

**Analoga, Biosynthese und chemische Analytik
der mikrobiellen Polyketide Iromycin und Lysolipin**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Torben Hofeditz

aus Kiel

Tübingen

2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

14.12.2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stephanie Grond

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Martin E. Maier

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen sowie im Institut für Organische Chemie der Eberhard Karls Universität Tübingen von Oktober 2008 bis Oktober 2012 unter der Anleitung von Prof. Dr. Stephanie Grond durchgeführt.

Frau Prof. Dr. Stephanie Grond
danke ich für ihr stetes Interesse
am Fortgang dieser Arbeit sowie
für viele wertvolle Diskussionen,
Anregungen und Ideen.

Meinen Eltern

und

Karin

Niemals Aufgeben!

Unsere größte Schwäche ist
das Aufgeben. Der sicherste
Weg zum Erfolg besteht darin,
immer wieder einen neuen
Versuch zu wagen.

Thomas Edison

Inhaltsverzeichnis

A. Theoretischer Teil.....	4
1 Struktur und Biosynthese von Polyketidwirkstoffen	4
2 Aktuelle Aspekte der Suche nach neuen Wirkstoffen.....	32
3 „Unnatürliche“ Naturstoffe durch `Biosynthetic Engineering´	39
4 Aufgabenstellung	45
5 Vorarbeiten am Stamm <i>Streptomyces bottropensis</i> Dra17.....	47
6 Mikrobielle Polyketide aus <i>Streptomyces bottropensis</i> Dra17.....	56
6.1 Kultivierung und chemische Analytik.....	56
6.2 Darstellung von SNAC-Estern für die Vorläufer-dirigierte Biosynthese	60
6.3 Vorläufer-dirigierte Biosynthese am Beispiel der Iromycine.....	63
6.4 Ergebnisse der durchgeführten Fütterungsexperimente	66
6.5 Biologische Aktivität der Iromycin-Analoga.....	78
6.6 Diskussion.....	82
6.7 Ausblick	85
7 Das polycyclische Xanthon-Antibiotikum Lysolipin (56, 16).....	87
7.1 Substanzklasse der polycyclischen Xanthon-Antibiotika	93
7.2 Biosynthesegencluster des Lysolipins I (16).....	97
8 Identifizierung des Genproduktes der min PKS II von 56 und 16	119
8.1 Fermentationsoptimierung und Kultivierung	120

8.2	Optimierung der chemischen Analytik von Lysochinon-TH1 (137) und Lysochinon-TH2 (138)	124
8.3	Studien zur Derivatisierung und Kristallisation von Lysochinon-TH1 (137)	143
8.4	Strategie der Reinstoffisolierung von Lysochinon-TH1 (137).....	148
8.5	Chemische und spektroskopische Charakterisierung der Metabolite	153
8.6	Diskussion	213
8.7	Ausblick.....	218
9	Zusammenfassung der Ergebnisse	220
9.1	Mikrobielle Polyketide aus <i>S. bottropensis</i> Dra17.....	220
9.2	Identifizierung des Genproduktes der min PKS II (<i>llpD</i> , E, F) und Cyclasen (<i>llpCI</i> – <i>CIII</i>) aus der heterologen Expression in <i>S. albus</i>	221
10	Summary of Results	224
10.1	Microbial Polyketides from <i>Streptomyces bottropensis</i> Dra17.....	224
10.2	Identification of the gene product produced by the min PKS II (<i>llpD</i> , E, F) and cyclases (<i>llpCI</i> – <i>CIII</i>) from heterologous expression in <i>S. albus</i>	225
B.	Experimenteller Teil	228
1	Allgemeine Materialien und Methoden.....	228
1.1	Instrumentelle Analytik	228
1.2	Chromatographie.....	231
1.3	Mikrobiologische Methoden und Geräte	243
2	Mikrobielle Polyketide aus <i>Streptomyces bottropensis</i> Dra17	248
2.1	Mikrobiologische Arbeiten	248
2.2	Darstellung von SNAC-Estern für die Vorläufer-dirigierte Biosynthese	251

2.3	Vorläufer-dirigierte Biosynthese am Beispiel der Iromycine.....	253
2.4	Charakterisierung der Metabolite von <i>Streptomyces bottropensis</i> Dra17	255
3	Identifizierung des Genproduktes der min PKS II von 56 und 16	263
3.1	Mikrobiologische Arbeiten.....	263
3.2	Aufarbeitung	271
3.3	Kristallisationsstudien	281
3.4	Derivatisierungsstudien	282
3.5	Weiterführende Aufarbeitungsstudien mit Poly(vinylpolypyrrolidin) (PVPP)	298
3.6	Chemische Charakterisierung der isolierten Substanzen	299
	Abkürzungsverzeichnis	301
	Literaturverzeichnis.....	302

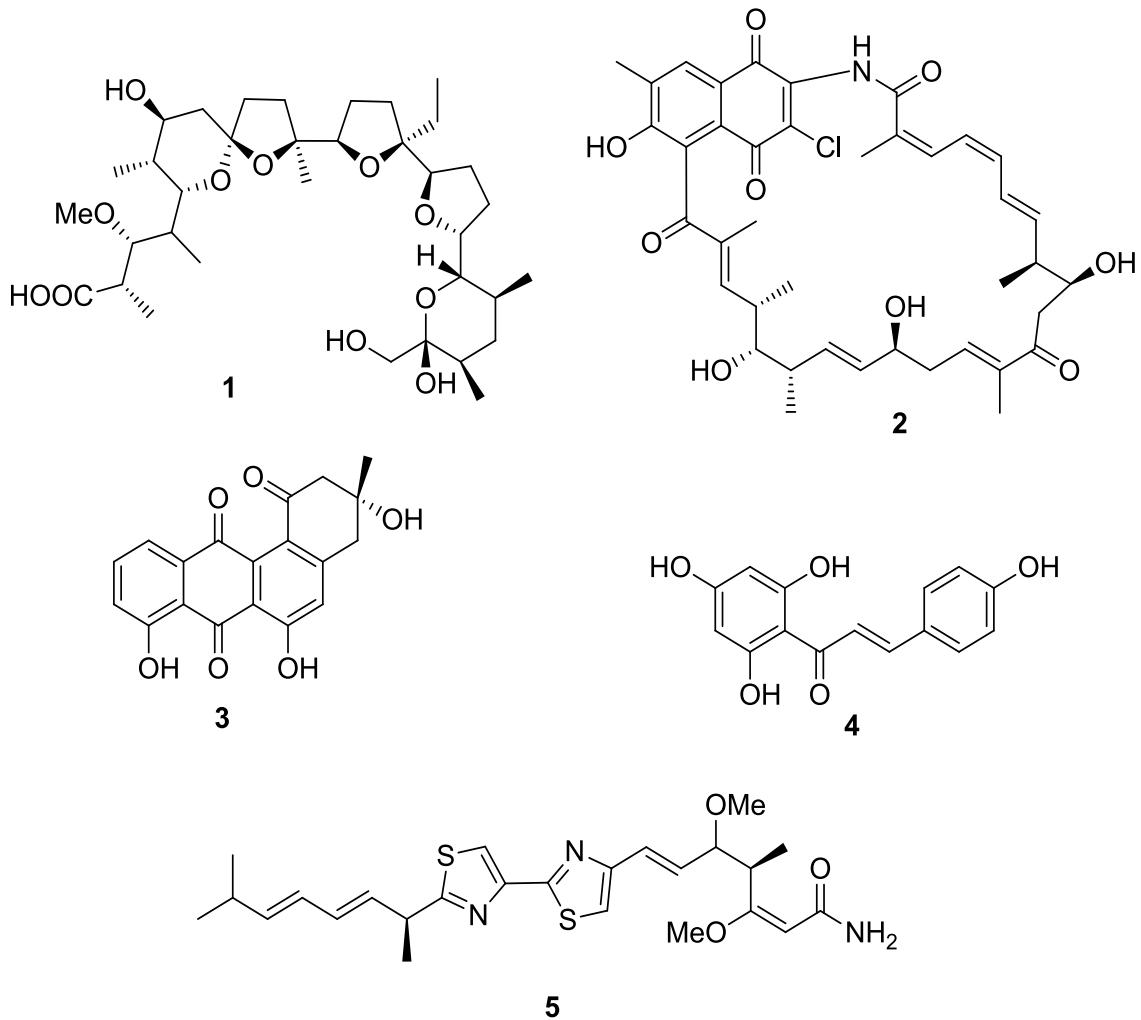
A. Theoretischer Teil

1 Struktur und Biosynthese von Polyketidwirkstoffen

Klassifizierung von Polyketidbiosynthese-Systemen

Bei der Beschreibung des Erfolgs der Naturstoffchemie und -analytik spielt die Gruppe der Polyketide eine außergewöhnliche Rolle. Polyketide wurden zuerst im Jahre 1907 thematisiert. Der Begriff „Polyketide“ wurde 1907 von COLLIE abgeleitet. Es wurde postuliert, dass Naturstoffe durch Polyketomethylen-Gruppen aufgebaut werden. Daraus entstand der Begriff der Polyketide.^[1] Eine Weiterentwicklung dieser Hypothese wurde durch ROBINSON erreicht. Dieser stellte die Hypothese auf, dass Polyketide durch Kondensation aus Acetateinheiten aufgebaut werden.^[1] BIRCH und DONOVAN gelang eine Formulierung, um diese Biosynthesewege genauer zu definieren. Es wurde beschrieben, dass eine Polyketidkette durch Kondensation von aktivierten Acetateinheiten aufgebaut wird. Diese Formulierung führte zu einer breiten Akzeptanz.^[1, 2]

Polyketide präsentieren eine der größten Substanzklassen innerhalb der Naturstoffe^[3] und gehören zu den Sekundärmetaboliten. Diese Substanzklasse ist strukturell sehr komplex, obwohl sie von einfachen Carbonsäuren aufgebaut wird.^[4, 5] Ursprünglich fand eine Klassifizierung der Polyketide weitestgehend über den Biosynthesemechanismus statt.^[6] Hier wurden vier Obergruppen definiert: Polyketide, die durch eine Typ I-Polyketidsynthase (PKS I), durch eine Polyketidsynthase vom Typ II (PKS II), durch eine Polyketidsynthase vom Typ III (PKS III) oder von einem PKS-NRPS Hybrid-System (Polyketidsynthase-Nonribosomale Peptid Synthethase) synthetisiert werden.^[7] Die PKS III ist noch relativ selten und wird auch nur der Vollständigkeit halber erwähnt.^[8] Exemplarische Vertreter sind: Monensin (**1**, PKS I)^[9], Naphthomycin A (**2**, PKS I)^[10], Rabelomycin (**3**, PKS II)^[11], Naringenin-Chalcon (**4**, PKS III)^[12] und Myxothiazol A (**5**, PKS-NRPS)^[13].



Heute ist bekannt, dass es viele Ausnahmen zu den hier aufgeführten katalytischen Systemen gibt. Es konnten verschiedene Mischtypen identifiziert werden.^[6] Demnach konnte nicht nur bei Pilzen sondern auch mittlerweile bei Bakterien eine Iteration in der Verwendung der unterschiedlichen Domänen beobachtet werden. Es ist also durchaus möglich, dass auch bei der modularen, bakteriellen PKS I eine iterative Verwendung von Domänen während der „linearen Biosynthese“ resultieren bzw. auftreten kann. Ein weiteres Beispiel für solche Abweichungen der Norm ist durch die PKS III gegeben. Früher nur in Pflanzen isoliert, existiert heute das Wissen um PKS III-Biosynthesewege bakterieller Natur.^[6] Durch jede Entdeckung neuer Biosynthesewege werden dahingehend neue Fragen aufgeworfen, wodurch neuer Klärungsbedarf entsteht.^[14]

In Tabelle 1-1 sind die grundlegenden Unterschiede der PKS I, PKS II und der PKS III zusammengefasst. Auf das PKS-NRPS Hybrid-System wird in dieser Tabelle verzichtet. Oft sind mehrere enzymatische Reaktivitäten auf einem Protein vereinigt, so dass man von Megasyntasen spricht, da die Proteine Größen bis 350 kDa haben.^[15]

Tabelle 1-1: Vergleich verschiedener PKS-Typen.^[16, 17, 18, 19]

PKS	Proteinstruktur	Synthesemechanismus	gefunden in
Typ I (modular)	Proteine mit mehreren Modulen	linear (Assembly-line); Jede Domäne (Active- Site) wird nur einmal verwendet	Bakterien
Typ I (iterativ*)	verschiedene Proteine mit je einem Modul	Iterative* Verwendung	Pilzen, wenige Bakterien
Typ II	verschiedene Proteine mit je einem Modul	Iterative* Verwendung der Active-Sites	Bakterien
Typ III	Protein mit mehreren Modulen	Iterative* Verwendung	Pflanzen (größter Teil), teilweise Bakterien und Pilze

*Iterativ bedeutet, dass eine mehrfache Nutzung stattfindet.

Aufbau und Funktion der PKS I

Zum besseren Verständnis ist es wichtig, zunächst den Aufbau solcher Multienzymsysteme zu beschreiben. Der grundlegende Aufbau wird in Proteine, Module und Domänen unterteilt. Domänen sind die kleinsten Untereinheiten und werden auch als Active-Sites bezeichnet; Module setzen sich aus mehreren Domänen zusammen; Proteine werden durch verschiedene Module aufgebaut. Module interagieren miteinander, um einen funktionalen Enzymkomplex bzw. Multienzymkomplex zu bilden.^[16] Die Hauptfunktion einer PKS ist die Kondensation von Acylgruppen. Hierbei handelt es sich um decarboxylative Claisen-ähnliche Kopf-Schwanz-Kondensationen. Ein Modul katalysiert die Verlängerung um eine Acylgruppe und Domänen bewerkstelligen die Katalyse der Claisen-Kondensationen.^[16] Dadurch wird es erst möglich Polyketide über eine PKS aufzubauen.

Zunächst wird das PKS I-System und sein Aufbau präsentiert. Der erste vollständig bekannte PKS I-Biosynthesecluster, ist der vom Erythromycin A (**6**).^[20] Demnach ist dieses System von Multienzymkomplexen sehr gut untersucht (Abbildung 1-1).^[21]

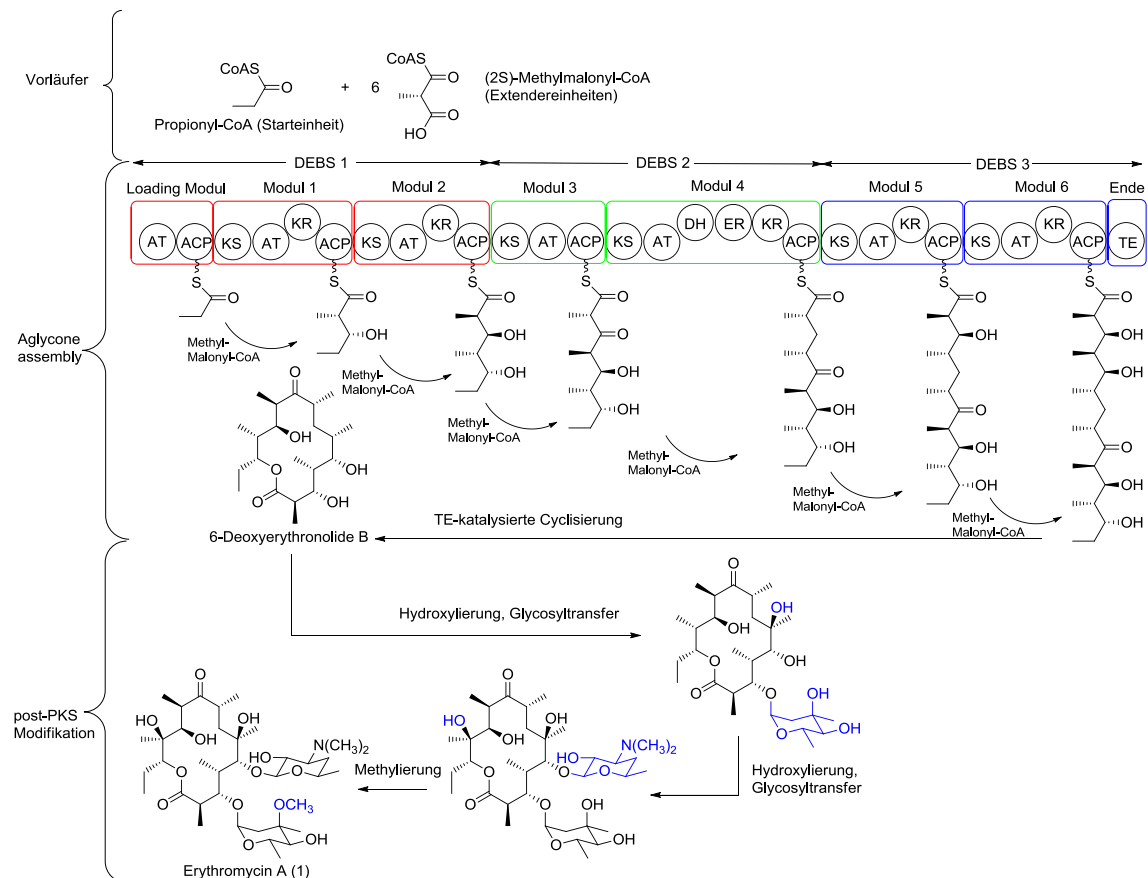
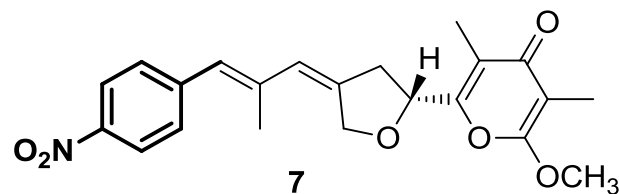


Abbildung 1-1: Biosynthese von Erythromycin A (**6**). DEBS: 6-Deoxyerythronolide B (**6a**) Synthase. Module: DEBS 1, 2 und 3; Domänen: AT = Acyltransferase; ACP = Acyl-Carrier-Protein; AS = Ketosynthase; DH = Dehydratase; KR = Ketoreduktase; ER = Enoylreduktase; TE = Thioesterase.

Bei der Kondensation von den in Abbildung 1-1 gezeigten Acylgruppen wird jedes Modul und jede Domäne nur einmal und nacheinander verwendet. Dabei entspricht jede Enzymdomäne einer Proteinsequenz, die eine enzymatische Aktivität ausübt, wie z. B. die Claisen-kondensierte Kettenverlängerung. Werden das Loading Modul und das Modul 1 aus Abbildung 1-1 betrachtet, werden durch die Ketosynthase (KS) zwei Schritte katalysiert. Die Polyketidkette wird von dem Acyl-Carrier-Protein (ACP) des Loading Moduls auf die KS von Modul 1 übertragen. Nachdem das ACP aus Modul 1

durch die Acyltransferase (AT) mit einem Extender beladen wurde, erfolgt die Kondensation der am KS befindlichen Kette mit der Verlängerungseinheit am ACP von Modul 1. Dieser Schritt wird ebenfalls von der KS katalysiert. Die wachsende Polyketidkette ist am ACP verankert. Die Thioesterase (TE) katalysiert die Hydrolyse der fertigen Polyketidkette sowie die Cyclisierung zum Endprodukt. Folglich werden die Domänen KS, AT und ACP, um die Kondensation einer Verlängerungseinheit katalysieren zu können, unbedingt benötigt. Als Starteinheiten werden Acetat und Propionat und auch ungewöhnliche Carbonsäuren wie *p*-Nitrobenzoesäure (Aureothin **(7)**, schwarze Hervorhebung) eingebaut.^[3]



Typische Extendereinheiten sind Malonyl-CoA, Methylmalonyl-CoA und seltener Ethylmalonyl-CoA.^[18] Die in Abbildung 1-1 dargestellten Domänen Ketoreduktase (KR), Dehydrogenase (DH) und Enoylreduktase (ER) sind reduktive Domänen und haben folgende Funktionen: KR: Reduktion von β -Keto- zu β -Hydroxygruppen; DH: Reduktion von β -Hydroxy- zu Enoylgruppen; ER: Reduktion von Enoyl- zu Alkylgruppen. Im Falle dieser reduktiven Enzyme erfolgt der Katalysemechanismus nicht linear. Am ACP ist ein flexibler Phosphopanthetheinarm enthalten. Dieser Arm schwingt von einer Domäne zur nächsten, so dass die enzymatische Reduktion erfolgen kann (Abbildung 1-2).^[22]

Struktur und Biosynthese von Polyketidstrukturen

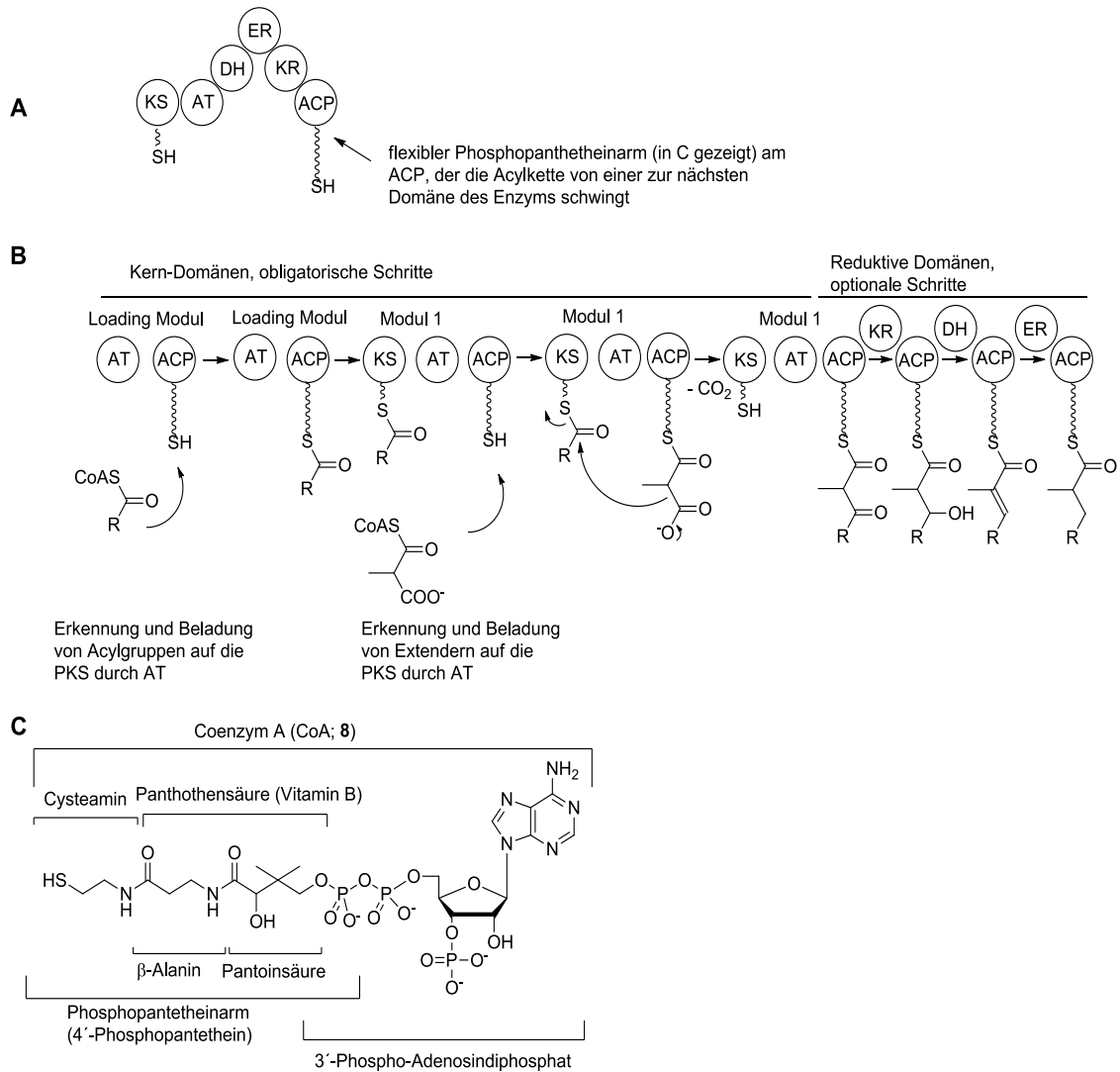


Abbildung 1-2: **A:** Flexibler Phosphopantetheinarm in der PKS I Biosynthese. **B:** Enzymatische Reaktionsfolgen der reduktiven Domänen. **C:** Coenzym A (**8**, CoA) und dessen Aufbau.

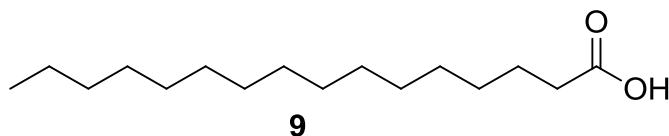
Tabelle 1-2 gibt die wichtigsten Enzyme einer PKS I wieder. Die Hauptfunktion einer PKS ist die Kondensation von Acylgruppen. Hierbei handelt es sich um decarboxylative Claisen-ähnliche Kopf-Schwanz-Kondensationen. Die Triebkraft dieser Kondensation ist die Decarboxylierung. Die hinzukommenden Bausteine, die Verlängerungseinheiten (Extendereinheiten), sind dabei vor allem an Co-Enzym A (CoA, **8**, Abbildung 1-2) gebundene Malonat- und Methylmalonateinheiten und gelten damit als aktivierte Acetat- bzw. Propionatgruppen.

Tabelle 1-2: Verschiedene Domänen mit zugehöriger Funktion.^[16, 20]

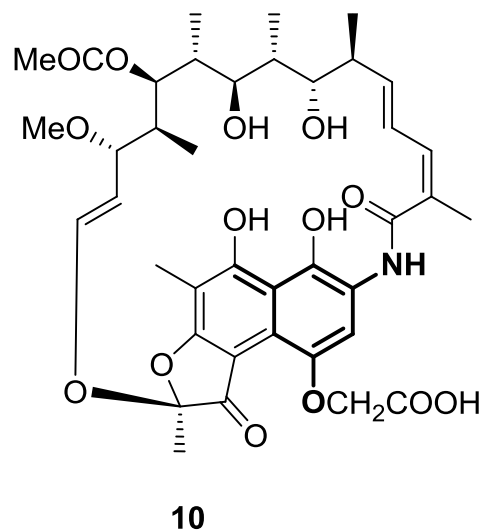
Enzym	Funktion
Acyltransferase (AT)	Erkennung unterschiedlicher Acylgruppen; Katalyse und Beladung von Start- und Extendereinheiten auf das ACP der PKS
Acyl-Carrier-Protein (ACP)	Trägt wachsende Polyketidgruppe als Thioester; Thiolgruppierung an einem Phosphopantetheinarm; dieser Arm ermöglicht die enzymatische Reaktionsfolgen der reduktiven Domänen
Ketosynthase (KS) (β-Ketoacyl-ACP Synthase)	Katalyse von: 1) Übertragung der Acylgruppe vom ACP des Vorgängermoduls auf die KS des aktuellen Moduls 2) Integration der am KS befindlichen Kette in die wachsende Polyketidkette am ACP des aktuellen Moduls; Thiolgruppierung aus einer Serin-Seitenkette
Ketoreduktase (KR)	Reduziert β -Ketogruppen zu β -Hydroxylgruppen
Dehydratase (DH)	Reduziert β -Hydroxygruppen zu Enoylgruppen
Enoylreduktase (ER)	Reduziert Enoylgruppen zu Alkylgruppen
Thioesterase (TE)	Hydrolyse der Polyketidkette und Cyclisierung zum Endprodukt.

Vergleich von PKS I und FAS

Aufgrund der zuvor beschriebenen Modularität wird die PKS I oft mit der Fettsäurebiosynthese (FAS, *fatty acid synthase*) verglichen.^[7, 23] Die PKS I und die FAS ähneln sich in ihrer Verwendung von Start- und Extendereinheiten sowie den verwendeten Domänen. Bei der FAS werden nur Malonyl-CoA-Einheiten zur Verlängerung der Kette verwendet, bis die richtige Kettenlänge, nämlich gesättigte, geradzahlige Fettsäuren (z.B. C₁₆-Fettsäure: Palmitinsäure (**9**)), erreicht ist. Daraufhin erfolgt eine Abspaltung der Fettsäure. Jeder neuen Verlängerungseinheit folgen alle enzymatischen Reduktionsreaktionen, bevor eine neue Fettsäure aufgebaut wird (Abbildung 1-3 A). Es wird immer eine bestimmte Kettenlänge synthetisiert.



Bei der PKS I werden neben Malonyl-CoA auch Methylmalonyl-CoA-Einheiten und andere Bausteine eingebaut, wie z.B. *p*-Nitrobenzoesäure (Aureothin (**7**)) oder 3-Amino-5-Hydroxybenzoesäure (Rifamycin B (**10**)). Es resultieren Actetateinheiten aus Malonyl-CoA und Propionateinheiten aus Methylmalonyl-CoA-Bausteinen als formale Kettenverlängerungseinheiten. Es ist möglich, dass eine verschiedene Anzahl von Modulen bzw. Domänen, Kerndomänen und auch reduktive Domänen (Abbildung 1-2), hintereinander geschaltet sind.^[24, 25] Dadurch können unterschiedlich lange Ketten realisiert werden.

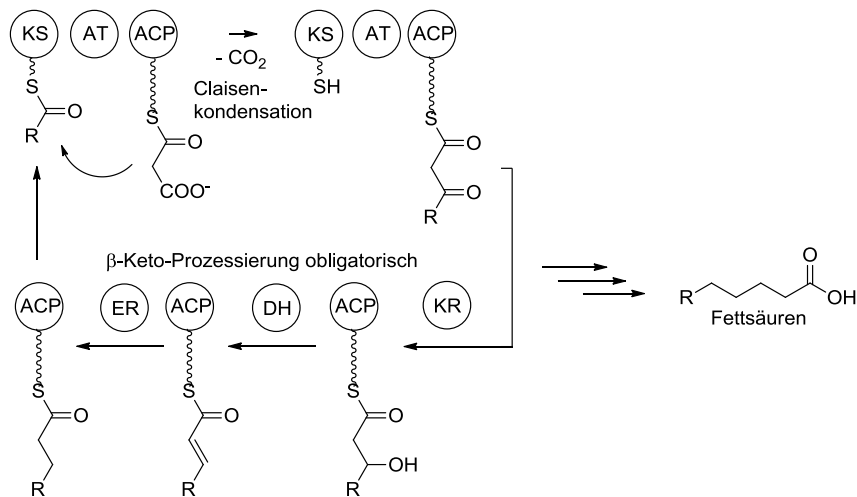


Eine größere strukturelle Diversität wird durch die optionale Nutzung der reduktiven Domänen erreicht. Bei der Verwendung dieser Domänen ist es möglich, dass nicht alle Reduktionskaskaden durchlaufen werden. Dadurch können teilweise oder hoch reduzierte Polyketide entstehen. Eine Gegenüberstellung der FAS und der PKS I wird in Abbildung 1-3 gezeigt.

Durch die unterschiedliche Kettenlänge der Polyketide, aber auch der verschiedenen Start- und Extendereinheiten ist eine sehr große strukturelle Diversität vorhanden bzw. möglich.^[7, 26, 27] Biosynthetisch werden so Makrolide (wie das Erythromycin A (**6**)), Polyether, Polyene und Macrolactame aufgebaut.^[17, 28] Deshalb weisen Polyketide ein großes Spektrum an biologischer Aktivität auf und sind somit von großer Bedeutung in der klinischen Anwendung von Chemotherapeutika und auch in der modernen Wirkstoffforschung. Polyketide werden unter anderem als Antibiotika,

Immunsuppressiva, Antiparasitika, cholesterinsenkende und tumorhemmende Wirkstoffe verwendet.^[7]

A) Fettsäurebiosynthese: Jeder neuen Verlängerungseinheit folgen alle enzymatischen Reduktionsreaktionen.



B) PKS I: Die Biosynthese der Polyketide ist nicht auf die Verwendung der reduktiven Domänen angewiesen. Diese müssen nicht nach jeder Verlängerungseinheit verwendet werden.

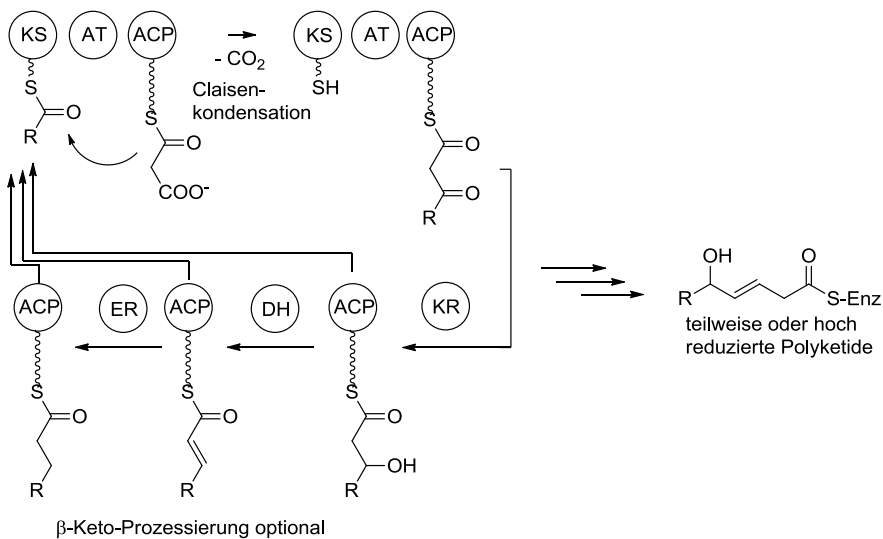
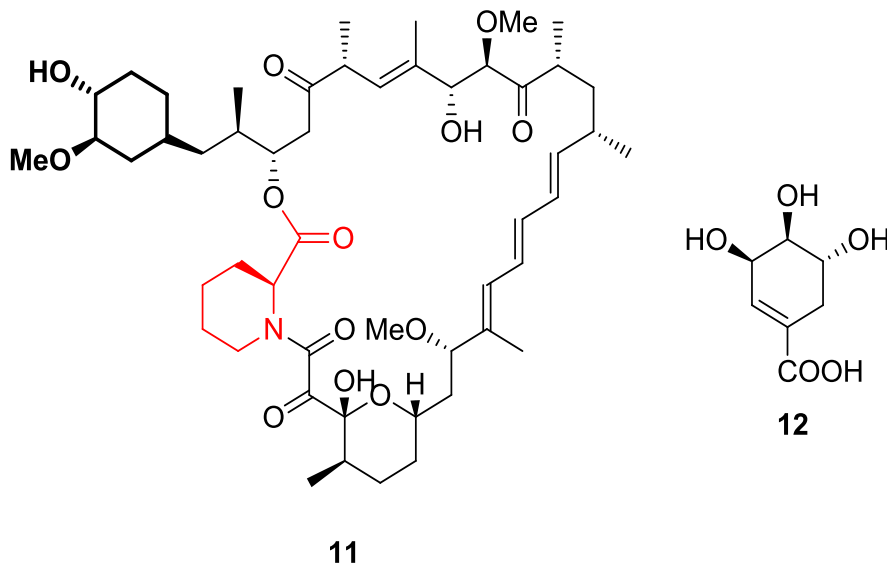


Abbildung 1-3: Vergleich von PKS I und FAS. **A**: FAS; **B**: PKS I.

Rifamycin B (**10**) und Rapamycin (**11**) sind zwei sehr gut untersuchte Polyketide, die ein gutes Beispiel für die große strukturelle Diversität darstellen. Im Falle von **10** liegt als Starteinheit die 3-Amino-5-Hydroxybenzoesäure vor, die biosynthetisch aus dem Kohlenhydratstoffwechsel stammt.^[29] Das Grundgerüst wird durch den Einbau von

acht Propionat- und zwei Acetateinheiten erhalten und mittels Post-PKS modifiziert. Bei **11** wird Shikimisäure (**12**) als Starteinheit verwendet. Dieses konnte aus Fütterungsexperimenten mit ^{13}C -markierter **12** bestätigt werden.^[30] Weiterhin werden sieben Propionat- und sieben Acetateinheiten und *L*-Pipicolinsäure (rot) mit in das Grundgerüst von Rapamycin (**11**) eingebaut. Für die *L*-Pipicolinsäure (rot) ist ein PKS-NRPS (-Hybrid) Modul notwendig.^[25] Rapamycin (**11**) und Rifamycin B (**10**) und die in der FAS gebildeten Strukturen sind deshalb sehr unterschiedlich.



Aufbau und Funktion der PKS II

Eine große Vielzahl an polycyclischen aromatischen Naturstoffen wird durch eine PKS II synthetisiert.^[31, 32] Diese Systeme sind heute sehr gut untersucht. Wie in Tabelle 1-1 beschrieben, unterliegt diese Katalyse einem iterativen Mechanismus, d.h. die katalytische Kaskade dieser Domänen wird mehrmals verwendet, bis die richtige Kettenlänge erreicht ist.^[33] Außerdem befinden sich in der katalytischen Kaskade keine reduktiven Domänen. Es konnte festgestellt werden, dass es sich in den meisten Fällen um ein 'minimales Set' an Enzymen handelt. Ein solches Set ist für den Aufbau und der Polyketovorstufe für die resultierende Kettenlänge verantwortlich und wird als minimale PKS bezeichnet.^[33] Durch dieses minimale Set an Enzymen wird die

Kettenlänge bestimmt, die bei verschiedenen Organismen eine unterschiedliche, aber immer definierte Länge vorgibt.^[33]

Die minimale PKS II besteht aus zwei Ketosynthasen (KS_{α} und KS_{β}) und einem Acyl-Carrier-Protein (ACP). Die KS_{α} ist für die Beladung der PKS II sowie für die Claisen-Kondensation des Extenders in die wachsende Polyketidkette am ACP verantwortlich. Die KS_{β} wird auch als Chain-Length-Factor (CLF) bezeichnet^[34] und kontrolliert die Kettenlänge.^[33] Bei der Beladung der PKS II sind in der Literatur drei Mechanismen beschrieben.^[33] 1.) Es wird Malonyl-CoA als Starteinheit verwendet, was eine Decarboxylierung als Folge hat.^[33] 2.) In einigen Fällen konnte auch gezeigt werden, dass eine KS vom Typ III (KS_{III}) für das Beladen (Priming) der PKS II verantwortlich ist.^[33] 3.) Es wird ein Acyl-CoA, wie z.B. Acetyl-CoA, durch eine Umesterung als Starteinheit verwendet, wodurch keine Decarboxylierung beim Priming notwendig ist.^[33] Eine genauere Beschreibung wird auf S. 14/15 gegeben.

In seltenen Fällen ist auch noch ein weiteres Enzym an der Beladung der PKS II beteiligt: Malonyl-CoA:ACP-Transacylase (MCAT), die für die Beladung der PKS II mit Malonyl-CoA als Starteinheit und die folgende Decarboxylierung verantwortlich ist.^[33] Es wird selten ein Hinweis dieses Enzyms in den Genclustern von Antibiotika-Produzenten gefunden. Daraus resultiert die Vermutung, dass bei den meisten PKS II-Biosynthesen die Transacylasen der Fettsäurebiosynthese zur Hilfe genommen werden.^[35] Ist die PKS II beladen, werden Malonyl-CoA Bausteine als Verlängerungseinheiten verwendet. Die minimale PKS katalysiert die iterativen Claisen-Kondensationen, die immer eine Decarboxylierung einer Malonyl-CoA-Einheit zur Folge haben. Diese Decarboxylierung ist gleichzeitig die Triebkraft dieser Katalyse. In der Abbildung 1-4 ist ein möglicher Mechanismus gezeigt, der bei der Biosynthese von aromatischen Polyketiden vorliegen kann.

PKS II: Polyketoverbindungen durch iterative Verwendung der minimalen PKS ohne reduktive Domänen.

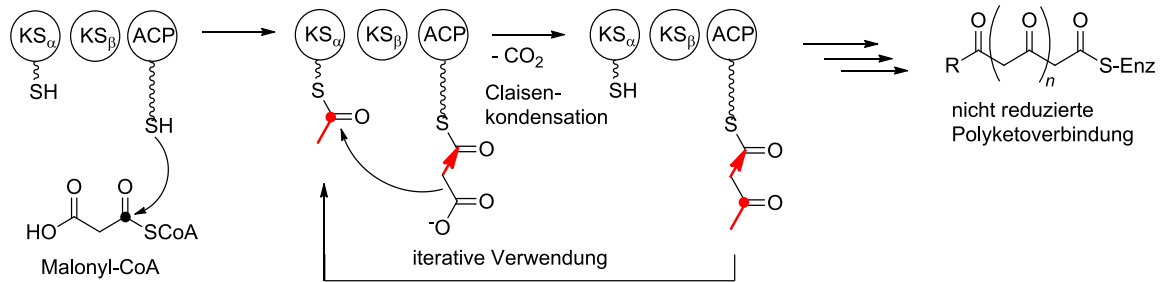


Abbildung 1-4: Mechanismus aus der aromatischen Polyketid-Biosynthese, Funktion der minimalen PKS.^[33]

Während der enzymatischen Kaskade ist die wachsende Polyketidkette am ACP verankert. Die beiden KS (KS α und KS β) bilden ein Heterodimer. Das ACP befindet sich innerhalb dieses Dimers der beiden Ketosynthasen (Abbildung 1-5). Aus dieser räumlichen Nähe geht ein großer Einfluss auf die Faltung der Polyketidkette hervor, da sich alle benötigten enzymatischen Funktionen mit der wachsenden Polyketidkette in direkter Umgebung befinden. Deshalb wird die Gesamtstruktur eines Tunnels bzw. Kanals angenommen.

Ist die erwartete Kettenlänge erreicht, findet die Abspaltung vom ACP statt. Daraus geht eine nicht-reduzierte Polyketoverbindung hervor. Anschließend erfolgen die Post-PKS-Modifikationen. Eine gerichtete Cyclisierung findet mittels Cyclasen, Aromatasen oder auch Ketoreduktasen statt. Weiterhin katalysieren Ketoreduktasen die Reduktion von Carbonylfunktionen. Oxidoreduktasen bringen weitere Sauerstoffatome in das Molekül ein oder sind für die Abgabe zweier Wasserstoffatome verantwortlich. Alkyltransferasen werden für eine Alkylübertragung auf das Molekül benötigt. Weitere Enzyme im PKS II-Stoffwechsel sind Halogenasen (Halogenierung) und Amidotransferasen (Aminübertragung, führt zu einem amidischen Ringschluss bzw. Bildung eines Amids).

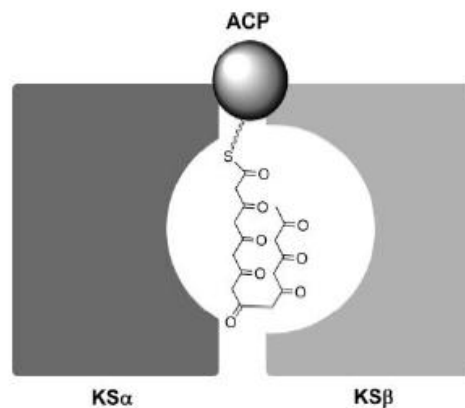


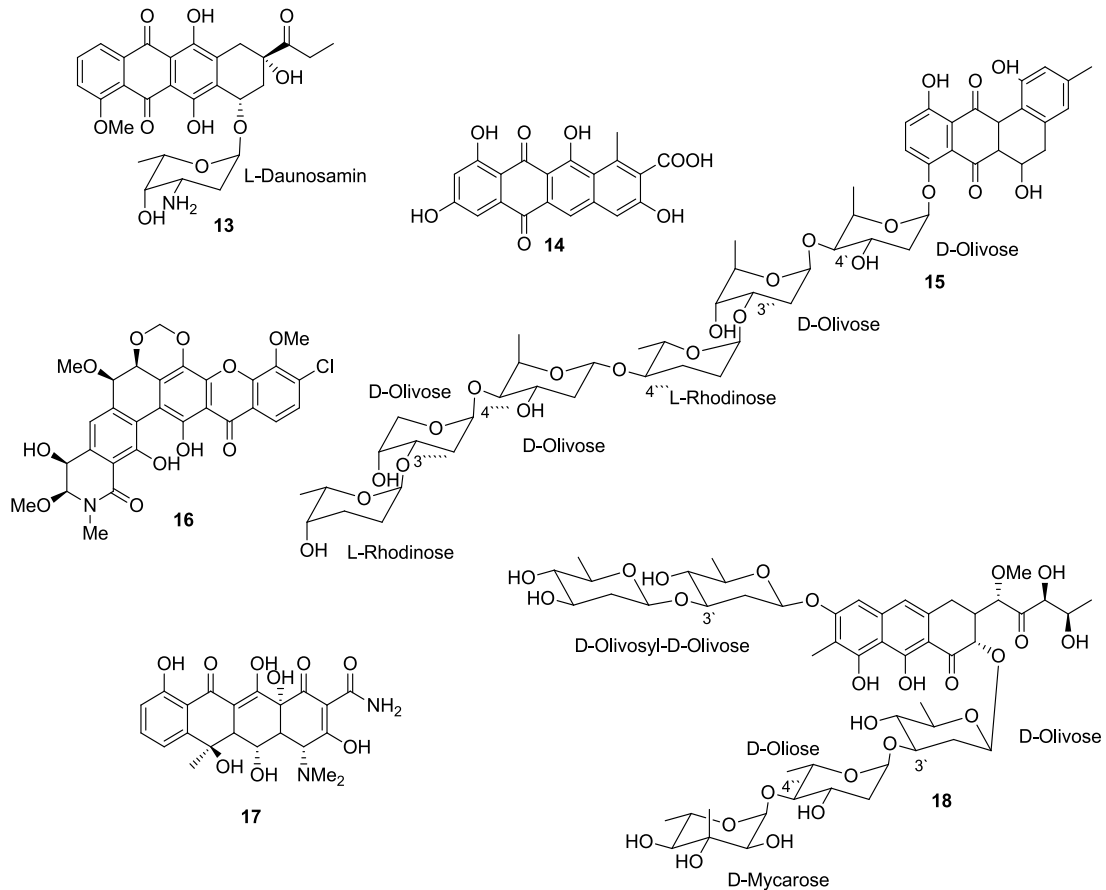
Abbildung 1-5: Modell für die Wirkungsweise der minimalen PKS. Abbildung entnommen aus [24].

Wichtige Mitglieder dieser Metabolite sind Anthracycline, Tetracenomycine, Angucycline, pentanguläre Polyphenole, Tetracycline und Aureolic Acids (Tabelle 1-3).^[36, 37]

Tabelle 1-3: Ausgewählte Verbindungen zu den wichtigsten PKS II Substanzklassen.

Substanzklasse	Beispielverbindung
Anthracycline	Doxorubicin (auch Adriamycin) (13)
Tetracenomycine	Tetracenomycin D3 (14)
Angucycline	Landomycin A (15)
Pentanguläre Polyphenole	Lysolipin I (16)
Tetracycline	Oxytetracyclin (17)
Aureolic Acids	Mithramycin ^[38] (18)

Für diese Substanzklassen von PKS II-Metaboliten wurde ein breites Wirkungsspektrum beschrieben. Beispielsweise konnten antitumor, antibakterielle, antivirale und zytostatische Wirkungen identifiziert werden.^[33, 36, 39] Dadurch sind auch die PKS II-Metabolite von großem Interesse in der klinischen Anwendung von Chemotherapeutika und sehr interessant für Fragestellungen in der modernen Wirkstoffforschung.



Vergleich der PKS I mit der PKS II

Verglichen mit einer PKS I wird schnell ersichtlich, wo die Unterschiede dieser beiden Biosynthesewege liegen. In der folgenden Tabelle sind die wesentlichen Unterschiede zwischen einer PKS I und einer PKS II aufgeführt.

Bei der PKS I erfolgt die Beladung (Priming) des Loading Moduls durch z.B. Propionyl-CoA oder Acetyl-CoA, ohne dass eine Decarboxylierung stattfindet. Eine Verlängerung der Polyketidkette wird durch decarboxylative Claisen-Kondensationen durch Extendereinheiten wie Malonyl-CoA oder Methylmalonyl-CoA bewerkstelligt.^[18] Die dabei entstehende Decarboxylierung ist die Triebkraft dieser Katalyse.

Tabelle 1-4: Vergleich von bakterieller PKS I und PKS II.

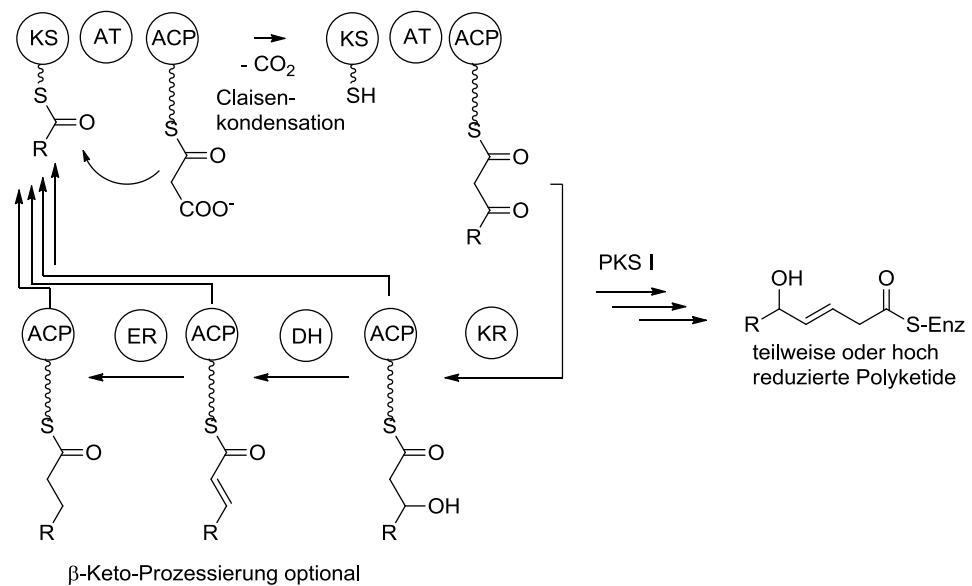
PKS I	PKS II
Modularer Aufbau, keine Iteration der Domänen	Iteration der Domänen
Beinhaltet reduktive Domänen	Keine reduktiven Domänen
Teilweise oder hoch reduzierte Verbindungen	Nicht reduzierte Polyketoverbindungen
Start- und Extendereinheiten sind Malonyl-CoA, Methylmalonyl-CoA und weitere Carbonsäuren	Start- und Extendereinheiten sind Malonyl-CoA
Makrozyklen, Polyene, Polyether etc.	Aromatische Verbindungen; Cyclisierungen durch Cyclasen, Kettoreduktasen und Aromatasen
Besteht aus mehreren Proteinen mit mehreren Domänen; Interaktion zwischen Proteinen um Katalyse zu ermöglichen	Mehrere Proteine mit je einem Modul

Ganz sicher kann der Priming Mechanismus bei der PKS II nicht beschrieben werden. Es existieren drei literaturbekannte Möglichkeiten, die PKS II zu beladen.^[33] 1.) Es wird Malonyl-CoA als Starteinheit verwendet, was eine Decarboxylierung als Folge hat. Es wurde beschrieben, dass dazu die Malonyl-CoA:ACP-Transacylase (MCAT) im Stande wäre, diese Decarboxylierung zu katalysieren. Aber es wurde von LEADLAY *et al.* auch gezeigt, dass die KS_β-Domäne auch eine Decarboxylase-Aktivität besitzt, wodurch ebenfalls eine Decarboxylierung katalysiert werden würde.^[33] 2.) In einigen Fällen konnte auch gezeigt werden, dass eine KS vom Typ III (KS III) für das Priming der PKS II verantwortlich ist. Hierbei werden kurzkettige Fettsäuren auf die PKS II geladen, die durch die Claisen-Kondensationen von Malonyl-CoA Extendereinheiten verlängert wird.^[33] 3.) Es wird ein Acyl-CoA, wie z.B. Acetyl-CoA, als Starteinheit verwendet, wodurch keine Decarboxylierung beim Priming notwendig ist.^[33] Beim Oxytetracyclin (**17**) konnte sogar gezeigt werden, dass ein Malonamyl-CoA als Starteinheit fungiert, wodurch keine Decarboxylierung stattfinden kann.^[33]

Die Funktionsweisen der PKS I und der PKS II sind zuvor ausführlich beschrieben worden. Zusätzlich zu der Tabelle 1-4 ist in Abbildung 1-6 ein Vergleich des

Mechanismus aufgeführt. Während bei der PKS I strukturelle Diversität beim Aufbau der Polyketidkette resultiert und durch Post-PKS-Enzyme erweitert wird, hat die PKS II lediglich einen Einfluss auf die Kettenlänge. Strukturelle Diversität wird bei der PKS II nach der Biosynthese durch die Post-PKS-`Tailoring Enzyme` eingebracht. Diese `Tailoring Enzyme` sind so speziell, dass sehr viele unterschiedliche Verbindungsklassen gebildet werden können.

A) PKS I: Keine Iteration, Verwendung von reduktiven Domänen.



B) PKS II: Iteration, keine reduktiven Domänen.

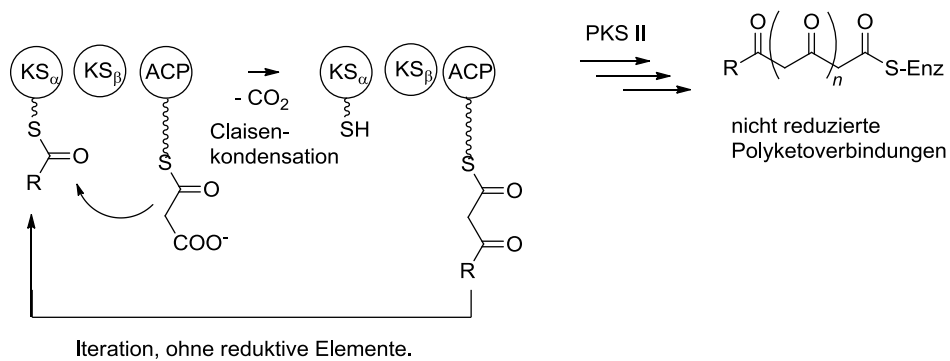


Abbildung 1-6: Vergleich von bakterieller PKS I und der PKS II. **A:** Möglicher Mechanismus einer PKS I. **B:** Möglicher Mechanismus einer PKS II.

Cyclisierung von PKS II-Biosyntheseprodukten

Um einen Einblick in die Cyclisierungen von PKS II Metaboliten zu erhalten, werden mögliche Faltungsmuster diskutiert. Pilze und filamentöse Bakterien, meistens Actinomyceten, sind die größten Produzenten von polyaromatischen Verbindungen nach der PKS II. Viele Aromaten besitzen medizinisch relevante Aktivitäten. Daher ist es nicht verwunderlich, dass teilweise ähnliche Faltungsmuster gefunden werden.^[40] Ein gutes Beispiel ist das Chrysophanol (**19**). **19** konnte sowohl aus Pflanzen und Pilzen als auch aus Streptomycceten isoliert werden.^[41] Es ist das prominenteste Beispiel für die Isolierung einer vollständig identischen Struktur aus Bakterien und Pilzen. Abgesehen von ein paar wenigen Ausnahmen, bauen Pilze und Bakterien nicht die gleichen Strukturen auf.^[40]

Durch Biosynthesestudien mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat konnte gezeigt werden, dass im Aufbau von **19** ein anderes Einbaumuster bei Pilzen, als bei Streptomycceten auftritt. Diese beiden Faltungen (F- und S-Mode) wurden von FIEDLER *et al.* am Beispiel von Chrysophanol (**19**) untersucht (Abbildung 1-7).^[41, 42]

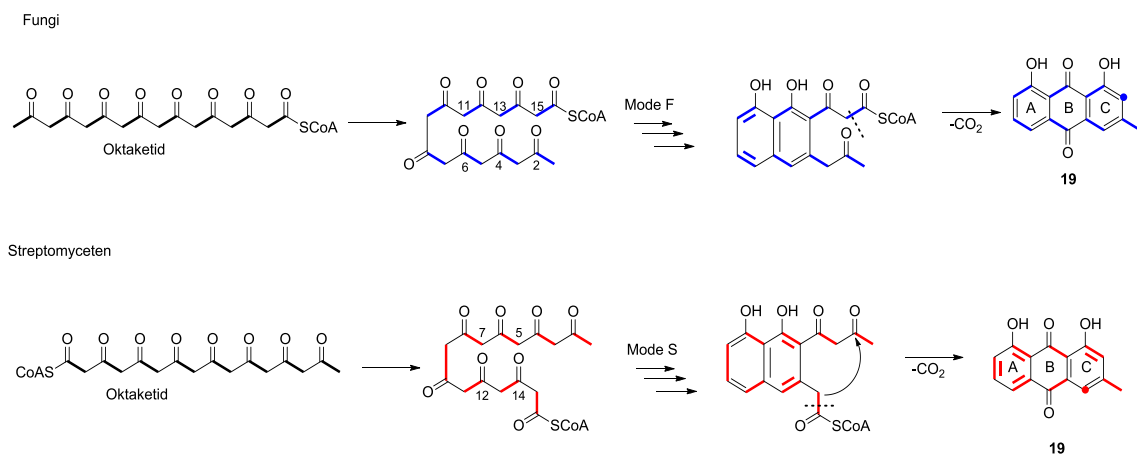


Abbildung 1-7: Bildung von Chrysophanol (**19**) in Pilzen (F-Mode) und Streptomycceten (S-Mode).

Bei Pilzen resultiert ein Einbau von zwei intakten Acetateinheiten in den Ring A. Dieses wird als F-Mode bezeichnet, wobei das F für Fungi steht. Eine Aldolkondensation findet zwischen den Kohlenstoffatomen C-2/C-15, C-4/C-13 und C-6/C-11 statt.

Bei Streptomyceten liegt hingegen ein Einbaumuster von drei intakten Acetateinheiten für den Ring A vor. In diesem Fall wird es als S-Mode bezeichnet, wobei das S für Streptomyceten steht.^[40] Beim S-Mode ist die Kettenrichtung umgedreht. Hierbei erfolgt eine Aldolkondensation zwischen den Kohlenstoffatomen C-5/C-14 und C-7/C-12.

Beim Vergleich dieser unterschiedlichen Anordnungen der Polyketidkette geht hervor, dass ein anderes Faltungsmuster resultiert. Diese unterschiedliche Faltung beim Chrysophanol (**19**) führt zu einem anderen Einbaumuster der ¹³C-markierten Vorläufer (Abbildung 1-7). Vermutlich nimmt die Umgebung, in der sich das Oktaketid jeweils befindet, einen großen Einfluss auf die resultierende Faltung. R. THOMAS und FIEDLER *et al.* haben Untersuchungen zu verschiedenen Systemen dieser Art durchgeführt.^[40, 41, 42] Bei diesen Untersuchungen konnte eine große Einheitlichkeit festgestellt werden.

Aufbau und Funktion der PKS III

Obwohl die durch PKS III-Systeme katalysierte Biosynthese in Bakterien sehr selten ist, soll kurz eine Analyse des Mechanismus erfolgen.

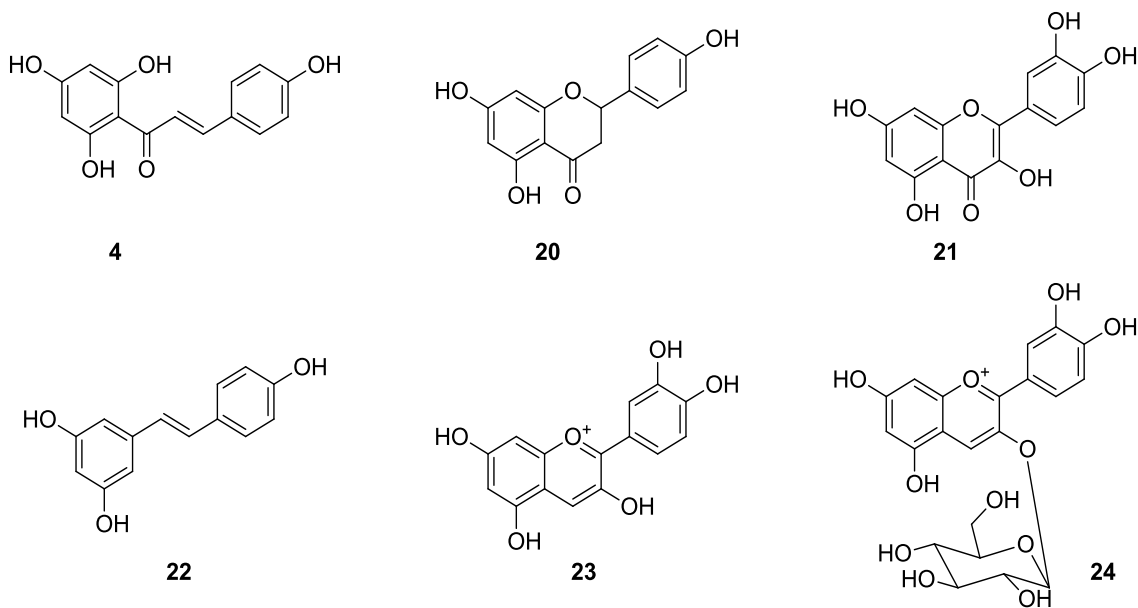
Die PKS III gleicht in ihrer Funktionsweise der Chalcon- bzw. der Stilben-Synthase und kommt in der Regel in Pflanzen vor.^[43] Auch in Bakterien war es möglich, eine PKS III zu identifizieren und heterolog in Pseudomonaten zu exprimieren.^[44]

Charakteristisch für den Metabolismus in Pflanzen sind Phenylpropanoid Starteinheiten aus dem Aminosäurestoffwechsel. In Bakterien werden analog zur PKS I und PKS II Malonyl-CoA Einheiten verwendet. Im Vergleich zu PKS I und PKS II hat die PKS III eine Größe von 40-45 kDa. Es handelt sich um ein Homodimer, welches kein ACP für die katalytische Kaskade benötigt.^[45]

PKS III-Systeme sind in der Lage Chalcone, Flavanone, Flavonole, Stilbene sowie Anthocyanidine und Anthocyanine, also kleinere aromatische Verbindungen, aufzubauen (Tabelle 1-5).^[15, 45]

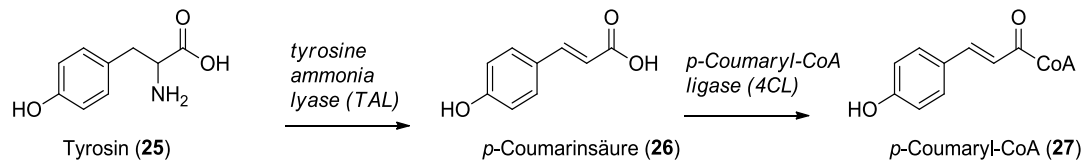
Tabelle 1-5: Beispielverbindungen, produziert von einer PKS III.

Substanzklasse	Beispielverbindung
Chalcone	Naringenin-Chalcon (4)
Flavanone	Naringenin-Flavanon (20)
Flavanole	Quercetin (21)
Stilbene	Resveratrol (22)
Anthocyanidine	Cyanidin (23)
Anthocyanine	Cyanin (24)



Chalcone und Chalcon-Synthasen (CHS) sind in Pflanzen weit verbreitet, wodurch die Vermutung besteht, dass sämtliche andere Vertreter von diesen Substraten abstammen.^[12, 46] Um den Aufbau dieser Substanzen zu verstehen, wird ein kleiner Einblick in die Biosynthese von Quercetin (**21**) und Resveratrol (**22**) gegeben. Zunächst wird die Starteinheit biosynthetisiert. Dazu existiert in Pflanzen und Bakterien ein geringfügig unterschiedlicher Mechanismus. In Bakterien ist die *tyrosine ammonia lyase* (TAL) dazu befähigt, direkt aus Tyrosin (**25**) *p*-Coumarinsäure (**26**) zu bilden, welches durch die *p*-*Coumaryl*-CoA *ligase* (4CL) zu der Starteinheit *p*-Coumaryl-CoA (**27**) umgewandelt wird (Abbildung 1-8). In Pflanzen muss der Umweg über das Phenylalanin (**28**) und die Zimtsäure (**29**) gegangen werden, um **27** zu generieren (Abbildung 1-8).

A: Biosynthese von *p*-Coumaryl-CoA in Bakterien



B: Biosynthese von *p*-Coumaryl-CoA in Pflanzen

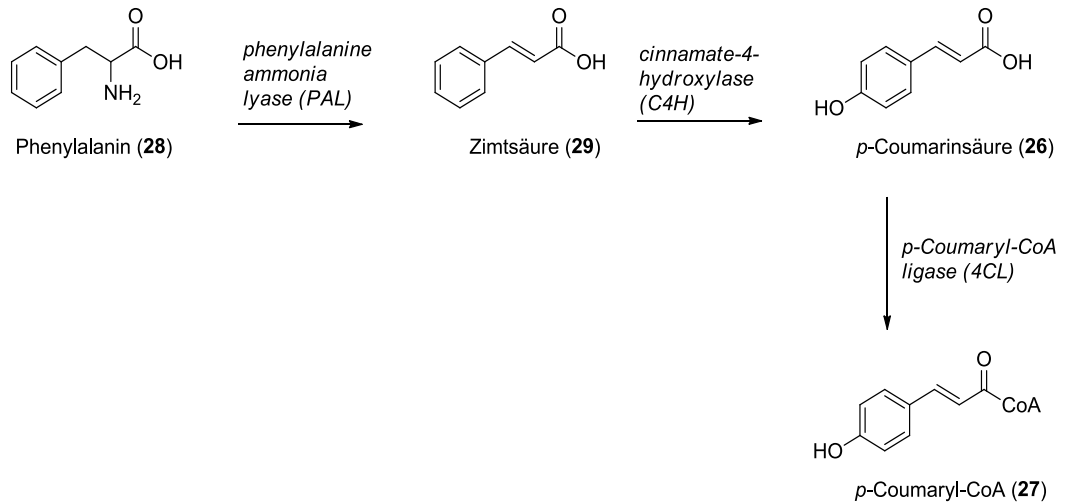


Abbildung 1-8: Biosynthese von *p*-Coumaryl-CoA (**27**). **A:** In Bakterien; **B:** In Pflanzen.^[47]

Bei der Biosynthese von Quercetin (**21**) und Resveratrol (**22**) ist *p*-Coumaryl-CoA (**27**) die Starteinheit. Die KS der PKS III wird mit **27** beladen. Es wird keine ACP- und auch keine AT-Domäne verwendet. Demnach katalysiert die KS der PKS III gleichzeitig die durch Claisen-Kondensation erfolgten Verlängerungen der Polyketidkette und die Beladung bzw. die Erkennung der Starteinheit. Insgesamt werden drei Malonyl-CoA-Einheiten mit in die Polyketidkette eingebaut. Verläuft die weitere Katalyse dieses so erhaltenen Tetraketids über eine Chalcon-Synthase (CHS), so entsteht erst das Naringenin-Chalcon (**4**) und über mehrere Schritte wird das Quercetin (**21**) gebildet. Wird die weitere Katalyse allerdings über eine Stilben-Synthase (STS) katalysiert, entsteht zum einen das Resveratrol (**22**) und zum anderen findet eine Decarboxylierung statt. Die Decarboxylierung findet aber bei einem Malonyl-CoA-Baustein und nicht an der Starteinheit statt (Abbildung 1-9).^[12, 15]

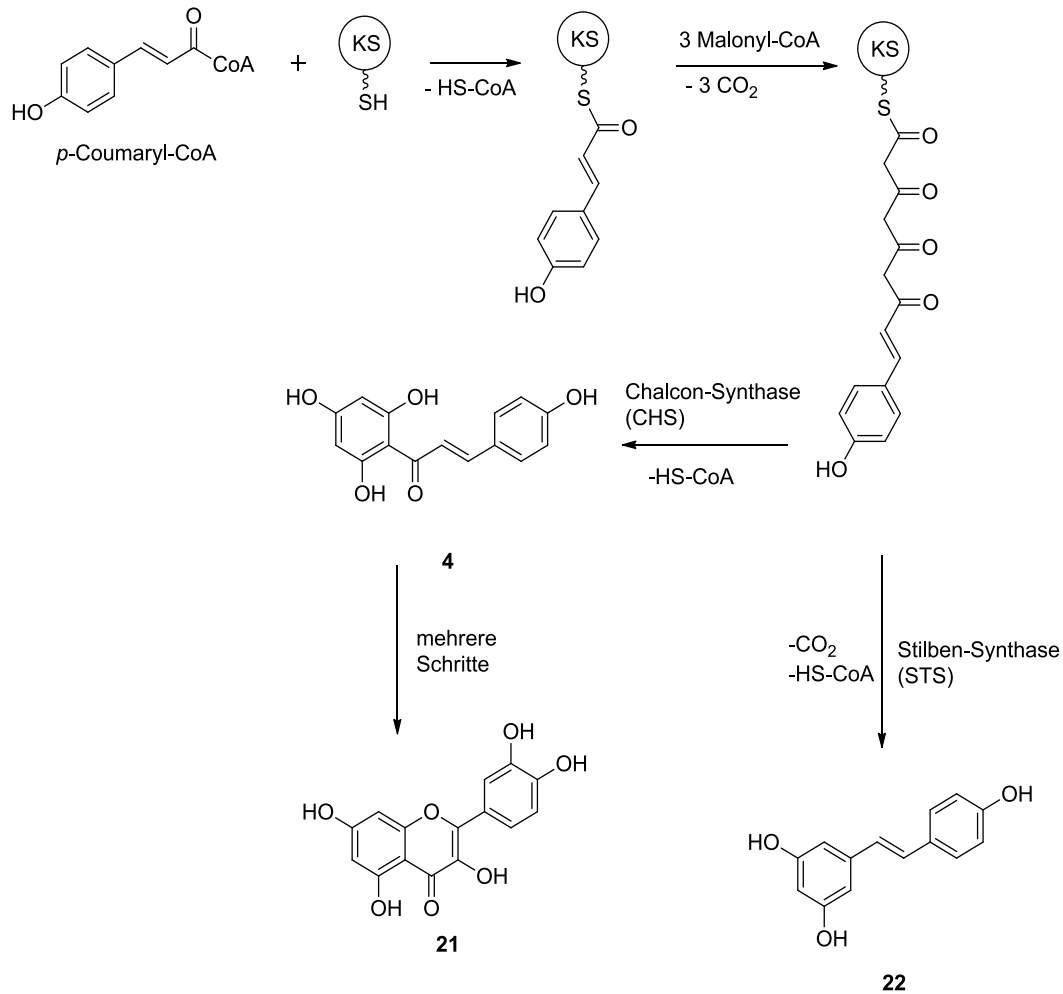


Abbildung 1-9: Biosynthese von Quercetin (**21**) und Resveratrol (**22**) durch eine PKS III.

Lange Zeit wurde es für unwahrscheinlich gehalten, dass eine PKS III mehr als drei Kondensationsschritte katalysieren kann.^[12] Durch eine PKS III in Bakterien konnte dieses widerlegt werden. Eine vierfache-fache iterative Kondensation von Malonyl-CoA mit Malonyl-CoA als Starteinheit führte biosynthetisch über das 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalen (THN, **30**) zum Flaviolin (**31**). Für eine PKS III war die Verwendung von Malonyl-CoA als Starteinheit sehr ungewöhnlich. Dabei entspricht die erste Ringfaltung einer Aldolkondensation vom Stilben-Synthase-Typ (STS-Typ) und die zweite Faltung einem Chalcon-Synthase-Typ (CHS-Typ), also einer Claisen-Kondensation (Abbildung 1-10).^[12]

Durch die Identifikation von PKS III-Mechanismen in Bakterien ist es eventuell möglich, durch kombinatorische Biosynthese ganz neue Substanzklassen aufzubauen bzw. zu erschließen.

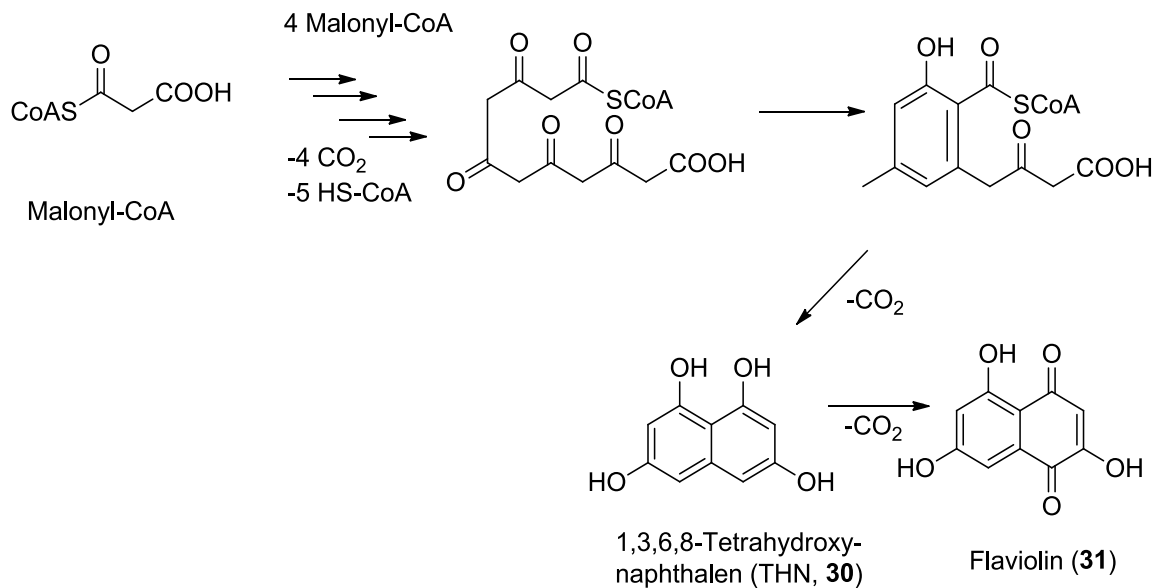
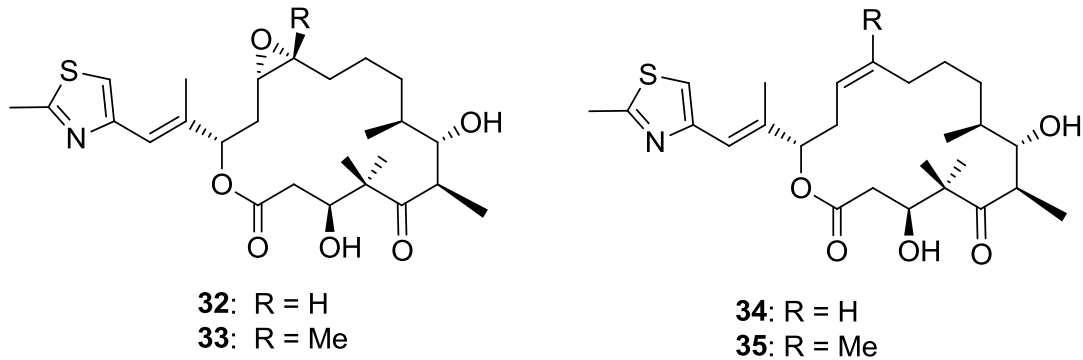


Abbildung 1-10: Biosynthese von Flaviolin (**31**) in Bakterien.^[12]

Aufbau und Funktion der PKS-NRPS

Um den Überblick der biosynthetischen Systeme der Polyketide zu vervollständigen, wird das Hybrid-System einer PKS-NRPS (Polyketidsynthase-Nicht-Ribosomale-Peptidsynthase) kurz vorgestellt. Dieses Hybridsystem zeigt vom Aufbau eine lineare Modularität wie bei der PKS I.^[48] Neben dem schon gezeigten PKS-NRPS-Metabolit Myxothiazol (**5**) sind auch die Epothilone A-D (**32-35**) gut untersucht.

Durch die PKS werden auch hier normalerweise Malonyl-CoA und Methylmalonyl-CoA als Start- und Verlängerungseinheiten eingebaut. Durch die NRPS kommt es zum Einbau von Aminosäuren. Hierbei werden sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren verwendet.^[49]



Verglichen mit der PKS I sind Module vorhanden, die auch nicht iterativ verwendet werden. Auch ist die Größe dieser Megasyntasen in der gleichen Größenordnung. Während die PKS I-Proteine eine Größe bis 350 kDa aufweisen^[15], ist die größte PKS-NRPS 450 kDa groß.^[50] Allerdings sind die Module in diesem Hybrid-System dazu fähig, schon während der Biosynthese andere Heteroatome außer Sauerstoffatome mit in die wachsende Kette einzubauen. Diese Heteroatome stammen aus dem Einbau von Aminosäuren, wie z.B. Cystein und Serin. Dadurch wird die strukturelle Diversität deutlich erhöht, was sich auch auf die biologische Aktivität auswirkt.

Ein direkter Vergleich von NRPS- und PKS I-Domänen zeigt gewisse Ähnlichkeiten auf (Tabelle 1-6). Die HC- und die KS-Domäne: Beide Domänen sind bei der Biosynthese dafür verantwortlich, zwei enzymatische Funktionen zu katalysieren. Zum einen die Übertragung der Startereinheit auf das nächste Modul und zum anderen die Integration in die wachsende Kette. Beim HC ist die Integration mit einer Cyclisierung einer Aminosäure mit anschließender Verlängerung der Kette verbunden. Die AD- und AT-Domäne: Beide Domänen sind für die Erkennung und Beladung des Extenders (AD: Aminosäure; AT: kurzkettige Carbonsäure) verantwortlich (Tabelle 1-6). Die PCP- und die ACP-Domäne: Beide Domänen tragen die wachsende Kette als Thioester gebunden.

Tabelle 1-6: NRPS und PKS I Domänen im Vergleich.

NRPS-Domänen	äquivalente PKS I Domänen
Heterocyclisierung (HC)	Ketosynthase (KS)
Adenylierung (AD)	Acyltransferase (AT)
Oxidoreduktase (OX)	---
Peptidyl-Carrier-Protein (PCP)	Acyl-Carrier-Protein (ACP)

Während der Biosynthese der Epothilone A-D (**32-35**) werden in diesen PKS-NRPS-Hybrid-Systemen die Domänen der PKS mit den Domänen der NRPS kombiniert. (Abbildung 1-11). Durch die NRPS wird der Thiazolring (Abbildung 1-12) aufgebaut und das Makrolid durch die PKS.

Die HC-Domäne katalysiert die Heterocyclisierung von Cystein zum Thiazol (Abbildung 1-12) und von Serin/Threonin zum Oxazolin.^[51] Dieser Schritt ist analog der Claisen-artigen Kettenverlängerung bei der PKS I. Diese Domäne ist zusätzlich für die Katalyse von der PKS ACP-Domäne des Loading Moduls zur PCP-Domäne des NRPS Moduls zuständig. Die AD-Domäne ist pro NRPS Modul für die Beladung von genau einer Aminosäure verantwortlich. Bei den Epothilonen A–D (**32–35**) ist es Cystein. Die PCP-Domäne trägt die wachsende Peptidyl-Kette gebunden als Thioester. Diese Kerndomänen, bei der PKS I die KS, AT und ACP-Domänen, sind obligatorisch, um eine Verlängerung der wachsenden Kette zu erhalten.

Struktur und Biosynthese von Polyketidstrukturen

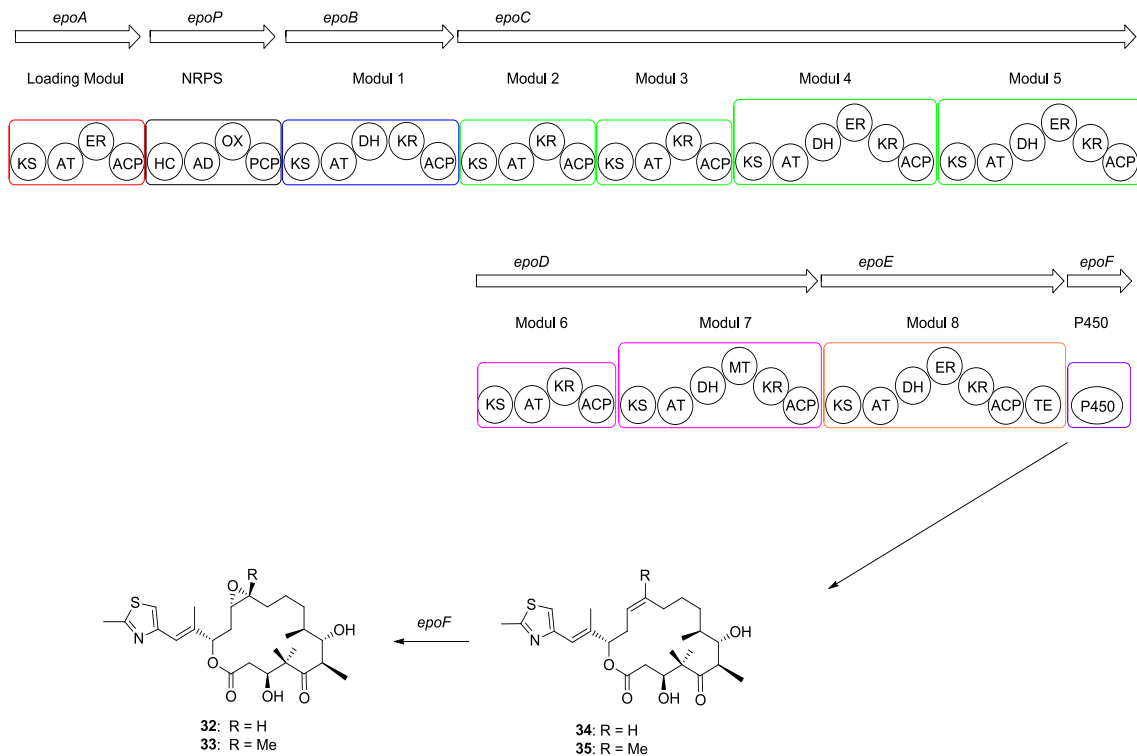


Abbildung 1-11: Biosynthese von PKS-NRPS-Metaboliten Epothilon A–D (**32–35**). PKS-Enzyme: KS = Ketosynthase, AT = Acyltransferase, ACP = Acyl-Carrier-Protein, KR = Ketoreduktase, DH = Dehydrogenase, ER = Enoylreduktase, TE = Thioesterase, MT = Methyltransferase; NRPS-Enzyme: HC = Heterocyclisierung, AD = Adenylierung, OX = Oxidoreduktase, PCP = Peptidyl-Carrier-Protein, P450 = Cytochrom P450.[52]

Eine Heterocyclisierung während der Biosynthese ist von PKS-Systemen nicht bekannt. Am Beispiel der Epothilone A–D (**32–35**) ist gezeigt, wie die Katalyse zum Thiazolgerüst stattfindet. Nachdem das Loading Modul beladen wurde, wird ein Cystein auf das NRPS Modul geladen. Wie zuvor beschrieben, katalysiert die HC-Domäne die Übertragung der Acylgruppe des Loading Moduls auf den Cysteinrest, der am PCP verankert ist, sowie die folgende Heterocyclisierung. Es wird analog zur PKS I nur jede Domäne einmal und nacheinander verwendet (Abbildung 1-12).

Struktur und Biosynthese von Polyketidstrukturen

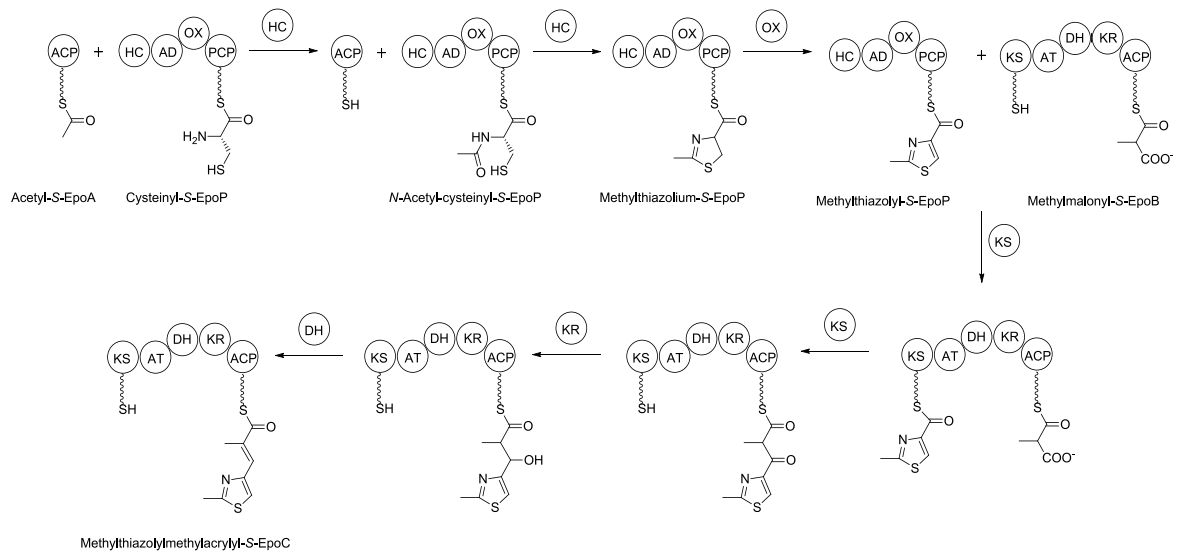
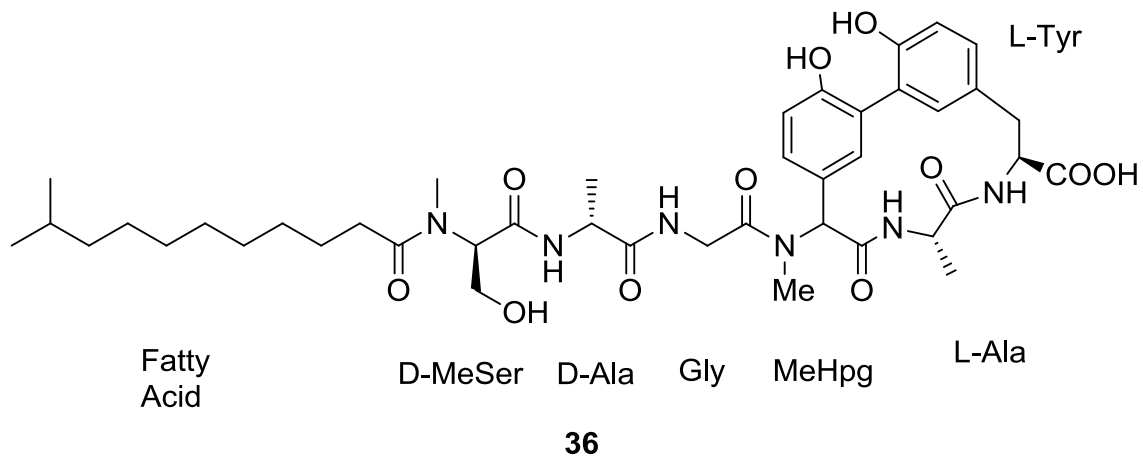


Abbildung 1-12: Mechanismus der Epothilon Biosynthese. Cyclisierung zum Thiazol.[53]

Vergleichbar zur PKS I können bei der PKS-NRPS auch Makrozyklen generiert werden.^[54] Oft handelt es sich um zyklische Peptide, wie z.B. Arylomycin A₂ (**36**).^[55] Hierbei baut die PKS den Fettsäureschwanz und die NRPS das makrocyclische Peptid auf.



Die PKS-Systeme sind seit mehreren Dekaden sehr gut untersucht worden, wodurch eine große Anzahl an Polyketiden resultierte. Dieser hier beschriebene Überblick, verschafft einen Einblick in den Aufbau und die Funktion der unterschiedlichen Systeme. Dadurch werden ein breites Verständnis und auch ein großes Forschungsinteresse vermittelt. Es wird auch deutlich, dass die Naturstoffforschung

das vorherrschende interfakultäre Wissen aus der Chemie und der Biologie benötigt, um genetische Methoden gekoppelt mit der chemischen Analytik und der Strukturaufklärung effizient und sinnvoll einzusetzen.

Ausblick und Trends in der PKS-Forschung

Durch die beschriebenen Biosynthesemechanismen, die stärker auftretenden Resistenzen und die Methode der kombinatorischen Biosynthese wird der Weg vorgegeben. Es müssen neue Substanzen möglicherweise mit neuen Targets identifiziert werden, um schnellstmöglich in die klinischen Phasen für die spätere Markteinführung zu gelangen. Viele im Labor zu kultivierenden Stämme, die als Wirkstoffquelle dienen, sind schon intensiv untersucht worden, was die Identifizierung neuer Substanzen sehr erschwert. Daher werden das genetische, das biologische und das chemische Wissen sowie das generelle Verständnis um die katalytischen Kaskaden immer wichtiger. Durch 'gene shuffling' und weitere Methoden aus der kombinatorischen Biosynthese kann es relativ schnell gelingen, neue Substanzen zu isolieren.^[56] Durch chemische aber auch durch biologische Derivatisierung kann dadurch eine Substanzbibliothek auf der Suche nach neuen Leitstrukturen aufgebaut werden.^[57] Dazu gehört auch das High-Throuput-Screening (HTS). Durch modernere Technologie und Methoden ist es durch Roboter möglich, dass sehr schnell mehrere Millionen Verbindungen getestet werden können.^[58] Mit der Erschließung neuer Wirkstoffquellen, können die möglicherweise ganz neuen Substanzklassen sehr schnell auf biologische Aktivität gescreent werden.

Zukünftig werden die genetischen Methoden, wie z.B. die heterologe Expression von kompletten Biosynthesegenclustern, dazu führen, dass im Labor nicht-kultivierbare Stämme, z.B. aus marinen Habitaten, handelbarer werden.^[59] Dadurch besteht die Möglichkeit zur Entdeckung ganz neuer Substanzklassen mit eventuell neuen Targets.

Ein weiterer zukunftsweisender Aspekt wird durch die umgekehrte Pharmakologie (reverse pharmacology) erbracht. Dabei geht es darum, die Routine (vom Labor zur

Klinik) zu unterbrechen, indem klinische Ansätze und Beobachtungen mit in die Leitstrukturfindung integriert werden (von der Klinik zum Labor).^[60]

2 Aktuelle Aspekte der Suche nach neuen Wirkstoffen

Neue Wirkstoffe und auftretende Resistenzen

Resistenzen sind auf dem Vormarsch. Weltweit treten multiresistente pathogene Keime auf, die auf keine Standardtherapie ansprechen. Grund dafür sind Resistenzen gegen mehrere Antibiotika.^[61] Eine Ursache für diese multiplen Resistenzen ist der horizontale Gentransfer. Anders als beim vertikalen Gentransfer, bei welchem eine Weitergabe des Erbmaterials nur an direkte Nachkommen vorkommt, erfolgt beim horizontalen Gentransfer eine Weitergabe von genetischem Material auch an nicht-verwandte Arten.^[62] Bei dieser Art von genetischer Wanderung spielen Plasmide eine große Rolle.^[63] Mögliche Mechanismen zur Weitergabe von genetischem Material sind in Abbildung 2-1 aufgezeigt.

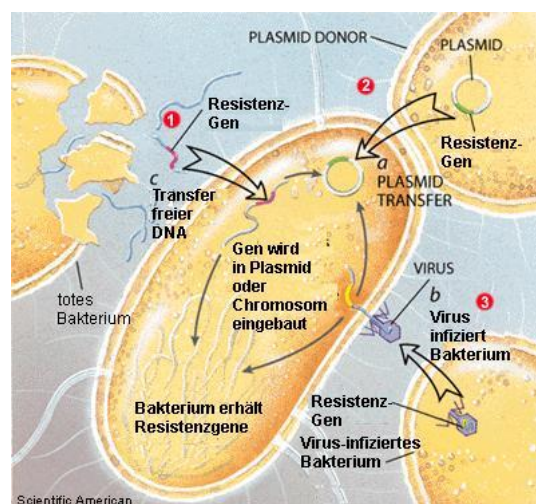


Abbildung 2-1: Horizontaler Gentransfer bei Bakterien. **1:** Transformation; **2:** Konjugation; **3:** Transduktion. Abbildung entnommen aus [64].

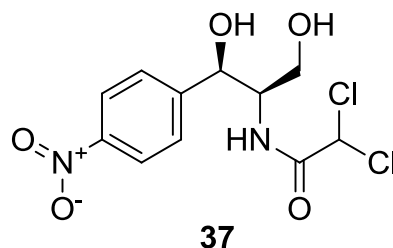
Dabei beschreibt die Transformation die Aufnahme freier DNA, die Konjugation beinhaltet einen Gentransfer zwischen verschiedenen Zellen und die Transduktion beschreibt den Bakteriophagen-induzierten Gentransfer. Wenn ein Bakterium mit einer natürlichen Resistenz weitere resistente Gene durch einen horizontalen Gentransfer erhält, entsteht ein multiresistenter Erreger. Weitere Ursachen für eine

Resistenz ist der übermäßige Gebrauch von Antibiotika zur Vorsorge auch ohne Symptomatik, mangelhafte Hygiene in Krankenhäusern oder der unvorsichtige Einsatz von Antibiotika in der Tiermast.^[64] Verstärkt wird diese Problematik außerdem durch weltweiten Reiseverkehr. Dadurch ist es möglich, dass Bakterien mit verschiedenen Resistenzen völlig andere Lebensräume „erschließen“ können.^[65] Durch jeden Einsatz eines Antibiotikums wird auf Antibiotikaresistenz selektioniert. Dadurch kann jeder Gebrauch eines Antibiotikums die Effizienz und die Lebensdauer dieses Medikaments erniedrigen.

Zu dieser Problematik tragen natürliche Resistenzen bei. Antibiotika-Produzenten müssen sich selber vor ihren Produkten schützen, was durch Resistenzgene geschieht. Auch bei Bakterien, die in räumlicher Nähe der Antibiotika-Produzenten leben, ist es möglich, dass Resistenzen gebildet werden.^[66] Diese Resistenzen können durch horizontalen Gentransfer auch auf humanpathogene Bakterien übertragen werden.

Der Kampf gegen die Resistenzen ist ein Wettlauf mit der Zeit. Eine Arzneientwicklung mit der anschließenden Markteinführung dauert im Schnitt 10–15 Jahre (Tabelle 2-1) und kostet 800 Millionen Dollar^[67, 68] (450 Millionen Pfund^[69]). Die Entwicklung von multiresistenten pathogenen Keimen ist um einiges schneller als die Entwicklung neuer Arzneimittel.

Ein Beispiel stellt das Chloramphenicol (**37**) dar. **37** ist ein Breitbandantibiotikum, was 1947 aus *Streptomyces venezuelae* isoliert wurde.^[70, 71]



Es konnte gezeigt werden, dass knapp zehn Jahre nach der Entdeckung die ersten Resistenzen aufgetreten sind.^[61] Für die auftretende Resistenz sind Acetylierungen der

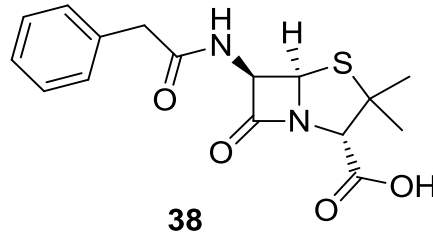
beiden Hydroxygruppen durch die bakterieneigenen Chloramphenicol-Acetyl-transferasen (CAT) verantwortlich.^[72]

Tabelle 2-1: Phasen der Arzneientwicklung.^[67, 73]

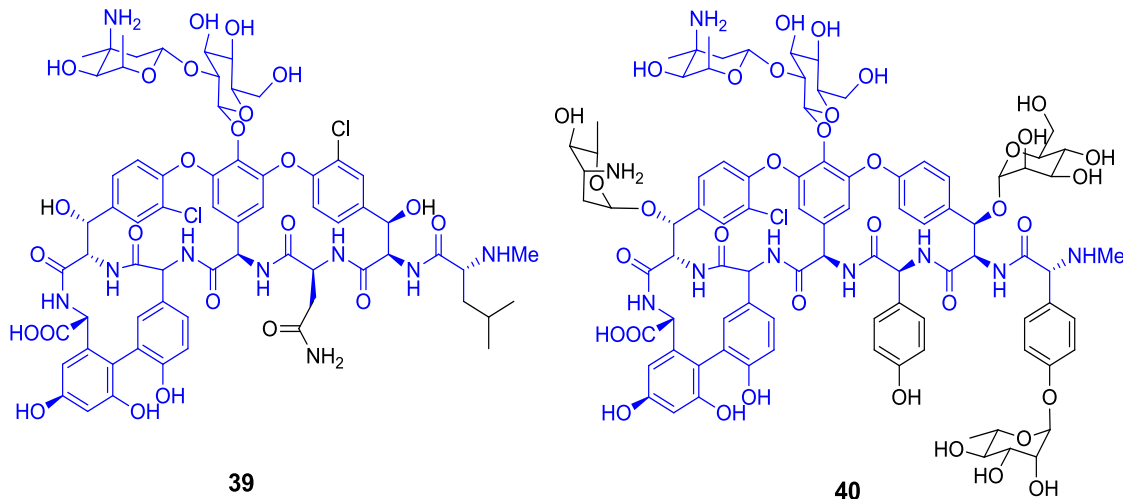
Phase	Testgruppe	Ziel	Dauer
Prälinik	Labor (z.B. Zellkulturen und Tierversuche)	Feststellung der chemischen und physikalischen. Eigenschaften der Substanz und Beurteilung der Sicherheit und Wirksamkeit in lebenden Zellen	Bis 6.5 Jahre
Klinische Studien			
Phase I	10–100 gesunde Probanden	Erster Test an gesunden Menschen	1–2 Jahre
Phase II	50–500 Patienten	Erster Test auf Wirksamkeit an wenigen kranken Menschen	1–2.5 Jahre
Phase III	300–30000 Patienten	Statistisch signifikanter Nachweis der Wirksamkeit, Verträglichkeit und Sicherheit	2–3.5 Jahre
Zulassung	Alle Informationen aus präklinischen und klinischen Studien	Prüfung und Bewertung aller Studiendaten zur Wirksamkeit und Unbedenklichkeit	1–2 Jahre
Überwachung nach Markteinführung	Alle mit dem Arzneimittel behandelten Patienten	Erfassung und Bewertung von Nebenwirkungen (nicht aufgetreten in Phase I–III; später oder selten auftretend), um fortlaufend ein positives Nutzen-Risiko-Verhältnis sicherzustellen	laufend

Auch die Penicilline sind ein gutes Beispiel für eine sehr schnell auftretende Resistenz. Das Penicillin (Vertreter Penicillin G (**38**)), ein β -Lactam-Antibiotikum, wurde 1940 von

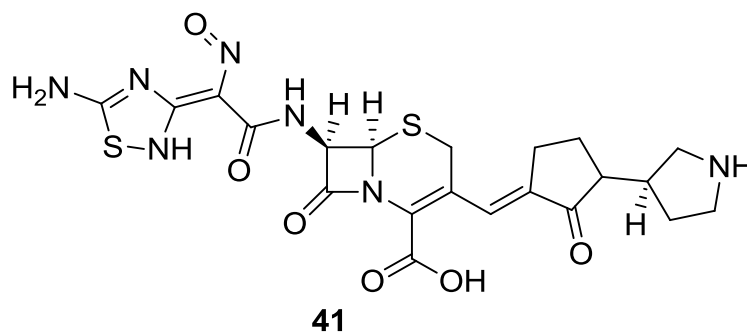
ALEXANDER FLEMING aus *Penicillium chrysogenum* isoliert. In der Klinik kam es 1943 zum Einsatz, obwohl die ersten Resistenzen schon 1940 aufgetreten sind.^[74]



Aufgrund der exzessiven Verwendung (Tiermast, Prophylaxe) von Antibiotika werden einige Antibiotika als Reserve zurückgehalten und nur im Notfall verwendet. Vancomycin (**39**)^[75] ist ein solches Reserve-Antibiotikum. Vancomycin (**39**) ist ein Glykopeptid und wurde 1954 aus *Amycolatopsis orientalis* (Familie: Pseudonocardaceae) isoliert.^[76] Avoparcin (**40**) wurde bis 1997 als Wachstums-promoter in der Tierzucht eingesetzt.^[77, 78] Bei **40** handelt es sich ebenfalls um ein Glykopeptid, was dem Vancomycin (**39**) sehr ähnlich ist (blau). **39** wird vor allem gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stämme oder multiresistente Enterokokken eingesetzt. Durch den hohen Selektionsdruck den **40** durch Verwendung in der Tiermast ausgeübt hat, konnten Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) oder allgemeiner Glykopeptid-resistente Enterokokken (GRE) schon 1987 beschrieben werden.^[77, 79] Die Enterokokken, *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis*, sind Bakterien der Darmflora und haben die Fähigkeit, sich Resistenzen sehr schnell anzueignen. Das macht diese Erreger sehr gefährlich und zudem verläuft die Übertragung der Resistenzen durch die VRE einfacher als bei MRSA.^[76, 80]



In einigen Fällen konnte das Auftreten einer VRSA (Vancomycin-resistenter *Staphylococcus aureus*) beobachtet werden.^[81] In diesem Fall handelt es sich um einen „Superkeim“, der auftreten kann, wenn eine Erkrankung gleichzeitig an VRE und MRSA besteht.^[82] Tritt ein solcher Keim auf, so müssen andere Reserve-Antibiotika herangezogen werden, wie z.B. Ceftobiprol (**41**), ein Cephalosporin der 6. Generation.^[83, 84]



Mechanismen der Resistenzentwicklung

Bei der Betrachtung der auftretenden Resistenzen müssen auch die einzelnen Resistenzmechanismen analysiert werden. Bakterien haben verschiedene Techniken entwickelt, das sind oft physiologisch neue Stoffwechselkompetenzen, um sich gegen Antibiotika zu schützen: a.) Eine Verhinderung der Antibiotika an die Zelle zu binden oder in die Zelle einzutreten; b.) Produktion eines Antibiotikum-inaktivierenden

Enzyms (Spaltung, Funktionalisierung); c.) Der interne Bindungsort des Antibiotikums wird verändert (Abbildung 2-2).

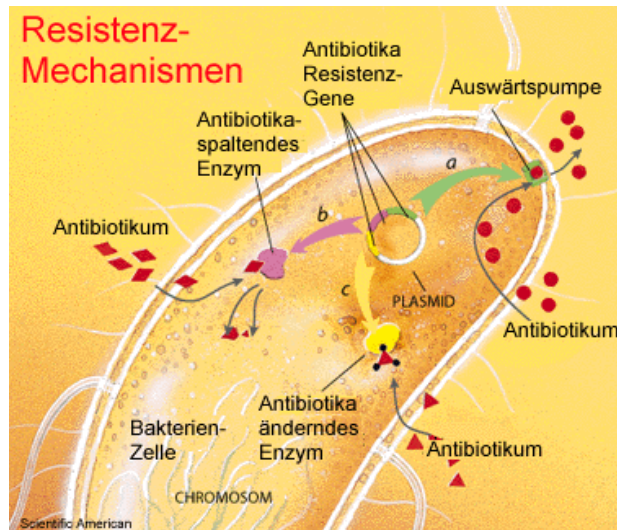


Abbildung 2-2: Resistenzmechanismen: a.) Verhinderung in die Zelle einzutreten; b.) Produktion eines Antibiotikum-inaktivierenden Enzyms; c.) Der interne Bindungsort wird verändert. Abbildung entnommen aus [64].

Beispielhaft an der β -Lactam-Antibiotikaklasse wird gezeigt, wie eine Inaktivierung bzw. eine Spaltung stattfinden kann. Die β -Lactamase katalysiert die Hydrolyse von β -Lactam-Verbindungen (Penicilline und Cephalosporine). Das Produkt der Ringöffnung decarboxyliert sehr leicht im Anschluss, wodurch das Penicillin G (**38**) nicht mehr wirksam ist.

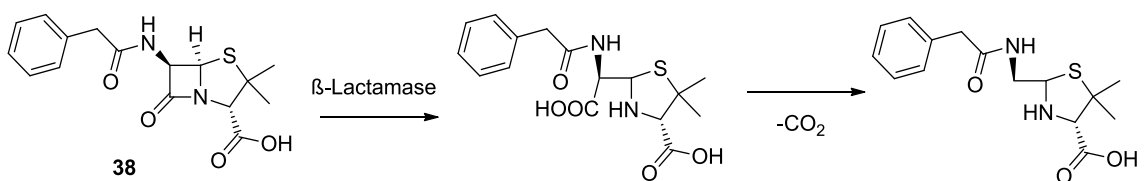


Abbildung 2-3: β -Lactamase-Aktivität bei der Spaltung von Penicillin G (**38**).^[64]

Die meisten zugelassenen Arzneimittel sind Naturstoffe oder deren Derivate.^[85] Daher wird die Suche nach neuen Wirkstoffen oder das Erschließen neuer Produzenten ein

wichtiges und zukunftsorientiertes Forschungsziel und die Entdeckung neuer Naturstoffe ein sehr wichtiges Anliegen.

Aufgrund solcher Resistenzen ist es notwendig, neue Targets bzw. neue Leitstrukturen zu identifizieren, um eine gute klinische Versorgung zu gewährleisten. Diese Leitstrukturen können auf unterschiedlichem Wege derivatisiert bzw. modifiziert werden: 'Biosynthetic Engineering', chemische Derivatisierung (Semisynthese) oder Totalsynthese bzw. kombinatorische Synthese^[86, 87].

3 „Unnatürliche“ Naturstoffe durch `Biosynthetic Engineering`

`Biosynthetic Engineering` ist auch als kombinatorische Biosynthese bekannt. Um neue Derivate von wirksamen Naturstoffen zu erzeugen, werden verschiedene Methoden, meistens genetischer Natur, angewandt. Der zentrale Gedanke bei der kombinatorischen Biosynthese besteht in der Rekombination oder Mutation von beteiligten Enzymen an der Biosynthese.^[88] In der Regel muss für die kombinatorische Biosynthese der Gencluster sequenziert und charakterisiert sein. Daraus ergeben sich folgende Methoden: Vorläufer-dirigierte Biosynthese, Mutasynthese, der heterologe Expression und `gene shuffling`, welche hier im Detail aufgeführt werden.

Vorläufer-dirigierte Biosynthese und Mutasynthese

Die Vorläufer-dirigierte Biosynthese benötigt zunächst und im einfachsten Fall keine genetischen Ansätze. Es erfolgt eine Zugabe von alternativen Vorläufern während der Kultivierung (Abbildung 3-1, A–E: Natürliche Metabolite; B`–E`: neue Derivate; a–d: Enzyme). Durch den Einbau dieser nicht-natürlichen Vorläufer, anstelle der normalen Starteinheiten, wird die Diversität von Polyketiden erhöht. Man muss also davon ausgehen, dass einige Biosyntheseenzyme eine erweiterte Substratspezifität haben. So können einem Naturstoff wichtige strukturelle oder biologische Eigenschaften verliehen werden.

