

**UNIVERSITÄT  
BAYREUTH**

**Studien zu den RIESKE-Oxygenasen JerP und JerL  
der Jerangolid Biosynthese**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

**Florian Guth**

geb. am 18.06.1995 in Bamberg

**Bayreuth, August 2024**

---

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen Juni 2019 und Juli 2024 an der Professur Organische Chemie (Lebensmittelchemie) der Universität Bayreuth unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Frank Hahn angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Art der Dissertation: Monographie

Dissertation eingereicht am: 22.08.2024

Zulassung durch die Promotionskommission: 25.09.2024

Wissenschaftliches Kolloquium: 26.02.2025

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Cyrus Samimi

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Frank Hahn (Gutachter)

Prof. Dr. Carlo Unverzagt (Gutachter)

Prof. Dr. Andreas Möglich (Vorsitz)

Prof. Dr. Johannes Brendel

---

Teile dieser Dissertation (Monographie) sind bereits in den folgenden Publikationen erschienen:

1. F. Hahn, F. M. Guth, *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37*, 1300–1315.

<https://doi.org/10.1039/D0NP00012D>

Diese Publikation ist in vorliegender Arbeit mit Literaturstelle [20] zitiert.

2. F. M. Guth, F. Lindner, S. Rydzek, A. Peil, S. Friedrich, B. Hauer, F. Hahn, *ACS Chem. Biol.* **2023**, *18*, 2450–2456.

<https://doi.org/10.1021/acscchembio.3c00498>

Diese Publikation ist in vorliegender Arbeit mit Literaturstelle [97] zitiert.

Mitwirkung an folgender Publikation:

3. S. Rydzek, F. Guth, S. Friedrich, J. Noske, B. Höcker, F. Hahn, *ChemCatChem* 2024, *16*, e202400883. <https://doi.org/10.1002/cctc.202400883>

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VI</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>7</b>
<b>2 SUMMARY</b>	<b>10</b>
<b>3 EINLEITUNG</b>	<b>13</b>
3.1 Polyketide	15
3.2 Jerangolide	21
3.3 RIESKE-Oxygenasen	25
3.4 RIESKE-Oxygenasen in <i>tailoring</i> -Prozessen des Sekundärmetabolismus	33
<b>4 STAND DER FORSCHUNG</b>	<b>40</b>
4.1 Totalsynthesen der Jerangolide	40
4.2 <i>In vitro</i> -Enzymaktivitätstests der RIESKE-Oxygenasen JerP und JerL	47
<b>5 ZIELSETZUNG</b>	<b>51</b>
<b>6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>53</b>
6.1 Substratsynthese	53
6.2 <i>In silico</i> -Studien der Jerangolid RIESKE-Oxygenasen	75
6.3 Replikation der <i>in vitro</i> -Experimente zu JerP und JerO	83
6.4 Klonierungsstrategien	86
6.5 Expressionsstudien	89
6.6 <i>In vivo</i> -Enzymreaktionstests	93
<b>7 EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>116</b>
7.1 Chemische Arbeiten	116
7.2 Molekularbiologische & biochemische Arbeiten	150
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>170</b>
<b>9 ANHANG</b>	<b>178</b>
9.1 NMR-Spektren	178
9.2 Materialien & Geräte	206

---

9.3	Gelelektrophorese	217
9.4	Protein-MS-MS-Analysen	222
9.5	Abbildungen <i>in silico</i> -Studien	225
9.6	Entwicklungsprozess des optimierten <i>in vivo</i> -Enzymreaktions-protokolls	227
9.7	UPLC-MS Chromatogramme	229
9.8	HRMS-Analyse	277
9.9	Tabelle/Umsätze	280
<b>DANKSAGUNG</b>		<b>285</b>
<b>(EIDESSTATTLICHE) VERSICHERUNGEN UND ERKLÄRUNGEN</b>		<b>286</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

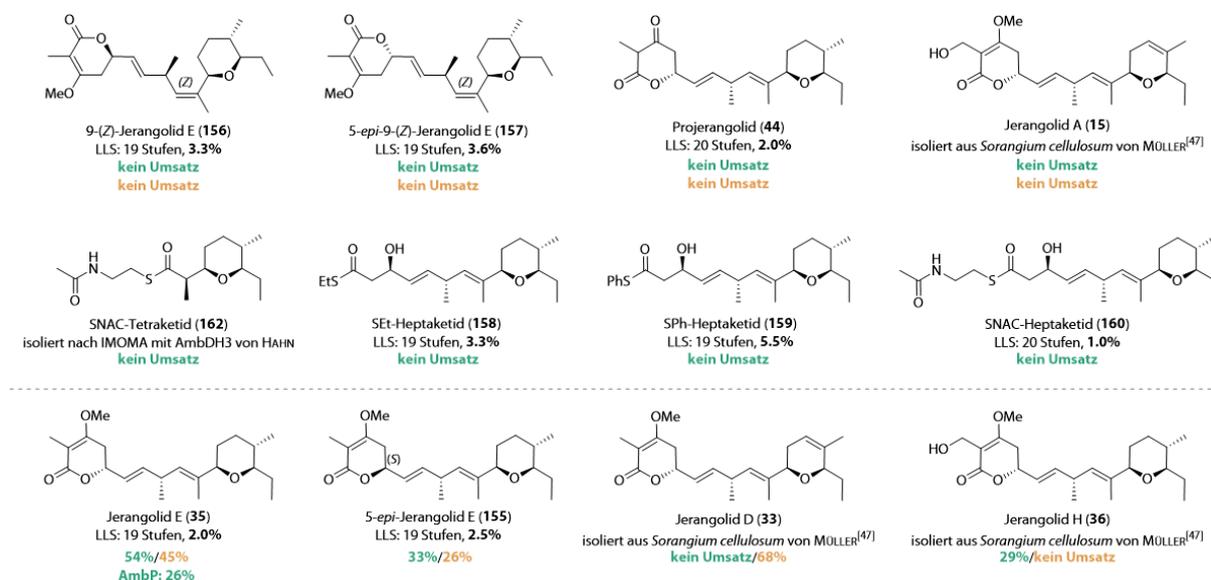
2YT	<i>double yeast/tryptone</i> , zweifache Menge Hefeextrakt/Trypton
abs.	absoluiert
Ac	Acetyl
ACP	Acyl-Carrier-Protein
<i>amb/Amb</i>	Gene/Proteine der Ambruticin Biosynthese
Äq.	Äquivalente
AT	Acetyltransferase
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
Bu	Butyl
CoA	Coenzym A
DBU	1.8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DH	Dehydratase
DHP	Dihydropyran
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMP	Dess-Martin-Periodinan
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
<i>d.r.</i>	<i>diastereomeric ratio</i> , Diastereomerenverhältnis
<i>e.e.</i>	<i>enantiomeric excess</i> , Enantiomerenüberschuss
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Enoylreduktase
ESI	Elektronensprayionisation
Et	Ethyl
gef.	gefunden
gew.-%	Gewichtsprozent
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His <sub>6</sub>	Hexahistidin
HOG	<i>high osmolarity glycerol</i>
(U)HPLC	<i>(ultra) high performance liquid chromatography</i>
HV	<i>headspace vial</i>
IBs	<i>inclusion bodies</i>
IMOMA	intramolekulare Oxa-MICHAEL-Addition
IPTG	Isopropyl-β-d-1-thiogalactopyranosid
<i>i</i> -PrOH	<i>iso</i> -Propylalkohol
<i>jerP</i> / <i>JerP</i>	Gene/Proteine der Jerangolid Biosynthese
konz.	konzentriert
KR	Ketoreduktase
KS	β-Ketoacylsynthase

---

MBP	<i>maltose-binding protein</i> , Maltosebindeprotein
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MPW	Milliporewasser
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PE	Petrolether (40 – 60 °C)
Ph	Phenyl
PhMe	Toluol
PKS	Polyketidsynthase
ppm	<i>parts per million</i>
PPTS	Pyridin- <i>para</i> -toluolsulfonat
quant.	quantitative Ausbeute
RO	RIESKE-Oxygenase
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
ges.	gesättigt
SAM	S-Adenosylmethionin
SNAC	<i>N</i> -(2-Mercaptoethyl)acetamid
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBSOTf	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyltrifluormethansulfonat
TE	Thioesterase
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
TMS	Trimethylsilyl
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
vol.-%	Volumenprozent
xg	x-Faches der Erdbeschleunigung
ΔT	Erhitzen auf Siedetemperatur

# 1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die bisher wenig charakterisierte Gruppe der RIESKE-Oxygenasen des Sekundärmetabolismus um die Enzyme JerP und JerL der Jerangolid-Biosynthese erweitert. In Zuge dessen wurde außerdem der Biosyntheseweg hinsichtlich Zeitpunktes und Reihenfolge der Oxidationen aufgeklärt sowie das Potential der ROs für chemoenzymatische Totalsynthesen evaluiert. Zu Beginn wurden JerP und JerL mittels *in silico*-Studien erfolgreich anhand charakteristischer Sequenzmotive als ROs identifiziert und die Struktur derer an simulierten 3D-Proteinmodellen untersucht. Zur Realisierung der Enzymreaktion wurde ein Co-Expressionssystem am Beispiel von pET-Duet™-1\_gerP\_gerO in *E. coli* C41-CmpX13 etabliert. Dazu wurden zunächst die entsprechenden Gene kloniert und anschließend Versuchsreihen zur Expression durchgeführt. Durch die Co-Expression von Reduktase und RO im Vektor pET-Duet™-1 konnte durch eine gegenseitige Stabilisierung der Proteine eine erfolgreiche Produktion aktiver Enzyme erreicht werden. Die Übertragung des Verfahrens auf das homologe AmbP und JerL war ebenfalls erfolgreich. Aufgrund der Empfindlichkeit der ROs gegenüber äußeren Einflüssen sowie der schwierigen Isolation der Proteine wurde das Enzymreaktionssystem in *in vivo*-Enzymreaktionstests verwendet.

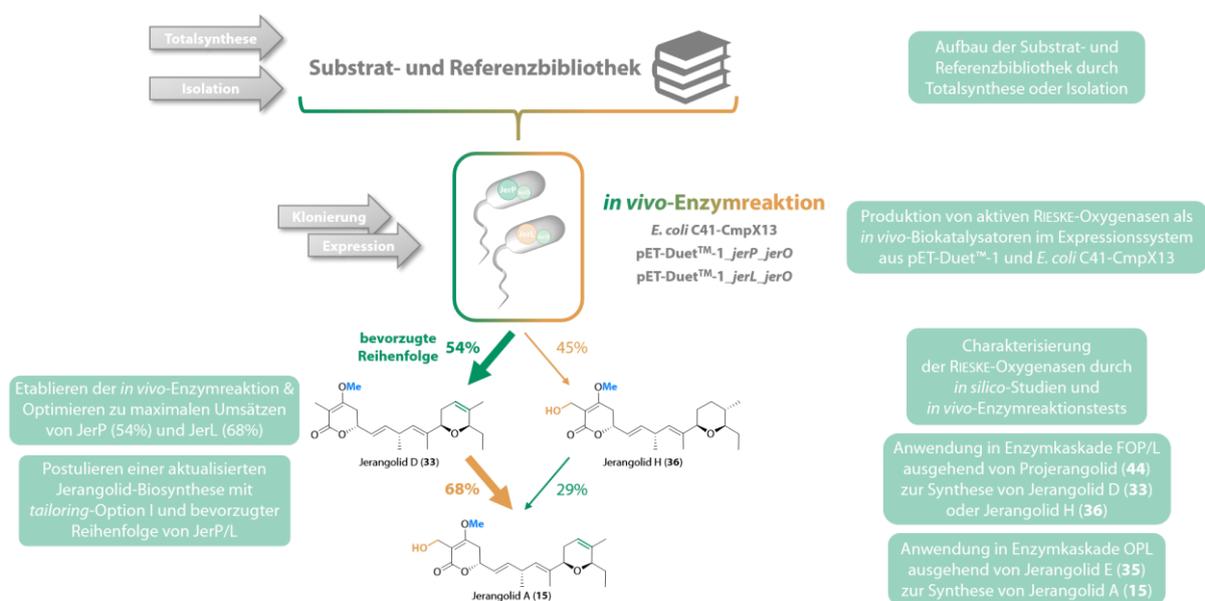


**Abbildung 1-1.** Übersicht der aufgebauten Substrat- und Referenzbibliothek mit Angabe der Darstellungsmethode und im Falle einer Totalsynthese inklusive LLS und isolierter Ausbeute sowie Angabe des Umsatzes von *in vivo*-Enzymreaktionstests mit JerP, AmbP und JerL. (A) von ROs nicht akzeptierte Substrate, (B) durch mindestens eine RO umgesetzt Substrate.

Der dazu benötigte postulierte biosynthetische Vorläufer Jerangolid E (35), dessen Derivate (155-157) sowie weitere Substrate (44, 158-160) wurden gemäß einem etablierten Totalsyntheseprotokoll<sup>[1]</sup> in ausreichenden Mengen und Ausbeuten dargestellt. Die weiteren

Substrate oder Referenzen **15**, **33**, **36** und **162** wurden dankenswerterweise von ROLF MÜLLER (HIPS SAARBRÜCKEN) oder durch den Arbeitskreis zur Verfügung gestellt (Abbildung 1–1).

Die Etablierung und Optimierung der *in vivo*-Enzymreaktion am Modellsystem von JerP/O ist in Kapitel 6.6.1 beschrieben. Im Rahmen der Optimierung konnten folgende Faktoren als entscheidend für den Umsatz mit den ROs identifiziert werden: die Wahl des Cofaktors NADH, die Sauerstoffverfügbarkeit, die Reaktionstemperatur sowie das Einführen eines Standardpräparationsprotokolls. Die Übertragung auf die verbleibenden ROs verlief ohne Komplikationen. Jerangolid E (**35**) konnte unter optimierten Bedingungen von JerP (54%), JerL (45%) und AmbP (26%) erfolgreich umgesetzt werden. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass JerO für beide ROs der Jerangolid-Biosynthese als regenerierende Reduktase dient. In weiteren charakterisierenden Experimenten konnte eine Lösungsmitteltoleranz gegenüber 5 v% DMSO, Methanol und Isopropanol sowie die Möglichkeit zur Lagerung der aktiven Zellkultur bei -80 °C für bis zu einem Monat ohne Aktivitätsverlust beobachtet werden. Im Rahmen nachfolgender *in vivo*-Enzymreaktionstests zur Substrattoleranz konnte eine hohe Spezifität der ROs beobachtet werden. Von den zwölf untersuchten Substraten konnten lediglich vier zum entsprechenden Produkt umgesetzt werden. Neben dem bereits erwähnten Jerangolid E (**35**) wurde dessen Epimer **155** zu 33% von JerP bzw. zu 26% von JerL umgesetzt. Des Weiteren konnte im Falle von JerP ein 29%iger Umsatz von Jerangolid H (**36**) und von JerL ein 68%iger Umsatz von Jerangolid D (**33**) beobachtet werden.



**Abbildung 1–2.** Erreichte Ziele während der Untersuchung der ROs der Jerangolid-Biosynthese mit Angabe des verwendeten *in vivo*-Enzymreaktionssystems sowie des postulierten *tailoring*-Prozesses ausgehend von Jerangolid E (**35**) mit bevorzugter Reihenfolge.

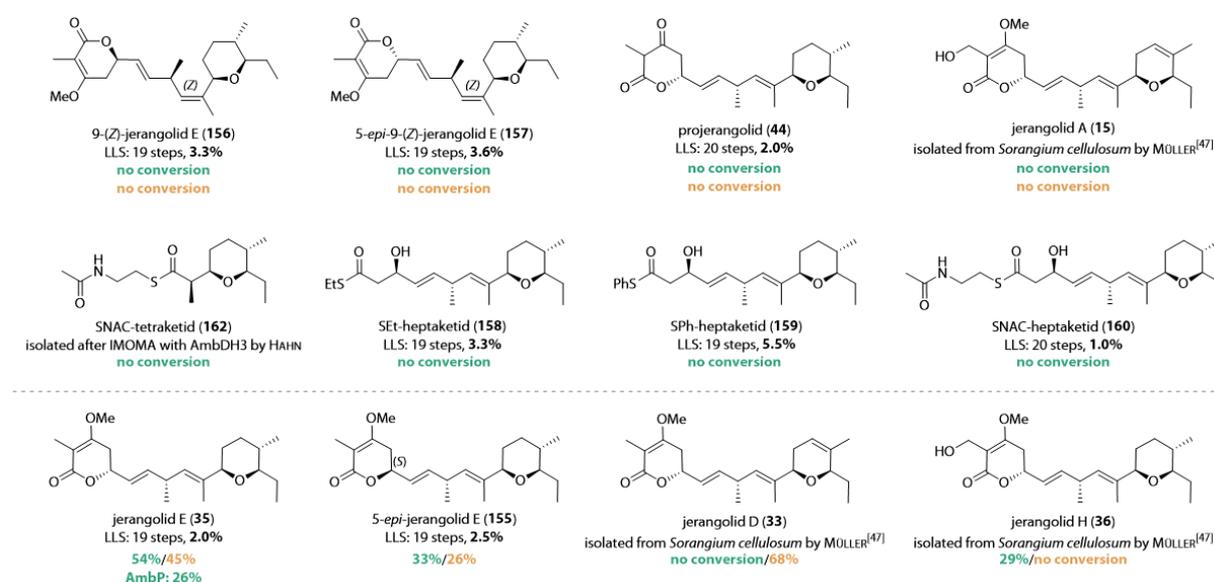
---

Die Ergebnisse der Substrattoleranztests ermöglichten eine weitere Aufklärung der Biosynthese der Jerangolid. Die ROs JerP und JerL sind ausschließlich während des *tailoring*-Prozesses nach vorgelagerter *O*-Methylierung des *post*-PKS-Produkts Projerangolid (**44**) mit der präferierten Reihenfolge Desaturierung gefolgt von Hydroxylierung aktiv (Abbildung 6–34). Die Aktivität zu einem früheren Zeitpunkt der Biosynthese konnte durch den fehlenden Umsatz von **44** und der Surrogate (**158-160**, **162**) ausgeschlossen werden. Diese These konnte durch Enzymkaskadenreaktionen ausgehend von **44**, in denen JerF mit einer der ROs kombiniert wurde bestätigt werden. Nur noch erfolgreicher *O*-Methylierung durch JerF zeigten die ROs Aktivität (Abbildung 6–35). Das zeigt wie essentiell dieses Strukturmotiv und wie hoch die Substratspezifität von ROs ist. Außerdem wurde das System aus JerP/L/O nach Co-Expression eingesetzt (Abbildung 6–36). In beiden Kaskadenreaktionen konnte das entsprechende Produkt erfolgreich erhalten werden, was einen möglichen Einsatz der ROs in chemoenzymatischen Naturstoff-Totalsynthesen andeutet. Auf diesen grundlegenden Erkenntnissen können zukünftige Studien zur Anwendung in chemoenzymatischen Naturstoff-Totalsynthesen aufgebaut und entwickelt werden.

Die umfangreichen Studien der RIESKE-Oxygenasen JerP und JerL als *in vivo*-Biokatalysatoren ermöglichten die Erweiterung der kleinen Gruppe der ROs des Sekundärmetabolismus um weitere Vertreter und trugen maßgeblich zur Aufklärung des Biosyntheseweges der Jerangolide bei (Abbildung 1–2). Dabei sind JerP und AmbP mit ihrer Eigenschaft, Desaturierung an nicht aktivierten Positionen zu katalysieren, innerhalb dieser Gruppe einzigartig und besonders interessant für zukünftige Forschung. Außerdem unterstreicht diese Arbeit erneut die bemerkenswerte Fähigkeit von ROs des Sekundärmetabolismus zur hochselektiven oxidativen Funktionalisierung komplexer molekularer Gerüste. Um einen noch detaillierteren Eindruck dieser vielversprechenden ROs zu bekommen, können zukünftige Studien den Fokus auf die Produktion gereinigter Enzyme für eine vollständige biochemische Charakterisierung, Strukturanalysen sowie *Protein-Engineering* richten.

## 2 Summary

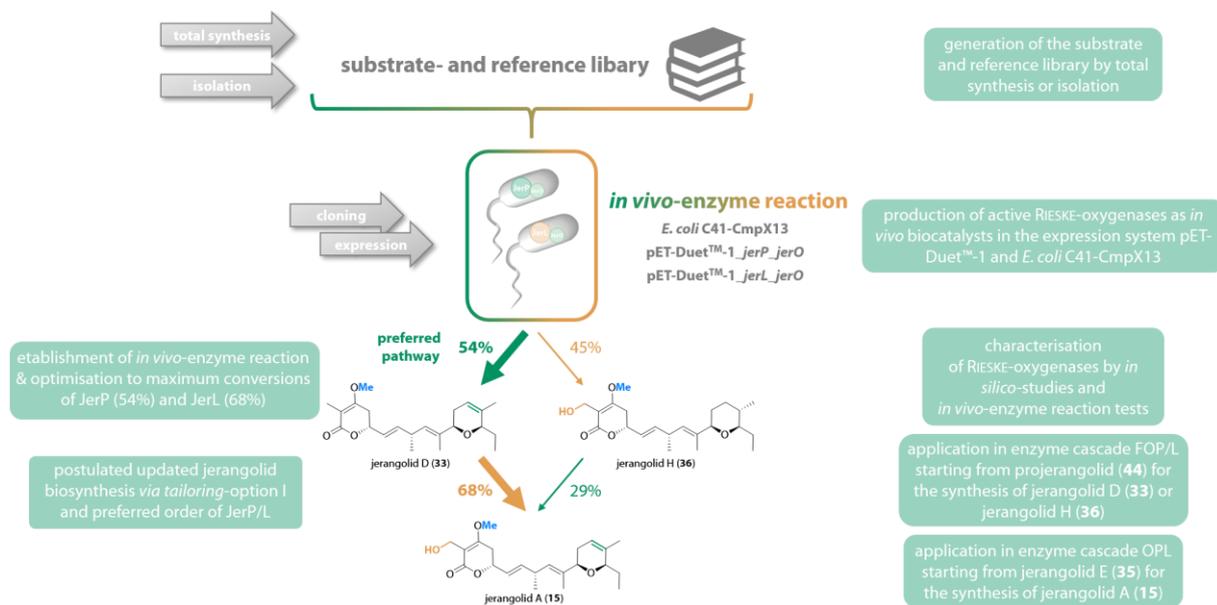
In the course of this work, the previously poorly characterised group of RIESKE-oxygenases of secondary metabolism was expanded to include the enzymes JerP and JerL of jerangolid biosynthesis. Also, the biosynthetic pathway was elucidated with regard to the timing and sequence of oxidations and the potential of the ROs for chemoenzymatic total syntheses was evaluated. Initially, JerP and JerL were successfully identified as ROs through *in silico* studies based on characteristic sequence motifs, and their structure was analysed using simulated three-dimensional protein models. To facilitate the enzyme reaction, a co-expression system was established using the pET-Duet™-1\_ *jerP\_jerO* construct in *E. coli* C41-CmpX13 as a model. To this end, the corresponding genes were initially cloned and subsequently subjected to a series of expression experiments. The co-expression of the reductase and RO in the pET Duet™-1 vector resulted in the successful production of active enzymes, which were stabilised by mutual interaction. The transfer of the process to the homologous AmbP and JerL was also successful. Due to the sensitivity of the ROs to external influences and the difficulty of isolating the proteins, the enzyme reaction system was used in *in vivo* enzyme reaction tests.



**Figure 2-1.** Overview of the generated substrate and reference library, with total synthesis, including LLS and isolated yield as well as details of the conversion of *in vivo* enzyme reaction tests with **JerP**, **AmbP** and **JerL**. (A) substrates not accepted by ROs, (B) substrates converted by at least one RO.

The postulated biosynthetic precursor jerangolid E (**35**), its derivatives (**155-157**) and additional substrates (**44**, **158-160**) were synthesised in sufficient quantities in accordance with an established total synthesis protocol.<sup>[1]</sup> The remaining substrates or references (**15**, **33**, **36** and **162**) were generously provided by ROLF MÜLLER (HIPS SAARBRÜCKEN) or by the working group itself

(Figure 2-1). The establishment and optimisation of the *in vivo* enzyme reaction using the JerP/O model system are described in detail in section 6.6.1. During the optimisation process, it was determined that the following factors were critical for the conversion with the ROs: the selection of the cofactor NADH, the availability of oxygen, the reaction temperature, and the implementation of a standard preparation protocol. The transfer to the remaining ROs was completed without incident. The conversion of jerangolid E (**35**) was successfully achieved under optimised conditions involving JerP (54%), JerL (45%) and AmbP (26%). Moreover, JerO was identified as a regenerating reductase for both ROs involved in the biosynthesis of jerangolid. Further characterisation experiments revealed that the cells were tolerant to solvents including 5 v% DMSO, methanol and isopropanol. Additionally, the active cell culture could be stored at -80 °C for up to one month without loss of activity. In subsequent *in vivo* enzyme reaction tests for substrate tolerance, a high degree of substrate specificity was observed for the ROs. Of the twelve substrates analysed, only four were converted to the corresponding product. In addition to the aforementioned jerangolid E (**35**), its epimer **155** was converted to 33% by JerP and 26% by JerL. Furthermore, a 29% conversion of jerangolid H (**36**) was observed in the case of JerP, and a 68% conversion of jerangolid D (**33**) was observed in the case of JerL.



**Figure 2-2.** Targets achieved during the investigation of the ROs of jerangolid biosynthesis with indication of the *in vivo* enzyme reaction system used and the postulated tailoring process starting from jerangolid E (**35**) with preferred pathway.

The results of the substrate tolerance tests facilitated a more detailed understanding of the jerangolid biosynthesis. The ROs JerP and JerL are exclusively active during the tailoring process following the upstream *O*-methylation of the *post*-PKS product projerangolid (**44**) with the preferred sequence desaturation followed by hydroxylation (Abbildung 6–34). The lack of

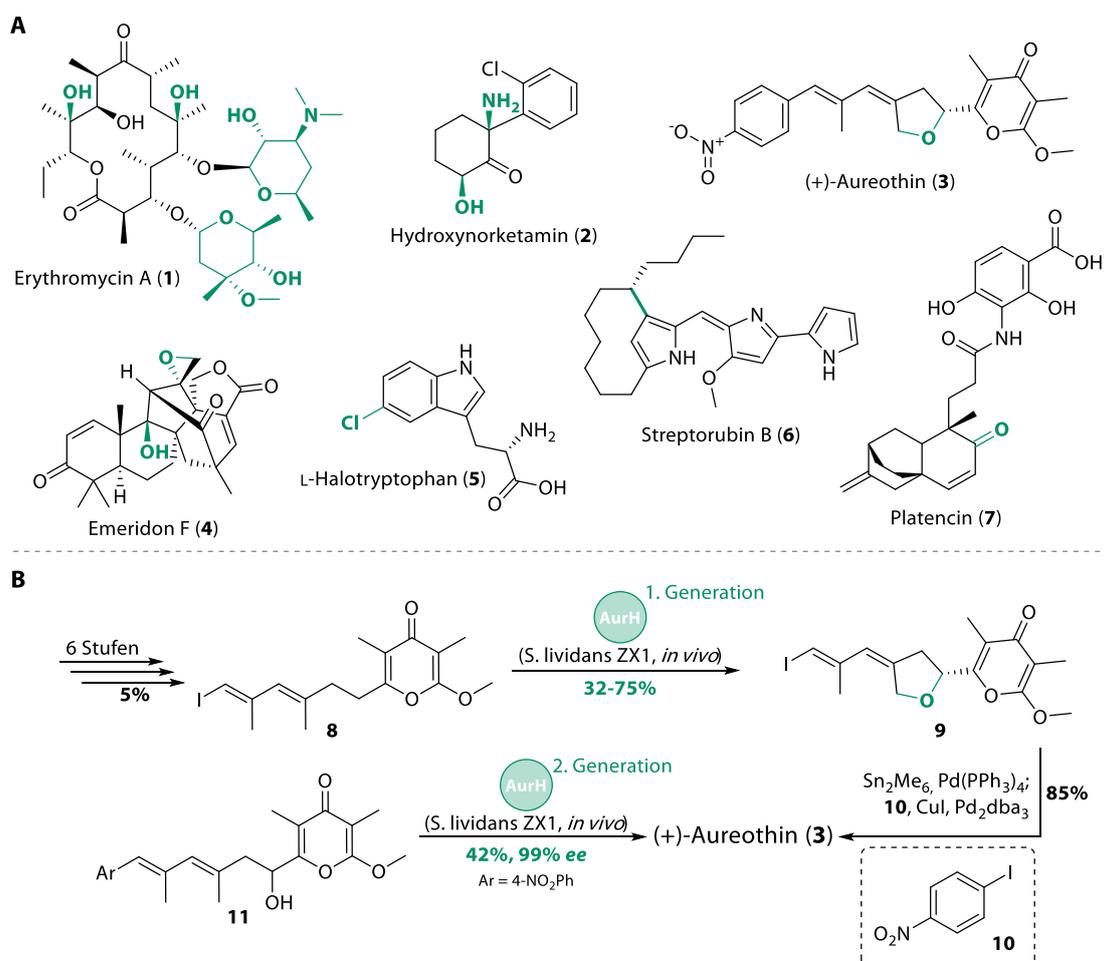
---

turnover of **44** and the surrogates (**158-160, 162**) excludes the possibility of activity at an earlier stage of biosynthesis. This hypothesis was corroborated by enzyme cascade reactions initiated from **44**, in which JerF was combined with either one of the ROs. The ROs exhibited activity solely following successful *O*-methylation by JerF (Abbildung 6–35). This illustrates the crucial role of this structural motif and the high substrate specificity of ROs. Furthermore, the JerP/L/O system was employed following co-expression (Abbildung 6–36). In both cascade reactions, the corresponding product was successfully obtained. These fundamental findings provide a foundation for future studies on the application of ROs in chemoenzymatic total syntheses of natural products.

The investigation of the RIESKE-oxygenases JerP and JerL as *in vivo* biocatalysts has facilitated the expansion of the limited group of ROs of secondary metabolism with additional representatives, thereby contributing considerably to the elucidation of the biosynthetic pathway of jerangolids (Figure 2-2). The unique ability of JerP and AmbP to catalyse desaturation at non-activated positions represents a significant advancement within this group, offering promising avenues for future research. Moreover, this work reiterates the remarkable capacity of ROs of secondary metabolism for highly selective oxidative functionalisation of complex molecular scaffolds. To gain a more comprehensive understanding of these promising ROs, future studies could concentrate on the production of purified enzymes for comprehensive biochemical characterisation, structural analysis and protein engineering.

### 3 Einleitung

Getreu dem Motto *“better late than never”* sind enzymatische Modifikationen auf späten Stufen der Naturstoffbiosynthese von großer Bedeutung und wachsendem Interesse für Wirkstoffforschung und chemoenzymatischer Totalsynthese.<sup>[2-4]</sup> Neben hoher Regio- und Stereoselektivität zeichnen sich diese Reaktionen durch milde, meist wässrige Reaktionsbedingungen und die Überflüssigkeit von Schutz- oder dirigierenden Gruppen aus. Der Stellenwert dieser Enzymreaktionen zeigt sich insbesondere darin, dass in den letzten Schritten oft erst mittels Katalysen an hochfunktionalisierten und komplexen Strukturen die biologische Aktivität durch die Komplettierung des Pharmakophors erreicht wird. Das breite Repertoire enzymatischer Reaktionen in späten Stufen des Sekundärmetabolismus führt zu vielfältigen molekularen Architekturen (Abbildung 3–1, A).<sup>[5-7]</sup>



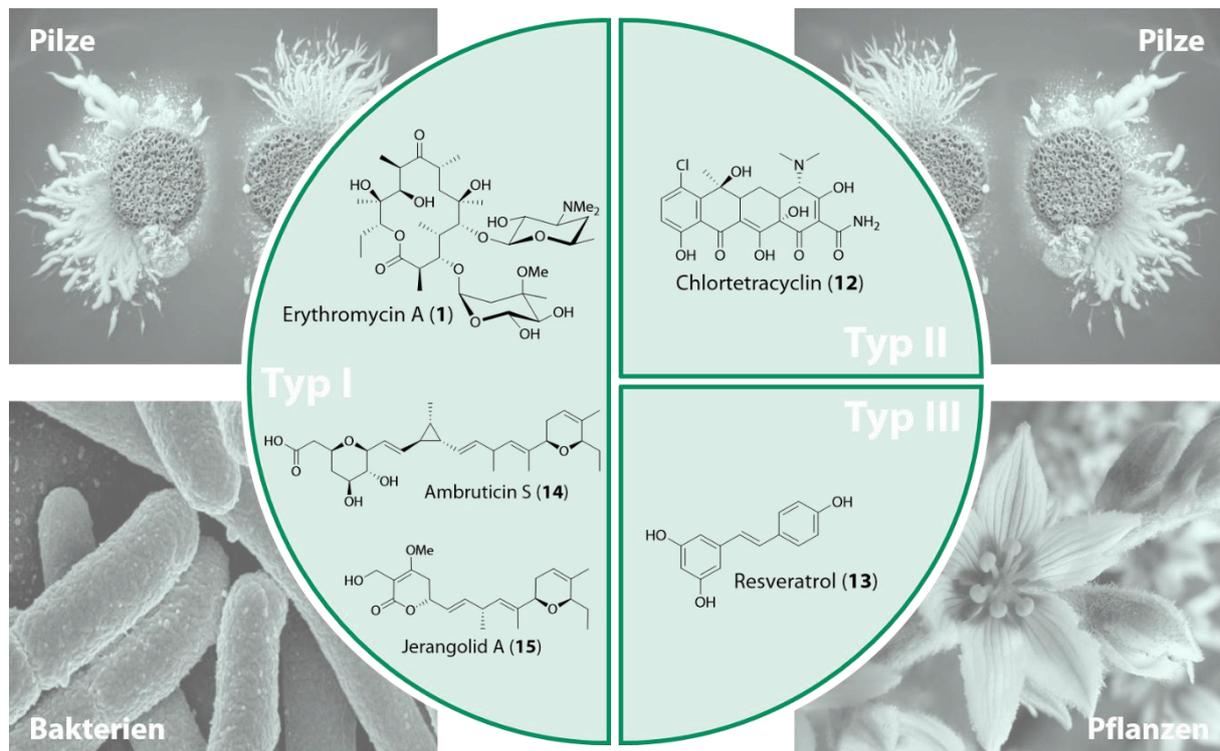
**Abbildung 3–1.** (A) Überblick über die vielfältige molekulare Architektur hochfunktionalisierter Naturstoffe, bei denen entscheidende Modifikationen (grün) im *tailoring*-Prozess vollzogen werden. (B) Chemoenzymatische Totalsynthese von (+)-Aureothin (3) nach HERTWECK unter Verwendung des *tailoring*-Enzyms AurH und gleichzeitiger oxidativer kinetischer Racematspaltung (2. Generation).<sup>[5,8]</sup>

---

Diese enzymatischen Modifikationen können insbesondere als Vorlage für anspruchsvolle C-H-Funktionalisierungen dienen. Die starke Chemo-, Regio- und Stereoselektivität geht mit einer hohen Substratspezifität einher, welche jedoch die Übertragung auf flexible Synthesemethoden erschweren kann. Durch Methoden wie *protein engineering* und *genome mining* können Enzyme für den Einsatz in der chemoenzymatischen Totalsynthese flexibler gemacht werden. Die Gegebenheiten der Natur konnten bereits in ersten Ansätzen dieser Art ausgenutzt werden.<sup>[5]</sup> So wurde beispielsweise 2004 das Antimykotikum (+)-Aureothin (**3**) in einer von HERTWECK entwickelten chemoenzymatischen Totalsynthese mit einer Ausbeute von 4% über acht Stufen dargestellt. Mit chemischen Methoden wurde das Kohlenstoffrückgrat des Vorläufers **8** aufgebaut. Durch die Kombination mit der multifunktionellen P450 Monooxygenase AurH, welche eine enantioselektive Kaskade aus C-H-Hydroxylierung und C-H-Esterifizierung katalysiert, konnte das essentielle Furan *in vivo* mit Ausbeuten zwischen 32 und 75% generiert werden. Die abschließende STILLE-Kupplung führt zur Bildung des Endprodukts (+)-Aureothin (**3**). In einer zweiten Generation der enzymatischen Katalyse wurde die Reaktion sogar als oxidative kinetische Racematspaltung durchgeführt (Abbildung 3–1, B).<sup>[8]</sup> Die Relevanz der einfachen und flexiblen Zugänglichkeit zu Wirkstoffen, wie Antimykotika, zeigt ein Blick auf den sich rasant ausbreitenden Hefepilz *Candida auris*. Dieser Erreger trat erstmals 2009 als Infektion im Gehörgang einer Patientin in Japan auf.<sup>[9]</sup> Inzwischen zeigt sich eine starke Zunahme der Verbreitungsquoten weltweit, was die *world health organisation* (WHO) veranlasste, *Candida auris* auf die *fungus priority pathogen list* zu setzen. Eine Erklärung für diese starke Verbreitung liegt zum einen in der Mensch-Mensch-Übertragung, die erstmals im Zusammenhang mit *Candida* erstmals beobachtet wurde und die besonders durch nosokomiale Infektion stattfindet. Darüber hinaus sind 90% des Erregers gegen mindestens eines der bekannten Antimykotika resistent. Eine Invasive Infektion des Blutkreislaufs, Harn- oder Atemwege oder Wunden stellt eine ernsthafte Gefahr dar und weist eine Sterblichkeitsrate von 30 bis 72% auf.<sup>[10,11]</sup> An diesem aktuellsten Beispiel wird deutlich, wie wichtig die kontinuierliche Weiterentwicklung von Wirkstoffen und flexiblen Synthesen ist. Durch den Einsatz von *tailoring*-Enzymen, wie diejenigen der Jerangolid Biosynthese, können neue Methoden und Wirkstoffe zugänglich gemacht werden.

### 3.1 Polyketide

Polyketide sind eine der vielfältigsten und umfangreichsten Naturstoffklassen mit stark divergierenden biologischen Aktivitäten und Wirkweisen. Einige Vertreter, die die unterschiedlichen Charakteristika veranschaulichen, sind in Abbildung 3–2 dargestellt. Eines der bekanntesten Antibiotika dieser Klasse ist Erythromycin A (**1**), das sich gegen die Mehrheit von grampositiven Bakterien richtet. Es wurde erstmals im Jahr 1952 aus *Streptomyces erythreus* isoliert.<sup>[12]</sup> Ein weiteres Beispiel für Breitbandantibiotika, Chlortetracyclin (**12**), konnte 1948 aus *Streptomyces aureofaciens* gewonnen wurde.<sup>[13]</sup> Jedoch treten vermehrt resistente Stämme gegen viele dieser bekannten Polyketidantibiotika auf, wodurch ihre Wirksamkeit verloren geht. Resveratrol (**13**) wurde im Jahr 1940 aus den Wurzeln des weißen Nieswurz (*Veratrum grandiflorum* O.Loes) isoliert und könnte als mögliches Therapeutikum dienen. Obwohl bisher keine aussagekräftigen Studien zur Wirkung an Menschen vorliegen, zeigen sich jedoch positive Effekte auf Krebs, kardiovaskuläre Krankheiten und auf die Reduzierung von Stress sowie Zellalterung bei anderen Organismen, wie Hefen oder sogar Wirbeltieren.<sup>[14,15]</sup>



**Abbildung 3–2.** Klassifizierung der Polyketid-Beispiele (**11–15**) nach Biosynthese-Typ und deren Hauptisolationsquellen. Abbildung adaptiert.<sup>[16–18]</sup>

Die aus Myxobakterien isolierbaren Ambruticine und Jerangolide zählen ebenfalls zu den Polyketiden.<sup>[19–21]</sup> Als Vertreter dieser sind Ambruticin S (**14**) und Jerangolid A (**15**) dargestellt. Im weiteren Verlauf wird genauer auf das Vorkommen, die biologische Aktivität sowie die Bio- und

---

Totalsynthese der Jerangolid-Polyketidgruppe eingegangen. Bei allen Beispielen fällt neben einer hohen strukturellen Komplexität und Variabilität eine hohe Dichte an funktionalen Gruppen, Sauerstofffunktionalitäten und Stereozentren auf. Durch diese Merkmale lassen sich alle Vertreter vereinen, obwohl sie große Unterschiede aufweisen, was auf eine Verwandtschaft und vergleichbare Biosynthesewege für alle Typen schließen lässt.

### **3.1.1 Biosynthese durch Polyketidsynthasen**

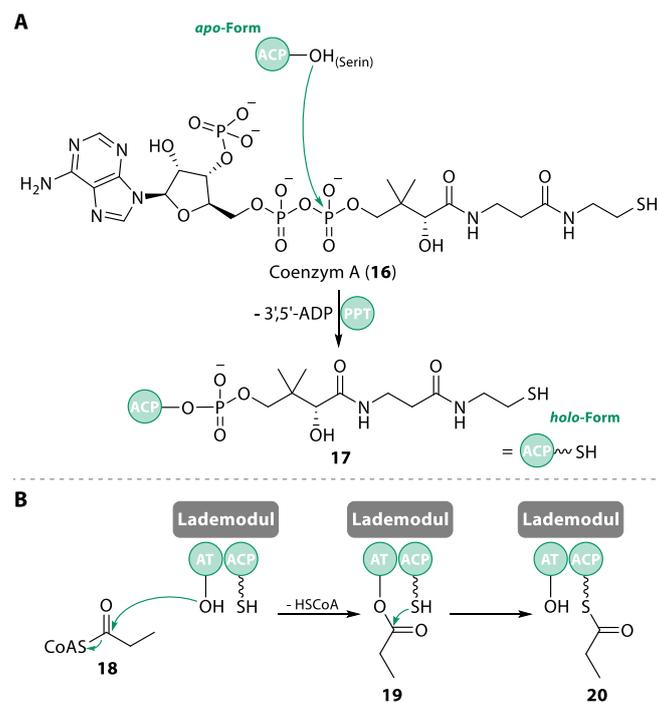
Der Biosynthese dieser exzeptionellen Naturstoffklasse zugrunde liegt eine modulare und variable Verknüpfung und Prozessierung einfacher Bausteine, wie Acetyl- oder Malonylverbindungen, durch große multifunktionale Enzymkomplexe, die als Polyketidsynthasen (PKS) bezeichnet werden. Generell lassen sich Polyketide drei Typen von PKS zuordnen (Abbildung 3–2).<sup>[12,22–24]</sup> Im Folgenden werden die verschiedenen Typen genauer charakterisiert und der allgemeine Mechanismus der Biosynthese am Typ I erläutert.

#### **3.1.1.1 PKS-Typ I**

Typ I PKS sind phylogenetisch verwandt mit Fettsäuresynthasen in Tieren und Pilzen, ähneln sich in ihren katalytischen Grundschritten und zeichnen sich durch Modularität mit linear angeordneten, kovalent verknüpften Domänen aus. Eine Unterscheidung zwischen multimodularen und iterativen PKS kann anhand der Synthesemodule vorgenommen werden. Eine Kettenverlängerung durch mehrere aneinander gereihete Module sequenziell katalysiert, gilt als multimodular. Wohingegen eine Katalyse wiederholend durch ein und dasselbe Modul einen iterativen Charakter kennzeichnet. Dieser Typ I tritt hauptsächlich in Bakterien (multimodular) und Pilzen (iterativ) auf. Durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Domänen sind die stark divergierenden Polyketide des PKS-Typ I meist reduziert und hochfunktionalisiert (Abbildung 3–2, **1**, **14** & **15**).<sup>[25–29]</sup> Der exakte Zusammenhang zwischen Polyketideigenschaften und Katalyse wird durch einen Blick auf den Mechanismus klarer. Zur besseren Verständlichkeit können die Biosyntheseschritte wie folgt differenziert werden.

## Beladung der PKS

Für die Katalyse und Prozessierung in der PKS ist es notwendig, dass das Substrat an eine Carrier-Domäne, nämlich das Acyl-Carrier-Protein (ACP), gebunden ist. Im Lademodul wird der Startbaustein durch eine Acyltransferase (AT) auf die *holo*-Form des ACP übertragen (Abbildung 3–3).<sup>[30]</sup>



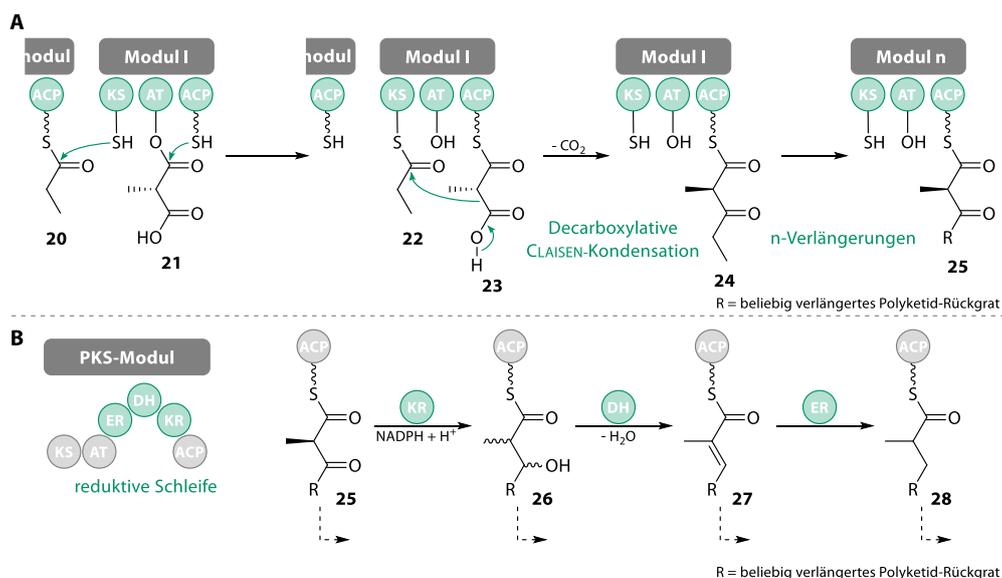
**Abbildung 3–3.** (A) Synthese der benötigten *holo*-Form des ACP durch Transphosphorylierung einer Serin-Seitenkette mit dem 4'-Phosphopantethein des Coenzym A (16) katalysiert durch Phosphopantetheinyltransferase (PPT).<sup>[30]</sup> (B) Prozess der PKS-Beladung mit einem Startbaustein.

Zusätzlich zur Beladung agieren ATs während der Verlängerung des Polyketid-Rückgrats, indem sie den Verlängerungsbaustein auf eine Ketosynthase (KS) übertragen. Diese Prozesse sind von der Sequenz der AT abhängig, was die Auswahl des Startbausteins oder Verlängerungsbausteins beeinflusst. Je nach PKS kann zwischen *cis*- und *trans*-AT, einer intramodularen oder intermodularen Domäne unterschieden werden. In der Regel übertragen *Trans*-AT iterativ an mehreren Modulen agierend den gleichen Baustein. Im Gegensatz dazu können bei *Cis*-AT modulspezifisch verschiedene Bausteine übertragen werden, ohne dass zwischen den Modulen eine große Ähnlichkeit gegeben sein muss.<sup>[28,31–33]</sup>

## Verlängerung und Prozessierung

Ein Verlängerungsmodul des Rückgrats besteht minimal aus einer ACP-, AT- und KS-Domäne zusammen. Die Übertragung des Vorläuferbausteins und Bereitstellung des

Verlängerungsbausteins durch die AT ermöglicht den Schlüsselschritt der Verlängerung, der durch die KS katalysiert wird. Grundsätzlich können verschiedene Malonyl-CoA-Bausteine verwendet werden. Zur Veranschaulichung wurde hier der Fall eines Methylmalonyl-Bausteins gezeigt (Abbildung 3–4, A). Unter decarboxylativer CLAISEN-Kondensation zwischen Vorläufer- und Verlängerungsbaustein entsteht eine neue C-C-Bindung.<sup>[25]</sup> Nach erfolgreicher Reaktion wird das verlängerte Rückgrat auf die KS des nächsten Moduls übertragen und die Verlängerungssequenz kann erneut durchlaufen werden (Abbildung 3–4, A).



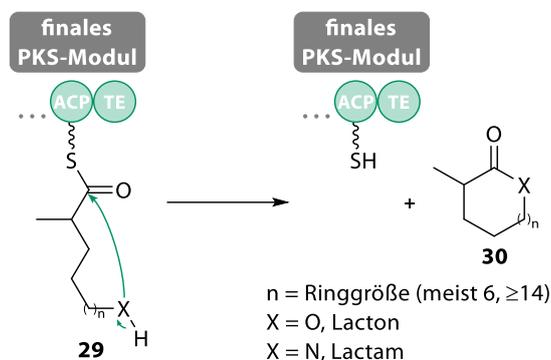
**Abbildung 3–4. (A)** Prozess der Verlängerung des Polyketid-Rückgrats durch die Schlüsselreaktion der decarboxylativen CLAISEN-Kondensation. **(B)** Reduzierende Prozessierung des Polyketid-Rückgrats durch die Domänen der reduktiven Schleife; gestrichelte Pfeile zeigen Variabilität und Ausstiegspunkte aus der reduktiven Schleife.

Zusätzlich zu den Minimalanforderungen an ein Modul können im Falle einer Prozessierung die Domänen der reduktiven Schleife durchlaufen werden. Dabei wird der durch die Kondensationsreaktion entstandene  $\beta$ -Ketothioester zu Beginn durch eine Ketoreduktase (KR) zum Alkohol reduziert, welcher anschließend durch eine Dehydratase (DH) weiter in ein Olefin überführt wird. Durch die nachfolgende Enoylreduktase (ER) wird schließlich ein gesättigtes Alkan erzeugt. Diese Schleife kann in einem PKS-Modul vollständig, gar nicht oder nur teilweise auftreten. Dadurch wird ein breites Spektrum reduzierend prozessierter Polyketide ermöglicht, die als neuer modifizierter Vorläuferbaustein dienen (Abbildung 3–4, B).<sup>[12,23,24,28,34]</sup>

## Abspaltung

Nach Durchlaufen der PKS wird im finalen Modul das vollständig aufgebaute und prozessierte Polyketid-Rückgrat katalysiert mithilfe einer Thioesterase (TE) von der *holo*-Form des ACP

abgespalten. Während des Transacylierungsprozess des ACP-gebundenen Polyketid-Thioesters auf ein internes Nucleophil, meistens Wasser, erfolgt, kommt es zu einer gleichzeitigen Zyklisierung. (Abbildung 3–5).

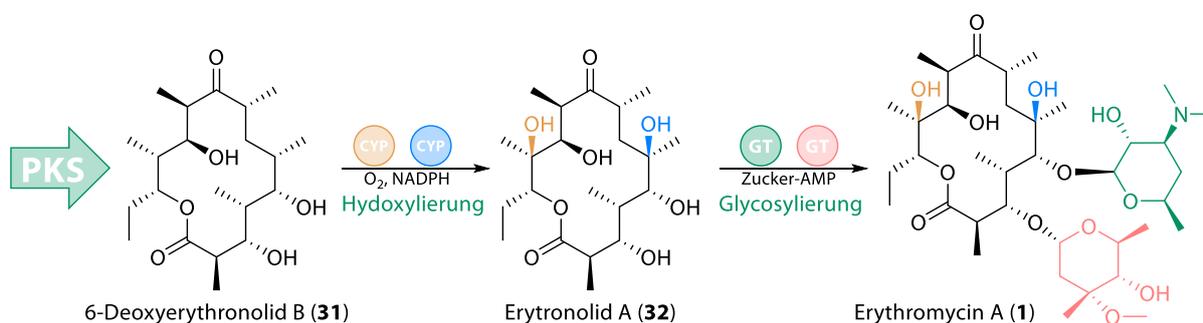


**Abbildung 3–5.** Prozess der Abspaltung des PKS-Produkts vom finalen Modul der PKS durch eine TE.

Je nach Nucleophil liegen die entstehenden Zyklen entweder als Lacton oder Lactam vor. Die häufigste Ringgröße beträgt sechs, jedoch sind auch Ringgrößen  $\geq 14$  wahrscheinlich. Ringe mit acht, zehn oder zwölf Gliedern werden dagegen selten bis gar nicht gebildet. In Ausnahmefällen können auch kleinere Ringsysteme entstehen.<sup>[29,35,36]</sup>

### post-PKS Funktionalisierung

Angeschlossen an die PKS folgen in den meisten Fällen weitere Modifikationen des *post*-PKS-Produkts durch sogenannte *tailoring*-Enzyme. Diese können eine breite Palette an Reaktionen katalysieren. Neben Hydroxylierungen, Methylierungen, Glycosylierungen und Zyklisierungen treten, wie im Falle der Jerangolide, auch Desaturierungen auf.<sup>[6]</sup>



**Abbildung 3–6.** Prozess der *post*-PKS-Funktionalisierung am Beispiel von Erythromycin A (**1**) bei dem zwei Hydroxylierungen und zwei Glycosylierungen zum Erhalt der biologischen Aktivität führen.

Oft sorgen erst diese *post*-PKS-Funktionalisierungen, wie im prominenten Falle des Erythromycin A (**1**), für den Erhalt der biologischen Aktivität bzw. des Pharmakophors der Polyketide (Abbildung 3–6). In diesem Prozess finden an unaktivierten Positionen katalysiert

---

durch verschiedene Cytochrom P450 (CYP) zwei Hydroxylierungen sowie zwei Glycosylierungen mit stark prozessierten Zuckern mittels Glycosyltransferasen (GT) statt und generieren die Grundlage der biologischen Aktivität.<sup>[24,31,37–39]</sup>

### 3.1.1.2 PKS-Typ II

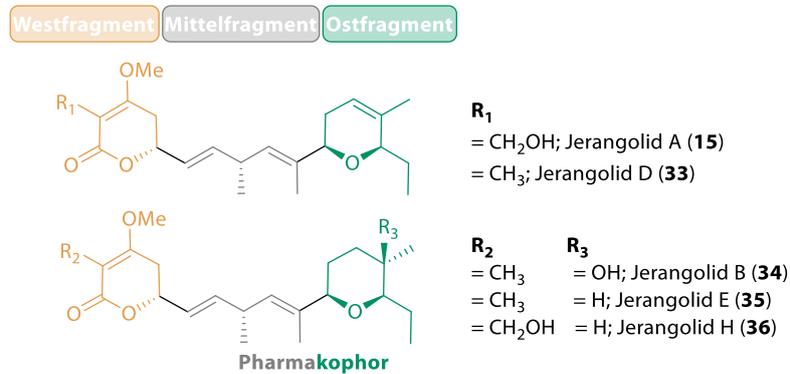
Dieser Typ kommt überwiegend in Bakterien, aber auch in Pilzen und vereinzelt in Protozoen vor und wurde bislang nur in iterativen Formen gefunden. Die Polyketidsynthese wird durch einen dissoziierbaren Komplex aus monofunktionellen Enzymen katalysiert. Dabei erfolgt eine iterative Verlängerung einer Acyl-CoA-Starteinheit (ACP-gebunden) mit Malonyl-CoA-Verbindungen, wobei die Kettenlänge durch den chain length factor ( $KS\alpha$  &  $KS\beta$ ) reguliert wird. Die meisten Produkte des PKS-Typs II sind polyzyklisch und aromatisch und weisen einen Funktionalisierungsgrad auf, der mit dem des Typs I vergleichbar ist (Abbildung 3–2, **12**). Allerdings werden die gebildeten PKS-Produkte erst nachfolgend durch beispielsweise Kettoreduktasen, Zyklasen oder Aromatasen funktionalisiert.<sup>[29,40,41]</sup>

### 3.1.1.3 PKS-Typ III

Der letzte der drei Typen unterscheidet sich vor allem durch seine Unabhängigkeit von *carrier*-Domänen und kommt hauptsächlich in Pflanzen vor. Die als Homodimere vorliegenden Enzyme, sogenannten Synthasen, katalysieren mit nur einem aktiven Zentrum iterative Verlängerungen sowie die anschließende Zyklisierung zu den PKS-Typ III-Produkten. Charakteristisch sind mono- bis bizyklische, aromatische Verbindungen, die nur einen niedrigen Funktionalisierungsgrad aufweisen (Abbildung 3–2, **13**).<sup>[29,41,42]</sup>

## 3.2 Jerangolide

Die Jerangolide sind Naturstoffe, die von einem Myxobakterium produziert werden und antimykotische Aktivität aufweisen. Sie gehören zu einer Gruppe der Polyketide und wurden erstmals im Jahr 1996 aus *Sorangium cellulosum* So ce 307 isoliert.<sup>[19,43,44]</sup>

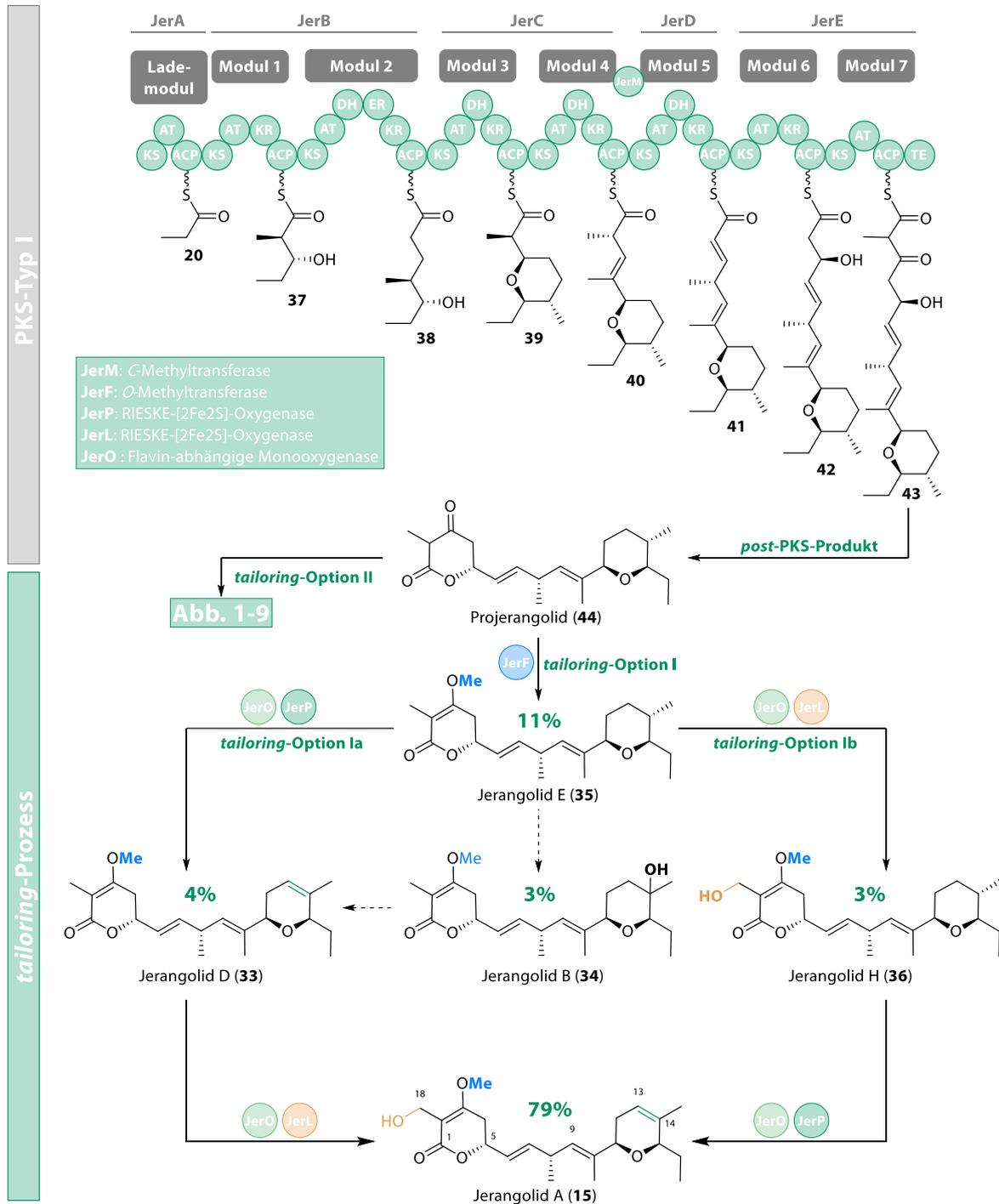


**Abbildung 3–7.** Strukturen der aus *Sorangium cellulosum* So ce 307 isolierten Jerangolide (**15**, **33–36**), mit  $\delta$ -Pyranon (orange), 1,4-Dien-Einheit (grau) und Tetrahydropyranring bzw. Dihydropyranring (grün).

Strukturell können Jerangolide in drei Fragmente unterteilt werden (Abbildung 3–7). Das Ostfragment wird durch einen dreifach substituierten Tetrahydropyran (THP) bzw. einen Dihydropyranring (DHP) mit Doppelbindung (grün) gebildet. Im Mittelfragment findet sich eine nicht konjugierte 1,4-Dien-Einheit (grau) wieder. Diese Fragmente bilden zusammen das Pharmakophor. Im daran anschließenden Westfragment ist die Struktur durch ein  $\delta$ -Pyranon (orange) definiert.<sup>[19,43,44]</sup> Diese Fragmentcharakteristik ist für eine flexible und möglichst einfache Totalsynthese der Jerangolide von Vorteil. Es besteht eine Ähnlichkeit zwischen Jerangoliden und Ambruticinen, nicht nur was ihren natürlichen Produzenten, die Biosynthese und die strukturelle Beschaffenheit betrifft, sondern auch in ihrer biologischen Aktivität. Die antimykotischen Eigenschaften beruhen auf der Induzierung des *high osmolarity glycerol* (HOG) *signal pathway*. Durch die Hyperaktivierung der Histidin-Kinase Hik1 wird innerhalb der Zelle eine Akkumulation von Glycerin und freien Fettsäuren ausgelöst, was zu osmotischem Stress führt. Wenn gleichzeitig eine geringe externe Osmolarität vorhanden ist, führt dieser Prozess zur Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran, was zum Ausströmen der Zellbestandteile und somit zum Zelltod führt. Durch die spezifische Aktivität, beruhend auf gezielter Beeinflussung des nur in Pilze vorkommenden HOG *signal pathways*, zeigt sich geringe Toxizität gegenüber Säugetieren. Die nachgewiesene Wirkung von Jerangolid A (**15**) gegen Histoplasmose und Kokzidioidomykose sowie die Aktivität gegenüber *Hansenula anomala*, *Mucor hiemalis* (0.07  $\mu\text{g/mL}$ ) und *Candida albicans* (4.20  $\mu\text{g/mL}$ ) machen das Mittel besonders interessant im Hinblick auf steigende Resistenzen.<sup>[19,45]</sup>

## Biosynthese

Durch Analysen von Genclustern und die Charakterisierung von Blockmutanten untersuchte JULIEN den Biosyntheseweg der Jerangolide und Ambruticine in *Sorangium cellulosum*.

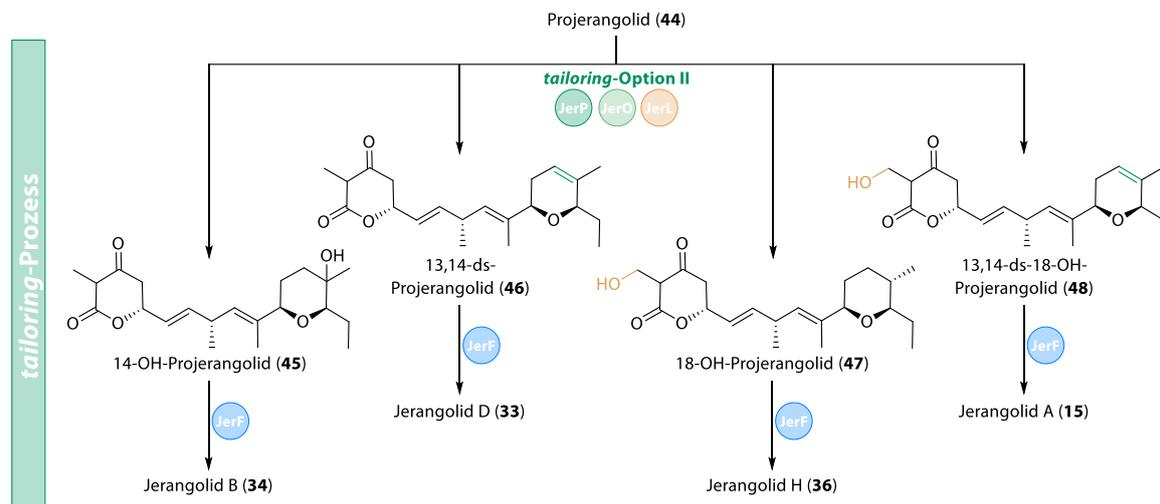


**Abbildung 3–8.** Postulierte Biosynthese der Jerangolide nach JULIEN, HAHN und REICHENBACH. Ausgehend vom Propionylstartbaustein Prozessierung durch eine PKS-Typ-I mit zusätzlicher Zyklisierung durch die bifunktionale Dehydratase des Modul 3, einer C-Methylierungs-Olefin-Verschiebungskaskade in Modul 4 und Darstellung der möglichen *tailoring*-Prozessreihenfolge, startend mit dem *post*-PKS-Produkt Projerangolid (44) inklusive Prozentwerte des jeweiligen aus *Sorangium cellulosum* So ce 307 isolierten Jerangolids. [1,19–21,36,46–51]

---

Zusammen mit den Ergebnissen von HAHN und den Isolationsstudien von REICHENBACH lassen sich folgende Annahmen treffen: Es wird angenommen, dass der Biosyntheseweg der Jerangolide dem der Ambruticine in den ersten fünf Modulen ähnelt, wobei der Aufbau des östlichen Fragments durch Verlängerung mit zwei Methylmalonyl- und drei Malonylbausteinen erfolgt. Gemäß den Erkenntnissen von JULIEN und HAHN erfolgt die Biosynthese in beiden Fällen über eine PKS-Typ I mit Unterschieden in den Modulen 3 und 4 (Abbildung 3–8).<sup>[20,21,36,48–51]</sup> Während Modul 3 erfolgt neben der bekannten Dehydratisierung des Rückgrats eine Zyklisierung zum THP statt. Diese wird durch die bifunktionale Dehydratase AmbDH3 katalysiert und folgt dem Schema einer stereoselektiven intramolekulare Oxa-MICHAEL-Addition (IMOMA). Die zusätzliche Aktivität der Dehydratase ist auf die im Vergleich weniger sterisch anspruchsvolle Aminosäure Valin173 zurückzuführen. Diese ermöglicht die konformative Rückgrat-Umlagerung des Substrats, die für die Zyklisierung benötigt wird.<sup>[20,48–50]</sup> Die C-Methylierungs-Olefin-Verschiebungs-Kaskade in Modul 4 wird durch AmbM und der trifunktionalen AmbDH4 katalysiert und ist die zweite Abweichung von einem Standard PKS-Typ I.<sup>[20,51]</sup> In den folgenden Jerangolid-exklusiven Modulen 6 und 7 wird das Rückgrat durch Kondensation eines Malonyl- bzw. Methylmalonylbausteins verlängert. Nach der Abspaltung und Bildung des  $\delta$ -Pyranons im Westfragment, katalysiert durch die TE des finalen *Moduls* 7, wird das *post*-PKS-Produkt Projerangolid (**44**) in einem *tailoring*-Prozess modifiziert. Für diesen Prozess können drei denkbare Varianten, *tailoring*-Optionen Ia und Ib (Abbildung 3–8), sowie *tailoring*-Option II (Abbildung 3–9), postuliert werden. Bisher konnte keiner dieser Optionen eindeutig bestätigt werden. Durch die initiale Katalyse durch die SAM-abhängige O-Methyltransferase JerF erfolgt in Option I eine Transformation zu Jerangolid E (**35**). JerF ist das erste bekannte Enzym, das die Bildung von nicht-aromatischen, zyklischen Methylenolethern katalysiert. Erste Studien zeigten eine große Substrattoleranz von JerF bei gleichzeitiger hoher Selektivität. Es werden sowohl aliphatische als auch aromatische Substrate variabler Größe akzeptiert. Die Methylierung erfolgt in jedem Fall spezifisch als 3-O-Methylierung. Bei Zugabe des Enzyms war keine Methylierung an weiteren möglichen Zielen, wie dem 1-Sauerstoff oder 2-Kohlenstoff, zu beobachten.<sup>[1,20,46]</sup> Es wird angenommen, dass daraufhin zwei finale Modifikationen durch die RIESKE-[2Fe2S]-Cluster-Proteine JerP und JerL folgen. Diese Cluster-Proteine sollen jeweils durch die Flavin-abhängige Monooxygenase JerO regeneriert werden. Diese katalysieren zum einen die Desaturierung des Tetrahydropyrans und zum anderen die C-18-Hydroxylierung, wodurch das Produkt des Biosyntheseweges Jerangolid A (**15**) entsteht. Die finalen Schritte können theoretisch in den *tailoring*-Optionen Ia und Ib durchlaufen werden. Im Rahmen von Naturstoffisolationen aus

*Sorangium cellulosum* wurden Zwischenprodukte für beide Optionen isoliert. Mit Jerangolid B (**34**) konnte eine während der Desaturierung mit JerP auftretende hydroxylierte Zwischenspezies isoliert werden. Allerdings lässt sich auf Basis der Prozentsätze der isolierten Naturstoffe keine Präferenz ableiten.<sup>[19-21,47]</sup> Im Falle der *tailoring*-Option II verläuft der Prozess in umgekehrter Reihenfolge (Abbildung 3–9).



**Abbildung 3–9.** *tailoring*-Option II mit umgekehrter Katalysereihenfolge. O-Methylierung durch JerF nach zuvor erfolgter Katalyse an Projerangolid durch die RIESKE-Oxygenasen; ds= desaturiert.

In diesem Fall wird das *post*-PKS-Produkt Projerangolid (**44**) zuerst durch die RIESKE-Oxygenasen (ROs) prozessiert. Die verschiedenen entstandenen Zwischenprodukte sind vergleichbar mit denen der Option I, liegen jedoch in ihrer entsprechenden Projerangolid-Form (**45–48**) vor. Die finalen Naturstoffprodukte (**15, 33, 34, 36**) werden durch folgende O-Methylierung durch JerF erhalten. Der exakte Zeitpunkt der Wirkung und die Reihenfolge der Katalyse der RIESKE-Oxygenasen sind noch nicht vollständig bewiesen worden (Abbildung 3–8, Abbildung 3–9). Eine weitere Untersuchung und Charakterisierung der RIESKE-Oxygenasen JerP und JerL ist erstrebenswert, nicht nur zum Verständnis der Reihenfolge des *tailoring*-Prozesses. Um das Potenzial dieser neuartigen und vielversprechenden Oxygenaseklasse vollständig zu erfassen und auszuschöpfen, sind grundlegende sowie weiterführende Experimente von höchstem Interesse.

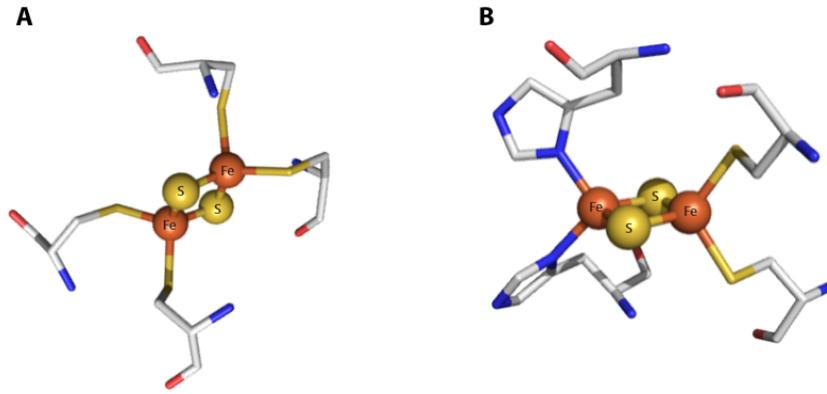
---

### 3.3 RIESKE-Oxygenasen

Die junge Klasse von [FeS]-Cluster-Oxygenasen, die von non-häm-Eisen abhängig sind, hat aufgrund ihrer Eigenschaften und der noch offenen Forschungsfragen das Potential, einen bedeutenden Beitrag zu nachhaltigen oxidativen Katalysen zu leisten. Insbesondere C-H-Funktionalisierungen sind hierbei von Interesse. Für eine effektive Nutzung dieses Potentials ist es unerlässlich, RIESKE-Oxygenasen, einschließlich ihrer Vorkommen, Struktur, Funktion und Mechanismen, in ihrer Gesamtheit genauer zu untersuchen und zu verstehen. Erstmals im Jahr 1968 wurden in *Pseudomonas putida* diese Oxygenasen als Schlüsselproteine im oxidativen Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen beschrieben.<sup>[52,53]</sup> Während des Abbauprozesses werden hauptsächlich, wie im Falle des bestcharakterisierten Beispiels, der Naphthalendioxygenase (NDO), im Initiierungsschritt *cis*-Dihydroxylierungen katalysiert. Aktuellere Studien zeigen zudem das Auftreten als Biokatalysatoren im Sekundärmetabolismus bei der Biosynthese hochaktiver Naturstoffe. RIESKE-Oxygenasen des Sekundärmetabolismus katalysieren eine Vielzahl an unterschiedlichen oxidativen Schlüsselreaktionen, wie beispielsweise Carbozyklisierungen, *N*-Oxidationen, Desaturierungen oder Hydroxylierungen.<sup>[54-56]</sup> Diese breite Palette an Reaktionen macht diese Enzymklasse noch interessanter für weitergehende Forschung und den Einsatz in chemoenzymatischen Synthesen.

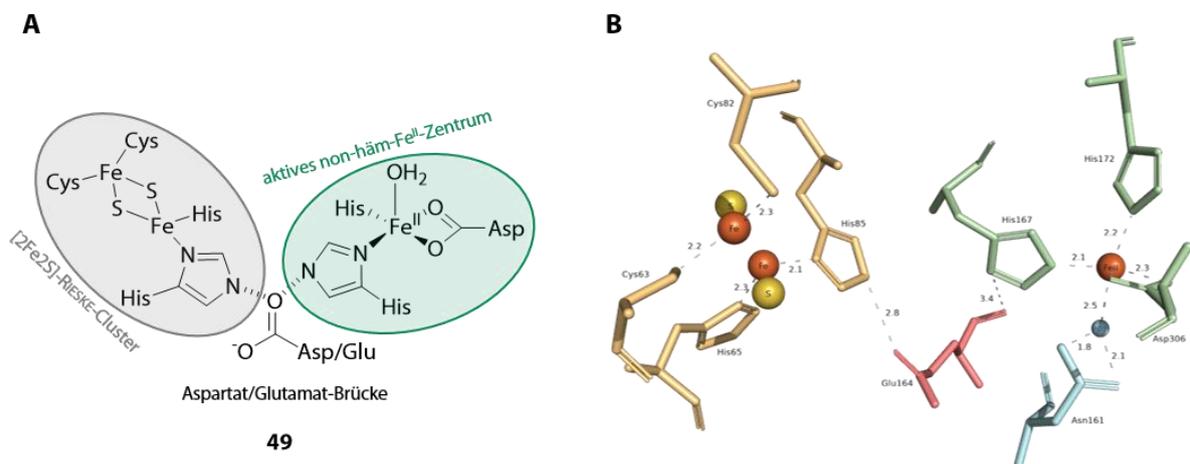
#### 3.3.1 Beschaffenheit und Aufbau

RIESKE-Oxygenasen zeichnen sich durch den charakteristischen Verbund aus [FeS]-Cluster und dem katalytisch aktiven non-häm-Eisenzentrum, der über Aminosäuren an die Proteinmatrix koordinieren ist, aus. [FeS]-Cluster-Proteine treten in nahezu allen natürlichen Systemen auf und sind Bestandteil vieler wichtiger Abläufe und Reaktionen wie Elektronentransferprozesse und regulatorische Vorgänge, Katabolismus oder Biosynthese.<sup>[57,58]</sup> Ein genauerer Blick auf den Cluster zeigt, dass dieser in Form eines weitverbreiteten [2Fe2S]-Clusters vorliegt (Abbildung 3–10).<sup>[56,59-61]</sup> In der Regel wird ein Cluster von vier Cysteinylliganden tetraedrisch koordiniert. Dies bei RIESKE-Cluster-Proteinen jedoch nicht der Fall, da zwei der Liganden durch Histidinylliganden ersetzt sind, was insbesondere Auswirkungen auf die elektronischen Eigenschaften des Clusters hat. Dies zeigt sich durch einen niedrigeren *g*-Faktor (ein Indikator für Histidinylliganden) und ein erhöhtes charakteristisches Redoxpotential (-150 bis -50 mV).



