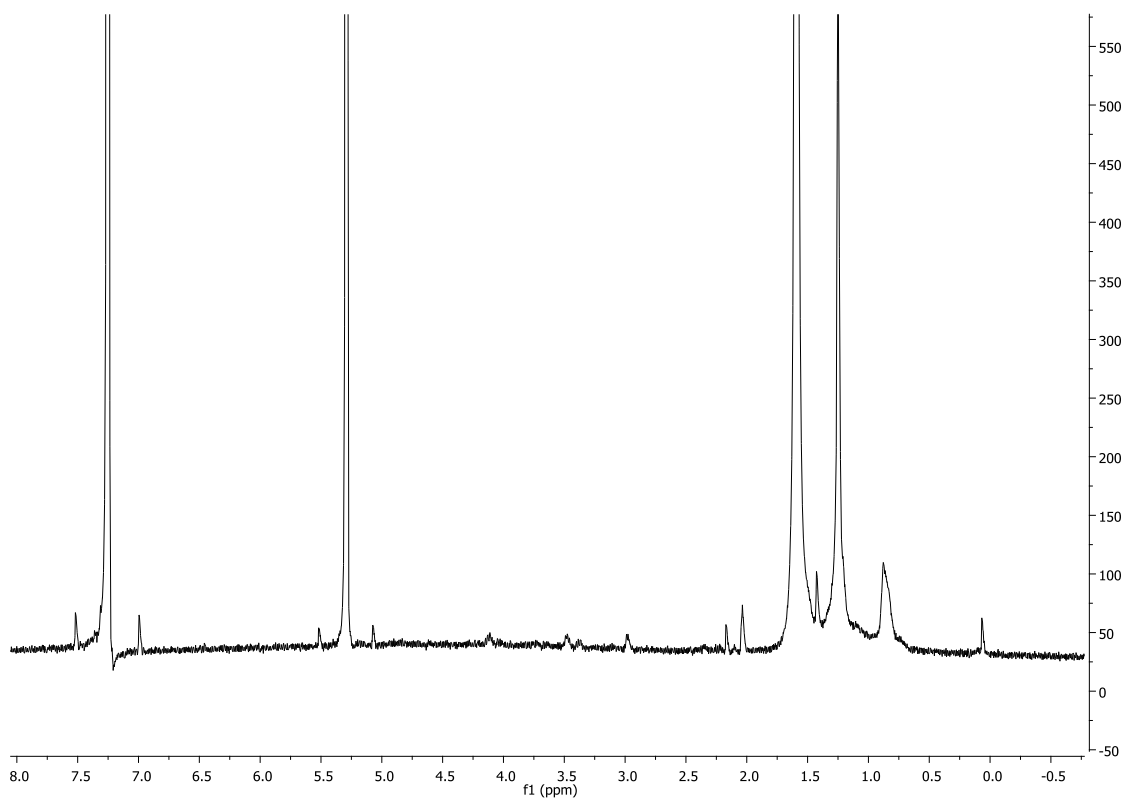


Abbildung 180: ^1H -Spektrum der säulenchromatographischen Aufreinigung (Fraktion 3) der Naturstoffextraktion von *S. plymuthica*.