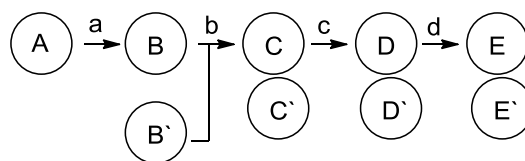
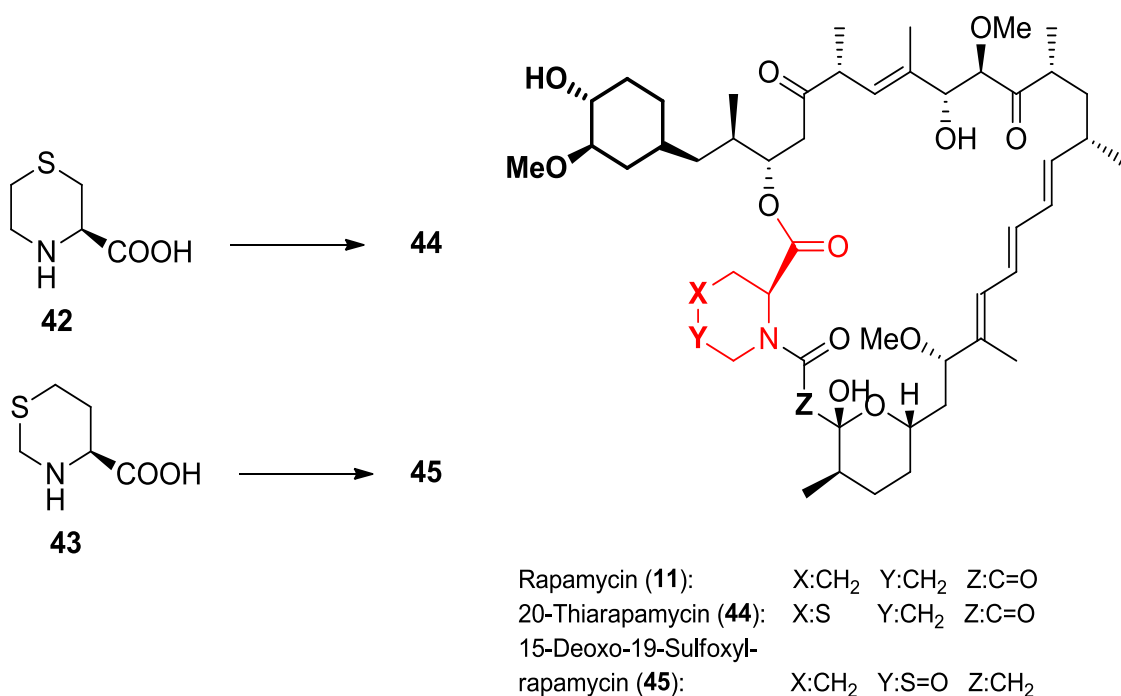


Abbildung 3-1: Prinzip der Vorläufer-dirigierten Biosynthese. **A–E**: Natürliche Derivate; **B`–E`**: nicht natürliche Vorläufer und neue Derivate; **a–d**: Enzyme.^[87]

Beispielweise ist es durch die Methode der Vorläufer-dirigierten Biosynthese gelungen, schwefelhaltige Vorläufer in das Gerüst von Rapamycin (**11**) einzubauen.^[89] Gefüttert

wurden (*S*)-1,4-Thiazan-3-Carbonsäure (**42**) und (*S*)-1,3-Thiazan-4-Carbonsäure (**43**) als unmodifizierte Carbonsäuren, wodurch 20-Thiarapamycin (**44**, 100 mg/L) und 15-Deoxo-19-sulfoxylrapamycin (**45**, 10 mg/L) isoliert werden konnten. X, Y und Z bezeichnen die unterschiedlichen Positionen, an denen durch diese Fütterungsexperimente Änderungen im Grundgerüst von **11** auftreten können. Die Menge an produziertem Rapamycin (**11**) liegt bei 30 mg/L^[90] und befindet sich damit zwischen den beiden neu erzeugten Derivaten (**44**, **45**). Demnach liegt eine breite Substratspezifität beim Einbau von modifizierter *L*-Pipicolinsäure.



Alternativ existiert die Mutasyntese, die das gleiche Prinzip wie die Vorläuferdirigierte Biosynthese innehat. Allerdings geht der Fütterung ein genetischer Knock-Out voraus, der die natürliche Bildung des Naturstoffes deshalb unterbindet (Abbildung 3-2), da der entsprechende Vorläufer nicht zur Verfügung steht.^[91]

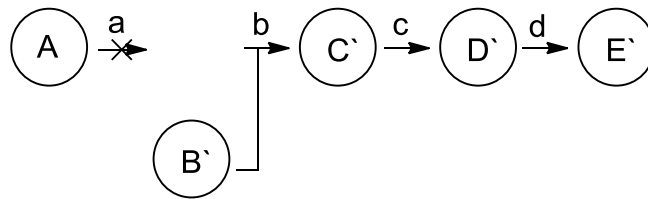


Abbildung 3-2: Prinzip der Mutagenese. **A**: Natürlicher Vorläufer; **B'**: nicht natürlicher Vorläufer; **C'-E'**: neue Derivate; **a-d**: Enzyme.^[87]

HERTWECK *et al.* konnten mit der Mutagenese eine Derivatisierung von Aureothin (**7**) herbeiführen.^[91] Dazu wurde das *AurF* Gen ausgeschaltet und statt *p*-Nitrobenzoesäure (**46**) *p*-Cyanbenzoesäure (**47**) während einer Kultivierung gefüttert. Daraus konnten 5.9 mg des dunkelgelben Aureonitrils (**48**) gewonnen werden. Auch durch die Fütterung von *p*-Cyanbenzoesäure-SNAC-Ester (**49**) konnte die Ausbeute von **48** nicht gesteigert werden (Abbildung 3-3).

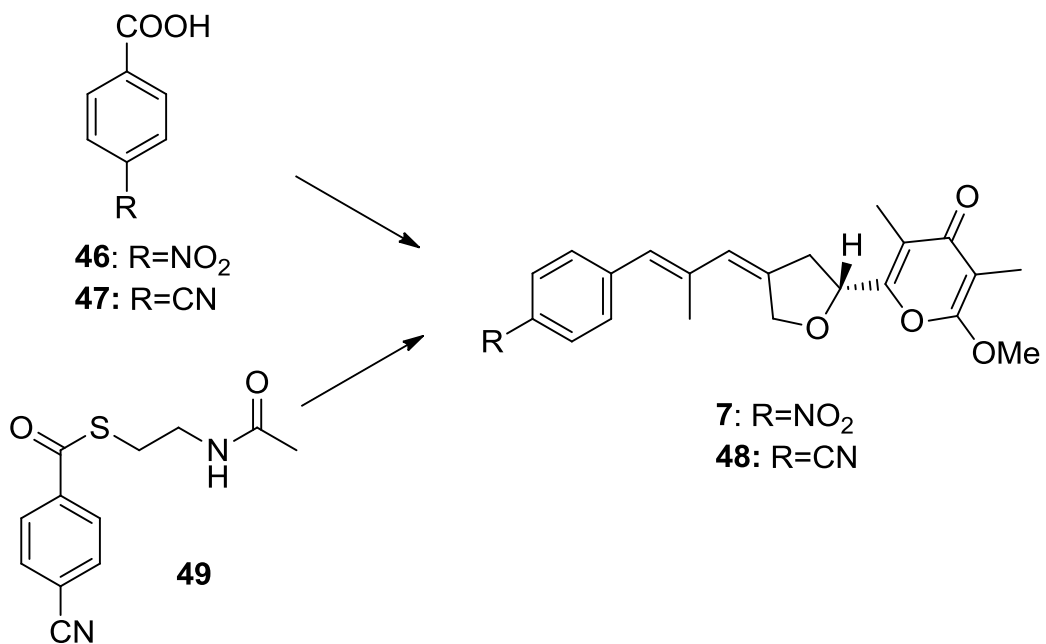
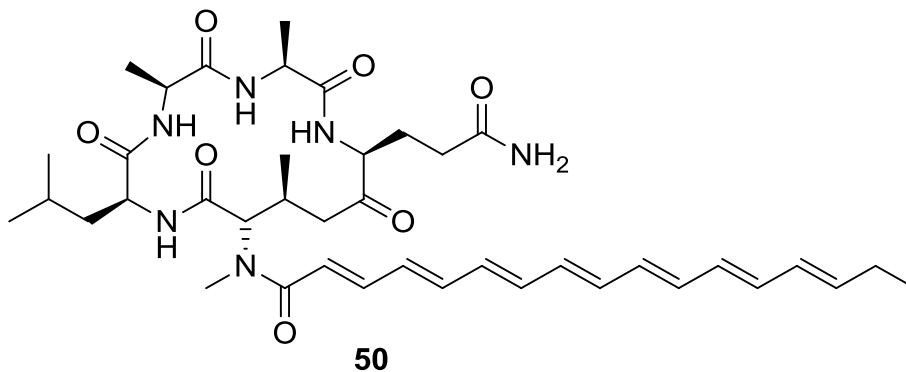


Abbildung 3-3: Mutagenese von Aureothin (**7**).

Heterologe Expression

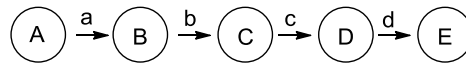
Bei der heterologen Expression werden die Biosynthesegene von dem natürlichen Produzenten in einen neuen Wirt transferiert. Dadurch wird es möglich, strukturell komplexe Verbindungen zu produzieren oder auch neue Derivate zu erzeugen.^[92] Ein gutes Beispiel ist die heterologe Expression von Myxochromid S (**50**). **50** wird ursprünglich in dem Myxobakterium *Stigmatella aurantiaca* produziert. Eine heterologe Expression wurde in *Pseudomonas putida* realisiert. Dazu war es notwendig den gesamten Biosynthesegencluster auf ein Cosmid zu klonen, verschiedene Elemente zur Integration in den neuen Wirt mit einzubringen, sowie den ursprünglichen Promoter auszutauschen, damit eine Expression in dem neuen Wirt stattfinden kann.^[92] Ein wichtiger Vorteil ist, dass Pseudomonaten eine Phosphopantetheinyltransferase besitzen. Diese Transferase ist zur Aktivierung von heterologen PKS- und NRPS-Elementen von Streptomycceten und Myxobakterien erforderlich.^[92] Durch diese Heterologe Expression konnte die Ausbeute von Myxochromid S (**50**) von 8 mg (*Stigmatella aurantiaca*) auf 40 mg (*Pseudomonas putida*) gesteigert werden.^[92]



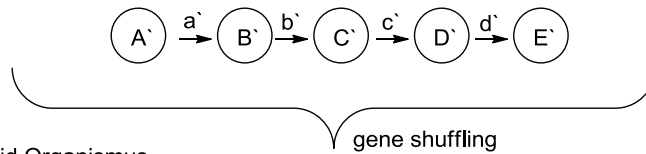
'Gene Shuffling'

Eine weitere Methode der kombinatorischen Biosynthese ist das 'gene shuffling'. Hier findet eine Rekombination von Modulen bzw. enzymatischen Funktionen aus unterschiedlichen Biosynthesewegen statt (Abbildung 3-4).

Wildtyp Organismus 1



Wildtyp Organismus 2



Hybrid Organismus

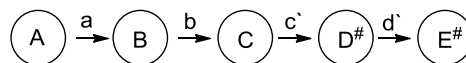
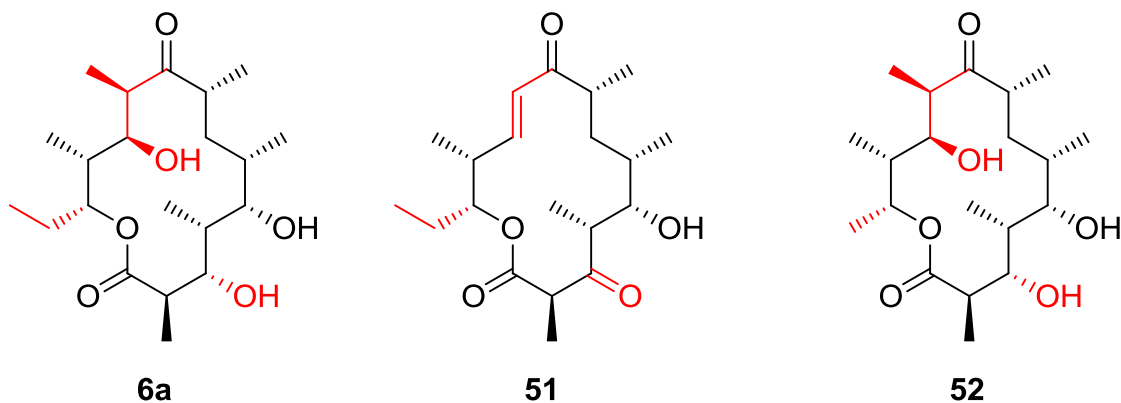


Abbildung 3-4: Allgemeine Darstellung des 'gene shufflings'. **A-E und A'-E'**: Natürliche Derivate der beiden Wildtypen; **a-d und a'-d'**: Enzyme der beiden Wildtyp Organismen. **D# und E#**: Neu erzeugte Derivate durch 'gene shuffling'.

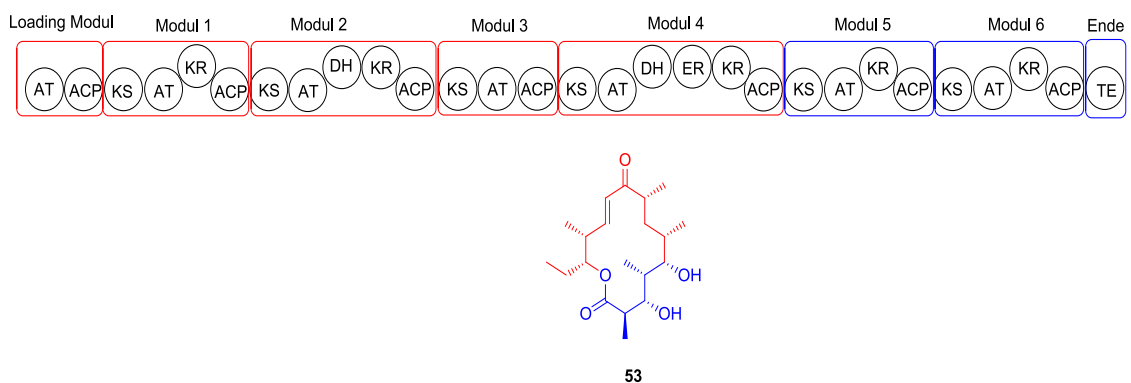
Ein sehr gut untersuchtes Beispiel ist das 'Biosynthetic Engineering' an Macroliden wie von 6-Deoxyerythronolid B (**6a**), Narbonolid (**51**) oder 8,8a-Deoxyoleandolid (**52**) den Aglykonen von Erythromycin (**6**), Pikromycin und Oleandomycin.^[20, 93, 94, 95] Die Unterschiede sind in rot dargestellt. Hierbei wurden analog zu Abbildung 3-4 Module der unterschiedlichen Biosynthesewege miteinander kombiniert (Abbildung 3-5).



Findet eine genetische Rekombination aus Genen der Erythromycin-, Pikromycin- und der Oleandomycin-Biosynthese statt, wird ein neues Polyketid-Makrolide erhalten, das 3-Hydroxy-narbonolid (**53**, Abbildung 3-5). Die Ausbeuten von **53** (0.1 mg/L) sind vergleichbar niedrig wie die von **51**.^[94] Aus diesen Experimenten geht hervor, dass die

Module 5 und 6 mit der TE Domäne (aus der Erythromycin- (blau) und der Oleandomycin-Biosynthese (grün)) beide die Biosynthese von **53** komplettieren können. Weiterhin ersichtlich war, dass sehr geringe Mengen aus solchen genetischen Manipulationen hervorgehen kann, was durchaus ein Problem darstellen kann. Um neue Substanzen zu testen, wird ausreichend Substanz benötigt. Durch eine so geringe Ausbeute von 0.1 mg/L kann nur in einem sehr großen Maßstab genügend Substanz zur Verfügung gestellt werden.

A: Rekombination von Modulen aus der Pikromycin-Biosynthese (rot) mit Modulen aus der Erythromycin-Biosynthese (blau).



A: Rekombination von Modulen aus der Pikromycin-Biosynthese (rot) mit Modulen aus der Oleandomycin-Biosynthese (grün).

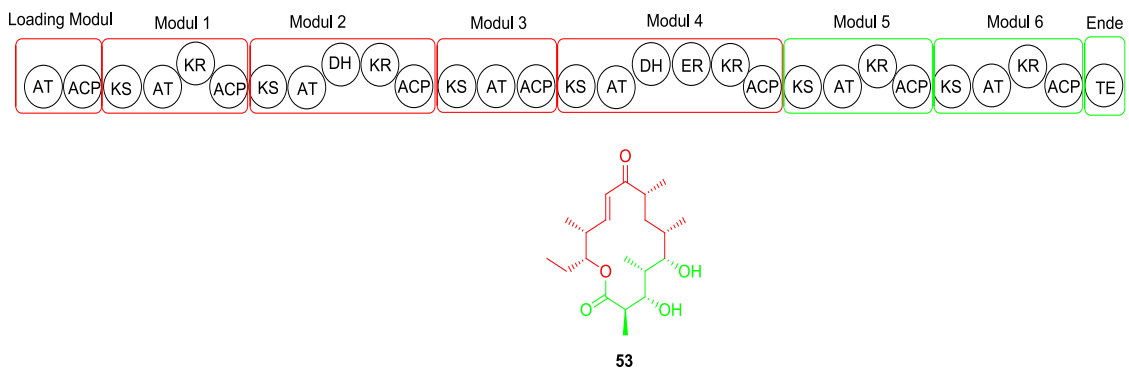
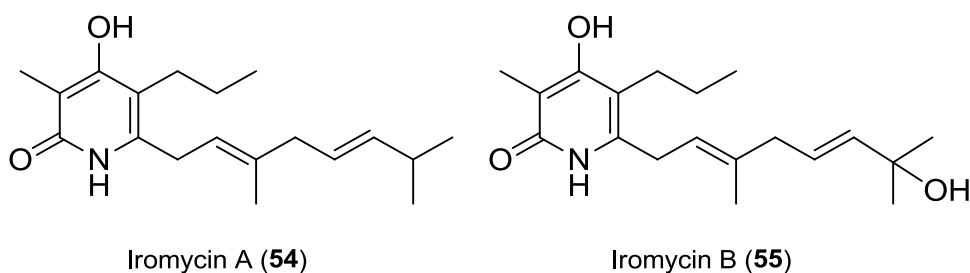


Abbildung 3-5: `Gene shuffling` von **A**: Modulen aus der Pikromycin- und der Erythromycin-Biosynthese und **B**: aus der Pikromycin- und der Oleandomycin-Biosynthese.[94]

4 Aufgabenstellung

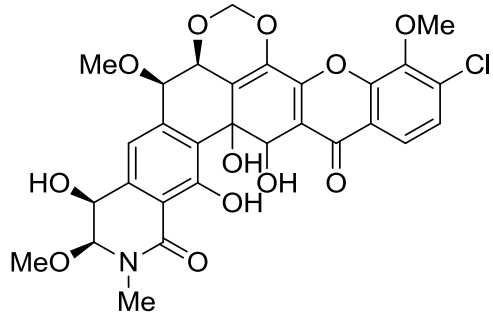
Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die Etablierung der chemischen Analytik und Untersuchung neuer Sekundärstoffe verschiedener Streptomyceten.

Am Beispiel des *Streptomyces bottropensis* Dra17 sollte durch Vorläufer-dirigierte Biosynthesen abgeklärt werden, ob es möglich ist, neue Starteinheiten auf die für die Iromycin-Bildung (**54**, **55**) verantwortliche PKS zu laden, um neue Derivate zu erzeugen. Im Rahmen der eigenen Diplomarbeit^[96] wurden hierzu bereits Vorversuche durchgeführt. Eine optimierte Beladung der PKS sollte durch den Einsatz von SNAC-Estern gewährleistet werden, die synthetisch hergestellt werden. Es sollte versucht werden nicht nur derivatisierte Carbonsäuren sondern auch unmodifizierte Aminosäuren als Starteinheit in das Grundgerüst der Iromycine einzubauen. Die Hauptkomponenten bei einer Kultivierung sind Iromycin A (**54**) und B (**55**).

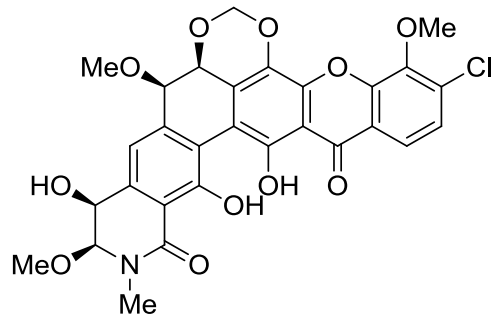


Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, in Kooperation mit dem AK WEBER (Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen, IMIT), ein genetisch erzeugtes Stoffwechselprodukt auf Grundlage des Biosynthesegenclusters des Lysolipins (**56**, **16**) zu isolieren und in seiner Struktur aufzuklären. Diese Substanz fiel durch eine stark rosa-rote Eigenfarbe auf. Vorversuche, *Streptomyces albus* mit dem enthaltenden minimalen PKS II-Gencluster zu kultivieren, waren nicht erfolgreich. In diesem Zusammenhang sollte eine reproduzierbare Produktionsmethode, die Aufarbeitung und die Reinstoffisolierung der Metaboliten ausgearbeitet werden. Bei einer erfolgreichen Isolierung und Charakterisierung der Struktur sollte durch Fütterungsexperimente mit [1,2-¹³C₂]Acetat die Biogenese dieses bzw. dieser PKS II-

Metaboliten bestimmt werden. Durch die Aufklärung der Struktur ist es eventuell möglich, einen tieferen Einblick in die Lysolipin (**56**, **16**)-Biosynthese zu erhalten.



Lysolipin X (**56**)



Lysolipin I (**16**)

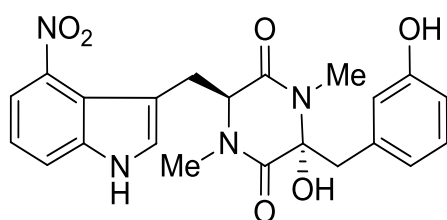
5 Vorarbeiten am Stamm *Streptomyces bottropensis* Dra17

Wenn es darum geht neue Wirkstoffe zu identifizieren, müssen verschiedene Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien oder Pilze, einem chemischen oder biologischen Screening unterzogen werden. Das biologische Screening zielt darauf ab, Substanzen mit biologischen Eigenschaften selektiv zu identifizieren.

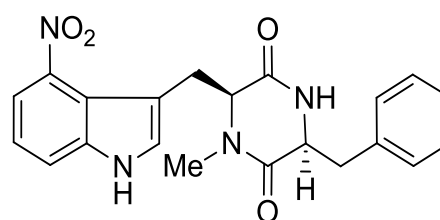
Bei dem chemischen Screening ist es möglich durch Verwendung verschiedener Kultivierungsbedingungen, das Entstehen neuer Metabolite voranzutreiben. Es können z.B. Temperatur, Sauerstoffzufuhr oder das gesamte Medium, aber auch nur Medienbestandteile verändert werden. Das Verfahren, durch welches das Metabolitenspektrum eines Stammes durch Veränderungen der Kultivierungsbedingungen genauer erfasst wird, wird als OSMAC-Verfahren (One Strain Many Compounds) bezeichnet.^[97]

Neue Familie der Iromycine (54, 55, 59–62)

O. WAGNER führte im Rahmen seiner Dissertation ein chemisches Screening durch.^[98] Hierzu wurden Bodenproben eines Kalkmagerrasens vom Drakenberg in Herberhausen, nahe Göttingen, verwendet. Mit Hilfe des OSMAC-Verfahrens wurde der Bakterienstamm *Streptomyces bottropensis* Dra17 unterschiedlich kultiviert. Es konnten bereits bekannte und neue Metabolite identifiziert werden: Zum einen wurden Substanzen gefunden, die als Thaxthomine (**57**, **58**) identifiziert wurden.



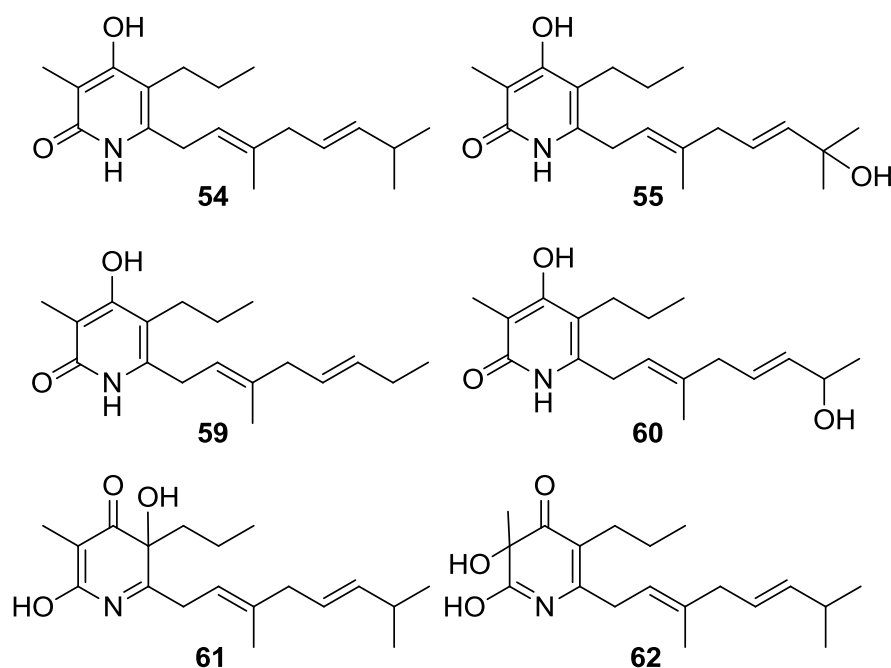
Thaxthomin A (**57**)



Thaxthomin C (**58**)

Zum anderen wurden bisher nicht als chemische Strukturen publizierte Mitglieder der Familie der Iromycine gefunden. Iromycin A (**54**) und B (**55**) wurden aus den Extrakten isoliert und charakterisiert.^[98] Auch konnte gezeigt werden, dass **54** totalsynthetisch dargestellt werden kann.^[99] Die Biogenese der Iromycine konnte durch Medien-Optimierungen und Fütterungen durch markierte Vorläufer von O. WAGNER^[98] und J. v. FRIEHLING^[100] weitestgehend aufgeklärt werden. Allein der Vertreter Iromycin A (**54**) konnte in der Patentliteratur als der Streptomyceten-Metabolit NK26588 identifiziert werden.^[101]

Durch verschiedene im Vorfeld durchgeführten Medienoptimierungen ist es F. SURUP im Rahmen seiner Dissertation gelungen, das Spektrum der Iromycine um die Iromycine C–F (**59–62**) zu erweitern.^[102, 103]



Biogenese der Iromycine (54, 55, 59–62)

Das Grundgerüst der Iromycine (**54**, **55**, **59**, **60**) beinhaltet einen vollständig substituierten Pyridonring sowie zwei unterschiedlich lange Alkyl- bzw. Alkenyl-Seitenketten. Es handelt sich hier um eine ungewöhnliche, neue Stoffklasse. Eine Naturstofffamilie, die sich durch zwei Alkyl-Seitenketten und zusätzlich einen

vollständig substituierten Pyridonring auszeichnet, war bis zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt. Allein der Vertreter Iromycin A (**55**) war in der Patentliteratur bekannt.^[101] Durch die Aufklärung der Biogenese stellte sich heraus, dass sich das Iromycin-Grundgerüst aus Acetat- und Propionateinheiten zusammensetzt (Abbildung 5-1).

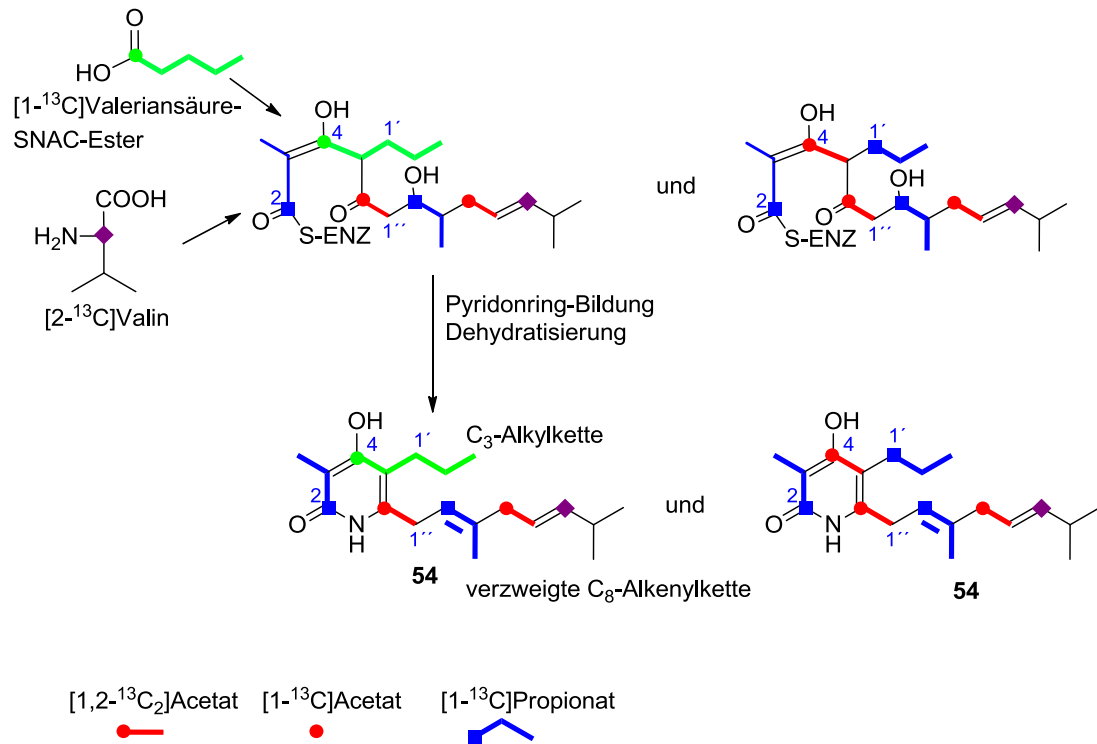


Abbildung 5-1: Biogenese-Schema für das Iromycin A (**54**).

In den Polyketidstoffwechselwegen, wie sie hier vorliegen, werden die Acetat- und Propionatbausteine durch Malonat- bzw. Methylmalonateinheiten gebildet. Dies geschieht analog zur Fettsäure-Biosynthese.^[7] Ein Vergleich dazu ist in Kapitel A 1 (S. 13–15) beschrieben. Es liegt hier mit hoher Wahrscheinlichkeit eine PKS I vor. Die Starteinheit der einzelnen Iromycine ist unterschiedlich. Bei Iromycin A (**54**) und B (**55**) handelt es sich um eine Isobutyrateinheit, welche durch Transaminierung aus *L*-Valin (**63**) entsteht (Abbildung 5-2).^[104] Bei den Iromycinen C (**59**) und D (**60**) tritt als Starteinheit eine Propionatgruppierung auf. Es konnte festgestellt werden, dass *L*-Leucin (**64**) zu Isovaleryl-CoA umgeformt wird und somit als Starteinheit in der Myxothiazol (**5**)-Biosynthese zur Verfügung steht.

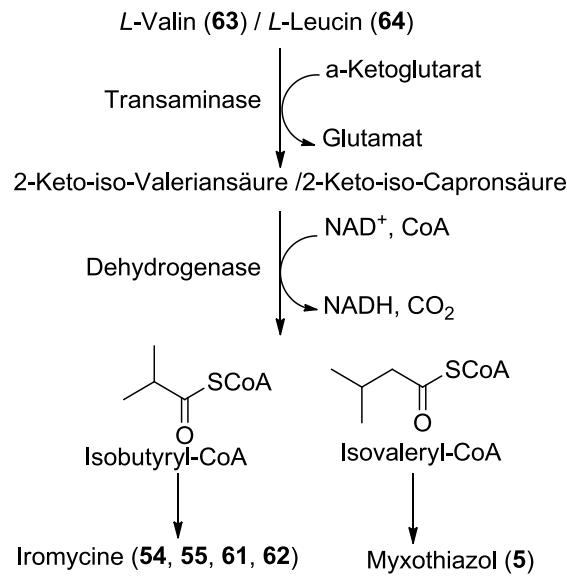


Abbildung 5-2: *L*-Valin (63) und *L*-Leucin (64) als Starteinheiten der Iromycine (54, 55, 61, 62) und Myxothiazol (5).^[104]

Durch die Aufklärung der Biogenese der Iromycine (54, 55, 59–62) wurde ein Biosyntheseweg postuliert (Abbildung 5-3). Es wird angenommen, dass es sich um eine PKS I handelt. Der Biosynthesegencluster konnte bisher noch nicht identifiziert werden, so dass noch keine Bestätigung dieser Hypothese vorliegt. Dadurch sind auch die Proteine, die an der Biosynthese beteiligt sind, noch unbekannt. Interessanterweise werden bei Modul 4 (Abbildung 5-3) sowohl ein Malonyl- als auch ein Methylmalonyl-CoA Baustein eingebaut.

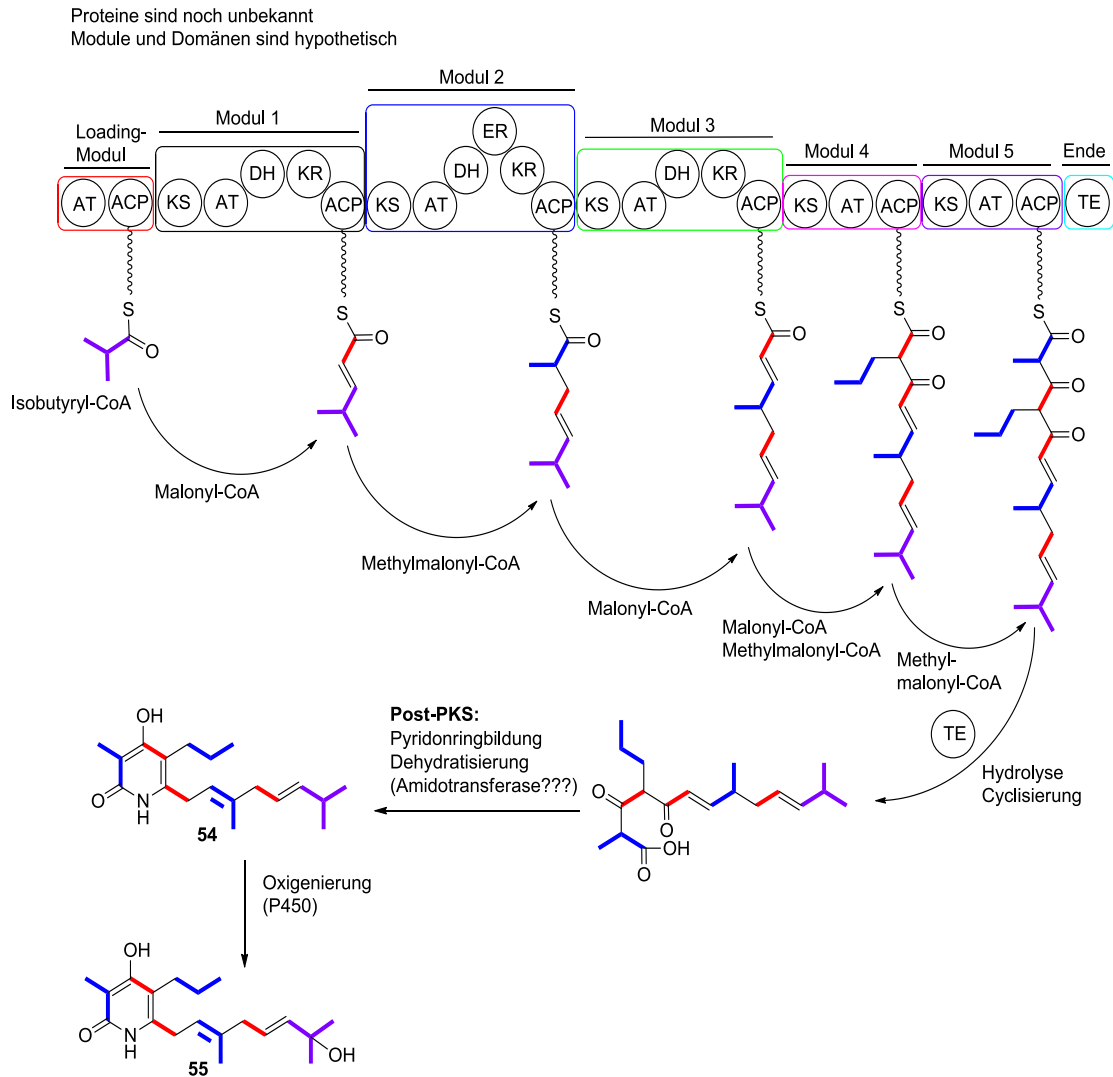


Abbildung 5-3: Abbildung der Hypothese zur Iromycin (**54**, **55**)-Biosynthese von Iromycin A (**54**) und B (**55**). AT = Acyltransferase; ACP = Acyl-Carrier-Protein; KS = Ketosynthase; DH = Dehydratase; KR = Ketoreduktase; ER = Enoylreduktase; TE = Thioesterase; P450 = P450 abhängige Monooxygenase. **Lila:** L-Valin (**63**); **Rot:** Acetat; **Blau:** Propionat.

Vorarbeiten zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese

Im Rahmen der Vorläufer-dirigierten Biosynthese wurde die Substratspezifität der PKS der Iromycin-Biosynthese überprüft. Dazu wurden Fütterungsexperimente sowohl in Schüttelkolben als auch im Fermenter durchgeführt (Tabelle 5-1). Es wurden 5-Chlorvaleriansäure-SNAC-Ester (**65**), *trans*-2-Hexensäure-SNAC-Ester (**66**), 2-Methylbuttersäure-SNAC-Ester (**67**), [1-¹³C]-Valeriansäure-SNAC-Ester (**68**), *n*-Hexensäure-

SNAC-Ester (**69**), 5-Fluor-valeriansäure-SNAC-Ester (**70**), *L-tert*-Leucin (**71**) und *L*-Leucin (**64**) gefüttert (Abbildung 5-4, Tabelle 5-1).^[96, 102]

Tabelle 5-1: Eigene Vorarbeiten zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese in Schüttelkolben und im Fermenter.^[96]

Substanzname	Molmasse [g/mol]	Fütterungskonzentration*	Fermentationsvolumen [mL]
<i>L</i> -Leucin (64) ^[96]	131.2	7.3 mM	2 × 200
<i>L-tert</i> -Leucin (71) ^[96]	131.2	7.3 mM	2 × 200
<i>L-tert</i> -Leucin (71) ^[96]	131.2	10.1 mM	1 × 200
<i>n</i> -Hexansäure-SNAC-Ester (69) ^[96]	217.3	6.8 mM	2 × 200
5-Fluor- <i>n</i> -Valeriansäure-SNAC-Ester (70) ^[96]	221.3	6.8 mM	800

$$* \left[c \right] = \frac{\text{Einwaage [mmol]}}{1 \text{ L Nährlösung}}$$

Bei den veresterten Carbonsäuren (**65–70**) konnte lediglich ein Einbau von **67** und **68** identifiziert werden, wodurch Iromycin A (**54**) aufgebaut wurde (Abbildung 5-1). Dabei wurde **67** in die verzweigte C₈-Alkenylseitenkette und **68** in die C₃-Alkylkette des Iromycin-Grundgerüsts eingebaut. Trotz der Ähnlichkeit der anderen Substrate, konnten keine Derivate erzeugt werden. Diese Resultate sprechen für eine hohe Substratspezifität. Aus diesen Fütterungsergebnissen geht hervor, dass die C₃-Seitenkette nicht nur durch ein Acetat- und ein Propionatbaustein, sondern auch durch ein Pentanoat-Extender aufgebaut werden kann (Abbildung 5-1).

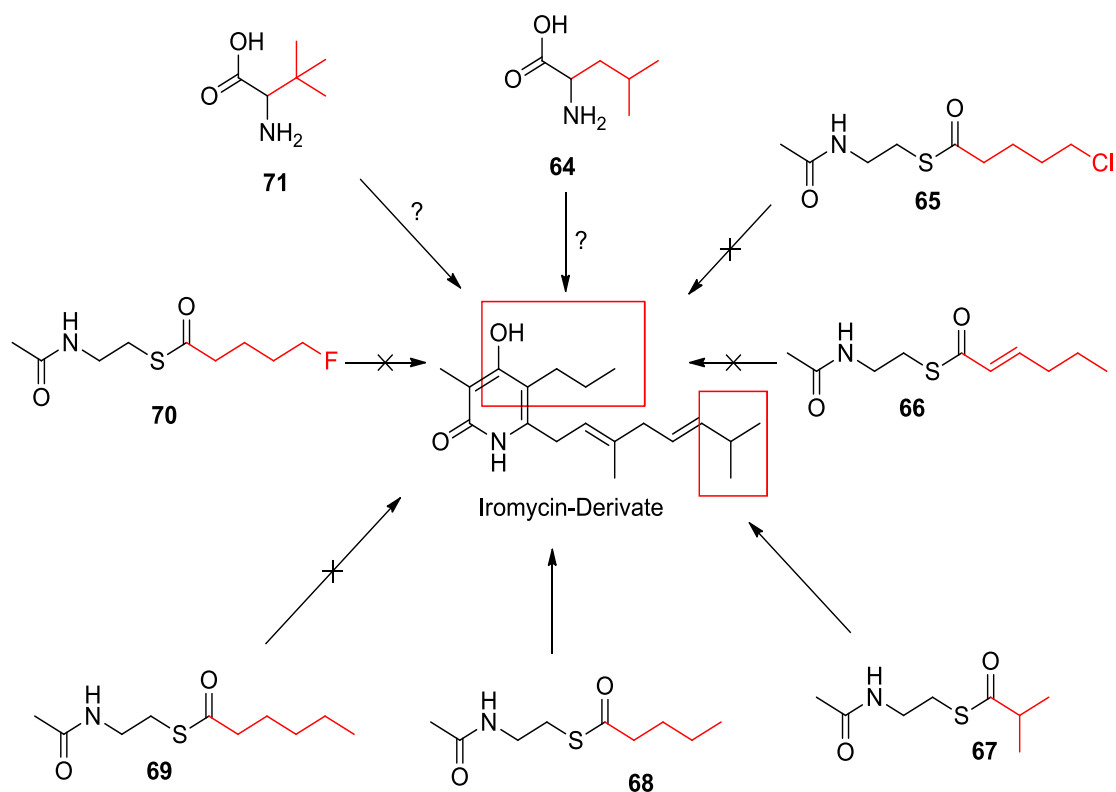
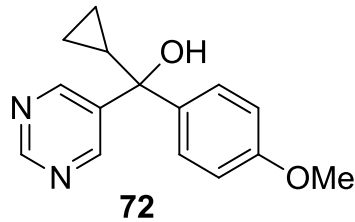


Abbildung 5-4: Durchgeführte Fütterungsexperimente von Vorgängern im Rahmen der Vorläufer-dirigierten Biosynthese zur Derivatisierung in der C₃- und der C₈-Kette der Iromycin.^[96, 102]

Bei den beiden Aminosäuren (**64**, **71**) konnte in der LC-MS ein Metabolit mit $m/z = 317$ $[M+H]^+$ detektiert werden.^[96] Wenn ein Einbau resultiert, ist bei beiden neu erzeugten Derivaten dieselbe Molmasse zu erwarten. Allerdings waren die Mengen zu gering, sodass keine Isolierung stattfinden konnte.

P450-abhängige Monooxygenasen sind in der Lage ein sp^3 -Zentrum zu hydroxylieren.^[105] Eine Hydroxylierung dieser Art findet von Iromycin A (**54**) zu B (**55**) statt (Abbildung 5-3). Um zu überprüfen, ob **55** mittels einer P450-abhängigen Monooxygenase oxidiert wird, wurde ein weiteres Fütterungsexperiment mit Ancymidol (**72**) durchgeführt. Bei **72** handelt es sich um einen Inhibitor von P450-Enzymen.^[102]



Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion von **55** deutlich reduziert (ohne **72**: 3.2 mg/L; mit **72** (300 mg/L): 2.0 mg/L) werden konnte, während bei der Zugabe von **72** ein deutlicher Anstieg von **54** (ohne **72**: 1.3 mg/L; mit **72** (300 mg/L): 21.0 mg/L) zu verzeichnen war.^[102] Dieses Ergebnis lieferte einen deutlichen Hinweis darauf, dass **55** über eine P450 Monooxygenase von **54** oxidiert wird (Abbildung 5-3).

Weiterhin wurden Untersuchungen zur Bestimmung der Stickstoffquelle durchgeführt. Gefüttert wurden stickstoffmarkiertes Ammoniumsulfat ($^{15}\text{NH}_4$)₂SO₄ und Natriumnitrat (Na¹⁵NO₃).^[102] Durch die Fütterung von ($^{15}\text{NH}_4$)₂SO₄ konnte im Gegensatz zu dem Na¹⁵NO₃ ein Einbau als wahrscheinliche Post-PKS Modifikation identifiziert werden. Daher wird vermutet, dass der ungewöhnliche Pyridonring durch Verbindungen aus dem Ammoniumpool aufgebaut wird. Allerdings ist auch Glutamin oder ein direkter Abkömmling davon denkbar.^[102] Auch wenn diese Vermutung besteht, konnte die genaue Stickstoffquelle der Iromycin-Familie bisher nicht identifiziert oder bestätigt werden.

Interessant ist ein Vergleich der Iromycine (**54**, **55**) zu dem in den Arbeitsgruppen von W. WOHLLEBEN und T. WEBER (Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen, IMIT) bearbeitetem Naturstoff Kirromycin (**73**). **73** beinhaltet genau wie die Iromycine (**54**, **55**, **59**, **60**) einen Pyridonring. Es wurde herausgefunden, dass hier die Stickstoffquelle des Pyridonringes das β -Alanin (**74**) ist, welches durch die Decarboxylierung von Aspartat (**75**) gebildet wird (Abbildung 5-5). Diese Beobachtung konnte durch Fütterungsexperimente mit markierten Vorläufern bestätigt werden.^[106, 107] Das β -Alanin (**74**) kommt im Allgemeinen aus dem Primärstoffwechsel und dient als Vorläufer von Vitamin B₅ (Pantothenat, Abbildung 1-2), dem Co-Enzym A (**8**, Abbildung 1-2) und dem Phosphopantethein (Abbildung 1-2).^[108] Daher

gilt es zu prüfen, ob das Aspartat auch im Falle der Iromycine als Stickstoffquelle dient oder nicht.

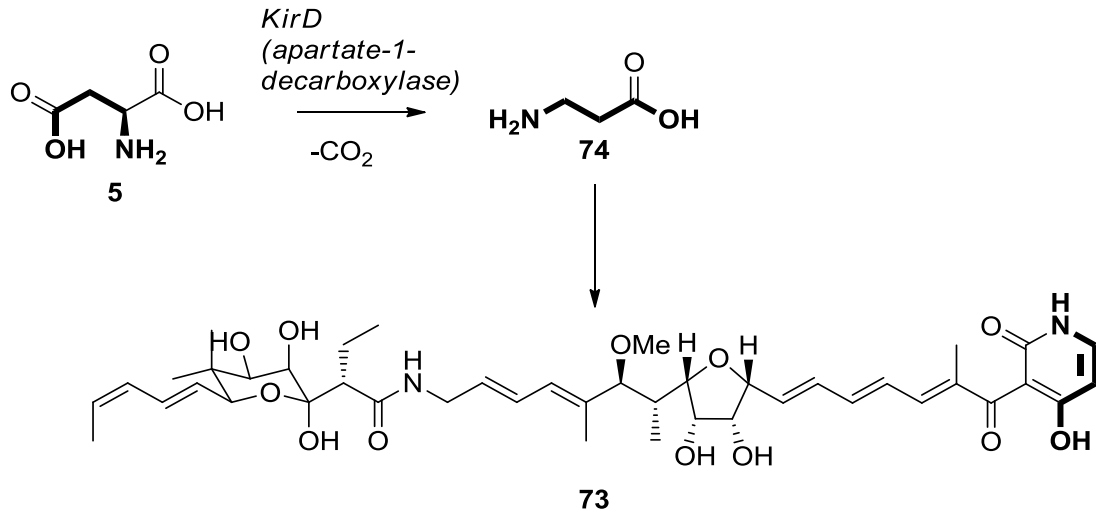


Abbildung 5-5: Aufbau des Pyridonrings von Kirromycin (**73**) durch Decarboxylierung von Aspartat (**75**) über β -Alanin (**74**).

6 Mikrobielle Polyketide aus *Streptomyces bottropensis* Dra17

6.1 Kultivierung und chemische Analytik

Die Stammhaltung erfolgte auf Agarplatten mit dem Medium M2⁺ (Malzextrakt, Hefeextrakt, Glucose, CaCO₃). Der Stamm *Streptomyces bottropensis* Dra17 wurde bis zur Ausbildung einer geschlossenen hellgrauen Sporenschicht inkubiert. Zum Kultivieren einer Flüssigkultur wurde eine Vorkultur mit dem Medium SGG (Glucose, Glycerin, Stärke, Caseinpepton, CaCO₃, Cornsteep Powder, Hefeextrakt, NaCl) in Schüttelkolben angesetzt. Die Vorkulturen wurden für 48 h bei 28 °C inkubiert. Für die Hauptkultur wurde Medium S (Stärke, Glycerin, Caseinpepton, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Leberextrakt, NaCl) verwendet, da hier nur die Iromycine (**54, 55, 59-62**) und nicht die Thaxthomine (**57, 58**) produziert wurden. Die Kultivierung fand sowohl in Schüttelkolben als auch in Rührkesselfermentern statt.

Nach der Ernte der Kulturbrühe erfolgte eine Trennung von Mycel und Kulturfiltrat. Anschließend wurde das Mycel mit einem Aceton/MeOH-Gemisch (7:3) im Ultraschallbad aufgeschlossen. Das Kulturfiltrat wurde auf einen pH-Wert von 5.0–6.0 mit 1.0 N HCl eingestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Das Metabolitenspektrum der Rohprodukte wurde mittels HPLC-MS (Säule: 1; Programm: A-01) und dünnschichtchromatographisch analysiert. Durch Anisaldehyd und im UV (256 und 366 nm) konnten die Iromycine sichtbar gemacht werden. Die nicht hydroxylierten Iromycine (**54, 59, 76, 77**) färbten violett während hydroxylierte Iromycine (**55, 60, 78**) eine blaue Färbung annahmen.

Die HPLC-MS-Analytik stellt in dieser Arbeit eine der wichtigsten analytischen Methoden dar, um den Erfolg einer Fermentation hinsichtlich der Iromycinproduktion zu überprüfen (Tabelle 6-1). Die Iromycine E (**61**) und F (**62**) wurden als Nebenkomponenten nur in sehr geringen Mengen produziert und meistens nicht beobachtet.

Nach Überprüfung der Rohprodukte auf Iromycingehalt wurden diese durch Säulenchromatographie mittels verschiedener Materialien gereinigt. Die Aufarbeitung der Iromycine wurde mehrfach zu optimieren versucht. Aus diesem Grund existieren drei Varianten, um eine Isolierung zu gewährleisten.

Variante 1: Zunächst erfolgt eine Auftrennung an Kieselgel mit dem Eluenten $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1. Iromycin A (**54**) und seine Derivate können sehr gut von Iromycin B (**55**) und seinen Derivaten abgetrennt werden. Gleichzeitig wird der Extrakt entfettet. Nachfolgend werden Iromycin A (**54**) und dessen Derivate an RP-Kieselgel mit einem Aceton/Wasser-Gemisch (3:1) getrennt. Iromycin B (**55**) und dessen Derivate benötigen stattdessen zur Isolierung Methanol/Wasser 7:3. Den letzten Schritt bildet die Reinstoffisolierung mittels HPLC (Iromycin A (**54**) und Derivate: Säule: 14; Programm: S-03; Iromycin B (**55**), und Derivate: Säule: 13; Programm: S-05).

Variante 2: Die Rohprodukte werden über eine Sephadex LH-20 (Methanol) säulenchromatographisch getrennt. Im Anschluss erfolgen die Schritte aus **Variante 1**.

Variante 3: Die Rohprodukte werden über eine Sephadex LH-20 (Methanol) säulenchromatographisch getrennt, mit anschließender Aufreinigung an der HPLC (Iromycin A (**54**) und Derivate: Säule: 14; Programm: S-03; Iromycin B (**55**) und Derivate: Säule: 13; Programm: S-05).

Problematisch bei der **Variante 1** war, dass trotz der Säulenchromatographie immer noch Fette in der Probe vorhanden waren, auch nach der HPLC. Die Iromycine besitzen eine lange unpolare Seitenkette. Mit dieser können durch Van-der-Waals-Wechselwirkung Fette interagieren. Dadurch ist eine Abtrennung nicht möglich.

Variante 2 zeigt die beste Aufarbeitung. Durch die Verwendung von Sephadex LH-20 (Methanol) werden die zuvor beschriebenen Fette abgetrennt und alle Iromycine in einer Fraktion vereinigt, weil diese annähernd die gleiche Größe besitzen. Die folgenden Schritte (**Variante 1**) ermöglichen die Trennung der nicht hydroxylierten (**54**, **59**, **76**, **77**) von den hydroxylierten (**55**, **60**, **78**) Iromycinen, um eine Reinstoffisolierung mittels HPLC gewährleisten zu können. Problematisch zeigte sich bei **Variante 3** die Trennung an der HPLC, da sowohl die nicht hydroxylierten (**54**, **59**, **76**, **77**) als auch die

hydroxylierten (**55**, **60**, **78**) Iromycine in der Probe vorhanden waren und diese sich durch ein deutlich unterschiedliches Laufverhalten unterscheiden. Dennoch ist es gelungen eine Isolierung von **79** (Kapitel A 6.4, S. 78) zu erreichen.

Tabelle 6-1: Isolierte Iromycine (**54**, **55**, **59**, **60**, **76–79**) und das Laufverhalten in der LC-MS mit dem LC-MS-Standard-Gradienten.

Substanz	Molmasse [g/mol]	R _t [min]	Beobachtete Ionen	Ausbeute [mg]
Iromycin A (54)	303.45	26.6	[M+H] ⁺ , [2M+H] ⁺ , [M-H] ⁻	5.5
Iromycin B (55)	319.45	23.6	[M+H] ⁺ , [M+H-H ₂ O] ⁺ , [2M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ , [M-H] ⁻	6.2
Iromycin C (59)	289.42	26.1	[M+H] ⁺ , [2M+H] ⁺ , [M-H] ⁻	2.1
Iromycin D (60)	305.21	22.5	[M+H] ⁺	1.0
Iromycin S (76)	317.24	27.2	[M+H] ⁺	45.3
Iromycin G (77)	317.24	27.2	[M+H] ⁺ , [2M+H] ⁺ , [M-H] ⁻	9.2
Iromycin H (78)	333.47	23.2	[M+H] ⁺	4.7
Iromycin I (79)	335.44	21.1	[M+H] ⁺ , [M-H] ⁻	5.0

Mit Tabelle 6-1 wird außerdem auch das sehr ähnliche Laufverhalten gezeigt. Alle Iromycine differenzieren sich nur sechs Minuten von der Retentionszeit, obwohl ein unterschiedlicher Hydroxylierungsgrad vorliegt.

Schon aus dem Rohextrakt einer Kultivierung mit dem *Streptomyces bottropensis* Dra17 ist es möglich, die Iromycine A (**54**) und B (**55**) als Hauptkomponenten eindeutig mittels HPLC-MS zu identifizieren (Abbildung 6-1). Dabei weist das Iromycin A (**54**) eine Masse $m/z = 304$ [M+H]⁺ und 607 [2M+H]⁺ auf (Abbildung 6-1 D). Beim Iromycin B (**55**) werden Massenfragmente mit $m/z = 320$ [M+H]⁺ und 302 [M+H-H₂O]⁺ beobachtet (Abbildung 6-1 E).

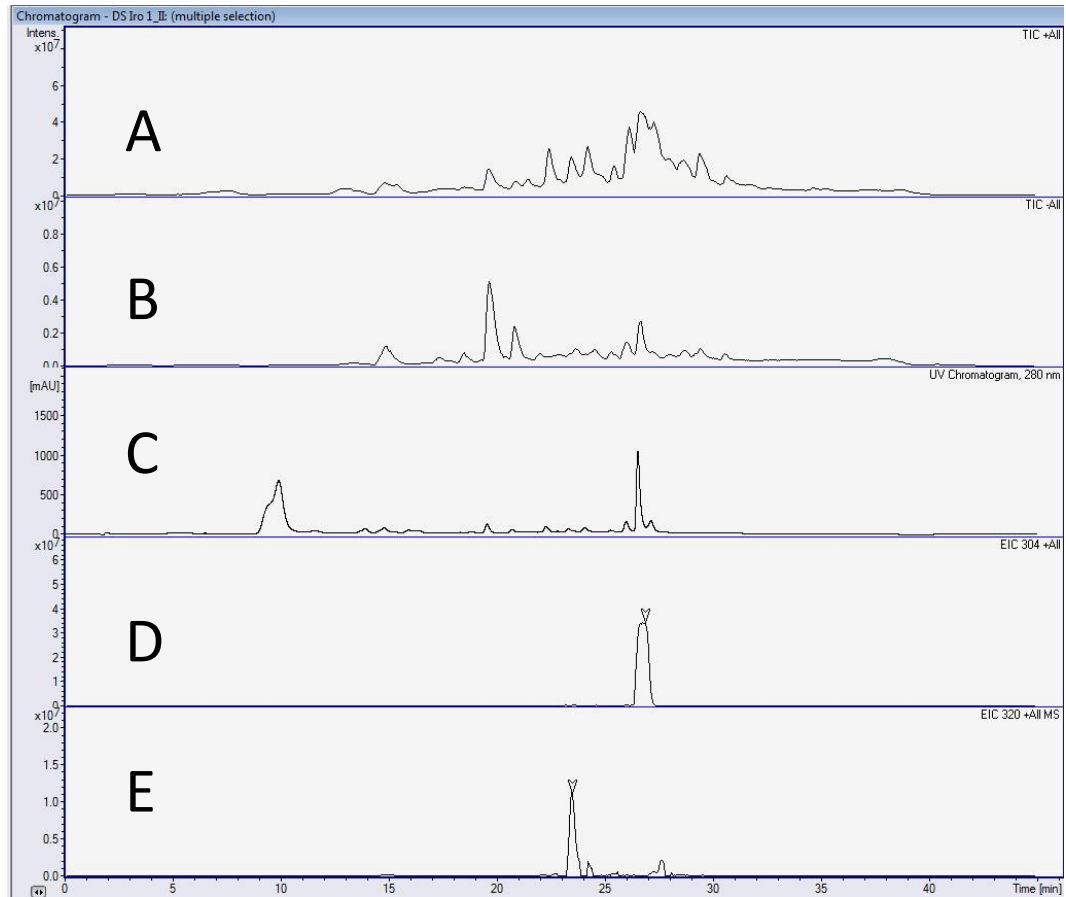


Abbildung 6-1: LC-MS-Chromatogramm eines Rohextraktes. **A**: Total Ion Chromatogramm (TIC positive Mode); **B**: TIC (negative Mode); **C**: UV-Spur 280 nm; **D**: Extraktion der Masse $m/z = 304$ (Iromycin A (**54**) $[M+H]^+$, $[2M+H]^+$) bei einer Retentionszeit von 26.6 Minuten, **E**: Extraktion der Masse $m/z = 320$ (Iromycin B (**55**) $[M+H]^+$) bei einer Retentionszeit von 23.6 Minuten.

In der vorliegenden Arbeit war es möglich, durch Verwendung einer Sephadex LH-20 (Methanol) zu zeigen, dass einige Fette nicht nach Polarität an Kieselgel sondern erst durch den Größenausschluss abgetrennt werden können. Dadurch ist die Reinstoffisolierung der Iromycinfamilie erst richtig gewährleistet. Weiterhin konnten vier neue Derivate (**76–79**) im Rahmen der Vorläufer-dirigierten Biosynthese generiert werden (Kapitel A 6.4).

6.2 Darstellung von SNAC-Estern für die Vorläufer-dirigierte Biosynthese

In früheren Arbeiten konnte durch Fütterung von ^{13}C -markierter Valeriansäure gezeigt werden, dass die C_3 -Seitenkette der Iromycine nicht nur durch eine Acetat- und eine Propionateinheit, sondern auch durch einen Pentanoatbaustein aufgebaut werden kann (Abbildung 5-1).^[102] Die Vorläufer-dirigierte Biosynthese, beschrieben in Kapitel A 3, ist eine sehr gut geeignete Methode, um die Substratspezifität der PKS zu überprüfen. Bei dieser Methode werden während der Kultivierung neue stammfremde, mögliche Vorläufermoleküle zu der Kulturbrühe hinzugegeben. Solche Fütterungen werden zum Beginn der Produktion des gewünschten Metaboliten durchgeführt. Hierbei muss stets darauf geachtet werden, dass die sterilen Bedingungen streng eingehalten werden. Bei diesen Fütterungsexperimenten mit dem Stamm *S. bottropensis* Dra17 werden überwiegend Aminosäuren und veresterte Carbonsäuren als mögliche Vorläufer verwendet. Bevorzugt sollen die Carbonsäuren chemisch-synthetisch zu *N*-Acetylcysteamin-thioestern (SNAC-Ester) derivatisiert werden (Abbildung 6-2).^[109, 110]

Diese Verbindungen zeigen eine höhere Membranpermeabilität und stellen ein Acetyl-CoA-Mimetikum dar.^[111] Mimetika sind als chemische Verbindungen definiert, die an gleiche Wirkorte wie die natürlichen Liganden, wie z.B. Proteine, binden. Hierbei ist die strukturelle Ähnlichkeit und vor allem die chemische Aktivität von Co-Enzym A (**8**) zu *N*-Acetylcysteamin (**80**) gegeben (Abbildung 6-3, blau hinterlegt), wodurch eine Nachahmung der natürlichen Derivate zur Umwandlung zum Acyl-Trägerprotein vollzogen wird.^[112] Deshalb laden SNAC-Ester vermehrt Carbonsäure-Vorläufer auf das PKS-System, die dort als an Enzym gebundene Thioester vorliegen.^[113]

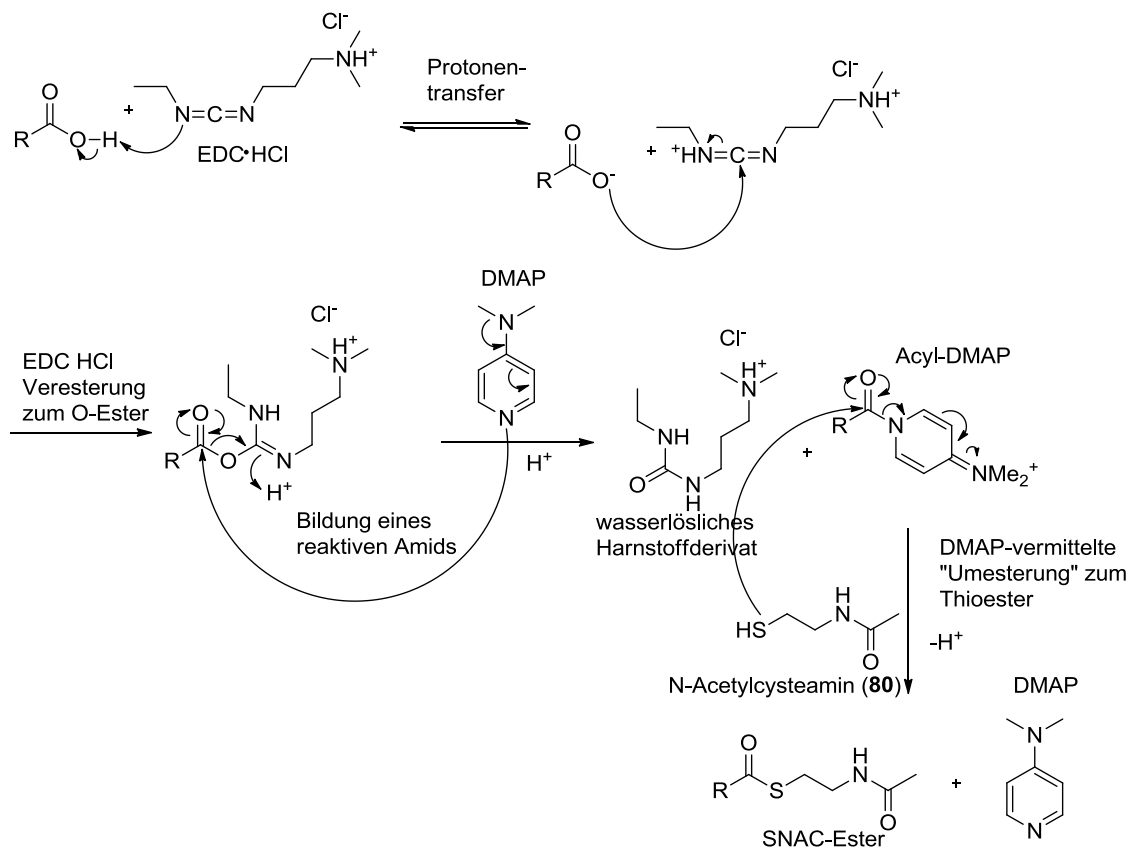


Abbildung 6-2: Allgemeiner Mechanismus zur Darstellung von SNAC-Estern.

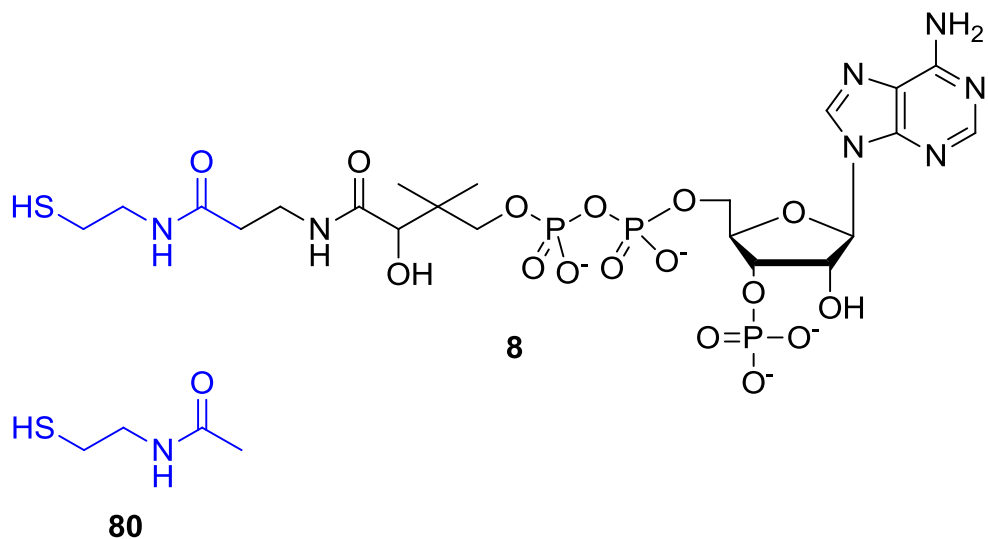


Abbildung 6-3: Strukturelle Ähnlichkeit von N-Acetylcysteamin (**80**) zum Co-Enzym A (**8**).

Die Nachahmung des Co-Enzyms A (**8**, Abbildung 1-2) soll im Rahmen dieser Arbeit zu einer verbesserten Beladung der PKS und damit zu einem erhöhten Einbau führen. Alle

Reaktionen von Carbonsäuren zu den SNAC-Estern wurden unter strikt trockenen Bedingungen, d.h. unter Argonatmosphäre und unter Verwendung trockener Lösungsmittel durchgeführt (Abbildung 6-4).

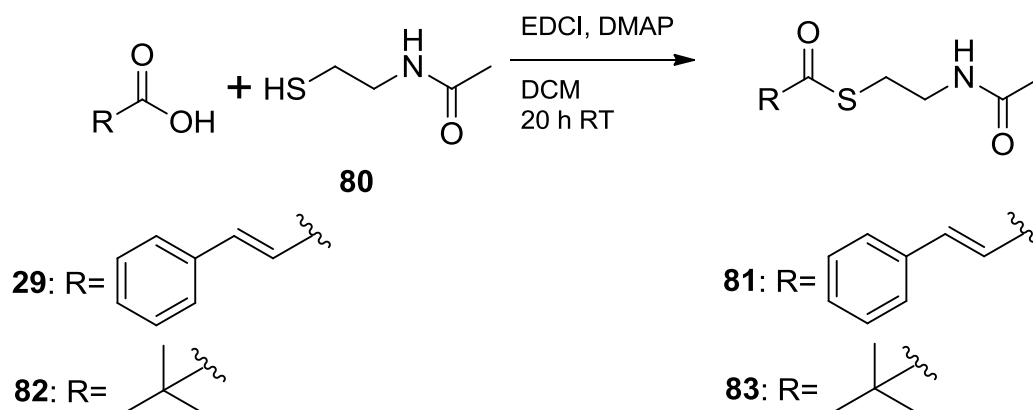


Abbildung 6-4: Allgemeine Darstellung der SNAC-Ester.

Bei der Synthese wurden Zimtsäure (**29**) oder Pivalinsäure (**82**) und DMAP in Dichlormethan vorgelegt und unter Eisbadkühlung EDCI hinzugegeben. Nach 1 h Rühren bei 0 °C wurde das *N*-Acetylcysteamin (**80**) hinzugefügt, auf Raumtemperatur erwärmt und dann 20 h gerührt. Eine Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel.

Tabelle 6-2: Dargestellte SNAC-Ester (**81**, **83**).

Produkt	Ausbeute
Zimtsäure-SNAC-Ester (81)	29 %
Pivalinsäure-SNAC-Ester (83)	54 %

Darstellung von Zimtsäure-SNAC-Ester (81)

81 wurde mit einer Ausbeute von 29 % durch chromatographische Aufreinigung an Kieselgel mit Chloroform/Methanol 9:1 erhalten. Die Charakterisierung erfolgte mittels $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 . Charakteristische Signale im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum sind die Amidbindung ($\delta_{\text{C}} = 170.5$ ppm) und die Thioestergruppe ($\delta_{\text{C}} = 190.1$ ppm) des *N*-Acetylcysteaminrestes. Im Protonenspektrum konnten die Protonen der

trans-Doppelbindung bei $\delta_{\text{H}} = 6.73$ und 7.63 ppm mit einer Kopplungskonstante von 15.9 Hz und die aromatischen Protonen im Bereich von $\delta_{\text{H}} = 7.39$ bis 7.56 ppm eindeutig bestimmt werden. Weitere charakteristische Merkmale der SNAC-Ester sind die freie Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.98$, $\delta_{\text{C}} = 23.6$ ppm) sowie die beiden Methylengruppen zwischen dem Stickstoffatom und dem Schwefelatom ($\delta_{\text{H}} = 3.17$ und 3.51 ppm).

Darstellung von Pivalinsäure-SNAC-Ester (83)

83 wurde mit einer Ausbeute von 54% durch chromatographische Aufreinigung an Kieselgel mit Chloroform/Methanol $85:15$ erhalten. Die Charakterisierung erfolgte mittels $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 . Charakteristische Signale im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum sind die Amidbindung ($\delta_{\text{C}} = 177.3$ ppm) und die Thioestergruppe ($\delta_{\text{C}} = 207.6$ ppm) des *N*-Acetylcysteaminrestes. Im Protonenspektrum konnten die Protonen der *tert*-Butylgruppe eindeutig bei $\delta_{\text{H}} = 1.21$ ppm mit einem Integral von neun Protonen bestimmt werden. Die weiteren Protonen und Kohlenstoffatome wurden durch den Vergleich der NMR-Daten von **81** relativ schnell identifiziert.

6.3 Vorläufer-dirigierte Biosynthese am Beispiel der Iromycine

Bei der Iromycin-Familie gibt es zwei denkbare Möglichkeiten, durch Vorläufer-dirigierte Biosynthese neue Derivate zu generieren und somit einen Eingriff in die Biosynthese vorzunehmen. Möglich ist ein Einbau in die C_3 -Alkylseitenkette oder in die lange, verzweigte C_8 -Alkenylkette.

Ein Einbau in die C_8 -Kette würde bedeuten, dass eine Veränderung der Starteinheit vorliegt. Im Normalfall ist die Starteinheit für Iromycin A (**54**) und B (**55**) *L*-Valin (**63**), also formal ein Isobutyrat, und bei Iromycin C (**59**) und D (**60**) ein Propionat-Baustein, wie in Kapitel A 5 (S. 52) beschrieben. Wie die Aminosäure *L*-Valin (**63**) in der Natur in Isobutyryl-CoA umgewandelt wird, damit es als Carbonsäurebaustein verwendet werden kann, wurde schon beschrieben (Abbildung 5-2).

Fütterung von ausgewählten Substanzen

In dieser Arbeit wurde versucht, durch Zufütterung verschiedener veresterter Carbonsäuren, aber auch Aminosäuren, eine Derivatisierung des Iromycin-Grundgerüsts zu erhalten. Die Aminosäuren wurden unverändert zugefüttert; sie mussten lediglich gelöst und der pH-Wert der Fütterungslösung auf pH 7.0 eingestellt werden. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 1.0 N HCl- bzw. 1.0 N NaOH-Lösung. Im Organismus bzw. in den Zellen existieren Transportsysteme für Aminosäuren. Aus diesem Grund musste an dieser Stelle keine Derivatisierung erfolgen, da die Aminosäuren die Membran über die vorhandenen Transporter passieren können. In der Zelle kommt es zu Transaminierungsreaktionen, so dass die Aminosäuren hier als mögliche Biosynthese-Vorläufer vorliegen (Abbildung 5-2). Bei diesen Fütterungsexperimenten wurden sowohl Fermenter als auch Schüttelkolben eingesetzt. Um Stress auf die Bakterien auszuüben und zu erhöhen, wurden die Fütterungen mit 7.1-7.3 mM Lösungen im Fermentationsmedium durchgeführt. Gefüttert wurden Zimtsäure-SNAC-Ester (**81**), Pivalinsäure-SNAC-Ester (**83**) und *L*-Isoleucin (**84**) (Abbildung 6-5, Tabelle 6-3). Aus diesen Fütterungen wurde versucht, die C₈-Alkenylkette des Iromycin-Grundgerüsts zu verändern, indem die Starteinheit ausgetauscht wird.

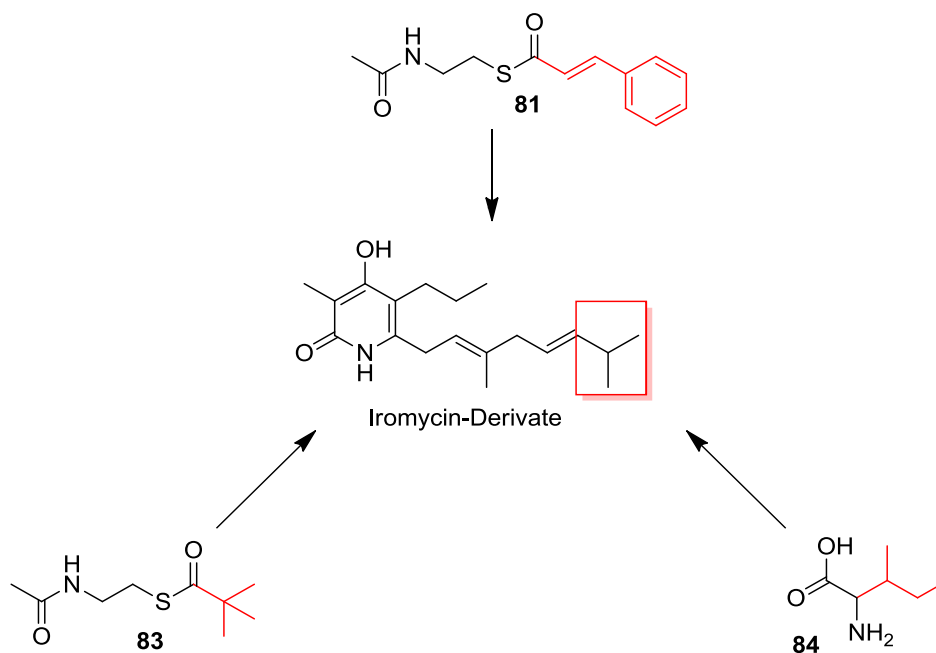

 Abbildung 6-5: Mögliche Ideen zur Derivatisierung in der verzweigten C₈-Kette der Iromycine.^[70]

Tabelle 6-3: Vorläufer-dirigierte Biosynthese im Fermenter und in Schüttelkolben.

Substanzname	Molmasse [g/mol]	Fütterungsendkonzentration	Fermentationsvolumen [mL]
Zimtsäure-SNAC-Ester (81)	249.3	7.3 mM	2 × 250
Pivalinsäure-SNAC-Ester (83)	203.3	7.1 mM 7.24 mM	800 4000
L-Isoleucin (84)	131.2	7.3 mM 7.3 mM	2000 4000

Im Schüttelkolben erfolgten die Kultivierungen mit einem Volumen von 500 mL. Das verwendete Medium der Hauptkultur war Medium S (Stärke, Glycerin, Caseinpepton, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Leberextrakt, NaCl). Die Hauptkultur wurde für 72 h inkubiert. Die Vorläufer wurden für die Kultivierungsexperimente jeweils in 10 mL sterilem, bidestilliertem Wasser gelöst und mit 1 mL steril filtriertem DMSO verdünnt, um eine bessere Membranpermeabilität zu ermöglichen. Diese Fütterungslösungen wurden steril filtriert. Die Fütterungen erfolgten jeweils in zwei Schritten à 5.5 mL nach der 24. und 36. Stunde der Kultivierung. Nach Ende der Kultivierung folgte eine standardisierte Aufarbeitung mit anschließender Dünnschichtchromatographie

(Kieselgel, Chloroform/Methanol 9:1) und HPLC-MS-Analyse der einzelnen Rohextrakte (Mycel und Kulturfiltrat).

Fütterungsexperimente im Fermenter (Biostat-B-Fermenter) wurden in einem Volumen von zwei oder vier Litern durchgeführt. Vor dem Start der Kultivierung erfolgte die Zugabe von ca. 1 mL einer Niox-Lösung (Anti-Schaum). Der pH-Wert wurde während der Kultivierung bei einem pH-Wert zwischen 5.5 und 7.5 gehalten (pH-Sperre). Die Vorläufermoleküle wurden für die Fütterung in 40–50 mL sterilem, bidestilliertem Wasser gelöst und mit 2–3 mL unsterilem DMSO verdünnt. Bei der Kultivierung im Fermenter wurde die Lösung des jeweiligen Vorläufers mittels einer Schlauchdosierpumpe ab der 24. Stunde der Kultivierung für einen Zeitraum von 12–18 h zugefüttert. Zum Erntezeitpunkt hatte die Kulturbrühe eine braune Färbung und wies einen pH-Wert von 7.5–7.7 auf. An die Standardaufarbeitung schloss sich die Analyse der Rohextrakte (Mycel und Kulturfiltrat) per Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Chloroform/Methanol 9:1) und LC-MS-UV-Analytik an.

6.4 Ergebnisse der durchgeführten Fütterungsexperimente

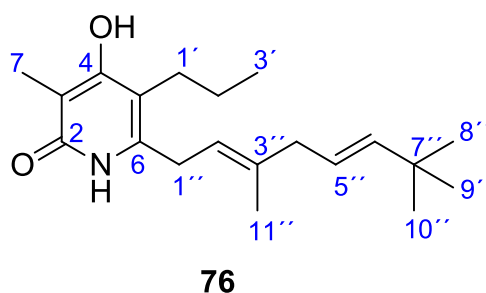
Fütterung von Zimtsäure-SNAC-Ester (81)

Es wurde eine Kultivierung durchgeführt, wo eine Fütterung von Zimtsäure-SNAC-Ester (**81**, Tabelle 6-3) stattfand. Nach der Kultivierung erfolgte eine Trennung des Rohproduktes an Sephadex LH-20 (Methanol) mit dünnschichtchromatographischer Kontrolle und anschließender HPLC-MS-Untersuchung. Es konnten keine Hinweise auf neue Derivate gefunden werden, daher wurde auf eine weitere Aureinigung verzichtet.

Am Beispiel von diesem Fütterungsexperiment konnte im Rahmen der Vorläufer-dirigierten Biosynthese kein neues Iromycin-Derivat erzeugt werden. Zimtsäure-SNAC-Ester (**81**) wird also weder von dem Loading Modul noch von den weiteren Modulen der PKS in der Iromycin-Biosynthese akzeptiert. Wenn eine breite Substratspezifität der PKS vorliegt und nicht-natürliche Vorläufer mit in das Grundgerüst der Iromycine eingebaut werden, ist **81** wahrscheinlich zu groß, um hier zum Erfolg zu führen.

Iromycin S (76)

Es wurde eine Kultivierung durchgeführt, wo eine Fütterung von Pivalinsäure-SNAC-Ester (**83**, Tabelle 6-3) stattfand. Die Aufarbeitung erfolgte über eine RP-18 Säule (Lobar C; Aceton/Wasser 3:1). Durch eine Flussrate von 0.1 bis 0.2 mL/min konnten 45.3 mg leicht verunreinigt isoliert werden. Mittels LC-MS-UV-Analyse wurde der Myceleextrakt untersucht und es konnte eine Molmasse von 317 g/mol bei einer Retentionszeit (R_t) von 27.2 Minuten und einem Fragment von $m/z = 318 [M+H]^+$ abgeleitet werden. Der Massenunterschied zu Iromycin A (**54**) beträgt lediglich 14. Das spricht für den Einbau einer Methylengruppe in das Grundgerüst der Iromycine. Diese farblose Substanz zeigte ein ähnliches chemisches Verhalten wie das Iromycin A (**54**). Durch einen Vergleich der NMR-Daten mit denen von Iromycin A (**54**) war es relativ schnell möglich, alle Signale zuzuordnen (Abbildung 6-6). In dem Bereich von $\delta_H = 5$ bis 5.5 ppm sind deutlich drei Signale zu sehen, die je mit einem Integral von einem Wasserstoffatom auf olefinische Protonen hindeuten. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den chemischen Verschiebungen von C-2'', C-5'' und C-6''. Den einzigen Unterschied zu **54** zeigt das Signal bei ca. $\delta_H = 1$ ppm. Dieses Signal weist ein Integral von neun Protonen auf, was auf eine *tert*-Butylgruppe hindeutet. Alle anderen angezeigten Signale waren identisch zu denen von **54**.



Durch dieses Fütterungsexperiment konnte gezeigt werden, dass die Starteinheit von Iromycin A (**54**) in der Biosynthese ausgetauscht wurde. In die verzweigte C₈-Alkenylseitenkette wurde so eine Methylengruppe mit eingebracht, woraus eine *tert*-Butylgruppe resultierte. Aus diesen Untersuchungen ergab sich die Struktur des Iromycin S (**76**) mit einer Ausbeute von 45.3 mg (leicht verunreinigt). Vor der

erfolgreichen Durchführung dieses Experimentes konnte Iromycin S (**76**) lediglich mittels Totalsynthese dargestellt werden.^[114] Demnach stellt die Vorläufer-dirigierte Biosynthese eine sehr gute und schnelle Methode dar, um **76** zu produzieren.

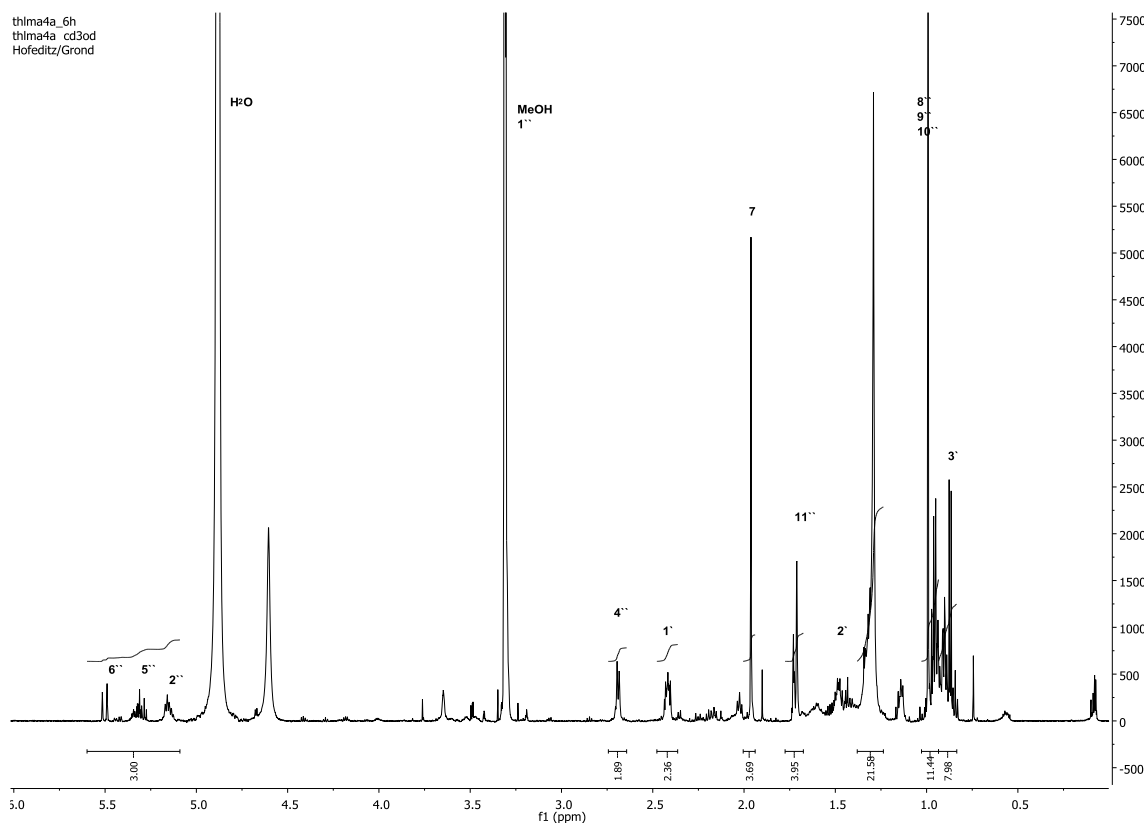


Abbildung 6-6: $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz) von Iromycin S (**76**).

Iromycin G (77)

Es wurde eine Kultivierung durchgeführt, wo eine Fütterung von *L*-Isoleucin (**84**, Tabelle 6-3) stattfand. Die Aufarbeitung erfolgte zunächst an Kieselgel (Chloroform/Methanol 9:1 \rightarrow 7:3). Im Anschluss wurde an RP-Kieselgel zweifach aufgereinigt (1. Aceton/Wasser 3:1; 2. Methanol/wasser 12:1), um an der HPLC die Reinstoffisolierung (Kapitel B 2.1.2) zu gewährleisten. Dadurch konnten 9.2 mg (leicht verunreinigt) aus vier Litern Kultur isoliert werden. Wie schon bei Iromycin S (**76**), konnte auch hier ein Metabolit mit einer Molmasse von 317 g/mol aus LC-MS-UV-Messungen nachgewiesen werden. Mit einer R_t von 27.2 Minuten ist dieser Metabolit nicht von **76** zu unterscheiden.

Der entscheidende Hinweis konnte erst mittels dünnschichtchromatographischer Überprüfung erhalten werden (Abbildung 6-7). Auf einem RP-DC (Aceton/Wasser 3:1) wurden Iromycin A (**54**), Iromycin C (**59**) und Iromycin S (**76**) sowie der Extrakt mit dem neuen Metaboliten aufgetragen. Folgende R_f -Werte wurden ermittelt: Iromycin A (**54**): 0.25; Iromycin C (**59**): 0.28; Iromycin S (**76**): 0.23 und der neue Metabolit (später Iromycin G (**77**)): 0.22. Das geringfügig andere Laufverhalten in Abbildung 6-7 ließ vermuten, dass es sich um eine andere Verbindung handeln könnte.

Iromycin A (**54**) und C (**59**) werden bereits aus dem Extrakt einer Standard-Fermentation immer beobachtet. Iromycin S (**76**) und G (**77**) wurden hier erst durch Experimente zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese aus verschiedenen Fütterungen erhalten (Tabelle 6-3). Mittels LC-MS-Analytik konnte keine Unterscheidung gemacht werden, lediglich dieser minimale Unterschied auf dem RP-DC ließ einen Unterschied vermuten.

Wie das Iromycin A (**54**) konnte auch das Iromycin G (**77**) aus dem Mycelextrakt einer Kultivierung mit einer Ausbeute von 9.2 mg (leicht verunreinigt) und einer Kulturgröße von vier Litern gewonnen werden.

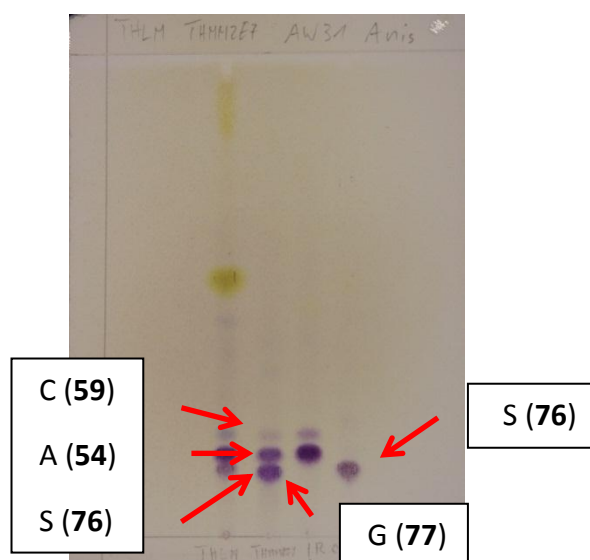
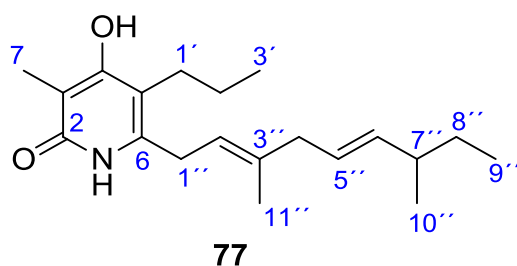


Abbildung 6-7: RP-DC-Platte. A: Iromycin A (**54**); C: Iromycin C (**59**); S: Iromycin S (**76**); G: Iromycin G (**77**).

Die Molmasse von 317 g/mol wurde durch ein ESI-MS (positiv mode: $[M+H]^+$ und $[2M+H]^+$; negativ mode: $[M-H]^-$) ermittelt. Durch ein HR-ESI-Experiment wurde die Summenformel von $C_{20}H_{29}NO_2$ errechnet. Das 1H -NMR-Spektrum (Abbildung 6-8) von Iromycin G (**77**) ist dem Spektrum von **54** sehr ähnlich. Die olefinischen Protonen, im Bereich $\delta_H = 5$ –5.5 ppm, sowie 1'-H, 3'-H, 1''-H und 6''-H waren unverändert im Vergleich zu Iromycin A (**54**). Es erscheint ein Multiplett mit $\delta_H = 1.22$ –1.34 ppm und einem Integral von zwei Wasserstoff-atomen, was bei **54** nicht zu sehen war. Bei 9''-H, $\delta_H = 0,84$ ppm, konnte deutlich ein Triplet und bei 7''-H, $\delta_H = 1.99$ ppm, ein Multiplett identifiziert werden. Diese Unterschiede im Vergleich zu **54** zeigen den Einbau einer zusätzlichen Methylengruppe (8''-H). Durch HMBC-Kreuzkopplungen zu C-6'' ($\delta_C = 139.4$ ppm), C-7'' ($\delta_C = 39.9$ ppm) und C-9'' ($\delta_C = 12.3$ ppm) konnte eine weitere Bestätigung für den Einbau von C-8'' gegeben werden. Durch den Vergleich der Spektren konnte gezeigt werden, dass es sich um das neue Mitglied Iromycin G (**77**) der Iromycinfamilie handelt. Durch dieses Fütterungsexperiment wurde die Starteinheit in der Biosynthese ausgetauscht. In die verzweigte C_8 -Kette wurde auf diese Weise zusätzlich eine Methylengruppe mit eingebracht. NMR- und MS-Experimente bestätigen diese neue Struktur, die in der Literatur noch nicht beschrieben ist.



Durch dieses Fütterungsexperiment von *L*-Isoleucin war es möglich 9.2 mg (leicht verunreinigt) von Iromycin G (**77**) zu isolieren. Es handelt sich um ein neues, unbeschriebenes Iromycin, welches durch die Methode der Vorläufer-dirigierten Biosynthese produziert wurde. Demnach zeigt das Loading-Modul eine breitere Substratspezifität, wodurch eine Veränderung der Starteinheit resultieren konnte. Dadurch war es möglich zu zeigen, dass die Methode der Vorläufer-dirigierten

Biosynthese eine sehr gute Möglichkeit darstellt, um neue Derivate von Naturstoffen zu erzeugen. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte noch keine biologische Testierung erfolgen, sodass über die mögliche Wirksamkeit von Iromycin G (**77**) keine Aussage getroffen werden kann.

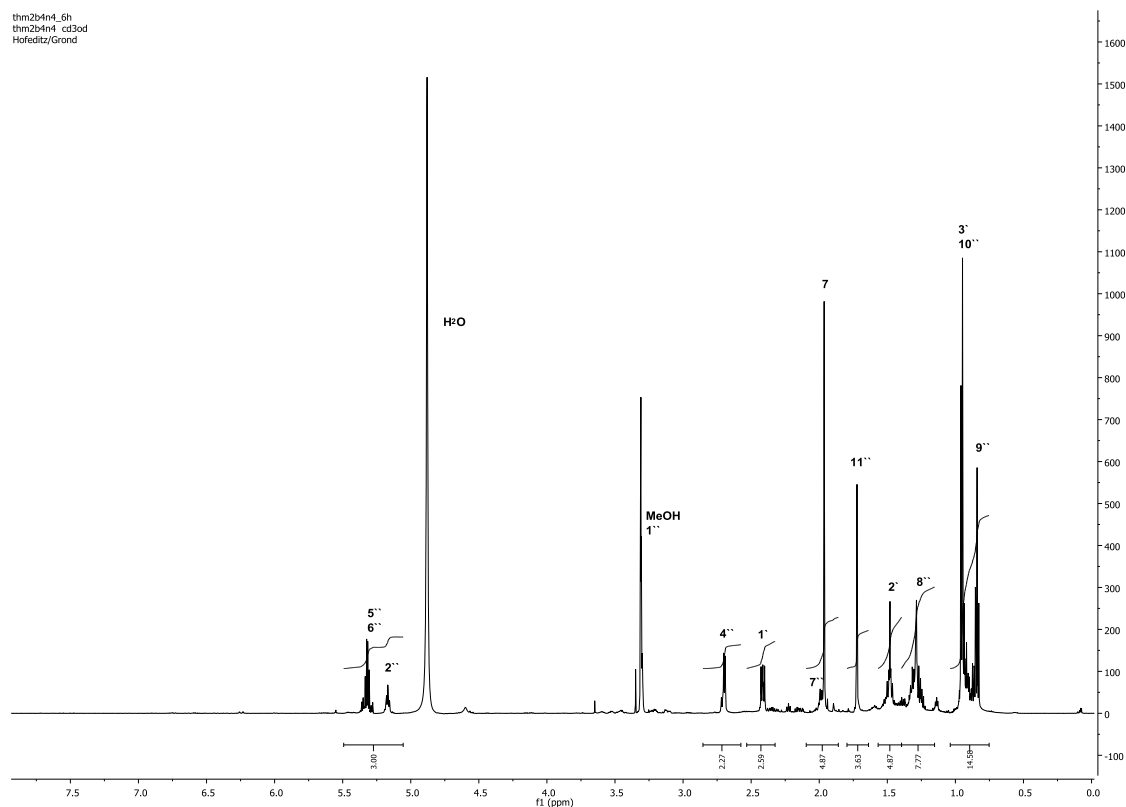
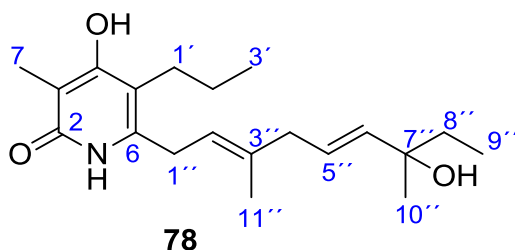


Abbildung 6-8: $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz) von Iromycin G (**77**).

Iromycin H (79)

Es wurde eine Kultivierung durchgeführt, wo eine Fütterung von *L*-Isoleucin (**84**, Tabelle 6-3) stattfand. Die Aufarbeitung erfolgte zunächst an Kieselgel (Chloroform/Methanol 9:1 \rightarrow 7:3). Im Anschluss wurde eine Trennung an RP-Kieselgel (Methanol/Wasser 8:2) durchgeführt. In LC-MS-Analysen wurde eine Molmasse von 333 g/mol mit einer R_t von 23.2 Minuten nachgewiesen (positive Mode: $[\text{M}+\text{H}]^+$). Mittels HR-ESI-MS-Experiment wurde die Summenformel von $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NO}_3$ ermittelt. Dieser Metabolit wurde genau wie das Iromycin B (**55**) aus dem Kulturfiltrat der Fermentation extrahiert und aufgereinigt. Das chemische Verhalten war ähnlich dem

von Iromycin B (**55**). Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 6-9) des hier neu isolierten Metaboliten, von Iromycin H (**78**), ist nahezu identisch mit dem von **55**. Die olefinischen Protonen, im Bereich $\delta_{\text{H}} = 5\text{--}5.5$ ppm, sowie $1'\text{-H}$, $3'\text{-H}$, $1''\text{-H}$ und $6''\text{-H}$ waren unverändert im Vergleich mit Iromycin B (**55**). Es erscheint ein Multiplett mit $\delta_{\text{H}} = 1.22\text{--}1.37$ ppm und einem Integral von zwei Wasserstoffatomen, was bei **55** nicht zu sehen war. Bei $9''\text{-H}$, $\delta_{\text{H}} = 0,82$ ppm, konnte deutlich ein Triplet identifiziert werden. Im Vergleich zu **77** konnte keine Kopplung im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zu $7''\text{-H}$ gesehen werden. Das deutet daraufhin, dass hier kein Proton vorhanden ist. Durch das HSQC-Experiment konnte dem C- $7''$ eine chemische Verschiebung von $\delta_{\text{C}} = 73.6$ ppm zugeordnet werden, was für eine Hydroxygruppe an C- $7''$ spricht.^[115] Diese Beobachtung konnte im Vergleich zu **55** bestätigt werden. Somit wurde durch den gezeigten Einbau einer zusätzlichen Methylengruppe ($8''\text{-H}$), eine in der Literatur noch nicht beschriebene Substanz erhalten und als ein Mitglied der Iromycinfamilie identifiziert. Diese Verbindung wurde als Iromycin H (**78**) bezeichnet. Damit wurde aus dem Fütterungsexperiment mit *L*-Isoleucin (**85**) ein zweiter Metabolit neben dem Iromycin G (**77**) analog zu Iromycin A (**54**) und B (**55**) als hydroxyliertes Derivat gewonnen und als Iromycin H (**78**) bezeichnet. Durch dieses Fütterungsexperiment war es gelungen, die Starteinheit in der Biosynthese auszutauschen. In die verzweigte C_8 -Kette wurde auf diese Weise eine zusätzliche Methylengruppe (C- $8''$) mit eingebracht.



Im Rahmen der Vorläufer-dirigierten Biosynthese wurde *L*-Isoleucin (**84**) gefüttert und es konnte Iromycin H (**78**) mit einer Ausbeute von 4.7 mg (leicht verunreinigt) aus zwei Litern Kultur isoliert werden. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass auch das hydroxylierte Derivat (**78**) von Iromycin G (**77**) analog zu den Iromycinen A (**54**) und

B (**55**) produziert werden kann. Wie schon durch die Iromycin G (**77**)-Produktion belegt wurde, besitzt das Loading Modul der PKS eine breitere Substratspezifität. Aber auch die P450-abhängige Monooxygenase, die für die Hydroxylierung an C-7'' verantwortlich ist (Abbildung 5-3), muss eine breitere Substratspezifität besitzen, da durch das C-9'' die Position der Hydroxylierung deutlich abgeschirmter ist.

Durch das Fütterungsexperiment mit *L*-Isoleucin (**84**) konnte erneut die Vorläufer-dirigierte Biosynthese als eine zuverlässige Methode bestätigt werden, um neue Derivate in der Iromycinfamilie zu generieren. Dieses wird durch eine unspezifischere Beladung der PKS durch nicht-natürliche Vorläufer erreicht.

Bis zu diesem Zeitpunkt konnte noch keine biologische Testierung erfolgen, sodass über die mögliche Wirksamkeit von Iromycin H (**78**) keine Aussage getroffen werden kann.

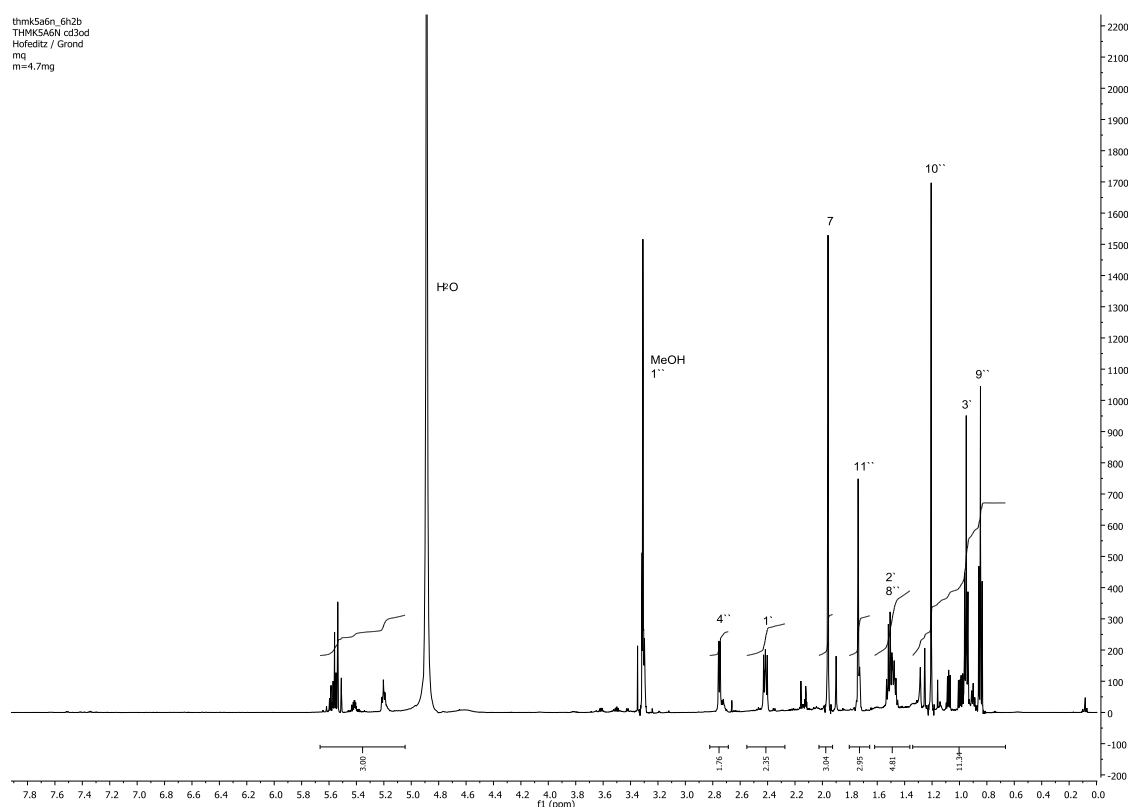


Abbildung 6-9: $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz) von Iromycin H (**78**).

Iromycin I (79)

Es wurde eine Kultivierung durchgeführt, wo eine Fütterung von *L*-Isoleucin (**84**, Tabelle 6-3) stattfand. In LC-MS-Analysen wurde eine Molmasse von 335 g/mol mit einer R_t sowohl von 21.1 als auch 21.6 Minuten zusätzlich zu Iromycin B (**55**, 23.6 Minuten) im Kulturfiltratextrakt (Abbildung 6-10 E) nachgewiesen (positive Mode: $[M+H]^+$; negativ Mode: $[M-H]^-$). Dieses deutete auf eine polarere Verbindung als Iromycin B (**55**) hin (Abbildung 6-10 D). Schon in verschiedenen LC-MS-Untersuchungen konnten zwei Metabolite mit der Masse von 335 g/mol mit einer Retentionszeit (R_t) von 21.1 und 21.5 Minuten identifiziert werden (Abbildung 6-10 E). Es konnte jedoch bis zu diesem Zeitpunkt keine Reinstoffisolierung erfolgen.

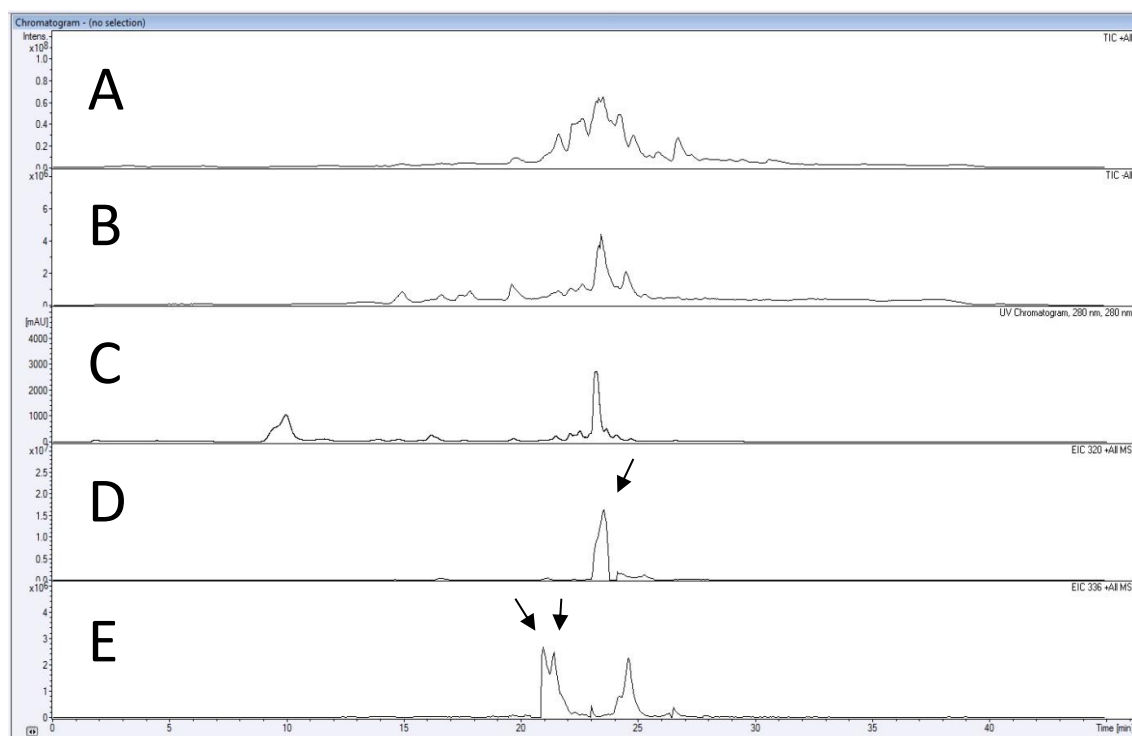


Abbildung 6-10: LC-MS-Chromatogramm eines Extraktes. **A**: Total Ion Chromatogramm (TIC positive Mode); **B**: TIC (negative Mode); **C**: UV-Spur 280 nm; **D**: Extraktion der Masse $m/z = 320$ (Iromycin B (**55**) $[M+H]^+$) bei einer Retentionszeit von 23.6 Minuten; **E**: Extrahierte Massenspur der Masse $m/z = 336$ $[M+H]^+$ bei einer Retentionszeit von 21.1 und 21.6 Minuten.

In diesem Fütterungsexperiment mit *L*-Isoleucin (**84**, 4 L) wurde eine größere Substanzmenge dieser beiden Metaboliten ($m/z = 336$ $[M+H]^+$; $R_t = 21.1$ und

21.6 Minuten) produziert, sodass die Reinstoffisolierung des Metaboliten (5.0 mg) bei einer Retentionszeit (R_t) von 21.6 Minuten erreicht werden konnte. Die Isolierung erfolgte mittels Sephadex LH-20 (Methanol) mit anschließender Reindarstellung an der HPLC. Es konnte eine Summenformel von $C_{19}H_{29}NO_4$ ermittelt werden, welche im Vergleich zu **55** ein weiteres Sauerstoffatom zeigt.