**Abbildung 3-10.** Vergleich von [2Fe2S]-Clustern. (A) [2Fe2S]-Standardcluster, PDB: 1AWD, (B) [2Fe2S]-RIESKE-Cluster, PDB: 5CXM. Die Strukturen wurden mit PyMol erstellt.<sup>[62]</sup>

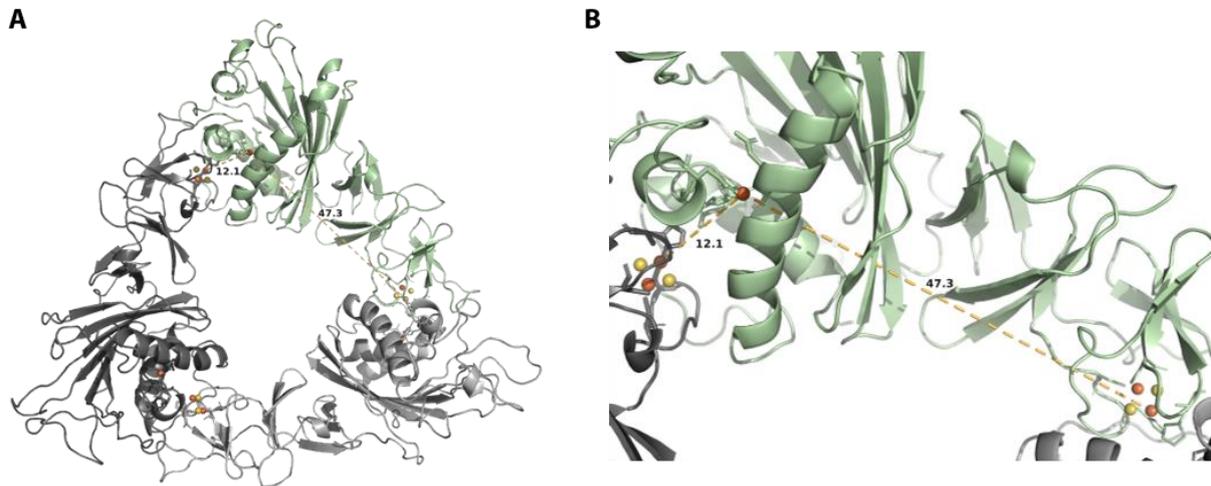
Die Koordinationsgeometrie ändert sich von einem tetraedrischen Standard zu einer eher planaren Anordnung, bei der Schwefel als  $S^{2-}$ -Anion und Eisen als  $Fe^{2+}$ - oder  $Fe^{3+}$ -Kation vorliegen. Ausgehend vom oxidierten Zustand  $Fe^{III}Fe^{III}$  wird der Oxidationszustand des cysteinkoordinierten Eisen im reduzierten Cluster ( $Fe^{III}Fe^{II}$ ) zu  $Fe^{2+}$  geändert (Abbildung 3-10).<sup>[57,63-67]</sup>



**Abbildung 3-11.** Darstellung der charakteristischen Motive der RIESKE-Oxygenasen. (A) Darstellung als Molekülstruktur 49. Abbildung angelehnt an Literatur.<sup>[55]</sup> (B) Darstellung als Proteinstruktur mit entsprechenden Abständen in Å am Beispiel der RIESKE-Oxygenase JerP. Grün: non-häm-Eisen-kordinierende Aminosäuren, Orange: [2Fe2S]-RIESKE-Cluster-kordinierende Aminosäuren, Blau: koordiniertes Wassermolekül mit Hellblau: stabilisierende Aminosäure aus sekundärer Koordinationsebene, Lachs: verbindende Glutamatbrücke. Das 3D-Proteinstrukturmodell wurde aus hinterlegten Proteinsequenzen mit SWISSMODEL generiert, wobei die RIESKE-Oxygenase SxtT als Vorlage diente.<sup>[68]</sup> Die erhaltenen Strukturen wurden mit Pymol 2.5 visualisiert.<sup>[62]</sup>

Das hochkonservierte Cluster-Bindemotiv  $CXHX_{15-17}CXXH$  findet sich in allen RIESKE-Oxygenasen wieder. Damit über eine Aspartat- oder Glutamatbrücke verbunden befindet sich das katalytisch aktive mononukleare non-häm- $Fe^{II}$ -Zentrum. Das Zentrum wird koordiniert durch eine 2-His-1-Carboxylat-Triade, welche ebenfalls das hochkonservierte Motiv  $DXXHX_4H$  bildet. In der Regel erfolgt eine zusätzliche Stabilisierung des Zentrums durch die Koordination von Wasser (Abbildung 3-11). Bei Betrachtung der makromolekularen Struktur der Oxygenasen zeigt sich,

dass die Enzyme meistens als trimerer oder hexatrimerer Proteinkomplex ( $\alpha^3$ ,  $\alpha^3\alpha^3$ ,  $\alpha^3\beta^3$ ), bestehend aus katalytischer  $\alpha$ -Untereinheiten und optionaler struktureller  $\beta$ -Untereinheiten, vorliegen. Innerhalb dieser  $\alpha$ -Untereinheiten befindet sich der RIESKE-Cluster *N*-terminal und das non-häm-Eisenzentrum *C*-terminal.<sup>[54–56,69–72]</sup>

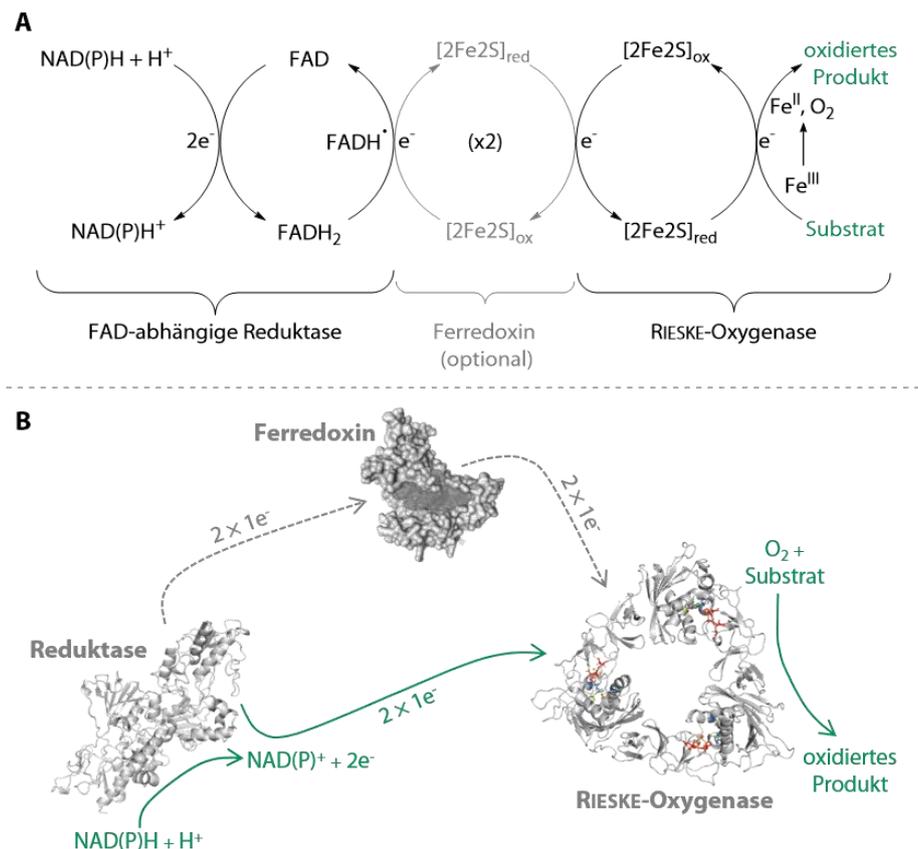


**Abbildung 3–12.** Abstände des aktiven non-häm-Eisenzentrums zum Rieske-Cluster innerhalb eines Monomers (12.1 Å) sowie zwischen zwei Monomeren (12.1 Å) am Beispiel von JerP. **(A)** Vollansicht des Trimers, **(B)** Ausschnitt auf relevante Bereiche eines Monomers und angrenzende Einheiten. Das 3D-Proteinstrukturmodelle wurde aus hinterlegten Proteinsequenzen mit SWISSMODEL generiert, wobei die RIESKE-Oxygenase SxtT als Vorlage diente.<sup>[68]</sup> Die erhaltenen Strukturen wurden mit PVMOL 2.5 visualisiert.<sup>[62]</sup>

Der Grund der Trimerbildung in deren aktiver Form, lässt sich anhand der Abstände des [2Fe2S]-Clusters zum aktiven Zentrum erklären. Die Distanz innerhalb einer  $\alpha$ -Untereinheit ist mit  $\sim 40\text{--}50$  Å zu groß, um eine Elektronenübertragung zu ermöglichen. Der Cluster-Zentrum-Abstand zwischen zwei benachbarten  $\alpha$ -Untereinheiten ist mit  $\sim 10$  Å jedoch nah genug für einen Elektronentransfer (Abbildung 3–12). Für eine katalytische Aktivität muss die Oxygenase an eine [2Fe2S]-Cluster-regenerierende Reduktase gekoppelt sein. RIESKE-Oxygenase und Reduktase bilden zusammen Zweikomponentensysteme, bei denen die Reduktase elektronenmobilisierend wirkt und die Elektronen direkt überträgt. Wenn die Elektronenübertragung durch ein optionales Ferredoxin vermittelt wird, spricht man von einem Dreikomponentensystem. Weiterhin ist mindestens ein Cofaktor als Elektronenquelle, häufig NAD(P)H, sowie molekularer  $O_2$  als Sauerstoffquelle der Oxidationen erforderlich (Abbildung 3–13).<sup>[54–56,71,73]</sup>

### 3.3.2 Funktionsweise und Mechanismus

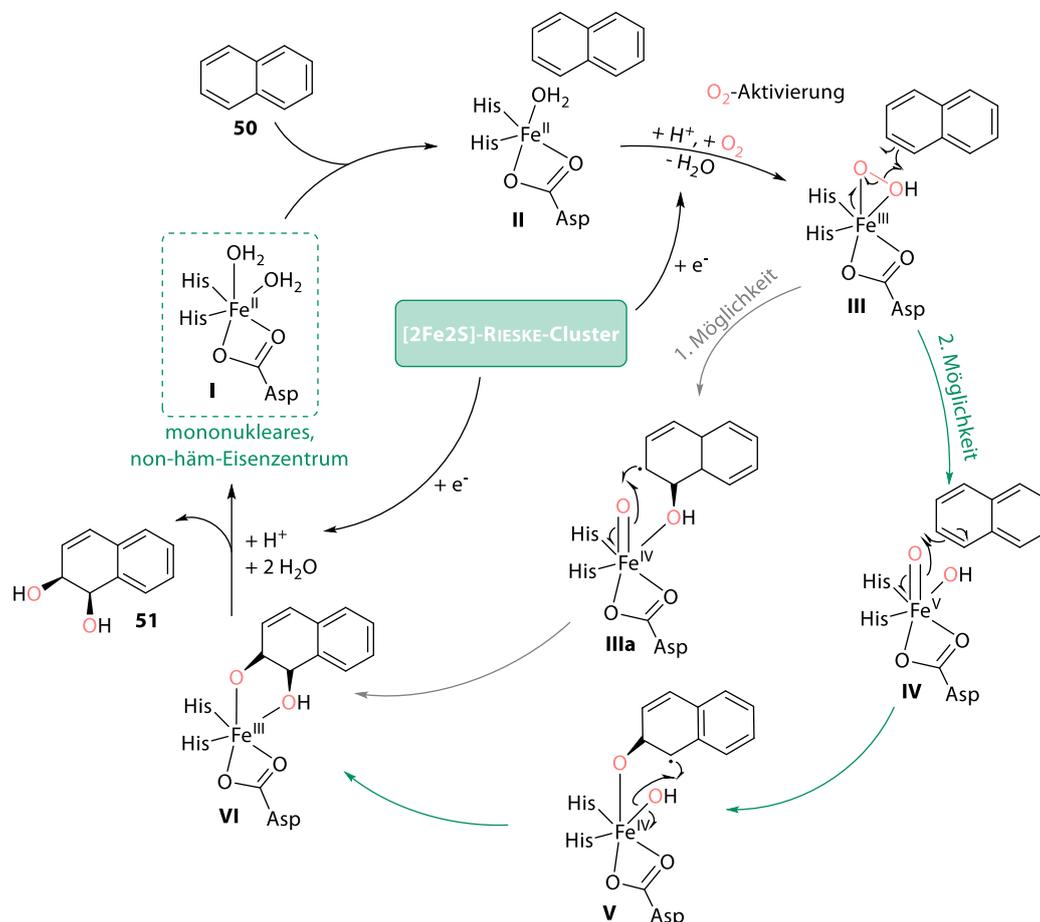
Betrachtet man bisher postulierte Mechanismen und die Elektronentransferkette (ETK) ergibt sich ein umfassenderes Bild der Funktionsweise der RIESKE-Oxygenase-Systeme. Für die Oxidation müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen wird die ETK erst durch die Anlagerung des Substrats in der aktiven Tasche initiiert, zum anderen muss der [2Fe2S]-Cluster reduziert werden, damit der Transfer der Elektronen auf das non-häm-Eisenzentrum möglich ist.



**Abbildung 3–13.** Übersicht über die Elektronentransferkette in RIESKE-Oxygenase-Systemen. **(A)** Flusschema der ETK. **(B)** Übersicht über die ETK zwischen den einzelnen beteiligten Einheiten an Beispiel von JerP und JerO. Die 3D-Proteinstrukturmodelle wurden aus hinterlegten Proteinsequenzen mit SWISSMODEL generiert, wobei die RIESKE-Oxygenase SxtT und die ursprüngliche FMO als Vorlage dienen.<sup>[68]</sup> Die erhaltenen Strukturen wurden mit PVMOL 2.5 visualisiert.<sup>[62]</sup> Abbildung in Anlehnung an Literatur.<sup>[74]</sup>

Zu Beginn oxidiert die gekoppelte flavinabhängige Reduktase das Reduktionsmittel NAD(P)H und setzt dabei zwei Elektronen frei, die auf einen Flavin-Cofaktor übertragen werden. Anschließend erfolgt die iterative Übertragung der Elektronen entweder direkt oder vermittelt durch das optionale Ferredoxin auf den [2Fe2S]-Cluster übertragen, der bei diesem Prozess reduziert wird (Abbildung 3–13). Durch die resultierende Protonierung eines der Histidinylliganden wird dieser fähig, eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Aspartat-/Glutamatbrücke einzugehen. Dadurch ändert sich die Position der Brückeneinheit, was neben der Ermöglichung des Elektronentransports zu einer Konformationsänderung im non-häm-

Eisenzentrum führt. Erst dann kann Sauerstoff aktiviert werden. Durch diesen regulierenden, geordneten Mechanismus wird verhindert, dass das aktive Zentrum durch Sauerstoff inaktiviert wird. Wenn sowohl das Substrat als auch der Sauerstoff am non-häm-Eisen koordiniert bzw. aktiviert wurden, kann das Substrat schrittweise oxidiert werden.<sup>[56,74,75]</sup>



**Schema 3-1.** Exemplarischer Mechanismus der RIESKE-Oxygenasen am Beispiel der Naphthalendihydroxylierung durch NDO. Abbildung in Anlehnung an Literatur.<sup>[55]</sup>

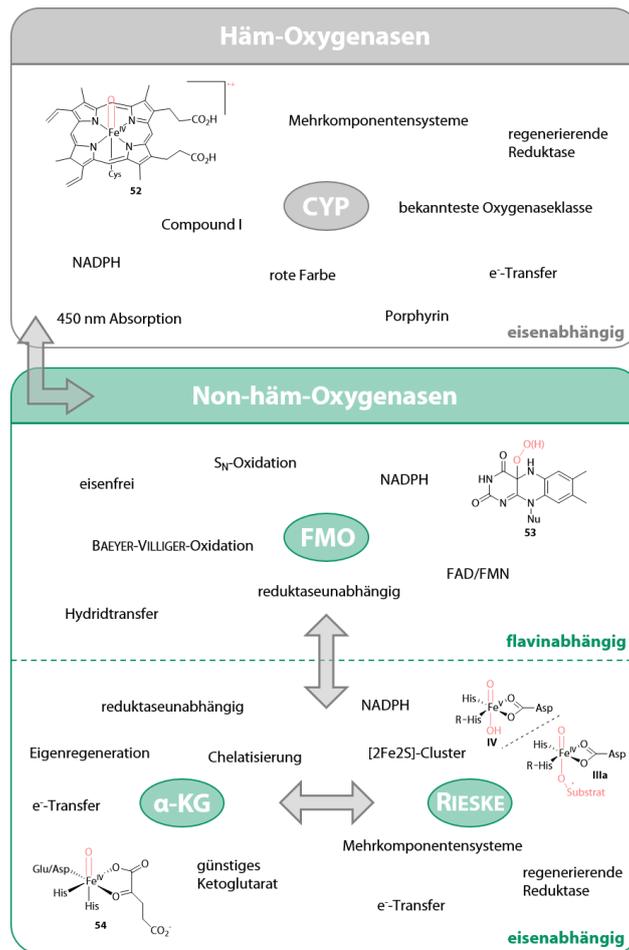
Der genaue Mechanismus der Oxidation und intermediäre Zustände des non-häm-Eisenzentrums konnten bisher noch nicht abschließend aufgeklärt werden. Am prominentesten Beispiel der NDO wurde ein radikalischer Mechanismus mit zwei möglichen Pfaden postuliert (Schema 3-1). Initiiert durch die Substratkoordination in der aktiven Tasche kann die Sauerstoffaktivierung und der Transfer eines Elektrons vom RIESKE-Cluster erfolgen. Durch eine nachfolgende Protonierung entsteht der Peroxid-Komplex (III), von dem aus zwei mögliche Pfade postuliert wurden. Es bleibt unklar, ob der Peroxid-Komplex (III) direkt während der Sauerstoffbindungsspaltung mit dem Substrat interagiert oder ob zunächst eine Bindungsspaltung mit Umlagerung zu einer Fe<sup>V</sup>-Spezies stattfindet. Bei direkter Substratoxidation (grauer Pfad) wird ein Fe<sup>IV</sup>=O-Komplex (IIIa) in Verbindung mit einem Hydroxynaphthalenradikal-Intermediat gebildet, das unter Transfer eines zweiten Elektrons direkt

---

zu einem am Fe<sup>III</sup>-Komplex-gebundenen Alkoxyhydroxynaphtalen-Intermediat (**VI**) katalysiert wird. Der zweite postulierte Pfad (grün) beginnt mit einer Sauerstoffbindungsspaltung und Umlagerung zu einem Fe<sup>V</sup>=O(OH)-Komplex (**IV**). Erst mit dieser Spezies findet die Wechselwirkung des Substrats statt, bei der ein Alkoxy-naphtalenradikal-Intermediat gebunden am Fe<sup>IV</sup>-OH-Komplex (**V**) entsteht. Durch weiteren Elektronentransfer und Katalyse wird das Fe<sup>III</sup>-Komplex-gebundene Alkoxyhydroxynaphtalen-Intermediat (**VI**) gebildet. In beiden Fällen wird das *cis*-dihydroxylierte Naphtalen (**51**) nach abschließender Protonierung freigesetzt. Dabei wird das non-häm-Eisenzentrum regeneriert (Schema 3-1).<sup>[55,56]</sup> Nach diesem ausführlichen Einblick in die außergewöhnlichen RIESKE-Oxygenasen sollen nun deren Alleinstellungsmerkmale hervorgehoben werden.

### 3.3.3 Vergleich mit weiteren Oxygenase-Typen

Durch einen Vergleich mit den drei am weitesten verbreiteten Oxygenase-Typen können die Alleinstellungsmerkmale der RIESKE-Oxygenasen und die jeweiligen Unterschiede genauer dargestellt werden. Neben den bereits erwähnten CYP werden auch  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängig Oxygenasen ( $\alpha$ -KG) sowie Flavin-abhängige Monooxygenasen (FMO) verglichen (Abbildung 3–14). Zur besseren Übersichtlichkeit soll der Vergleich anhand von vier Kategorien abstrahiert werden. Zu Beginn des Kapitels werden die Oxygenasen nach Art der katalytischen Einheit eingeteilt. Im Anschluss daran erfolgt eine Abgrenzung der RIESKE-Oxygenasen anhand struktureller Unterscheidungsmerkmale, Abhängigkeit von Cosubstrat/Cofaktor und mechanistischer Unterschiede von den drei weiteren Typen abgegrenzt. In der folgenden Vergleichsübersicht (Abbildung 3–14) werden die zwei Hauptgruppen der häm- und non-häm-Oxygenasen sowie deren jeweilige Unterkategorien, wie eisen- oder flavinabhängige Oxygenasen miteinander verglichen. Im Bereich jeder spezifische Oxygenaseklasse lassen sich charakteristische Schlagworte sowie die dazu gehörende aktive Spezies identifizieren. Diese Merkmale werden in den entsprechenden Vergleichskategorien detailliert erläutert.



**Abbildung 3–14.** Vergleichsübersicht der RIESKE-Oxygenasen zu den drei am weitesten verbreiteten Oxygenasearten. Gezeigt sind neben den aktiven Sauerstoffspezies auch charakteristische Schlagworte anhand denen der folgende Vergleich gezogen wurde.<sup>[5,76–85]</sup>

### Art der katalytischen Einheit

Die vorliegenden Oxygenase-Typen können aufgrund ihrer katalytischen Einheit in Flavin-abhängige, häm- und non-häm-eisenabhängige-Oxygenasen gegliedert werden. Im Gegensatz zu den anderen Arten besitzen FMOs kein katalytisches Eisenzentrum, sondern koordinieren Flavin als katalytische Einheit.<sup>[76,78,79]</sup> Neben den bereits erwähnten non-häm-Rieske-Oxygenasen können auch α-KG dieser Kategorie zugeordnet werden. Das katalytische Eisenzentrum ist direkt über Aminosäuren, wie Histidin, Glutamin oder Asparagin, an die Proteinmatrix gebunden.<sup>[77,84,85]</sup> Die Klassifizierung zwischen häm und non-häm-Oxygenasen erfolgt aufgrund des Vorhandenseins oder Fehlens, der prosthetischen Gruppe Porphyrin. Alleinig CYP werden als häm-Eisen-abhängige Oxygenasen, bei denen das aktive Eisenzentrum durch Porphyrin koordiniert wird, definiert.<sup>[81–83]</sup> Diese Unterteilung anhand des Porphyringerüsts wird durch Betrachtung weiterer Unterschiede, insbesondere der strukturellen Unterschiede, noch deutlicher.

---

## Strukturelle Unterschiede

Besonders die CYPs unterscheiden sich von den anderen drei Gruppen hinsichtlich der Koordination der aktiven Einheit. Das Fe<sup>II</sup> ist dort vierfach durch das prosthetische Porphyringerüst koordiniert, und eine zusätzliche Koordination mit Cystein führt zur einzigen direkten Interaktion mit der Proteinmatrix. Das häm-Gerüst erzeugt gleichzeitig die rote Farbe der CYPs. Diese Oxygenasen lassen sich in unterschiedliche Gruppen einteilen, wovon der Großteil liegt als Mehrkomponentensystem vorliegt und eine Reduktase als Partner benötigt. Über alle Gruppen hinweg sind der häm-bindende-*loop* und das *FXXGXRXCXG*-Motiv konserviert.<sup>[81-83]</sup> Im Gegensatz dazu stehen die weiteren Oxygenase-Klassen, bei denen die katalytische Einheit direkt von Aminosäuren der Proteinmatrix, wie Histidin, Glutamin oder Asparagin, koordiniert wird. Die Struktur der RIESKE-Oxygenasen wird in Abschnitt 3.3.1 ausführlich beschrieben. Im Falle von  $\alpha$ -KG wird das Fe<sup>II</sup>-Zentrum von dem konservierten *HXD/EX<sub>n</sub>H*-Motiv in einer doppelsträngigen  $\beta$ -Helix gebunden. Diese non-häm-Eisen-abhängigen Oxygenasen benötigen keine Reduktase als Partner, da sowohl das Eisenzentrum als auch das Cosubstrat automatisch regeneriert werden können.<sup>[77,84,85]</sup> In der Klasse der FMO wird Flavin als katalytische Einheit koordiniert. Bei FMOs sind das Identitätsmotiv *FXGX<sub>3</sub>HX<sub>3</sub>F/Y*, das FAD/FMN- und NAD(P)H-Bindemotiv sowie ein Arginin in der aktiven Tasche konserviert. FMOs sind Oxygenasen in Einkomponentensystemen und benötigen keine Partner zur Regeneration.<sup>[76,78,79]</sup> Die Komplexstruktur dieser drei Klassen ist aufgrund der Biosynthese divers und kann als monomere bis trimere Komplexform beobachtet werden.

## Abhängigkeit von Cosubstrat und Cofaktor

Die Abhängigkeit von molekularem Sauerstoff als Sauerstoffquelle und einem Cosubstrat oder Cofaktor als Reduktionsmittel vereint alle Klassen dieser Oxygenasen. RIESKE-Oxygenasen, CYPs und FMOs sind NAD(P)H-abhängig.<sup>[81-83]</sup> Die ersten beiden Klassen benötigen Reduktasen, die den Cofaktor oxidieren und Elektronen auf die Oxygenase übertragen. Bei FMOs erfolgt die Reduktion des katalytisch aktiven FAD durch einen Hydrid-Transfer von NAD(P)H in der aktiven Tasche.<sup>[76,78,79]</sup> Nur  $\alpha$ -KG besitzen keine Abhängigkeit von NAD(P)H, stattdessen sind diese vom kostengünstigeren  $\alpha$ -Ketoglutarat als Cosubstrat abhängig. Letzteres chelatisiert das Fe<sup>II</sup>-Zentrum und spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung der katalytischen Spezies.<sup>[77,84,85]</sup>

---

## Mechanistische Unterschiede

Ähnlich wie RIESKE-Oxygenasen katalysieren auch die anderen Klassen eine Vielzahl diverser oxidativer Reaktionen im Sekundärmetabolismus und beim Abbau von Schadstoffen. Die häufigsten auftretenden sind Hydroxylierungen und Zyklisierungen oder im Falle der FMO BAEYER-VILLIGER-Oxidationen.<sup>[7,54,79,86,87]</sup> Unterschiede zeigen sich hierbei in der Art der Inkooperation des Sauerstoffs und der aktiven katalytischen Spezies. Zunächst soll jedoch näher auf die eisenabhängigen Oxygenasen eingegangen werden. Nach der Impulsgebung durch Substrat- oder Cosubstratanlagerung erfolgt hier der Reaktionsmechanismus iterativ durch eine zweimalige Elektronenübertragung. Anschließend wird die aktive Spezies gebildet, welche meist radikalisch ist und nach der Sauerstoffaktivierung entsteht. Im Falle der RIESKE-Oxygenasen wurde diese als Fe<sup>IV</sup>- oder Fe<sup>V</sup>-Oxospezies **IIIa/IV**, je nach Zeitpunkt und Art der O<sub>2</sub>-Bindungsspaltung, postuliert. Einzigartig sind der elektronentransportierende [2Fe2S]-Cluster sowie die Fähigkeit zur Reaktion als Dioxygenase.<sup>[54,55]</sup> In der weiteren non-häm Oxygenaseklasse, den  $\alpha$ -KG, wird ebenfalls eine Fe<sup>IV</sup>-Oxospezies **54** gebildet. Durch die Reaktion mit Wasser und unverbrauchtem  $\alpha$ -Ketoglutarat werden Succinat und das Produkt freigesetzt, wodurch das katalytische Eisenzentrum regeneriert wird. Eine wichtige Bioaktivität dieser Klasse, die als Monooxygenasen agieren, liegt in der Hydroxylierung von Aminosäuren.<sup>[5,77,80,84,85]</sup> Die aktive Spezies der CYPs, die ebenfalls Monooxygenasen sind, ist der sogenannte *compound I*, der eine radikalische, kationische Fe<sup>IV</sup>-Oxospezies **52** darstellt. Die Besonderheit dieses Mechanismus besteht darin, dass mehrere *shunt*-Wege durchlaufen werden können, was zur facettenreichen Aktivität der CYPs beiträgt.<sup>[5,80–83]</sup> Im Gegensatz zeigt sich ohne die Beteiligung von Eisen, wie im Falle der FMOs, eine andere mechanistische Charakteristik. Durch den Hydridtransfer von NAD(P)H auf Flavin wird dieses reduziert und die Sauerstoffaktivierung kann erfolgen. Hierbei wird die aktive Flavin-Hydroperoxid-Spezies **53** gebildet. Ausgehend von der aktiven Spezies kann entweder ein S<sub>N</sub>- oder ein BAEYER-VILLIGER-Oxidationsmechanismus durchlaufen werden. Durch Freisetzen von Wasser und NAD(P)<sup>+</sup> wird das Flavin wieder zur oxidierten Art regeneriert.<sup>[5,76,78–80]</sup>

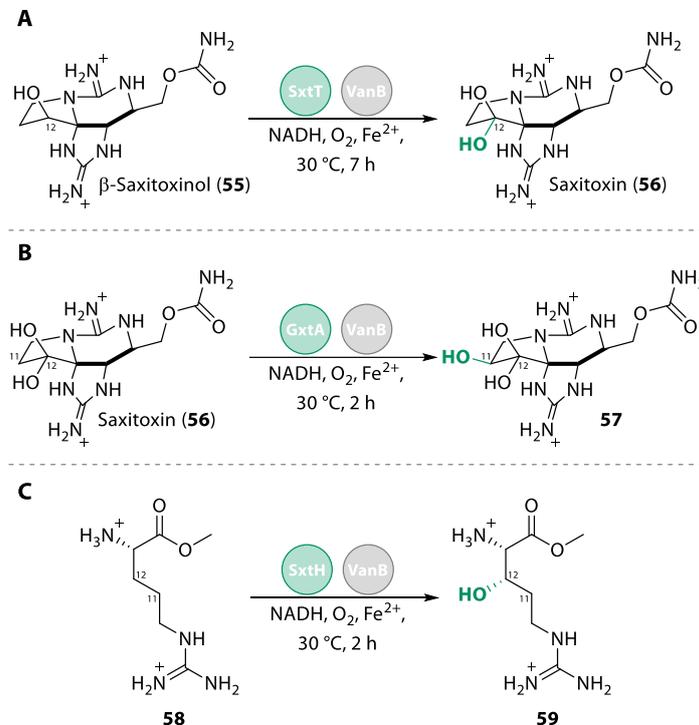
### 3.4 RIESKE-Oxygenasen in *tailoring*-Prozessen des Sekundärmetabolismus

Neben dem bisher beobachteten Hauptaufgabenbereich der RIESKE-Oxygenasen, dem Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen, werden immer mehr dieser Proteine in ihrer Eigenschaft als Biokatalysatoren im Sekundärmetabolismus entdeckt. Im Folgenden werden

ausgewählte Enzyme und ihre bisherige Forschungslage präsentiert. Die Beispiele sind in ihrer Art herausragend und zeigen das enorme Potenzial der RIESKE-Oxygenasen als Biokatalysatoren in späten Stadien der Naturstoffsynthese. Neben der erstmaligen *in vitro* Anwendung einer C-H-Bindungs-Hydroxylierung, Stickstoffoxidationen und Carbozyklisierungen wird auch ein Tandem-System bestehend aus Oxygenase und Epoxidhydrolase vorgestellt.

### 3.4.1 Hydroxygenasen - SxtT, SxtH und GxtA

Saxitoxin (**56**) ist ein paralytisches Schalentiertoxin mit beeindruckender biologischer Aktivität und trizyklischer Architektur. Durch seine Affinität zu spannungsgesteuerten Natriumkanälen ist es eine Leitsubstanz für die Behandlung von verschiedenen Krankheiten und Schmerzen. Während der Biosynthese erfolgen im *tailoring*-Prozess bemerkenswerte, selektive C-H-Hydroxylierungen. NARAYAN untersuchte erstmals im Jahr 2018 die beteiligten Enzyme und konnte so einen Beitrag zur Aufklärung der Biosynthese liefern. Für die regio- und stereoselektiven Hydroxylierungen an den Positionen C11 und C12 wurden die im Gencluster auftretenden RIESKE-Oxygenasen SxtT, SxtH und GxtA in Betracht gezogen.



**Schema 3-2.** Charakterisierung der Oxygenasen der Saxitoxin Biosynthese und Aufklärung der Wirkreihenfolge durch NARAYAN, dabei dient VanB in allen Fällen als regenerierende Reduktase. (A) Identifizierung und *in vitro* Umsetzung des natürlichen Substrats  $\beta$ -Saxitoxinol (**55**) von SxtT. (B) Identifizierung und *in vitro* Umsetzung des natürlichen Substrats Saxitoxin (**56**) von GxtA. (C) Identifizierung und *in vitro* Umsetzung des natürlichen linearen Substrats **58** von SxtH.<sup>[68]</sup>

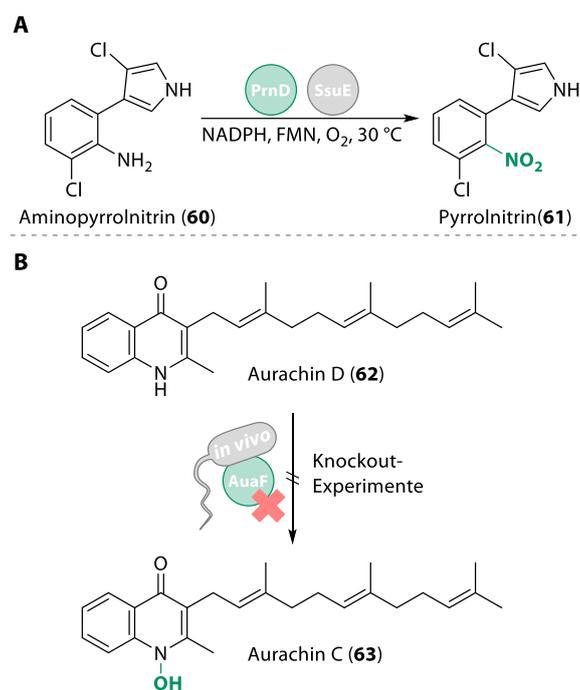
---

Nach heterologer Produktion von Maltosebindeprotein (MBP) Fusionsproteinen in *Escherichia coli* wurden die Oxygenasen mit verschiedenen Intermediaten der Biosynthese getestet und folgende Erkenntnisse abgeleitet:  $\beta$ -Saxitoxinol (**55**) konnte, nach Substrattoleranztests, als natürliches Substrat für SxtT identifiziert werden und wurde durch einmalige C12-Hydroxylierung zu Saxitoxin (**56**) umgesetzt. In früheren Vorläuferexperimenten wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Regenerationspartner verwendet. Nachdem aus dem Saxitoxin Gencluster keine aktive Reduktase identifiziert werden konnte, wurde die Reduktase VanB, welche mit einer verwandten RIESKE-Oxygenase gekoppelt ist, in Hydroxylierungsexperimenten eingesetzt. Dies führte direkt zu Umsatzsteigerung (Schema 3-2, A). Saxitoxin (**56**) selbst konnte als natürliches Substrat von GxtA identifiziert werden. Durch die beobachtete C11-Hydroxylierung wurde ein Gonyautoxin-Vorläufer **57** erhalten (Schema 3-2, B). Sowohl SxtT als auch GxtA weisen eine gewisse Substrattoleranz gegenüber trizyklischen Kernstrukturen auf. Aufgrund der zuvor gewonnenen Erkenntnisse und der fehlenden Aktivität an Trizyklen konnte die Funktion der zweiten C12-Hydroxylierung auf einer früheren Biosynthesestufe SxtH zugeordnet werden. Tests an Surrogaten haben gezeigt, dass der lineare Vorläufer **58** der Zeitpunkt der ersten C12-Hydroxylierung ist (Schema 3-2, C). Im Jahr 2020 wurde eine erste strukturelle Charakterisierung veröffentlicht, welche auch gezielte Mutationen in der aktiven Tasche sowie im Substrattunnel und *loop* bei SxtT und GxtA untersuchte und einen Einfluss der Proteinarchitektur auf die Selektivität und Aktivität belegen konnte.<sup>[89]</sup> Bemerkenswert ist hierbei, dass durch diese Untersuchungen erstmals C-H-hydroxylierende RIESKE-Oxygenasen der paralytischen Schalentiergift-Biosynthese *in vitro* charakterisiert werden konnten.<sup>[88]</sup>

### 3.4.2 N-Oxidasen - PrnD und AuaF

Das Antibiotikum Pyrrolnitrin (**61**) und das Chinolinalkaloid Aurachin C (**63**) weisen in ihrer Struktur beide oxidierte Stickstoffatome auf. Zusätzlich teilen beide die Art und Weise der Oxidation des Stickstoffs, durch RIESKE-Oxygenasen. Bisher stellen die beiden Vertreter die einzigen RIESKE-Oxygenasen dar, denen eine Funktion als N-Oxidase nachgewiesen werden konnte. Im Jahr 2005 konnte ZHAO zeigen, dass PrnD in Gegenwart der Reduktase SsuE die Aminogruppe des Aminopyrrolnitrins (**60**) zur Nitrogruppe des Pyrrolnitrins (**61**) oxidiert. PrnD war lange Zeit die erste und einzige RIESKE-Oxygenase, die *in vitro* charakterisiert wurde. Nach Produktion des His<sub>6</sub>-Fusionsproteins und Reinigung mittels Nickelaffinitätschromatographie wurde das resultierende apo-Protein durch Inkubation mit Eisensulfid unter anaeroben

Bedingungen rekonstituiert. Durch gezielte Mutagenese, kinetische Studien, *labeling*-Experimenten und die Identifikation von Intermediaten des Katalysezyklus konnte die Substratspezifität untersucht und ein Mechanismus postuliert werden.



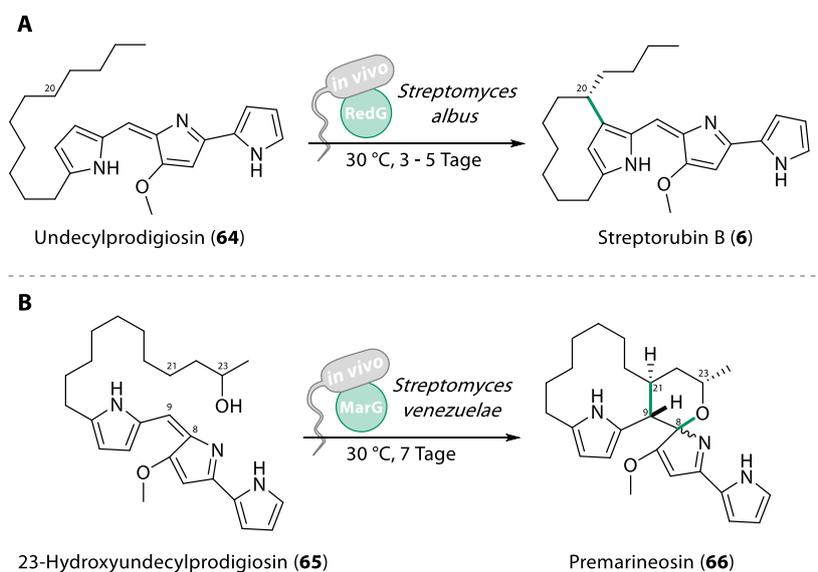
**Schema 3-3.** Charakterisierungen der *N*-Oxidasen PrnD und AuaF. **(A)** *in vitro* Charakterisierung von PrnD im natürlichen Kontext unter Verwendung der Reduktase SsuE durch ZHAO.<sup>[54,55,90–92]</sup> **(B)** Identifikation der AuaF-Funktion durch *in vivo*-Knockout-Experimente von MÜLLER.<sup>[54,93]</sup>

Mechanistisch verläuft die Oxidation nach Hydroxylierung über eine direkte Dehydrogenierung und nicht wie erwartet über vorgeschaltete Dihydroxylierung (Schema 3-3, A).<sup>[54,55,90–92]</sup> Die verwandte RIESKE-Oxygenase AuaF wurde im Jahr 2011 von MÜLLER untersucht. Durch *Knockout*-Experimente konnte ihre Rolle als *N*-hydroxylierende Oxygenase nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu PrnD agiert dieses Enzym als Monooxygenase. 2-Methyl-3-farnesyl-chinolin-4-on auch bekannt als Aurachin D (**62**) wird durch AuaF zum Hydroxylamin Aurachin C (**63**) oxidiert (Schema 3-3, B). Es sind keine weiteren Experimente bekannt, die über diesen ersten *in vivo*-Charakterisierungsansatz hinausgehen.<sup>[54,93]</sup>

### 3.4.3 Carbozyklasen - RedG und MarG

Die bis dato völlig unbekannte Aktivität von RIESKE-Oxygenasen, regio- und stereodivergente oxidative Carbozyklisierungen, wurde durch die Charakterisierung von RedG und MarG zum Reaktionsprofil dieser Oxygenasen hinzugefügt. Prodigine und verwandte Marineosine weisen Makrozyklen als dominantes Strukturmotiv auf. Im Fall von Streptorubin B (**6**) konnte CHALLIS

2015 durch Deletionsexperimente nachweisen, dass die oxidative C-C-Zyklisierung des linearen Vorläufers Undecylprodigiosin (**64**) katalysiert von RedG *in vivo* in *Streptomyces albus* stattfindet. Dabei wurde ebenfalls ein Mechanismus postuliert. durch Deuterierung des C7 konnte nachgewiesen werden, dass der C7-Wasserstoff abstrahiert wird und der Ring unter Inversion des Stereozentrums geschlossen wird (Schema 3-4, A).



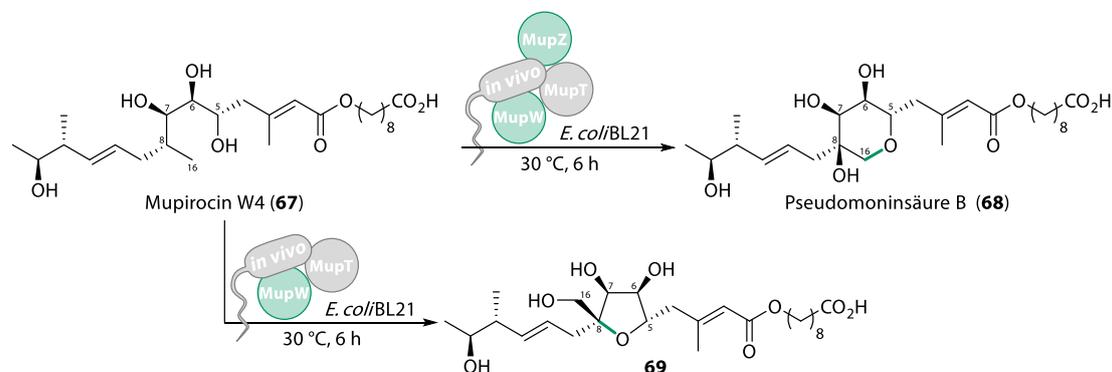
**Schema 3-4.** Charakterisierung der homologen Carbozyklasen RedG und MarG. **(A)** *in vivo* Charakterisierung von RedG am zuvor durch RedH erhaltenen natürlichen Vorläufer Undecycloprodigiosin (**64**) durch CHALLIS.<sup>[54,55,94]</sup> **(B)** *in vivo* Charakterisierung von MarG am natürlichen Vorläufer 23-Hydroxyundecycloprodigiosin (**65**) durch REYNOLDS.<sup>[54,95]</sup>

Normalerweise finden oxidative Zyklisierungen unter Retention des Stereozentrums statt, was die Außergewöhnlichkeit der Rieske-Oxygenase RedG nochmals hervorhebt.<sup>[54,55,94]</sup> MarG weist eine Sequenzhomologie von 64% zu RedG auf und wurde von REYNOLDS im Jahr 2014 *in vivo* in *Streptomyces venezuelae* charakterisiert. Deletions- und Fütterungsexperimente ermöglichten es, die Rolle der Bildung des Makrozyklus und Spiro-THP-Aminals des Premarinosins ausgehend von 23-Hydroxyundecylprodigiosin (**65**) MarG zuzuschreiben (Schema 3-4, B).<sup>[54,95]</sup>

### 3.4.4 Oxidatives Tandem-System - MupW und MupZ

*Pseudomonas fluorescens* produziert mit den Pseudominsäuren oder anders Mupirocin ein gegen Gram-positive Bakterien und Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) wirksames Antibiotikum. Die Aktivität der Mupirocine beruht auf dem THP-Ring in der Struktur, der durch das Tandem-System bestehend aus der RIESKE-Oxygenase MupW und der Epoxidhydrolase MupZ gebildet wird. Nach fehlgeschlagenen *in vitro*-Versuchen mit His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen untersuchte WILLIS dieses System 2018 *in vivo* in *E. coli*. Durch Zugabe von

Mupirocin W4 (**67**) zu *E. coli* Zellen, die ausschließlich die Gene der RIESKE-Oxygenase MupW und der Reduktase MupT heterolog exprimierten, konnte die Bildung eines THF-Rings beobachtet werden. Das postulierte Epoxid, welches durch die Oxidation der C8-C16 Bindung durch MupW als Intermediat entsteht, zyklisiert spontan (Schema 3-5).

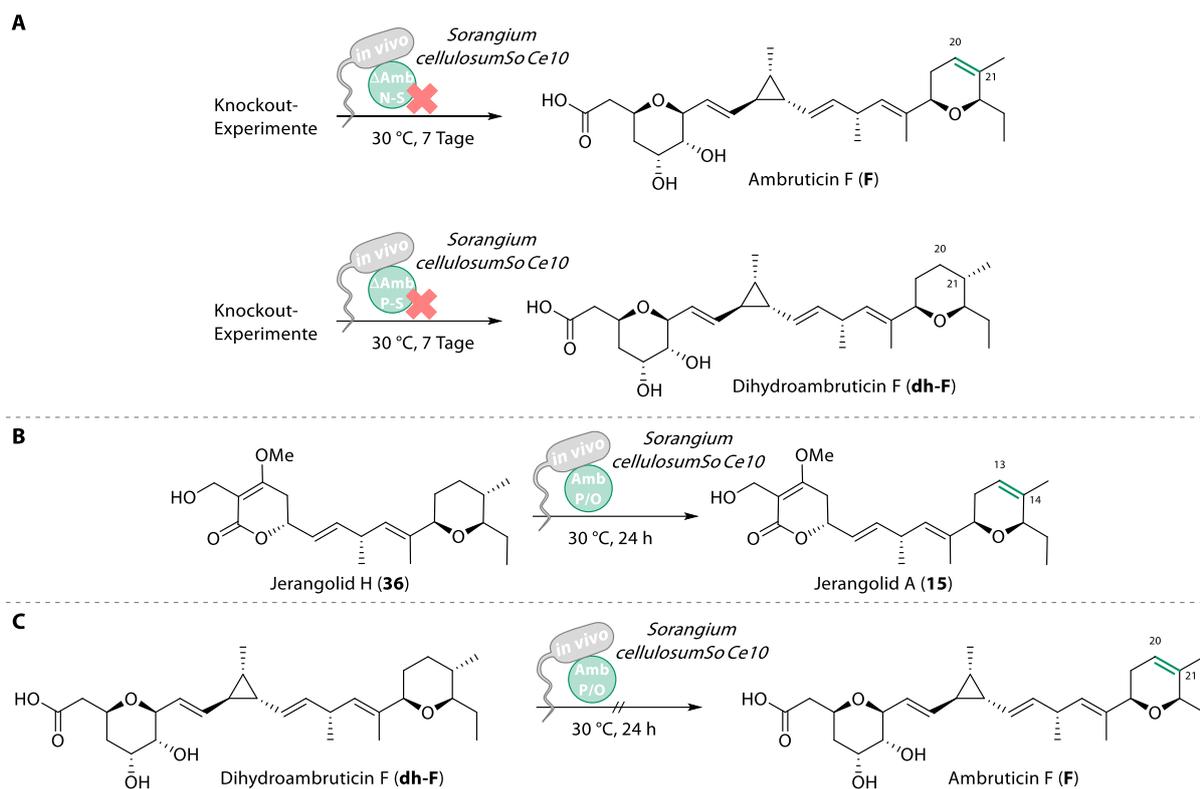


**Schema 3-5.** *In vivo* Charakterisierung der RIESKE-Oxygenase MupW unter Einsatz der Reduktase MupT durch WILLIS. Je nach Einsatz im Tandem-System mit MupZ (THP-Bildung) oder alleinstehend (THF-Bildung) wurde Pseudomoninsäure B (**68**) bzw. das spontan zyklisierte **69** als Produkt identifiziert.<sup>[54,96]</sup>

Durch die zusätzliche Co-Expression des Gens der Epoxidhydrolase MupZ findet enzymkontrolliert eine nicht bevorzugte 6-*endo*-tet-Zyklisierung, entsprechend anti-BALDWIN, durch stereoselektiven Angriff der 5-OH-Gruppe an C16 unter Öffnung des Epoxids statt. Die Öffnung des Epoxids löst die Bildung des 8-OH-THP-Rings aus, wodurch Pseudomoninsäure B (**68**) erhalten wird (Schema 3-5). Die Oxidation eines nicht aktivierten Alkans zu einem Epoxid durch RIESKE-Oxygenasen ist eine ungewöhnliche Reaktion und wurde zuvor nicht beobachtet.<sup>[54,96]</sup>

### 3.4.5 Ambruticin Dihydropyranbildung – AmbP und AmbO

Nach Veröffentlichung der Arbeiten dieser Promotion<sup>[97]</sup>, die im weiteren Verlauf noch detailliert präsentiert werden, veröffentlichte WILLIS 2024 in Anlehnung daran Studien zur THP-Bildung durch die Desaturase AmbP während der Ambruticin Biosynthese.<sup>[98]</sup> Durch die enge Verwandtschaft der Ambruticine und bereits vorgestellten Jerangolide weisen beiden ähnelnde biologische Aktivitäten und PKS-Biosynthesen auf. Es wird angenommen, dass die Bildung des 20,21-Alkens der Ambruticine durch AmbP und dessen regenerierende Reduktase AmbO zu verschiedenen Zeitpunkten im fortgeschrittenen Verlauf der Biosynthese im Wildtyp *Sorangium cellulosum* So ce10 stattfinden könnte.<sup>[21]</sup>



**Schema 3-6.** *In vivo* Charakterisierung der RIESKE-Oxygenase AmbP und Aufstellen einer Hypothese des Wirkzeitpunktes während der Ambruticin-Biosynthese durch WILLIS. **(A)** Knockout-Experimente mit den Stämmen So Ce10- $\Delta$ AmbN-S und So Ce10- $\Delta$ AmbP-S, **(B)** Inkubation von Jerangolid H (**36**) mit dem Ganzzell-System So Ce10-AmbP/O, **(C)** Inkubation von 20,21-Dihydroambruticin F (**dh-F**) mit dem Ganzzell-System So Ce10-AmbP/O.<sup>[98]</sup>

Aus diesem Grund wurde neben Inkubation der Substrate mit zuvor präparierten So ce10-*Knockout*-Stämmen  $\Delta$ ambP-S und  $\Delta$ ambN-S auch eine *in vivo*-Enzymreaktion unter Verwendung eines So ce10-AmbP/O-Stamm, bei dem alle sonstigen PKS-Gene entfernt wurden, durchgeführt. Auch Jerangolid H (**36**) wurde unter diesen Bedingungen als Substrat verwendet. Die Inkubationsstudien unter Verwendung der *Knockout*-Stämme bestätigten die entscheidende Rolle AmbP/O zur Bildung des 20,21-Alkens. Nur bei Experimenten mit vorhandenen Genen der RO und ihrer Reduktase konnte eine Prozessierung von **dh-F** zu **F** beobachtet werden. In sonstigen Fällen akkumulierte nur **dh-F**. Um eine Hypothese zum Zeitpunkt der Desaturierung während der Biosynthese aufzustellen wurden zum einen **36** und **dh-F** mit einem So ce10-AmbP/O-Stamm inkubiert. Überraschender Weise wurde Jerangolid H (**36**) mit einem Umsatz von 23% zu Jerangolid A (**15**) prozessiert, während bei der Inkubation von **dh-F** kein Umsatz stattgefunden hat. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde postuliert, dass AmbP zu einem früheren Zeitpunkt der Biosynthese, vermutlich vor Schluss des westlichen THP-Rings, an der Bildung des 20,21-Alkens der Ambruticine beteiligt sein muss.

## 4 Stand der Forschung

### 4.1 Totalsynthesen der Jerangolide

#### 4.1.1 Totalsynthesen nach MARKO, HANESSIAN und JAUCH

Neben der in dieser Arbeit angewandten Totalsynthesestrategie nach HAHN, welche im Kapitel 4.1.2 detailliert vorgestellt wird, sind drei weitere Strategien bekannt. Im Folgenden sollen kurz die Konzepte sowie die Schlüsselschritte der Totalsynthesen von Jerangolid D (**33**) nach POSPISIL, Jerangolid A (**15**) nach HANESSIAN und Jerangolid B (**34**) nach JAUCH erläutert werden. Alle diese Synthesen basieren auf der Strategie der Fragmentkupplung und vorangestellter meist stereoselektiven Synthese derselben.

#### Totalsynthese Jerangolid D (**33**)

Die erste jemals veröffentlichte Totalsynthese eines Jerangolid Naturstoffes, war die von MARKO aus dem Jahr 2007. Dabei wurde erstmals die diskutierte Strategie zur Synthese von Jerangolid D (**33**) angewandt.

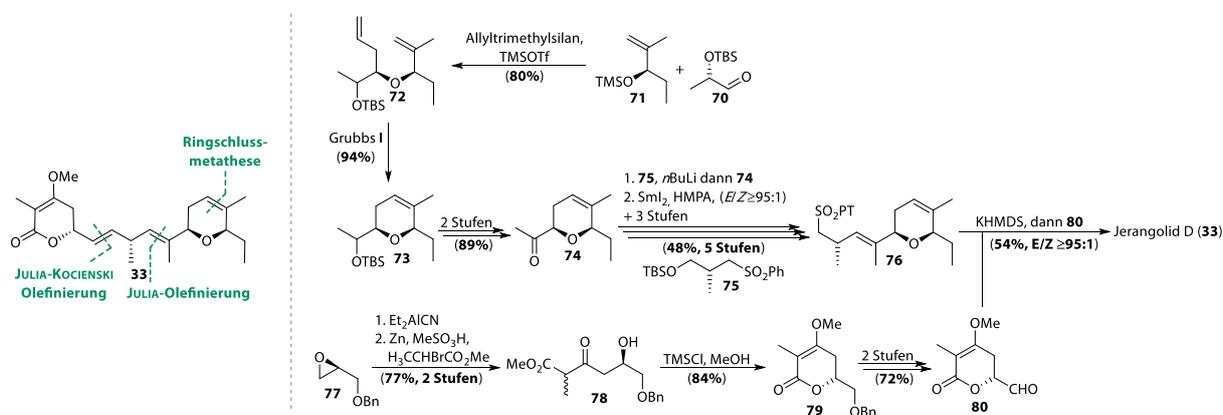


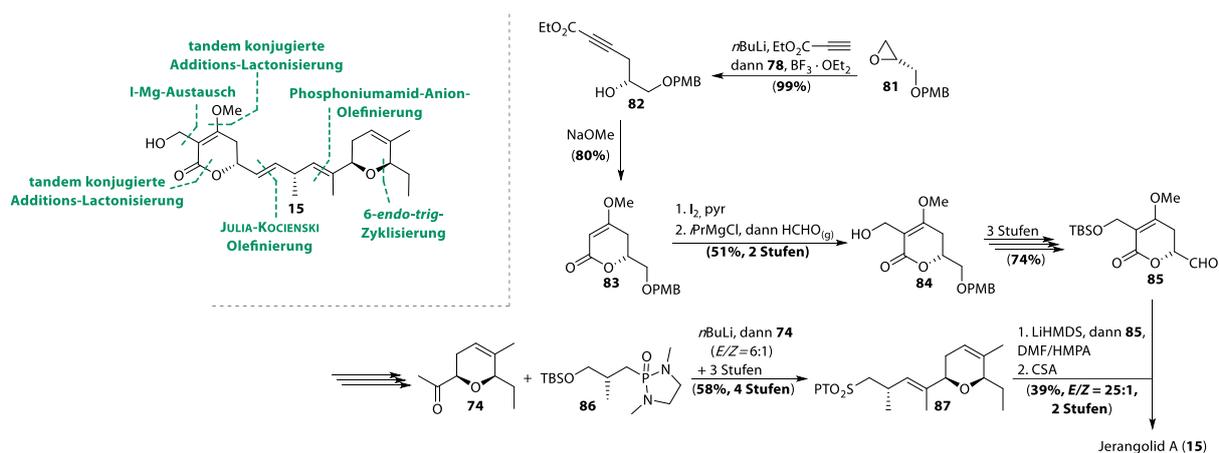
Abbildung 4–1. Retrosyntheseschritte sowie Schlüsselschritte der Totalsynthese von Jerangolid D (**33**) nach MARKO aus dem Jahr 2007. [20,99]

Das Dihydropyran (DHP) **74** wurde durch eine diastereoselektive dreikomponentige SAKURAI-Kondensation gefolgt von einer Ringschlussmetathese ohne Probleme erhalten. Die **74**-Kupplung mit dem Sulfon **75** wurde durch eine abgewandelte JULIA-Olefinierung mit reproduzierbare Ausbeuten (52-67%) und einer hervorragenden Diastereoselektivität ( $E:Z \geq 95:1$ ) realisiert. Ausgehend von **77** führten eine Epoxidöffnung, BLAISE-Reaktion sowie eine Trimethylsilyl (TMS)-vermittelte Zyklisierungsveresterung zur Bildung des benzyl-geschützten Laktone **79**. Dieses wurde dann in den Aldehyd **80** überführt, welcher wiederherum in einer

JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung (JKO) mit dem Sulfon **76** verknüpft wurde. Im finalen Schritt wurde Jerangolid D (**33**) mit einer Ausbeute von 54% und einem *E:Z*-Verhältnis von  $\geq 95:1$  erhalten.<sup>[20,99]</sup>

## Totalsynthese Jerangolid A (**15**)

Eine zweite Totalsynthese, die sich an dieser Strategie orientiert, ist die von Jerangolid A (**15**) nach HANESSIAN aus dem Jahr 2010.



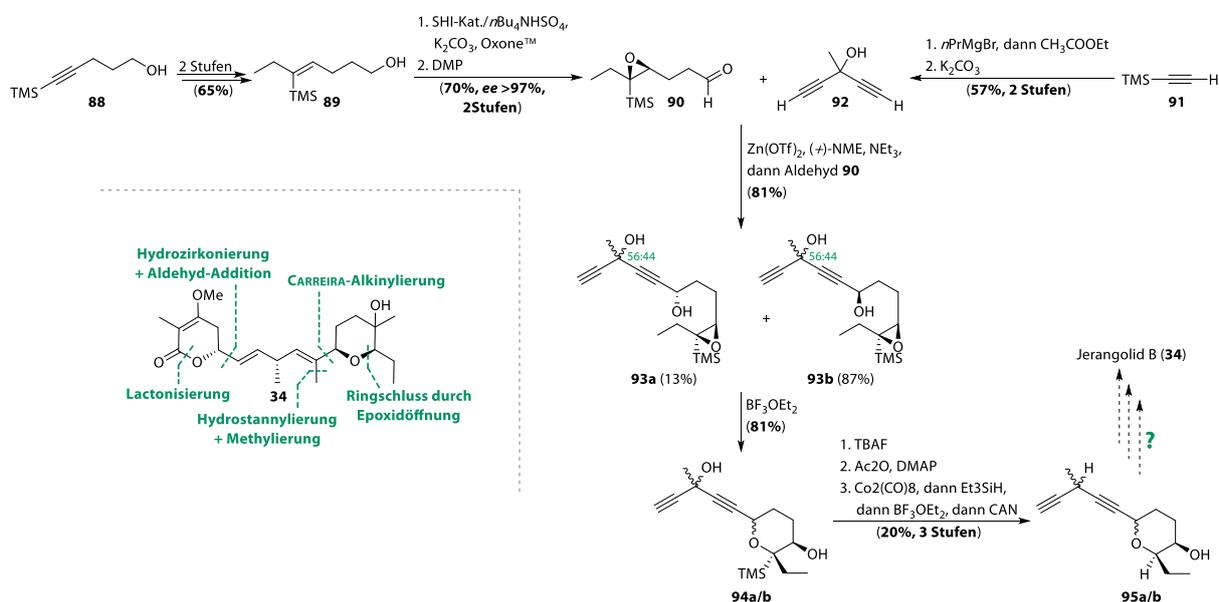
**Abbildung 4–2.** Retrosyntheseschritte sowie Schlüsselschritte der Totalsynthese von Jerangolid A (**15**) nach HANESSIAN aus dem Jahr 2010.<sup>[20,100]</sup>

Das Aldehyd-Fragment **85** wurde durch Epoxidöffnung, oxa-MICHAEL-Lactonisierung, Formyladdition sowie Manipulation von Schutzgruppen und Oxidation gewonnen. Auch in diesem Fall wurde das DHP-Methylketon **74** in einer ersten Kupplungsreaktion, einer Phosphoniumamid-Anion-Olefinierung, mit **86** verwendet. Das mit einer Ausbeute von 58% und einem *E:Z*-Verhältnis von 6:1 entstandene Sulfon **87** wurde anschließend in einer zweiten Kupplung mit **85** (46%, *E:Z* = 25:1) durch eine JKO verbunden. Nach der Entschützung konnte Jerangolid A (**15**) erfolgreich mit einer Ausbeute von 39% über zwei Stufen erhalten werden.<sup>[20,100]</sup>

## Totalsynthese Jerangolid B (**34**)

Der aktuellste Ansatz einer flexiblen Totalsynthese der Jerangolide wurde im Jahr 2020 von JAUCH am Beispiel von Jerangolid B (**34**) veröffentlicht. In der vorliegenden Studie ist die Totalsynthese bisher jedoch unvollständig und kaum optimiert. Lediglich Fragment **95**, welches bereits Ähnlichkeiten zu den Charakteristika des Pharmakophors aufweist, konnte als Intermediat mit einer Ausbeute von 7% über sieben Stufen erhalten werden. Während der

Synthese dieses Intermediats **95** bildeten eine CARREIRA-Alkinylierung mit einem unkonjugierten Diin **92**, eine TMS-vermittelte 6-*endo-tet*-Epoxidöffnung, und eine abschließende Deoxygenierung durch NICHOLAS-Reaktion die Schlüsselschritte.<sup>[101]</sup>



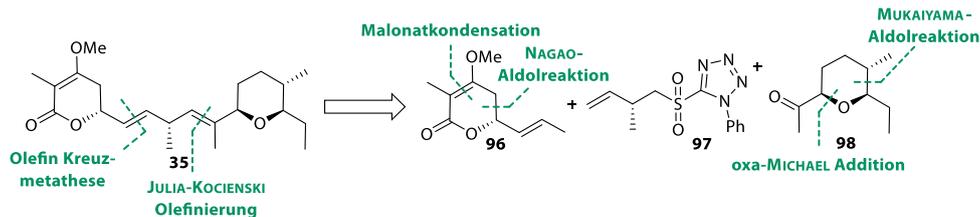
**Abbildung 4-3.** Retrosyntheseschritte der unvollständigen Totalsynthese von Jerangolid B (**34**) nach JAUCH aus dem Jahr 2020 sowie Schlüsselschritte bis zum Intermediat **95**.<sup>[101]</sup>

Ausgehend vom kommerziell erhältlichem 5-Trimethylsilyl-pent-4-yn-1-ol **88** wurde durch Hydroaluminierung, Iodierung gefolgt von NEGISHI-Kupplung sowie SHI-Epoxidierung und DESS-MARTIN-Oxidation der zur CARREIRA-Alkinylierung benötigte Aldehyd **90** synthetisiert. Dabei wurde unter Verwendung des SHI-Katalysators in einer Epoxidierung (74%, *ee*  $\geq$  97%) das zum Ringschluss benötigte Epoxid erzeugt. Nach der CARREIRA-Alkinylierung dieses Aldehyds **90** und Diin **92** konnte das Diastereomergemisch **93ab** (56:44) mit einer Selektivität von 87:13 und einer Ausbeute von 81%, erhalten werden. Die folgende Epoxidöffnung und der Ringschluss durch  $\text{BF}_3\text{EtO}_2$  führten zu den THP-Diastereomeren **94ab** bei einer Ausbeute von 81% und einer hoher 6-*endo-tet*-Selektivität. Die finale Entschützung und Deoxygenierung durch eine NICHOLAS-Reaktion führten schlussendlich in drei Stufen und einer Ausbeute von 20% zum Intermediat **95**. Derzeit wird daran gearbeitet, die Totalsynthese von Jerangolid B (**34**) abzuschließen sowie die NICHOLAS-Reaktion zu optimieren.<sup>[101]</sup>

## 4.1.2 Totalsynthesen nach HAHN

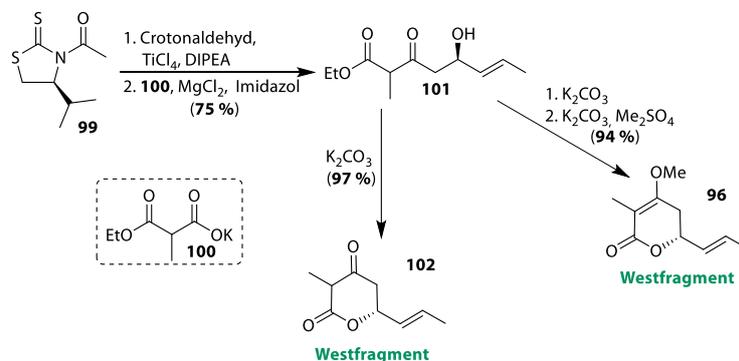
### Totalsynthese Jerangolid E (35)

Die in dieser Arbeit angewandte Methode aus dem Jahr 2018 nach HAHN bietet einen flexiblen Zugang zu verschiedenen post-PKS-Produkten und Derivaten der Jerangolid Biosynthese. Die Variabilität wird auch in diesem Fall durch eine modulare Synthesestrategie erreicht, bei der drei einzelne Fragmente miteinander verbunden werden (Schema 4-1).<sup>[1,20,99,100]</sup>



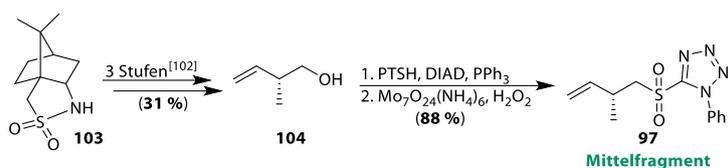
Schema 4-1. Retrosynthese von Jerangolid E (35) nach HAHN.

Jerangolid E (35) wurde in 15 linearen Stufen mit einer Ausbeute von 15% erhalten. Drei zuvor synthetisierte Fragmente, das Vinyllacton **96**, das Mittelfragment **97** und das Pyran **98** wurden über eine JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung und anschließende Olefin Kreuzmetathese gekuppelt.<sup>[1]</sup>



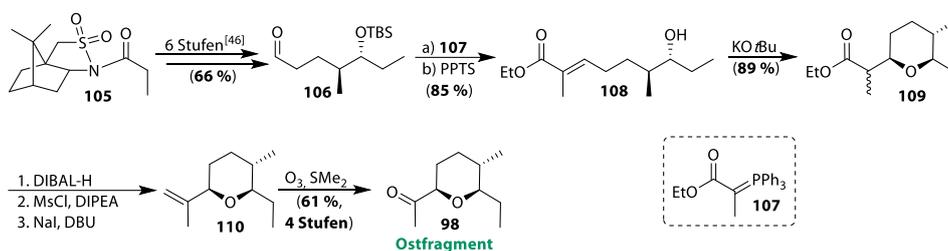
Schema 4-2. Synthese des Vinyllactons **96** mittels NAGAO-Aldolreaktion und anschließende Malonatkondensation.

Die Vinyllactone **96** und **102** wurden synthetisiert, indem zunächst eine stereoselektive NAGAO-Aldol-Reaktion durchgeführt wurde. Anschließend erfolgte eine Malonat-Kondensation mit dem Kaliumsalz **100** und schließlich die Zyklisierung des 5-Hydroxy-3-oxoesters (**101**) unter schwach basischen Bedingungen. Optional konnte währenddessen ohne zusätzliche Aufarbeitung eine *O*-Methylierung mittels  $\text{Me}_2\text{SO}_4$  durchgeführt werden, um den Methylenolether zu erhalten (Schema 4-2).<sup>[1,102]</sup>



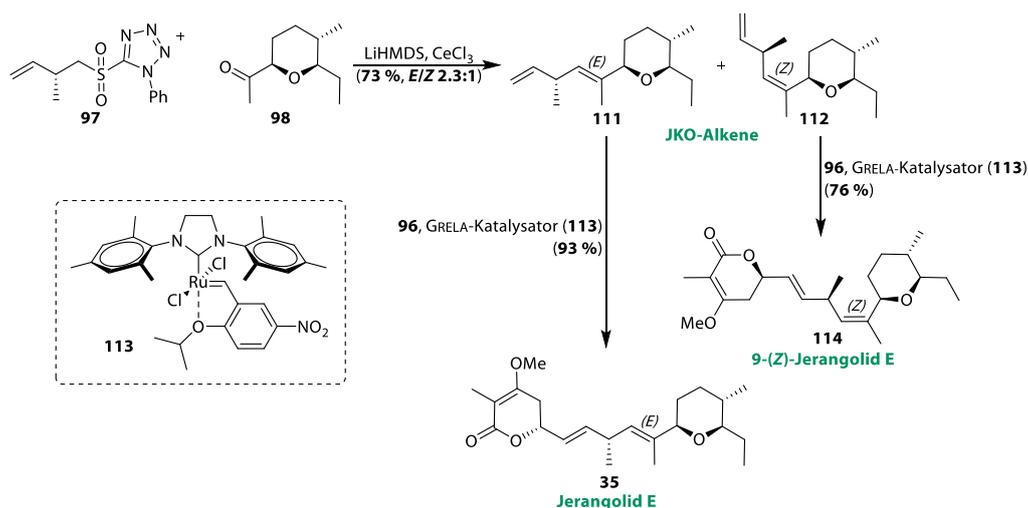
**Schema 4-3.** Synthese des Sulfons **97** ausgehend von dem OPPOLZER-Sultam **103**.

Gemäß einer Vorschrift von BREIT wurde der Homoallylalkohol **104** in drei Stufen ausgehend vom OPPOLZER-Sultam **103** synthetisiert (Schema 4-3).<sup>[1,103]</sup> Mittels anschließender MITSUNOBU-Reaktion und Oxidation des Thioethers mit Peroxomolybdat konnte das Mittelfragment **97** erhalten werden.



**Schema 4-4.** Synthese des Pyrans **98** ausgehend von **105**.

Die aufwendigste Fragmentsynthese, die Synthese des Pyrans **98** wurde anfangs nach einem bereits von HAHN etablierten Protokoll durchgeführt um den Aldehyd **106** zu erhalten (Schema 4-4).<sup>[49]</sup> Dieser wurde in einer WITTIG-Olefinierung mit anschließender TBS-Entschützung umgesetzt. Nach der Zugabe von KOtBu und der dadurch induzierten stereoselektiven intramolekularen Oxa-MICHAEL-Addition (IMOMA) konnte eine Mischung der C2-Epimere von **109** erhalten werden. Die Verwendung des Gemisches war für den weiteren Verlauf unproblematisch, da bei Umsetzung zu **110** das Stereozentrum in einen sp<sup>2</sup>-hybridisierten Kohlenstoff überführt wurde. Nach der abschließenden Ozonolyse wurde das gewünschte Pyran **98** erhalten.<sup>[1]</sup> Die drei erfolgreich erhaltenen Fragmente konnten nun in den finalen Schritten der Totalsyntheseroute durch verschiedene C-C-Kupplungsreaktionen über die Alkene **111** und **112** zu den gewünschten Jerangolid E Verbindungen verknüpft werden.



**Schema 4-5.** JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung und Olefin Kreuzmetathese mittels GRELA-Katalysator **113** der Jerangolid E (**35**) Totalsynthese nach HAHN.

Das Ostfragment **98** und das Mittelfragment **97** wurden durch JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung miteinander verbunden. Die optimierten Reaktionsbedingungen der Reaktion sind in Tabelle 4-1, Eintrag 3 aufgeführt. Das Gemisch aus (*E*)- und (*Z*)-Isomer wurde durch Säulenchromatographie getrennt, wodurch die Isomere unabhängig voneinander umgesetzt werden konnten.<sup>[104,105]</sup> Dadurch konnte die Synthese von 9-(*Z*)-Derivaten realisiert werden.

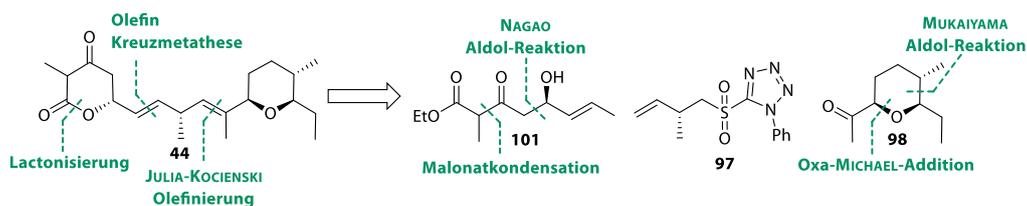
**Tabelle 4-1.** Bedingungen der JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung während des Optimierungsprozesses der Reaktion.

	LiHMDS [Äq.]	CeCl <sub>3</sub> [Äq.]	weitere Bedingungen	Ausbeute [%]	E:Z
<b>1</b>	1.3	-	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , -40 °C → RT, 17 h Ansatzgröße: 17 mg	26	2.6:1
<b>2</b>	1.4	-	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , -40 °C → -20 °C, 3 h Ansatzgröße: 10 mg	n.b.	3.2:1
<b>3</b>	1.6	0.4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , -40 °C → RT, 6 h Ansatzgröße: 18 mg	73	2.3:1
<b>4</b>	1.3	0.6	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , -40 °C → RT, 17 h Ansatzgröße: 100 mg	61	2.1:1
<b>5</b>	1.3	0.6	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , -40 °C → RT, 17 h Ansatzgröße: 200 mg	45	1.8:1

n.b. = nicht bestimmt

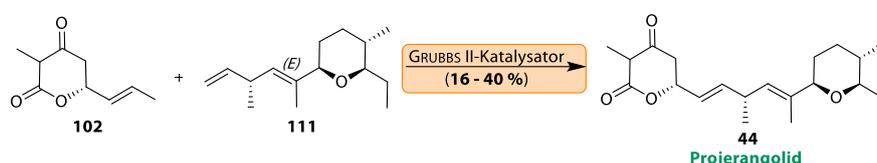
Während der Optimierung dieser Reaktion stellte sich heraus, dass sowohl die Stereoselektivität als auch die Ausbeute mit bei höheren Ausgangsmengen abnahmen und längere Reaktionszeiten für vergleichbare Ausbeuten erforderlich waren (Tabelle 4-1). Die abschließende Kupplung erfolgte durch Kreuzmetathese des erhaltenen Alkens **111** und des Westfragments **96** unter Verwendung des GRELA-Katalysators **113** in C<sub>7</sub>F<sub>8</sub> als Lösungsmittel. Ein vollständiger Umsatz und eine Ausbeute von 93% wurden erreicht.<sup>[106–109]</sup> Auf diese Weise war es möglich, neben Jerangolid E (**35**) auch das korrespondierende 9-(*Z*)-Derivat **114** zu synthetisieren.<sup>[1]</sup>

## Totalsynthese Projerangolid (44)



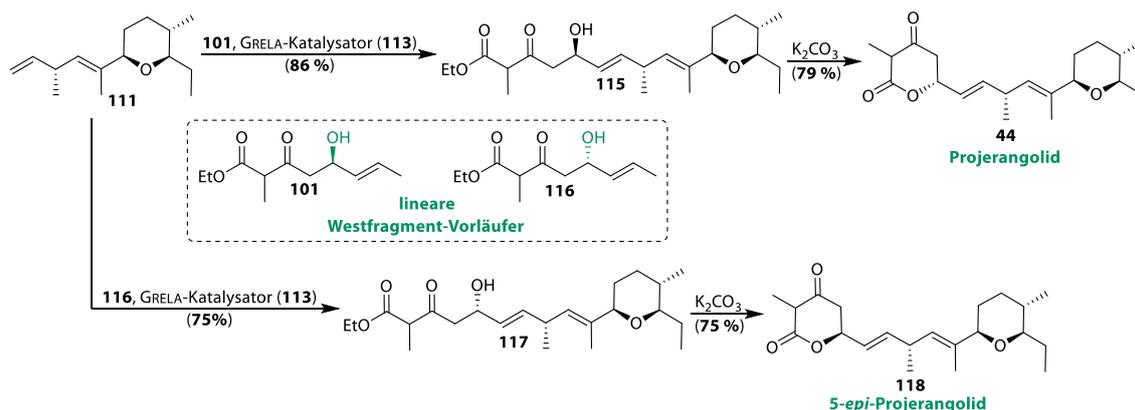
Schema 4-6. Retrosynthese von Projerangolid (44) nach HAHN.

Entsprechend der beschriebenen Synthesestrategie von Jerangolid E (35) wurde Projerangolid (45) von HAHN in 16 linearen Stufen mit einer Ausbeute von 11% synthetisiert (Schema 4-6). Analog wurde die Kupplung der Fragmente **102** und **111** per Kreuzmetathese angestrebt.<sup>[1]</sup>



Schema 4-7. Olefin Kreuzmetathese von **102** und **111** als nicht optimierter finaler Kupplungsschritt der Projerangolid (**44**) Totalsynthese.