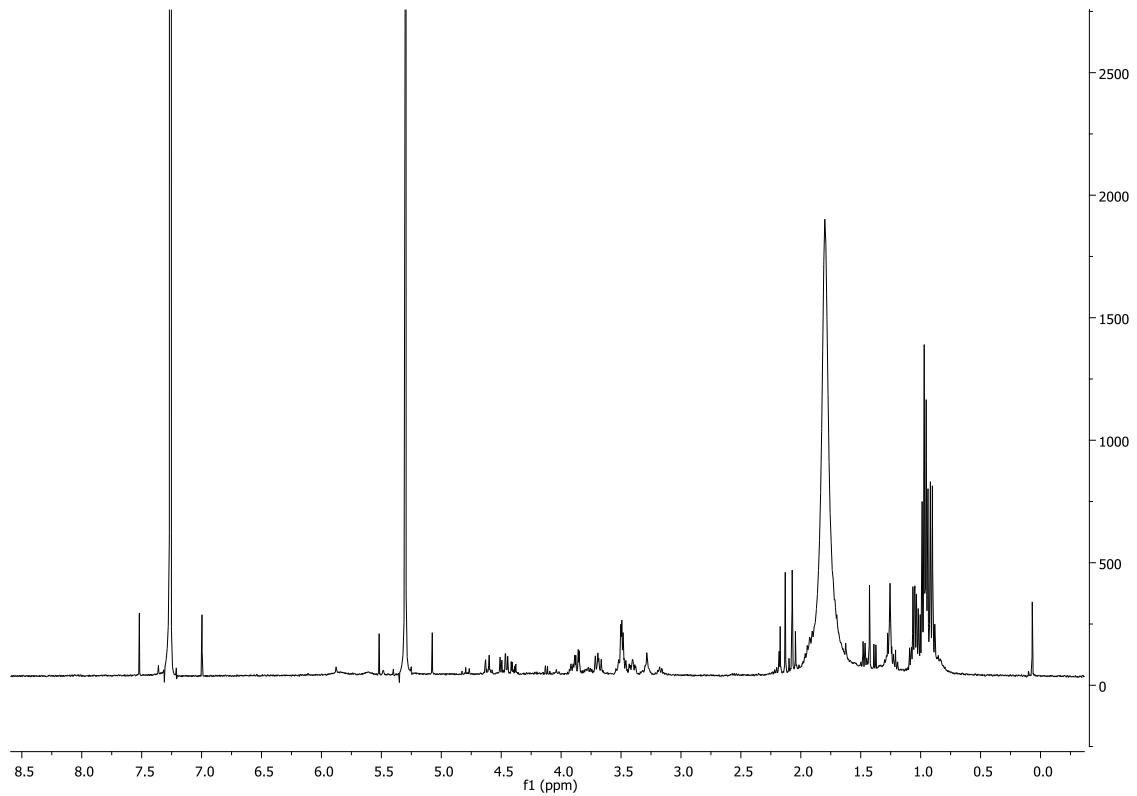


Abbildung 181: ^1H -Spektrum der säulenchromatographischen Aufreinigung (Fraktion 4) der Naturstoffextraktion von *S. plymuthica*.

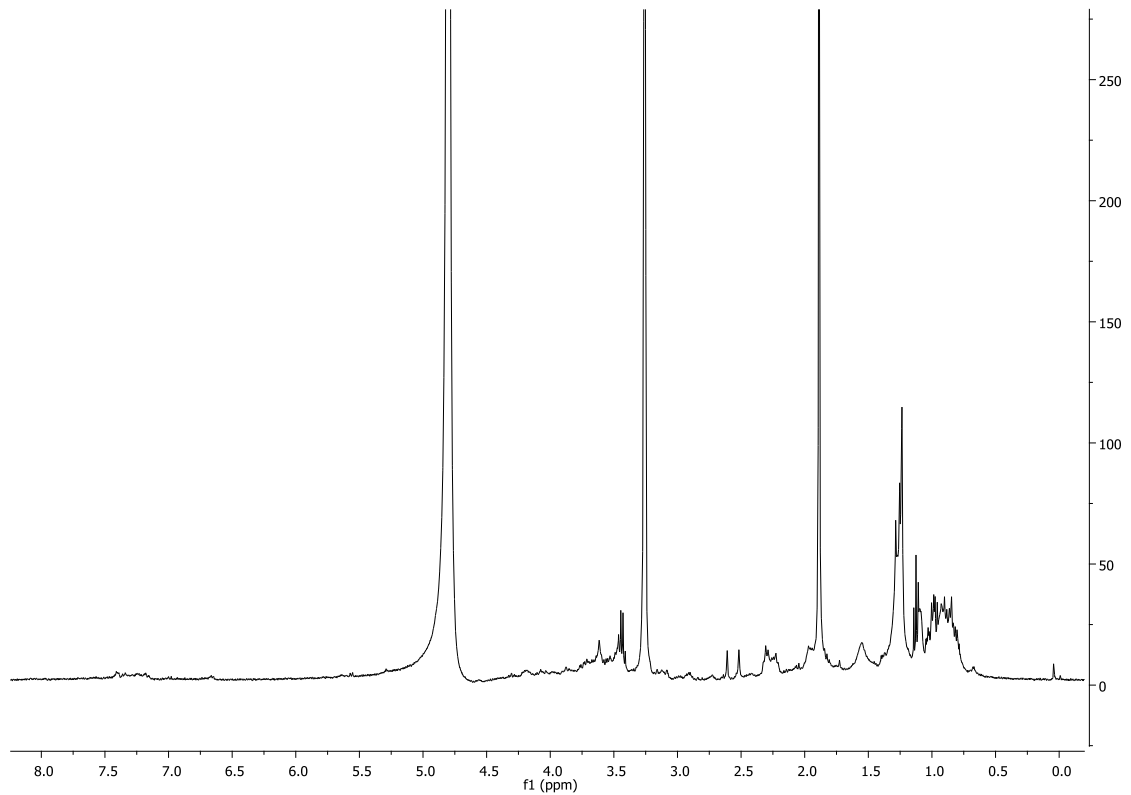


Abbildung 182: ^1H -Spektrum der säulenchromatographischen Aufreinigung (Fraktion 5) der Naturstoffextraktion von *S. plymuthica*.