Ein Vergleich der 1H -NMR-Spektren mit denen von Iromycin B (**55**) und Iromycin A (**54**) zeigte deutlich, dass es sich bei dem neu isolierten Metaboliten um ein Mitglied der Iromycinfamilie handelt. Direkt neben dem Methanolsignal bei $\delta_H = 3.31$ ppm im 1H -NMR-Spektrum (Abbildung 6-11, Abbildung 6-12) konnte ein Dublett vom Dublett mit einer Kopplungskonstante von zweimal 10.9 Hz, einem Integral von zwei Protonen und eine chemische Verschiebung von $\delta_H = 3.38$ ppm identifiziert werden. Durch das HMBC-Experiment konnte belegt werden, dass von dieser Methylengruppe Kreuzkopplungen zu C-9'' ($\delta_C = 24.5$ ppm), C-7'' ($\delta_C = 73.9$ ppm) und C-6'' ($\delta_C = 137.6$ ppm) hervorgehen. Diese Beobachtungen führten zu dem Schluss, dass es sich um ein neues Signal handeln musste, das bei den Iromycinen bisher nicht identifiziert werden konnte. Auch das ^{13}C -NMR-Spektrum wies eindeutig ein Signal bei $\delta_C = 70.8$ und ein Signal bei $\delta_C = 73.9$ ppm auf. Diese beiden Signale deuten auf an Sauerstoffatome gebundene Kohlenstoffatome hin.^[115] Bei **55** ist hingegen nur ein Signal bei $\delta_C = 73.0$ ppm zu beobachten. Durch die Auswertung der NMR-Spektren (Abbildung 6-11, Abbildung 6-12) konnte eine polarere Verbindung als Iromycin B (**55**) bestätigt werden.

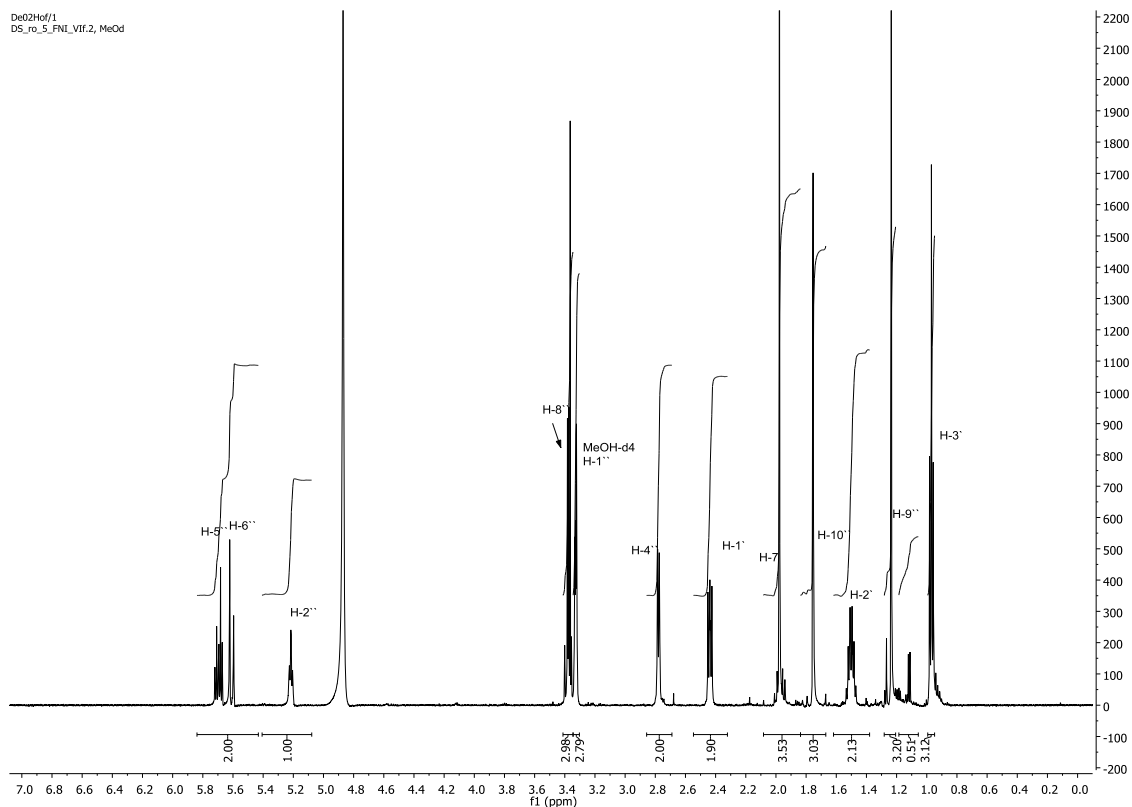


Abbildung 6-11: ^1H -NMR-Spektrum (CD_3OD , 600 MHz) von Iromycin I (**79**).

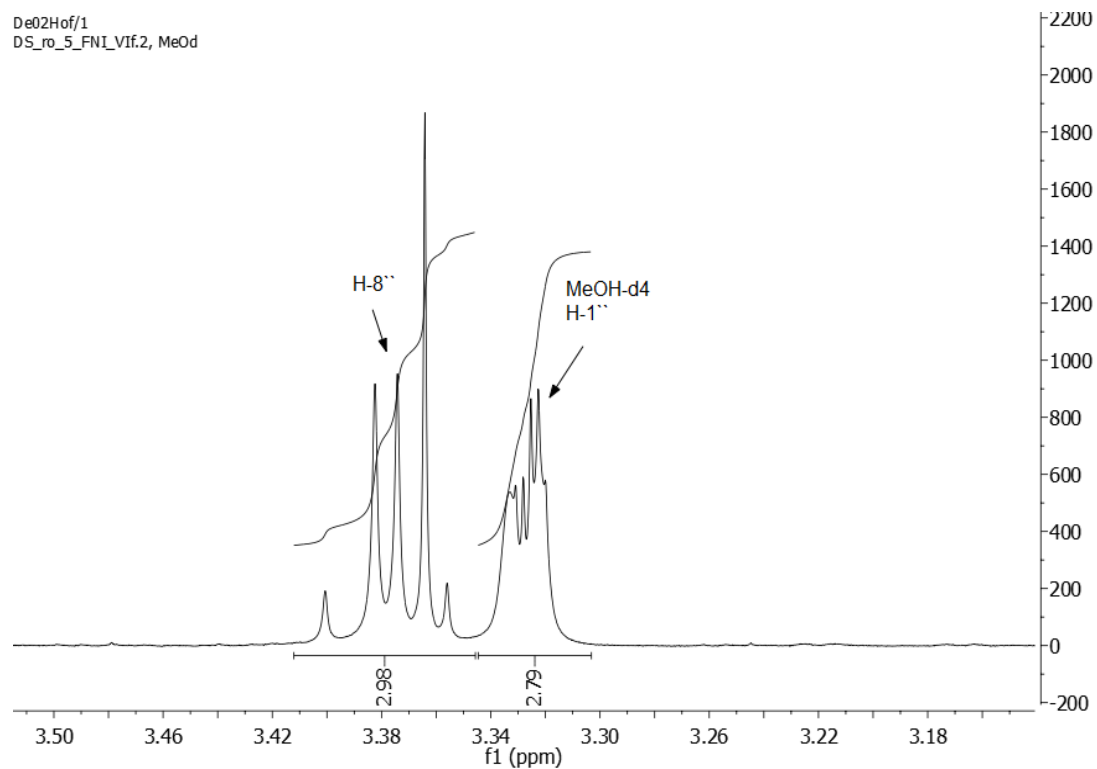


Abbildung 6-12: Expansions zu Abbildung 6-11.

Eine weitere LC-MS-Messung wurde nach Aufreinigung an der HPLC durchgeführt (Abbildung 6-13). Bei einer R_t von 21.6 Minuten ist der aufgereinigte Metabolit (später Iromycin I (**79**)) (Abbildung 6-13) mit der Masse $m/z = 336$ $[M+H]^+$ abgebildet.

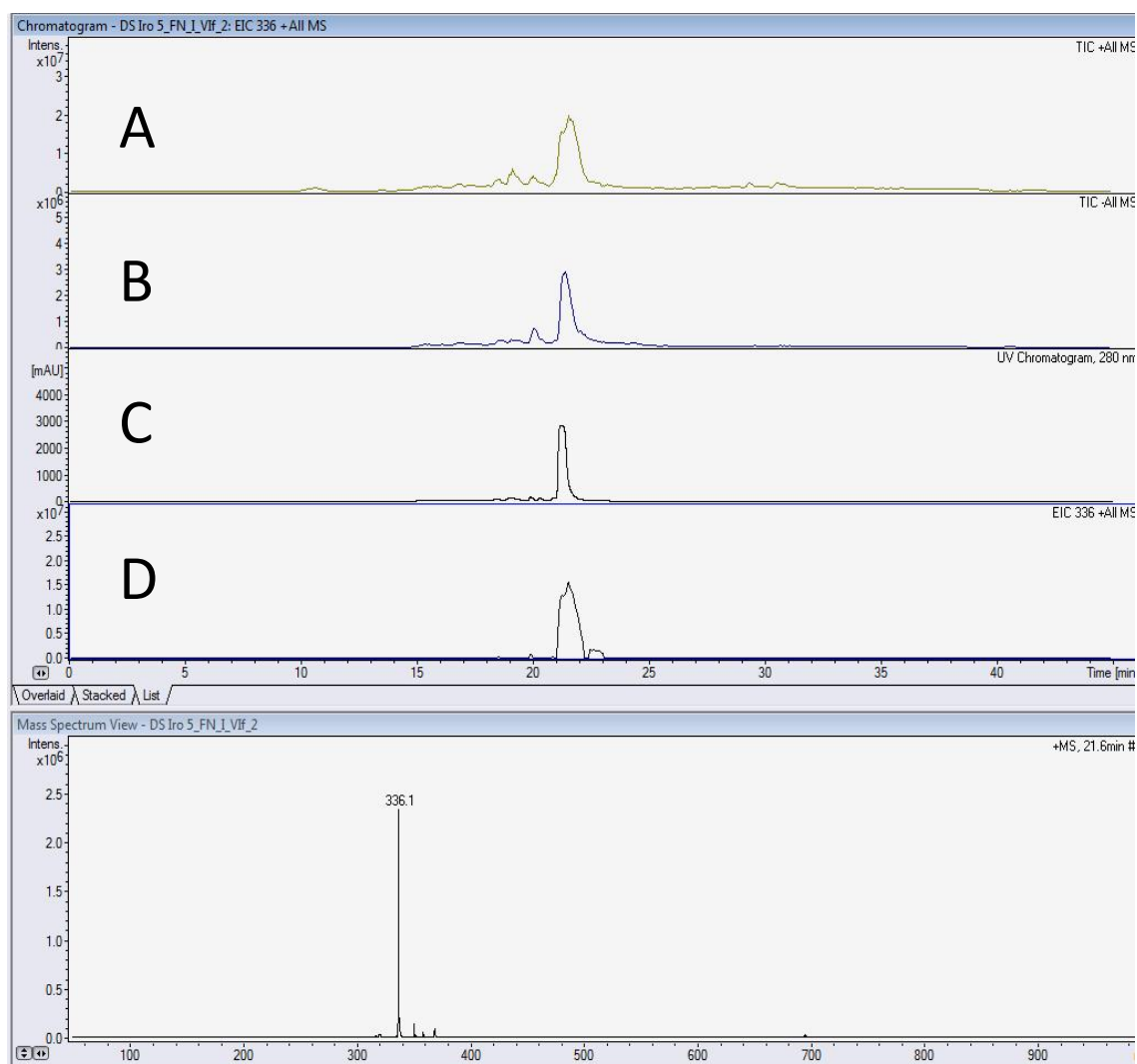
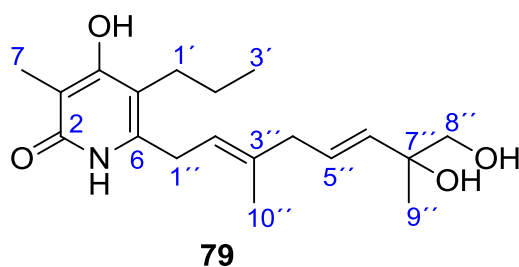


Abbildung 6-13: LC-MS-Chromatogramm der Iromycin I (**79**) beinhaltenden HPLC-Fraktion mit einer R_t von 21.6 Minuten. **A:** Total Ion Chromatogramm (TIC, positive Mode); **B:** TIC (negativ Mode); **C:** UV-Chromatogramm bei 280 nm; **D:** Extrahierte Massenspur von Iromycin I (**79**) bei $m/z = 336$ $[M+H]^+$.

Diese neue Verbindung wurde noch nicht in der Literatur beschrieben und wurde als Iromycin I (**79**) bezeichnet.



Aus dem Fütterungsexperiment mit *L*-Isoleucin (**84**) konnte neben Iromycin G (**77**) und H (**78**) das Iromycin I (**79**) als weiteres Mitglied der Iromycinfamilie mit 5.0 mg aus vier Litern Kultur isoliert werden. Durch dieses Fütterungsexperiment konnte erneut die Vorläufer-dirigierte Biosynthese als eine zuverlässige Methode bestätigt werden, um neue Derivate in der Iromycinfamilie zu generieren. Es konnte gezeigt werden, dass ein höher oxygeniertes Derivat (**79**) von Iromycin B (**55**) gebildet wird. Wie bei **55** wird vermutet, dass die P450-abhängige Monooxygenase, die für die Hydroxylierung an C-7'' verantwortlich ist (Abbildung 5-3), auch das C-8'' hydroxylieren kann.

Bis zu diesem Zeitpunkt konnte noch keine biologische Testierung erfolgen, sodass über die mögliche Wirksamkeit von Iromycin I (**79**) keine Aussage getroffen werden kann.

6.5 Biologische Aktivität der Iromycin-Analoga

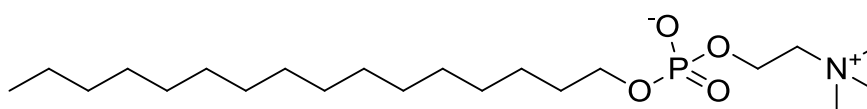
Iromycin A (**54**) und B (**55**) wurden in Kooperation mit M. KAISER am Schweizer Tropeninstitut in Basel (AK BRUN) auf folgende Parasiten getestet: *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhod.*), *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi.*), *Leishmania donovani* (*L. don. axen.*) und *Plasmodium falciparum* (*P. falc. K1*). Weiterhin wurden auch Cytotoxizitätstests (Cytotox. L6) durchgeführt (Tabelle 6-4).ⁱ

ⁱ Wir danken M. KAISER (AK BRUN) für die Durchführung der Tests.

Tabelle 6-4: Ermittelte IC₅₀-Werte aus dem Schweizer Tropeninstitut. Alle Werte sind in µg/mL angegeben.

Name	T. b. rhod.	T. cruzi	L. don. axen	P. falc. K1	Cytotox. L6
Melarsoprol	0.003				
Benznidazol		0.0316			
Miltefosine (85)			0.206		
Chloroquine				0.072	
Podophyllotoxin					0.005
Iromycin A (54)	1.69	66.69	1.33	> 5	> 90
Iromycin B (55)	23.21	68.16	14.4	4.67	> 90

Durch die mit dem Parasiten *Leishmania donovani* durchgeführten *in vitro* Tests konnte eine moderate, aber um eine Zehnerpotenz schwächere Aktivität als der Standard (Miltefosin (**85**)) von Iromycin A (**54**) bestimmt werden. Bei dem Standard Miltefosin (**85**) handelt es sich um ein zwitterionisches Phospholipid, auf dem Markt unter dem Namen Impavido®.^[116]


85

Bei der Leishmaniose handelt es sich um eine weit verbreitete Infektionskrankheit mit einer hohen Todesrate aus den Tropen und Subtropen.^[117] Bei dieser Krankheit werden Protozoen durch die Sand- und Schmetterlingsmücke der Gattung *Phlebotomus* auf Schafe, Hunde und den Menschen übertragen, wo eine Ausbreitung in Leber, Milz und Knochenmark stattfindet. Bei Nichtbehandlung führt diese Ausbreitung spätestens nach 24 Monaten zum Tode.^[116]

In vorhergehenden Arbeiten des AK GROND wurden weitere biologische Aktivitäten für die Metaboliten des *Streptomyces bottropensis* Dra17 beschrieben. Die Thaxthomine A (**57**) und C (**58**) wurden durch F. SURUP^[102] und P. KÖSSLER^[118] bearbeitet. Bei **57** und **58** war literaturbekannt, dass diese Metabolite für das Auftreten von Kartoffelschorf (Kartoffelfäule) verantwortlich sind.^[119]

Durch die Arbeiten von F. SURUP^[102] und Beschreibungen in der Patentliteratur^[101] konnte gezeigt werden, dass die Stickstoffoxid-Synthasen (NO-Synthasen) gehemmt werden. Stickstoffoxid (NO) ist ein intrazelluläres Signalmolekül, welches dem Gehirn sowie dem Blutkreislauf unterschiedliche Regulationsmechanismen vermittelt. Gebildet werden diese Substanzen durch die NO-Synthasen.^[120] Es findet eine Unterteilung in drei Untereinheiten statt: die nNOS (neuronal), die iNOS (induzierbar) und die eNOS (endothelial). In einem Assay mit Eierstockzellen des chinesischen Hamsters, der die eNOS- und die nNOS-Isoformen exprimiert, konnte in Gegenwart eines Ca²⁺-Ionophors (A23187) eine Hemmung der eNOS durch Iromycin A (**54**), B (**55**) und C (**59**) gezeigt werden.^[103] Iromycin A (**54**) zeigt die potenteste Wirkung, gefolgt von Iromycin C (**59**). Iromycin B (**55**) zeigt lediglich eine sehr geringe Hemmung. Die nNOS wird nicht gehemmt.^[102]

Weiterhin war es möglich eine inhibitorische Wirkung auf den Komplex I der Atmungskette zu bestimmen. Getestet wurden verschiedene Iromycine, Iromycine A–F (**54**, **55**, **59–62**) und Iromycin S (**76**), sowie unterschiedliche synthetische Derivate.^[114] Als Referenz diente hier das Piericidin A₁ (**86**), ein Polyketid mit Methoxypyridinkopf aus *Streptomyces piomogeues* var. Hangzhouwanensis oder *Streptomyces mobaraensis*, das als Inhibitor des Komplex I der Atmungskette bekannt ist.^[121] Ein Vergleich von Iromycin A (**54**) mit **86** zeigt eine deutliche strukturelle Verwandtschaft (schwarze Hervorhebung). Dennoch hat **54** eine um zwei Zehnerpotenzen schwächere Aktivität als **86**. Möglicherweise haben die beiden Methoxygruppen oder aber die längere Alkenylkette von **86** einen deutlichen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung des Komplex I der Atmungskette. Iromycin S (**76**) zeigt eine moderate, um nur eine Zehnerpotenz schwächere Aktivität als Piericidin A₁ (**86**). Durch die bei **76** auftretende *tert*-Butylgruppe ist eine höhere Komplexität als in **54** vorhanden. Wird diese Betrachtung in den Vergleich mit einbezogen, so liegt der Schluss nahe, dass die potentere Wirkung auf die längere, verzweigte Alkenylkette in **86** zurückzuführen ist. Durch die erhaltenen IC₅₀-Werte (Tabelle 6-5) geht hervor, dass der Oxygenierungsgrad einen hohen Einfluss auf die biologische Aktivität der Iromycine haben muss. Je höher

der Oxygenierungsgrad ist, desto größer ist der Wirkverlust in Bezug auf die Iromycine (Tabelle 6-5).

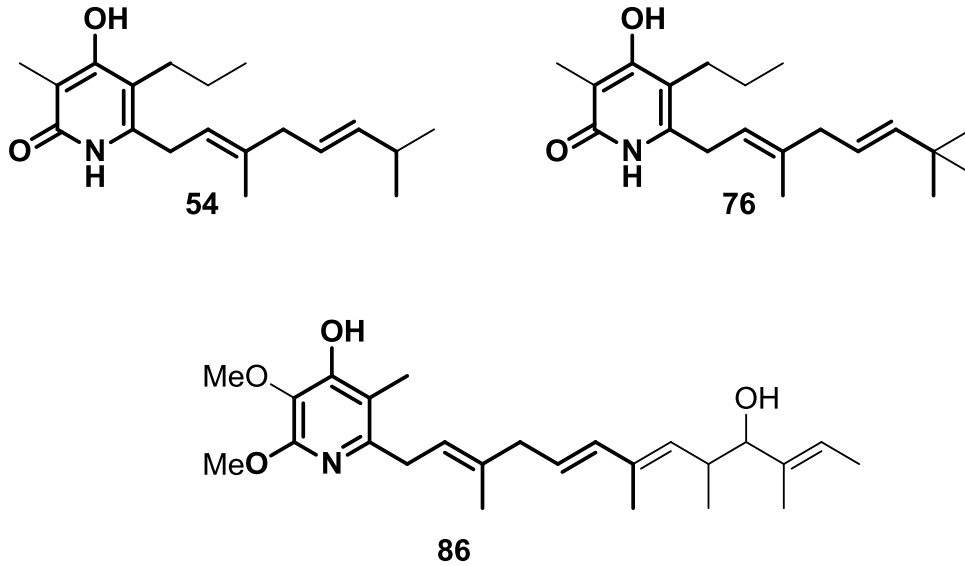


Tabelle 6-5: Inhibitorischer Effekt auf den Komplex I der Atmungskette. Ermittelte IC₅₀-Werte. Die Werte werden in ng/mL angegeben.^[114]

Verbindung	IC ₅₀ (ng/mL)
Iromycin A (54)	140
Iromycin B (55)	5700
Iromycin C (59)	1020
Iromycin D (60)	> 8097
Iromycin E (61)	> 8097
Iromycin F (62)	> 8097
Iromycin S (76)	58
Piericidin A ₁ (86)	2.1

Des Weiteren konnte in Agardiffusionstests gezeigt werden, dass Iromycin A (**54**) und C (**59**) einen Hemmhof bei den Testkeimen *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* ausgebildet haben.^[102]

6.6 Diskussion

Durch verschiedene Fütterungsexperimente (Abbildung 6-5) mit stammfremden möglichen Vorläufermolekülen ist es gelungen, vier Derivate (**76–79**) zu isolieren. Es konnte gezeigt werden, dass das Iromycin S (**76**), neben der schon bekannten Totalsynthese^[114], auch zielgerichtet durch Vorläufer-dirigierte Biosynthese generiert werden kann. Dies konnte durch die Fütterung von Pivalinsäure-SNAC-Ester (**83**) sichergestellt werden (Abbildung 6-14). In rot ist die erhaltene Veränderung im Grundgerüst in Bezug auf Iromycin A (**54**) und B (**55**) dargestellt.

Bei der Totalsynthese wurde über zwölf Stufen eine Gesamtausbeute von 46.3 mg (14 %) von Iromycin S (**76**) erhalten, während aus der Vorläufer-dirigierte Biosynthese aus einem vier Liter-Fermenter 45.3 mg leicht verunreinigtes Iromycin S (**76**) isoliert werden konnte.^[114, 122] Vergleichend konnte gezeigt werden, dass durch die Vorläufer-dirigierte Biosynthese vergleichbare Mengen wie aus der Totalsynthese mit einem großen Zeitersparnis zugänglich gemacht werden konnten, was einen deutlichen Vorteil dieser Methode zeigt. Allerdings kann während der Totalsynthese, z.B. durch Kreuzkupplungen eine Variation in der Seitenkette generiert werden. Für eine solche Variation muss eine weitere Kultivierung stattfinden, wobei ein Einbau in das Grundgerüst der Iromycine (**54**, **55**) vom Substrat und der Substratspezifität der PKS abhängig ist. Beispielweise konnten aus Fütterungsexperimenten von 2-Methylbuttersäure-SNAC-Ester (**67**) und [1-¹³C]-Valeriansäure-SNAC-Ester (**68**) (Kapitel A 5, S. 54–56) lediglich Iromycin A (**54**) erhalten werden^[102], während andere Substrate nicht eingebaut wurden (Abbildung 5-4). Während zu SNAC-Estern modifizierte Carbonsäuren teilweise eine Beladung der PKS ermöglichen, konnten Fütterungen von unmodifizierten Carbonsäuren zu keinem erfolgreichen Einbau und somit nicht zu neuen Derivaten führen.^[96, 102]

Weiterhin ist es gelungen, durch die beschriebene Fütterung von *L*-Isoleucin (**84**), die Iromycine G (**77**), H (**78**) und I (**79**) aufzubauen (Abbildung 6-14). Diese drei Derivate der Iromycinfamilie wurden bisher noch nicht beschrieben und sind damit neu. Bei den neuen Substanzen (**77-79**) handelt es sich um Derivate von Iromycin A (**54**) und B (**55**),

welche sich jeweils nur durch eine Methylengruppe bzw. eine weitere Hydroxygruppe von diesen unterscheiden. Bei der Fütterung von Aminosäuren konnten vergleichend mit Fütterungsexperimenten von SNAC-Estern Beschränkungen festgestellt werden. Während der Einbau von **84** zu einer erfolgreichen Produktion von neuen Derivaten (**77–79**) führte, waren die Fütterungen von *L-tert*-Leucin (**71**) und *L*-Leucin (**64**) nicht eindeutig und es konnten keine neuen Derivate erzeugt werden.

Bei der Fütterung von Zimtsäure-SNAC-Ester (**81**) konnte mittels LC-MS-DAD Analyse keine zugehörige Masse gefunden und im Dünnschichtchromatogramm konnte nur der SNAC-Ester gesehen werden. Die Biosynthese der Iromycine (**54, 55**) wurde offenbar durch die Anwesenheit von **81** gestört, denn es konnten **54** und **55** lediglich in Spuren in den Extrakten identifiziert werden. Die Substratspezifität des PKS-Loading-Moduls reicht demnach nicht aus, um die modifizierte Zimtsäure (**29**) auf das PKS-System zu laden (Abbildung 6-14).

Durch diese beschriebenen Fütterungsexperimente konnte gezeigt werden, dass die Methode der Vorläufer-dirigierten Biosynthese erfolgreich neue Derivate (**76–79**) der Iromycine (**54, 55**) erzeugen kann, aber es wurden auch Grenzen bzw. Limitierungen dieser Methode aufgezeigt. Diese Beschränkungen sind durch die Abhängigkeit vom Substrat sowie der Substratspezifität der PKS gegeben. Bei einer strukturellen Abweichung des Substrates von den natürlichen Vorläufern kann ein nicht erfolgreicher Versuch, neue Iromycin-Derivate zu erzeugen, resultieren.

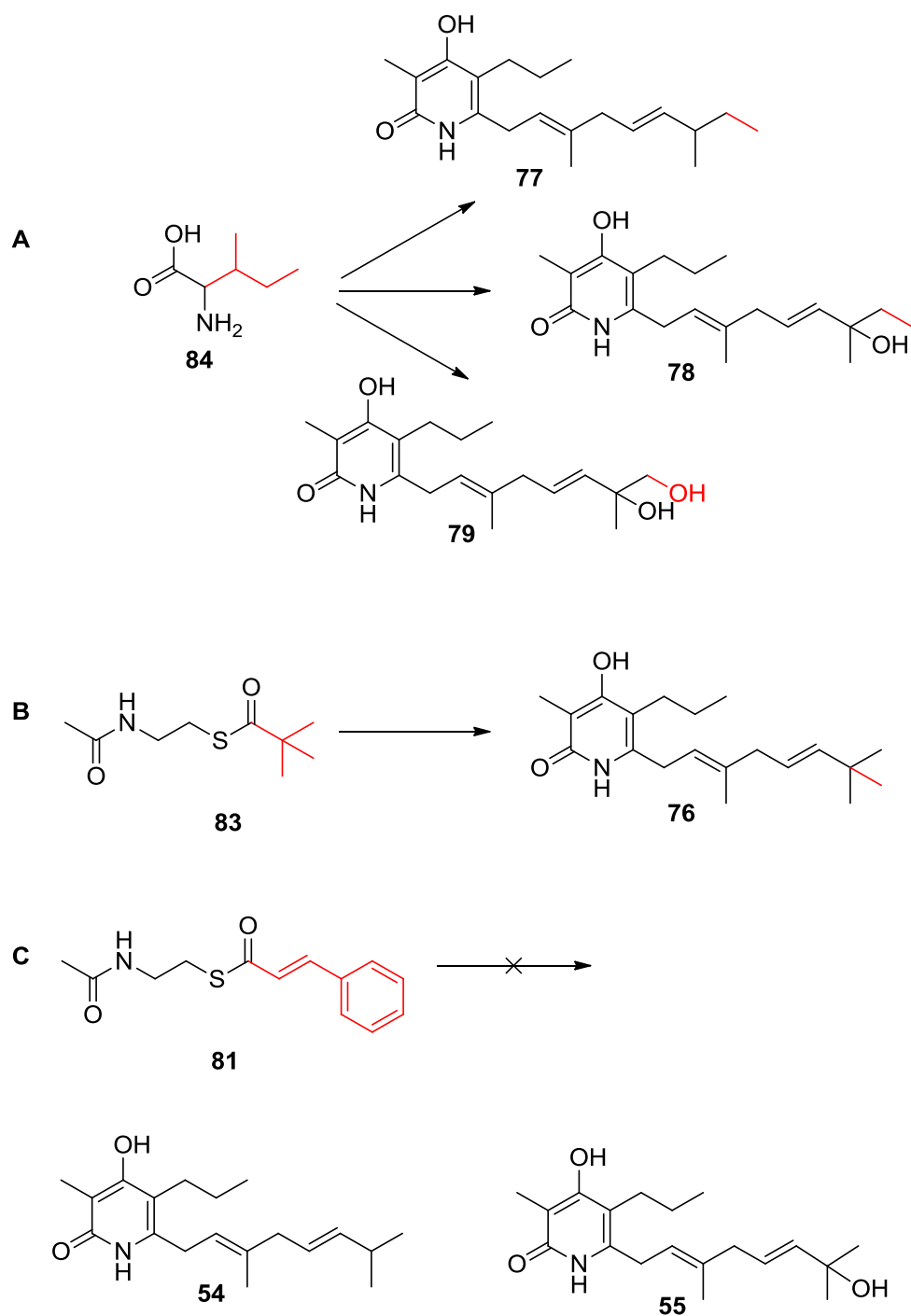
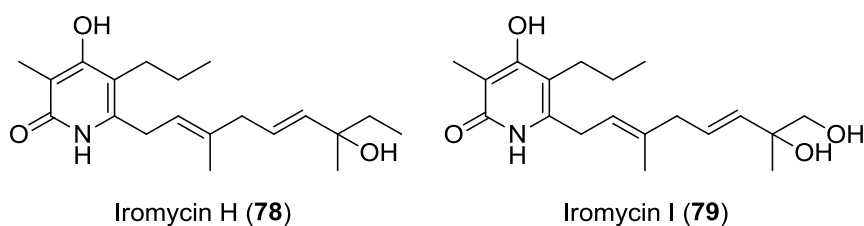
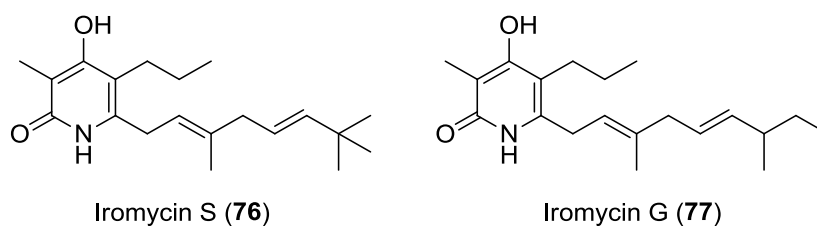


Abbildung 6-14: Erhaltene Resultate der Fütterungen zur Derivatisierung in der C₈-Kette der Iromycine (**54**, **55**). **A**: Fütterung von L-Isoleucin (**84**); **B**: Fütterung von Pivalinsäure-SNAC-Ester (**83**); **C**: Fütterung von Zimtsäure-SNAC-Ester (**81**). **Rot**: Erhaltene Veränderung im Grundgerüst im Vergleich zu Iromycin A (**54**) und B (**55**).

Trotz der intensiv optimierten Aufarbeitung mittels Säulenchromatographie, MPLC, LC-MS und HPLC konnte zwar die Struktur dieser vier Derivate (**76–79**) verifiziert

werden, allerdings gelang es nicht, die für biologische Testierung notwendigen Mengen als Reinstoff bereitzustellen. Ein mögliches Problem ist, dass trotz der verschiedenen Reinigungsschritte immer noch ein Teil an Fetten in der Probe vorhanden war. Durch verschiedene Wechselwirkungen, wie z.B. Van-der-Waals-Wechselwirkungen, ist eine Bindung an das Zielmolekül möglich. Daraus resultieren mehr Signale mit höheren Integralen im NMR-Spektrum mit einer chemischen Verschiebung von $\delta_H = 0.88$ und 1.26 ppm.



Für weitere Aufreinigungsversuche der Iromycine (76–79) ist es daher erforderlich, andere Methoden zu etablieren. Zur Zeit der hier vorliegenden Experimente war ein wesentlicher Faktor der geringen Substanzmengen, dass der Stamm *Streptomyces bottropensis* Dra17 womöglich nicht als Reinkultur vorlag. Es konnte eine Kontamination des Streptomyceten durch einen *Bacillus* identifiziert werden; ein hitzeresistenter Sporenbildner, der durch Verdünnungsausstriche oder die Verwendung von Membranfiltern entfernt werden musste.

6.7 Ausblick

Zukünftige Arbeiten könnten zum Gegenstand haben, den Biosynthesegencluster der Iromycine (54, 55) zu finden. Es wäre dann von Interesse nach der Aufklärung des Genclusters Knock-Outs an verschiedenen Stellen im Cluster zu generieren, um

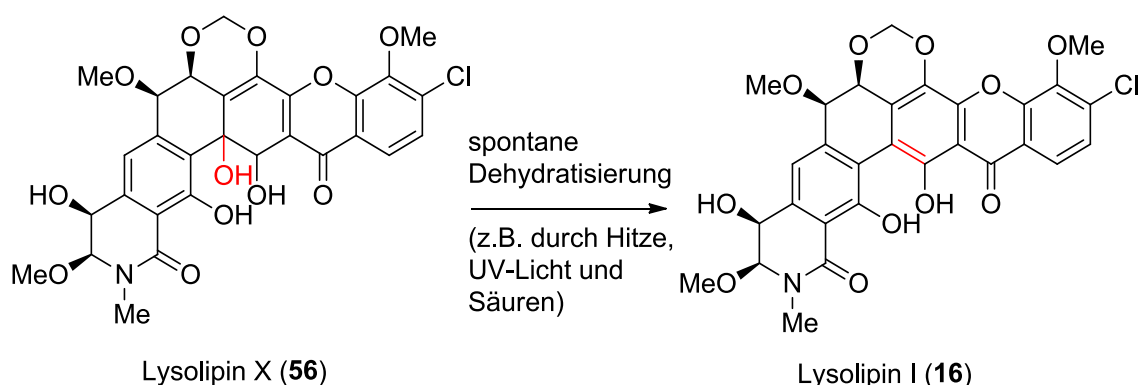
Derivate zu erzeugen. Ausgenommen für einen Knock-Out sind die Kern-Domänen (KS, AT, ACP). Diese Domänen sind obligatorisch für eine Verlängerung in der Polyketidkette. Denkbar wäre ein Knock-Out der Enoylreduktase in Modul 2 (Abbildung 5-3), wodurch ein konjugiertes Doppelbindungssystem entstehen könnte. Außerdem wäre es möglich eine oder mehrere der vorhandenen Ketoreduktasen bzw. Dehydrogenasen auszuschalten. Mit dem „Ausknocken“ der reduktiven Domänen würde eine größere strukturelle Diversität der Produkte erhalten werden. Möglicherweise resultiert ein ganz neues bzw. anderes Faltungs- und Cyclisierungsmuster bei der Hydrolyse der Polyketidkette durch die TE-Domäne. Weiterhin muss geprüft werden, was passiert, wenn ein komplettes Modul ausgeschaltet wird. Hierfür würde sich Modul 4 anbieten, da hier zwei Verlängerungseinheiten eingebaut werden.

Auch sind ‚gene shuffling‘-Experimente denkbar. Durch den Austausch eines oder mehrerer Module, können möglicherweise neue Derivate erzeugt und eine Iromycin-Substanzbibliothek aufgebaut werden.

Durch eine erneute Fütterung sollten die erzeugten Metabolite (76–79) als Reinsubstanz dargestellt werden und so den biologischen Testierungen zugänglich gemacht werden können.

7 Das polycyclische Xanthon-Antibiotikum Lysolipin (56, 16)

Dieses Projekt umfasst die polycyclischen Xanthon-Antibiotika Lysolipin X (farblos, **56**) und Lysolipin I (gelb, **16**) und ist ein Kooperationsprojekt mit dem AK WEBER (Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen, IMIT). Das Lysolipin X (**56**) und das Lysolipin I (**16**) wurden von ZÄHNER *et al.* 1975 in Tübingen entdeckt.^[123] Diese beiden lipophilen Substanzen werden sowohl von *Streptomyces violaceoniger* Tü96^[123] als auch von *Streptomyces tendae* Tü 4042 gebildet^[124].



Die beschriebene Bioaktivität ist antibakterieller (gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien), antifungischer (nur **16**), anticoccidialer und cytotoxischer (HeLa Zelllinien) Natur.^[125] Zudem ist bekannt, dass es sich bei den Lysolipinen (**56**, **16**) um Inhibitoren der Glycopeptid-Synthese handelt.^[123] Die Namensgebung dieser Substanzen beruht auf deren lytischer Wirkung auf Zellwände von Bakterien.^[123] Bei dem Lysolipin X (**56**) handelt es sich um eine instabile Vorstufe von Lysolipin I (**16**). Durch Hitze-, Licht- und Säureeinwirkung findet eine spontane Dehydratisierung an Position C-12 statt. Dadurch wird **56** in das stabilere **16** umgewandelt.^[123] Bereits zwei Jahre nach der Entdeckung der Lysolipine konnte eine Kristallstruktur des Triacetates publiziert werden.^[126] Aus dieser Kristallstruktur und chemischen Derivatisierungen konnte die absolute Konfiguration von Lysolipin I (**16**) eindeutig bestimmt werden.^[125] Für die Struktur des Lysolipin X (**56**) war aufgrund der Instabilität keine Aussage zu treffen. Es wurden Fütterungsexperimente mit ¹³C-markierten Vorläufern von

Floss *et al.* durchgeführt.^[125] Es wurden folgende Substanzen während der Kultivierung mit zur Kulturbrühe gegeben: $[1-^{13}\text{C}]$, $[2-^{13}\text{C}]$, $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat, $[1,3-^{13}\text{C}_2]$, $[2-^{13}\text{C}]$, $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$, $[1,3-^{13}\text{C}_2\ ^{18}\text{O}_2]$ Malonsäure, $[-\text{S}-^{13}\text{CH}_3]$ Methionin und $^{18}\text{O}_2$ (Abbildung 7-1). Bei der Fütterung mit markiertem Acetat konnte gezeigt werden, dass nur vier intakte Acetateinheiten eingebaut werden und es konnte eine Einbaurrate von 1-2 % berechnet werden (Abbildung 7-1 rechts). Durch eine Fütterung mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ -Malonsäure, wurde eine komplette Malonateinheit als eine ungewöhnliche Starteinheit eingebaut. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Lysolipine (**56**, **16**) aus einer Polyketidkette aufgebaut werden. Dieses wurde durch den Einbau von zehn intakten Acetateinheiten und eine Einzelmarkierung mit einer Einbaurrate von 5-10 % (Abbildung 7-1 links) belegt.^[125]

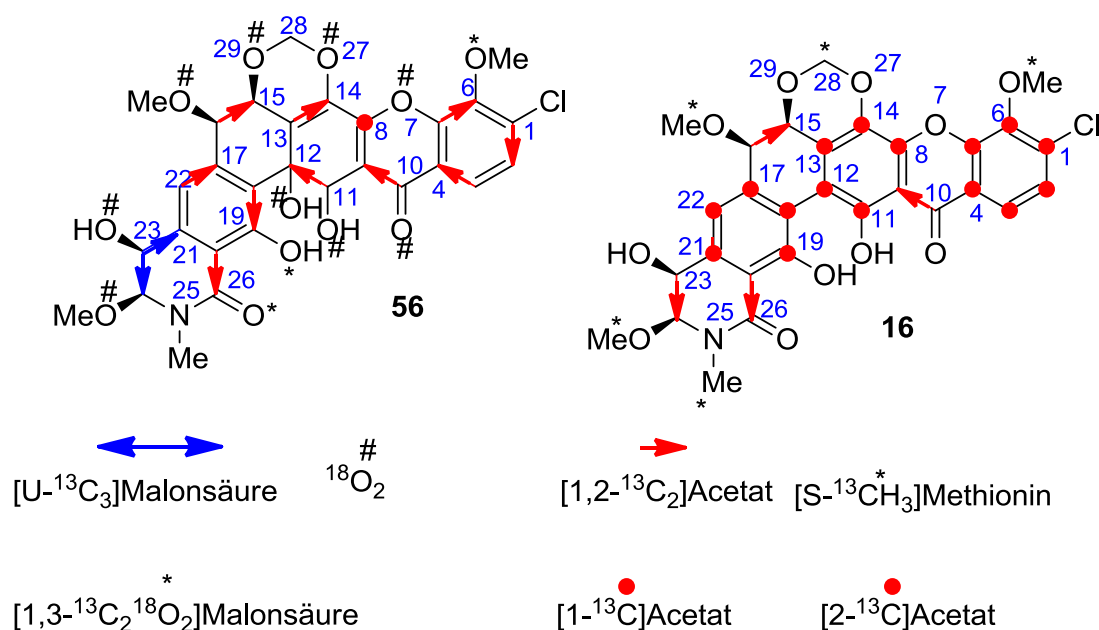


Abbildung 7-1: Resultate aus den Fütterungsexperimenten der Lysolipine X (**56**) und I (**16**). **Links:** Fütterung von $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ und $[1,3-^{13}\text{C}_2\ ^{18}\text{O}_2]$ Malonsäure, $[1,3-^{13}\text{C}_2]$ und $[2-^{13}\text{C}]$ Malonsäure sowie eine Fermentation unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre. **Rechts:** Fütterung von $[1-^{13}\text{C}]$, $[2-^{13}\text{C}]$ und $[\text{U}-^{13}\text{C}_2]$ Acetat, sowie ^{13}C -markiertes Methionin.^[125]

Viele der vorhandenen Sauerstoffatome stammen aus dem Luftsauerstoff und werden demnach als Post-PKS-Modifikationen eingefügt (Abbildung 7-1). Aus diesen Experimenten wurde die Biogenese der Lysolipine (**56**, **16**) sehr weitreichend, jedoch

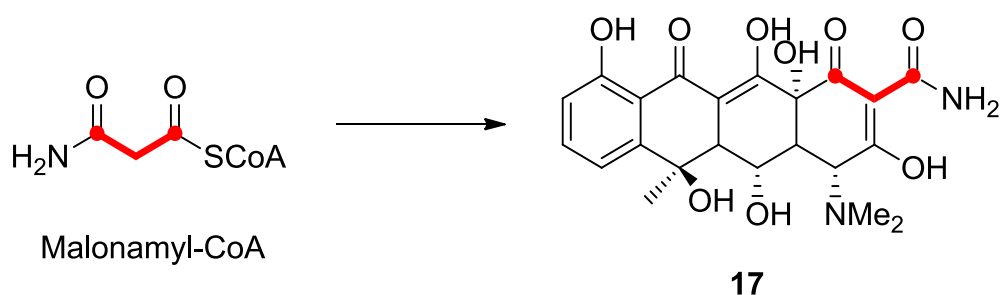
nicht abschließend bestimmt. Unklar blieb der biosynthetische Ursprung der Starteinheit. BOCKHOLT *et al.* haben als Starteinheit den Einbau einer intakten Malonateinheit beschrieben und konnten dieses durch Fütterungsexperimente belegen (Abbildung 7-1).^[125] Die Lysolipine (**56, 16**) sind Dodecaketide, Polyketide, die durch eine PKS II produziert werden. Wie in Kapitel A 1 ist die Beladung einer PKS II noch nicht ausreichend geklärt (s. S. 16-18). Unter anderem findet bei der Beladung von Malonyl-CoA eine Decarboxylierung beim Übertragen der Starteinheit auf die KS_α-Domäne statt. Dadurch steht diese bereit, um in die wachsende Polyketidkette integriert zu werden. Weiterhin konnten im Biosynthesegencluster der Lysolipine (**56, 16**) keine Hinweise gefunden werden, die einen Einbau einer kompletten Malonateinheit rechtfertigen.^[127] Aus dieser Tatsache ergibt sich ein großer Widerspruch zu den durchgeführten Fütterungsergebnissen von BOCKHOLT *et al.*

In Anlehnung an diese Biosynthesestudien wurde ein Biosyntheseweg von T. WEBER *et al.* postuliert (Abbildung 7-2).^[124, 125]

Nach der bisherigen Biosynthesehypothese werden 12 Malonateinheiten mittels PKS II kondensiert. Durch Cyclasen, Reduktasen, Oxygenasen, Halogenasen und Methyltransferasen wird das Molekül weiter modifiziert. Das Endprodukt Lysolipin X (**56**) wird schnell durch eine Dehydratisierung in das Lysolipin I (**16**) umgesetzt. Diese Dehydratisierung wird durch Hitze, UV-Licht oder auch Säuren begünstigt und verläuft bevorzugt kinetisch ab.

Ungewöhnlich ist der Einbau einer vollständigen Malonateinheit.^[125] Die Antriebskraft der Kondensation ist normalerweise bei Polyketidsynthasen eine Decarboxylierung. Dadurch werden nur zwei Kohlenstoffatome, also formal eine Acetateinheit, in ein Grundgerüst mit eingebaut. Es wurde für die Lysolipin (**56, 16**)-Biosynthese vermutet, dass der Biosyntheseweg A aus Abbildung 7-2 abläuft. Hier wird zuerst ein Malonyl-CoA zu einem Malonamyl-CoA mit Hilfe der Amidotransferase (*llpA*) modifiziert. Es ist für den Biosynthesemechanismus der PKS II nicht eindeutig geklärt, wie die Beladung der PKS II abläuft (Vergleich Kapitel A 1, S. 21-22).

Im Biosyntheseweg A findet eine Amidierung statt. Ohne dass eine Decarboxylierung stattfindet, wird das so generierte Amid in die kondensierte Kette der Biosynthese mit aufgenommen. Ein solches Phänomen konnte auch schon in der Biosynthese von Oxytetracyclin (**17**) festgestellt werden.^[34, 128] Bei den genetischen Untersuchungen des Genclusters des Lysolipins (**56, 16**) der ersten AT, wurden hierzu allerdings keine Hinweise gefunden.



Beim Biosyntheseweg B (Abbildung 7-2) werden 12 Malonyl-CoA-Bausteine mittels der PKS II kondensiert. Die Amidotransferase-Reaktion der C₂₅-Polyketidkette findet im Anschluss daran neben den Cyclase-, Reduktase- und Oxygenase-Reaktionen statt (Abbildung 8-41). Durch die Amidotransferase findet der amidische Ringschluss statt. Dieser Weg scheint der wahrscheinlichere zu sein. Für eine Beladung der PKS II mit Malonamyl-CoA, konnte bei der Untersuchung des Genclusters der ersten AT keine Hinweise für diese Hypothese gefunden werden.

Das polycyclische Xanthon-Antibiotikum Lysolipin (56, 16)

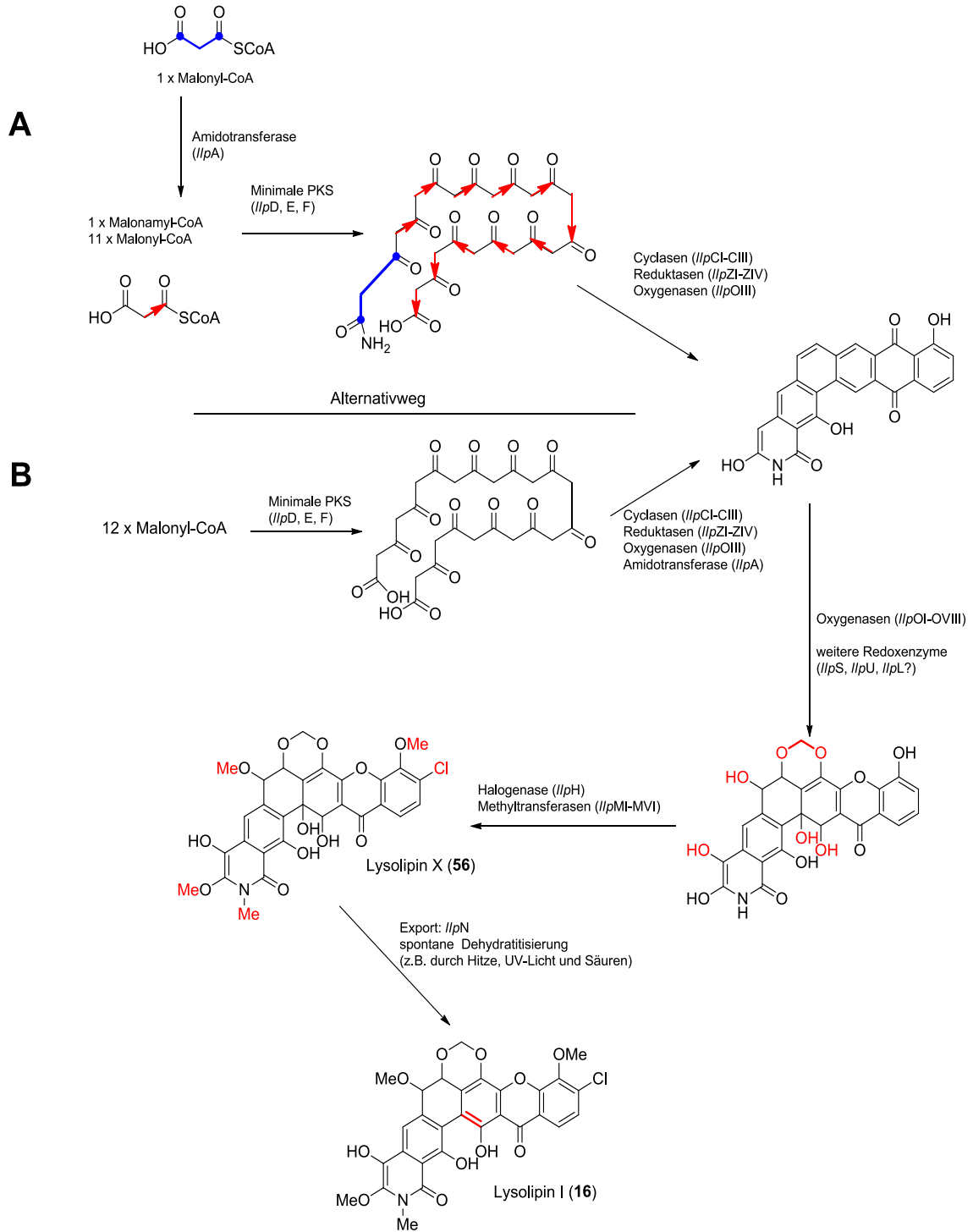


Abbildung 7-2: Postulierte Biosynthesewege für die Lysolipine (**56**, **16**) von 1994 bis 2010.^[124, 125]

A: Amidierung der Startereinheit; Einbau des Stickstoffatoms am Anfang in die Kette.

B: Amidotransferase-Reaktion der C₂₅-Kette.

Biosynthese des Xanthongerüsts des Lysolipin (56, 16)

Für die Lysolipine (56, 16) wurden biosynthetische Studien durchgeführt. Durch die postulierte Biosynthese (Abbildung 7-2) wurde auch eine mechanistische Hypothese zur Bildung des Xanthon-Grundgerüsts aufgestellt. Demnach wird aus einem Chinon ein Lacton gebildet. Vermutlich wird dieser Schritt durch eine Bayer-Villiger-Mono-Oxygenase (BVMO) katalysiert.^[35] C. UNSIN hat vermutet, dass diese Bayer-Villiger-Oxygenierung durch die FAD-abhängigen Oxygenasen *llpOI*, *llpOV* oder *llpOVIII* (Abbildung 7-2) katalysiert werden können.^[35] Es ist ein möglicher Mechanismus dargestellt. Dabei wird in einer Bayer-Villiger-Reaktion ein Sauerstoffatom in das Chinongerüst integriert. Dadurch entsteht ein Lacton. Im Anschluss kann ein nucleophiler Angriff des eingeführten Sauerstoffatoms stattfinden, wodurch sich eine Decarbonylierung ereignet. Dadurch wird das Xanthongerüst gebildet (Abbildung 7-3). Alternativ kann eine hydrolytische Ringöffnung des Lactons auftreten. Ein anschließender nucleophiler Angriff des eingeführten Sauerstoffatoms geht mit einer Abspaltung von zwei Wasserstoffatomen und einer Decarboxylierung einher (Abbildung 7-3).^[125] Diese oxidative Decarboxylierung wird durch die Informationen aus dem Biosynthesegencluster gestützt.

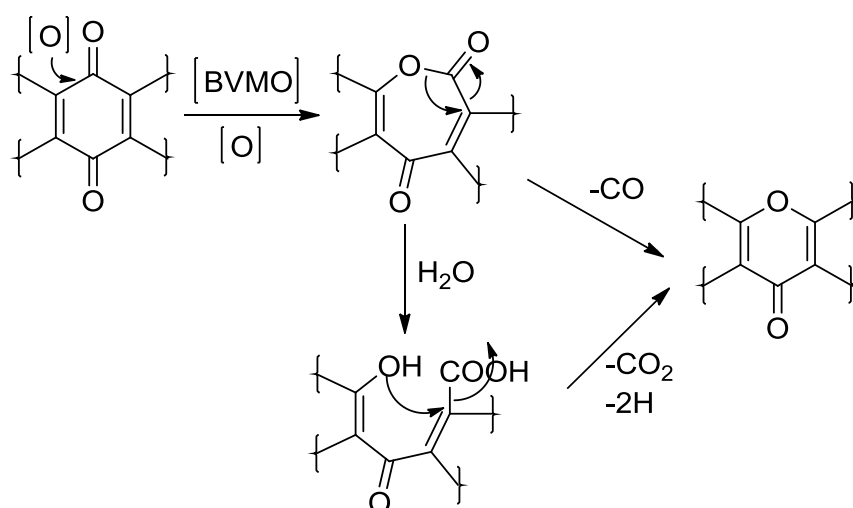
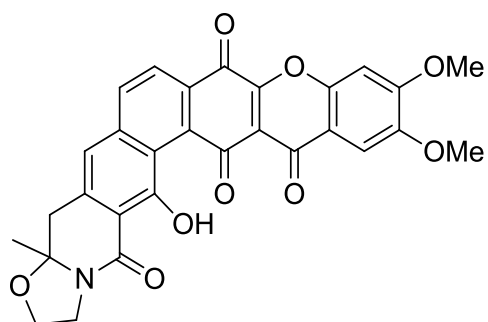


Abbildung 7-3: Mechanistische Hypothese für die Ausbildung des Xanthongerüsts.^[125]

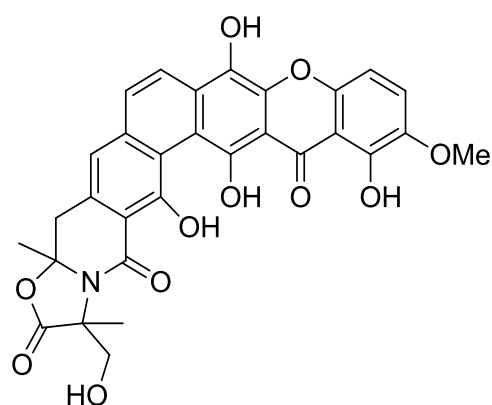
Die genaue Bildung des Xanthons ist noch nicht geklärt. Eine Post-PKS Umlagerung im hier vorgestellten Umfang ist chemisch plausibel und würde damit auch zum Biosynthesecluster stimmig sein.

7.1 Substanzklasse der polycyclischen Xanthon-Antibiotika

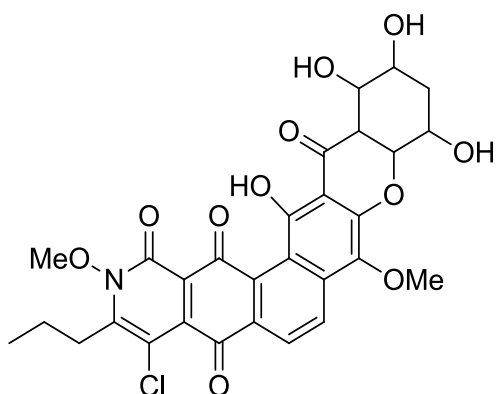
Einige der am besten beschriebenen Mitglieder der mikrobiellen polycyclischen Xanthon-Antibiotika zeigen eine strukturelle Ähnlichkeit zum Lysolipin (56, 16). Die Verbindungen **87-96** weisen alle ein mindestens sechs-gliedriges Ringsystem mit einem unterschiedlichen Substitutionsmuster, sowie einen Pyridonring bzw. einen Pyridon-ähnlichen Ring auf.



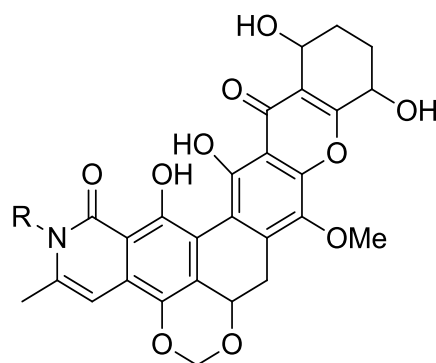
Cervinomycin A₂ (**87**)



Citreamicin ε (**88**)

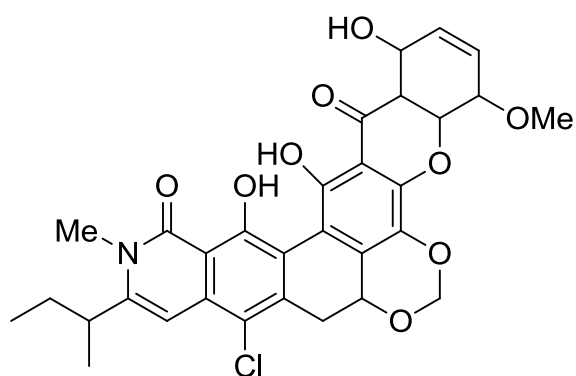


Kibdelon A (**89**)

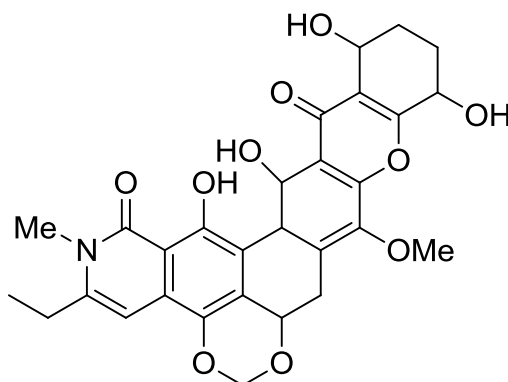


Simaomicin α: R = Me (**90a**)
Simaomicin β: R = H (**90b**)

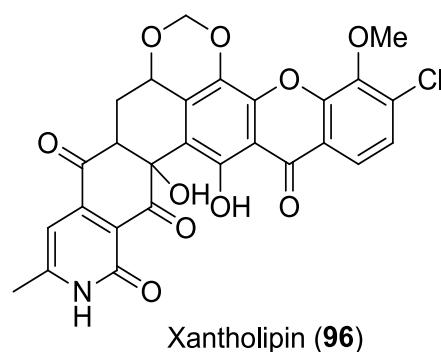
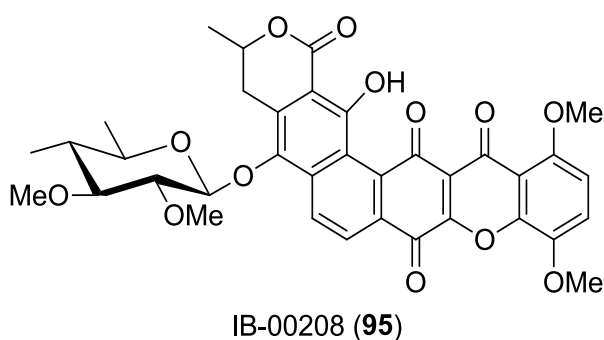
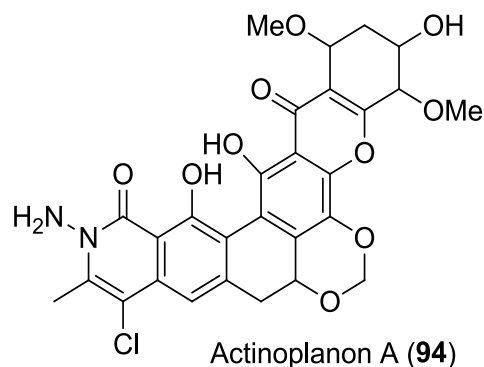
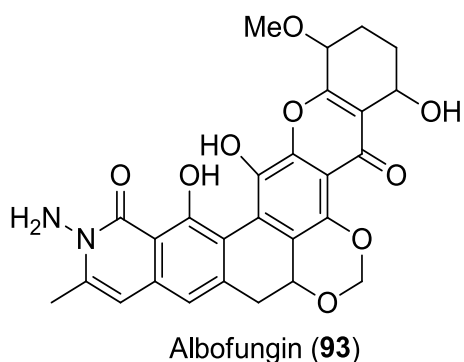
Lediglich **95** stellt ein polycyclisches Lacton ohne ein Stickstoffatom dar. Weiterhin ist sehr auffällig, dass im Gegensatz zum Lysolipin (**56, 16**) eine kurze Alkylkette (von ein bis vier Kohlenstoffatomen) in α -Position zum Stickstoffatom bzw. Sauerstoffatom (**95**) zu finden ist. Dieses deutet auf ein anderes Einbaumuster während der Biosynthese hin. Ein Einbau einer solchen Alkylkette wird detaillierter in Kapitel A 8.5 diskutiert. Wie in Abbildung 7-2 beschrieben, erfolgt bei den Lysolipinen (**56, 16**) ein Einbau einer intakten Malonateinheit, der widersprüchlich ist. Durch die kurzen Alkylketten von **87-96** lässt sich hier jedoch vermuten, dass weitere Malonyl-CoA Bausteine decarboxyliert als Acetateinheiten eingebaut werden oder dass ein anderer Mechanismus für die Beladung der PKS II verantwortlich ist (Kapitel A 1, S. 21-22). Der Einbau von anderen Starteinheiten bzw. die Kondensation von mehreren Malonyl-CoA-Einheiten wird in Kapitel A 8.5 beschrieben.



SCH 54445 (**91**)



SCH 42137 (**92**)



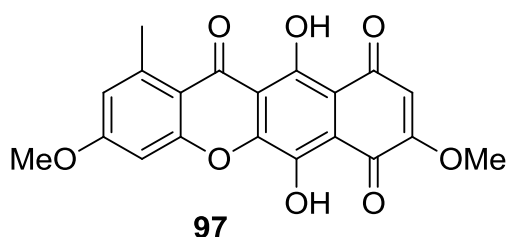
Detaillierte Daten für die polycyclischen Xanthone (**87-96**) sind ergänzend in der nachfolgenden Tabelle 7-1 (Produzenten, biologische Aktivität) dargestellt. Auch die Lysolipine X (**56**) und I (**16**) zeigen verschiedene biologische Aktivitäten, dazu gehören antibakterielle (gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien), antifungische (nur **16**), anticoccidiale und cytotoxische (HeLa Zelllinien) Aktivität.^[125] Über den Wirkmechanismus der Xanthone kann noch keine Aussage getroffen werden.

Die einzelnen Vertreter dieser Substanzklasse werden von unterschiedlichsten Mikroorganismen aus der Gattung *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinomadura* und Weiteren (Tabelle 7-1) produziert. Das breite Spektrum der antibiotischen Wirkung reicht von antibakterieller und antifungischer bis hin zu cytotoxischer Wirkung (Tabelle 7-1). Daraus kann geschlossen werden, dass Xanthongerüste keinen bestimmten molekularen Wirkmechanismus haben.

Tabelle 7-1: Literaturbekannte Vertreter der polycyclischen Xanthone-Antibiotika, ihre mikrobiellen Produzenten und ihre beschriebene Aktivität.

Verbindung	Produzent	Biologische Aktivität
Cervinomycine (87) ^[129,130]	<i>Streptomyces cervinus</i>	antibakteriell (Anaerobier); cytotoxisch; Aktivität gegen Mycoplasmen
Citreamicine (88) ^[131, 132, 133]	<i>Micromonospora citrea</i> ; <i>Streptomyces vinaceus</i>	antibakteriell (Gram-positiv inkl. MDRSA)
Neocitreamicine ^[134]	<i>Nocardia</i> (strain G0655)	antibakteriell (Gram-positiv inkl. MRSA und VRE)
Kibdelone (89) ^[135]	<i>Kibdelosporangium</i> sp. (MST-108465)	antibakteriell (<i>Bacillus subtilis</i>); Aktivität gegen Würmer (nematocidal, <i>Haemonchus contortus</i>); cytotoxisch (NS-1)
Simaomicine ^[136, 137] Simaomicin α (90a), Simaomicin β (90b), auch beschrieben als LL-D42067 α (90a) und LL-D42067 β (90b)	<i>Actinomadura madura</i>	anticoccidial; antibakteriell; antiprotozoal
SCH 54445 (91) ^[138]	<i>Actinoplanes</i> sp. Sch 54445	antifungisch; Aktivität gegen Hefen und Dermatophyten
SCH 42137 (92) ^[139]	<i>Actinoplanes</i> sp. SCC 1906	Aktivität gegen Hefen und Dermatophyten
Albofungin (93) ^[129, 140, 141, 142]	<i>Actinomyces albus</i> var. fungatus	Aktivität gegen Hefen; antibakteriell (Gram-positiv); antifungisch; antihelminthische Aktivität; Inhibition der DNA- bzw. RNA-Synthese
Actinoplanone (94) ^[143]	<i>Actinoplanes</i> sp. R-304	antibakteriell; cytotoxisch (HeLa-Zelllinien und Inhibition der DNA-Synthese)
IB-00208 (95) ^[144, 145]	<i>Actinomadura</i> sp. (marin)	<i>In vitro</i> Cytotoxizität (P-388, A 549, HT-29, SK-MEL-28); Bakterizid (<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Micrococcus luteus</i>)
Xantholipin (96) ^[146, 147]	<i>Streptomyces flavogriseus</i>	HSP47 Inhibitor

Weiterhin sind nicht nur die polycyclischen Xanthon-Antibiotika als potente Wirkstoffe bekannt, sondern auch noch eine Vielzahl weiterer natürlich vorkommender Xanthon-Wirkstoffe.^[148] Als Vertreter mit einem sehr großen Spektrum an antibiotischer Wirkung und der strukturellen Vielfalt, sei das rote Pigment Bikaverin (**97**) genannt.^[149, 150, 151] **97** wird durch den Pilz *Fusarium fukikuroi* produziert und weist eine antiprotozoale (*Leishmania brasiliensis*) und eine cytotoxische Wirkung gegen mehrere Tumorzelllinien auf.^[149, 150, 151]



7.2 Biosyntheseegencluster des Lysolipins I (16)

Im Arbeitskreis von Prof. Dr. W. WOHLLEBEN und PD Dr. T. WEBER (Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen, IMIT) wurde die Lysolipin (**56, 16**)-Biosynthese hinsichtlich des Biosyntheseegenclusters untersucht. Um den Lysolipin (**56, 16**)-Biosyntheseegencluster zu finden, wurde die gesamte genomische DNA von *Streptomyces tendae* Tü 4042 untersucht und eine Cosmidbank mit dem integrativen Cosmid Vektor pOJ436 erstellt. Im Anschluss wurde ein PCR-Screening durchgeführt, um den Lysolipin (**56, 16**)-Biosyntheseegencluster zu identifizieren. Dazu wurden degenerierte Primer verwendet, für KS Genproben (KS-forward-primer: 5`-TSG CST GCT TGG AYG CSA TC-3`; KS-reverse-primer: 5`-TGG AAN CCG CCG AAB CCG CT-3`) und für Halogenasen (Halo-forward-primer: 5`-GCG GCT GCA GST GGD WSA TYC CGY T-3`; Halo-reverse-primer: 5`-CCS STG GAT CCS CGG GTC SAB GAA GC-3`)^[124] Drei Cosmide (4H04, 4022 und 3J01: positiv auf KS_α und Halogenase) wurden heterolog in *Streptomyces albus* exprimiert und auf ihre Produktion hinsichtlich Lysolipin (**16**) untersucht (Abbildung 7-4).^[35] Dazu wurden Extrakte aus der heterologen Expression in *S. albus* mittels HPLC-MS analysiert. Der Stamm *Streptomyces albus* (J1074) wurde hierzu eingesetzt, da dieser ein geeigneter Wirt für eine heterologe Expression ist.^[152]

Als Negativkontrolle diente *S. albus* mit dem Cosmid 2k05, der nicht-funktionelle Teile aus dem Kirromycin-Biosynthesecluster beinhaltet (*S. albus* kirr-2K05).^[124] Das Cosmid 4H04 zeigte in der HPLC-MS, dass Lysolipin (**56**, **16**) produziert wurde. Eine Massenspur von $m/z = 598$ $[M+H]^+$, ein identisches UV-Chromatogramm sowie ein typisches Isotopenmuster analog zum Lysolipin (**56**, **16**) konnte identifiziert werden (Abbildung 7-4).^[124]

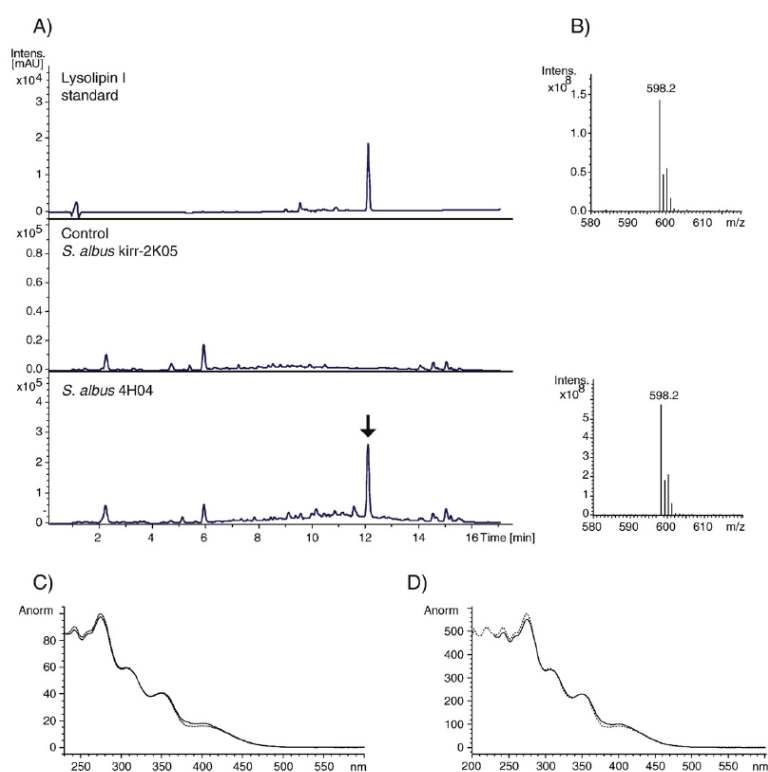


Abbildung 7-4: **A:** HPLC-DAD-Analytik mit Lysolipin I (**16**) (Standard), dem Cosmid 4H04 in *Streptomyces albus* und Negativkontrolle. **B:** Massenspektrum, positive Ionen $[M+H]^+$ von Lysolipin I (**16**) und dem im *S. albus* gebildeten Lysolipin I (**16**). **C:** UV/Vis-Spektren von Lysolipin (**16**) und dem Lysolipin-Standard aus *S. albus*. **D:** UV/Vis-Spektren von Lysolipin (**16**) aus *S. albus* und aus der HPLC-UV-Naturstoff-Datenbank-Referenz.^[153] Abbildung entnommen aus [124].

Die Produktion von Lysolipin I (**16**) konnte damit für das Cosmid 4H04 in *S. albus* bestätigt werden. Dadurch wurde gezeigt, dass alle Gene, die zur Biosynthese der Lysolipine benötigt werden auf dem Cosmid 4H04 vorhanden und intakt waren. Dieses Cosmid wurde durch Shotgun-Sequenzierung vollständig sequenziert und annotiert, d.h. es wurde ein Vorschlag für eine funktionelle Zuordnung der Gene durch einen

Vergleich verschiedener Sequenzen oder Datenbanken durchgeführt.^[124] Die Annotation wurde mit dem Programm CLUSEAN verwirklicht.^[124, 154] Der Gencluster umfasst 42 kb mit 42 Genen. Die Gene wurden mit *llp* für Lysolipin (56, 16) und mit Buchstaben und Zahlen nach ihrer Funktion benannt (z.B. Cyclasen I-III: *llpCI-III*). Es konnten Gene für eine Polyketidsynthase vom Typ II (PKS II; „Minimale PKS“), drei Cyclasen, Reduktasen / Oxygenasen, eine Halogenase, Methyltransferasen, eine Amidotransferase, fünf Regulatoren, ein Exporter und sechs weitere Proteine mit noch nicht geklärter Funktion identifiziert werden (Abbildung 7-5).

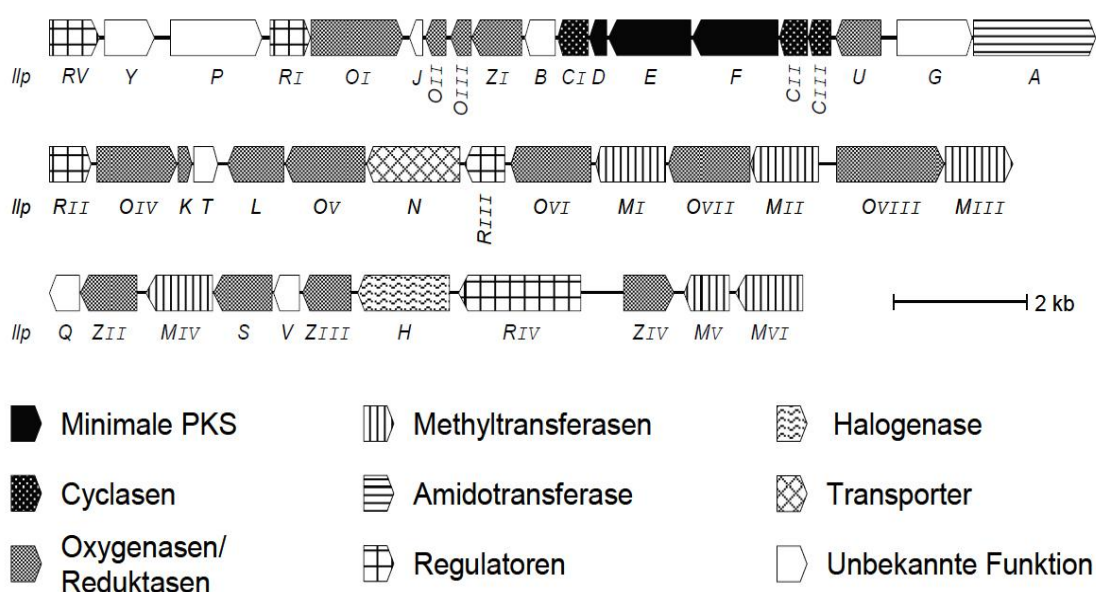


Abbildung 7-5: Schematische Darstellung des Biosyntheseclusters der Lysolipine (57, 16). Jedes Gen wird durch einen Pfeil dargestellt, der die Richtung der Transkription und den Anfang und das Ende des Proteins (ORF, open reading frame, offener Leserahmen) angibt. Abbildung entnommen aus [35].

7.2.1 Überblick über minimale PKS II-Systeme

Durch die Methode der kombinatorischen Biosynthese werden neue Polyketide erzeugt, indem verschiedene Komponenten aus einem PKS-Komplex mit anderen Genen verschiedener Biosynthesewege genetisch kombiniert werden. Ein Beispiel für PKS I ist in Kapitel A 3 genauer beschrieben.

Ganz andere Möglichkeiten gelten für PKS II-Systeme. Dazu werden beispielweise bestimmte Gene, wie das Initiation-Modul einer PKS II, heterolog exprimiert und mit den enzymatischen Funktionen des neuen Wirts kombiniert. Wenn beispielsweise eine Kombination der act PKS bzw. der tcm PKS mit dem Loading Modul aus der R1128 (98)-Biosynthese verwendet wurden, konnten dadurch neue Polyketide isoliert werden (R1128 (98)).

Bei der minimalen PKS wird oft nur dieses komplette Set in seiner gesamten Genomsequenz an notwendigen Genen exprimiert, denn einzelne Module für eine Verlängerung durch Malonyl-CoA-Bausteine existieren hier nicht. Häufig geschieht dieses zusammen mit Cyclasen bzw. Aromatasen. Zuweilen werden diese Enzyme sogar zusammen mit verschiedenen Kettoreduktasen exprimiert.^[155] Als Voraussetzung für diese Expression der minimalen PKS II ist es notwendig, dass der Biosynthese-Gencluster bekannt ist.

Heute existieren verschiedene, literaturbekannte Experimente zur heterologen Expression von PKS II-Genprodukten, von denen im Folgenden einige Beispiele für die verschiedenen Strukturklassen der isolierten Produkte beschrieben werden.

Die minimale PKS von Actinorhodin (99, act PKS), KS_{α} , KS_{β} und ACP, heterolog in *Streptomyces parvulus* exprimiert und hinsichtlich der gebildeten Produkte untersucht.^[156] Dabei wurde als Metabolit das Aloesaponarin II (100) isoliert. Es ist ein C_{15} -Grundgerüst, welches aus einer spontanen Cyclisierung einer C_{16} -Vorstufe entstanden sein könnte (Abbildung 7-6). Diese Vorstufe wird wahrscheinlich durch die „minimale“ act PKS mit den Domänen KS_{α} , KS_{β} und ACP gebildet.

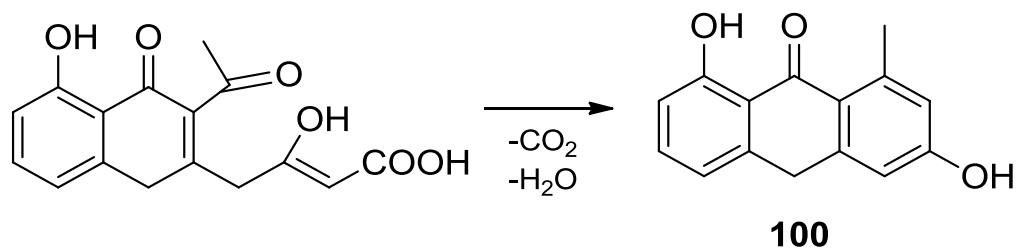
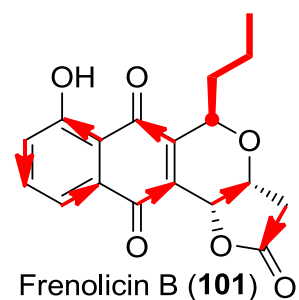
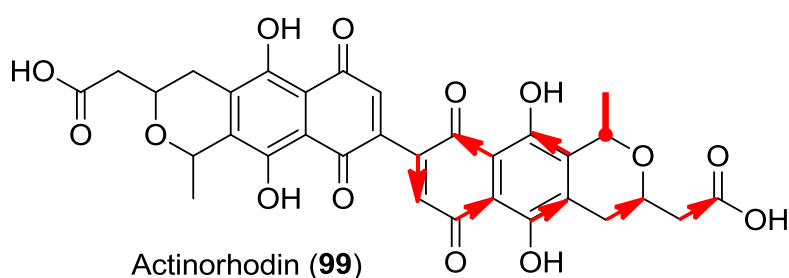
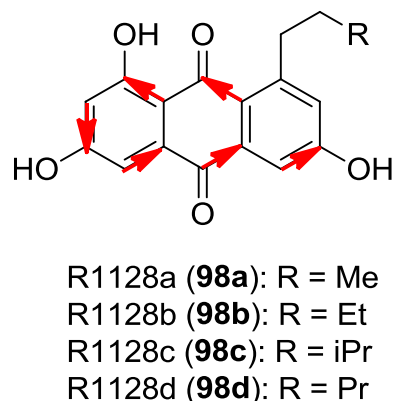
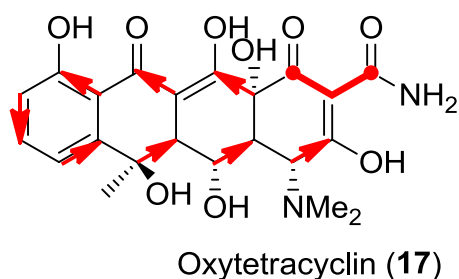
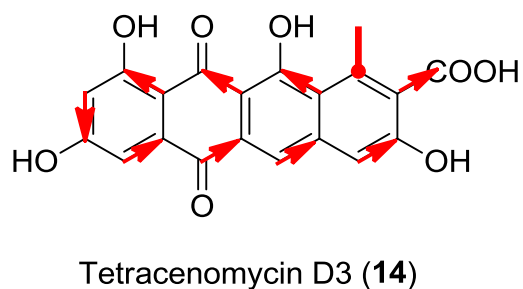
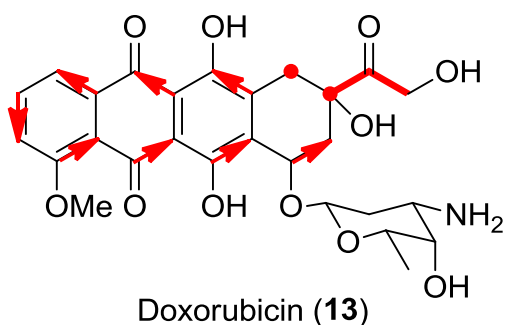


Abbildung 7-6: Aloesaponarin II (**100**) und mögliche Vorstufe als Produkte der heterologen Expression der min act PKS.

Da die Monomere des Actinorhodins (**99**) formal aus 8 Acetateinheiten (C_{16}) aufgebaut werden, wird daraus ersichtlich, dass eine minimale PKS für die Länge der Polyketidkette verantwortlich ist. Allerdings kann daraus keine strukturelle Vorhersage für die genaue chemische Struktur der neuen Polyketide getroffen werden. Beispielsweise fehlt Aloesaponarin II (**100**) im Vergleich zu den Monomeren von **99** ein Kohlenstoffatom. D.h. die Decarboxylierung, die zu **100** führt, findet beim natürlichen Produzenten von **99** nicht statt. Wird ein Vergleich der Starteinheiten von verschiedenen PKS II-Metaboliten untersucht, so zeigen Tetracenomycin D3 (**14**) und Actinorhodin (**99**) einen Acetatbaustein als Starteinheit. Doxorubicin (**13**) wird mit einem Propionat, Oxytetracyclin (**17**) mit einer Malonamyl-CoA-Einheit und Frenolicin B (**101**) mit einer Butyrateinheit gestartet. Bei R1128a-d (**98a-d**) ist die Starteinheit von dem vorhandenen organischen Substituenten abhängig.^[104] Dadurch wird bestätigt, dass bei einer PKS II nicht nur Malonyl-CoA als Starteinheit Verwendung finden kann, wobei die Beladung noch nicht ganz geklärt ist (Kapitel A 1; S. 16-18).



Die Faltung einer Polyketidkette wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Werden zusätzliche Enzyme, wie z.B. Ketoreduktasen oder Cyclasen mitexprimiert, kann dieses einen großen Einfluss auf die Faltung einer Polyketidkette oder auch die Ringschlüsse nehmen.^[157, 158] Dies zeigt sich auch im Vergleich von der minimalen PKS von Actinorhodin (**99**) und Tetracenomycin D3 (**14**, tcm PKS), denn bei **14** erfolgt eine

Kondensation zwischen C-9 und C-14 (Decaketid), während bei **99** eine Kondensation zwischen C-5 und C-10 (Oktaketid) resultiert (Abbildung 7-7).

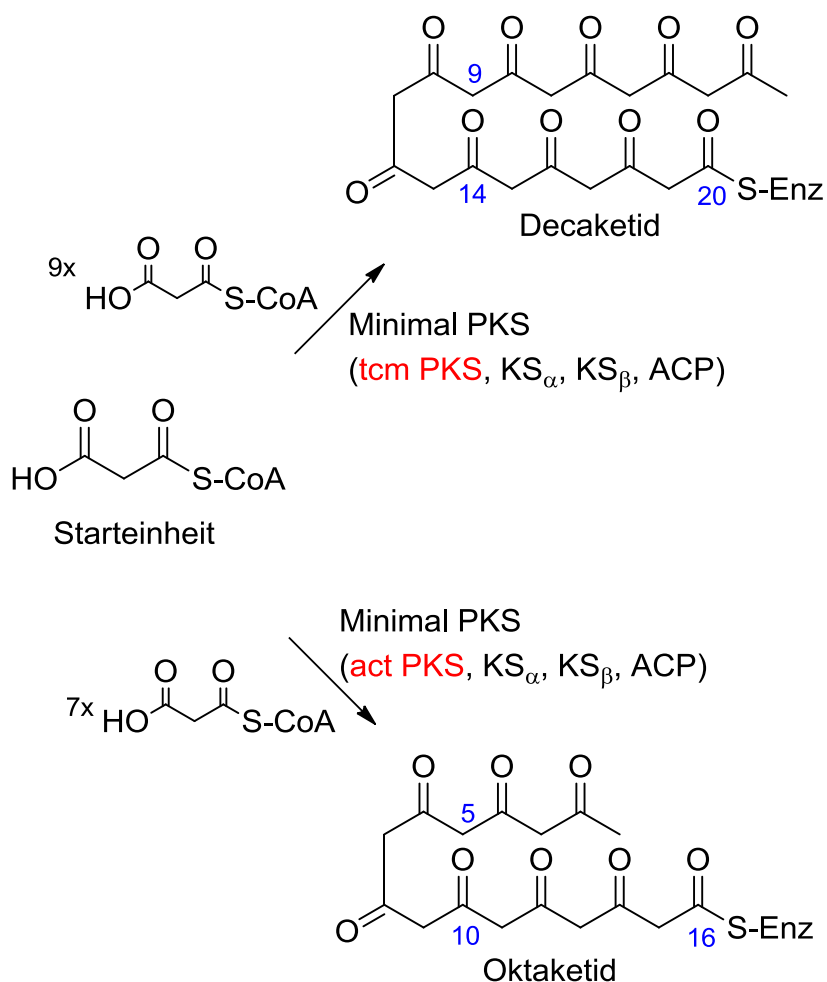


Abbildung 7-7: Hypothese zu den Primärprodukten der minimalen PKS. Die tcm PKS bildet ein Decaketid; Die act PKS bildet ein Oktaketid.^[157, 159, 160]

Die Gruppe von C. KHOSLA führte Experimente zur heterologen Expression durch und isolierte die Produkte. Dabei wurde beobachtet, dass die tcm PKS und die act PKS eine unterschiedliche Kettenlänge ausbilden. Wie erwartet wurde bei der tcm PKS ein Decaketid (C₂₀) und bei der act PKS ein Oktaketid (C₁₆) gebildet.^[157, 159, 160] Es fand eine heterologe Expression der act PKS (KS_α, KS_β, ACP zusammen mit KR und CYC/ARO, Abbildung 7-8) und der tcm PKS (KS_α, KS_β, ACP zusammen mit KR und CYC/ARO, Abbildung 7-9) statt. Die chemischen Strukturen entsprechen jedoch nicht dem

erwarteten Faltungsmuster. Stattdessen bilden sich spontan ohne weitere Enzyme die Verbindungen SEK4 (**102**) und SEK4b (**103**). Diese wurden charakterisiert. Durch die zusätzliche Expressierung von Kettoreduktasen und Aromatasen bzw. Cyclasen konnten zusätzlich weitere Verbindungen isoliert werden: SEK34 (**104**), DMAC (**105**) und Mutactin (**106**) (Abbildung 7-8).^[157, 158, 159, 161]

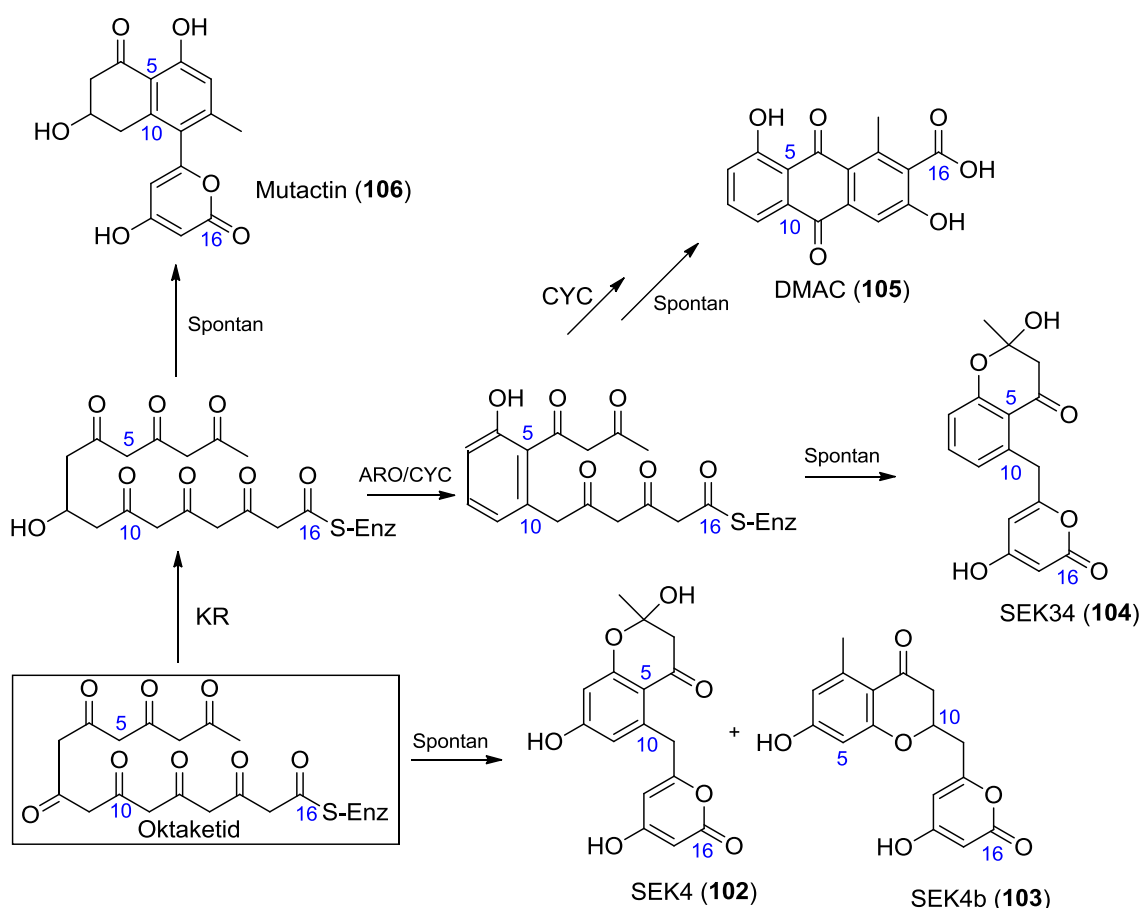


Abbildung 7-8: Verschiedene Cyclisierungsprodukte ausgehend von dem Oktaketid der act PKS: Identifizierte Produkte durch heterologe Expression der act PKS (KS_{α} , KS_{β} und ACP) mit KR und CYC/ARO; ARO = Aromatase; CYC = Cyclase; KR = Kettoreduktase.^[157, 158, 159]

Bei einem Vergleich der isolierten Produkte aus act PKS-Experimenten mit denen der tcm-PKS, resultieren sehr ähnliche Kettenfaltungen, wobei die C₂₀-Kettenlänge erhalten bleibt. Aus der kombinatorischen Biosynthese konnten KHOSLA *et al.* SEK 15 (**107**), SEK15b (**108**), RM20 (**19**), RM20b (**110**), RM20c (**111**) und RM80 (**112**) isolieren (Abbildung 7-9).^[157, 158, 159]

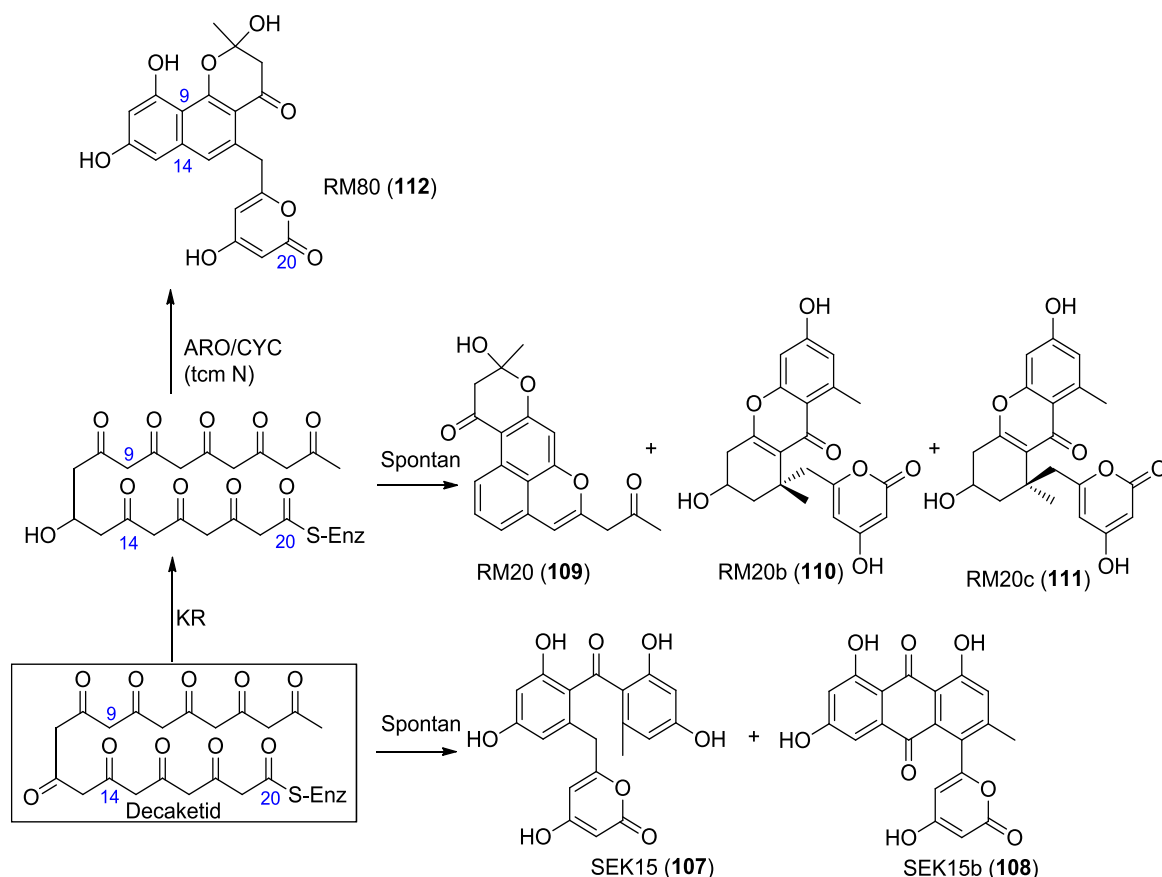


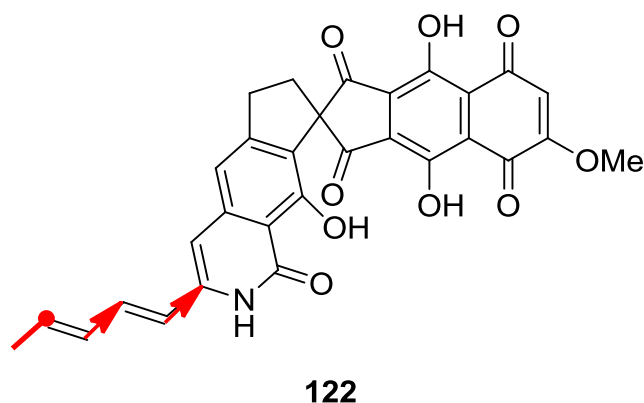
Abbildung 7-9: Verschiedene Cyclisierungsprodukte ausgehend von dem Decaketid der tcm PKS: Identifizierte Produkte durch heterologe Expression der tcm PKS (KS_{α} , KS_{β} und ACP) mit KR und CYC/ARO; ARO = Aromatase; CYC = Cyclase; KR = Ketoreduktase.^[157, 158, 159]

Durch die heterologe Expression in verschiedenen neuen Wirten ist die minimale PKS in der Lage, daraus eine kleine Substanzbibliothek neuer bzw. modifizierter Substanzen aufzubauen.^[157] Einen sehr guten Überblick einer solchen Substanzbibliothek haben KHOSLA *et al.* beschrieben.^[162]

Ein weiteres, beschriebenes und gut untersuchtes Beispiel einer genetischen Manipulation eines Biosyntheseweges mit einer minimalen PKS ist das *whiE*, das für die Struktur eines grauen Sporenpigments in *Streptomyces coelicolor* codiert.^[163] Interessanterweise konnten bei dieser minimalen PKS verschiedene Polyketide charakterisiert werden, welche eine unterschiedliche Kettenlänge besitzen. Aus 12 Malonyl-CoA-Bausteinen werden die Produkte TW93c-TW93h (**113–118**) gebildet. Wird jetzt eine Cyclase aus dem *whiE*-Biosyntheseweg mit exprimiert, entsteht aus 12 Malonyl-CoA-Bausteinen nur ein Produkt, TW95a (**119a**), welches durch Luftsauerstoff

zu TW95b (**119b**) oxidiert wird. Außerdem konnte beobachtet werden, dass aus sieben Acetateinheiten das TW93a (**120**) und aus 11 Acetateinheiten das TW93b (**121**) gebildet werden (Abbildung 7-10).

Das letzte hier erwähnte Beispiel ist das Fredericamycin A (**122**), welches Antitumor-Wirkung besitzt. **122** wurde 1981 von PANDEY *et al.* aus *Streptomyces griseus* (FCRC-48) isoliert und Biosynthesestudien unterzogen.^[164]



2005 konnte von SHEN *et al.* der Biosynthesegencluster von Fredericamycin A (**122**) identifiziert, sequenziert, analysiert und heterolog exprimiert werden.^[165] Damit ist dieses Pentadecaketid das Polyketid mit der längsten Polyketidkette, welches bisher sequenziert wurde.^[166] Weitere *in vivo* Untersuchungen haben ergeben, dass die Enzyme *fdmM* und *fdmM1* eine neue Familie von Oxygenasen darstellt, wodurch neue Fredericamycine produziert und charakterisiert werden konnten.^[167]

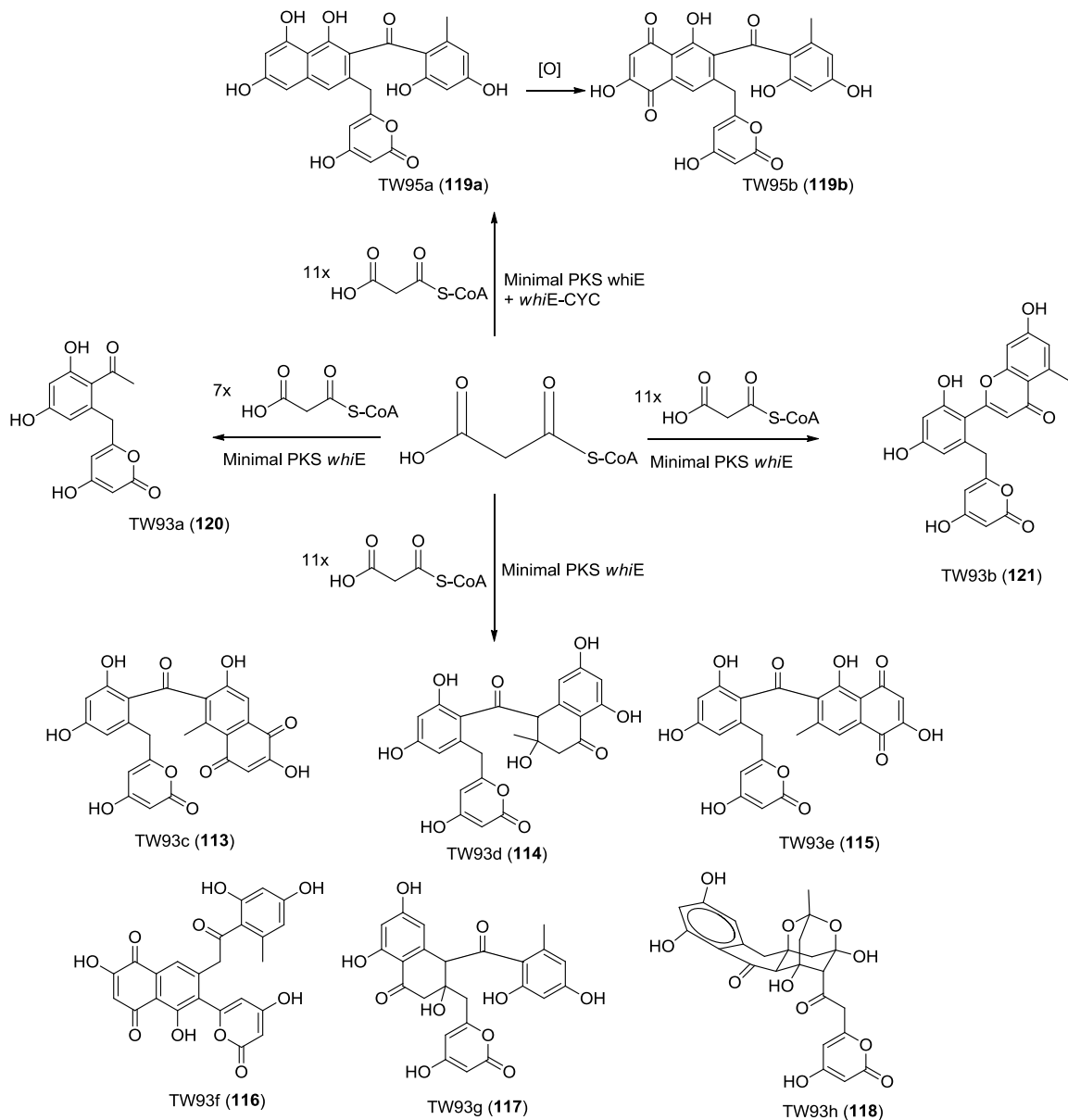
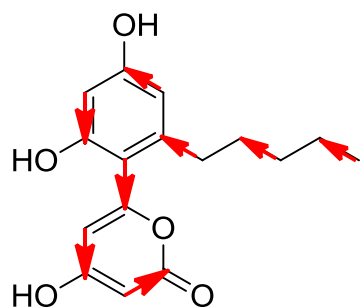


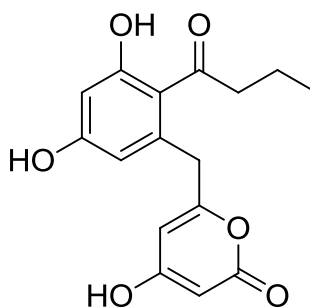
Abbildung 7-10: Strukturen der charakterisierten Polyketide, die durch die minimale *whiE* PKS gebildet werden. CYC = Cyclase.^[36]

Aufbauend auf diesen Studien zu Post-PKS-Biosynthesereaktionen der Fredericamycine (**122**) konnten weitere Untersuchungen folgen. Es wurde von der *act* PKS der CLF (Chain-Length-Factor) zusammen mit der minimalen PKS von Fredericamycin A (**122**) exprimiert. Daraus sind folgende Hauptprodukte identifiziert worden: SEK4 (**102**), SEK4b (**103**), d.h. die Länge der PKS-Kohlenstoffkette wurde nun vom CLF der *act* Biosynthese bestimmt, sodass Oktaketide entstanden sind (Abbildung 7-7). Weiterhin war es möglich drei neue Polyketide zu isolieren: AD284a (**123**), AD284b (**124**), und

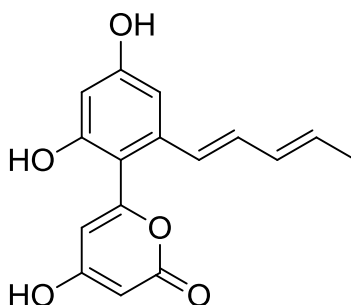
AD284c (**125**).^[168] Es handelt sich um Oktaketide gemäß ihrer Kettenlänge aus act PKS-Experimenten.



AD284a (**123**)



AD284b (**124**)



AD284c (**125**)

Von KHOSLA *et al.* wurde der CLF von **122** untersucht.^[166] Hierbei wurde die minimale PKS von Fredericamycin A (**122**, *fdm* min PKS, *fdm*FGH, KS_{α} , KS_{β} (CLF) und ACP) mit der *act* KR kombiniert (einer Ketoreduktase aus der Biosynthese von Actinorhodin (**99**), Abbildung 7-11 A). Weiterhin wurde *fdm*W (Phosphogantetheinyltransferase, Pptase) sowie eine MCAT (Malonyl-CoA:ACP-Transferase) aus *S. coelicolor* mit exprimiert (Abbildung 7-11 A). *fdm*W ist für die Aktivierung von *fdm*H und die MCAT für die Beladung der *fdm* min PKS verantwortlich. Ohne das Vorhandensein von *fdm*W wurde kein Fredericamycin (**122**) produziert.^[166]

Durch den Einbau von 11 Malonyl-CoA Bausteinen wird TW94b (**126**) und TW94c (**127**) erhalten, wohingegen durch den Einbau von 12 Malonyl-CoA Einheiten das TW94d (**128**) erzeugt wird (Abbildung 7-11 A1, Abbildung 7-11 A2). Weiterhin wurde beobachtet, dass AD210a (**129**) gebildet wurde, wozu eine Dehydratase (DH) und eine Enoylreduktase (ER) aus dem Fettsäurestoffwechsel des Primärstoffwechsels von

Streptomyces coelicolor benötigt wurde. Es kann daher von einem `cross-talk` zwischen Sekundär- und Primärstoffwechsel ausgegangen werden, der zu neuen chemischen Strukturen führt (Abbildung 7-11 B). *fdmS* konnte die Funktion einer Ketosynthase (KS) und *fdmC* der einen Ketoreduktase (KR) zugeordnet werden.

Während der regulären Biosynthese von Fredericamycin A (**122**) wird die Polyketidkette durch *fdmH*, *fdmS*, *fdmC* und *fdmW* initiiert, wozu eine Dehydratase (DH) aus dem Fettsäurestoffwechsel des Primärstoffwechsels von *Streptomyces griseus* verwendet wurde (`cross-talk`). Die Kettenverlängerung erfolgt mit der min PKS (*fdmFGH*) und einem durch `cross-talk` verwendete MCAT, wodurch das Fredericamycin A (**122**) produziert wurde. (Abbildung 7-11 C).

Nicht nur beim Fredericamycin A (**122**) wurden Experimente zur Variation der Starteinheit durchgeführt. Cox *et al.* und KHOSLA *et al.* haben eine genetische Manipulation auch bei der act PKS^[169] sowie dem R1128 Loading Modul^[170] erzeugt. Weitere Beispiele für kombinatorische Biosynthesen mit verschiedenen minimalen PKS II Systemen wurden u.a. von MÄNTSÄLÄ *et al.*^[171] und STROHL *et al.*^[172] beschrieben.