Im Vergleich zu den bisherigen Erfahrungen mit der Kreuzmetathese wurde in diesem Fall, ein signifikanter Rückgang der Ausbeuten, mit schwankenden Höchstwerten von 40%, beobachtet. Dieses Verhalten konnte auf geringe Stabilität und schwierige Isolierbarkeit des Projerangolids (**44**) zurückgeführt werden. Um dieser Problematik entgegen zu wirken, wurde eine Modifikation der bisherigen Route angestrebt.<sup>[1]</sup>



Schema 4-8. Optimiertes Olefin Kreuzmetatheseprotokoll der Projerangolid (**44**) Totalsynthese nach HAHN.

Um dieses Problem zu lösen, wurde die Kreuzmetathese unter denselben Bedingungen mit der linearen Vorstufe **101**, welche erst anschließend unter milden basischen Bedingungen zyklisiert wurde, durchgeführt (Schema 4-8). Dadurch, dass die Reaktionsreihenfolge geändert wurde, war es möglich, die Zwischenstufe und das Endprodukt schonender zu isolieren. Durch diese Anpassung konnte Projerangolid (**44**) in 16 linearen Stufen mit einer Ausbeute von 11% erhalten

---

werden. Auch im Fall der Projerangolide konnte aufgrund der Variabilität der Totalsynthese ein Derivat zugänglich zu machen. Durch Kreuzmetathese, mit dem zuvor synthetisierten Enantiomer **116** als linearem Vorläufer und anschließender Zyklisierung wurde das nicht-natürliche Derivat 5-*epi*-Projerangolid (**118**) erhalten.<sup>[1]</sup>

## 4.2 *In vitro*-Enzymaktivitätstests der RIESKE-Oxygenasen JerP und JerL

### 4.2.1 Enzymproduktion

Die Anwendung der Proteine in *in vitro* Enzymaktivitätstests sollte zunächst in löslicher Form erfolgen. Im Zuge dessen wurden umfangreiche Studien zur Expression, dem Erhalt des [2Fe2S]-Clusters und der Reinigung vorgenommen. Neben dem Aufbau einer *E. coli* Stamm/Plasmid-Bibliothek und der Expression dieser, wurden die einzelnen Expressionen unter Variation verschiedenster Parameter getestet. Eine Vielzahl der Versuche führte zur Proteinaggregation bzw. unlöslichen Proteinen. Am vielversprechendsten waren Expressionen unter Verwendung des Plasmids pETMBP-1a in Verbindung mit *E. coli* Tuner™ (DE3) und der zusätzlichen Verwendung der GROEL/GROES- und DNAJ/DNAK/GRPE-Chaperonsysteme (pG-KJE8-Plasmid). Dabei konnten bis zu 80% lösliches Protein erfolgreich erhalten und gereinigt werden. Jedoch fiel auf, dass die typische Eisenfärbung, die ein Indiz für den erfolgreichen Einbau des [2Fe2S]-Clusters ist, nicht vorhanden war. Nichtsdestotrotz sollte der verwendete MBP-tag für den Einsatz in Aktivitätstests final abgespalten werden, wobei es erneut zu starker Proteinaggregation kam.<sup>[110,111]</sup> Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse und der wiederholenden Aggregation wurde eine denaturierende Proteingewinnung durch *inclusion bodies* (IBs) mit anschließender Rekonstitution angestrebt. Die optimierten Bedingungen des erfolgreichen Protokolls und die Anwendung der Proteine in einem ersten Aktivitätstest werden nachfolgend präsentiert.

#### Denaturierung und Präparation der *inclusion bodies*

Zur Präparation der IBs von His<sub>6</sub>-JerP/L und GST-JerO wurden die entsprechenden Zellpellets der pCold-I\_*jerP/L* und pGEX-6P-I\_*jerO* Expressionen in Lysepuffer (1 mL/0.1 g Zellen, Tuner™ (DE3)) resuspendiert. Nach Zugabe frischer 1 mM DTT und 0.1 mM PMSF Lösungen erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschalls. Anschließend wurde der Überstand nach Zentrifugation verworfen und das Zellpellet zweimal mit Waschpuffer I gewaschen. Die Denaturierung wurde

durch eine einstündige Resuspension des Pellets im Denaturierungspuffer durchgeführt. Nach dem Zentrifugieren und Verwerfen unlöslicher Bestandteile wurde der Überstand bei -80 °C gelagert, bis er weiterverwendet wurde.<sup>[110,111]</sup>

### Rekonstitution des RIESKE-[2Fe-2S]-Clusters

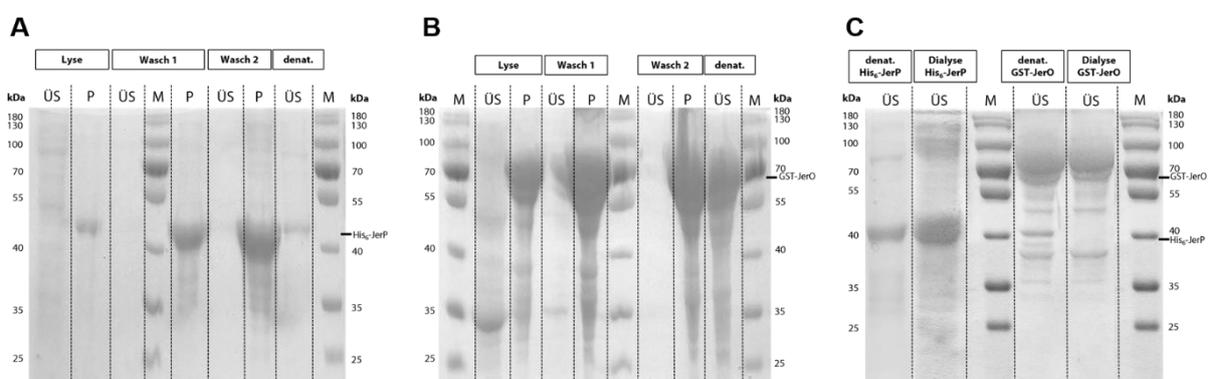
Für die Rekonstitution sind entgaste Puffer/Reagenzien erforderlich und die einzelnen Schritte müssen unter Intertgasatmosphäre durchgeführt werden. Der denaturierte Überstand wurde mit Denaturierungspuffer verdünnt und inkubiert, danach wurde eine Natriumsulfid-Lösung hinzugegeben und inkubiert. Nach Zugabe der Rekonstitutionslösung und einer erneuten Inkubation wurde die Lösung mit eisenfarbenem Aussehen in einen Dialyseschlauch (14 kDa) transferiert und unter Rühren dialysiert.<sup>[110,111]</sup>

### Rekonstitution der Monooxygenase JerO

Die Rekonstitution von JerO erfolgte durch die Verdünnung des denaturierten Überstands in Dialysepuffer. Anschließend wurde die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch (14 kDa) überführt und dialysiert.<sup>[110,111]</sup>

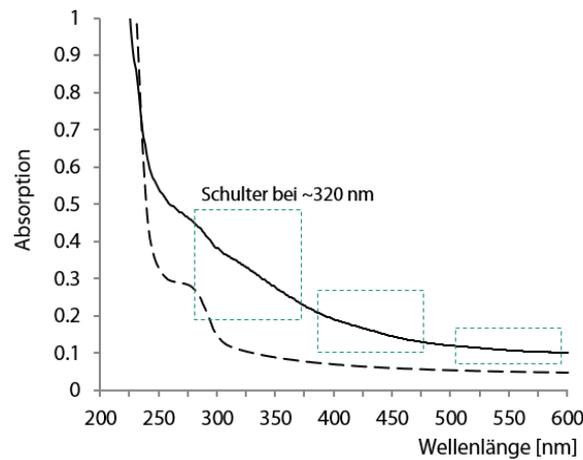
## 4.2.2 Analytik der Proteinisolierung

Die Renaturierung von His<sub>6</sub>-JerL war bei allen Versuchen erfolglos. Bei allen Tests ergab sich eine starke Proteinaggregation, die Lösung verfärbte sich nicht typischerweise bräunlich. Daher wurden die folgenden Untersuchungen nur am Beispiel von JerP/O durchgeführt.



**Abbildung 4-4.** SDS-Polyacrylamidgel (12%) des Monitorings des Verlaufs der Denaturierung und Rekonstitution von His<sub>6</sub>-JerP und GST-JerO. **(A)** Denaturierung von His<sub>6</sub>-JerP. **(B)** Denaturierung von GST-JerO. **(C)** Rekonstitution und Dialyse von beiden Enzymen. **M:** Marker (kDa), **P:** Pellet, **ÜS:** Überstand; GST-JerO = 69 kDa, His<sub>6</sub>-JerP = 42 kDa.<sup>[110]</sup>

Der Prozess und die erfolgreiche Darstellung der Proteine His<sub>6</sub>-JerP und GST-JerO wurden mittels SDS-PAGE verfolgt (Abbildung 4–4). Der erfolgreiche Einbau des [2Fe<sub>2</sub>S]<sub>2</sub>-Clusters wurde durch UV/Vis-Absorptionsspektroskopie bestätigt (Abbildung 4–5).<sup>[110,111]</sup> Wie in Abbildung 4–5 dargestellt, zeigen sich charakteristische Maxima bei ~320, ~450 und ~570 nm.



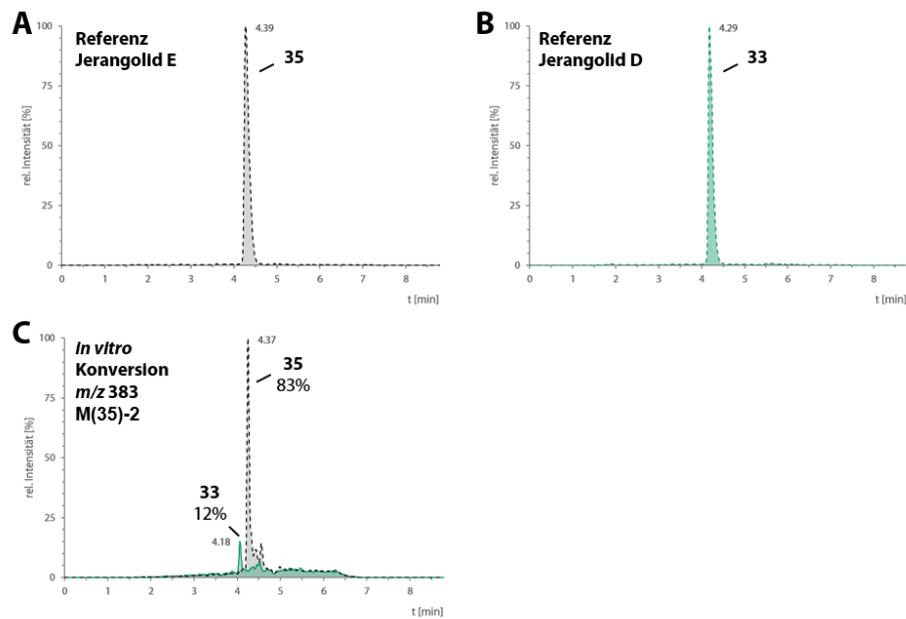
**Abbildung 4–5.** UV/Vis-Absorptionsspektrum der rekonstituierten Enzyme His<sub>6</sub>-JerP und GST-JerO. Durchgezogenen Linie = His<sub>6</sub>-JerP (1 mg/mL), gestrichelte Linie = GST-JerO (0,6 mg/mL).<sup>[110]</sup>

Das Spektrum zeigte minimal eine Schulter bei ~320 nm auf, was darauf schließen lässt, dass eine erfolgreiche Rekonstitution stattgefunden hat und ein aktiver [2Fe-2S]-Cluster vorlag. Die anderen charakteristischen Maxima zeigten zu wenig Intensität, um interpretiert werden zu können. Dies war auf die geringe Konzentration des isolierten Enzyms zurückzuführen.<sup>[110]</sup>

#### 4.2.3 *In vitro* Enzymreaktion von Jerangolid E (35) mit JerP

Für einen ersten Aktivitätstest wurden die rekonstituierten RIESKE-Oxygenase JerP und Reduktase JerO in einer *in vitro* Enzymreaktion eingesetzt. Jerangolid E (35), His<sub>6</sub>-JerP und GST-JerO wurden in Tris/HCl Puffer gelöst und FAD sowie NADPH zugegeben. Die Reaktion wurde für 16 h bei 25 °C und 300 µM inkubiert. Nach Zugabe von ges. NaCl-Lösung zum Beenden der Reaktion wurde die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Der Umsatz wurde mittels UPLC-MS-Chromatographie bestimmt.<sup>[110]</sup> Bei der Analyse mittels UPLC-MS-Chromatographie wurde ein Signal ( $t_R = 4.18$  min) mit dem zugehörigen m/z-Verhältnis für Jerangolid D (33) identifiziert. Der Umsatz wurde anhand der Integralflächen des Edukts und Produkts bestimmt. Dieser war mit maximal 12% niedrig und wurde mit der geringen Aktivität der Reduktase JerO begründet. Durch den verwendeten GST-tag wurde die Proteinstruktur so verändert, wodurch möglicherweise große Auswirkungen auf die Sterik, Stabilität und Koordination des Reduktase/Oxygenase-Paares sowie die allgemeinen reduzierenden Eigenschaften und somit

auf die ETK angenommen werden konnten. Die erwartete Masse wurde anschließend mittels HRMS bestätigt.<sup>[110]</sup>

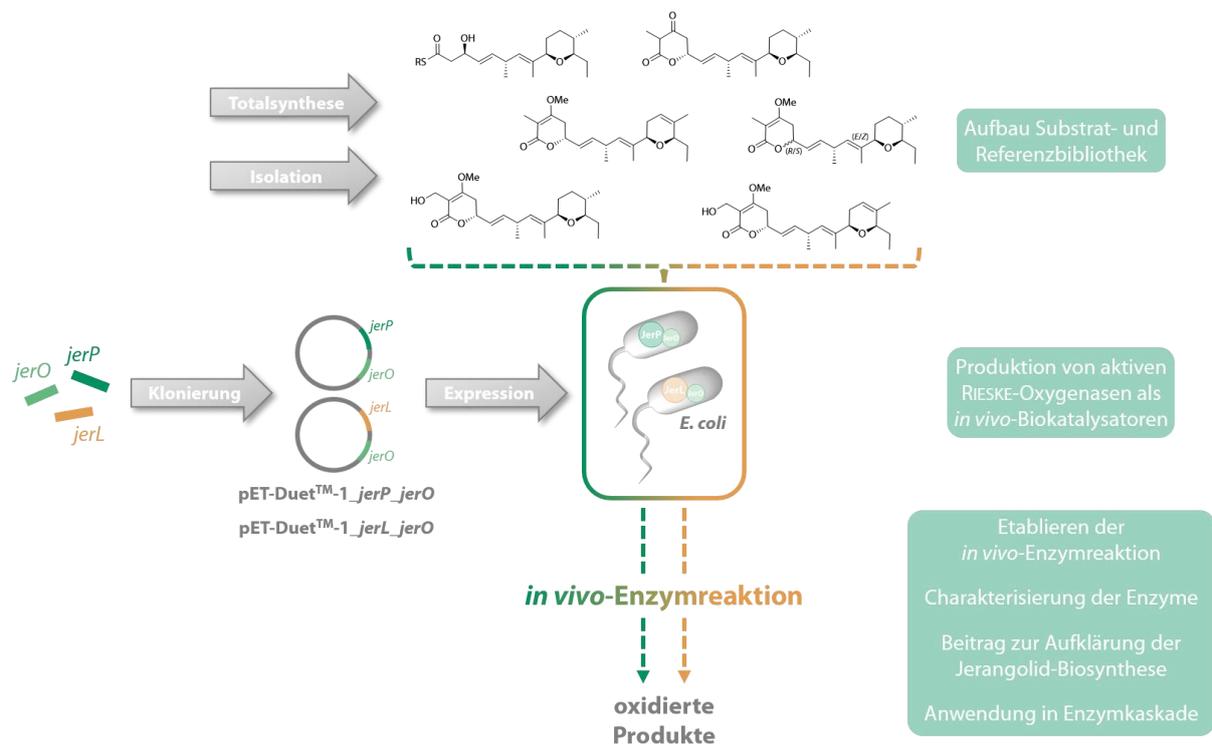


**Abbildung 4-6.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vitro* Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit 30.5  $\mu\text{M}$  His<sub>6</sub>-JerP und 66.6  $\mu\text{M}$  GST-JerO. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; (A) Referenz Jerangolid E (**35**), (B) Referenz Jerangolid D (**33**), (C) *in vitro* Enzymreaktion. HRMS: ber. 383.2199, gef. 383.3300.<sup>[110]</sup>

Ein Vergleich mit aktuellen Referenzen zeigt allerdings eine Abweichung der Retentionszeit des Produkts von rund 0.1 min während die des Substrats übereinstimmt (Abbildung 6–11). Diese Beobachtung lässt die gewonnen Ergebnisse mindestens kritisch hinterfragen. Es sollte angestrebt werden, die Experimente zu wiederholen.

## 5 Zielsetzung

Jerangolide, Naturstoffe aus der Klasse der Polyketide, weisen neben ihrer hochselektiven antimykotischen biologischen Aktivität auch außergewöhnliche enzymkatalysierte Transformationen im Verlauf der Biosynthese auf. Zusätzlich zu den bereits erwähnten und teilweise aufgeklärten Besonderheiten sind vor allem die Oxidationsreaktionen an nicht aktivierten Positionen von hohem synthetischem Interesse. Postuliert wurden diese Reaktionen als Teil des *tailoring*-Prozesses, bei dem die RIESKE-Oxygenasen JerP und JerL zum einen eine Desaturierung im THP-Ring des Ostfragments und zum anderen eine Hydroxylierung der Methylgruppe des Methylenolethers im Westfragment katalysieren (Kapitel 3.2). Ähnlich wie Cytochrom P450 besitzen diese Oxygenasen großes Potential zur Enzymkatalyse. Allerdings sind nur wenige RIESKE-Oxygenasen des Sekundärmetabolismus bisher untersucht und teilweise charakterisiert worden (Kapitel 3.4). Zurückzuführen ist dieser Umstand unter anderem auf deren Empfindlichkeit gegenüber äußeren Einflüssen und die schwierige Handhabung während Isolation und Reaktion.



**Abbildung 5–1.** Angestrebte interdisziplinäre Strategie zur Untersuchung der ROs der Jerangolid-Biosynthese durch Kombination aus den Bereichen der synthetischen Chemie, Molekularbiologie und Biochemie.

Um diese kleine Gruppe der ROs um *JerP* und *JerL* zu erweitern und einen Beitrag zur Aufklärung der Jerangolid-Biosynthese hinsichtlich Zeitpunktes und Reihenfolge der Oxidationen zu leisten, sollten im Rahmen dieser Arbeit die beiden RO charakterisiert und deren Enzymreaktionen am

---

postulierten biosynthetischen Vorläufer Jerangolid E (**35**) etabliert werden. JerP und dessen regenerierende Reduktase JerO sollte als Modellsystem dienen und aus den daraus gewonnenen Erkenntnissen eine Übertragung auf JerL/JerO und das homologe AmbP/AmbO stattfinden. Das benötigte Jerangolid E (**35**), dessen Derivate (**155-157**) sowie weitere Substrate (**44, 158-160**) sollten analog einer etablierten Strategie<sup>[1]</sup> totalsynthetisch dargestellt werden. Neben der Charakterisierung mittels *in silico*-Studien und einem erneuten Versuch der *in vitro*-Anwendung von JerP, lag der Fokus vor allem auf dem Etablieren und Nutzen eines *in vivo*-Enzymreaktionssystems. Die Strategie der *in vivo*-Enzymreaktion sollte die empfindlichen Proteine gegenüber äußeren Einflüssen schützen, deren Handhabung schonender gestalten und die Aktivität steigern. Dazu wurde eine Co-Expression der Gene der Reduktase und der RO, von der eine stabilere Produktion des Proteinkomplexes erwartet wurde, angestrebt. Realisiert werden sollte das durch die Verwendung von pET-Duet-1™ als Expressionsvektor in *E. coli*. Nach erfolgreicher Produktion von Reduktase und RO in *E. coli* sollte die *in vivo*-Enzymreaktion am postulierten biosynthetischen Vorläufer Jerangolid E (**35**) etabliert und auf einen Umsatz von  $\geq 30\%$  optimiert werden. Zu diesem Zweck sollten einzelne Faktoren der Reaktions- sowie Präparationsbedingungen schrittweise verändert und deren Einfluss auf den Umsatz untersucht werden. Schlussendlich sollten am optimierten System der *in vivo*-Enzymreaktion Tests zur Substrattoleranz und der Verwendung in Enzymkaskadenreaktionen durchgeführt werden. Anhand der gewonnenen Ergebnisse sollte neben der Substrattoleranz und dem Zeitpunkt sowie der Reihenfolge der Oxidationen während der Jerangolid-Biosynthese auch ein möglicher Einsatz der ROs in chemoenzymatischen Naturstoff-Totalsynthesen beleuchtet werden.

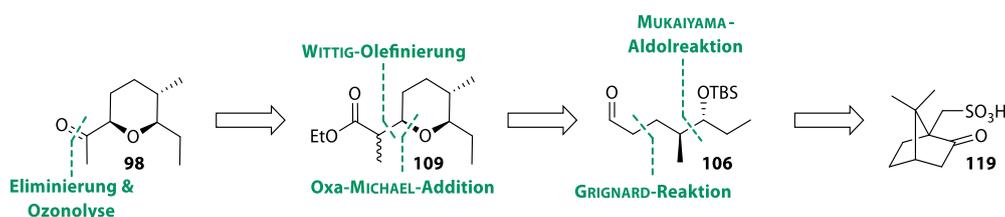
## 6 Ergebnisse und Diskussion

### 6.1 Substratsynthese

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Totalsynthese der für Enzymreaktionstests benötigten Substrate **35**, **44** sowie **155** - **160** diskutiert. Der Fokus der totalsynthetischen Arbeiten lag dabei, im Gegensatz zum klassischen Ansatz auf einer divergenten und flexiblen Zugänglichkeit der einzelnen Verbindungen für Enzymreaktionstests. Dieses Kapitel ist chronologisch gegliedert in die Synthese der benötigten Fragmente, die JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung und die anschließende Kreuzmetathese. Ehe auf die erzielten Ergebnisse eingegangen wird, wird zu Beginn jedes Abschnitts kurz der retrosynthetische Ansatz präsentiert.

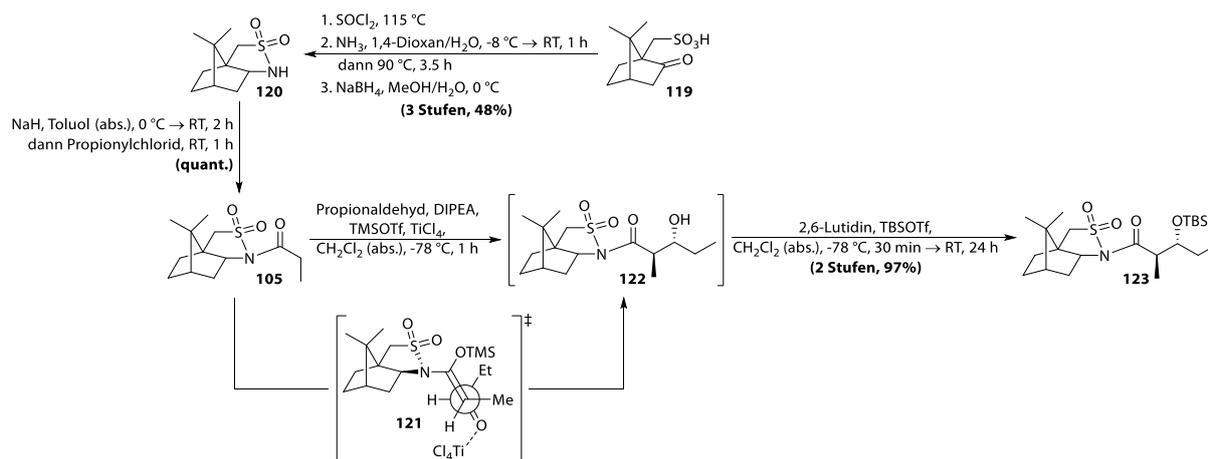
#### 6.1.1 Kupplungsfragmente

##### 6.1.1.1 Ostfragment 98



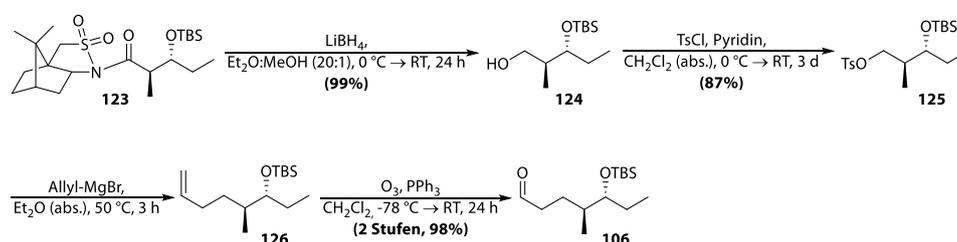
Schema 6-1. Retrosynthesestrategie des Ostfragments **98**.

Zu Beginn sollte ausgehend von (*R*)-(-)-Camphersulfonsäure (**119**) das OPPOLZER-Sultam als dirigierendes Auxiliar für eine spätere Aldolreaktion synthetisiert werden. Nach Propionylierung des Sultams und anschließender MUKAIYAMA-Aldolreaktion zur selektiven Erzeugung des *anti*-Aldolprodukts sollte das Auxiliar wieder reduktiv abgespalten und der entstandene Alkohol in eine gute Abgangsgruppe (Tosyl-) überführt werden. Durch GRIGNARD-Reaktion an dieser Position, gefolgt von Ozonolyse sollte der Aldehyd **106** erzeugt werden. Durch WITTIG-Olefinierung sollte die Verlängerung des Rückgrats und die Einführung der Ethylesterfunktion stattfinden. Nach Entschützung der Hydroxygruppe sollte unter basischen Bedingungen eine stereoselektive IMOMA durchgeführt werden. Der Ester sollte nun zum Alkohol reduziert werden, um anschließend eine gute Abgangsgruppe (Mesyl-) zu erzeugen und eine E1cb-Eliminierung durchzuführen. Das entstandene Alken sollte durch Ozonolyse zum Jerangolid-Ostfragment **98** umgesetzt werden.



**Schema 6-2.** Synthese von **123** über *anti*-selektive MUKAIYAMA-Aldol-Reaktion und direkt anschließende TBS-Schützung. Das während der Aldol-Reaktion dirigierende OPPOLZER-Sultam wurde zuvor ausgehend von (*R*)-(-)-Camphersulfonsäure synthetisiert und propionyliert.

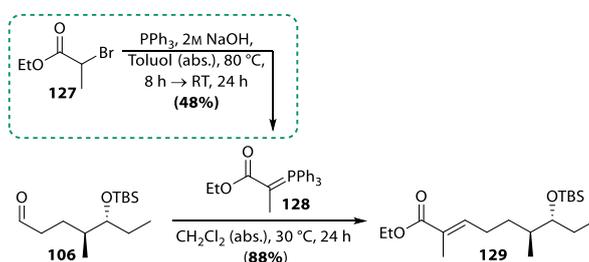
Ausgehend von (*R*)-(-)-Camphersulfonsäure (**119**) wurde das OPPOLZER-Sultam als dirigierendes Auxiliar für eine spätere Aldolreaktion synthetisiert. Hierzu wurde **119** in drei Stufen über Herstellung des Säurechlorids, Bildung des Champhersulfonylimins und Reduktion dessen mittels  $\text{NaBH}_4$ , mit einer Ausbeute von 48% zum gewünschten OPPOLZER-Sultam **120** prozessiert. Nach quantitativer Propionylierung konnte in einer MUKAIYAMA-Aldol-Reaktion der erzeugte Silylenolether mit Propionaldehyd zum Aufbau der gewünschten Stereozentren umgesetzt werden. Die Enolat-Geometrie hat bei dieser Reaktion keinen Einfluss, stattdessen ist durch den sterischen Anspruch des OPPOLZER-Sultams nur der Rückseitenangriff des Silylenolethers möglich, was zur *anti*-Konfiguration führt.<sup>[112,113]</sup> Die Reaktion verläuft also unter Auxiliar-Kontrolle über den Übergangszustand **121** (Schema 6-1). Anschließend wurde, um daraufhin das Auxiliar reaktiv zu entfernen, der entstandene Alkohol mittels TBSOTf und 2,6-Lutidin geschützt. Eine zusammengefasste Ausbeute über beide Stufen ergab nach Reinigung *per* Säulenchromatographie 97%.



**Schema 6-3.** Synthese des Aldehyds **106** über eine GRIGNARD-Reaktion und Ozonolyse mit milder, neutraler Aufarbeitung.

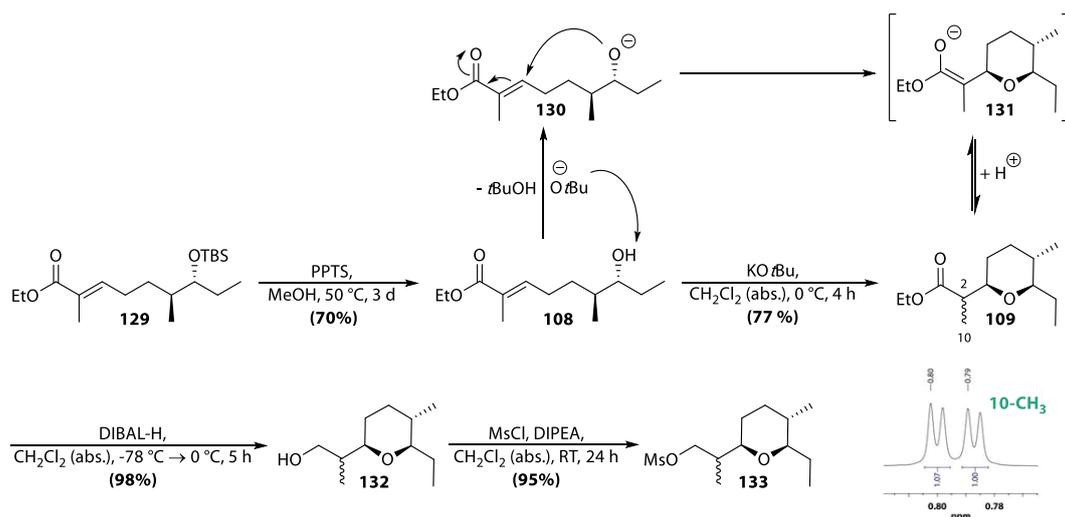
Die Abspaltung wurde in einem Lösungsmittelgemisch von Diethylether und Methanol durchgeführt, dabei dient der Anteil an Methanol zur Steigerung der Aktivität des  $\text{LiBH}_4$  und zur Verbesserung der Löslichkeit. Die reduktive Abspaltung des OPPOLZER-Sultams mittels  $\text{LiBH}_4$  lieferte den Alkohol **124** in einer Ausbeute von 99%. Das abgespaltene Auxiliar konnte mittels

Reinigung durch Säulenchromatographie vom Produkt abgetrennt werden. Für die geplante GRIGNARD-Reaktion wurde eine gute Abgangsgruppe benötigt. Der primäre Alkohol wurde mit Tosylchlorid und Pyridin tosyliert. Die lange Reaktionszeit von drei Tagen war der unvollständigen und langsamen Umsetzung des Alkohols zum Tosylat **125** geschuldet. Durch Säulenchromatographie konnte das nicht umgesetzte Edukt vollständig reisoliert werden. Das reine Produkt wurde in einer Ausbeute von 68% erhalten. Anschließend erfolgte eine GRIGNARD-Reaktion mit frisch synthetisierten Allyl-MgBr, wobei das Alken **126** erhalten wurde. Dieses wurde direkt in anschließender Ozonolyse mit Aufarbeitung mittels Triphenylphosphin zum Aldehyd **106** (zusammengefasste Ausbeute über zwei Stufen 98%) umgesetzt.



**Schema 6-4.** Synthese des Esters **129** durch WITTIG-Olefinierung und Synthese des benötigten Ylids **128**.

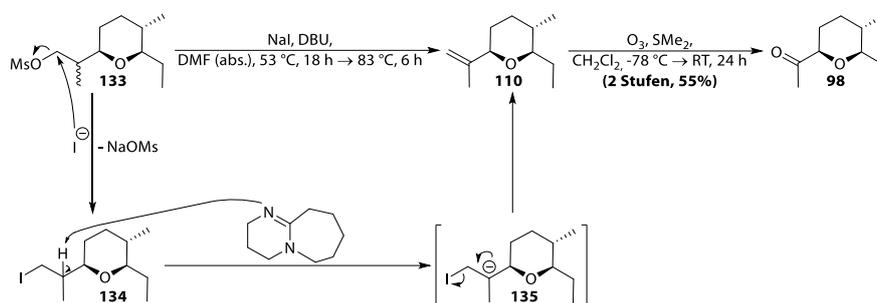
Der Aldehyd **106** wurde in einer WITTIG-Olefinierung mit dem Ylen **128** zum Ester **129** umgesetzt. Es wurde eine dreifach substituierte, (*E*)-konfigurierte Doppelbindung erzeugt. Zuerst wurde das Phosphoniumsalz durch Substitution gebildet, welches anschließend mittels basischer Aufarbeitung in das Ylen **128** überführt wurde (Ausbeute: 48%). Bei Verwendung dessen konnte, nach Reinigung per Säulenchromatographie, der Ester **129** in einer guten Ausbeute von 70% erhalten werden. Daraus lässt sich schließen, dass es für diese WITTIG-Olefinierung notwendig ist, Ylen **128** direkt umzusetzen. Noch effektiver zeigte sich der Einsatz von kommerziell erworbenen Ylen **128**. Vermutet wird, dass die kommerzielle Charge aufgrund weniger Verunreinigungen stabiler und aktiver ist. Durch diese Änderung konnten vorher benötigte Reaktionsstufen und Ressourcen eingespart und die Ausbeute der WITTIG-Olefinierung auf 88% gesteigert werden. Diese Reaktion generierte das für die IMOMA benötigte MICHAEL-System in **108/129**.



**Schema 6-5.** Synthese des Mesylats **133** über stereoselektive, intramolekulare oxa-MICHAEL-Addition zum Erhalt des *cis*-Tetrahydropyrans, gefolgt von Reduktion und Mesylierung, inklusive Ausschnitt des 10-CH<sub>3</sub>-Signals aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Rohproduktes der *syn*-selektiven IMOMA zur Bestimmung des Isomerenverhältnisses der Position 2-C von 1.07. Vollständiges <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum siehe Abbildung 9–9.

Nach milder, saurer TBS-Entschützung mittels PPTS in Methanol (Ausbeute: 70%) wurde die *syn*-selektive IMOMA durchgeführt. Die *syn*-Selektivität ist in diesem Fall auf die Reaktionsführung zurückzuführen. Unter kinetischen Bedingungen findet bevorzugt die Bildung des *trans*-THP-Rings statt. Während unter den gewählten thermodynamischen Bedingungen, mit längerer Reaktionszeit und höherer Temperatur, überwiegend die Bildung des *cis*-THP-Rings stattfindet.<sup>[114–116]</sup> Die durch KOtBu deprotonierte Hydroxygruppe kann an der Doppelbindung des MICHAEL-Systems angreifen, wodurch der Tetrahydropyranring geschlossen wird. Während dieses Prozesses wird ein Enolat **131** gebildet, das sich letztendlich durch Reprotonierung und Keto-Enol-Tautomerie zum Produkt der Reaktion **109** umwandelt (Schema 6-5). In  $\alpha$ -Position des Esters trat, bedingt durch die Tautomerie, keine Stereoselektivität auf (Isomerenverhältnis 1.07:1, Schema 6-5). Das Produkt konnte nach Reinigung *per* Säulenchromatographie als Gemisch seiner C-2-Epimere in einer Ausbeute von 77% erhalten werden. Da das Stereozentrum während der nächsten Reaktionssequenz (Schema 6-6) in einen sp<sup>2</sup>-hybridisierten Kohlenstoff überführt wurde, konnte das Epimerengemisch ohne Nachteile weiterverwendet werden. Der Ester **109** wurde durch DIBAL-H in einer Ausbeute von 98% zum Alkohol **132** reduziert. Eine direkte Iodierung des Alkohols, durch beispielsweise eine APPEL-Reaktion, war in diesem Fall nicht möglich. Vorhergehende Arbeiten in der Arbeitsgruppe zeigten, dass Reaktivität und Umsatz der direkten Iodierung gering waren. Für die geplante Eliminierungsreaktion wurde eine Abgangsgruppe benötigt, weshalb der Alkohol **132** mit Mesylchlorid und DIPEA in das Mesylat **133** überführt wurde. Das Mesylat **133** wurde in einer Ausbeute von 95% erhalten und konnte

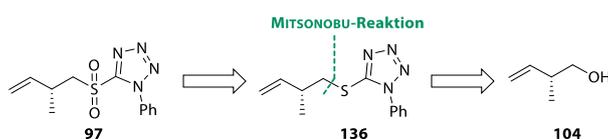
ohne weitere Reinigung weiterverwendet werden. Dieses wurde anschließend *in situ* durch Iodid substituiert.



**Schema 6-6.** Synthese des Ostfragments **98** über eine E1cB-Eliminierung und Ozonolyse mit milder, neutraler Aufarbeitung.

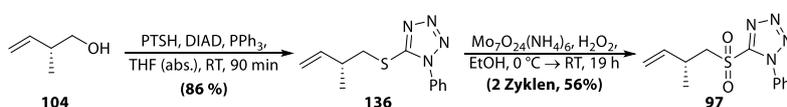
Aufgrund der Instabilität an Licht des Natriumiodids und der Zwischenstufen musste die Reaktion in vollständiger Dunkelheit durchgeführt werden. Die initiale Substitution der Mesylatgruppe **133** durch Iodid führte zur iodierten Spezies **134**, welche anschließend durch die Base Diazabicycloundecen (DBU) deprotoniert werden konnte. Dabei wurde ein stabilisiertes tertiäres Carbanion **135** als Übergangszustand ausgebildet- Durch dieses konnte Iodid eliminiert und das leicht flüchtige Alken **110** gebildet werden.<sup>[117]</sup> Aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften wurde bei der Aufarbeitung sehr vorsichtig mit nur moderaten Unterdrücken gearbeitet und das Alken **110** direkt weiterverwendet. In der anschließenden Ozonolyse mit milder, neutraler Aufarbeitung mittels Dimethylsulfid konnte das Ostfragment **98** nach Reinigung *per* Säulenchromatographie erfolgreich erhalten werden. Eine zusammengefasste Ausbeute über beide Stufen ergab 55%. Die Synthese des Ostfragments mit 10% in 17 linearen Stufen weist, im Vergleich zur Literatur<sup>[1]</sup> (13 lineare Stufen, 30%), eine niedrigere Ausbeute bei mehr linearen Stufen auf. In der literaturbekannten Synthese wurde direkt von **105** gestartet. Die zusätzlichen Stufen kommen durch die Synthese des OPPOLZER-Sultams und dessen Propionylierung zustande. Geringe Ausbeuten während der Auxiliarsynthese tragen zu der im Vergleich niedrigeren Gesamtausbeute bei. Diese Synthesesequenz wurde im Maßstab 50.0 g (*R*)-(-)-Camphersulfonsäure (**119**), mit dem vorrangigen Ziel, genügend Auxiliar für diese und weitere Totalsynthesen darzustellen, durchgeführt. Auch die Reaktionssequenz aus Iodierung, Eliminierung und Ozonolyse zeigt in der Literatur mit 62% gegenüber den hier beobachteten 55% eine leicht höhere Ausbeute. Der Verlust der Ausbeute in der Eliminierung lässt sich durch die Lichtempfindlichkeit der Reagenzien erklären. Das eingesetzte NaI könnte weniger Reaktivität aufgewiesen haben und die Zwischenstufe bei Lichteinstrahlung zersetzt worden sein. Alle weiteren Syntheseschritte der Ostfragment-Synthese sind vergleichbar zur Literatur abgelaufen.

### 6.1.1.2 Mittelfragment 97



Schema 6-7. Retrosynthesestrategie des Mittelfragments **97** ausgehend vom vorhandenen Alkohol **104**.

Da der Alkohol **104**, welcher nach einem Protokoll von BREIT<sup>[103]</sup> synthetisiert wurde, aus vorhergegangenen Arbeiten in einem ausreichenden Maßstab ( $\geq 2.00$  g) vorhanden war, sollte ausgehend von diesem durch eine MITSUNOBU-Reaktion mit dem 1-Phenyl-1*H*-tetrazol-5-thiol der Thioether **136** synthetisiert werden. Anschließend sollte dieser durch Oxidation zum Sulfon in das JULIA-KOCIENSKI-Reagenz bzw. das Mittelfragment **97** überführt werden.

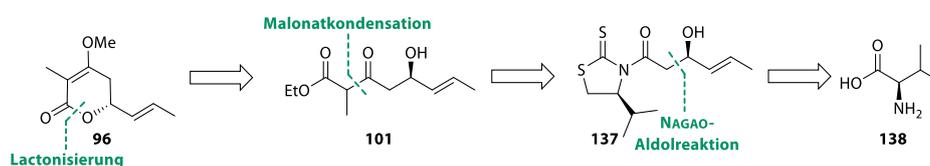


Schema 6-8. Synthese des Mittelfragments **97** über MITSUNOBU-Reaktion und Oxidation.

Der Homoallylalkohol **104** wurde in einer MITSUNOBU-Reaktion mit 1-Phenyl-1*H*-tetrazol-5-thiol, DIAD und Triphenylphosphin zum Thioether **136** umgesetzt. Nach Reinigung *per* Säulenchromatographie konnte das Produkt in einer Ausbeute von 86% erhalten werden. Durch Oxidation mit Peroxomolybdat und Wasserstoffperoxid wurde das Sulfon **97** synthetisiert. Um die unerwünschte Peroxidbildung der terminalen Doppelbindung zu vermeiden, wurde die Reaktion mittels DC-Kontrolle verfolgt und rechtzeitig abgebrochen. Nach Säulenchromatographie konnte die mono-oxidierte Zwischenstufe, das Sulfoxid, reisoliert und **97** abgetrennt werden. Das reisolierete monooxidierte Zwischenprodukt wurde in einem weiteren Oxidations-Zyklus umgesetzt. Die finale Ausbeute beider Zyklen lag bei 56%. Somit konnten ausreichende Mengen des Mittelfragments **97** erfolgreich erhalten werden. Beide Stufen zusammen ergaben eine Gesamtausbeute von 48%, wohingegen in der Literatur<sup>[1]</sup> 88% erreicht wurden. Erklärt werden kann dies durch den Oxidationsschritt. Dort kann die Ausbeute bei Bedarf durch weitere Zyklen gesteigert werden. In diesem Fall reichte die Menge an Mittelfragment **97** aber bereits nach zwei Oxidationen für die geplanten Experimente aus und das reisolierete Zwischenprodukt wurde zur Lagerung verwendet.

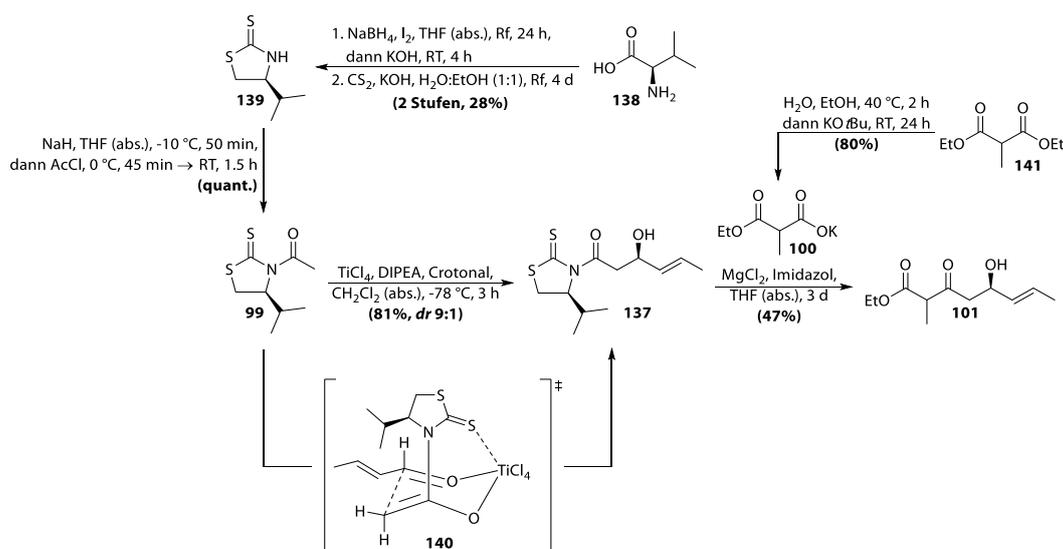
### 6.1.1.3 Westfragmente 96, 142, 147 und 148

(*R,E*)-4-Methoxy-3-methyl-6-(prop-1-en-1-yl)-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-on (**96**)



Schema 6-9. Retrosynthesestrategie des Westfragments **96** und dessen linearen Vorläufer **101**.

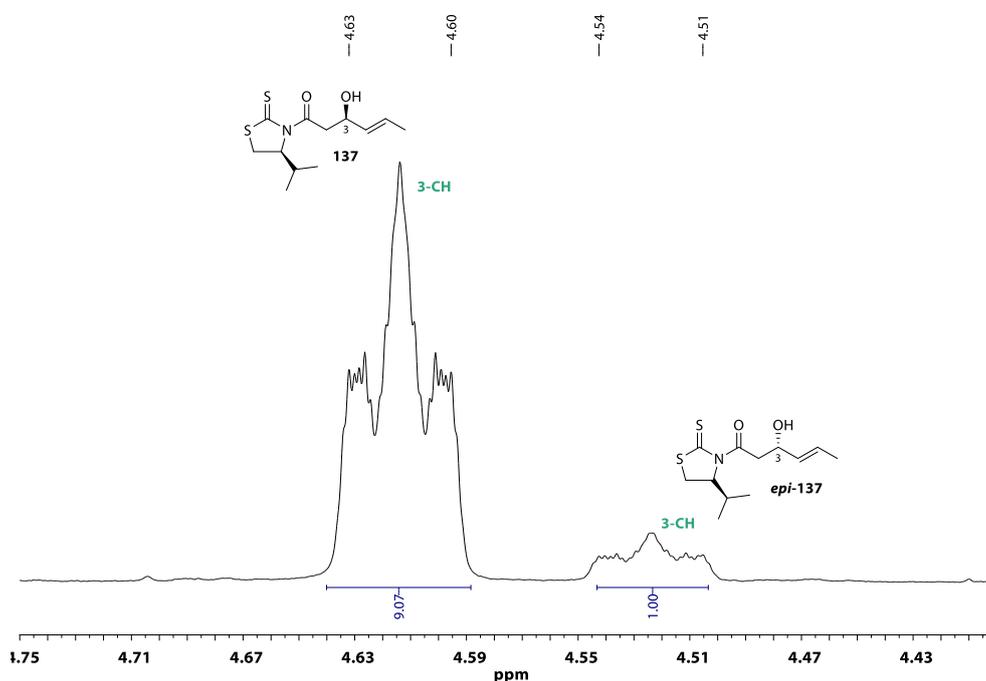
Durch eine asymmetrische NAGAO-Aldol-Reaktion von Crotonal mit dem acetylierten (*S*)-NAGAO-Auxiliar sollte der sekundäre Alkohol **137** stereoselektiv aufgebaut werden. Das dazu benötigte (*S*)-NAGAO-Auxiliar sollte zuvor aus *D*-Valin erzeugt und acetyliert werden. Die nachfolgende Abspaltung vom Auxiliar sollte unter gleichzeitiger Verlängerung des Kohlenstoff-Rückgrats durch eine Malonat Kondensation mit dem entsprechenden Kaliumsalz des Malonatbausteins stattfinden. Nach Lactonisierung unter leicht basischen Bedingungen sollte eine *O*-Methylierung des Ketons durchgeführt und somit das Westfragment **96** final erhalten werden.



Schema 6-10. Synthese des linearen Vorläufers **101** über eine NAGAO-Aldol-Reaktion und Malonat-Kondensation.

Zu Beginn der Westfragment-Synthese wurde *D*-Valin **138** nach Reduktion zu Valinol mit Kohlenstoffdisulfid zum (*S*)-NAGAO-Auxiliar **139** umgesetzt, welches dirigierend in folgender Aldolreaktion eingesetzt werden sollte. Mit 28% über zwei Stufen ist die Ausbeute der Auxiliar-Synthese eher gering. Die Synthese des (*S*)-NAGAO-Auxiliars wurde in einem Maßstab  $\geq 20.0$  g durchgeführt, wodurch auch bei bereits erwarteten geringen Ausbeuten (Literatur<sup>[118,119]</sup>: 44%) ausreichend Material erzeugt werden konnte. In neueren Synthesestrategien des Arbeitskreises wird dieses Problem durch die Verwendung von Valinol als Startbaustein umgangen. Nach Acetylierung zu **99** wurde zum Aufbau des Stereozentrums eine kinetisch kontrollierte NAGAO-

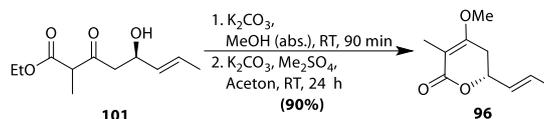
Aldol-Reaktion durchgeführt. Dabei wurde zuerst das stereoinduzierende, acetylierte (*S*)-NAGAO-Auxiliar **99** mit DIPEA und der LEWIS-Säure TiCl<sub>4</sub> aktiviert und anschließend mit Crotonal umgesetzt. Dies führt zuerst zur Ausbildung eines Enolats und anschließend des ZIMMERMAN-TRAXLER-Übergangszustands **140** (Schema 6-10). Stabilisiert wird dieser Zustand durch Chelatisierung der LEWIS-basischen Positionen der drei Reaktionskomponenten am Titanzentrum. Die *syn*-Selektivität in Bezug auf die Isopropylgruppe des Auxiliars resultiert aus der pseudoäquatorialen Anordnung des Crotonals. Aufgrund der Konformation des fixierten Auxiliars wird durch diese Anordnung eine destabilisierende, 1,3-diaxiale Wechselwirkung des Isopropylsubstituenten mit dem Aldehyd vermieden.<sup>[102,120]</sup>



**Abbildung 6–1.** Ausschnitt des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums des Diastereomengemisches **137** und *epi*-**137** der NAGAO-Aldol-Reaktion zur Bestimmung des *dr* von 9:1 anhand des 3-CH-Signals. Vollständiges <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum siehe Abbildung 9–20.

Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das Aldolprodukt **137** in einer Ausbeute von 81% und einem *dr* von 9:1 erhalten werden (Abbildung 6–1). Anschließend wurde durch eine Malonatkondensation mit dem Kaliumsalz **100** das Auxiliar abgespalten und der lineare Vorläufer **101** synthetisiert. Mit 47% lieferte diese Reaktion nach säulenchromatographischer Reinigung eine im Vergleich zur Literatur<sup>[1]</sup> niedrige Ausbeute. Dies kann zum einen durch die Verwendung einer im Vergleich älteren Charge des Kaliumsalzes erklärt werden. Das Kaliumsalz könnte bei Kontakt mit Luftfeuchtigkeit zur entsprechenden Carbonsäure hydrolysieren, die dann anschließend decarboxyliert. Somit wäre ein gewisser Anteil unbrauchbar für die Kondensation. Zum anderen konnte das freigesetzte Auxiliar auch durch mehrmalige

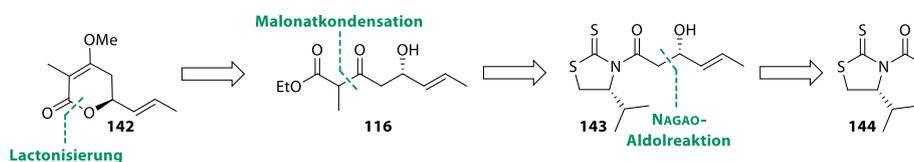
Säulenchromatographie nur partiell vom Produkt getrennt werden, weshalb noch eine Mischfraktion von Auxiliar und Produkt vorlag.<sup>[121]</sup>



**Schema 6-11.** Synthese des Westfragments **96** durch Lactonisierung und Methylierung.

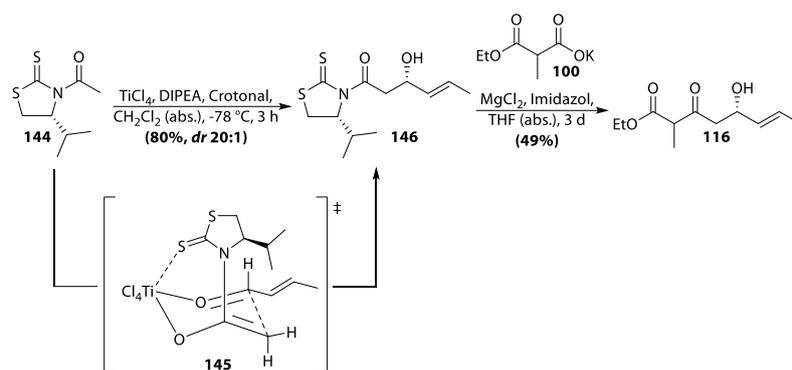
Der lineare Vorläufer **101** wurde anschließend in einer zweistufigen Reaktionssequenz lactonisiert und *O*-methyliert. Zuerst wurde die Lactonisierung unter milden basischen Bedingungen durchgeführt. Nach Entfernen des Methanols und Wechsel des Lösungsmittels zu Aceton konnte mittels des Methylierungsreagenzes Dimethylsulfat das Keton selektiv *O*-methyliert werden. Das Entfernen des Methanols war insofern nötig, da dieser negative Einfluss auf Reaktivität und Ausbeute hat. Dabei ist darauf zu achten, dass das Dimethylsulfat rein, unzersetzt und unter Schutzgas-Atmosphäre vorliegt. Beim Einsatz einer vermutlich mit Luft in Kontakt gekommenen Charge waren Zersetzungsprodukte zu beobachten. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie konnte das Westfragment **96** in einer Ausbeute von 90% erfolgreich erhalten werden. Ein Vergleich mit der Literatur<sup>[1]</sup> (drei lineare Stufen ab **99**, 70%) zeigt, dass die Synthese des Westfragments mit 34% eine niedrigere Ausbeute aufweist. Es ist noch Mischfraktion der Reinigung der Malonatkondensation vorhanden, die für spätere Verwendung als Zwischenstufe gelagert wurde. Die weiter umgesetzte Menge an **101** erzeugte ausreichend Westfragment **96** zur Verwendung in mehreren Kreuzmetathesen.

(*S,E*)-4-Methoxy-3-methyl-6-(prop-1-en-1-yl)-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-on (**142**)



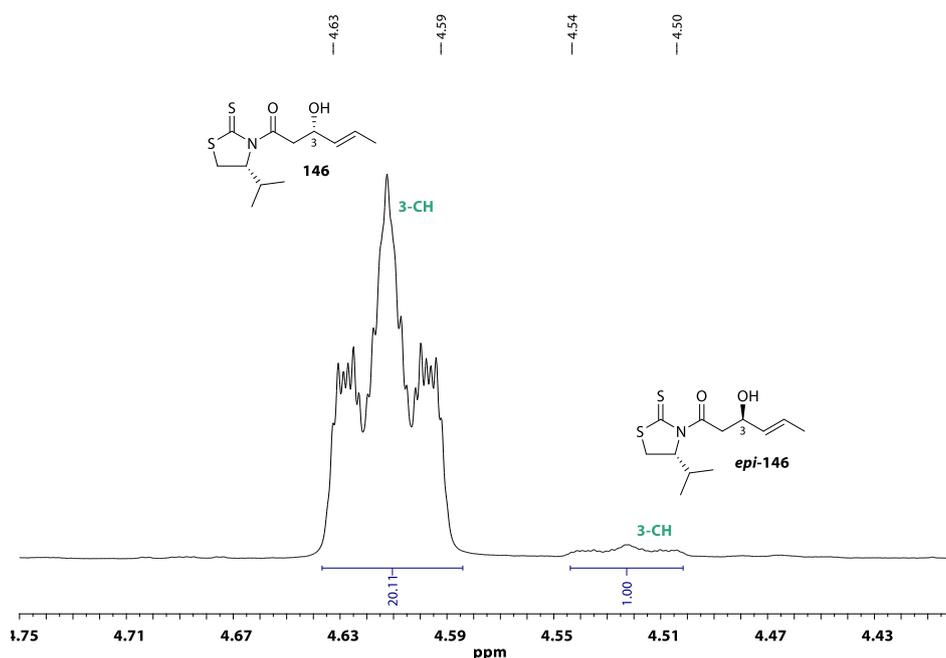
**Schema 6-12.** Retrosynthesestrategie des Westfragments **142**.

Analog zur Synthese des Westfragments **96** sollte das Enantiomer **142** synthetisiert werden. Die Stereoinformation sollte in diesem Fall ebenfalls durch eine asymmetrische NAGAO-Aldol-Reaktion von Crotonal mit dem acetylierten (*R*)-NAGAO-Auxiliar **144** erzeugt werden. Es wurde eine bereits vorhandene Charge des acetylierten Auxiliars verwendet.



**Schema 6-13.** Synthese des linearen Vorläufers **116** über eine NAGAO-Aldol-Reaktion und Malonat-Kondensation.

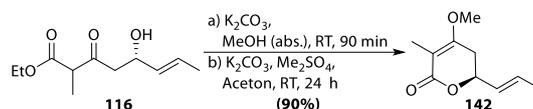
Die Synthese des enantiomeren Westfragments **142** wurde analog unter Verwendung bereits vorhandenem **144** durchgeführt. Zur Erzeugung der entgegengesetzten Stereochemie wurde das acetylierte (*R*)-NAGAO-Auxiliar **144** in der NAGAO-Aldol-Reaktion verwendet. Der entsprechende ZIMMERMANN-TRAXLER-Übergangszustand ist in Schema 6-13 dargestellt.<sup>[102,120]</sup> Nach Reinigung durch Säulenchromatographie konnte das Aldolprodukt **146** in einer Ausbeute von 80% rein erhalten werden.



**Abbildung 6-2.** Ausschnitt des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des Diastereomergemisches **146** und *epi*-**146** der NAGAO-Aldol-Reaktion zur Bestimmung des *dr* von 20:1 anhand des 3-CH-Signals. Vollständiges  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum siehe Abbildung 9–24.

Im Vergleich mit dem Epimer konnte eine bessere Selektivität, aufgrund der Verwendung einer erstmalig geöffneten  $\text{TiCl}_4$ -Charge, erreicht werden. Die darauffolgende Malonat-Kondensation lief aus bereits oben genannten Gründen vergleichbar ab. Der lineare Vorläufer **116** konnte mit einer Ausbeute von 49% nach mehrmaliger säulenchromatographischer Reinigung erhalten

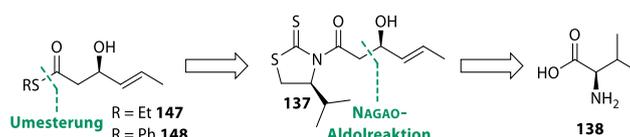
werden.<sup>[121]</sup> Bis zu diesem Punkt galt die Synthese als literaturbekannt<sup>[11]</sup> (40%, zwei lineare Stufen) und lieferte vergleichbare Ausbeuten mit 39% über zwei lineare Stufen.



**Schema 6-14.** Synthese des Westfragments **142** durch Lactonisierung und Methylierung.

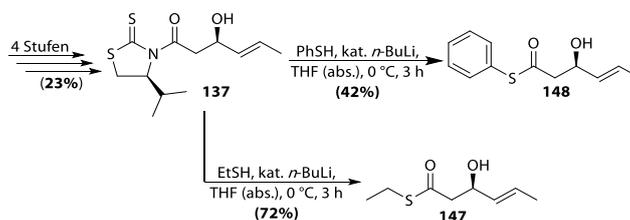
Erneut wurde zuerst die Lactonisierung des linearen Vorläufers angestrebt, ehe nach Wechsel des Lösungsmittels selektiv 3-O-methyliert werden konnte. Nach Reinigung *per* Säulenchromatographie konnte das Westfragment **142** in einer zum Epimer vergleichbaren Ausbeute von 90% erfolgreich erhalten werden.

### Lineare Thioester-Westfragmente **147** und **148**



**Schema 6-15.** Retrosynthesestrategie der linearen Thioester-Westfragmente **147** und **148**.

Der durch eine asymmetrische NAGAO-Aldol-Reaktion von Crotonal mit dem acetylierten (S)-NAGAO-Auxiliar stereoselektiv aufgebaute sekundäre Alkohol **137** sollte erneut vom Auxiliar abgespalten werden. In diesem Fall sollte die Abspaltung vom Auxiliar allerdings durch eine Umesterung mit dem entsprechenden Thiol stattfinden. Dadurch sollten die Westfragmente **147** und **148** synthetisiert werden.

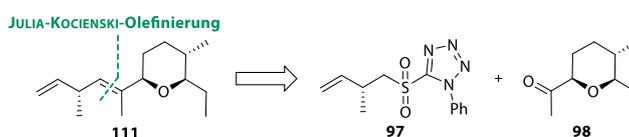


**Schema 6-16.** Synthese der linearen Thioester-Westfragmente **147** und **148** durch Umesterung des NAGAO-Aldolprodukts **137** mittels Thiophenol bzw. Ethanthiol.

Das NAGAO-Aldolprodukt **137** (4 Stufen, 23%, *dr* 9:1) diente als Ausgangspunkt der Synthese der linearen Thioester **147** und **148**. Durch Umesterung unter Verwendung des Thiophenol-Lithiumthiolats, welches zuvor *in situ* durch Umsatz des Thiols mit katalytischen Mengen *n*-Butyllithium generiert wurde, konnte in einem Schritt das Auxiliar abgespalten und der Thioester **146** erzeugt werden. Auch hier war es problematisch das freie Auxiliar vom Thioester *per*

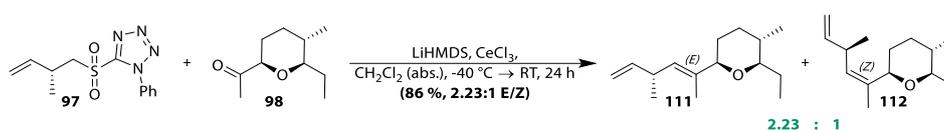
Säulenchromatographie abzutrennen. Damit ist auch die vergleichbar niedrige Ausbeute von 42% zu erklären. Durch mehrmalige Reinigung konnte eine ausreichende Menge ( $\geq 0.30$  g) des Westfragments **148** rein gewonnen werden. Im Falle der Synthese des Thioesters **147** wurde die Abspaltung unter Verwendung des Ethanthiol-Lithiumthiolats nach gleicher Prozedur durchgeführt. Nach erfolgreicher Synthese und Reinigung *per* Säulenchromatographie konnte **147** in 72% Ausbeute erhalten werden.

### 6.1.2 JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung



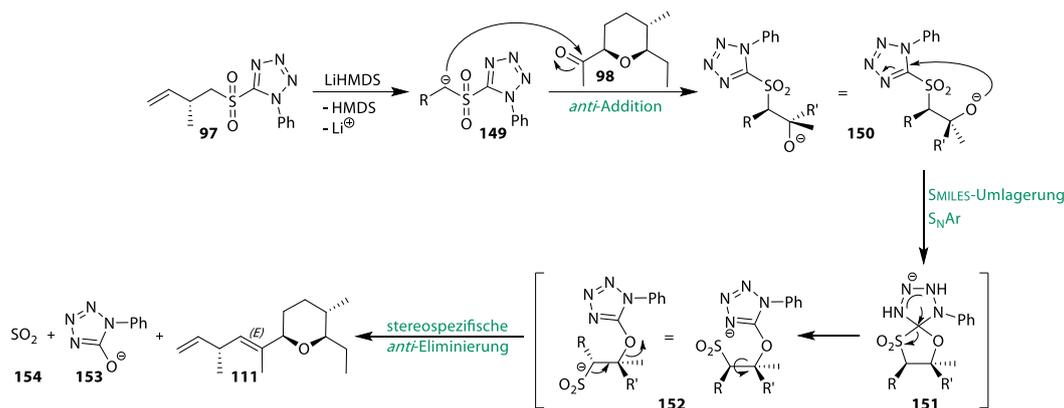
**Schema 6-17.** Retrosynthetischer Ansatz des (*E*)-Alkens **111**.

Das Ostfragment **98** sollte in einer JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung mit dem Mittelfragment **97** umgesetzt werden. Aufgrund des Bedarfs am vermuteten biosynthetischen Vorläufer Jerangolid E (**35**) sollte die Olefinierung das (*E*)-Alken **111** als Hauptprodukt liefern. Für Derivatisierungen wurden aber sowohl das (*Z*)- als auch das (*E*)-Isomer des Alkens benötigt. Die Selektivität sollte über das Sulfonyl zugunsten des (*E*)-Isomers eingestellt werden. Es ist bekannt dass der Heteroarylrest des Sulfonyls für die Selektivität verantwortlich ist. Das 1-Phenyl-1*H*-tetrazol-1-yl gilt als dirigierend für (*E*)-Selektivität, wohingegen beispielsweise beim Einsatz von Pyridyl überwiegend (*Z*)-Isomer entsteht.



**Schema 6-18.** Synthese von **111/112** durch (*E*)-selektive JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung.

Das Mittelfragment **97** wurde in der JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung mit dem Ostfragment **98** mittels LiHMDS als Base und  $\text{CeCl}_3$  gekuppelt. Nach Tests zu verschiedenen Vorschriften aus der Literatur<sup>[1,104,105]</sup> wurden bei der Vorschrift nach HAHN<sup>[1]</sup> die besten Ergebnisse erzielt. Der Mechanismus der Olefinierung und die darauf beruhende (*E*)-Selektivität sind in Schema 6-19 dargestellt.



Schema 6-19. Mechanismus der JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung.<sup>[122]</sup>

Das Sulfon **97** wird in  $\alpha$ -Position von einer Lithium-Base deprotoniert. Das dabei entstandene Li-Carbanion **149** kann nun nukleophil den Carbonylkohlenstoff des Ostfragments **98** angreifen und eine hoch diastereoselektive *anti*-Addition durchführen. In diesem Schritt findet bereits die Einstellung des (*E/Z*)-Verhältnisses statt. Während der Reaktion wirken der substituierte Tetrazolring, mit dessen sterischen Anspruchs, und das Gegenion (Lithium), aufgrund dessen chelatisierenden Effekts, *anti*-dirigierend. In der folgenden SMILES-Umlagerung (Heteroaryl-Verschiebung) greift das Alkoxid den elektronenarmen Tetrazolring nukleophil ( $S_NAr$ ) an und bildet eine sehr gute Abgangsgruppe. Durch die Rotation um die C-C-Bindung wird die benötigte Konformation erzeugt und die stereospezifische *anti*-Eliminierung mit  $SO_2$  als Elektrofug kann als finaler Schritt der JKO stattfinden. Dabei wird die in *anti*-Position stehende Abgangsgruppe eliminiert und das gewünschte (*E*)-Alken **111** erzeugt.<sup>[122]</sup>

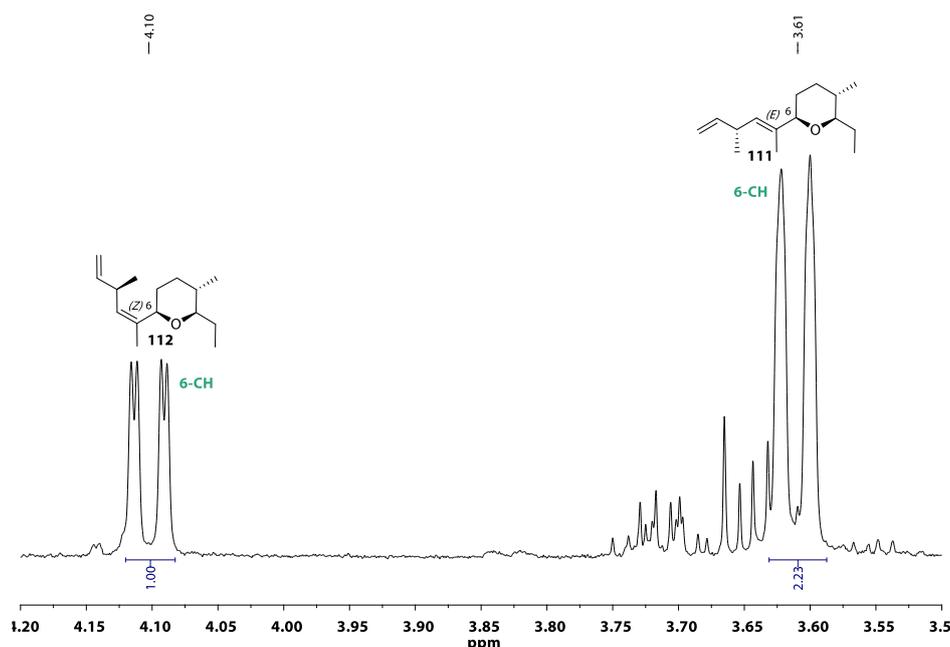
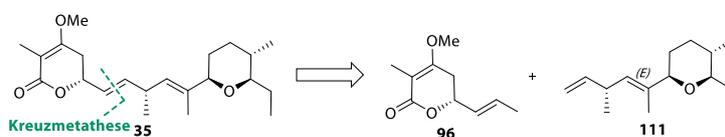


Abbildung 6-3. Ausschnitt des  $^1H$ -NMR-Spektrums des Rohgemisches der JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung zur Bestimmung des (*E/Z*)-Verhältnisses von  $\leq 2.23:1$  anhand des 6-CH-Signals. Vollständige  $^1H$ -NMR-Spektren siehe Abbildung 9–16 und Abbildung 9–17.

Durch säulenchromatographische Reinigung konnte nicht verbrauchtes Keton **98** reisoliert und die Alkene **111/112** mit einer Gesamtausbeute von 68% bei einem (*E/Z*)-Verhältnis von  $\leq 2.23:1$  (Abbildung 6–3) abgetrennt werden. Eine erneute Säulenchromatographie ermöglichte die Trennung von (*E*)- und (*Z*)-Alken. Ein Vergleich mit der Literatur<sup>[1]</sup> (73%, (*E/Z*)-Verhältnis von 2.3:1) zeigt, dass nahezu identische Selektivität und Ausbeute in der JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung erzielt werden konnten.

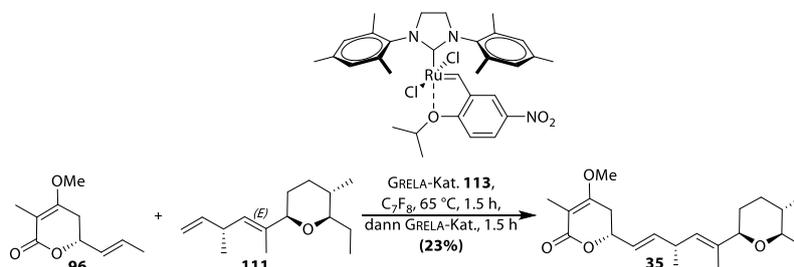
### 6.1.3 Kreuzmetathesen und abschließende Stufen

#### 6.1.3.1 Synthese von Jerangolid E (**35**)



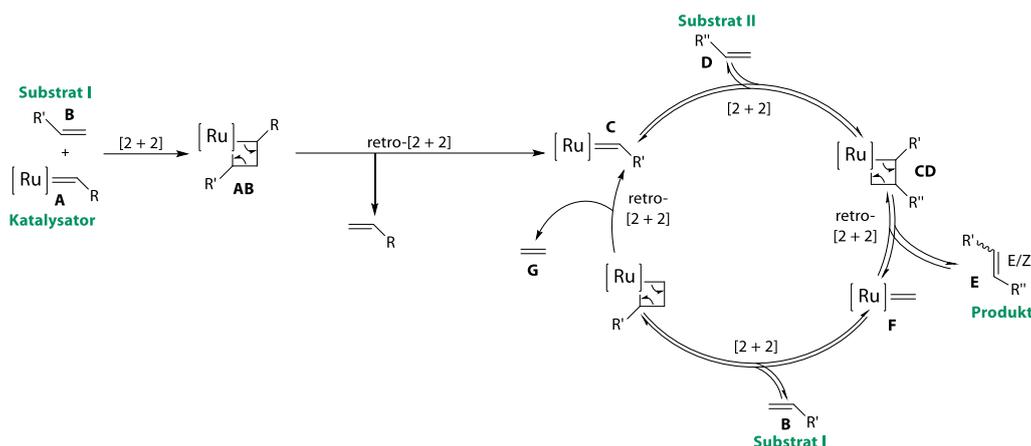
Schema 6-20. Retrosynthetischer Ansatz von Jerangolid E (**35**).

Jerangolid E (**35**) sollte gemäß der Literatur<sup>[1]</sup> synthetisiert werden. Das (*E*)-Alken **111** sollte durch Kreuzmetathese mit dem Westfragment **96** verbunden werden. Als Katalysator der Metathese sollte der GRELA-Katalysator **113** dienen.



Schema 6-21. Synthese von Jerangolid E (**35**) durch Kreuzmetathese unter Einsatz des GRELA-Katalysator **113**.

Das Westfragment **96** wurde mit dem (*E*)-Alken **111** in einer Kreuzmetathese umgesetzt. Der GRELA-Katalysator **113** diente zur Aktivierung und Katalyse der Reaktion.<sup>[107–109]</sup>  $C_7F_8$  wurde als Lösungsmittel verwendet, da bekannt ist, dass perfluorierte Lösungsmittel die Reaktivität und Ausbeute in Ruthenium-katalysierten Olefinmetathesen steigern.<sup>[106]</sup> Um den Umsatz und die Ausbeute der Metathese zu steigern, wurde nach zwei Stunden Reaktionszeit eine weitere Portion Katalysator hinzugegeben. Der allgemeine Mechanismus einer Metall-katalysierten (Ruthenium-katalysierten) Kreuzmetathese ist in Schema 6-22 dargestellt.



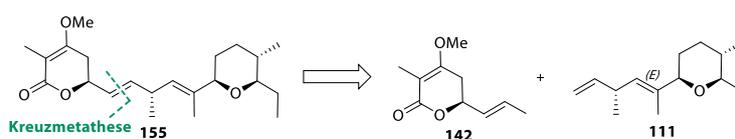
**Schema 6-22.** Allgemeiner Mechanismus einer metallkatalysierten Kreuzmetathese.<sup>[123–125]</sup>

Zu Beginn wird in der Startreaktion der Katalysator **A** mit einem Alken **B** gekuppelt und ein Ligand über die Zwischenstufe eines Metallacyclobutans **AB** eliminiert. Die Kupplungsreaktionen verlaufen allgemein durch eine [2+2]-Zykloaddition und die Eliminierungen durch eine retro-[2+2]-Zykloaddition. Der Metallcarbenkomplex **C** bildet mit einem zweiten Alken **D** das Metallacyclobutan **CD** und eliminiert anschließend das Metatheseprodukt **E** als (*E/Z*)-Gemisch. Dadurch ist der Metallcarbenkomplex **F** mit Ethen gebildet worden und kann mit neuem Alken **B** gekuppelt werden. Dabei wird in einer Eliminierung irreversibel Ethen (**G**) freigesetzt und der Startkomplex **C** gebildet. Anschließend wird der Zyklus erneut durchlaufen.<sup>[123–125]</sup>

Das Rohprodukt wurde direkt nach Abkühlen säulenchromatographisch und durch RP-HPLC gereinigt. Dies war für alle der geplanten Substrate nötig, um die benötigte Qualität für Enzymarbeiten sicher zu stellen. Die Kreuzmetathese zum Erhalt von Jerangolid E (**35**) verlief erfolgreich mit einer Ausbeute von 23%. Die im Vergleich zur Literatur (93%)<sup>[1]</sup> niedrigere Ausbeute könnte zum einen an der Verwendung einer älteren, teilweise inaktiven Charge des Katalysators bzw. Kontakts selbigem oder der Reaktion mit Sauerstoff liegen. Es ist möglich, dass dies während der Katalysatorzugabe erfolgte. Nicht verbrauchtes Startmaterial konnte teilweise zurückgewonnen werden. Jerangolid E (**35**) konnte erfolgreich in 19 linearen Stufen mit einer Ausbeute von 2% synthetisiert werden. Ein Vergleich mit der Literatur (15 lineare Stufen, 15%)<sup>[33]</sup> zeigte, dass die erhaltene Ausbeute niedriger ist. Ein Grund dafür liegt in der Synthese des Ostfragments **96**, bei dem mit vier zusätzlichen Stufen nur ein Drittel der Literaturausbeute (13 lineare Stufen, 30%)<sup>[33]</sup> erzielt werden konnte. Dort sind die Stufen der zusätzlichen Stufen der Auxiliarsynthese die, die den größten Einfluss auf die vergleichbar niedrige Ausbeute haben. Allerdings wurde Synthesesequenz im Maßstab  $\geq 50$  g durchgeführt, bei dem das übergeordnete Ziel war ausreichend Substanz für diese und weitere Totalsynthesen zu

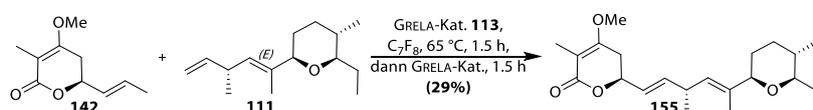
generieren. Ein weiterer Grund ist die, wegen des vermutlichen Luftkontakts des Katalysators, schlecht verlaufende Kreuzmetathese. In literaturbekannten Metathesen konnten die Ausbeuten durch die Verwendung einer frischen Katalysator-Charge gesteigert werden.<sup>[1]</sup> Durch die Totalsynthese konnten ausreichende Mengen (kumuliert  $\geq 100$  mg) an Jerangolid E (**35**) für geplante Enzymreaktionstests bereitgestellt werden.