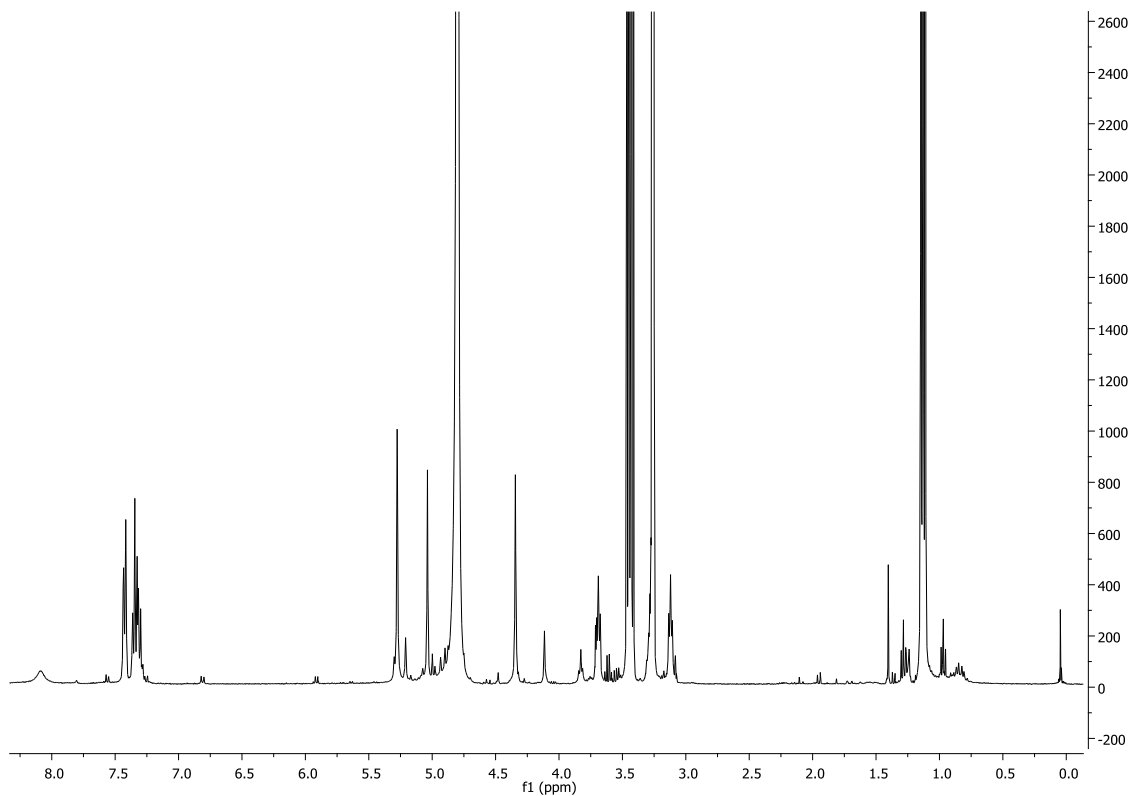


Abbildung 183: ^1H -Spektrum der säulenchromatographischen Aufreinigung (Fraktion 6) der Naturstoffextraktion von *S. plymuthica*.

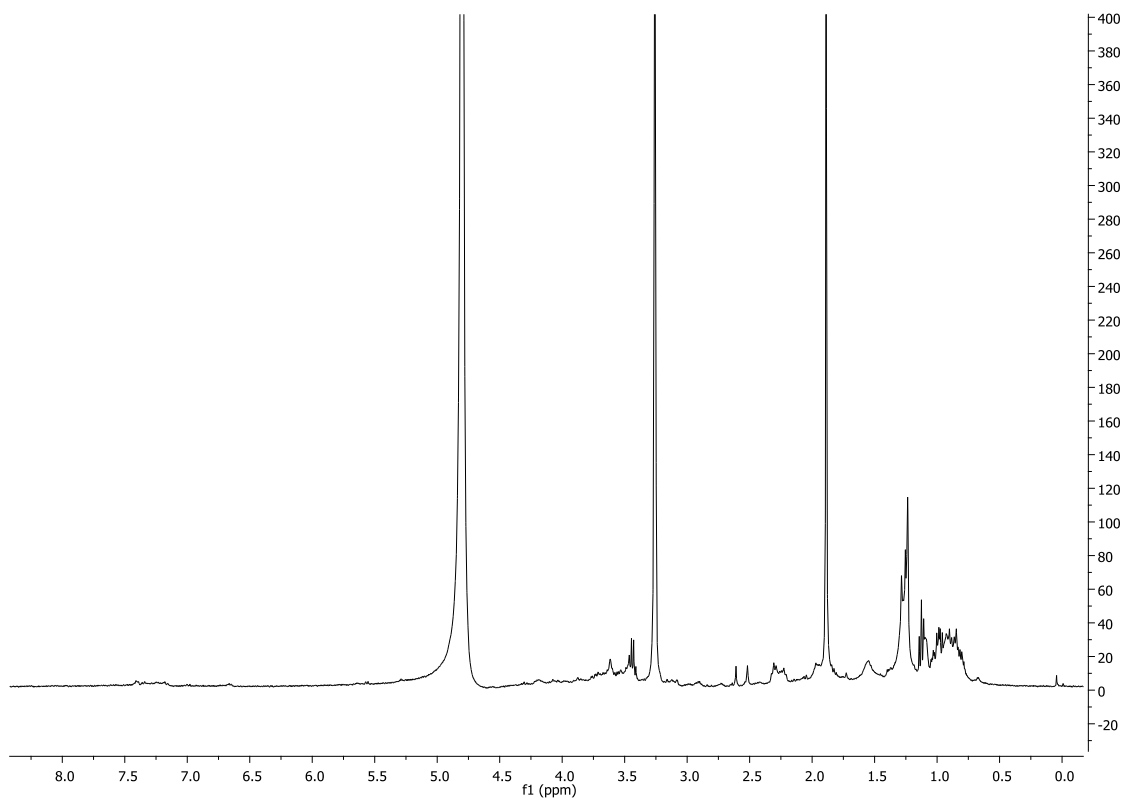


Abbildung 184: ^1H -Spektrum der säulenchromatographischen Aufreinigung (Fraktion 7) der Naturstoffextraktion von *S. plymuthica*.