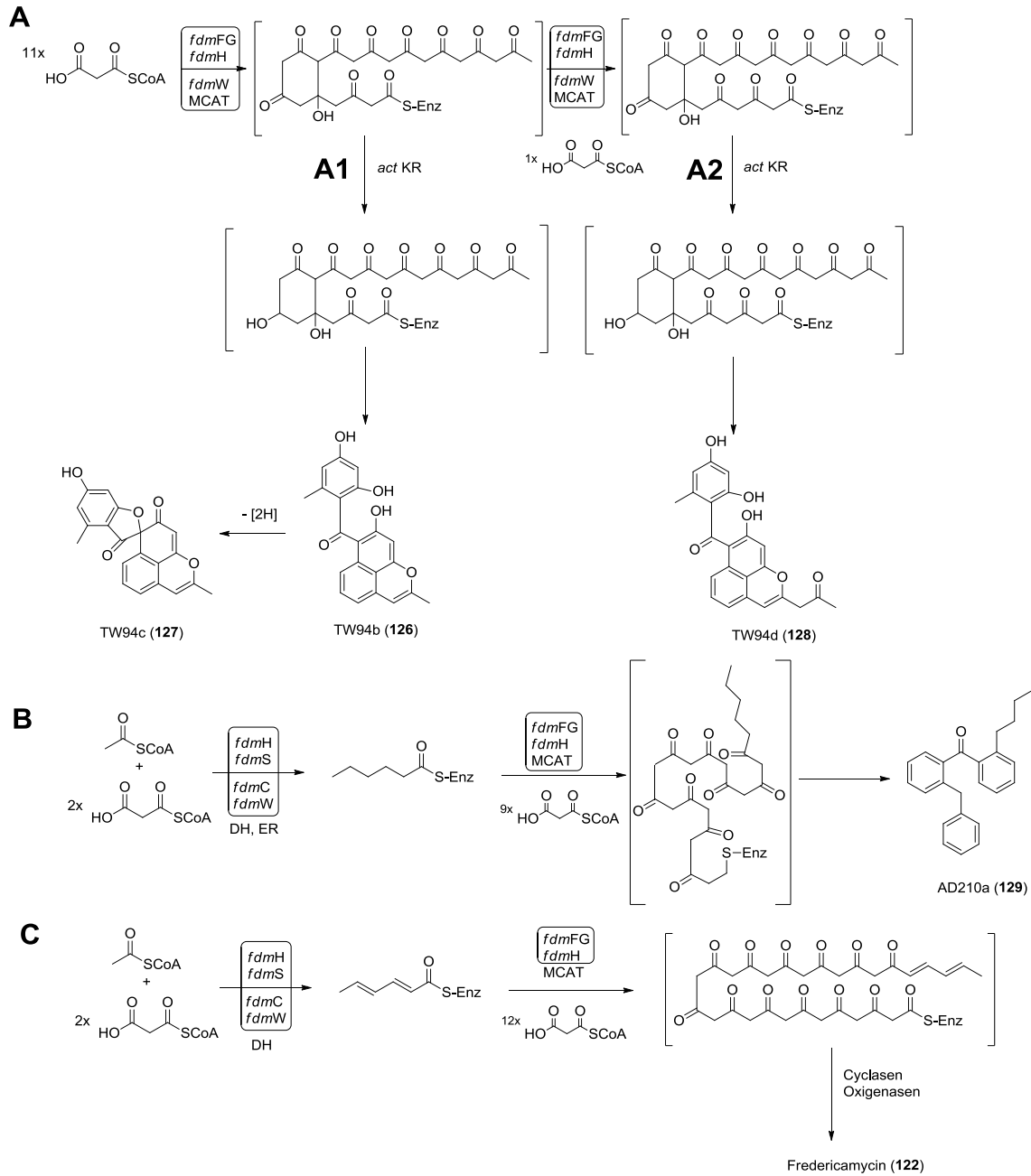


Abbildung 7-11: Biosynthese-Hypothese von TW94b-d (**126-128**) und AD210a (**129**). **A**: Heterologe Expression in *Streptomyces albus* J1074 mit Co-Expression von einer act KR, Ketoreduktase aus der Actinorhodin Biosynthese und einer MCAT ; **A1**: Einbau von 11 Malonyl-CoA Einheiten; **A2**: Einbau von 12 Malonyl-CoA Einheiten; **B**: Gebrauch einer DH (Dehydratase) und einer ER (Enoylreduktase) aus dem Primärstoffwechsel von *Streptomyces coelicolor*; **C**: Reguläre Biosynthese von Fredericamycin A (**122**), im Wildtyp-Stamm *Streptomyces griseus*.^[166]

7.2.2 Funktion und Einordnung von beschriebenen Cyclasen

HERTWECK *et al.* haben Cyclisierungen unterschiedlicher Polyphenole zusammengefasst und mit dem discoidalen Resistomycin (**130**) verglichen (Abbildung 7-12).^[174] Zur Diskussion stehen die Benzoisochromanchinone (**131**), Angucycline (**132**) Tetracycline/Aureolic Acids (**133**), pentangulären Polyphenole (**134**), Anthracycline (**135**) und Tetracenomycin D3 (**14**). Zu den pentangulären Polyphenolen (**134**) gehören die Lysolipine (**56, 16**). Die beschriebene Einteilung der Cyclasen wurde aufgrund der Funktion und des involvierten Biosyntheseweges vorgenommen (Gruppen I–X; sortiert nach ihrem Farbcode; Abbildung 7-12). In Abbildung 7-12 wird gezeigt, dass in sämtliche Polyphenole (**14, 131–135**), die von einer PKS II bzw. minimalen PKS II gebildet werden, die wachsende Polyketidkette U-förmig hineingelegt wird und so die charakteristischen Grundgerüsten entstehen.^[174] Aufgrund der Anordnung der Cyclasen sind die polyphenolischen Grundgerüste teilweise linear oder gewinkelt aufgebaut (der Farbcode der einzelnen Cyclasen steht für die Funktion der Cyclasen; Gruppen I–X). Anders ist es beim Resistomycin (**130**), bei dem die wachsende Polyketidkette in S-Form gefaltet wird.^[173] Daraus entsteht ein discoidales, polyphenolisches Ringsystem (Abbildung 7-12).

Bei der Betrachtung der Cyclasen des Lysolipin (**56, 16**)-Biosynthesewegs ist eine gute Charakterisierung des Grundgerüsts ohne Post-PKS-Modifikationen gegeben (Abbildung 7-12; mit Pfeilen angedeutet). Alle beschriebenen Cyclasen können diese durch die jeweiligen farbigen Symbole (Abbildung 7-12) zugeordneten, spezifischen Grundgerüste aufbauen, wenn sie sich im Wildtyp-Produzenten befinden. Wie groß die Strukturvariation aus den minimalen PKS II-Systemen in anderen Expressionswirten sein kann, ist im Abschnitt zuvor ausführlich beschrieben.

Das polycyclische Xanthon-Antibiotikum Lysolipin (56, 16)

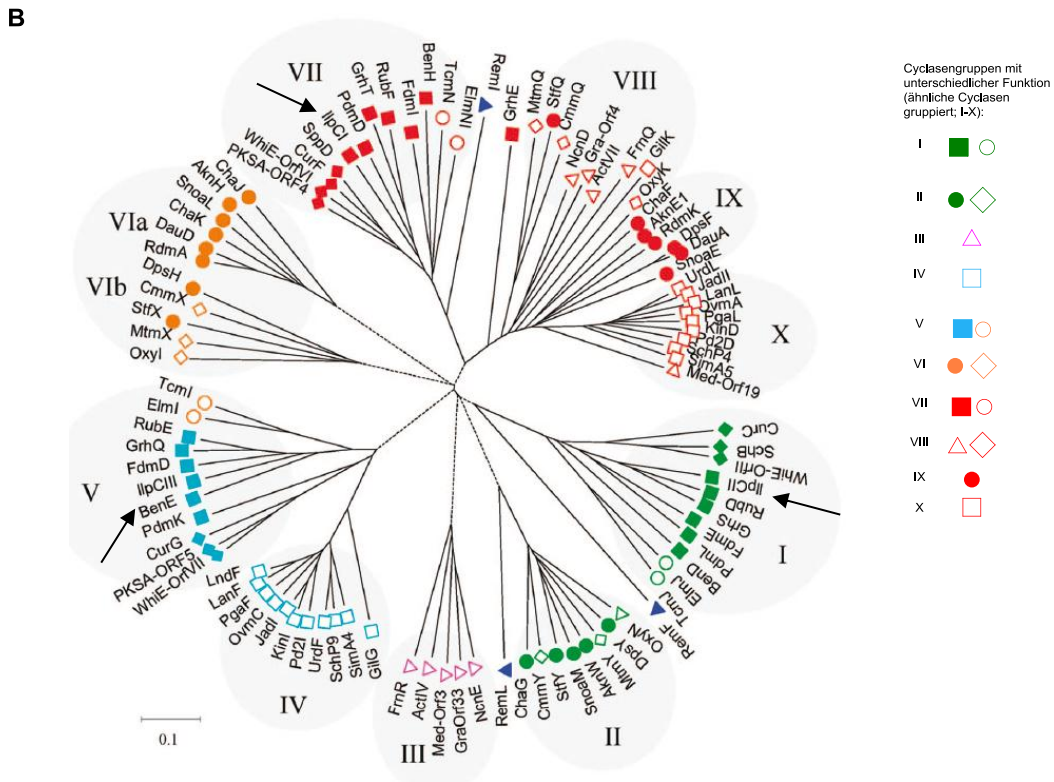
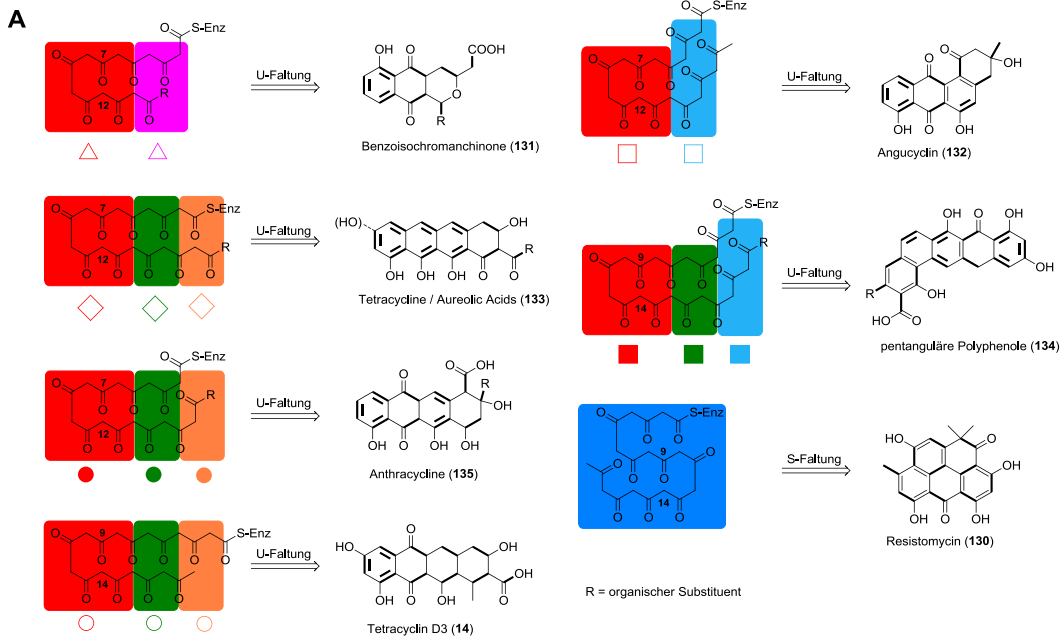


Abbildung 7-12: Beschriebene Cyclasen von PKS II Systemen. **A:** Cyclasen und ihre Cyclisierungsmuster. **B:** Gruppierung (I-X) von Cyclasen mit ähnlichen primären Cyclisierungsmustern. Der Farbcode steht für die Funktion der Cyclasen. *llpCI-CIII*: Cyclasen von Lysolipin (56, 16) mit Pfeilen angedeutet. Abbildung entnommen aus [174].

7.2.3 Herstellung von *Streptomyces albus* mit der minimalen PKS II von Lysolipin (56, 16)^[35]

Diese Vorarbeiten wurden von C. UNSIN während ihrer Promotion im AK Prof. Dr. W. WOHLLEBEN und PD Dr. T. WEBER (Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen, IMIT) angefertigt. Viele chemische Strukturen von Intermediaten in der Biosynthese vom Lysolipin (56, 16) sind noch nicht bestätigt. Um mögliche Vorläufer zu isolieren und die Aufklärung der Biosynthese voranzutreiben, wurden die Gene für die minimale PKS von Lysolipin (56, 16, *llpD*, E, F) zusammen mit den drei Cyclasen (*llpCI-CIII*) kloniert und mittels PCR amplifiziert. Dafür wurden Restriktionsschnittstellen, *HindIII* und *EcoRI*, eingeführt. Über diese Schnittstellen war es möglich, ein 4.1 kb-Fragment mit den für die lys PKS und Cyclasen benötigten Genen in den Vektor pSETermE**p* einzufügen. Das Vektor-Konstrukt mit Insert wurde pSETermE-mPc genannt, kurz `mPc` (Abbildung 7-13).

Enthalten sind die Gene für die min lys PKS (*llpD*, E, F) und die Cyclasen (*llpCI-CIII*) und werden kontrolliert von dem konstitutiven Promotor ermE**p*. Dieser trägt weiterhin eine Apramycin-Resistenzkassette (*aac(3) IV*) und einige Elemente für den Transfer und die Chromosomen-Integration in Actinomyceten (RP4ori, attP, int). Dieser Vektor wurde verwendet, da er eine konstitutive Expression der Gene mit dem Promoter der Erythromycin A (6)-Biosynthese ermöglicht. D.h. dass die Gene unabhängig vom Wachstumsstatus exprimiert werden (Abbildung 7-13).^[35] Als Negativkontrolle wurde ein Stamm verwendet, der mit einem Leervektor transformiert wurde, dem die lys min PKS (*llpD*, E und F) und die drei Cyclasen (*llpCI-CIII*) fehlen.

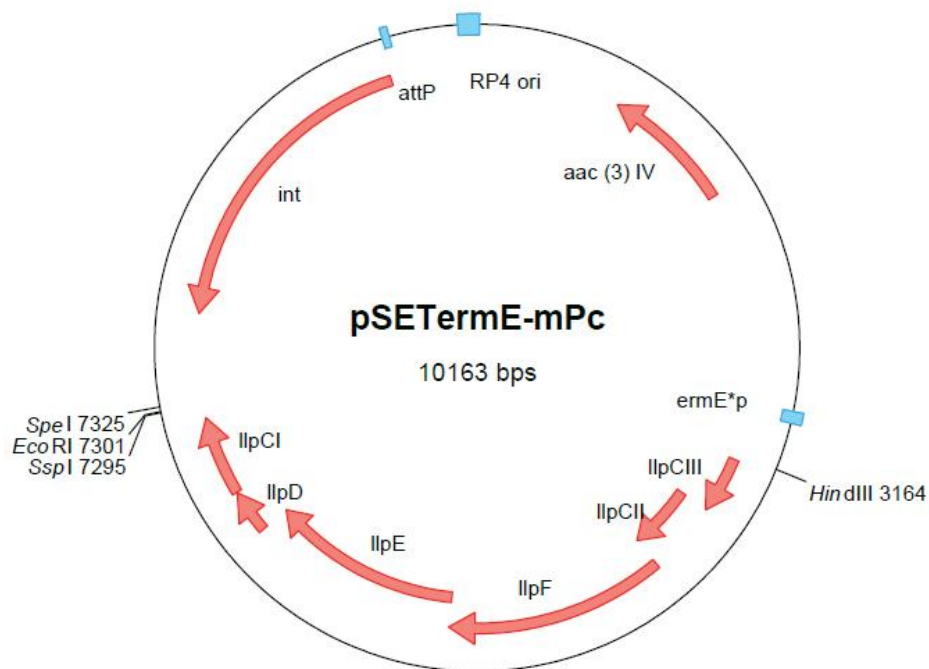
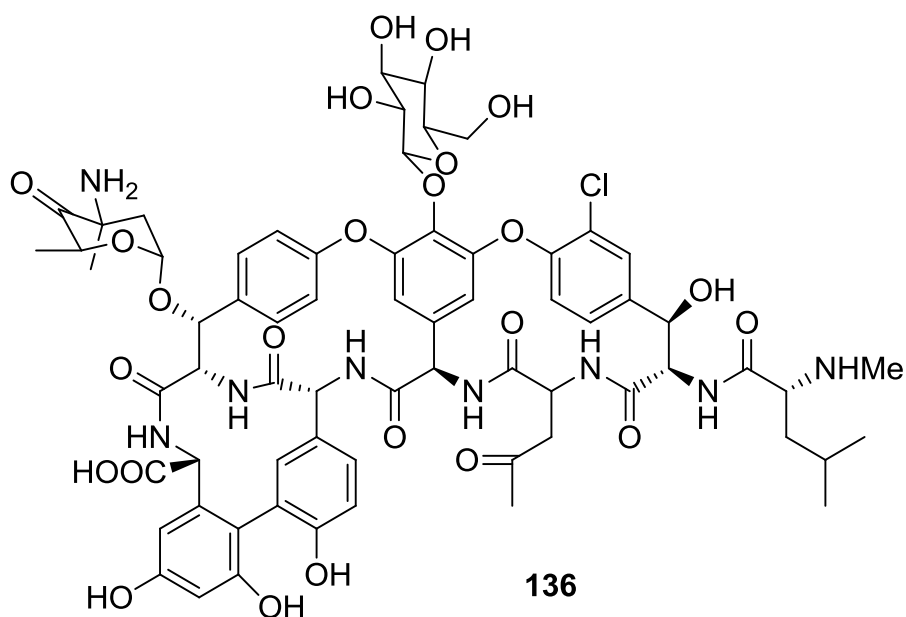


Abbildung 7-13: Plasmidkarte von pSETermE-mPc (minimale PKS mit Cyclasen). Dabei handelt es sich *IlpD-F* um die lys min PKS (KS_{α} , KS_{β} und ACP). *Ilp* steht für eine enzymatische Funktion aus der Lysolipin (56, 16)-Biosynthese. Abbildung entnommen aus [35].

Es wurde zunächst eine heterologe Expression in verschiedenen Actinomyceten-Stämmen durchgeführt. Diese heterologe Expression diente der Überprüfung, in wie weit eine Lysolipin-Vorstufe oder sogar neue Polyketidstrukturen gebildet werden. In der Tabelle 7-2 sind die Stämme für die heterologe Expression gezeigt, die mit dem gewünschten Vektor transformiert wurden.

Tabelle 7-2: Stämme für die heterologe Expression der minimalen lys PKS.

Stamm	Eigenschaft
<i>Streptomyces coelicolor</i> Δact	Bildet kein Actinorhodin (99) mehr
<i>Streptomyces albus</i> J1074	Gut geeignet für die heterologe Expression
<i>Amycolatopsis balhimycina</i> DSM5908	Bildet das Glycopeptid Balhimycin (136) ^[175]



Interessanterweise konnte bei dem Wachstum auf Agarplatten für alle drei ausgewählten Stämme eine Pigmentbildung beobachtet werden (Abbildung 7-14). Sowohl bei *Streptomyces coelicolor* Δ act-mPc, als auch bei *Streptomyces albus*-mPc wird ein dunkler Farbstoff (braun bzw. schwarz) in den Agar ausgeschieden, was bei der Negativkontrolle nicht der Fall ist. Anders ist es bei *Amycolatopsis balhimycina*-mPc. Hier verfärben sich die gebildeten Kolonien direkt (rot-braun). Wieder wird dieses Phänomen nicht bei der Negativkontrolle beobachtet. Durch diese Beobachtungen wird bestätigt, dass die lys PKS mit Cyclasen dafür verantwortlich ist, neue Substanzen produzieren zu können. Auch die Sporen bzw. gewachsenen Kolonien weisen ein anderes Erscheinungsbild auf (Abbildung 7-14). In Abbildung 7-14 wurde die Negativkontrolle mit pSETermE und der Stamm mit Insert (min PKS und Cyclasen) als mPc bezeichnet.

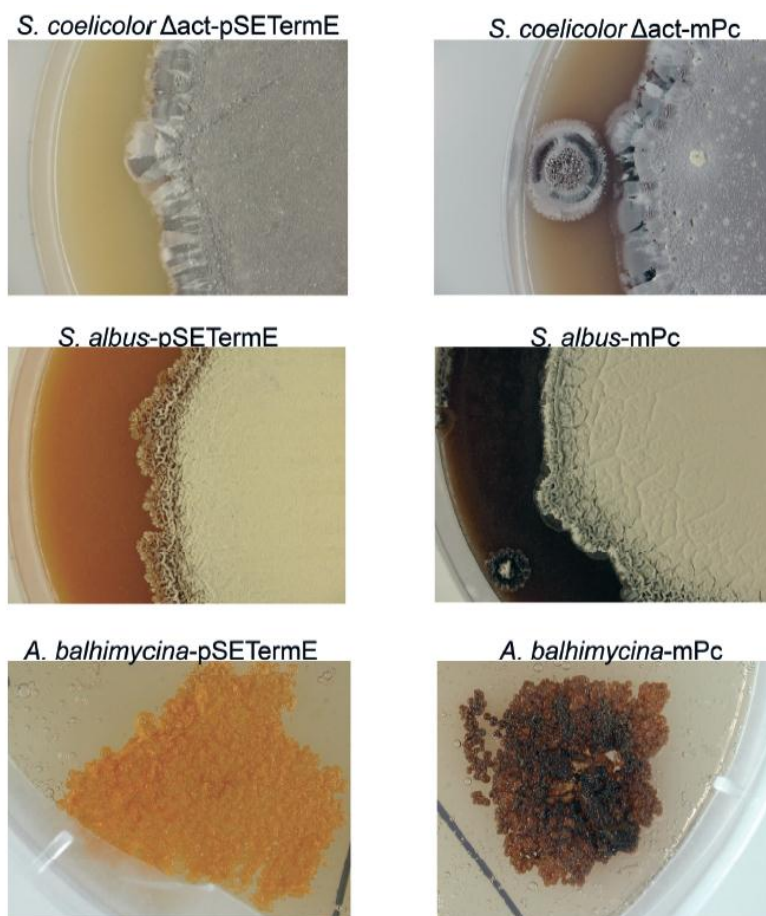


Abbildung 7-14: Pigmentbildung von transformierten Stämmen beim Wachstum auf Agarplatten. **Links:** Negativkontrolle; **Rechts:** Stämme mit minimaler lys PKS und Cyclasen (Vektor pSETerme-mPc). Abbildung entnommen aus [35].

Zur Überprüfung der neu produzierten Verbindungen wurden die zuvor genannten Stämme mit dem mPc-Insert in Kultur genommen. In gleicher Art und Weise wurde mit Kontrollstämmen mit dem Leervektor verfahren. Die Kulturextrakte wurden mittels HPLC-ESI-MS mit DAD überprüft. Im Anschluss erfolgte ein UV-Datenbank-Abgleich, um sicherzustellen, ob bekannte oder neue Substanzen gebildet worden sind (Tabelle 7-3 bis Tabelle 7-5).^[35] Die entdeckten, bekannten Substanzen gehören zu der Gruppe der Siderophore (Tabelle 7-3).

Tabelle 7-3: Gefundene Substanzen im Kontrollstamm aus *S. coelicolor* Δact.^[35]

Substanz	Retentionszeit [min]	(m/z)
Enterochelin	8.0	670 (M+H) ⁺
Dihydroxybenzoylserin-Trimer	6.8	687 (M+H) ⁺

Tabelle 7-4: Mittels HPLC-UV-Datenbank als neue Substanzen gefunden aus *S. albus*-mPc.^[35]

Retentionszeit [min]	(m/z)
5.7	448.4 (M+H) ⁺
10.8	627.6 (M+H) ⁺
12.6	697.6 (M+H) ⁺

Tabelle 7-5: Mittels HPLC-UV-Datenbank als neue Substanzen gefunden aus *A. balhimycina*-mPc.^[35]

Retentionszeit [min]	(m/z)
10.5	620.3 (M+H) ⁺

Die [M+H]⁺-Fragmente der neuen Substanzen konnten nicht in der Negativkontrolle identifiziert werden. Aus diesem Grund muss die Produktion dieser Metabolite durch die lys PKS mit Cyclasen verursacht worden sein. Alle drei oben genannten Stämme wurden in Schüttelkolben kultiviert, während *S. albus*-mPc zusätzlich noch im 10 L Fermenter kultiviert wurde. Durch die Aufarbeitung und Extrakt-Analyse mit der HPLC-ESI-MS und dem Vergleich mit der UV-Datenbank konnte gezeigt werden, dass hier nur die Substanz m/z = 448.2 bei einer Retentionszeit (R_t) von 5.7 Minuten gebildet wurde. Die anderen beiden Substanzen konnten nicht gefunden werden. Zu allen in Tabelle 7-4 und Tabelle 7-5 genannten Substanzen wurde im Rahmen der Dissertation von C. UNSIN noch kein Strukturvorschlag gemacht.^[35]

Bei der Aufarbeitung wurde lediglich der Kulturüberstand nach Zentrifugation bearbeitet. Die Zellen wurden nicht aufgeschlossen und untersucht. Daher wäre es möglich, dass noch weitere unbekannte Verbindungen, die nur im Mycel-Extrakt vorliegen, unbeachtet blieben. Bei den durch dieses HPLC-Screening entdeckten Metaboliten konnte bisher auch noch keine Korrelation in Bezug auf die gebildete Färbung des Agars hergestellt werden. Zudem wurden Bioaktivitätstests gegen *Bacillus subtilis* von Kulturextrakten aus *S. albus*-mPc, *S. coelicolor* Δ act-mPc und *A. balhimycina*-mPc durchgeführt. Es konnten aber keine Hemmhöfe erhalten werden.

Eine interessante Aufgabe der vorliegenden Dissertation ist die Reinstoffisolierung und Aufklärung der chemischen Struktur von neuen Verbindungen aus der heterologen Expression der lys min PKS II mit Cyclasen in den Expressionswirt *S. albus*.

8 Identifizierung des Genproduktes der min PKS II von **56** und **16**

A. TEXTOR hatte während ihrer Promotionszeit verschiedene Kultivierungsversuche (Kapitel B 3.1.2) mit *Streptomyces albus*-mPc (min PKS mit Cyclasen *llpCI-CIII*) und *Streptomyces albus* pSETermE*p (Negativkontrolle) unternommen. Dazu wurden bewachsene Agarplatten des AK WEBER (Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen, IMIT) bezogen. Der *S. albus* wurde ausgewählt, da in den Arbeiten von C. UNSIN mehrere unbekannte Substanzen in den Extrakten durch HPLC-UV Datenbankabgleich identifiziert wurden.^[35]

Aus Kultivierungsversuchen anhand von Agarkulturen (SM-Medium) wurden die Kulturüberstände mit Ethylacetat (EE) und die Zellen aufeinander folgend mit Aceton (Ac1, Ac2) und Methanol extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden einer dünnschichtchromatographischen Untersuchung unterzogen. Es konnte ein Unterschied im Metabolitenmuster der beiden Stämme (*Streptomyces albus*-mPc (lys min PKS mit Cyclasen) und *Streptomyces albus* pSETermE*p) identifiziert werden. Im Vergleich zur Negativkontrolle (*Streptomyces albus* pSETermE*p) konnte bei *Streptomyces albus*-mPc eine rote-rosa-farbene Substanz (Abbildung 8-1) detektiert werden. Durch die heterologe Expression der min PKS II (*llpD*, E, F) mit Cyclasen (*llpCI-CIII*) wurde diese rote Verbindung gebildet und stellt daher möglicherweise ein Intermediat der Lysolipin (**56**, **16**)-Biosynthese dar.

Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Isolierung und Strukturaufklärung der roten Substanz. Dafür muss u.a. eine Aufarbeitung etabliert werden.

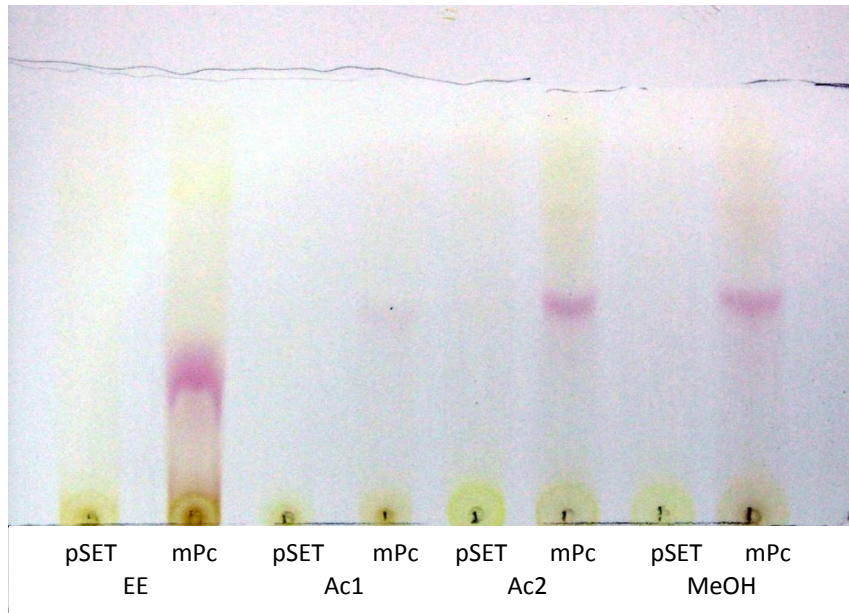


Abbildung 8-1: Dünnschichtchromatogramm von *S. albus*-mPc und entsprechendem Kontrollstamm. Laufmittel Methanol/Wasser 6:4, RP-Kieselgel. Kontrastierung wurde bearbeitet. **pSET**: Negativkontrolle, **mPc**: Stamm mit Insert. **EE**: Ethylacetat-Extrakt, **Ac1, Ac2**: Aceton-Extrakte, **MeOH**: MeOH-Extrakt.

8.1 Fermentationsoptimierung und Kultivierung

Fermentationsoptimierung

In den Expressionvektor wurde eine Apramycin-Resistenzkassette mit integriert. Durch Zugabe von Apramycin in die Kulturbrühe, wurde selektiert. Auf Grundlage der Erfahrung aus den oben genannten Vorarbeiten erfolgte die Kultivierung zunächst nur auf Agarplatten im SM-Medium mit 50 µg/mL Apramycin für 7 Tage bei 28 °C. Hierbei wurde jeweils ein größerer Ansatz von 2 oder 10 L gewählt, um letztendlich genügend Substanz für die Strukturaufklärung zu erhalten. Hierbei entsprachen 2 L Medium etwa 100 Platten und 10 L etwa 500 Platten. Dabei konnten die bewachsenen Agarplatten des Kontrollstammes von denen des Stammes mit Insert (min PKS II (*llpD*, E, F) mit Cyclasen (*llpCI*–*CIll*)) deutlich unterschieden werden. Der Agar des Kontrollstammes behielt eine braune Farbe, während bei der Kultivierung der Insertionsmutante der Agar schwarz gefärbt wurde (Kapitel B 3.1.1, Abbildung 3-1). Aufgearbeitet wurde zunächst standardmäßig durch Extrahieren der Agarkulturen mit der dreifachen Menge Ethylacetat (EE) und Homogenisierung mittels eines Pürierstabs (Kapitel B 3.2).

In dem SM-Medium werden oft Flavonoide wie das Genistein und das Daidzin gebildet. Um diese Produktion zu verringern oder vollständig zu unterbinden und um die Produktion der Zielsubstanz zu erhöhen, wurden Variationen der Kultivierungen durchgeführt. Als Nährmedien wurden das SG- (Soja-Glucose), das SGM- (Soja-Glucose-Malonsäure; 15mm, 1.59 g Malonsäure) und das SGN-Medium (Soja-Glucose-Natriumacetat; 15mm, 1.25 g Natriumacetat) getestet. Jedem Medium wurde 50 µg/mL Apramycin hinzugefügt. Es wurde für 7 Tage bei 28 °C kultiviert. Zum einen sollte überprüft werden, ob eine Produktion der roten Substanz beim Austausch der Kohlenstoffquelle stattfindet und zum anderen ob eine erhöhte Produktion des roten Metaboliten durch die Zugabe von Malonsäure oder Natriumacetat resultiert. Aufgearbeitet wurde zunächst standardmäßig durch Extrahieren der Agarkulturen mit der dreifachen Menge Ethylacetat (EE) und Homogenisierung mittels eines Pürierstabs (Kapitel B 3.2). Es konnte in jedem Fall eine Produktion des roten Pigmentes identifiziert werden.

Um eine Produktion des roten Pigments in Flüssigkultur zu gewährleisten, wurden weitere Nährmedien wie M2 (Malzextrakt, Hefeextrakt, Glucose), M2⁺ (Malzextrakt, Hefeextrakt, Glucose, CaCO₃), G20 (Glycerin, Malzextrakt, Hefeextrakt), M65 (Malzextrakt, Hefeextrakt, Glucose, CaCO₃), Hafermehl, SGG (Glucose, Glycerin, Stärke) und NL 1358 (Glucose, Caseinpepton, Salze) getestet. Dieser Nährmedienvariation lag dem OSMAC-Ansatz (One Strain Many Compounds) zugrunde, nach dem ein Stamm unter verschiedenen Bedingungen verschiedene Metabolite oder verschiedene Mengen der Metabolite produzieren kann.^[97] Hier sollte versucht werden, durch Reihenversuche eine Erhöhung der Ausbeute der roten Pigmente zu erreichen. Pro Medium wurde ein Ansatz mit und ein Ansatz ohne Natriumacetat (492.18 mg / 400 mL; 15mm) durchgeführt. Bei den OSMAC-Experimenten wurde auf eine Kontrollfermentation mit dem Stamm ohne Insert (*Streptomyces albus* pSETermE*p) verzichtet, da die Festphasen-Kultivierungen im SM-Medium immer reproduzierbar die rote Färbung erbracht haben. Das wasserfreie Natriumacetat wurde so eingewogen, dass eine Endkonzentration von 15 mm (492.18 mg / 400 mL)

vorlag. Die Zugabe erfolgte vor dem Autoklavieren. Alle Fermentationsansätze wurden für 4 Tage bei 28 °C (Kapitel B 3.1.3.2) kultiviert.

Kultivierung in Schüttelkolben

Weil die Kultivierung auf Agarplatten zeitlich äußerst ineffektiv und vor allem die Aufarbeitung der einzelnen Agarplatten sehr zeitintensiv war, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erneut Experimente zur Flüssigkultivierung durchgeführt.

Für die Vorkultur wurde das Medium G20 versetzt mit Apra⁵⁰ (Apra⁵⁰-Stammlösung: 50 mg Apramycin / mL sterilem H₂O; 1 mL Apra⁵⁰ auf 1 L Medium) verwendet, da in zuvor beschriebenen Vorversuchen eine gute Produktion zu verzeichnen war. Als Inokulum diente 1 cm² (ca. 1/8) einer gut bewachsenen Agarplatte von *Streptomyces albus*-mPc. Für die Hauptkultur wurde das Medium M65 aufgrund seiner sehr guten Produktion verwendet, mit Apra⁵⁰ versetzt und für 96 h bei 28 °C inkubiert. Autoklaviertes XAD-16 (15 g pro 300 mL) wurde der Kultur nach 24 h hinzugefügt. Auf Vergleichsexperimente mit dem Kontrollstamm *Streptomyces albus* pSETermE*p wurde verzichtet.

Die Kulturbrühe wurde über Celite filtriert. Das Filtrat wurde mit Ethylacetat extrahiert, das XAD-Gemisch mit den Zellen mit Aceton/Methanol 7:3 aufgeschlossen und wie in Kapitel A 8.2 chemisch-analytisch untersucht. Die Extrakte wurden dünnschicht-chromatographisch (KG; Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 6:8:1 + 1 % TFA im Laufmittel) untersucht, wodurch gezeigt werden konnte, dass der rote Metabolit in dem Zellextrakt vorhanden war. Das Filtrat wurde daher verworfen.

Kultivierung im Fermenter

Da das rote Pigment aus Schüttelkolben (400 mL Ansatz) als Rohfraktion gewonnen werden konnte, erschien es äußerst reizvoll ein 'Up-scaling' der Fermentation in einem Rührkesselfermenter zu etablieren. Ziel war die Isolierung von ausreichender Menge,

etwa 5-10 mg Reinstoff, die zur Strukturaufklärung notwendig sind. Die Vorkultur wurde im Medium G20 angesetzt. Die Kultivierung der Hauptkultur fand in einem Fermenter mit einem Volumen von 4 L Medium M65 inklusive 400 mL Vorkultur statt. Inkubiert wurde für 96 h bei 28 °C und einer Luftzufuhr von 4 vvm (vvm: Volumen der Luft pro Volumen des Fermenters pro Minute; 4 vvm: bei 4 Litern = 16 L Luft/min). Nach der 24. Stunde wurde autoklaviertes XAD-16 zu der Kulturbrühe hinzugegeben. Wie zuvor beschrieben, wurde bei der Aufarbeitung das Filtrat verworfen und nur die Zellen mit dem XAD-Adsorberharz aufgearbeitet.

Fermentationskurve von Streptomyces albus-mPc

Um die Biogenese möglicher Metabolite zu bestimmen, wurde eine Fermentationskurve aufgenommen. Dadurch sollte ein Startpunkt einer möglichen Fütterung von markierten und unmarkierten Vorläufern bestimmt werden. Diese Fütterungsexperimente sollten im Rahmen der Vorläufer-dirigierten Biosynthese stattfinden (Kapitel A 8.1).

Es fand eine Kultivierung im Fermenter nach dem Standardverfahren in Medium M65 statt. Ab der 8. Stunde der Fermentation und anschließend im Abstand von 6 h, wurde jeweils eine Probe entnommen (20 mL). Durch Zentrifugation (10 Minuten, 9000 rpm) wurden die festen Bestandteile von der Flüssigkeit separiert und abdekantiert. Je 20 mL Überstand wurden mit 1 N HCl auf pH = 4.0–5.0 angesäuert (Kontrolle mit pH-Papier), dreimal mit je 20 mL Ethylacetat extrahiert, im Vakuum eingeeengt und ausgewogen. Die Zellen von jeweils 20 mL Probe, wurden zusammen mit dem XAD-Adsorberharz einmal mit 50 mL Aceton/Methanol (Verhältnis 7:3) im Ultraschallbad für ca. 20 Minuten extrahiert, filtriert, im Vakuum eingeeengt und ausgewogen.

Hierbei wurde keine DC-Analyse durchgeführt. Durch im Vorfeld unternommenen DC-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Zellen mit dem XAD-Adsorberharz die Zielverbindung enthielten. Daher wurden nur die Proben der Zellen mit XAD-16 mittels

HPLC untersucht und die Intensitäten des gemäß den UV-Spektren rot-farbenen Stoffes miteinander verglichen (Kapitel B 3.1.3.4). Durch diese Fermentationskurve wurde für zukünftige Fütterungsexperimente im Rahmen der Vorläufer-dirigierten Biosynthese der Fütterungsbeginn auf die 32. Stunde festgesetzt (Diagramm 3-1, Kapitel B 3.1.3.4). Die Methode der Vorläufer-dirigierten Biosynthese wurde genauer in der Einleitung beschrieben (Kapitel A 3).

Biogenesestudien mit [1,2-¹³C₂]Acetat

Biosynthesestudien wurden durchgeführt, um die Biogenese der neuen Metabolite aufzuklären. Die Kultivierung von *S. albus* pSETermE*p-mPc wurde mit Medium G20 als Vorkultur, Medium M65 als Hauptkultur durchgeführt und fand im 4 L-Fermenter statt. Um die Biogenese der charakterisierten neuen Verbindung aufzuklären, wurde eine Fütterung von [1,2-¹³C₂]Acetat (5.95 mM Endkonzentration) ab der 32. Stunde über einen Zeitraum von 20 h mittels einer Schlauchdosierpumpe durchgeführt. Parallel fanden zwei Kontrollkultivierungen in Schüttelkolben (pro Ansatz 4 × 300 mL Erlenmeyerkolben mit je 100 mL Medium) statt, um die Produktion des roten Pigmentes zu überprüfen. Eine Kontroll-Fermentation erfolgte ohne Zusätze und eine mit nicht-markiertem Acetat.

Bei den Kontroll-Fermentationen in Schüttelkolben wurde zur 32. Stunde und 24 h später mittels einer sterilen Spritze zugefüttert.

8.2 Optimierung der chemischen Analytik von Lysochinon-TH1 (137) und Lysochinon-TH2 (138)

Aufarbeitungsoptimierung und Experimente der Dünnschichtchromatographie

Bei der Projektübernahme von A. TEXTOR war aus Vorarbeiten lediglich bekannt, dass es sich bei den roten Pigmenten wahrscheinlich um Produkte handelt, die aus der heterologen Expression einer minimalen PKS II (*llpD*, E, F) mit Cyclasen (*llpCI*–*CIII*)

stammen. In Kapitel A 7.2.3 wurde die Erzeugung eines Expressionsvektors mit entsprechendem Insert mit der min PKS II (*llpD*, E, F) und Cyclasen (*llpCI–CIII*) beschrieben. Auf diesem Wege wurde der Vektor mit Insert (pSETermE*p-mPc) auf Grundlage des Leervektors pSETermE*p erzeugt. Eine minimale PKS (Kapitel A 7.2.1), sollte dazu befähigt sein, aromatische Grundgerüste aufzubauen. Wenn ohne Post-PKS-Modifikation im heterologen Wirt neue Verbindungen gebildet werden, sollten erwartungsgemäß nur Carbonylfunktionen oder Hydroxy-Funktionalitäten als funktionelle Gruppen auftreten.

Es konnte in Kapitel A 8.1 gezeigt werden, dass diese rot gefärbte Substanz reproduzierbar durch Kultivierung im Schüttelkolben und Fermenter gebildet wurde.

Als problematisch erwies sich jedoch die chemische Analytik mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC. Auf DC-Platten konnten viele rote Pigmente identifiziert werden. Diese zeigten eine starke Bandenverbreiterung sowie eine starke pH-Abhängigkeit bezüglich des chemischen Laufverhaltens. In ersten HPLC-Untersuchungen (RP-18, analytische Nucleodur) konnte von vorgereinigten Fraktionen, die UV-Spur von zwei dieser farbigen Pigmente identifiziert werden. Allerdings war es zunächst sehr schwierig, die richtigen Parameter für reproduzierbare Trennungen zu erhalten. Durch Veränderung des pH-Wertes konnten auch hier große Schwankungen in Bezug auf die Retentionszeit festgestellt werden. Genaueres wird am Ende dieses Kapitels beschrieben.

Um eine bessere Chromatographie zu erreichen, wurden verschiedene Laufmitteltests auf DC-Platten durchgeführt. Daraus sollte die präparative Isolierung des roten Pigmentes durch effiziente DC-Methoden ermöglicht werden. Verwendet wurden für diese Optimierungsversuche KG-, Nano-Sil-Diol- und RP-DC-Platten.

Dünnschichtchromatographie an Reversed Phase-Material

Zunächst wurde an RP-Material eine Optimierung durchgeführt. Verglichen wurde das Laufverhalten in Abbildung 8-2 mit verschiedenen Additiven im Laufmittel. Starke

R_f -Wert Schwankungen waren erkennbar. Eine Farbveränderung von rot (neutral) zu orange-rot (Laufmitteladditiv 0.05 % Ameisensäure) bzw. lila (Laufmitteladditiv 0.05 % konz. Ammoniak [32 %ig in Wasser]) konnte beobachtet werden. Durch ein basisches Laufmitteladditiv wurden die möglichen funktionellen Gruppen deprotoniert. Daraus resultierte eine starke Verminderung der Retention auf RP-Material, was sich in einem hohen R_f -Wert widerspiegelte. Das könnte auf das Vorhandensein von phenolischen OH- oder COOH-Gruppen hinweisen, da im basischen Milieu eine höhere Polarität ($-O^-$, $-COO^-$) vorliegt.

Es war notwendig eine sinnvolle Dünnschichtchromatographie zu erarbeiten, um definierte Banden zu erreichen. Dadurch wäre eine Aufreinigung auch an der HPLC oder mittels präparativer Dünnschichtchromatographie möglich. Daher war die DC-Analyse wichtig für die Reinstoffisolierung. Es wurden viele verschiedene Laufmittel mit und ohne Additive für RP-DC-Platten ausprobiert. In der Tabelle 3-1 (Kapitel B 3.2.1) sind alle im Laufe dieser Arbeit ausprobierten und verwendeten Laufmittel angegeben.

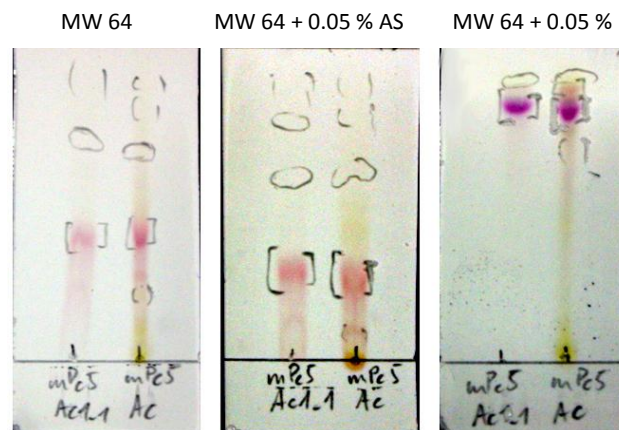


Abbildung 8-2: RP-Dünnschichtchromatogramm von Pigmentfraktionen aus *S. albus*-mPc. RP-KG, Methanol/Wasser 6:4. **Links:** ohne Additive, **Mitte:** mit Zusatz von 0.05 % Ameisensäure, **Rechts:** mit Zusatz von 0.05 % konz. Ammoniak (32 %ig in Wasser). Additive jeweils mit im Laufmittel. Kontrastierung wurde bearbeitet.

Es war eine große Herausforderung, auf dem RP-Material definierte Banden zu erhalten. Mit einem basischen Laufmitteladditiv hatte das rote Pigment eine geringere Retention und es konnte ein Farbumschlag zu lila beobachtet werden. Mit Säure als

Laufmitteladditiv hingegen wurde die Retention erhöht und ein Farbumschlag zu orange resultierte. Base und Säure als Laufmitteladditive sind daher in der folgenden Entwicklung von großem Interesse.

Bei der Kultivierung von *S. albus*-mPc fand jedesmal eine Produktion von vielen roten bis violetten Substanzen statt. Um definierte Banden der produzierten Metabolite auf der DC-Platte zu erhalten wurden im folgendem neben den Methanol/Wasser-Gemischen auch Aceton/Wasser-Gemische (7:3; 1:1 und 1:1 + 0.05 % TFA) verwendet (Abbildung 8-3). Wieder konnte eine Orangefärbung unmittelbar am Startfleck, aber auch eine rote Bande aus wahrscheinlich mehreren rot bis violett gefärbten Substanzen bei einem R_f -Wert von 0.48 identifiziert werden.

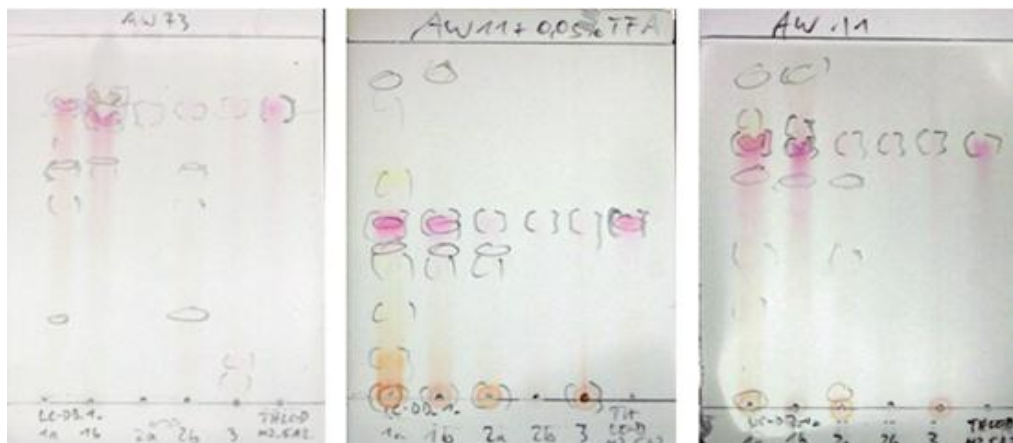


Abbildung 8-3: RP-Dünnschichtchromatogramm von Pigmentfraktionen aus *S. albus*-mPc mit unterschiedlichen Laufmitteln. **Links:** Aceton/Wasser 7:3; **Mitte:** Aceton/Wasser 1:1 mit 0.05 % Trifluoressigsäure; **Rechts:** Aceton/Wasser 1:1. Kontrastierung wurde bearbeitet.

Die rote Verbindung wurde in Anwesenheit der starken Trifluoressigsäure unpolarer und in Anwesenheit einer Base polarer. Dadurch wurde die Vermutung gestützt, dass es sich um ein Polyphenol handeln könnte, dessen Hydroxygruppen bei Säurezugabe protoniert und bei Basenzugabe deprotoniert vorliegen würden. Problematisch war, dass keine einzeln separierten roten oder violetten Banden identifiziert werden konnten.

Weitere DC's mit Aceton/Wasser-Gemischen (1:1 bzw. 1:2 mit jeweils 0.05 % Triethylamin) wurden angefertigt (Abbildung 8-4). Erstmals wurden aus dem roten Pigmentgemisch zwei Banden mit Aceton/Wasser 1:1 dünn-schichtchromatographisch getrennt. Es konnte eine rote und eine lila-farbene Bande identifiziert werden. Mit dem 1:2-Gemisch war lediglich eine relativ breite, nicht definierte Bande erkennbar. Der Extrakt wurde jeweils entweder in reinem Methanol oder Aceton aufgetragen, da hier die beste Löslichkeit gegeben war.

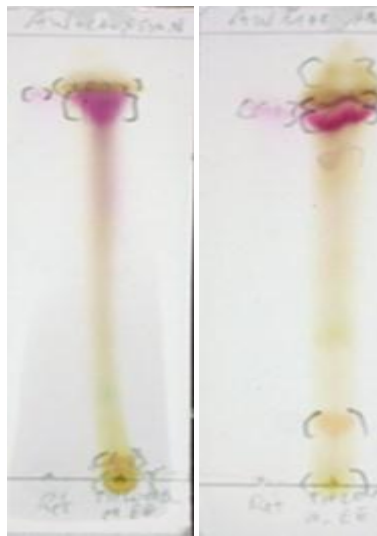


Abbildung 8-4: RP-Dünnschichtchromatogramm von Pigmentfraktionen aus *S. albus*-mPc. **Links:** Aceton/Wasser 1:1 + ,05 % Triethylamin; **Rechts:** Aceton/Wasser 1:2 + 0,05 % Triethylamin. Kontrastierung wurde bearbeitet.

Chromatographie an Diol-Kieselgel

Bisher war es mittels RP-DC-Methoden nicht gelungen, die notwendige Trennung der offensichtlich mehreren roten Pigmente zu erreichen. Deshalb wurde Nano-SIL-Diol-Material verwendet, um ein anderes Polaritätsfenster auszunutzen.

Die Polarität von Diol-Material liegt zwischen dem von RP- und dem von KG-Material.^[176] Im Gegensatz zum RP-Material ist es auch möglich, das Material komplett mit Wasser zu benetzen. Die verwendeten Laufmittel für Diol-Material sind in Tabelle 3-2 (Kapitel B 3.2.1) dargestellt. Wie schon beim RP-Material, konnten keine scharfen

und definierten Banden auf dem DC identifiziert werden. Zusätzlich konnte hier aber eine zweite rote Substanz am Startfleck ausgemacht werden. Dieses Phänomen wurde auch bei 0.05 % Ameisensäure als Laufmitteladditiv beobachtet. Mit 0.05 % NH₃ (32 %ig in Wasser) als Additiv im Laufmittel wurde der R_f -Wert deutlich erhöht. Hingegen war die zuvor identifizierte rote Substanz am Startfleck bei NH₃-Zugabe nicht mehr identifizierbar. Durch die Zugabe einer Base bei RP- bzw. Diol-Material wurde die Retention deutlich erniedrigt, wodurch die roten und violetten Pigmente nicht mehr voneinander trennbar waren. Das stützte wiederum die Vermutung, dass es sich um ein bzw. mehrere Polyphenole handeln könnte, wobei die phenolischen Hydroxygruppen deprotoniert vorliegen würden. Das würde die geringe Retention erklären. Auch hier war problematisch, dass keine separierten roten Banden, weder auf Diol-KG- noch auf RP-Material, erhalten werden konnten.

Kieselgel-Chromatographie

Parallel wurden Optimierungsversuche an KG-Material durchgeführt, um die Chromatographie zu verbessern. Die dazu verwendeten Laufmittel mit bzw. ohne Additive sind in der Tabelle 3-3 (Kapitel B 3.2.1) aufgeführt. Es konnten keine definierten Banden erhalten werden, d.h. die vielen verschiedenen roten Farbpigmente konnten nicht einzeln voneinander separiert werden.

Durch die unzureichend gute und wenig effiziente Chromatographierbarkeit an RP-, Diol- und an Kieselgel-Material wurden andere Faktoren betrachtet, die möglicherweise Auswirkungen auf das Laufverhalten haben könnten. Es wurde vermutet, dass es sich bei dem roten Pigment eventuell um ein Siderophor handeln könnte. Siderophore sind notwendige Eisen-Chelatoren. Diese binden das Eisen und haben so einen großen Einfluss, wenn es um den Eisenhaushalt in verschiedenen Organismen geht.^[177] Bei einem Siderophor wird Eisen komplexiert. Diese Komplexbildung würde eine einfache Chromatographie unterbinden bzw. stark beeinträchtigen.^[178] Die Hypothese wäre, dass die min PKS II die Produktion eines PKS-Produktes ermöglicht, welches als Eisen-komplexierender-Ligand fungiert. Eine zweite

Hypothese wäre, dass gar kein PKS-Produkt gebildet wird, sondern der Hoststamm vorhandene rot-farbene Eisenchelatoren durch das eingeführte Plasmid mit Insert überproduziert.

Um diese Hypothese zu evaluieren, wurde ein weiteres Laufmittel-Gemisch (Chloroform/Methanol/Wasser 70:30:4) getestet (PROF. DR. WINKELMANN). Eine definiertere Bande konnte bei einem Additiv von 0.1 % Ameisensäure im Laufmittel erhalten werden (Abbildung 8-5). Solch eine definierte Bande wurde vorher noch nicht gesehen und konnte auch ohne Säurezusatz nicht beobachtet werden. Jedoch konnten die vielen roten Pigmente wieder nicht einzeln voneinander getrennt werden.

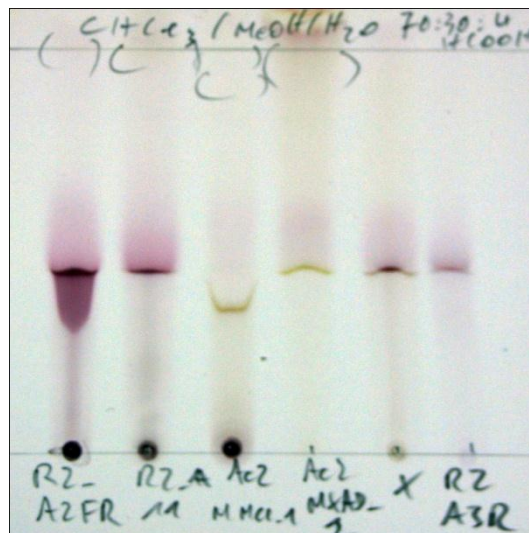


Abbildung 8-5: KG--Dünnschichtchromatogramm von Pigmentfraktionen aus *S. albus*-mPc. Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser 70:30:4 + 0.1 % Ameisensäure. Kontrastierung wurde bearbeitet.

Dieses Laufmittelgemisch stellte eine deutliche Verbesserung zu vorigen Versuchen auf KG-Material dar, da es gelungen war eine scharfe und definierte Bande zu erhalten. Dennoch waren die Ergebnisse noch nicht zufriedenstellend.

Zur weiteren Optimierung wurde der Säureanteil auf 1 % erhöht und zusätzlich die Säure ausgetauscht (Abbildung 8-6). Mit 1 % Ameisensäure im Laufmittel resultierte ein R_f -Wert von 0.73. Erkennbar war eine definierte Bande einer möglichen Zielverbindung mit einer schlechten Separierung der anderen Komponenten. Mit 1 %

Trifluoressigsäure waren ein R_f -Wert von 0.63 und besser separierte Banden zu erkennen. Das war als vorteilhafter für die weiteren Isolierungsarbeiten einzustufen.

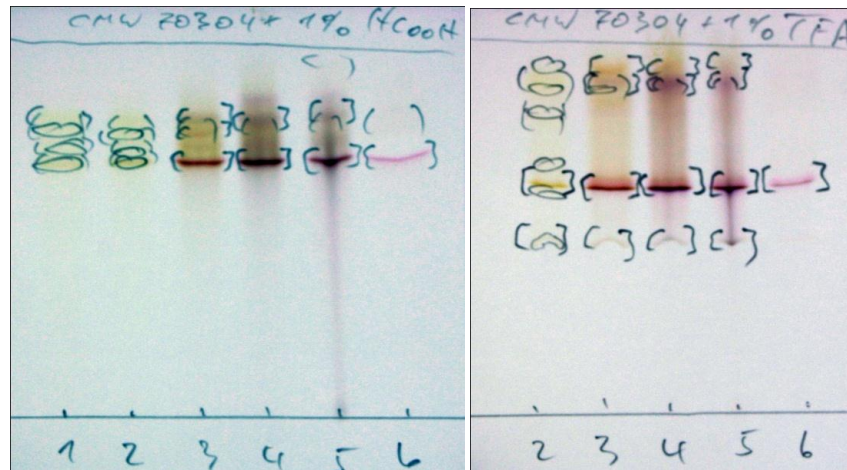


Abbildung 8-6: KG--Dünnschichtchromatogramm von Pigmentfraktionen aus *S. albus*-mPc. Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser 70:30:4; **Links:** mit 1 % Ameisensäure; **Rechts:** mit 1 % Trifluoressigsäure. Kontrastierung wurde bearbeitet.

Als bestes Laufmittel konnte Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 6:8:1 + 1 % Trifluoressigsäure bestimmt werden. Es resultierten zwei scharfe, rote Banden, wie beispielsweise in Abbildung 8-7 dargestellt. Folgende Parameter mussten beachtet werden, um eine gute Reproduzierbarkeit zu erreichen: Das Laufmittel musste immer neu hergestellt werden, die Zusammensetzung 6:8:1 + 1 % Trifluoressigsäure musste genauestens eingehalten und eine trockene DC-Kammer musste stets verwendet werden. Andernfalls unterlag das Laufverhalten sehr großen Schwankungen und schlug sich in sehr unterschiedlichen R_f -Werten nieder.

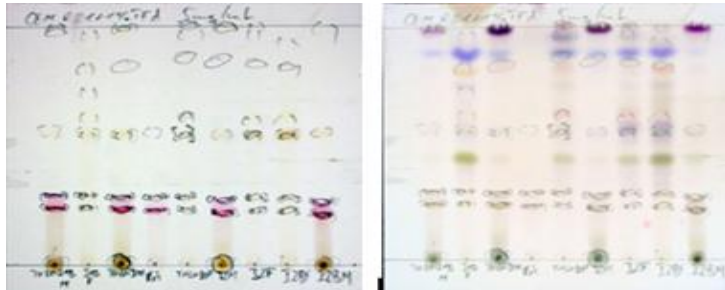


Abbildung 8-7: KG--Dünnschichtchromatogramm von Extrakten aus *S. albus*-mPc. Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 6:8:1 + 1 % Trifluoressigsäure; **Links**: ohne Anis; **Rechts**: mit Anis. Kontrastierung wurde bearbeitet.

Zusammenfassende Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie

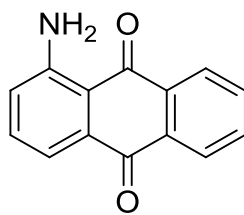
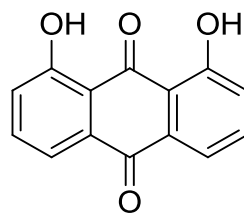
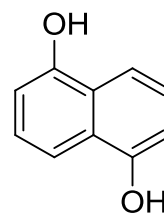
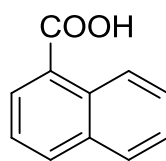
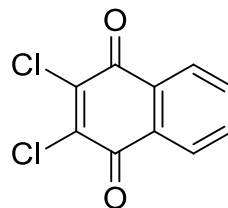
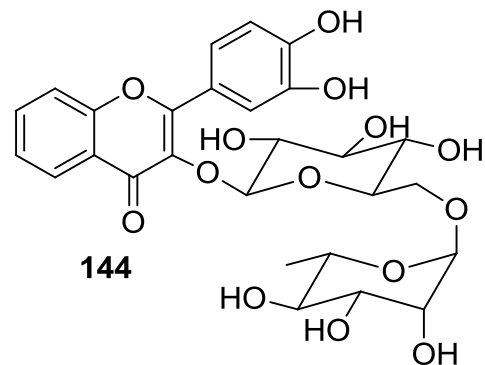
Die besten Ergebnisse wurden auf KG-Material mit dem Laufmittel Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol im Verhältnis 6:8:1 + 1 % Trifluoressigsäure erzielt. Auf RP-Material wurden die schärfsten Banden mit einem Aceton/Wasser-Gemisch (1:1 und 0.05 % NEt_3 als Laufmitteladditiv) beobachtet. Durch den Einsatz von Säuren und Basen konnte ein Farbumschlag beobachtet werden: Bei Basenzugabe lila und bei Säurezugabe orange-rot. Weiterhin hatten Säuren und Basen einen starken Einfluß auf das chemische Laufverhalten.

Durch die Verwendung von Säuren und Basen könnte eine Teilprotonierung bzw. Teildeprotonierung der roten Pigmente vorliegen, wodurch ein unterschiedlicher R_f -Wert entstehen kann. Wenn eine Substanz teilweise protoniert bzw. deprotoniert vorliegt, ergibt sich ein Problem bei der Isolierung der Substanz. Erwartungsgemäß würde in dem Fall eine geringere Ausbeute resultieren. Durch diese Teilprotonierung bzw. Teildeprotonierung konnte auch eine Immobilisierung z.B. am Kieselgelmaterial erfolgen, wodurch eine starke Bandenverbreiterung resultiert.

Phenolische Modellsubstanzen

Die zuvor beschriebenen Farbveränderungen bei Säure- oder Basen-Zugabe wurden als Ausgangspunkt für die Untersuchung phenolischer Substanzen verwendet. Es wurden

einige Vorversuche mit vorhandenen Chemikalien als Modellkomponenten durchgeführt. Diese Verbindungen (1-Aminoanthrachinon (**139**), 1,8-Dihydroxyanthrachinon (**140**), 1,5-Dihydroxynaphthalin (**141**), 1-Napththoesäure (**142**), 2,3-Dichlor-1,4-Napththochinon (**143**) und Rutin Hydrat (**144**)) stellen unterschiedliche phenolische Substanzen dar und wurden, gelöst in Methanol, auf ihr Säure-Base-Verhalten getestet (Tabelle 3-8). Möglicherweise könnte aus diesen Versuchen eine Erkenntnis über das Grundgerüst der roten Pigmente erhalten werden.

**139****140****141****142****143****144**

Es wurde beobachtet, dass **139** (in Methanol rote Lösung) keine Farbveränderung bei einer Additivzugabe (Säure und Base) zeigte. **140** färbte sich hingegen mit Säure von orange-gelb zu gelb und mit Base dunkelrot. Weiterhin färbte sich **141** (braun in Lösung) zu hellbraun (Säure) und violett (Base). Es konnte bei Säurezugabe eine Entfärbung (**142**) und keine farbliche Veränderung (**143**, **144**) beobachtet werden. Bei Basenzugabe waren keine farblichen Veränderungen bei **142** und **144** und eine Färbung zu türkis-grün bei **143** zu beobachten.

Diese Ergebnisse spiegelten die Vermutung wider, dass es sich bei den gesuchten roten bis violetten Verbindungen um Anthrachinone handeln könnte. Die Farben und das Säure-Base-Verhalten dieser Testverbindungen (**139**, **140**) sind den Eigenschaften der

roten und violetten Pigmente sehr ähnlich. Das 1-Aminoanthrachinon (**139**) zeigt einen sehr ähnlichen roten Farbton. Wie in Kapitel A 4 beschrieben, sollte es sich bei der Zielverbindung um ein minimales PKS II Produkt handeln. Demnach sind aller Wahrscheinlichkeit nach keine Enzyme vorhanden, die ein Stickstoffatom in das Molekül einbringen können.

Die Resultate des 1,8-Dihydroxyanthrachinons (**140**) zeigten die meisten Ähnlichkeiten zu den farbigen Pigmenten auf. Bei Säurezugabe wurde die Lösung gelb und bei Basenzugabe tiefrot. Vergleichend zu verschiedenen vorgereinigten farbigen Fraktionen wurden verschiedene Extrakte mit 1,8-Dihydroxyanthrachinon (**140**), 1,5-Dihydroxynaphthalin (**141**) und Rutin Hydrat (**144**) auf ein DC aufgetragen und diese Analyse mit zwei unterschiedlichen Laufmitteln durchgeführt (Abbildung 8-8).

In Abbildung 8-8 konnten für das 1,8-Dihydroxyanthrachinon (**140**) zwei definierte Banden identifiziert werden. Sehr interessant war, dass die untere Bande genau auf der Höhe des roten Pigmentes aus dem Extrakt von *S. albus*-mPc lief und ebenfalls rötlich war. Damit erhärtete sich die Vermutung, dass es sich bei der roten Verbindung um ein Anthrachinonderivat handeln könnte.

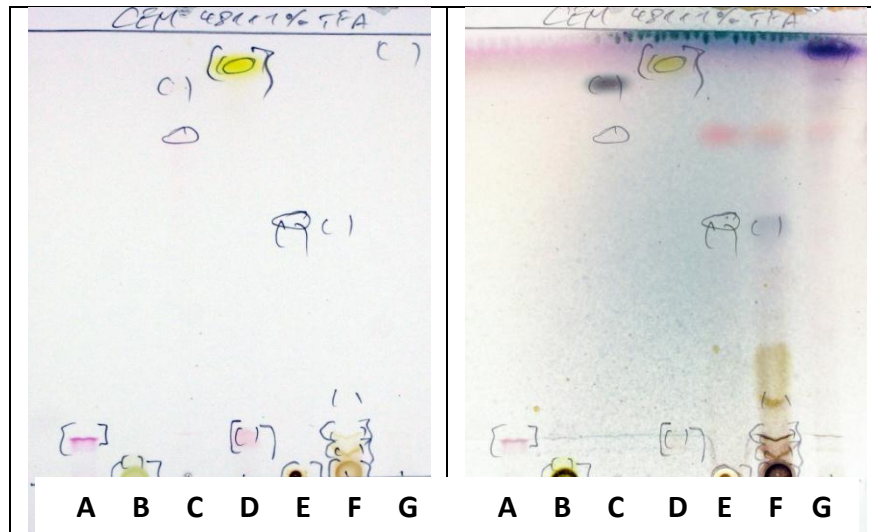


Abbildung 8-8: KG--Dünnschichtchromatogramm von Pigmentfraktionen aus *S. albus*-mPc und den phenolischen Modellverbindungen. Laufmittel Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 4:8:1 + 1% Trifluoressigsäure; Links: ohne Anis; Rechts: mit Anis angesprüht. **A**: Referenz des roten Pigments. **B**: Rutin Hydrat (**144**). **C**: 1,5-Dihydroxynaphthalin (**141**). **D**: 1,8-Dihydroxyanthrachinon (**140**). **E-G**: Extrakte aus *S. albus*-mPc in einem unterschiedlichen Aufarbeitungsstadium. Kontrastierung wurde bearbeitet.

Präparative Dünnschichtchromatographie

Um auf der Basis der oben genannten Erkenntnisse eine rasche Reinstoffisolierung von einem roten Pigment aus den Extrakten von *S. albus*-mPc zu erhalten, sollten die roten Banden mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (KG, Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 6:8:1 + 1 % Trifluoressigsäure) getrennt werden (Kapitel B 3.2.1.2). Dazu wurden 4 mL einer 25 mg/mL-Lösung des Extraktes in Methanol oder Aceton nacheinander mit einer Spritze auf die präparativen DC-Platten aufgetragen. Nach dem herauskratzen der roten und violetten Banden, wurde das enthaltene Kieselgel durch Filtration entfernt. Die NMR- und MS-Analysen führten allerdings zu keinem weiterführenden Ergebnis, daher wird hier nicht weiter darauf eingegangen.

Chromatographie und HPLC-Analytik von Extrakten zur Reinsubstanz

Chromatographie

Die Zielsetzung war die Reinstoffisolierung der roten Pigmente als mögliche min PKS II-Produkte. Daher wurden die bei der DC optimierten Laufmittel auf die Säulenchromatographie und Trennung an SPE-Kartuschen (SPE: Solid-Phase-Extraction) übertragen. Sowohl Kieselgel- und RP-Material fanden Verwendung. Weiterhin wurden Größenausschlussmaterialien, wie Sephadex LH-20 und Toyopearl HW-40F mit unterschiedlichen Eluenten getestet. Bei allen Materialien war es sehr schwierig, eine gute Trennung zu erhalten, was sich in der DC-Analytik der erhaltenen ca. 100-300 Fraktionen zeigte. Sowohl mit KG- als auch mit RP-Material für Schwerkraftsäulen wurde eine Immobilisierung der Substanz an der stationären Phase vermutet. Durch die Zugabe verschiedener Additive ins Laufmittel war es möglich, etwas schärfere Banden zu detektieren (Kapiteln B 3.2.1.4 und 3.2.1.5).

HPLC-Analytik

Da die chromatographische Analytik (Säulenchromatographie) deutlichen Schwierigkeiten unterlag, wurden Experimente an der HPLC durchgeführt. Anhand der durchgeführten dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurde eine mittlere Polarität der roten Pigmente angenommen. Wie bei den Optimierungen an verschiedenen Materialien für die KG-Säulenchromatographie, war auch die Reinigung von vorgereinigten Fraktionen an der HPLC eine sehr große Herausforderung.

Es gelang zunächst nicht, die richtigen HPLC-Parameter zu erhalten, um reproduzierbare Trennungen zu erzielen. Es wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich R_f -Wert und Trennleistung erhalten. Für das rote Pigment konnte eine sehr große Varianz in der Retentionszeit beobachtet werden. Diese Varianz trat sowohl beim Messen mit Säure als auch mit Base als Laufmitteladditiv auf. Beispielhaft ist die Verwendung von Triethylamin in Abbildung 8-9 ergänzend durch die Tabelle 8-1 dargestellt.

Tabelle 8-1: Parameter zu den HPLC-Läufen aus Abbildung 8-9.

	Säule / Name der Säule		Pro- gramm	Laufmittel	Additiv	R_t [min]
Abbildung 8-9 A	5	Nucleodur RP-18 HTec, analytisch	A-23	A: Wasser B: Methanol	je 0.025 % NEt ₃	14.0
Abbildung 8-9 C	5	Nucleodur RP-18 HTec, analytisch	A-23	A: Wasser B: Methanol	je 0.025 % NEt ₃	4.8
Abbildung 8-9 D	5	Nucleodur RP-18 HTec, analytisch	A-24	A: Wasser B: Methanol	je 0.025 % NEt ₃	3.4
Abbildung 8-9 E	5	Nucleodur RP-18 HTec, analytisch	A-25	A: Wasser B: Methanol	je 0.025 % NEt ₃	9.3
Abbildung 8-9 F	5	Nucleodur RP-18 HTec, analytisch	A-26	A: Wasser B: Methanol	je 0.025 % NEt ₃	23.0

Wie bereits beschrieben, konnten deutliche Schwankungen bei den Retentionszeiten beobachtet werden. Gemessen wurde mit Triethylamin als Laufmitteladditiv (Abbildung 8-9 A, C, D, Tabelle 8-1). Die Bedingungen waren nahezu identisch, doch die Retentionszeiten variierten zwischen 3.4 und 14.0 Minuten. Wurden die Startbedingungen von 45 % B auf 60 % B bzw. 55 % B verändert (Tabelle 8-1; Abbildung 8-9 E und F), so war wiederum eine sehr große Schwankung in der Retentionszeit festzustellen ($R_t = 9.3$ und 23. Minuten). Dieses Laufverhalten deutete, wie bei den dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen beschrieben, auf sehr pH-sensitive Substanzen hin. Ergänzend dazu ist in Abbildung 8-9 B das extrahierte UV-Spektrum abgebildet. Vergleichend mit den erhaltenen Maxima bei einer Messung mit Ameisensäure als Laufmitteladditiv (Abbildung 8-10, Abbildung 8-11), lag nun ein Maximum von 540 statt 484 nm vor. Daraus ging hervor, dass durch Protonierung bzw. Deprotonierung der Chromophor minimal verändert wurde. Hieraus resultierte eine Verschiebung zu langwelligerem Licht (hypsochrome Farbverschiebung) bzw. zu kurzwelligerem Licht (bathochrome Farbverschiebung). Eine genauere Analyse des Chromophors bzw. der resultierenden Farbigeit ist in Kapitel A 8.5.4 gegeben.

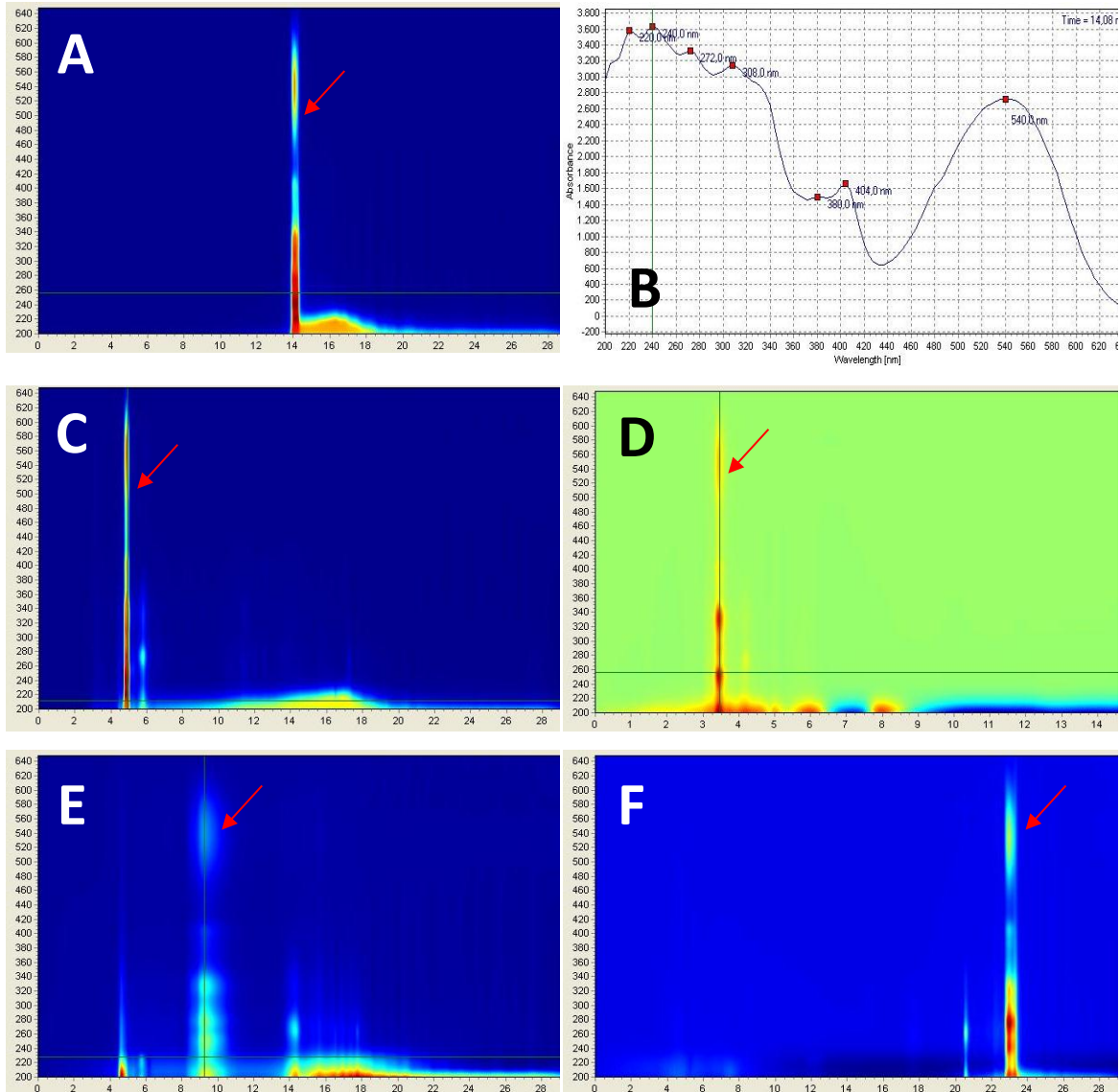


Abbildung 8-9: HPLC-Chromatogramme von verschiedenen roten Pigmentfraktionen. Gemessen im basischen Milieu. **A, C–F**: Wellenlängenbereiche von 190–650 nm. **B**: Extrahiertes UV-Spektrum von Abbildung 8-16 A. Beispielhaft für einen basischen pH-Wert. Um eine bessere Übersicht zu gewährleisten, wurde kein UV-Chromatogramm von nur einer Wellenlänge angegeben.

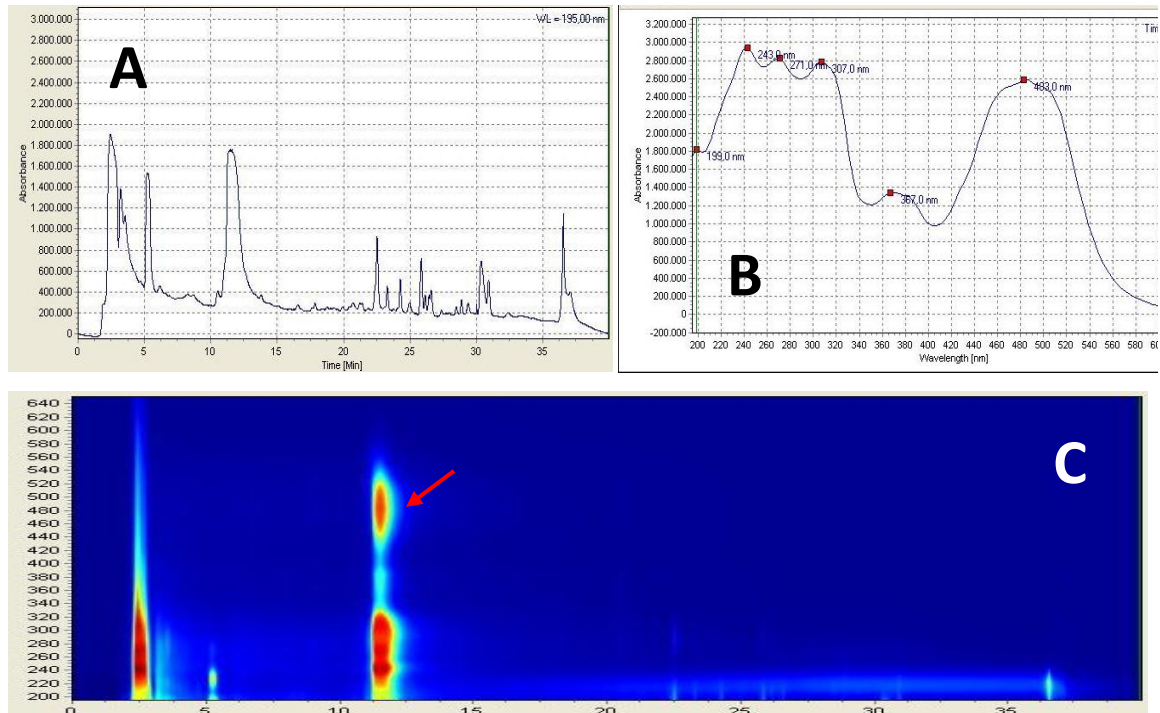


Abbildung 8-10: Identifizierung des UV-Chromatogramm eines roten Pigments aus einer Pigmentfraktion (roter Pfeil). Gemessen mit Säurezusatz. **A**: UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm. **B**: Extrahiertes UV-Spektrum des roten Pigments. **C**: UV-Chromatogramm des roten Pigments bei einer Wellenlänge von 190–650 nm.

Aus einer Pigmentfraktion wurde das UV-Chromatogramm des roten Pigments bei einer $R_t = 11.5$ Minuten identifiziert. Abgebildet wurden das UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm (Abbildung 8-10 A) und das UV-Chromatogramm über den Wellenlängenbereich von 190–650 nm (Abbildung 8-10 C). Daraus konnte das UV-Spektrum extrahiert werden (Abbildung 8-10 B). Charakteristisch waren fünf Absorptionsmaxima bei 243, 271 und 307 nm, sowie bei einer Wellenlänge von 367 und 483 nm.

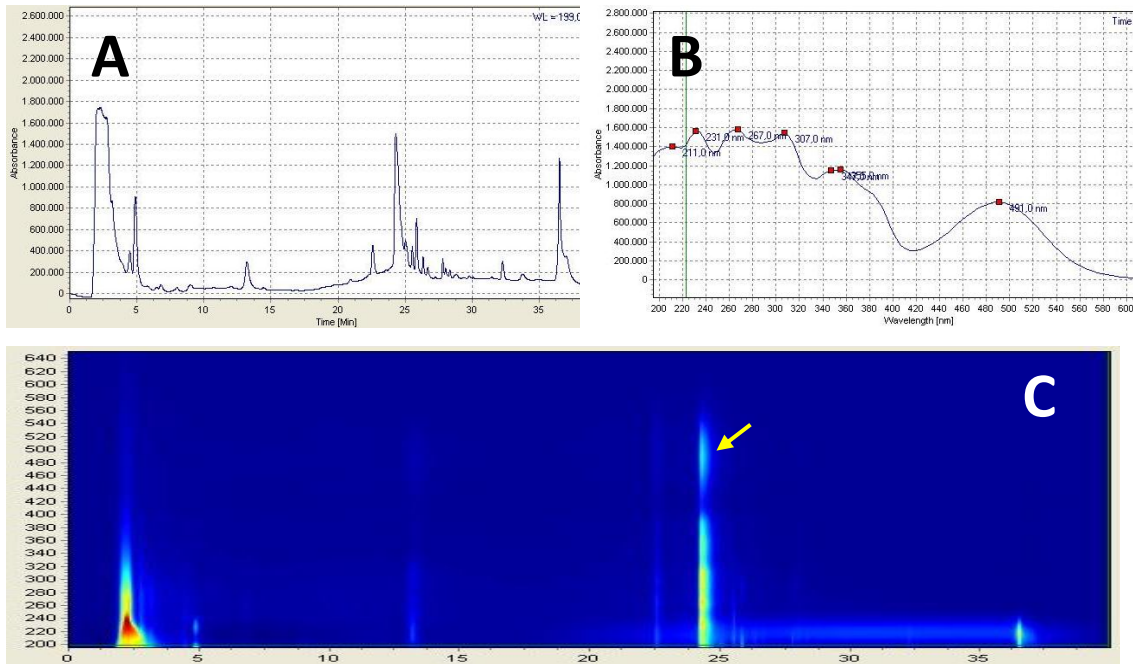


Abbildung 8-11: Identifizierung des UV-Chromatogramms des lila-farbenen Pigments aus einer Pigmentfraktion (gelber Pfeil). Gemessen mit Säurezusatz. **A:** UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm. **B:** Extrahiertes UV-Spektrum des lila-farbenen Pigments. **C:** UV-Chromatogramm des lila-farbenen Pigments bei einer Wellenlänge von 190–650 nm.

Aus einer weiteren Pigmentfraktion wurde das UV-Chromatogramm eines lila-farbenen Pigments bei einer $R_t = 24.4$ Minuten identifiziert. Abgebildet wurden das UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 200 nm (Abbildung 8-11 A) und das UV-Chromatogramm über den Wellenlängenbereich von 190–650 nm (Abbildung 8-11 C). Daraus konnte wiederum das UV-Spektrum extrahiert werden (Abbildung 8-11 B). Charakteristisch waren sechs Absorptionsmaxima bei 211, 231, 267 und 307 nm, sowie bei einer Wellenlänge von 355 und 491 nm.

Die 'Peak-Purity' war sowohl bei dem roten als auch bei dem lila-farbenen Pigment nicht zufriedenstellend. Demnach wurden weitere Optimierungen durchgeführt. Folglich stellte sich auch die HPLC-Analytik, vergleichend zu den schon durchgeführten chromatographischen Untersuchungen, als eine große Herausforderung heraus. Beispielsweise konnten anhand des UV-Spektrums zwei von vielen roten chromophortragenden Stoffen detektiert werden (Abbildung 8-10, Abbildung 8-11).

Die besten Ergebnisse an der HPLC wurden mit den Parametern aus Tabelle 8-2 erhalten. Weitere Parameter, sind in Kapitel B 1.2 dokumentiert.

Tabelle 8-2: Aus der Optimierung hervorgehende Parameter für effiziente HPLC-Untersuchung.

	Säule	Name der Säule	Programm/ Laufmittel	R _t (min) [rot]	R _t (min) [lila]
analytisch	4	<i>Dr. Maisch</i> , C-4-Säule, 250 × 4.6 mm	A-12 / A: Wasser ^a B: Acetonitril ^a	5.5	7.7
	4	<i>Dr. Maisch</i> , C-4-Säule, 250 × 4.6 mm	A-21 / A: Wasser ^b B: Acetonitril	12.0– 13.0	n.b.
	4	<i>Dr. Maisch</i> , C-4-Säule, 250 × 4.6 mm	A-22 / A: Wasser ^a B: Acetonitril ^a	18.0– 19.0	n.b.
semipräparativ	14	<i>Dr. Maisch</i> , C-4-Säule, 250 × 8 mm	S-09 / A: Wasser ^a B: Acetonitril ^a	5.5	7.7
	14	<i>Dr. Maisch</i> , C-4-Säule, 250 × 8 mm	S-11 / A: Wasser ^a B: Acetonitril ^a	18.0– 19.0	n.b.
präparativ	16	<i>Dr. Maisch</i> , C-4-Säule, 250 × 20 mm	P-03 / A: Wasser ^b B: Acetonitril	12.0– 13.0	n.b.

a) 0.05 % HCOOH als Laufmitteladditiv; b) Ammoniumformiat (20 mM) + 0.1 % TFA in einem Liter Wasser; n.b.: nicht beobachtbar.

LC-MS-Analytik

Neben der HPLC-Analytik der vorgereinigten Pigmentfraktionen, wurde auch LC-MS-DAD-Analytik durchgeführt. Es wurden zwei rote, chromophortragende Stoffe detektiert. Es konnte bei einem Pigment (rote Zielverbindung) eine Retentionszeit von 13.7 Minuten mit einer Masse von m/z : 461.1 [M-H]⁻ (Abbildung 8-12 A, roter Pfeil) bestimmt werden. Weiterhin war es möglich, ein zweites Pigment bei einer Retentionszeit von 16.5 Minuten mit einer Masse von m/z = 487 [M-H]⁻ (Abbildung 8-12 B, lila farbener Pfeil) identifiziert werden. Es war nicht möglich, das Pigment mit

$m/z = 487.1$ $[M-H]^-$ in allen Extrakten zu detektieren im Gegensatz zu dem Pigment mit $m/z: 461.1$ $[M-H]^-$.

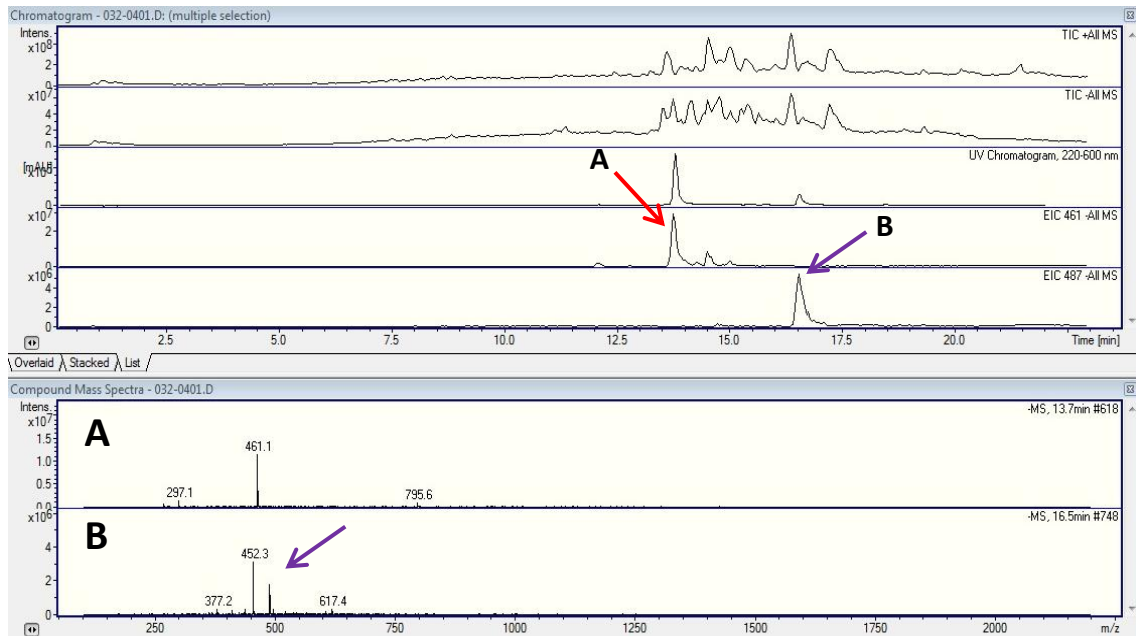


Abbildung 8-12: LC-MS-Chromatogramm einer vorgereinigten Fraktion der farbigen Pigmente. **A:** $R_t = 13.7$ Minuten; $m/z = 461.1$ $[M-H]^-$ (roter Pfeil). **B:** $R_t = 16.5$ Minuten; $m/z = 487.1$ $[M-H]^-$ (lila Pfeil).

Um weitere Strukturinformationen zu erhalten wurde eine LC-MS/MS- und eine LC-MS³-Untersuchung durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass in beiden Untersuchungen lediglich ein Massenfragment von 58 abgespalten wurde. Dadurch konnte eine neue Masse mit $m/z = 403.0$ $[M-H]^-$ identifiziert werden, was beispielhaft an der LC-MS/MS-Messung in Abbildung 8-13 dargestellt ist. Die erhaltene Retentionszeit von 13.8 Minuten stimmte mit der Retentionszeit aus Abbildung 8-13 für das rote Pigment überein.

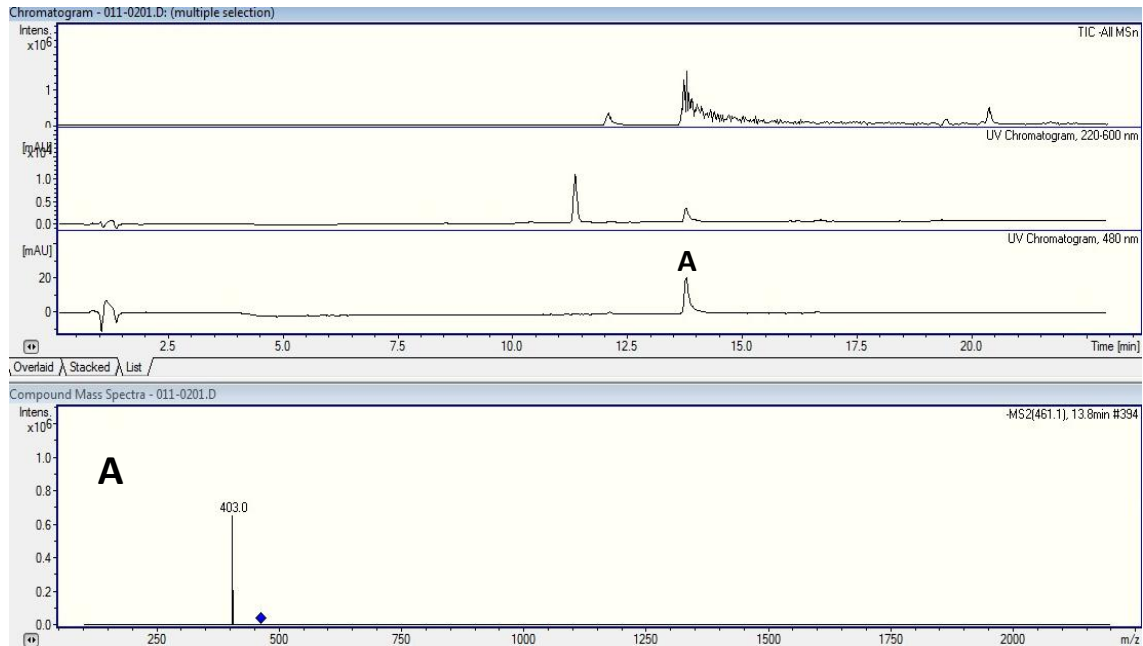


Abbildung 8-13: LC-MS/MS-Messung einer Pigment-haltigen Fraktion aus *S. albus*-mPc. Detektierte Masse: 461.3 [M-H] bei einer Retentionszeit von 13.8 Minuten. Detektion eines abgespaltenen Fragments mit $m/z = 58$.

Die Abspaltung von einem Fragment mit der Masse von $m/z = 58$ deutet auf eine McLafferty-Umlagerung eines Ketons hin.^[115] Ein möglicher Mechanismus wird in Abbildung 8-24 (Kapitel A 8.5.1, S.155) vorgestellt.

8.3 Studien zur Derivatisierung und Kristallisation von Lysochinon-TH1 (137)

Experimente zur Methylierung der roten Pigmente

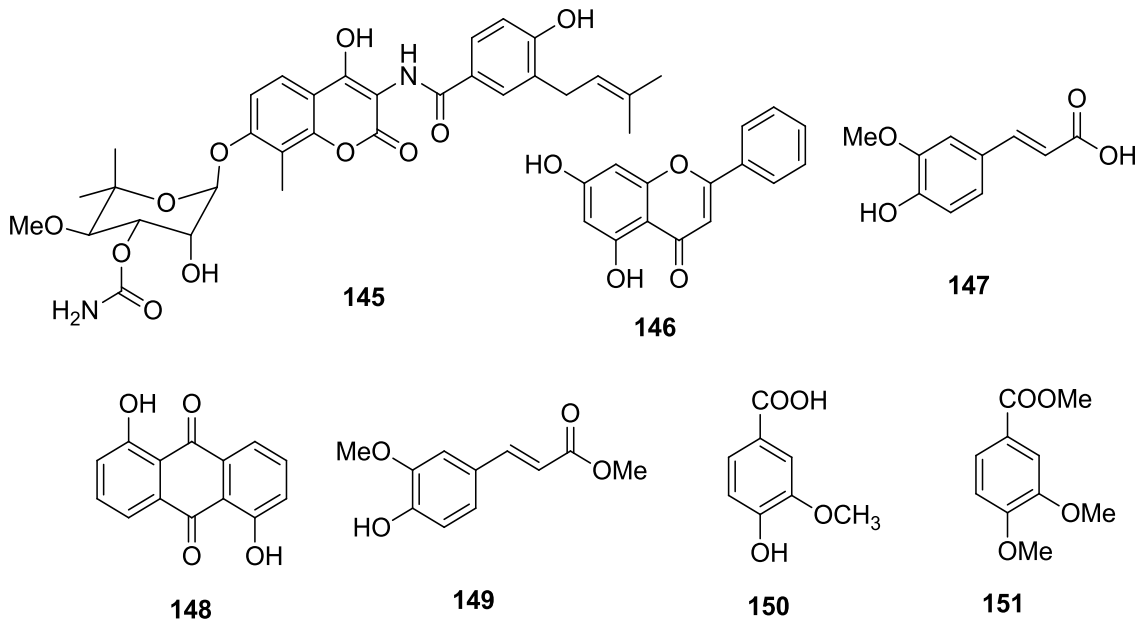
Um eine bessere Chromatographie zu erreichen, wurde versucht aus einer vorgereinigten Pigmentfraktion zu derivatisieren. Das rote Pigment wurde wahrscheinlich durch eine PKS II aufgebaut. Daher handelte es sich vermutlich um ein Polyphenol mit noch zusätzlichen Carbonyl- oder Carboxylfunktionen. Aus diesem Grund wurde in erster Linie versucht, die Hydroxygruppen zu methylieren. In Kapitel B 3.4 sind die Durchführungen ergänzend zu Tabelle 8-3 im Detail beschrieben.

Tabelle 8-3: Derivatisierungen von Modellverbindungen und angereicherten Fraktionen des roten Pigments.

Edukt	Reagenz	Zusatz	Lösungsmittel	Beobachtung / DC-Analyse
Novobiocin (145) ^a	TMSCHN ₂	HBF _{4(aq.)}	DMF	kein Umsatz
Chrysin (146) ^a	TMSCHN ₂	HBF _{4(aq.)}	DCM/MeOH 5:1	kein Umsatz
Ferulasäure (147) ^a	TMSCHN ₂	HBF _{4(aq.)}	DCM/MeOH 3:1	kein Umsatz
Anthrurufin (148) ^a	TMSCHN ₂	HBF _{4(aq.)}	DCM/MeOH 5:1	kein Umsatz
Ferulasäure (147) ^a	TMSCHN ₂	HBF _{4(aq.)}	EtOH	Komplettumsatz zu 149
Vanillinsäure (150) ^a	TMSCHN ₂	---	Toluol/MeOH 5:1	Komplettumsatz zu 151
Vanillinsäure (150) ^a	TMSCHN ₂	---	Toluol/MeOH 3:2	Komplettumsatz zu 151
Novobiocin (145) ^a	TMSCHN ₂	---	Toluol/MeOH 3:2	kein Umsatz
1,8-Dihydroxy-anthrachinon (140) ^a	MeI	KOH	Methanol	kein Umsatz
Pigmentfraktion ^b	TMSCl	Imidazol	DMF	kein Umsatz
Pigmentfraktion ^b	TMSCHN ₂	---	DMF	DC-Teilumsatz
Pigmentfraktion ^b	TMSCHN ₂	---	Et ₂ O/DCM 1:1	kein Umsatz
Pigmentfraktion ^b	TMSCHN ₂	---	Toluol/MeOH 3:2	DC-Teilumsatz
Pigmentfraktion ^b	TMSCHN ₂	---	Toluol/MeOH 3:2	kein Umsatz
Pigmentfraktion ^b	TMSCHN ₂	BF ₃ (OEt) ₂	DMF/MeOH 9:1	DC-Teilumsatz
Pigmentfraktion ^b	TMSCHN ₂	Hünig-Base	MeCN/MeOH 9:1	kein Umsatz
Pigmentfraktion ^b	DMC	TBAB	DMC	kein Umsatz
Pigmentfraktion ^b	Ag ₂ O	---	DCM/MeOH 1:1	kein Umsatz
Pigmentfraktion ^b	MeI	Kaliumcarbonat	Aceton/DMSO 4:1	DC-Teilumsatz
Pigmentfraktion ^b	DMS	Kaliumcarbonat	Aceton	DC-Teilumsatz
Pigmentfraktion ^b	MeI	KOH	DMSO	DC-Teilumsatz

a) Modellverbindung; b) rotes Pigment; TMSCl: Trimethylsilylchlorid; TMSCHN₂: Trimethylsilyldiazomethan; DMC: Dimethylcarbonat; MeI: Methyljodid; DMS: Dimethylsulfat.

Mit LC-MS-Untersuchungen konnte bei einem Derivatisierungsversuch ein Substanzgemisch verschiedener Stoffe mit entsprechendem Chromophor (UV_{max}: λ = 480 nm) nachgewiesen werden.



Die LC-MS-Analyse zeigte eine Übereinstimmung mit unterschiedlichen Methylierungsgraden. Es konnte im Vergleich zu $M = 462 \text{ g/mol}$ (Abbildung 8-12) eine Masse von $m/z = 475$ $[M-H]^-$ (einfach methyliert) mit einer Retentionszeit von 15.5 Minuten (Abbildung 8-14 A), eine Masse von $m/z = 489$ $[M-H]^-$ (zweifach methyliert) bei einer Retentionszeit von 14.8 (Abbildung 8-14 C1) und 16.3 Minuten (Abbildung 8-14 C2) und die nicht methylierte Spezies mit einer Masse von $m/z = 461$ $[M-H]^-$ bei einer Retentionszeit von 13.8 (Abbildung 8-14 B) Minuten identifiziert werden.

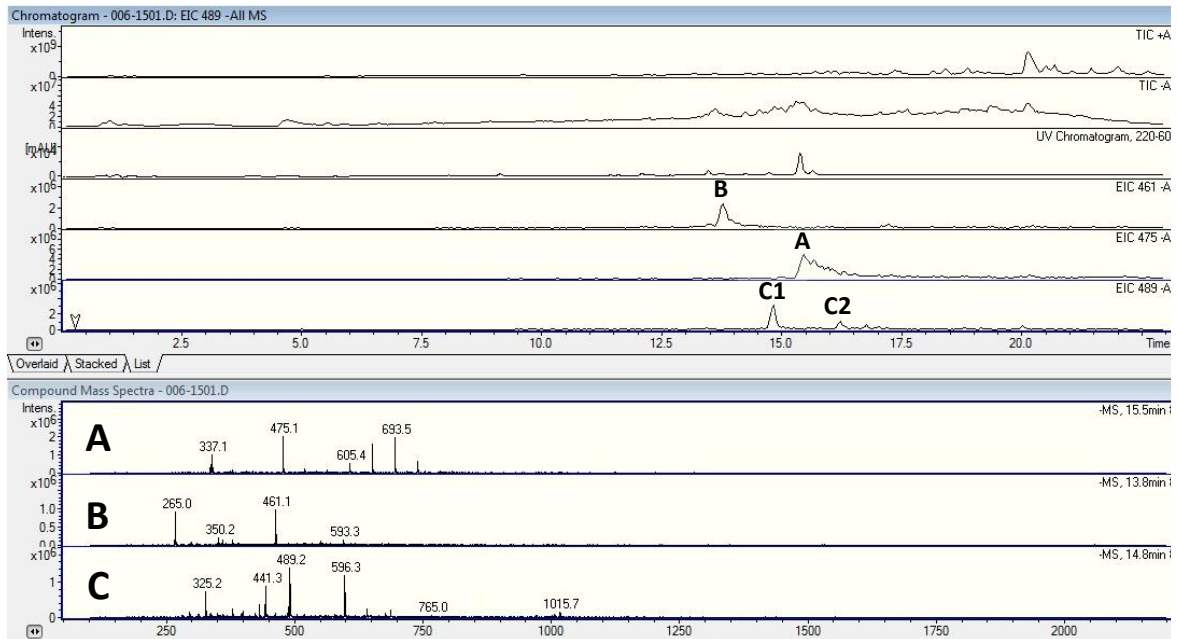


Abbildung 8-14: LC-MS (ESI)-Chromatogramm einer Pigmentfraktion nach Reaktion mit TMSCHN_2 . **A**: einfach methylierte Spezies mit $m/z = 475$ $[\text{M-H}]^-$; **B**: nicht methylierte Spezies mit $m/z = 461$ $[\text{M-H}]^-$; **C (1+2)**: zweifach methylierte Spezies mit $m/z = 489$ $[\text{M-H}]^-$.

Auch bei den Derivatisierungsstudien wurden LC-MS/MS-Untersuchungen durchgeführt, um mehr Strukturinformationen zu erhalten (Abbildung 8-15). Es wurde die Masse von $m/z = 489$ $[\text{M-H}]^-$ für eine zweifach methylierte, rote Spezies bei unterschiedlichen Retentionszeiten identifiziert. Dabei wurden Retentionszeiten von 15.5, 14.8 und 16.2 Minuten bestimmt (Abbildung 8-15 A–C). Bei diesen Zeiten konnte jeweils ein abgespaltenes Fragment mit der Masse von 58 vergleichend zu Abbildung 8-13 beobachtet werden. Daraus resultierte eine Masse von $m/z = 431$ $[\text{M-H}]^-$. Bei einer Retentionszeit von 16.2 Minuten wurde zusätzlich ein Massenfragment von 14 abgespalten, was auf eine Methylengruppe hindeutet. Dadurch konnte eine einfache Methylierung, wahrscheinlich von einer Hydroxygruppe, belegt werden.

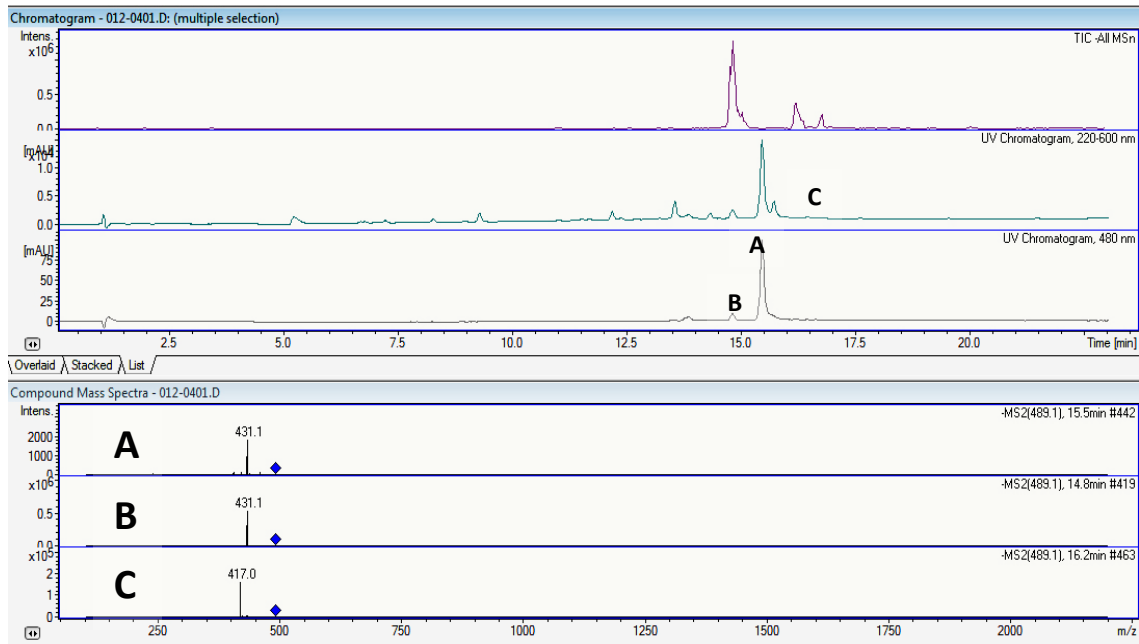


Abbildung 8-15: LC-MS/MS (ESI)-Chromatogramm einer Pigmentfraktion nach Reaktion mit TMSCHN_2 . **UV**: 220–600 nm und 480 nm; Detektierte Masse: $m/z = 489$ $[\text{M-H}]^-$ (zweifach methylierte Spezies). **A**: $R_t = 15.5$ min; Ein Massenfragment von 58 wurde abgespalten; **B**: $R_t = 14.8$ min; Ein Massenfragment von 58 wurde abgespalten; **C**: $R_t = 16.2$ min; Zwei Massenfragmente von 58 und 14 wurden abgespalten.

Es konnte durch massenspektrometrische Methoden belegt werden, dass ein Gemisch aus mehrfach methylierten Pigmenten erhalten werden konnte. Es waren sehr geringe Umsätze und auch Ausbeuten während der Reaktion erhalten worden, wodurch auf weitere Analytik verzichtet wurde.