### 6.1.3.2 Synthese von 5-*epi*-Jerangolid E (**155**)



**Schema 6-23.** Retrosynthetischer Ansatz von 5-*epi*-Jerangolid E (**155**).

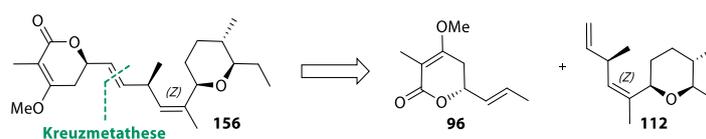
Von der Synthese des Jerangolid E (**35**) abgeleitet, sollte 5-*epi*-Jerangolid E (**155**) dargestellt werden.<sup>[1]</sup> Es sollte wiederherum unter Einsatz des GRELA-Katalysators **113** eine Kreuzmetathese als finaler Kupplungsschritt erfolgen. In diesem Fall sollte das (*E*)-Alken **111** mit dem Epimer des Westfragments **142** gekoppelt werden.



**Schema 6-24.** Synthese von 5-*epi*-Jerangolid E (**155**) durch Kreuzmetathese unter Einsatz des GRELA-Katalysator **113**.

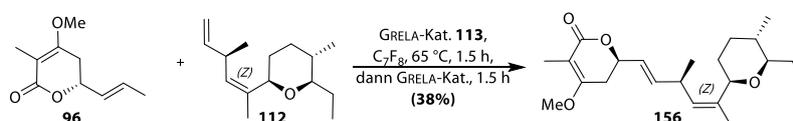
Die Kreuzmetathese zur Synthese von 5-*epi*-Jerangolid E (**155**) wurde unter Einsatz des GRELA-Katalysators **113** analog zu Kapitel 6.1.3.1 mit dem Westfragment **142** durchgeführt. Es konnte nach Reinigung durch Säulenchromatographie und RP-HPLC eine Ausbeute von 29% erzielt werden. Nicht verbrauchtes Startmaterial konnte teilweise zurückgewonnen werden. Die niedrigere Ausbeute kann anhand der gleichen Gründe wie bei der Kreuzmetathese von Jerangolid E (**35**) erklärt werden. In 19 linearen Stufen konnte 5-*epi*-Jerangolid E (**155**) mit einer Ausbeute von 2.5% erfolgreich synthetisiert werden. Die im Vergleich zur Epimersynthese der Literatur<sup>[1]</sup> niedrigere Ausbeute lässt sich auf die unter Kapitel 6.1.3.1 erwähnten Gründe der Ostfragmentsynthese zurückführen. Durch die Totalsynthese konnten ausreichende Mengen (kumuliert  $\geq 20.0$  mg) an 5-*epi*-Jerangolid E (**155**) für geplante Enzymreaktionstests bereitgestellt werden.

### 6.1.3.3 Synthese von 9-(Z)-Jerangolid E (156)



Schema 6-25. Retrosynthetischer Ansatz von 9-(Z)-Jerangolid E (156).

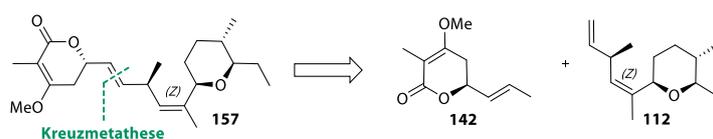
Von der Synthese des Jerangolid E (35) abgeleitet, sollte 9-(Z)-Jerangolid E (156) dargestellt werden.<sup>[1]</sup> Es sollte wiederherum unter Einsatz des GRELA-Katalysators 113 eine Kreuzmetathese als finaler Kupplungsschritt erfolgen. In diesem Fall sollte das (Z)-Alken 112 mit dem Westfragment 96 gekoppelt werden.



Schema 6-26. Synthese von 9-(Z)-Jerangolid E (156) durch Kreuzmetathese unter Einsatz des GRELA-Katalysator 113.

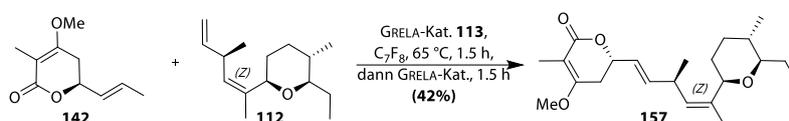
Die Kreuzmetathese zur Synthese von 9-(Z)-Jerangolid E (156) wurde unter Einsatz des GRELA-Katalysators 113 analog zu Kapitel 6.1.3.1 mit dem (Z)-Alken 112 durchgeführt. Diese und alle folgenden Kreuzmetathesen wurden mit einer frischen Charge Katalysator durchgeführt, wodurch die Ausbeuten im Vergleich gestiegen sind. Es konnte nach Reinigung durch Säulenchromatographie und RP-HPLC eine Ausbeute von 38% erzielt werden. Nicht verbrauchtes Startmaterial konnte teilweise zurückgewonnen werden. Außerdem ist es möglich, dass das verwendete (Z)-Alken 112 schlechter akzeptiert wurde als das Isomer. Die Unterschiede der Konformation könnten zu inaktiveren Katalysator-Zuständen führen sowie durch sterische Hinderung die Umsätze beeinträchtigen. In 19 linearen Stufen konnte 9-(Z)-Jerangolid E (156) mit einer Ausbeute von 3.3% erfolgreich synthetisiert werden. Ein Vergleich mit der literaturbekannten Synthese (15 lineare Stufen, 3.2%)<sup>[1]</sup> zeigte, dass die erhaltene Ausbeute ähnlich ist. Die niedrigere Ausbeute kann vor allem auf das während der Kreuzmetathese vermutlich schlechter akzeptierte (Z)-Isomer zurückgeführt werden. Außerdem sind die in Kapitel 6.1.3.1 genannten Gründe der Ostfragmentsynthese zu beachten. Durch die Totalsynthese konnten ausreichende Mengen (kumuliert  $\geq 10$ mg) an 9-(Z)-Jerangolid E (156) für geplante Enzymreaktionstests bereitgestellt werden.

#### 6.1.3.4 Synthese von 5-*epi*-9-(*Z*)-Jerangolid E (157)



Schema 6-27. Retrosynthetischer Ansatz von 5-*epi*-9-(*Z*)-Jerangolid E (157).

Von der Synthese des Jerangolid E (35) abgeleitet, sollte 5-*epi*-9-(*Z*)-Jerangolid E (157) dargestellt werden.<sup>[1]</sup> Es sollte wiederherum unter Einsatz des GRELA-Katalysators 113 eine Kreuzmetathese als finaler Kupplungsschritt erfolgen. In diesem Fall sollte das (*Z*)-Alken 112 mit dem Epimer des Westfragments 142 gekoppelt werden.

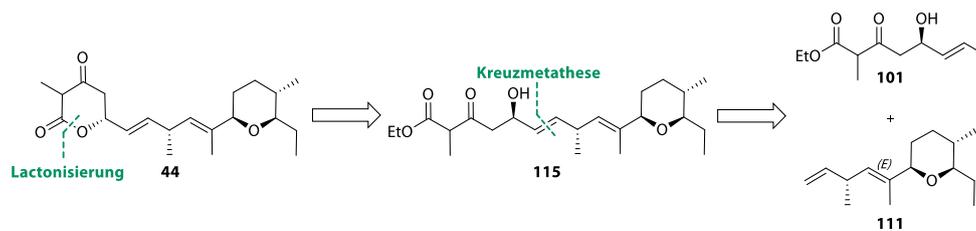


Schema 6-28. Synthese von 5-*epi*-9-(*Z*)-Jerangolid E (157) durch Kreuzmetathese unter Einsatz des GRELA-Katalysator 113.

Die Kreuzmetathese zur Synthese von 5-*epi*-9-(*Z*)-Jerangolid E (157) wurde unter Einsatz des GRELA-Katalysators 113 analog zu Kapitel 6.1.3.1 mit dem Westfragment 142 und (*Z*)-Alken 112 durchgeführt. Es konnte nach Reinigung durch Säulenchromatographie und RP-HPLC eine Ausbeute von 42% erzielt werden. Nicht verbrauchtes Startmaterial konnte teilweise zurückgewonnen werden. In 19 linearen Stufen konnte 5-*epi*-9-(*Z*)-Jerangolid E (157) mit einer Ausbeute von 3.6% (Epimersynthese der Literatur 3.2%)<sup>[1]</sup> erfolgreich synthetisiert werden. Die niedrige Ausbeute lässt sich auf die unter Kapitel 6.1.3.1 erwähnten Gründe der Ostfragmentsynthese zurückführen. Außerdem wird das (*Z*)-Isomer während der Metathese vermutlich schlechter akzeptiert. Durch die Totalsynthese konnten ausreichende Mengen (kumuliert  $\geq 10.0$  mg) an 5-*epi*-9-(*Z*)-Jerangolid E (157) für geplante Enzymreaktionstests bereitgestellt werden.

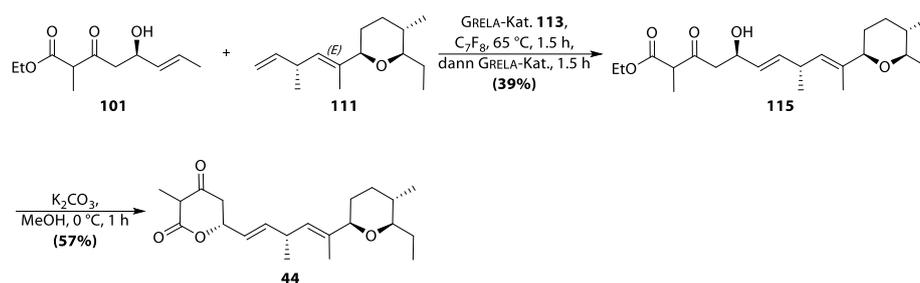
#### 6.1.3.5 Synthese von Projerangolid (44)

Analog zur literaturbekannten Synthese von Projerangolid (44)<sup>[1]</sup> sollte selbiges synthetisiert werden. Der lineare Vorläufer 101 des Westfragments 96 sollte in einer Kreuzmetathese unter Einsatz des GRELA-Katalysators 113 mit dem (*E*)-Alken 111 gekuppelt werden. Anschließend sollte die nachträgliche Lactonisierung unter milden basischen Bedingungen stattfinden.



**Schema 6-29.** Retrosynthetischer Ansatz von Projerangolid (**44**).

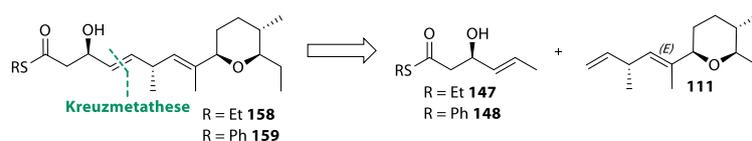
So sollte die bekanntermaßen niedrige Ausbeute bei direkter Verwendung des Lactons **102** in der Metathese verhindert werden.<sup>[1]</sup>



**Schema 6-30.** Synthese von Projerangolid (**44**) über Kreuzmetathese unter Einsatz des GRELA-Katalysator **113** und Lactonisierung.

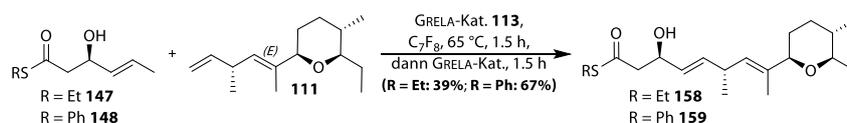
Die letzten Syntheseschritte der Synthese von Projerangolid (**44**) wurden entsprechend der Literatur durchgeführt.<sup>[1]</sup> Das (*E*)-Alken **111** wurde mit dem linearen Vorläufer **101** unter Einsatz des Grela-Katalysators **113** in einer Kreuzmetathese umgesetzt. Diese wurde analog zu den bereits beschriebenen Metathesen durchgeführt (Ausbeute: 39%). Das lineare Zwischenprodukt wurde anschließend unter milden basischen Bedingungen einer Lactonisierung unterzogen. Das mit einer Ausbeute von 57% gebildete Projerangolid (**44**) ist temperaturempfindlich und relativ instabil. Aus diesen Gründen musste die komplette Aufarbeitung so schnell wie möglich gekühlt bei 0 °C stattfinden. Außerdem war beim Entfernen des Lösungsmittels darauf zu achten, dass die Temperatur bei der Evaporation 8 °C nicht übersteigt und die Vorlage auf -20 °C gekühlt wird. Projerangolid (**44**) konnte erfolgreich in 20 linearen Stufen mit einer Ausbeute von 2% synthetisiert werden. Im Vergleich zum Literaturwert der Totalsynthese von Projerangolid (**44**) (Lit.<sup>[1]</sup>: 16 lineare Stufen, 10%) ist die erhaltene Ausbeute etwas geringer. Die im Vergleich zur Literatur niedrigere Ausbeute lässt sich auf die unter Kapitel 6.1.3.1 erwähnten Gründe der Ostfragmentsynthese zurückführen. Durch die Totalsynthese konnten ausreichende Mengen (kumuliert ≥5.00 mg) an Projerangolid (**44**) für geplante Enzymreaktionstests bereitgestellt werden.

### 6.1.3.6 Synthese der Heptaketide 158, 159 und 160



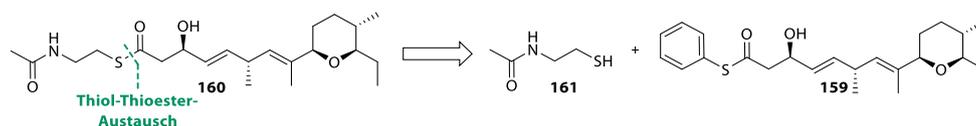
Schema 6-31. Retrosynthetischer Ansatz der Heptaketide 158 und 159.

Die finale Reaktion in der Synthese der Heptaketide 158 und 159 sollte ebenfalls eine Kreuzmetathese unter Verwendung des GRELA-Katalysators 113 darstellen. Das (*E*)-Alken 111 sollte mit dem entsprechenden Westfragment 147 oder 148 verbunden werden.



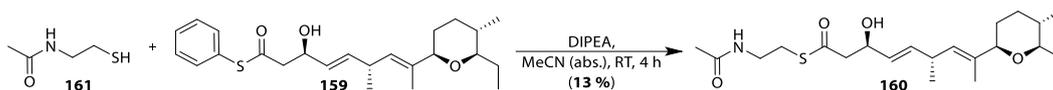
Schema 6-32. Synthese der Heptaketide 158 und 159 durch Kreuzmetathese unter Einsatz des GRELA-Katalysator 113.

Aus der Literatur<sup>[126]</sup> ist bekannt, dass Ruthenium-basierte Katalysatoren, in diesem Fall GRUBBS-II, zur Kreuzmetathese von  $\beta$ -Hydroxythioestern verwendet werden können. Der GRELA-Katalysator sollte aufgrund höherer Effizienz und Aktivität bei niedrigerer Temperatur verwendbar sein. In Analogie zur Literatur<sup>[126]</sup> wurde zur Kreuzmetathese der Thioester 158 und 159 ein Ruthenium-basierter Katalysator verwendet. Das entsprechende Westfragment wurde wie in vorhergehenden Kreuzmetathesen unter Einsatz des GRELA-Katalysators 113, mit dem (*E*)-Alken 111 umgesetzt. Nach Reinigung *per* Säulenchromatographie und RP-HPLC konnte sowohl das S-Et-Heptaketid 158 (Ausbeute: 39%) als auch das S-Ph-Heptaketid 159 (Ausbeute: 67%) erhalten werden. Die Surrogate 158 und 159 konnten erfolgreich in 19 linearen Stufen mit einer Ausbeute von 3.3% bzw. 5.5% synthetisiert werden. Die Gesamtausbeuten sind auf die unter Kapitel 6.1.3.1 erwähnten Gründe der Ostfragmentsynthese zurückzuführen. Durch die Totalsynthese konnten ausreichende Mengen (kumuliert  $\geq 20$ mg) der Heptaketide 158 und 159 für geplante Enzymreaktionstests gestellt werden.



Schema 6-33. Retrosynthetischer Ansatz des SNAC-Heptaketids 160.

Aus dem S-Ph-Heptaketid 159 sollte nachfolgend in einem Schritt das SNAC-Heptaketid 160 dargestellt werden. Zu diesem Zweck sollte ein Thiol-Thioester-Austausch mit HSNAC (161) stattfinden.

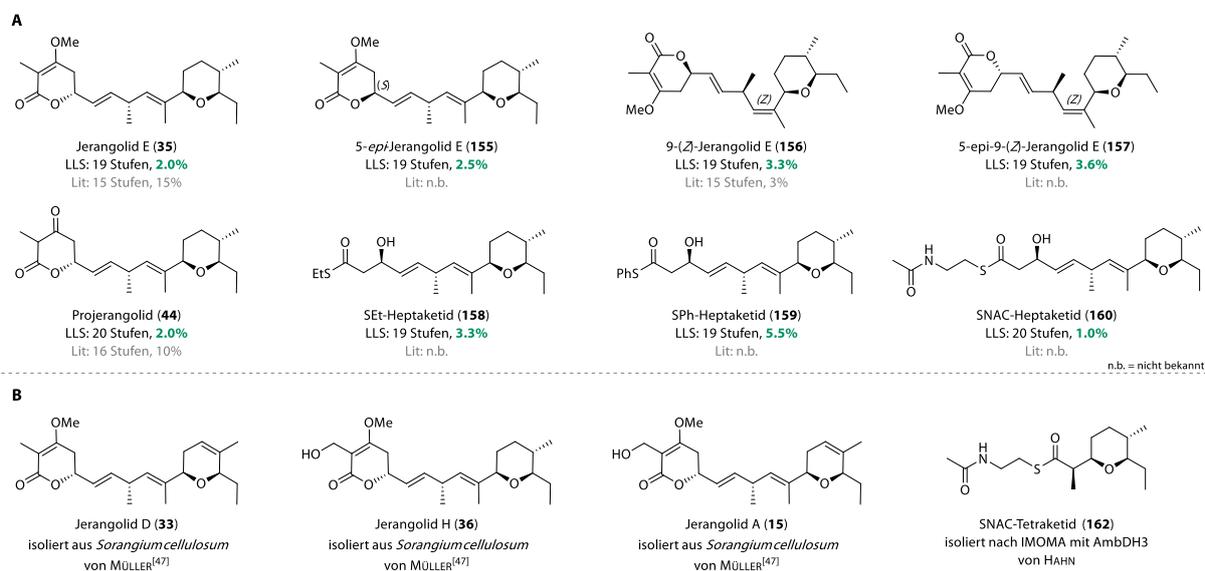


**Schema 6-34.** Synthese der SNAC-Heptaketids **160** durch Thiol-Thioesteraustausch von **159** und HSNAC (**161**).

Abgeleitet von einem im Arbeitskreis etablierten Protokoll und weiterer Literatur<sup>[127]</sup> wurde das SPh-Heptaketid **159** mit HSNAC (**161**) in einem Thiol-Thioester-Austausch mit DIPEA im Unterschuss umgesetzt. Der pH-Wert darf durch die eingesetzte Base nicht signifikant erhöht werden, da sonst im basischen eine *retro*-Aldol-Reaktion leicht und bevorzugt stattfindet. Deshalb soll durch das Thiol-Thiolat-Puffersystem und dem Unterschuss an Base der pH-Wert konstant gehalten und die Hydrolyse der Thioesters verhindert werden.<sup>[127,128]</sup> Da ein Überschuss an Thiol eingesetzt wurde, musste dieses anschließend durch Säulenchromatographie mit kupfer-impregnierten Silicagel abgetrennt werden. Des Weiteren entstanden bei der Reaktion das SNAC-Dimer und das Heterodisulfid aus dem abgespalteten Thiophenol und SNAC. Ein Thiophenol-Dimer war nicht zu identifizieren. Die beiden vorkommenden Spezies konnten durch RP-HPLC erfolgreich abgetrennt werden, sodass das SNAC-Heptaketid **160** rein in einer Ausbeute von 13% erhalten werden konnte. Die niedrige Ausbeute ist auf die isolierten Nebenprodukte (Disulfide), die in größeren Anteilen vorlagen und die mehrmalige und komplexe Reinigung durch unter anderem kupfer-impregnierten Silicagel zurückzuführen. Das SNAC-Heptaketid **160** konnte erfolgreich in 20 linearen Stufen mit einer Ausbeute von 1% synthetisiert werden. Die Gesamtausbeute ist auf die unter Kapitel 6.1.3.1 erwähnten Gründe der Ostfragmentsynthese zurückzuführen. Durch die Totalsynthese konnten ausreichende Mengen (kumuliert  $\geq 5.00$  mg) des SNAC-Heptaketids **160** für geplante Enzymreaktionstests bereitgestellt werden.

## 6.1.4 Zusammenfassung der Substratsynthesen

In Abbildung 6–4 ist eine Übersicht über die zuvor diskutierten Synthesen der Substrate dargestellt. Alle totalsynthetisch adressierten Substrate konnten erfolgreich nach dem Protokoll von HAHN in ausreichender Menge und bester Reinheit für Enzymreaktionstests erhalten werden (Abbildung 6–4, A).



**Abbildung 6–4.** Übersicht der Substrate (**15, 33, 36, 35, 44, 155-160, 162**) für Enzymreaktionstests. (**A**) synthetisierte Substrate (**35, 44, 155-160**) inklusive längster linearer Sequenz (LLS) und Ausbeuten sowie Literaturvergleich, (**B**) erhaltene, isolierte Substrate/Referenzen (**15, 33, 36, 162**) mit Angabe der Isolationsquelle und der zu Verfügung stellenden Gruppe.

Das SNAC-Tetraketid (**162**), ein Surrogat des Produkts des PKS-Moduls 3, war innerhalb des Arbeitskreises als Produkt von Enzymreaktionstest zur IMOMA mit AmbDH3 bereits vorhanden. Außerdem wurden Jerangolid D (**33**), Jerangolid H (**36**) sowie Jerangolid A (**15**), die sowohl als Substrate als auch als Referenzen eingesetzt werden sollten, dankenswerterweise von ROLF MÜLLER (HIPS SAARBRÜCKEN) zur Verfügung gestellt (Abbildung 6–4, B).

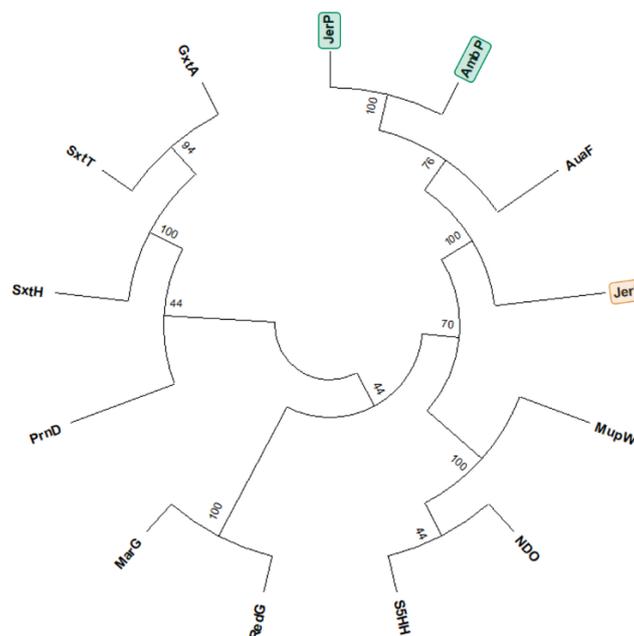
Mit der Verfügbarkeit aller Substraten und Referenzen war es möglich zu den *in silico*-mikrobiologischen sowie biochemischen Studien, wie etwa die angestrebten Enzymreaktionstests, der RIESKE-Oxygenasen JerP und JerL überzugehen. Für eine erste Einordnung und Identifizierung des Ursprungs dieser Enzyme und deren Charakteristika sowie Beschaffenheit wurden zu Beginn *in silico*-Studien durchgeführt.

## 6.2 *In silico*-Studien der Jerangolid RIESKE-Oxygenasen

Die folgenden *in silico*-Studien sollten dazu dienen, spezifische Charakteristika der Enzyme JerP, JerL sowie AmbP, anhand derer sie den RIESKE-Oxygenasen zugeordnet werden können, zu identifizieren. Zusätzlich soll ein anfänglicher Einblick in deren Besonderheiten in den Bereichen strukturelle Motive, Wechselwirkungen der aktiven Tasche, sowie allgemeine Struktur der Proteine ermöglicht werden. Nach phylogenetischer Analyse sollten ROs-charakteristische Motive anhand von Sequenzvergleichen und Übertragung auf 3D-Proteinmodelle untersucht werden. Anhand dieser Modelle sollte außerdem ein vager Einblick in die aktive Tasche sowie potentielle Enzym-Substrat-Interaktionen ermöglicht werden. Gleichzeitig sollte die Reduktase des Jerangolidgenclusters JerO unter Zuhilfenahme solcher Modelle charakterisiert werden.

### 6.2.1 Bezug zwischen RIESKE-Oxygenasen des Sekundärmetabolismus

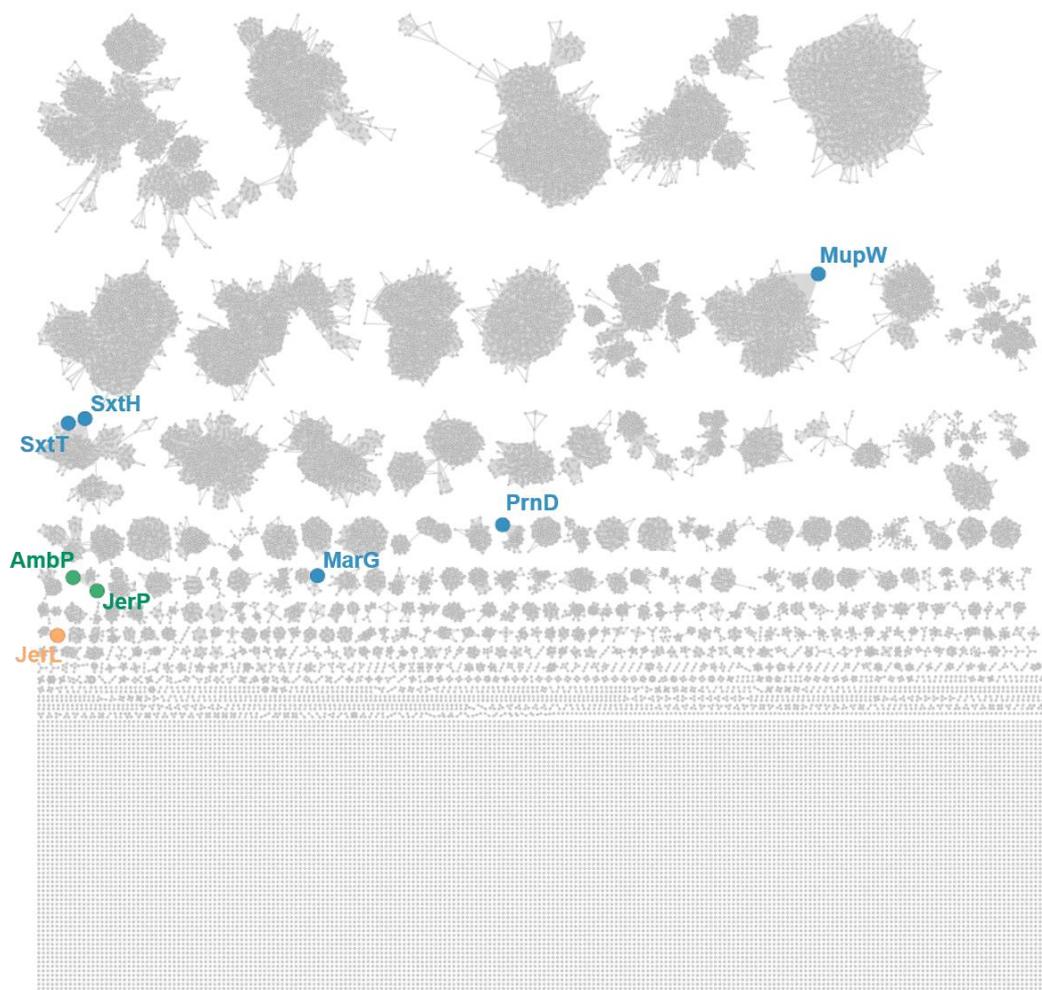
Um einen Bezug zwischen JerP, JerL und AmbP sowie weiteren ROs des Sekundärmetabolismus herzustellen wurden ein phylogenetischer Baum und ein *sequence similarity network* (SSN) erstellt. Die ausgewählten ROs sind in Kapitel 3.4 genauer beschrieben.



**Abbildung 6–5.** Phylogenetischer Baum der Familie der RIESKE-Oxygenasen mit Oxygenasen des Jerangolidgenclusters und Oxygenase des verwandten Ambruticingenclusters. Farblich hervorgehoben sind JerP, AmbP und JerL. Die Vorläuferzustände wurden mithilfe der *Maximum-Likelihood*-Methode und des JTT-Matrixmodells abgeleitet.<sup>[129]</sup> Der Baum zeigt eine Reihe möglicher Aminosäuren(-zustände) an jedem Vorgängerknoten auf Grundlage ihrer abgeleiteten Wahrscheinlichkeit am ersten Standort. Die Ausgangsbäume für die heuristische Suche wurden automatisch durch Anwendung der Algorithmen Neighbor-Join und BioNJ auf eine Matrix von paarweisen Abständen, die mit dem JTT-Modell geschätzt wurden, ermittelt und anschließend wurde die Topologie mit dem höchsten log-Likelihood-Wert ausgewählt. Die Raten zwischen den Standorten wurden dabei als einheitlich behandelt (*uniform rates option*). Diese Analyse umfasste 13 Aminosäuresequenzen. Im

endgültigen Datensatz waren insgesamt 565 Positionen enthalten. Die evolutionären Analysen wurden in MEGA11 durchgeführt.<sup>[130]</sup>

Die phylogenetische Analyse zeigt, dass die ausgewählten ROs in zwei übergeordnete Gruppen unterteilt werden können. Die Oxygenasen des Saxitoxingenclusters und PrnD bilden einen eigenen Ast aus. Beide Arten agieren mittels Hydroxylierung oxidativ an stickstoffhaltigen Verbindungen. Alle weiteren ROs zeigen gemeinsamen Ursprung. Generell konnte ein Zusammenhang zwischen phylogenetischer Nähe und Ähnlichkeiten in den Substratstrukturen sowie Ähnlichkeiten in den Oxidationsschritten beobachtet werden. JerP und AmbP zeigen untereinander hohe Homologie und entspringen dem gleichen Knotenpunkt wie JerL und AuaF und entspringen dem gleichen Vorfahren. Im Vergleich zu JerL sind die desaturierenden Oxygenasen JerP und AmbP vom Ursprung aus zusätzlich zweimalig weiterentwickelt. Ein ähnliches Bild zeigt sich beim Vergleichen der Aminosäuresequenzen und Darstellung in einem SSN.



**Abbildung 6–6.** *Sequence similarity network* der RIESKE-Oxygenase-Proteinfamilie (Pfam: PF00355). Der Datensatz wurde mit dem EFI-EST (*Enzyme Function Initiative Tools- Enzyme Similarity Tool*) mit einem Alignment Score von 70 erstellt. Die Daten wurden in CYTOSCAPE V 3.10.0 als repräsentatives Knotennetzwerk dargestellt, wobei jeder Knoten Proteine mit 50 %

Sequenzidentität enthält. Die grünen und orangefarbenen Markierungen zeigen die Positionen der JerP/AmbP- und JerL-Homologe an, die blauen Markierungen stellen die ausgewählten ROs aus dem Sekundärmetabolismus dar (siehe Kapitel 3.4).<sup>[131–133]</sup> Ergänzend siehe Sequenzalignments in Abbildung 6–7.

Alle verwandten ROs, wie SxtT und SxtH, zeigen wie erwartet räumliche Nähe im Netzwerk und verbundene Knotenpunkte. Im angesprochenen Beispiel konnte anders als in der phylogenetischen Analyse ein großer Abstand der Gruppe der Sxt-ROs zu PrnD, und somit geringe Sequenzähnlichkeiten, beobachtet werden. Auch die Oxygenasen des Jerangolid- bzw. Ambruticingenclusters JerP, JerL und AmbP liegen räumlich sehr nahe im Netzwerk. Die verwandten JerP und AmbP zeigen zusätzlich eine Verbindung in ihren Knotenpunkten, was die vorherigen Ergebnisse bestätigt und eine hohe Homologie nahelegt. Die entscheidenden Beobachtungen der phylogenetischen Analyse im Bezug auf JerP, JerL und AmbP können durch den Vergleich der Aminosäuresequenzen bestätigt werden. Der Bezug zwischen den ROs des Sekundärmetabolismus ist eindeutig. Aufgrund dessen kann anschließend ein Vergleich der charakteristischen Sequenzmotive stattfinden, um eine Identifizierung von JerP, JerL und AmbP als RIESKE-Oxygenase durchzuführen.

## 6.2.2 Sequenzalignments RIESKE-Oxygenasen

Die Sequenzen von JerP, JerL und AmbP wurden mit acht bereits charakterisierten RO des Sekundärmetabolismus (genaueres in Kapitel 3.4) im Rahmen eines *Multiple-Sequence Alignments* verglichen und auf die charakteristischen Sequenzmotive untersucht.

<b>JerL</b>	LAG-NAYALFRDEQGRPAAL--ADACPHRLAPLSQGRVRPDGRLECPYHGW	100
<b>JerP</b>	LAG-HEIVVVRTSSGGLGAF--TDRCPHRMRLSEGWVEG-DRLVCAYHGW	87
<b>AmbP</b>	RLAGREIVVVRTSSGGLGAF--TDRCPHRMRLSEGWVEG-DRLVCAYHGW	71
<b>MupW</b>	EIGELSFILVRNEALEI--KAYYNSCRHRGRRLCSGDSSV-RELRCPYHGF	136
<b>AuaF</b>	VAG-KQIALFRTADGNV GAL--EDRCPHRRM KLSV GKVEG-DRLVCPYHGW	71
<b>PrnD</b>	LLG-VKLVLWRSQEQNSPIQVWQDYCPHRGVPLSMGEVAN-NTLVCPYHGW	79
<b>SxtH</b>	LLG-VKLVLWRSQEQNSPIQVWQDYCPHRGVPLSMGEVAN-NTLVCPYHGW	79
<b>SxtT</b>	LLG-VKLVLWRSQEQNSPIQVWQDYCPHRGVPLSMGEVAN-NTLVCPYHGW	79
<b>GxtA</b>	LLG-VKLVLWRSQEQNSPIQVWQDYCPHRGVPLSMGEVAN-NTLVCPYHGW	79
<b>RedG</b>	RMG-QDLVLRDIDGNLVCQ--GARCPHKGANLGDGRMKG-NTIECPYHGF	71
<b>MarG</b>	RLG-EELVLRDLDGNVVCQ--GARCPHKGAWLGDGRMKG-NAIECPYHGF	71
	* * * * * : * : * :	

<b>JerL</b>	D--GFEYA-GTFSHLAPAPLHVIFDNSSE-DEHTPFVHGR-	178	<b>JerL</b>	KEIRDVVK	319
<b>JerP</b>	E--GYVPR-GLLRHRAVPFELALDNFIE-IEHTPFVHFM-	174	<b>JerP</b>	IELRLDMR	308
<b>AmbP</b>	E--GYVPA-GVLRHRAVPFELALDNFIE-VEHTPFVHFM-	158	<b>AmbP</b>	LELRDMR	292
<b>MupW</b>	E--GKYIA-GHSRHILPANWKNVMESFME-GLHAPETHGH-	237	<b>MupW</b>	YVYDQDMD	420
<b>AuaF</b>	P--DHRCA-FVMRHRMEAPLEVLDNFVE-LDHSVTTHLI-	157	<b>AuaF</b>	YETKLDQE	291
<b>PrnD</b>	---GDFMH-LHFAFETTAVLRIVENFYD-AQHASPVHELP	194	<b>PrnD</b>	-----DVK	325
<b>SxtH</b>	T--CTKSY-----LIKSSPFRVMDNFID-VSHFFVHD--	170	<b>SxtH</b>	ETTEQDIP	289
<b>SxtT</b>	T--YTKSY-----LIQASPFVMDNSID-VSHFFFIHD--	170	<b>SxtT</b>	ETIEQDIR	282
<b>GxtA</b>	T--YTKSY-----LIQASPFVMDNSID-VSHFFFIHE--	170	<b>GxtA</b>	QVIEEDIR	282
<b>RedG</b>	D--NRKLY-ATKRWRTPVHYTRYIESLLE-FYHVTVVHR--	167	<b>RedG</b>	VQDPQDVR	306
<b>MarG</b>	E--NDRVY-DTISWNKPVHYTRYIESVQE-FYHVTVVHR--	167	<b>MarG</b>	VQDPQDYK	306
	: : * * *			:	

**Abbildung 6–7.** Sequenzalignments der RIESKE-Oxygenasen JerP, JerL und AmbP mit bereits charakterisierten ROs des Sekundärmetabolismus. Das [2Fe2S]-Cluster-Bindemotiv ist in orange markiert, die 2-His-1-Carboxylat-Triade (HHD) in grün, die koordinierende Brücke in lachsfarben und die Wasser koordinierende Aminosäure der zweiten Koordinationssphäre in hellblau. MupW = THP-erzeugende Oxygenase der Mupirocin Biosynthese, AuaF und PrnD = N-hydroxylierende Oxygenasen der Aurachin bzw. Pyrrolonitrin Biosynthese, SxtH/T und GxtA = C-hydroxylierende Oxygenasen der Saxitoxin Biosynthese, RedG

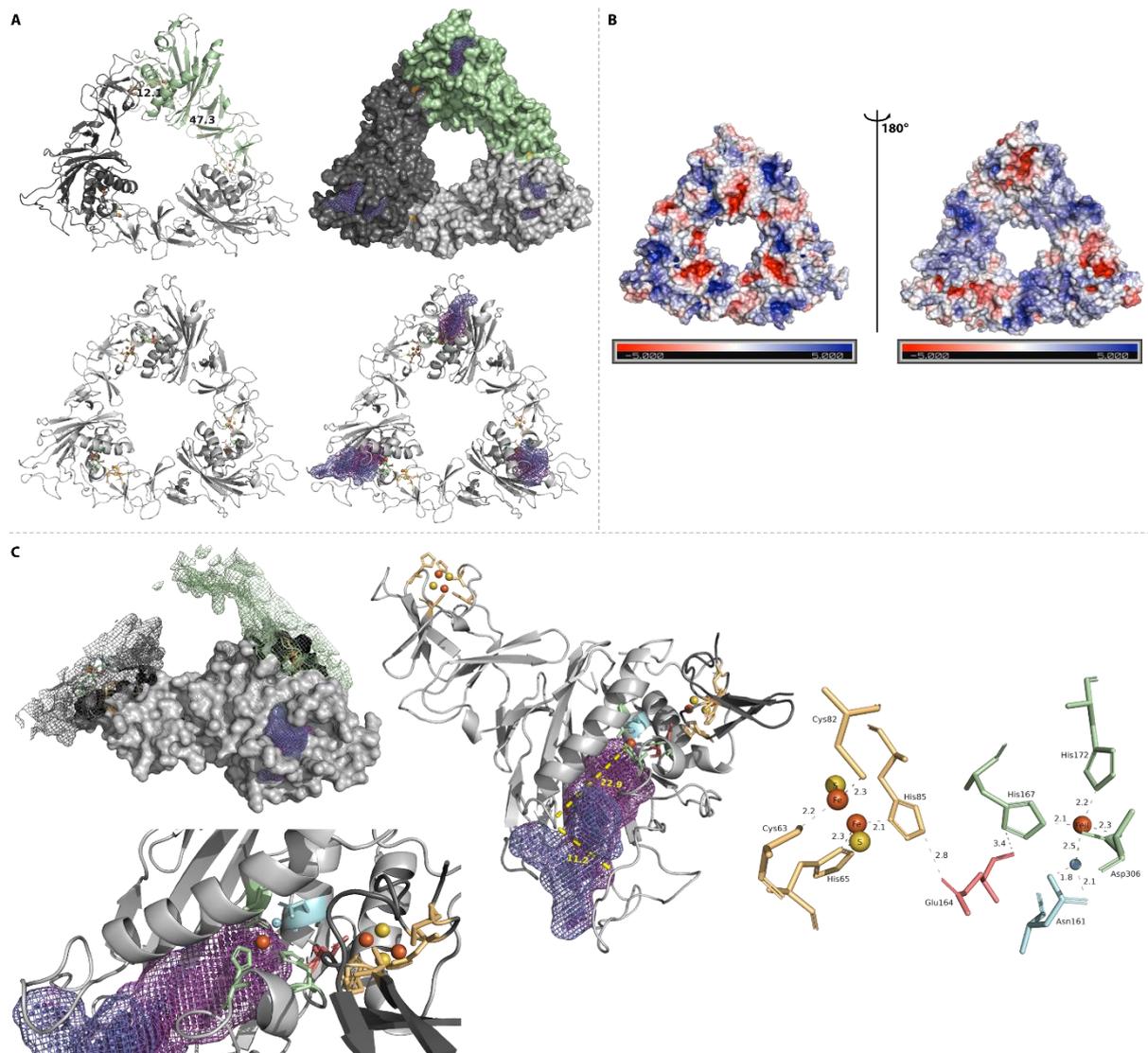
---

und MarG = ringbildende Oxygenasen der Marineosin bzw. Prodigin Biosynthese. „“ = chemisch identische Aminosäuren, „“ = ähnliche Aminosäuren und „\*“ = identische Aminosäuren.<sup>[134]</sup>

Sowohl das hochkonservierte  $CXHX_{15-17}CXXH$ -Motiv der Koordination des  $[2Fe_2S]$ -Clusters als auch das  $DXXHX_4H$ -Motiv der 2-His-Carboxylat-Triade (HHD), benötigt für die Koordination des non-häm-Eisenzentrums, konnten erfolgreich identifiziert werden (Abbildung 6–7). Das verbrückende und elektronentransportierende Element zwischen Cluster und aktivem Zentrum bildet in allen drei Fällen eine Glutamatbrücke. Im Falle von JerL ist dies ein Unterschied zu anderen  $sp^3$ -Kohlenstoff-hydroxylierenden ROs wie SxtT, SxtH und GxtA, die an dieser Stelle ein Aspartat tragen. Eine weitere Ähnlichkeit zwischen allen nicht-zyklisierenden ROs (JerP/L, AuaF, PrnD sowie SxtT, SxtH und GxtA) ist die Stabilisierung des katalytischen Eisenzentrums durch einen Wasserliganden der über ein das für diese Gruppe spezifische Asparagin in zweiter Koordinationssphäre gebunden ist. In jedem Fall konnten JerP, JerL sowie AmbP anhand der vorhandenen charakteristischen Sequenzmotive als RIESKE-Oxygenasen identifiziert werden.

### 6.2.3 3-D-Proteinmodelle

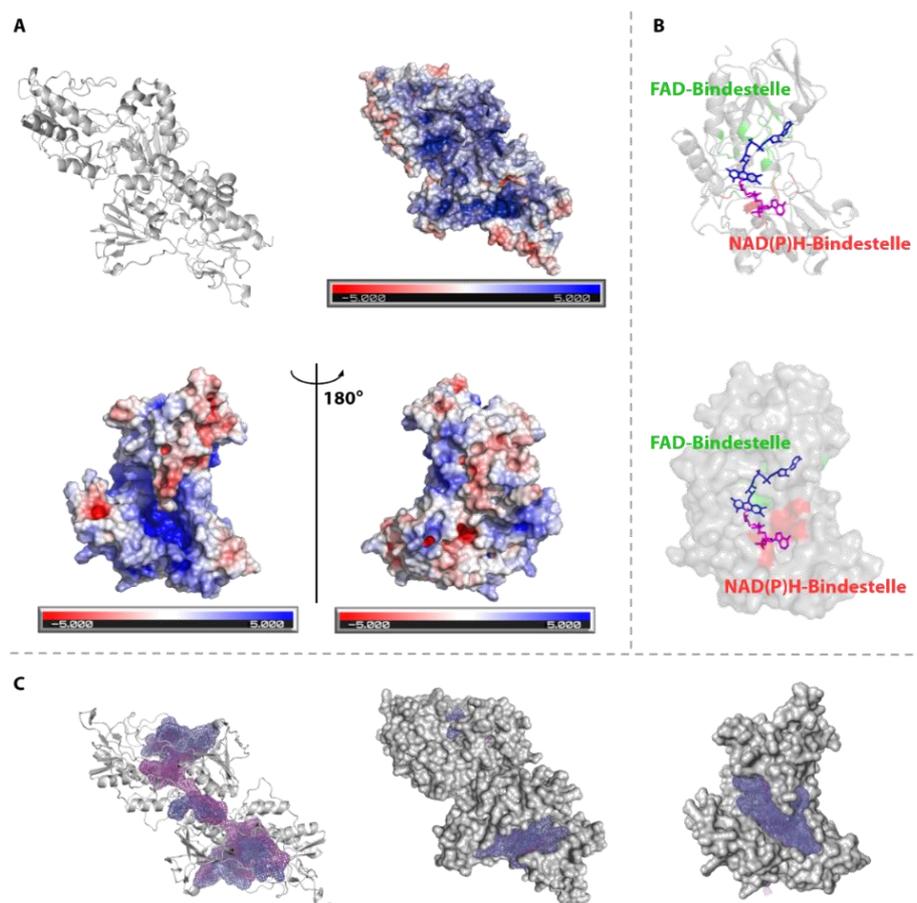
Zur Visualisierung der charakteristischen Motive und Struktur sowie Identifizierung der makromolekularen Struktur der drei Rieske-Oxygenasen sollten 3-D-Proteinmodelle angefertigt werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die gekoppelte Reduktase JerO charakterisiert werden. Anhand dieser Modelle sollten die Eigenschaften und Abhängigkeiten der ROs und der Reduktase der Jerangolid Biosynthese besser verstanden sowie Charakteristika der aktiven Tasche untersucht werden. Zur besseren Darstellung ist hier als Beispiel für die ROs das Proteinmodell von JerP gezeigt. Die Modelle von JerL und AmbP befinden sich in Kapitel 9.5. Zur Modellierung der RIESKE-Oxygenasen-Strukturen diente aufgrund der intensiven Studien zu Funktion und Struktur SxtT als Templat. Wie erwartet sind alle ROs in trimerer Komplexform ( $\alpha_3$ ) modelliert, wobei sich die katalytisch aktiven Bereiche jeweils an den Monomergrenzflächen befinden. Dort liegt der vorhergesagte und zur Aktivität benötigte Abstand ( $\sim 12.0 \text{ \AA}$ ) zwischen *N*-terminalen  $[2Fe_2S]$ -Cluster und *C*-terminalen non-häm-Eisenzentrum vor (Abbildung 6–8, A). Durch *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver* (APBS) (Abbildung 6–8, B) Berechnungen konnte zudem die Wechselwirkung der Monomere durch komplementär geladenen Kontaktbereiche gezeigt werden. Ergänzende Kavitäten-Modellierungen identifizierten einen Hohlraum, der das aktive Zentrum mit der Proteinoberfläche verbindet und als Substratbindetasche dienen könnte. Der potentielle Eingang zu dieser Tasche weist in allen Fällen einen Durchmesser von  $\sim 11.0 \text{ \AA}$  auf und ist in einer Distanz von  $\sim 23.0 \text{ \AA}$  zum aktiven Zentrum (Abbildung 6–8, C).



**Abbildung 6-8.** 3-D-Proteinmodelle der RIESKE-Oxygenase JerP. (A) 3-D-Proteinmodelle des trimeren  $\alpha_3$ -Komplexes. *Oben links*: 3-D-Modell mit farblich abgesetzten Monomeren und Abstände des aktiven non-häm-Eisenzentrums zum Rieske-Cluster innerhalb eines Monomers (12.1 Å) und zwischen zwei Monomeren (47.3 Å), *Oben rechts*: 3-D-Proteinoberflächenmodell mit farblich abgegrenzten Monomeren und Eingängen zur Substratbindetasche in lila *Unten links*: 3-D-Modell mit non-häm-Eisenzentrum, [2Fe2S]-RIESKE-Cluster und koordinierenden Aminosäuren, *Unten rechts*: 3-D-Modell zusätzlich mit Kavität von aktivem Zentrum und Substratbindetasche in lila, (B) Elektrostatische Oberflächenpotentiale mit Farbgradient von rot (-5) bis blau (+5), (C) Vollständige 3-D-Monomerstrukturen des Proteinmodells und angrenzendem aktiven Zentrum mit hervorgehobenen non-häm-Eisenzentrum und [2Fe2S]-Rieske-Cluster inklusive interagierender Aminosäuren, deren Abstände in Å sowie Kavität des aktiven Zentrums und der Substratbindetasche. Lila: Kavität und Eingang, Orange: non-häm-Eisenkoordinierende Aminosäuren, Grün: [2Fe2S]-RIESKE-Cluster-koordinierende Aminosäuren, Blau: koordiniertes Wassermolekül mit Hellblau: stabilisierende Aminosäure aus sekundärer Koordinationsebene, Lachs: verbindende Glutamatbrücke. Das 3D-Proteinstrukturmodell wurde aus hinterlegten Proteinsequenzen mit SWISSMODEL generiert, wobei die RIESKE-Oxygenase SxtT als Vorlage diente.<sup>[68]</sup> Die erhaltenen Strukturen wurden mit PVMOL 2.5 visualisiert.<sup>[62]</sup>

Der Porendurchmesser wäre somit ausreichend für einen Eintritt der biosynthetischen Vorstufen bzw. Substrate in den Substrattunnel. Auch die berechneten Volumina der Kavitäten von JerP und JerL, die mit  $370 \text{ \AA}^3$  und  $371 \text{ \AA}^3$  nahezu identisch sind, erscheinen angemessen und sollten ausreichen, um ihre strukturell sehr ähnlichen Substrate darin zu binden und zu prozessieren. Im Falle von AmbP ist das berechnete Volumen ( $\sim 272 \text{ \AA}^3$ ) deutlich kleiner. Diese Beobachtung könnte die Hypothese von WILLIS, dass AmbP an linearen Ambruticin-Substraten auf früheren

Stufen der Biosynthese aktiv ist, stützen (Kapitel 3.4.5). Die linearen Vorläufer könnten so in der aktiven Tasche gebunden werden, dass weniger Volumen nötig ist, als im Falle eines vorhandenen THP-Rings. Die allgemein weniger voluminösen Jerangolide könnten trotz dieses Strukturmotivs in der aktiven Tasche gebunden und wie beobachtet prozessiert werden.<sup>[98]</sup> Die charakteristischen koordinierenden Aminosäuren haben in allen Fällen einen Abstand von 1.80-3.40 Å zum entsprechenden Koordinationspartner, was übereinstimmend mit den theoretischen Abständen von Wasserstoffbrückenbindungen ist (Abbildung 6–8, C). Von einer realitätsnahen Positionierung aller entscheidenden Aminosäuren zur Bindung des [2Fe2S]-Clusters, des non-häm-Eisenzentrums, für die Verbindung durch die Glutamatbrücke sowie für die Stabilisierung eines Wassermoleküls kann anhand der Abstände und der Modellierungen ausgegangen werden. Die im Jerangolidgencluster identifizierte Reduktase JerO, die mutmaßlich sowohl die RIESKE-Oxygenasen JerP als auch JerL regeneriert, wurde auf Basis der ursprünglichen FMO als homodimere Struktur modelliert.



**Abbildung 6–9.** 3-D-Proteinmodelle der Reduktase JerO. (A) 3-D-Proteinmodelle des Homodimers und elektrostatische Oberflächenpotentiale mit Farbgradient von rot (-5) bis blau (+5). *Oben:* 3-D-Modell des Homodimers und dessen elektrostatisches Oberflächenpotential, *Unten:* 3-D-Modell des Monomers und dessen elektrostatisches Oberflächenpotential, (B) Prognostizierte Cofaktorbindestellen für FAD (grün) und NAD(P)H (rot), (C) 3D-Modell mit Kavitäten (lila) des Homodimers und zur Zwecken der Bindungsstellen-Identifikation des Monomers. Die 3D-Proteinstrukturmodelle wurden aus hinterlegten Proteinsequenzen mit SWISSMODEL generiert, wobei die ursprüngliche FMO als Vorlage diente.<sup>[68]</sup> Die erhaltenen Strukturen wurden mit PYMOL 2.5 visualisiert.<sup>[62]</sup>

Ein Analyse des elektrostatischen Oberflächenpotentials, der Cofaktor-Bindestellen und der Identifikation von Kavitäten ergab neben einer innenliegenden FAD-Bindestelle (C-Score: 0.58) eine benachbarte NAD(P)H-Bindestelle (C-Score: 0.30), die näher an der Proteinoberfläche liegt. Dabei sind wie erwartet beide Bindestellen von positiv geladener Oberfläche umgeben. Somit sind alle Voraussetzungen zur Wechselwirkung und Regeneration der RIESKE-Oxygenasen gegeben. Ob eine Abhängigkeit von NADH oder NADPH als Elektronenquelle vorliegt, soll später durch praktische Tests in Enzymreaktionstests aufgeklärt werden

## 6.2.4 Simulation von 3-D-Substratstrukturen

Um einen detaillierteren Einblick auf die Natur der Substrate und Auswirkung von strukturellen Veränderungen zu bekommen wurden 3-D-Substratstrukturen im energetisch günstigsten Zustand mittels AVOGADRO simuliert und visualisiert. Hierfür wurden der vermutete biosynthetische Vorläufer Jerangolid E (**35**), das sich strukturell sehr abhebbende 9-(Z)-Jerangolid E (**156**) sowie das putative PKS-Produkt Projerangolid (**44**) ausgewählt. So war es möglich, eine große Bandbreite an der strukturell und konformell unterschiedlichen Substrate abzudecken. Die erhaltenen Ergebnisse können im späteren Verlauf der Arbeit zur Bewertung von Umsätzen der Enzymaktivitätsexperimente und Substratspezifität der RO verwendet werden.

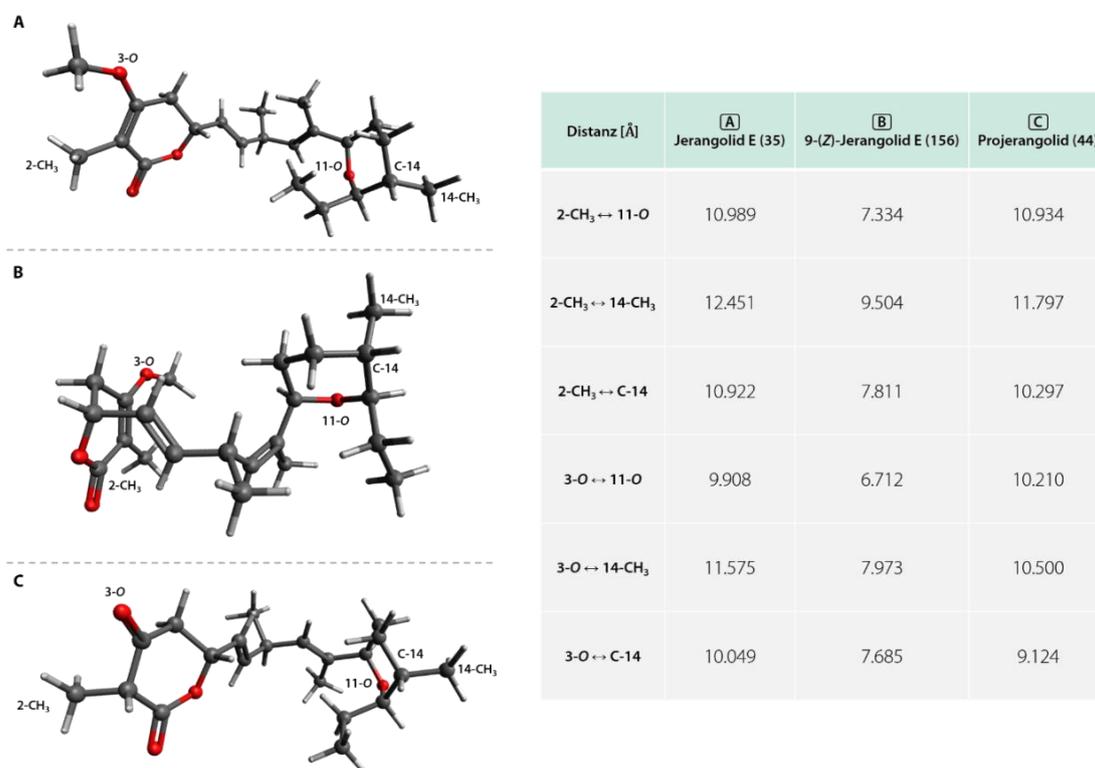


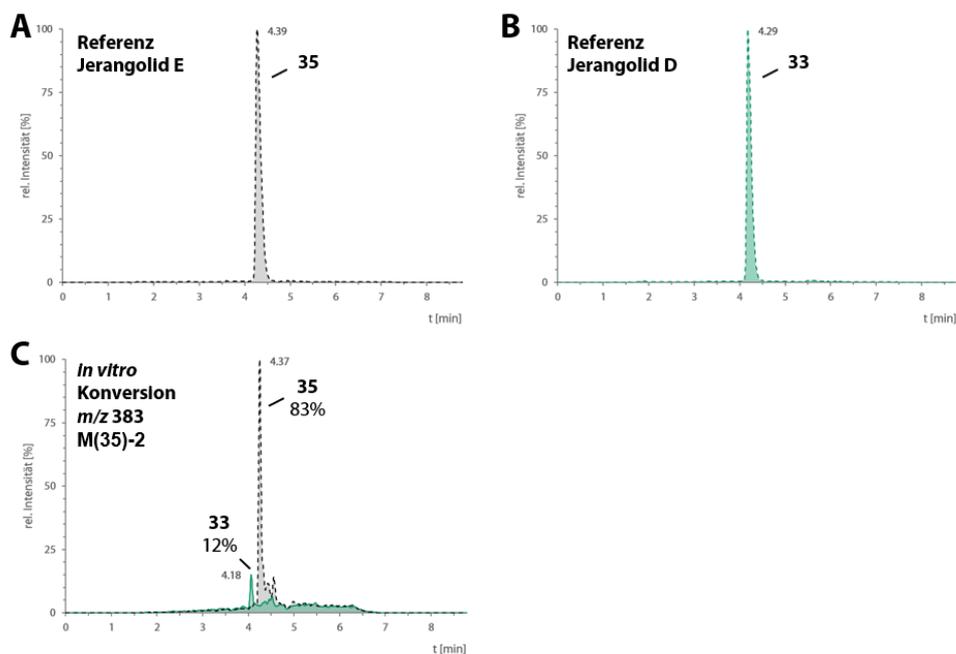
Abbildung 6–10. 3-D-Substratstrukturen des niedrigsten Energiezustandes und Atomabstände von (A) Jerangolid E (**35**), (B) 9-(Z)-Jerangolid E (**156**) und (C) Projerangolid (**44**).

---

Die Struktur von Jerangolid E (**35**) wird als weitgehend gestreckt vorhergesagt, was zu einem maximalen Abstand von  $\sim 12.5$  Å zwischen C-14 und 2-CH<sub>3</sub>, den Reaktionsstellen der ROs JerP und JerL, führt. Somit besitzt der vermutete biosynthetische Vorläufer die maximale Ausdehnung im Vergleich. Im Falle von 9-(Z)-Jerangolid E (**156**) wird dieser Abstand und damit auch der Abstand der beiden Ringstrukturen durch die (Z)-konfigurierte Doppelbindung um  $\sim 3.00$  Å verringert. Auch die generelle Positionierung bzw. Konformation relevanter Gruppen wird verändert. 9-(Z)-Jerangolid E (**156**) weist erhebliche Veränderungen im Vergleich zum vermuteten biosynthetischen Vorläufer auf, was spätere Enzymreaktionstest beeinträchtigen könnte. Die Positionsunterschiede relevanter Gruppen und der Unterschied der maximalen Ausdehnung liegen im Falle von Projerangolid (**44**) hingegen innerhalb von 1.00 Å-Differenzen. Im Vergleich mit Jerangolid E (**35**) sticht ausschließlich der erhebliche Unterschied der Positionierung der 10-CH<sub>3</sub>-Gruppe heraus. Dieser resultiert aus der Rotation der C-8-C-9-Bindung des Projeranoglicids (**44**) um  $\sim 180^\circ$  im Vergleich zu Jerangolid E (**35**). Nur anhand dieser Strukturmodelldaten lassen sich keine eindeutigen Aussagen zum Einfluss der Struktur von Projerangolid (**44**) auf Enzymreaktionstest treffen. Ein Vergleich der funktionellen Gruppen zeigt außerdem, dass nur im Falle von Projerangolid (**44**) der 3-Sauerstoff als Keton und nicht als Methylenolether vorliegt, was möglicherweise Einfluss in späteren Enzymreaktionstest nehmen könnte. Anhand der durchgeführten *in silico*-Studien konnte gezeigt werden, dass alle Voraussetzungen, wie strukturelle Eigenschaften und charakteristische Motive, die für die Aktivität der ROs JerP, JerL und AmbP erfüllt sein müssen, vorhanden sind. Zudem sind alle Ergebnisse vergleichbar mit weiteren, bereits charakterisierten RIESKE-Oxygenasen des Sekundärmetabolismus. Auch die nötigen Charakteristika der Reduktase JerO, welche die beiden ROs des Genclusters regeneriert, wurden nachgewiesen. Zusätzlich wurden Studien zur Substratstruktur durchgeführt, die später Argumentationsgrundlage für mögliche Substratspezifität sein können.

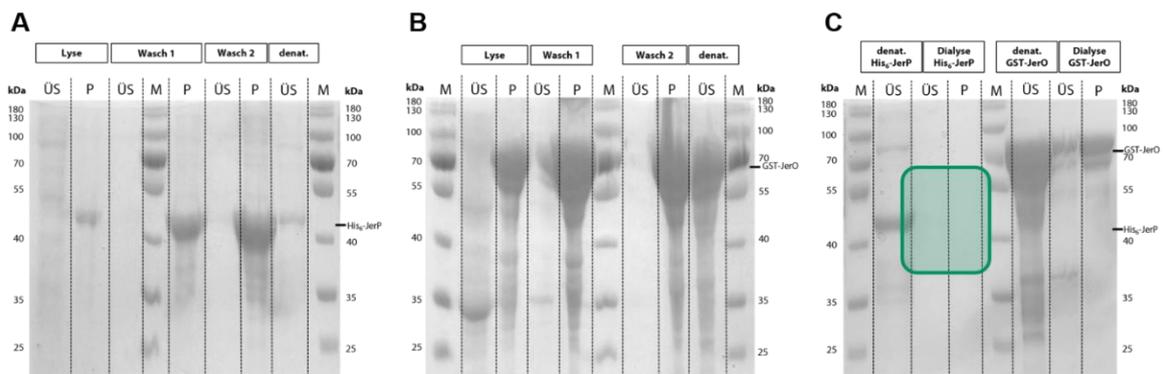
### 6.3 Replikation der *in vitro*-Experimente zu JerP und JerO

Vorangegangene Experimente (siehe Kapitel 4.2) ließen vermuten, dass ein Einsatz der RIESKE-Oxygenase JerP in Kombination mit der Reduktase JerO in Form isolierter Enzyme *in vitro* möglich sein sollte. Allerdings hinterließ ein Vergleich der Retentionszeiten der UPLC-MS-Chromatogramme des möglichen Produkts und der Referenz des Jerangolid D (**33**) Zweifel an zuvor postulierten *in vitro*-Ergebnissen. Eine Differenz von 0.11 min legt nahe, dass das gewollte Produkt während *in vitro*-Enzymreaktionstest nicht gebildet wurde (Abbildung 6–11).



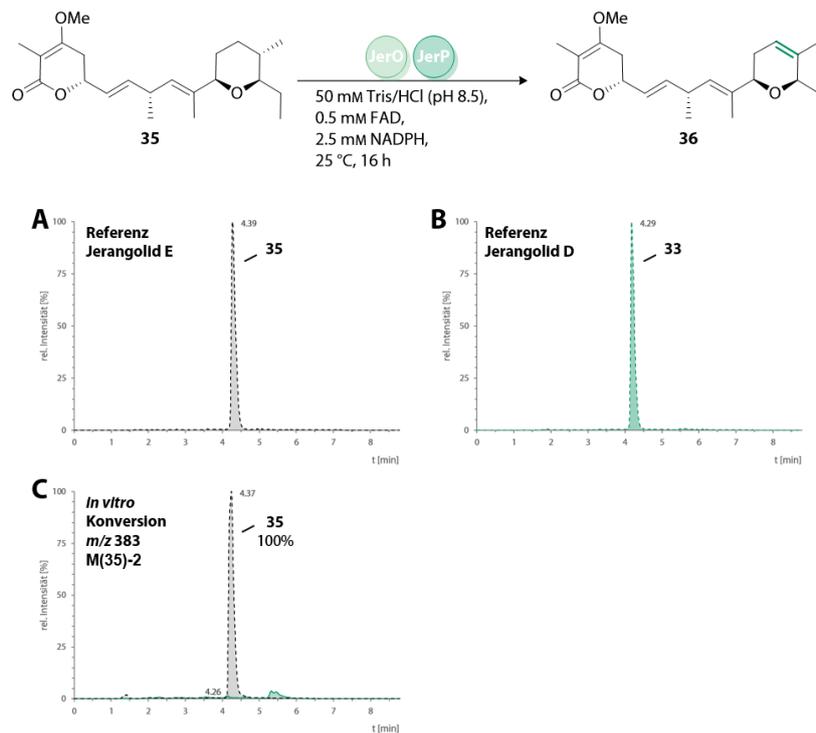
**Abbildung 6–11.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vitro* Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit 30.5  $\mu\text{M}$  His<sub>6</sub>-JerP und 66.6  $\mu\text{M}$  GST-JerO. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; (A) Referenz Jerangolid E (**35**), (B) Referenz Jerangolid D (**33**), (C) *in vitro* Enzymreaktion. HRMS: ber. 383.2199, gef. 383.3300.<sup>[110]</sup>

Diese Vermutung sollte durch eine Wiederholung der Experimente untersucht werden. Nach vorgegebenem Protokoll wurden IBs von His<sub>6</sub>-JerP/L und GST-JerO präpariert. Die Proteine lagen nun in denaturierter Form vor. Mit dieser Art der denaturierenden Proteingewinnung wurde verhindert, dass die Proteine, wie zuvor bei üblicher löslicher Produktion beobachtet, stark aggregieren und ausfallen. Durch Rekonstitution des [2Fe2S]-Clusters mittels eisen- und schwefelhaltiger Rekonstitutionslösung unter Inertgasatmosphäre und anschließender Rückfaltung durch Dialyse sollten korrekt gefaltete und aktive ROs erhalten werden. Auch die Reduktase sollte mittels Rekonstitution und Dialyse in ihre aktive Form überführt werden. Die Kontrolle der einzelnen Protokollschritte wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gele durchgeführt (Abbildung 6–12).



**Abbildung 6–12.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Kontrolle des Verlaufs der Denaturierung und Rekonstitution von His<sub>6</sub>-JerP und GST-JerO. **(A)** Denaturierung von His<sub>6</sub>-JerP, **(B)** Denaturierung von GST-JerO, **(C)** Rekonstitution und Dialyse beider Enzyme. **M:** Marker (kDa), **P:** Pellet, **ÜS:** Überstand; GST-JerO = 69 kDa, His<sub>6</sub>-JerP = 42 kDa.

Die Kontrolle des Protokolls zeigte, dass GST-JerO nach Rekonstitution und Rückfaltung erfolgreich in löslicher Form erhalten werden konnte. Eine deutliche Bande bei der erwarteten Masse von ~69 kDa war auf dem SDS-Polyacrylamid-Gel (Abbildung 6–12, C) zu sehen. Allerdings lag der größte Teil in unlöslicher Form vor, was auf eine unvollständige oder komplexe Dialyse schließen lässt. Gleichzeitig liegt ein größerer Teil nach diesem Prozess präzipitiert vor. Im Falle der RO JerP konnte keinerlei Enzym erhalten werden. Nach Dialyse ist weder eine lösliche noch unlösliche Form bei erwarteter Masse von ~42 kDa (Abbildung 6–12, C, **grüner Rahmen**) zu beobachten. Um festzustellen ob dennoch aktives His<sub>6</sub>-JerP vorhanden war wurde ein *in vitro*-Enzymreaktionstest mit der vermeintlich löslichen Fraktion angestrebt. Dabei wurde die in Kapitel 4.2.3 gewählten Bedingungen für eine möglichst nahe Replikation genutzt. Die Menge der zugegeben löslichen Proteinlösung orientierte sich an zuvor verwendeten Konzentrationen und Volumina. Die Reduktase wurde in einer theoretischen Konzentration von 66.6 µM in Kombination mit 0.2 mL Proteinlösung eingesetzt um 0.25 mM des vermuteten biosynthetischen Vorläufers Jerangolid E (**35**) unter Verwendung von 2.50 mM NADPH und 0.50 mM FAD bei 25 °C für 16 h umzusetzen. Wie erwartet konnte keine Konversion zu Jerangolid D (**33**) beobachtet werden. Somit konnte bestätigt werden, dass JerP nicht in aktiver Form durch das Denaturierungs- und Rekonstitutionsprotokoll erhalten werden konnte.



**Abbildung 6–13.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vitro*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit theoretischen 30.5  $\mu\text{M}$  His<sub>6</sub>-JerP und 66.6  $\mu\text{M}$  GST-JerO. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; **(A)** Referenz Jerangolid E (**35**), **(B)** Referenz Jerangolid D (**33**), **(C)** *in vitro*-Enzymreaktion.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  = 385,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  = 383.

RIESKE-Oxygenasen sind mit ihren  $[\text{2Fe2S}]$ -Cluster und dem aktiven Eisenzentrum äußerst empfindlich was Produktion und Einsatz in Enzymreaktionstests betrifft. Durch ihre Anfälligkeit gegenüber Sauerstoff, Temperatur und zu harscher Handhabung ist die Verwendung insbesondere in *in vitro*-Systemen problematisch und komplex. Die Mehrzahl an ROs des Sekundärmetabolismus aus der Literatur (Kapitel 3.4) konnten nicht erfolgreich *in-vitro* in Enzymreaktionen eingesetzt werden, auch in den Fällen in denen Enzymaktivität beobachtet wurde gelang dies meist mit heterologen Ganzzell-Biokatalysatoren.<sup>[54,55,93,94,96]</sup> Außerdem konnten die Zweifel an den früheren Ergebnissen des *in vitro*-Enzymreaktionstest (Kapitel 4.2.3)<sup>[110]</sup> nicht bereinigt werden. Die Kombination aus den genannten Problemen mit *in vitro*-Systemen bei ROs führte dazu, dass ein anderer Ansatz gewählt wurde, um die Jerangolid RIESKE-Oxygenasen zu charakterisieren. Der neu gewählte Ansatz der Ganzzell *in vivo*-Enzymreaktion bietet eine Reihe an Vorteilen. Neben den klassischen ökonomischen und ökologischen Vorteilen eines *in vivo*-Ansatzes, wie das Einsparen des Protein-Reinigungsschrittes, führt die Verwendung der ROs in Zellen zu den entscheidenden Faktoren. Durch die Zellen werden die empfindlichen Proteine gegen äußere Faktoren besser geschützt und können einfacher sowie schonender gehandhabt werden.<sup>[54,55]</sup> Die Zellen dienen somit sowohl als Schutz- als auch als Transportvehikel der empfindlichen Proteine. Ein weiterer Vorzug liegt darin, dass innerhalb der Zelle eine Coexpression von RO und Reduktase mit anschließender direkter Verwendung als

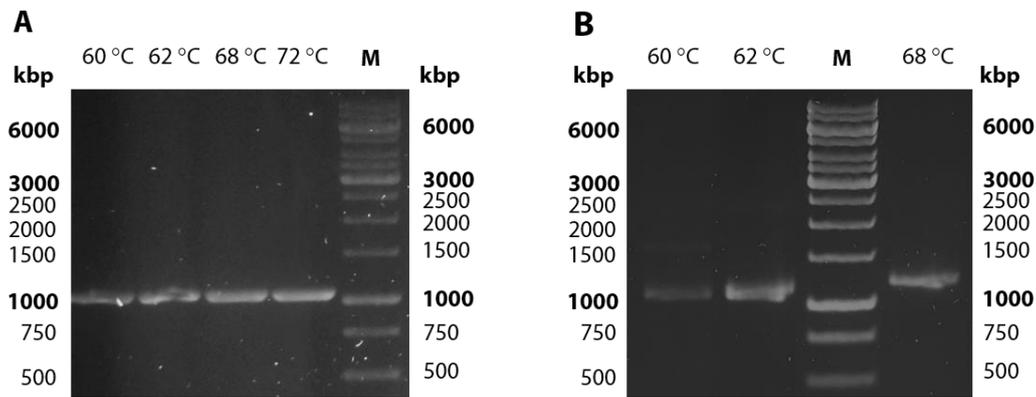
---

Katalysatorsystem einfach möglich ist. Es wird angenommen, dass sich Proteine wie ROs und ihre Reduktase bei einer Coexpression gegenseitig stabilisieren und in ihrer korrekten Faltung unterstützen.<sup>[54,55]</sup> Um diesen Ansatz der *in vivo*-Enzymreaktion zu realisieren mussten neben der Entwicklung und Darstellung eines geeigneten Expressionssystems und -vektors die passenden Bedingungen für Enzymreaktionstests entwickelt werden. In allen folgenden Kapiteln dienen die RIESKE-Oxygenase JerP und die Reduktase JerO als Modellsystem. Anhand dieses Systems sollten Klonierung, Expression und *in vivo*-Enzymreaktion untersucht und optimiert werden, um nach dem Erreichen ausreichender Umsätze aussagekräftige Versuche zur Substratspezifität durchführen zu können. Bei erfolgreicher Durchführung wurden die Erkenntnisse analog auf die weiteren zu untersuchenden ROs JerL und AmbP übertragen und angewandt, um die verbleibenden ROs zu charakterisieren.

## 6.4 Klonierungsstrategien

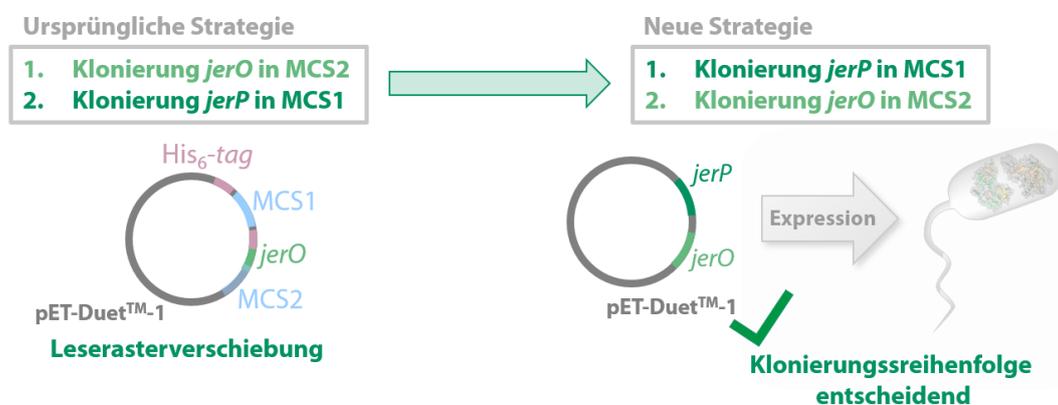
Die RIESKE-Oxygenasen JerP und JerL sollten jeweils zusammen mit der regenerierenden Reduktase JerO in *E. coli* produziert werden. Außerdem sollte das homologe System AmbP/O nach gleichem Protokoll erhalten werden. Dazu ist es nötig, dass beide Gene simultan exprimiert werden. Dadurch wäre es möglich, dass ein Proteinkomplex aus RO und Reduktase gebildet werden kann, der sich selbst stabilisiert und positiv auf die Löslichkeit auswirken kann. Eine gängige Methode für Coexpressionen ist die Verwendung eines Plasmidvektors, bei dem die zu exprimierenden Gene in verschiedenen Produktionsstellen eingebracht werden können. Das System der Wahl für derartige Expressionen bilden Duet-Vektoren. Diese Plasmide besitzen neben Promotor und RBS-Sequenzen zwei *multiple cloning sites* (MCS) und können so zwei verschiedene Gene simultan exprimieren. Gleichzeitig muss, im Unterschied zu einem System mit mehreren Vektoren, nur eine Art der Resistenz und des Promotors beachtet werden. Gewählt wurde der Expressionsvektor pET-Duet-1™ (Abbildung 9–53), der sich besonders für den Einsatz mit *E. coli*-Zellen, die kompatibel mit dem T7-Expressionssystem sind, eignet. Die Verwendung von *E. coli* als etabliertes Expressionssystem rekombinanter Proteine bringt zahlreiche Vorteile mit sich. Aufgrund der extensiven Verwendung und Charakterisierung des Systems stehen zahlreiche molekulare Werkzeuge und Protokolle, wie beispielsweise ein umfangreicher Katalog an Expressionsplasmiden, eine große Anzahl von gentechnisch veränderten Stämmen sowie zahlreiche Kultivierungsstrategien, für die Produktion heterologer Proteine auf hohem Niveau zur Verfügung.<sup>[135]</sup> Nacheinander sollten das Gen der entsprechenden RO in MCS1 und das Gen

der Reduktase JerO in MCS2 des pET-Duet-1™ über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *EcoRI/NotI* bzw. *NdeI/XhoI* eingebracht werden. Die benötigten Gene wurden mittels *polymerase chain reaction* (PCR) ausgehend von entsprechenden Templaten erzeugt. Die verwendeten Primer und Template sind in Tabelle 9-5 und Tabelle 9-6 aufgeführt.