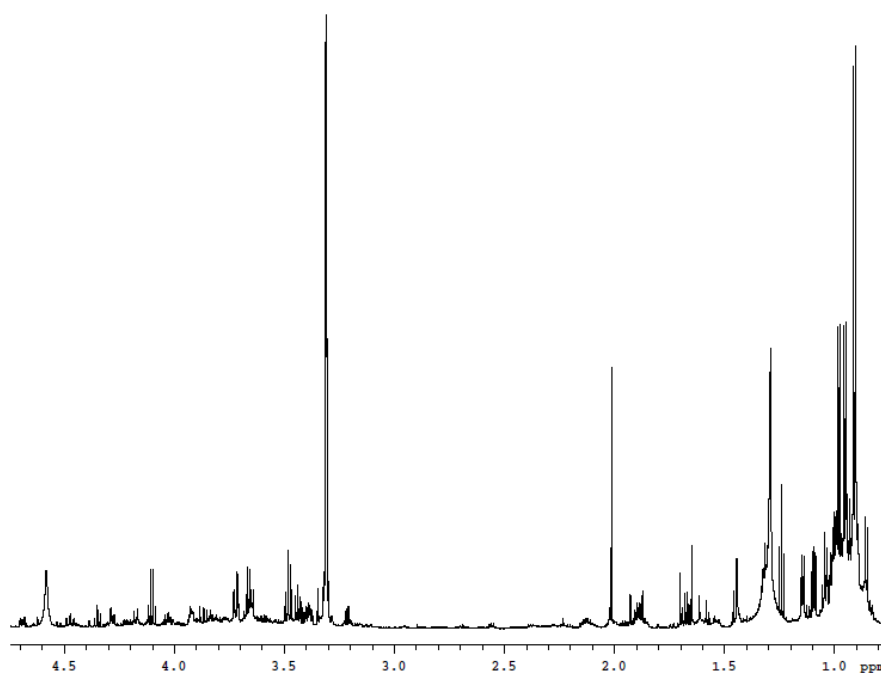


Abbildung 185: ^1H -Spektrum von dem unbekanntem Naturstoff 137.

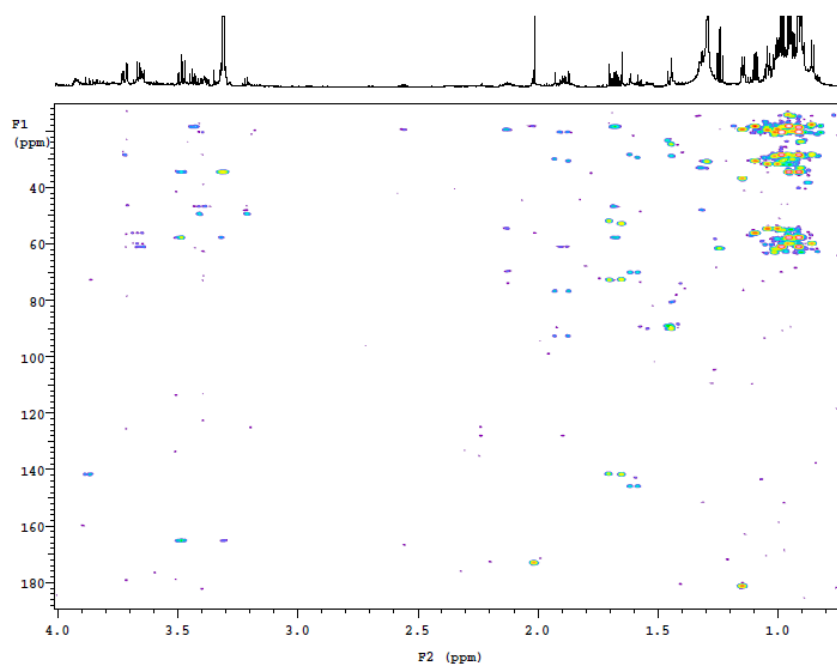


Abbildung 186: HMBC-Spektrum von dem unbekanntem Naturstoff 137.