Experimente zur Kristallisation

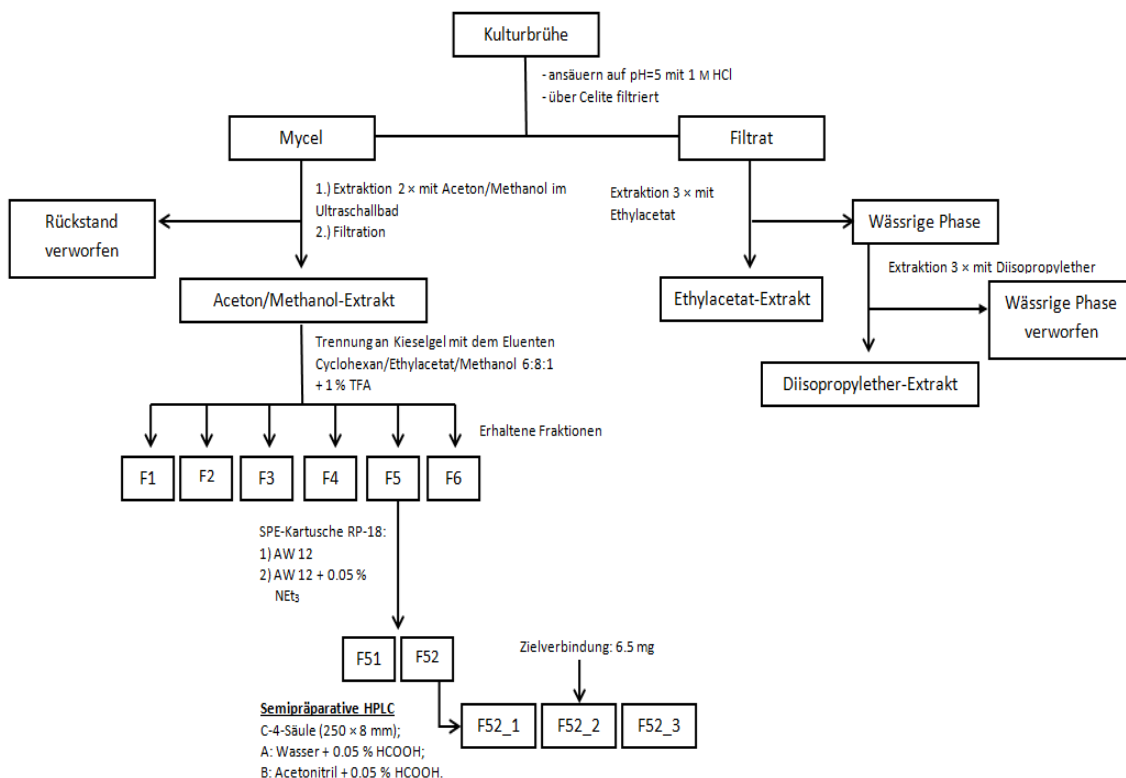
Neben den durchgeführten Derivatisierungsstudien wurden zusätzlich Kristallisationsversuche unternommen. Hierzu sind drei verschiedene Methoden herangezogen worden. Alle Kristallisationsansätze lieferten keine kristallinen, roten Substanzen, sodass hier nicht weiter darauf eingegangen wird. Eine genaue Beschreibung der unternommenen Versuche sind in Kapitel B 3.3 und B 3.4 dargestellt. Die zu untersuchenden Substanzen waren keine Reinsubstanzen, sondern angereicherte

Fraktionen. Daher könnte es möglich gewesen sein, dass Verunreinigungen für die nicht funktionierende Kristallisation verantwortlich waren.

8.4 Strategie der Reinstoffisolierung von Lysochinon-TH1 (137)

8.4.1 Erste Reinstoffisolierung des roten Pigments

Zunächst wurde der pH-Wert der Kulturbrühe mit 1 M HCl auf pH 5.0 eingestellt. Die Kulturbrühe wurde über Celite filtriert, um das Mycel und das Filtrat voneinander zu trennen. Das Filtrat wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der meiste Substanzanteil war im Mycel zu finden. Hier erfolgte eine Aceton/Methanol-Extraktion (2 × 7:3) im Ultraschallbad für eine halbe Stunde mit anschließender Filtration.



Schema 8-1: Aufarbeitung, die zu einem Strukturvorschlag führte.

Die daraus erhaltenen organischen Extrakte wurden vereinigt und säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Eluenten Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 6:8:1 + 1 % Trifluoressigsäure getrennt. Dabei war die Substanz über die ganze Säule verteilt bzw. verschmiert. Die im Anschluss folgende SPE-Kartusche (RP-18-Material; zwei Laufmittel: 1.) Aceton/Wasser 1:2; 2.) Aceton/Wasser 1:2 0.05 % Triethylamin) lieferte zwei Fraktionen, die an der HPLC analysiert (Abbildung 8-16) und getrennt wurden (Programm: A-12, S-09; Säule: 4, 14). Dabei stellt der rote Pfeil das rote Pigment und der lila-farbene Pfeil das violette Pigment dar (Abbildung 8-16). Aus diesem Verfahren wurden 6.5 mg (verunreinigt) erhalten. Daraufhin konnte eine NMR-Analyse erfolgen (Abbildung 8-19, Abbildung 8-21, Kapitel A 8.5).

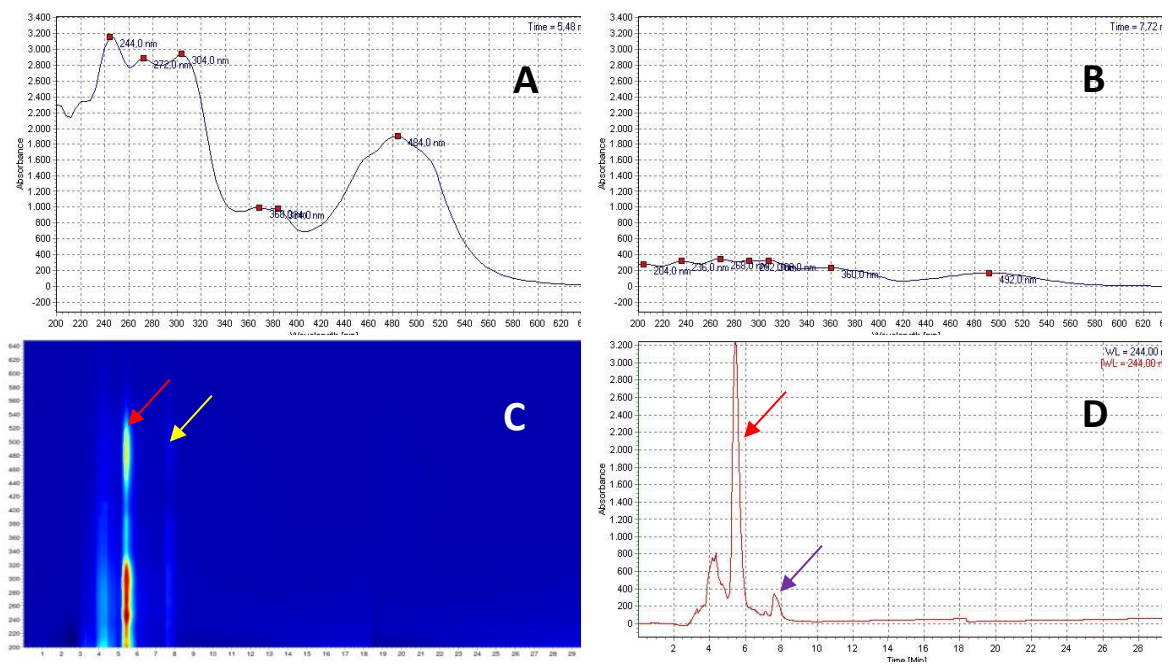


Abbildung 8-16: HPLC-Chromatogramm von vorgereinigten Fraktionen der farbigen Pigmente. **A:** Extrahiertes UV-Spektrum der roten Zielverbindung (roter Pfeil). **B:** Extrahiertes UV-Spektrum der lila-farbenen Zielverbindung (lilane Pfeil). **C:** HPLC-Chromatogramm in einem Wellenlängenbereich von 190-650 nm.; **roter Pfeil:** UV-Spur eines der roten Pigmente (rote Zielverbindung). **gelber Pfeil:** mögliche UV-Spur eines zweiten Pigmentes (lila-farbene Substanz). **D:** Extrahiertes UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 244 nm.

Ein sehr großer Nachteil in Bezug auf dieses Aufarbeitungsverfahren war es, dass die Aufarbeitung nicht reproduzierbar war. Demnach wurde erneut nach weiteren

Methoden gesucht, die zu einem reproduzierbaren Ergebnis führen, um die Substanz als Reinstoff zu isolieren. Optimierungsversuche wurden bereits bei der Kultivierung durchgeführt. Beispielhaft konnte durch einen XAD-16 Zusatz zur Kulturbrühe gezeigt werden, dass von der gesuchten Substanz nichts mehr im Filtrat identifiziert wurde und folglich nur noch das Mycel aufgearbeitet werden musste.

8.4.2 Reproduzierbare Reinstoffisolierung von Lysochinon-TH1 (137)

Eine neue Aufarbeitung konnte etabliert werden (Schema 8-2).

Eine basische Aktivierung des RP-Materials zeigte sich als vorteilhaft, da sonst eine zu starke Retention stattfindet. Zum Aktivieren wurde reines Pyridin verwendet. Im Anschluss folgte das Spülen des Materials mit Reinstwasser. Durch das Spülen mit Wasser, wurde ein Großteil des Pyridins entfernt, das Material behielt dabei aber den basischen Charakter. Der gesamte säulenchromatographische Prozess an RP-Material stellt keine Trennung, sondern vielmehr eine Filtration dar. Lediglich die roten bzw. lila farbigen Fraktionen wurden aufgefangen und der orange-braune Rest wurde verworfen.

Für die Trennung an der präparativen HPLC wurden Fraktionen mit einer Größe von ca. 780 mg in DMSO (12 mL) gelöst und jeweils 2 mL (Autosampler) oder 0.8 mL mittels Probenauftragsventil aufgetragen. Das rote Pigment konnte bei einer Retentionszeit von 11–12 Minuten detektiert werden (Abbildung 8-17, roter Pfeil). Nach der Trennung an der präparativen HPLC (Säule 16; Programm: P-03) war eine Entsalzung notwendig, denn Ammoniumformiat reicherte sich in der Probe an.

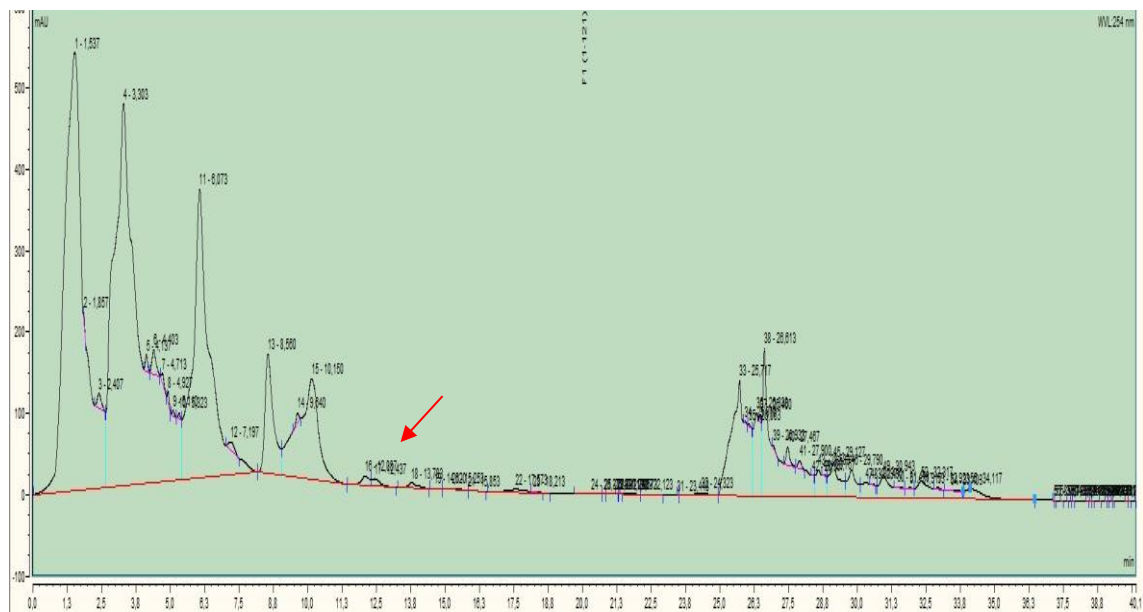
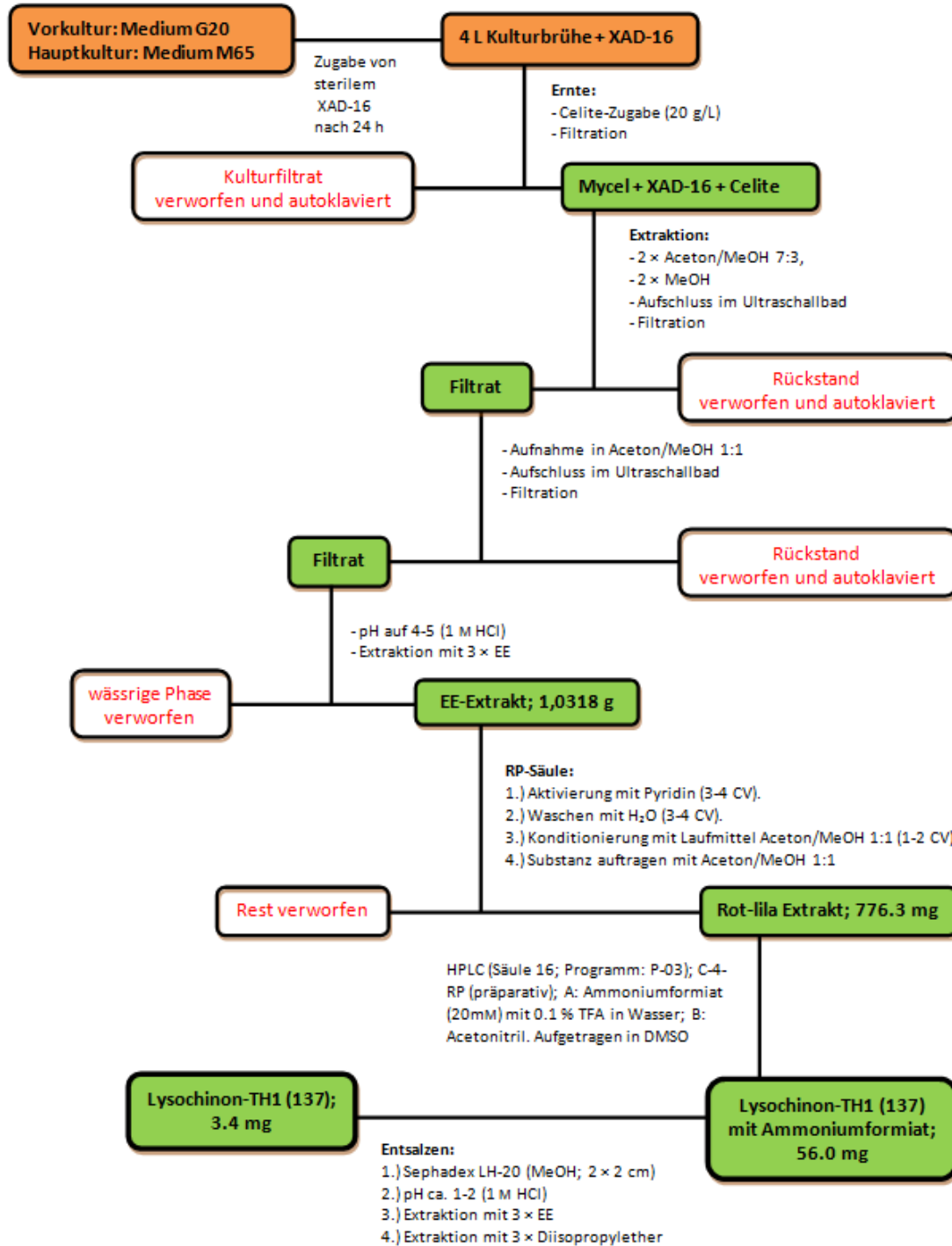


Abbildung 8-17: HPLC-Chromatogramm aus der präparativen Aufreinigung (roter Pfeil) von Lysochinton-TH1 (**137**) (Schema 8-2).

Gelöst in Methanol wurde die Probe auf eine Sephadex LH-20-Säule (MeOH; 2 × 2 cm) aufgetragen und mit Methanol eluiert. Dabei wurden zuerst Salze und später die roten Pigmente eluiert. Eine anschließende Extraktion mit Ethylacetat (3 × gleiches Volumen) wurde als eine weitere Methode zur Entsalzung durchgeführt. Für die Extraktion wurde die trockene Probe dazu in Wasser aufgenommen, mit 1 N HCl angesäuert (ca. pH = 2.0-3.0), anschließend mit Ethylacetat versetzt und dreimal extrahiert. Der erhaltene organische Extrakt wurde zunächst im Vakuum eingedunstet, später erneut in Wasser aufgenommen, mit 1 N HCl angesäuert (ca. pH = 2.0-3.0) und anschließend dreimal mit Diisopropylether extrahiert. Durch diese Aufarbeitung wurden 3.4 mg aus vier Litern Kultur von dem roten Pigment isoliert.

Mittels $^1\text{H-NMR}$ konnte ein Reinheitsgrad von ca. 70 % ermittelt werden, was für die Auswertung der NMR-Spektren ausreichend, aber insgesamt nicht zufriedenstellend war. Die Verunreinigungen waren Fette und das Ammoniumformiat aus der präparativen HPLC. Das macht in zukünftigen Arbeiten eine weitere Optimierung

dieser hier vorgestellten Aufarbeitung erforderlich, um eine größere Reinheit zu gewährleisten.



Schema 8-2: Kultivierungs- und Aufarbeitungsschema von dem roten Pigment. CV: Column Volumes.

8.5 Chemische und spektroskopische Charakterisierung der Metabolite

8.5.1 Strukturvorschlag und Überlegung zur Biogenese

Bestimmung der Summenformeln

Während der Aufarbeitungsoptimierung konnte eine Summenformel der Pigmente der roten und lila Substanz aus LC-MS-Untersuchungen erhalten werden. Dazu wurden Fraktionen aus Fermentationen im Schüttelkolben bzw. im Fermenter und Aufarbeitung mittels Chromatographie an Kieselgel und HPLC mittels LC-MS und HR-ESI-MS-Methoden im negativ Mode untersucht. In diesem Modus konnte eindeutig die Zielsubstanz identifiziert werden (Abbildung 8-18). Für das rote Pigment wurde eine Masse von $m/z = 463.2 [M+H]^+$ und $947.3 [2M+Na]^+$ (Abbildung 8-18 A) und eine Masse von $m/z = 461.1 [M-H]^-$ detektiert werden.

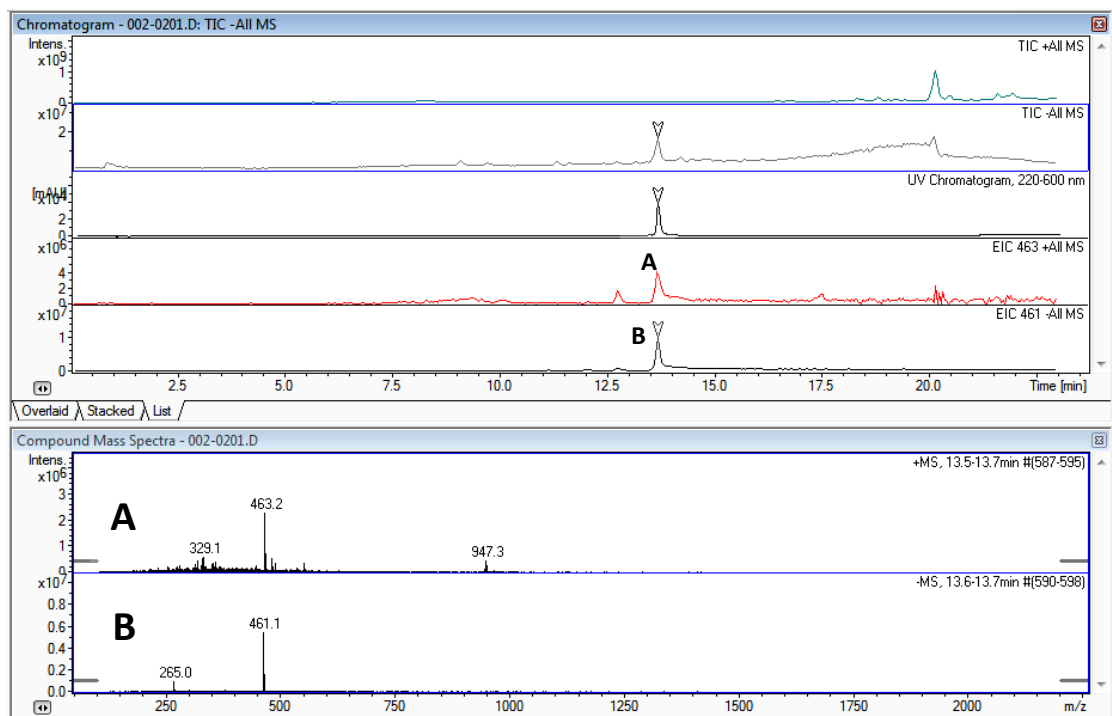


Abbildung 8-18: LC-MS Chromatogramm eines Pigmentextraktes. UV: 220-600 nm; **A**: Extrahierte Massenspur $463.2 [M+H]^+$, $947.3 [2M+Na]^+$. **B**: Extrahierte Massenspur $461.1 [M-H]^-$.

Durch die Hochauflösung konnte eine Molmasse von $m/z = 461.087756 [M-H]^-$ (relative Massenabweichung = 0.11 ppm) bestimmt und dadurch eine Summenformel

von $C_{25}H_{18}O_9$ generiert werden. Es konnten 17 Doppelbindungsäquivalente daraus errechnet werden. Für die lila Substanz wurde entsprechend mittels LC-MS-Analytik eine Molmasse von 488.1 g/mol ermittelt. Durch die Hochauflösung konnte eine Molmasse von $m/z = 487.0670 [M-H]^-$ (relative Massenabweichung = 0.1 ppm) bestimmt und dadurch eine Summenformel von $C_{26}H_{16}O_{10}$, entsprechend 19 Doppelbindungsäquivalente generiert werden (Kapitel A 8.5.3). Deshalb deuteten erste Vermutungen auf ein relativ großes, konjugiertes Ringsystem hin. Es mussten die Doppelbindungsäquivalente, aber auch die geringe Protonenzahl berücksichtigt werden.

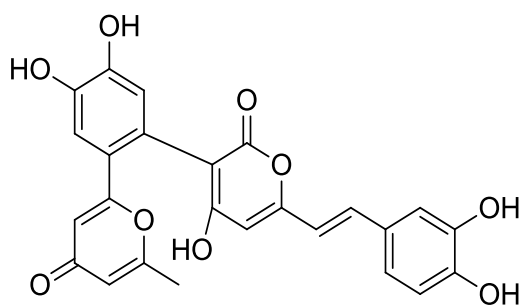
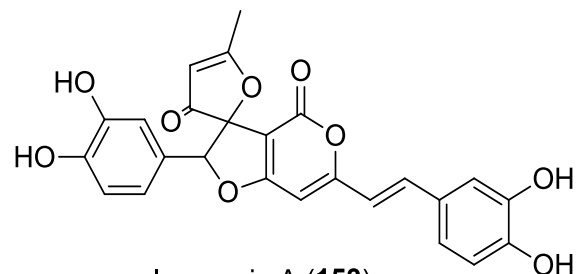
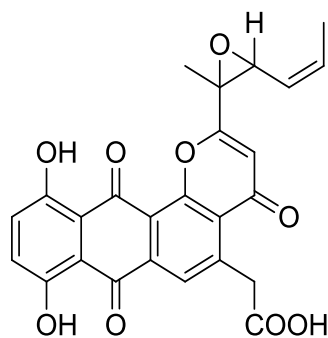
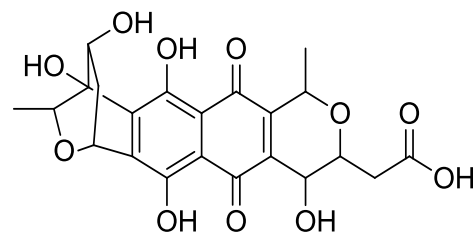
Datenbankrecherche

Bei einer Datenbankrecherche^[179] wurden drei Treffer in Bezug auf die Summenformel erzielt: 1) Inonoblin C (**152**) wird von dem Pilz *Inonotus obliquus* gebildet und weist eine gelbe Farbe auf.^[180] 2) Inoscavin A (**153**) wird von dem Pilz *Inonotus xeranticus* gebildet und zeigt ebenfalls eine gelbe Farbe.^[181, 182] 3) Sapurimycin (**154**); wird von *Streptomyces sp.* DO-116 produziert und weist eine rote Farbe auf, die UV-Daten weichen jedoch von den UV-Daten des roten Pigmentes ab.^[183, 184]

Es wurde eine weitere Datenbankrecherche durchgeführt. Als Suchkriterien wurde ein Massenbereich von 462-462.5 als Quelle *Streptomyces* angegeben. So wurden 2 Treffer erhalten.^[179] Neben dem schon erwähnten Sapurimycin (**154**), wurde auch das Granatomycin E (**155**)^[185, 186] gefunden, das jedoch ebenfalls keine Übereinstimmung der UV-Daten lieferte.

Von besonderem Interesse für das vorliegende Projekt ist jedoch der Hinweis auf das Anthrachinongerüst von **154**. Aus den Arbeiten mit den phenolischen Modellverbindungen (Kapitel A 8.2) ging die Vermutung hervor, dass es sich um ein Anthrachinongerüst handeln könnte. Diese Vermutung wird durch diese Datenbankrecherche gestützt. Sapurimycin (**154**) wird von Streptomyceten produziert, besitzt eine rote Eigenfarbe und zeigt die gleiche Summenformel wie die rote

Zielverbindung. Auch beim Sapurimycin (**154**) war die Aufarbeitung zur Reinsubstanz eine große Herausforderung, schon aufgrund der produzierten Menge; nämlich konnten 20 mg **154** aus 30 L Kultur isoliert werden. Zudem erschwerte die zusätzlich auftretende pH-Aktivität die Aufreinigung zur Reinsubstanz. Die Aufklärung der Struktur war nur mittels Derivatisierung möglich.^[183, 184] Durch die schlechte Löslichkeit in konventionellen Lösungsmitteln und einer Instabilität in DMSO, wurde für die Strukturaufklärung mit Diazomethan methyliert und die Struktur anhand von dem gebildeten Methylester aufgeklärt.


 Inonoblin C (**152**)

 Inoscavin A (**153**)

 Sapurimycin (**154**)

 Granatomycin E (**155**)

NMR-Auswertung

Aus der ersten Isolierung des roten Pigments (Kapitel A 8.4.1), wurde für das Lysochinon ein erster Strukturvorschlag **156** abgeleitet. Die rote Verbindung (6.5 mg verunreinigt) ist nicht optimal bis zum Reinstoff aufgereinigt. Die NMR-Daten wurden

trotzdem verwendet, um zu einem ersten Strukturvorschlag von Lysochinon (**156**) zu gelangen.

Eine vergrößerte Darstellung der Bereiche mit einer chemischen Verschiebung von $\delta_H = 6.4\text{--}7.3$ ppm und $\delta_H = 2.1\text{--}3.3$ ppm sind in Abbildung 8-20 dargestellt.

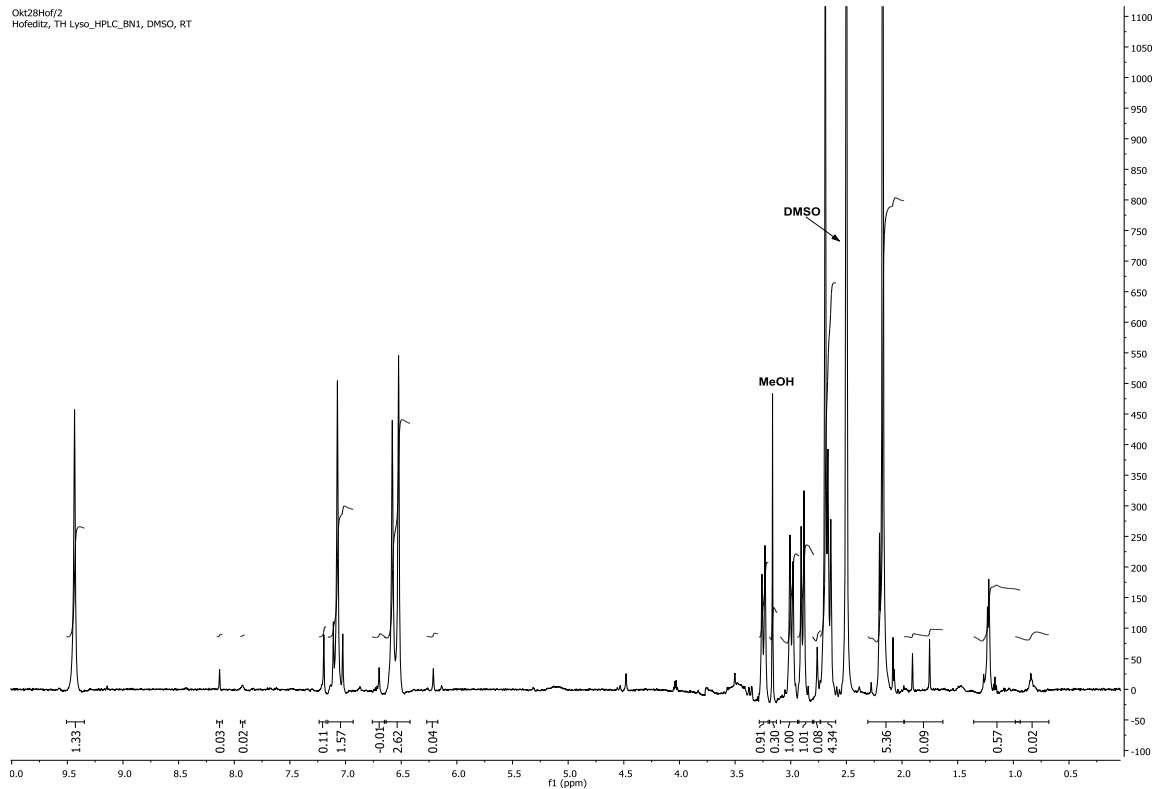


Abbildung 8-19: $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) des roten Pigments, ein erster Strukturvorschlag **156**.

Im Protonenspektrum sind deutlich sehr wenige Signale zu erkennen. Die chemische Verschiebung bei $\delta_H = 9.44$ ppm deutete zunächst auf ein Aldehyd-Proton, bzw. funktionelle Gruppen mit einem starken entschirmenden Effekt hin. Aufgrund der sehr großen Anzahl von 17 Doppelbindungsäquivalenten deutet alles auf ein großes, wahrscheinlich aromatisches Ringsystem hin. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind lediglich drei Signale mit der Intensität von je einem Proton im Bereich von 7 ppm zu sehen. Bei der Zielsubstanz sind mit dem Signal bei $\delta_H = 9.44$ ppm nur vier aromatische Protonen vorhanden (Abbildung 8-20 A). Die Protonensignale bei $\delta_H = 6.52$ und 7.06 ppm zeigen keine Aufspaltung im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, allerdings ist im COSY eine deutliche Kopplung sichtbar. Dies deutet daraufhin, dass es eine sehr kleine Kopplung ist. Die

Größe der Kopplung ist für eine aromatische *ortho*-Kopplung (7-9 Hz) zu klein, aber für eine *para*-Kopplung (oft nicht detektierbar, da <1 Hz) möglicherweise zu groß. Daraus kann nur noch eine *meta*-Kopplung (1-3 Hz) resultieren. Es wäre also möglich, dass es ein aneliertes Ringsystem ist, welches zwei aromatische Protonen in *meta*-Stellung besitzt.

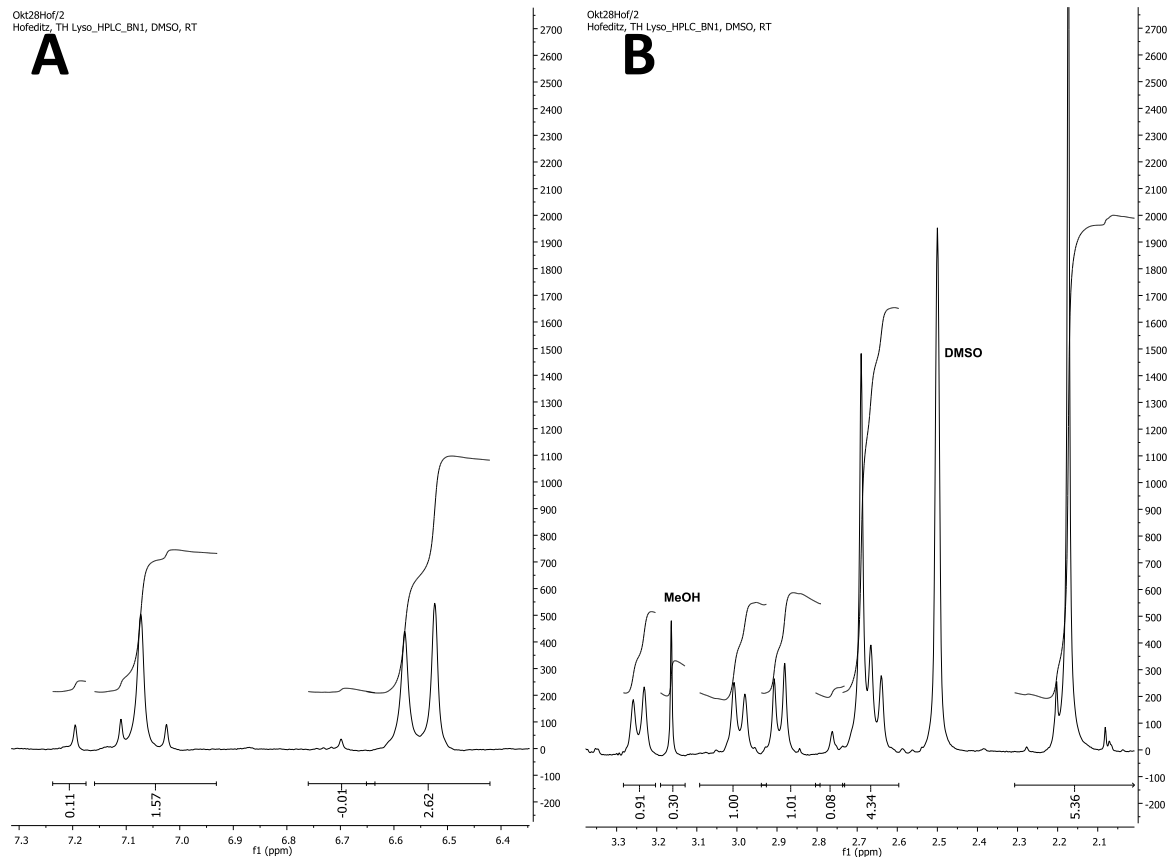


Abbildung 8-20: Vergrößerungen (Expansions) zu Abbildung 8-19. **A:** $\delta_{\text{H}} = 6.4\text{--}7.3$ ppm; **B:** $\delta_{\text{H}} = 2.1\text{--}3.3$ ppm.

Weitere aliphatische Wasserstoffatome weisen eine chemische Verschiebung von $\delta_{\text{H}} = 2.17$ bis zu 3.24 ppm auf (Abbildung 8-20 B). Das deutet darauf hin, dass es sich um aliphatische Methylenprotonen handeln könnte. Das Singulett mit einem Integral von drei Protonen bei einer chemischen Verschiebung von $\delta_{\text{H}} = 2.17$ ppm steht im Einklang mit dem Vorhandensein einer Methylgruppe an einer Carbonylfunktion. Durch HSQC-Experimente konnte gezeigt werden, dass die Signale $\delta_{\text{H}} = 2.65$ und 2.89 sowie 2.99 und 3.24 ppm zu je zwei Methylenignalen gehören, die nur mit sich selber koppeln. Das bedeutet, dass diese Protonen diastereotop sind. Diese Beobachtung

wurde durch das COSY-Experiment und die Kopplungskonstante von jeweils 15.9 Hz für beide CH₂-Signale gestützt. Ein Signal bei $\delta_{\text{H}} = 2.69$ ppm stellt ein Singulett mit einem Integral von zwei Protonen dar, was auf eine Methylengruppe hindeutet, die keine Nachbarprotonen besitzt. Durch die HSQC-Experimente konnten weiterhin allen identifizierten Protonen die zugehörigen Kohlenstoffatome zugeordnet werden (Tabelle 8-4). Verwunderlich war die Zuordnung eines Kohlenstoffatoms bei $\delta_{\text{C}} = 117.2$ ppm zu dem zugehörigen Proton bei $\delta_{\text{H}} = 9.44$ ppm. Das deutet keineswegs auf einen Aldehyd, sondern eher auf ein aromatisches Signal mit einer deutlichen Entschirmung hin.

Bei der Betrachtung des ¹³C-NMR-Spektrums (Abbildung 8-21) konnten zunächst sehr wenig aliphatische Kohlenstoffatome identifiziert werden. Das Signal mit einer chemischen Verschiebung von $\delta_{\text{C}} = 32.5$ ppm deutet auf eine Methylgruppe in direkter Nachbarschaft einer entschirmenden Gruppe hin. Die Signale bei $\delta_{\text{C}} = 52.5, 53.4,$ und 42.9 ppm stehen im Einklang mit der chemischen Verschiebung von Methylengruppierungen. Ein weiteres ¹³C-Signal bei $\delta_{\text{C}} = 71.0$ ppm deutet auf ein Kohlenstoffatom mit einem gebundenen Sauerstoffatom im aliphatischen Bereich. Die Kohlenstoffatome mit einer chemischen Verschiebung in den Bereichen von $\delta_{\text{C}} = 150.5, 164.0$ und 164.5 ppm deuten auf phenolische Kohlenstoffatome hin. Die Signale bei $\delta_{\text{C}} = 182.4, 196.2$ sowie 207.8 ppm weisen carbonylischen Charakter auf, wobei die Carbonylgruppe bei $\delta_{\text{C}} = 207.8$ ppm eher auf eine freie Acetyl- bzw. Acylgruppe hindeutet. In dem Bereich von $\delta_{\text{C}} = 107.0$ bis 140 ppm sind aromatische Kohlenstoffatome zu finden.

Mittels HMBC-Experimenten wurden folgende mittel- und unmittelbare Nachbarschaftsverhältnisse von mehreren Kohlenstoffatomen ermittelt. Es sind nicht viele Protonen im ¹H-NMR erkennbar, daher nehmen alle Protonen eine entscheidende Funktion in der Strukturaufklärung ein. Schlüsselsignale waren $\delta_{\text{H}} = 7.06$ ($\delta_{\text{C}} = 107.0$ ppm) und 6.52 ppm ($\delta_{\text{C}} = 108.0$ ppm), die eine Kopplung mit $\delta_{\text{C}} = 182.4, 110.5, 107.0$ und 108.0 ppm zeigten. Daraus war es möglich, den Ring A (**156**, Abbildung 8-22) zu konstruieren. Weitere entscheidende Signale bei $\delta_{\text{H}} = 2.65$ und 2.89

(beide $\delta_C = 52.2$ ppm) wiesen eine Kreuzkopplung zu $\delta_C = 196.2$ (zwei 4J -Kopplungen), 71.0, 42.9 und 53.4 ppm auf; ein Signal bei $\delta_H = 2.69$ ppm ($\delta_C = 53.4$ ppm) koppelte zu $\delta_C = 207.8, 32.5, 71.0, 52.2$ und 42.9 ppm; ein Signal bei $\delta_H = 2.17$ ppm ($\delta_C = 32.5$ ppm) koppelte zu $\delta_C = 207.8$ ppm; weitere Schlüsselsignal bei Signalen von $\delta_H = 2.99$ und 3.24 ppm (beide $\delta_C = 42.9$ ppm) koppelten zu $\delta_C = 150.5, 71.0, 52.2$ und 53.4 ppm. Aus den Kreuzkopplungen dieser beschriebenen Signale gelang es, den Ring E (**156**, Abbildung 8-22) aufzubauen.

Mit Kenntnis von Ring A und E sowie der weiteren Auswertungen der NMR-Spektren, wurde ein erster Strukturvorschlag (**156**) für das Lysochinon erstellt. Allerdings konnten nicht alle Kohlenstoffatome eindeutig zugeordnet werden. Die an C-13 befindliche Carboxylgruppe, wurde postuliert. Es konnten im $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ keine eindeutigen Belege für eine Carboxylgruppe identifiziert werden. In Tabelle 8-4 sind die Zuordnungen und die Bezifferung aufgeführt.

Identifizierung des Genproduktes der min PKS II von **56** und **16**

Okt28Hof/1
Hofeditz, TH Lyso_HPLC_BN1, DMSO, RT

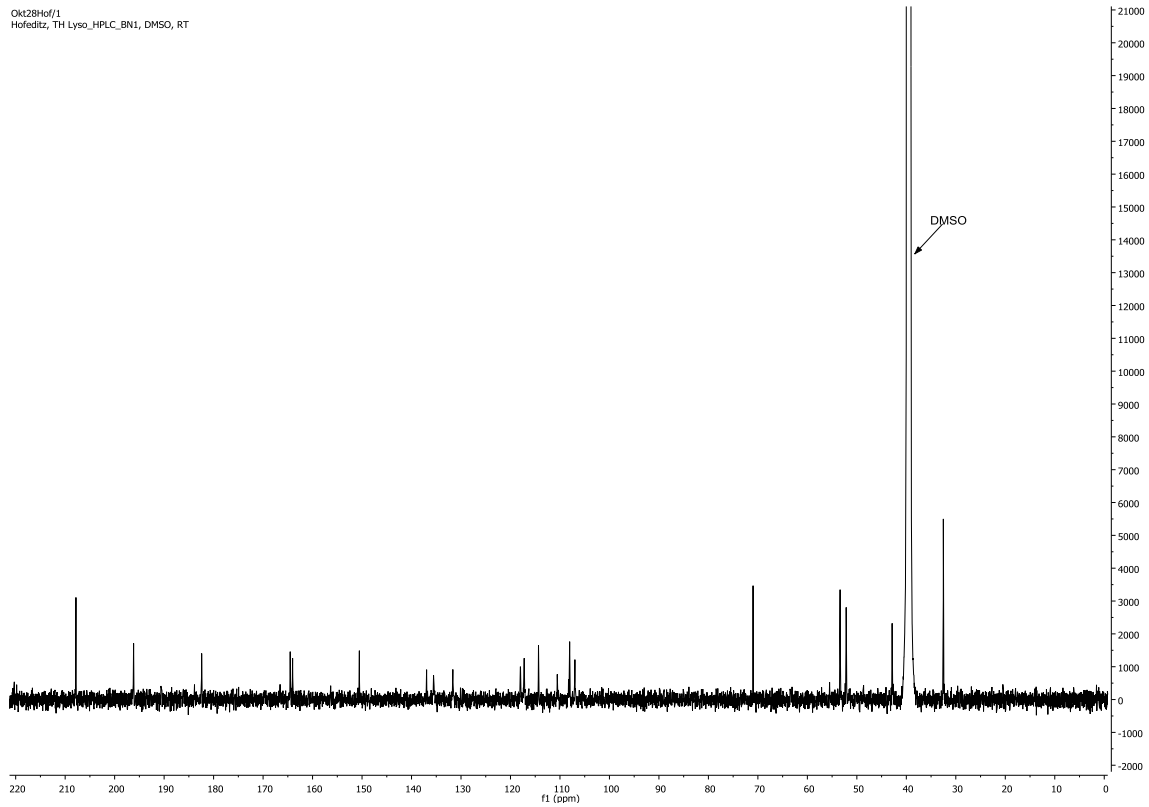
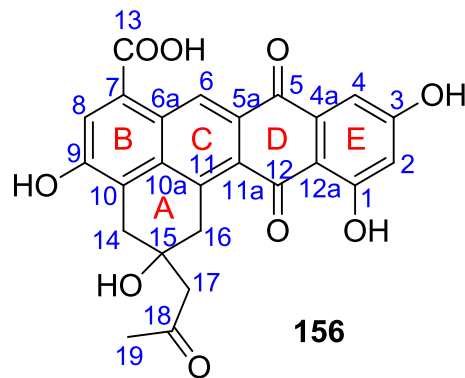


Abbildung 8-21: ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) des Pigments mit roter Farbe, ein erster Strukturvorschlag **156**.



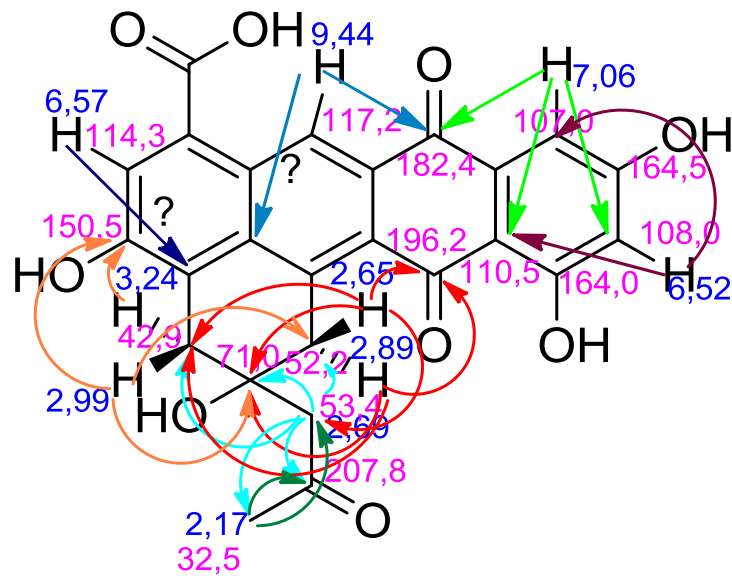


Abbildung 8-22: HMBC-Kreuzkopplungen von **156**.

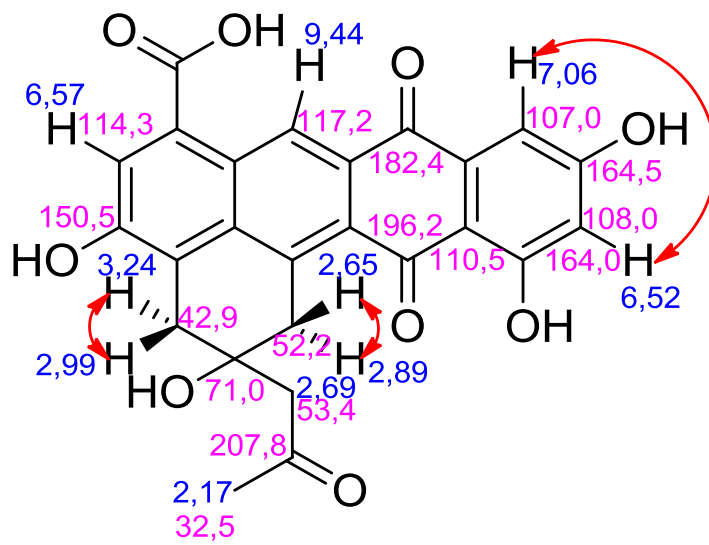
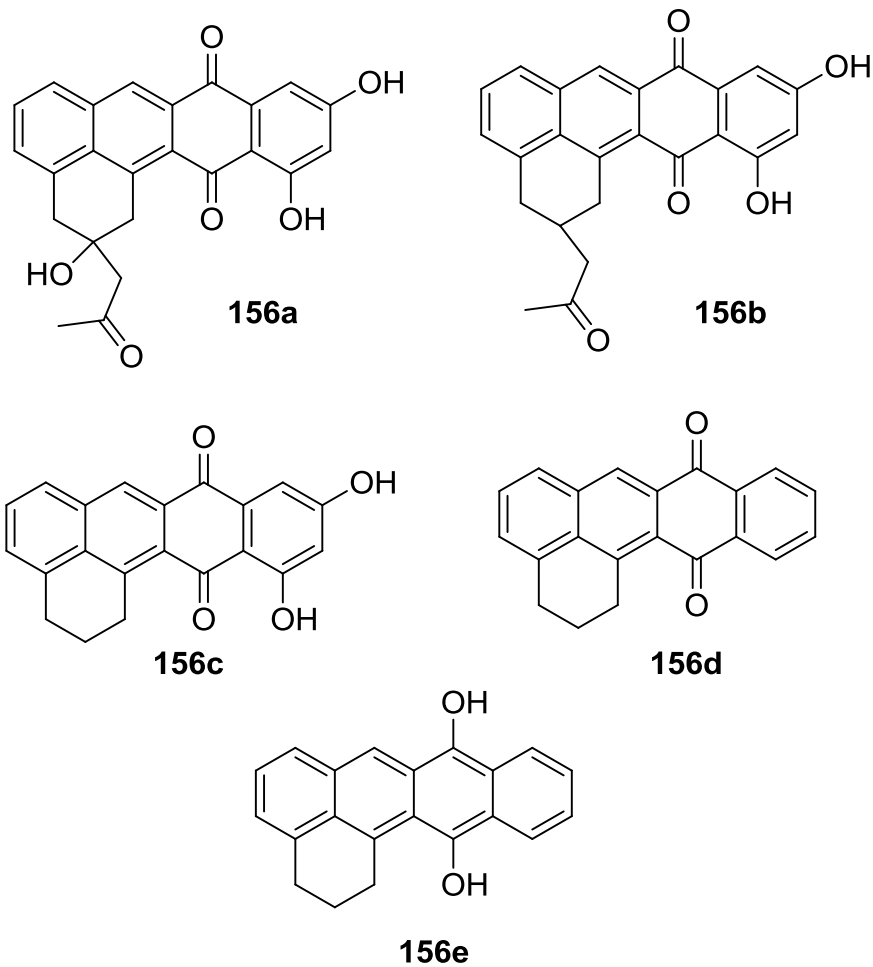


Abbildung 8-23: COSY-Kopplungen von **156**.

Tabelle 8-4: NMR-Daten mit Nummerierung und Zuordnung für den Strukturvorschlag **156** (600 MHz, DMSO-*d*₆) für das Lysochinon. n.b (nicht bestimmbar).

156, Atom-Nr.	δ_H [ppm]	δ_C (HSQC) [ppm]	156, Atom-Nr.	δ_H [ppm]	δ_C (HSQC) [ppm]
1	---	164.0	18	---	207.8
2	6.52	108.0	19	2.17	32.5
3	---	164.5	n.b	---	118.0
4	7.06	107.0	n.b.	---	131.7
5	---	182.4	n.b.	---	135.6
6	9.44	117.2	n.b.	---	137.0
8	6.57	114.3			
12	---	196.2			
12a	---	110.6			
14a	2.99	42.9			
14b	3.24	42.9			
15	---	71.0			
16a	2.65	52.2			
16b	2.89	52.2			
17	2.69	53.4			

Es konnten aus dem ¹³C-NMR-Spektrum (Abbildung 8-21) und unter Zuhilfenahme der HSQC- und HMBC-Experimente (Abbildung 8-22) nicht alle Signale eindeutig zugeordnet werden. Zu diesen Signalen gehörte auch die an C-13 befindliche Carboxylgruppe. Trotzdem konnten durch die hier diskutierten NMR-Spektren, die COSY-, HSQC- und HMBC-Experimente die hier beschriebene Struktur **156** abgeleitet werden. Eine Scifinder-Recherche mit genau dieser Struktur zeigte keine Treffer. Durch Veränderung der Struktur **156** wurden fünf weitere Scifinder-Recherchen von den Strukturen **156a–156e** durchgeführt.



Auch in diesen Recherchen konnte keine Übereinstimmung erzielt werden.

Massenspektrometrische Untersuchungen

Um mehr Strukturinformationen zu erhalten, wurden LC-MS/MS und MS³-Messungen durchgeführt (Abbildung 8-13). Bei beiden Untersuchungen konnte eindeutig gezeigt werden, dass ausschließlich ein Fragment mit dem m/z -Verhältnis von 58 abgespalten wurde.

Dieses Resultat könnte von einer McLafferty-Umlagerung stammen, da kein Stickstoffatom im Molekül vorhanden ist (Abbildung 8-24) und somit keine ungerade Molmasse vorlag.^[115] Der Mechanismus einer denkbaren McLafferty-Umlagerung ist in

Abbildung 8-24 dargestellt. Deshalb könnte ein anelliertes Ringsystem, wie in **156**, ein denkbar plausibles Grundgerüst darstellen.

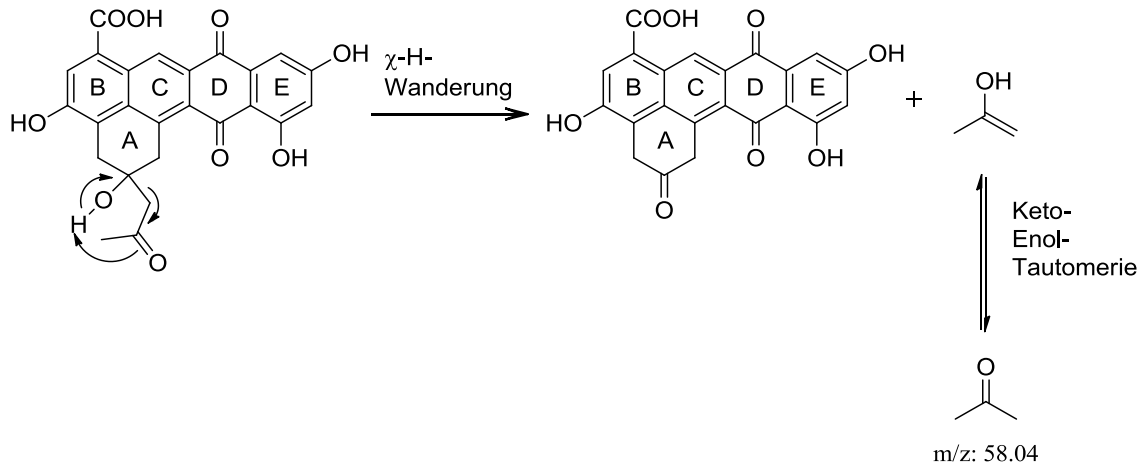


Abbildung 8-24: Die McLafferty-Umlagerung in der MS-Analyse am Beispiel des Strukturvorschlages.^[115]

Das aus der McLafferty-Umlagerung erhaltene Fragment steht im Einklang mit der aliphatischen Seitenkette bei C-17 vom Strukturvorschlag **156** (Abbildung 8-24). Es ergab sich noch ein weiterer Hinweis: Aufgrund der Abspaltung von ausschließlich einem Fragment mit dem m/z -Verhältnis von 58, sowohl bei MS/MS- als auch bei MS³-Untersuchungen, schien das gesamte Molekül sehr stabil zu sein und keine weiteren Abspaltungen zuzulassen.

Prüfung des Strukturvorschlages 156 mittels Biogenese-Hypothese

Problematisch an diesem Strukturvorschlag **156** waren folgende Sachverhalte, so dass **156** als nicht sicherer Strukturvorschlag einzustufen war: 1) Insgesamt konnten zwei ⁴J-Kopplungen im HMBC identifiziert werden, die aber wichtige Strukturinformation lieferten. Normalerweise können ¹J-, ²J- und ³J-Kopplungen beobachtet werden. 2) Wurde eine Acetatkette in die Struktur hinein gelegt, so entstand ein zu den Cyclasen (*llpCI-CIII*) beschriebenes inkonsistentes Faltungsmuster (Vergleich s. Kapitel 7.2.2). 3) Es war nicht möglich, alle Kohlenstoffatome im ¹³C-NMR-Spektrum

zuzuordnen. Unter anderem war die chemische Verschiebung der Carboxylfunktion an Position C-13 nicht bestimmbar und wurde daher postuliert. Deshalb wurden weitere Arbeiten zur Absicherung des Strukturvorschlages notwendig.

Für diesen Strukturvorschlag **156** wurde eine Hypothese zur Biosynthese abgeleitet (Abbildung 8-25). Demnach könnte die Biosynthese am Kohlenstoffatom C-19 starten und die Kondensationen der insgesamt 13 Acetateinheiten erfolgen bis zur Position C-11. Des Weiteren würden die Kondensationsschritte gegen den Uhrzeigersinn bis zum C-6a verlaufen. Die nächste Acetateinheit kondensiert an Position C-10a und C-10. Durch ein Fütterungsexperiment mit markierten Vorläufern (Kapitel A 8.5.3) müsste an Position C-14 eine Einzelanreicherung zu finden sein. Demnach würde hier eine Decarboxylierung bzw. eine Decarbonylierung während der Biosynthese stattfinden. Im Anschluss könnte die Kondensation von zwei Acetateinheiten an Position C-9 und C-8 sowie an C-7 und C-13 erfolgen.

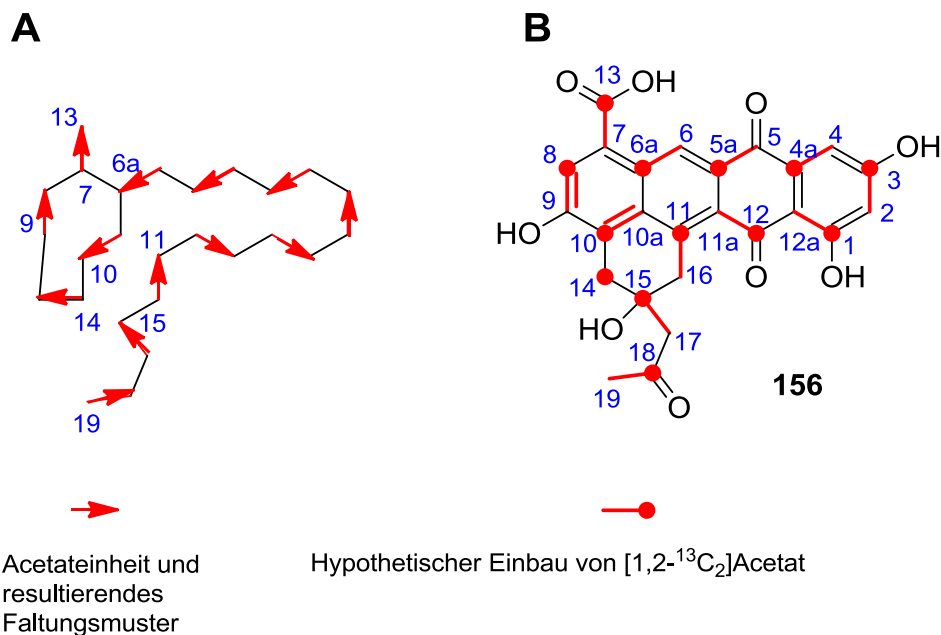


Abbildung 8-25: Postulierte Biosynthese von dem Strukturvorschlag Lysochinon-TH1 (**156**). **A**: Genuine Polyketidkette für **156**. **B**: Hypothese des Einbaumusters für **156**.

Für eine kritische Bewertung dieses Strukturvorschlages bedurfte es folgender Voraussetzungen: 1) PKS II: Es handelte sich um ein PKS II-Produkt, daher war es

notwendig, dass eine durchgängige, sinnvolle Acetatkette in die Struktur hineingelegt werden konnte. 2) Strukturaufklärung: Die erhaltenen NMR-Daten aus ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HSQC, COSY und HMBC müssen plausibel und zueinander stimmig sein.

Das Hineinlegen einer sinnvollen Acetatkette in die Struktur **156** war sehr schwierig (Abbildung 8-25). Nach der aufgestellten Hypothese der Biogenese, erfolgt während der Biosynthese eine Decarboxylierung am Kohlenstoffatom C-14, wodurch die Kette unterbrochen würde. Das resultierende Faltungsmuster widersprach den in Kapitel 7.2.2 (Abbildung 7-12) beschriebenen Faltungen durch die Cyclasen *llpCI-CIII* (Abbildung 8-26). Zudem konnte die Aufarbeitung nicht reproduziert werden, wodurch es nicht möglich war, weitere Verbindungen zu isolieren, um dieses Faltungsmuster zu bestätigen. Dadurch war der Strukturvorschlag nicht gesichert.

Bei der Strukturaufklärung konnte nicht zu jedem Atom eine Zuordnung stattfinden. Weiterhin konnten im HMBC-Experiment Kreuzkopplungen (von $\delta_{\text{H}} = 2.65$ und 2.89 ppm (beide am $\delta_{\text{C}} = 52.2$ ppm) zu $\delta_{\text{C}} = 196.2$ ppm) identifiziert werden, die sich als ^4J -Kopplungen herausstellten (Abbildung 8-22). Normalerweise werden ^2J - und ^3J -Kopplungen beobachtet. Auch die beschriebene Carboxylgruppe (C-13) von **156** war nicht zu identifizieren. Aus diesen Ergebnissen wurde die Plausibilität dieses Strukturvorschlags in Frage gestellt. Es mussten weitere Arbeiten vorgenommen werden, um eine Absicherung des Strukturvorschlags zu erreichen.

8.5.2 Vergleich mit ähnlichen Naturstoffen: Pradimicine und weitere

Benzo[α]naphthacen Chinone

In Kapitel A 7.2.2 sind die im Lysolipin I (**16**)-Biosynthesegencluster vorhandenen Cyclasen (*llpCI-CIII*) beschrieben. Eingeordnet wurden diese nach ihrer Funktion, der Möglichkeit zum Aufbau von pentangulären Polyphenolen. Die vorgeschlagene Struktur **156** trägt ein polycyclisches, aromatisches und anneliertes Ringsystem mit der erwarteten Anzahl an 17 Doppelbindungsäquivalenten. Allerdings ist in Struktur **156** die Anordnung der Ringe anders als erwartet (Abbildung 8-26).

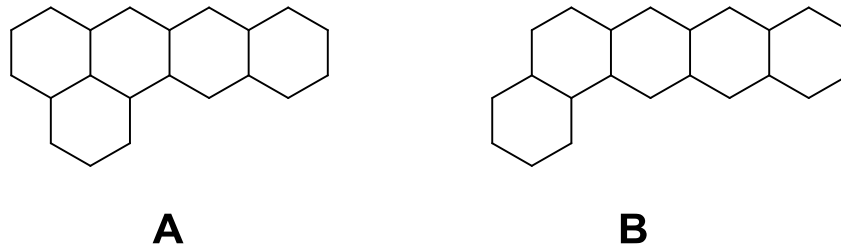
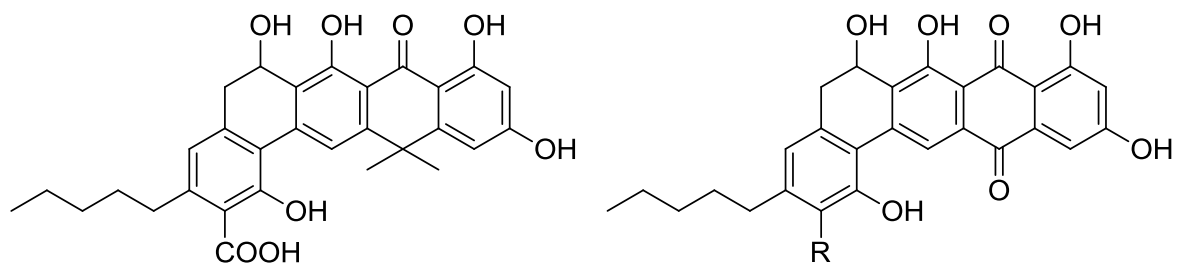


Abbildung 8-26: **A**: Schematisches Ringsystem von **156**. **B**: Schematisches Ringsystem anhand von der Cyclasen (*llpCl-CIII*)-Spezifität.

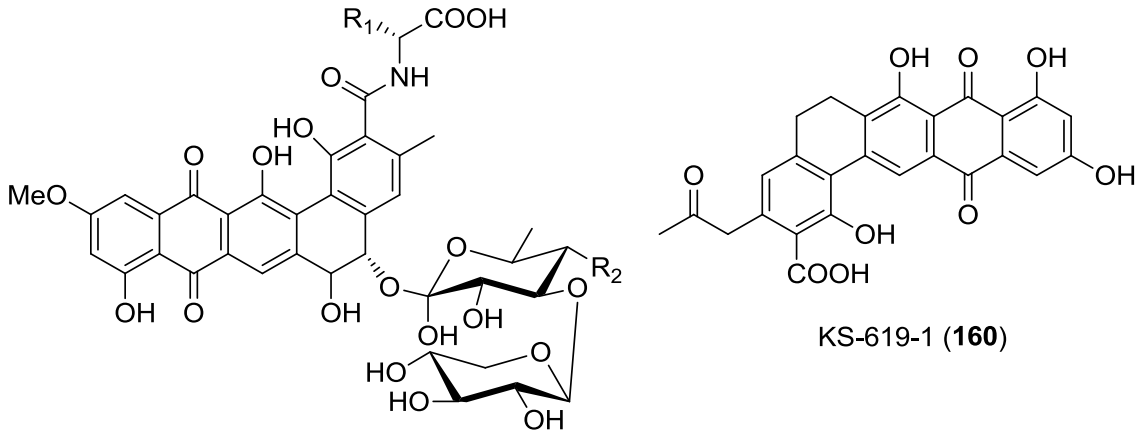
In Bezug auf weitere in dem zuvor genannten Abschnitt beschriebene Cyclasen befand sich der neue Strukturvorschlag **156** aus der lys PKS zwischen den Produkten der Angucyclin (**132**)- und der Anthracyclin (**135**)-Cyclasen. Dies ist sehr untypisch und widersprach allen Erwartungen. Allerdings ist eine Expression dieser Cyclasen in einem heterologen Wirt eine größere Herausforderung, als die im Wildtyp-Stamm.



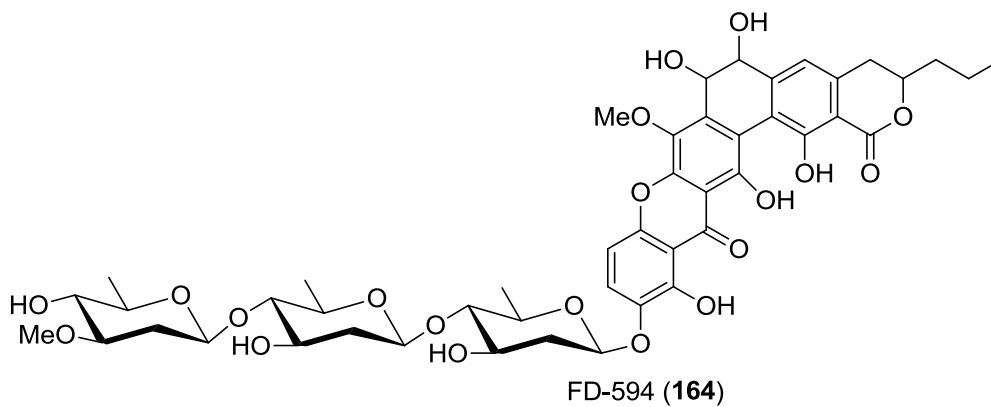
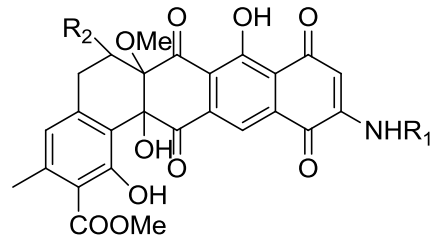
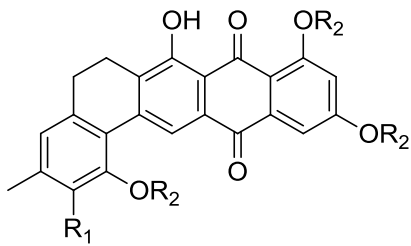
Bequinostatin A (**157a**) R = COOH
 Bequinostatin B (**157b**) R = H

Benastatin A (**158**)

Durch Literaturrecherche konnte ein Vergleich zu der Gruppe der Benzo[α]naphthacen Chinone gezogen werden. Ein Merkmal ist eine grundsätzliche Ähnlichkeit in Bezug auf das Grundgerüst der pentangulären Polyphenole. Aus dieser Gruppe sind verschiedene Vertreter bekannt: Bequinostatin A (**157a**), Bequinostatin B (**157b**) und Benastatin A (**158**)^[187, 188, 189], Pradimicin A (**159a**) und D (**159b**)^[188, 190, 191, 192, 193, 194, 195], Benanomycin A (**159c**) und B / Pradimicin C (**159d**)^[196], KS-619-1 (**160**)^[197, 198], G-2N (**161**), G-2A (**162**)^[199, 200], SF2446 A3 (**163a**) und B3 (**163b**)^[201, 202] sowie FD-594 (**164**)^[203].



Pradimicin A (**159a**) $R_1 = \text{NHMe}; R_2 = \text{Me}$
 Pradimicin D (**159b**) $R_1 = \text{NHMe}; R_2 = \text{H}$
 Benanomycin A (**159c**) $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{Me}$
 Benanomycin B = Pradimicin C (**159d**) $R_1 = \text{NH}_2; R_2 = \text{Me}$



Die pentangulären Polyphenole der Pradimicinfamilie

Die Familie der Pradimicine stellt eine sehr potente Substanzklasse dar. Innerhalb weniger Jahre konnten die Struktur und die Biosynthese von Pradimicin A (**159a**) und seinen Derivaten aufgeklärt werden. OKI *et al.*^[195], WALSH *et al.*^[204, 205] und BALZARINI *et al.*^[206] konnten die biologischen Aktivitäten einer Reihe von sieben Pradimicinen und acht Derivaten erweitern. Neben synthetischen Arbeiten^[207, 208, 209] und spektroskopischen Untersuchungen^[210, 211] ist es KIM *et al.*^[212] gelungen, den Biosynthesegencluster der Pradimicine (**159a**) zu identifizieren, zu sequenzieren und zu charakterisieren und daraus eine Biosynthese nach PKS II zu pentangulären Polyphenolen zu belegen (Abbildung 8-27 und Abbildung 8-28).

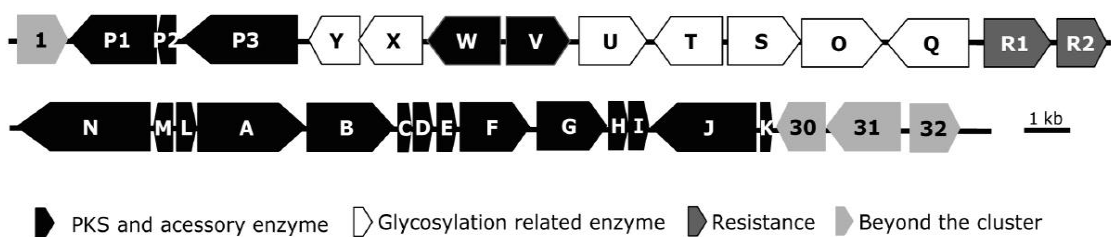


Abbildung 8-27: Biosynthesegencluster von Pradimicin (**159a**). Abbildung entnommen aus [212].

Dank dieser Arbeiten war es TANG *et al.* möglich, biosynthetische und genetische Untersuchungen zu betreiben.^[213, 214] Diese Arbeiten bzw. Beispiele der Pradimicine (**159a**) sollen deutlich den Zusammenhang zwischen der Funktion der Cyclasen und dem letztendlichen Grundgerüst aufzeigen. Die Cyclasen bauen ein Grundgerüst erwartungsgemäß nach Kapitel A 7.2.2 auf. Dieses stand im großen Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen mit dem Strukturvorschlag **156**. Mittels 'Biosynthetic-Engineering' konnten die einzelnen Schritte der Pradimicin (**159a**)-Biosynthese aufgeklärt werden und zu einem Biosyntheschema zusammengetragen werden. (Abbildung 8-28).^[213]

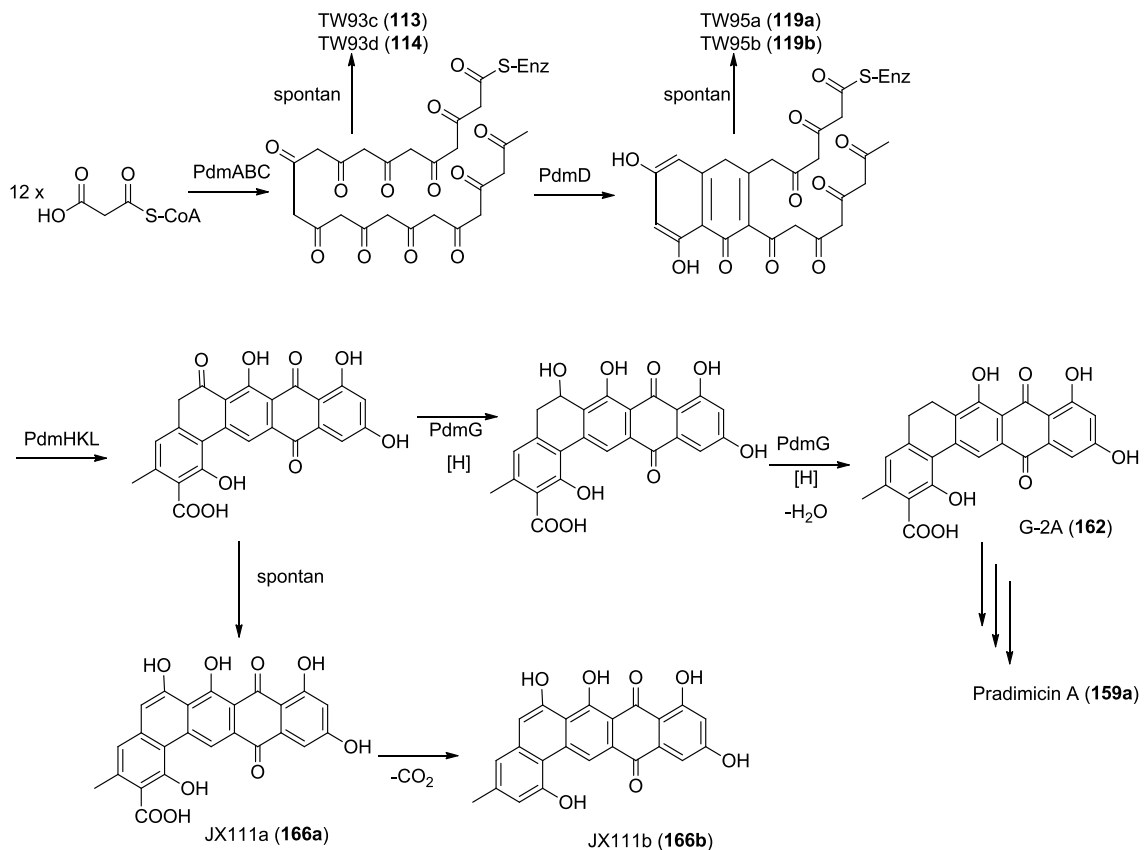
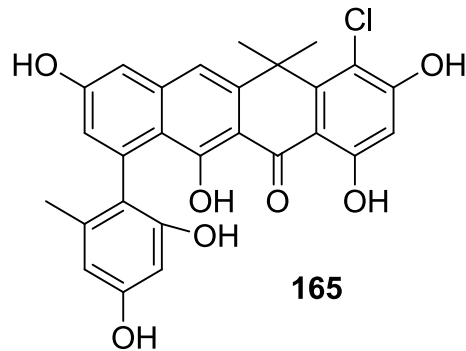


Abbildung 8-28: Biosynthese von Pradimicin A (**159a**). Die Verbindungen TW93c (**114**), TW93d (**115**), TW95a (**119a**) und TW95b (**119b**) [Abbildung 7-10].^[213]

Vergleich mit AZ154 (**165**), einem Tridecaketid

Das Grundgerüst von Lysochinon-TH1 (**137**) wird aus einer Tridecaketidkette gebildet. Ein Vorläufer aus 13 Acetateinheiten ist nicht oft publiziert. FENG *et al.* haben gezeigt, dass aus einer minimalen PKS II die Struktur von AZ154 (**165**) resultierte. Das Faltungsmuster war jedoch ein anderes, als das in der vorliegenden Arbeit (vier anellierte Ringe, die durch eine Einfachbindung mit einem weiteren Aromaten verbunden sind). Es wurde allerdings nicht beschrieben, ob das von Cyclasen und der minimalen PKS gebildete Biosynthese-Intermediat auch isoliert oder die Struktur nur postuliert wurde.^[215] Somit stellt das Lysochinon-TH1 (**137**) mit 13 aneinander kondensierten Acetatgruppen das größte Polyketid dar, welches nur aus der min PKS II (*llpD*, E, F) und Cyclasen (*llpCI*–CIII) in einem Expressionswirt gebildet wird.



8.5.3 Biogenese und Strukturaufklärung von Lysochinon-TH1 (137)

Durch Fütterungsexperimente mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Acetat}$ sollte die Biogenese der roten Substanz aufgeklärt und die oben vorgeschlagene Struktur **156** überprüft werden. Weiterhin sollte die genaue Identifizierung der Biogenese einen Aufschluss darüber geben, wie die Verbindung in der Biosynthese durch die min PKS II (*llpD*, E, F) und die Cyclasen (*llpCI*–*CIII*) aufgebaut wird. Durch die Absicherung der Biogenese des roten Pigments sollte ferner untersucht werden, in wie weit diese Struktur mit der postulierten Biosynthese des Lysolipins (**56**, **16**) vereinbar ist (Abbildung 7-2). Mit dem optimierten und im Rahmen dieser Arbeit etablierten Aufarbeitsverfahren (Kapitel A 8.4.2) wurde die Kultivierung, ein vier Liter Fermenter mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Acetat}$ fütterung (Kapitel A 8.1), aufgearbeitet und 3.4 mg der roten Substanz erhalten. Daraus geht hervor, dass es sich bei dem roten Pigment um eine Minderkomponente handelt. Im Anschluss wurde eine NMR-Analyse (600 MHz; 3 mm Röhrchen, $\text{DMSO-}d_6$) durchgeführt und ein $^1\text{H-NMR}$, ein $^{13}\text{C-NMR}$, ein HSQC und ein HMBC aufgenommen. Mittels $^1\text{H-NMR}$ ließ sich auf eine Reinheit von ca. 70 % schließen, was ausreichend für die folgende Strukturaufklärung war.

$^1\text{H-NMR}$ der $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Acetat}$ markierten Substanz 137

Zunächst wurde das in Abbildung 8-19 gezeigte $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Aufarbeitung an der präparativen HPLC noch Ammoniumformiat enthalten war. Dieses verdeckte nahezu das Signal bei $\delta_{\text{H}} = 7.09$ ppm. Mit Zuhilfenahme der Expansions (Abbildung 8-30), war es allerdings

möglich, alle Signale eindeutig zuzuordnen. Wieder war das Singulett bei $\delta_H = 9.48$ ppm zu beobachten, sowie die Signale mit einer chemischen Verschiebung von $\delta_H = 7.09$, 6.66 und 6.55 ppm. Auch die Methylenprotonen und die aliphatische Methylgruppe mit einer chemischen Verschiebung von $\delta_H = 2.18$ bis 3.26 ppm konnten bestätigt werden (Abbildung 8-19, Abbildung 8-30). Die Zugehörigkeit zu den entsprechenden Kohlenstoffatomen wurde durch das HSQC-Experiment belegt.

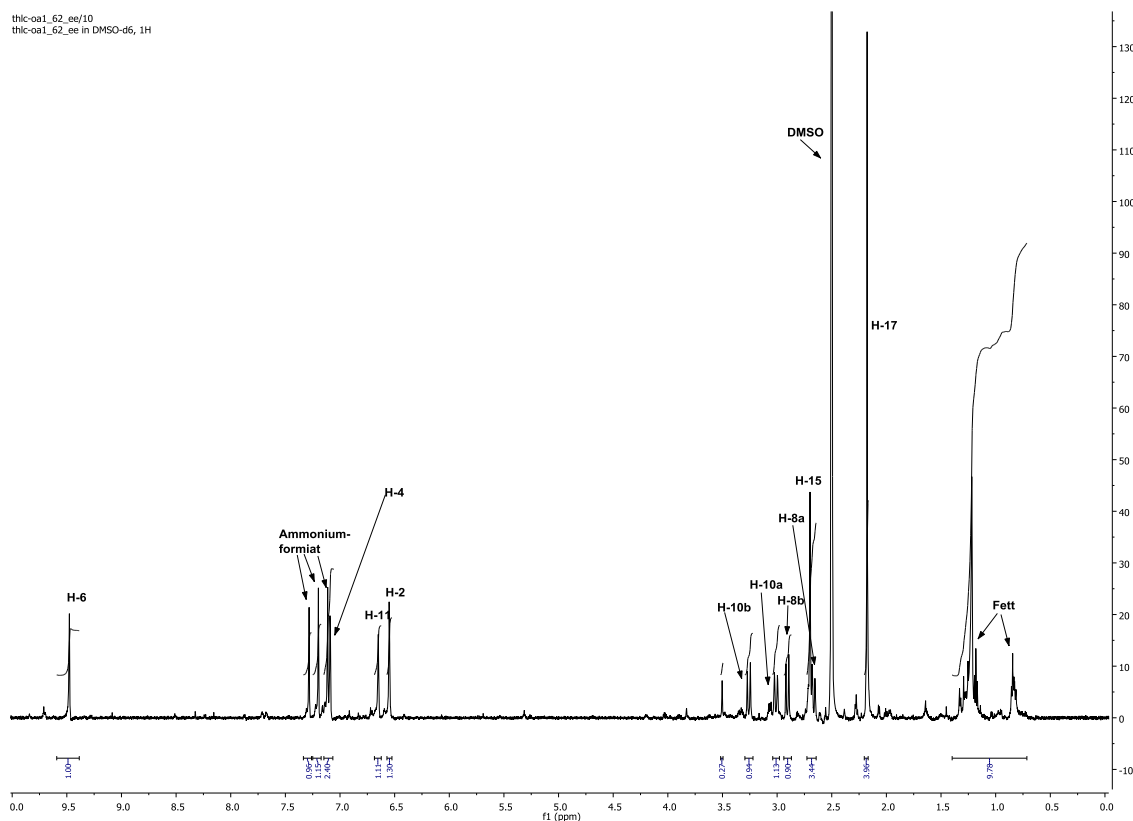


Abbildung 8-29: $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 ; 600 MHz) von Lysochinon-TH1 (**137**); ^{13}C -markiert.

Alle Signale konnten identifiziert werden, die schon durch das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 8-19) der nicht markierten Substanz bekannt waren. Durch die noch vorhandenen Fette sowie das Ammoniumformiat, konnte ein Reinheitsgrad von ca. 70 % ermittelt werden, was für die Auswertung der NMR-Spektren ausreichend war. Eine größere Reinheit wäre für eine biologische Testierung notwendig. Falls eine biologische Aktivität auftreten sollte, könnte nicht garantiert werden, dass diese von der Zielsubstanz oder der Verunreinigung resultiert.

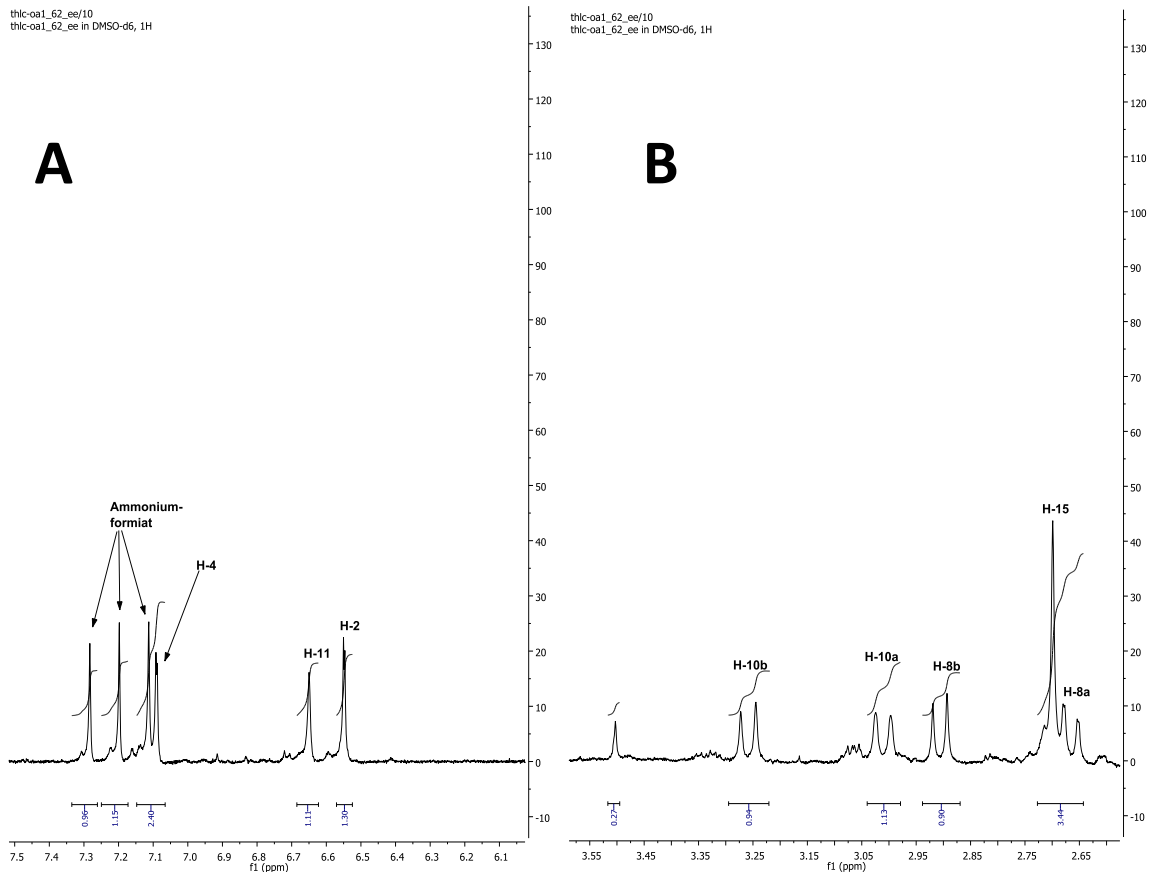


Abbildung 8-30: Expansion von Abbildung 8-29. **A**: $\delta_{\text{H}} = 6.1\text{--}7.5$ ppm; **B**: $\delta_{\text{H}} = 2.60\text{--}3.60$ ppm.

¹³C-NMR des [1,2-¹³C₂]Acetat markierten Lysochinon-TH1 (137)

Beim Vergleich von dem ¹³C-NMR des markierten roten Pigmentes (Abbildung 8-31) und des nicht markierten Pigmentes (Abbildung 8-21) konnten deutliche Unterschiede festgestellt werden.

Schon in den NMR-Spektren des nicht markierten Pigments (Abbildung 8-19, Abbildung 8-21), war eine Zuordnung der Carboxylgruppe (C-13) nicht eindeutig. Die Intensitäten der vorhandenen Signale mit einer chemischen Verschiebung von $\delta_{\text{C}} = 160\text{--}175$ ppm waren sehr klein. Daher wurde diese Carboxylgruppe postuliert. Ein Hinweis auf diese Carboxylgruppe war in den NMR-Spektren des markierten Pigments (Abbildung 8-19, Abbildung 8-31) nicht gegeben. Anstelle dieser Carboxylgruppe war eine Carbonylgruppe vorhanden ($\delta_{\text{C}} = 186.6$ ppm). Dieses Signal war in dem ¹³C-NMR-Spektrum des unmarkierten roten Pigments nicht zu sehen (Abbildung 8-21).

Vermutlich war die Relaxationszeit dieser Carbonylgruppe im NMR durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu benachbarten Hydroxylgruppen sehr lang. Zusätzlich kann DMSO als Lösungsmittel komplexierend wirken. Eine solche Komplexierung wird z.B. durch die Bildung relativ starker Wasserstoffbrückenbindungen hervorgerufen. Dadurch könnte hervorgehen, dass die Retentionszeit bestimmter Signale außerhalb der NMR-Zeitskala läge. Das könnte zu einem fehlenden Signal führen.^[216]

Durch die Fütterung von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat sollte ein Einbau von intakten, angereicherten Acetateinheiten resultieren. Aus diesem Einbau würden definierte Kopplungskonstanten zwischen zwei angereicherten, benachbarten Kohlenstoffatomen folgen, womit intakte Acetateinheiten sehr gut identifiziert werden könnten. Durch diese charakteristischen Kopplungskonstanten und Zuhilfenahme des HSQC erfolgte die Analyse der ^{13}C -NMR-Signale. Die NMR-Spektren (Abbildung 8-31, Abbildung 8-32, Abbildung 8-33) wurden hinsichtlich der Zuordnungen und der Kopplungskonstanten ausgewertet und mit denen von einer Probe ohne ^{13}C -Markierung verglichen. Für diesen Vergleich wurden die Abbildung 8-21 und Abbildung 8-31 herangezogen. Ausgewertet wurden vor allem Kopplungen benachbarter isotope-markierter Kohlenstoffkerne. Wenn nur ein Kohlenstoffatom einer Acetateinheit eingebaut worden wäre, so würde eine Einzelanreicherung zu sehen sein, aber keine Kopplung zu isotope-markierten Nachbarn. Allerdings könnten statistische Kopplungen zu natürlich vorkommenden Kohlenstoffatomen auftreten, die zu ^{13}C - ^{13}C -Kopplungen führen würden. Das Auftreten von statischen Kopplungen spricht für eine hohe Anreicherung des Kohlenstoffatoms in Nachbarschaft.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum (Abbildung 8-31) wurden die ^{13}C - ^{13}C -Kopplungen analysiert. Daraus ging hervor, dass bei jedem Kohlenstoffatom eine Anreicherung vorlag. Es wurden deutlich eine Zentrallinie und ein Dublett gesehen. Ein Dublett im ^{13}C -NMR-Spektrum resultiert aus einer Kopplung zweier benachbarter, isotope-markierter Kohlenstoffatome und belegt in diesem Fall den Einbau einer intakten Acetateinheit (Abbildung 8-31, Abbildung 8-32, Abbildung 8-33). Die daraus resultierenden,

charakteristischen ^{13}C - ^{13}C -Kopplungen sind für beide Koplungspartner identisch, wodurch dieser eindeutig bestimmt werden kann.

Weiterhin waren zufällig auftretende, also statische Kopplungen zu Nachbarn beobachtet worden (Abbildung 8-32, Abbildung 8-33).

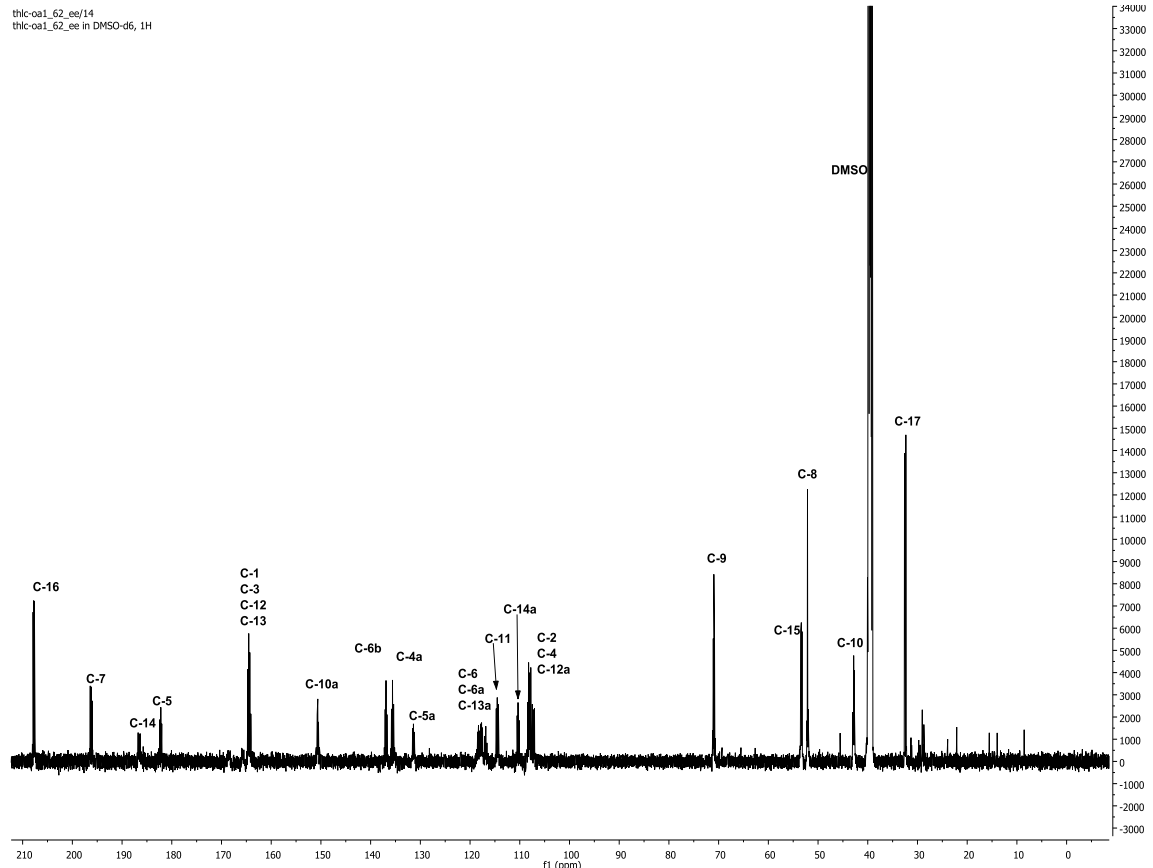


Abbildung 8-31: ^{13}C -NMR (DMSO-*d*6; 150 MHz) von Lysochinon-TH1 (**137**); ^{13}C -markiert.

Nach vollständiger Auswertung und Berücksichtigung der vorhandenen NMR-Spektren (^{13}C -NMR, HMBC, HSQC, ^1H -NMR) war es nicht möglich, die Struktur **156** zu bestätigen. Es wurde eine ^{13}C - ^{13}C -Kopplung von ca. 40 Hz identifiziert (Abbildung 8-32 D koppelt mit Abbildung 8-33 I). Die hier eingebaute Acetateinheit wies eine chemische Verschiebung von $\delta_{\text{C}} = 42.8$ und 150.6 ppm auf. Wird die Struktur **156** zugrunde gelegt, so zeigte diese eine Kopplung von C-9 mit C-14 (Abbildung 8-25). Diese beiden Kohlenstoffatome sind in **156** nicht direkt benachbart, sondern durch das C-10-Atom voneinander getrennt. Daher sollte zwischen diesen beiden Kohlenstoffatomen keine

Kopplung zu beobachten sein. Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann der Strukturvorschlag **156** für das rote Pigment nicht stimmen.

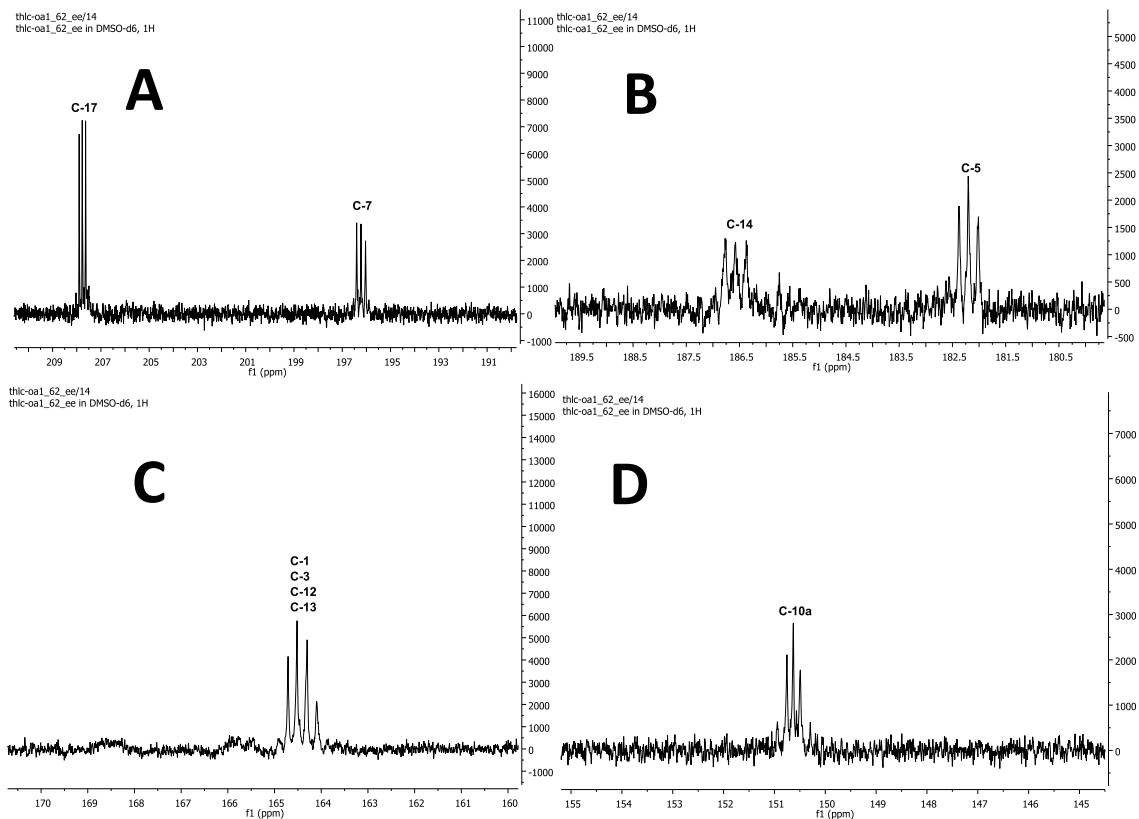


Abbildung 8-32: Expansion zu Abbildung 8-31. **A:** $\delta_C = 190\text{--}210$ ppm. **B:** $\delta_C = 180\text{--}190$ ppm. **C:** $\delta_C = 160\text{--}170$ ppm. **D:** $\delta_C = 145\text{--}155$ ppm.

Ein neuer Strukturvorschlag musste für das rote Pigment vorgenommen werden. Folgende Daten waren jetzt stimmig: 1) Im HMBC konnten keine 4J -Kopplungen mehr, sondern nur noch 3J - und 2J -Kopplungen identifiziert werden. 2) Es konnte eine Zuordnung aller Kohlenstoffatome erfolgen (Tabelle 8-5), die durch den Einbau von intakten Acetateinheiten belegt wurden. 3) Es wurden $^{13}\text{C}\text{--}^{13}\text{C}$ -Kopplungen nur zu benachbarten, isotopenmarkierten Kohlenstoffkernen beobachtet. Teilweise waren zufällige, statistische Kopplungen zu sehen. 4) Wurde eine Acetatkette in die Struktur **137** hineingelegt, so resultierte ein mögliches Grundgerüst, welches durch die Cyclasen (*llpCl-CIII*) aufgebaut werden könnte. Aus den Kopplungsmustern der ^{13}C -markierten NMR-Spektren wurde eine mögliche Biogenese ermittelt (Abbildung 8-35). Daraus

konnte eine weitere sehr ähnliche Struktur vorgeschlagen werden. Die Struktur wurde als Lysochinon-TH1 (**137**) bezeichnet.

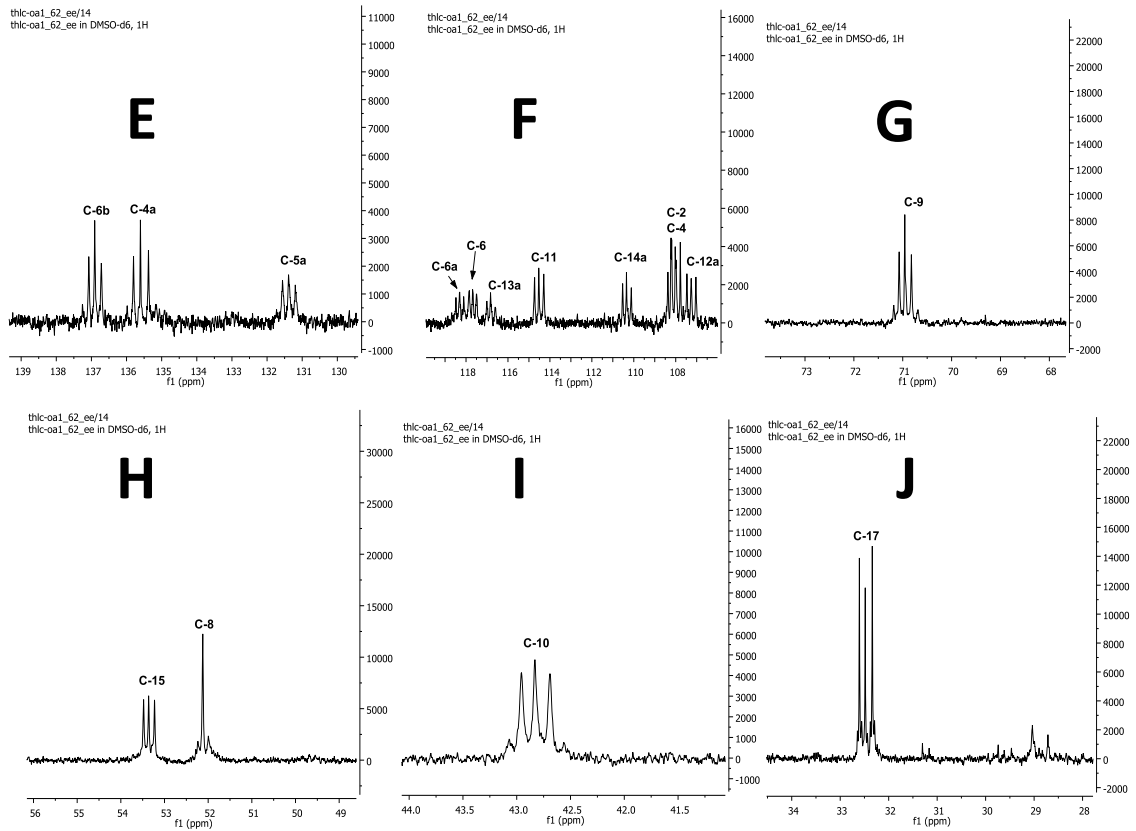
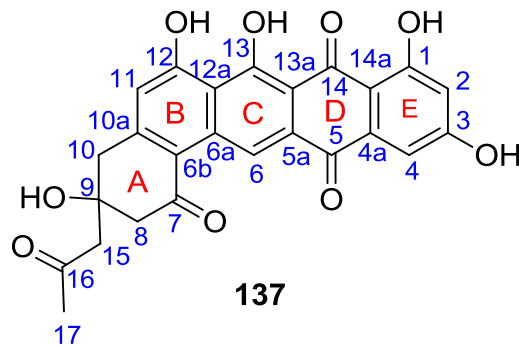


Abbildung 8-33: Expansion zu Abbildung 8-31. **E**: $\delta_C = 130\text{--}139$ ppm. **F**: $\delta_C = 107\text{--}119$ ppm. **G**: $\delta_C = 68\text{--}74$ ppm. **H**: $\delta_C = 49\text{--}56$ ppm. **I**: $\delta_C = 41\text{--}44$ ppm. **J**: $\delta_C = 28\text{--}34$ ppm.



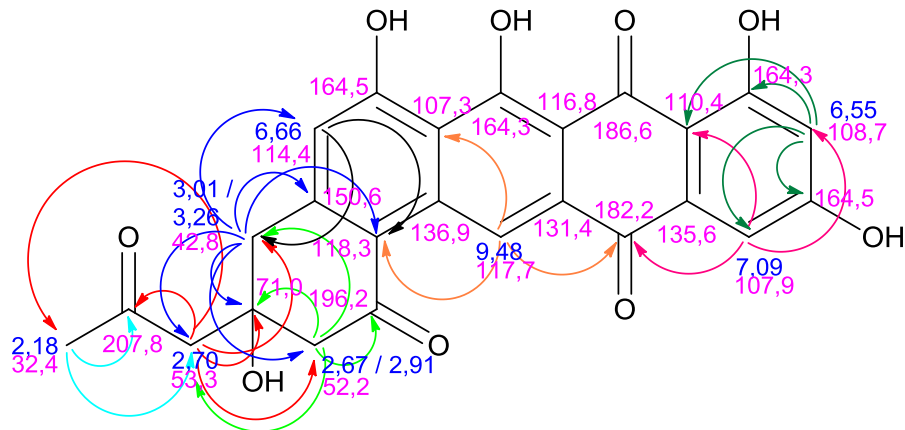


Abbildung 8-34: Erhaltene HMBC-Korrelationen von Lysochiron-TH1 (**137**) mit der chemischen Verschiebung der Wasserstoffatome (blau) und der Kohlenstoffatome (pink).

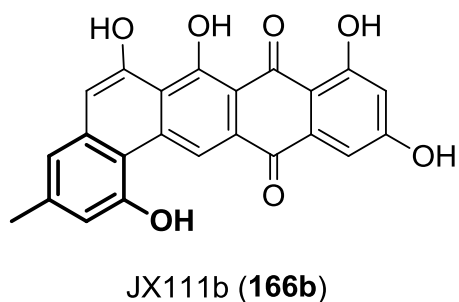
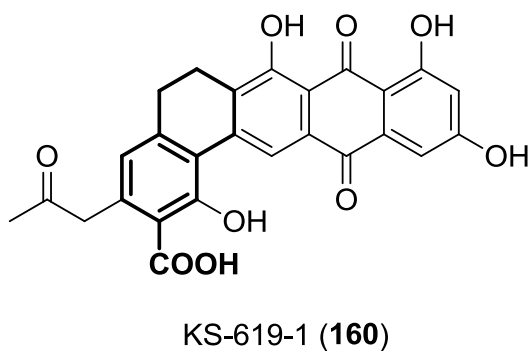
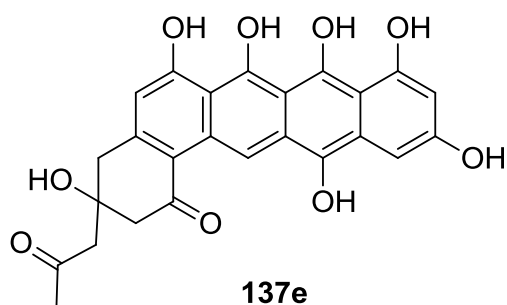
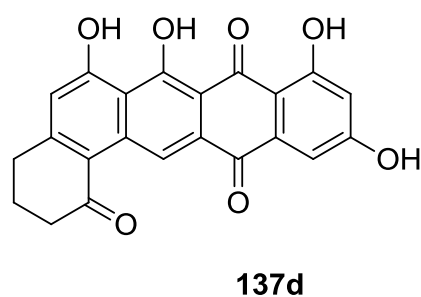
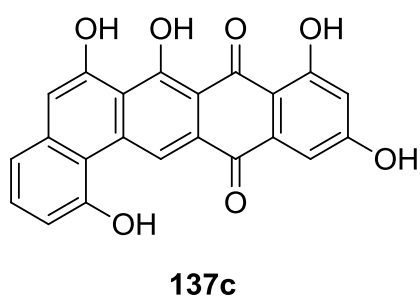
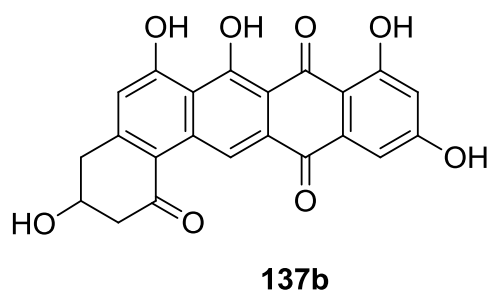
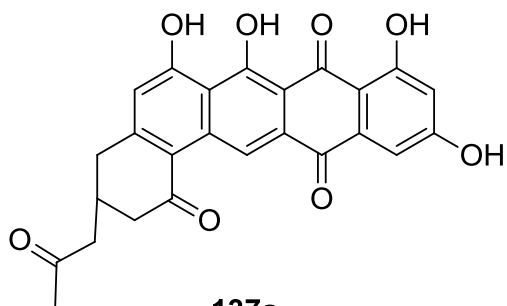
Das Signal bei einer chemischen Verschiebung von $\delta_c = 150.6$ ppm konnte einem α,β -ungesättigtem Keton zugeordnet werden.^[115] Diese Zuordnung ist zu der Struktur **137** plausibel. Bei **137** befinden sich die Kohlenstoffatome C-10 ($\delta_c = 42.8$ ppm) und C-10a ($\delta_c = 150.6$ ppm) in direkter Nachbarschaft. Das deckte sich mit den analytischen Daten aus dem Fütterungsexperiment mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Acetat}$. Zwischen diesen beiden Kohlenstoffatomen konnte eine Kopplung von ca. 40 Hz identifiziert werden. Vergleichend mit dem ersten Strukturvorschlag **156** konnte eine Kopplung von C-9 ($\delta_c = 150.6$ ppm) und C-14 ($\delta_c = 42.8$ ppm)) ebenfalls identifiziert werden. Allerdings waren bei **156** die Kohlenstoffatome C-9 und C-14 nicht benachbart. Die Kopplung von 40 Hz war aber viel zu groß, um von einer 3J -Kopplung zu stammen. Daher waren die Daten nicht stimmig zueinander. Daraufhin wurde **137** für das rote Pigment vorgeschlagen.

Tabelle 8-5: NMR-Daten mit Nummerierung und Zuordnung für Lysochinon-TH1 (**137**). Gemessen in DMSO-d₆.