**Abbildung 6–14.** Agarosegel (1%) zur Analyse der PCR der Gene *jerP* und *jerO* bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen. (A) *jerP* (1.1 kbp) mit Restriktionsstellen *EcoRI/NotI* bei 60 °C–72 °C, (B) *jerO* (1.2 kbp) mit Restriktionsstellen *NdeI/XhoI* bei 60 °C–68 °C. M = Marker, kbp = Kilobasenpaare.

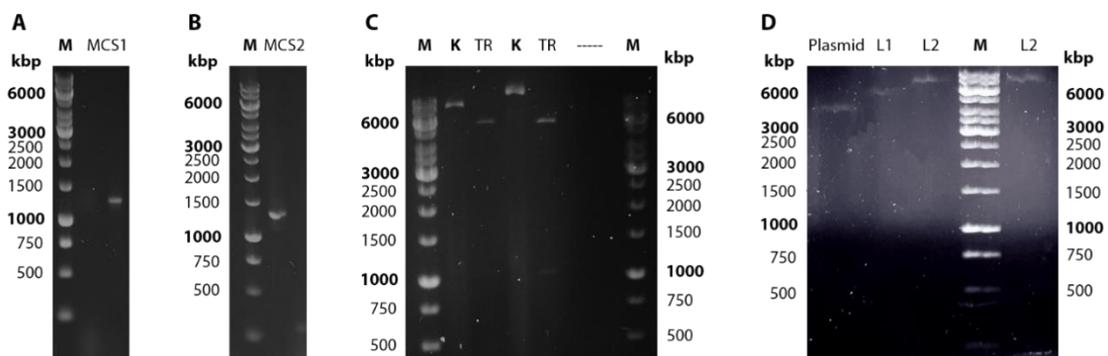
Die Gene *jerP* und *jerO* konnten bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen durch standardmäßige PCR erfolgreich amplifiziert und anschließend isoliert werden. Die Übertragung auf *jerL* war erfolgreich. Nachdem die Gene, mit den gewünschten Sequenzen der Schnittstellen versehen, erfolgreich erstellt werden konnten, sollten diese durch Ligation in den pET-Duet-1™-Vektor eingebracht werden. Durch Verdau des Plasmids und des Gens mit den Restriktionsenzymen der entsprechenden MCS und anschließender Ligation durch die T4-DNA-Ligase wurden nacheinander das Gen der Reduktase und das der RO in die vorhergesehene MCS des linearisierten Plasmids kloniert.



**Abbildung 6–15.** Entwicklung der Klonierungsstrategie ausgehend von der ursprünglichen Strategie und der erhaltenen Leserasterverschiebung zum expressionsfähigen Konstrukt pET-Duet™-1\_*jerP*\_*jerO* als positives Resultat der neuen Strategie.

Dabei stellte sich nach Überprüfung des ersten Ligationsschrittes durch Sequenzierung heraus, dass die Reihenfolge in der die Gene in die MCS eingebracht werden entscheidend ist. Im Falle

der geplanten Reihenfolge, in der zuerst *jerO* in MCS2 eingebracht werden sollte, kam es infolgedessen einmalig zum spontanen fehlerhaften Einbau des Gens. Dieses war Vershoben zur MCS ligiert worden. Durch diesen verschobenen Einbau wurde das Leseraster ausgehend vom Startcodon so verschoben, dass das Gen fehlerhaft und nicht wie gewünscht in der Sequenz von *JerO* exprimiert werden würde. Somit würde kein aktives Protein zur Regeneration der ROs vorliegen. Eine Verwendung des Konstrukts in Expressionen war so nicht möglich. Aus diesen Gründen wurde die Ligationsreihenfolge geändert (Abbildung 6–15). Wurde zuerst *jerP* in MCS1 gefolgt von *jerO* in MCS2 ligiert, konnte das Konstrukt pET-Duet™-1\_*jerP\_jerO* erhalten werden.



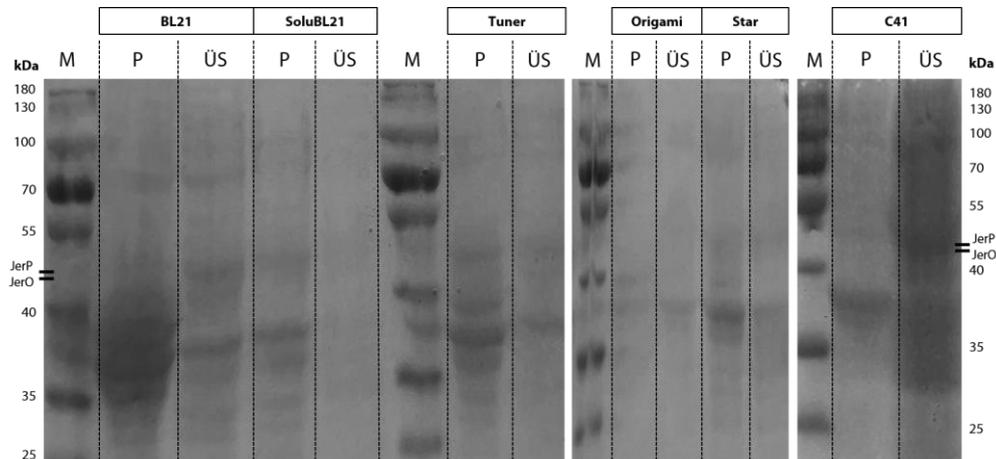
**Abbildung 6–16.** Agarosegele (1%) zur Überprüfung der Klonierung von pET-Duet™-1\_*jerP\_jerO*. **(A, B)** Identifizierung positiver Ligationen der MCS1 (1.3 kbp) und MCS2 (1.4 kbp) mittels Kolonie-PCR mit MCS-Primern, **(C)** Testrestriktion der MCS1 des Konstrukts pET-Duet™-1\_*jerP\_jerO* mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI*, linearisiertes Plasmid (~6.4 kbp), *jerP* (1.1 kbp), **(D)** Vergleich von geschlossenen Plasmiden: pET-Duet™-1 (5.4 kbp) mit L1 = pET-Duet™-1\_*jerP* (6.3 kbp) und L2 = pET-Duet™-1\_*jerP\_jerO* (7.5 kbp). M = Marker, K = Kontrolle pET-Duet™-1\_*jerP\_jerO*, kbp = Kilobasenpaare.

Das Ergebnis jedes Ligationsschrittes wurde nach Transformation in *E. coli* One Shot™ TOP10, mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung (MICROSYNTH) bestätigt. In Abbildung 6–16 A, B sind Beispiele für positive Proben der Kolonie-PCR von MCS1 (1.3 kbp) und MCS2 (1.4 kbp) dargestellt. Dabei wurden die jeweils vorgegebenen MCS-Primer verwendet. Im Falle des ersten Versuchs der Klonierung von pET-Duet™-1\_*jerP\_jerO* wurde zusätzlich die Vollständigkeit des Vektors durch eine Testrestriktion der MCS1 mit *EcoRI* und *NotI* und ein Vergleich der Klonierungsprodukte mit dem Leerplasmid durchgeführt (Abbildung 6–16 C, D). Es war zu erkennen, dass bei der Testrestriktion das linearisierte Plasmid (5.4 kbp) im Vergleich mit der Kontrolle um die herausgeschnittenen Basenpaare leichter wird und das Fragment von *jerP* wie erwartet bei 1.1 kbp erscheint. Zusätzlich zeigt der Vergleich der Klonierungsschritte und des Leerplasmids, dass die Anzahl an Basenpaaren um die erwartete Anzahl mit jedem Schritt zunimmt. Analog zur etablierten Klonierungsstrategie wurde das Konstrukt pET-Duet™-1\_*jerL\_jerO* dargestellt (Kapitel 9.3). Für die Produktion der homologen RO AmbP zusammen mit der Reduktase des Ambruticingenclusters AmbO wurde das expressionsfähige Plasmid pET-

Duet™-1\_ambP\_ambO von GENWIZZ erworben. Nachdem alle angestrebten pET-Duet™-1-Konstrukte vorlagen, sollte die Coexpression der ROs und Reduktasen etabliert und der Umsatz in der Reaktion mit Jerangolid E (35) optimiert werden.

## 6.5 Expressionsstudien

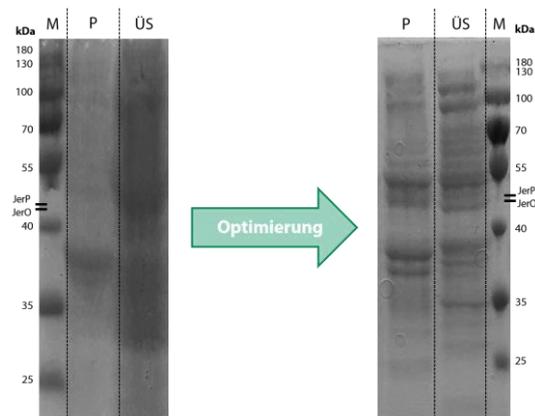
In einem nächsten Schritt sollte die Produktion der ROs und Reduktasen ausgehend von den erstellten Konstrukten untersucht werden. Auch in diesem Fall diente pET-Duet™-1\_jerP\_jerO als Modellsystem und die erhaltenen Ergebnisse sollten auf die weiteren Expressionsplasmide übertragen werden. Zunächst wurde pET-Duet™-1\_jerP\_jerO in den *E. coli* BL21 (DE3)-Stamm, welcher als Expressionsstandard etabliert ist, transformiert. Der Standardexpressionsstamm für *high-level*-Expressionen zeichnet sich durch das T7 RNA Polymerase-IPTG Induktionssystem aus. Die Expression wurde analog zu bereits bekannten Bedingungen des Arbeitskreises getestet. Nach Anwachsen der Zellkultur in 2YT-Medium bei 37 °C und 180 µM bis zu OD<sub>600</sub> = 0.4 wurde mit 0.1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) je Gen induziert und die Expression für 22 h bei 15 °C und 180 µM durchgeführt.



**Abbildung 6–17.** SDS-Gel (12%) der Expressionsversuche von pET-Duet™-1\_jerP\_jerO in *E. coli* BL21 (DE3), SoluBL21™, Tuner™ (DE3), Origami™ (DE3), Star™ (DE3) sowie C41-CmpX13. M: Marker (kDa), P: Pellet, ÜS: Überstand; JerO = 41 kDa, JerP = 42 kDa; aufgetragene Probenvolumina 10 µL.

Die Kontrolle der Expression wurde in allen Fällen durch SDS-Gele durchgeführt. Zum Vergleich wurden unter den beschriebenen Bedingungen noch weitere IPTG-induzierbare *E. coli* Expressionsstämme, wie SoluBL21™, Tuner™ (DE3), Origami™ (DE3), Star™ (DE3) oder C41-CmpX13 getestet. Besonderes Augenmerk lag aufgrund der verbesserten Protein-Löslichkeit und erhöhten Produktion von Flavoproteinen dabei auf dem C41-Stamm. Dieser soll besonders für die Produktion von Membranproteinen bzw. toxischen Proteinen geeignet sein. Diese

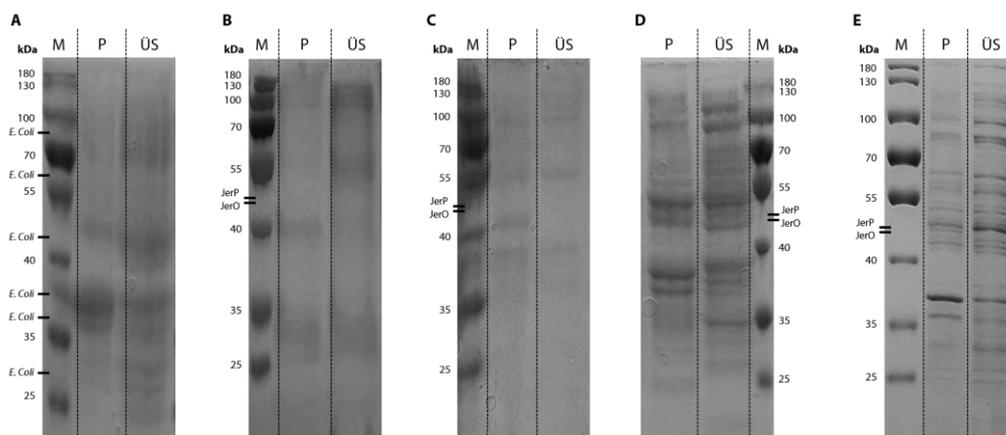
Eigenschaft wurde auf Veränderungen im genetischen Profil von C41, aus denen Unterschiede des Transkriptoms im Vergleich mit dem Mutterstamm BL21 (DE3) resultieren, zurückgeführt.<sup>[135–137]</sup> Die Mehrheit der getesteten *E. coli*-Stämme wies wenig Proteinproduktion in löslicher Form auf. Lediglich schwache Banden, von denen die des Standardstammes BL21 (DE3) noch am vielversprechenden erschienen, waren auf dem SDS-Polyacrylamid-Gel zu erkennen. Im Falle von *E. coli* C41 zeigte sich, wie erhofft, eine erhöhte Proteinmenge. Im Überstand war eine deutliche Bande bei erwarteter Größe von JerP (42 kDa) und JerO (41 kDa) zu erkennen. Die Ergebnisse des Stammes C41-CmpX13 wurden als bestes Ergebnis der Versuchsreihe gewertet und für zukünftigen Expressionstest und anschließende *in vivo*-Enzymreaktionstests verwendet. Am ausgewählten System sollten zunächst die Bedingungen der Expression und korrelierende Faktoren für eine erhöhte und schonende Proteinproduktion in löslicher Form optimiert werden. Neben verschiedenen Expressionsmedien (LB, Autoinduktion, 2YT), -zeiten (0-22h) und -temperaturen (15 °C und 30 °C) wurden schonendere Induktionsbedingungen getestet. Ein vollständiger Überblick ist in Kapitel 9.3 zu sehen. Die folgenden Bedingungen wurden als die besten der Versuchsreihe identifiziert. Nach Anwachsen der C41-Zellkultur in 2YT-Medium bei 37 °C und 180  $\mu$ M bis zu  $OD_{600} = 0.2$  wurde diese für 30 min bei 4 °C für eine schonendere Induktion gekühlt. Die Expression wurde mit 0.1 mM IPTG je Gen induziert und für 22 h bei 15 °C und 180  $\mu$ M durchgeführt.



**Abbildung 6–18.** Optimierung der Expression. Links: Ausgangspunkt, Rechts: Optimierte Expression von pET-Duet™-1\_gerP\_gerO in *E. coli* C41. M: Marker (kDa), P: Pellet, ÜS: Überstand; JerO = 41 kDa, JerP = 42 kDa; aufgetragene Probenvolumina 10  $\mu$ L.

In *Abbildung 6–18* sind die Ergebnisse der Optimierung dargestellt. Das rechte Gel weist definierte Proteinbanden auf. Eine stark auftretende Bande bei ungefähr 42 kDa zeigt, dass die Produktion an löslichem JerP und JerO nochmals verbessert werden konnte. Um die Proteinproduktion, korrekte Faltung und Einbau des [2Fe2S]-Clusters sowie des aktiven Eisenzentrums zusätzlich zu unterstützen wurden unter den optimierten Bedingungen die

Zugabe von Additiven getestet (Kapitel 9.3). Durch 100  $\mu\text{M}$  FAD bzw. Riboflavin sollte während der Produktion die korrekte Faltung der Reduktase gefördert werden. Die Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  an unterschiedlichen Eisenschwefel-Quellen, wie  $\text{FeS}$ ,  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ ,  $\text{FeCl}$  sowie  $\text{FeSO}_4$  sollte den Korrekten Einbau des Clusters und aktiven Zentrums der RO begünstigen. In beiden Fällen und in Kombination derer konnte qualitativ anhand des SDS-Polyacrylamid-Gels keine Veränderung der Proteinproduktion im Vergleich zur Expression ohne Additive beobachtet werden. Eine Vermutung, dass die Proteine Membran assoziiert sind sollte weiter untersucht werden. Durch Zugabe verschiedener Tenside, wie SDS, Tween20 oder Triton X-100 in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  sollte eine stabilere Produktion löslicher Proteine erreicht werden. Durch die Beeinflussung der Oberflächenspannung, Unterstützung der Proteinfaltung und Imitieren einer Lipiddoppelschicht wurde ein positiver Effekt vermutet. Die gewählten Tenside sollten amphipathische Eigenschaften besitzen und in geringer Konzentration eingesetzt werden, um zum einen die Zellmembran besser simulieren zu können und zum anderen nicht zur Denaturierung der Proteine zu führen. Es konnten keine eindeutigen Aussagen zu den beobachteten Ergebnissen der SDS-Polyacrylamid-Gele getroffen werden (Kapitel 9.3). Außerdem konnten die eingesetzten Tenside nicht abgetrennt werden, wodurch diese Enzymreaktionstest und analytische Methoden behindern. Somit wurden alle Überlegungen zur weiteren Verbesserung der Proteinproduktion durch erwähnte Additive verworfen und an den zuvor optimierten Parametern der Coexpression festgehalten.



**Abbildung 6–19.** Vergleich der SDS-(Gradienten)Gele (12%, 8→15%). (A) optimierte Expression pET-Duet<sup>TM</sup>-1, (B) nicht induzierter pET-Duet<sup>TM</sup>-1<sub>jerP\_jerO</sub>, (C) optimierte Expression pET-Duet<sup>TM</sup>-1<sub>jerP</sub>, (D) optimierte Expression pET-Duet<sup>TM</sup>-1<sub>jerP\_jerO</sub>, (E) Optimierte Expression pET-Duet<sup>TM</sup>-1<sub>jerP\_jerO</sub> und optimierte Gelmethode, jeweils in *E. coli* C41. M: Marker (kDa), P: Pellet, ÜS: Überstand; JerO = 41 kDa, JerP = 42 kDa; aufgetragene Probenvolumina 10  $\mu\text{L}$  bei gleichen Zellmengen.

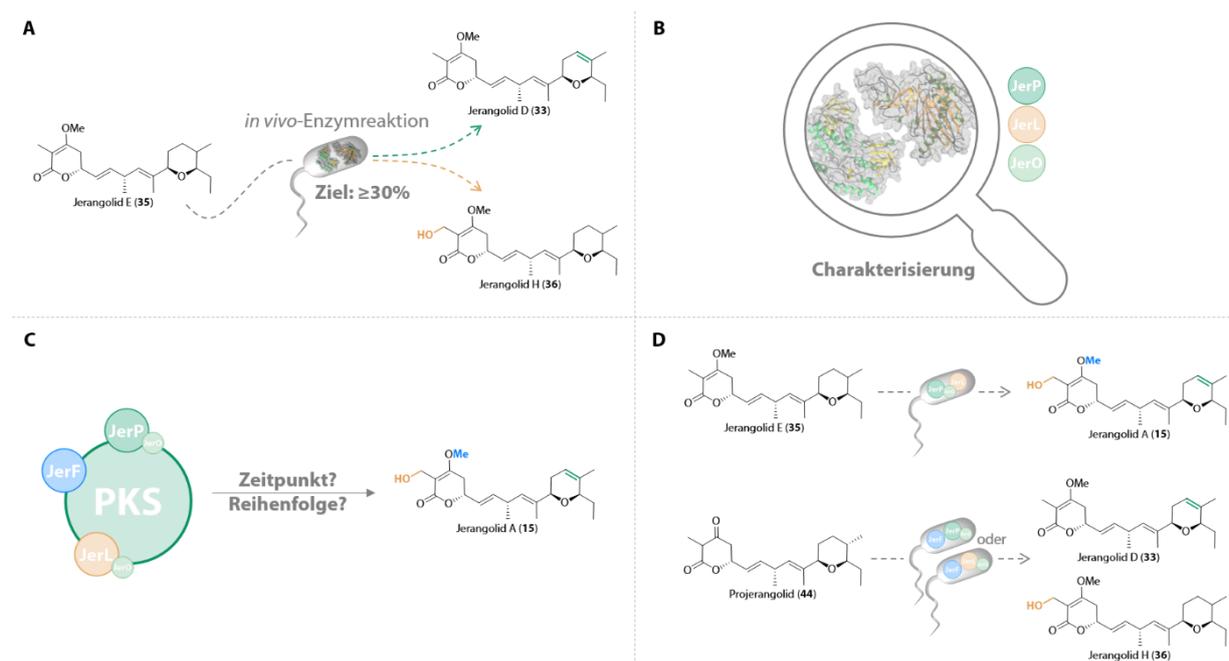
Zusätzlich zur optimierten Expression sollte die Auflösung des Ergebnisses durch SDS-Polyacrylamid-Gele verbesserte werden. Dazu wurden im finalen Verlauf der Arbeit Gradientengele, mit einem Gradienten des Trenngels (8%→15%), verwendet. Ein Beispiel der

---

verbesserten Auflösung ist in Abbildung 6–19, E dargestellt. Mit den etablierten Expressionsbedingungen konnten für spätere Enzymreaktionstest benötigte sowie unterstützende Argumentationsgrundlagen erzeugt werden (Abbildung 6–19). Eine Probe vor Induktion und Proben der Expressionen von Leervektor, RO allein sowie dem System aus RO und Reduktase wurden miteinander verglichen um die Identität der Banden zu bestimmen und *E. coli* eigens produzierte Proteine auszuschließen. Die Übertragung auf JerL sowie AmbP verlief erfolgreich (Kapitel 9.3). Anschließend wurden die Proteine ausgewählter Banden per MS/MS bestimmt. Alle ROs und Reduktasen konnten mit hoher Übereinstimmung identifiziert werden (Kapitel 9.4). Außerdem konnte so der positive Effekt der Co-Expression mit unterstützender Reduktase für die Produktion der ROs nachgewiesen werden, da bei der Expression des Konstrukts pET-Duet™-1\_*jerP* keine Bildung der RO zu beobachten war (Abbildung 6–19, C). Für geplante Kaskadenreaktionen wurde das System aus pET-Duet™-1\_*jerP\_jerO* mit pET28a(+)\_*jerL* in *E. coli* C41 cotransformiert und die Expression nach etablierten Bedingungen durchgeführt. Es konnten alle drei Proteine durch Coexpression des beschriebenen Systems erfolgreich erhalten werden. Durch das Etablieren eines geeigneten Expressionssystem, *E. coli* C41, in Verbindung mit den optimierten Expressionsbedingungen konnten alle ROs mit ihrer entsprechenden Reduktase in aktiver Form produziert werden. Zusätzlich gelang es ein System aus JerO/P/L für eine Kaskadenreaktion zugänglich zu machen. Anschließend an die erfolgreichen Expressionsstudien sollte die Aktivität der produzierten RIESKE-Oxygenasen während *in vivo*-Enzymreaktionstest untersucht und optimiert werden und ein System zur Charakterisierung der ROs etabliert werden.

## 6.6 *In vivo*-Enzymreaktionstests

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollten, um verschiedene Ziele zu verfolgen, *in vivo*-Enzymreaktionstests mit den RIESKE-Oxygenasen JerP, JerL und AmbP durchgeführt werden. Das übergeordnete Ziel war die Etablierung der RO-Aktivität. Erst nach Erreichen ausreichend hoher Umsätze ( $\geq 30\%$ ) während der Experimente können Vergleiche zwischen Experimenten mit unterschiedlichen Substraten gezogen und damit komplexere, die Biosynthese betreffende Fragestellungen beantwortet werden.



**Abbildung 6–20.** Ziele der *in vivo*-Enzymreaktionstests. (A) Entwickeln und optimieren eines *in vivo*-Enzymreaktionssystems der Umsetzung von Jerangolid E 35 mit JerP/JerO hinzu Umsätzen  $\geq 30\%$ , (B) Simultane Charakterisierung der ROs JerP und JerL sowie deren regenerierenden Reduktase JerO, (C) Aufklärung der Jerangolid-Biosynthese mit besonderem Fokus auf Wirkzeitpunkt und -reihenfolge der ROs, (D) Enzymkaskadenreaktionen, zur Ergänzung der Ergebnisse aus B und C sowie Beleuchtung eines möglichen Einsatzes der ROs in chemoenzymatischen Naturstoff-Totalsynthesen.

Einerseits sollten so weitere Mitglieder der bisher kleinen Gruppe der charakterisierten ROs des Sekundärmetabolismus (Kapitel 3.4) hinzugefügt werden. Andererseits sollte anhand der gewonnenen Erkenntnisse der Enzymreaktionstests die Biosynthese der Jerangolide, hinsichtlich Zeitpunkt und Reihenfolge der Enzymreaktionen der ROs, detailliert aufgeklärt werden. Zu diesem Zweck sollten ergänzend auch Enzymkaskadenreaktionen durchgeführt werden. Gleichzeitig sollte anhand derer ein möglicher Einsatz der ROs in chemoenzymatischen Naturstoff-Totalsynthesen beleuchtet werden.

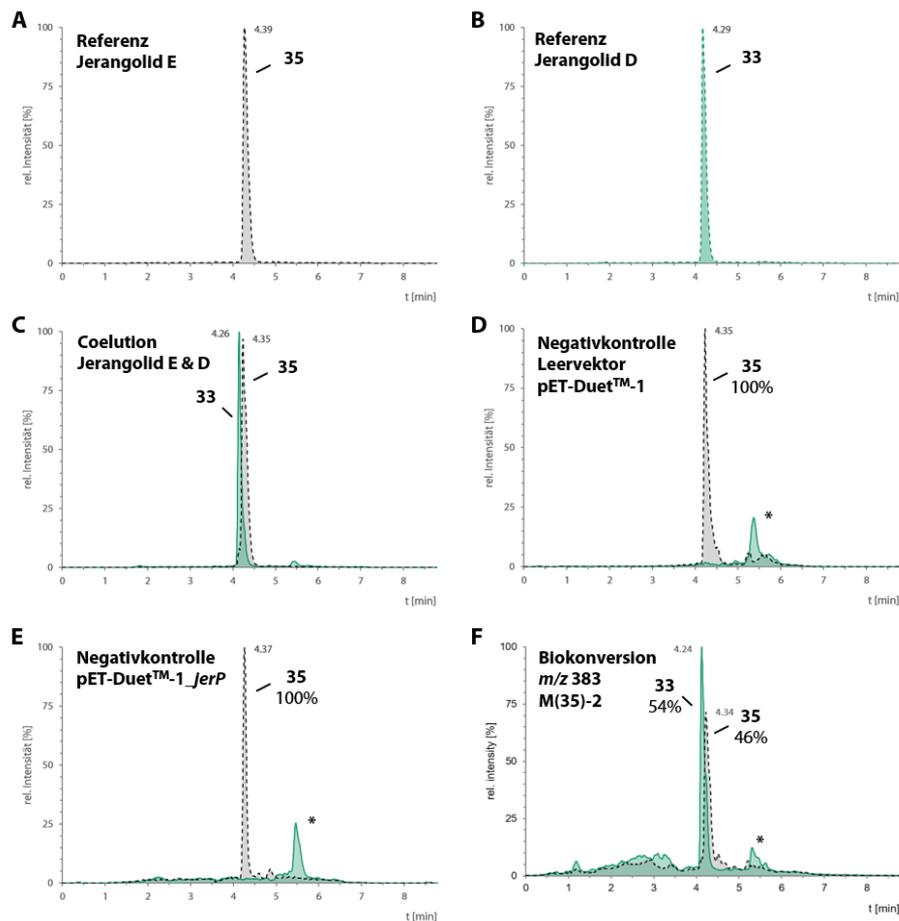
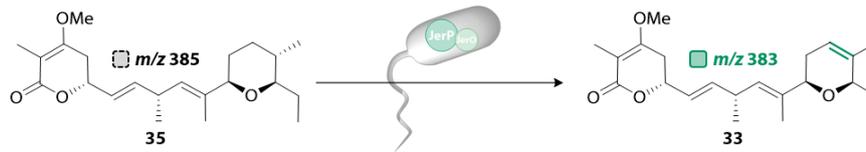
---

### 6.6.1 Systementwicklung und Optimierungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein System entwickelt, das eine möglichst schonende und effiziente *in vivo*-Enzymreaktion gewährleistet. Zu Beginn des Kapitels werden die Methodik und analytischen Standards erläutert, die während oder nach jedem Enzymreaktionstest zum Einsatz kamen. Dies erfolgt am Beispiel der letztendlich optimierten JerP-Enzymreaktion. Im weiteren Verlauf erfolgt eine detaillierte Betrachtung der Faktoren, die maßgeblich zur Optimierung des Umsatzes der *in vivo*-Enzymreaktionstests beigetragen haben. Darüber hinaus wurde eine umfangreiche Charakterisierung der ROs, wie beispielsweise in Studien zur Lösungsmitteltoleranz, vorgenommen. Das Kapitel schließt mit einer Darstellung der Ergebnisse der optimierten *in vivo*-Enzymreaktionen von JerP und JerL sowie einem Vergleich zu den Ausgangsbedingungen.

#### Methodik und Analytik

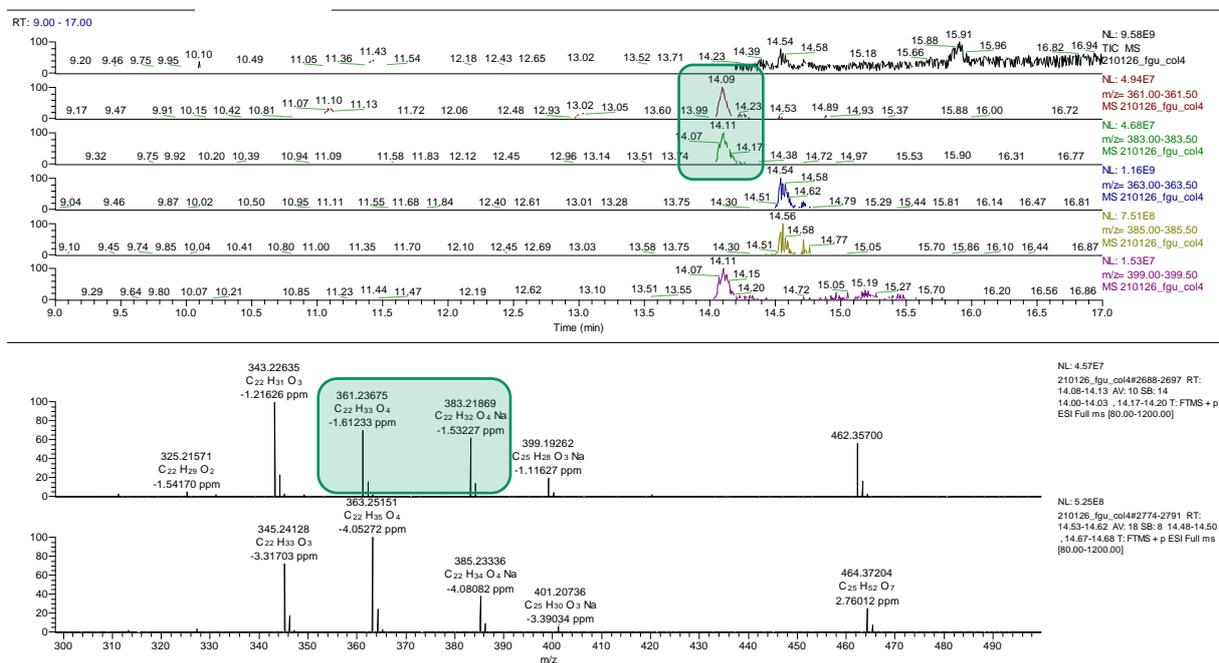
Die Enzymreaktionen wurden mittels UPLC-MS analysiert. Die entsprechenden Umsätze wurden aus dem Verhältnis der Integralflächen in den UPLC-MS-Chromatogrammen der *in vivo*-Enzymreaktionen bestimmt. Für eine Zuordnung des Enzymreaktionsproduktes wurden die Retentionszeiten ( $t_R$ ) mit denen der entsprechenden isolierten Referenzen verglichen und sind in allen Chromatogrammen angegeben. Eine Coelution von Substrat und Referenz sollte Aufschluss darüber geben, ob und wie sich die  $t_R$  dadurch verändern und eine Vergleichsgrundlage für die Enzymreaktionstests liefern. Die zur Verfügung gestellten Referenzen wurden zuvor auf ihre Reinheit und Identität per HRMS und NMR untersucht (Kapitel 9.1 und 9.8).



**Abbildung 6–21.** UPLC-MS-Chromatogramme *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerP unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls als Beispiel für Methodik und Analytik. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit *m/z* 383,  $t_R = 5.57$ ; (A) Jerangolid E (**35**) Referenz, (B) Jerangolid D (**33**) Referenz, (C) Coelution der Jerangolid E und Jerangolid D Referenz, (D) Negativkontrolle: Enzymreaktion mit *E. coli* C41-CmpX13 pET-Duet™-1, (E) Negativkontrolle: Enzymreaktion mit *E. coli* C41-CmpX13 pET-Duet™-1\_ JerP, (F) Enzymreaktion mit *E. coli* C41-CmpX13 pET-Duet™-1\_ JerP.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 385$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 383$ .

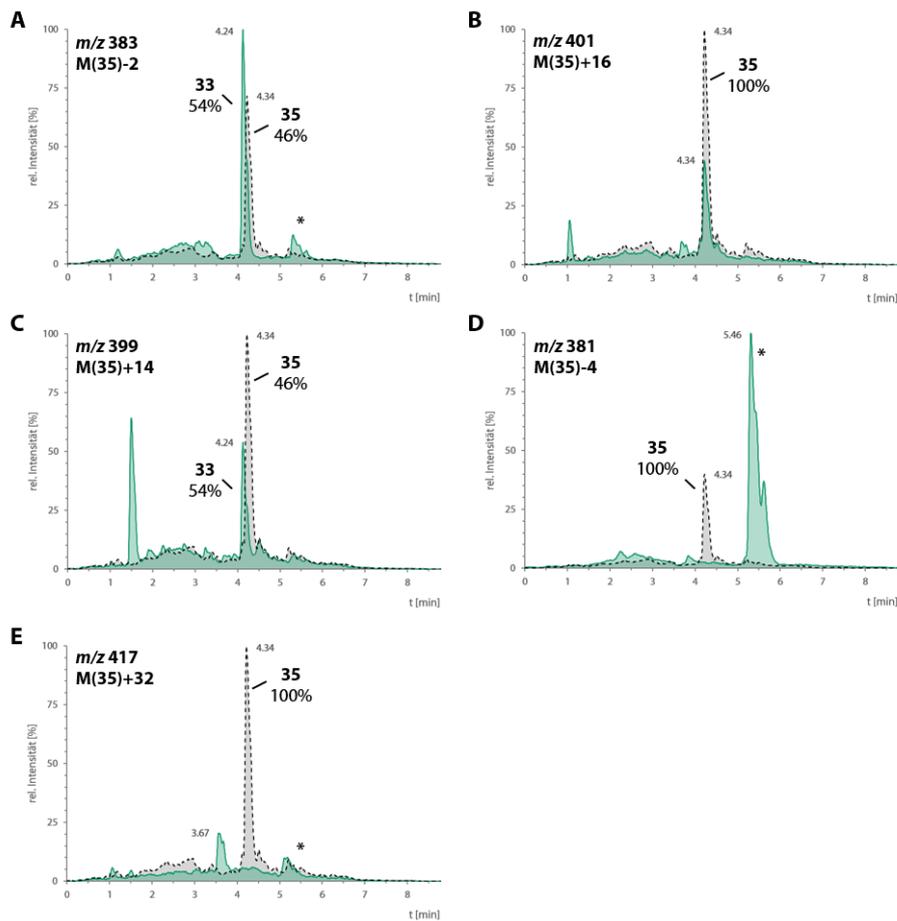
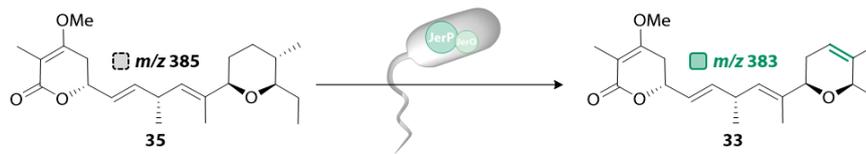
Die alleinige Elution von Substrat und Referenz kann nachfolgend als Vergleich verwendet werden, da die Coelution die  $t_R$  nur minimal bis nicht beeinflusst. Der vermutliche biosynthetische Vorläufer Jerangolid E (**35**) besitzt eine  $t_R$  von  $\sim 4,39$  min, wohingegen das Produkt der Desaturierung durch JerP, Jerangolid D (**33**), eine  $t_R$  von  $\sim 4,29$  min aufweist, was einer Differenz  $\Delta t_R$  von  $\sim 0,10$  min entspricht. Die weiteren Referenzen Jerangolid H (**36**) und Jerangolid A (**15**) zeigen ein ähnliches Verhalten mit  $t_R = 4,10$  min bzw.  $t_R = 4,00$  min (Kapitel 9.6 und 9.7). Die Auswertung der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) durch JerP hat einen Umsatz von 54 % zu Jerangolid D (**33**) mit einer  $t_R = 4,24$  min ergeben. Bei ausgewählten Experimenten mit hinreichendem Umsatz wurde zusätzlich eine Identifizierung des Produkts

durch HRMS vorgenommen (Abbildung 6–22 + Kapitel 9.8). Die durchgeführten Negativkontrollen, eine Enzymreaktion mit *E. coli*-Zellen, die den Leervektor pET-Duet™-1 oder pET-Duet™-1\_jerP trugen, bestätigen zusätzlich das erhaltene Ergebnis. Es wurde, wie erwartet, kein Umsatz beobachtet. Die durchgeführte Negativkontrolle mit pET-Duet™-1\_jerP, dem kein exprimiertes Reduktasegen zugewiesen wurde, zeigt zudem, dass die Aktivität von der regenerierenden Wirkung des JerO abhängt. Auch im Falle von JerL ist diese Abhängigkeit zu beobachten (Abbildung 6–32), was darauf hindeutet, dass JerO, wie erwartet, als regenerierende Reduktase für beide ROs des Genclusters dient.



**Abbildung 6–22.** HRMS-Chromatogramm von Jerangolid D (**33**) aus vereinten Enzymreaktionen von Jerangolid E (**35**) mit JerP/O.  $M_{\text{gefunden}}$  Jerangolid D (**33**)  $m/z$  für C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 361.2368 und C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> = 383.2187 bei  $t_R$  = 14.11 min (grün hervorgehoben) und  $M_{\text{berechnet}}$  Jerangolid D (**33**)  $m/z$  für C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 361.2373 und C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> = 383.2193.

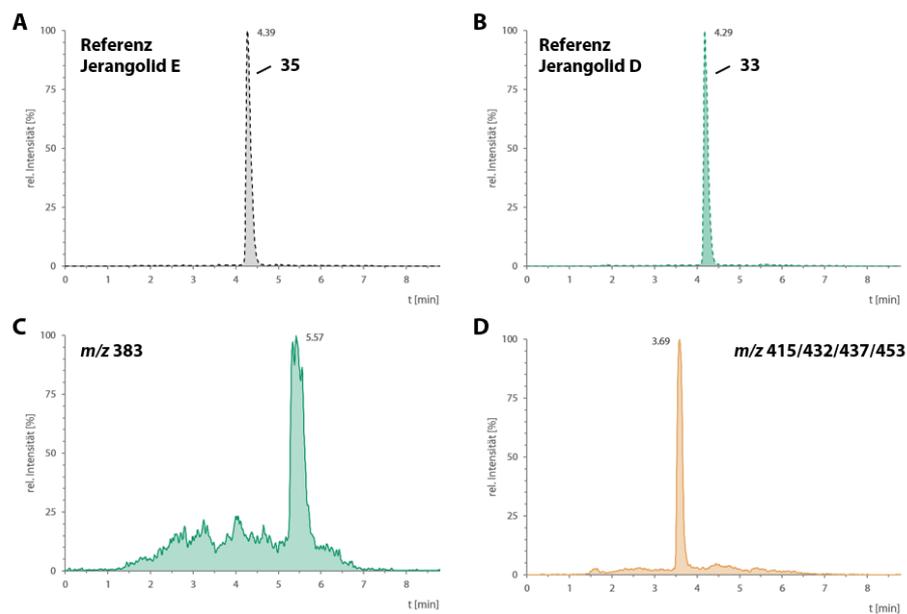
Das Vorliegen vorstellbarer Mehrfachoxidationen oder -desaturierungen durch die ROs wurde durch eine Überprüfung der spezifischen Massespuren mit einem entsprechenden  $m/z$ -Verhältnis verifiziert (Abbildung 6–23).



**Abbildung 6–23.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerP hinsichtlich möglicher Intermediate oder Mehrfachoxidationen. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; **(A)** Massespur des monodesaturierten Produkts  $m/z$  383, **(B)** Massespur des monohydroxylierten Produkts  $m/z$  401, **(C)** Massespur des monohydroxylierten sowie monodesaturierten Produkts  $m/z$  399 entspricht  $[M+K]^+$  Jerangolid D (**33**), **(D)** Massespur des didesaturierten Produkts  $m/z$  381, **(E)** Massespur des dihydroxylierten Produkts  $m/z$  417.

Weder Jerangolid B (**34**,  $m/z$ -Verhältnis von +16 im Vergleich zu **35**) noch Mehrfachdesaturierungen (Abbildung 6–23) sowie -hydroxylierungen durch JerL (Kapitel 9.7) konnten ausgehend von Jerangolid E (**35**) und den verwendeten Derivaten beobachtet werden. Die ROs der Jerangolid-Biosynthese zeigen demnach eine hohe Selektivität und Spezifität für eine Oxidation. In einigen Fällen manifestieren sich nach den Umsetzungen in den UPLC-MS-Chromatogrammen unerwartete Signale zu anderen Retentionszeiten ( $t_R = 3,69$  oder  $5,57$  min) (gekennzeichnet durch \*). Um zu demonstrieren, dass es sich um Verunreinigungen aus den verwendeten Plastikmaterialien mit  $m/z$ -Verhältnis ( $m/z = 383, 415/432$ ) handelt, die identisch zum erwarteten Produkt sind, wurde folgendes Protokoll angewandt: Die Inkubation und

Extraktion wurden in Abwesenheit von Substrat und Zellen durchgeführt und die erhaltenen Proben per UPLC-MS analysiert.



**Abbildung 6–24.** UPLC-MS-Chromatogramme der Extraktion von Plastikartikeln zur Identifikation des Ursprungs der Kontaminanten. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; (A) Jerangolid E (35) Referenz, (B) Jerangolid D (33) Referenz, (C) Kontaminante  $m/z$  383 mit  $t_R = 5.57$ , (D) Kontaminante  $m/z$  415/432/437/453 mit  $t_R = 3.69$ .

Es konnte bestätigt werden, dass durch die Verwendung von Lösungsmittel wie EtOAc und MeOH Verunreinigungen aus den Plastik-Materialien gelöst und in die MS-Analytik überführt wurden. Die Retentionszeiten der  $m/z$ -Verhältnisse stimmen mit denen der beobachteten Kontaminanten nach einigen Enzymreaktionen überein (Abbildung 6–24). Die Signale der Verunreinigungen sind in vorherigen sowie nachfolgenden Chromatogrammen durch einen \* gekennzeichnet.

## Optimierung des *in vivo*-Enzymreaktionssystems

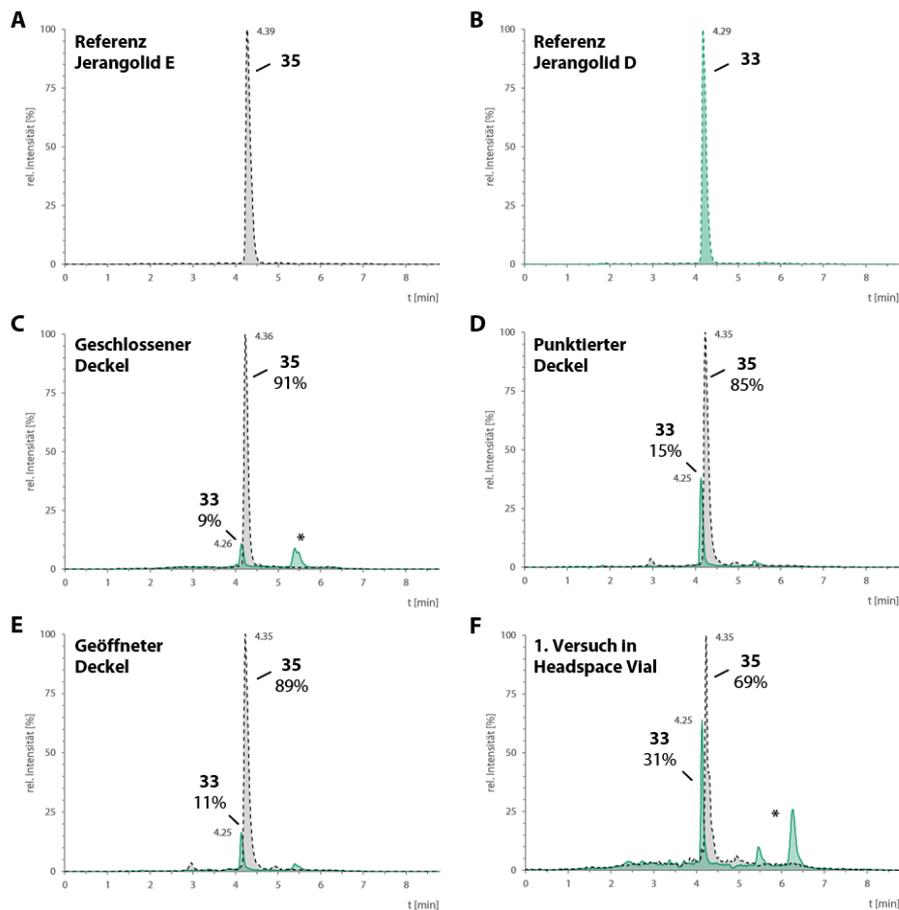
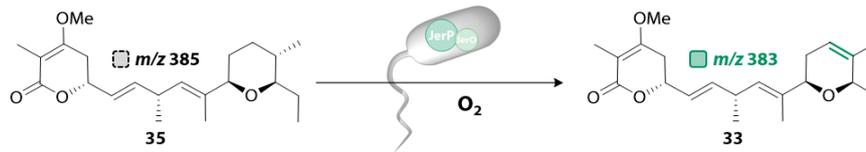
Nachdem die analytische Methodik etabliert, die Ergebnisse verifiziert und mögliche Verunreinigungen identifiziert und diskutiert wurden, soll im Folgenden der Optimierungsprozess genauer präsentiert und der Weg zum vorgestellten besten Umsatz durch JerP von 57% diskutiert werden. Als Ausgangspunkt wurden folgende Bedingungen, die sich an die *in vitro*-Enzymreaktionstests (Kapitel 4.2.3) und an die Literatur<sup>[110]</sup> anlehnen, gewählt:

**Tabelle 6-1.** Ausgangsbedingungen für die Optimierung des *in vivo*-Enzymreaktionssystems.

Ausgangsbedingungen	Optimierte <i>in vivo</i> -Enzymreaktion
<b>Präparation</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ 20 mg Zellpellet/200 <math>\mu</math>L</li><li>▪ Reaktionsmedium: 200 <math>\mu</math>L Tris/HCl-Puffer (pH 8.5)</li><li>▪ Reaktionsgefäß: Eppendorfgefäß mit geschlossenem Deckel</li></ul>	
<b>Reaktionsbedingungen</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ 0.25 mM Substrat</li><li>▪ 0.5 mM FAD</li><li>▪ 2.5 mM NADPH</li><li>▪ Heizblock</li><li>▪ 25 °C, 300 UpM, 16 h</li></ul>	
<b>Aufarbeitung</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ 2 <math>\times</math> CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></li></ul>	

Im Anschluss an die Genexpression erfolgte die Zentrifugation mit darauffolgender Entfernung des Überstandes. In einem nächsten Schritt wurden 20 mg des Zellpellets in ein Eppendorfgefäß eingewogen, in welchem das Substrat bereits vorgelegt war. Im Anschluss wurden die Cofaktoren zugegeben und das Reaktionsgemisch in Tris/HCl-Puffer suspendiert. Das anschließende Schütteln in einem Heizblock bei 25 °C und 300 UpM für 16 h in der Vertikalen diente der Umsetzung. Um die angestrebten Umsätze zu erreichen, ist es erforderlich, die erwähnten Bedingungen parameterweise zu variieren und hin zu höheren Umsätzen zu optimieren. Im Folgenden werden zu Beginn die Schlüsselschritte und maßgebenden Faktoren der Optimierungen detailliert abgehandelt. Eine erste erkennbare Verbesserung konnte bei der Verwendung von NADH als Cofaktor und Elektronenquelle beobachtet werden. Die meisten ROs sind entweder NADPH- oder NADH-abhängig (Kapitel 3.3 und 3.4). Im Rahmen von *in vitro*- und ersten *in vivo*-Enzymreaktionstests wurde eine Cofaktor-Konzentration von 2.5 mM NADPH zugegeben.

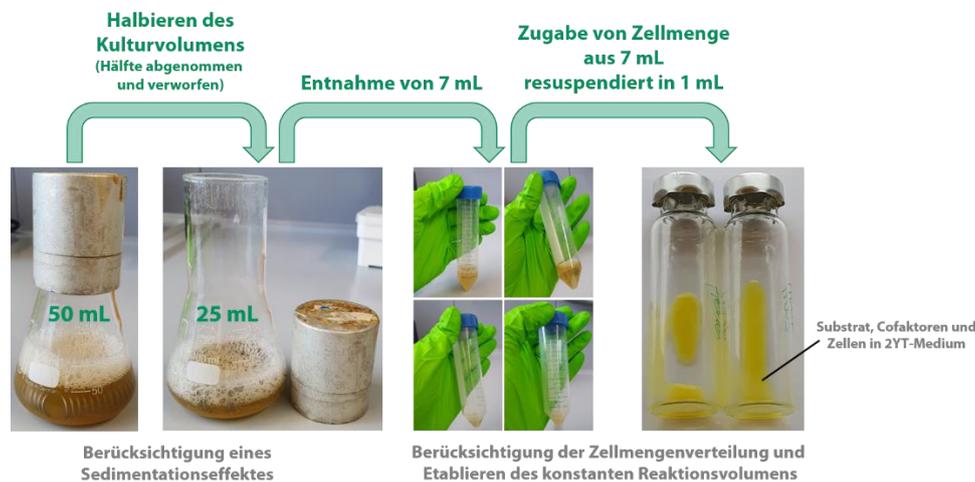




**Abbildung 6–26.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit verschiedenen Varianten der Sauerstoffverfügbarkeit. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit *m/z* 383,  $t_R = 5.57$  min; (A) Jerangolid E (**35**) Referenz, (B) Jerangolid D (**33**) Referenz, (C–F) Enzymreaktion in unterschiedlichen Typen an offenen und geschlossenen Reaktionsgefäßen.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 385$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 383$ .

Im Vergleich zur begrenzten Sauerstoffverfügbarkeit in einem Eppendorfgefäß mit geschlossenem Deckel (9% Umsatz) konnte der Umsatz in den durchgeführten Tests auf bis zu 31% gesteigert werden. Die Ergebnisse der Experimente mit offenem und punktiertem Deckel ließen zunächst den Schluss zu, dass die Sauerstoffverfügbarkeit einen größeren direkten Einfluss auf den Umsatz der *in-vivo*-Enzymreaktionstests ausübt. Dieser Annahme wurde durch die erstmalige Verwendung eines HV schließlich bestätigt (Abbildung 6–26, F). Die vergrößerte Oberfläche zum Gasaustausch und die bessere Möglichkeit der Durchmischung aufgrund der Volumenverhältnisse der Reaktion und des Gefäßes tragen entscheidend zur erhöhten RO-Aktivität bei. In darauffolgenden Aktivitätstests in HV wurden große Umsatzenschwankungen in einem Bereich zwischen 0% und 58% beobachtet (Abbildung 9–75). Um eine Reproduzierbarkeit und weitere Umsatzsteigerung zu erreichen, wurde ein standardisiertes

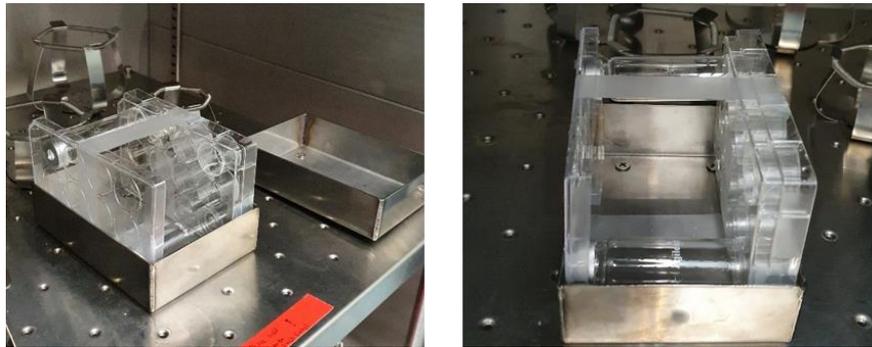
Protokoll der Präparation (Kapitel 9.6) der Enzymreaktionstests in HV entworfen. Neben einer möglichst schonenden Handhabung der Zellkultur wurden standardisierte Zellmengen und Reaktionsvolumina sowie ein reproduzierbarer, sicherer und nachhaltiger Versuchsaufbau angestrebt.



**Abbildung 6–27.** Standardisiertes Protokoll zur Präparation der in *in vivo*-Enzymreaktionstests verwendeten Zellsuspensionen unter Berücksichtigung eines Sedimentationseffektes und einer Studie zur Zellmengenverteilung (Abbildung 9–76) mit möglichst schonender und nachhaltiger Handhabung.

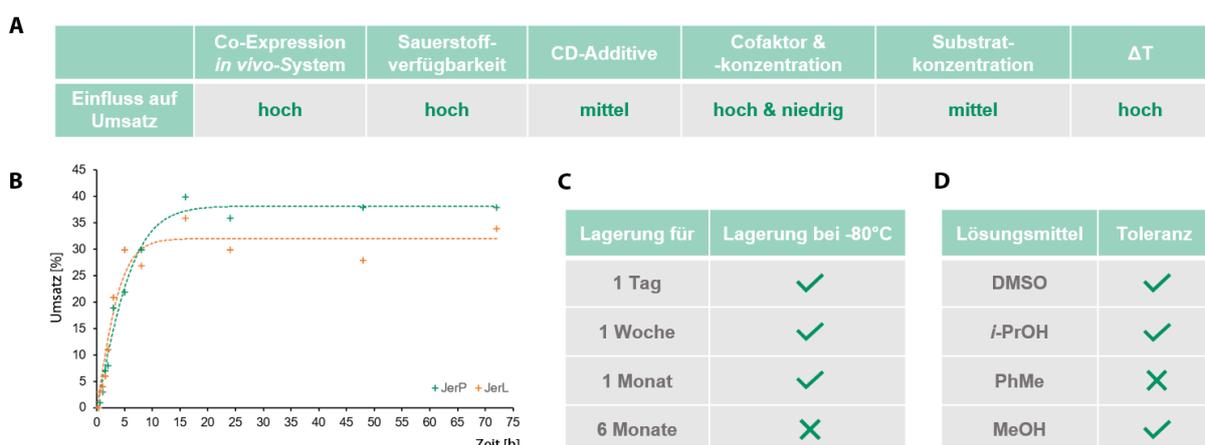
Ausgehend von 50 mL Zellkulturen wurde nach einer Standzeit von ca. 30 min von oben die Hälfte der Zellkultur vorsichtig abgenommen. Nach Resuspendieren der verbleibenden Zellen durch Schwenken wurden je 7 mL entnommen und die Kultur anschließend auf ein Reaktionsvolumen von 1 mL normiert. Die durch das Protokoll erhaltene Zellsuspension in 2YT-Medium wurde direkt in Enzymreaktionstests eingesetzt. Im Vergleich zum zuvor in Reaktionen eingesetzten Puffer konnte durch die direkte Verwendung der Zellkulturen im Expressionsmedium eine schonende Handhabung sowie Ressourcenschonung erreicht werden. Die Entnahme von 7 mL aktiver Zellkultur nach Sedimentation basiert auf einer Studie zur Zellmengenverteilung, in der die optimale Menge an Zellen für die *in vivo*-Enzymreaktionstests ermittelt wurde. Dabei wurden Volumina aus verschiedenen großen Zellkulturen mit und ohne Berücksichtigung des optisch sichtbaren Sedimentationseffektes (Absetzen der Zellen als Pellet im Medium) in Enzymreaktionstests eingesetzt. Im Mittel waren 122 mg aktive Zellen in 7 mL Zellkultur enthalten und zeigten in einer vorhergegangenen Studie nach Normierung auf ein Reaktionsvolumen von 1 mL und Berücksichtigung des Sedimentationseffektes den höchsten reproduzierbaren Umsatz (Abbildung 9–76). Wie intendiert, konnte eine Reproduzierbarkeit von Umsätzen  $\geq 30\%$  mittels eines standardisierten Präparationsprotokolls (Abbildung 6–27) erzielt werden. Darüber hinaus wurden, mit Blick auf

sichere, reproduzierbare Bedingungen sowie Nachhaltigkeit, zwei Edelstahlwannen während der Inkubation der Enzymreaktionstests genutzt.



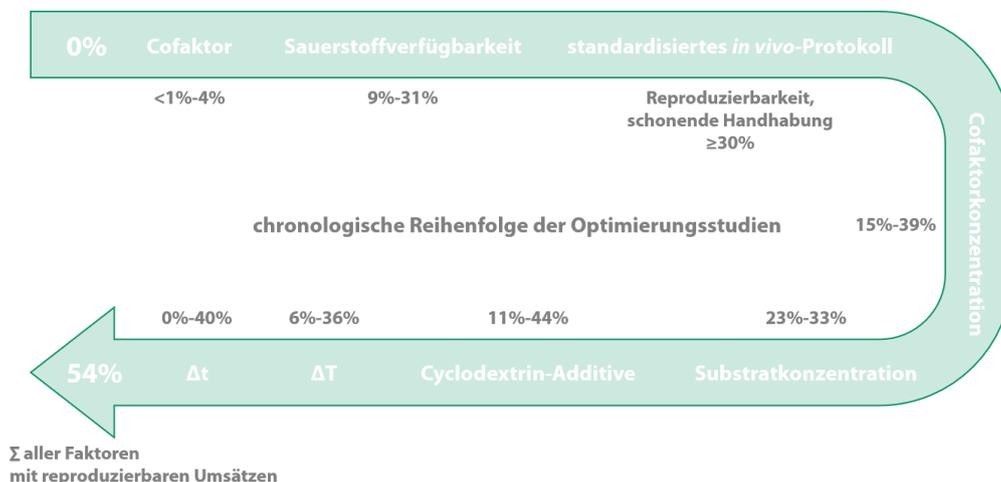
**Abbildung 6–28.** Angefertigte Edelstahlwannen zur standardisierten Durchführbarkeit des *in vivo*-Enzymreaktionstest-Aufbaus im Inkubator unter Lichtausschluss (erzielt durch Abkleben der Scheibe mit Alufolie).

Durch die standardisierte Fixierung der Proben in den Edelstahlschalen (Abbildung 6–28) wurden Verbrauchsmaterialien eingespart und jeder Aktivitätstest auf die gleiche Weise inkubiert. Die konstante Orientierung während des Schüttelns bei 180 UpM gewährleistete vergleichbare Gasaustausch- und Mischbedingungen für alle Enzymreaktionen. Durch zusätzlichen Lichtausschluss während der Inkubation sollten die empfindlichen ROs vor äußeren Einflüssen geschützt und ihre konstante Aktivität gewährleistet werden. Nach der ausführlichen Behandlung der Schlüsselschritte zur Etablierung der *in vivo*-Enzymreaktion und der maßgeblichen Faktoren mit dem größten Einfluss auf den Umsatz soll im Folgenden kurz auf die weiteren untersuchten Faktoren und deren Wirkung eingegangen werden (Abbildung 6–29, A). Die entsprechenden Chromatogramme und Ergebnisgrafiken finden sich in Kapitel 9.7.



**Abbildung 6–29.** Übersicht über Optimierungs- und Charakterisierungsfaktoren der *in vivo*-Enzymreaktionen der Systeme JerP/O und JerL/O nach Genexpression in *E. coli*C41-CmpX13. **(A)** Einfluss der untersuchten Faktoren während der Optimierung auf den Umsatz, **(B)** Zeitverlauf der *in vivo*-Enzymreaktionen von **35** mit JerP/O bzw. JerL/O (Hinweis: gestrichelte Linien stellen in diesem Fall keine Ausgleichsgeraden dar, sondern sollen nur dazu dienen den Verlauf der Einzelpunkte optisch besser nachvollziehen zu können), **(C)** Lagerbarkeit der Zellkulturen vor Verwendung in Aktivitätstests bei -80 °C, **(D)** Lösungsmitteltoleranz der ROs bei Zugabe von 5 v% des entsprechenden Lösungsmittel.

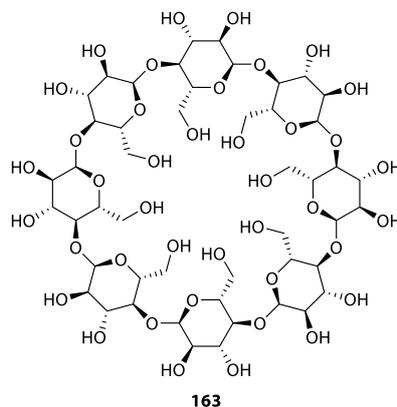
Nachdem die kritischsten Faktoren, wie die bevorzugte Elektronenquelle und die Präparation im HV sowie die Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit, für einen reproduzierbar hohen Umsatz identifiziert wurden, sollte auch der Einfluss der Cofaktorkonzentration von NADH und FAD auf den Umsatz untersucht werden. Dazu wurde eine Versuchsreihe des Enzymreaktionstests mit variierenden Konzentrationen (0 - 4 mM) von NADH und FAD im Verhältnis 1:1 bei ansonsten konstanten Bedingungen durchgeführt. Das Cofaktorverhältnis wurde zuvor in einer Versuchsreihe ermittelt (Abbildung 9–91). Als optimale Cofaktorkonzentration wurde 1 mM ermittelt, da hier der höchste und reproduzierbarste Umsatz von 20% auftrat. Ohne Zugabe von Cofaktoren wurde zwar einmalig ein höherer Umsatz (39%) beobachtet, dieser konnte jedoch nicht konstant reproduziert werden (Abbildung 6–30 und Abbildung 9–92). Die Beobachtungen zeigten, dass die in der Zelle vorhandenen Cofaktoren für einen gewissen Umsatz ausreichend verfügbar sein können, was durch die Zugabe von 1 mM NADH und FAD unterstützt bzw. gewährleistet werden kann. Bei einem Überschuss an Cofaktoren treten negative Effekte auf die Enzymaktivität auf. Es wird vermutet, dass durch äußeren Konzentrationsdruck, der zu einer Umstellung des Stoffwechsels und Anpassung des Energiestoffwechsels führen kann, ein hoher Stress im Zellsystem entsteht. Im Allgemeinen hat die Cofaktorkonzentration wenig oder keinen Einfluss auf den Umsatz von *in vivo*-Enzymreaktionstests.



**Abbildung 6–30.** Übersicht über den chronologischen Verlauf der Optimierungstudien der *in vivo*-Enzymreaktionstests. Zeitlichen Abfolge der untersuchten Faktoren (Einfluss auf Umsatz in Abbildung 6–29) von Startpunkt 0% hin zum Optimum von 54% Umsatz der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (35) mit JerP unter Angabe des minimalen sowie maximalen Umsatzes [%] der einzelnen Faktor-Optimierungsstudien.

Um die maximal umsetzbare Substratmenge mit maximalem Umsatz zu bestimmen, wurde ein Bereich von 0.025 – 0.4 mM Substratkonzentration in einzelnen *in vivo*-Enzymreaktionstests umgesetzt. Die maximale Substratkonzentration, die mit einem reproduzierbaren maximalen Umsatz von 32% umgesetzt werden konnte, liegt bei 0.05 mM. Mit zunehmender

Substratmenge sinkt der Umsatz um etwa ein Drittel auf 23% (Abbildung 6–30). Große Mengen der unpolaren Jerangolid-Substrate können die Aufnahme in die *E. coli* Zellen vermindern oder blockieren. Außerdem ist eine optisch nicht sichtbare Ausfällung im Medium denkbar. Geringere Substratmengen sind im konstanten Volumen besser löslich und können daher leichter und in größeren Mengen in die Zelle transferiert werden bzw. stehen den ROs zur Verfügung. Ein weiterer Versuch des *Upscaling* der *in vivo*-Enzymreaktion von 2 mg Jerangolid E (**35**) mit 200 mL aktiver Zellkultur blieb erfolglos. Wegen Unwirtschaftlichkeit, schwieriger Präparation und Aufreinigung sowie wenig aussagekräftiger Analytik wurden keine weiteren Versuche in diese Richtung unternommen (Abbildung 9–51 und Abbildung 9–103). Die Substratkonzentration zeigt bei geringen Substratmengen kaum einen Einfluss, während bei größeren Mengen ein starker Einfluss auf den Umsatz auftritt. Die unpolaren Jerangolide sind im wässrigen Reaktionsmedium der ROs schwer löslich und wenig verfügbar. Durch Zugabe von Cyclodextrinen (CD) soll die Löslichkeit und Verfügbarkeit verbessert und damit der Umsatz erhöht werden. CDs gehören zur Klasse der cyclischen Oligosaccharide, die aus D-Glucosemonomeren aufgebaut sind.



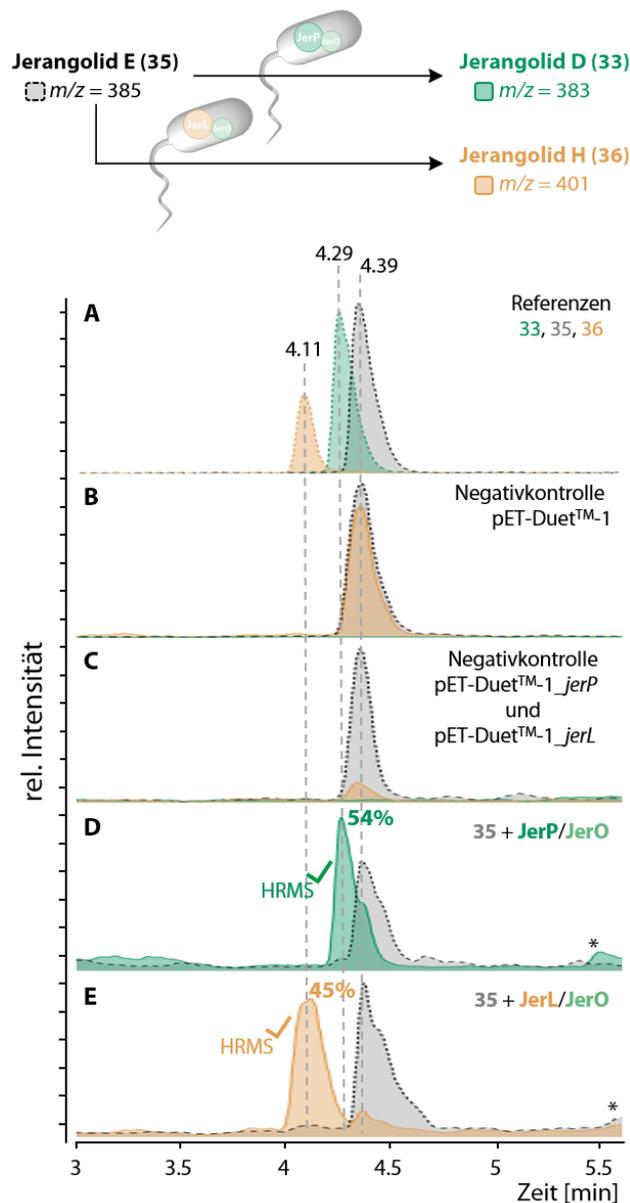
**Abbildung 6–31.**  $\beta$ -Cyclodextrin (**163**) als Vertreter der Cyclodextrinadditive.

Sie besitzen einen hydrophoben Hohlraum im Inneren und eine polare Außenfläche, wodurch sie leicht Einschlussverbindungen mit apolaren organischen Verbindungen eingehen können. In speziellen Fällen, wie Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin, weisen die Glucoseeinheiten verschiedene Substituenten auf. Verbunden damit sind deren Eigenschaften als Mizellenbildner und die Porengröße der Mizellen.<sup>[138–140]</sup> In einer Versuchsreihe wurde die Zugabe der drei bekanntesten Cyclodextrine,  $\alpha$ -,  $\beta$ - sowie  $\delta$ -CD, untersucht. Die drei CDs weisen unterschiedliche Ringgrößen ( $n = 6, 7$  oder  $8 \times$  Glucose) auf, was zu unterschiedlichen Selektivitäten bei der Substratbindung führt. Von den verwendeten CDs kristallisierte sich  $\beta$ -CD (**163**, Abbildung 6–31) als das effizienteste Additiv zur Umsatzsteigerung heraus. Mit 44% Umsatz nach Zugabe liegt

---

es im Vergleich (Ausgangspunkt: 33%) weit vor  $\alpha$ - und  $\delta$ -CD, bei denen der Umsatz auf 17 bzw. 11% sank (Abbildung 6–30 und Abbildung 9–94). Mit dieser moderaten Umsatzsteigerung kann die Wirkung dieses Parameters als mittel eingestuft werden. Nach Etablierung konstant hoher Umsätze sollte anschließend versucht werden, die RIESKE-Oxygenasen der Jerangolid-Biosynthese durch *in vivo*-Enzymreaktionstests genauer zu charakterisieren. Dazu wurden weitere Versuchsreihen zur Temperaturabhängigkeit, zur Stabilität bei Lagerung der Zellkulturen, zur Lösemitteltoleranz sowie eine Zeitverlaufsbestimmung durchgeführt. Bei der Bestimmung des Zeitverlaufs wurden einzelne Enzymreaktionsversuche zum entsprechenden Zeitpunkt durch Zugabe von EtOAc beendet. Der Verlauf ist in Abbildung 6–29, B grafisch aufbereitet. Es ist zu erkennen, dass nach ~16 h ein Umsatzmaximum erreicht wird, das in den folgenden Zeiträumen von ein, zwei und drei Tagen als Plateau konstant verläuft. Innerhalb der ersten 16 h steigt der Umsatz relativ gleichmäßig an, wobei der erste Umsatz nach einer Stunde beobachtet wurde. Zwischen fünf und 16 Stunden tritt die maximale Umsatzsteigerung auf. Die ROs JerP und JerL sind sehr temperaturempfindlich und weisen nur Aktivität in einem kleinen Temperaturbereich zwischen 30 und 37 °C auf (Abbildung 6–30). Somit besitzt der Faktor der Reaktionstemperatur auch einen großen Einfluss auf den Umsatz. Zusätzlich wurde die Stabilität der ROs durch Tests zur Lagerbarkeit und Lösemitteltoleranz untersucht (Abbildung 6–29, C + D). Eine Lagerung der Zellkultur nach Expression bei -80°C ist bis zu einem Monat ohne signifikanten Aktivitätsverlust möglich. Es wurde auch festgestellt, dass Cosolventien verwendet werden können, wenn dies für eine bessere Substratlösung erforderlich ist. Das *in vivo* Enzymreaktionssystem zeigte Toleranz gegenüber 5 v% DMSO, Methanol und Isopropanol. Bei Verwendung von Toluol wurde keine Aktivität beobachtet. Zusammenfassend führten die Versuchsreihen zur Optimierung und Charakterisierung zu den in Abbildung 6–32 beschriebenen Bedingungen. Die Ausgangsbedingungen sind zum direkten Vergleich gegenübergestellt. Zusätzlich sind die besten Ergebnisse unter Verwendung der optimierten Methodik für die beiden RIESKE-Oxygenasen JerP und JerL dargestellt (Abbildung 6–32). Die Optimierungen, die am Beispiel der Prozessierung von Jerangolid E (**35**) durch JerP durchgeführt wurden, konnten problemlos auf JerL übertragen werden.

Ausgangsbedingungen	Optimierte <i>in vivo</i> -Enzymreaktion
<b>Präparation</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>20 mg Zellpellet/200 <math>\mu</math>L</li> <li>Reaktionsmedium: 200 <math>\mu</math>L Tris/HCl-Puffer (pH 8.5)</li> <li>Reaktionsgefäß: Eppendorfgefäß mit geschlossenem Deckel</li> </ul>	<b>Präparation</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>1 mL Zellsuspension nach Standardpräparationsprotokoll (Abb. 2-27)</li> <li>Reaktionsmedium: 1 mL 2YT-Medium</li> <li>Reaktionsgefäß: <i>Headspace Vial</i></li> </ul>
<b>Reaktionsbedingungen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>0.25 mM Substrat</li> <li>0.5 mM FAD</li> <li>2.5 mM NADPH</li> <li>Heizblock</li> <li>25 °C, 300 UpM, 16 h</li> </ul>	<b>Reaktionsbedingungen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>0.05 mM Substrat</li> <li>1 mM FAD</li> <li>1 mM NADH</li> <li>0.05 mM <math>\beta</math>-CD</li> <li><i>Headspace Vial</i> (horizontal geschüttelt)</li> <li>Inkubator (unter Lichtausschluss)</li> <li>30 °C, 180 UpM, 16 h</li> </ul>
<b>Aufarbeitung</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>2 <math>\times</math> CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Extraktion</li> </ul>	<b>Aufarbeitung</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>4 <math>\times</math> EtOAc-Extraktion</li> </ul>



**Abbildung 6–32.** *In vivo*-Enzymreaktionstest unter optimierten Bedingungen. Ausschnitt der UPLC-MS-Chromatogramme zwischen 3 und 5.5 min der (A) Referenzen von Jerangolid D (33), Jerangolid E (35) und Jerangolid H (36), (B) Negativkontrolle: Enzymreaktion mit *E. coli* C41 pET-Duet™-1, (C) Negativkontrolle: Enzymreaktion mit *E. coli* C41-CmpX13 pET-Duet™-1\_jerP/L, (D) UPLC-MS-Chromatogramm der optimierten *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (35) mit JerP.  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün, (E) UPLC-MS-Chromatogramm der optimierten *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (35) mit JerL. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in orange. \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$  min;  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 385$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 383$ .  $t_R$ (jerangolid H) = 4.11 min,  $C_{22}H_{34}O_5Na$   $[M+Na]^+ = 401$ .

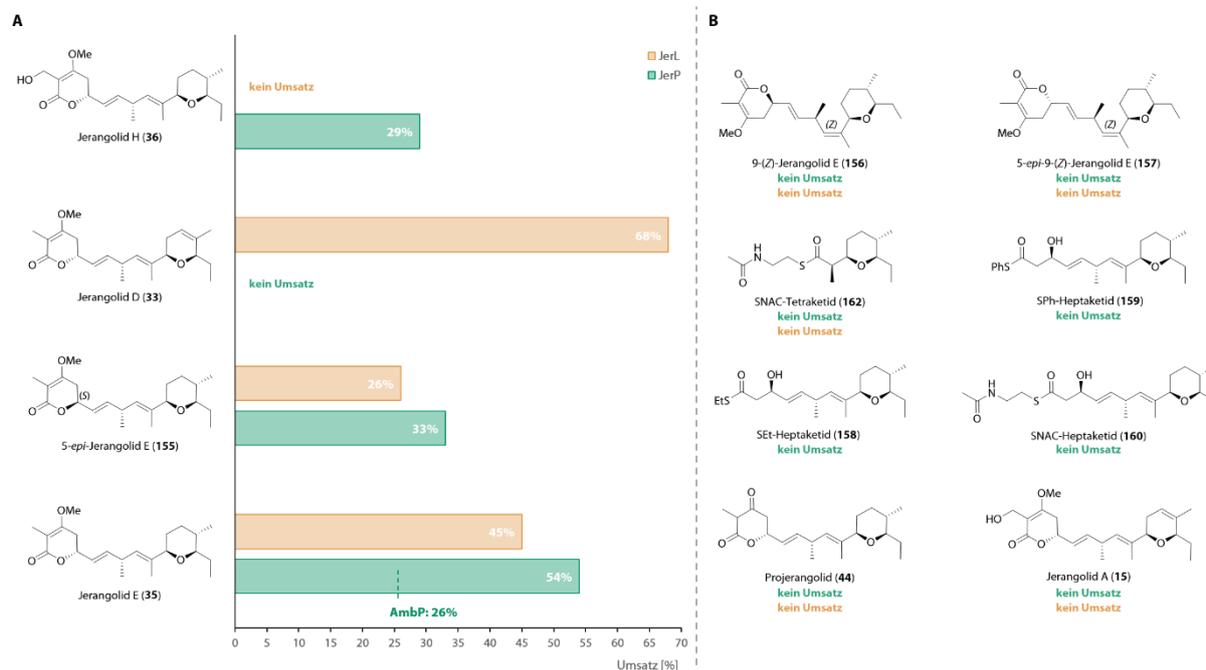
---

In beiden Fällen wurde die *in vivo*-Enzymreaktion erfolgreich etabliert und der Umsatz ausgehend von 0% deutlich über das angestrebte Ziel von  $\geq 30\%$  gesteigert. Die Oxidation durch JerP wies einen maximalen Umsatz von 54% zu Jerangolid D (**33**) auf. Unter den identischen übertragenen Bedingungen konnte Jerangolid E (**35**) zu 45% durch JerL in Jerangolid H (**36**) überführt werden. Die erfolgreiche Etablierung der *in vivo*-Enzymreaktion der Jerangolide durch die RIESKE-Oxygenasen JerP und JerL ermöglichte die detaillierte Untersuchung der weiteren Ziele (Abbildung 6–20).