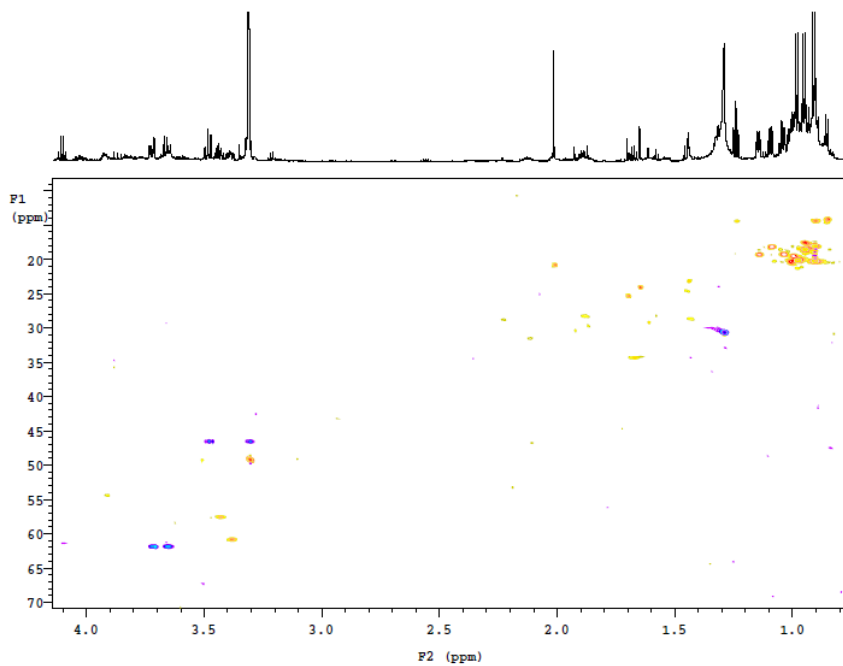


Abbildung 187: HSQC-Spektrum von dem unbekanntem Naturstoff 137.

6.5 LCMS-Daten

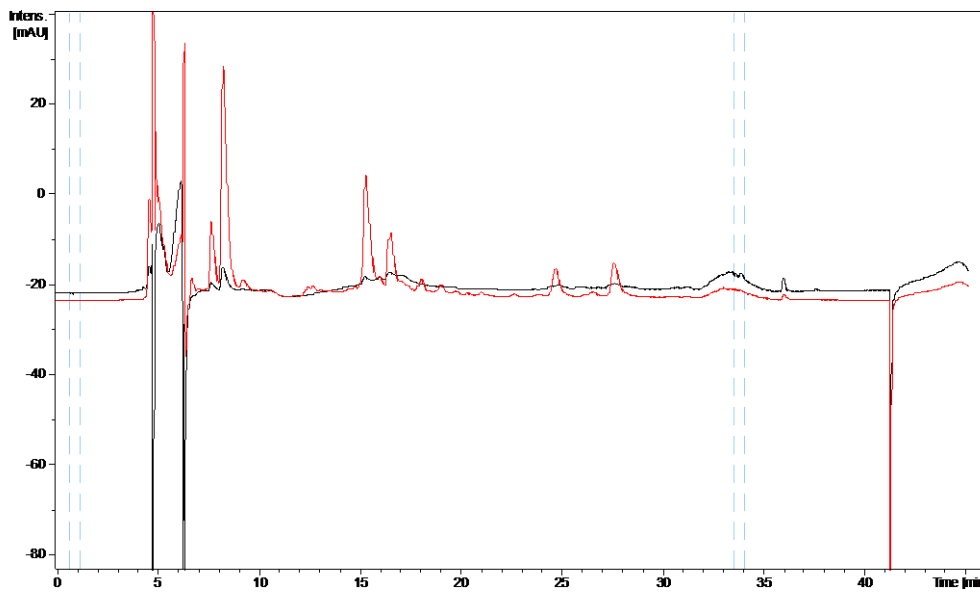


Abbildung 188: Vergleich der UV-Spektren des Überstand-Rohextrakts von *S. plymuthica* - Wildtyp und Knock-Out-Mutante in LB-Medium (bei 30 °C); schwarz: Wildtyp, rot: KO (Wellenlänge: 220 nm).