137, C-Atom.	δ_{H} [ppm]	δ_{C} (HSQC) [ppm]	137, C-Atom	δ_{H} [ppm]	δ_{C} (HSQC) [ppm]
C-1	---	164.3	C-11	6.66	114.4
C-2	6.55	108.7	C-12	---	164.5
C-3	---	164.5	C-12a	---	107.3
C-4	7.09	107.9	C-13	---	164.3
C-4a	---	135.6	C-13a	---	116.8
C-5	---	182.2	C-14	---	186.6
C-5a	---	131.4	C-14a	---	110.4
C-6	9.48	117.7	C-15	2.70	53.3
C-6a	---	118.3	C-16	---	207.8
C-6b	---	136.9	C-17	2.18	32.4
C-7	---	196.2			
C-8	2.67, 2.91	52.2			
C-9	---	71.0			
C-10	3.01, 3.26	42.8			
C-10a	--	150.6			

Datenbank-Recherche

Es wurde nach der exakten Struktur **137** mittels Scifinder-Datenbank gesucht und es konnte keine Übereinstimmung gefunden werden. Wenn die Struktur von **137** zu **137a–e** geändert wurde, konnte ein Treffer mit einer Ähnlichkeit von 85-95 % erhalten werden. Gefunden wurde die Struktur **166b** (Abbildung 8-28).



Allerdings wurde ein weiterer Naturstoff mit einer sehr großen Ähnlichkeit in der Literatur beschrieben: KS-619-1 (**160**). Im Vergleich zu Lysochinon-TH1 (**137**) ist lediglich die schwarze Hervorhebung (**160**, **166b**) unterschiedlich. Eine um eine Acetateinheit verkürzte Polyketidkette wurde hier bestimmt.

Biogenese-Hypothese für 137

Die Anreicherung bei den durch das Fütterungsexperiment mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat erhaltenen Kohlenstoffatomen von **137** wurde errechnet (Kapitel B 3.1.4.1). Die Einzelanreicherung an C-8 (nur statistische Kopplungen) deutete darauf hin, dass dort eine intakte Acetateinheit vorhanden war, die evtl. während der Biosynthese oder auch während der Aufarbeitung decarboxyliert wurde. C-8 stammt somit aus dem C-2 Kohlenstoffatom einer Acetateinheit, nämlich der letzten Extendereinheit der Polyketid-Biosynthese von Lysochinon-TH1 (**137**).

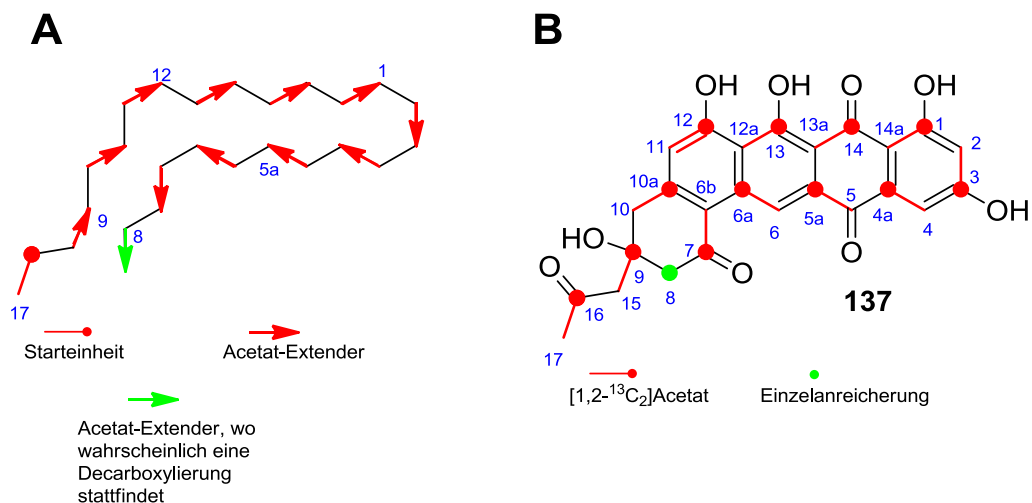


Abbildung 8-35: Biogenese von Lysochinon-TH1 (**137**). **A:** Genuine Polyketidkette für **137**. **B:** Hypothese des Einbaumusters für **137**.

Durch die Decarboxylierung einer β -Keto-Carbonsäure kann dieser Prozess kinetisch bevorzugt ablaufen. Eine solche Decarboxylierung könnte durch den folgenden, möglichen aber allgemeinen Mechanismus realisiert werden (Abbildung 8-36).

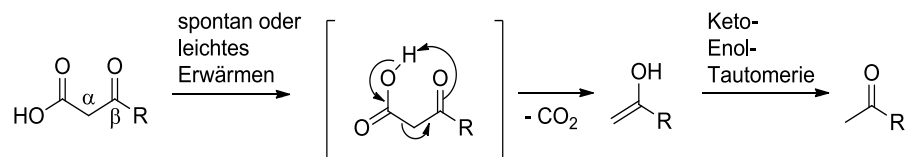


Abbildung 8-36: Allgemeiner Mechanismus einer β -Keto-Decarboxylierung.

Dabei würde durch eine Umlagerung eine Keto-Verbindung und CO $_2$ entstehen.

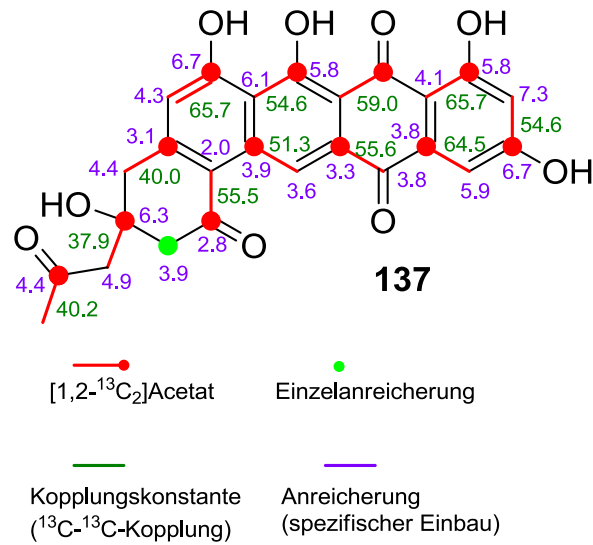


Abbildung 8-37: Biogenese von Lysochiron-TH1 (**137**) mit ¹³C-¹³C-Kopplungskonstanten (dunkelgrün) und Anreicherungen (violett).

Es wurden nun die Anreicherung nach der Formel in Kapitel B 3.1.4.1 berechnet (Abbildung 8-37, Tabelle 8-6). Es ging daraus eine Anreicherung für alle Kohlenstoffatome hervor: Ein spezifischer Einbau von 2.0–7.3 konnte festgestellt werden.

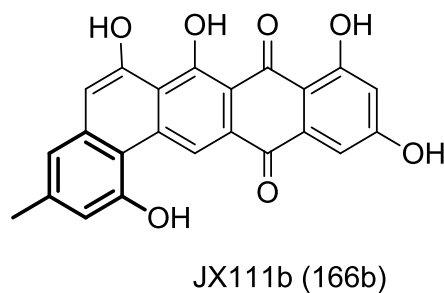
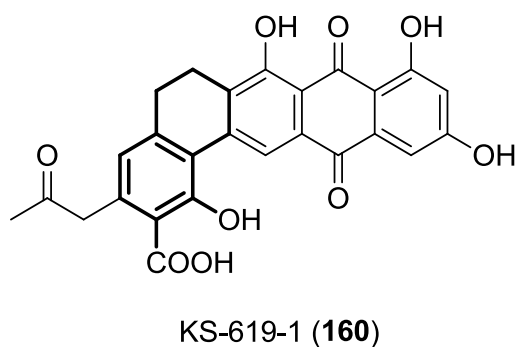
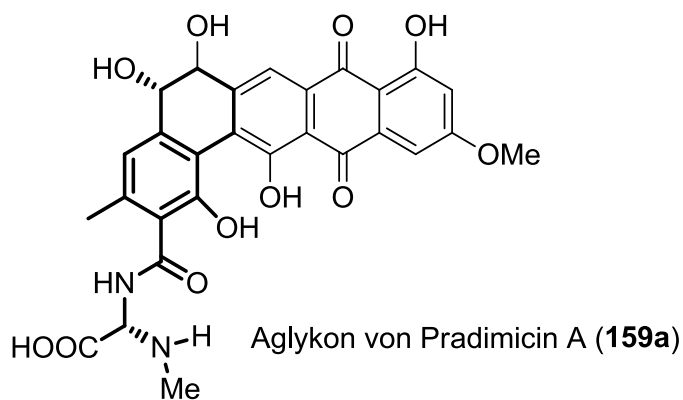
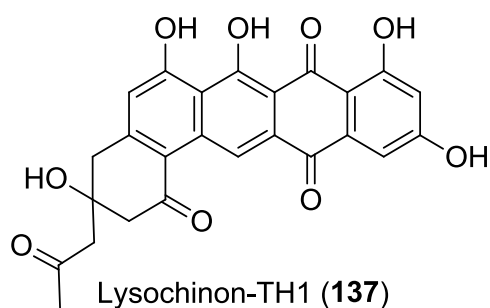
Tabelle 8-6: Höhe der Anreicherung und dem spezifischen Einbau von Lysochinon-TH1 (**137**), welche durch das Fütterungsexperiment von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat erhalten wurden.

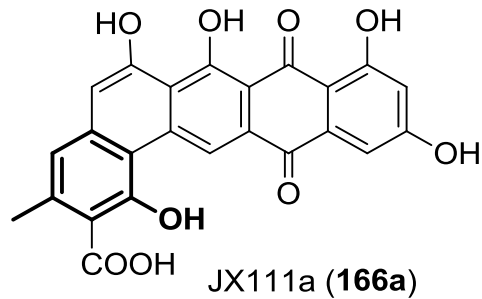
C-Atom	137 δ_c [ppm]	Integrierte Intensität (markierte Substanz)	Integrierte Intensität (Referenz- substanz)	Anreicherung [%]	Spezifischer Einbau	Statistische Kopplungen zu
C-1	164.3	148500.54	26779.16	0.06	5.8	C-2
C-2	108.7	258956.65	38026.93	0.07	7.3	C-1
C-3	164.5	230040.07	36491.45	0.07	6.7	C-4
C-4	108.0	218910.11	38897.04	0.06	5.9	C-3
C-4a	135.6	128030.79	32670.37	0.04	3.8	C-5
C-5	182.2	113731.76	28538.17	0.04	3.8	C-4a
C-5a	131.4	116592.22	32613.67	0.03	3.3	C-6
C-6	118.3	126176.64	33066.76	0.04	3.6	C-5a
C-6a	136.9	121559.05	29922.87	0.04	3.9	C-6b
C-6b	117.7	156522.22	62356.91	0.02	2.0	C-6a
C-7	196.2	125680.67	39478.23	0.03	2.8	C-8
C-8	52.2	272409.62	67517.08	0.04	3.9	C-7, C-9
C-9	71.0	239294.07	39925.74	0.06	6.3	C-8, C-10
C-10	42.8	252561.56	56466.40	0.04	4.4	C-9
C-10a	150.6	119859.13	35293.11	0.03	3.1	C-11
C-11	114.4	164560.28	38021.24	0.04	4.3	C-10a
C-12	164.5	230040.07	36491.45	0.07	6.7	C-12a
C-12a	107.3	155109.45	26769.51	0.06	6.1	C-12
C-13	164.3	148500.54	26779.16	0.06	5.8	C-13a
C-13a	116.2	92927.53	---	---	---	C-13
C-14	186.6	106031.71	---	---	---	C-14a
C-14a	110.3	121111.92	28617.71	0.04	4.1	C-14
C-15	53.3	281943.39	58169.04	0.05	4.9	C-16
C-16	207.8	162065.11	36747.45	0.04	4.4	C-15
C-17	32.4	328644.60	72761.44	0.00	0.0	---

Eine Normierung erfolgte auf die Zentrallinie des Kohlenstoffatoms C-17.

Zusammenfassend ließ sich für Lysochinon-TH1 (**137**) belegen: Das Grundgerüst und die erhaltene Biogenese stimmen mit dem Aufbau, der von *llpCl*–*CIII* aus der Lysolipin (**56**, **16**)-Biosynthese katalysiert werden kann, überein. Die vorhandenen Sauerstoffatome waren aus biosynthetischer Sicht an der Stelle, die aus dem Einbau von Malonyl-CoA-Bausteinen resultieren würden. Es war möglich eine durchgängige und sinnvolle Acetatkette in die Struktur von Lysochinon-TH1 (**137**) hineinzulegen. Die NMR-Daten waren plausibel und stimmig zueinander.

Ein direkter Vergleich mit dem Aglykon des Streptomycetenmetabolites Pradimicin A (**159a**), sowie den Naturstoffmetaboliten KS-619-1 (**160**), JX111a (**1660a**) und JX111b (**1660b**), stellte die direkte strukturelle Verwandtschaft innerhalb dieser Substanzklasse heraus. Es wurde ein pentanguläres Polyphenol aufgebaut. **137**, **159a**, **160** und **166b** besitzen das gleiche Grundgerüst mit einem anderen Substitutionsmuster (schwarze Hervorhebung).





Ähnlich wie **166b** eine strukturelle Ähnlichkeit zu **137** zeigt, weist **166a** eine große strukturelle Ähnlichkeit zu dem folgenden **138** auf. Dies könnte auf eine ähnliche Bioaktivität hindeuten. Diesbezüglich kann über Lysochinon-TH2 (**138**) noch keine Aussage getroffen werden, da noch keine biologische Testierung vorgenommen werden konnte. Für Lysochinon-TH1 ist die biologische Aktivität in Kapitel A 8.5.5 beschrieben. **166a** und **166b** wurden nur isoliert aber nicht auf ihre biologische Aktivität getestet.^[213]

Weitere min PKS II-Produkte

In der dünnschichtchromatographischen Untersuchung konnte eindeutig das Vorhandensein von mehreren roten bis violetten Pigmenten beobachtet werden. Nicht nur mittels DC- sondern auch mit HPLC- und LC-MS-DAD-Analytik konnte eindeutig gezeigt werden, dass mehrere farbige Pigmente gebildet wurden (Kapitel A 8.2). Dem roten Pigment, also Lysochinon-TH1 (**137**), konnte eine Molmasse von 462 g/mol und eine Summenformel von $C_{25}H_{18}O_9$ zweifelsfrei zugeordnet werden. In der vorliegenden Arbeit ist es nur gelungen, das Lysochinon-TH1 (**137**) zu isolieren. Wahrscheinlich liegen weitere Pigmente in sehr geringen Mengen vor, die keine Isolierung erlauben.

In Kooperation mit der Firma Bruker (Bremen) wurden zwei durch HPLC aufgereinigte Proben (Kapitel A 8.4.1) untersucht.ⁱⁱ Trotz HPLC-Aufreinigung konnten zusätzlich Salze und weitere Metabolite detektiert werden (Abbildung 8-38, Abbildung 8-40).

ⁱⁱ Wir danken D. WUNDERLICH und S. MEYER (Bruker Daltonik, Bremen) für die Durchführung dieser LC-MS-Untersuchungen.

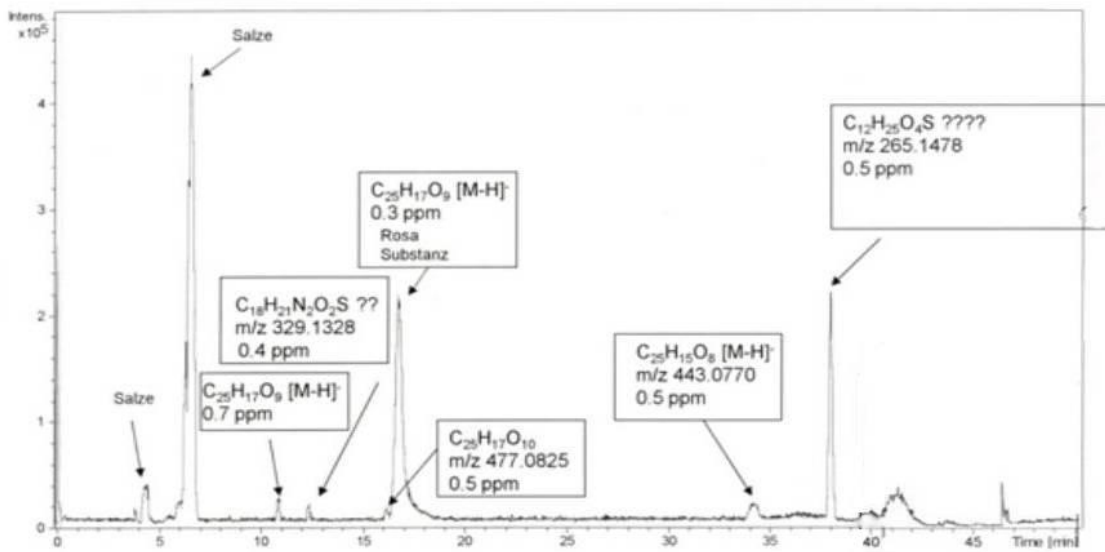
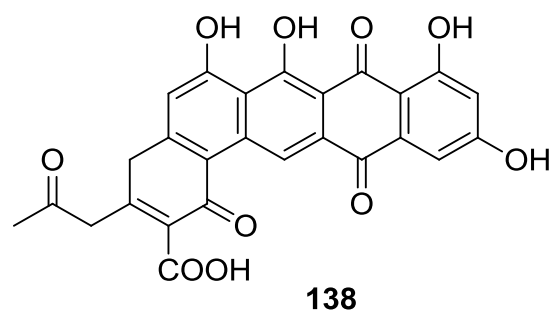


Abbildung 8-38: LC-MS-Untersuchung des durch HPLC aufgereinigten roten Pigmentes Lysochinnon-TH1 (**137**).

Aus diesen Analysen (Abbildung 8-38, Abbildung 8-40) konnten zum einen die Summenformel von Lysochinnon-TH1 (**137**) mit $C_{25}H_{18}O_9$ bestätigt (Abbildung 8-38), als auch die Summenformel von $C_{26}H_{16}O_{10}$, entsprechend 19 Doppelbindungsäquivalenten, erhalten werden. Diese Summenformel weist somit eine Massendifferenz von 26 zu **137** auf. Im Vergleich zu der Summenformel von Lysochinnon-TH1 (**137**) deutet dies auf den Verlust von zwei Protonen und der Addition einer Carbonylfunktion hin. Auf Grundlage dieser bisher vorhandenen, analytischen Daten ist die Struktur **138** abgeleitet worden. Es handelt sich wahrscheinlich um ein C-8-Carboxylanalogon von Lysochinnon-TH1 (**137**), welches als Lysochinnon-TH2 (**138**, lila) bezeichnet wurde.



Die Struktur von Lysochinon-TH2 (**138**) beinhaltet eine β -Keto-Carbonsäure. Der allgemeine Mechanismus einer β -Keto-Decarboxylierung (Abbildung 8-36) wurde auf das Lysochinon-TH2 (**138**) übertragen. Es ist plausibel, dass durch diesen Mechanismus (Abbildung 8-39) Lysochinon-TH1 (**137**) entstehen könnte. Bevor eine Decarboxylierung stattfindet, muss eine Addition von Wasser an die in Konjugation befindliche Doppelbindung (C-8, C-9) erfolgen. Im Anschluss kann die Decarboxylierung analog zu Abbildung 8-36 stattfinden und es würde **137** entstehen.

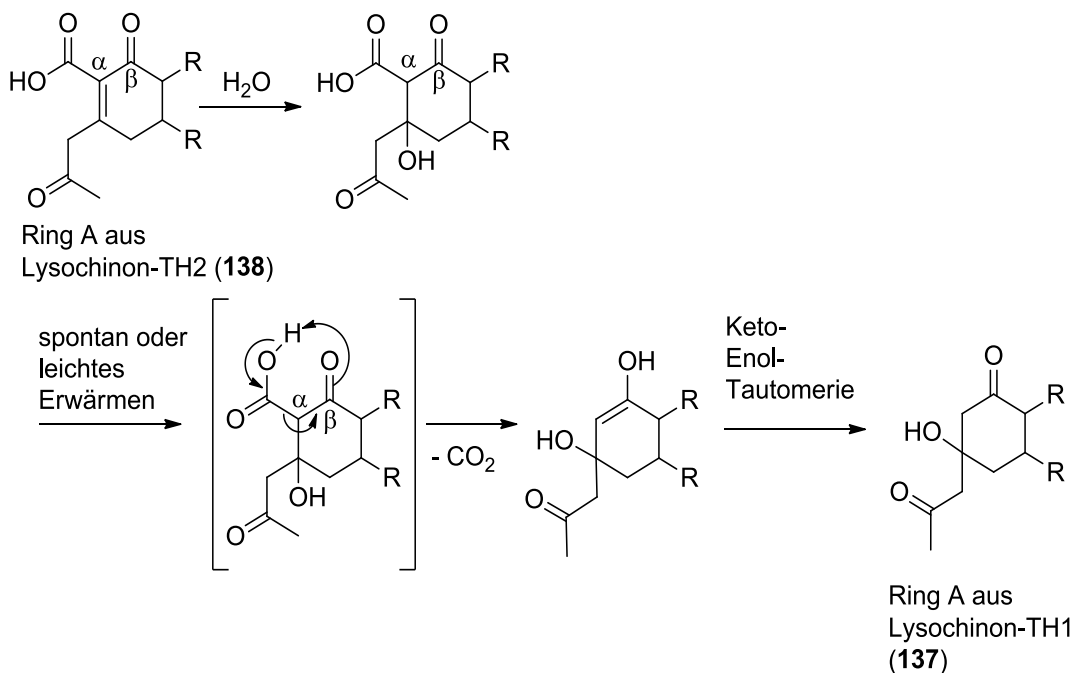


Abbildung 8-39: Decarboxylierung von einer β -Ketocarbonsäure am Beispiel von Ring A von Lysochinon-TH1 (**137**).

Der Ringschluss resultierte aus der Faltung der Acetatketten während der Biosynthese. Diese Faltung wurde durch die Cyclasen //pCl–CIII katalysiert, die aus der Lysolipin (**56**, **16**)-Biosynthese stammen.

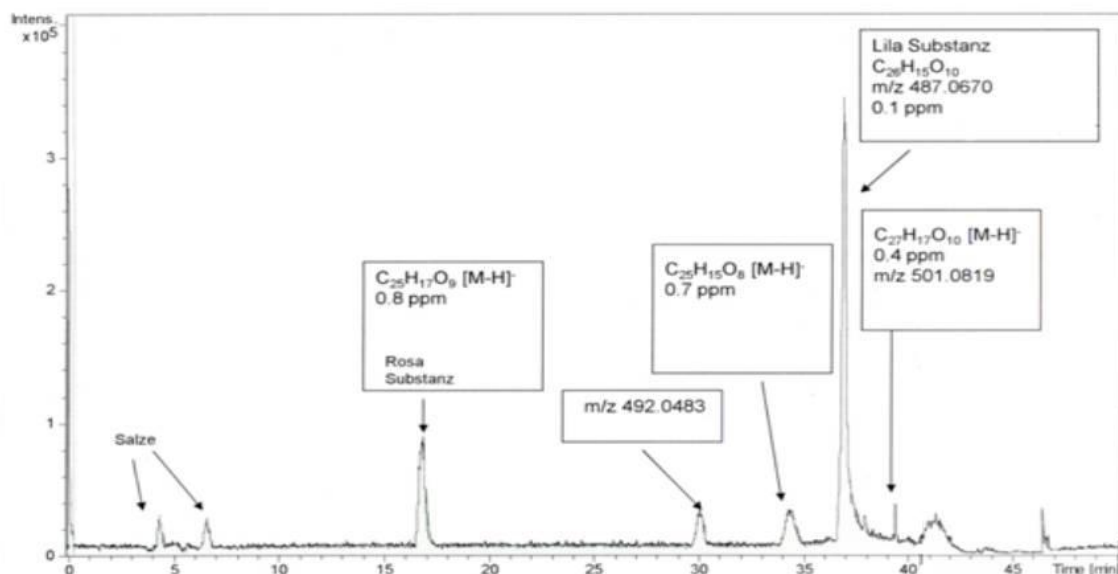
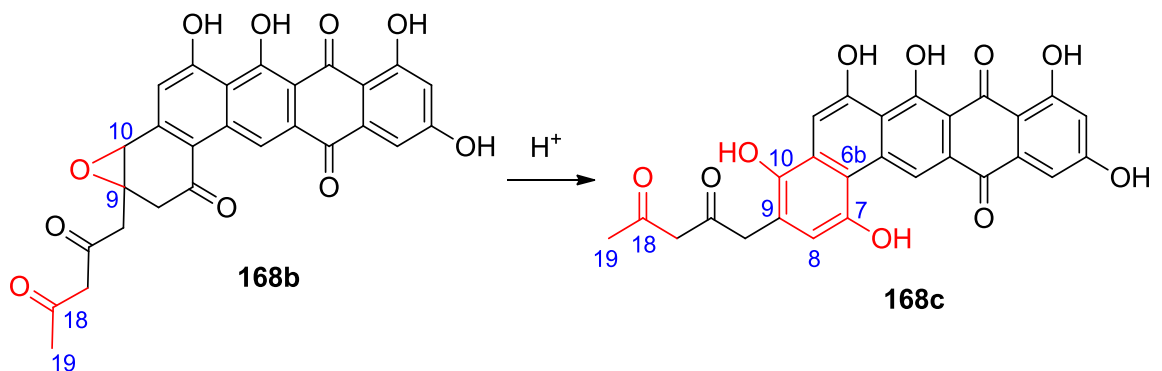
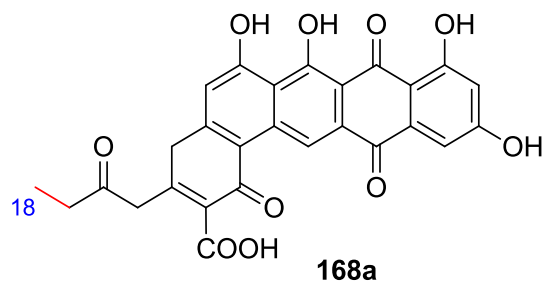
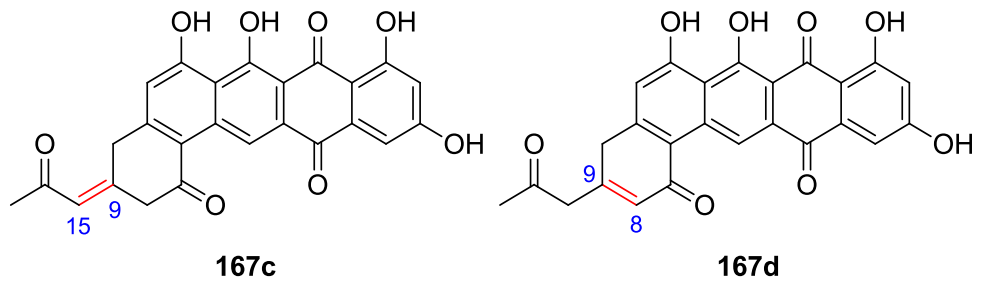
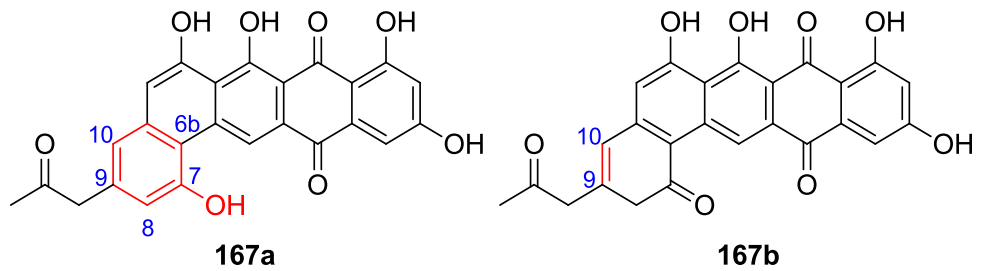


Abbildung 8-40: LC-MS-Untersuchung des durch HPLC aufgereinigten lila-farbenen Pigmentes, Lysochinon-TH2 (**138**).

Weiterhin konnten die Summenformeln $C_{25}H_{16}O_8$ und $C_{27}H_{18}O_{10}$ generiert werden. Bei $C_{25}H_{16}O_8$ wurde im Vergleich mit Lysochinon-TH1 (**137**) Wasser abgespalten. Vergleichend mit den analytischen Daten und unter Berücksichtigung der Struktur von **137**, wurden die Strukturen **167a–d** abgeleitet. Die vier Vorschläge resultieren aus der unterschiedlichen Position der Doppelbindung, die durch die Eliminierung von Wasser resultiert.

Die Summenformel $C_{27}H_{18}O_{10}$ deutet im Vergleich mit Lysochinon-TH2 (**138**) auf eine weitere Methylengruppierung hin. Entsprechend der analytischen Daten sowie der Struktur von Lysochinon-TH2 (**138**), wurde die Struktur **168a** abgeleitet. Möglicherweise liegt hier ein Methylmalonyl-CoA-Baustein als Starteinheit vor, ähnlich Frenolicin (**101**), wo ein Butyratbaustein als Starteinheit einer PKS II verwendet wird. Bei Doxorubicin (**13**) liegt ein Propionatbaustein als Starteinheit einer PKS II vor (Kapitel A 7.2.1). Die Beladung einer PKS II ist im Detail in Kapitel A 1 beschrieben.



Weiterhin konnten die Verbindungen **168b** und **168c** unter Berücksichtigung der analytischen Daten abgeleitet werden. Während der Biosynthese beider Verbindungen (**168b**, **168c**) müsste eine weitere Acetateinheit in die wachsende Polyketidkette kondensieren (C-18, C-19), woraus eine Kettenlänge von 14 kondensierten Acetateinheiten resultieren würde.

Denkbar wäre ein vorhandenes Epoxid bei **168b** an C-9 und C-10. Bei diesem Epoxid wäre eine säurekatalysierte Öffnung denkbar, wodurch **168c** resultieren könnte. Die Triebkraft dieser Reaktion wäre die Rearomatisierung. Daraus würde ein Dihydrochinonsystem (**168c**) zusätzlich zu dem schon vorhandenen Chinonsystem entstehen. Durchaus wäre auch denkbar, dass **168c** direkt aus der Biosynthese gebildet wird.

Für die Vorschläge von **167a–d** und **168a–c** liegen nur diese LC-MS-Daten vor, so dass keine dieser hypothetischen Verbindungen mittels NMR belegt werden konnte.

Zu allen nicht diskutierten, erhaltenen Summenformeln aus Abbildung 8-38 und Abbildung 8-40 konnten keine Strukturvorschläge abgeleitet werden.

Erweiterte Biosynthesehypothese für Lysolipin (56, 16)

Aus der Struktur des pentangulären Lysochinon-TH1 (**137**) und der an C-8 carboxylierten Struktur Lysochinon-TH2 (**138**) wurde eine Hypothese für eine mögliche Biosynthese aufgestellt (Abbildung 8-42). Im Vergleich zu der bisher bekannten Biosynthese von T. WEBER (Abbildung 7-2)^[124], werden nicht 12 sondern 13 Acetateinheiten aneinander kondensiert. Als Starteinheit konnte ein Acetatbaustein bestimmt werden. Dadurch wurde die Möglichkeit widerlegt, dass eine Malonamyl-CoA-Einheit als Starteinheit fungiert (Abbildung 7-2 A). Das geht aus dem Aufbau von Lysochinon-TH1 (**137**) und dem an C-8 carboxylierten Lysochinon-TH2 (**138**) sowie der Biogenese-Hypothese von **137** und **138** hervor (Abbildung 8-37). **138** stellt ein Intermediat (ein direkter Vorläufer von Lysolipin (**56, 16**)) in der Lysolipin (**56, 16**)-Biosynthese dar, während **137** ein aus der heterologen Expression der min PKS II (*llpD, E, F*) mit Cyclasen (*llpCI–CIII*) in *S. albus* erzeugtes Derivat ist. Alle weiteren Schritte in der Lysolipin (**56, 16**)-Biosynthese bleiben identisch: Es wird zuerst eine Polyketidkette aus 13 aneinander kondensierten Acetateinheiten durch die min PKS II (*llpD, E, F*) aufgebaut. Mittels der Cyclasen (*llpCI–CIII*) wird vermutlich die Verbindung Lysochinon-TH2 (**138**) erhalten. Sind die Reduktasen, Oxygenasen und alle weiteren

Enzyme vorhanden (Wildtyp-Produzent), findet der Biosyntheseweg des Lysolipins I (**16**) statt, der von T. WEBER *et al.* postuliert wurde (Abbildung 7-2).^[124]

Befinden sich die Cyclasen (*llpC*–III), wie in dieser Arbeit beschrieben, in einer nicht natürlichen Umgebung (Expressionswirt), so entsteht das Lysochinon-TH1 (**137**) aus **138**. Lysochinon-TH2 (**138**) durch den in Abbildung 8-39 hypothetischen Mechanismus. Es werden zwei mögliche Biosynthesehypothesen mit **138** im Mittelpunkt diskutiert.

Biosynthesehypothese A

Das Lysochinon-TH2 (**138**) trägt 26 anstelle von 25 Kohlenstoffatomen, wie das Lysolipin (**56**, **16**). Damit ist die hier beschriebene Polyketidkette um ein Kohlenstoffatom länger als bei der Biosynthese-Hypothese von T. WEBER *et al.* von 2010 (Abbildung 7-2 B).

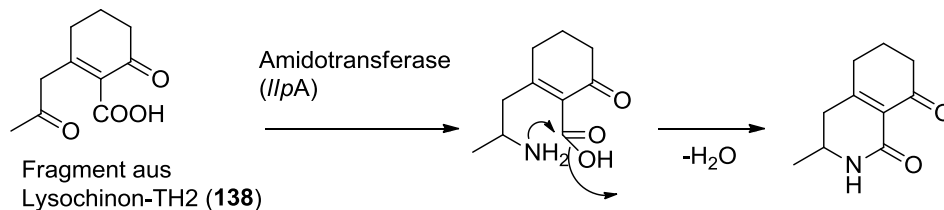


Abbildung 8-41: Möglicher Mechanismus des amidischen Ringschlusses in der Lysolipin (**56**, **16**)-Biosynthese.

Daraus ergibt sich beim amidischen Ringschluss in α -Position zum Stickstoffatom eine Methylgruppe (Abbildung 8-41). Findet der weitere Biosyntheseweg des Lysolipins (**56**, **16**) statt, werden möglicherweise durch diese zusätzliche Methylgruppe methylierte Lysolipine (**169**, **170**) gebildet (Abbildung 8-42).^[217]

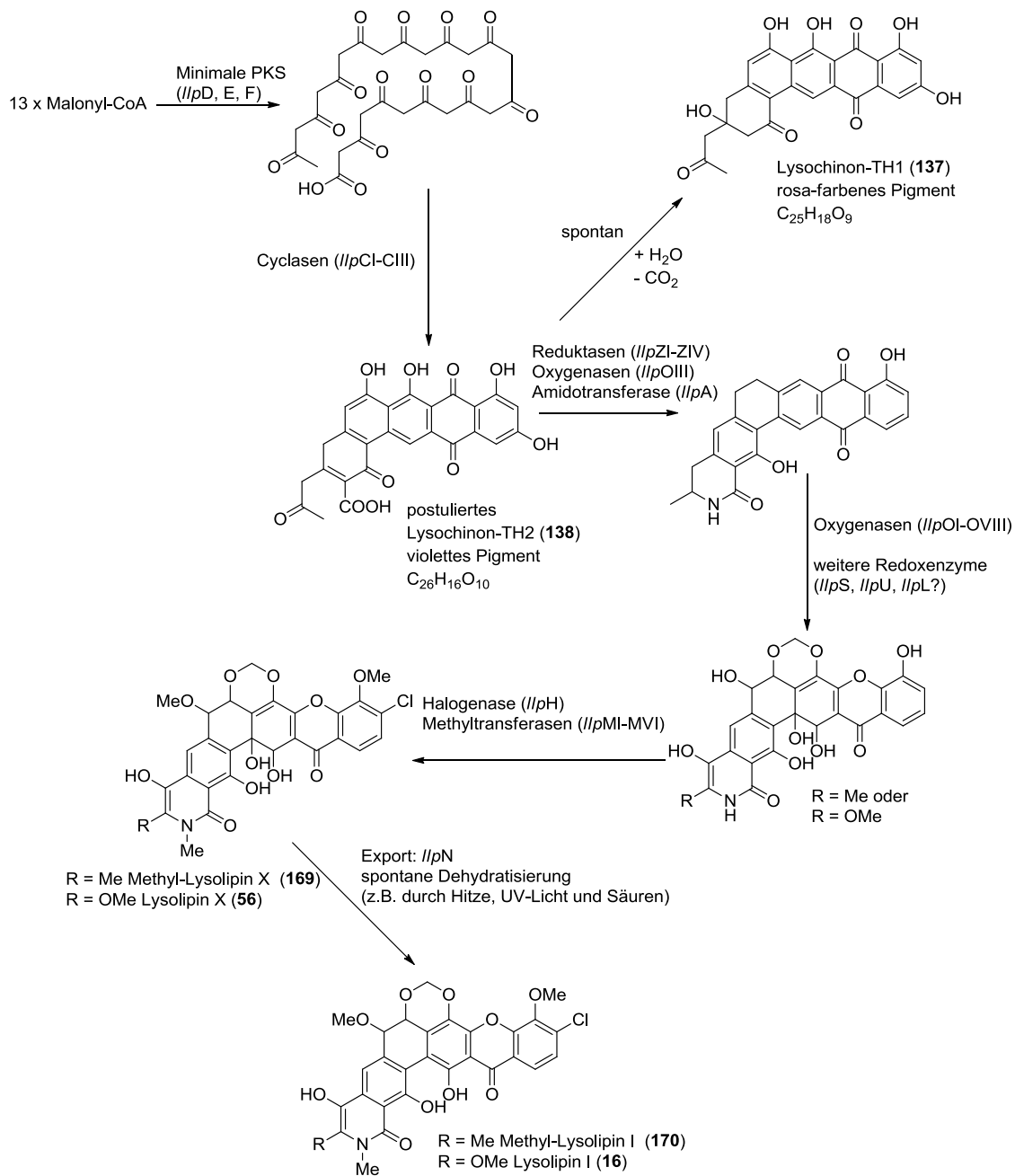


Abbildung 8-42: Postulierte Biosynthese von T. Weber ergänzt durch die Erkenntnisse über das durch die min PKS II mit Cyclasen (*llpD*, E, F; *llpCI-CIII*) gebildete Produkt Lysochinon-TH1 (**137**) und dem postuliertem violettem Pigment Lysochinon-TH2 (**138**).

Biosynthesehypothese B

Wenn das lila-farbene Pigment Lysochinon-TH2 (**138**) einen direkten Vorläufer des Naturstoffes Lysolipin X (**56**) bzw. des Lysolipins I (**16**) darstellt, muss die Methylgruppe in Nachbarschaft des Stickstoffatoms während der Biosynthese entfernt werden. Eine

Möglichkeit bietet die Enzymgruppe der Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen (*IlpOIV*, *IlpOVI* oder *IlpOVII*).^[124] Diese sind dazu befähigt, nicht-funktionalisierte sp^3 -Zentren zu hydroxylieren.^[218] Im Anschluss könnte eine Oxidation mit folgender Decarboxylierung erfolgen, was zu Lysolipin X (**56**) und Lysolipin I (**16**) führen würde (Abbildung 8-43).

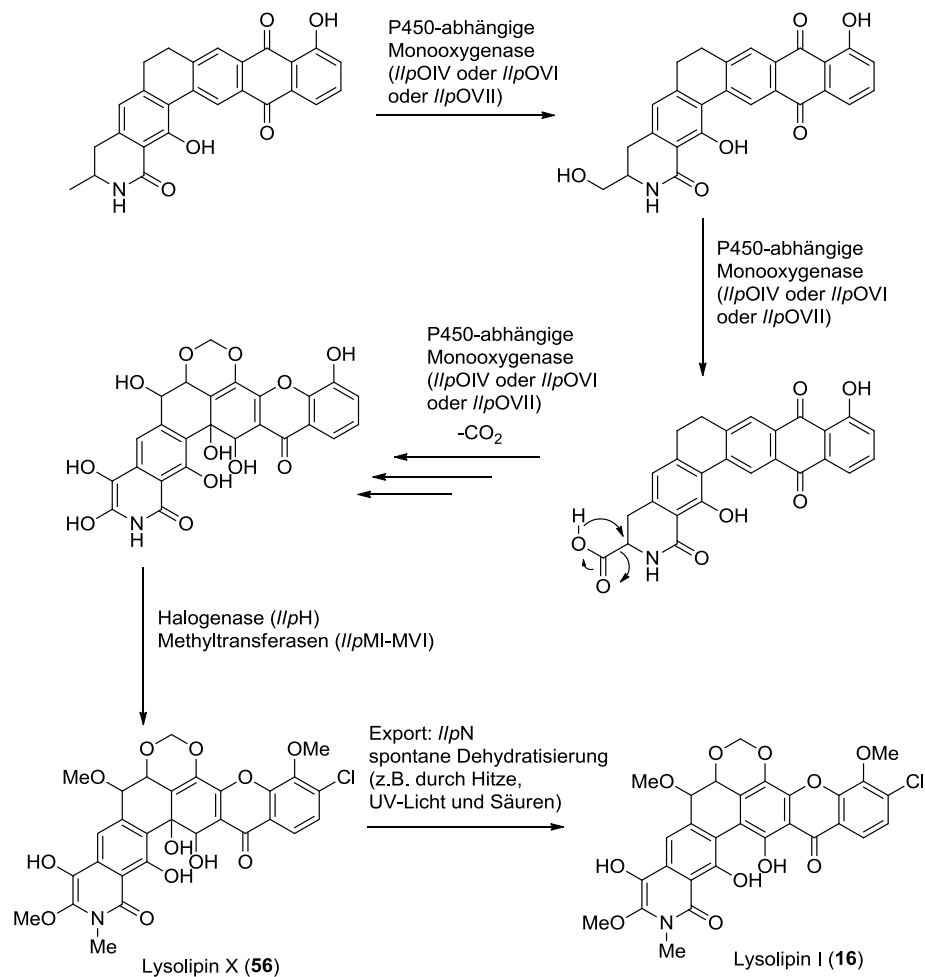


Abbildung 8-43: Ausschnitt aus der Lysolipin (**56**, **16**)-Biosynthese: Abbau der zusätzlichen Methylgruppe mittels P450-abhängigen Monooxygenasen, wodurch Lysolipin X (**56**) und I (**16**) gebildet werden.

Ob die Biosynthesehypothese A oder B stattfindet, muss in weiteren Arbeiten geklärt werden.

Aus der in dieser Arbeit modifizierte Biosynthese (Abbildung 8-42) von Lysolipin (**56**, **16**) ging hervor, dass die PKS II-Kette ohne das Stickstoffatom aufgebaut wird. Erst

später wird das Stickstoffatom durch die Amidotransferase (*llpA*) eingeführt, wodurch ein amidischer Ringschluss erfolgt (Abbildung 8-41, Abbildung 8-42).

Damit wurde der hypothetische Biosyntheseweg A (Abbildung 7-2) als Alternative widerlegt. Es konnte durch das Fütterungsexperiment mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat gezeigt werden, dass 13 intakte Acetateinheiten mittels der min PKS II (*llpD*, E, F) aneinander kondensiert werden. Es kann daher nicht passieren, dass eine Malonyl-CoA-Einheit zunächst durch die Amidotransferase (*llpA*) amidiert und das entstehende Malonamyl-CoA als weitere Starteinheit in der Biosynthese von Lysolipin (**56**, **16**) bereitgestellt wird.

Es konnte Lysochinon-TH2 (**138**) als ein Intermediat der Lysolipin (**56**, **16**)-Biosynthese postuliert werden. Zudem konnten durch LC-MS-Untersuchungen mehrere Metaboliten identifiziert werden, deren Summenformeln sehr ähnlich dem des isolierten Lysochinon-TH1 (**137**) waren. Demnach ist es möglich, dass die Cyclasen *llpCI*–*CIII* weitere Derivate erzeugen können. Es konnte allerdings noch keine Isolierung erfolgen, so dass zum jetzigen Zeitpunkt keine NMR-Spektren vorgelegt werden können, um so die Hypothese der weiteren Derivate zu stützen.

Aufarbeitung mit Poly(vinylpolypyrrolidon)

Durch die Strukturaufklärung von Lysochinon-TH1 (**137**) wurde dieses als pentanguläres Polyphenol bestätigt. Aufgrund dessen wurde noch eine weitere, möglicherweise effizientere Aufarbeitungsmethode getestet. Es wurde Poly(vinylpolypyrrolidon) (PVPP) verwendet. PVPP ist ein quer vernetztes, unlösliches Polymer. Dieses Polymer wird verwendet, um aus verschiedenen Matrices Phenole bzw. Polyphenole herauszufiltern.^[219, 220, 221, 222] Im Zuge dieses Experiments wurde eine Aufarbeitung aus den genannten Literaturstellen abgeleitet. Dadurch konnte eindeutig gezeigt werden, dass das Lysochinon-TH1 (**137**) selektiv aus Lösungen herausgefiltert werden konnte. Allerdings war es nicht möglich, **137** wieder von diesem Polymer herunter zu lösen. Das Filtrat der Elution wurde mittels NMR-

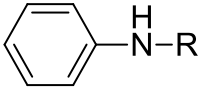
Spektroskopie untersucht. Es konnten keine Signale von Lysochinon-TH1 identifiziert werden.

8.5.4 Farbigkeit und Chromophore

Eine Substanz erscheint farbig, sobald eine Absorption von Licht durch unterschiedliche Chromophore mit auxochromen Gruppen innerhalb des sichtbaren Spektrums erfolgt. Chromophore bestehen generell aus großen delokalisierten π -Elektronensystemen (konjugierte Doppelbindungen, durch Azogruppen verbundene Aromaten, Chinone und Chinoide Systeme, Carbonyle, substituierte Aromaten), die für die Absorption von Licht in definierten spektralen Bereichen verantwortlich sind.^[115]

Die auxochromen Gruppen werden auch als Farbhelfer bezeichnet, welche die Farbigkeit vertiefen. Es wird zwischen auxochromer und antiauxochromer Gruppe unterschieden (Tabelle 8-7).

Tabelle 8-7: Vergleich von Auxochromen- und Antiauxochromengruppen.

Auxochrome Gruppen	Antiauxochrome Gruppen
Elektronendonatoren (+M-Effekt)	Elektronenakzeptoren (-M-Effekt)
Rotverschiebung (Verschiebung zu größeren Wellenlängen) → bathochromer Effekt	Blauverschiebung (Verschiebung zu kleineren Wellenlängen) → hypsochromer Effekt
Substituenten: -OH, -OR, O ⁻ , NH ₂ (primär, sekundär, tertiär) und 	Substituenten: COH, CO, NO ₂ , —C=NR_2^+ , —C=OR^+ H , H

Eine Absorption vom gesamten sichtbaren Bereich, führt zu einer Überlagerung der unterschiedlichen Farben, so dass der Farbeindruck schwarz ist. Bei einer Absorption außerhalb des sichtbaren Spektrums erscheint alles weiß. Die verschiedenen Spektralbereiche sind in Tabelle 8-8 aufgeführt.

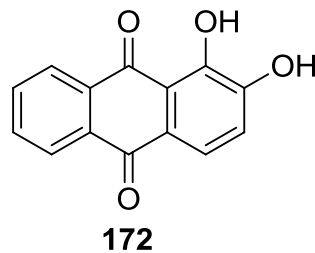
Tabelle 8-8: Absorbierte und sichtbare Farben und ihre Wellenlängen.

Wellenlänge [nm]	Farbe des absorbierten Lichtes	Beobachtete Farbe
400-435	Violett	Gelb
435-480	Blau	Orange
480-500	Blau-Grün	Rot
500-580	Gelb-Grün	Lila
580-595	Gelb	Violett
595-610	Orange	Blau
610-770	Rot	Blau-Grün

Aufgrund der starken Eigenfarbe von Lysochinon-TH1 (**137**) werden die Chromophore verschiedener Verbindungen verglichen. Aus dieser Gegenüberstellung soll hervorgehen, welche Strukturmerkmale bei Lysochinon-TH1 (**137**), Kapurimycin A1–A3 (**171a–c**)^[223, 224], Lysolipin I (**16**), Sapurimycin (**154**) und IB-00208 (**95**) zur Farbigkeit beitragen.

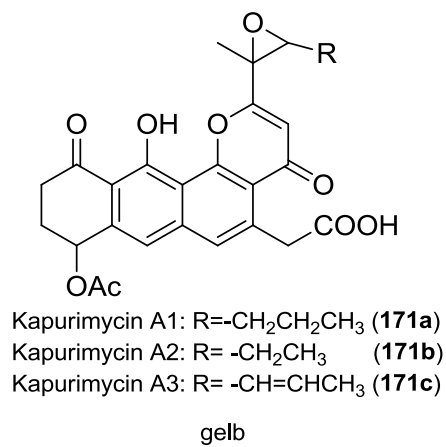
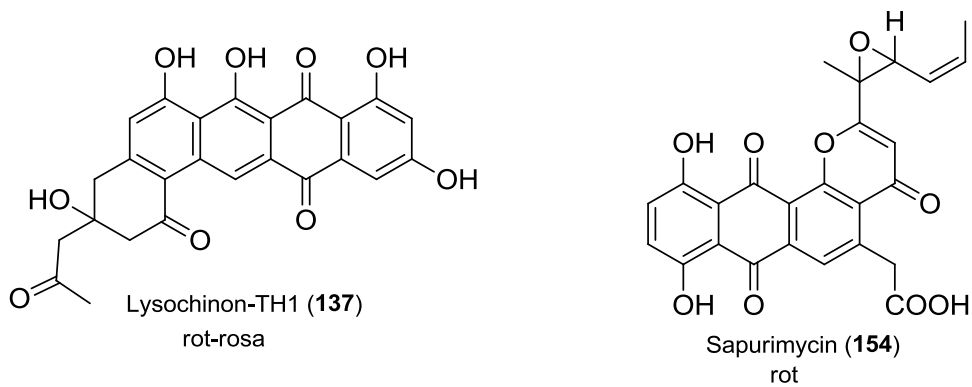
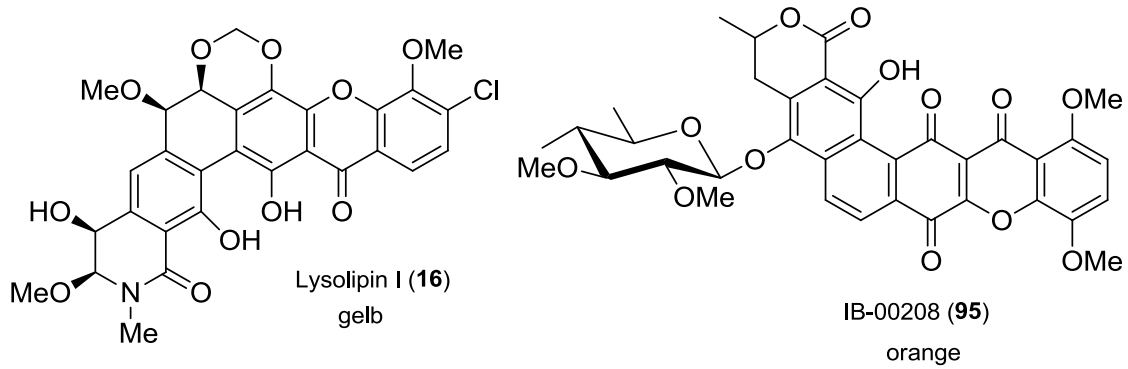
Alle Strukturen besitzen eine unterschiedliche Eigenfarbe. Nur die Kapurimycine A1–A3 (**171a–c**) und das Lysolipin I (**16**) besitzen eine gelbe Farbe. Daraus folgt, dass eine Absorption im Bereich von 400-435 nm stattfindet. Beide Substanzklassen besitzen zwei aromatische Sechsringe und ein Pyron. Im Gegensatz zu **16** liegt bei Kapurimycin A1–A3 (**171a–c**) eine gewinkelte Anordnung des Chromophors vor und das Pyron befindet sich ganz außen. Dennoch absorbieren **16** und **171a–c** im Spektralbereich von 400-435 nm. Demnach hat die gewinkelte Anordnung und die Position des Pyrons keine Auswirkung auf das Absorptionsverhalten. Werden Sapurimycin (**154**) und IB-00208 (**95**) mit einbezogen, ist ein deutlicher Unterschied im Chromophor zu erkennen. Beide Verbindungen tragen wie die Kapurimycine A1–A3 (**171a–c**) und das Lysolipin I (**16**) ein Pyrongerüst. Allerdings sind im Grundgerüst auch 1,4-Chinone. Das IB-00208 (**95**) hat ein großes konjugiertes System, mit dem Chinon in direkter Nachbarschaft des Pyrons. Dies scheint einen Unterschied in der Absorption zu

ermöglichen. Die Absorption findet jetzt im Spektralbereich von 435-480 nm statt, es erscheint orange. Das Sapurimycin (**154**) besitzt ebenfalls ein Chinon- und ein Pyron-Baustein im Grundgerüst. Diese sind aber durch einen Benzolring getrennt, woraus ein Anthrachinongerüst resultiert, welches außerdem Phenolgruppen trägt. Es handelt sich nicht um normale Phenolgruppen, sondern um ein 1,4-Dihydrochinon. Vergleichend dazu konnte ein hydroxyliertes Anthrachinon schon 1868 als roter Farbstoff identifiziert werden. Dieser Farbstoff wurde als Alizarin bezeichnet (**172**)^[225].



Das hydroxylierte Anthrachinon beim Sapurimycin (**154**) scheint hier in erster Linie der Farbgeber zu sein. Durch die Phenolgruppen am Anthrachinon, wird eine bathochrome Farbverschiebung hervorgerufen, wodurch die rote Farbe zustande kommt. Lysochinon-TH1 (**137**) besitzt als Chromophor ein Naphthacenchinon (**173**, Abbildung 8-44) in Konjugation mit einer Carbonylfunktion. Dieses große konjugierte System beinhaltet wieder eine Chinon-Struktur mit angrenzenden phenolischen Aromaten. Diese Anordnung begünstigt die rot-rosa Eigenfarbe eben dieser Substanz, durch eine auftretende Bathochromie (Phenolgruppen) und gleichzeitiger Hypsochromie (konjugierte Carbonylfunktion), also einem 'Push-Pull-Effekt'.

Im Fall von Lysochinon-TH1 (**137**) fand eine Farbänderung (sauer: orange; neutral: pink; basisch: violett) bei der Änderung des pH-Wertes statt. Strukturelle Veränderungen konnten am Beispiel von Abbildung 8-44 nur postuliert werden. Im basischen Milieu wird wahrscheinlich eine Deprotonierung der Phenolgruppen zu Phenolaten erfolgen. Diese Phenolatanionen würden den Chromophor vergrößern und mehr Elektronen in das konjugierte System speisen, was zu einem verstärkten bathochromen Effekt führt.



Vermutlich entsteht durch Ansäuern das 1,4-Dihydrochinonsystem (**174**, Abbildung 8-44), wodurch eine Vergrößerung des aromatischen, konjugierten Systems und außerdem auch eine Änderung der Farbigkeit einhergehen könnte.

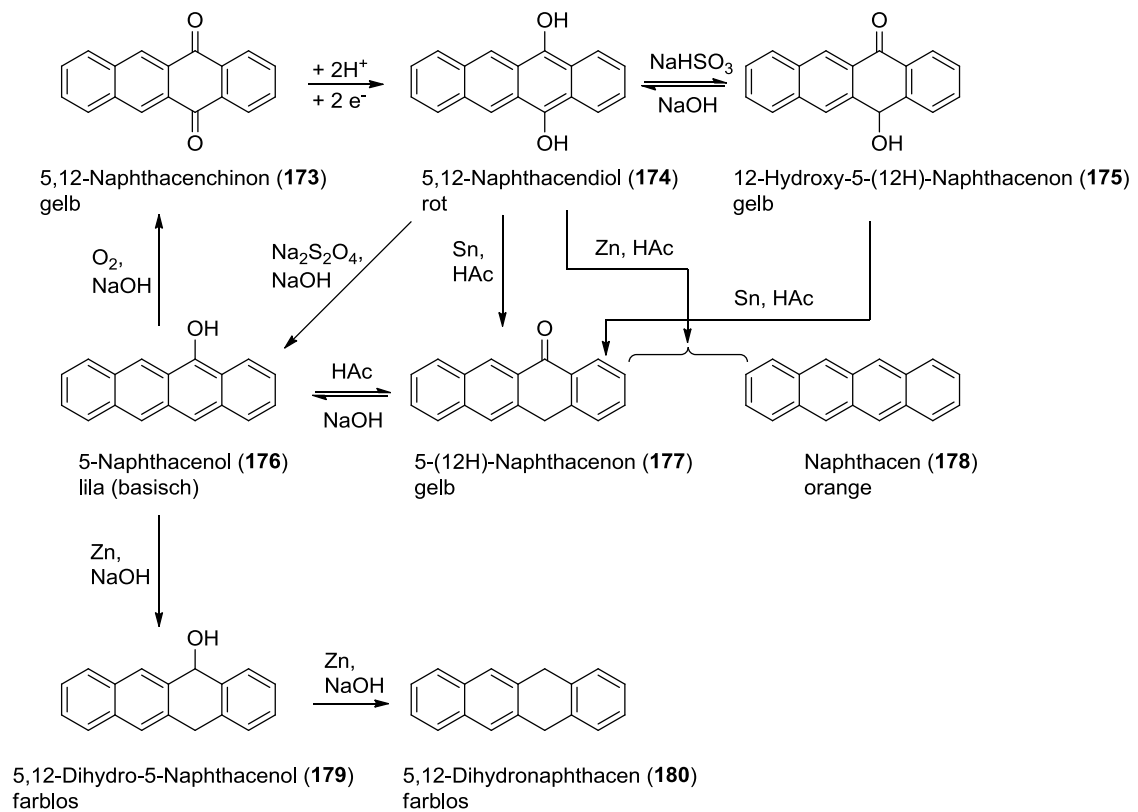


Abbildung 8-44: Oxidation und Reduktion von Naphthacenen (**167–174**) mit der dazugehörigen Farbigeit.^[226]

Verschiedene Naphthacene (**173–180**) und ihre Farbigeit sind in Abbildung 8-44 dokumentiert. Zusätzlich sind die Möglichkeiten zur chemischen Oxidation bzw. Reduktion, sowie die farbliche Veränderung dieser Naphthacene (**173–180**) aufgeführt. Bei **174** wurde eine rote Eigenfarbe beschrieben (Abbildung 8-44). Durch die bei **137** vorhandenen Phenolgruppen würde eine bathochrome Farbverschiebung auftreten, woraus die rosa-rote Eigenfarbe hervorgehen könnte, aber wahrscheinlich keine orange Farbe resultieren würde. Daher wird vermutlich eine andere Veränderung des Chromophors erhalten. Auf dieser Grundlage wurden weitere Überlegungen angestellt, um mögliche Verbindungen zu konstruieren, die aus Lysochinon-TH1 (**137**) durch Ansäuern entstehen (Abbildung 8-46). Dabei wurden die entstehenden Veränderung in rot hervorgehoben. Denkbar sind Verbindungen mit den folgenden Summenformeln: $C_{25}H_{20}O_9$, $C_{25}H_{19}O_9$, $C_{25}H_{18}O_8$ und $C_{25}H_{16}O_8$ (Abbildung 8-46). Die Summenformel $C_{25}H_{16}O_8$ (**167a–d**) wurde aus den LC-MS-Untersuchungen von Bruker

(Bremen) aus HPLC-aufgereinigten Proben erhalten (Abbildung 8-38, Abbildung 8-40) und könnte daher sehr realistisch sein. Bei allen anderen Verbindungen könnte ein Semichinon (**181**), ein Dihydrochinon (**174**) oder ein Hydroxychinon (**175**) entstehen (Abbildung 8-45).

Die Entstehung des Dihydrochinons (**174**) und des Hydroxychinons (**175**) könnten über das Semichinon (**181**) verlaufen. Der zugrunde gelegte, mögliche, allgemeine Mechanismus ist in Abbildung 8-45 dargestellt. Zuerst wird das Chinonsystem protoniert. Durch anschließende Aufnahme eines Elektrons entsteht **181**. Eine weitere Elektronenaufnahme bewirkt, dass eine negative Ladung erzeugt wird. Durch die anschließende Protonierung könnte jetzt entweder das Dihydrochinon (**174**) oder auch das Hydroxychinon (**175**) gebildet werden (Abbildung 8-45). Allerdings muss ein Elektronendonator, der als Redoxpartner fungiert, vorhanden sein. Andernfalls kann keine Reduktion vom Chinon zum Hydrochinon bzw. Hydroxychinon erreicht werden.

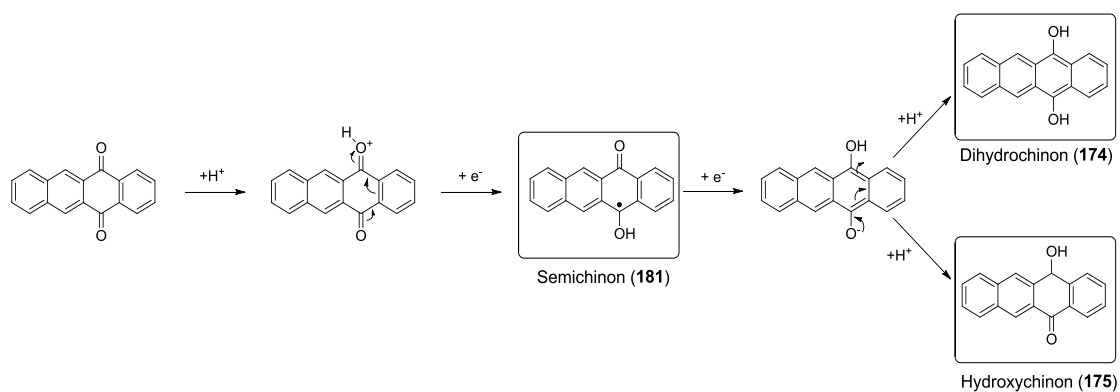
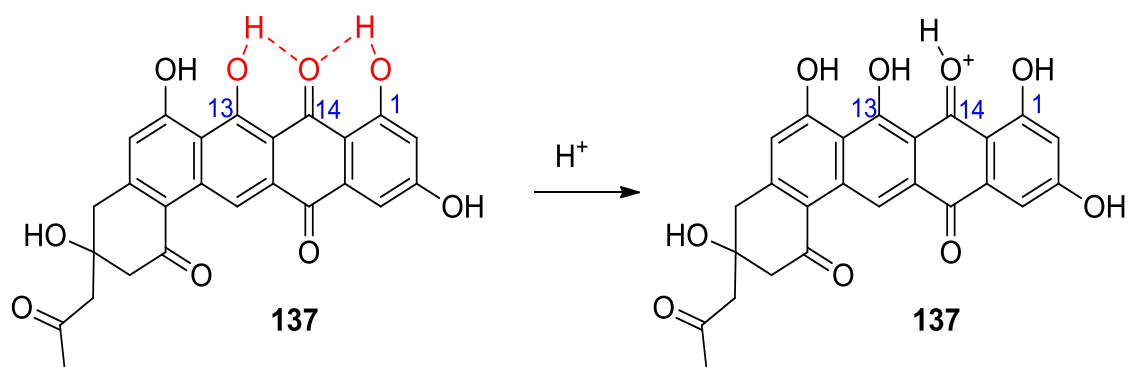


Abbildung 8-45: Allgemeiner Mechanismus zur Bildung von Semichinon (**181**), Dihydrochinon (**174**) und Hydroxychinon (**175**).



Um eine dieser Hypothesen zu stützen und um zu ermitteln, welche Chromophorveränderung wirklich eintritt, wurde von dem unmarkierten Lysochinson-TH1 (**137**) eine NMR-Untersuchung in $\text{DMSO-}d_6$ (3 mm Röhrchen, 600 MHz, Abbildung 8-19) und die gleiche Probe in $\text{DMSO-}d_6$ mit 2 Tropfen TFA-*d* versetzt (3 mm Röhrchen, 600 MHz) mit gleicher Anzahl an Scans durchgeführt.

Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren mit und ohne TFA-*d*-Zusatz

Die erhaltenen Ergebnisse waren sehr überraschend. Vergleichend mit dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ohne TFA-*d* (Abbildung 8-19) waren deutliche Veränderungen sichtbar (Abbildung 8-47). Ein direkter Vergleich der beiden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ist in Abbildung 8-48 und mit Expansions in Abbildung 8-49 gegeben. Im aliphatischen Bereich ($\delta_{\text{H}} = 0.8\text{--}1.95$ ppm) waren deutlich mehr Signale erkennbar, oder auch eine deutlich höhere Intensität zu verzeichnen, beispielsweise $\delta_{\text{H}} = 1.2$ ppm mit einer Intensität von 17 Protonen (Abbildung 8-48, Abbildung 8-49).

Bei der Messung mit TFA-*d*-Zusatz waren mit einer chemischen Verschiebung von $\delta_{\text{H}} = 2.18\text{--}3.29$ ppm alle Signale mit der richtigen Intensität und Multiplizität vorhanden, die durch die analytischen Daten von Lysochinson-TH1 (**137**) bekannt waren. Allerdings lag ein geringfügiger Shift von ca. $\delta_{\text{H}} = 0.04$ ppm ins Tieffeld für die Dubletts ($\delta_{\text{H}} = 2.70$ (H-8a); 2.94 (H-8b); 3.05 (H-10a) und 3.28 (H-10b) ppm) und das Singulett ($\delta_{\text{H}} = 2.73$ (H-15) ppm) vor. Worauf dieser Shift beruht, konnte nicht bestimmt werden.

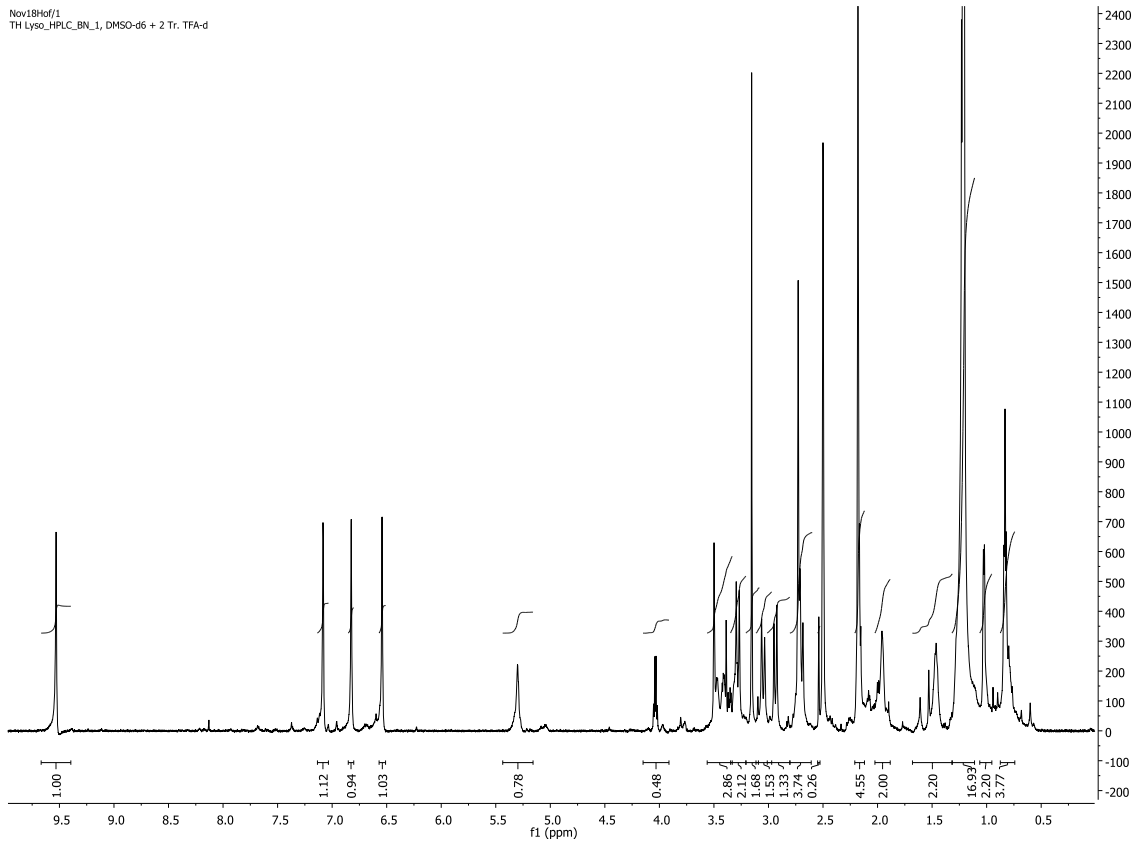


Abbildung 8-47: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) mit 2 Tr. TFA-*d*.

Bei einer chemischen Verschiebung von $\delta_{\text{H}} = 4.04$ (Quartett) und 5.32 (Singulett) ppm traten zwei neue Signale auf, die vorher nicht zu sehen waren. Diese Signale besaßen je ein Integral von einem Proton. Da in $\text{DMSO-}d_6$ gemessen wurde, könnte das Singulett bei $\delta_{\text{H}} = 5.32$ ppm auf eine Hydroxygruppe hindeuten. Ein weiteres Zeichen, welches für eine Hydroxygruppe spricht ist, dass im HSQC-Experiment kein Kohlenstoffatom für diese Verschiebung im ^1H -NMR-Spektrum zugeordnet werden konnte.

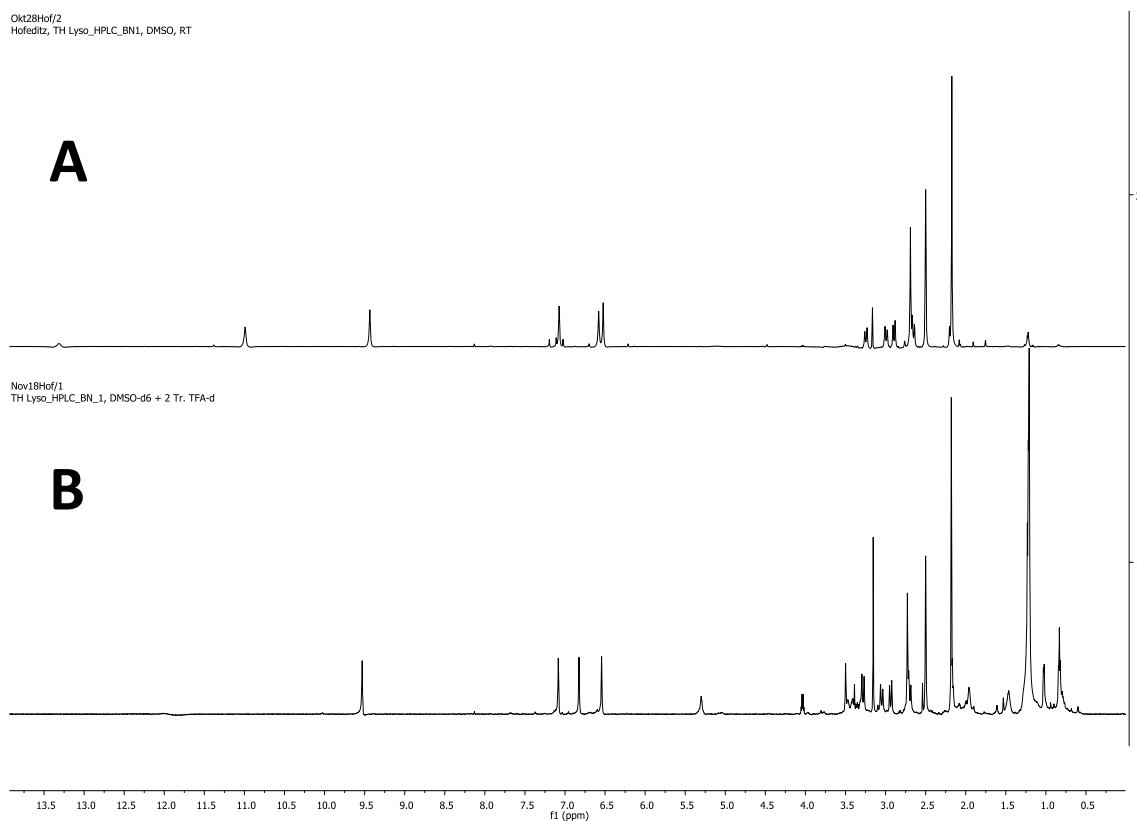


Abbildung 8-48: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$). A: ohne TFA; B: mit TFA- d .

Eine sehr deutliche Veränderung war bei den Signalen mit $\delta_{\text{H}} = 6.53$ (H-1); 6.82 (H-11) und 7.07 (H-4) ppm aufgetreten. Während im Vergleich zu dem NMR-Spektrum ohne TFA- d -Zusatz (Abbildung 8-19) die beiden Signale $\delta_{\text{H}} = 6.53$ und 7.07 ppm lediglich einen geringen Shift von ca. $\delta_{\text{H}} = 0.01$ ppm erfuhren, war das Signal $\delta_{\text{H}} = 6.82$ ppm (ohne TFA- d : $\delta_{\text{H}} = 6.57$ ppm) deutlich verschoben (Abbildung 8-48, Abbildung 8-49). Durch Zuhilfenahme des HSQC war ebenfalls ein deutlicher Tieffeld-Shift zu verzeichnen. Es konnte ein Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 116.2$ ppm zugeordnet werden (ohne TFA- d : $\delta_{\text{C}} = 114.4$ ppm). Diese Verschiebungen könnten daraufhin deuten, dass in direkter Nachbarschaft zu C-11 eine Addition geschehen ist, da alle anderen Protonensignale vorhanden waren und somit keine Änderung des Chromophors durch Wasserabspaltung resultieren würde. Weiteren Aufschluss sollte der Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren liefern.

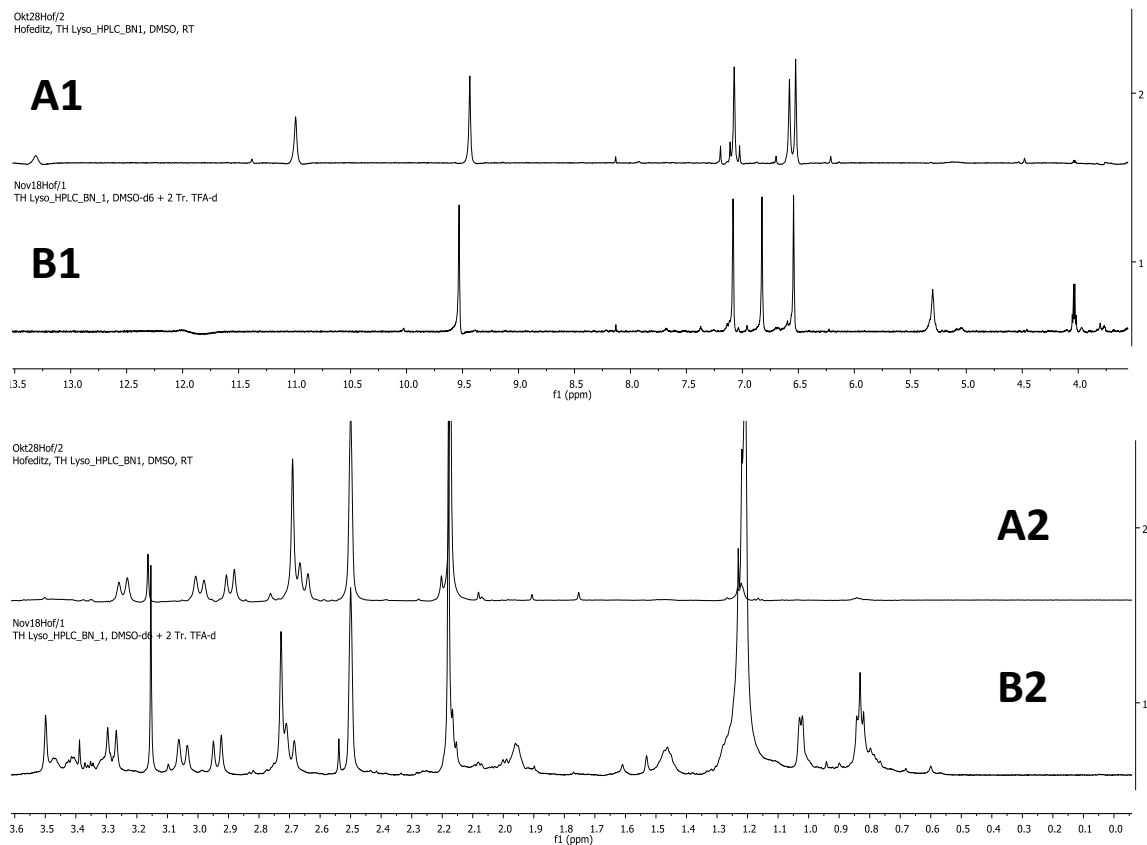


Abbildung 8-49: Expansions und Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (400 MHz; $\text{DMSO-}d_6$). **A1**: ohne TFA; $\delta_{\text{H}} = 4\text{--}13$ ppm; **B1**: mit TFA-*d*; $\delta_{\text{H}} = 4\text{--}13$ ppm; **A2**: ohne TFA; $\delta_{\text{H}} = 0\text{--}3.6$ ppm; **B2**: mit TFA-*d*; $\delta_{\text{H}} = 0\text{--}3.6$ ppm;

Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren mit und ohne TFA-*d*

Auch hier waren deutlich mehr Signale zu identifizieren als in dem ^{13}C -NMR-Spektrum ohne TFA-*d* (Abbildung 8-21). Dies traf insbesondere auf den aliphatischen Bereich und den Bereich mit einer chemischen Verschiebung um $\delta_{\text{C}} = 40\text{--}75$ ppm zu (Abbildung 8-50, Abbildung 8-51). Es konnte beobachtet werden, dass hier einige neue Signale eine gleich große Intensität wie die von Lysochinon-TH1 (**137**) besaßen, beispielhaft in Abbildung 8-51 dargestellt. Möglicherweise deutete dieses Phänomen auf einen Zerfall oder an unterschiedlichen Positionen protonierte Spezies hin. Im Vergleich zu dem ^{13}C -NMR-Spektrum ohne TFA-*d*, war das Signal mit $\delta_{\text{C}} = 188.3$ ppm erkennbar. Weiterhin waren bei $\delta_{\text{C}} = 160$ ppm drei Signale, aber mit einer sehr geringen Intensität vorhanden. Da im Spektrum ohne TFA-*d* nur zwei Signale in diesem Bereich zu sehen waren, die aber vier Kohlenstoffatome charakterisierten, musste etwas für diese

„Aufspaltung“ verantwortlich sein. In Abbildung 8-51 war deutlich eine Intensitätssteigerung bei den Signalen $\delta_c = 135.6$ und 136.4 ppm zu sehen. Es bleibt daher unklar, was durch die Protonierung mit TFA-*d* mit dem Chromophor passiert.

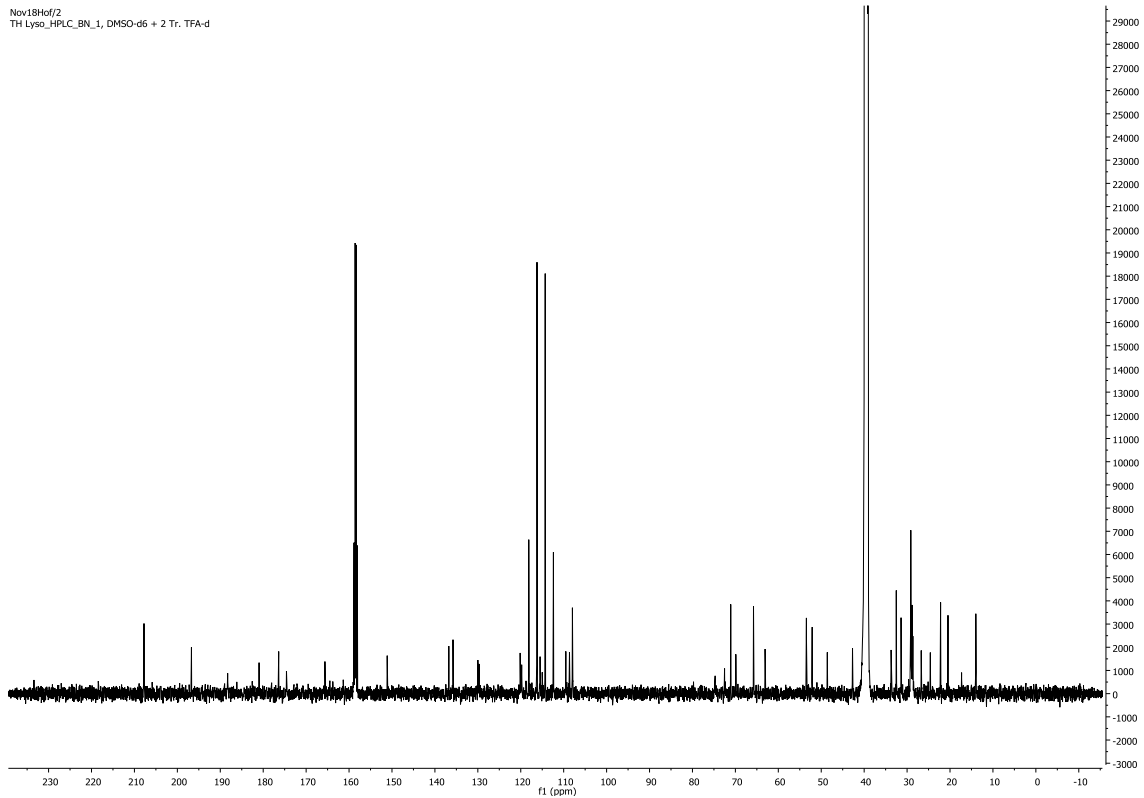


Abbildung 8-50: ^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, DMSO-*d*6) mit 2 Tr. TFA-*d*.

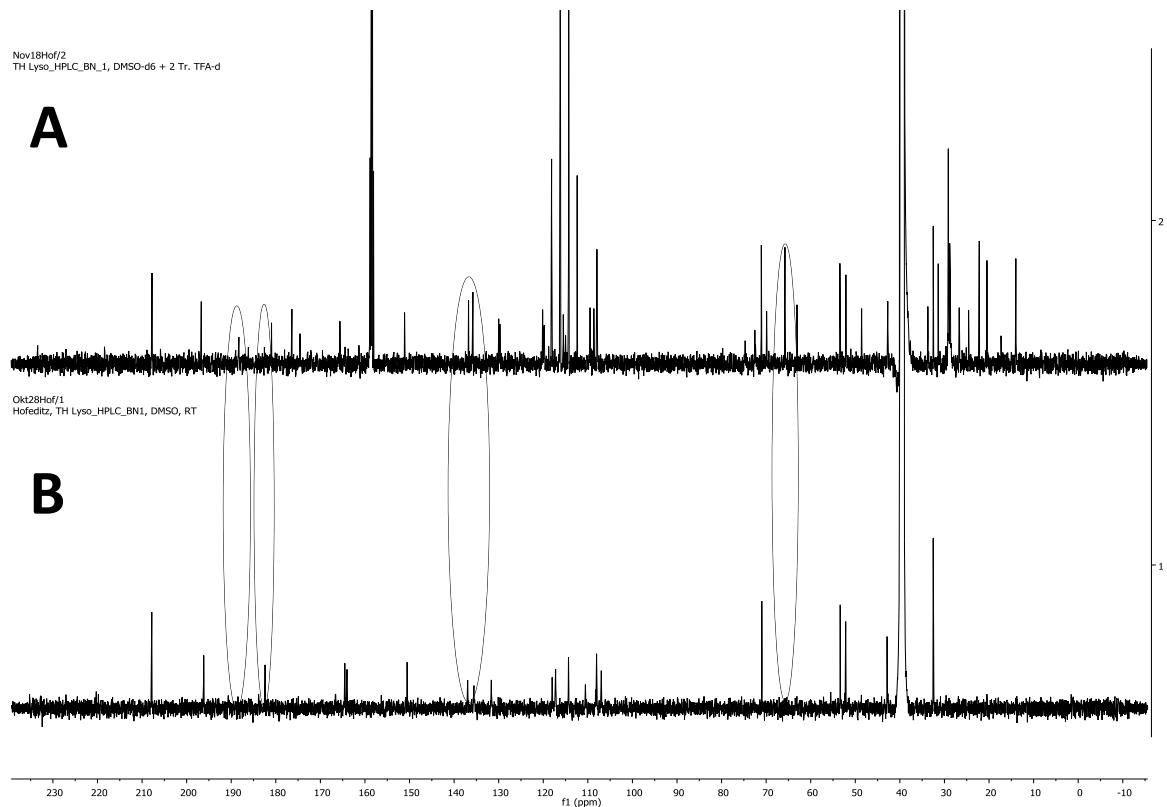


Abbildung 8-51: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): **A**: mit 2 Tr. TFA-*d*. **B**: ohne TFA-*d*.

Diese Messungen, mit und ohne TFA-*d*-Zusatz, wurden auch mit der Modellverbindung 1,8-Dihydroxyanthrachinon (**140**) durchgeführt, um zu überprüfen, inwieweit eine Änderung des Chromophors eintritt. Auch hier konnte ein Farbumschlag beobachtet werden: **140** in $\text{DMSO-}d_6$ (gelb-braun) und in $\text{DMSO-}d_6$ mit 4 Tropfen TFA-*d* (orange).

Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von **140 mit und ohne TFA-*d*-Zusatz**

140 wurde parallel ohne TFA-*d* ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz, 5 mm Röhrchen, 128 scans, 14.2 mg, Abbildung 8-52 A) und TFA-*d* ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz, 5 mm Röhrchen, 128 scans, 15.0 mg, Abbildung 8-52 B) gemessen. Bei der Messung ohne Säure-Zusatz (Abbildung 8-52 A) konnte ein Dublett vom Dublett ($J = 8.5$ und 0.7 Hz) mit einer Intensität von zwei Protonen bei einer chemischen Verschiebung von $\delta_{\text{H}} = 7.37$ ppm, ein Dublett vom Dublett ($J = 7.6$ und 0.8 Hz) mit einer Intensität von zwei Protonen bei

einer chemischen Verschiebung von $\delta_{\text{H}} = 7.69$ ppm, ein Dublett vom Dublett ($J = 8.3$ und 7.9 Hz) mit einer Intensität von zwei Protonen bei einer chemischen Verschiebung von $\delta_{\text{H}} = 7.79$ ppm, sowie ein Singulett mit einer Intensität von zwei Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 11.91$ ppm identifiziert werden.

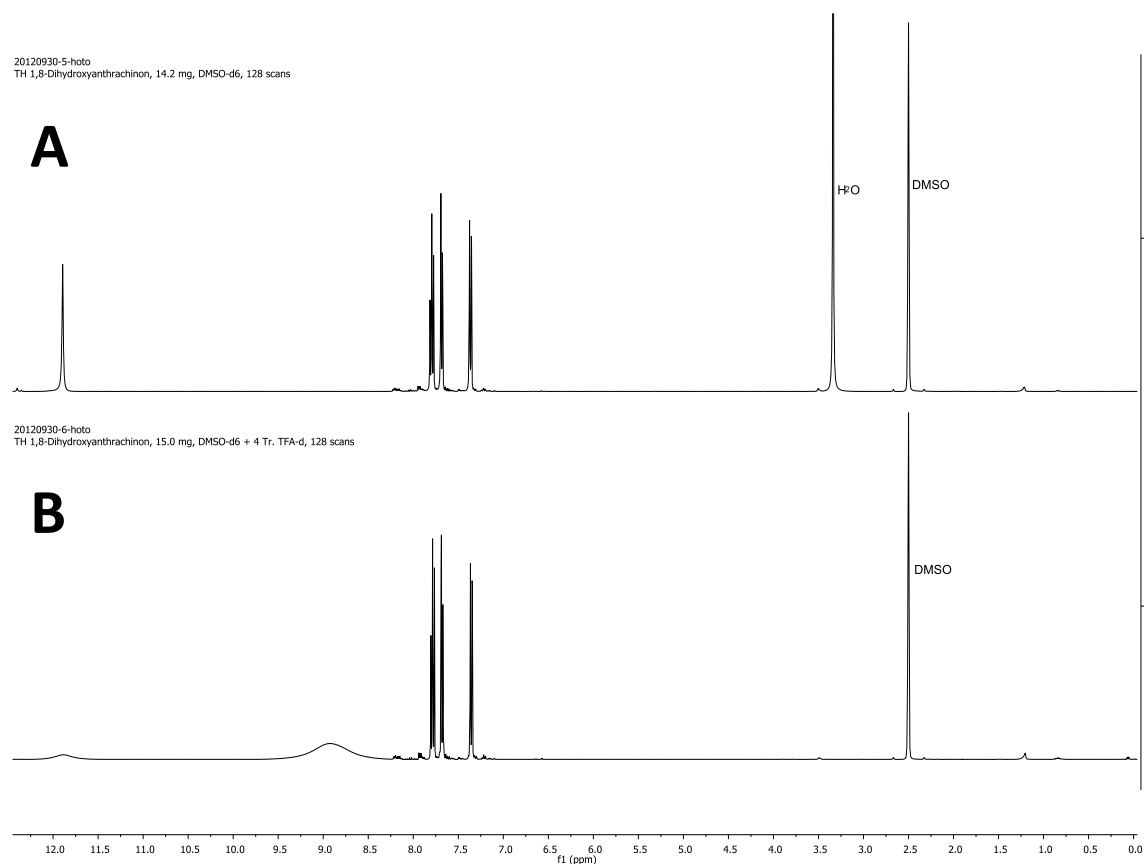
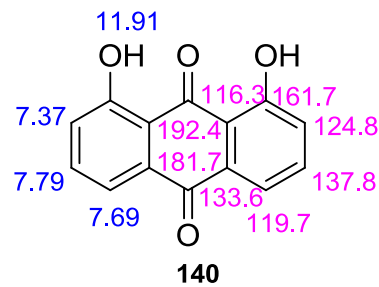


Abbildung 8-52: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, DMSO- d_6): **A**: ohne TFA- d . **B**: mit 4 Tr. TFA- d .

Bei der Messung TFA- d (Abbildung 8-52 B) konnten ebenfalls die aromatischen Protonen mit einer chemischen Verschiebung von $\delta_{\text{H}} = 7.37$ – 7.79 ppm beobachtet werden. Allerdings fehlte das Wassersignal ($\delta_{\text{H}} = 3.33$ ppm) und das Singulett ($\delta_{\text{H}} = 11.91$ ppm). Stattdessen tauchten zwei sehr breite Signale auf ($\delta_{\text{H}} = 8.94$ und 11.91 ppm). Im ^1H -NMR sind alle Protonensignale, die nicht mehr zu sehen sind, mit Deuterium ausgetauscht.^[115] Solche Austauschprozesse finden normalerweise bei D_2O und Trifluoressigsäure relativ schnell statt. In DMSO wird der Protonen-Transfer deutlich verlangsamt.^[115] Vermutlich fand ein H/D-Austausch von dem Wasser in dem DMSO- d_6 statt, wodurch aus TFA- d TFA entstand. Das TFA könnte nun mit den

Hydroxygruppen in 140 austauschen, wodurch entweder keine bzw. sehr breite OD-Signale resultieren. Einen genaueren Hinweis sollte der Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren liefern (Abbildung 8-53).



- chemische Verschiebung im ^1H -NMR-Spektrum
- chemische Verschiebung im ^{13}C -NMR-Spektrum

Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren von 140 mit und ohne TFA-d-Zusatz

Bei der Messung von **140** ohne Säure-Zusatz (Abbildung 8-53 A) konnten acht Signale identifiziert werden ($\delta_{\text{C}} = 116.3, 119.7, 124.8, 161.7, 181.7$ und 192.4 ppm). Da es sich um ein symmetrisches Molekül handelt, charakterisieren alle Signale zwei Kohlenstoffatome, bis auf die Carbonylfunktionen ($\delta_{\text{C}} = 181.3$ und 192.0 ppm).

Vergleichend waren diese Signale auch bei der Messung mit TFA-*d* (Abbildung 8-53 B) zu identifizieren. Als einzige, erkennbare Unterschiede waren die deutlichen kleineren Intensitäten bei einer chemischen Verschiebung von $\delta_{\text{C}} = 161.7$ und 124.8 ppm beobachtbar. Genau diese Kohlenstoffatome befinden sich an den beiden Hydroxygruppen bzw. in direkter Nachbarschaft dazu. Daraus ging die Vermutung hervor, dass eine Protonierung der Hydroxygruppen stattfand. Diese Vermutung ist plausibel zu den gemessenen ^1H -NMR-Daten, die oben beschrieben wurden.

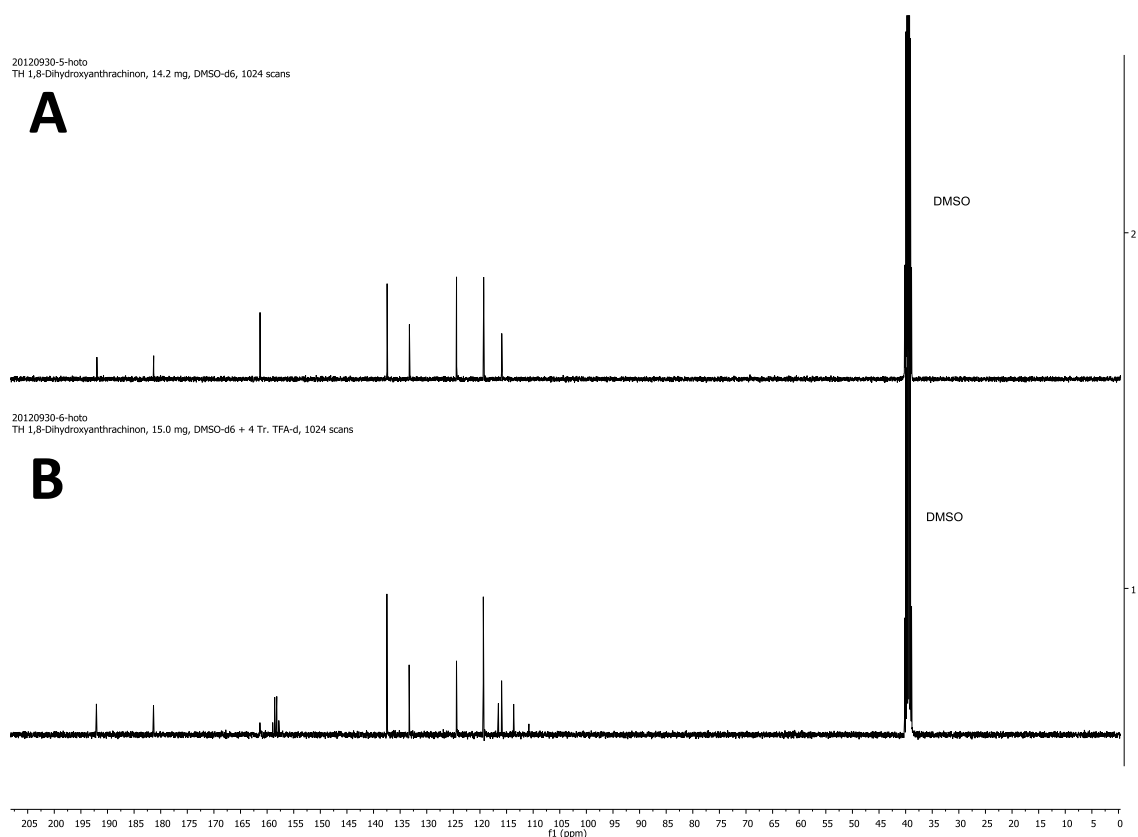


Abbildung 8-53: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren (100.6 MHz, DMSO- d_6): A: ohne TFA- d . B: mit 4 Tr. TFA- d .

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit des 1,8-Dihydroxyanthrachinons (**140**) zu Lysochinon-TH1 (**137**) konnte nicht geklärt werden, wodurch die Farbveränderung hervorgerufen wird.

Es wurde vermutet, dass eine Änderung des Chromophors durch Wasserabspaltung, Bildung des Semichinons, Bildung des Dihydrochinons oder die Ausbildung des Dihydroxychinons für diesen Farbumschlag verantwortlich war (Abbildung 8-45, Abbildung 8-46). Weiterhin wurde eine Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen postuliert, wodurch sich die Farbigkeit ändern könnte. Durch NMR-Untersuchungen mit TFA- d als Zusatz konnten diese Hypothesen nicht gestützt werden, hingegen wurden weitere Fragen aufgeworfen. Auch bei der Modellverbindung **140** konnte nur vermutet werden, dass eine Protonierung der Hydroxy- bzw. Carbonylgruppen vorliegt. Weitere Analysen zur Bestätigung dieser Vermutungen wurden zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Während der vorliegenden Arbeit war es demnach nicht möglich, die Ursache für die Farbveränderung durch Ansäuern zu klären. Durch weitere Untersuchungen könnte eventuell geklärt werden, was durch Änderung des pH-Wertes im Sauren geschieht.

Farbige Phenole durch Veränderung des pH-Wertes

Ein literaturbekanntes Beispiel von farbigen Phenolen, bei dem der pH-Wert einen sehr starken Effekt auf die Farbigkeit hat, sind Anthocyane.^[227] In diesem Beispiel wird durch Veränderung des pH-Wertes der Chromophor minimal und reversibel verändert. Daraus resultieren die sehr unterschiedlichen Farben wie rot, lila, gelb, aber auch eine Entfärbung (Abbildung 8-54).

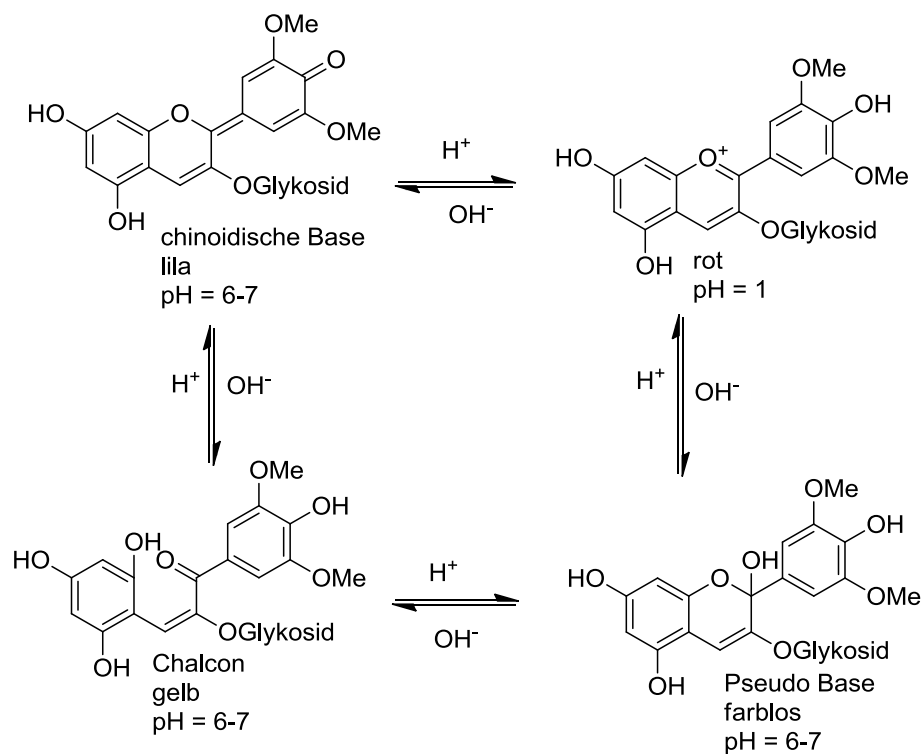
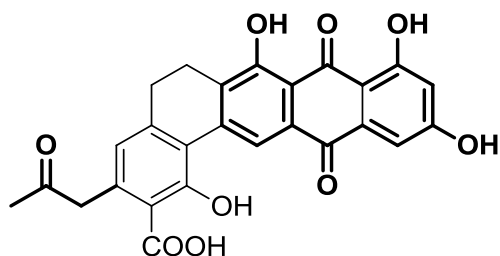
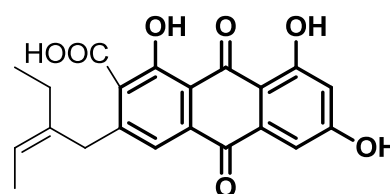
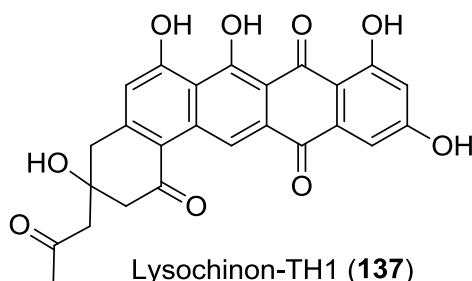


Abbildung 8-54: pH-abhängige Farbigkeit der Anthocyane.

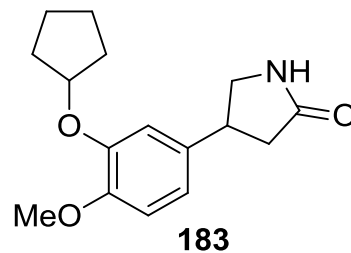
8.5.5 Biologische Aktivität von Lysochinon-TH1 (**137**)

KS-619-1 (**160**) und auch K-259-2 (**182**) stellen Inhibitoren der Phosphodiesterasen vom Typ 4 (PDE4) dar.^[197, 198, 228] Die PDE4 ist ein interessantes Target bei der Wirkstoffentwicklung zur Behandlung von Entzündungskrankheiten, wie Asthma und „chronic obstructive pulmonary disease (COPD)“ [einer chronischen Entzündungskrankheit der Lunge] aber auch Schuppenflechte (Psoriasis), Schizophrenie, Diät-induzierte Fettleibigkeit, Glucose-Intoleranz oder Multiple-Sklerose.^[229, 230, 231, 232, 233, 234] Dieses große Anwendungsgebiet macht die PDE4 zu einem therapeutisch sehr attraktiven Target. Die PDE4 adressiert cyclische Nucleotide, wie cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) oder cGMP (cyclisches Guaninmonophosphat) und baut diese ab. Dabei handelt es sich um zelluläre Messenger, die regulatorische Funktionen in allen Zellen besitzen.^[235] Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von **160** und **181** zu Lysochinon-TH1 (**137**, schwarze Hervorhebung), wurde **137** hinsichtlich seiner biologischen Aktivität getestet. Diese Assays wurden im Kieler Wirkstoff-Zentrum am Geomar (KiWiZ) in Kiel durchgeführt.^[iii]

KS-619-1 (**160**)K-259-2 (**182**)Lysochinon-TH1 (**137**)

ⁱⁱⁱ Wir danken Frau Dr. J. Wiese und Prof. Dr. J.F. Imhoff für die Durchführungen der biologischen Testierungen.

Bei einem *in vitro* Test konnte eine Hemmung des Enzyms Phosphodiesterase (PDE4) beobachtet werden. Aus einer Einzelbestimmung ging hervor, dass zu 84 % bei einer Konzentration von 50 μM und zu 56 % bei einer Konzentration um 10 μM gehemmt wurde. Es konnte bei einer Doppelbestimmung des IC_{50} -Wertes nur ein Bereich von 10 μM -20 μM bestimmt werden, da **137** ein Lumineszenzsignal hervorruft, dass bei einer Konzentration von > 10 μM stört. Eine weitere Eingrenzung war daher nicht möglich. Als Standard wurde Rolipram (**183**, $\text{IC}_{50} = 0.8 \mu\text{M}$) verwendet.^[231, 234]



Weiterhin wurde auf antibiotische Wirkung getestet. Bei einem Einsatz von **137** mit einer Konzentration von 100 μM wurden folgende sehr schwache Aktivitäten gefunden:

- *Staphylococcus lentus*: Hemmung des Wachstums um 39 %
- *Staphylococcus epidermidis*: Hemmung des Wachstums um 66 %
- *Propionibacterium acnes*: Hemmung des Wachstums um 74 % (bei 50 μM : 55 %; 25 μM : 26 %)

Eine IC_{50} -Wert Bestimmung (Konzentration bei der eine 50%ige Hemmung auftritt) wurde bei diesen schwachen Aktivitäten nicht durchgeführt, weil mit einem IC_{50} -Wert von > 50 μM gerechnet wurde.

Die biologischen Testierungen wurden nach SCHULZ *et al.* ermittelt.^[231]

8.6 Diskussion

Fermentation und chemische, präparative Analytik

In diesem Kooperationsprojekt mit dem AK WEBER (Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen, IMIT) war es meine Aufgabe, ein rotes

Pigment, welches aus der heterologen Expression der min PKS II mit Cyclasen (*llpD*, E, F; *llpCI-CIII*) aus dem Lysolipin (**56**, **16**)-Biosynthesegencluster in *Streptomyces albus* hervorgeht, chemisch zu untersuchen.

Problematisch war, dass bis zu diesem Zeitpunkt eine Produktion des roten Pigments nur auf Agarplatten (Schwarzfärbung während der Kultivierung) möglich war. Mit dieser Ausgangslage war eine reproduzierbare Möglichkeit zur Kultivierung in Flüssigkulturen notwendig, um eine effiziente Aufarbeitungsmethode zu erarbeiten. Die Grundlage hierzu wurde durch das OSMAC-Verfahren (One Strain Many Compounds) gelegt.^[97] Im Rahmen des OSMAC-Verfahrens wurde eine Nährmedienoptimierung durchgeführt. Daraus gingen Medium G20 für die Vorkultur und das Medium M65 für die Hauptkultur jeweils mit Apra⁵⁰ versetzt als bestes Produktionsmedium hervor. Die schon bei den Agarkulturen aufgetretene Schwarzfärbung, konnte auch in den Flüssigkulturen als charakteristisches Merkmal beobachtet werden. Aus diesen Optimierungsarbeiten konnte anhand des OSMAC-Ansatzes gezeigt werden, dass durch Veränderungen des Nährmediums ein sehr großes Potential für einen Stamm hinsichtlich der Sekundärmetabolitenproduktion besteht.

Aus der Dünnschichtchromatographie, als auch der HPLC- und HPLC-MS-DAD-Analytik, ging die Produktion neuer Substanzen aus dem Stamm *S. albus*-mPc hervor. Es konnten mehrere rote bzw. violette Metaboliten im Vergleich zu der Negativkontrolle (*S. albus* pSETermE*p) auf dem DC identifiziert werden. Dabei war die Detektion an KG-Material eindeutiger als an RP-Material. Als problematisch erwies sich diese Pigment-Mischung für die Aufarbeitung mit dem Ziel von 5–10 mg Reinstoff, aufgrund der starken pH-Aktivität.

Durch umfangreiche Optimierung der Dünnschichtchromatographie konnte das ternäre Gemisch Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 6:8:1 + 1 % TFA als das optimale Laufmittelgemisch für die weiterführende chromatographische Aufarbeitung erhalten werden. Nur so waren für Chromatographie von Gramm-Mengen an Extrakt die produzierten roten und violetten Pigmente sichtbar zu machen. Problematisch waren

die vielen, sehr farbigen, aber in geringer Menge produzierten Metabolite (ca. 15-20), die erst in der HPLC identifiziert aber nicht isoliert werden konnten. Diese hatten ein sehr stark verändertes, durch pH-Variationen induziertes Laufverhalten, was beispielhaft an den roten und violetten Pigmenten zu sehen war. Diese durch pH-Aktivität induzierten Schwankungen im chemischen Laufverhalten, machten die Aufreinigung zu einer sehr großen Herausforderung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Aufarbeitungsweg neu entwickelt und etabliert (Kapitel A 8.4.2). Dabei war eine basische Aktivierung des RP-Materials mittels Pyridin erforderlich. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings der Mechanismus dieser Aktivierung nicht geklärt werden. Vermutlich lagert sich das Pyridin innerhalb der C₁₈-Kohlenstoffkette ein, sodass restliche Silanole mit einem Pyridin-Endcapping versehen werden. Dadurch wäre es denkbar, dass das gesamte Material einen basischen Charakter bekommt, der durch waschen mit Wasser erhalten bleibt. Dieser basische Charakter machte eine Vortrennung an RP-Material erst möglich.