### 6.6.2 Substrattoleranz und Aufklärung der Jerangolid-Biosynthese

Der Umsatz verschiedener Substrate (Abbildung 6–4) durch die RIESKE-Oxygenasen JerP und JerL wurde mittels der optimierten *in vivo*-Enzymreaktionstests untersucht. Die Ergebnisse sollten Aufschluss über die Substrattoleranz der ROs geben und zudem die Aufklärung des Zeitpunkts und der Reihenfolge der Enzymreaktionen während der Biosynthese ermöglichen. Im Rahmen der Studie wurden verschiedene Derivate von Jerangolid E (**155–157**) eingesetzt, um die Substrattoleranz und den Einfluss charakteristischer Strukturmerkmale auf den Umsatz zu untersuchen. Die Studie zur Aufklärung der Biosynthese sollte Zeitpunkte während der Polyketidbiosynthese, direkt nach Abspaltung durch die TE sowie verschiedene Zeitpunkte eines möglichen *tailoring*-Prozesses umfassen. Die gewählten Tetra- und Heptaketidsubstrate **158–160** sowie **162** repräsentieren Zeitpunkte in den PKS-Modulen 3 und 6. Das post-PKS-Produkt Projerangolid (**44**) deckt den Zeitpunkt nach Abspaltung durch die TE ab, währenddessen Jerangolid E, D, H und A (**35, 33, 36, 15**) verschiedene Stadien des *tailorings* suggerieren. Bei vier der zwölf Substrate, die während der *in vivo*-Enzymreaktionstests zur Bestimmung der Substrattoleranz und Aufklärung der Biosynthese verwendet wurden, konnte ein Umsatz verzeichnet werden. Das jeweils beste Ergebnis ist zum Vergleich in einem Balkendiagramm in Abbildung 6–33, A dargestellt. Der vermutete biosynthetische Vorläufer Jerangolid E (**35**) sowie dessen Epimer **155** konnten sowohl von JerP (54%/33%) als auch JerL (45%/26%) umgesetzt werden. Die Zwischenprodukte des *tailoring*-Prozesses Jerangolid H (**36**) und Jerangolid D (**33**) konnten jeweils nur von der zu erwartenden RIESKE-Oxygenase JerP bzw. JerL in das Biosyntheseprodukt Jerangolid A (**15**) prozessiert werden. Dies zeigt erneut die erwartete hohe Regioselektivität der ROs. Die Desaturierung von **36** zeigte einen Umsatz von 29%, wohingegen die Hydroxylierung von **33** mit 68% den besten Umsatz der Versuchsreihe

aufwies. Bei den unter Abbildung 6–33, B dargestellten Substraten (**15**, **44**, **156–160**, **162**) konnte kein Umsatz detektiert werden.



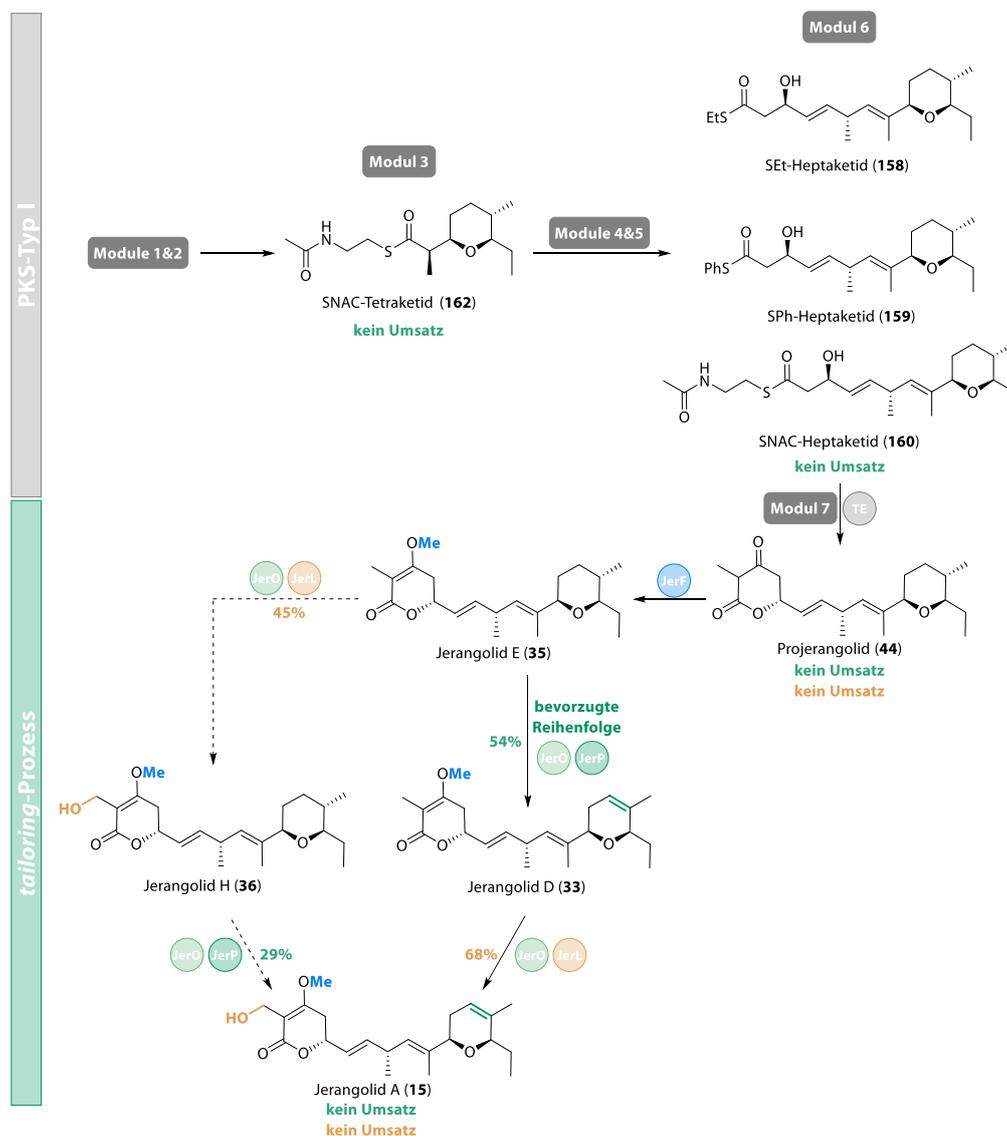
**Abbildung 6–33.** Ergebnisse der *in vivo*-Enzymreaktionstests im Rahmen der Substrattoleranz. **(A)** Darstellung der positiven Enzymreaktionstest der Substrate **33**, **35**, **36** und **155** sowie deren Umsätze durch *JerP/AmbP* und *JerL* in einem Balkendiagramm, **(B)** getestete Substrate ohne Umsatz (**15**, **44**, **156–160**, **162**) durch beide ROs. Entsprechende UPLC-MS-Chromatogramme finden sich in Kapitel 9.7.

In Anbetracht der Substrattoleranz lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten: Die ROs *JerP* und *JerL* besitzen, wie bereits untersuchte Enzyme der Klasse, eine hohe Substratspezifität. Aufgrund der maximalen Umsatzwerte für *JerP* an Jerangolid E (**35**) und für *JerL* an Jerangolid D (**33**) wurden diese als die präferierten natürlichen Substrate der jeweiligen RO identifiziert. Veränderungen in der Struktur sowie der Konformation der Substrate haben einen signifikanten Einfluss auf den Umsatz. Während bei 5-*epi*-Jerangolid E (**155**) noch 33%/26% Umsatz erreicht werden konnten, zeigten andere Strukturänderungen einen großen Einfluss auf den Umsatz. Eine Konformationsänderung der Doppelbindung an Position C9 zum (*Z*)-Alken wie in **156** und **157** führte dazu, dass die Substrate nicht mehr umgesetzt wurden. In Verbindung mit den *in silico*-Studien und insbesondere den Substratmodellierungen (Kapitel 6.2) lässt sich der Umsatzverlust anhand der gravierenden Veränderungen der Abstände sowie der Position der Reaktionsstellen des Substrats erklären. Im Vergleich zur Standardkonformation könnten die Bindung, Aktivierung und somit der Umsatz durch die ROs erheblich beeinträchtigt sein. Insbesondere der Methylenether des Westfragments ist von entscheidender Bedeutung für die hohen Umsätze während der Katalysen. Sobald dieser, wie im Falle von Projerangolid (**44**), nicht mehr als Strukturmotiv vorliegt, wurde kein Umsatz beobachtet. Aufgrund der

---

durchgeführten Substratmodellierungen lässt sich keine eindeutige Aussage darüber treffen, ob die strukturellen Unterschiede ausreichend sind, um eine Substratbindung oder Prozessierung zu verhindern. Die Abstände und Molekülausdehnung sind nahezu identisch mit der von **35**. Allerdings ist anzunehmen, dass die Änderung der funktionellen Gruppe von Methylenolether zu Keton zu größeren negativen Effekten auf die erwähnten Prozesse führt. Des Weiteren könnten spezifische Wechselwirkungen innerhalb des katalytischen Zentrums beeinträchtigt werden. Auch bei Substitution des Westfragments durch einen linearen Thioester, wie in **158–160** und **162**, ist kein Umsatz zu beobachten. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass das Lacton mit Methylenolether im Westfragment ein essenzielles Strukturmotiv für die Substratspezifität und -aktivierung darstellt. Im Rahmen der Enzymreaktionstests wurde Jerangolid E (**35**) auch mittels AmbP zu 26% oxidiert (Abbildung 6–33, gestrichelte Linie). Die verwandte RO des Ambruticin-Genclusters scheint toleranter auf Änderungen im Westfragment zu sein und zeigt auch Aktivität an kleineren Substraten mit unterschiedlichen Strukturmotiven im Vergleich zu dessen postuliertem Substrat 20,21-Dihydro-Ambruticin J. Werden die obigen Ergebnisse nun zur Aufklärung der Biosynthese betrachtet, können zusätzlich folgende Annahmen getroffen werden (Abbildung 6–34): Sowohl das Tetraketid **162** als auch die Heptaketide **158–160**, die als Surrogate ACP-gebundener Verbindungen nach Prozessierungen durch Modul 3 bzw. 6 dienen, wurden von JerP nicht desaturiert. Ein Test mit JerL wurde nicht durchgeführt, da dessen Reaktionsstelle im vorliegenden linearen Westfragment nicht als Motiv enthalten ist. In Kombination mit der nicht vorhandenen Aktivität der ROs am *post*-PKS-Produkt Projerangolid (**44**) wurde postuliert, dass sowohl JerP als auch JerL Enzyme des *tailoring*-Prozesses sind. Die vorgelagerte *O*-Methylierung durch JerF ist essentiell für den Erhalt der RO-Aktivität. Nur Substrate die diese Charakteristik aufweisen (alle *post*-PKS-Jerangolide beginnend bei Jerangolid E (**35**)) werden prozessiert. Es ist denkbar, dass durch die Methylierung ein positiver Effekt auf die geringe Substratstabilität der biosynthetischen Vorläufer eintritt. Bedingt dadurch kann auf eine signifikant bessere Verfügbarkeit der Substrate und eine ermöglichte Aktivität der ROs geschlossen werden. Von Jerangolid E (**35**) aus ist es möglich, dass entweder zuerst JerP oder JerL wirkt. Beide theoretische Reihenfolgen konnten anhand der Ergebnisse bestätigt werden. Aufgrund der im Vergleich deutlich höheren Umsätze von 54% und 68% wurde der *tailoring*-Prozess von Jerangolid E (**35**) über Jerangolid D (**33**) zum Biosyntheseprodukt Jerangolid A (**15**) als bevorzugte Reihenfolge festgelegt. Aufgrund der Ergebnisse der *in vivo*-Enzymreaktionstests kann ausgeschlossen werden, dass Jerangolid A (**15**) Gegenstand von Mehrfachoxidationen ist. Somit kann **15** als finales Produkt bestätigt werden.

Das isolierte Intermediat der Desaturierung Jerangolid B (**34**) konnte in keinem der Experimente beobachtet werden. Es ist denkbar, dass das Zwischenprodukt mit leicht eliminierbarer Hydroxygruppe nur im natürlichen Kontext lang genug stabil ist, um isoliert werden zu können. Zudem könnte Jerangolid B (**34**) durch andere, bislang nicht aufgeklärte Zusammenhänge während der Biosynthese gebildet werden.



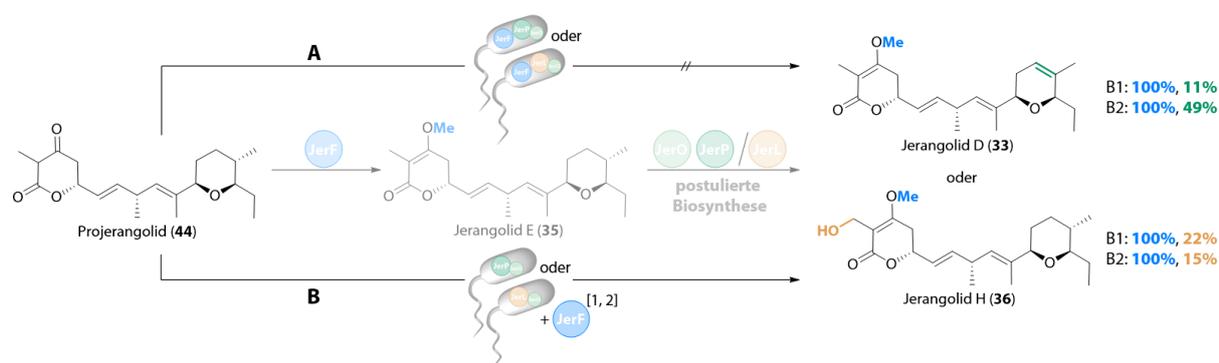
**Abbildung 6–34.** Interpretation der *in vivo*-Enzymreaktionstests für postulierte Biosynthese mit Fokus auf Wirkzeitpunkt und -reihenfolge der RIESKE-Oxygenasen JerP und JerL. Tetra- und Heptaketide (**162** und **158-160**) stellen Surrogate der ACP-gebundenen Verbindungen nach Prozessierung im entsprechenden PKS-Modul dar.

Die Abhängigkeit der Aktivität von JerP und JerL vom Strukturmotiv des Methylenolethers wirft ein deutliches Licht auf den Zeitpunkt und Verlauf der Biosynthese. Zudem zeigt sich dadurch, die ROs zugeschriebene hohe Substratspezifität. Die postulierte Biosynthese und *tailoring*-Option I (Abbildung 3–8) konnten durch die Ergebnisse bestätigt und um die bevorzugte Reihenfolge der ROs ergänzt werden. Die in Abbildung 3–9 dargestellte *tailoring*-Option II, bei der die ROs vor JerF aktiv sein können, wurde somit ebenfalls ausgeschlossen. Nach Etablierung

des *in vivo*-Enzymreaktionstests, Charakterisierung der RIESKE-Oxygenasen und Postulierung eines *tailoring*-Prozesses sollten JerP und JerL Anwendung in Enzymkaskadenreaktionen finden. Ein weiteres Ziel war es, die Ergebnisse der Aufklärung der Biosynthese zu unterstützen und die Möglichkeit eines Einsatzes der ROs in chemoenzymatischen Totalsynthesen von Naturstoffen zu beleuchten.

### 6.6.3 Anwendung in enzymatischen Kaskadenreaktionen

Die Untersuchung zweier unterschiedlicher Systeme der *in vivo*-Kaskadenreaktion sollte dazu beitragen, weitere Klarheit über Zeitpunkt und Reihenfolge der Enzymreaktionen während der Jerangolid-Biosynthese zu gewinnen. Die Kombination der *O*-Methyltransferase JerF mit entweder JerP oder JerL sollte die Beobachtung, dass das nicht akzeptierte Projerangolid (**44**) erst nach Prozessierung zu Jerangolid E (**35**) von den ROs weiter umgesetzt werden kann, unterstützen. Dies würde die bisherige Vermutung, dass JerF essentiell als erstes Enzym des *tailoring*-Prozesses aktiv sein muss, bestätigen.



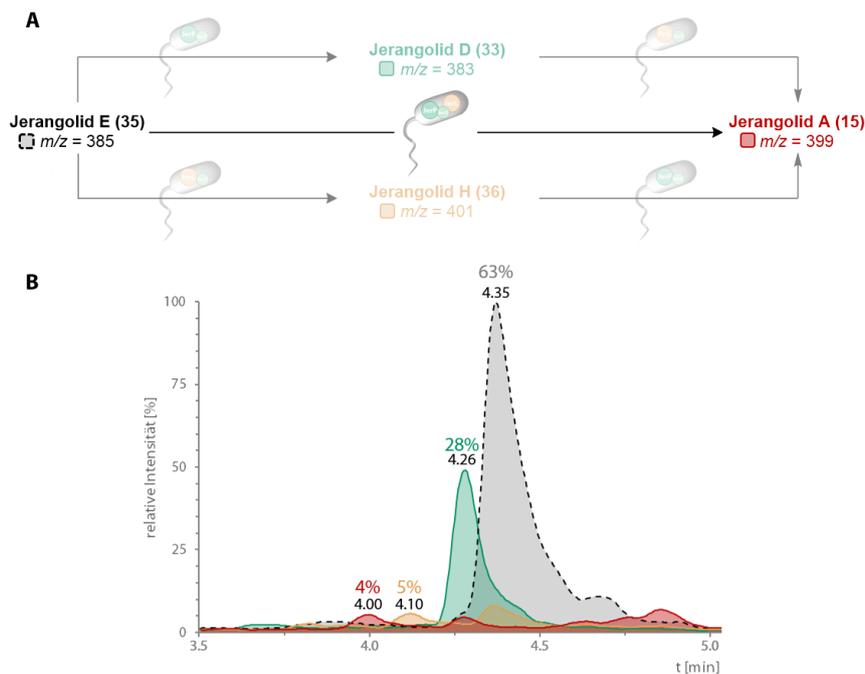
**Abbildung 6–35.** *In vivo*-Enzymkaskadenreaktionen von Projerangolid (**44**) durch das System nach (A) Co-Expression von pET-Duet™-1\_gerP/gerL\_gerO mit pET28a(+)\_gerF und nach (B) Expression von pET-Duet™-1\_gerP/gerL\_gerO und anschließender Zugabe von **B1**: gereinigtem Protein JerF oder **B2**: Lysat der Expression von pET28a(+)\_gerF. Umsätze durch JerF (blau) und JerP (grün) oder JerL (orange). Entsprechende UPLC-MS-Chromatogramme finden sich in Kapitel 9.7.

Nachdem die angestrebte Strategie der Co-Expression von pET-Duet™-1\_gerP/gerL\_gerO mit pET28a(+)\_gerF keine Umsätze von Projerangolid (**44**) zeigte, wurde die Zugabe von JerF angepasst. Der Ansatz des *in vivo*-Enzymreaktionstests wurde nach Expression von pET-Duet™-1\_gerP/gerL\_gerO wie etabliert unter Standardbedingungen vorbereitet. In einem weiteren Ansatz wurde entweder gereinigtes JerF oder Lysat einer Expression von pET28a(+)\_gerF vor Katalysebeginn zugegeben und die Reaktion unter Standardbedingungen durchgeführt. In beiden Fällen konnte eine vollständige Umsetzung von Projerangolid (**44**) zu Jerangolid E (**35**) durch JerF nachgewiesen werden. Durch diese entscheidende Prozessierung konnte, wie vermutet, sowohl die Aktivität von JerP als auch JerL erhalten werden. Es konnten Unterschiede

---

im Gesamtumsatz der Kaskadenreaktion je nach verwendeter JerF-Zugabeform beobachtet werden. Im Falle der Enzymreaktion mit JerP zu Jerangolid D (**33**) wurde der höchste Umsatz von 49% unter der Verwendung von JerF-Lysat erzielt. Die RO JerP scheint durch das verwendete JerF-Zelllysate und darin möglicherweise enthaltene Proteine oder Zellbestandteile stabilisiert sowie in ihrer Aktivität positiv beeinflusst zu werden. Im Gegensatz dazu zeigt JerL im Trend kein derartiges Verhalten. Der allgemein geringere Umsatz durch JerL in der Kaskadenreaktion wies mit 22% bei Verwendung von gereinigtem JerF den höchsten Umsatz der direkten Enzymreaktion zu Jerangolid H (**36**) auf. Es ist denkbar, dass JerL anders als JerP eine bessere Kompatibilität mit gereinigtem Enzym aufweist und keine Unterstützung durch die oben beschriebenen Lysateffekte in einer Kaskadenreaktion benötigt. Als Schlussfolgerung kann erneut getroffen werden, dass die Desaturierung und Hydroxylierung erst nach der *O*-Methylierung durch JerF stattfinden kann. Der nur nach vorheriger *O*-Methylierung auftretende Umsatz beider ROs in der Enzymkaskadenreaktion unterstreicht erneut die Bedeutung des Methylenolethers für eine Aktivität der Enzyme. Die postulierte Biosynthese sowie die Wirkzeitpunkte und -reihenfolge der ROs (Abbildung 6–35) können durch die erhaltenen Ergebnisse untermauert werden. Durch die bemerkenswerten Ergebnisse, dass die ROs nur Substrate des späteren *tailoring*-Prozess nach vorgelagerter *O*-Methylierung akzeptieren und die Aufklärung der Biosynthese wird außerdem erneut die enge Substrattoleranz von ROs deutlich.

Grundsätzlich ist es möglich, beide RIESKE-Oxygenasen in einer Kaskadenreaktion mit JerF zu verwenden, ausgehend von Projerangolid (**44**). Aufgrund der leichteren Zugänglichkeit nach etabliertem Protokoll (Kapitel 6.1) sowie der erhöhten Stabilität wäre eine chemoenzymatische Totalsynthese ausgehend von Jerangolid E (**35**) für eine Anwendung interessanter. In einem zweiten Kaskadensystem wurde **35** durch eine Kombination aus pET-Duet™-1\_gerP\_gerO und pET28a(+)\_gerL unter etablierten Standardbedingungen umgesetzt. Die Kombination mit enzymatisch katalysierten anspruchsvollen Modifikationen auf späteren Stufen ermöglicht schließlich die Zugänglichkeit von Jerangolid A (**15**).



**Abbildung 6–36.** (A) *in vivo*-Enzymkaskadenreaktion von Jerangolid E (**35**) durch das System nach Co-Expression von pET-Duet™-1\_*jerP\_jerO* und pET28a(+)*jerL*. Transparente Bereiche zeigen mögliche Reaktionssequenzen und Zwischenprodukte. Zusätzlich mit (B) Ausschnitt  $t_R = 3.5 - 5.0$  min des UPLC-MS Chromatogramm des *in vivo*-Enzymreaktionstests mit den entsprechenden  $m/z$ -Verhältnissen zur Bestimmung von 63% Jerangolid E (**35**) (grau,  $m/z$  385,  $t_R = 4.35$  min), 28% Jerangolid D (**33**) (grün,  $m/z$  383,  $t_R = 4.26$  min), 5% Jerangolid H (**36**) (orange,  $m/z$  401,  $t_R = 4.10$  min) sowie 4% Jerangolid A (**15**) (rot,  $m/z$  399,  $t_R = 4.00$  min). Vollständiges UPLC-MS-Chromatogramm befindet sich in Kapitel 9.7.

Nach der *in vivo*-Prozessierung von Jerangolid E (**35**) durch das JerP-JerL-System konnte ein Gesamtumsatz (**15+33+36**) von 37% beobachtet werden (Abbildung 6–36, B). Als Hauptprodukt konnte Jerangolid D (**33**) mit einem Anteil von 28% identifiziert werden, was die obige Annahme bestätigt, dass JerP bevorzugt als erste RO wirkt. Des Weiteren konnte ein Anteil von 5% Jerangolid H (**36**) festgestellt werden, welcher durch die Reaktion von JerL mit **35** entstanden ist. Das Endprodukt der Biosynthese, Jerangolid A (**15**), wurde mit einem Anteil von 4% aus Kombination beider *tailoring*-Optionen erhalten. Des Weiteren ist denkbar, dass JerL aufgrund der Co-Expression des Gens aus pET28a(+)*jerL* weniger aktiv produziert wird als in direkter Kombination mit der Reduktase JerO, wie dies unter Verwendung von pET-Duet™-1\_*jerL\_jerO* der Fall ist. Neben den unterstützenden Aussagen zur Reihenfolge der *tailoring*-Reaktion kann das untersuchte JerP-JerL-System durchaus Anwendung in einer chemoenzymatischen Totalsynthese von Jerangolid A (**15**) finden. Die beiden initialen Untersuchungen zu Enzymkaskadereaktionen demonstrieren das grundlegende Potenzial der ROs der Jerangolid-Biosynthese für einen potenziellen Einsatz in chemoenzymatischen Naturstoff-Totalsynthesen. Durch zukünftige Optimierungen hinsichtlich des Umsatzes durch die ROs, der Produkttrennung sowie der Isolation der Endverbindungen kann das entdeckte Potential weiter gesteigert und ausgeschöpft werden.

---

#### 6.6.4 Zusammenfassung

Nach erfolgreicher Produktion aktiver RIESKE-Oxygenasen durch Coexpression mit der regenerierenden Reduktase JerO unter Verwendung des zuvor klonierten Konstruktes pET-Duet™-1\_*jerP\_jerO* bzw. pET-Duet™-1\_*jerL\_jerO* in *E. coli* C41-CmpX13 war es möglich Enzymreaktionstests durchzuführen (Kapitel 6.4 und 6.5). Durch das Etablieren und anschließende Optimieren der *in vivo*-Enzymreaktion mit reproduzierbaren Umsätzen  $\geq 30\%$  am Modellsystem JerP/O und das Übertragen auf JerL und AmbP konnten weitere Vertreter der bisher kleinen Gruppe der RIESKE-Oxygenasen des Sekundärmetabolismus untersucht werden (Kapitel 6.6.1). Des Weiteren wurden die ROs und die Reduktase hinsichtlich verschiedener Reaktionsfaktoren wie Sauerstoffverfügbarkeit, Cofaktorabhängigkeit, Lösungsmitteltoleranz oder Lagerbarkeit der Zellkulturen charakterisiert. Zudem konnte der Zeitpunkt und die Katalysereihenfolge der ROs in der Biosynthese durch Tests zur Substrattoleranz und Kaskadenreaktionen postuliert werden. Die ROs JerP und JerL sind Enzyme des *tailoring*-Prozesses, in dessen Verlauf ausgehend von Jerangolid E (**35**) zunächst die Desaturierung und anschließend die Hydroxylierung zum Biosyntheseprodukt Jerangolid A (**15**) katalysiert wird (Abbildung 6–34). Die gewonnenen Erkenntnisse leisten einen wesentlichen Beitrag zur weiteren Aufklärung der Jerangolid-Biosynthese. Während der Katalyse zeigen beide Oxygenasen eine hohe Substratspezifität. Von den zwölf eingesetzten Substraten wurden lediglich vier (**33**, **35**, **36** und **155**) umgesetzt (Abbildung 6–33). Die hier präsentierten Ergebnisse stellen einen grundlegenden Schritt bei der Etablierung der ROs für chemoenzymatische Naturstoff-Totalsynthesen dar.

---

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Chemische Arbeiten

#### 7.1.1 Allgemeine Hinweise zu chemisch-synthetischen Arbeiten & Analytik

##### Geräte

Luft- oder feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden unter Inertgasatmosphäre (Stickstoff oder Argon) in ofengetrockneten Glasgeräten durchgeführt. Spritzen und Kanülen wurden vor Verwendung mehrfach mit Inertgas gespült.

##### Chemikalien und Lösungsmittel

Alle Reagenzien, deren Herstellung nicht angegeben ist, wurden von den Firmen ACROS ORGANICS, ABCR, THERMO FISHER, SIGMA-ALDRICH, CARBOLUTION, FLUKA, TCI, ALFA AESAR, ROTH oder MERCK käuflich erworben und ohne weitere Reinigung verwendet. Falls erforderlich wurde zum Entfernen von gelöstem Sauerstoff das jeweilige Reagenz mit Argon entgast. Absolutierte Lösungsmittel wurden von ACROS ORGANICS bezogen.

##### Dünnschichtchromatographie

Sämtliche Dünnschichtchromatogramme wurden mit Polygram® SIL G/UV<sub>254</sub> Fertigplatten der Firma MARCHEREY-NAGEL erstellt. Zur Detektion der Substanzen diente die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm. Nicht-fluoreszierenden Substanzen wurden durch Anfärben mit dem KMnO<sub>4</sub>-Färbereagenz (200 mL Wasser, 10 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.5 g KMnO<sub>4</sub>, 2.5 mL 5% NaOH) detektiert.

##### Säulenchromatographie

Für säulenchromatographische Reinigungen wurden als stationäre Phase Kieselgel der Firma MACHEREY-NAGEL ("MN Kieselgel 60": Korngröße von 40-63 µm), [Cu] × SiO<sub>2</sub> (10 w% CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O) oder C18-RP Kieselgel 90 (Korngröße von 40-63 µm) der Firma SIGMA ALDRICH verwendet.

##### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Zur Reinigung von Substanzen mittels semipräparativer RP-HPLC wurde eine Anlage der Firma WATERS (WATERS 600 Controller, WATERS 2876 Dual λ Absorbtion Detector, WATERS Fraction Collector II) mit Umkehrsäule (Kinetex® RP-C18, 5 µm, 100 Å) der Firma PHENOMENEX verwendet. Bei allen Läufen wurde folgender Lösungsmittelgradient verwendet: (H<sub>2</sub>O:MeCN = 95:5 {5 min}, Gradient H<sub>2</sub>O:MeCN 95:5 → 5:95 {15 min}, H<sub>2</sub>O:MeCN = 5:95 {6 min}, 20 mL/min).

Analytische Untersuchungen mittels UPLC-MS fanden *per* Elektronensprayionisation im Positiv-Modus (ESI+) mit vorheriger Trennung über eine Umkehrsäule (WATERS HSS C18) am Gerät

---

Acquity<sup>TM</sup> der Firma WATERS statt. Bei allen Läufen wurde folgender Lösungsmittelgradient verwendet: (H<sub>2</sub>O:MeOH = 90:10 {Start}, Gradient H<sub>2</sub>O:MeOH 0:10 → 10:90 {4 min}, H<sub>2</sub>O:MeOH = 10:90 {2 min}, Gradient H<sub>2</sub>O:MeOH 10:90 → 90:10 {1 min}, H<sub>2</sub>O:MeOH = 90:10 {2 min}, 0.5 mL/min).

### NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Messungen wurden an einem BRUKER Avance III 500 HD Spektrometer (500 MHz) der Firma BRUKER bei RT (= 298 K) durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der  $\delta$ -Skala (ppm) angegeben. Als interner Standard diente bei <sup>1</sup>H-NMR-Spektren das Resonanzsignal der Restprotonen des verwendeten Lösungsmittels CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$  = 7.26 ppm) und bei <sup>13</sup>C-Spektren das deuteriumgekoppelte Signal von CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$  = 77.16 ppm).<sup>[75]</sup> Zur Beschreibung der Signalformen wurden folgende Symbole verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin. = Quintett, sept. = Septett, m = Multiplett, br. = breit. Die Kopplungskonstante *J* wurde in Hz angegeben. Für <sup>13</sup>C-Spektren gilt: q = quartär, t = tertiär, s = sekundär und p = primär. Die Auswertung der Spektren fand computergestützt mit Hilfe des Programms MestreNova der Firma MESTRELAB RESEARCH statt.

### Hochauflösende Massenspektrometrie

Die Aufnahme der Massenspektren (MS) durch Elektronenspray Ionisation (ESI) erfolgte am Gerät Thermo Scientific Q Exactive der Firma THERMO SCIENTIFIC. Die Proben wurden *per* Direkteinlass, ohne vorherige LC-Trennung, in das System eingebracht.

### Drehwertmessungen

Die Messung der Drehwerte erfolgte an einem Polarimeter 241 der Firma PERKIN-ELMER.

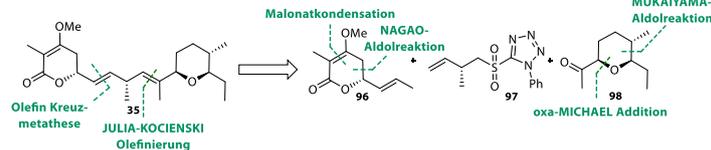
### Ozonolyse

Ozon wurde mit Hilfe des Ozongenerators Modell 503 der Firma FISCHER erzeugt. Bei allen Reaktionen betrug der Sauerstofffluss 80 L/h und die Stromstärke 1.00 A. Der verwendete Sauerstoff 4.5 wurde von der Firma RIESSNER GASE bezogen. Überschüssiges Ozon wurde durch das Einleiten von Sauerstoff, bei gleicher Flussrate, in die Lösung, ausgetrieben.

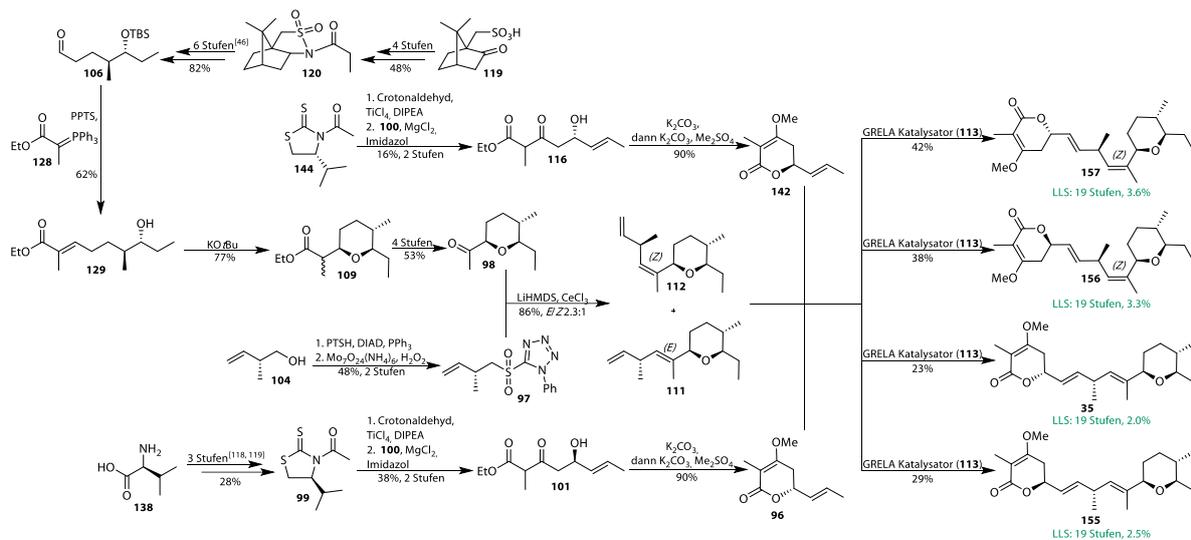
## 7.1.2 Synthesen

Die Syntheseroute der für die Enzymreaktion benötigten Endverbindungen (**35**, **44**, **155-160**) und deren Schlüsselintermediate ist in Schema 7-1 zusammengefasst dargestellt.

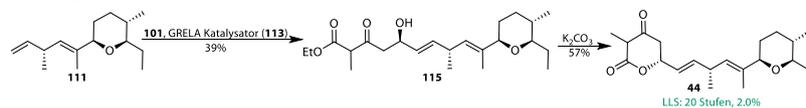
### Retrosynthese



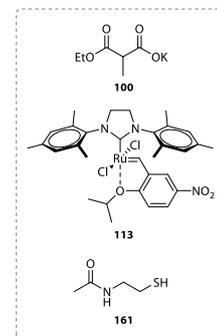
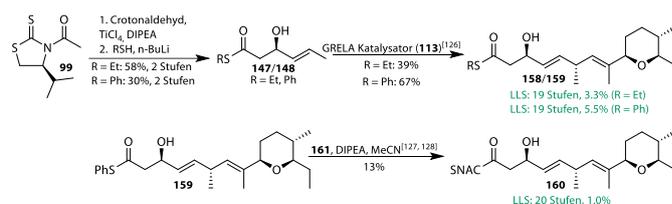
### Jerangolide E & Derivate



### Projerangolid



### Biosynthetische Vorläufer-Surrogate

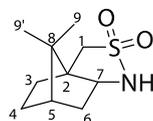


**Schema 7-1.** Überblick der Syntheseroute zu den biosynthetischen Intermediate (**35**, **44**), deren Derivaten und Surrogaten (**155** – **160**). Syntheseprotokoll angelehnt an Literatur<sup>[1,20,110,141]</sup>.

Im Folgenden werden die Durchführung und Analytik der Einzelreaktionen im Detail beschrieben.

### 7.1.2.1 Ostfragment 98

(3*a**R*,6*S*)-8,8-dimethylhexahydro-3*H*-3*a*,6-methanobenzo[*c*]isothiazole-2,2-dioxid  
(120)



**120**  
 $C_{10}H_{17}NO_2S$   
 $M = 215.31 \text{ g/mol}$

Zu (1*R*)-(-)-Champher-10-sulfonsäure **119** (50.0 g, 215 mmol, 1.0 Äq.) wurde tropfenweise Thionylchlorid (31.3 mL, 430 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und unter Rückfluss bei 80 °C für 1.5 h gerührt. Die Temperatur wurde auf 115 °C erhöht und gerührt, bis keine Gasentwicklung mehr erkennbar war. Nach Zugabe eines Tropfens Dimethylformamids wurde das überschüssige Thionylchlorid sowie weitere flüchtige Bestandteile *in vacuo* (> 60 mbar) entfernt und anschließend mit Toluol (25.0 mL) codestilliert.

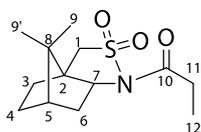
Nach Aufnahme des Rückstands in 1,4-Dioxan (50.0 mL) und Zutropfen zu Ammoniakwasser (850 mL) bei -5 °C wurde auf 90 °C erhitzt und für 2 h unter Reflux (Rf) gerührt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt, filtriert und der Rückstand mit Wasser gewaschen. Der erhaltene Feststoff wurde in MeOH:H<sub>2</sub>O (3:1, 67.0 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt worauf portionsweise NaBH<sub>4</sub> (8.14 g, 215 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben wurde. Nach 3 h rühren wurden flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt.

Der Rückstand wurde in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50.0 mL) aufgenommen und zu 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (200 mL) gegeben. Die wässrige Phase wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 200 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung gewaschen sowie getrocknet (MgSO<sub>4</sub>). Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile *in vacuo* konnte das Produkt (26.1 g, 104 mmol, 48%, 3 Stufen) als weißer Feststoff erhalten werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 4.01$  (br. s, 1H, NH), 3.43 (dd,  $J = 7.9, 5.3$  Hz, 1H, 7-CH), 3.12 (d,  $J = 13.7$  Hz, 1H, 1-CH<sub>2</sub>), 3.11 (d,  $J = 13.7$ , 1H, 1-CH<sub>2</sub>), 2.00 – 1.83 (m, 4H, 3-CH<sub>2</sub>, 4-CH<sub>2</sub>, 5-CH, 6-CH<sub>2</sub>), 1.60 – 1.55 (m, 1H, 3-CH<sub>2</sub>), 1.50 – 1.42 (m, 1H, 6-CH<sub>2</sub>), 1.35 – 1.27 (m, 1H, 4-CH<sub>2</sub>), 1.13 (s, 3H, 9-CH<sub>3</sub>), 0.94 (s, 3H, 9'-CH<sub>3</sub>) ppm.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

1-((3*aR*,6*S*)-8,8-dimethyl-2,2-dioxidotetrahydro-3*H*-3*a*,6-methanobenzo[*c*]isothiazol-1(4*H*)-yl)propan-1-on (**105**)



**105**

$C_{13}H_{21}NO_3S$

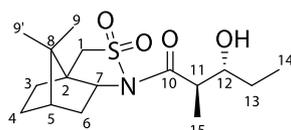
$M = 271.38 \text{ g/mol}$

Zu einer 0.25 M Lösung des OPPOLZER-Sultams **120** (10.0 g, 39.8 mmol, 1.0 Äq.) in Toluol (160 mL) wurde nach Abkühlen auf 0 °C portionsweise NaH (2.39 g, 59.7 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben und die Lösung bei RT für 2 h gerührt. Anschließend wurde Propionylchlorid (5.52 mL, 59.7 mmol, 1.5 Äq.) zugetropft und erneut für 1 h gerührt. Zum Beenden der Reaktion wurde nach erneutem Abkühlen auf 0 °C ges.  $NH_4Cl$ -Lösung zugegeben. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit  $CH_2Cl_2$  (3 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet ( $MgSO_4$ ) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach Reinigung durch Umkristallisation aus Toluol konnte das Produkt (13.5 g, 49.8 mmol, quant.) als weiße, nadelförmige Kristalle erhalten werden.

**$^1H$ -NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta = 3.86$  (dd,  $J = 7.9, 5.3$  Hz 1H, 7-CH), 3.47 (d,  $J = 13.7$  Hz, 1H, 1- $CH_2$ ), 3.44 (d,  $J = 13.7$  Hz, 1H, 1- $CH_2$ ), 2.80 – 2.69 (m, 2H, 11- $CH_2$ ), 2.16 – 2.11 (m, 1H, 6- $CH_2$ ), 2.07 (dd,  $J = 13.7$  Hz, 7.8 Hz, 1H, 6- $CH_2$ ), 1.95 – 1.86 (m, 3H, 4- $CH_2$ , 5-CH), 1.43 – 1.32 (m, 2H, 3- $CH_2$ ), 1.18 – 1.15 (m, 6H, 9- $CH_3$ , 12- $CH_3$ ), 0.97 (s, 3H, 9'- $CH_3$ ) ppm.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

(2*R*,3*R*)-1-((3*aR*,6*S*)-8,8-Dimethyl-2,2-dioxidotetrahydro-3*H*-3*a*,6-methanobenzo[*c*]isothiazol-1(4*H*)-yl)-3-hydroxy-2-methylpentan-1-on (**122**)



**122**

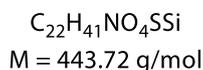
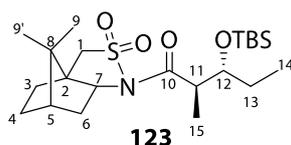
$C_{16}H_{27}NO_4S$

$M = 329.45 \text{ g/mol}$

Zu einer Lösung des propionierten OPPOLZER-Sultams **105** (10.0 g, 36.8 mmol, 1.0 Äq.) in  $CH_2Cl_2$  (84.0 mL) wurden langsam DIPEA (9.40 mL, 55.2 mmol, 1.5 Äq.) und TMSOTf (12.0 mL,

66.2 mmol, 1.8 Äq.) zugetropft. Anschließend wurde für 24 h bei RT gerührt. Zu einer Lösung von Propionaldehyd (3.95 mL, 55.2 mmol, 1.5 Äq.) in abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (166 mL) wurde nach Abkühlen auf -78 °C langsam 1 M TiCl<sub>4</sub> in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (55.2 mL, 55.2 mmol, 1.5 Äq.) zugetropft. Es wurde die auf -78 °C vorgekühlte Lösung des Sultams vorsichtig zugegeben und für eine Stunde bei gleichbleibender Temperatur gerührt. Zum Beenden der Reaktion wurde ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung zugegeben und die Reaktion auf 0 °C erwärmt und für eine weitere Stunde gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung in der folgenden Reaktion umgesetzt.

(2*R*,3*R*)-3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-1-((3*aR*,6*S*)-8,8-dimethyl-2,2-dioxidotetrahydro-3*H*-3*a*,6-methanobenzo[*c*]isothiazol-1(4*H*)-yl)-2-methylpentan-1-on (**123**)



Eine Lösung des MUKAIYAMA-Aldolprodukts **122** (10.0 g, 30.4 mmol, 1.0 Äq.) in abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (202 mL) wurde auf -78 °C abgekühlt. Es erfolgte die Zugabe von 2,6-Lutidin (5.30 mL, 45.6 mmol, 1.5 Äq.) und TBSOTf (10.5 mL, 45.6 mmol, 1.5 Äq.), woraufhin für 30 min gerührt wurde. Nach Erwärmen auf RT wurde für weitere 24 h gerührt. Anschließend wurde zum Beenden der Reaktion ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung zugegeben. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, *n*-Hexan/EtOAc 9:1) wurde das Produkt (15.9 g, 35.8 mmol, 97%, 2 Stufen) als gelbliches Öl erhalten.

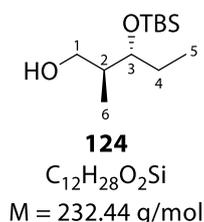
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 4.06 (ddd, *J* = 7.4, 6.2, 3.0 Hz, 1H, 12-CH), 3.88 (dd, *J* = 7.5, 5.1 Hz, 1H, 7-CH), 3.44 (d, *J* = 13.7, 1H, 1-CH<sub>2</sub> und d, *J* = 13.7, 1H, 1-CH<sub>2</sub>), 3.29 (dq, *J* = 13.1, 6.7 Hz, 1H, 11-CH), 2.07 – 1.98 (m, 2H, 6-CH<sub>2</sub>), 1.93 – 1.84 (m, 3H, 5-CH, 4-CH<sub>2</sub>), 1.51 – 1.29 (m, 4H, 13-CH<sub>2</sub>, 3-CH<sub>2</sub>), 1.15 (s, 3H, 9-CH<sub>3</sub>), 1.11 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, 15-CH<sub>3</sub>), 0.96 (s, 3H, 9'-CH<sub>3</sub>), 0.90 – 0.86 (m, 12H, OTBS, 14-CH<sub>3</sub>), 0.09 (s, *J* = 3.0 Hz, 3H, OTBS), 0.07 (s, 2H, OTBS) ppm.

---

**Retentionsfaktor ( $R_f$ )** (*n*-Hexan/EtOAc 9:1): 0.34.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

(2*S*,3*R*)-3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylpentan-1-ol (**124**)



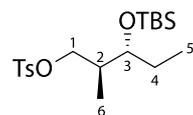
Eine Lösung des TBS-geschützten MUKAIYAMA-Aldolprodukts **123** (15.7 g, 35.3 mmol, 1.0 Äq.) in Et<sub>2</sub>O:MeOH (20:1, 352 mL) wurde auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde LiBH<sub>4</sub> (1.54 g, 70.5 mmol, 2.0 Äq.) portionsweise zugegeben. Nach Erwärmen der Reaktion auf RT und Rühren über 24 h erfolgte zum Beenden der Reaktion die Zugabe von 1 M HCl. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, *n*-Hexan/EtOAc 9:1) wurde das Produkt (16.1 g, 69.0 mmol, 99%) als gelbliches Öl erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 3.77$  (dd,  $J = 10.9, 3.6$  Hz, 1H 1-CH<sub>2</sub>), 3.63 (dd,  $J = 11.3, 5.1$  Hz, 1H, 3-CH), 3.54 (dd,  $J = 10.9, 5.3$  Hz, 1H, 1-CH<sub>2</sub>), 1.81 – 1.75 (m, 1H, 2-CH), 1.63 – 1.57 (m, 2H, 4-CH<sub>2</sub>), 0.99 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, 6-CH<sub>3</sub>), 0.91 – 0.89 (m, 9H, OTBS), 0.86 (t,  $J = 3.7$  Hz, 3H, 5-CH<sub>3</sub>), 0.09 (s, 3H, OTBS), 0.08 (s, 3H, OTBS) ppm.

**$R_f$**  (*n*-Hexan/EtOAc 9:1): 0.40.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

(2*S*,3*R*)-3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylpentyl 4-methylbenzenesulfonat  
(125)



**125**  
 $C_{19}H_{34}O_4SSi$   
 $M = 386.62 \text{ g/mol}$

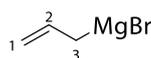
Zu einer Lösung des Alkohols **124** (2.38 g, 10.2 mmol, 1.0 Äq.) in  $CH_2Cl_2$  (115 mL) wurden nach Abkühlen auf  $0^\circ C$  langsam Pyridin (1.22 mL, 15.4 mmol, 1.5 Äq.) und Tosylchlorid (2.15 g, 11.3 mmol, 1.1 Äq.) zugetropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur und Rühren für drei Tage wurde zum Beenden der Reaktion gesättigte  $NaHCO_3$ -Lösung zugegeben und für weitere 30 min gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit  $CH_2Cl_2$  ( $4 \times 200 \text{ mL}$ ) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet ( $MgSO_4$ ) und flüchtige Bestandteile unter reduziertem Druck entfernt. Nach mehrmaliger säulenchromatographischer Reinigung ( $SiO_2$ , *n*-Hexan/EtOAc 39:1 und *n*-Hexan/EtOAc 79:1) wurde das Produkt (3.46 g, 8.94 mmol, 87%) als gelbe Flüssigkeit erhalten. Nicht umgesetztes Startmaterial konnte vollständig reisoliert werden.

**$^1H$ -NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta = 7.78$  (d,  $J = 8.3 \text{ Hz}$ , 2H, OTs), 7.34 (d,  $J = 7.9 \text{ Hz}$ , 2H, OTs), 4.07 (dd,  $J = 9.4, 5.1 \text{ Hz}$ , 1H, 1- $CH_2$ ), 3.85 (dd,  $J = 9.4, 7.3 \text{ Hz}$ , 1H, 1- $CH_2$ ), 3.49 (q,  $J = 5.5 \text{ Hz}$ , 1H, 3-CH), 2.45 (s, 3H, OTs), 1.97 – 1.89 (m, 1H, 2-CH), 1.47 – 1.33 (m, 2H, 4- $CH_2$ ), 0.86 (d,  $J = 6.9 \text{ Hz}$ , 3H, 6- $CH_3$ ), 0.82 – 0.78 (m, 12H, OTBS, 5- $CH_3$ ), -0.01 (s, 3H, OTBS), -0.05 (s, 3H, OTBS) ppm.

**R<sub>f</sub>**(*n*-Hexan/EtOAc 79:1): 0.25.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

### Allylmagnesiumbromid (**163**)

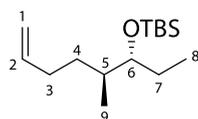


**163**  
 $C_3H_5BrMg$   
 $M = 145.28 \text{ g/mol}$

Zu Beginn wurden Magnesiumspäne (6.15 g, 253 mmol, 1.2 Äq.) vorgelegt und ausgeheizt. Es erfolgte die Zugabe von katalytischen Mengen  $I_2$  (zwei Körnchen) und  $Et_2O$  (211 mL), worauf 5 min bei RT gerührt wurde. Anschließend wurde Allylbromid (18.3 mL, 211 mmol, 1.0 Äq.) bei

0 °C sehr langsam zugegeben und die Reaktion nach Erwärmen auf RT für 24 h gerührt. Das in Lösung vorliegende Produkt wurde, nach Absetzen des Feststoffes, direkt weiterverwendet.

*tert*-Butyldimethyl(((3*R*,4*S*)-4-methyloct-7-en-3-yl)oxy)silan (**126**)

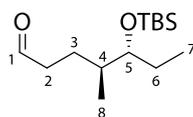


**126**

$C_{15}H_{32}OSi$   
 $M = 256.51 \text{ g/mol}$

Zum gelösten Allylmagnesiumbromid (**163**) (211 mL, 211 mmol, 4.0 Äq.) wurde eine Lösung des Tosylats (**125**) (13.1 g, 34.0 mmol, 1.0 Äq.) in  $Et_2O$  (260 mL) langsam zugetropft. Nach Erhitzen für 3 h bei 50 °C unter Rf wurde die Reaktion auf 0 °C abgekühlt und zum Beenden der Reaktion ges.  $NH_4Cl$ -Lösung und Wasser zugegeben. Es wurde für eine weitere Stunde gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit  $Et_2O$  ( $3 \times 200 \text{ mL}$ ) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet ( $MgSO_4$ ) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* ( $> 200 \text{ mbar}$ ) entfernt. Der Rückstand wurde über Silica filtriert und nach mehrmaligem Nachspülen mit  $Et_2O$  wurden erneut die flüchtigen Bestandteile *in vacuo* ( $> 200 \text{ mbar}$ ) entfernt. Die zurückbleibende leicht gelbe Flüssigkeit wurde in folgender Ozonolyse ohne weitere Reinigung direkt weiterverwendet.

(4*S*,5*R*)-5-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-4-methylheptanal (**106**)



**106**

$C_{14}H_{30}O_2Si$   
 $M = 258.48 \text{ g/mol}$

Eine 0.1 M Lösung des GRIGNARD-Produkts **126** (5.56 g, 21.7 mmol, 1.0 Äq.) in  $CH_2Cl_2$  (200 mL) wurde auf -78 °C abgekühlt. Anschließend wurde  $O_3$  solange durch die Lösung geleitet, bis ein Farbumschlag nach blau zu erkennen war. Nun wurde  $O_2$  durch die Lösung geleitet, bis ein Farbumschlag von blau nach grau/farblos zu erkennen war. Zur Lösung wurde  $PPh_3$  (8.52 g, 32.5 mmol, 1.5 Äq.) gegeben und nach Erwärmen auf RT über Nacht gerührt. Flüchtige

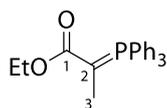
Bestandteile wurden *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, *n*-Hexan/EtOAc 39:1) wurde das Produkt (5.51 g, 22.3 mmol, 98%) als farbloses Öl erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 9.77 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, 1-CH), 3.44 (q, *J* = 10.4, 5.8 Hz, 1H, 5-CH), 2.54 – 2.46 (m, 1H, 2-CH<sub>2</sub>), 2.42 – 2.34 (m, 1H, 2-CH<sub>2</sub>), 1.81 – 1.73 (m, 1H, 3-CH<sub>2</sub>), 1.62 – 1.54 (m, 1H, 3-CH<sub>2</sub>), 1.46 – 1.33 (m, 3H, 6-CH<sub>2</sub>, 4-CH), 0.89 – 0.84 (m, 15H, OTBS, 7-CH<sub>3</sub>, 8-CH<sub>3</sub>), 0.04 (s, 3H, OTBS), 0.03 (s, 3H, OTBS) ppm.

**R<sub>f</sub>**(*n*-Hexan/EtOAc 39:1): 0.38.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

### Ethyl-2-(triphenyl- $\lambda^5$ -phosphanylidene)propanoat (**128**)



**128**

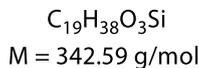
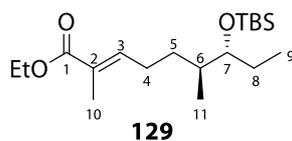
C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub>P

M = 362.41 g/mol

Zu einer 0.1 M Lösung des 2-Brom-propionsäureethylesters (**127**) (10.8 mL, 80.1 mmol, 1.1 Äq.) in Toluol (80 mL) wurde PPh<sub>3</sub> (20.0 g, 76.3 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und die Lösung für 8 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Lösung wurde filtriert und mit EtOAc gewaschen und die flüchtigen Bestandteile des Filtrats unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mit einigen Tropfen Phenolphthalein-Lösung versetzt. Daraufhin wurde vorsichtig 2 M NaOH-Lösung zugetropft bis ein Farbumschlag zu leichtem rosa zu erkennen war. Die wässrige Phase wurde direkt mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 50.0 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Das Produkt (13.1 g, 36.3 mmol, 48%) wurde ohne weitere Reinigung weiterverwendet.

**R<sub>f</sub>**(*n*-Hexan/EtOAc 39:1): 0.38.

(6*S*,7*R*,*E*)-Ethyl-7-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnon-2-enoat (**129**)



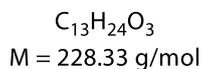
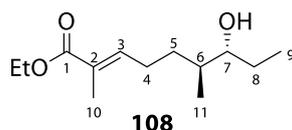
Zu einer 0.2 M Lösung des Aldehyds **106** (0.39 g, 1.51 mmol, 1.0 Äq.) in  $CH_2Cl_2$  (7.60 mL) wurde das Ylen **128** (1.10 g, 3.03 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und für 24 h bei 30 °C gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung ( $SiO_2$ , *n*-Hexan/EtOAc 50:1) wurde das Produkt (0.46 g, 1.35 mmol, 88%) als farbloses Öl erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 6.74 (dt,  $J$  = 7.5, 1.4 Hz, 1H, 3-CH), 4.18 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, OEt), 3.42 (q,  $J$  = 5.9 Hz, 1H, 7-CH), 2.28 – 2.17 (m, 1H, 4- $CH_2$ ), 2.15 – 2.06 (m, 1H, 4- $CH_2$ ), 1.83 (s, 3H, 10- $CH_3$ ), 1.63 – 1.54 (m, 1H, 5- $CH_2$ ), 1.53 – 1.46 (m, 1H, 5- $CH_2$ ), 1.43 – 1.36 (m, 2H, 8- $CH_2$ ), 1.29 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H, OEt), 1.26 – 1.19 (m, 1H, 6-CH), 0.89 – 0.85 (m, 15H, OTBS, 9- $CH_3$ , 11- $CH_3$ ), 0.03 (s, 3H, OTBS), 0.02 (s, 3H, OTBS) ppm.

**R<sub>f</sub>**(*n*-Hexan/EtOAc 50:1): 0.30.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

(6*S*,7*R*,*E*)-Ethyl-7-hydroxy-2,6-dimethylnon-2-enoat (**108**)



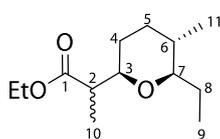
Zu einer 0.05 M Lösung des Esters **129** (4.97 g, 14.5 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (290 mL) wurde PPTS (18.2 g, 72.6 mmol, 5.0 Äq.) gegeben und die Lösung für drei Tage bei 50 °C gerührt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile *in vacuo* wurde der Rückstand in  $H_2O$  aufgenommen und die wässrige Phase mit  $CH_2Cl_2$  (3 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges.  $NH_4Cl$ - und  $NaCl$ -Lösung gewaschen, getrocknet ( $MgSO_4$ ) und flüchtige Bestandteile erneut *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung ( $SiO_2$ , *n*-Hexan/EtOAc 5:1) wurde das Produkt (2.03 g, 8.87 mmol, 70%) als farbloses Öl erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 6.78 – 6.74 (m, 1H, 3-CH), 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OEt), 3.36 (m, 1H, 7-CH), 2.31 – 2.22 (m, 1H, 4-CH<sub>2</sub>), 2.18 – 2.09 (m, 1H, 4-CH<sub>2</sub>), 1.83 (s, 3H, 10-CH<sub>3</sub>), 1.68 – 1.61 (m, 1H, 5-CH<sub>2</sub>), 1.58 – 1.51 (m, 2H, 5-CH<sub>2</sub>, 8-CH<sub>2</sub>), 1.40 – 1.36 (m, 1H, 8-CH<sub>2</sub>), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OEt), 0.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, 9-CH<sub>3</sub>), 0.92 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 11-CH<sub>3</sub>) ppm.

**R<sub>f</sub>** (*n*-Hexan/EtOAc 5:1): 0.32.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

### Ethyl-2-((2*R*,5*S*,6*R*)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyranyl)-propanoat (**109**)



**109**

C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>

M = 228.33 g/mol

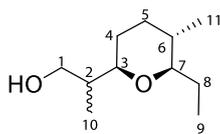
Eine 0.1 M Lösung des Esters **108** (2.03 g, 8.87 mmol, 1.0 Äq.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (110 mL) wurde auf 0 °C abgekühlt. Daraufhin wurde KO<sup>t</sup>Bu (1.00 g, 8.87 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und für 4 h bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung zum Beenden der Reaktion und Trennen der Phasen wurde die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, *n*-Hexan/EtOAc 29:1) wurde das Produkt (1.56 g, 6.82 mmol, 77%) als flüssiges und farbloses Öl mit einem Isomerenverhältnis von 1.07:1 erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 4.18 – 4.08 (m, 2H, OEt), 3.43 – 3.36 (m, 1H, 3-CH), 2.83 – 2.76 (m, 1H, 7-CH), 2.51 – 2.43 (m, 1H, 2-CH), 1.81 – 1.73 (m, 1H, 5-CH<sub>2</sub>), 1.71 – 1.64 (m, 1H, 5-CH<sub>2</sub>), 1.58 – 1.52 (m, 1H, 4-CH<sub>2</sub>), 1.36 – 1.15 (m, 9H, 4-CH<sub>2</sub>, 6-CH, 8-CH<sub>2</sub>, 10-CH<sub>3</sub>, OEt), 1.09 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, 10-CH<sub>3</sub>), 0.93, 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, 9-CH<sub>3</sub>), 0.80, 0.79 (d, *J* = 2.1 Hz, 3H, 11-CH<sub>3</sub>) ppm.

**R<sub>f</sub>** (*n*-Hexan/EtOAc 29:1): 0.40.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

2-((2*R*,5*S*,6*R*)-6-Ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-propanol (**132**)



**132**

$C_{11}H_{22}O_2$

$M = 186.29 \text{ g/mol}$

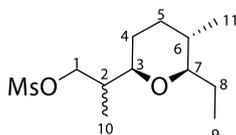
Eine 0.05 M Lösung des Esters **109** (640 mg, 2.80 mmol, 1.0 Äq.) in  $CH_2Cl_2$  (56 mL) wurde auf  $-78^\circ C$  abgekühlt. Anschließend wurde langsam, zuvor auf  $0^\circ C$  abgekühltes, 1 M DIBAL-H in Hexan (14.0 mL, 14.0 mmol, 5.0 Äq.) zugetropft. Nach Erwärmen der Reaktion auf  $0^\circ C$  wurde für 5 h gerührt. Darauf wurde K-Na-Tartrat zum Beenden der Reaktion zugegeben und bei RT über Nacht gerührt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit  $CH_2Cl_2$  ( $4 \times 100 \text{ mL}$ ) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet ( $MgSO_4$ ) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt, wodurch das Produkt (510 mg, 2.74 mmol, 98%) als farblose Flüssigkeit erhalten und ohne weitere Reinigung weiterverwendet wurde.

**$^1H$ -NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta = 3.71 - 3.58$  (m, 2H, 1- $CH_2$ ),  $3.51 - 3.46$ ,  $3.23 - 3.19$  (m, 1H, 3-CH),  $2.92 - 2.87$  (m, 1H, 7-CH),  $1.99 - 1.90$  (m, 1H, 2-CH),  $1.85 - 1.66$  (m, 4H, 2'-CH, 4- $CH_2$ , 5- $CH_2$ , 8- $CH_2$ ),  $1.54 - 1.47$  (m, 1H, 8- $CH_2$ ),  $1.43 - 1.30$  (m, 3H, 4- $CH_2$ , 4'- $CH_2$ , 6-CH),  $1.23 - 1.13$  (m, 1H, 5- $CH_2$ ),  $0.99 - 0.90$  (m, 4H, 10- $CH_3$ , 9- $CH_3$ ),  $0.85$  (d,  $J = 7.0 \text{ Hz}$ , 1H, 10- $CH_3$ ),  $0.83 - 0.81$  (m, 3H, 11- $CH_3$ ) ppm.

**R<sub>f</sub>**(*n*-Hexan/EtOAc 5:1): 0.42.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

2-((2*R*,5*S*,6*R*)-6-Ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-propylmethansulfonat (**133**)



**133**

$C_{12}H_{24}O_4S$

$M = 264.38 \text{ g/mol}$

Eine 0.15 M Lösung des Alkohols **132** (0.51 g, 2.74 mmol, 1.0 Äq.) in  $CH_2Cl_2$  (18.5 mL) wurde auf  $0^\circ C$  abgekühlt. Anschließend wurden langsam DIPEA (0.72 mL, 4.11 mmol, 1.5 Äq.) und Methansulfonylchlorid (0.32 mL, 4.11 mmol, 1.5 Äq.) zugetropft und die Reaktion über Nacht

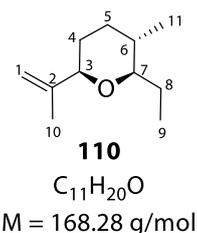
gerührt. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser wurde die organische Phase getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung ( $\text{SiO}_2$ , *n*-Hexan/EtOAc 10:1) wurde das Produkt (0.69 g, 2.60 mmol, 95%) als gelbes Öl erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 4.36 – 4.25, 4.10 (m, 2H, 1- $\text{CH}_2$ ), 3.33 – 3.29, 3.13 – 3.08 (m, 1H, 3-CH), 3.00, 2.99 (s, 3H, OMs), 2.82 – 2.76 (m, 1H, 7-CH), 2.00 – 1.84 (m, 1H, 2-CH), 1.81 – 1.76 (m, 1H, 4- $\text{CH}_2$ ), 1.73 – 1.61 (m, 1H, 5- $\text{CH}_2$ ), 1.50 – 1.11 (m, 5H, 4- $\text{CH}_2$ , 5- $\text{CH}_2$ , 6-CH, 8- $\text{CH}_2$ ), 1.02 – 0.99 (m, 3H), 0.95 – 0.90 (m, 3H), 0.81 – 0.79 (m, 3H) ppm.

**$R_f$** (*n*-Hexan/EtOAc 10:1): 0.11.

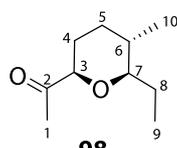
Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

(2*R*,3*S*,6*R*)-2-Ethyl-3-methyl-6-(prop-1-en-2-yl)tetrahydro-2*H*-pyran (**110**)



Zu einer 0.05 M Lösung des Mesylats **133** (1.37 g, 5.17 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (105 mL) wurde unter Lichtausschluss Natriumiodid (2.32 g, 15.5 mmol, 3.0 Äq.) zugegeben und die Lösung bei 53 °C über Nacht gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von DBU (1.39 mL, 9.31 mmol, 1.8 Äq.) und die Reaktion wurde für weitere 6 h bei 83 °C gerührt. Zum Beenden der Reaktion wurde die Reaktionslösung auf Eis gegeben. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Pentan (4 × 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 M HCL und ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gewaschen, getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* (> 350 mbar) entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung in folgender Ozonolyse weiterverwendet.

### 1-((2*R*,5*S*,6*R*)-6-Ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-ethan-1-on (**98**)



**98**

$C_{10}H_{18}O_2$

$M = 170.25 \text{ g/mol}$

Eine 0.28 M Lösung des Alkens **110** (710 mg, 4.23 mmol, 1.0 Äq.) in  $CH_2Cl_2$  (15 mL) wurde auf  $-78^\circ C$  abgekühlt. Anschließend wurde  $O_3$  solange durch die Lösungen geleitet, bis ein Farbumschlag nach blau zu erkennen ist. Nun wurde  $O_2$  durch die Lösung geleitet, bis ein Farbumschlag von blau nach grau/farblos zu erkennen ist. Zur Lösung wurde  $SMe_2$  (0.35 mL, 4.70 mmol, 1.1 Äq.) gegeben und nach Erwärmen auf RT über Nacht gerührt. Flüchtige Bestandteile wurden *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung ( $SiO_2$ , *n*-Hexan/EtOAc 15:1) wurde das Produkt (390 mg, 2.30 mmol, 55%) als farbloses Öl erhalten.

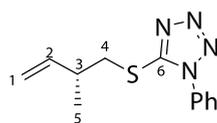
**$^1H$ -NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta = 3.72$  (dd,  $J = 11.7, 2.4$  Hz, 1H, 3-CH), 2.93 – 2.87 (m, 1H, 7-CH), 2.21 (s, 3H, 1- $CH_3$ ), 1.91 – 1.80 (m, 2H, 4- $CH_2$ , 5- $CH_2$ ), 1.74 (ddq,  $J = 14.9, 7.5, 2.8$  Hz, 1H, 8- $CH_2$ ), 1.48 – 1.32 (m, 3H, 4- $CH_2$ , 6-CH, 8- $CH_2$ ), 1.26 – 1.18 (m, 1H, 5- $CH_2$ ), 0.98 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H, 9- $CH_3$ ), 0.83 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, 10- $CH_3$ ) ppm.

**$R_f$** (*n*-Hexan/EtOAc 15:1): 0.44.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

#### 7.1.2.2 Mittelfragment 97

### (*R*)-5-((2-Methylbut-3-en-1-yl)thio)-1-phenyl-1-*H*-tetrazol (**136**)



**136**

$C_{12}H_{14}N_4S$

$M = 246.33 \text{ g/mol}$

Eine 0.13 M Lösung des Alkohols **104** (0.63 g, 7.27 mmol, 1.0 Äq.) in THF (58.0 mL) wurde auf  $0^\circ C$  abgekühlt. Anschließend wurden 1-Phenyl-1*H*-tetrazol-5-thiol (1.55 g, 8.72 mmol, 1.2 Äq.) und  $PPh_3$  (2.30 g, 8.72 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben. Darauf wurde langsam DIAD (1.71 mL, 8.72 mmol,

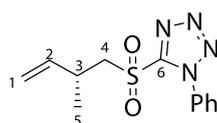
1.2 Äq.) zugetropft und nach Erwärmen auf RT für 1.5 h gerührt. Nach Beenden der Reaktion durch Zugabe von ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Et<sub>2</sub>O (3 × 60.0 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, *n*-Hexan/EtOAc 10:1) wurde das Produkt (1.54 g, 6.25 mmol, 86%) als farbloses Öl erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.60 – 7.52 (m, 5H, Ph), 5.76 (ddd, *J* = 17.4, 10.3, 7.4 Hz, 1H, 2-CH), 5.09 (ddd, *J* = 17.2, 1.3, 1.3 Hz, 1H, 1-CH<sub>2</sub>), 5.05 (ddd, *J* = 10.2, 1.2, 1.2 Hz, 1H, 1-CH<sub>2</sub>), 3.46 – 3.38 (m, 2H, 4-CH<sub>2</sub>), 2.68 (dtq, *J* = 6.8, 7.0, 6.9 Hz, 1H, 3-CH), 1.18 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 5-CH<sub>3</sub>) ppm.

**R<sub>f</sub>** (*n*-Hexan/EtOAc 10:1): 0.36.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

#### (*R*)-5-((2-Methylbut-3-en-1-yl)sulfonyl)-1-phenyl-1-*H*-tetrazol (**97**)



**97**

C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S

*M* = 278.33 g/mol

Eine 0.18 M Lösung des Thioethers **136** (1.54 g, 6.25 mmol, 1.0 Äq.) in Ethanol (40 mL) wurde auf 0 °C abgekühlt. Eine Lösung aus Ammoniummolybdat (2.31 g, 1.88 mmol, 0.3 Äq.) in 30%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3.90 mL, 37.5 mmol, 6.0 Äq.) wurde langsam zugetropft und die Reaktion für 19 h gerührt. Nach Beenden der Reaktion durch Zugabe von Wasser wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 50.0 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, *n*-Hexan/EtOAc 6:1) wurde das Produkt (kombiniert: 0.97 g, 3.47 mmol, 56%) als weißer Feststoff erhalten. Reisoliertes Sulfoxid wurde in weiteren Oxidationszyklen umgesetzt.

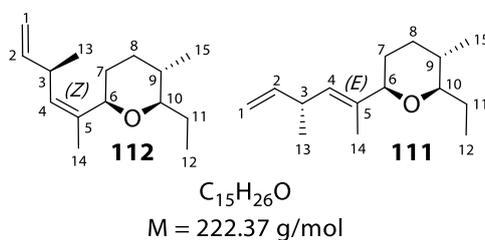
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.68 – 7.58 (m, 5H, Ph), 5.74 (ddd, *J* = 17.3, 10.1, 7.4 Hz, 1H, 2-CH), 5.10 (ddd, *J* = 17.1, 1.1, 1.1 Hz, 1H, 1-CH<sub>2</sub>), 5.03 (ddd, *J* = 10.3, 1.0, 1.0 Hz, 1H, 1-CH<sub>2</sub>), 3.92 (dd, *J* = 14.6, 7.1 Hz, 1H, 4-CH<sub>2</sub>), 3.68 (dd, *J* = 14.6, 6.4 Hz, 1H, 4-CH<sub>2</sub>), 3.03 (dtq, *J* = 6.9, 7.0, 6.8 Hz, 1H, 3-CH), 1.25 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 5-CH<sub>3</sub>) ppm.

**R<sub>f</sub>** (*n*-Hexan/EtOAc 6:1): 0.46.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

### 7.1.2.3 JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung

(2*R*,3*S*)-2-Ethyl-3-methyl-6-((*R*,*E*)-4-methylhexa-2,5-dien-2-yl)tetrahydro-2*H*-pyran (63) und (2*R*,3*S*)-2-Ethyl-3-methyl-6-((*R*,*Z*)-4-methylhexa-2,5-dien-2-yl)tetrahydro-2*H*-pyran (111 & 112)



Eine Lösung des Sulfons **97** (179 mg, 0.65 mmol, 1.1 Äq.) in  $CH_2Cl_2$  (4.00 mL) wurde auf  $-40^\circ C$  abgekühlt. Darauf erfolgte die langsame Zugabe von 1 M LiHMDS in THF (0.76 mL, 0.76 mmol, 1.3 Äq.),  $CeCl_3$  (116 mg, 0.47 mmol, 0.8 Äq.) und einer Lösung des Ketons **98** (100 mg, 0.59 mmol, 1.0 Äq.) in  $CH_2Cl_2$  (3.60 mL). Über 2 h wurde die Reaktion vorsichtig auf RT erwärmt und anschließend über Nacht gerührt. Zum Beenden der Reaktion wurden  $CH_2Cl_2$ , ges.  $NH_4Cl$ -Lösung,  $H_2O$  und 1 M HCl zugegeben. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit  $CH_2Cl_2$  (3  $\times$  20.0 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges.  $NaHCO_3$ - und  $NaCl$ -Lösung gewaschen. Nach Reextraktion der wässrigen Phase wurden die vereinten organischen Phasen getrocknet ( $MgSO_4$ ) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* ( $> 250 \text{ mbar}$ ) entfernt. Nach mehrmaliger säulenchromatographischer Reinigung (200 mL  $SiO_2$ , *n*-Hexan/EtOAc 4:1 und 100 mL  $SiO_2$ , *n*-Pentan) wurde das Produkt (112 mg, 0.50 mmol, 86%) als farbloses Öl mit einem (*E/Z*)-Verhältnis von 2.2:1 erhalten.

**$^1H$ -NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ ) (**E**-Isomer:  $\delta = 5.76$  (ddd,  $J = 17.1, 10.2, 6.2 \text{ Hz}$ , 1H, 2-CH), 5.25 – 5.21 (m, 1H, 4-CH), 4.97 – 4.87 (m, 2H, 1- $CH_2$ ), 3.60 (br.d,  $J = 11.1 \text{ Hz}$ , 1H, 6-CH), 3.13 – 3.04 (m, 1H, 3-CH), 2.94 – 2.87 (m, 1H, 10-CH), 1.82 – 1.75 (m, 1H, 8- $CH_2$ ), 1.73 – 1.66 (m, 1H, 11- $CH_2$ ), 1.65 (d,  $J = 1.3 \text{ Hz}$ , 3H, 14- $CH_3$ ), 1.64 – 1.60 (m, 1H, 7- $CH_2$ ), 1.49 – 1.16 (m, 4H, 7- $CH_2$ , 8- $CH_2$ , 9-CH, 11- $CH_2$ ), 1.05 (d,  $J = 6.8 \text{ Hz}$ , 3H, 13- $CH_3$ ), 0.95 (t,  $J = 7.4 \text{ Hz}$ , 3H, 12- $CH_3$ ), 0.81 (d,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 3H, 15- $CH_3$ ) ppm;

(**Z**-Isomer:  $\delta = 5.79$  (ddd,  $J = 17.2, 10.3, 5.9 \text{ Hz}$ , 1H, 2-CH), 5.01 – 4.97 (m, 2H, 1- $CH_2$ , 4-CH), 4.93 – 4.89 (m, 1H, 1- $CH_2$ ), 4.09 (dd,  $J = 11.4, 2.2 \text{ Hz}$ , 1H, 6-CH), 3.24 – 3.15 (m, 1H, 3-CH), 2.93 – 2.88 (m, 1H, 10-CH), 1.81 – 1.76 (m, 1H, 8- $CH_2$ ), 1.71 (d,  $J = 1.4 \text{ Hz}$ , 3H, 14- $CH_3$ ), 1.69 – 1.64 (m, 1H, 11- $CH_2$ ), 1.61 – 1.56 (m, 1H, 7- $CH_2$ ), 1.45 – 1.39 (m, 2H, 7- $CH_2$ , 11- $CH_2$ ), 1.38 – 1.32 (m, 1H, 9-CH), 1.26 –

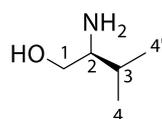
1.19 (m, 1H, 8-CH<sub>2</sub>), 1.02 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 13-CH<sub>3</sub>), 0.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, 12-CH<sub>3</sub>), 0.81 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 15-CH<sub>3</sub>) ppm.