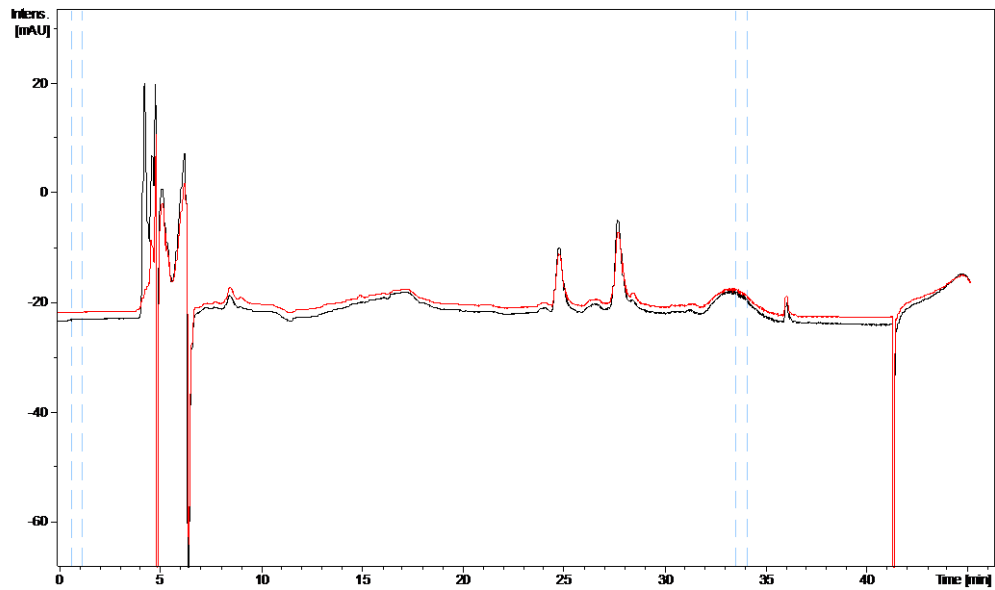


Abbildung 189: Vergleich der UV-Spektren des Zell-Rohextrakts von *S. plymuthica* - Wildtyp und Knock-Out-Mutante in LB-Medium (bei 30 °C); schwarz: Wildtyp, rot: KO (Wellenlänge: 220 nm).

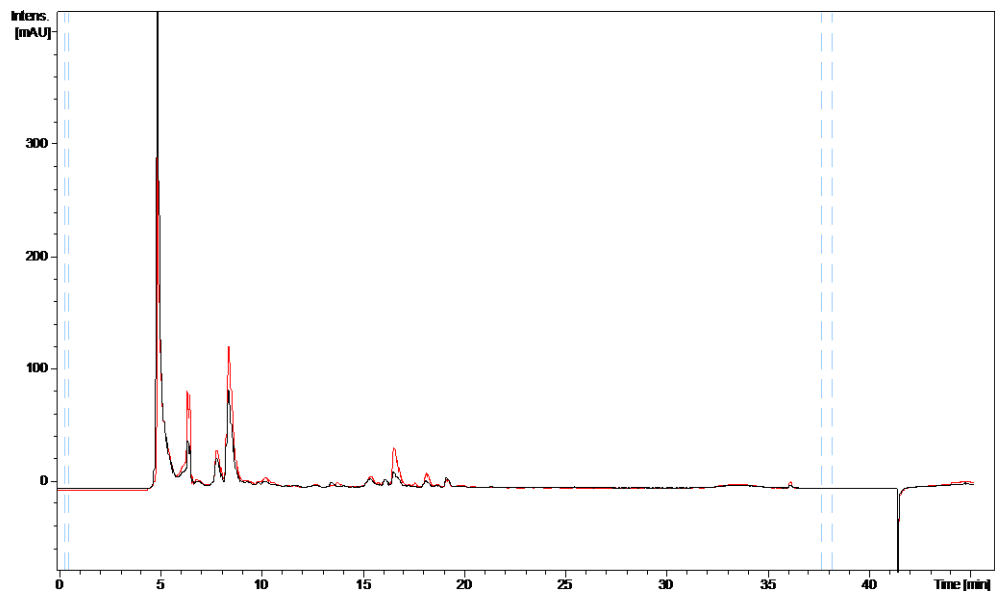


Abbildung 190: Vergleich der UV-Spektren des Überstand-Rohextrakts von *S. plymuthica* - Wildtyp und Knock-Out-Mutante in NB II-Medium (bei 30 °C); schwarz: Wildtyp, rot: KO (Wellenlänge: 220 nm).

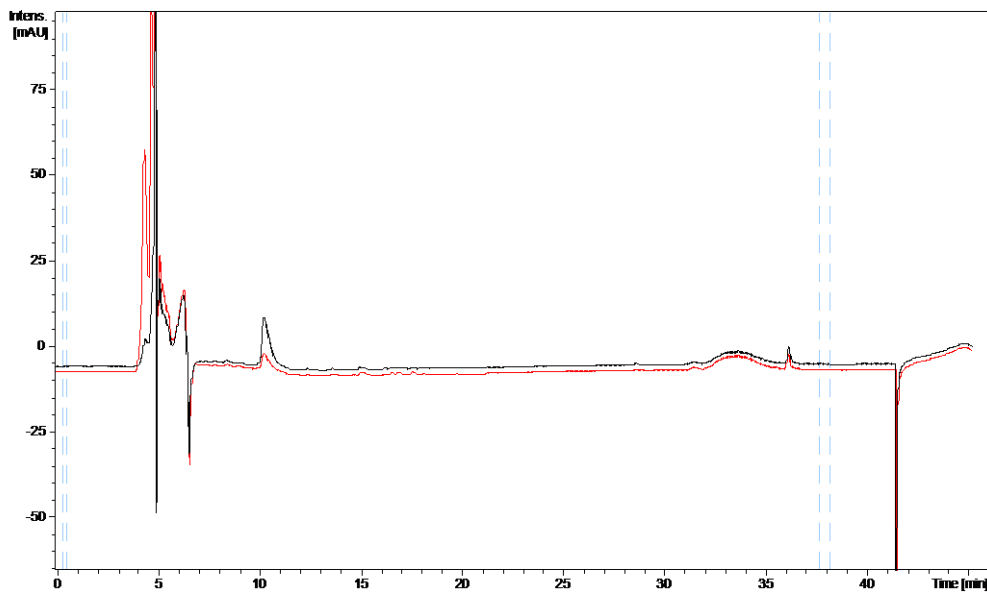


Abbildung 191: Vergleich der UV-Spektren des Zell-Rohextrakts von *S. plymuthica* - Wildtyp und Knock-Out-Mutante in NB II-Medium (bei 30 °C); schwarz: Wildtyp, rot: KO (Wellenlänge: 220 nm).