Strukturaufklärung

Zunächst konnten die Summenformel C₂₅H₁₈O₉ und damit 17 Doppelbindungsäquivalente aus HR-ESI-MS-Messungen bestimmt werden. Nach der ersten Aufarbeitung (Kapitel A 8.4.1) konnte unter Berücksichtigung der MS- und NMR-Daten (¹H-NMR, ¹³C-NMR, HSQC, HMBC, COSY) ein erster Strukturvorschlag für das Lysochinon (**156**) ermittelt werden. Daraus ging eine eindeutige Zuordnung in die Substanzklasse der Naphthacenchinone hervor, was deutlich der Cyclasen (*lIpCl*–*ClII*)-Spezifität aus Kapitel A 7.2.2 widersprach. Nachdem auch die Auswertungen der NMR-Spektren einige Unstimmigkeiten aufgeworfen haben, war es essentiell, diese Struktur (**156**) einer Überprüfung zu unterziehen. Zur Überprüfung von Strukturvorschlag **156** und zur Bestimmung der Biogenese wurde ein Fütterungsexperiment mit [1,2-¹³C₂]Acetat durchgeführt. Dieses Experiment sollte diesen ersten Strukturvorschlag absichern, sowie ein eindeutiges Faltungsmuster für eine in die Struktur hineingelegte Acetatkette ergeben.

Anhand des neuen Aufarbeitungsweges (Kapitel A 8.4.2) konnte eine ^{13}C -markierte Substanz (3.4 mg) aus vier Litern Kultur isoliert werden, die erschöpfend NMR-spektroskopisch ausgewertet wurde. Das erste Mal war es möglich, für alle Kohlenstoffatome im ^{13}C -NMR-Spektrum eine Signalzuordnung zu erreichen. Es konnte eine Anreicherung in jedem Kohlenstoffatom gefunden (Spezifischer Einbau von 2.0-7.3; Kapitel A 8.5.3, Tabelle 8-6) werden.

Auf Grundlage des ersten Strukturvorschlags **156** und des durchgeführten Fütterungsexperimentes mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat konnte anhand der NMR-Auswertungen des ^{13}C -markierten roten Pigments eine widersprüchliche Kopplungskonstante identifiziert werden. Diese Kopplungskonstante hatte eine Größenordnung von 40 Hz und stammt von nicht benachbarten Kohlenstoffatomen. Daher konnte die Struktur **156** nicht bestätigt werden, denn die resultierten Kopplungen waren nicht mit dem erwarteten Grundgerüst in Einklang zu bringen. Aus diesem Grund musste eine Überprüfung der NMR-Daten erfolgen, die mit Zuhilfenahme der Kopplungskonstanten aus dem Fütterungsexperiment mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat stattfand.

Letztendlich ging aus erneuter, erschöpfender NMR-Auswertung zusammen mit den erhaltenen Kopplungen eine weitere, ähnliche Verbindung hervor. Zweifelsfrei wurde das pentanguläre Polyphenol als Struktur bestimmt, welches ein durch die Cyclasen-Spezifität (Kapitel A 7.2.2) erwartetes Grundgerüst darstellt. Diese Struktur konnte in keiner Datenbank gefunden werden und wurde als Lysochinon-TH1 (**137**) bezeichnet. Für **137** sind alle analytischen Daten plausibel und die resultierende Faltung von Lysochinon-TH1 (**137**) passt in das Biosyntheschema. Wird eine Acetatkette in die Struktur von Lysochinon-TH1 (**137**) gelegt, so wird wie erwartet, eine U-förmige Anordnung gefunden, welche in Kapitel A 7.2.2 (Abbildung 7-12) beschrieben wurde.

Das in der Literatur bekannte Sapurimycin (**154**) (rot, $\text{C}_{25}\text{H}_{18}\text{O}_9$) aus *Streptomyces sp.* DO-116 weist ein ähnliches, pH-induziertes chemisches Laufverhalten auf.^[183, 184] Durch den Einsatz von Puffern und der Größenausschlusschromatographie konnten aus 30 Litern Kulturbrühe 20 mg **154** (0.667 mg/L) isoliert werden. Die Methylierung mit Diazomethan zum Methylester führte schließlich zu der Strukturaufklärung von

154.^[184] Diese sehr ähnlichen Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung von **137** und **154** sprechen dafür, dass durch geschickten Einsatz von chemischer Analytik, pH-Problematiken entgegen getreten werden kann. Diese Art der Aufarbeitung ist allerdings nur möglich, sofern keine Zersetzung bei verschiedenen pH-Werten stattfindet.

Im Vergleich zu der postulierten Biosynthese-Hypothese von Lysolipin (**56**, **16**) durch T. WEBER (Abbildung 7-2) konnte nicht die Kondensation von 12 sondern von 13 Malonyl-CoA-Bausteinen belegt werden. Die resultierende Polyketidkette wird demnach formal aus 13 Acetateinheiten aufgebaut. Dadurch entsteht ein sehr großer Widerspruch zu den Fütterungsexperimenten von BOCKHOLT *et al.* (Abbildung 7-1). Hier wurde gezeigt, dass als Starteinheit eine intakte Malonateinheit eingebaut wurde, was sehr ungewöhnlich ist. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnisse aus der durchgeführten Fütterung mit [1,2-¹³C₂]Acetat, stützen die Ergebnisse aus den Biosynthesegenclusteruntersuchungen. Dabei waren keine Hinweise vorhanden, die auf einen Einbau einer intakten Malonateinheit schließen ließ.

Durch die hier vorliegende Arbeit konnte durch die Isolierung und Strukturaufklärung von Lysochinon-TH1 (**137**) und die postulierte Struktur von Lysochinon-TH2 (**138**) ein deutlicher Einblick in die Biosynthese von Lysolipin (**56**, **16**) gegeben werden. Aus diesen Ergebnissen geht eindeutig hervor, dass die min PKS II (*llpD*, E, F) und die Cyclasen (*llpCI*–CIII) in dem Expressionswirt *S. albus* im Stande sind, neue Metaboliten aufzubauen, die aber im Aufbau des chemischen Grundgerüsts sehr charakteristisch sind. **137** wird durch 13 aneinander kondensierte Acetateinheiten aufgebaut und stellt somit ein Tridecaketid dar. Durch einen Literaturvergleich wurde gezeigt, dass **137** das größte bekannte Polyketid ist, das aus einer min PKS II (*llpD*, E, F) und Cyclasen (*llpCI*–CIII) durch heterologe Expression gebildet wird.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit isolierte Verbindung Lysochinon-TH1 (**137**) und die große Menge an produzierten, identifizierten farbigen Metaboliten wurde deutlich, dass durch eine genetische Manipulation sehr schnell eine Menge an neuen Metaboliten produziert werden kann. Bei diesen Metaboliten könnte ein größerer

Maßstab zur Isolierung und Strukturaufklärung eben dieser Verbindungen führen. Daraus ergibt sich ein recht großes Potential der kombinatorischen Biosynthese im Hinblick auf das 'drug development'. Die hier vorliegende Arbeit präsentiert viele produzierte Verbindungen, die mit Analytikmethoden identifiziert wurden, aufgrund der geringen Mengen aber nicht isoliert werden konnten. Es muss zunächst durch Dereplikation geklärt werden, ob nicht schon bekannte und charakterisierte Strukturen gebildet worden sind, die dementsprechend keiner Isolierung unterliegen müssen. Um durch chemische Analytik weitere Verbindungen zu isolieren, muss mittels kombinatorischer Biosynthese eine größere Produktion der Metabolite bereitgestellt werden.

Weiterhin zeigten diese erhaltenen Resultate, dass NMR-Spektren nicht teilweise nicht eindeutig oder auch auf mehreren Wegen zu interpretieren sind. Ein Beispiel dazu bietet der erste Strukturvorschlag **156** vergleichend mit Lysochinon-TH1 (**137**). Hierbei lagen zwei sehr ähnliche Verbindungen vor, die sich aber doch grundlegend unterschieden. Durch das Fütterungsexperiment mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat und die erschöpfende NMR-Auswertung konnte **156** durch inkonsistente Daten widerlegt werden. Widerum konnte durch weitere, intensive Auswertung der analytischen Daten die Struktur von **137** mit plausiblen Daten belegt werden. Daher sollte immer eine kritische Betrachtung geschehen, um auszuschließen, dass Fehlinterpretationen auftreten.

8.7 Ausblick

Lysochinon-TH1 (**137**) wurde isoliert, strukturell charakterisiert und die Biosynthese ist durch markiertes Acetat belegt worden. Die absolute Konfiguration von Lysochinon-TH1 (**137**) wurde bisher nicht bestimmt. Zwei Ansätzen könnte zukünftig nachgegangen werden: 1) Kristallisationsversuche: Bei einer erfolgreichen Kristallisation ist es möglich, durch die darauf folgenden Röntgenstrukturanalysen Aussagen über die absolute Stereochemie von **137** zu treffen. 2) Totalsynthese: Der

andere Ansatz besteht in einer Totalsynthese, wodurch beide Stereoisomere erhalten werden würden.

Lysochinon-TH1 (**137**) wurde in sehr geringen Mengen (3.4 mg aus vier Litern Kultur) produziert. Daraus ergibt sich eine weitere mögliche genetische Optimierungsarbeit. Es kann daran gearbeitet werden, eine Erhöhung der Produktion von Lysochinon-TH1 (**137**) zu erzielen. Daraus ist dann eine weitere Aufreinigung von anderen Vorläufern der Lysolipin (**56**, **16**)-Biosynthese vorstellbar. Je mehr Vorläufer identifiziert sind, desto mehr Details würde über die Biosyntheseintermediate des gesamten Biosyntheseweges ausgesagt werden können.

Der in dieser Arbeit diskutierte Widerspruch beim Aufbau von Lysochinon-TH1 (**137**) (13 intakte Acetateinheiten in der Polyketidkette) zu den Fütterungsexperimenten von BOCKHOLT *et al.* (Abbildung 7-1, Einbau eines intakten Malonyl-CoA-Bausteins als Starteinheit) führt zu einem erneuten Fütterungsexperiment. Mit einer Fütterung von [U-¹³C₃]-Malonsäure bei einer Fermentation mit dem Expressionswirt *S. albus* (min PKS II *llpD*, E, F und Cyclasen *llpCI*–CIII) sollte mit Gewissheit gezeigt werden, ob die min PKS II der Lysolipine (**56**, **16**) dazu fähig ist, als Starteinheit eine intakte Malonyl-CoA-Einheit einzubauen oder nicht. Aus den daraus resultierenden ¹³C-NMR-Spektren, müssten eindeutige Kopplungen hervorgehen, die einen Beleg für den Einbau einer formalen Acetateinheit oder einer Propionateinheit als Kettenstart geben. In diesem Zusammenhang wäre es auch denkbar, chemisch modifizierte Malonsäuren (u.a. SNAC-Ester) zu füttern, um durch die Vorläufer-dirigierte Biosynthese eine Derivatisierung zu erreichen.

9 Zusammenfassung der Ergebnisse

9.1 Mikrobielle Polyketide aus *S. bottropensis* Dra17

- Zimtsäure-SNAC-Ester (**81**) und Pivalinsäure-SNAC-Ester (**83**) wurden durch Synthese in Ausbeuten von 29 % (**81**) und 54 % (**83**) erhalten.
- Im Rahmen der Vorläufer-dirigierten Biosynthese wurden *L*-Isoleucin (**84**), Pivalinsäure-SNAC-Ester (**83**) und Zimtsäure-SNAC-Ester (**81**) in dieser Arbeit in Fütterungsexperimenten zugefüttert.
- Durch diese Fütterungsexperimente ist es in der vorliegenden Arbeit das erste Mal gelungen, neue Iromycinderivate zu erzeugen. Bisher konnte mit dieser Methode nur das Iromycin A (**54**) aus Fütterungsexperimenten von [1-¹³C]*n*-Valeriansäure-SNAC-Ester (**68**) erhalten werden.^[102]
- Aus dem Fütterungsexperiment mit *L*-Isoleucin (**84**) konnten drei neue, nicht literaturbekannte Derivate aus der Iromycinfamilie isoliert und strukturaufgeklärt (¹H-NMR, ¹³C-NMR und 2D-NMR, MS) werden (Kapitel A 6.4), die Iromycine G (**77**), H (**78**) und I (**79**). Als Reinstoff lagen die Verbindungen nicht vor.
- Aus dem Fütterungsexperiment mit Pivalinsäure-SNAC-Ester (**83**) resultierte das erstmalig aus der Vorläufer-dirigierten Biosynthese Iromycin S (**76**). Diese Verbindung wurde schon in der Literatur beschrieben, war jedoch nur durch Totalsynthese zugänglich.^[114]
- Es konnten nicht natürliche Vertreter der Iromycinfamilie erzeugt werden, die vorher nicht beschrieben waren. Daher deuten die Resultate aus der Vorläufer-dirigierten Biosynthese auf eine breite Substratspezifität des Loading-Modules der PKS I der Iromycine (**54**, **55**) hin. Dadurch wurde gezeigt, dass das Prinzip

der Vorläufer-dirigierten Biosynthese sehr viel Potential zur Derivatisierung von Naturstoffen besitzt.

9.2 Identifizierung des Genproduktes der min PKS II (*IlpD, E, F*) und Cyclasen (*IlpCI–CIII*) aus der heterologen Expression in *S. albus*

Fermentation und chemische, präparative Analytik

- Eine in dieser Arbeit durchgeführte Optimierung der Nährmedien ermöglichte erstmals eine erfolgreiche Kultivierung in Flüssigkultur (Kapitel A 8.1). Als beste Produktionsmedien wurden G20 (Vorkultur) und M65 (Hauptkultur) bestimmt, jeweils mit Apra⁵⁰ (50 µg/mL) versetzt. In ersten Arbeiten war hingegen nur eine Kultivierung auf Agarplatten (Medium SM versetzt mit Apra⁵⁰) möglich.
- Dünnschichtchromatographische Analytik (Kapitel A 8.2) führte vergleichend mit der Negativkontrolle (*S. albus* pSETermE*p) zu der Identifizierung von mehreren roten bzw. violetten Pigmenten. Es konnte eine reproduzierbare DC-Analytik (KG: Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 6:8:1 + 1 % TFA) und eine Aufreinigung an der HPLC (C₄-Säule, präparativ; A: Ammoniumformiat (20 mM) + 0.1 % TFA / Liter Wasser, B: Acetonitril) etabliert werden. Damit wurde erstmals eine reproduzierbare Aufarbeitung für das rosa-violette Pigment Lysochinon-TH1 (**137**) etabliert (Kapitel A 8.4.2). 3.4 mg rotes, ¹³C-markiertes Pigment wurden aus vier Litern Kultur erhalten.

Strukturaufklärung und erweiterte Biosynthese-Hypothese

- Durch LC-MS-Untersuchungen konnte für das rote Pigment erstmals eine Molmasse von 462 g/mol ermittelt werden. Aus der Hochauflösung (HR-ESI-MS) wurde die Summenformel C₂₅H₁₈O₉ errechnet. Für das violette

wurde eine Molmasse von 488 g/mol mittels LC-MS bestimmt und eine Summeformel von $C_{26}H_{16}O_{10}$ bestimmt.

- Um die Biogenese des Lysochinon-TH1 (**137**) aufzuklären, wurde ein Fütterungsexperiment mit $[1,2-^{13}C_2]$ Acetat durchgeführt und das reine Lysochinon-TH1 (**137**) isoliert.
- Die erhaltenen Kopplungskonstanten unterstützten zweifelsfrei die Struktur von Lysochinon-TH1 (**137**). **137** ist in keiner Datenbank zu finden und damit eine neue Struktur. Es wurde eindeutig gezeigt, dass es sich bei **137** um ein pentanguläres Polyphenol, wie bei den Lysolipinen (**56, 16**), handelt.
- Lysochinon-TH1 (**137**) enthält 13 kondensierte Acetateinheiten und ist damit das größte Polyketid (Tridecaketid), welches derzeit nur durch eine min PKS II (*llpD, E, F*) mit Cyclasen (*llpCI–CIII*) aufgebaut werden kann.
- Das violette Pigment ($M = 488$ g/mol, $C_{26}H_{16}O_{10}$) konnte nicht isoliert werden. Seine Struktur wurde auf Grundlage der vorliegenden analytischen MS/MS, UV-Daten und der Struktur von Lysochinon-TH1 (**137**) abgeleitet. Diese Verbindung wurde als Lysochinon-TH2 (**138**) bezeichnet. Dabei handelt sich vermutlich um ein C-8-Carboxylanalogon von **137**.
- Auf Grundlage von Lysochinon-TH1 (**137**) und Lysochinon-TH2 (**138**) wurde die im AK WEBER (Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen, IMIT) postulierte Biosynthese (Abbildung 7-2) von Lysolipin (**56, 16**) deutlich erweitert (Abbildung 8-42). Weiterhin wurde zweifelsfrei gezeigt, dass die min PKS II (*llpD, E, F*) eine Polyketidkette aus 13 und nicht aus 12 kondensierten Acetateinheiten aufbaut. Die Cyclasen (*llpCI–CIII*) sind dafür verantwortlich, die Cyclisierung von fünf der sechs Ringe im Lysolipin (**56, 16**) ohne 'Post-PKS-Tailoring-Enzyme' zu katalysieren. Das Stickstoffatom wird

demnach erst später in der Lysolipin (**56, 16**)-Biosynthese eingebracht. Dadurch konnte der hypothetische Biosyntheseweg A aus Abbildung 7-2 (Kapitel A 7) in der vorliegenden Arbeit eindeutig widerlegt werden.

- Es konnte eine hemende Wirkung auf die Phosphodiesterase 4 (PDE4) in einem *in vitro* Test festgestellt werden. Für Lysochinon-TH1 (**137**) konnte ein IC_{50} -Wert/Bereich mit 10–20 μM bestimmt (Standard: Rolipram (**183**); $IC_{50} = 0.8 \mu M$) werden. Eine genauere Eingrenzung war durch eine zusätzliche Lumineszenz durch den Chromophor von **137** nicht möglich. Weiterhin konnten schwache antibiotische Aktivitäten ermittelt werden (Kapitel A 8.5.5).

10 Summary of Results

10.1 Microbial Polyketides from *Streptomyces bottropensis* Dra17

- Cinnamic acid snac ester (**81**) and pivalic acid snac ester (**83**) were synthesized with yields of 29 % (**81**) and 54 % (**83**).
- In the course of precursor-directed biosynthesis *L*-isoleucine (**84**), pivalic acid SNAC ester (**83**) and cinnamic acid SNAC ester (**81**) were added in feeding experiments done in this current thesis.
- For the first time new iromycine derivatives were successfully obtained from feeding experiments. Previously, only Iromycine A (**54**) could be isolated from feeding experiments of [1-¹³C]*n*-valeric acid snac ester (**68**).^[102]
- The feeding experiment with *L*-leucine (**84**) resulted in three new, undescribed derivatives of the iromycin family, which were isolated and characterized by NMR and MS, the iromycines G (**77**), H (**78**) and I (**79**). These compounds were not received as pure substances.
- The feeding experiment with pivalic acid SNAC ester (**83**) resulted in the isolation of Iromycin S (**76**). **76** was obtained the first time from a feeding experiment. Previously, **76** was only received from total synthesis.^[114]
- These results indicate a broad substrate specificity of the PKS I loading module in the Iromycin (**54**, **55**) biosynthesis. Non natural derivatives were generated via precursor-directed biosynthesis. These achievements reflect the great potential of derivatization of natural products by the method of precursor directed biosynthesis.

10.2 Identification of the gene product produced by the min PKS II (*llpD*, *E*, *F*) and cyclases (*llpCI–CIII*) from heterologous expression in *S. albus*

Fermentation and chemical, preparative analytics

- An optimization implemented in my doctoral dissertation of microbiological media enables a successful cultivation in liquid media (Chapter A 8.1). The best production media was G20 (preculture) and M65 (main culture), with an addition of apramycin (50 µg/mL) respectively. In previous works only cultivation on agar plates (SM with apramycin) was possible.
- Thin layer chromatography (TLC, Chapter A 8.2) led to the identification of several red and violet pigments in comparison with the negative control (*S. albus*-pSETermE**p*). Reproducible TLC- and HPLC-analytics led to a new, reproducible isolation of one red pigment (Chapter A 8.4.2). In this way it was possible to isolate 3.4 mg of ¹³C-enriched red pigment from a culture broth with a volume of four liters.

Structure elucidation and extended biosynthesis hypothesis

- LC-MS investigations showed a molecular weight of 462 g/mol for the red pigment. From HR-ESI-MS a sum formula of C₂₅H₁₈O₉ was obtained. For the violet pigment a molecular weight of 488 g/mol was received and thereby with HR-ESI-MS experiments a sum formula of C₂₆H₁₆O₁₀ was calculated.
- For validating the biogenesis of lysoquinone-TH1 (**137**), a feeding experiment with completely ¹³C-labeled acetate was implemented and the pure lysoquinone-TH1 (**137**) isolated.

- The received coupling constants provided unequivocally the structure of lysoquinone-TH1 (**137**). Database investigations revealed no matches concerning **137** with already existing substances. Therefore **137** is a new compound. The structural motive contains a pentangular polyphenolic compound similar to lysolipine (**56, 16**).
- Lysoquinone-TH1 (**137**) contains a Polyketide chain of 13 acetate extender (tridecaketide). Therewith **137** is the biggest Polyketide, which is only built up through minimal pks II (*lIpD, E, F*) with cyclases (*lIpCI–CIII*).
- Isolation of the violet pigment ($M = 488 \text{ g/mol}$, $C_{26}H_{16}O_{10}$) was not accessible. The derived structure based on analytical MS/MS, UV-data and the structure of lysoquinone-TH1 (**137**). This compound was named lysoquinone-TH2 (**138**). It seems to be a C-8 carboxyl analogue of **137**.
- Based on the structures of lysoquinone-TH1 (**137**) and lysoquinone-TH2 (**138**) an extended biosynthesis hypothesis to the corresponding biosynthesis (Chapter A 7) of lysolipine (**56, 16**) was worked out. Furthermore unequivocal investigations showed the condensation of 13 and not 12 acetate extenders while biosynthesis from minimal pks II (*lIpD, E, F*). Therefore, only the cyclases (*lIpCI–CIII*) are responsible for the cyclization of five from six rings present in lysolipine (**56, 16**). The nitrogen atom is introduced in a later stage of biosynthesis. These received achievements clearly disprove the biosynthesis hypothesis path A (Chapter A 7) postulated by T. WEBER *et al.*
- Biological Assays showed an moderate activity for lysoquinone-TH1 (**137**) for the enzyme cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 (PDE4) with 10–20 μM (standard: Rolipram (**183**) with an IC_{50} of 0.8 μM). A more detailed determination was not possible because of an additional luminescence induced

by the chromophor of **137**. In addition weak antibiotic activity could be observed (Chapter A 8.5.5).

B. Experimenteller Teil

1 Allgemeine Materialien und Methoden

1.1 Instrumentelle Analytik

Drehwerte: Polarimeter *Perkin-Elmer* Modell 241. Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ sind in $[10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ mol}^{-1}]$ angegeben.

Elektronenspektren (UV): Spektrometer *Varian* Modell Cary 3E; *Varian Cary 50*. Die UV-Spektren wurden im sauren und basischen Milieu nach Zugabe von einem Tropfen 1 M HCl bzw. 1 M NaOH zu 2 mL einer methanolischen Lösung der Substanzen vermessen. Die Wellenlänge (λ) ist in [nm] angegeben und bezieht sich im Allgemeinen auf das Absorptionsmaximum; sh = Schulter. Der molare Extinktionskoeffizient ε ist in $[1000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}]$ angegeben und wurde unter Berücksichtigung gerätespezifischer Konstanten mit nachfolgender Gleichung berechnet:

$$\varepsilon [1000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}] = \frac{E \cdot \text{Molmasse} \cdot 10}{\text{Einwaage [mg]}}$$

Die Probe (0.1 mg) wurde in einem Volumen von 10 mL gelöst. Die Schichtdicke der verwendeten Küvette betrug 1 cm.

Infrarotspektren (IR): IR-Spektrometer *Perkin-Elmer* Modell 1600. Alle IR-Spektren wurden als KBr-Presslinge aufgenommen.

Circulardichroismus-Spektren: *Jasco* Modell J 810. Die molaren Elliptizitäten θ sind in $[10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ mol}^{-1}]$ angegeben.

NMR-Spektroskopie

NMR-Abteilung Georg-August-Universität Göttingen:

Alle Spektren wurden in 3 mm Röhren gemessen.

^1H -NMR-Spektren: *Varian* Inova-600 (600 MHz); *Varian* Mercury-300 (300 MHz); *Varian* Unity-300 (300 MHz).

^{13}C -NMR-Spektren: *Varian* Inova-600 (150.8 MHz); *Varian* Inova-500 (125.7 MHz) ausgestattet mit *Varian* PFG Cold Probe (Heliumkühlung); *Varian* Mercury-300 (75.5 MHz); *Varian* Unity-300 (75.5 MHz).

NMR-Abteilung Eberhard Karls Universität Tübingen:

Alle Spektren wurden in 3 bzw. 5 mm Röhren gemessen.

^1H -NMR-Spektren: *Bruker*, AMX-600 (600 MHz); *Bruker*, Avance-400 (400 MHz); *Bruker*, ARX-250 (250 MHz); *Bruker*, DRX-400 (400 MHz).

^{13}C -NMR-Spektren: *Bruker*, AMX-600 (150.6 MHz, 3 und 5 mm Röhren); *Bruker*, Avance-400 (100.6 MHz); *Bruker*, ARX-250 (62.5 MHz); *Bruker*, DRX-400 (100.6 MHz).

2D-NMR-Spektren: ^1H , ^1H -COSY (^1H , ^1H -Correlated Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity).

Alle ^1H -NMR-Spektren sind als Spektren erster Ordnung interpretiert, soweit Signalaufspaltung und Kopplungskonstanten angegeben sind. Abkürzungen: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, dd = doppeltes Dublett, ddd = Dublett vom doppelten Dublett, t = Triplett, td = Triplett vom Dublett, dq = Dublett vom Quartett, m = Multiplett.

Chemische Verschiebungen sind in δ -Werten [ppm] relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als interner Standard angegeben. Kopplungskonstanten J sind in Hertz [Hz] angegeben.

Die Auswertung erfolgte mittels MestReNova (*Mestrelab Research S.L., 2011*), Version: 7.0.3-8830.

Massenspektrometrie

Angegeben sind jeweils die Quotienten aus Masse zu Ladung (m/z) sowie die relativen Intensitäten bezogen auf den Basispeak.

Analytik-Abteilung Georg-August-Universität Göttingen:

EI-MS: *Thermo Finnigan* Doppelfokussierendes Sektorfeld-Massenspektrometer MAT 95, 70 eV; mit NH_3 als Reaktandgas.

ESI-MS: *Thermo Finnigan* LCQ (Ionenfalle).

FT-ICR-MS (ESI-HR-MS): *Bruker Daltonik*, Apex IV (FTICR).

Analytik-Abteilung Eberhard Karls Universität Tübingen:

ESI-MS: *Bruker Daltonik*, Esquire 3000+ (Ionenfalle); Helium als Reaktandgas.

FT-ICR-MS (ESI-HR-MS): *Bruker Daltonics*, Apex II.

Spritzenpumpe für Direkteinspritzung: *Cole & Parmer*, 74900 series.

Software (Tübingen): esquireControl Version 5.0 Build No. 65.0; Bruker Daltonics esquire 5.0 Build 169; DataAnalysis Version 3.0 (Build 49); ChemStation for LC, Version: Rev.A.08.03 [847].

1.2 Chromatographie

Lösungsmittel: Für die Chromatographie benötigte Lösungsmittel wurden zuvor destilliert. Für die HPLC finden analysenreine Lösungsmittel und Reinstwasser (*Millipore* Milli-Q Reference A⁺) Verwendung, welche zuvor im Ultraschallbad (10-15 min) bzw. mittels Durchleiten von Helium (5-10 min) entgast wurden.

Dünnschichtchromatographie: *Merck* DC-Alufolien, Kieselgel (KG) 60 F₂₅₄, 20×20 cm, Schichtdicke 0.2 mm; *Merck* DC-Alufolien, RP-18 60 F₂₅₄, 20×20 cm, Schichtdicke 0.2 mm; *Macherey-Nagel* DC-Alufolien, Kieselgel Alugram[®] Nano SIL DIOL/UV₂₅₄, 4×8 cm, Schichtdicke 0.2 mm. Angegeben sind R_f -Werte (Laufhöhe relativ zur Lösungsmittelfront). Modifizierung des Laufmittels erfolgte durch Zugabe verschiedener Anteile von NEt₃ bzw. Ameisensäure.

Sprühreagenzien: Nach *Merck*, Anfärbereagenzien für die Dünnschicht- und Papierchromatographie.^[236] Nach dem Ansprühen wurden die DC-Platten auf ca. 100 °C erwärmt.

Anisaldehyd (Nr. 21): 1.0 mL Anisaldehyd in einer Lösung aus 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 5 mL konz. Schwefelsäure.

Orcin (Nr. 250): **Lösung a:** 1 g Eisen(III)-chlorid wird in 100 mL Schwefelsäure (10 %) gelöst. **Lösung b:** Orcinlösung (6 % in Ethanol). Sprühlösung: Vor Gebrauch werden 10 mL **a** und 1 mL **b** gemischt. Nachbehandlung: 10 – 15 min erwärmt.

Ehrlichs Reagenz (Nr. 91): 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in einem Gemisch von 25 mL konz. Salzsäure und 75 mL Methanol gemischt.

Ninhydrin (Nr. 231): 0.2 g Ninhydrin gelöst in 100 mL Ethanol.

Vanillin-Schwefelsäure (Nr. 322): 0.5 g Vanillin werden in 100 mL konz. Schwefelsäure-Ethanol-Mischung (40 + 10) gelöst. Erwärmen auf 120 °C bis zur optimalen Farbintensität der Banden.

Kaliumpermanganat (Nr. 182): Kaliumpermanganatlösung (0.05 % in Wasser).

Molybdato-phosphorsäure (Nr. 204; Tauchlösung): Molybdato-phosphorsäurelösung (5 oder 10 % in Ethanol). Auf 120 °C erwärmen bis zur optimalen Bandenbildung (blau-grün).

Eisen(III)-chlorid (Nr. 125): Eisen(III)-chloridlösung (1-5 % in Salzsäure 0.5 mol/L).
Hydroxamsäuren: rot; Phenole: blau oder grünlich.

Naturstoffreagenz A^[237]: eine 1 %ige methanolische Lösung von Naturstoffreagenz A und eine 5 %ige ethanolische Polyethylenglykol 4000-Lösung werden nacheinander auf die DC-Platte gesprüht. Es entstehen sofort oder nach 15 min unter UV (365 nm) intensive Fluoreszenzfarben. Das Fluoreszenzverhalten ist strukturabhängig. Die methanolische Lösung muss vor Gebrauch frisch angesetzt werden.

Ceriummolybdat: 5 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ und 25 g $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ gelöst in 450 mL dest. Wasser und 50 mL konz. Schwefelsäure.

Bromkresolgrün (Nr. 42): 0.04 g Bromkresolgrün werden in 100 mL Ethanol gelöst. Die Lösung wird mit Natronlauge 0.1 mol/L bis zu einer auftretenden Blaufärbung versetzt.

2,4-Dinitrophenylhydrazin (Nr. 103): 1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin gelöst in einer Mischung aus 25 mL Ethanol, 8 mL Wasser und 5 mL konz. Schwefelsäure.

o-Dianisidin (Nr. 76): Gesättigte o-Dianisidin-Lösung in Eisessig.

Säulenchromatographie: Für Schwerkraftsäulen wurde *Macherey-Nagel* Kieselgel (KG) 60, 0.040-0.063 nm und *Merck* Lichroprep® Diol, 25-40 µm verwendet. Für die Gelchromatographie kamen *Sigma-Aldrich* Sephadex LH-20 sowie *Tosoh Corporation*

Toyopearl® HW-40F zum Einsatz. Für die Reversed-Phase (RP) Chromatographie wurde Merck Kieselgel-60 RP-18 (40-63 µm) verwendet.

Mitteldruckchromatographie (MPLC): Pumpe Knauer HPLC Pumpe 64; Knauer Wellchrom Maxi-Star K-1000. Merck Lobar RP-18 Fertigsäulen LiChroprep (40-63 µm): Typ A (240×10 mm), Typ B (310×25 mm), Typ C (450×50 mm).

Varian IntelliFlash, Programm: Varian 971-FP Version 3.1.524. ELSD-Detektor: Varian 385-LC.

Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Alle Messungen fanden bei Raumtemperatur statt.

Analytische/Semipräparative HPLC mit DAD-Kopplung:

Anlage 1 (analytisch): Pumpe Jasco PU-1580; Mischkammer Jasco LG-1580-02; Entgaser Jasco DG-2080-53; MD-Detektor Jasco MD-2010plus; ELSD-Detektor: Varian 385-LC; CD-Detektor: Jasco CD-995; AD-Wandler: Jasco LC-Net II/ADC; Autosampler Jasco AS-1555 mit Rheodyne 100 µL Auftragsschleife.

Anlage 2 (analytisch/semipräparativ):

Pumpe Jasco PU-2080plus; Mischkammer Jasco LG-2080-02; Entgaser Jasco DG-2080-53; PDA-Detektor Jasco MD-2010plus; Säulenofen Jasco CO-2065.

Analytisch: Autosampler Jasco AS-2055plus mit Rheodyne 100 µL Auftragsschleife.

Semipräparativ: Manuelles Probenaufgabeventil mit Rheodyne 500 µL Auftragsschleife.

Software (Tübingen; beide Anlagen) : Jasco ChromPass Chromatography Data System, Version 1.8.6.1.

Software (Göttingen): *Jasco* Borwin mit Borwin-PDA Version 1.50 (Chromatographie); HSS-2000 Version 3.5.2 (Steuerung).

Analytische HPLC mit DAD- und ESI-MS-Kopplung (HPLC-MS):

Georg-August-Universität Göttingen:

Pumpe und Mischkammer *Flux Instruments* Rheos 4000; Entgaser *Flux Instruments* ERC-3415α Autosampler *Jasco* 851-AS; PDA-Detektor *Finnigan* Surveyor; Massendetektor *Thermo Finnigan* LCQ (ESI-MS).

Software: *Flux Instruments* Janeiro Version 1.10.0 (Steuerung Pumpe); *Thermo/Finnigan* TunePlus Version 1.3 (Steuerung ESI-MS); *Finnigan* Xcalibur Version 1.3 (Chromatographie, Steuerung).

Eberhard Karls Universität Tübingen:

1.) LC-MS-Anlage des Instituts für organische Chemie

HPLC: *Agilent* 1100 series.

ESI-MS: *Bruker Daltonik*, Esquire 3000+ (Ionenfalle); Helium als Reaktandgas.

Software: esquireControl Version 5.0 Build No. 65.0; *Bruker Daltonics* esquire 5.0 Build 169; DataAnalysis Version 3.0 (Build 49); ChemStation for LC, Version: Rev.A.08.03 [847].

2.) LC-MS-Anlage des Lehrstuhls Prof. WOHLLEBEN (AK Prof. FIEDLER).

HPLC: *Agilent* 1200 series mit Diodenarraydetektor (DAD), 10 mm Standard Flusszelle.

Detektionswellenlängen (Bandbreite):

230 nm (10 nm), 260 nm (20 nm), 280 nm (20 nm), 360 nm (20 nm), 435 nm (40 nm);

ESI-MS: *Agilent* LC/MSD Ultra Trap System XCT 6330.

Software: Agilent, LC/MSD ChemStation Rev. B.01.03; *Bruker Daltonik*, 6300 Series Trap Control Version 6.1.

MS-Parameter: ESI Interphase (positive, negative, alternierend); Mode Ultra Scan; Kapillarspannung 3.5 kV; Temperatur 350 °C.

Präparative HPLC mit DAD-Kopplung (Georg-August-Universität Göttingen): Pumpe und Mischkammer *Jasco* PU-1587; DAD-Detektor *Jasco* UV-1575; manuelles Probenauftragsventil mit *Rheodyne* 2 mL Auftragsschleife.

Software: *Jasco* Borwin mit Borwin-PDA Version 1.50 (Chromatographie); HSS-2000 Version 3.5.2 (Steuerung).

Präparative HPLC des Fachbereiches der Biologie der MN-Fakultät (Eberhard Karls Universität Tübingen, AK Prof. FIEDLER):

Diese Anlage ist ein halbautomatisches Hochdruckgradientensystem (LaPrep von VWR). Folgende Komponenten sind enthalten:

VWR P110 Pumpe (2 ×); *Knauer* dynamische Mischkammer; *Valco* manuelles Injektionssystem C6UW mit 5 mL Probenschleife; VWR P 314 2-Kanal-UV-VIS Detektor; *Abimed* bzw. *Kipp & Zonen* 2-Kanal Flachbettschreiber.

Präparative HPLC mit DAD-Kopplung (Eberhard Karls Universität Tübingen, AK Prof. GROND):

Thermo Scientific Ultimate 3000:

Pumpe: HPG 3200 BX-Pumpe; Flussraten bis 50 mL/min; Autosampler: WPS-3000SL mit 2.5 mL Sample Loop bzw. 2.5 mL Spritze; DAD-Detektor: DAD-3000RS mit 8 UV-Kanälen und einer semipräparativen Messzelle; SR-3000 Solvent Rack; Ultimate 3000 Fraction

Collector AFC-3000; manuelles Bioline Probenauftragsventil mit *Rheodyne* 1 mL Auftragsschleife; *Knauer* Online Degasser.

Software: Chromeleon® Version 6.80.

Analytische HPLC-Säulen:

Säule 1 (Standard für Analytik und HPLC-MS; Iromycin B (55), D (60), H (78) und I (79)

Aufreinigung: *Grom (Grace)*, Superspher RP C-18 endc., 100 Å, 4 µm, 100 × 2 mm ID; Vorsäule: *Grom (Grace)*, Superspher Guard coulmn RP C-18 endc., 100 Å, 10 × 2 mm ID; Flussrate 0.2 mL/min.

Säule 2 (Standard für Analytik und HPLC-MS AK Fiedler): *Dr. Maisch GmbH*, Nucleosil C-18, 100 Å, 3 µm, 100 × 2 mm ID; Säulentemperatur: 40 °C Flussrate 0.4 mL/min, Injektionsvolumen: 2.5 µL.

Säule 3 (Iromycin A (54), C (59), G (77) und S (76) Aufreinigung): *Macherey-Nagel*, Nucleodur RP C-18 endc. 100 Å, 5 µm, 250 × 3 mm ID; Vorsäule: *Macherey-Nagel*, Nucleodur ChromCart® RP C-18 endc., 100 Å, 20 × 3 mm ID; Flussrate 0.5 mL/min.

Säule 4 (Lysochinon-TH1 (137)): *Dr. Maisch GmbH*, Reprosil Gold 120 C-4, 5 µm, 250 × 4.6 mm ID; Vorsäule: *Dr. Maisch GmbH*, Standard Guard Reprosil Gold 120 C-4, 5 µm, 10 × 4.6 mm ID. Flussrate 0.5 mL/min.

Säule 5 (Lysochinon-TH1 (137)): *Macherey-Nagel*, Nucleodur C-18 HTec, 5 µm, 250 × 4.6 mm ID; Vorsäule: *Macherey-Nagel*, Nucleodur C-18 HTec, 8 × 4 mm ID, 5 µm. Flussrate 0.5 mL/min.

Säule 6: *Macherey-Nagel*, Nucleodur Hilic, 5 µm, 100 × 2 mm ID; ohne Vorsäule. Flussrate 0.5 mL/min.

Säule 7: *Dr. Maisch GmbH*, Reprospher Hilic-P, 5 µm, 125 × 2 mm ID; Vorsäule: *Dr. Maisch GmbH*, Standard Guard Reprospher Hilic-P, 5 µm, 10 × 4.6 mm ID. Flussrate 0.5 mL/min.

Säule 8: *Dr. Maisch GmbH*, Kromasil 100 C-18, 5 µm, 250 × 4 mm ID; Vorsäule: *Dr. Maisch GmbH*, Standard Guard Kromasil 100 C-18, 5 µm, 10 × 4.6 mm ID. Flussrate 0.5 mL/min.

Säule 9: *Knauer*, CN-Säule C-18, 5 µm, 250 × 4.6 mm ID; mit Vorsäule; Flussrate 0.5 mL/min.

Säule 10: *Macherey-Nagel*, Nucleosil C-8, 5 µm, 250 × 4.6 mm ID; ohne Vorsäule Flussrate 0.5 mL/min.

Säule 11: *Macherey-Nagel*, Nucleodur Sphinx C-18, 5 µm, 250 × 4.6 mm ID, mit Vorsäule; Flussrate 0.5 mL/min.

Semipräparative HPLC-Säulen:

Säule 12 (Aufreinigung von Iromycin B (55), D (60), H (78) und I (79)): *Grom (Grace)*, Superspher RP C-18, 100 Å, 5 µm, 100 × 8 mm ID; Vorsäule: *Grom (Grace)*, Superspher Guard column C-18, 100 Å, 5 µm, 10 × 8 mm ID; Flussrate 2.5 mL/min.

Säule 13 (Aufreinigung von Iromycin A (54), C (59), G (77), S (76) und I (79)): *Macherey-Nagel*, Nucleodur RP C-18 endc., 110 Å, 5 µm, 250 × 8 mm ID; Vorsäule: *Macherey-Nagel*, Nucleodur RP C-18 endc. Flussrate 2.5 mL/min.

Säule 14 (Aufreinigung von Lysochinon-TH1 (137)): *Dr. Maisch GmbH*, Reprosil Gold 120 C-4, 5 µm, 250 × 8 mm ID; Vorsäule: *Dr. Maisch*, Standard Guard Reprosil Gold 120 C-4, 5 µm, 30 × 8 mm ID. Flussrate: 2.5 mL/min.

Säule 15 (Aufreinigung von Lysochinon-TH1 (137)): *Macherey-Nagel*, Nucleodur C-18 HTec, 5 µm, 250 × 8 mm ID; Vorsäule: *Macherey-Nagel* Nucleodur C-18 HTec, 5 µm, 10 × 8 mm ID. Flussrate 2.5 mL/min.

Präparative HPLC-Säulen:

Säule 16 (Aufreinigung von Lysochinon-TH1 (137)): *Dr. Maisch GmbH*, Reprosil Gold 120 C-4, 5 µm, 250 × 20 mm ID; Vorsäule: *Dr. Maisch*, Standard Guard Reprosil Gold 120 C-4, 5 µm, 30 × 20 mm ID. Flussrate: 13 mL/min.

Säule 17: *Macherey-Nagel*, Nucleodur 100-5 C-18 endc., 50 × 21 mm ID; Flussrate: bis 20 mL/min.

Säule 18: *Grom*, Nucleodur 100 RP C-18 endc., 4µm, 100 × 20 mm ID mit Vorsäule; Flussrate: bis 20 mL/min.

Programme und Laufmittelsysteme für die HPLC:

Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die UV-Detektion bei 254 nm.

Analytische HPLC:

A-01 (Standard für Analytik und HPLC-MS): 40 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Methanol (B), jeweils mit 0.05 % Ameisensäure. Programm: von 20 % auf 100 % B in 20 min, 10 min bei 100 % B, in 2 min auf 20 % B, 8 min bei 20 % B.

A-02 (Standard für Analytik und HPLC-MS, AK FIEDLER): 23 min; Laufmittelsystem Wasser + 0.1 % Ameisensäure (A)/ Acetonitril + 0.06 % Ameisensäure (B). Programm: von 10 % auf 100 % B in 15 min, 2 min bei 100 % B, in 1 min auf 10 % B, 5 min bei 10 % B.

A-03: 40 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B). Programm: von 20 % auf 60 % B in 10 min, in 5 min auf 75 % B, in 5 min auf 100 % B, 10 min bei 100 % B, in 4 min auf 20 % B, 6 min bei 20 % B; Detektion bei 560 nm.

A-04: 20 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit je 0.05 % Ameisensäure. Programm: von 60 % auf 70 % B in 2 min, 3 min bei 70 % B, in 2 min auf 100 % B, 6 min bei 100 % B, in 2 min auf 60 % B, 5 min bei 60 % B; Detektion bei 560 nm.

A-05: 40 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit je 0.05 % Ameisensäure. Programm: in 20 min von 40 % B auf 100 % B, 10 min bei 100 % B, in 4 min auf 40 % B, 6 min bei 40 % B; Detektion bei 560 nm.

A-06: 40 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit je 0.05 % Ameisensäure. Programm: 2 min bei 40 % B, in 8 min auf 55 % B, 2 min bei 55 % B, in 8 min auf 100 % B, 10 min bei 100 % B, in 4 min auf 40 % B, 6 min bei 40 % B; Detektion bei 560 nm.

A-07: 40 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 40 min isokratisch bei 45 % B.

A-08: 40 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit jeweils 0.1 % Trifluoressigsäure. Programm: 25 min bei 30 % B, in 2 min auf 100 % B, 5 min bei 100 % B, in 2 min auf 30 % B, 6 min bei 30 % B.

A-09: 30 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Methanol (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 1 min bei 40 % B, in 3 min auf 60 % B, 1 min bei 60 % B, in 5 min auf 100 % B, 10 min bei 100 % B, in 2 min auf 40 % B, 8 min bei 40 % B. Detektion bei 490 nm.

A-10: 40 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Methanol (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 20 min bei 80 % B, in 5 min auf 100 % B, 5 min bei 100 % B, in 2 min auf 80 % B, 8 min bei 80 % B.

A-11: 40 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 5 min bei 40 % B, in 6 min auf 60 % B, 5 min bei 60 % B, in 4 min auf 100 % B, 10 min bei 100 % B, in 2 min 40 % B, 8 min bei 40 % B. Detektion bei 490 nm.

A-12: 30 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 5 min bei 60 % B, in 5 min auf 100 % B, 10 min bei 100 % B, in 2 min auf 60 % B, 8 min bei 60 % B. Detektion bei 500 nm.

A-13: 40 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B). Programm: 20 min bei 60 % B, in 3 min auf 100 % B, 7 min bei 100 % B, in 2 min auf 60 % B, 8 min bei 60 % B.

A-14: 40 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 5 min bei 20 % B, in 5 min auf 40 % B, 5 min bei 40 % B, in 5 min auf 100 % B, 10 min bei 100 % B, in 2 min auf 20 % B, 8 min bei 20 % B.

A-15: 75 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 5 min bei 20 % B, in 5 min auf 30 % B, 10 min bei 30 % B, in 5 min auf 40 % B, 10 min bei 40 % B, in 5 min auf 60 % B, 10 min bei 60 % B, in 5 min auf 100 % B, 10 min bei 100 % B, in 2 min auf 20 % B, 8 min bei 20 % B.

A-16: 45 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B). Programm: 10 min bei 18 % B, in 5 min auf 40 % B, 10 min bei 40 % B, in 5 min auf 100 % B, 5 min bei 100 % B, in 2 min auf 20 % B, 8 min bei 20 % B. Detektion bei 280 nm.

A-17: 40 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B). Programm: 5 min bei 20 % B, in 1 min auf 40 % B, 2 min bei 40 % B, in 2 min auf 60 % B, 10 min bei 60 % B, in 2 min auf 100 % B, 8 min bei 100 % B, in 2 min auf 20 % B, 8 min bei 20 % B. Detektion bei 280 nm.

A-18: 35 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: in 15 min von 40 % B auf 60 % B, in 1 min auf 100 % B, 5 min bei 100 % B, in 2 min auf 40 % B, 8 min bei 40 % B. Detektion bei 500 nm.

A-19: 35 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Methanol (B) mit jeweils 0.025 % Triethylamin. Programm: 15 min bei 20 % B, in 5 min auf 100 % B, 10 min bei 100 % B, in 2 min auf 20 % B, 8 min bei 20 % B.

A-20: 50 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Methanol (B) mit jeweils 0.025 % Triethylamin. Programm: 15 min bei 40 % B, in 5 min auf 60 % B, 10 min bei 60 % B, in 2 min auf 100 % B, 8 min bei 100 % B, in 2 min auf 40 % B, 8 min bei 40 % B.

A-21: 40 min; Laufmittelsystem Ammoniumformiat (20 mM) mit 0.1 % TFA in Wasser (A)/ Acetonitril (B). Programm: 20 min bei 45 % B, in 5 min auf 75 % B, 8 min bei 75 % B, in 2 min auf 45 %, 8 min bei 45 %.

A-22: 50 min; Laufmittelsystem A Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 30 min bei 45 % B, in 5 min auf 100 % B, 5 min bei 100 % B, in 2 min auf 45 %, 8 min bei 45 %.

A-23: 30 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Methanol (B) mit jeweils 0.025 % Triethylamin. Programm: 30 min isokratisch bei 45 % B.

A-24: 15 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Methanol (B) mit jeweils 0.025 % Triethylamin. Programm: 15 min isokratisch bei 45 % B.

A-25: 30 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Methanol (B) mit jeweils 0.025 % Triethylamin. Programm: 30 min isokratisch bei 60 % B.

A-26: 30 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Methanol (B) mit jeweils 0.025 % Triethylamin. Programm: 30 min isokratisch bei 55 % B.

A-27: 50 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 10 min bei 40 % B, in 5 min auf 60 % B, 10 min bei 60 %, in 5 min auf 100 % B, 10 min bei 100 % B, in 2 min auf 40 % B, 8 min bei 40 % B.

Semipräparative HPLC:

S-01: 30 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Methanol (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 1 min bei 40 % B, in 3 min auf 60 % B, 1 min bei 60 % B, in 5 min auf 100 % B, 10 min bei 100 % B, in 2 min auf 40 % B, 8 min bei 40 % B.

S-02: 40 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Methanol (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 20 min bei 80 % B, in 5 min auf 100 % B, 5 min bei 100 % B, in 2 min auf 80 % B, 8 min bei 80 % B.

S-03: 40 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B). Programm: 20 min bei 60 % B, in 3 min auf 100 % B, 7 min bei 100 % B, in 2 min auf 60 % B, 8 min bei 60 % B.

S-04: 40 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 5 min bei 20 % B, in 5 min auf 40 % B, 5 min bei 40 % B, in 5 min auf 100 % B, 10 min bei 100 % B, in 2 min auf 20 % B, 8 min bei 20 % B.

S-05: 45 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B). Programm: 10 min bei 18 % B, in 5 min auf 40 % B, 10 min bei 40 % B, in 5 min auf 100 % B, 5 min bei 100 % B, in 2 min auf 20 % B, 8 min bei 20 % B. Detektion bei 280 nm.

S-06: 40 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B). Programm: 5 min bei 20 % B, in 1 min auf 40 % B, 2 min bei 40 % B, in 2 min auf 60 % B, 10 min bei 60 % B, in 2 min auf 100 % B, 8 min bei 100 % B, in 2 min auf 20 % B, 8 min bei 20 % B. Detektion bei 280 nm.

S-07: 35 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Methanol (B) mit jeweils 0.025 % Triethylamin. Programm: 15 min bei 20 % B, in 5 min auf 100 % B, 10 min bei 100 % B, in 2 min auf 20 % B, 8 min bei 20 % B.

S-08: 50 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Methanol (B) mit jeweils 0.025 % Triethylamin. Programm: 15 min bei 40 % B, in 5 min auf 60 % B, 10 min bei 60 % B, in 2 min auf 100 % B, 8 min bei 100 % B, in 2 min auf 40 % B, 8 min bei 40 % B.

S-09: 30 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 5 min bei 60 % B, in 5 min auf 100 % B, 10 min bei 100 % B, in 2 min auf 60 % B, 8 min bei 60 % B.

S-10: 40 min; Laufmittelsystem Ammoniumformiat (20 mM) mit 0.1 % TFA in Wasser (A)/ Acetonitril (B). Programm: 20 min bei 45 % B, in 5 min auf 75 % B, 8 min bei 75 % B, in 2 min auf 45 %, 8 min bei 45 %.

S-11: 50 min; Laufmittelsystem A Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 30 min bei 45 % B, in 5 min auf 100 % B, 5 min bei 100 % B, in 2 min auf 45 %, 8 min bei 45 %.

Präparative HPLC:

P-01: 25 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 15 min bei 60 % B, in 5 min auf 100 % B, 5 min bei 100 % B, 20 min bei 60 % B..

P-02: 15 min; Laufmittelsystem Wasser (A)/ Acetonitril (B) mit jeweils 0.05 % Ameisensäure. Programm: 20 min isokratisch bei 45 % B.

P-03: 40 min; Laufmittelsystem Ammoniumformiat (20 mM) mit 0.1 % TFA in Wasser (A)/ Acetonitril (B). Programm: 20 min bei 45 % B, in 5 min auf 75 % B, 8 min bei 75 % B, in 2 min auf 45 %, 8 min bei 45 %.

1.3 Mikrobiologische Methoden und Geräte

Alle mikrobiologischen Arbeiten wie Stammhaltung, Überimpfen und Fermentation wurden unter den hier üblichen sterilen Bedingungen durchgeführt.

1.3.1 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedienbestandteile wurden von folgenden Firmen bezogen:

AppliChem: Glycerin wasserfrei; Calciumcarbonat (gefällt); D-Mannitol; Natriumcarbonat.

Difco: Agar; Bacto Nutrient Broth.

Marcor: Cornsteep Powder.

<u>Roth:</u>	D-Glucose; Stärke aus Kartoffeln; Weizenstärke; Natriumchlorid; Glycerin; Zitronensäure; Dikaliumhydrogenphosphat-Tetrahydrat; Agar Agar, Kobe I; Caseinpepton (tryptisch verdaut).
<u>Müller's Mühle:</u>	Kartoffelmehl.
<u>Sigma-Aldrich:</u>	Glucose-monohydrat; Natriumchlorid.
<u>Hensel-Werke:</u>	Soja (fettarm).
<u>Merck:</u>	Malzextrakt; Caseinpepton; D-Glucose; Fleischextrakt; Leberpulver; Hefeextrakt; Magnesiumsulfat-Heptahydrat.
<u>Neuform:</u>	Hafermehl (Holo Hafergold).
<u>Oxoid:</u>	Hefeextrakt; Leberextrakt; Caseinpepton (tryptisch verdaut).
<u>Riedel-de Haën:</u>	Glycerin (84-87 %); Glucose-monohydrat; Natriumacetat (wasserfrei); D-Mannitol.
<u>Fluka:</u>	Malzextrakt; EDTA.
<u>Acros Organics:</u>	Stärke (Weizen); Calciumchlorid-Dihydrat.
<u>VWR:</u>	Natriumchlorid.

Alle hier nicht aufgeführten Bestandteile, zum größten Teil Salze, wurden aus dem Bestand der Chemikalienausgabe der Georg-August-Universität Göttingen bzw. der Eberhard Karls Universität Tübingen bezogen.

Spurenelement-Lösung ‚Spur 11‘:

Für einen Liter demineralisiertes Wasser: $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (3 g); Fe(III)-Citrat (1 g); MnSO_4 (0.2 g); ZnCl_2 (0.1 g); $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (0.025 g); $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ (0.02 g); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (0.01 g); CoCl_2 (0.004 g).

Antibiotikum-Stammlösung (Apra⁵⁰):

Apramycin-Sulfat wird in einer Konzentration von 50 µg/mL zu dem sterilen Medium, bei ca. 55 °C hinzugegeben. Es wird aufgrund der leichteren Handhabung eine Stammlösung verwendet. Dazu wird eine Lösung mit 50 mg/mL hergestellt. Das Apramycin-Sulfat wird in bidest. Wasser gelöst und danach steril filtriert. Im Anschluss wird pro 1000 mL Nährlösung 1 mL dieser Stammlösung hinzugefügt.

Nährmedienzusammensetzung:

Für alle Nährmedien wurde, sofern nicht anders angegeben, Leitungswasser verwendet und der pH-Wert vor dem Autoklavieren mit 0.5 M Salzsäure bzw. 0.5 M Natronlauge eingestellt. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 20 g/L Agar zugesetzt. Alle Nährmedien wurden durch Autoklavieren (feuchte Hitze, 121 °C, 1 bar Überdruck, 20 min) sterilisiert.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf ein Endvolumen von einem Liter.

Nährmedium:

M2⁺ (YMG, YMG⁺): Malzextrakt (10 g); Hefeextrakt (4 g); D-Glucose (4 g); CaCO₃ (0.3 g); pH = 7.0.

M2⁺* (YMG⁺): Malzextrakt (10 g); Hefeextrakt (4 g); D-Glucose (4 g); CaCO₃ (0.5 g); pH = 7.0.

M2^{*} (YMG): Malzextrakt (10 g); Hefeextrakt (4 g); D-Glucose (4 g); pH = 7.0.

Medium S: Stärke (Weizen oder Kartoffeln, 10 g); Glycerin (4 g); Caseinpepton (4 g); Hefeextrakt (0.5 g); Fleischextrakt (0.5 g); Leberextrakt (0.5 g); NaCl (1 g); pH = 7.0.

SGG(*)	D-Glucose (10 g); Glycerin (10 g); Stärke (Weizen oder Kartoffeln, 10 g); Caseinpepton (5 g); CaCO ₃ (3 g); Cornsteep-Powder (2.5 g), Hefeextrakt (2 g); NaCl (1 g); pH = 7.3.
SM*	Soja (fettarm, 20 g); D-Mannitol (20 g); pH = 7.0.
SG*	Soja (fettarm, 20 g); D-Glucose (20 g); pH = 7.0.
SMM*	Soja (fettarm, 20 g); D-Glucose (20 g); Malonsäure (15 mM, 1.59 g); pH = 7.0.
SMN*	Soja (fettarm, 20 g); D-Glucose (20 g); Natriumacetat (15 mM, 1.25 g); pH = 7.0.
G20*	Glycerin (20 g); Malzextrakt (10 g); Hefeextrakt (4 g).
M65*	Malzextrakt (10 g); Hefeextrakt (4 g); D-Glucose (4 g); CaCO ₃ (2 g); pH = 7.2.
Hafermehl*	Hafermehl (20 g), ,Spur 11'(2.5 mL).
NL1358*	D-Glucose (30 g); Caseinpepton (2 g); KH ₂ PO ₄ (1 g); NaCl (1 g); MgSO ₄ × 7 H ₂ O (0.5 g); Spur 11 (5 mL); pH = 7.0.
R2YE^[35]	Saccharose (128.75 g); K ₂ SO ₄ (0.31), MgCl ₂ × 6 H ₂ O (12.65 g); Glucose (12.5 g); Casaminosäuren (0.125 g); (Agar (27.5 g)) in 780 mL deionisiertem H ₂ O lösen; getrennt autoklavieren: 0.5 % KH ₂ PO ₄ (12.5 mL); 5 M CaCl ₂ × 2 H ₂ O (5 mL); 20 % L-Prolin (18.75 mL); 5.73 % TES (pH 7.2) (125 mL); 1 N NaOH (6.25 mL); Spurenelementlösung (2.5 mL); erst vor Gebrauch hinzugeben: 10 % Hefeextrakt (50 mL).

*: Zur Kultivierung des *Streptomyces albus* wurde Apra⁵⁰ bei ca. 55 °C hinzugefügt.

(*): sowohl für die Kultivierung vom *Streptomyces albus* als auch vom *Streptomyces bottropensis* Dra17 verwendet.

1.3.2 Langzeiterhaltung

Glycerin-Einlagerung: Steriles Glycerin wurde mit dem gleichen Volumen einer 48 h Kultur (Bedingungen s. Standardkultivierung der einzelnen Stämme) in Kryoröhrchen (Fa. *Sarstedt*) gemischt und bei -28 °C bzw. -70 °C gelagert. Diese 50 %ige Glycerin-Einlagerung ist je nach Stamm ca. sechs bis 48 Monate haltbar.

Stickstoff-Einlagerung: Von einer gut bewachsenen Agarplatte wurden mit einseitig zugeschweißten und mit einem Bleistück beschwerten sterilen Polypropylen-Halm Agarstückchen ausgestanzt, bis der Halm gefüllt war. Der Halm wurde in einem zweiten äußeren Halm gesteckt und dann an beiden Enden zugeschmolzen. Die Einlagerung erfolgt in einem Dewargefäß über flüssigem Stickstoff.

1.3.3 Schüttler und Fermenter

Inkubationsschüttelschränke *B. Braun* BS-1 und BS-4; Inkubationsschüttelschrank *B. Braun* Certomat HK mit Rundschüttler *B. Braun* Certomat U; Rundschüttler *B. Braun* Certomat RM; Längsschüttler (gebaut von den Werkstätten der Universität Göttingen).

Fermenter *B. Braun* Biostat B (2 L und 5 L) und *B. Braun* Biostat E (10 L) mit *Ingold* O₂-Elektroden.

1.3.4 Weitere Geräte

Autoklav: *Fedegari* FSV II, *Thermo SCIENTIFIC* Varioklav 135S.

Flowbox: *Thermo SCIENTIFIC* MSC-ADVANTAGE.

Wiegebrett: *Heidolph* Polymax 1040.

UV-Lampe: *Schütt Labortechnik*.

Ultraschallbad: *Qualilab*.

Pürrierstab: *Braun* Multiquick 3 Hand Processor, MR 300 Curry.

Fraktionssammler: *Isco* Cygnet; *Amersham Biosciences* Frac-920; *Pharmacia Biotech* RediFrac

Evaporator: *Biotage* V-10 Evaporator mit EV10 Carousel.

Lyophylle (Eiskondensator): *Christ* Beta 2-8 LD plus; *Christ* LOC 2m.

Rotationsverdampfer: *Büchi* R-200 mit V-800 Vakuumcontroller, *Büchi* R-215 mit V-855 Vakuumcontroller und V-700 Vakuumpumpe.

Zentrifugen: Tischzentrifuge *Eppendorf* Typ 5415D; Zentrifugen *Sigma* 4K15; Vakuumzentrifuge *Eppendorf* Concentrator 5301.

2 Mikrobielle Polyketide aus *Streptomyces bottropensis* Dra17

2.1 Mikrobiologische Arbeiten

2.1.1 Stammhaltung und Flüssigkulturen

Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf Agarplatten. Für die Stammhaltung wurde der Stamm *Streptomyces bottropensis* Dra17 mittels einer Platinimpföse auf M2⁺-Medium ausgestrichen und bis zur Ausbildung einer geschlossenen hellgrauen Sporenschicht für 7-10 Tage bei 28 °C inkubiert. Bewachsene Agarplatten wurden mit Parafilm® M (Fa. *Pechiney; Brand*) verschlossen und sind bei 4 °C Lagertemperatur für mindestens vier Monate haltbar.

Kultivierung in Flüssigkulturen

Vorkulturen

Die Fermentationen der Vorkulturen erfolgte in Schüttelkolben (300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen und Schaumstoffverschluss) beschickt mit

jeweils 100 mL SGG-Medium. Animpfmaterial war ca. 1/8 bzw. 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte.

Hauptkulturen

Variation A: Kultivierung in Schüttelkolben

Die Kultivierung erfolgte in 1 L Erlenmeyerkolben (mit drei Schikanen und Schaumstoffverschluss) mit jeweils 300 mL Nährlösung befüllt. Die Hauptkultur wurde mit 5 % einer 48 h alten Schüttelkolben-Vorkultur angeimpft und für 72 h bei 28°C und 220 - 250 rpm inkubiert. Zum Erntezeitpunkt hatten die Kulturen eine braune Färbung und wiesen einen pH-Wert zwischen 7.0 und 8.0 auf.

Variation B: Kultivierung in Biostat-B-Fermentern

Die Kultivierung erfolgte in 2 oder 5 L Gefäßen des Biostat-B-Fermenters, die mit 700 oder 1800 mL Medium S befüllt waren. Vor dem Start der Kultivierung erfolgte die Zugabe von ca. 1 mL einer Niax-Lösung (2.5 g Niax in 27.5 mL 70 % Ethanol). Als Inokulum diente 10 % einer 48 h alten Schüttelkolben-Vorkultur. Die Rührgeschwindigkeit betrug 500 rpm, die Temperatur 28 °C und die Belüftung 2-4 vvm. Die Nährlösung hatte einen pH-Wert von 7.0. Die pH-Einstellung erfolgte während der 72 h Inkubation mit 2 M Zitronensäure und 0.5 M NaOH, die im Vorfeld sterilisiert wurden. Zum Erntezeitpunkt hatte die Kulturbrühe eine braune Färbung und wies einen pH-Wert von 7.5-7.7 auf.

2.1.2 Isolierung und chemische Analytik

Die Fermentation der Vor- und Hauptkultur wurde unter den zuvor beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Nach der Ernte wurde die Kulturbrühe mit Celite (20 g/L) versetzt und anschließend filtriert. Der Rückstand (Mycel und Celite) wurde mit

MeOH/Aceton 3:7 (2 × 400 mL) versetzt und für jeweils 15 min im Ultraschallbad aufgeschlossen, filtriert und im Vakuum das Lösungsmittel entfernt. Der pH-Wert des Kulturfiltrats wurde mit 1 N HCl auf 5.0-5.6 angesäuert, mit Ethylacetat (3 × 500 mL) extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend erfolgte eine dünnschichtchromatographische Untersuchung der Extrakte mit einer Konzentration von 5-6 mg/mL (gelöst in MeOH) und dem Laufmittel CHCl₃/MeOH 9:1. Zur Identifizierung bekannter Substanzen wurden Referenzsubstanzen verwendet. Aufgetragen wurde mit einer 10 µL-Kapillare. Die produzierten Sekundärmetabolite wurden unter einer UV-Lampe (254 und 366 nm) und durch Ansprühen mit Anisaldehyd sichtbar gemacht. Es folgte eine Untersuchung mittels HPLC-DAD-MS-Kopplung mit einer Konzentration von max. 6 mg/mL in MeOH. Zur Isolierung der Sekundärmetaboliten wurden verschiedene Varianten durchgeführt.

Variante 1: Die Rohprodukte wurden durch verschiedene, nacheinander folgende chromatographische Methoden aufgereinigt:

1. Säulenchromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol 9:1)
 - Trennung der Iromycine (**54**, **55** und Derivate), Entfettung
2. Mitteldruckchromatographie an RP-Kieselgel (Aceton/Wasser 3:1)
 - gut geeignet für Iromycin A (**54**) und seine Derivate
- 2a. Mitteldruckchromatographie an RP-Kieselgel (Methanol/Wasser 7:3) gut
 - geeignet für Iromycin B (**55**) und seine Derivate
3. Säulenchromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol 95:5)
4. Mitteldruckchromatographie an RP-Kieselgel (Methanol/Wasser 12:1)

Punkt 3 und 4 wurden für die Aufreinigung von Iromycin G (**77**) und H (**78**) verwendet. Im Anschluss erfolgte die Reinigung mittels HPLC (Iromycin A (**54**) und Derivate: Säulen: 1-3, 13; Programme: A-01, A-02, A-13, S-03; Iromycin B (**55**) und Derivate: Säulen: 1,2,12,13; Programme: A-01, A-02, A-06, A-16, A-17, S-05, S-06.). Es wurde jeweils eine dünnschichtchromatographische Untersuchung der Extrakte durchgeführt.

Variante 2: Aufreinigung der Rohprodukte nach folgenden Schritten:

1. Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 (Methanol)
2. Endreinigung an der HPLC (Iromycin A (54) und Derivate: Säulen: 1-3, 13; Programme: A-01, A-02, A-13, S-03; Iromycin B (55) und Derivate: Säulen: 1,2,12,13; Programme: A-01, A-02, A-06, A-16, A-17, S-05, S-06.)

Variante 3: Aufreinigung der Rohprodukte nach folgenden Schritten:

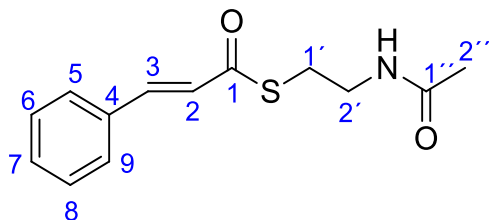
1. Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 (Methanol)
2. Säulenchromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol 9:1)
3. Säulenchromatographie an RP-Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch (Aceton/Wasser 3:1 oder Methanol/Wasser 7:3)
4. Endreinigung an der HPLC (Iromycin A (54) und Derivate: Säulen: 1-3, 13; Programme: A-01, A-02, A-13, S-03; Iromycin B (55) und Derivate: Säulen: 1,2,12,13; Programme: A-01, A-02, A-06, A-16, A-17, S-05, S-06.)

2.2 Darstellung von SNAC-Estern für die Vorläufer-dirigierte Biosynthese

2.2.1 Darstellung von Zimtsäure-SNAC-Ester (81)

Zu einer Suspension von Zimtsäure (**29**) (10.0 mmol, 1.48 g, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (35 mL) wurde bei 0 °C EDCl·HCl (20.9 mmol, 4.00 g, 2.1 Äq.) und nach 1.5 h *N*-Acetylcysteamin (**80**) (12.0 mmol, 1.43 g, 1.2 Äq.) hinzugegeben. Nach Erwärmen auf RT wurde das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Anschließend wurden Dichlormethan (35 mL) und Wasser (70 mL) zum Beenden der Reaktion hinzugefügt und die organische Phase abgetrennt, mit einer gesättigten NH₄Cl-Lösung (70 mL) und einer gesättigten NaCl-Lösung (70 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingeeengt. So wurden 2.64 g Rohprodukt erhalten und dieses wurde über eine zweifache Säulenchromatographie an Kieselgel mit den

Eluenten Chloroform/Methanol (9:1) und Chloroform/Methanol (95:5) aufgereinigt. Die Titelverbindung **81** (722.0 mg, 2.90 mmol, 29 %) wurde als gelblicher Feststoff leicht verunreinigt erhalten.



C₁₃H₁₅NO₂S (249.33)

R_f-Wert: 0.41 (Chloroform/Methanol 9:1)

Anfärbeverhalten: gelb (Anisaldehyd)

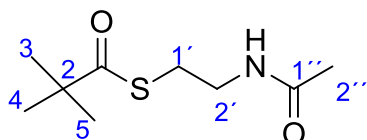
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 1.98 (s, 3H, 2''-H₃), 3.17 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, 1'-H₂), 3.51 (q, *J* = 5.4 Hz, 12.5 Hz, 2H, 2'-H₂), 6.73 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, 2-H), 7.39-7.43 (m, 3H, 6-H, 7-H, 8-H), 7.54-7.56 (m, 2H, 5-H, 9-H), 7.63 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, 3-H) ppm.

¹³C-NMR (150.6 MHz, CDCl₃): δ = 23.6 (C-2''), 28.8 (C-1'), 40.0 (C-2'), 124.8 (C-2), 128.4 (C-5, C-9), 129.3 (C-6, C-8), 131.0 (C-7), 133.8 (C-3), 141.4 (C-4), 170.5 (C-1''), 190.1 (C-1) ppm.

2.2.2 Darstellung von Pivalinsäure-SNAC-Ester (**83**)

Zu einer Suspension von Pivalinsäure (**82**) (40.0 mmol, 4.08 g, 1.0 Äq.) in Dichlormethan (88 mL) wurde bei 0 °C EDCl·HCl (60.0 mmol, 11.5 g, 1.5 Äq.) und nachfolgend *N*-Acetylcysteamin (**80**) (60.0 mmol, 7.15 g, 6.4 mL, 1.5 Äq.) hinzugegeben. Nach Erwärmen auf RT wurde das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Anschließend wurden Dichlormethan (50 mL) und Wasser (100 mL) zum Beenden der Reaktion hinzugefügt und die organische Phase abgetrennt. Die organische Phase

wurde mit einer gesättigten NH_4Cl -Lösung (70 mL), einer gesättigten NaCl -Lösung (70 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit den Eluenten Chloroform/Methanol (85:15) aufgereinigt. Die Titelverbindung **83** (4.41 g, 21.7 mmol, 54.3 %) wurde als weißes Pulver erhalten.



$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_2\text{S}$ (203.24)

R_f-Wert: 0.39 (Chloroform/Methanol 9:1)

Anfärbeverhalten: gelb (Anisaldehyd)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.21$ (s, 9H, 3- H_3 , 4- H_3 , 5- H_3), 1.99 (s, 3H, 2''- H_3), 2.95 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, 1'- H_2), 3.41 (dd (q, dt), $J = 6.5$ Hz, 2H, 2'- H_2) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, CDCl_3): $\delta = 22.6$ (C-2''), 27.8 (C-3, C-4, C-5), 28.9 (C-1'), 40.2 (C-2'), 47.5 (C-2), 177.3 (C-1''), 207.6 (C-1) ppm.

2.3 Vorläufer-dirigierte Biosynthese am Beispiel der Iromycine

2.3.1 Fütterungsexperimente

Schon in der von mir angefertigten Diplomarbeit^[96], der Dissertation von F. SURUP^[102] und auch in dieser vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Experimente im Rahmen der Vorläufer-dirigierten Biosynthese durchgeführt. Dabei wurden einige Experimente im Schüttelkolben und einige dieser Fütterungen im Fermenter kultiviert.

2.3.1.1 Fütterungsexperimente zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese in Schüttelkolben

Bei den Kultivierungen in Schüttelkolben wurden die Vorläufermoleküle aus Tabelle 2-1 zu der Kulturbrühe hinzugegeben. Die Zugabe erfolgte bei Standardbedingungen nach der 24. und 36. Stunde. Eine Kultur (2 Erlenmeyerkolben), ohne Fütterungszusatz, diente hierbei als Kontrolle. Die Vorläufermoleküle wurden für die Fütterung in 1 mL steril filtriertem DMSO gelöst und mit 10 mL sterilem, bidestilliertem Wasser verdünnt. Bei der Fütterung von dem Zimtsäure-SNAC-Ester (**81**) waren 10 mL DMSO und 14 mL Wasser notwendig, um den Ester zu lösen. Der pH-Wert der Fütterungslösung wurde mit 0.5 M HCl oder 0.5 M NaOH auf 6.5–7.0 eingestellt. Die Lösung wurde vor der Fütterung steril filtriert.

Tabelle 2-1: Zur Kultur des Stammes *Streptomyces bottropensis* Dra17 zugegebene Vorläufermoleküle bei einer Kultivierung in Schüttelkolben.

Substanz	Molmasse [g/mol]	Einwaage [g]	Fütterungsendkonzentration [mM]	Fermentationsvolumen [mL]
L-Isoleucin (84)	131.2	2.41	7.3	10 × 300
Zimtsäure-SNAC-Ester (81)	249.3	1.48	6.8	2 × 250

2.3.1.2 Fütterungsexperimente zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese in Fermentern

Bei den größeren Kultivierungsansätzen im Fermenter wurden als Vorläufermoleküle die in Tabelle 2-2 aufgeführten Substanzen verwendet. Die Fütterungen erfolgten unter den oben beschriebenen Standardbedingungen. Bei der Kultivierung im Fermenter wurde die Lösung des jeweiligen Vorläufermoleküls mittels einer Schlauchdosierpumpe ab der 24. Stunde für einen Zeitraum von 12-18 h zugefüttert, in Abhängigkeit des Volumens der Fütterungslösung. Die Vorläufermoleküle wurden für die Fütterung in einer Mischung aus steril filtriertem DMSO (2-3 mL) und sterilem, bidestilliertem Wasser (40-50 mL) gelöst. Der pH-Wert dieser Lösungen wurde außer

bei *L*-Isoleucin (**84**) nicht korrigiert. **84** wurde durch langsame Zugabe von zunächst 0.5 M NaOH, dann 2 N HCl und wieder 0.5 M NaOH gelöst und auf einen pH-Wert von 7.0 eingestellt.

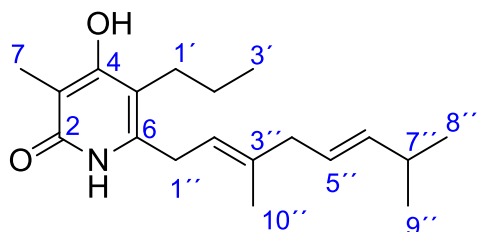
Tabelle 2-2: Zur Kultur des Stammes *Streptomyces bottropensis* Dra17 zugegebene Vorläufermoleküle bei einer Kultivierung in Fermentern.

Substanz	Molmasse [g/mol]	Einwaage [g]	Fütterungs- endkonzentration [mM]	Fermentations- volumen [mL]
Pivalinsäure-SNAC-Ester (83)	203.3	4.41	7.24	3000
<i>L</i> -Isoleucin (84)	131.2	1.92	7.3	2000

2.4 Charakterisierung der Metabolite von *Streptomyces bottropensis*

Dra17

Iromycin A (55)



$C_{19}H_{29}NO_2$ (303.45)

R_f-Wert: 0.51 (Chloroform/Methanol 9:1); 0.55 (Aceton/Wasser 4:1);
0.25 (Aceton/Wasser 3:1)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd)

EI-MS m/z (%) = 303 (38) $[M]^+$, 274 (12) $[M-C_2H_5]^+$, 260 (17) $[M-C_3H_7]^+$, 234 (100) $[M-C_5H_9]^+$, 220 (69), 192 (25), 164 (21), 71 (13), 55 (17), 43 (38).

IR (KBr): $\bar{\nu}$ = 3398, 2961, 2931, 2871, 1636, 1458, 1381, 1219, 1165, cm^{-1} .

UV (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 291 (7065), 206 (32120) nm.

(MeOH/HCl): λ_{max} (ϵ) = 273 (7710), 204 (37495) nm.

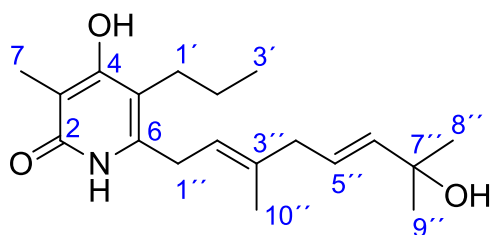
(MeOH/NaOH): λ_{max} (ϵ) = 278 (7050), 204 (24980) nm.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ = 0.97 (t, J = 7.5 Hz, 3H, 3'-H₃), 0.98 (d, J = 7.0 Hz, 6H, 8''-H₃, 9''-H₃), 1.50 (tq, J = 8.0 Hz, 7.5 Hz, 2H, 2'-H₂), 1.73 (s, 3H, 10''-H₃), 1.98 (s, 3H, 7-H₃), 2.26 (dq, J = 7.0 Hz, 7.0 Hz, 7.0 Hz, 1H, 7''-H), 2.43 (t, J = 8.0 Hz, 2H, 1'-H₂), 2.70 (d, J = 6.5 Hz, 2H, 4''-H₂), 3.32 (d, J = 7.5 Hz, 2H, 1''-H₂), 5.17 (dt, J = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1H, 2''-H), 5.32 (ddd, J = 15.0 Hz, 6.5 Hz, 1.0 Hz, 1H, 5''-H), 5.42 (ddt, J = 15.0 Hz, 7.0 Hz, 1.0 Hz, 1H, 6''-H) ppm.

Das Signal der CH₂-Gruppe 1''-H₂ liegt unter dem Methanol-Signal.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CD_3OD): δ = 8.7 (C-7), 14.5 (C-3'), 16.5 (C-10''), 23.0 (C-8'', C-9''), 24.1 (C-2'), 28.0 (C-1'), 30.4 (C-1''), 32.3 (C-7''), 43.7 (C-4''), 106.0 (C-3), 113.7 (C-5), 121.0 (C-2''), 125.7 (C-5''), 138.8 (C-3''), 140.8 (C-6''), 143.0 (C-6), 165.9 (C-2), 166.1 (C-4) ppm.

Iromycin B (56)



$\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_3$ (319.45)

R_f -Wert: 0.39 (Chloroform/Methanol 9:1); 0.46 (Methanol/Wasser 8:2)

Anfärbeverhalten: blau (Anisaldehyd)

EI-MS m/z (%) = 319 (4) $[M]^+$, 317 (5) $[M-2H]^+$, 304 (15) $[M-CH_3]^+$, 301 (11) $[M-H_2O]^+$, 274 (37), 220 (88), 164 (12), 129 (14), 43 (100).

IR (KBr): $\bar{\nu}$ = 3366, 2964, 2930, 2871, 1630, 1430, 13761, 1220, 1156, cm^{-1} .

UV (MeOH): λ_{max} (ϵ): 290 (9540), 207 (41595) nm.

(MeOH/HCl): λ_{max} (ϵ): 273 (11020), 204 (52870) nm.

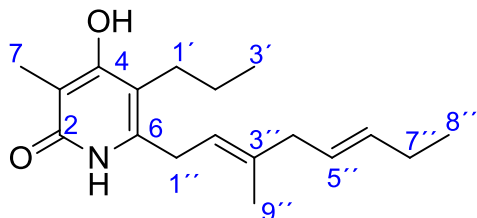
(MeOH/NaOH): λ_{max} (ϵ): 278 (8315), 220 (38890) nm.

1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): δ = 0.94 (t, J = 7.5 Hz, 3H, 3'-H₃), 1.24 (s, 6H, 8''-H₃, 9''-H₃), 1.47 (tq, J = 8.0 Hz, 7.0 Hz, 2H, 2'-H₂), 1.73 (d, J = 1.0 Hz, 3H, 10''-H₃), 1.95 (s, 3H, 7-H₃), 2.41 (t, J = 8.0 Hz, 2H, 1'-H₂), 2.72 (d, J = 6.5 Hz, 2H, 4''-H₂), 5.18 (dt, J = 7.0 Hz, 1.0 Hz, 1H, 2''-H), 5.57 (td, J = 15.5 Hz, 6.0 Hz, 1H, 5''-H), 5.62 (d, J = 15.5 Hz, 1H, 6''-H) ppm.

Das Signal der CH₂-Gruppe 1''-H₂ liegt unter dem Methanol-Signal.

^{13}C -NMR (125.7 MHz, CD_3OD): δ = 8.7 (C-7), 14.5 (C-3'), 16.6 (C-10''), 24.1 (C-2'), 27.9 (C-1'), 29.9 (C-8'', C-9''), 30.4 (C-1''), 43.3 (C-4''), 71.1 (C-7''), 106.0 (C-3), 113.7 (C-5), 121.3 (C-2''), 125.3 (C-5''), 138.5 (C-3''), 141.2 (C-6''), 142.9 (C-6), 165.9 (C-2), 166.0 (C-4) ppm.

Iromycin C (59)



C₁₈H₂₇NO₂ (289.42)

R_F-Wert: 0.67 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2); 0.05 (Methanol/Wasser 7:3);

0.28 (Aceton/Wasser 3:1)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd)

ESI-MS: (positive Ionen): $m/z = 290 [M+H]^+$, $312 [M+Na]^+$, $601 [2M+Na]^+$.

(negative Ionen): $m/z = 288 [M-H]^-$, $334 [M+HCOO]^-$.

HR-ESI-MS: berechnet $m/z = 290.21146$.

gefunden $m/z = 290.21149$ (Abweichung 0.1 ppm).

IR : $\bar{\nu} = 3420, 2962, 2932, 2872, 1717, 1636, 1458, 1380, 1220, 1167, 1115, 1054, 970 \text{ cm}^{-1}$.

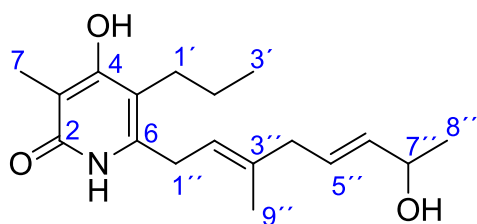
UV : (MeOH) $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 293 (1988), 207 (8432) \text{ nm}$.

(MeOH + NaOH) $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 278 (2213), 221 (8394) \text{ nm}$.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.94$ (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 3 H, 3'-H₃), 0.96 (t, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 3 H, 8''-H₃), 1.47 (tq, $J = 8.0 \text{ Hz}, 7.5 \text{ Hz}$, 2 H, 2'-H₂), 1.70 (s, 3 H, 9''-H₃), 1.95 (s, 3 H, 7-H₃), 2.01 (ddq, $J = 7.5 \text{ Hz}, 7.5 \text{ Hz}, 1.0 \text{ Hz}$, 2 H, 7''-H₂), 2.40 (t, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 2 H, 1'-H₂), 2.67 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 2 H, 4''-H₂), 3.26 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 2 H, 1''-H₂), 5.15 (dt, $J = 7.0 \text{ Hz}, 1.0 \text{ Hz}$, 1 H, 2''-H), 5.37 (dtt, $J = 15.5 \text{ Hz}, 7.0 \text{ Hz}, 1.0 \text{ Hz}$, 1 H, 5''-H), 5.50 (dtt, $J = 15.5 \text{ Hz}, 7.5 \text{ Hz}, 1.0 \text{ Hz}$, 1 H, 6''-H) ppm.

¹³C-NMR (150.6 MHz, CD₃OD): $\delta = 8.7$ (C-7), 14.3 (C-3'), 14.5 (C-8''), 16.5 (C-9''), 24.1 (C-2'), 26.6 (C-7''), 28.0 (C-1'), 30.4 (C-1''), 43.7 (C-4''), 106.0 (C-3), 113.8 (C-5), 121.0 (C-2''), 127.7 (C-5''), 135.2 (C-6''), 140.4 (C-6), 140.5 (C-3''), 165.9 (C-2), 166.8 (C-4) ppm.

Iromycin D (60)



C₁₈H₂₇NO₃ (305.21)

R_f-Wert: 0.01 (Chloroform/Methanol 9:1); 0.36 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2); 0.23 (Methanol/Wasser 7:3)

Anfärbeverhalten: blau (Anisaldehyd)

ESI-MS: (positive Ionen): $m/z = 288 [M+H-H_2O]^+$, $306 [M+H]^+$, $633 [2M+Na]^+$.

HR-ESI-MS: berechnet $m/z = 306.206308$.

gefunden $m/z = 306.206370$ (Abweichung 0.2 ppm).

$[\alpha]_D^{20} = -150^\circ$ ($c = 1.0$, Methanol).

IR: $\bar{\nu} = 3421, 2962, 2929, 2871, 1700, 1635, 1436, 1376, 1220, 1167, 1114, 1056, 971 \text{ cm}^{-1}$.

UV: (MeOH) $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 289 (911), 206 (3771) \text{ nm}$.

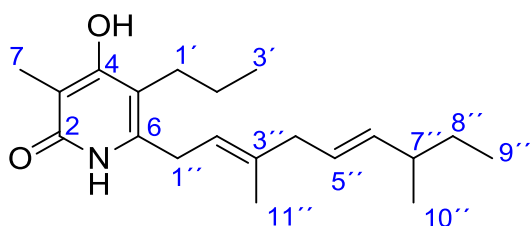
(MeOH + HCl) $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 275 (1094), 204 (4513) \text{ nm}$.

(MeOH + NaOH) $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 278 (943), 220 (3561) \text{ nm}$.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.94$ (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3 H, 3'-H₃), 1.19 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 3 H, 8''-H₃), 1.48 (tq, $J = 8.0 \text{ Hz}, 7.0 \text{ Hz}$, 2 H, 2'-H₂), 1.73 (s, 3 H, 10''-H₃), 1.95 (s, 3 H, 7-H₃), 2.41 (dt, $J = 8.0 \text{ Hz}, 2.0 \text{ Hz}$, 2 H, 1'-H₂), 2.73 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 2 H, 4''-H₂), 4.18 (dq, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 1 H, 7''-H), 5.18 (dt, $J = 7.0 \text{ Hz}, 1.0 \text{ Hz}$, 1 H, 2''-H), 5.55 (ddt, $J = 15.0 \text{ Hz}, 6.5 \text{ Hz}, 1 \text{ Hz}, 5''-H$), 5.58 (ddd, $J = 15.0 \text{ Hz}, 6.5 \text{ Hz}, 1.0 \text{ Hz}$, 1 H, 6''-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CD_3OD): $\delta = 8.7$ (C-7), 14.5 (C-3'), 16.6 (C-9''), 23.7 (C-8''), 24.1 (C-2'), 27.9 (C-1'), 30.3 (C-1''), 43.2 (C-4''), 69.1 (C-7''), 106.0 (C-3), 113.8 (C-5), 121.4 (C-2''), 128.4 (C-6''), 137.5 (C-5''), 138.3 (C-3''), 142.8 (C-6), 165.9 (C-2), 166.4 (C-4) ppm.

Iromycin G (77)



$\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{NO}_2$ (317.24)

R_f -Wert: 0.48 (Methanol/Wasser 12:1); 0.22 (Aceton/Wasser 3:1);

0.19 (Aceton/Wasser 2:1 mit je 0.05 % Ameisensäure)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd)

ESI-MS: (positive Ionen): $m/z = 318$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 340 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

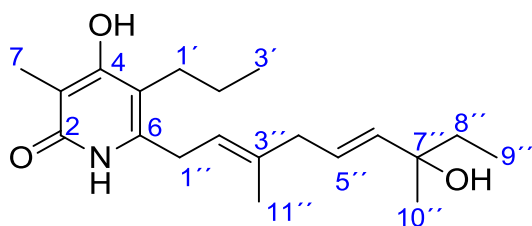
HR-ESI-MS: berechnet $m/z = 317.2355$.

gefunden $m/z = 317.2315$ (Abweichung 0.999 ppm).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.84$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, 9''-H₃), 0.94 (dd, $J = 6.8$ Hz, 6H, 3'-H₃, 10''-H₃), 1.22-1.34 (m, 2H, 8''-H₂), 1.47 (m, 2H, 2'-H₂), 1.71 (s, 3H, 11''-H₃), 1.95 (s, 3H, 7-H₃), 1.99 (m, 1H, 7''-H), 2.41 (m, 2H, 1'-H₂), 2.69 (m, $J = 6.0$ Hz, 2H, 4''-H₂), 3.31 (m, 2H, 1''-H₂), 5.16 (tq, $J = 1.0$ Hz, 7.0 Hz, 1H, 2''-H), 5.27-5.36 (m, 2H, 5''-H, 6''-H) ppm.

¹³C-NMR (150.6 MHz, CD₃OD): δ = 8.8 (C-7), 12.3 (C-9''), 14.6 (C-10''), 16.6 (C-11''), 21.0 (C-3'), 24.1 (C-2'), 28.0 (C-1'), 30.5 (C-1''), 30.9 (C-8''), 39.9 (C-7''), 43.7 (C-4''), 105.9 (C-3), 113.6 (C-5), 120.9 (C-2''), 127.1 (C-5''), 138.7 (C-3''), 139.4 (C-6''), 142.8 (C-6), 165.8 (C-2), 165.9 (C-4) ppm.

Iromycin H (78)



C₂₀H₃₁NO₃ (333.47)

R_f-Wert: 0.36 (Methanol/Wasser 8:2); 0.67 (Methanol/Wasser 12:1);

0.57 (Methanol/Wasser 9:1)

Anfärbeverhalten: blau (Anisaldehyd)

ESI-MS: (positive Ionen): m/z = 334.3 [M+H]⁺, 356.2 [M+Na]⁺, 689.5 [2M+Na]⁺

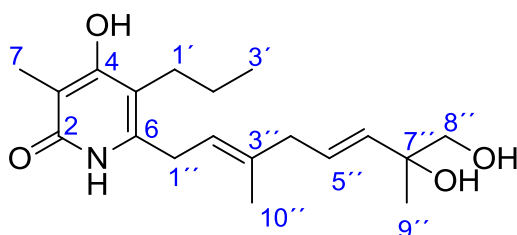
HR-ESI-MS: berechnet m/z = 333.2304.

gefunden m/z = 333.2265 (Abweichung 0.8 ppm).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 0.82 (t, J = 7.0 Hz, 3H, 9''-H₃), 0.94 (m, 3H, 3'-H₃), 1.20 (s, 3H, 10''-H₃), 1.22-1.37 (m, 2H, 8''-H₂), 1.42-1.57 (m, 2H, 2'-H₂), 1.75 (s, 3H, 11''-H₃), 1.95 (s, 3H, 7-H₃), 2.41 (m, 2H, 1'-H₂), 2.74 (d, J = 6.0 Hz, 2H, 4''-H₂), 3.31 (m, 2H, 1''-H₂), 5.19 (tq, J = 7.0, 1.0 Hz 1H, 2''-H), 5.46-5.61 (m, 2H, 5''-H, 6''-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.6 MHz, CD_3OD): δ = 8.8 (C-7), 8.9 (C-9''), 14.6 (C-3'), 16.7 (C-11''), 24.2 (C-2'), 27.4 (C-10''), 28.0 (C-1'), 30.4 (C-1''), 36.2 (C-8''), 43.4 (C-4''), 73.6 (C-7''), 105.8 (C-3), 114.2 (C-5), 121.3 (C-2''), 126.2 (C-6''), 138.5 (C-3''), 139.8 (C-5''), 142.3 (C-6), 165.6 (C-2), 167.6 (C-4) ppm.

Iromycin I (79)



$\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_4$ (335.44)

Anfärbeverhalten: blau (Anisaldehyd)

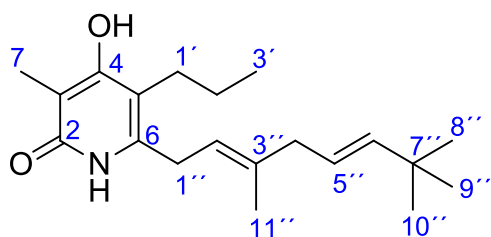
ESI-MS: (positive Ionen): m/z = 336.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

ESI-MS: (negative Ionen): m/z = 334.3 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ = 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 3H, 3'-H₃), 1.24 (s, 3H, 9''-H₃), 1.50 (m, 2H, 2'-H₂), 1.75 (s, 3H, 10''-H₃), 1.98 (s, 3H, 7-H₃), 2.44 (m, 2H, 1'-H₂), 2.78 (d, J = 7.3 Hz, 2H, 4''-H₂), 3.31 (m, 2H, 1''-H₂), 3.38 (dd, J = 10.9 Hz, 10.9 Hz, 2H, 8''-H₂), 5.22 (tq, J = 6.9 Hz, 1H, 2''-H), 5.61 (dt, J = 15.7 Hz, 1H, 6''-H), 5.70 (td, J = 15.7 Hz, 6.9 Hz, 1H, 5''-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.6 MHz, CD_3OD): δ = 8.7 (C-7), 14.5 (C-3'), 16.6 (C-10''), 24.1 (C-2'), 24.5 (C-9''), 27.9 (C-1'), 30.3 (C-1''), 43.4 (C-4''), 70.8 (C-8''), 73.9 (C-7''), 106.0 (C-3), 113.7 (C-5), 121.3 (C-2''), 127.8 (C-5''), 137.6 (C-6''), 138.6 (C-3''), 142.8 (C-6), 165.9 (C-4), 166.1 (C-2) ppm.

Iromycin S (76)



$C_{20}H_{31}NO_2$ (317.24)

***R_f*-Wert:** 0.23 (Aceton/Wasser 3:1)

Anfärbeverhalten: rötlich (Anisaldehyd)

1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): δ = 0.97 (t, J = 7.5 Hz, 3H, 3'-H₃), 0.98 (d, J = 7.0 Hz, 9H, 8''-H₃, 9''-H₃, 10''-H₃), 1.50 (tq, J = 8.0 Hz, 7.5 Hz, 2H, 2'-H₂), 1.73 (s, 3H, 11''-H₃), 1.98 (s, 3H, 7-H₃), 2.43 (t, J = 8.0 Hz, 2H, 1'-H₂), 2.70 (d, J = 6.5 Hz, 2H, 4''-H₂), 3.32 (d, J = 7.5 Hz, 2H, 1''-H₂), 5.17 (dt, J = 7.5 Hz, 1.5 Hz, 1H, 2''-H), 5.32 (ddd, J = 15.0 Hz, 6.5 Hz, 1.0 Hz, 1H, 5''-H), 5.42 (ddt, J = 15.0 Hz, 7.0 Hz, 1.0 Hz, 1H, 6''-H) ppm.

Das Signal der CH₂-Gruppe 1''-H₂ liegt unter dem Methanol-Signal.

3 Identifizierung des Genproduktes der min PKS II von 56 und 16

3.1 Mikrobiologische Arbeiten

3.1.1 Stammhaltung und Kultivierung

Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf Agarplatten. Hierfür wurde der Stamm *Streptomyces albus* mittels einer Platinimpföse auf SM-Medium (Soja-Mannit) versetzt mit Apra⁵⁰ (50 µg/mL) ausgestrichen und bis zur Ausbildung einer geschlossenen, hellgrauen

Sporenschicht für 7 Tage bei 28 °C und Dunkelheit inkubiert. Bewachsene Agarplatten wurden mit Parafilm® M (Fa. Pechiney; Brand) verschlossen und sind bei 4 °C Lagertemperatur für mindestens vier Monate haltbar. Es wurde die Insertionsmutante (minimal pKS mit Cyclasen; kurz: mPc) und die Negativkontrolle (pSETermE*p [gleicher Vektor, aber ohne Insert]) jeweils ausgestrichen und kultiviert. Bei der Insertionsmutante verfärbte sich die Agarplatte erst rötlich und anschließend schwarz, bei der Negativkontrolle war die Farbe der Agarplatte hellbraun.

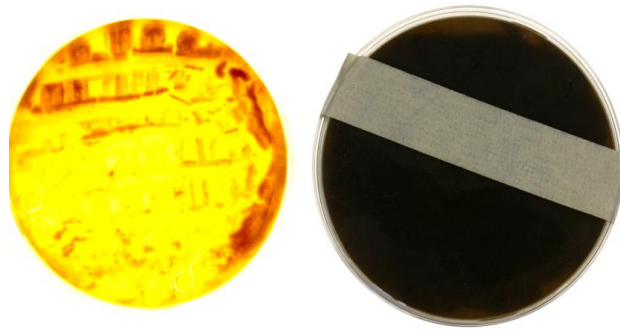


Abbildung 3-1: links: Agarplatte des Leervektors; rechts: Agarplatte der Insertionsmutante. Kontrastierung wurde bearbeitet.

3.1.2 Vorarbeiten zu den Kultivierungen

Dr. A. TEXTOR hatte während ihrer Promotionszeit Kultivierungsversuche auf fester Oberfläche (Agar) unternommen. Kultiviert werden sollten *Streptomyces albus*-mPc und *Streptomyces albus* pSETermE*p, beschrieben in Kapitel B 3.1.1, um mögliche neue Sekundärmetabolite zu identifizieren. Dazu wurden bewachsene Agarplatten vom AK WEBER aus Tübingen mit Apra⁵⁰ versetzt verwendet.

Kultivierungsbedingungen:

Variante 1: Flüssigkultur mit Medium S für die Hauptkultur

Als Vorkultur wurden 1 L Erlenmeyerkolben (EMK) mit 100 mL S-Medium (Medienzusammensetzung s. [35]; Verwendung von Fleischpepton statt Caseinpepton)

verwendet. Die Kultivierung dauerte 3 Tage bei 28 °C und 180 rpm. Desweiteren wurde Apra⁵⁰ hinzugegeben. Die Hauptkultur wurde 5 Tage bei 30 °C und 180 rpm in 1 L EMK mit je 100 mL Medium S kultiviert. Es erfolgte hier bei der Hauptkultur keine weitere Zugabe von Apra⁵⁰. Angeimpft wurde je 100 mL Medium mit 5 mL der oben beschriebenen Vorkultur.

Variante 2: Flüssigkultur mit Medium R2YE für die Hauptkultur

Die Vorkultur wurde in 1 L EMK mit 100 mL S-Medium (Medienzusammensetzung s. [35]) angesetzt. Die Kultivierungsdauer betrug 3 Tage bei 28 °C und 180 rpm. Es wurde Apra⁵⁰ hinzugegeben. Als Medium für die Hauptkultur wurde das Medium R2YE verwendet.

Variante 3: Plattenkultivierung

Die Kultivierung wurde analog zu Kapitel B 3.1.1 auf Agarplatten durchgeführt. Bei dieser Kultivierung konnte nach Aufarbeitung (Kapitel B 3.2, Schema 3-1) zum ersten Mal ein Unterschied bei der DC-Analytik zwischen dem *Streptomyces albus* – mPc und dem *S. albus* pSETermE*p identifiziert werden (Abbildung 8-1). Bei Untersuchungen konnten in dem Extrakt der Insertionsmutante *S. albus*-mPc (min PKS II (*llpD*, E, F) mit Cyclasen (*llpCI*–*CIII*)) rot-violette Substanzen mittels DC beobachtet werden (Kapitel A 8.2).

3.1.3 In dieser Arbeit durchgeführte Kultivierungsoptimierungen

3.1.3.1 Festphasen-Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte zunächst nur auf Agarplatten und wurde unter Bedingungen aus Kapitel B 3.1.2 Variante 3 kultiviert. Hierbei wurden jeweils ein Ansatz von 2 bzw. 10 L gewählt.

In dem SM-Medium sind oft Flavonoide wie das Genistein und das Daidzein vorhanden. Um diese Produktion zu verringern oder vollständig zu unterbinden und um die Produktion der Zielsubstanz zu erhöhen, wurden im Folgenden Medienoptimierungen durchgeführt.

Variante 1:

Es wurde als Medium das SG-Medium (Soja-Glucose) gewählt. Das Volumen betrug 1 L.

Variante 2:

Es wurde als Medium das SMM-Medium (Soja-Mannit-Malonsäure) gewählt. Die Malonsäure wurde vor dem Autoklavieren zu dem Medium hinzugegeben, so dass eine Endkonzentration von 15 mM erhalten wurde. Das Volumen betrug 1 L.

Variante 3:

Es wurde als Medium das SMN-Medium (Soja-Mannit-Natriumacetat) gewählt. Das Natriumacetat wurde vor dem Autoklavieren zu dem Medium hinzugegeben, so dass eine Endkonzentration von 15 mM erhalten wurde. Das Volumen betrug 1 L.

3.1.3.2 Medienoptimierung für eine Kultivierung in Flüssigkeit

Die ersten Kultivierungsversuche wurden in 300 mL Erlenmeyerkolben (EMK) mit drei Bodenschikanen und Schaumstoffkappen durchgeführt. Es wurde ohne Vorkultur und in verschiedenen Medien gearbeitet, um eine Produktion der Zielsubstanz in Flüssigkulturen zu erreichen. Es wurden jeweils Medien mit einem Volumen von 400 mL pro Ansatz angesetzt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf 55-60 °C abgekühlt, mit Apra⁵⁰ versehen und angeimpft. Als Animpfmaterial diente

jeweils 1 cm² (ca. 1/8) einer gut bewachsenen Agarplatte. Die Inkubationsdauer betrug 4 Tage bei 28 °C und 180 rpm. Auf eine Kontrollfermentation mit dem Leervektor wurde verzichtet. Das wasserfreie Natriumacetat wurde so eingewogen, dass eine Endkonzentration von 15 mM vorlag. Die Zugabe erfolgte vor dem Autoklavieren. Folgende Medien wurden verwendet: M2, M2⁺, G20, M65, Hafermehl, SGG und NL 1358. Von jedem Medium wurde ein Ansatz mit und ein Ansatz ohne Natriumacetat durchgeführt.

3.1.3.3 Kultivierung in Flüssigkeit

Variante 1: Kultivierung ohne Vorkultur

Die Flüssigkultivierung erfolgte sowohl in 300 mL Erlenmeyerkolben (EMK) mit Schikane als auch in 1 L EMK mit drei Schikanen. Zur Kultivierung wurde das Medium M65 als ein sehr gutes Produktionsmedium bestimmt. Bei den vorangegangenen Medienoptimierungen wurden Kultivierungen mit und ohne Zugabe von Natriumacetat durchgeführt. Nach dem Autoklavieren wurde unter den gängigen sterilen Bedingungen das Nährmedium erst auf ca. 55-60 °C abgekühlt, mit einer Apra⁵⁰-Stammlösung versehen und im Anschluss mit ca. 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte des Stammes *Streptomyces albus*-mPc angeimpft und bei 28 °C, Dunkelheit und 180 rpm für 4 Tage ohne Vorkultur inkubiert. Hierbei wurde nur die Insertionsmutante verwendet. Auf eine Kontrollfermentation mit dem Leervektor wurde verzichtet.

Variante 2: Kultivierung mit Vorkultur und Zugabe von XAD-16-Zugabe

Für die Vorkultur wurden 250 bzw. 300 mL EMK mit Schikane verwendet, die mit 100 mL G20-Medium befüllt waren. Das Medium wurde autoklaviert und anschließend auf ca. 55-60 °C abgekühlt. Es wurde Apra⁵⁰ ins Medium gegeben und mit ca. 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte des Stammes *Streptomyces albus*-mPc angeimpft.

Inkubiert wurde für 48 h bei 28 °C und 180 rpm. 15 mL (5 % v/v) dieser Vorkultur wurden zum Inokulieren der Hauptkultur verwendet. Als Medium für die Hauptkultur wurde M65 verwendet. Das Medium wurde autoklaviert, auf 55-60 °C abgekühlt und mit Apra⁵⁰-Stammlösung versehen (1 mL Apra⁵⁰ auf 1 L Medium). Die Kultivierung der Hauptkultur erfolgte in 1 L EMK mit 3 Bodenschikanen, die mit je 300 mL Medium befüllt waren. Nach 24 h erfolgte eine Zugabe von autoklaviertem XAD-16 (15 g pro 300 mL Medium). Die Kultivierung der Hauptkultur wurde für 6 Tage durchgeführt.

Variante 3: Kultivierung mit Vorkultur; Hauptkultur im Fermenter mit XAD-16-Zugabe

Verwendet wurden 250 bzw. 300 mL EMK mit Schikane, die mit 100 mL G20-Medium befüllt waren. Das Medium wurde autoklaviert und anschließend auf ca. 55-60 °C abgekühlt. Im Anschluss wurde Apra⁵⁰ ins Medium gegeben und mit ca. 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte des Stammes *Streptomyces albus*-mPc angeimpft. Inkubiert wurde für 48 h bei 28 °C und 180 rpm. Kultivierung der Hauptkultur fand in einem Fermenter mit einem Volumen von 4 L Medium M65 statt. Bestandteil dieser 4 L sind 400 mL einer 48 h alten Vorkultur (10 % v/v). Erst wurde das Animpfmateriale in den Fermenter gegeben und anschließend Apra⁵⁰ hinzugefügt. Inkubiert wurde für eine Kultivierungsdauer von 96 h, bei 28 °C, 300-350 rpm und einer Luftzufuhr von 4 vvm (ca. 2 L/min). Nach der 24. Stunde wurde autoklaviertes XAD-16 (15 g pro 300 mL) zu der Kulturbrühe hinzugegeben.

3.1.3.4 Fermentationskurve von *Streptomyces albus*-mPc

Es fand eine Kultivierung wie in Kapitel B 3.1.3.3 Variation II beschrieben statt. Ab der 8. Stunde der Fermentation und dann im Abstand von 6 h wurde jeweils eine Probe entnommen (20 mL). Durch Zentrifugieren (10 Minuten, 9000 rpm) wurden die festen Bestandteile von der Flüssigkeit separiert und abdekantiert. Der Überstand wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, im Vakuum das Lösungsmittel eingeeengt und ausgewogen. Der Rückstand wurde einmal mit Aceton/Methanol im Verhältnis 7:3 im

Ultraschallbad für ca. 20 Minuten extrahiert, filtriert, im Vakuum das Lösungsmittel eingengt und ausgewogen. Die Extrakte wurden an der HPLC vermessen.