**R<sub>f</sub>**(*n*-Pentan): (*E*-Alken: 0.08; (*Z*-Alken: 0.11).

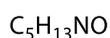
Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

#### 7.1.2.4 Westfragmente 96, 142, 147 und 148

(*S*)-2-amino-3-methylbutan-1-ol (**164**)



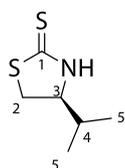
**164**



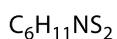
M = 103.17 g/mol

Zu einer 0.47 M Lösung von L-Valin **138** (20.0 g, 0.17 mol, 1.0 Äq.) in THF (360 mL) wurde nach Abkühlen auf 0 °C langsam NaBH<sub>4</sub> (15.4 g, 0.41 mol, 2.4 Äq.) und eine 1.42 M Lösung von Iod (43.2 g, 0.17 mol, 1.0 Äq.) in THF (120 mL) zugegeben. Das Gemisch wurde für 24 h unter R<sub>f</sub> gerührt. Nach Kühlen auf 0 °C und Zugabe von MeOH (120 mL) wurden flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt und der Rückstand in wässriger KOH-Lösung (320 mL) aufgenommen. Anschließend wurde für 4 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und flüchtige Bestandteile erneut *in vacuo* entfernt. Das verbleibende gelbe Öl wurde ohne weitere Reinigung direkt umgesetzt.

(*S*)-4-Isopropylthiazolidine-2-thion (**139**)



**139**



M = 161.28 g/mol

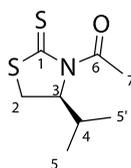
Zu einer 3.30 M Lösung des Aminoalkohols **164** (17.6 g, 0.17 mol, 1.0 Äq) in EtOH (51.2 mL) wurden CS<sub>2</sub> (27.8 mL, 0.46 mol, 2.7 Äq.) und eine 2.30 M Lösung von KOH (25.8 mL, 0.46 mol, 2.7 Äq.) in H<sub>2</sub>O:EtOH (1:1, 200 mL) zugegeben und für vier Tage unter R<sub>f</sub> gerührt. Nach Abkühlen

der Reaktion auf RT wurde die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 300 \text{ mL}$ ) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach Reinigung durch Umkristallisation aus Hexan:EtOAc wurde das Produkt (7.52 g, 46.6 mmol, 28%, 2 Stufen) in Form weißer Kristalle erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 7.51$  (br. s, 1H, NH), 4.05 – 4.01 (m, 1H, 3-CH), 3.51 (dd,  $J = 11.1$ , 8.3 Hz, 1H, 2- $\text{CH}_2$ ), 3.33 (dd,  $J = 11.1$ , 8.3 Hz, 1H, 2- $\text{CH}_2$ ), 2.01 – 1.92 (m, 1H, 4-CH), 1.03 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, 5- $\text{CH}_3$ ), 0.99 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, 5'- $\text{CH}_3$ ) ppm.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[110]</sup>

### (S)-1-(4-isopropyl-2-thioxothiazolidin-3-yl)ethan-1-on (**99**)



**99**

$\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NS}_2$

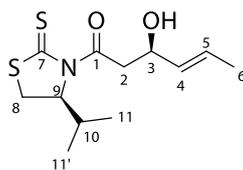
$M = 189.34 \text{ g/mol}$

Zu einer 0.3 M Lösung des (S)-NAGAO-Auxiliars **139** (4.71 g, 29.2 mmol, 1.0 Äq.) in THF (100 mL) wurde nach Abkühlen auf  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$  Natriumhydrid (0.77 g, 32.1 mmol, 1.1 Äq., 60%ig) gegeben und die Lösung bei  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  für 50 min gerührt. Anschließend wurde Acetylchlorid (2.29 mL, 32.1 mmol, 1.1 Äq.) langsam zugetropft und für weitere 45 min bei  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Nach Erwärmen auf RT wurde das Rühren erneut für 1.5 h fortgesetzt. Danach wurde auf  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt und zum Beenden der Reaktion ges.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung (80.0 mL) zugegeben. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert ( $3 \times 7.00 \text{ mL}$ ). Die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (20.0 mL) gewaschen, getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ), und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Das Produkt **99** (5.93 g, 29.2 mmol, quant.) wurde als gelbliches Öl erhalten.

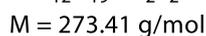
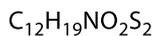
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.15$  (ddd,  $J = 7.7$ , 6.2, 1.1 Hz, 1 H, 3-CH), 3.50 (dd,  $J = 11.4$ , 8.0 Hz, 1 H, 2- $\text{CH}_2$ ), 3.02 (dd,  $J = 11.5$ , 1.2 Hz, 1 H, 2- $\text{CH}_2$ ), 2.77 (s, 3 H, 7- $\text{CH}_3$ ), 2.36 (dsept,  $J = 6.9$ , 6.5 Hz, 1 H, 4-CH), 1.05 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3 H, 5- $\text{CH}_3$ ), 0.97 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3 H, 5'- $\text{CH}_3$ ) ppm.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[110]</sup>

(*R,E*)-3-Hydroxy-1-((*R*)-4-isopropyl-2-thioxothiazolidin-3-yl)hex-4-en-1-on (**137**)



**137**



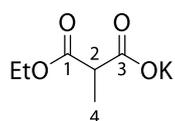
Eine 0.1 M Lösung des acetylierten (*S*)-NAGAO-Auxiliars **99** (4.68 g, 21.6 mmol, 1.1 Äq.) in  $CH_2Cl_2$  (216 mL) wurde auf  $-78^\circ C$  abgekühlt. Nach Zugabe von 1 M  $TiCl_4$  in  $CH_2Cl_2$  (21.6 mL, 21.6 mmol, 1.1 Äq.) wurde für 10 min gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von DIPEA (4.41 mL, 25.9 mmol, 1.3 Äq.). Nach 1 h rühren wurde eine Lösung von Crotonal (1.16 mL, 19.4 mmol, 1.0 Äq.) in  $CH_2Cl_2$  zugetropft und erneut für 1 h gerührt. Nach Zugabe von ges.  $NH_4Cl$ -Lösung zum Beenden der Reaktion wurde unter Erwärmen auf RT für 1 h gerührt. Darauf wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit  $CH_2Cl_2$  (3  $\times$  200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet ( $MgSO_4$ ) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung ( $SiO_2$ , *n*-Hexan/EtOAc 4:1) wurde das Produkt (4.32 g, 15.8 mmol, 81%, *d.r.* 8.3:1) als gelbes Öl erhalten.

**$^1H$ -NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta = 5.80 - 5.72$  (m, 1H, 4-CH), 5.56 (ddq,  $J = 15.3, 6.5, 1.6$  Hz, 1H, 5-CH), 5.16 (ddd,  $J = 7.6, 5.0, 0.9$  Hz, 1H, 9-CH), 4.65 - 4.58 (m, 1H, 3-CH), 3.62 (dd,  $J = 17.7, 2.9$  Hz, 1H, 2-CH<sub>2</sub>), 3.52 (dd,  $J = 11.5, 8.0$  Hz, 1H, 8-CH<sub>2</sub>), 3.29 (dd,  $J = 17.7, 9.0$  Hz, 1H, 2-CH<sub>2</sub>), 3.03 (dd,  $J = 11.5, 1.0$  Hz, 1H, 8-CH<sub>2</sub>), 2.37 (dsept,  $J = 6.7, 6.9$  Hz, 1H, 10-CH), 1.72 - 1.69 (m, 3H, 6-CH<sub>3</sub>), 1.07 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, 11'-CH<sub>3</sub>), 0.98 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, 11-CH<sub>3</sub>) ppm.

**$R_f$**  (*n*-Hexan/EtOAc 4:1): 0.15.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

### Kalium-3-ethoxy-2-methyl-3-oxopropanoat (**100**)



**100**

$C_6H_9KO_4$

$M = 184.23 \text{ g/mol}$

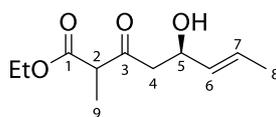
Zu einer 0.9 M Lösung von Diethylmethylmalonat **141** (4.90 mL, 28.7 mmol, 1.0 Äq.) in Ethanol (33.0 mL) wurde  $H_2O$  (0.52 mL, 28.7 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und die Reaktion für 2 h bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von  $KOtBu$  (3.22 g, 28.7 mmol, 1.0 Äq.) in Ethanol (14.0 mL) über 70 min langsam zugetropft und über Nacht bei RT gerührt. Nach Fällung mit  $Et_2O$  (15.0 mL) und Filtration wurde der Rückstand viermal mit einer  $Et_2O$  /Ethanol-Lösung (1:1) und dreimal mit  $Et_2O$  gewaschen. Nach Trocknen bei 50 °C *in vacuo* wurde das Produkt (4.25 g, 23.1 mmol, 80%) als farbloser Feststoff erhalten.

**$^1H$ -NMR** (500 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 4.15$  (q,  $J = 7.2$  Hz, 2 H, OEt), 3.34 (q,  $J = 7.3$  Hz, 1 H, 2-CH), 1.29 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3 H, 4- $CH_3$ ), 1.23 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3 H, OEt) ppm.

**$R_f$**  (*n*-Hexan/Aceton 4:1): 0.71.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[110]</sup>

### Ethyl-(5*R*,*E*)-5-hydroxy-2-methyl-3-oxooct-6-enoat (**101**)



**101**

$C_{11}H_{18}O_4$

$M = 214.26 \text{ g/mol}$

Zu einer 0.4 M Lösung des NAGAO-Aldolprodukts **137** (0.58 g, 2.14 mmol, 1.0 Äq.) in THF (5.40 mL) wurden  $MgCl_2$  (0.24 g, 2.35 mmol, 1.1 Äq.) und das Kaliumsalz **100** (0.87 g, 4.71 mmol, 2.2 Äq.) gegeben und für 45 min gerührt. Nach Zugabe von Imidazol (0.16 g, 2.35 mmol, 1.1 Äq.) wurde für weitere drei Tage gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit  $EtOAc$  verdünnt und mit 0.5 M  $HCl$  gewaschen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit  $EtOAc$  ( $3 \times 10.0$  mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges.  $NH_4Cl$ -Lösung gewaschen, getrocknet ( $MgSO_4$ ) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach

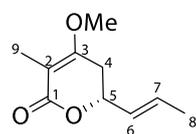
säulenchromatographischer Reinigung ( $\text{SiO}_2$ , *n*-Hexan/EtOAc 4:1) wurde das Produkt (216 mg, 1.01 mmol, 47%) als gelbes Öl erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 5.72 (ddq,  $J$  = 15.2, 6.5, 1.1 Hz, 1H, 7-CH), 5.51 – 5.45 (m, 1H, 6-CH), 4.56 – 4.50 (m, 1H, 5-CH), 4.20 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, OEt), 3.53, 3.53 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 1H 2-CH), 2.82 – 2.68 (m, 2H 4- $\text{CH}_2$ ), 1.69 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 3H, 8- $\text{CH}_3$ ), 1.35, 1.34 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H, 9- $\text{CH}_3$ ), 1.27 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H, OEt) ppm.

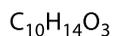
**$R_f$**  (*n*-Hexan/EtOAc 5:1): 0.10.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

(*R,E*)-4-Methoxy-3-methyl-6-(prop-1-en-1-yl)-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-on (**96**)



**96**



$M = 182.22 \text{ g/mol}$

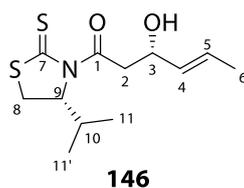
Zu einer 0.1 M Lösung des  $\beta$ -Ketoesters **101** (216 mg, 1.01 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (6.00 mL) wurde  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.28 g, 2.02 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und für 90 min bei RT gerührt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile *in vacuo* wurde der Rückstand in Aceton (6.00 mL) aufgenommen. Anschließend wurde langsam  $\text{Me}_2\text{SO}_4$  (0.19 mL, 2.02 mmol, 2.0 Äq.) zugetropft und für weitere 24 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 0.1 M HCl und EtOAc zum Beenden der Reaktion wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc ( $3 \times 10 \text{ mL}$ ) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung ( $\text{SiO}_2$ , *n*-Hexan/EtOAc 2:1) wurde das Produkt (165 mg, 0.91 mmol, 90%) als gelbes Öl erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 5.86 (ddq,  $J$  = 15.3, 6.5, 1.0 Hz, 1H, 7-CH), 5.61 (ddq,  $J$  = 15.3, 7.0, 1.6 Hz, 1H, 6-CH), 4.77 – 4.71 (m, 1H, 5-CH), 3.77 (s, 3H, OMe), 2.64 – 2.50 (m, 2H, 4- $\text{CH}_2$ ), 1.77 (dd,  $J$  = 2.0, 1.2 Hz, 3H, 9- $\text{CH}_3$ ), 1.73 (ddd,  $J$  = 6.6, 1.6, 0.7 Hz, 3H, 8- $\text{CH}_3$ ) ppm.

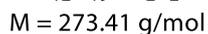
**$R_f$**  (*n*-Hexan/EtOAc 2:1): 0.32.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

(*S,E*)-3-Hydroxy-1-((*R*)-4-isopropyl-2-thioxothiazolidin-3-yl)-hex-4-en-1-on (**146**)



**146**



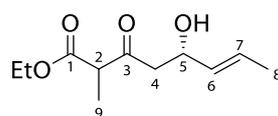
Eine 0.1 M Lösung des acetylierten (*R*)-NAGAO-Auxiliars **144** (3.95 g, 19.4 mmol, 1.1 Äq.) in  $CH_2Cl_2$  (200 mL) wurde auf  $-78^\circ C$  abgekühlt. Nach Zugabe von 1 M  $TiCl_4$  in  $CH_2Cl_2$  (19.42 mL, 19.4 mmol, 1.1 Äq.) wurde für 10 min gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von DIPEA (3.96 mL, 23.3 mmol, 1.3 Äq.). Nach einer Stunde rühren wurde eine Lösung von Crotonal (1.44 mL, 17.5 mmol, 1.0 Äq.) in  $CH_2Cl_2$  zugetropft und erneut für eine Stunde gerührt. Nach Zugabe von ges.  $NH_4Cl$ -Lösung zum Beenden der Reaktion wurde unter Erwärmen auf RT für 1 h gerührt. Darauf wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit  $CH_2Cl_2$  (4  $\times$  250 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet ( $MgSO_4$ ) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach mehrmaliger säulenchromatographischer Reinigung ( $SiO_2$ , *n*-Hexan/ $EtOAc$  4:1 und  $SiO_2$ , *n*-Pentan/ $EtOAc$  2:1) wurde das Produkt (3.86 g, 14.12 mmol, 80%, *d.r.* 20:1) als gelbes Öl erhalten.

**$^1H$ -NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  = 5.76 (ddq,  $J$  = 15.1, 6.5, 1.1 Hz, 1H, 4-CH), 5.59 – 5.53 (m, 1H, 5-CH), 5.18 – 5.13 (m, 1H, 9-CH), 4.63 – 4.59 (m, 1H, 3-CH), 3.61 (dd,  $J$  = 17.6, 2.9 Hz, 1H, 2- $CH_2$ ), 3.52 (dd,  $J$  = 11.5, 8.0 Hz, 1H, 8- $CH_2$ ), 3.29 (dd,  $J$  = 17.7, 9.0 Hz, 1H, 2- $CH_2$ ), 3.02 (dd,  $J$  = 11.5, 1.0 Hz, 1H, 8- $CH_2$ ), 2.37 (dsept,  $J$  = 6.7, 6.9 Hz, 1H, 10-CH), 1.72 – 1.70 (m, 3H, 6- $CH_3$ ), 1.07 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, 11'- $CH_3$ ), 0.98 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, 11- $CH_3$ ) ppm.

**$R_f$**  (*n*-Pentan/ $EtOAc$  2:1): 0.33.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

Ethyl-(5*S*,*E*)-5-hydroxy-2-methyl-3-oxooct-6-enoat (**116**)



**116**

$C_{11}H_{18}O_4$

$M = 214.26 \text{ g/mol}$

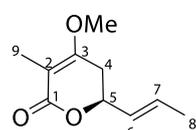
Zu einer 0.4 M Lösung des NAGAO-Aldolprodukts **146** (0.45 g, 1.63 mmol, 1.0 Äq.) in THF (8.20 mL) wurden  $MgCl_2$  (0.17 g, 1.79 mmol, 1.1 Äq.) und das Kaliumsalz **100** (0.66 g, 3.59 mmol, 2.2 Äq.) gegeben und für 45 min gerührt. Nach Zugabe von Imidazol (0.12 g, 1.79 mmol, 1.1 Äq.) wurde für drei Tage gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit EtOAc verdünnt und mit 0.5 M HCl gewaschen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 50.0 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges.  $NH_4Cl$ -Lösung gewaschen, getrocknet ( $MgSO_4$ ) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung ( $SiO_2$ , *n*-Hexan/EtOAc 5:1) wurde das Produkt (0.17 g, 0.79 mmol, 49%) als gelbes Öl erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta = 5.73$  (ddq,  $J = 14.1, 6.5, 1.1$  Hz, 1H, 7-CH), 5.52 – 5.45 (m, 1H, 6-CH), 4.57 – 4.50 (m, 1H, 5-CH), 4.20 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H, OEt), 3.53 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H, 2-CH), 2.84 – 2.68 (m, 2H, 4- $CH_2$ ), 1.71 – 1.68 (m, 3H, 8- $CH_3$ ), 1.35, 1.34 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H, 9- $CH_3$ ), 1.27 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, OEt) ppm.

**R<sub>f</sub>**(*n*-Hexan/EtOAc 5:1): 0.10.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

(*S*,*E*)-4-Methoxy-3-methyl-6-(prop-1-en-1-yl)-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-on (**142**)



**142**

$C_{10}H_{14}O_3$

$M = 182.22 \text{ g/mol}$

Zu einer 0.1 M Lösung des  $\beta$ -Ketoesters **116** (170 mg, 0.79 mmol, 1.0 Äq.) in MeOH (4.00 mL) wurde  $K_2CO_3$  (220 mg, 1.58 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und für 90 min bei RT gerührt. Nach Entfernen flüchtiger Bestandteile *in vacuo*, wurde der zurückgebliebene Rückstand in Aceton (4.00 mL) aufgenommen und anschließend  $Me_2SO_4$  (0.15 mL, 1.58 mmol, 2.0 Äq.) zugetropft und für 24 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.1 M HCl und EtOAc beendet.

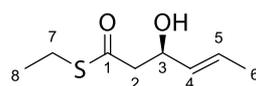
Die Phasen wurden separiert und die wässrige Phase mit EtOAc (3 × 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, *n*-Hexan/EtOAc 2:1) wurde das Produkt **142** (0.13 g, 0.71 mmol, 90%) als gelbes Öl erhalten.

**R<sub>f</sub>**(*n*-Hexan/EtOAc 2:1): 0.33.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 5.86 (ddq, *J* = 15.2, 6.5, 1.0 Hz, 1H, 7-CH), 5.61 (ddq, *J* = 15.3, 6.9, 1.6 Hz, 1H, 6-CH), 4.77 – 4.70 (m, 1H, 5-CH), 3.78 (s, 3H, 10-CH<sub>3</sub>), 2.65 – 2.50 (m, 2H, 4-CH<sub>2</sub>), 1.78 (dd, *J* = 1.9, 1.2 Hz, 3H, 9-CH<sub>3</sub>), 1.74 (ddd, *J* = 6.6, 1.6, 0.7 Hz, 3H, 8-CH<sub>3</sub>) ppm.

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen des Epimers der Literatur.<sup>[1]</sup>

#### S-ethyl-(*R,E*)-3-hydroxyhex-4-enethioat (**147**)



**147**

C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>S

M = 174.26 g/mol

Nach Abkühlen einer Ethanthiollösung (790 μL, 11.0 mmol, 3.0 Äq.) in THF (17.0 mL) auf 0 °C wurde 2.5 M *n*-BuLi in THF (440 μL, 1.10 mmol, 0.3 Äq.) zugetropft und die Reaktion für 1 h gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe einer Lösung von **137** (1.00 g, 3.66 mmol, 1.0 Äq.) in THF (20.0 mL) und es wurde erneut für 1.5 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung beendet und auf RT erwärmt. Nach verdünnen mit H<sub>2</sub>O wurden die entstandenen Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Et<sub>2</sub>O (3 × 30.0 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, *n*-Hexan/EtOAc 5:1 and *n*-Hexan/EtOAc 9:1) wurde das Produkt **147** (460 mg, 2.64 mmol, 72%) als leicht braunes Öl erhalten.

**R<sub>f</sub>**(*n*-Hexan/EtOAc 9:1): 0.10.

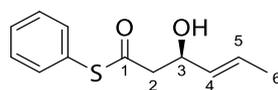
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 5.74 (ddq, *J* = 15.5, 6.7, 1.1 Hz, 1H, 5-CH), 5.48 (ddq, *J* = 15.5, 6.7, 1.5 Hz, 1H, 4-CH), 4.55 – 4.51 (m, 1H, 3-CH), 2.90 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, 7-CH<sub>2</sub>), 2.75 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, 2-CH<sub>2</sub>), 1.70 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 6-CH<sub>3</sub>), 1.26 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, 8-CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 199.2 (q, 1-C), 131.7 (t, 4-CH), 127.9 (t, 5-CH), 69.7 (t, 3-CH), 50.8 (s, 2-CH<sub>2</sub>), 23.6 (s, 7-CH<sub>2</sub>), 17.8 (p, 6-CH<sub>3</sub>), 14.8 (p, 8-CH<sub>3</sub>) ppm.

**HRMS** [ESI]  $m/z$  für  $C_8H_{15}O_2S$   $[M+H]^+$ : ber. 175.0787, gef. 175.0785.

$[\alpha]_D^{22}$ : +7.96 ( $c = 1.0, CH_2Cl_2$ ).

S-phenyl-(*R,E*)-3-hydroxyhex-4-enethioat (**148**)



**148**

$C_{12}H_{14}O_2S$

$M = 222.30 \text{ g/mol}$

Nach Abkühlen einer Thiophenollösung (1.06 mL, 10.4 mmol, 3.0 Äq.) in THF (15.0 mL) auf 0 °C wurde 2.5 M *n*-BuLi in THF (410  $\mu$ L, 1.04 mmol, 0.3 Äq.) zugetropft und die Reaktion für 1 h gerührt. Nach Zugabe einer Lösung von **137** (950 mg, 3.47 mmol, 1.0 Äq.) in THF (20.0 mL) wurde erneut für 1.5 h gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von ges.  $NH_4Cl$ -Lösung beendet und auf RT erwärmt. Nach Verdünnen mit  $H_2O$  wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit  $Et_2O$  (3  $\times$  30.0 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet ( $MgSO_4$ ) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung ( $SiO_2$ , *n*-Hexan/ $EtOAc$  5:1 and *n*-Hexan/ $EtOAc$  9:1) wurde das Produkt **148** (320 mg, 1.44 mmol, 42%) als leicht braunes Öl erhalten.

$R_f$  (*n*-Hexan/ $EtOAc$  9:1): 0.15.

**$^1H$ -NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta = 7.44 - 7.40$  (m, 5H, Ph), 5.76 (ddq,  $J = 15.2, 6.5, 1.1$  Hz, 1H, 5-CH), 5.52 (ddq,  $J = 15.3, 6.7, 1.6$  Hz, 1H, 4-CH), 4.57 (dq,  $J = 6.5, 0.9$  Hz, 1H, 3-CH), 2.89 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, 2- $CH_2$ ), 2.88 (s, 1H, 2- $CH_2$ ), 2.54 (br.s, 1H, OH), 1.71 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, 6- $CH_3$ ) ppm.

**$^{13}C$ -NMR** (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta = 197.4$  (q, 1-C), 134.6 (t, Ph), 131.5 (t, 4-CH), 129.8 (t, Ph), 129.4 (t, Ph), 128.1 (t, 5-CH), 127.3 (q, 7-C), 69.6 (t, 3-CH), 50.4 (s, 2- $CH_2$ ), 17.8 (p, 6- $CH_3$ ) ppm.

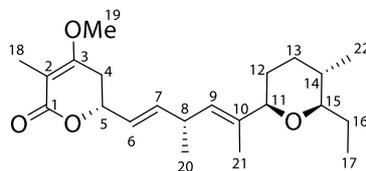
**HRMS** [ESI]  $m/z$  für  $C_{12}H_{13}OS$   $[M-H_2O+H]^+$ : ber. 205.0682, gef. 205.0687.

$[\alpha]_D^{22}$ : +8.0 ( $c = 1.0, CH_2Cl_2$ ).

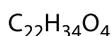
## 7.1.2.5 Olefin-Kreuzmetathesen & finale Stufen

### 7.1.2.5.1 Jerangolid E & Derivate 35, 44, 155-160

#### Jerangolid E (35)



**35**



M = 362.51 g/mol

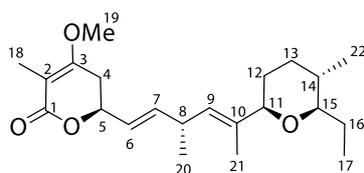
Zu einer 0.5 M Lösung des (*E*)-Alkens **111** (10.1 mg, 45.4  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) in  $\text{C}_7\text{F}_8$  (200  $\mu\text{L}$ ) wurde das Lacton **96** (16.5 mg, 90.8  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde mittels Argons entgast. Nach Zugabe des GRELA-Katalysators **113** (1.80 mg, 2.70  $\mu\text{mol}$ , 6.00 mol%) und Rühren für 1.5 h bei 65 °C wurde die Reaktion durch erneute Katalysatorzugabe reaktiviert und für weitere 1.5 h gerührt. Nach Abkühlen und folgender säulenchromatographischer Reinigung ( $\text{SiO}_2$ , *n*-Hexan/EtOAc 5:1) wurde das Produkt **35** (5.80 mg, 16.0  $\mu\text{mol}$ , 23%) als gelbliches Öl erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 5.78 (ddd,  $J$  = 15.6, 6.1, 1.0 Hz, 1H, 7-CH), 5.52 (ddd,  $J$  = 15.5, 6.7, 1.5 Hz, 1H, 6-CH), 5.23 – 5.21 (m, 1H, 9-CH), 4.75 – 4.71 (m, 1H, 5-CH), 3.78 (s, 3H, 19- $\text{CH}_3$ ), 3.60 (br. d,  $J$  = 11.0 Hz, 1H, 11-CH), 3.17 – 3.09 (m, 1H, 8-CH), 2.94 – 2.87 (m, 1H, 15-CH), 2.62 – 2.50 (m, 2H, 4- $\text{CH}_2$ ), 1.83 – 1.79 (m, 1H, 13- $\text{CH}_2$ ), 1.78 – 1.78 (m, 3H, 18- $\text{CH}_3$ ), 1.73 – 1.67, 1.63 – 1.61 (m, 2H, 12- $\text{CH}_2$ , 16- $\text{CH}_2$ ), 1.64 (d,  $J$  = 1.2 Hz, 3H, 21- $\text{CH}_3$ ), 1.47 – 1.38 (m, 2H, 12- $\text{CH}_2$ , 16- $\text{CH}_2$ ), 1.36 – 1.30 (m, 1H, 14-CH), 1.25 – 1.16 (m, 1H, 13- $\text{CH}_2$ ), 1.08 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, 20- $\text{CH}_3$ ), 0.95 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H, 17- $\text{CH}_3$ ), 0.81 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, 22- $\text{CH}_3$ ) ppm.

**R<sub>f</sub>**(*n*-Hexan/EtOAc 5:1): 0.23.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.<sup>[1]</sup>

## 5-*epi*-Jerangolid E (**155**)



**155**

$C_{22}H_{34}O_4$

$M = 362.51 \text{ g/mol}$

Zu einer 0.5 M Lösung des (*E*)-Alkens **111** (7.50 mg, 33.7  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) in  $C_7F_8$  (150  $\mu\text{L}$ ) wurde das Lacton **142** (15.3 mg, 84.0  $\mu\text{mol}$ , 2.5 Äq.) zugegeben und die Lösung mittels Argons entgast. Nach Zugabe des GRELA-Katalysators **113** (1.34 mg, 2.00  $\mu\text{mol}$ , 6.00 mol%) und Rühren für 1.5 h bei 65 °C wurde die Reaktion durch erneute Katalysatorzugabe reaktiviert und für weitere 1.5 h gerührt. Nach Abkühlen und folgender säulenchromatographischer Reinigung ( $\text{SiO}_2$ , *n*-Hexan/EtOAc 5:1) wurde das Produkt **155** (3.50 mg, 9.65  $\mu\text{mol}$ , 29%) als gelbliches Öl erhalten.

$R_f$  (*n*-Hexan/EtOAc 5:1): 0.23.

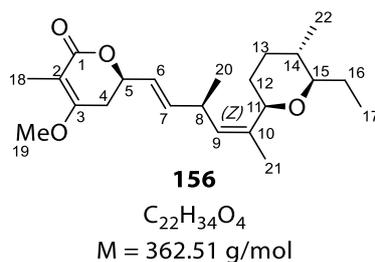
**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 5.77$  (ddd,  $J = 15.5, 6.4, 1.0$  Hz, 1H, 7-CH), 5.53 (ddd,  $J = 15.5, 6.9, 1.4$  Hz, 1H, 6-CH), 5.25 – 5.21 (m, 1H, 9-CH), 4.77 – 4.71 (m, 1H, 5-CH), 3.78 (s, 3H, 19- $\text{CH}_3$ ), 3.59 (br. d,  $J = 10.9$  Hz, 1H, 11-CH), 3.17 – 3.09 (m, 1H, 8-CH), 2.91 (ddd,  $J = 10.3, 7.7, 2.9$  Hz, 1H, 15-CH), 2.64 – 2.49 (m, 2H, 4- $\text{CH}_2$ ), 1.83 – 1.80 (m, 1H, 13- $\text{CH}_2$ ), 1.78 (dd,  $J = 1.9, 1.1$  Hz, 3H, 18- $\text{CH}_3$ ), 1.74 – 1.66, 1.63 – 1.61 (m, 2H, 12- $\text{CH}_2$ , 16- $\text{CH}_2$ ), 1.65 (d,  $J = 1.2$  Hz, 3H, 21- $\text{CH}_3$ ), 1.48 – 1.41 (m, 2H, 12- $\text{CH}_2$ , 16- $\text{CH}_2$ ), 1.39 – 1.34 (m, 1H, 14-CH), 1.22 – 1.18 (m, 1H, 13- $\text{CH}_2$ ), 1.06 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, 20- $\text{CH}_3$ ), 0.95 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H, 17- $\text{CH}_3$ ), 0.82 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, 22- $\text{CH}_3$ ) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 168.5$  (q, 1-C), 165.3 (q, 3-C), 139.8 (t, 7-CH), 136.8 (q, 10-C), 127.3 (t, 9-CH), 124.9 (t, 6-CH), 103.7 (q, 2-C), 84.5 (t, 15-CH), 81.8 (t, 11-CH), 75.4 (t, 5-CH), 55.6 (p, 19- $\text{CH}_3$ ), 34.8 (t, 8-CH), 34.4 (t, 14-CH), 33.3 (s, 13- $\text{CH}_2$ ), 30.9 (s, 12- $\text{CH}_2$ ), 29.9 (s, 4- $\text{CH}_2$ ), 26.1 (s, 16- $\text{CH}_2$ ), 20.7 (p, 20- $\text{CH}_3$ ), 17.9 (p, 22- $\text{CH}_3$ ), 13.5 (p, 21- $\text{CH}_3$ ), 9.7 (p, 17- $\text{CH}_3$ ), 9.0 (p, 18- $\text{CH}_3$ ) ppm.

**HRMS** [ESI]  $m/z$  für  $C_{22}H_{35}O_4$  [M+H] $^+$ : ber. 363.2520, gef. 363.2523.

$[\alpha]_D^{22}$ : +4.30 ( $c = 0.3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

## 9-(*Z*)-jerangolid E (**156**)



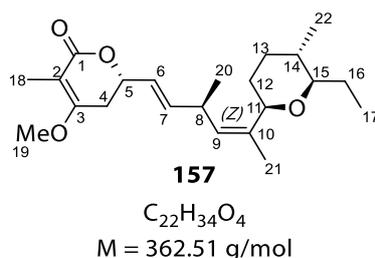
Zu einer 0.5 M Lösung des (*Z*)-Alkens **112** (10.6 mg, 47.6  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}$ q.) in  $C_7F_8$  (200  $\mu\text{L}$ ) wurde das Lacton **96** (17.3 mg, 95.0  $\mu\text{mol}$ , 2.5  $\text{\AA}$ q.) zugegeben und die Lösung mittels Argons entgast. Nach Zugabe des GRELA-Katalysators **113** (1.94 mg, 2.90  $\mu\text{mol}$ , 6.00 mol%) und Rühren für 1.5 h bei 65 °C wurde die Reaktion durch erneute Katalysatorzugabe reaktiviert und für weitere 1.5 h gerührt. Nach Abkühlen und folgender säulenchromatographischer Reinigung ( $\text{SiO}_2$ , *n*-Hexan/EtOAc 5:1) wurde das Produkt **156** (6.50 mg, 17.9  $\mu\text{mol}$ , 38%) als gelbliches Öl erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5.82$  (ddd,  $J = 15.6, 5.4, 0.9$  Hz, 1H, 7-H), 5.57 (ddd,  $J = 15.6, 6.6, 1.6$  Hz, 1H, 6-CH), 4.96 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, 9-CH), 4.76 – 4.72 (m, 1H, 5-CH), 4.05 (dd,  $J = 11.3, 2.0$  Hz, 1H, 11-CH), 3.78 (s, 3H, 19- $\text{CH}_3$ ), 3.29 – 3.22 (m, 1H, 8-CH), 2.93 – 2.89 (m, 1H, 15-CH), 2.63 – 2.51 (m, 2H, 4- $\text{CH}_2$ ), 1.78 (m, 3H, 18- $\text{CH}_3$ ), 1.71 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, 21- $\text{CH}_3$ ), 1.69 – 1.64 (m, 1H, 13- $\text{CH}_2$ ), 1.61 – 1.53 (m, 2H, 12- $\text{CH}_2$ ), 1.46 – 1.32 (m, 3H, 13- $\text{CH}_2$ , 14-H, 16- $\text{CH}_2$ ), 1.26 – 1.18 (m, 1H, 16- $\text{CH}_2$ ), 1.04 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, 20- $\text{CH}_3$ ), 0.91 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H, 17- $\text{CH}_3$ ), 0.81 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, 22- $\text{CH}_3$ ) ppm.

**R<sub>f</sub>**: (*n*-Hexan:EtOAc / 5:1) = 0.36.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.<sup>[1]</sup>

## 5-*epi*-9-(*Z*)-jerangolid E (**157**)



Zu einer 0.5 M Lösung des (*Z*)-Alkens **112** (11.6 mg, 52.0  $\mu\text{mol}$ , 1.0  $\text{\AA}$ q.) in  $C_7F_8$  (150  $\mu\text{L}$ ) wurde das Lacton **142** (23.7 mg, 130  $\mu\text{mol}$ , 2.5  $\text{\AA}$ q.) zugegeben und die Lösung mittels Argons entgast.

Nach Zugabe des GRELA-Katalysators **113** (2.10 mg, 3.12  $\mu\text{mol}$ , 6.00 mol%) und Rühren für 1.5 h bei 65 °C wurde die Reaktion durch erneute Katalysatorzugabe reaktiviert und für weitere 1.5 h gerührt. Nach Abkühlen und folgender säulenchromatographischer Reinigung ( $\text{SiO}_2$ , *n*-Hexan/EtOAc 5:1) wurde das Produkt **157** (8.20 mg, 22.0  $\mu\text{mol}$ , 42%) als gelbliches Öl erhalten.

$R_f$  (*n*-Hexan/EtOAc 5:1): 0.25.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 5.80 (ddd,  $J$  = 15.9, 5.3, 1.5 Hz, 1H, 7-CH), 5.56 (ddd,  $J$  = 15.6, 6.6, 1.6 Hz, 1H, 6-CH), 4.98 – 4.96 (m, 1H, 9-CH), 4.77 – 4.71 (m, 1H, 5-CH), 4.10 – 4.03 (m, 1H, 11-CH), 3.78 (s, 3H, 19- $\text{CH}_3$ ), 3.28 – 3.20 (m, 1H, 8-CH), 2.91 (ddd,  $J$  = 10.5, 7.5, 3.9 Hz, 1H, 15-CH), 2.64 – 2.50 (m, 2H, 4- $\text{CH}_2$ ), 1.83 – 1.79 (m, 1H, 13- $\text{CH}_2$ ), 1.79 – 1.77 (m, 3H, 18- $\text{CH}_3$ ), 1.71 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 3H, 21- $\text{CH}_3$ ), 1.68 – 1.51 (m, 2H, 12- $\text{CH}_2$ , 16- $\text{CH}_2$ ), 1.48 – 1.40 (m, 2H, 12- $\text{CH}_2$ , 16- $\text{CH}_2$ ), 1.39 – 1.34 (m, 1H, 14-CH), 1.27 – 1.18 (m, 1H, 13- $\text{CH}_2$ ), 1.03 (dd,  $J$  = 6.8, 3.3 Hz, 3H, 20- $\text{CH}_3$ ), 0.91 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 3H, 17- $\text{CH}_3$ ), 0.80 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H, 22- $\text{CH}_3$ ) ppm.

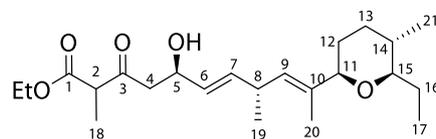
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 168.5 (q, 1-C), 165.3 (q, 3-C), 139.9 (t, 7-CH), 136.9 (q, 10-C), 129.5 (t, 9-CH), 125.0 (t, 6-CH), 103.7 (q, 2-C), 84.1 (t, 15-CH), 76.8 (t, 11-CH), 75.3 (t, 5-CH), 55.6 (p, 19- $\text{CH}_3$ ), 34.1 (t, 8-CH), 33.8 (t, 14-CH), 33.2 (s, 13- $\text{CH}_2$ ), 30.7 (s, 12- $\text{CH}_2$ ), 29.8 (s, 4- $\text{CH}_2$ ), 25.9 (s, 16- $\text{CH}_2$ ), 20.7 (p, 20- $\text{CH}_3$ ), 19.5 (p, 21- $\text{CH}_3$ ), 17.9 (p, 22- $\text{CH}_3$ ), 9.3 (p, 17- $\text{CH}_3$ ), 9.0 (p, 18- $\text{CH}_3$ ) ppm.

**HRMS** [ESI]  $m/z$  für  $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{O}_4$  [M+H] $^+$ : ber. 363.2520, gef. 363.2517.

$[\alpha]_D^{22}$ : +85.86 ( $c$  = 0.58,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

#### 7.1.2.5.2 Projerangolid (44)

Ethyl-(5*R*,6*E*,8*R*,9*E*)-10-((2*R*,5*S*,6*R*)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-5-hydroxy-2,8-dimethyl-3-oxoundeca-6,9-dienoat (**115**)



**115**

$\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{O}_5$   
 $M = 394.55 \text{ g/mol}$

Zu einer 0.5 M Lösung des (*E*)-Alkens **111** (8.60 mg, 39.0  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) in  $\text{C}_7\text{F}_8$  (100  $\mu\text{L}$ ) wurde der Ester **101** (20.8 mg, 97.0  $\mu\text{mol}$ , 2.5 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde mittels Argons entgast. Nach Zugabe des GRELA-Katalysators **113** (1.54 mg, 2.30  $\mu\text{mol}$ , 6.00 mol%) und Rühren für 1.5 h

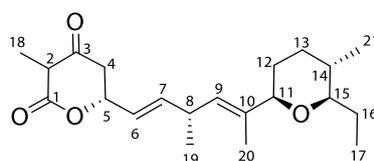
bei 65 °C wurde die Reaktion durch erneute Katalysatorzugabe reaktiviert und für weitere 1.5 h gerührt. Nach Abkühlen und folgender säulenchromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, *n*-Hexan/EtOAc 5:1) wurde das Produkt **44** (6.00 mg, 15.0 μmol, 39%) als gelbliches Öl erhalten.

**R<sub>f</sub>**(*n*-Hexan/EtOAc 5:1): 0.25.

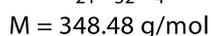
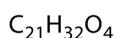
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 5.68 – 5.62 (m, 1H, 7-CH), 5.43 – 5.38 (m, 1H, 6-CH), 5.24 – 5.19 (m, 1H, 9-CH), 4.57 – 4.50 (m, 1H, 5-CH), 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OEt), 3.58 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, 11-CH), 3.52 (q, *J* = 7.1, 1H, 2-CH), 3.11 – 3.04 (m, 1H, 8-CH), 2.92 – 2.88 (m, 1H, 15-CH), 2.81 – 2.68 (m, 2H, 4-CH<sub>2</sub>), 1.81 – 1.75 (m, 1H, 13-CH<sub>2</sub>), 1.72 – 1.65 (m, 1H, 12-CH<sub>2</sub>), 1.63 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H, 20-CH<sub>3</sub>), 1.62 – 1.59 (m, 1H, 12-CH<sub>2</sub>), 1.47 – 1.37 (m, 2H, 16-CH<sub>2</sub>), 1.36 – 1.32, (m, 3H, 14-CH, 18-CH<sub>3</sub>), 1.29 – 1.26 (m, 4H, 13-CH<sub>2</sub>, OEt), 1.04 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 0.95 (dd, *J* = 7.4, 7.4 Hz, 3H, 17-CH<sub>3</sub>), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 21-CH<sub>3</sub>) ppm.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>[1]</sup>

#### Projerangolid (**44**)



**44**



Eine 0.5 M Lösung des Metatheseprodukts **115** (6.00 mg, 15.0 μmol, 1.0 Äq.) in MeOH (300 μL) wurde auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4.15 mg, 30.0 μmol, 2.0 Äq.) zugegeben und für eine Stunde bei 0 °C gerührt. Die folgende Aufarbeitung erfolgte dauerhaft bei 0 °C. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc (4 × 5.00 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt (<10 °C Wasserbadtemperatur, -20 °C Vorlagetemperatur), wodurch das Produkt (3.00 mg, 8.60 μmol, 57%) als farbloses Öl erhalten wurde.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 5.84 (ddd, *J* = 15.5, 5.6, 0.9 Hz, 1H, 7-CH), 5.50 (ddd, *J* = 15.5, 6.7, 1.6 Hz, 1H, 6-CH), 5.23 – 5.20 (m, 1H, 9-CH), 5.16 – 5.12 (m, 1H, 5-CH), 3.61 (br. d, *J* = 11.4, 1H, 11-CH), 3.56 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, 2-CH), 3.19 – 3.12 (m, 1H, 8-CH), 2.90 (ddd, *J* = 9.8, 6.9, 3.0 Hz, 1H, 15-

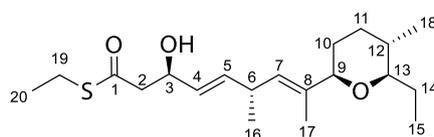
CH), 2.76 (dd,  $J = 19.0, 3.0$  Hz, 1H, 4-CH<sub>2</sub>), 2.55 (dd,  $J = 19.0, 11.7$  Hz, 1H, 4-CH<sub>2</sub>), 1.83 – 1.76 (m, 2H, 12-CH<sub>2</sub>, 16-CH<sub>2</sub>), 1.72 – 1.75 (m, 2H, 12-CH<sub>2</sub>, 16-CH<sub>2</sub>), 1.64 (d,  $J = 1.4$  Hz, 3H, 20-CH<sub>3</sub>), 1.46 – 1.40 (m, 2H, 13-CH<sub>2</sub>, 14-CH), 1.36 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1.35 – 1.32 (m, 1H, 13-CH<sub>2</sub>), 1.06 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 0.95 (dd,  $J = 7.4, 7.4$  Hz, 3H, 17-CH<sub>3</sub>), 0.81 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, 21-CH<sub>3</sub>).

**R<sub>f</sub>** (*n*-Hexan/EtOAc 5:1): 0.23.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein.<sup>[1]</sup>

### 7.1.2.5.3 Heptaketide **158-160**

*S*-ethyl-(3*R*,4*E*,6*R*,7*E*)-8-((2*R*,5*S*,6*R*)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-3-hydroxy-6-methylnona-4,7-dienethioat (**158**)



**158**

$C_{20}H_{34}O_3S$   
 $M = 354.55$  g/mol

Zu einer 0.5 M Lösung des (*E*)-Alkens **111** (10.0 mg, 45.0  $\mu$ mol, 1.0 Äq.) in C<sub>7</sub>F<sub>8</sub> (120  $\mu$ L) wurde der Thioester **147** (19.6 mg, 112  $\mu$ mol, 2.5 Äq.) zugegeben und die Lösung mittels Argons entgast. Nach Zugabe des GRELA-Katalysators **113** (1.81 mg, 2.70  $\mu$ mol, 6.00 mol%) und Rühren für 1.5 h bei 65 °C wurde die Reaktion durch erneute Katalysatorzugabe reaktiviert und für weitere 1.5 h gerührt. Nach Abkühlen und folgender säulenchromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, *n*-Hexan/EtOAc 5:1) wurde das Produkt **158** (6.20 mg, 18  $\mu$ mol, 39%) als leicht braunes Öl erhalten.

**R<sub>f</sub>** (*n*-Hexan/EtOAc 5:1): 0.40.

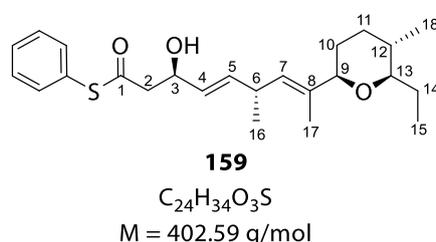
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 5.65$  (ddd,  $J = 15.8, 6.3, 1.1$  Hz, 1H, 5-CH), 5.41 (ddd,  $J = 15.5, 6.6, 1.4$  Hz, 1H, 4-CH), 5.22 – 5.20 (m, 1H, 7-CH), 4.56 – 4.51 (m, 1H, 3-CH), 3.59 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H, 9-CH), 3.12 – 3.04 (m, 1H, 6-CH), 2.93 – 2.87 (m, 3H, 2-CH<sub>2</sub>, 13-CH), 2.77 – 2.73 (m, 2H, 19-CH<sub>2</sub>), 1.79 (ddd,  $J = 13.0, 6.7, 3.2$  Hz, 1H, 11-CH<sub>2</sub>), 1.73 – 1.65 (m, 1H, 14-CH<sub>2</sub>), 1.64 (d,  $J = 1.3$  Hz, 3H, 17-CH<sub>3</sub>), 1.62 – 1.60 (m, 1H, 10-CH<sub>2</sub>), 1.46 – 1.39 (m, 2H, 10-CH<sub>2</sub>, 14-CH<sub>2</sub>), 1.38 – 1.29 (m, 1H, 12-CH), 1.28 – 1.24 (m, 4H, 16-CH<sub>3</sub>, 11-CH<sub>2</sub>), 1.05 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, 16-CH<sub>3</sub>), 0.95 (dd,  $J = 7.4, 7.4$  Hz, 3H, 15-CH<sub>3</sub>), 0.80 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, 18-CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 199.0 (q, 1-C), 137.0 (t, 5-CH), 136.5 (q, 19-C), 128.2 (t, 4-CH), 127.9 (t, 7-CH), 127.9 (q, 8-C), 84.4 (t, 13-CH), 82.0 (t, 9-CH), 69.8 (t, 3-CH), 50.9 (s, 2-CH<sub>2</sub>), 34.6 (t, 6-CH), 34.3 (t, 12-CH), 33.3 (s, 11-CH<sub>2</sub>), 30.9 (s, 10-CH<sub>2</sub>), 26.0 (s, 14-CH<sub>2</sub>), 23.6 (s, 19-CH<sub>2</sub>), 20.8 (p, 16-CH<sub>3</sub>), 17.9 (p, 18-CH<sub>3</sub>), 14.8 (p, 20-CH<sub>3</sub>), 13.3 (p, 17-CH<sub>3</sub>), 9.6 (p, 15-CH<sub>3</sub>) ppm.

HRMS [ESI] *m/z* für C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>O<sub>3</sub>S [M-H]<sup>-</sup>: ber. 353.2145, gef. 353.2022.

[α]<sub>D</sub><sup>22</sup>: +59.68 (c = 0.62, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

*S*-phenyl-(3*R*,4*E*,6*R*,7*E*)-8-((2*R*,5*S*,6*R*)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-3-hydroxy-6-methylnona-4,7-dienethioat (**159**)



Zu einer 0.5 M Lösung des (*E*)-Alkens **111** (13.0 mg, 58.0 μmol, 1.0 Äq.) in C<sub>7</sub>F<sub>8</sub> (150 μL) wurde der Thioester **148** (32.2 mg, 145 μmol, 2.5 Äq.) zugegeben und die Lösung mittels Argons entgast. Nach Zugabe des GRELA-Katalysators **113** (2.35 mg, 3.50 μmol, 6.00 mol%) und Rühren für 1.5 h bei 65 °C wurde die Reaktion durch erneute Katalysatorzugabe reaktiviert und für weitere 1.5 h gerührt. Nach Abkühlen und folgender säulenchromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, *n*-Hexan/EtOAc 5:1) wurde das Produkt **159** (15.6 mg, 39 μmol, 67%) als leicht braunes Öl erhalten.

R<sub>f</sub> (*n*-Hexan/EtOAc 4:1): 0.45.

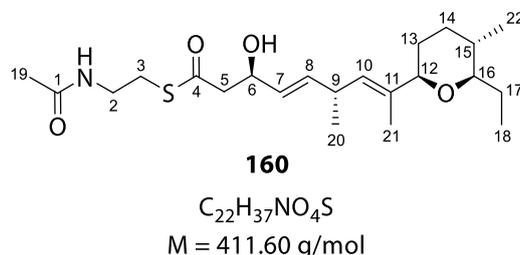
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.43 – 7.41 (m, 5H, Ph), 5.69 (ddd, *J* = 15.5, 6.3, 1.1 Hz, 1H, 5-CH), 5.44 (ddd, *J* = 15.5, 6.5, 1.4 Hz, 1H, 4-CH), 5.24 – 5.21 (m, 1H, 7-CH), 4.61 – 4.54 (m, 1H, 3-CH), 3.59 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, 9-CH), 3.14 – 3.06 (m, 1H, 6-CH), 2.94 – 2.85 (m, 3H, 2-CH<sub>2</sub>, 13-CH), 1.79 (ddd, *J* = 13.0, 6.7, 3.7 Hz, 1H, 11-CH<sub>2</sub>), 1.73 – 1.67 (m, 1H, 14-CH<sub>2</sub>), 1.64 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, 17-CH<sub>3</sub>), 1.63 – 1.61 (m, 1H, 10-CH<sub>2</sub>), 1.47 – 1.40 (m, 2H, 10-CH<sub>2</sub>, 14-CH<sub>2</sub>), 1.38 – 1.32 (m, 1H, 12-CH), 1.23 – 1.16 (m, 1H, 11-CH<sub>2</sub>), 1.05 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 16-CH<sub>3</sub>), 0.95 (dd, *J* = 7.4, 7.4 Hz, 3H, 15-CH<sub>3</sub>), 0.81 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 18-CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 197.2 (q, 1-C), 137.2 (t, 5-CH), 136.6 (q, 19-C), 134.6 (t, Ph), 129.8 (t, Ph), 129.4 (t, Ph), 128.1 (t, 4-CH), 127.8 (t, 7-CH), 127.3 (q, 8-C), 84.4 (t, 13-CH), 81.9 (t, 9-CH), 69.7 (t, 3-CH), 50.6 (s, 2-CH<sub>2</sub>), 34.6 (t, 6-CH), 34.3 (t, 12-CH), 33.3 (s, 11-CH<sub>2</sub>), 30.9 (s, 10-CH<sub>2</sub>), 26.0 (s, 14-CH<sub>2</sub>), 20.8 (p, 16-CH<sub>3</sub>), 17.9 (p, 18-CH<sub>3</sub>), 13.3 (p, 17-CH<sub>3</sub>), 9.6 (p, 15-CH<sub>3</sub>) ppm.

HRMS [ESI] *m/z* für C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>O<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: ber. 403.2301, gef. 403.2289.

[α]<sub>D</sub><sup>22</sup>: +36.47 (c = 0.85, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

*S*-(2-acetamidoethyl)-(3*R*,4*E*,6*R*,7*E*)-8-((2*R*,5*S*,6*R*)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-3-hydroxy-6-methylnona-4,7-dienethioat (**160**)



Zu einer 0.05 M Lösung des Thioesters **159** (7.75 mg, 19.3 μmol, 1.0 Äq.) in MeCN (400 μL) wurde HSNAC **161** (6.91 mg, 58.0 μmol, 3.0 Äq.) und DIPEA (5 μL, 30.0 μmol, 1.6 Äq.) zugegeben und die Reaktion für 4 h bei RT gerührt. Nach beenden der Reaktion durch Zugabe von CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O und ges. NaCl-Lösung wurden die entstandenen Phasen getrennt und die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 5.00 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO<sub>4</sub>) und flüchtige Bestandteile anschließend *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (195 mg [Cu] × SiO<sub>2</sub>, EtOAc and SiO<sub>2</sub>, EtOAc) wurde das Rohprodukt als gelbliches Öl erhalten. Anschließende Reinigung via RP-HPLC (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 95:5 → 5:95 {20 min}, H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 5:95 {5 min}, 20 mL/min) lieferte das Produkt **160** (1.10 mg, 2.67 μmol, 13%) als farbloses Öl.

R<sub>f</sub> (EtOAc): 0.28.

t<sub>R</sub>: 11.14 min

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 5.78 (br.s, 1H, NH), 5.67 (ddd, *J* = 15.5, 6.3, 1.1 Hz, 1H, 8-CH), 5.41 (ddd, *J* = 15.5, 6.6, 1.4 Hz, 1H, 7-CH), 5.22 – 5.20 (m, 1H, 10-CH), 4.58 – 4.52 (m, 1H, 6-CH), 3.60 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, 12-CH), 3.49 – 3.41 (m, 2H, 2-CH<sub>2</sub>), 3.12 – 3.00 (m, 3H, 3-CH<sub>2</sub>, 9-CH), 2.93 – 2.88 (m, 1H, 16-CH), 2.82 – 2.73 (m, 2H, 5-CH<sub>2</sub>), 1.97 (s, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 1.79 (ddd, *J* = 13.0, 6.8, 3.7 Hz, 1H, 14-CH<sub>2</sub>), 1.70 (ddd, *J* = 14.1, 7.4, 3.0 Hz, 1H, 17-CH<sub>2</sub>), 1.63 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, 21-CH<sub>3</sub>), 1.62 – 1.60 (m, 1H, 13-CH<sub>2</sub>), 1.46 – 1.39 (m, 2H, 13-CH<sub>2</sub>, 17-CH<sub>2</sub>), 1.37 – 1.31 (m, 1H, 15-CH), 1.24 – 1.15 (m,

---

1H, 14-CH<sub>2</sub>), 1.05 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 20-CH<sub>3</sub>), 0.95 (dd, *J* = 7.4, 7.4 Hz, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 22-CH<sub>3</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 198.9 (q, 4-C), 170.5 (q, 1-C), 137.2 (t, 8-CH), 136.6 (q, 11-C), 128.2 (t, 7-CH), 127.7 (t, 10-CH), 84.5 (t, 16-CH), 81.9 (t, 12-CH), 69.8 (t, 6-CH), 51.2 (s, 5-CH<sub>2</sub>), 39.5 (s, 2-CH<sub>2</sub>), 34.6 (t, 15-CH), 34.4 (t, 9-CH), 33.3 (s, 14-CH<sub>2</sub>), 30.9 (s, 13-CH<sub>2</sub>), 28.9 (s, 3-CH<sub>2</sub>), 26.0 (s, 17-CH<sub>2</sub>), 23.4 (p, 19-CH<sub>3</sub>), 20.8 (p, 10-CH<sub>3</sub>), 17.9 (p, 22-CH<sub>3</sub>), 13.4 (p, 21-CH<sub>3</sub>), 9.6 (p, 18-CH<sub>3</sub>) ppm.

**HRMS** [ESI] *m/z* für C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>4</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: ber. 412.2516, gef. 412.2513.

**[α]<sub>D</sub><sup>22</sup>**: +22.50 (c = 0.4, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

## 7.2 Molekularbiologische & biochemische Arbeiten

### 7.2.1 Material

Für molekularbiologische und biochemische Arbeiten verwendete Gerätschaften und Materialien sind in Tabelle 9-1 und Tabelle 9-2 aufgeführt. Die verwendeten Biochemikalien und Chemikalien, zur Herstellung von Puffern, Medien und Reaktionslösungen, sowie ihre Bezugsquelle, sind in Tabelle 9-3 dargestellt. Das verwendete Reinstwasser wurde nach Aufarbeitung durch das Laborwasserreinigungssystem B30 der Firma ADRONA verwendet. Alle Medien und Puffer für die Bakterienkultivierung wurden vor Benutzung bei 121 °C für 20 min autoklaviert oder sterilfiltriert (0.45 µm, CA). Benötigte Enzyme wurden von THERMOFISHER SCIENTIFIC bezogen und nach Protokoll mit den mitgelieferten Puffern verwendet. Methanol in HPLC-Reinheit wurde für die analytischen UPLC-MS-Messungen benutzt. Reinheit beziehungsweise Qualität sind ebenfalls in Tabelle 9-3 aufgeführt. Für Weiteres siehe Kapitel 9.2.

### 7.2.2 Methoden

#### 7.2.2.1 *in silico*-Experimente

##### Phylogenetischer Baum

Die Vorläuferzustände wurden mithilfe der Maximum-Likelihood-Methode und des JTT-Matrixmodells abgeleitet.<sup>[129]</sup> Der Baum zeigt eine Reihe möglicher Aminosäuren(-zustände) an jedem Vorgängerknoten auf Grundlage ihrer abgeleiteten Wahrscheinlichkeit am ersten Standort. Die Ausgangsbäume für die heuristische Suche wurden automatisch durch

---

Anwendung der Algorithmen *Neighbor-Join* und *BioNJ* auf eine Matrix von paarweisen Abständen, die mit dem JTT-Modell geschätzt wurden, ermittelt und anschließend wurde die Topologie mit dem höchsten log-Likelihood-Wert ausgewählt. Die Raten zwischen den Standorten wurden dabei als einheitlich behandelt (*uniform rates option*). Diese Analyse umfasste 13 Aminosäuresequenzen. Im endgültigen Datensatz waren insgesamt 565 Positionen enthalten. Die evolutionären Analysen wurden in MEGA1 1<sup>[130]</sup> durchgeführt.

### Sequence Similarity Network (SSN)

*Sequence similarity network* der RIESKE-Oxygenase-Proteinfamilie (Pfam: PF00355). Der Datensatz wurde mit dem EFI-EST<sup>[131,132]</sup> (Enzyme Function Initiative Tools - Enzyme Similarity Tool) mit einem Alignment Score von 70 erstellt. Die Daten wurden in CYTOSCAPE V 3.10.0<sup>[133]</sup> als repräsentatives Knotennetzwerk dargestellt, wobei jeder Knoten Proteine mit 50% Sequenzidentität enthält.

### Sequenzvergleich

Die Sequenzvergleiche erfolgten mittels BLAST.<sup>[134]</sup>

### 3D-Proteinmodelle

3D-Proteinstrukturmodelle wurden aus den hinterlegten Proteinsequenzen mit SWISSMODELL<sup>[68]</sup> unter Verwendung des RO SxtT (6WN3) oder des angestammten FMO2 (6SEM) als Vorlagen erstellt, und die Ergebnisse mit PYMOL 2.5 (PYMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC) visualisiert. Der Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) wurde verwendet, um elektrostatische Oberflächenpotentiale abzubilden und mögliche Wechselwirkungsflächen darzustellen (APBS ELEKTRO<sup>[142]</sup>). Die Hohlräume wurden mit dem PYMOL 2.5 Plugin CAVIOMIX (<https://inno-phore.com/cavitomix/>) modelliert. Die Cofaktor-Bindungsstellen wurden mit COACH Protein-Ligand Binding Site Prediction<sup>[143,144]</sup> vorhergesagt.

### 3D-Substratmodelle

3D-Modelle von Jerangolid E (**35**), 9-(Z)-Jerangolid E (**156**) und Projerangolid (**44**) wurden im niedrigsten energetischen Zustand simuliert und mit AVOGADRO dargestellt.

---

## 7.2.2.2 Biochemische und molekularbiologische Arbeiten

### Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

2YT-Medium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl
Kompetenzpuffer I	50 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM Kaliumacetat, pH 6.2
Kompetenzpuffer II	50 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM Kaliumacetat, 20% (v/v) Glycerin, pH 6.2

In einem 15 mL-Reaktionsgefäß wurden 5 mL 2YT-Medium mit *E. coli*-Zellen aus einer Gefrierkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Von dieser Kultur wurde 1 mL entnommen und in einen 250 mL-Erlenmeyerkolben mit Spirale mit 50 mL 2YT-Medium überführt. Die Kultur wurde anschließend bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Nach 3 h wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C und 3500 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 mL eiskaltem Kompetenzpuffer I resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut für 10 min bei 4 °C und 3500 xg zentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 5 mL eiskaltem Kompetenzpuffer II resuspendiert. Die chemisch kompetenten Zellen wurden auf Trockeneis (-78 °C) zu jeweils 50 µL aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

SOC-Medium	0.5% (w/v) Hefeextrakt, 2.0% (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 25 mM MgCl <sub>2</sub> × H <sub>2</sub> O, 1.0% (w/v) Glucose, pH 7.0
2YT-Medium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl
2YT-Agar	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, 16 g/L Agar
Ampicillin	50 mg/mL Ampicillin-Natriumsalz in H <sub>2</sub> O
Kanamycin	60 mg/mL Kanamycin-Monosulfat in H <sub>2</sub> O

Zur Transformation wurden 50 µL chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 1 - 5 µL Plasmid für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 1 min. Die Reaktionen wurden anschließend 10 min auf Eis inkubiert, mit 500 µL SOC-Medium versetzt und bei 37 °C und 300 UpM für 1 h inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 s bei 8000 x g

---

wurden 400 µL des Überstandes verworfen, das Zellpellet in dem verbliebenden Medium resuspendiert und auf 2YT-Agarplatten (25 mL Agar mit 0.1% (v/v) Antibiotikum) ausplattiert. Die nachfolgende Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht.

## Stammhaltung

Glycerin (50% (v/v))            0.5 g/mL Glycerin (99.9%) in H<sub>2</sub>O

Zur Konservierung der Stämme wurden Gefrierkulturen angefertigt. In einem geeigneten Cryoröhrchen wurden 500 µL der Bakterienkultur mit 500 µL Glycerin (50% (v/v) in H<sub>2</sub>O) unter der Sterilbank vermischt und bei -80 °C gelagert.

## Isolation von DNA mithilfe des *QIAprep Miniprep Kits*

Für eine Lagerung bei -20 °C, Klonierungsarbeiten, Transformationen und Sequenzierungen wurde DANN verwendet, die mittels *QIAprep miniprep Kit* isoliert wurde.

Puffer P1                            *QIAprep Miniprep Kit* der Firma QIAGEN

Puffer P2                            *QIAprep Miniprep Kit* der Firma QIAGEN

Puffer N3                            *QIAprep Miniprep Kit* der Firma QIAGEN

RNase I Stammlösung            10 mg/mL RNase I in H<sub>2</sub>O

Zur Plasmid-Isolation wurde das *QIAprep Miniprep Kit* der Firma QIAGEN verwendet. Nach Transformation eines Plasmids in *E. coli* One Shot™ TOP10 wurde eine Kolonie in 6 mL 2YT-Medium mit 6 µL des entsprechenden Antibiotikums in einem 15 mL Reaktionsgefäß bei 37 °C und 180 UpM über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Kultur bei 10000 xg für 10 min zentrifugiert und der erhaltene Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 247.5 µL Puffer P1 resuspendiert, 2.5 µL RNase I zugegeben und in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Nach mehrmaligem Invertieren wurden 250 µL Puffer P2 hinzugegeben und erneut invertiert. Im Anschluss wurde die Lösung mit 350 µL Puffer N3 versetzt und für 10 min bei 13000 xg zentrifugiert. 800 µL des resultierenden Überstandes wurden auf die mitgelieferte Säule gegeben und für 1 min bei 13000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 750 µL Puffer PE auf die Säule gegeben. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 xg für 1 min,

---

wonach der Durchfluss erneut verworfen wurde. Anschließend wurden zur Elution zweimal je 20 µL H<sub>2</sub>O auf die Säule gegeben und nach 1 min bei 13000 xg für 1 min zentrifugiert.

### Reinigung von DNA mithilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits

NTI-Puffer *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* der Firma MACHEREY-NAGEL

NT3-Puffer *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* der Firma MACHEREY-NAGEL

Für die Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen wurde das *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* der Firma MACHEREY-NAGEL verwendet. Die zu reinigende DNA-Probe wurde mit dem doppelten Volumen an NTI-Puffer versetzt und durch Zentrifugation für 1 min bei 11000 xg auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde zwei Mal durch Zugabe von je 700 µL NT3-Waschpuffer und Zentrifugation für 1 min bei 11000 xg gewaschen. Zur kompletten Entfernung der Puffer wurde die Säule nach den Waschschritten 1 min bei 11000 xg zentrifugiert. Zur Elution wurden zweimal je 20 µL H<sub>2</sub>O auf die Säule gegeben und nach 1 min bei 11000 xg für 1 min zentrifugiert.

### Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von linearisierter und zirkulärer DNA erfolgte durch photometrische Analyse bei einer Wellenlänge von 260 nm an einem Plattenlesegerät. Die Reinheit von DNA wurde durch Bildung der Quotienten  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$  und  $\frac{A_{230}}{A_{260}}$  bestimmt.

### Agarosegelelektrophorese

Agarosegel 1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer

TAE-Puffer 40 mM TRIS-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0

Probenpuffer (6X) 10 mM TRIS-HCl, 0.03% (w/v) Bromphenolblau, 0.03% (w/v) Xylencyanol FF, 60% (v/v) Glycerin, 60 mM EDTA, pH 7.6

Fluoreszenz-Farbstoff *Midori Green Advance* der Firma NIPPON GENETICS

DNA-Standard *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* der Firma THERMOFISHER SCIENTIFIC

Zur Analyse von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten wurden native 1%ige Agarosegele verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte hierbei nach ihrer Größe in einer Agarosematrix mittels Anlegens eines elektrischen Feldes. Die Agarose wurde durch Erhitzen in 1x TAE-Puffer und H<sub>2</sub>O gelöst. Nach kurzer Abkühlphase wurde 0.08 µL Fluoreszenz-Farbstoff pro 1 mL Gelvolumen hinzugegeben, das flüssige Gel in den Gelträger der Gelelektrophoresekammer gegeben und für 10 min ausgehärtet. Zur Erstellung der Gelproben wurden die DNA-Proben mit 6x Probenpuffer auf eine 1x Endkonzentration eingestellt. Als Längenmarker dienten 5 µL des DNA-Standards. Die Elektrophorese wurde bei 130 V für 1 h in 1x TAE-Puffer durchgeführt. Durch Interkalation des Farbstoffes in die DNA konnten die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

### Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Amplifikate wurden mit Hilfe von selektiven Primern unter Verwendung der thermostabilen *Phusion® High-Fidelity* DNA-Polymerase über eine Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) erzeugt. Primer für die PCR wurden von SIGMA-ALDRICH (Tabelle 9-5) und die Polymerase von THERMOFISHER SCIENTIFIC bezogen. Die Zusammensetzung der jeweiligen PCR ist in Tabelle 7-1 zu entnehmen.

**Tabelle 7-1.** Standard-PCR unter Verwendung der *Phusion® High-Fidelity* DNA-Polymerase.

Komponente	Volumen [µL]	Endkonzentration
<i>Phusion®</i> -GC-Puffer mit MgSO <sub>4</sub> (5x) oder <i>Phusion®</i> -HF-Puffer	18	1x
10 mM dNTP-Mix	1.8	200 µM
10 µM 5'-Primer	4.5	0.5 µM
10 µM 3'-Primer	4.5	0.5 µM
DNA-Templat	1.9	-
<i>Phusion® High-Fidelity</i> DNA-Polymerase (2 U/µL)	0.9	0.05 U/µL
H <sub>2</sub> O	ad 90	-

Die PCR wurde in einem Thermocycler mit den Konstrukten angepasstem Temperaturprogramm (Tabelle 7-2) durchgeführt.

**Tabelle 7-2.** Standard-Temperaturprotokoll für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten.

Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
1	Initiale Denaturierung	95	180
35	Denaturierung	95	30
	Primerhybridisierung	65 – 72	30

	Elongation	72	30 s/kbp
1	Finale Elongation	72	300
1	Lagerung	4	Bis zur Probenentnahme

## Kolonie-PCR

Einzelkolonien wurden mit Hilfe von selektiven Primern unter Verwendung der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase über eine PCR auf erfolgreiche Ligation und damit Aufnahme des gewünschten Inserts getestet. Primer für die PCR wurden von SIGMA-ALDRICH (Tabelle 9-5) und die Polymerase von THERMOFISHER SCIENTIFIC bezogen. Die Zusammensetzung der benötigten Mischungen für die Kolonie-PCR ist Tabelle 7-3 und Tabelle 7-4 zu entnehmen.

**Tabelle 7-3.** Mischung 1 der Kolonie-PCR unter Verwendung der *Taq*-Polymerase.

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Endkonzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - <i>Taq</i> -Puffer	1	1x
25 mM $\text{MgCl}_2$	0.8	2 mM
Einzelkolonie	Pipettenspitze	-
$\text{H}_2\text{O}$	6.9	-

8.6  $\mu\text{L}$  Mischung 1 wurde für 3 min bei RT inkubiert und anschließend bei 95 °C für 5 min denaturiert. Nach Abkühlen erfolgte die Zugabe von 1.3  $\mu\text{L}$  Mischung 2.

**Tabelle 7-4.** Mischung 2 der Kolonie-PCR unter Verwendung der *Taq*-Polymerase.

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Endkonzentration
10 mM dNTP-Mix	0.2	200 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$ 5'-Primer	0.5	0.5 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$ 3'-Primer	0.5	0.5 $\mu\text{M}$
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (2 U/ $\mu\text{L}$ )	0.1	0.02 U/ $\mu\text{L}$

Die Kolonie-PCR wurden anschließend im Thermocycler mit folgendem Temperaturprotokoll (Tabelle 7-5) durchgeführt.

**Tabelle 7-5.** Standard-Temperaturprotokoll für die Kolonie-PCR.

Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Dauer [s]
1	Initiale Denaturierung	95	180
40	Denaturierung	95	30
	Primerhybridisierung	66	30
	Elongation	100	90 s/kbp
1	Finale Elongation	72	300
1	Lagerung	4	Bis zur Probenentnahme

---

## Enzymatische Hydrolyse von DNA

Zur enzymatischen Restriktion von DNA wurden die Restriktionsendonukleasen FastDigest EcoRI, NotI und NdeI, XhoI von THERMOFISHER SCIENTIFIC verwendet. Die Restriktion wurde bei 37 °C für 5 bis 10 min durchgeführt. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte abschließend bei 80 °C für 5 min (Tabelle 7-6).

**Tabelle 7-6.** Standard-Protokoll für die enzymatische Restriktion von DNA.

Komponenten	Volumen [µL]	Endkonzentration
H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 20	-
Fast-Digest-Puffer (10x)	1.5	1x
DNA	500 ng	25 ng/µL
FastDigest EcoRI oder NotI	0.5	-
FastDigest NdeI oder XhoI	0.5	-
FastDigest DpnI	0.5	(bei linearer syn. DNA)

## Ligation von linearisierter DNA

Die Ligation von linearisierten Plasmiden mit DNA-Fragmenten erfolgte mittels T4-DNA-Ligase von THERMOFISHER SCIENTIFIC bei 4 °C für 24 h oder bei 22 °C für 1 h. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µL mit einer DNA-Menge von 100 ng linearisierter Plasmid-DNA. Das Verhältnis von linearisierter Plasmid-DNA zu DNA-Insert betrug. 1:3, 1:5 oder 1:7 (Tabelle 7-7).

**Tabelle 7-7.** Zusammensetzung für die enzymatische Ligation von linearisierter DNA.

Komponenten	Volumen [µL]	Endkonzentration
T4 DNA-Ligase Puffer (10x)	2	1x
Linearisierte Plasmid-DNA (100 ng/µL)	1	5 ng/µL
DNA-Insert	entsprechend Verhältnis	entsprechend Verhältnis
T4 DNA-Ligase (5 U/µL)	0.5	0.125 U/µL
H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 20	-

Die abgeschlossene Ligation wurde für 10 min bei 65 °C inaktiviert und nach Abkühlen 5 µL des Ansatzes in *E. coli* One Shot™ TOP10 Zellen transformiert und ausplattiert.

## DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden unter Zuhilfenahme der Sequenzierkits *Mix2Seq* EUROFINs oder *Barcode Labels Economy Run* MICROSYNTH AG durchgeführt. Es wurden in einem Sequenziergefäß 15 µL gereinigte Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 50-100 ng/µL

---

vorgelegt und mit 2  $\mu$ L des Sequenzierprimers in einer Konzentration von 10  $\mu$ M versetzt. Die Sequenzierungen erfolgten jeweils in *forward* und *reverse* Richtung und deckten dabei das komplette Gen ab.

### 7.2.2.3 Proteinchemische Arbeiten

#### Vorkulturen

2YT-Medium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl
LB-Medium	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl
Ampicillin	50 mg/mL Ampicillin-Natriumsalz in H <sub>2</sub> O
Kanamycin	60 mg/mL Kanamycin-Monosulfat in H <sub>2</sub> O

Zur Erstellung von Vorkulturen wurden 6-50 mL Medium verwendet. Als Selektionsmarker diente das entsprechende Antibiotikum in einer Konzentration von 0.1% (v/v). Die Vorkulturen wurden mit einer Einzelkolonie oder Gefrierkultur angeimpft und bei 37 °C und 180 UpM über Nacht inkubiert.

#### Expressionskulturen

##### IPTG-induzierte Expressionskulturen

2YT-Medium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl
LB-Medium	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl
Ampicillin	50 mg/mL Ampicillin-Natriumsalz in H <sub>2</sub> O
Kanamycin	60 mg/mL Kanamycin-Monosulfat in H <sub>2</sub> O
IPTG-Lösung	1 M Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid in H <sub>2</sub> O

Zur Proteinproduktion wurden Hauptkulturen mit einer OD<sub>600</sub> von 0.05 erstellt. Dazu wurden jeweils 200 mL Medium mit 0.1% (v/v) Antibiotikum in Kultivierkolben mit Spirale vorgelegt, mit dem entsprechenden Volumen der Vorkultur angeimpft und anschließend bei 37 °C und

---

180 UpM inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> zwischen 0.4 und 0.6 wurde die Genexpression durch Zugabe von 1 M IPTG (Endkonzentration 0.2 mM) induziert. Die Expressionskulturen wurden bei 15 °C und 180 UpM für 22 h inkubiert.

### Autoinduzierte Expressionskulturen

2YT- Autoinduktionsmedium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 50 mM NH <sub>4</sub> Cl, 5 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1 mM MgSO <sub>4</sub> , 0.5% (w/v) Glycerin, 0.2% (w/v) Lactose, 2.8 mM Glucose, 0.1 mM FeCl <sub>3</sub>
Ampicillin	50 mg/mL Ampicillin-Natriumsalz in H <sub>2</sub> O
Kanamycin	60 mg/mL Kanamycin-Monosulfat in H <sub>2</sub> O

Es wurden Hauptkulturen mit einer OD<sub>600</sub> von 0.05 in 200 mL 2YT-Autoinduktionsmedium mit entsprechendem Antibiotikum in Kultivierkolben mit Spirale angeimpft und bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0.4–0.6 wurden die Kulturen bei 15 °C und 180 UpM für 22 h inkubiert.

### Zellernte

Nach 22 h wurden die Zellen der Expressionskulturen für 20 min bei 4234 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in H<sub>2</sub>O resuspendiert, erneut präzipitiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert oder direkt eingesetzt.

### Zellaufschluss mit Lysozymbehandlung

Lysozym	35000 FIP/mg, lyophilisiert der Firma CARL ROTH
Lysepuffer	40 mM TRIS, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10% (v/v) Glycerin, pH 8.5

Zellpellets wurden in 1 mL Lysepuffer pro 0.1 mg Pellet resuspendiert. Anschließend wurde das gleiche Volumen an Lysozymlösung (Endkonzentration 5 mg/mL) hinzugegeben und bei 37 °C und 300 UpM für 1 h inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 10000 xg wurde der Überstand abgenommen.