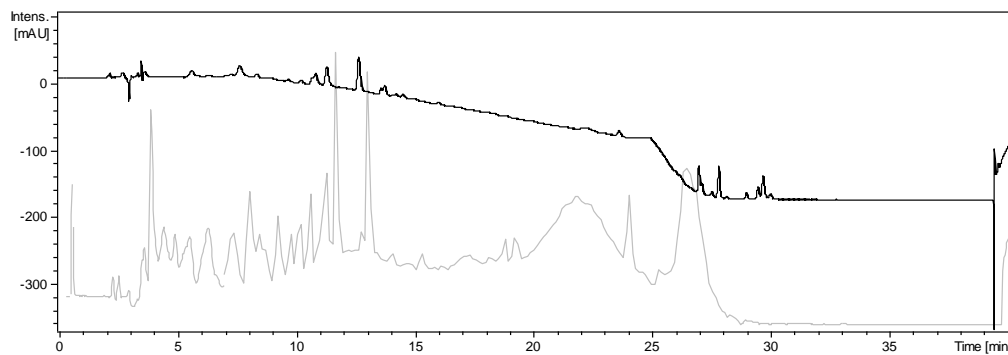


Abbildung 192: LC-HRMS-Lauf des *S. plymuthica*-Wildtyps in EPM-Medium (bei 27 °C); schwarz: UV-Chromatogramm (220 nm), grau: Massenspur.

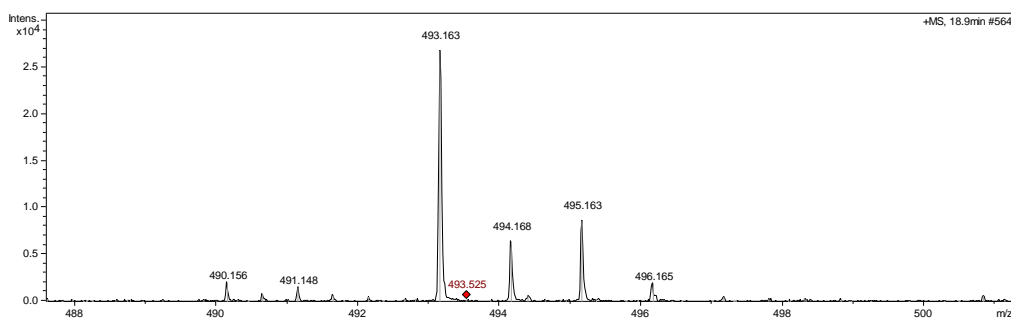


Abbildung 193: Vergrößerter Ausschnitt der Massenverteilung des *D. dadantii*-Wildtyps in EPM-Medium (bei 27 °C) bei 18.9 min.

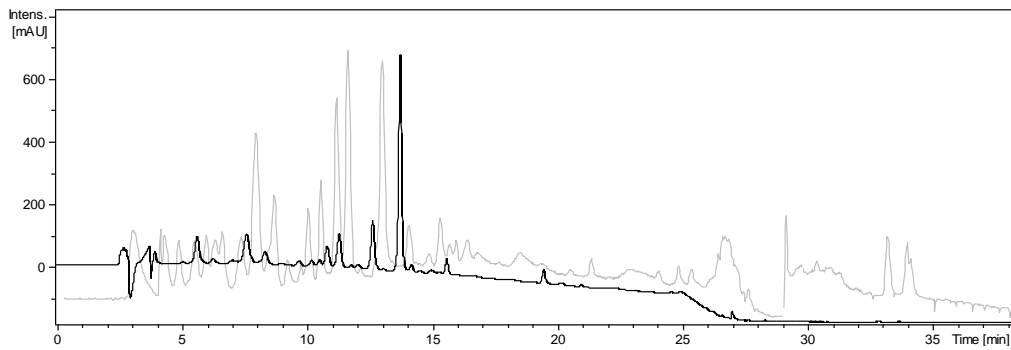


Abbildung 194: LC-MS-Lauf des *D. dadantii*-Wildtyps in EPM-Medium (bei 27 °C); schwarz: UV-Chromatogramm (220 nm), grau: Massenspur.