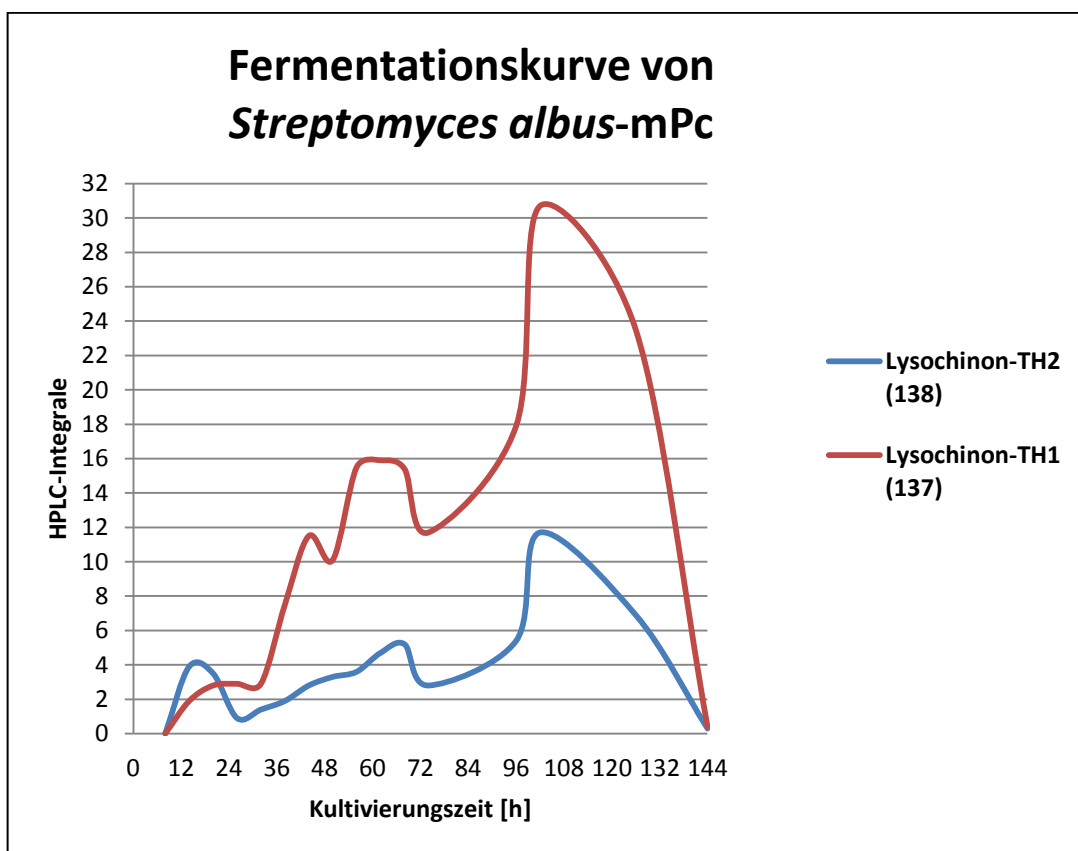


Diagramm 3-1: Fermentationskurve vom *Streptomyces albus*-mPc. Vergleich der HPLC-Integrale von dem rosa-roten Lysochinon-TH1 (137) und dem postuliertem lila-farbenen Lysochinon-TH2 (138).

3.1.4 Fütterungsexperimente von [1,2-¹³C₂]Acetat

Biosynthesestudien wurden durchgeführt, um die Biogenese der neuen Metabolite zu untersuchen und aufzuklären. Die Kultivierung erfolgte nach Kapitel B 3.1.3.3 Variation II. Um die Biogenese der neuen Verbindung aufzuklären, wurde eine Fütterung von [1,2-¹³C₂]Acetat (Endkonzentration: 5.95 mM; Einwaage: 2.0 g; gelöst in 26 mL sterilem Wasser) durchgeführt. Der pH-Wert der Fütterungslösung wurde auf 7.0–8.0 mit 0.5 M NaOH bzw HCl eingestellt und anschließend steril filtriert. Parallel fanden zwei Kontrollfermentationen in Schüttelkolben statt, um die Produktion zu überprüfen. Zum einen wurde *Streptomyces albus*-mPc ohne Zusätze fermentiert und zum anderen mit nicht markiertem Natriumacetat (2 × 292 mg gelöst in je 10 mL

sterilem Wasser; Endkonzentration: 5.95 mM) angezogen. Der pH-Wert der nichtmarkierten Fütterungslösung wurde wie oben beschrieben eingestellt. Mit 10 mL der nichtmarkierten Fütterungslösung wurde bei vier Kolben zugefüttert. Fütterungsbeginn war 32 h nach Inokulation. Im Fermenter wurde das [1,2-¹³C₂]Acetat mittels einer Schlauchdosierpumpe über einen Zeitraum von 20 h zugefüttert. Bei den Schüttelkolben wurde zur 32. Stunde und 24 h später mittels einer sterilen Spritze zugefüttert. Sowohl im Fermenter als auch in den Schüttelkolben wurde eine Endkonzentration von 5.95 mM (2.0 g/4 L) eingestellt.

3.1.4.1 Berechnung der ¹³C-Anreicherung mittels NMR-Spektroskopie nach Scott^[238]

[1,2-¹³C₂]Natriumacetat (99 % angereichert) wurde von der Fa. *Cambridge Isotope Laboratories, Inc.* bezogen.

Die ¹³C-Anreicherung im zu untersuchenden Molekül wurde berechnet unter Berücksichtigung der Anreicherung der markierten Vorläufer und der natürlichen Häufigkeit von ¹³C-Kohlenstoffkernen. Ein Einbau wird als erfolgreich betrachtet, wenn sich die Signalintensität eines Kohlenstoffatoms verdoppelt und somit der spezifische Einbau größer eins ist.

Für die Berechnung der Anreicherung [%] und des spezifischen Einbaus gilt:

$$\text{Anreicherung [\%]} = 1.1\% \times \frac{\text{Integrierte Signal-Intensität der markierten Verbindung}}{\text{Integrierte Signal-Intensität der Referenz}} - 1.1\%$$

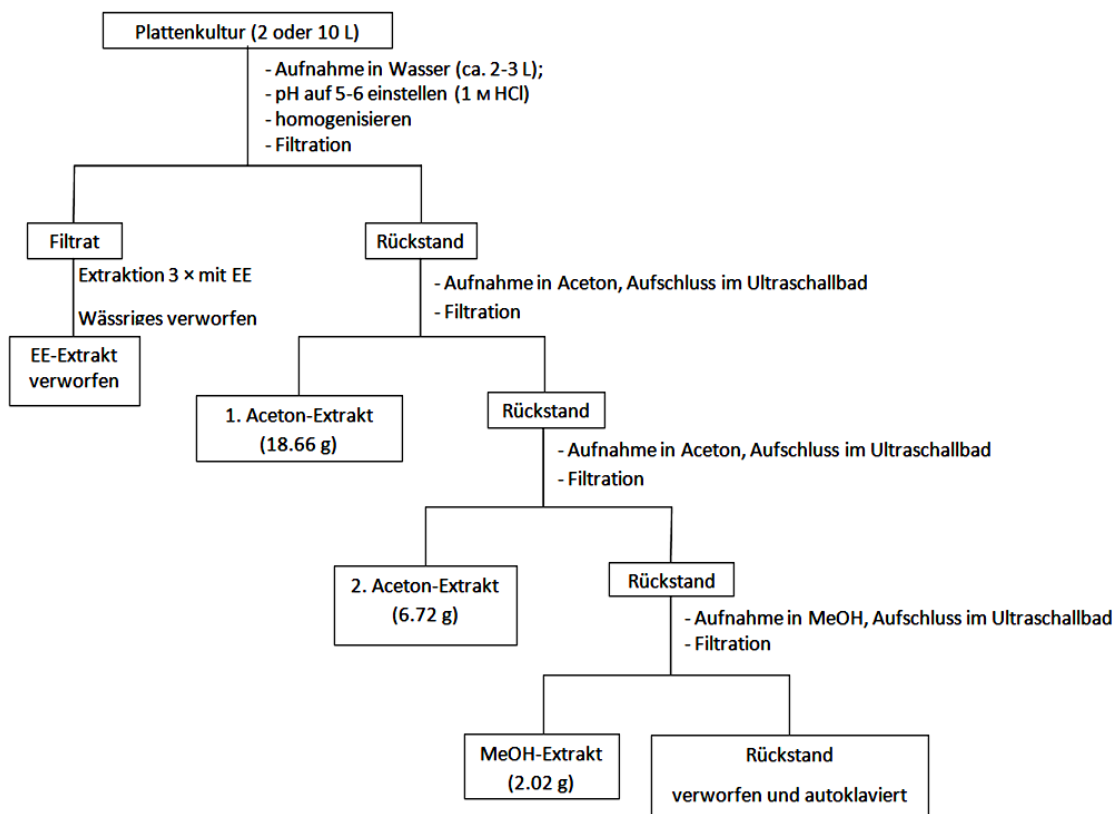
$$\text{Spezifischer Einbau} = \frac{\text{Anreicherung [\%]} \times 100}{\text{Anreicherung des zugefütterten Isotops [\%]}}$$

Die Ergebnisse sind in Kapitel A 8.5.3 (Tabelle 8-6) aufgeführt.

3.2 Aufarbeitung

Aufarbeitung der Festphasenkultivierung

Die Aufarbeitung der Festphasen-Kultivierungen wurde von Dr. ADRIANA TEXTOR nach ihrer Vorgehensweise durchgeführt. Die inokulierten Agarplatten wurden in einen Eimer (PP) gegeben, mit Wasser versetzt (ca. 2–3 L), mit einem Pürierstab homogenisiert, auf einen pH-Wert von 4.0-5.0 mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH eingestellt und über Celite filtriert. Es wurde Ethylacetat (EE) hinzugefügt und dreimal mit EE extrahiert. Der EE-Extrakt wurde verworfen. Das Mycel wurde mit Aceton versetzt und 30 Minuten im Ultraschallbad aufgeschlossen, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, so dass ein Aceton-Extrakt erhalten wurde (Aceton1, 18.66 g). Dieser Schritt wurde wiederholt (Extrakt Aceton 2, 6.72 g). Danach wurde der Rückstand in Methanol aufgenommen und 30 Minuten im Ultraschallbad aufgeschlossen, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, so dass ein Methanol-Extrakt extrakt erhalten wurde (Methanol1, 2.02 g). Im Falle des 10 L Ansatzes wurde dieser Schritt wiederholt (Extrakt Methanol2, 11.89 g). Die einzelnen Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch untersucht (Schema 3-1).

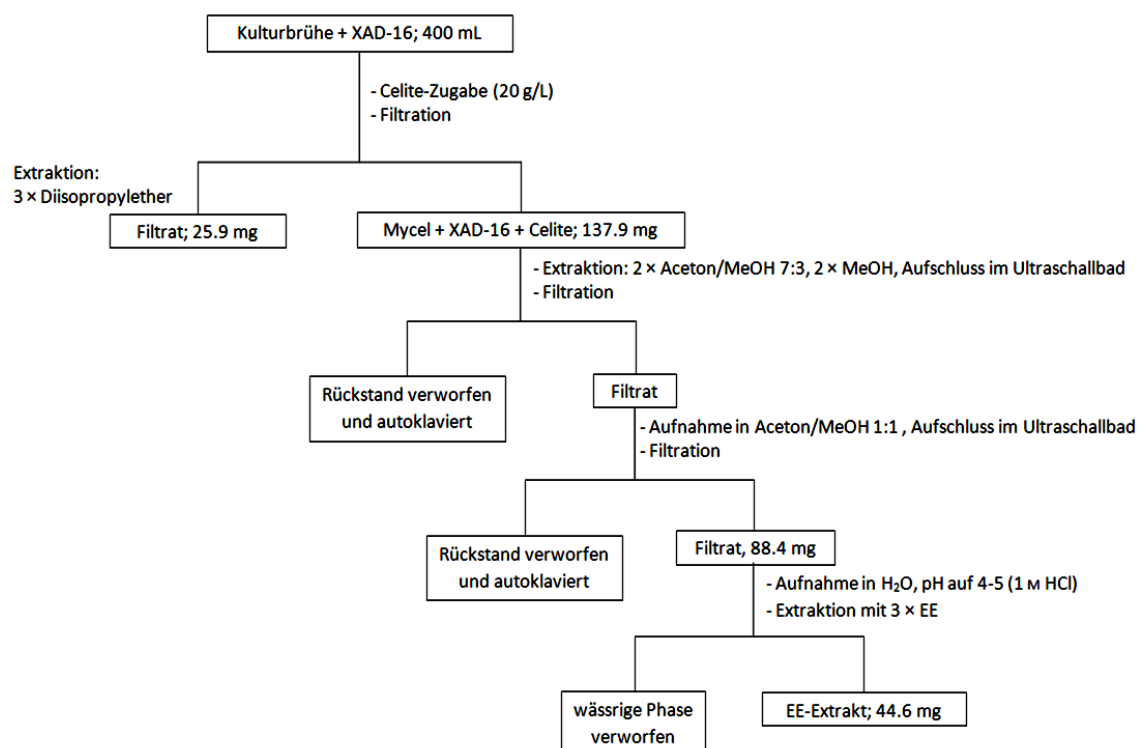


Schema 3-1: Erste Schritte der Aufarbeitung einer Festphasenkultivierung.

Aufarbeitung der Flüssigkulturen (mit und ohne XAD-16)

Zum Zeitpunkt der Ernte war das Medium (400 mL) dunkelbraun und hatte in der Regel einen pH-Wert von 6.0-7.0. Es wurde über Celite filtriert, um die Zellen von der Kulturbrühe zu trennen. Das Filtrat wurde mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von ca. 4.0-5.0 eingestellt und dreimal mit Diisopropylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum vom Lösungsmittel befreit (25.9 mg). Das Mycel (137.9 mg) wurde im Ultraschallbad mit Aceton/Methanol (7:3) aufgeschlossen, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Aceton/Methanol (1:1) aufgenommen, erneut filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Extrakt ausgewogen (88.4 mg). Das Filtrat wurde in Wasser aufgenommen und mit 1 M HCl ein pH-Wert von 4.5-5.0 eingestellt. Es folgte eine Extraktion mit Ethylacetat. Die organischen Phasen wurden vereinigt und der wässrige

Überstand verworfen (44.6 mg). Die Mycel- und Filtratextrakte wurden mit einer Referenz auf einem Kieselgel-DC (Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol (CEM) 6:8:1 + 1 % TFA) entwickelt. Das Filtrat wurde verworfen. Die Aufarbeitung mit XAD-16 Zusatz erfolgte analog (Schema 3-2).



Schema 3-2: Erster Schritt der Aufarbeitung einer Flüssigkultur.

3.2.1 Chemische Analytik: DC und Säulenchromatographie

Untersucht wurden farbige Pigmentfraktionen bzw. -extrakte aus *S. albus*-mPc hinsichtlich des produzierten Lysochinon-TH1 (**137**) und Lysochinon-TH2 (**138**). Es konnte eine sehr schlechte Trennung mit starker Bandenverbreiterung und Immobilisierung (die roten Farbstoffe blieben auf der Säule) am Säulenmaterial beobachtet werden. Daher wurden umfangreiche Optimierungen durchgeführt, mit dem Ziel einer guten Trennung für eine präparative Isolierung.

3.2.1.1 Dünnschichtchromatographie

Optimierungsschritte fanden an Kieselgel, RP-Kieselgel und auch an Nano-Sil-Diol-Material statt. Die Tabellen zeigen die ausgewählten Materialien und Lösungsmittelgemische.

Tabelle 3-1: Optimierung der Trennung von Pigmentfraktionen und Extrakten aus *S. albus*-mPc (Kapitel B 3.2) an RP-Material. In Klammern: Mischungsverhältnis, jeweils mit oder ohne Additive (v/v).

Laufmittel	verwendete Additive
Methanol/Wasser (6:4; 7:3; 8:2; 9:1; 1:1)	Ameisensäure (0.05 %, 0.5 %, 1 %); Triethylamin (0.05 %, 0.5 %)
Aceton/Wasser (7:3, 1:1; 6:1; 1:6; 1:3, 1:2)	Trifluoressigsäure (0.05 %); Triethylamin (0.05 %)
Acetonitril/Wasser (6:4)	Ameisensäure (0.05 %); Triethylamin (0.05 %)
Direkt auf DC aufgebrachte Additive^a	
Natriumhydroxid (0.1 M, 0.01 M)	
Salzsäure (1 M)	
Konzentrierte Schwefelsäure	
FeCl ₃ -Lösung	

^aZuerst Pigmentfraktionen oder Extrakten aus *S. albus*-mPc auf eine Konzentration von 5 mg/mL in MeOH eingestellt und mit einer 10 µL Kapillare auf eine DC-Platte aufgetragen. Im Anschluss wurde mit einer 10 µL Kapillare das entsprechende Additiv auf der DC-Platte auf die Pigmentfraktion bzw. Extrakt aus *S. albus*-mPc aufgetragen.

Tabelle 3-2: Optimierung der Trennung von Pigmentfraktionen und Extrakten aus *S. albus*-mPc (Kapitel B 3.2) an Diol-Material. In Klammern: Mischungsverhältnis, jeweils mit oder ohne Additive (v/v).

Laufmittel	verwendete Additive
Methanol/Wasser (6:4; 7:3; 8:2; 9:1)	Ameisensäure (0.05 %); Triethylamin (0.05 %)
Aceton/Methanol (4:1, 6:1)	Ameisensäure (0.05 %)
Aceton/Wasser (8:2; 7:3)	Ameisensäure (0.05 %)
Dichlormethan/Methanol (1:2; 1:1; 4:1; 9:1)	Ameisensäure (0.05 %)

Tabelle 3-3: Optimierung der Trennung von Pigmentfraktionen und Extrakten aus *S. albus*-mPc (Kapitel B 3.2) an Kieselgel. In Klammern: Mischungsverhältnis, jeweils mit oder ohne Additive (v/v).

Laufmittel	Generell verwendete Additive
Chloroform/Methanol (7:3, 9:1, 85:15, 6:4, 19:1, 98:2, 24:1, 50:1)	Ameisensäure (0.05 %); Triethylamin (0.05 %); Eisessig (0.1 %); Trifluoressigsäure (1 %); Ammoniumhydroxid [32%] (0.01 %)
Aceton/Methanol (9:1)	Ameisensäure (0.05 %); Triethylamin (0.05%)
Dichlormethan/Methanol (7:3, 9:1, 95:5)	Eisessig (0.1 %)
Cyclohexan:Ethylacetat:Methanol (CEM) (5:10:2, 5:10:4, 1:8:1, 3:8:1, 4:8:1, 5:8:1, 6:8:1)	Ameisensäure (0.05 %); Triethylamin (0.05 %); Eisessig (1 %, 2 %, 5 %); Trifluoressigsäure (1 %); Ammoniumhydroxid [32%] (0.01 %)
Toluol/Methanol (4:1)	---
Toluol/Ethylacetat/Eisessig (60:38:2, 49:49:2, 38:60:2)	---
Methanol	Trifluoressigsäure (0.1 %)
Aceton	---
Chloroform	Trifluoressigsäure (1 %)
Methanol/Wasser (6:4)	Ameisensäure (0.05 %)
Cyclohexan (1:1, 1:3, 2:1, 1:9)	Ameisensäure (0.05 %); Triethylamin (0.05 %)
Chloroform:Methanol:Wasser (CMW) (7:3:4, 70:30:4, 90:10:4, 80:20:4, 70:30:3, 70:30:0.4, 90:10:0.4)	Ameisensäure (0.05 %, 1 %, 0.1 %); Eisessig; pH 4.5; konz. H ₂ SO ₄ ; Ammoniumacetat (5 mm, 10 mm); Trifluoressigsäure (1 %, 1.6 %, 0.1 %, 0.5 %);

Die besten Laufmittel waren:

- RP: Aceton/Wasser 1:1 + 0.05 % NEt_3 .
- Diol: Dichlormethan/Methanol 4:1 + 0.05 % Ameisensäure
- Kieselgel: Chloroform/Methanol/Wasser 70:30:4 + 1 % TFA; CEM 6:8:1 + 1 % TFA.

3.2.1.2 Präparative und spezielle Dünnschichtchromatographie

Als Reinigungsschritt wurden präparative DC-Platten (*Macherey-Nagel*) verwendet. Dazu wurden maximal 100 mg in Methanol oder Aceton gelöst und mittels einer Spritze auf die Glas-DC-Platten aufgetragen. Als Laufmittel diente hier Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 6:8:1 + 1 % TFA. Nach Entwicklung wurden die Banden aus dem DC mit einem Spatel herausgekratzt, mit CHCl_3 /Methanol 9:1 extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Weiterhin wurden folgende individuell erarbeitete Varianten ausprobiert. Zum einen wurde das RP-KG-DC ohne Substanz zweimal mit Pyridin und dreimal mit Wasser imprägniert. Im Anschluss daran wurde die Substanz aufgetragen, wobei das Laufmittel Aceton/Wasser 1:2 Verwendung fand. Zum anderen wurden neutrales Aluminiumoxid und Polyamid-Material (*Macherey-Nagel*) mit dem Laufmittel CHCl_3 /Methanol 9:1 verwendet. Als dritte Variante wurde KG mit Koffein in Chloroform imprägniert. Die Laufmittel waren CHCl_3 /Methanol 9:1 bis 7:3.^[239]

3.2.1.3 Größenausschlusschromatographie

Durchgeführt wurden Aufarbeitungsschritte mit Schwerkraftsäulen. Die Größenausschlusschromatographie bietet eine wesentlich andere Selektivität als Kieselgel- oder RP-Kieselgelmaterialien. Die Trennung erfolgt nach Größe. Wechselwirkungen mit dem Material oder Polaritätseffekte treten dennoch auf,

können jedoch vernachlässigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass an Kiesegel- oder RP-Kiesegelmaterial eine starke Bandenverbreiterung der gewünschten Substanz auftritt. Auch bei anderer Selektivität konnte dieses Phänomen beobachtet werden. Geeignet erwies sich Sephadex LH-20 bei der Verwendung von Methanol + 0.05 % Triethylamin oder 0.5 % konz. Phosphorsäure als Laufmittelgemisch. Es folgten weitere Optimierungsversuche.

Tabelle 3-4: Größenausschlusschromatographie und die verwendeten Laufmittel der Trennung von Pigmentfraktionen und Extrakten aus *S. albus*-mPc (Kapitel B 3.2).

Material	Laufmittel
A) Toyopearl HW-40F	Methanol/Wasser 2:1
	Methanol + 0.1 % Trifluoressigsäure
B) Sephadex LH-20	Methanol
	Methanol + 0.05 % Triethylamin
	Methanol/Wasser 1:1 pH 8-8,5
	Methanol + 0.5 % konz. Phosphorsäure
	Aceton

3.2.1.4 Säulenchromatographie und Solid-Phase-Extraktion (SPE)

Bei der Durchführung von chromatographischen Analysen, konnte eine starke Bandenverbreiterung und somit keine Trennung erhalten werden. Aufgrund der großen Probleme hinsichtlich der chromatographischen Aufarbeitung wurden verschiedene Materialien ausprobiert. Die verwendeten Laufmittel für chromatographische Anwendung sind in Tabelle 3-5 mit Additiven dargestellt. In allen Fällen konnten zwei Problematiken beobachtet werden: 1) Eine sehr starke Bandenverbreiterung der Substanz über die gesamte Säulenlänge; 2) Immobilisierung der Substanz am Säulenmaterial, d.h. dass die roten Farbstoffe auf der Säule geblieben sind. Durch die Optimierung am Laufmittelgemisch für die Dünnschichtchromatographie konnten gute R_f -Werte erhalten werden. Es war jedoch nicht möglich, dieses Laufmittelgemisch auf die Säulenchromatographie zu übertragen, da

die unterschiedlichen Kieselgelmaterialien nur bei bestimmten pH-Werten stabil sind. Somit konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden.

Für eine basische Aktivierung des RP-KG-Materials erwies sich Pyridin als ein geeignetes Lösungsmittel.

Tabelle 3-5: Säulenchromatographie: Laufmittel und Materialien der Trennung von Pigmentfraktionen und Extrakten aus *S. albus*-mPc (Kapitel B 3.2).

Material	Laufmittel
A) Kieselgel	Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 5:10:4
	Chloroform/Methanol/Wasser 70:30:4 (0.5 % bzw. 1 % Trifluoressigsäure; 0.1 % Ameisensäure)
	Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 6:8:1 (1 % Trifluoressigsäure)
	Chloroform/Methanol (9:1; 24:1)
	Toluol/Methanol 4:1
B) RP-Kieselgel (C-18)	Methanol/Wasser (6:4; 7:3)
	Acetonitril/Wasser 6:4 + 0.05 % Ameisensäure
	Pyridin, Wasser, Aceton/Wasser 1:1
	Pyridin, Aceton/Methanol 1:1
C) Diol-Material	Aceton/Wasser 8:2

Auf den in Tabelle 3-5 gezeigten Materialien konnten, wie zuvor erwähnt, eine starke Bandenverbreiterung der Substanz und Immobilisierungseffekte festgestellt werden. Um dieser Problematik aus dem Weg zu gehen, wurde versucht auf viel kürzeren SPE-Kartuschen ein besseres Resultat zu erzielen. Auf der einen Seite wurden die gleichen Materialien optimiert, aber mit veränderten Laufmittelgemischen. Auf der anderen Seite wurden auch weitere Materialien verwendet, um verschiedene Selektivitäten zu erhalten. Die verwendeten Laufmittel, Materialien und zugesetzte Additive sind in Tabelle 3-6 dargestellt.

Tabelle 3-6: Verwendete Laufmittel der Trennung von Pigmentfraktionen und Extrakten aus *S. albus*-mPc (Kapitel B 3.2) für SPE-Kartuschen mit eingesetzten Additiven und Materialien.

Material	Laufmittel	Additive
A) RP-Kieselgel	Methanol/Wasser 6:4	---
	Methanol/Wasser 6:4, 9:1 Methanol	1 Tr. konz. NH ₃ (32 %ig in Wasser)
	Methanol/Wasser 6:4, Methanol, DMSO	Ameisensäure (0.1 %)
	Methanol/Wasser 6:4, 8:2, Methanol, DMSO	Ameisensäure (0.05 %)
	Acetonitril/Wasser 6:4	Ameisensäure (0.05 %)
	Aceton/Wasser 1:1	Trifluoressigsäure (0.05 %)
	Aceton/Wasser 1:2	Triethylamin (0.05 %)
	Pyridin, Wasser, Aceton/Wasser 1:2	---
B) Kieselgel	Chloroform/Methanol 24:1	---
C) Chromabond HR-XA	Wasser, Methanol	Ameisensäure (1 %, 10 %), Trifluoressigsäure (5 %), Natriumhydroxid (1 M, 0.1 M)
D) Easy	Wasser/Methanol 95:5; Methanol/Aceton 1:1;	1 N Salzsäure (10 %), 1 N Natriumhydroxid (10 %)

3.2.1.5 Sonstige verwendete Analytikmethoden

Die verwendeten Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

MCI-Gel: *Mitsubishi Chemical Corporation*. Amberlite XAD-2: *SERVA Feinbiochemica Heidelberg*; *Supelco*. Amberlite XAD-2 (500 mg/6 mL Kartuschen): *Applied Separations*. Amberlite XAD-16: *Rohm & Haas*. Anionentauscher: *Bayer*.

Tabelle 3-7: Adsorberharze und Anionentauscher der Trennung von Pigmentfraktionen und Extrakten aus *S. albus*-mPc (Kapitel B 3.2).

Material	Laufmittel
A) MCI-Gel	Wasser, Methanol/Wasser 6:4,
B) XAD-2	Methanol/Wasser 6:4, Methanol,
C) XAD-16	Wasser, Methanol/Wasser 6:4, Methanol
D) Anionentauscher Lewatit M 500, Cl-Form, starkbasisch, Typ 1	Methanol/Wasser 6:4 mit folgenden Additiven: Triethylamin (0.05 %), Ameisensäure (0.05 %)

3.2.2 Säure-Base-Verhalten von Modellkomponenten

Es wurden Vorversuche durchgeführt, um einen möglichen Aufschluss über das Grundgerüst der roten Verbindung zu erhalten. Dazu wurden verschiedene Komponenten (je eine Spatelspitze) in Methanol (5 mL) gelöst. Daraufhin sollte die farbliche Veränderung beobachtet werden, die aus der Zugabe von Säure bzw. Base resultiert. Verwendete Säuren und Basen, sowie verwendete Substanzen sind in Tabelle 3-8 dargestellt.

Tabelle 3-8: Vorversuche zum Säure-Base-Verhalten verschiedener Substanzen.

Modellverbindung	Farbe vor Additivzugabe	Additiv (je 0.5 mL)	Farbe nach Additivzugabe
1-Aminoanthrachinon (139)	rot	Ameisensäure	rot
1-Aminoanthrachinon (139)	rot	Triethylamin	rot
1,8-Dihydroxyanthrachinon (140)	orange-gelb	Ameisensäure	gelb
1,8-Dihydroxyanthrachinon (140)	orange-gelb	Triethylamin	dunkelrot
1,5-Dihydroxynaphthalin (141)	braun	Ameisensäure	hellbraun
1,5-Dihydroxynaphthalin (141)	braun	Triethylamin	violett
1-Naphthoesäure (142)	leicht bräunlich	Ameisensäure	farblos
1-Naphthoesäure (142)	leicht bräunlich	Triethylamin	leicht bräunlich
2,3-Dichlor-1,4-Naphthochinon (143)	gelblich	Ameisensäure	gelb
2,3-Dichlor-1,4-Naphthochinon (143)	gelblich	Triethylamin	türkis-grün
Rutin Hydrat (144)	gelblich	Ameisensäure	gelblich
Rutin Hydrat (144)	gelblich	Triethylamin	gelb

Als optimal erwies sich aufgrund der gesamten analytischen Studien eine Aufarbeitung des roten Pigments nach dem Schema 8-2 (Kapitel A 8.4.2). Dabei wurde die starke pH-Aktivität beachtet, um so eine Reinstoffisolierung zu gewährleisten.

3.3 Kristallisationsstudien

Da die Chromatographie eine große Herausforderung darstellte, wurde versucht, die verunreinigte Substanz auszukristallisieren. Hierzu wurden unterschiedliche Methoden angewendet.

Methode Nr. 1: Die Substanz wurde in Methanol gelöst und in einem Becherglas vorgelegt. Dieses Glas wurde in eine DC-Kammer gestellt, dessen Boden mit Chloroform befüllt war. In Chloroform weist die gesuchte Verbindung keine Löslichkeit auf. Der Deckel wurde verschlossen und mehrere Wochen stehen gelassen. Aus diesem Experiment konnten keine Kristalle gewonnen werden.

Methode Nr. 2:^[240] Die Zielsubstanz wurde in 5 mL DMSO gelöst und mit gleicher Menge Diethylether überschichtet. Der Ether diffundiert in das DMSO, sodass eine Polaritätsveränderung herbeigeführt wurde. Der Kolben wurde verschlossen und über einen längeren Zeitraum stehen gelassen. Wiederum konnten keine Kristalle der gewünschten Substanz erhalten werden.

Methode Nr. 3:^[241] Es wurde ein Extrakt in Tetrachlorkohlenstoff (4 mL) aufgenommen und mit H₂O₂ (1 mL) versetzt. Diese Mischung wurde unter Rückfluss 3 h gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktion (ohne Rühren) auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Gemisch wurde verschlossen und über einen längeren Zeitraum stehen gelassen. Es konnten keine Kristalle erzeugt werden.

3.4 Derivatisierungsstudien

Um die Zielsubstanz besser chromatographisch erfassen zu können, wurden einige Derivatisierungsreaktionen durchgeführt. Hierbei sollten gezielt Hydroxyfunktionalitäten derivatisiert werden. Um verschiedene Derivatisierungen zu testen, wurden unterschiedliche Modellverbindungen untersucht.

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) 1:^[242, 243]

Unter Argonatmosphäre wurde der Alkohol (1.0 mmol, 1.0 Äq.) und HBF_{4(aq)} (1.12 mmol, 0.07 mL, 1.0 Äq.) in Dimethylformamid (5 mL) vorgelegt und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wurde im Abstand von 20 Minuten schrittweise 1.0, 0.5, 0.25 und 0.25 mmol Trimethylsilyldiazomethan (TMSCHN₂; 2.0 M in Hexan, insgesamt

2 mmol, 2.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 µL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) beobachtet. Beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser. Die Reaktionslösung wurde im Vakuum vom Lösungsmittel entfernt, in Dichlormethan aufgenommen, mit gleicher Menge Wasser versetzt und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, optional über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde ausgewogen und erneut dünnschichtchromatographisch (10 µL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) untersucht.

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) 2:^[242, 243]

Unter Argonatmosphäre wurde der Alkohol (1.0 mmol, 1.0 Äq.) und $\text{HBF}_4(\text{aq})$ (1.12 mmol, 0.07 mL, 1.1 Äq.) in einem Dichlormethan/Methanol-Gemisch (5 mL) vorgelegt und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wurden im Abstand von 20 Minuten schrittweise 1.0, 0.5, 0.25 und 0.25 mmol Trimethylsilyldiazomethan (TMSCHN_2 ; 2.0 M in Hexan, insgesamt 2 mmol, 2.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 µL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) beobachtet. Beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser. Die Reaktionslösung wurde im Vakuum vom Lösungsmittel entfernt, in Dichlormethan aufgenommen, mit gleicher Menge Wasser versetzt und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, optional über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde ausgewogen und erneut dünnschichtchromatographisch (10 µL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) untersucht.

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) 3:^[242, 243]

Unter Argonatmosphäre wurde der Alkohol (1.0 mmol, 1.0 Äq.) und $\text{HBF}_4(\text{aq})$ (2.23 mmol, 0.14 mL, 2.0 Äq.) in Ethanol (5 mL) vorgelegt und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wurden im Abstand von 20 Minuten schrittweise mit 1.0, 0.5,

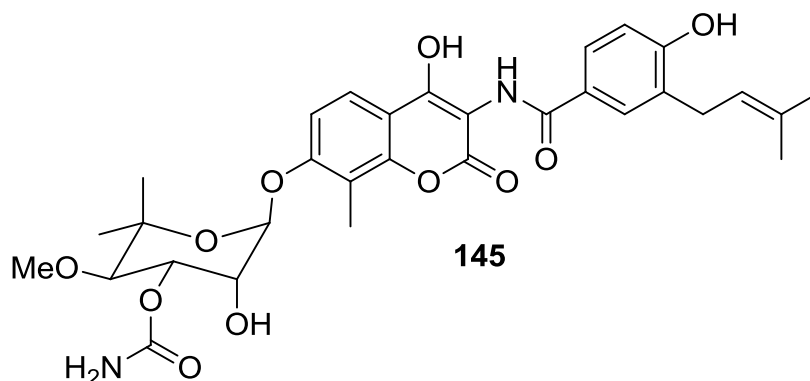
0.25 und 0.25 mmol Trimethylsilyldiazomethan (TMSCHN₂; 2.0 M in Hexan, insgesamt 2 mmol, 2.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 µL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) beobachtet. Beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser. Die Reaktionslösung wurde im Vakuum vom Lösungsmittel entfernt, in Dichlormethan aufgenommen, mit gleicher Menge Wasser versetzt und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde ausgewogen und erneut dünnschichtchromatographisch (10 µL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) untersucht.

Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) 4:^[243]

Unter Argonatmosphäre wurde ein trockenes Toluol/Methanol-Gemisch (3:2; 5 mL) vorgelegt, mit dem Alkohol versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde TMSCHN₂ (2.0 M in Diethylether) hinzugegeben und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 µL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) beobachtet. Die Reaktion wurde durch Einengen des Lösungsmittels im Vakuum beendet.

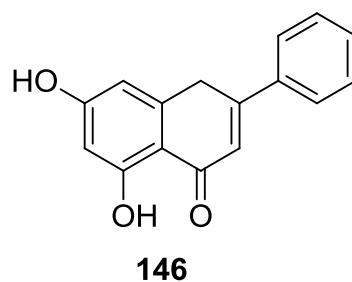
3.4.1 Durchgeführte Derivatisierungen mit Modellverbindungen

3.4.1.1 Derivatisierung von Novobiocin (**145**) (nach AAV 1)



Novobiocin (**145**) (1.0 mmol, 612.6 mg, 1.0 Äq.) wurde mit $\text{HBF}_{4(\text{aq})}$ (1.12 mmol, 0.07 mL, 1.1 Äq.) in DMF (5 mL) vorgelegt, bei 0 °C gerührt, mit TMSCHN_2 (2.0 mmol, 228.4 mg, 2.0 Äq.) versetzt und dünnschichtchromatographisch (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1) beobachtet. Nach Einengen des Lösungsmittels im Vakuum wurde ein Rohproduktgemisch (150.9 mg) erhalten. Es wurde keine weitere Aufarbeitung durchgeführt.

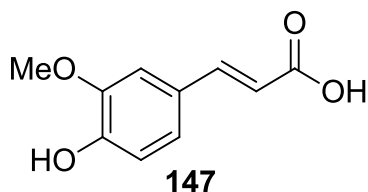
3.4.1.2 Derivatisierung von Chrysin (**146**) (nach AAV 2)



Chrysin (**146**) (1.0 mmol, 254.2 mg, 1.0 Äq.) und $\text{HBF}_{4(\text{aq})}$ (1.12 mmol, 0.07 mL, 1.1 Äq.) wurden in Dichlormethan/Methanol 5:1 (5 mL) vorgelegt und unter Eisbadkühlung mit TMSCHN_2 (2.0 mmol, 228.4 mg, 2.0 Äq.) versetzt. Nach Einengen des Lösungsmittels im

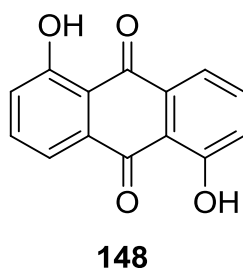
Vakuum wurde ein Reaktionsgemisch (78.5 mg) erhalten. Es wurde auf eine weitere Aufarbeitung verzichtet.

3.4.1.3 Derivatisierung von Ferulasäure (**147**) (nach AAV 2)



Ferulasäure (**147**) (1.0 mmol, 194.2 mg, 1.0 Äq.) und $\text{HBF}_{4(\text{aq})}$ (1.12 mmol, 0.07 mL, 1.1 Äq.) wurden in Dichlormethan/Methanol 3:1 (5 mL) vorgelegt und unter Eisbadkühlung mit TMSCHN_2 (2.0 mmol, 228.4 mg, 2.0 Äq.) versetzt. Nach Einengen des Lösungsmittels im Vakuum wurde ein Reaktionsgemisch (206.3 mg) erhalten. Das Edukt war nicht umgesetzt. Auf eine weitere Aufarbeitung wurde verzichtet.

3.4.1.4 Derivatisierung von Anthrarufin (**148**) (nach AAV 2)

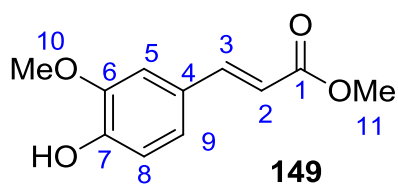


Anthrarufin (**148**) (1.0 mmol, 240.2 mg, 1.0 Äq.) und $\text{HBF}_{4(\text{aq})}$ (1.12 mmol, 0.07 mL, 1.1 Äq.) wurden in Dichlormethan/Methanol 5:1 (5 mL) vorgelegt und unter Eisbadkühlung mit TMSCHN_2 (2.0 mmol, 228.4 mg, 2.0 Äq.) versetzt. Nach Einengen des Lösungsmittels im Vakuum wurde ein Reaktionsgemisch (272.6 mg) erhalten. Es

konnte kein Umsatz festgestellt werden. Daher wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet.

3.4.1.5 Derivatisierung von Ferulasäure (**147**) (nach AAV 3)

Ferulasäure (**147**) (1.0 mmol, 194.2 mg, 1.0 Äq.) und $\text{HBF}_{4(\text{aq})}$ (2.23 mmol, 0.14 mL, 2.2 Äq.) wurden in EtOH (5 mL) vorgelegt und unter Eisbadkühlung mit TMSCHN_2 (3.25 mmol, 371.2 mg, 3.3 Äq.) versetzt. Nach Einengen des Lösungsmittels im Vakuum wurde ein Reaktionsgemisch (206.3 mg) erhalten. Das Edukt war nicht vollständig umgesetzt. Eine Aufreinigung fand an Kieselgel mit dem Eluenten Cyclohexan/Ethylacetat 2:1 statt. Es erfolgte eine dünnschichtchromatographische (10 μL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) Überprüfung. Aus dieser Derivatisierung ging Ferulasäuremethylester (**149**) (16.7 mg, 0.08 mmol, 8.0 %) hervor.



$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$ (208.07)

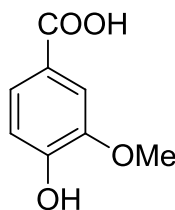
R_f -Wert 0.38 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Aceton- d_6): δ = 3.31 (s, 1H, 7-OH), 3.72 (s, 3H, 11-OMe), 3.92 (s, 3H, 10-OMe), 6.39 (d, 3J = 15.9 Hz, 1H, 2-H), 6.87 (d, 3J = 8.2 Hz, 1H, 8-H), 7.14 (d, 3J = 1.9 Hz, 8.2 Hz, 1H, 9-H), 7.33 (d, 3J = 1.9 Hz, 1H, 5-H), 7.59 (d, 3J = 15.9 Hz, 1H, 3-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.62 MHz, Aceton- d_6): δ = 51.5 (C-11), 56.3 (C-10), 111.3 (C-5), 115.5 (C-8), 116.0 (C-2), 123.9 (C-9), 127.3 (C-4), 145.7 (C-3), 148.7 (C-7), 149.9 (C-6), 167.9 (C-1) ppm.

Die chemischen Verschiebungen konnten durch ein HMBC-Experiment bestätigt werden.

3.4.1.6 Darstellung von 3,4-Dimethoxy-Benzoesäuremethylester (**151**)^[244]



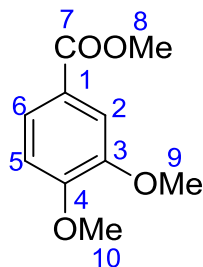
150

Unter Argonatmosphäre wurde ein trockenes Toluol/Methanol-Gemisch (5:1; 5 mL) vorgelegt, mit TMSCHN₂ (2.0 M in Diethylether; 0.6 mL, 1.2 mmol, 2.4 Äq.) versetzt und 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Vanillinsäure (**150**) (0.5 mmol, 84.08 mg, 1 Äq.) gelöst in wasserfreiem MeOH (1 mL) hinzugegeben und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 µL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) kontrolliert und durch Zugabe von Diethylether (20 mL) und Essigsäure (10 % in Wasser, 10 mL) beendet. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Die Titelverbindung (**151**) wurde als Feststoff (24.9 mg, 0.13 mmol, 26.0 %) erhalten.

3.4.1.7 Darstellung von 3,4-Dimethoxy-Benzoesäuremethylester (**151**) (nach AAV 4)

Das Toluol/Methanol-Gemisch (3:2; 5 mL) wurde mit Vanillinsäure (**150**) (0.5 mmol, 84.08 mg, 1.0 Äq.) vorgelegt, mit TMSCHN₂ (2.0 M in Diethylether; 0.9 mL, 1.8 mmol, 3.6 Äq.) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 µL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) kontrolliert. Die Reaktion wurde durch Einengen des Lösungsmittels im Vakuum beendet. Die

Titelverbindung (**151**) wurde als leicht verunreinigter Feststoff (25.0 mg, 0.504 mmol, quantitativ) erhalten.



151

$C_{10}H_{12}O_4$ (196.07)

R_f-Wert 0.89 (CHCl₃/MeOH 9:1); 0.43 (Cyclohexan/EE 2:1)

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆): δ = 3.80 (s, 3H, 10-OMe), 3.82 (s, 3H, 9-OMe), 3.85 (s, 3H, 8-OMe), 7.00 (d, ³J = 8.6 Hz, 1H, 5-H), 7.47 (d, ³J = 2.5 Hz, 1H, 2-H), 7.59 (dd, ³J = 2.5 Hz, 8.6 Hz, 1H, 6-H) ppm.

¹³C-NMR (100.62 MHz, Aceton-d₆): δ = 52.1 (C-8), 56.08 (C-9), 56.14 (C-10), 111.7 (C-5), 112.9 (C-6), 123.4 (C-1), 124.1 (C-2), 149.9 (C-3), 154.4 (C-4), 167.0 (C-7) ppm.

3.4.1.8 Derivatisierung von Novobiocin (**145**) (nach AAV 4)

Novobiocin (**145**) (15.0 mg, 0.025 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Toluol/Methanol (3:2; 5 mL) vorgelegt, mit TMSCHN₂ (2.0 M in Diethylether; 0.025 mL, 0.05 mmol, 2.0 Äq.) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 µL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) kontrolliert (0 min, 30 min, 120 min, 240 min). Zwischen dem 3. und 4. Kontroll-DC wurde erneut TMSCHN₂ (2.0 M in Diethylether; 0.025 mL, 0.05 mmol, 2.0 Äq.) hinzugegeben und auf 40 °C erwärmt. Die Reaktion wurde durch Einengen des Lösungsmittels im Vakuum beendet. Es wurde 15.6 mg des Rohproduktes erhalten, allerdings konnte kein Umsatz

festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde auf eine weitere Aufarbeitung verzichtet.

3.4.1.9 Derivatisierung von 1,8-Dihydroxyanthrachinon (140**) mit Methyljodid^[245]**

Kaliumhydroxid (80.1 mg, 1.428 mmol, 17.0 Äq.) wurde in Methanol (5 mL) vorgelegt und bei Raumtemperatur 5 Minuten gerührt. Anschließend wurde 1,8-Dihydroxyanthrachinon (**140**)-Fraktion (20.2 mg, 84.1 μ mol, 1.0 Äq.) in Methanol (1 mL) hinzugegeben und mit Mel im Überschuss (4.54 g, 32.0 mmol, 2.0 mL) versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (20 mL) beendet. Die Reaktionslösung wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und das Methanol im Vakuum entfernt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 μ L Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) kontrolliert. Die wässrige Reaktionslösung wurde mit 1 M HCl auf pH 3.0 gebracht und anschließend mit Diisopropylether (3 \times 20 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurde ein oranger Feststoff (33.5 mg) erhalten. NMR-Analyse konnte kein Umsatz identifiziert werden. Daher wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet.

3.4.2 Durchgeführte Derivatisierungen mit farbigen Pigmentfraktionen

Die Derivatisierungen wurden nicht von Reinsubstanzen, sondern von vorgereinigten Fraktionen des roten Pigments angefertigt.

3.4.2.1 Derivatisierung einer farbigen Pigmentfraktion mit Trimethylsilylchlorid (TMSCl)^[246]

Unter Argonatmosphäre wurde die angereicherte Lysochinon-TH1 (**137**)-Fraktion (10.0 mg, 0.022 mmol, 1.0 Äq.) mit TMSCl (1.0 M in THF; 7.17 mg, 0.066 mmol, 3.0 Äq.) in DMF (3 mL) vorgelegt, mit Imidazol (5.24 mg, 0.077 mmol, 3.5 Äq.) versetzt und 2 h

bei Raumtemperatur gerührt. Es erfolgte eine weitere Zugabe von TMSCl (14.34 mg, 0.13 mmol, 6.0 Äq.) und Imidazol (10.48 mg, 0.15 mmol, 7.0 Äq.). Es wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 μ L Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) kontrolliert. Beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 %iger NaHCO₃-Lösung (15 mL). Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit Cyclohexan (4 \times 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Es wurden 2.71 g als stark verunreinigtes Rohprodukt erhalten. Durch waschen mit Ammoniumchlorid und Cyclohexan wurde versucht überschüssiges TMSCl und Imidazol zu entfernen. Auf weitere Aufreinigungsschritte wurde verzichtet.

3.4.2.2 Derivatisierung einer farbigen Pigmentfraktion nach AAV 1

Die angereicherte Lysochinon-TH1 (**137**)-Fraktion (6.3 mg, 0.0136 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DMF (3 mL) vorgelegt und unter Rühren im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Es erfolgte die Zugabe von TMSCHN₂ im Überschuss (2 M in Diethylether, 456.88 mg, 4.0 mmol, 4.0 Äq., 4 \times 0.5 mL). Die Farbe der Reaktionslösung änderte sich von tief lila zu hellbraun. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 μ L Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) beobachtet und über Nacht gerührt. Zum Beenden der Reaktion wurde Wasser (10 mL) zu der Reaktionslösung gegeben. Das DMF/Wasser-Gemisch wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Diethylether (15 mL) aufgenommen und mit Wasser (15 mL) versetzt. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das überschüssige TMSCHN₂ konnte durch Zugabe von ein paar Tropfen konzentrierter Essigsäure entfernt werden. Es wurden 7.5 mg als verunreinigtes Rohprodukt erhalten. Es wurde ein NMR in CDCl₃ gemessen. Es konnte kein methyliertes Lysochinon-TH1 (**137**) erkannt werden. Daraufhin wurde auf eine weitere Aufarbeitung verzichtet.

3.4.2.3 Derivatisierung einer farbigen Pigmentfraktion nach AAV 1

Die angereicherte Lysochinon-TH1 (**137**)-Fraktion (1.6 mg, 3.28 μmol , 1.0 Äq.) wurde in Diethylether/Dichlormethan (3 mL) vorgelegt und unter Rühren im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Es erfolgte die Zugabe von TMSCHN₂ (2 M in Diethylether) im großen Überschuss. Die Farbe der Reaktionslösung änderte sich von rot zu orange über gelb zu gelb-grünlich. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 μL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) kontrolliert und über Nacht gerührt. Zum Beenden der Reaktion wurde Wasser (10 mL) zu der Reaktionslösung gegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (15 mL) versetzt und dreimal extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das überschüssige TMSCHN₂ konnte durch Zugabe von wenig konzentrierter Essigsäure entfernt werden. Es wurden 3.6 mg eines gelblichen Öles erhalten. Durch die dünnschichtchromatographische (10 μL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) Untersuchung konnte kein Umsatz festgestellt werden, somit wurde auf eine Aufreinigung verzichtet.

3.4.2.4 Derivatisierung einer farbigen Pigmentfraktion nach AAV 4

Die angereicherte Lysochinon-TH1 (**137**)-Fraktion (2.5 mg, 5.4 μmol , 1.0 Äq.) wurde in einem Toluol/Methanol-Gemisch (3:2; 5 mL) vorgelegt und bei Raumtemperatur 10 Minuten gerührt. Im Abstand von 30 Minuten wurde unter Rühren TMSCHN₂ (2 M in Diethylether, 3 \times 21.6 μmol , 12.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 μL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) kontrolliert. Die Farbe der Reaktionslösung schlug von rot nach braun um. Die Reaktion wurde durch Einengen des Lösungsmittels im Vakuum beendet. In Aceton verfärbte sich das erhaltene Rohprodukt (16.2 mg) lila. Eine Aufreinigung erfolgte an Kieselgel (Toluol/Methanol 4:1). Die einzelnen Fraktionen wurden mittels LC-MS (Säule 2, Programm A-02; Kapitel B 1.2) überprüft. Es konnte ein Gemisch aus nicht und 1- bis 4-fach methylierten Substanzen identifiziert werden. Das 3-fach methylierte Produkt hatte eine geringere Retentionszeit als das 2-fach methylierte Produkt. Im Anschluss darauf erfolgte die

Aufreinigung an einer SPE-Kartusche (KG, CHCl_3 /Methanol 24:1) mit einer weiteren Trennung an Sephadex LH-20 (Aceton). Es wurde ein Produktgemisch mit Ausbeuten von 0.5 bis 3.6 mg erhalten. Aus diesem Grund wurde keine weitere Aufreinigung durchgeführt.

3.4.2.5 Derivatisierung einer farbigen Pigmentfraktion nach AAV 4

Die angereicherte Lysochinon-TH1 (**137**)-Fraktion (9.6 mg, 20.8 μmol , 1.0 Äq.) wurde in einem Toluol/Methanol-Gemisch (3:2; 5 mL) vorgelegt und bei Raumtemperatur 10 Minuten gerührt. Im Abstand von 30 Minuten wurde unter Rühren TMSCHN_2 (2 M in Diethylether, 3×0.166 mmol, 24.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 μL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) kontrolliert. Die Farbe der Reaktionslösung wechselte nach erster Zugabe von TMSCHN_2 von rot über lila zu braun. Die Reaktion wurde durch Einengen des Lösungsmittels im Vakuum beendet. Das erhaltene Rohprodukt (14.0 mg) war bräunlich. Mittels LC-MS (Säule 2, Programm A-02; Kapitel B 1.2) konnte kein methyliertes Lysochinon-TH1 (**137**) identifiziert werden, daher wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet.

3.4.2.6 Derivatisierung einer farbigen Pigmentfraktion in Gegenwart von Bortrifluoretherat ($\text{BF}_3(\text{OEt})_2$)

Die angereicherte Lysochinon-TH1 (**137**)-Fraktion (9.6 mg, 20.8 μmol , 1.0 Äq.) wurde in einem DMF/Methanol-Gemisch (9:1; 1 mL) vorgelegt und bei Raumtemperatur gerührt. Unter Rühren folgte die Zugabe von $\text{BF}_3(\text{OEt})_2$ im sehr großen Überschuss. Die Reaktionslösung wurde mit TMSCHN_2 (2 M in Diethylether, 0.05 mmol, 2.4 Äq.) versetzt, wodurch ein Farbumschlag von rot zu lila zu beobachten war. Nach ca. 15 Minuten gab es einen Farbumschlag zu blau-lila. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 μL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) kontrolliert. Nach einer weiteren Zugabe von $\text{BF}_3(\text{OEt})_2$ im großen Überschuss und TMSCHN_2 (2 M in Diethylether, 0.05 mmol, 2.4 Äq.) wurde die Reaktion über Nacht gerührt. Zum

Beenden der Reaktion wurde konzentrierte Essigsäure (15 μ L) hinzugegeben und die Reaktionslösung 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von ges. NaHCO_3 -Lösung (20 mL) und Diethylether (20 mL). Es wurde dreimal mit Diethylether extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingeeengt. Das DMF der wässrigen Phase wurde im Hochvakuum (HV) entfernt, der Rückstand in Wasser (20 mL) aufgenommen und mit Ethylacetat (3×20 mL) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wodurch der Rückstand eine braune Färbung bekam. Es wurden 17.0 mg des Rohproduktes erhalten. Durch eine säulen-chromatographische Aufreinigung an Kieselgel ($\text{CHCl}_3/\text{Methanol}$ 24:1 \rightarrow 6:4) konnten 6 Fraktionen generiert werden. Diese wurden mittels NMR-spektroskopischer und LC-MS-Analyse (Säule 2, Programm A-02; Kapitel B 1.2) überprüft. In den massenspektrometrischen Daten konnte ein Gemisch aus mehrfach methylierten Verbindungen (Kapitel A 8.3) gezeigt, aber in den NMR-Daten nicht bestätigt werden. Auf weitere Aufreinigung wurde daher verzichtet.

3.4.2.7 Derivatisierung einer farbigen Pigmentfraktion in Gegenwart der Hünig-Base^[247]

Unter Argonatmosphäre wurde die angereicherte Lysochinson-TH1 (**137**)-Fraktion (10.8 mg, 23.4 μ mol, 1.0 Äq.) in Acetonitril/Methanol (9:1; 4 mL) vorgelegt, mit Hünig-Base (3.91 mg, 30.2 μ mol, 5.14 μ L, 1.3 Äq.) versetzt und bei Raumtemperatur 5 Minuten gerührt. Es erfolgte die Zugabe von TMSCHN_2 im Überschuss (2 M in Diethylether; 0.1 mmol, 11.4 μ g, 0.05 mL). Nach 1.5 h Reaktionszeit wurden erneut Hünig-Base (3.91 mg, 30.2 μ mol, 5.14 μ L, 1.3 Äq.) und TMSCHN_2 im Überschuss (2 M in Diethylether; 0.10 mmol, 11.4 μ g, 0.05 mL) bei Raumtemperatur hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt. Durch Einengen des Lösungsmittels im Vakuum wurde die Reaktion beendet. Es wurden 12.2 mg des Rohproduktes erhalten.

Mittels LC-MS (Säule 2, Programm A-02; Kapitel B 1.2) konnte kein Produkt identifiziert werden, daher wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet.

3.4.2.8 Derivatisierung einer farbigen Pigmentfraktion mit Dimethylcarbonat (DMC)^[248]

Unter Argonatmosphäre wurde die angereicherte Lysochinon-TH1 (**137**)-Fraktion (10.0 mg, 0.022 mmol, 1.0 Äq.) in DMC im Überschuss (1.61 g, 1.5 mL (+0.1 mL MeOH), 17.9 mmol) und Tetrabutylammoniumbromid [TBAB] (0.8611 mg, 2.671 μ mol) vorgelegt, auf 130 °C geheizt und 45 Minuten gerührt. Im Anschluss wurde eine Lösung aus DMC im Überschuss (2.14 g, 2 mL, 23.76 mmol), Methanol (0.3 mL) und der angereicherten Lysochinon-TH1 (**137**)-Fraktion (50.0 mg, 182.3 μ mol) hergestellt und über einen Zeitraum von 45 Minuten mittels einer Schlauchdosierpumpe zu der Reaktionslösung hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei 130 °C gerührt, erneut mit TBAB (0.8594 mg, 2.670 μ mol) versetzt und weitere 45 Minuten bei 130 °C gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 μ L Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) kontrolliert. Die Reaktion wurde durch das Einengen des Lösungsmittels im Vakuum beendet. Zu dem Rückstand wurde 2 N HCl (10 mL) und Diisopropylether (20 mL) hinzugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Diisopropylether (3 \times 20 mL) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. So wurden 83.8 mg des lila-grauen Rohproduktes erhalten. Mittels LC-MS (Säule 2, Programm A-02; Kapitel B 1.2) konnte kein Produkt identifiziert werden, daher wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet.

3.4.2.9 Oxidation des Dihydrochinons (174**) zum Chinon (**173**) mit Ag₂O^[249]**

Unter Argonatmosphäre wurde die angereicherte Lysochinon-TH1 (**137**)-Fraktion (18.15 mg, 39.3 μ mol, 1.0 Äq.) in trockenem Dichlormethan/Methanol-Gemisch (1.6 mL: 1.4 mL) vorgelegt, mit Ag₂O (17.1 mg, 73.8 μ mol) versetzt und unter Rückfluss

auf 65 °C geheizt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt. Der Rückstand wurde in DCM/Methanol (1:1, 5 mL) aufgenommen, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt (12.2 mg) wurde in CHCl₃/MeOH (24:1; 5 mL) aufgenommen. Hier wurde eine Aufreinigung an Kieselgel mit dem Eluenten CHCl₃/MeOH/NH₃ (32 %ig in Wasser) (24:1:0.01) durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels LC-MS (Säule 2, Programm A-02; Kapitel B 1.2) untersucht, wobei kein Produkt identifiziert werden konnte. Daraufhin wurde auf eine weitere Bearbeitung verzichtet.

3.4.2.10 Derivatisierung von einer farbigen Pigmentfraktion mit Methyljodid^[250]

Unter Argonatmosphäre wurde die angereicherte Lysochinon-TH1 (**137**)-Fraktion (9.7 mg, 21.0 µmol, 1.0 Äq.) in Aceton/DMSO (4 mL: 0.5 mL) vorgelegt, Kaliumcarbonat (14.5 mg, 0.105 mmol, 5.0 Äq.) hinzugegeben und mit Mel (45.4 mg, 0.32 mmol, 0.02 mL, 15.2 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch kontrolliert und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Über Nacht konnte ein Farbumschlag von rosa-rot zu lila beobachtet werden. Zum Beenden der Reaktion wurde über Celite filtriert, mit Dichlormethan (3 × 20 mL) gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das DMSO wurde am HV entfernt. Es wurde das Rohprodukt (14.3 mg) als verunreinigter Feststoff erhalten. Mittels LC-MS und dünnschicht-chromatographischer Analyse (10 µL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) konnte ein Produktgemisch identifiziert werden. Dieses Gemisch enthielt unter anderem 1-fach, 2-fach und 3-fach methylierte Verbindungen. Bei der DC-Analyse (10 µL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) zeigte sich, dass auf Höhe des Eduktes eine Bande zu sehen war, welche mit Anis gelb anfärbte. Es folgte eine Aufreinigung an Sephadex LH-20 (Aceton) mit anschließendem präpartiven DC (Kapitel B 3.2.1.1). Die Banden wurden herausgekratzt und an der LC-MS (Säule 2, Programm A-02; Kapitel B 1.2) untersucht. Es konnte ein Substanzgemisch identifiziert werden. Lediglich eine 1-fach methylierte Form war zu erkennen. Die Substanzmenge fiel zu gering für weitere Aufreinigungsmaßnahmen aus.

3.4.2.11 Derivatisierung einer farbigen Pigmentfraktion mit Dimethylsulfat (DMS)^[251]

Unter Argonatmosphäre wurde die angereicherte Lysochinon-TH1 (**137**)-Fraktion (9.7 mg, 21.0 μmol , 1.0 Äq.) in trockenem Aceton (4 mL) gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Kaliumcarbonat (80.1 mg, 0.580 mmol, 27.6 Äq.) hinzugegeben, die Reaktionslösung mit DMS (26.49 mg, 0.21 mmol, 0.02 mL, 10.0 Äq.) versetzt, auf 65 °C geheizt und dabei stetig gerührt. Dabei konnte ein Farbumschlag von rosa-rot zu lila beobachtet werden. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (10 μL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) kontrolliert. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, filtriert, mit Aceton gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (5 mL) aufgenommen, mit Triethylamin (2 mL) versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde Ethylacetat (50 mL) hinzugegeben, die organische Phase mit 5 %iger HCl (5 mL) und anschließend mit Wasser (15 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es resultierte ein gelb-oranges verunreinigtes Rohprodukt (6.5 mg). Mittels LC-MS (Säule 2, Programm A-02; Kapitel B 1.2) und dünnschichtchromatographischer (Kapitel B 3.2.1.1) Analyse konnte ein Produktgemisch identifiziert werden. Die Substanzmenge war zu gering, sodass auf eine weitere Aufreinigung verzichtet wurde.

3.4.2.12 Derivatisierung einer farbigen Pigmentfraktion mit Methyljodid^[252]

Kaliumhydroxid (72.9 mg, 1.299 mmol, 37.0 Äq.) wurde in DMSO (2 mL) vorgelegt und bei Raumtemperatur 5 Minuten gerührt. Anschließend wurde die angereicherte Lysochinon-TH1 (**137**)-Fraktion (16.1 mg, 34.8 μmol , 1.0 Äq.) in DMSO (1 mL) hinzugegeben und mit Mel (68.1 mg, 0.480 mmol, 0.03 mL, 13.8 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (20 mL) beendet. Die Reaktionslösung wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit CHCl_3 (3 \times 20 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das restliche DMSO

wurde im Hochvakuum (HV) entfernt. Es wurde ein verunreinigter Feststoff (7.3 mg) erhalten. Mittels DC- (10 µL Auftragsmenge; Kapitel B 3.2.1.1) und LC-MS-Analytik (5 mg/mL in LC-MS-MeOH; Säule 2, Programm A-02; Kapitel B 1.2) konnte ein Produktgemisch identifiziert werden. Die Substanzmenge war zu gering, daher wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet.

3.5 Weiterführende Aufarbeitungsstudien mit Poly(vinylpolypyrrolidin) (PVPP)

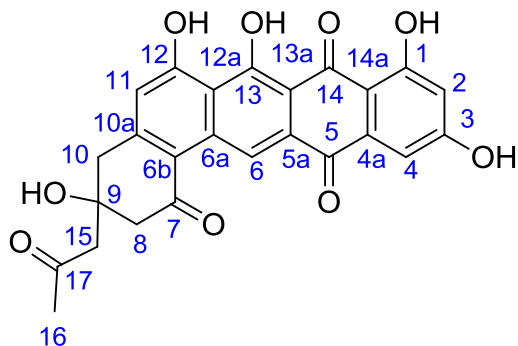
PVPP (*Sigma Aldrich*) ist ein quer vernetztes, unlösliches Polymer, um Phenole bzw. Polyphenole aus verschiedenen Matrices herauszufiltern (Kapitel A 8.5.3).^[219, 220, 221, 222]

Die folgende Aufarbeitung wurde aus den gerade genannten Literaturstellen abgeleitet:

Ein Extrakt (35.6 mg) wurde in 5 mL H₂O/MeOH (95:5) gelöst und mit PVPP (58.1 mg) versetzt. Dieses Gemisch wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss filtriert. Das Filtrat wurde erneut mit PVPP (115.0 mg) versetzt und 15 Minuten gerührt und erneut filtriert. Die Rückstände wurden vereint und mit 1 N NaOH (ca. 5 mL) gespült, wodurch sich die Farbe von rot zu lila veränderte. Es wurde erneut filtriert. Ein lila Rückstand blieb im Filter zurück. Beim Spülen mit 1 N HCl (ca. 2 mL) blieb ein roter Rückstand übrig. Durch NMR-Analyse des Filtrats konnte gezeigt werden, dass Lysochinon-TH1 (**138**) zwar selektiv aus einer Lösung herausgefiltert, allerdings dann nicht mehr von dem PVPP gelöst werden konnte.

3.6 Chemische Charakterisierung der isolierten Substanzen

Lysochinon-TH1 (137)



C₂₅H₁₈O₉ (462.10)

R_f-Wert: 0.45 (Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 6:8:1 + 1 % TFA)

Anfärbeverhalten: nicht möglich.

Eigenfarbe: rot-rosa.

ESI-MS (negative Ionen): $m/z = 461.1$ [M-H]⁻.

(positive Ionen): $m/z = 463.2$ [M+H]⁺.

HR-ESI-MS (berechnet): $m/z = 461.087806$ [M-H]⁻.

(gemessen): $m/z = 461.087756$ [M-H]⁻.

(relative Massenabweichung = 0.11 ppm).

IR (KBr): $\bar{\nu} = 3418, 2955, 2921, 2851, 1731, 1714, 1617, 1455, 1375, 1358, 1272, 1172, 1117, 1073, 799$ cm⁻¹.

UV (MeOH): $\lambda_{\max} (\epsilon) = 515 (1940), 397 (1512), 276 (6231), 204 (22475)$ nm.

(MeOH/HCl): $\lambda_{\max} (\epsilon) = 477 (2532), 284, (5853), 204 (22261)$ nm.

(MeOH/NaOH): $\lambda_{\max} (\epsilon) = 592 (789), 525 (1628), 395 (1447), 329 (3979), 282 (4127), 248 (6560), 210 (11986), 207 (12479), 203 (4423)$ nm.

CD (MeOH): $\lambda_{max} [\theta]$ = nicht vorhanden.

$[\alpha]_D^{20}$ = Kein Drehwert messbar.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.18 (s, 3H, 17-H₃), 2.67 (d, J = 15.9 Hz, 1H, 8-H_a), 2.70 (s, 2H, 15-H), 2.91 (d, J = 15.9 Hz, 1H, 8-H_b), 3.01 (d, J = 15.9 Hz, 1H, 10-H_a), 3.25 (d, J = 15.9 Hz, 1H, 10-H_b), 6.55 (d, ³ J = 2.6 Hz, 1H, 2-H), 6.66 (s, 1H, 11-H), 7.09 (d, 1H, ³ J = 2.6 Hz, 4-H), 9.48 (s, 1H, 6-H) ppm.

¹³C-NMR (150.6 MHz, DMSO-d₆): δ = 32.4 (C-17), 42.8 (C-10), 52.2 (C-8), 53.3 (C-15), 71.0 (C-9), 107.3 (C-12a), 108.0 (C-4), 108.7 (C-2), 110.3 (C-14a), 114.4 (C-11), 116.2 (C-13a), 117.7 (C-6b), 118.3 (C-6), 131.4 (C-5a), 135.6 (C-4a), 136.9 (C-6a), 150.6 (C-10a), 164.3 (C-1, C-13), 164.5 (C-3, C-12), 182.2 (C-5), 186.6 (C-14), 196.2 (C-7), 207.8 (C-16) ppm.

Durch das Fütterungsexperiment mit [1,2-¹³C₂]Acetat wurden verschiedene Kopplungskonstanten durch den Einbau des markierten Vorläufers für die isotopenmarkierten, benachbarten Kohlenstoffatome erhalten (Tabelle 3-9).

Tabelle 3-9: Erhaltene Daten aus dem Fütterungsexperiment mit [1,2-¹³C₂]Acetat. a: resultiert aus der Kopplung zweier benachbarter, isotopenmarkierter Kohlenstoffatome.

137, Atom-Nr.	δ_C [ppm]	$J_{C,C}$ [Hz] ^a	137, Atom-Nr.	δ_C [ppm]	$J_{C,C}$ [Hz] ^a
1	164.3	65.7	10	42.8	40.0
2	108.7	54.6	10a	150.6	40.0
3	164.5	54.6	11	114.4	65.7
4	108.0	64.5	12	164.5	65.7
4a	135.6	64.5	12a	107.3	54.6
5	182.2	55.6	13	164.3	54.6
5a	131.4	55.6	13a	116.2	59.0
6	118.3	51.3	14	186.6	59.0
6a	136.9	51.3	14a	110.3	65.7
6b	117.7	55.5	15	53.3	37.9
7	196.2	55.5	16	207.8	40.2
8	52.2	---	17	32.4	40.2
9	71.0	37.9			

Die erhaltenen Einbauraten sind in Kapitel A 8.5.3 ausführlich beschrieben.

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius	KR	Ketoreduktase
ACP	Acyl-Carrier-Protein	KS	Ketosynthase
act	Actinorhodin	LC-MS	HPLC-Kopplung mit Massenspektrometrie
Ag ₂ O	Silberoxid (I)	lys	Lysolipin
Äq.	Äquivalente	m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung
ARO	Aromatase	MCAT	Malonyl-CoA:ACP- Transacylase
AT	Acyltransferase	Mel	Methyliodid
BVMO	Bayer-Villiger- Mono- oxygenase	mPc	minimale PKS mit Cyclasen
CaCO ₃	Calciumcarbonat	MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography
CLF	Chain-Length- Factor	NMR	Nuclear Magnetic Resonance
CoA	Co-Enzym A	P450	P450-abhängige Monooxygenase
CV	Column volume	PCR	Polymeraseketten- reaktion
CYC	Cyclase(n)	Pdm	Pradimicin
DAD	Dioden Array Detector	PKS	Polyketidsynthase
DMC	Dimethylcarbonat	PKS-NRPS	Polyketidsynthase-Non- Ribosomale-Peptid- Synthase
DMS	Dimethylsulfat	ppm	parts per million
DMSO	Dimethylsulfoxid	R _f	Retentionsfaktor
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethyl- aminopropyl)carbo- diimid	rpm	rounds per minute
EMK	Erlenmeyerkolben	R _t	Retentionszeit
endc.	Endcapped	RT	Raumtemperatur
FAS	fatty acid synthesis / Fettsäurebiosynthese	SNAC	N-Acetylcysteamin
fdm	Fredericamycin	SPE	solid phase extraction
HF ₄ (aq)	Tetrafluorborsäure (wässrig)	Tcm	Tetracenomycin
HC	Heterocyclisierung	TE	Thioesterase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	TFA	Trifluoressigsäure
HR-ESI-MS	high resolution electron spray mass spectrometry	TLC	Thin Layer Chromatography
HSP	Heat Shock Protein	TMSCHN ₂	Trimethylsilyl- diazomethan
Hz	Hertz	TMSCI	Trimethylsilylchlorid
ID	inner diameter		
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration		
kb	kilo basepairs		
KOH	Kaliumhydroxid		

Literaturverzeichnis

- 1 R. Bentley, J.W. Bennet, *Annu. Rev. Microbiol.* **1999**, *53*, 411-446.
- 2 T. Mülhaupt, *Dissertation*, Ludwig-Maximilian-Universität München, **2003**.
- 3 B. Busch, C. Hertweck, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1833-1840.
- 4 H. Jenke-Kodama, E. Dittmann, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1856-1866.
- 5 T. Weber, K. Welzel, S. Pelzer, A. Vente, W. Wohlleben, *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 221-232.
- 6 R. Müller, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 4-6.
- 7 C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4782-4811.
C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688-4716.
- 8 L. Beerhues, B. Liu, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1719-1727.
- 9 W.K. Lutz, mF.K. Winkler, J.D. Dunitz, *Helv. Chim. Acta* **1971**, *54*, 1103-1108.
- 10 M. Meyer, W. Keller-Schierlein, S. Megahed, H. Zähner, A. Segre, *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 1356-1364.
- 11 M.K. Kharel, P. Pahari, H. Lian, J. Rohr, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2814-2817.
- 12 http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio2/schroeder/Index_German_General_de.html
STAND: 13.08.2012.
- 13 S. Weinig, *Dissertation*, Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig, **2003**.
- 14 J.C. Kwan, E.W. Schmidt, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 309-311.
- 15 M.B. Austin, J.P. Noel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 79-110.
- 16 http://www.rasmusfrandsen.dk/polyketide_syntheses.htm; STAND: 01.08.2010.
- 17 H.B. Bode, R. Müller, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6988-7007.
H.B. Bode, R. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6828-6846.
- 18 Y.A. Chan, A.M. Podevels, B.M. Kevany, M.G. Thomas, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 90-114.
- 19 J.M. Crawford, A.L. Vagstad, K.P. Whitworth, C.A. Townsend, K.C. Ehrlich, *ChemBioChem.* **2008**, *9*, 1019-1023.
- 20 K.J. Weissman, P.F. Leadlay, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 925-936.
- 21 D.E. Cane, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 27517-27523.

- 22 J. Staunton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 339-345.
- 23 D.A. Hopwood, D.H. Sherman, *Annu. Rev. Genet.* **1990**, 24, 37-66.
- 24 S. Smith, S.-C. Tsai, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, 24, 1041-1072.
- 25 D.H. Kwan, F. Schulz, *Molecules* **2011**, 16, 6092-6115.
- 26 R.F. Noss, *Conserv. Biol.* **1990**, 4, 355-364.
- 27 N.R. Pace, *Science* **1997**, 276, 734-740.
- 28 B.J. Rawlings, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 190-227.
- 29 J. Staunton, B. Wilkinson, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 2611-2629.
- 30 N.L. Paiva, M.F. Roberts, A.L. Demain, *J. Ind. Microbiol.* **1993**, 12, 423-428.
- 31 A. Das, C. Khosla, *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 631-639.
- 32 J. Dreier, C. Khosla, *Biochemistry* **2000**, 39, 2088-2095.
- 33 C. Hertweck, A. Luzhetskyy, Y. Rebets, A. Bechthold, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24, 162-190. (Review)
- 34 W. Zhang, K. Watanabe, C.C.C. Wang, Y. Tang, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 25717-25725.
- 35 C.E.-M. Unsin, *Dissertation*, Eberhard Karls Universität Tübingen, **2008**.
- 36 C. Olano, C. Méndez, J.A. Salas, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26, 628-660.
- 37 B.J. Rawlings, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 425-484.
- 38 F. Lombó, N. Menéndez, J.A. Salas, C. Méndez, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 73, 1-14.
- 39 B. Ostash, U. Rix, L.L. Remsing Rix, T. Liu, F. Lombo, A. Luzhetskyy, O. Gromyko, C. Wang, A.F. Braña, C. Méndez, J.A. Salas, V. Fedorenko, J. Rohr, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 547-555.
- 40 R. Thomas, *ChemBioChem.* **2001**, 2, 612-627. (Review)
- 41 G. Bringmann, T.F. Noll, T.A.M. Gulder, M. Grüne, M. Dreyer, C. Wilde, F. Pankewitz, M. Hilker, G.D. Payne, A.L. Jones, M. Goodfellow, H.-P. Fiedler, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 429-433.
- 42 G. Bringmann, A. Irmer, D. Feineis, T.A.M. Gulder, H.-P. Fiedler, *Phytochemistry* **2009**, 70, 1776-1786.
- 43 J.M. Jez, M.E. Bowman, J.P. Noel, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 5319-5324.
- 44 F. Gross, N. Lumiak, O. Perlova, N. Gaitatzis, H. Jenke-Kodama, K. Gerth, D. Gottschalk, E. Dittmann, R. Müller, *Arch. Microbiol.* **2006**, 185, 28-38.

- 45 K. Springob, J.-I. Nakajima, M. Yamakazi, K. Saito, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 288-303.
- 46 S. Tropf, T. Lanz, S.A. Rensing, J. Schröder, G. Schröder, *J. Mol. Evol.* **1994**, *38*, 610-618.
- 47 Y. Wang, H. Yi, M. Wang, O. Yu, J.M. Jez, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20684-20687.
- 48 M.A. Fischbach, C.T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468-3496.
- 49 G.H. Hur, C.R. Vickery, M.B. Burkart, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29* [preprint].
- 50 R.J. Cox, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2010-2026.
- 51 T. Duerfahrt, K. Eppelmann, R. Müller, M.A. Marahiel, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 261-271.
- 52 S.R. Park, J.W. Park, W.S. Jung, A.R. Han, Y.-H. Ban, E.J. Kim, J.K. Sohng, S.J. Sim, Y.J. Yoon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 109-117.
- 53 C.T. Walsh, S.E. O'Connor, T.L. Schneider, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *30*, 448-455.
- 54 F. Kopp, M.A. Marahiel, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 735-749.
- 55 K.S. Lam, *TRENDS Microbiol.* **2007**, *15*, 279-289.
- 56 C.W. Carreras, D.V. Santi, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 403-411.
- 57 C. Khosla, R.J.X. Zawada, *Trends Biotechnol.* **1996**, *14*, 335-341.
- 58 A.L. Harvey, *Rev. Salud. Anim.* **2009**, *31*, 8-12.
- 59 F.T. Wong, C. Khosla, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 117-123.
- 60 B. Patwardhan, R.A. Mashelkar, *Drug Discovery Today* **2009**, *14*, 804-811.
- 61 A. Argüelles Arias, M. Craig, P. Fickers, *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, Vol. 2, A. Méndez-Vilas (Ed.), Formatex Research Center, Badajoz, Spanien, **2011**.
- 62 A. Hartmann, *Mensch + Umwelt spezial*, *17. Ausgabe* **2004/2005**.
- 63 W. Wackernagel, *Akademie-Journal*, *01/2002*.
- 64 <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/13/bs13-8.htm>; STAND: 13.07.2012.
- 65 F. v. Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5194 – 5254.
- F. v. Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5072-5129.

- 66 http://www.forschung-leben.ch/ffl_de/assets/File/BioFokus/BioFokus51.pdf; STAND: 21.08.2012.
- 67 http://www.msd.de/forschung/klin/arzn_8220.html STAND: 21.08.2012.
- 68 J.A. DiMasi, R.W. Hansen, H.G. Grabowski, *J. Health Econ.* **2003**, *22*, 151-185.
- 69 G. Thomas, *Medicinal Chemistry An Introduction*, Second Edition, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, **2008**.
- 70 D. Gottlieb, H.E. Carter, P.W. Robbins, R.W. Burg, *J. Bacteriol.* **1962**, *84*, 888-895.
- 71 J. Doull, Z. Ahmed, C. Stuttard, L.C. Vining, *J. Gen. Microbiol.* **1985**, *131*, 97-104.
- 72 C. Kehrenberg, *Dissertation*, Tierärztliche Hochschule Hannover, **2002**.
- 73 http://www.merz.de/forschung_und_entwicklung/neues_medikament_entsteht/index.jsp STAND: 13.07.2012.
- 74 C.S. Meyer, *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität München, **2007**.
- 75 D. Bischoff, S. Pelzer, B. Bister, G.J. Nicholson, S. Stockert, M. Schirle, W. Wohlleben, G. Jung, R.D. Süßmuth, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4824-4827.
- D. Bischoff, S. Pelzer, B. Bister, G.J. Nicholson, S. Stockert, M. Schirle, W. Wohlleben, G. Jung, R.D. Süßmuth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4688-4691.
- 76 C. Böhme, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2011**.
- 77 H. von Baum, M. Dettenkofer, A.-M. Fahr, P. Heeg, C. Wendt, *Hyg, Med.* **2006**, *31*, 30-32.
- 78 A. Simon, N. Gröger, S. Engelhardt, G. Molitor, M. Exner, U. Bode, G. Fleischhack, *Hyg, Med.* **2004**, *29*, 259-275.
- 79 G. Werner, I. Klare, J. Hübner, W.V. Kern, W. Witte, *Chemother. J.* **2008**, 183-193.
- 80 M. Kresken, D. Hafner, W. Witte, R.R. Reinert, *Chemother. J.* **1999**, 136-145.
- 81 J.S. Bens, *J. Nephrol. Team* **2003**, 79-87.
- 82 E. Nannini, B.E. Murray, C.A. Arias, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, *10*, 1-6.
- 83 <http://www.internetchemie.info/chemiewiki/index.php?title=Cephalosporine>; STAND: 22.08.2012.
- 84 <https://www.thieme-connect.de/ejournals/abstract/10.1055/s-0029-1244232?locale=de&LgSwitch=1> STAND: 22.08.2012.
- 85 D.J. Newman, G.M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311-335.

- 86 H. Tomoda, T. Doi, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 32-39.
- 87 A. Kirschning, F. Taft, T. Knobloch, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3245-3259.
- 88 U. Sundermann, S. Kushnir, F. Schulz, *Nachr. Chem.* **2011**, *59*, 313-318.
- 89 E.I. Graziani, F.V. Ritacco, M.Y. Summers, T.M. Zabriskie, K. Yu, V.S. Berman, M. Greenstein, G.T. Carter, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2385-2388.
- 90 C. Vézina, A. Kudelski, S.N. Sehgal, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 721-726.
- 91 M. Ziehl, J. He, H.-M. Dahse, C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1226-1230.
- M. Ziehl, J. He, H.-M. Dahse, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1202-1205.
- 92 S.C. Wenzel, R. Müller, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 594-606.
- 93 J.R. Jacobsen, C.R. Hutchinson, D.E. Cane, C. Khosla, *Science* **1997**, *277*, 367-369.
- 94 L. Tang, H. Fu, R. McDaniel, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 77-84.
- 95 S.R. Park, A.R. Han, Y.-H. Ban, Y.J. Yoo, E.J. Kim, Y.J. Yoon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1227-1239.
- 96 T. Hofeditz, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen **2008**.
- 97 H.B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck, *ChemBioChem.* **2002**, *3*, 619-627.
- 98 O. Wagner, *Dissertation*, Georg-August-Universität Göttingen, **2000**.
- 99 H. Shojaei, Z. Li-Böhmer, P. v. Zezschwitz, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5091-5097.
- 100 J. v. Friehling, *Staatsexamensarbeit*, Georg-August-Universität Göttingen, **2002**.
- 101 Y. Sukenaga, T. Yamazaki, T. Aoyama, Y. Takayasu, T. Harada, Japanese Patent JP10 237044, CA, 129, 244203S, **1998**.
- 102 F. Surup, *Dissertation*, Georg-August-Universität Göttingen, **2007**.
- 103 F. Surup, O. Wagner, J. v. Friehling, M. Schleicher, S. Oess, P. Müller, S. Grond, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5085-5090.
- 104 B.S. Moore, C. Hertweck, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 70-99.
- 105 J.A. Hasler, R. Estabrook, M. Murray, I. Pikuleva, M. Waterman, J. Capdevila, V. Holla, C. Helvig, J.R. Falck, G. Farrell, L.S. Kaminsky, S.D. Spivack, E. Boitier, P. Beaune, *Mol. Aspects Med.* **1999**, *20*, 1-137.
- 106 K.J. Laiple, T. Härtner, H.-P. Fiedler, W. Wohlleben, T. Weber, *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 465-468.

- 107 T. Weber, K.J. Laiple, E.K. Pross, A. Textor, S. Grond, K. Welzel, S. Pelzer, A. Vente, W. Wohlleben, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 175-188.
- 108 J.E. Cronan, JR, *J. Bacteriol.* **1980**, *141*, 1291-1297.
- 109 Y. Hu, H.G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3837-3844.
- 110 B.J. Carroll, S.J. Moss, L. Bai, Y. Kato, S. Toelzer, T.-W. Yu, H.G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4176-4177.
- 111 J. Staunton, A.C. Sutkowski, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1110-1112.
- 112 K.J. Weissman, C.J. Smith, U. Hanefeld, R. Aggarwal, M. Bycroft, J. Staunton, P.F. Leadlay, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1503-1506.
- 113 D.J. Witter, J.C. Vederas, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2613-2623.
- 114 F. Surup, H. Shojaei, P. v. Zezschwitz, B. Kunze, S. Grond, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1738-1746.
- 115 M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, 8. Überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2011**.
- 116 M. Quitschau, *Dissertation*, Georg-August-Universität, **2009**.
- 117 A. Kuhlencord, T. Maniera, H. Eibl, C. Unger, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 1630-1634.
- 118 P. Kössler, *Dissertation*, Georg-August-Universität Göttingen, **2009**.
- 119 R.A. Bukhalid, T. Takeuchi, D. Labeda, R. Loria, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 738-744.
- 120 A. Ehsan, F. Sommer, A. Schmidt, T. Klotz, J. Koslowski, S. Niggemann, G. Jacobs, U. Engelmann, K. Addicks, *Cancer* **2002**, *95*, 2293-2301.
- 121 Q. Liu, F. Yao, Y.H. Chooi, Q. Kang, W. Xu, Y. Li, Y. Shao, Y. Shi, Z. Deng, Y. Tang, D. You, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 243-253.
- 122 H. Shojaei, *Dissertation*, Georg-August-Universität Göttingen, **2007**.
- 123 H. Drautz, W. Keller-Schierlein, H. Zähler, *Arch. Microbiol.* **1975**, *106*, 175-190.
- 124 P. Lopez, A. Hornung, K. Welzel, C. Unsin, W. Wohlleben, T. Weber, S. Pelzer, *Gene* **2010**, *461*, 5-14.
- 125 H. Bockholt, G. Udvarnoki, J. Rohr, U. Mocek, J.M. Beale, H.G. Floss, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2064-2069.
- 126 M. Dobler, W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 178-185.

- 127 Mündliche Mitteilung Tilmann Weber, **2012**.
- 128 W. Zhang, B.D. Ames, S.-C. Tsai, Y. Tang, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 2573-2580.
- 129 A. Nakagawa, S. Ōmura, K. Kushida, H. Shimizu, G. Lukacs, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 301-308.
- 130 S. Ōmura, Y. Iwai, K. Hinotozawa, Y. Takahashi, J. Kato, A. Nakagawa, A. Hirano, H. Shimizu, K. Haneda, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 645-652.
- 131 D.C. Hopp, D.J. Milanowski, J. Rhea, D. Jacobsen, J. Rabenstein, C. Smith, K. Romari, M. Clarke, L. Francis, M. Irigoyen, M. Luche, G.J. Carr, U. Mocek, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 2032-2035.
- 132 G.T. Carter, D.B. Borders, J.J. Goodman, J. Ashcroft, M. Greenstein, W.M. Maise, C.J. Pearce, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* **1991**, 2215-2219.
- 133 G.T. Carter, J.A. Nietzsche, D.R. Williams, D.B. Borders, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 504-512.
- 134 A.J. Peoples, Q. Zhang, W.P. Millett, M.T. Rothfeder, B.C. Pescatore, A.A. Madden, L.L. Ling, C.M. Moore, *J. Antibiot.* **2008**, *61*, 457-463.
- 135 R. Ratnayake, E. Lacey, S. Tennant, J.H. Gill, R.J. Capon, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 1610-1619.
- 136 T.M. Lee, G.T. Carter, D.B. Borders, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 1771-1772.
- 137 Y. Koizumi, H. Tomoda, A. Kumagai, X.-P. Zhou, S. Koyota, T. Sugiyama, *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 322-326.
- 138 M. Chu, I. Truumees, R. Mierzwa, J. Terracciano, M. Patel, D. Loebenberg, J.J. Kaminski, P. Das, M.S. Puar, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 525-528.
- 139 R. Cooper, I. Truumees, I. Gunnarsson, D. Loebenberg, A. Horan, J. Marquez, M. Patel, V. Gullo, M. Puar, P. Das, S. Mittelman, *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 444-453.
- 140 A.I. Gurevich, M.G. Karapetyan, M.N. Kolosov, V.N. Omelchenko, V.V. Onoprienko, G.I. Petrenko, S.A. Popravko, *Tetrahedron Lett.* **1972**, *18*, 1751-1754.
- 141 World Intellectual Property Organization; WO 01/95909 A1; 2001.12.20; C. Kempter, U. Roos, F. Schroeder, E. Lacey, J.H. Gill, K. Heiland; Novartis AG, Novartis-Erfindungen Verwaltungsgesellschaft m.b.H., Microbial Screening Technologies PTY. Limited; PR 00111957.7 200.06.16.
- 142 A.I. Gurevich, T.N. Deshko, G.A. Kogan, M.N. Kolosov, V.V. Kudryashova, V.V. Onoprienko, *Tetrahedron Lett.* **1974**, *33*, 2801-2804.
- 143 K. Kobayashi, C. Nishino, J. Ohya, S. Sato, T. Mikawa, Y. Shiobara, M. Kodama, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 741-750.
- 144 L. Malet-Casón, F. Romero, F. Espliego-Vásquez, D. Grávalos, J. L. Fernández-Puentes, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 219-225.

- ¹⁴⁵ J. Castro Rodríguez, J. L. Fernández Puentes, J. Pérez Baz, L. M. Cañedo, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 318-321.
- ¹⁴⁶ Y. Terui, C. Yiwen, L. Jun-ying, T. Ando, H. Yamamoto, Y. Kawamura, Y. Tomishima, S. Uchida, T. Okazaki, E. Munemento, T. Seki, K. Yamamoto, S. Murakami, A. Kawashima, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5427-5430.
- ¹⁴⁷ W. Zhang, L. Wang, L. Kong, T. Wang, Y. Chu, Z. Deng, D. You, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 422-432.
- ¹⁴⁸ H.R. El-Seedi, D.M.H. El-Ghorab, M.A. El-Barbary, M.F. Zayed, U. Göransson, S. Larsson, R. Verpoorte, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 2581-2626. (Review)
- Y. Wang, Z. Zheng, S. Liu, H. Zhang, E. Li, L. Guo, Y. Che, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 920-924.
- F. Zelefact, D. Guilet, N. Fahre, C. Bayet, S. Chevalley, S. Ngouela, B.N. Lenta, A. Valentin, E. Tsamo, M.-G. Dijoux-Franca, *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 954-957.
- H. Kikchi, T. Ohtsuki, T. Koyano, T. Kowithayakorn, T. Sakai, M. Ishibashi, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 452-455.
- K. Motohashi, M. Takagi, H. Yamamura, M. Hayakawa, K. Shin-ya, *J. Antibiot.* **2010**, *63*, 545-548.
- Y. Ren, L.B.S. Kardono, S. Riswan, H. Chai, N.R. Farnsworth, D.D. Soejarto, E.J. Carcache de Blanco, A.D. Kinghorn, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 949-955.
- Y.-h. Duan, Y. Dai, G.-h. Wang, X. Zhang, H.-f. Chen, J.-b. Chen, X.-s. Yao, X.-k. Zhang, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1283-1287.
- ¹⁴⁹ K.-S. Masters, S. Bräse, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3717-3776.
- ¹⁵⁰ P. Wiemann, A. Willmann, M. Straeten, K. Kielgrewe, M. Beyer, H.-U. Humpf, B. Tudzynski, *Mo. Microbiol.* **2009**, *72*, 931-946.
- ¹⁵¹ M.C. Limón, R. Rodríguez-Ortiz, J. Avalos, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 21-29.
- ¹⁵² Mündliche Mitteilung Tilmann Weber, **2011**.
- ¹⁵³ H.-P. Fiedler, *Nat. Prod. Lett.* **1993**, *2*, 119-128.
- ¹⁵⁴ T. Weber, C. Rausch, P. Lopez, I. Hoof, V. Gaykova, D.H. Huson, W. Wohlleben, *J. Biotechnol.* **2009**, *140*, 13-17.
- ¹⁵⁵ H. Zhou, Y. Li, Y. Tang, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 839-868.
- ¹⁵⁶ C.-Y. Kim, H.-J. Park, E.-S. Kim, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *13*, 819-822.
- ¹⁵⁷ Y. Tang, T. S. Lee, C. Khosla, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, 0227-0238.
- ¹⁵⁸ R.J.X. Zawada, C. Khosla, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 607-615.

- 159 Y. Tang, T. S. Lee, S. Kobayashi, C. Khosla, *Biochemistry* **2003**, *42*, 6588-6595.
- 160 P. Beltran-Alvarez, R.J. Cox, J. Crosby, T.J. Simpson, *Biochemistry*, **2007**, *46*, 14672-14681.
- 161 A.T. Keatinge-Clay, D.A. Maltby, K. Medzihradzky, C. Khosla & R.M. Stroud, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 888-893.
- 162 Y. Tang, T. S. Lee, H. Lee, C. Khosla, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7659-7671.
- 163 B.S. Moore, J. Piel, *Antonie van Leeuwenhoek* **2000**, *78*, 391-398.
- 164 K.M. Byrne, B.D. Hilton, R.J. White, R. Misra, R.C. Pandey, *Biochemistry* **1985**, *24*, 478-486.
- 165 E. Wendt-Pienkowski, Y. Huang, J. Zhang, B. Li, H. Jiang, H. Kwon, C.R. Hutchinson, B. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16442-16452.
- 166 P.-H. Szu, S. Govindarajan, M.J. Meehan, A. Das, D.D. Nguyen, P.C. Dorrestein, J. Minshull, C. Khosla, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1021-1031.
- 167 Y. Chen, E. Wendt-Pienkowski, S.R. Rajsiki, B. Shen, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 24735-24743.
- 168 A. Das, P.-H. Szu, J.T. Fitzgerald, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8831-8833.
- 169 T.P. Nicholson, C. Winfield, J. Westcott, J. Crosby, T.J. Simpson, R.J. Cox, *Chem. Commun.* **2003**, 686-687.
- 170 Y. Tang, A.T. Koppisch, C. Khosla, *Biochemistry* **2004**, *43*, 9546-9555.
- 171 M. Metsä-Ketelä, K. Palmu, T. Kunnari, K. Ylihonko, P. Mäntsälä, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 1291-1296.
- 172 V.B. Rajgarhia, W.R. Strohl, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 2690-2696.
- 173 K. Ishida, K. Fritzsche, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12648-12649.
- 174 K. Fritzsche, K. Ishida, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8307-8316.
- 175 S.R. Nadkarni, M.V. Patel, S. Chatterjee, E.K.S. Vijayakumar, K.R. Desikan, J. Blumbach, B.N. Ganguli, M. Limbert, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 334-341.
- 176 Persönliche Mitteilung Macherey-Nagel **2009**.
- 177 T. Gwinner, *Dissertation*, Eberhard Karls Universität Tübingen, **2008**.
- 178 Mündliche Mitteilung, PROF. DR. WINKELMANN aus Tübingen, Fachbereich Biologie, **2011**.
- 179 Chapman and Hall, *Dictionary of Natural Products on DVD*, Version 20:2, CRC Press; January **2012**.

- 180 I.-K. Lee, Y.-S. Kim, Y.-W. Jang, J.-Y. Jung, B.-S. Yun, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6678-6681.
- 181 J.-P. Kim, B.-S. Yun, Y. K. Shim, I.-D. Yoo, *Tet. Lett.* **1999**, *40*, 6643-6644.
- 182 I.-K. Lee, S.-J. Seok, W.-K. Kim, B.-S. Yun, *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 299-301.
- 183 M. Hara, T. Takiguchi, T. Ashizawa, K. Gomi, H. Nakano, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 33-39.
- 184 Y. Uosaki, T. Yasuzawa, M. Hara, Y. Saitoh, H. Sano, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 40-44.
- 185 W.F. Fleck, D.G. Strauss, H. Prauser, *Z. Allg. Mikrobiol.* **1980**, *20*, 543-551.
- 186 L.H. Pham, J. Vater, W. Rotard, C. Mügge, *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 710-723.
- 187 T. Aoyama, F. Kojima, F. Abe, Y. Muraoka, H. Naganawa, T. Takeuchi, T. Aoyagi, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 914-920.
- 188 Z. Xu, A. Schenk, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6022-6030.
- 189 G. Lackner, A. Schenk, Z. Xu, K. Reinhardt, Z.S. Yunt, J. Piel, C. Hertweck, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9306-9312.
- 190 M. Tsunakawa, M. Nishio, H. Ohkuma, T. Tsuno, M. Konishi, T. Naito, T. Oki, H. Kawaguchi, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2532-2536.
- 191 M. Kakushima, Y. Sawada, M. Nishio, T. Tsuno, T. Oki, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2636-2539.
- 192 K. Tomita, M. Nishio, K. Saitoh, H. Yamamoto, Y. Hoshino, H. Ohkuma, M. Konishi, T. Miyaki, T. Oki, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 755, 762.
- 193 T. Oki, O. Tenmyo, M. Hirano, K. Tomatsu, H. Kamei, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 763-770.
- 194 Y. Sawada, M. Nishio, H. Yamamoto, M. Hatori, T. Miyaki, M. Konishi, T. Oki, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 771-777.
- 195 Y. Sawada, T. Tsuno, H. Yamamoto, M. Nishio, M. Konishi, T. Oki, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1367-1374.
- 196 S. Kondo, S. Gomi, K. Uotani, S. Inouye, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 123-129.
- 197 T. Yasuzawa, M. Yoshida, K. Shirahata, H. Sano, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1111-1114.
- 198 Y. Matsuda, H. Kase, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1104-1110.
- 199 N.N. Gerber, M.P. Lechevalier, *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 2818-2821.
- 200 R.W. Rickards, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 336-339.

- 201 U. Takeda, T. Okada, M. Takagagi, S. Gomi, J. Itoh, M. Sezaki, M. Ito, S. Miyadoh, T. Shomura, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 417-424.
- 202 S. Gomi, T. Sasaki, J. Itoh, M. Sezaki, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 425-432.
- 203 F. Kudo, T. Yonezawa, A. Komatsubara, K. Mizoue, T. Eguchi, *J. Antibiot.* **2011**, *64*, 123-132.
- 204 T.J. Walsh, N. Giri, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1997**, *16*, 93-97.
- 205 C.E. Gonzalez, A.H. Groll, N. iri, D. Shetty, I. Al-Mohsen, T. Sein, E. Feuerstein, J. Bacher, S. Piscitelli, T.J. Walsh, *Antimicrob. Agents, Chemother.* **1998**, *42*, 2399-2404.
- 206 J. Balzarini, K. van Laethem, D. Daelemans, S. Hatse, A. Bugatti, M. Rusnati, Y. Igarashi, T. Oki, D. Schols, *J. Virol.* **2007**, *81*, 362-373.
- 207 N. Hayat, *Dissertation*, Paderborn, **1999**.
- 208 M. Kitamura, K. Ohmori, T. Kawase, K. Suzuki, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1308-1311.
- M. Kitamura, K. Ohmori, T. Kawase, K. Suzuki, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1229-1232.
- 209 M. Tamiya, K. Ohmori, M. Kitamura, H. Kato, T. Arai, M. Oorui, K. Suzuki, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9791-9823.
- 210 K.Fujikawa, Y. Tsukamoto, T. Oki, Y. Chuan-Lee, *Glycobiology* **1998**, *8*, 407-414.
- 211 M. Hu, Y. Ishizuka, Y. Igarashi, T. Oki, H. Nakanishi, *Spectrochim. Acta, Part A* **1999**, 2547-2558.
- 212 Kim, B. Chul, J.M. Lee, J.S. Ahn, B.S. Kim, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *17*, 830-839.
- 213 J. Zhan, K. Watanabe, Y. Tang, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1710-1715.
- 214 J. Zhan, K. Qiao, Y. Tang, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1447-1452.
- 215 Z. Feng, D. Kallifidas, S.F. Brady, *P.Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 12629-12634.
- 216 Mündliche Mitteilung Markus Kramer **2012**.
- 217 Mündliche Mitteilung Tilmann Weber **2012**.
- 218 J.A. Hasler, R. Estabrook, M. Murray, I. Pikuleva, M. Waterman, J. Capdevila, V. Holla, C. Helvig, J.R. Falck, G. Farrell, L.S. Kaminsky, S.D. Spivack, E. Boitier, P. Beaune, *Mol. Aspects Med.* **1999**, *20*, 1-137.
- 219 P.J. Magalhães, J.S. Vieira, L.M. Gonçalves, J.G. Pacheco, L.F. Guido, A.A. Barros, *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3258-3268.
- 220 H.W. Wen, W. Borejsza-Wysocki, T.R. DeCory, A.J. Baeumer, R. A. Durst, *Eur. Food. Res. Technol.* **2005**, *221*, 564-569.

- 221 C. Gopal, M. Rehmanji, *Brewers' Guardian*, May **2000**.
- 222 A.E. Mitchell, Y.-J. Hong, J.C. May, C.A. Wright, C.W. Bamforth, *J. Inst. Brew.* **2004**, 1-20.
- 223 M. Hara, T. Mokudal, E. Kobayashi, K. Gomi, H. Nakano, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1513-1518.
- 224 M. Yoshida, M. Hara, Y. Saitoh, H. Sano, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1519-1523.
- 225 <http://stainsfile.info/StainsFile/jindex.html>; STAND: 01.07.**2012**.
- 226 L.F. Fieser, *Reduction Products of Naphthacenequinone* **1931**, *53*, 2329-2341.
- 227 T. Lapidot, S. Harel, B. Akiri, R. Granit, J. Kanner, *J. Agric. Food. Chem.* **1999**, *47*, 67-70.
- 228 Y. Matsuda, K. Asano, I. Kawamoto, H. Kase, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1092-1100.
- 229 M.D. Houslay, P. Schafer, K.Y.J. Zhang, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 1503-1519.
- 230 V. Boswell-Smith, D. Spina, C.P. Page, *Brit. J. Pharmacol.* **2006**, *147*, S252-S257.
- 231 D. Schulz, P. Beese, B. Ohlendorf, A. Erhard, H. Zinecker, C. Dorador, J.F. Imhoff, *J. Antibiot.* **2011**, *64*, 763-768.
- 232 J. K. Millar, B.S. Pickard, S. Mackie, R. James, S. Christie, S.R. Buchanan, M.P. Malloy, J.E. Chubb, E. Huston, G.S. Baillie, P.A. Thomson, E.V. Hill, N.J. Brnadon, J.-C. Rain, L.M. Camargo, P.J. Whiting, M.D. Houslay, D.H.R. Blackwood, W.J. Muir, D.J. Porteous, *Science* **2005**, *310*, 1187-1191.
- 233 S.-J. Park, F. Ahmad, A. Philp, K. Baar, T. Williams, H. Luo, H. Ke, H. Rehmann, R. Taussig, A.L. Brown, M.K. Kim, M.A. Beaven, A.B. Burgin, V. Manganiello, J.H. Chung, *Cell* **2012**, *148*, 421-433.
- 234 S.J. Kanes, J. Tokarczyk, S.J. Siegel, W. Bilker, T. Abel, M.P. Kelly, *Neurosciences* **2007**, *144*, 239-246.
- 235 M.D. Houslay, G.S. Billie, D.H. Maurice, *Circ. Res.* **2007**, *100*, 950-966.
- 236 E. Merck, *Anfärbereagenzien für die Dünnschicht- und Papierchromatographie*, Merck, Darmstadt, **1980**.
- 237 www.carlroth.com STAND: 16.07.**2012**.
- 238 A.I. Scott, C.A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwara, R.J. Cushley, P.J. Whitman, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 8069-8080.
- 239 E. Hahn-Deinstrop, *Applied Thin-Layer Chromatography*, Second, Revised and Enlarged Edition, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2007**.
- 240 Mündliche Mitteilung von Alexander Seyboldt; Arbeitskreis Kunz; Anorganische Chemie **2011**.

- 241 H. Li, L. Duan, D. Zhang, G. Dong, L. Wang, Y. Qin, *J. Cryst. Growth* **2008**, *310*, 2537-2542.
- 242 T. Aoyama, T. Shiori, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5507-5508.
- 243 A. Presser, A. Hüfner, *Monatsh. Chem.* **2004**, *135*, 1015-1022.
- 244 E. Kühnel, D.D.P. Laffan, G.C. Lloyd-Jones, T. Martínez del Campo, I.R. Shepperson, J.L. Slaughter, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7205-7208.
- E. Kühnel, D.D.P. Laffan, G.C. Lloyd-Jones, T. Martínez del Campo, I.R. Shepperson, J.L. Slaughter, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7075-7078.
- 245 R.A.W. Johnstone, M.E. Rose, *Tetrahedron* **1979**, *35*, 2169-2173.
- 246 P.M. Kendall, J.V. Johnson, C.E. Cook, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1421-1424.
- 247 T. Aoyama, S. Terasawa, K. Sudo, T. Shioiri, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3759-3760.
- 248 S. Ouk, S. Thiébaud, E. Borredon, P. Le Gars, *Appl. Catal., A* **2003**, *241*, 227-233.
- 249 A. Nakagawa, S. Ōmura, K. Kushida, H. Shimizu, G. Lukacs, *J. Antibiot.* **1987**, *XL (3)*, 301-308.
- 250 S. Kotha, V.R. Shah, K. Mandal, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1159-1172.
- 251 D. Mal, S. Ray, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 3014-3020.
- 252 R.A.W. Johnstone, M.E. Rose, *Tetrahedron* **1979**, *35*, 2169-2173.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Stephanie Grond für die Überlassung dieses interessanten Themas, für das stetige Interesse am Fortgang dieser Arbeit und ihrer Diskussionsbereitschaft.

Ich möchte mich bei unseren technischen Assistenten Hans-Jörg Langer (Göttingen) und Verena Metzler (Tübingen) bedanken. Bei verschiedenen Fragestellungen waren sie immer hilfsbereit und standen mir mit Rat und Tat zur Seite.

Ein sehr großer Dank geht an die NMR-Abteilung an der Georg-August-Universität Göttingen. Die Aufnahme der Spektren wurde von Herrn Machinek, Carola Zolke, Martin Weitemeyer und Christiane Siebert durchgeführt. Danke für die geduldige Bearbeitung und Spreitzung der NMR-Spektren. Weiterhin danke ich der NMR-Abteilung der Eberhard Karls Universität Tübingen. Hier bedanke ich mich besonders bei Paul Schuler und Markus Kramer. Durch gute Hilfestellung und Diskussionen konnten verschiedene Probleme beseitigt werden. Danke für Eure Geduld. Auch möchte ich den NMR-Operatoren (Melanie Quitschau [Göttingen] und Martina Wölfler [Tübingen]) aus dem Arbeitskreis Grond dafür danken, dass sie meine Spektren aufgenommen haben und damit manchmal ihre kostbare Zeit am Wochenende geopfert haben.

Die Massenspektren wurden in Göttingen von Herrn Frauendorf und Györgyi Sommer-Udvarnoki und in Tübingen von Frau Wistuba aufgenommen und bearbeitet. Vielen Dank für Ihre Geduld und Hilfe, um einige Fragestellungen erfolgreich abzuschließen. Auch bedanke ich mich ganz herzlich für die Aufnahme von LC-ESI-MS Spektren sowie für die Einweisung zum selber messen bei Daniel Vollmar (Göttingen). Ein sehr großer Dank gilt Dipl. Ing. Andreas Kulik aus dem AK Fiedler (Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Fachbereich Biologie). Mit einem sehr großen Know-How und dem Messen von sehr vielen LC-MS-Messungen stand er mir sehr hilfreich beiseite. Danke schön!

Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. T. Weber bedanken, für sein stetes Interesse und für seine Gesprächsbereitschaft gerade wenn es um die in seinem Arbeitskreis durchgeführten genetischen Vorarbeiten ging.

Ein sehr großer Dank geht an die Korrekturleser dieser Arbeit: Dorothee Weisbrod, Martina Wölfle, Philipp Jetter, Nadja Burkard, Martin Konnerth, Karin Fleßner und Inger Hofeditz. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht das, was sie jetzt ist.

Ich danke allen Mitgliedern des Arbeitskreises (Jan, Matthias, Florian, Martin, Nadja, Martina, Dorothee, Philipp, Verena, Christian, Klaus), den Ehemaligen, die ich kennenlernen durfte (Melanie, Daniel, Philip, Nadine) den Mitarbeitern der Firma BioViotica (Verena, Michaela, Hans-Peter), sowie Frau Gisela Gastrock und Marianne Wagner für ein stets sehr gutes und ausgewogenes Arbeitsklima an der Uni.

Weiterhin möchte ich einen großen Dank an alle aussprechen, die mich während dieser Zeit begleitet haben und auch mit verantwortlich für die schönen Stunden außerhalb der Uni waren.

Zu guter Letzt möchte ich einen sehr großen Dank an meine Eltern, meine Geschwister und an Karin richten. Sie waren immer für mich da, haben mich unterstützt und teilweise auch aufgemuntert, wenn es nötig war. Danke!!!