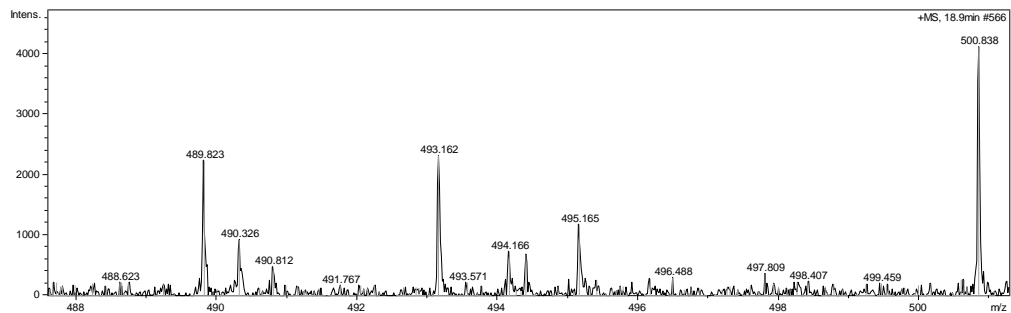


Abbildung 195: Vergrößerter Ausschnitt der Massenverteilung des *D. dadantii*-Wildtyps in EPM-Medium (bei 27 °C) bei 18.9 min.

6.6 Biosynthese von Oocydin A (59a) nach Salmond

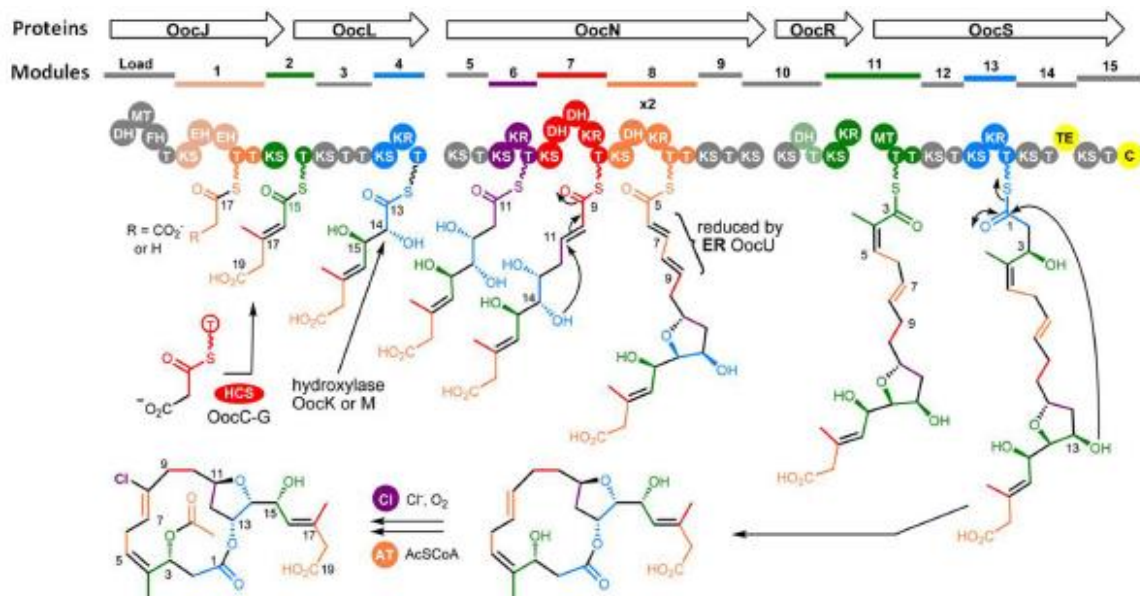


Abbildung 196: Postulierter Biosyntheseweg von Oocydin A (59a) nach Salmond.⁸⁴

7 Publikationen

R. Ueoka, A. R. Uria, S. Reiter, T. Mori, P. Karbaum, E. E. Peters, E. J. N. Helfrich, B. I. Morinaka, M. Gugger, H. Takeyama, S. Matsunaga, J. Piel: Metabolic and evolutionary origin of actin-binding polyketide from diverse organisms, *Nat Chem Biol* **2015**, 3 (10).

P. Pöplau, S. Frank, B. I. Morinaka, J. Piel: An enzymatic domain for the formation of cyclic ethers in complex polyketides, *Angew Chem Int Ed*, **2013**, 52, 13215-13218.

M. Jenner, S. Frank, A. Kampa, C. Kohlhaas, P. Pöplau, G. S. Briggs, J. Piel, N. J. Oldham: Substrate specificity in ketosynthase domains from *trans*-AT polyketide synthases, *Angew Chem Int Ed*, **2013**, 52, 1143-1147.

K. Jensen, H. Niederkrüger, K. Zimmermann, A. L. Vagstad, J. Moldenhauer, N. Brendel, S. Frank, P. Pöplau, C. Kohlhaas, C. A. Townsend, M. Oldiges, C. Hertweck, J. Piel: Polyketide proofreading by an acyltransferase-like enzyme, *Chem Biol*, **2012**, 19, 329-339.

8 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die eingereichte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen benutzt zu haben.

Diese Arbeit ist weder identisch noch teildentisch mit einer Arbeit, die an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn oder einer anderen Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades oder als Prüfungsleistung vorgelegt worden ist.

Die Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn ist mir bekannt.

Petra Karbaum

Bonn, den