---

## Zellaufschluss mit Ultraschallbehandlung

Kaliumphosphatpuffer      100 mM Kaliumhydrogenphosphat, pH 7.0

Das Zellpellet wurde in 1 mL Puffer pro 0.1 g Pellet resuspendiert. Die Zellen wurden 10 min im 30 s Rhythmus und einer 45%igen Amplitude mit Ultraschall unter ständiger Eiskühlung aufgeschlossen. Das Volllysat wurde bei 10000 xg und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, filtriert (0.45 µm, CA) und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

## Diskontinuierliche SDS-PAGE

Trenngel (12%)	40% (v/v) Acrylamid-Bisacrylamidlösung 19:1 (30%), 390 mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethan TRIS-HCl (pH 8.8), 0.1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 0.04% (v/v) N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED), 0.1% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)
Sammelgel (5%)	17% (v/v) Acrylamid-Bisacrylamidlösung 19:1 (30%), 62.5 mM TRIS-HCl (pH 6.8), 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (v/v) TEMED, 0.1% (w/v) APS
Probenpuffer (4x)	20 mM Dithiothreitol (DTT), 200 mM TRIS-HCl, 20% (w/v) Glycerin, 8% (w/v) SDS, 20% (w/v) Glycerin, 0.8% (w/v) Bromphenolblau
Fixierlösung	50% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure (100%ig)
Färbelösung	5% (v/v) Ethanol, 7.5% (v/v) Essigsäure (100%ig)
Coomassielösung	7.75 mM Coomassie Blue R-250
Marker	<i>Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa</i> der Firma THERMOFISHER SCIENTIFIC

Für die Gelproben wurden die entsprechenden Proben mit Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Lösung für das 12%ige Trenngel wurde angesetzt, invertiert und ca. 4 mL zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegeben. APS diente als Radikalstarter und TEMED als Polymerisationskatalysator. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde im Anschluss mit 500 µL *iso*-Propanol überschichtet. Nach Polymerisation des Gels wurde das *iso*-Propanol entfernt und das 5%ige Sammelgel erstellt. Nach leichtem Invertieren wurden 1.5 mL dieser Lösung zwischen die Platten gegeben. TRIS-Glycin-Puffer diente als Laufpuffer. Von den Gelproben wurden 20 µL und vom Marker 5 µL aufgetragen. Die Kammer wurde an eine Stromquelle angeschlossen und

die Proteine für 10 min bei 135 V und 2 h bei 175 V ihrer Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurde das Trenngel mit Fixierlösung bedeckt, für 30 s in der Mikrowelle erwärmt und auf dem Wippschüttler für 10 min geschwenkt. Nach Abdekantieren der Fixierlösung wurden 200 µL Coomassielösung mit 50 mL Färbelösung vermischt und zum Gel gegeben. Nach erneuten 30 s in der Mikrowelle wurde das Gel für 1 h auf dem Wippschüttler geschwenkt. Zum Entfärben des Gels wurde dieses in VE-H<sub>2</sub>O über Nacht geschwenkt. Anschließend wurde das Gel zur Dokumentation fotografiert.

### Graduelle SDS-Page

Trenngel (8%)	27% (v/v) Acrylamid-Bisacrylamidlösung 19:1 (30%), 26% (v/v) TRIS-HCl (pH 8.8), 0.1% (w/v) SDS, 0.05% (v/v) TEMED, 0.1% (w/v) APS
Trenngel (15%)	50% (v/v) Acrylamid-Bisacrylamidlösung 19:1 (30%), 26% (v/v) TRIS-HCl (pH 8.8), 0.1% (w/v) SDS, 0.05% (v/v) TEMED, 0.1% (w/v) APS
Sammelgel (5%)	17% (v/v) Acrylamid-Bisacrylamidlösung 19:1 (30%), 62.5 mM TRIS-HCl (pH 6.8), 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (v/v) TEMED, 0.1% (w/v) APS
Probenpuffer (4x)	20 mM DTT, 200 mM TRIS-HCl, 20% (w/v) Glycerin, 8% (w/v) SDS, 20% (w/v) Glycerin, 0.8% (w/v) Bromphenolblau
Fixierlösung	50% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure (100%ig)
Färbelösung	40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure (100%ig), 0.2% (v/v) CBB R-250
Coomassielösung	7.75 mM Coomassie Blue R-250
Entfärbelösung	40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure (100%ig)
Marker	<i>Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa</i> der Firma THERMOFISHER SCIENTIFIC

Für die Gelproben wurden die entsprechenden Proben mit Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Lösung für das 8%ige und 15%ige Trenngel wurde angesetzt, invertiert und je 3.7 mL in eine Pasteurpipette aufgezogen. Durch Aufziehen einer Luftblase wurde der Gradient der Trenngele erstellt und das gradierte Trenngel zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegeben. APS diente als Radikalstarter und TEMED als Polymerisationskatalysator. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde im Anschluss mit 500 µL *iso*-Propanol überschichtet. Nach

---

Polymerisation des Gels wurde das *iso*-Propanol entfernt und das 5%ige Sammelgel erstellt. Nach leichtem Invertieren wurden 1.5 mL dieser Lösung zwischen die Platten gegeben. TRIS-Glycin-Puffer diente als Laufpuffer. Von den Gelproben wurden 5 - 20  $\mu$ L und vom Marker 5  $\mu$ L aufgetragen. Die Kammer wurde an eine Stromquelle angeschlossen und die Proteine für 1.5 h bei 25 mA (pro Gel) ihrer Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurde das Trenngel mit Fixierlösung bedeckt, für 30 s in der Mikrowelle erwärmt und auf dem Wippschüttler für 10 min geschwenkt. Nach Abdekantieren der Fixierlösung wurden 50 mL Färbelösung zum Gel gegeben. Nach erneuten 30 s in der Mikrowelle wurde das Gel für mindestens 1 h auf dem Wippschüttler geschwenkt. Zum Entfärben des Gels wurde dieses in VE-H<sub>2</sub>O über Nacht geschwenkt oder mit Hilfe von Entfärbelösung ausreichend entfärbt. Anschließend wurde das Gel zur Dokumentation fotografiert.

### Proteinidentifizierung mittels MS-MS-Analyse

MS-Puffer I	10 mM DTT, 100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 8.5
MS-Puffer II	55 mM 2-Iodacetamid (IAA), 100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 8.5
MS-Puffer III	100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 8.5, 100% Acetonitril (1:1 (v/v))
MS-Puffer IV	25 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH 8.5
UPLC-Laufmittel A	0% (v/v) Acetonitril, 0.1% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA)
UPLC-Laufmittel B	H <sub>2</sub> O, 0.1% (v/v) TFA

Die eindeutige Identifizierung der Proteine erfolgte mittels MS-MS-Analyse. Die zu identifizierenden Proteinbanden wurden aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten, zerkleinert (1×1 mm) und in ein 1.50 mL-Reaktionsgefäß überführt. Zuerst wurden 500  $\mu$ L Acetonitril zugegeben und die bedeckten Gelstücke für 10 min inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und 50  $\mu$ L MS-Puffer I zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei 56 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Probe auf RT, wurden erneut 500  $\mu$ L Acetonitril zugegeben und der Ansatz weitere 10 min bei RT inkubiert. Nach Sedimentieren der Gelstücke und Entfernen des Überstandes wurden 50  $\mu$ L MS-Puffer II zugegeben und die Probe für 20 min im Dunklen inkubiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Die Entfärbung der Gelstücke fand durch

---

Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  MS-Puffer III statt. Eine vollständige Entfärbung wurde durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung einhergehend mit wiederholter sorgfältiger Durchmischung erreicht. Nach erneuter Sedimentation der Gelstücke und Abnahme des Überstandes wurden zur Dehydratisierung der Gelstücke 500  $\mu\text{L}$  Acetonitril zugegeben und inkubiert. Nachdem die Gelstücke eine weiße Farbe angenommen haben, wurde das überschüssige Acetonitril abgenommen. Der Verdau des Proteins wurde anschließend durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  MS-Puffer IV sowie 1  $\mu\text{L}$  Trypsin (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) gestartet. Der Ansatz wurde für 90 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden weitere 20  $\mu\text{L}$  MS-Puffer IV zur Probe gegeben und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe für 10 min bei 10000  $\times g$  zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß für die nachfolgende MS-MS-Analyse überführt.

Die weiterführende Analyse der Proteinproben wurde von DR. ANDREA DI FONZO oder SUSANNE SCHÄFER (Lehrstuhl Biochemie, Universität Bayreuth) durchgeführt. Hierzu wurde ein *Prominence UPLC* (SHIMADZU) mit einem TripleTOF® 5600+ Massenspektrometer verwendet. Die Trennung der Peptide erfolgte über eine Hypersil™ ODS C18 Säule (5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße, 200 Å Porengröße, THERMOFISHER SCIENTIFIC) mit folgendem Gradienten:

A:B = 0:100  $\rightarrow$  40:60 {20 min}, 40:60  $\rightarrow$  95:5 {2 min}, A:B = 95:5 {2 min}, A:B = 0:100 {6 min}, 70  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Die Ionisation erfolgte über eine TURBO V™ Ionenquelle (SCIEX) mit 5500 V Ionisationsspannung, 35 V Gegenstromgas, 4 V Quellgas, einer Proben temperatur von 350 °C und einer Kollisionsenergie von 43 V. Es wurde ein vollständiges Massenspektrum von 400–1250  $m/z$  aufgenommen. Dem Scan des Peptidvorläufers für 0.25 s folgten bis zu 20 MS-MS-Scans zwischen 100–2000  $m/z$ . Die Selektion der Fragmente erfolgte dabei über einen Ladungszustand von +2 bis +5 mit über 150 Detektionen pro s und einer Massentoleranz von 50 mDa.

Die Prozessierung der Rohdaten wurde mit Byonic™ (PROTEIN METRICS 2.8.2) durchgeführt. Beim Trypsinverdau wurden bis zu zwei ausgelassene Arginin- bzw. Lysinschnittstellen toleriert. Die Massentoleranz des Vorläuferpeptids wurde mit 2 Da, die des Peptidfragments mit 0.6 Da festgelegt. Gängige Modifikationen wie Oxidationen, Methylierungen, Acetylierungen und Carbamidomethylierungen wurden dabei berücksichtigt.

---

## Proteingewinnung unter denaturierenden Bedingungen

Lysepuffer	50 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% (w/v) NaN <sub>3</sub> , 0.5% (v/v) Triton-X 100, 1 mM DTT, 0.1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), pH 8.5
Waschpuffer	50 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% (w/v) NaN <sub>3</sub> , 0.5% (v/v) Triton-X 100, pH 8.5
Denaturierungspuffer	50 mM TRIS-HCl, 8 M Urea, pH 7.5
Dialysepuffer	50 mM TRIS-HCl, pH 8.5

Zu Beginn wurde das Zellpellet in Lysepuffer (1 mL/0.1 g Pellet) gelöst. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallbehandlung. Anschließend wurde 10 min bei 11000 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbliebene Pellet wurde in Waschpuffer gelöst und erneut bei 11000 xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert, worauf der Waschschrift zwei weitere Male wiederholt wurde. Im Anschluss daran wurde Denaturierungspuffer (1 mL/0.1 g Pellet) hinzugegeben und 1 h bei RT und 10 UpM in einem Überkoprotator inkubiert und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei 11000 xg und 4 °C für 30 min abgetrennt. Vor Einsatz wurde der Dialyseschlauch (MWCO 14 kDa, CARL ROTH) gründlich mit H<sub>2</sub>O gespült, worauf die mit Dialysepuffer auf eine Harnstoffkonzentration von 5 M verdünnte denaturierte Proteinlösung eingefüllt wurde. Die Dialyse der Proteinlösung erfolgte unter sanftem Rühren über Nacht bei 4 °C. Die Proteinlösung wurde nach der Dialyse bei 11000 xg und 4 °C für 10 min zentrifugiert und bei Bedarf mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt.

## Präparation von *inclusion bodies*

Lysepuffer	50 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% (w/v) NaN <sub>3</sub> , 0.5% (v/v) Triton-X 100, 0.1 mM PMSF, 1 mM DTT, pH 8.5
Waschpuffer I	50 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1 mM DTT, pH 8.5
Denaturierungspuffer	50 mM Tris, 8 M Harnstoff, pH 8.5

Zur Präparation der *inclusion bodies* (IB) von His<sub>6</sub>-JerP und GST-JerO wurden die Zellpellets der Expressionen von pCold-I<sub>jerP</sub> und pGEX-6P-L<sub>jerO</sub> in Lysepuffer (1 mL/0.1 g Zellen) resuspendiert. Nach Zugabe von DTT (Endkonzentration 1 mM) und PMSF (Endkonzentration 1 mM) erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschalls (10 x Zyklen mit 30 s Puls und 30 s Pause, Amplitude 40%, 4 °C). Nach Zentrifugation (15 min, 10000 xg, 4 °C) wurde der Überstand

---

verworfen und das Zellpellet zwei Mal mit Waschpuffer I gewaschen. Die Denaturierung wurde durch einstündige Resuspension des Pellets in Denaturierungspuffer durchgeführt. Nach Zentrifugation und Verwerfen unlöslicher Bestandteile wurde der Überstand direkt verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### Rekonstitution des JerP-RIESKE-[2Fe<sub>2</sub>S]-Cluster

Denaturierungspuffer	50 mM TRIS-HCl, 8 M Harnstoff, 2 mM DTT, pH 8.5
Na <sub>2</sub> S-Lösung	20 mM Na <sub>2</sub> S, 2 mM DTT in Dialysepuffer
Rekonstitutionslösung	50 mM TRIS-HCl, 0.7 mM Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , 0.14 mM DTT
Dialysepuffer	50 mM TRIS-HCl, pH 8.5

Die zur Rekonstitution benötigten Puffer und Reagenzien wurden zuvor entgast und die einzelnen Rekonstitutionsschritte unter Inertgasatmosphäre durchgeführt werden. Der denaturierte Überstand wurde mit Denaturierungspuffer verdünnt und für 10 min inkubiert, anschließend erfolgte die Zugabe einer Natriumsulfid-Lösung und Inkubation für 30 min. Nach Zugabe der Rekonstitutionslösung und einer erneuten Inkubation für 30 min wurde die eisenfarbige Lösung in einen Dialyseschlauch (MWCO 14 kDa, CARL ROTH) transferiert und unter Rühren im 200 × Volumen an Dialysepuffer bei 4 °C über Nacht dialysiert.

### Rekonstitution der Monooxygenase JerO

Dialysepuffer	50 mM TRIS-HCl, pH 8.5
---------------	------------------------

Die Rekonstitution von JerO erfolgte durch die Verdünnung des denaturierten Überstands mit Dialysepuffer, gefolgt von einem Transfer der Proteinlösung in einen Dialyseschlauch (MWCO 14 kDa, CARL ROTH) und Dialysieren unter Rühren im 200 × Volumen an Dialysepuffer über Nacht bei 4 °C.

---

## Enzymaktivitätstests mit rekonstituierten Proteinen (*in vitro*)

Reaktionspuffer                      50 mM TRIS-HCl, pH 8.5

Die rekonstituierten RIESKE-Oxygenase JerP und Monooxygenase JerO wurden in einer *in vitro*-Enzymreaktion eingesetzt. 0.25 mM Jerangolid E (**35**), 30.5  $\mu\text{M}$  His<sub>6</sub>-JerP und 66.6  $\mu\text{M}$  GST-JerO wurden in 200  $\mu\text{L}$  Reaktionspuffer gelöst und 0.50 mM FAD und 2.50 mM NADPH zugegeben. Die Reaktion wurde für 16 h bei 25 °C und 300 UpM inkubiert. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  ges. NaCl-Lösung wurde die wässrige Phase mit EtOAc (3  $\times$  200  $\mu\text{L}$ ) extrahiert, flüchtige Bestandteile *in vacuo* entfernt und der Rückstand in MeOH aufgenommen. Die Bestimmung des Umsatzes erfolgte mittels UPLC-MS-Chromatographie.

## *In vivo*-Enzymaktivitätstests mit ganzen Zellen

JerP-Reaktionspuffer                50 mM TRIS-HCl, 100 mM KCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>  $\times$  2 H<sub>2</sub>O, pH 7.6

FAD-Stammlösung                    100 mM FAD in JerP-Reaktionspuffer

NADPH-Stammlösung                100 mM NADPH in JerP-Reaktionspuffer

Ampicillin                              50 mg/mL Ampicillin-Natriumsalz in H<sub>2</sub>O

Das Zellpellet (0.1 g/mL) wurde mit 0.25 mM Jerangolid E (**35**), 0.5 mM FAD, 2.5 mM NADPH in 200  $\mu\text{L}$  JerP-Reaktionspuffer mit 0.1% des entsprechenden Antibiotikums bei 25 °C und 300 UpM für 16 h im Thermomixer in einem geschlossenen Reaktionsgefäß inkubiert. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  ges. NaCl-Lösung wurde die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2  $\times$  500  $\mu\text{L}$ ) extrahiert. Flüchtige Bestandteile wurden *in vacuo* entfernt, der Rückstand in MeOH aufgenommen und der Umsatz mittels UPLC-MS-Chromatographie bestimmt.

## Analyse per UPLC-MS

Extraktionen aus Enzymaktivitätstests wurden nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile *in vacuo* in 0.20 mL Methanol (HPLC-rein) gelöst und in ein UPLC-Gefäß filtriert (0.2  $\mu\text{m}$ , PTFE). Massenspektren der Enzymreaktionen wurden an einem ACQUITY™ UPLC® System der Firma WATERS mit Single Quadrupole Massenspektrometer und BEH C18 Säulen (Partikelgröße 1.7  $\mu\text{m}$ , Porengröße 130 Å, Säulendurchmesser 2.1  $\mu\text{m}$ , Länge 50 mm) aufgenommen. Die Injektion der in Methanol gelösten Proben fand im *Partial loop with needle overfill*-Modus über einen

---

*Autosampler* statt. Ionisation wurde nach dem Elektrospray-Verfahren im Positiv-Modus (*Electrospray Ionisation*, ESI+) durchgeführt. Die Auftrennung der Proben mittels UPLC erfolgte mit folgenden Gradienten: (H<sub>2</sub>O:MeOH = 90:10 {Start}, Gradient H<sub>2</sub>O:MeOH 90:10 → 20:80 {0.5 min}, H<sub>2</sub>O:MeOH 20:80 → 10:90 {4.5 min}, H<sub>2</sub>O:MeOH = 90:10 {1.5 min}, 0.5 mL/min).

#### 7.2.2.4 *In vivo*-Enzymreaktion – optimiertes Protokoll

##### Expressionskulturen

2YT-Medium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl
Ampicillin	50 mg/mL Ampicillin-Natriumsalz in H <sub>2</sub> O
IPTG-Lösung	1 M Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid in H <sub>2</sub> O

Zur Verwendung in *in vivo*-Enzymreaktionen wurden Einzelzellkolonien des entsprechenden *E. coli* C41-CmpX13 Stammes mit entsprechendem Expressionskonstrukt in ampicilinhaltigen 2YT-Medium (50 mL) angeimpft. Nach Anwachsen der Zellkulturen auf ein OD<sub>600</sub> von 0.3 bei 37 °C und Abkühlen bei 4 °C für 15 min wurde mit 0.1 mM IPTG (je beinhaltenem Gen) induziert. Die Gene der RIESKE-Oxygenase und Monooxygenase wurden für 22 h bei 15 °C und 180  $\mu$ M überexprimiert. Zur Kontrolle der Expression wurden SDS-Page Gelproben und folgend Gele angefertigt. Die Identität aller verwendeten Proteine wurde mittels MS-MS-Analyse bestätigt.

##### Standardisierte Präparation der verwendete Zellsuspension

Um eine Sedimentation der Zellen zu begünstigen wurden die überexprimierten Zellkulturen für 30 min bei 4 °C gelagert. Die obere Hälfte des 2YT-Medium-Überstandes (25 mL) wurde abgenommen und verworfen und das Zellpellet durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. 7 mL der Suspension wurden entnommen und zentrifugiert (15 min, 3234  $\times$ g, 4°C), anschließend wurden 6 mL des erhaltenen Überstandes verworfen und das Zellpellet im restlichen 1 mL 2YT-Medium resuspendiert. Die derartig präpariert Zellsuspension wurde direkt anschließend *in vivo*-Enzymreaktionen verwendet.

---

## Standardisiertes Protokoll der *in vivo*-Enzymreaktion

Zellsuspension	~122 mg Zellpellet resuspendiert in 1 mL 2YT-Medium
$\beta$ -CD-Stammlösung	11 mM CD in 2YT-Medium
FAD-Stammlösung	100 mM FAD in 2YT-Medium
NADH-Stammlösung	100 mM NADH in 2YT-Medium

50  $\mu$ M Substrat wurden mit äquimolar  $\beta$ -CD, 1 mM FAD und 1 mM NADH in 1 mL der präparierten Zellsuspension für 16 h bei 30 °C und 180 UpM in einem horizontal befestigtem *Headspace Vial* (Abbildung 9–77) inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend mit EtOAc (4  $\times$  1 mL) extrahiert. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile *in vacuo*, wurde der verbleibende Rückstand in 200  $\mu$ L MeOH aufgenommen und für die UPLC-MS-Analyse (MeOH:H<sub>2</sub>O = 10:90  $\rightarrow$  90:10 {4 min}, MeOH:H<sub>2</sub>O = 90:10 {2 min}, 0.5 mL/min) verwendet. Retentionszeiten der Substrate, des korrespondierenden Produkts und deren Referenzen sind in den UPLC-MS-Chromatogrammen gegeben. Die Prozentwerte der Konversion wurden mittels des Integralflächenverhältnisses, das durch die UPLC-MS-Analyse erhalten wurde, bestimmt (Anhang 9.6).

## Upscaling-Experiment

Zellsuspension	200 mL 2YT-Medium Zellkultur
$\beta$ -CD-Stammlösung	11 mM CD in 2YT-Medium
FAD-Stammlösung	100 mM FAD in 2YT-Medium
NADH-Stammlösung	100 mM NADH in 2YT-Medium

2 mg Substrat wurden mit äquimolar  $\beta$ -CD, 1 mM FAD und 1 mM NADH in 200 mL Zellsuspension für 16 h bei 30 °C und 180 UpM in einem Kultivierkolben ohne Spirale inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend mit EtOAc (4  $\times$  200 mL) extrahiert. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile *in vacuo*, wurde der verbleibende Rückstand in 200  $\mu$ L MeOH aufgenommen und für die UPLC-MS-Analyse (MeOH:H<sub>2</sub>O = 10:90  $\rightarrow$  90:10 {4 min}, MeOH:H<sub>2</sub>O = 90:10 {2 min}, 0.5 mL/min) verwendet. Retentionszeiten der Substrate, des korrespondierenden Produkts und deren Referenzen sind in den UPLC-MS-Chromatogrammen gegeben. Die Prozentwerte der Konversion wurden mittels des Integralflächenverhältnisses, das durch die UPLC-MS-Analyse erhalten wurde, bestimmt (Anhang 9.6). Nach anschließender

---

säulenchromatographischer Reinigung ( $\text{SiO}_2$ , *n*-Hexan/EtOAc 5:1) wurde das Gemisch mittels NMR (Abbildung 9–51) analysiert.

---

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] F. Lindner, S. Friedrich, F. Hahn, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 14091–14101.
- [2] S. Chakrabarty, E. O. Romero, J. B. Pyser, J. A. Yazarians, A. R. H. Narayan, *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 1374–1384.
- [3] J. B. Pyser, S. Chakrabarty, E. O. Romero, A. R. H. Narayan, *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 1105–1116.
- [4] E. O. Romero, A. T. Saucedo, R. Hern, D. Yang, S. Chakrabarty, A. R. H. Narayan, *J. Am. Chem. Soc. Au* **2023**, *3*, 2073–2085.
- [5] E. Romero, B. S. Jones, B. N. Hogg, A. Rué Casamajo, M. A. Hayes, S. L. Flitsch, N. J. Turner, C. Schnepel, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2021**, *60*, 16824–16855.
- [6] C. Olano, C. Méndez, J. A. Salas, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 571–616.
- [7] C. T. Walsh, *Nat. Prod. Rep.* **2023**, *40*, 326–386.
- [8] E. King-Smith, C. R. Zwick, H. Renata, *Biochemistry* **2018**, *57*, 403–412.
- [9] K. Satoh, K. Makimura, Y. Hasumi, Y. Nishiyama, K. Uchida, H. Yamaguchi, *Microbiol. Immunol.* **2009**, *53*, 41–44.
- [10] O. Kurzai, J. Wagener, *Dtsch. Arztebl.* **2019**, 4–8.
- [11] N. Geremia, P. Brugnaro, M. Solinas, C. Scarparo, S. Panese, *Healthc.* **2023**, *11*, 1–12.
- [12] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416.
- [13] B. M. Duggar, *Ann NY Acad Sci* **1948**, *51*, 177–181.
- [14] S. Samappito, J. E. Page, J. Schmidt, W. De-Eknamkul, T. M. Kutchan, *Phytochemistry* **2003**, *62*, 313–323.
- [15] P. Jeandet, E. Sobarzo-Sánchez, A. S. Silva, C. Clément, S. F. Nabavi, M. Battino, M. Rasekhian, T. Belwal, S. Habtemariam, M. Koffas, S. M. Nabavi, *Biotechnol. Adv.* **2020**, *39*, DOI 10.1016/j.biotechadv.2019.107461.
- [16] "Weißer Nieswurz," [https://cdn.dr.hauschka.com/images/system/plant\\_library/veratrum-album-l.jpg](https://cdn.dr.hauschka.com/images/system/plant_library/veratrum-album-l.jpg), 07/29/2024.

- 
- [17] "Candida Albicans," [https://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/img/Francois Striking image\\_higher resolution\\_1\\_800x599.jpg](https://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/img/Francois%20Striking%20image_higher_resolution_1_800x599.jpg), 07/29/2024.
- [18] "Bakterien," [https://www.swr.de/wissen/1631019058961%2Ckein-erfolg-im-kampf-gegen-multiresistente-bakterien-110~\\_v-16x7@2dXL\\_-a253d9ef734ceed2dcb1222775e1f0a268339ea8.jpg](https://www.swr.de/wissen/1631019058961%2Ckein-erfolg-im-kampf-gegen-multiresistente-bakterien-110~_v-16x7@2dXL_-a253d9ef734ceed2dcb1222775e1f0a268339ea8.jpg), 07/29/2024.
- [19] K. Gerth, P. Washausen, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1996**, 49, 71–75.
- [20] F. Hahn, F. M. Guth, *Nat. Prod. Rep.* **2020**, 37, 1300–1315.
- [21] B. Julien, Z. Q. Tian, R. Reid, C. D. Reeves, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 1277–1286.
- [22] M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3468–3496.
- [23] K. J. Weissman, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2004**, 362, 2671–2690.
- [24] K. J. Weissman, P. F. Leadlay, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 925–936.
- [25] A. T. Keatinge-Clay, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 1050–1073.
- [26] S. Smith, S. C. Tsai, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24, 1041–1072.
- [27] J. Kennedy, K. Auclair, S. G. Kendrew, C. Park, J. C. Vederas, C. R. Hutchinson, *Science (80-. )*. **1999**, 284, 1368–1372.
- [28] Y. Q. Cheng, J. M. Coughlin, S. K. Lim, B. Shen, *Chapter 8 Type I Polyketide Synthases That Require Discrete Acyltransferases*, Elsevier Inc., **2009**.
- [29] C. Hertweck, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, 48, 4688–4716.
- [30] J. Beld, E. C. Sonnenschein, C. R. Vickery, J. P. Noel, M. D. Burkart, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, 31, 61–108.
- [31] J. Cortes, S. F. Haydock, G. A. Roberts, D. J. Bevitt, P. F. Leadlay, *Nature* **1990**, 348, 176–178.
- [32] A. T. Keatinge-clay, *J. Struct. Biol.* **2015**, 193, 196–205.
- [33] E. J. N. Helfrich, J. Piel, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33, 231–316.
- [34] B. J. Dunn, K. R. Watts, T. Robbins, D. E. Cane, C. Khosla, *Biochemistry* **2014**, 53, 3796–3806.
- [35] R. S. Gokhale, D. Hunziker, D. E. Cane, C. Khosla, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 117–125.

- 
- [36] F. Hemmerling, F. Hahn, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1512–1550.
- [37] V. J. Stuitriton, *Angew. Chemie* **1991**, *103*, 1331–1335.
- [38] H. Zhang, Y. Wang, J. Wu, K. Skalina, B. A. Pfeifer, *Chem. Biol.* **2011**, *17*, 1232–1240.
- [39] G. Zhang, Y. Li, L. Fang, B. A. Pfeifer, **2015**.
- [40] C. Hertweck, A. Luzhetskyy, Y. Rebets, A. Bechthold, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 162–190.
- [41] H. Jenke-Kodama, A. Sandmann, R. Müller, E. Dittmann, *Mol. Biol. Evol.* **2005**, *22*, 2027–2039.
- [42] M. B. Austin, J. P. Noel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 79–110.
- [43] S. C. Wenzel, R. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1385–1407.
- [44] S. C. Wenzel, R. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1211–1224.
- [45] S. M. Ringel, R. C. Greenough, S. Roemer, D. Connor, A. L. Gutt, B. Blair, G. Kanter, M. von Strandtmann, *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1977**, *30*, 371–375.
- [46] S. Friedrich, F. Hemmerling, F. Lindner, A. Warnke, J. Wunderlich, G. Berkhan, F. Hahn, *Molecules* **2016**, *21*, DOI 10.3390/molecules21111443.
- [47] H. Reichenbach, K. Gerth, P. Washausen, *Heterocyclic Compounds Obtainable from Sorangium Cellulosium Bacteria, Their Preparation Process, and Agents Containing These Compounds*, **1997**, WO 97/31912.
- [48] T. Hollmann, G. Berkhan, L. Wagner, K. H. Sung, S. Kolb, H. Geise, F. Hahn, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 4973–4982.
- [49] G. Berkhan, F. Hahn, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*, 14240–14244.
- [50] L. Wagner, T. Roß, T. Hollmann, F. Hahn, *RSC Adv.* **2021**, *11*, 20248–20251.
- [51] G. Berkhan, C. Merten, C. Holec, F. Hahn, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55*, 13589–13592.
- [52] T. R. Patel, D. T. Gibson, *J. Bacteriol.* **1976**, *128*, 842–850.
- [53] B. C. Axcell, P. J. Geary, *Biochem. J.* **1975**, *146*, 173–183.
- [54] C. Perry, E. L. C. De Los Santos, L. M. Alkhalaf, G. L. Challis, E. C. de los Santos, L. M. Alkhalaf, G. L. Challis, *Nat. Prod. Rep.* **2018**, *35*, 622–632.

- 
- [55] S. M. Barry, G. L. Challis, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2362–2370.
- [56] M. Runda, N. A. W. de Kok, S. Sandy, *ChemBioChem* **2023**, *24*, DOI 10.1002/cbic.202300078.
- [57] D. C. Johnson, D. R. Dean, A. D. Smith, M. K. Johnson, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 247–281.
- [58] M. Fontecave, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 171–174.
- [59] M. Costas, M. P. Mehn, M. P. Jensen, L. Que, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 939–986.
- [60] L. A. Sazanov, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 375–388.
- [61] S. Iwata, J. W. Lee, K. Okada, J. K. Lee, M. Iwata, B. Rasmussen, T. A. Link, S. Ramaswamy, B. K. Jap, *Science (80-. )*. **1998**, *281*, 64–71.
- [62] Schrödinger, LLC, **2023**.
- [63] L. P. Wackett, *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 577–587.
- [64] N. J. Cospers, D. M. Eby, A. Kounosu, N. Kurosawa, E. L. Neidle, D. M. Kurtz, T. Iwasaki, R. A. Scott, *Protein Sci.* **2009**, *11*, 2969–2973.
- [65] E. Denke, T. Merbitz-Zahradnik, O. M. Hatzfeld, C. H. Snyder, T. A. Link, B. L. Trumpower, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 9085–9093.
- [66] B. L. Trumpower, C. A. Edwards, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 8697–8706.
- [67] J. S. Rieske, D. H. MacLennan, R. Coleman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1964**, *15*, 338–344.
- [68] T. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W296–W303.
- [69] C. L. Schmidt, L. Shaw, *J. Bioenerg. Biomembr.* **2001**, *33*, 9–26.
- [70] B. M. Martins, T. Svetlitchnaia, H. Dobbek, *Structure* **2005**, *13*, 817–824.
- [71] R. E. Parales, J. V. Parales, D. T. Gibson, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 1831–1837.
- [72] A. Karlsson, J. V. Parales, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund, S. Ramaswamy, *Science (80-*

- 
- ). **2003**, 299, 1039–1042.
- [73] B. Kauppi, K. Lee, E. Carredano, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund, S. Ramaswamy, *Structure* **1998**, 6, 571–586.
- [74] D. J. Ferraro, L. Gakhar, S. Ramaswamy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 338, 175–190.
- [75] M. Senda, S. Kishigami, S. Kimura, M. Fukuda, T. Ishida, T. Senda, *J. Mol. Biol.* **2007**, 373, 382–400.
- [76] M. M. E. Huijbers, S. Montersino, A. H. Westphal, D. Tischler, W. J. H. Van Berkel, *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, 544, 2–17.
- [77] R. P. Hausinger, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, 39, 21–68.
- [78] G. Bailleul, G. Yang, C. R. Nicoll, A. Mattevi, M. W. Fraaije, M. L. Mascotti, *Nat. Commun.* **2023**, 14, DOI 10.1038/s41467-023-36756-x.
- [79] C. T. Walsh, T. A. Wencewicz, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, 30, 175–200.
- [80] R. V. K. Cochrane, J. C. Vederas, *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 3148–3161.
- [81] I. G. Denisov, T. M. Makris, S. G. Sligar, I. Schlichting, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 2253–2277.
- [82] E. I. Solomon, A. Decker, N. Lehnert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 3589–3594.
- [83] D. Werck-Reichhart, R. Feyereisen, *Genome Biol.* **2000**, 1, 1–9.
- [84] C. R. Zwick, H. Renata, *Nat. Prod. Rep.* **2020**, 37, 1065–1079.
- [85] M. J. Ryle, R. P. Hausinger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 193–201.
- [86] S. S. Gao, N. Naowarajna, R. Cheng, X. Liu, P. Liu, *Nat. Prod. Rep.* **2018**, 35, 792–837.
- [87] L. M. Podust, D. H. Sherman, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 1251–1266.
- [88] A. L. Lukowski, D. C. Ellinwood, M. E. Hinze, R. J. Deluca, J. Du Bois, S. Hall, A. R. H. Narayan, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 11863–11869.
- [89] A. L. Lukowski, J. Liu, J. Bridwell-Rabb, A. R. H. Narayan, *Nat. Commun.* **2020**, 11, 1–10.
- [90] J. Lee, H. Zhao, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2006**, 45, 622–625.
- [91] J. Lee, M. Simurdiak, H. Zhao, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 36719–36728.

- 
- [92] J. K. Lee, E. L. Ang, H. Zhao, *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 6179–6183.
- [93] D. Pistorius, Y. Li, A. Sandmann, R. Müller, *Mol. Biosyst.* **2011**, *7*, 3308–3315.
- [94] D. M. Withall, S. W. Haynes, G. L. Challis, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 7889–7897.
- [95] S. M. Salem, P. Kancharla, G. Florova, S. Gupta, W. Lu, K. A. Reynolds, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4565–4574.
- [96] L. Wang, A. Parnell, C. Williams, N. A. Bakar, M. R. Challand, M. W. van der Kamp, T. J. Simpson, P. R. Race, M. P. Crump, C. L. Willis, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 968–976.
- [97] F. M. Guth, F. Lindner, S. Rydzek, A. Peil, S. Friedrich, B. Hauer, F. Hahn, *ACS Chem. Biol.* **2023**, *18*, 2450–2456.
- [98] J. I. Bowen, X. Zhong, K. Gao, B. Reed, M. P. Crump, L. Wang, C. L. Willis, *Chem. Sci.* **2024**, *3*, DOI 10.1039/d4sc00720d.
- [99] J. Pospíšil, E. Markó, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3516–3517.
- [100] S. Hanessian, T. Focken, R. Oza, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3172–3175.
- [101] J. Lenhof, M. Hutter, V. Huch, J. Jauch, *European J. Org. Chem.* **2020**, *2020*, 5833–5840.
- [102] E. Nagao, Y.; Hagiwara, Y.; Kumagai, T.; Ochiai, M.; Inoue, T.; Hashimoto, K.; Fujita, *J. Org. Chem* **1986**, *8*, 2391–2393.
- [103] S. Wünsch, B. Breit, *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21*, 2358–2363.
- [104] K. Tsubone, K. Hashizume, H. Fuwa, M. Sasaki, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 548–551.
- [105] K. Ishigai, H. Fuwa, K. Hashizume, R. Fukazawa, Y. Cho, M. Yotsu-Yamashita, M. Sasaki, *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19*, 5276–5288.
- [106] C. Samońłowicz, M. Bieniek, A. Pazio, A. Makal, K. Woźniak, A. Poater, L. Cavallo, J. Wójcik, K. Zdanowski, K. Grela, *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17*, 12981–12993.
- [107] K. Grela, S. Harutyunyan, A. Michrowska, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, *41*, 4038–4040.
- [108] A. K. Chatterjee, J. P. Morgan, M. Scholl, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3783–3784.
- [109] A. K. Chatterjee, T. L. Choi, D. P. Sanders, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11360–

- 
- 11370.
- [110] F. Lindner, Etablierung Chemoenzymatischer Totalsynthesen Der Jerangolide, Universität Bayreuth, **2019**.
- [111] A. Peil, In Vitro Studien Der RIESKE-[2Fe2S]-Cluster Enzyme JerP Und JerL Der Jerangolid-Biosynthese, Universität Bayreuth, **2017**.
- [112] T. Mukaiyama, *Chem. Lett.* **1973**, 2, 1011–1014.
- [113] W. Oppolzer, R. J. Mills, W. Pachinger, T. Stevenson, *Helv. Chim. Acta* **1986**, 69, 1542–1545.
- [114] T. Nagasawa, S. Kuwahara, *Heterocycles* **2012**, 85, 587–613.
- [115] N. M. Nasir, K. Ermanis, P. A. Clarke, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 3323–3335.
- [116] K. Lee, H. Kim, J. Hong, *Org. Lett.* **2011**, 13, 2722–2725.
- [117] R. W. Bates, L. Li, K. Palani, W. Phetsang, J. K. Loh, *Asian J. Org. Chem.* **2014**, 3, 792–796.
- [118] M. J. McKennon, A. I. Meyers, K. Drauz, M. Schwarm, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 3568–3571.
- [119] D. Delaunay, L. Toupet, M. Le Corre, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 6604–6607.
- [120] C. Spino, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, 53, 5498–5498.
- [121] T. E. Smith, M. Djang, A. J. Velander, C. W. Downey, K. A. Carroll, S. Van Alphen, *Org. Lett.* **2004**, 6, 2317–2320.
- [122] C. Aïssa, *European J. Org. Chem.* **2009**, 1831–1844.
- [123] M. S. Sanford, M. Ulman, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 749–750.
- [124] M. S. Sandford, J. A. Love, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6543–6554.
- [125] E. L. Dias, S. B. T. Nguyen, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3887–3897.
- [126] Z. Shi, B. A. Harrison, G. L. Verdine, *Org. Lett.* **2003**, 5, 633–636.
- [127] B. T. Worrell, S. Mavila, C. Wang, T. M. Kontour, C. H. Lim, M. K. McBride, C. B. Musgrave, R. Shoemaker, C. N. Bowman, *Polym. Chem.* **2018**, 9, 4523–4534.
- [128] G. M. Bracher, P. J.; Snyder, P. W.; Bohall, B. R.; Whitesides, G. M. *Orig. Life Evol. Biosph.* **2011**, 399–412.

- 
- [129] D. T. Jones, W. R. Taylor, J. M. Thornton, *Bioinformatics* **1992**, *8*, 275–282.
- [130] K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar, *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027.
- [131] N. Oberg, R. Zallot, J. A. Gerlt, *J. Mol. Biol.* **2023**, *435*, DOI 10.1016/j.jmb.2023.168018.
- [132] R. Zallot, N. Oberg, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **2019**, *58*, 4169–4182.
- [133] P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N. s. Baliga, J. Wang, D. Ramage, A. Nada, B. Schwikowski, T. Ideker, *Genome Res.* **1971**, *13*, 426.
- [134] T. L. Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. and Madden, *BMC Bioinformatics* **2009**, *10*, 421–430.
- [135] B. Miroux, J. E. Walker, *J. Mol. Biol.* **1996**, *260*, 289–298.
- [136] S. K. Kwon, S. K. Kim, D. H. Lee, J. F. Kim, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–13.
- [137] S. Schlegel, P. Genevoux, J. W. de Gier, *Cell Rep.* **2015**, *10*, 1758–1766.
- [138] L. Szente, É. Fenyvesi, *Struct. Chem.* **2017**, *28*, 479–492.
- [139] H. Viernstein, P. Weiss-Greiler, P. Wolschann, *J. Incl. Phenom.* **2002**, *44*, 235–240.
- [140] L. Liu, Q. X. Guo, *J. Incl. Phenom.* **2004**, *50*, 95–103.
- [141] F. Guth, Totalsynthese Verschiedener Jerangolid-Derivate Zur Aufklärung von Dessen Biosynthese Mittels Enzymexperimenten, Universität Bayreuth, **2019**.
- [142] E. Jurrus, D. Engel, K. Star, K. Monson, J. Brandi, L. E. Felberg, D. H. Brookes, L. Wilson, J. Chen, K. Liles, M. Chun, P. Li, D. W. Gohara, T. Dolinsky, R. Konecny, D. R. Koes, J. E. Nielsen, T. Head-Gordon, W. Geng, R. Krasny, G. W. Wei, M. J. Holst, J. A. McCammon, N. A. Baker, *Protein Sci.* **2018**, *27*, 112–128.
- [143] J. Yang, A. Roy, Y. Zhang, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 1096–1103.
- [144] J. Yang, A. Roy, Y. Zhang, *Bioinformatics* **2013**, *29*, 2588–2595.

# 9 Anhang

## 9.1 NMR-Spektren

Ostfragment

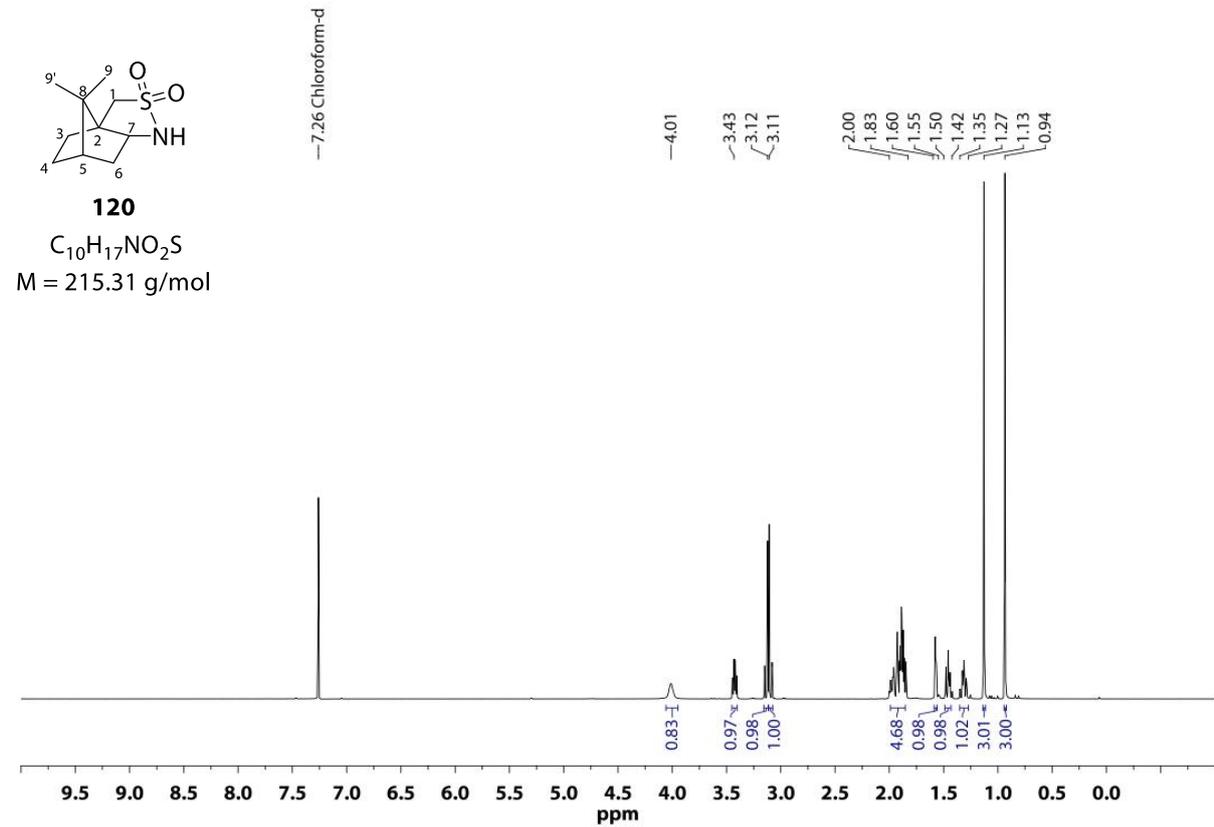


Abbildung 9-1.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **120** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

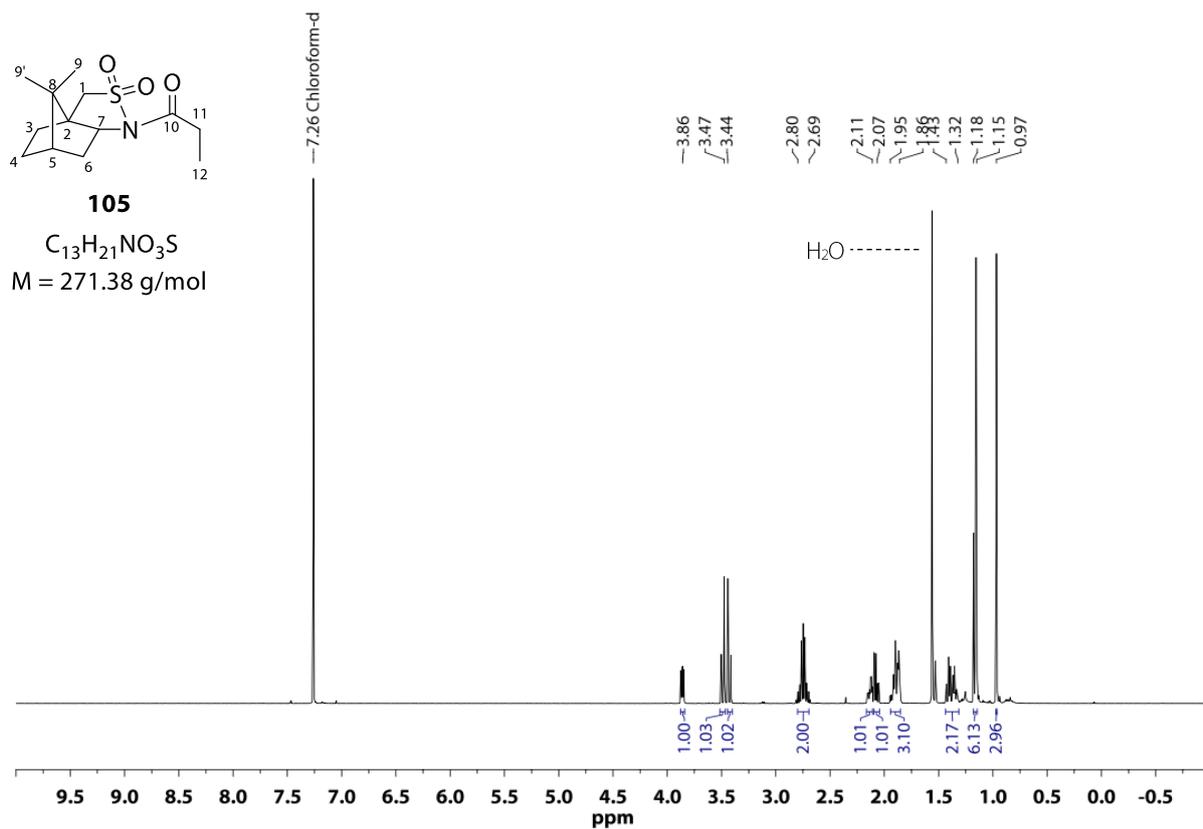


Abbildung 9–2.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **105** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

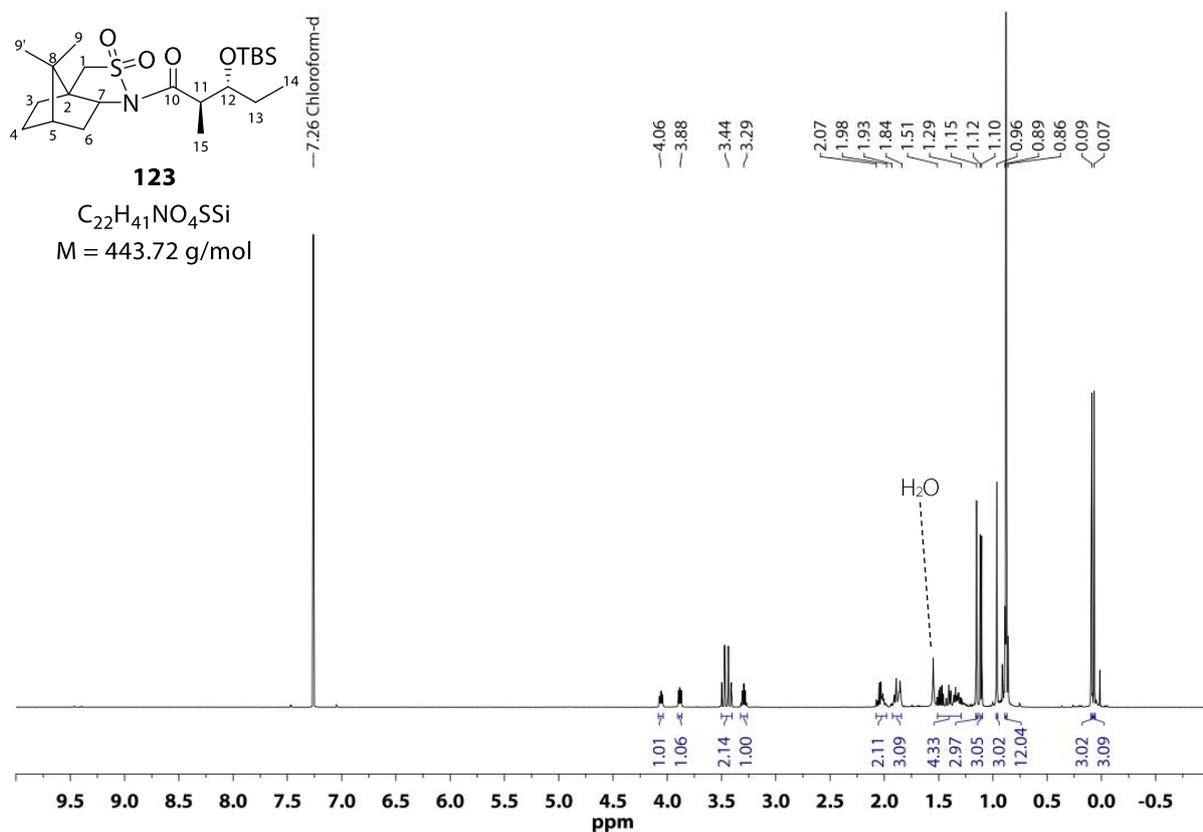


Abbildung 9–3.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **123** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).



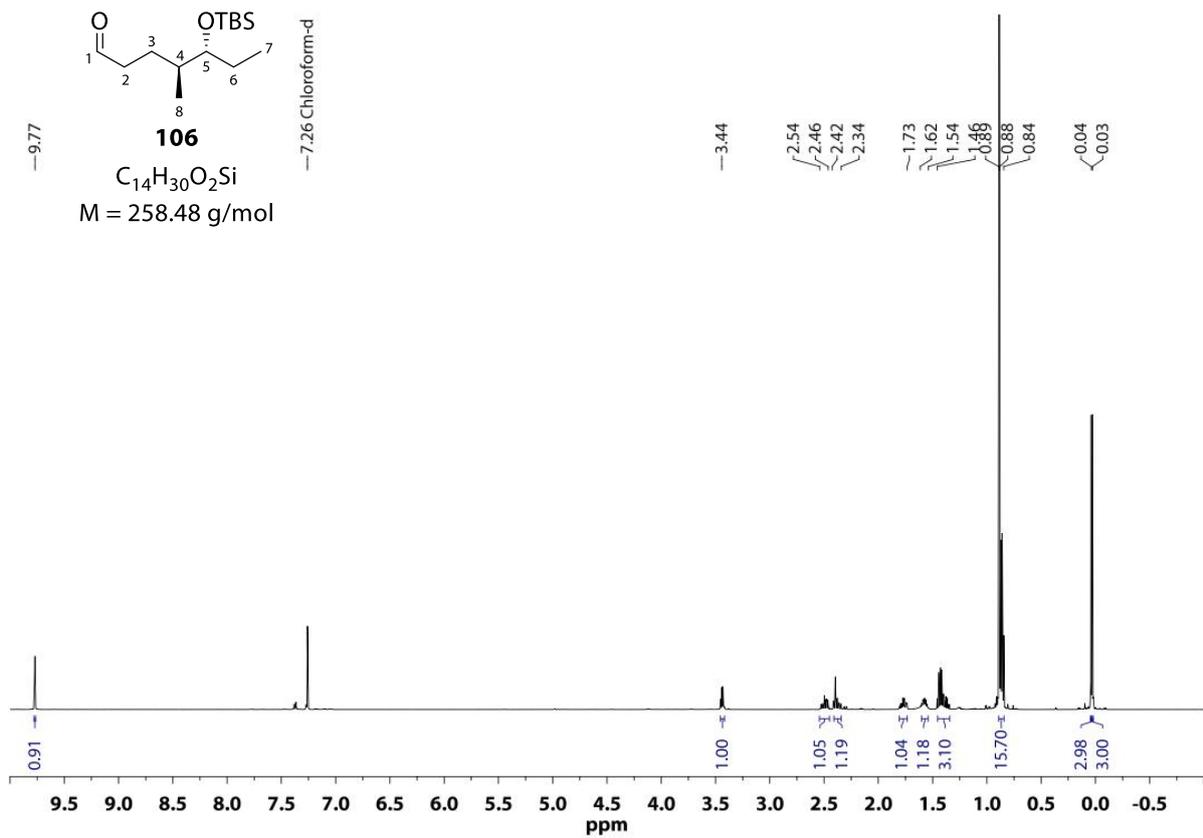


Abbildung 9–6.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **106** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

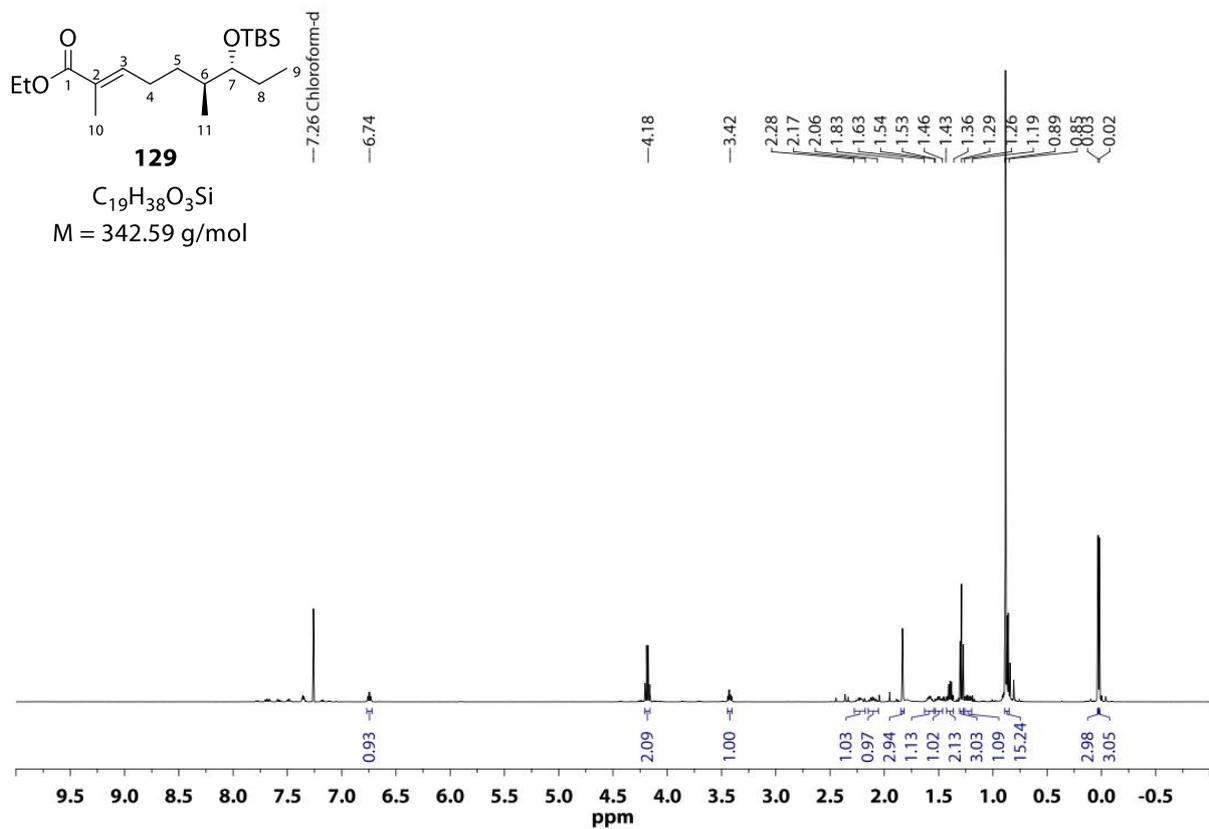


Abbildung 9–7.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **129** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

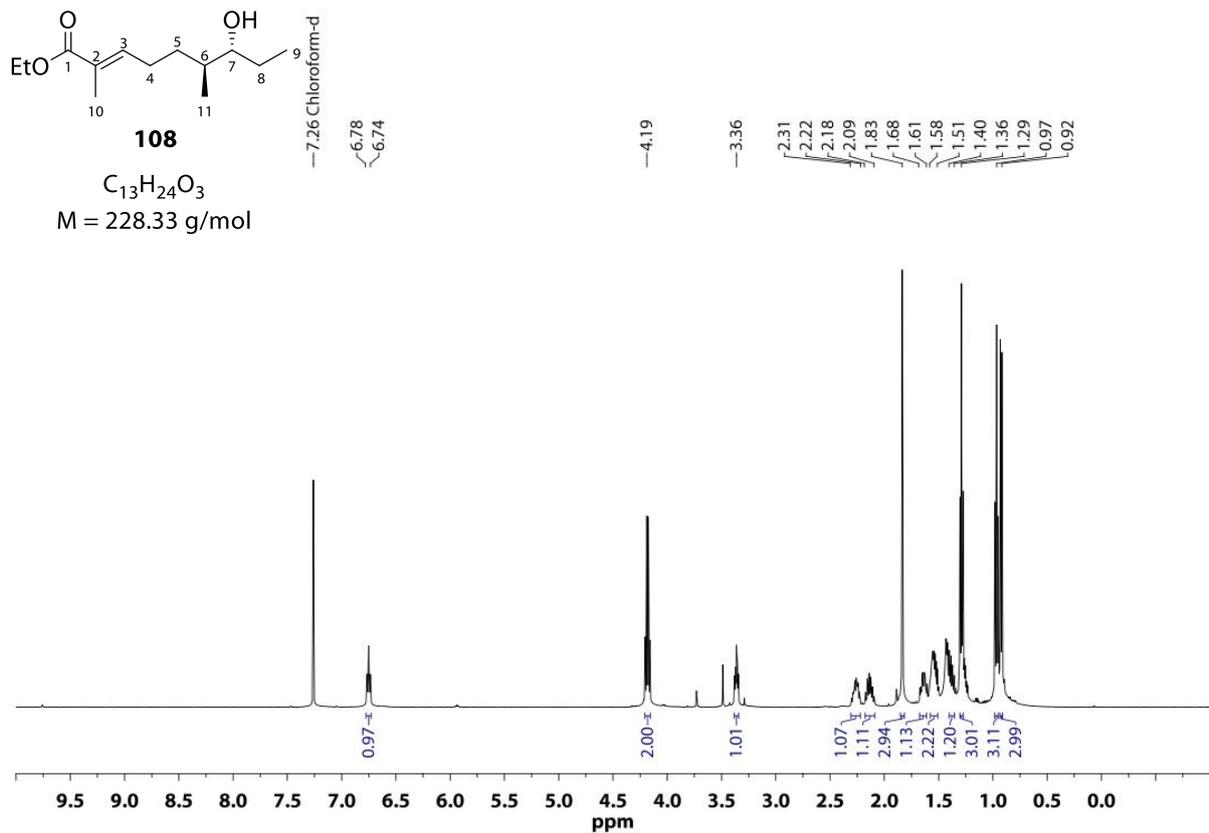


Abbildung 9–8.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **108** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

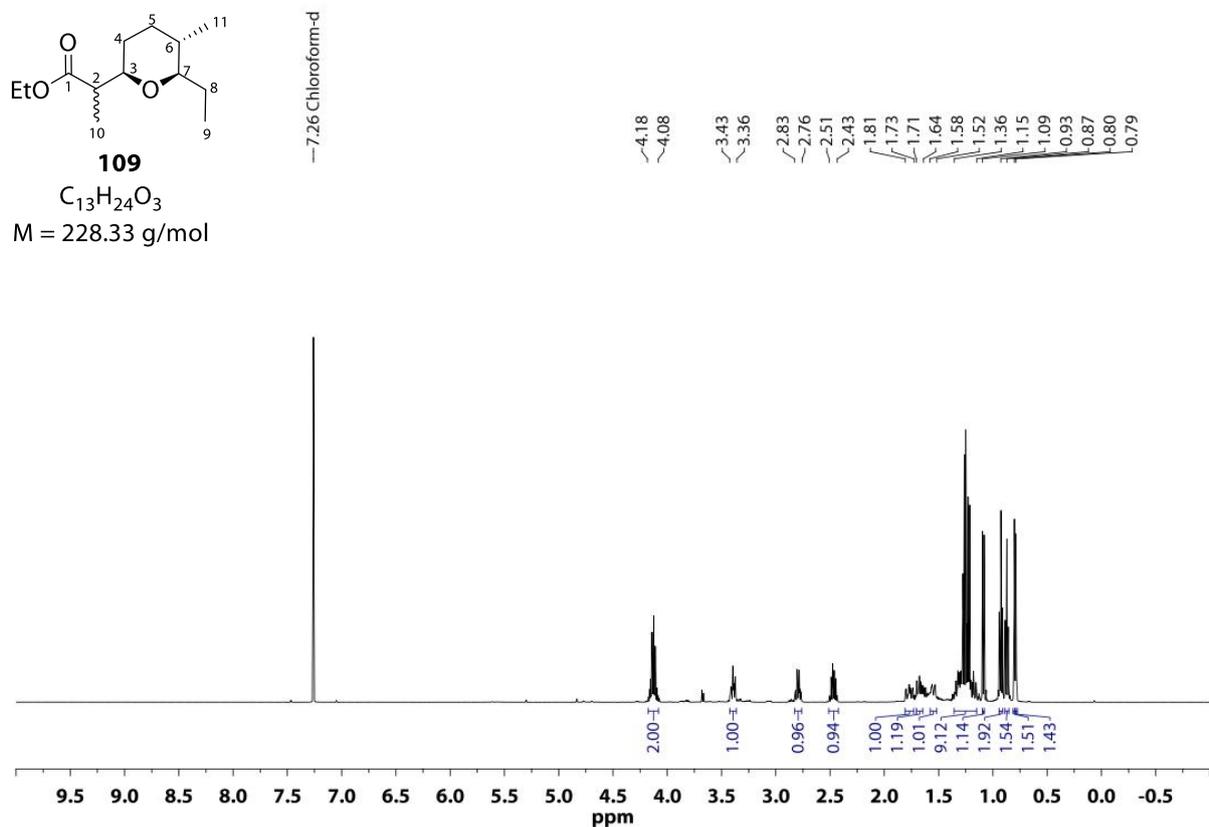


Abbildung 9–9.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **109** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

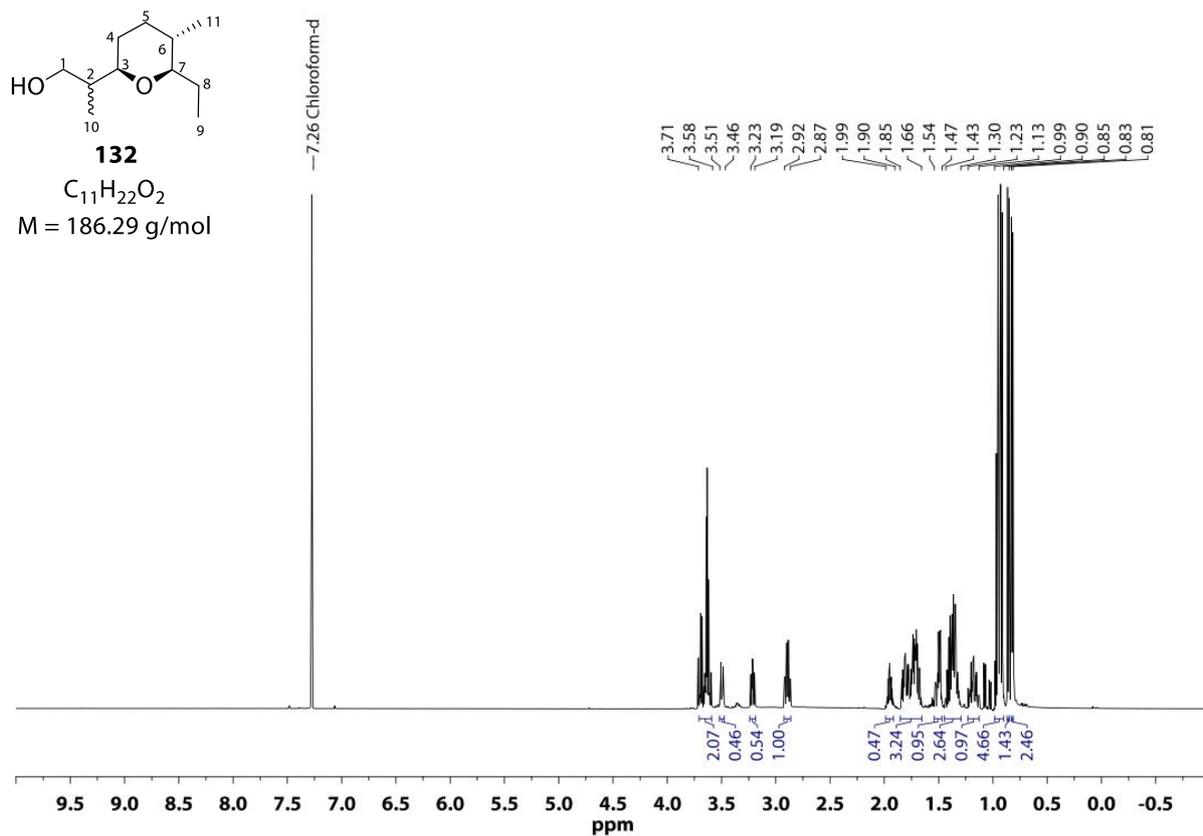


Abbildung 9–10.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **132** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

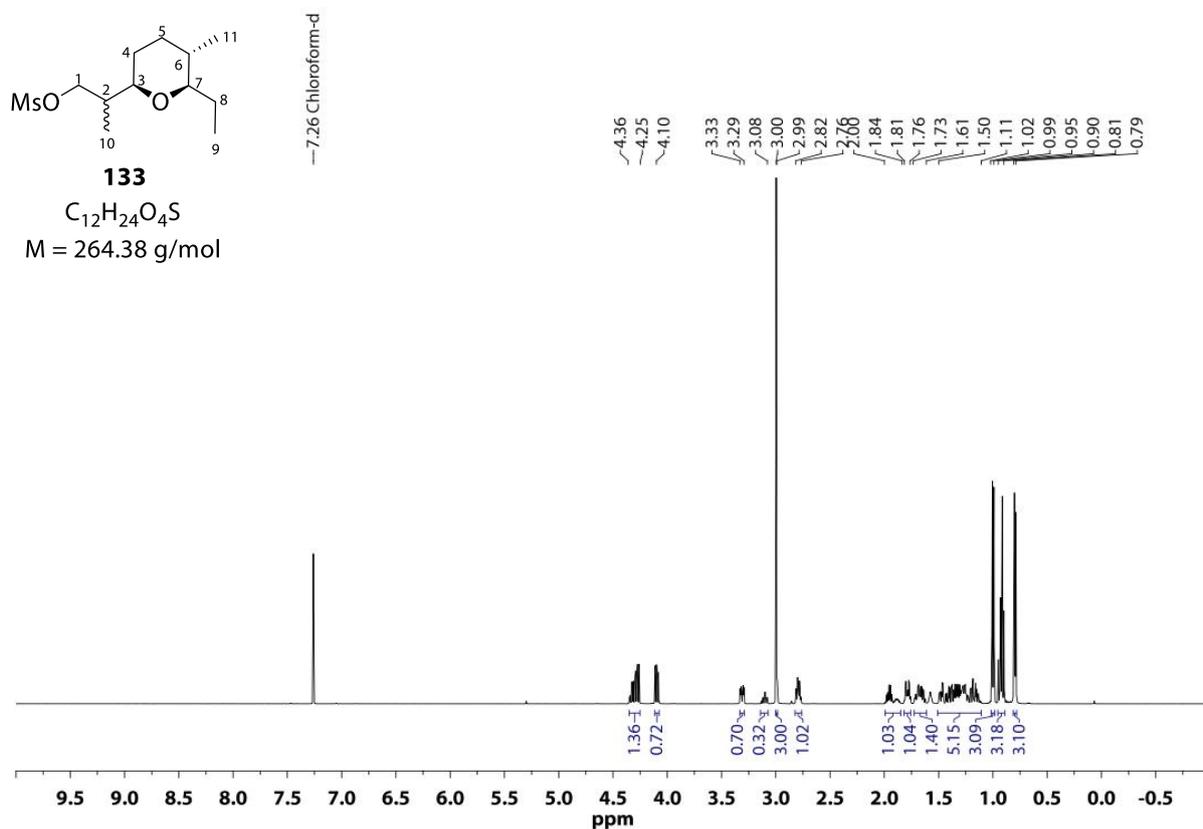


Abbildung 9–11.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **133** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

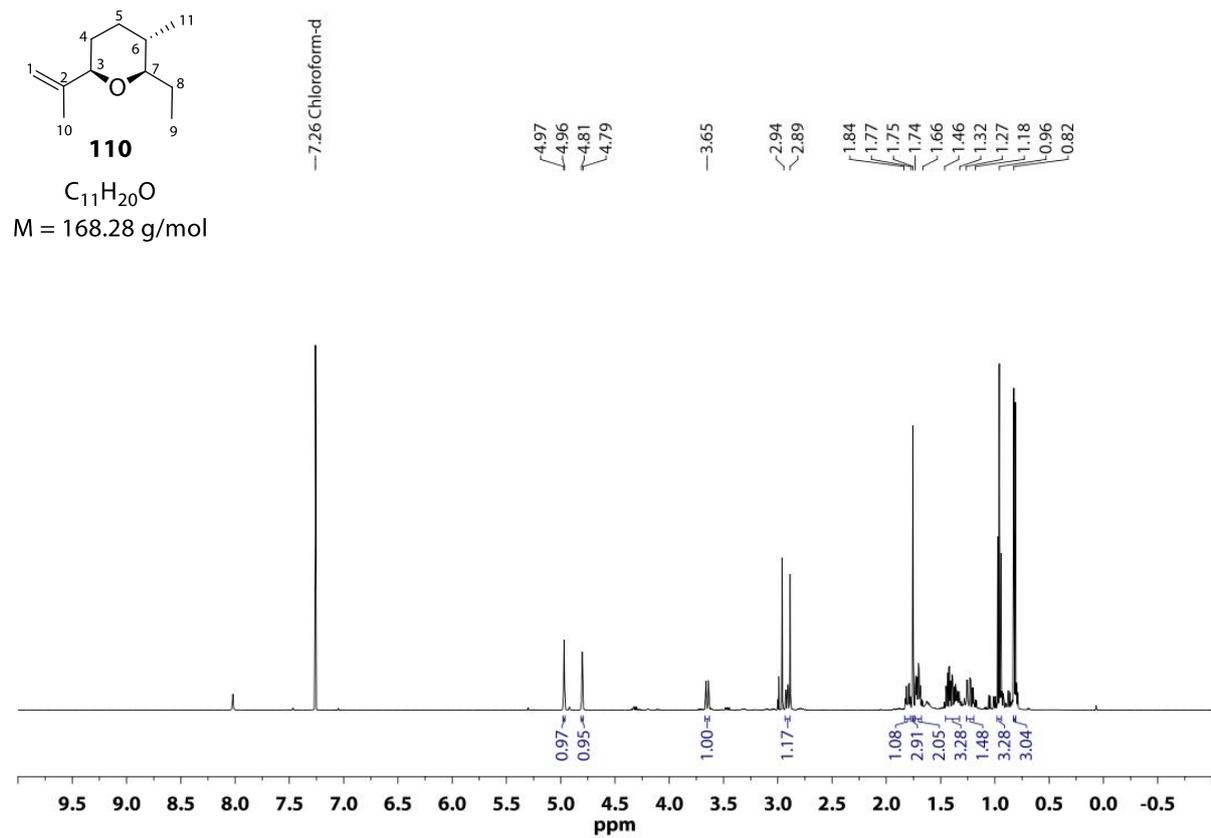


Abbildung 9–12.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **110** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

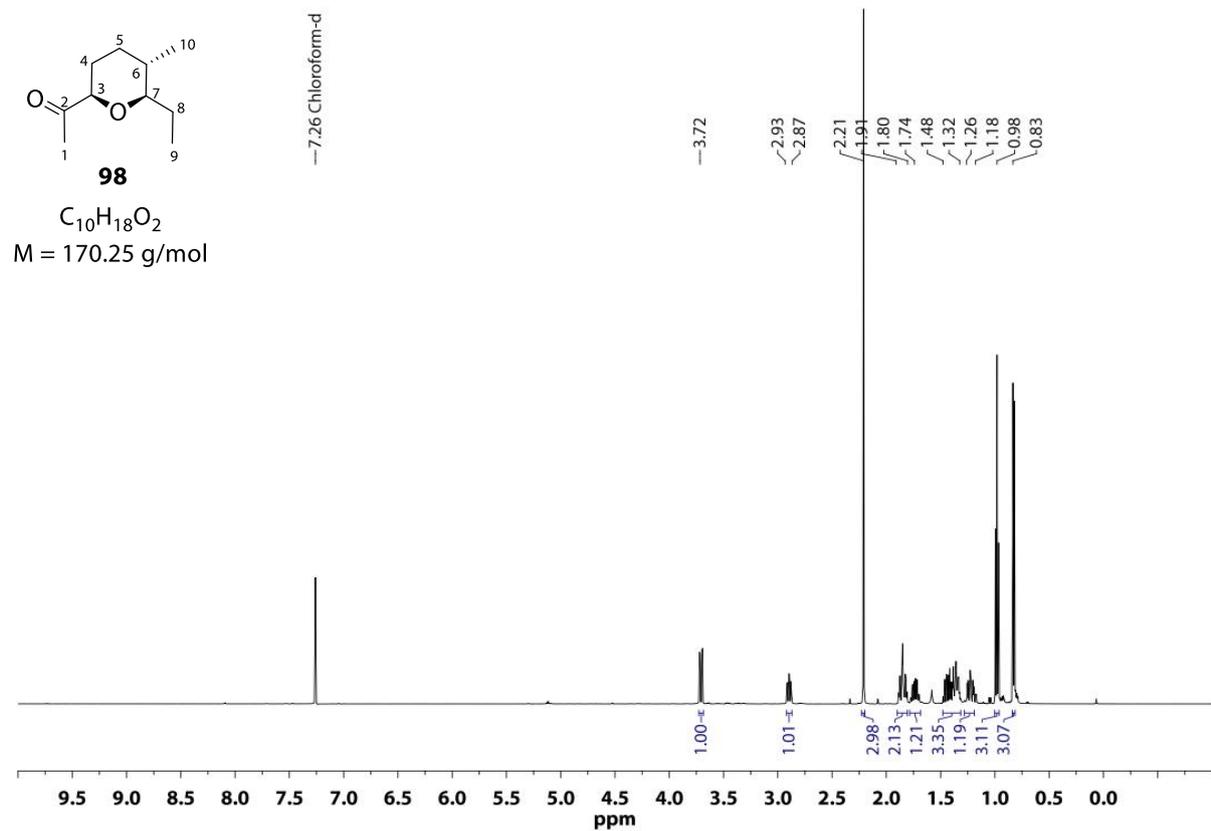


Abbildung 9–13.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **98** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

## Mittelfragment

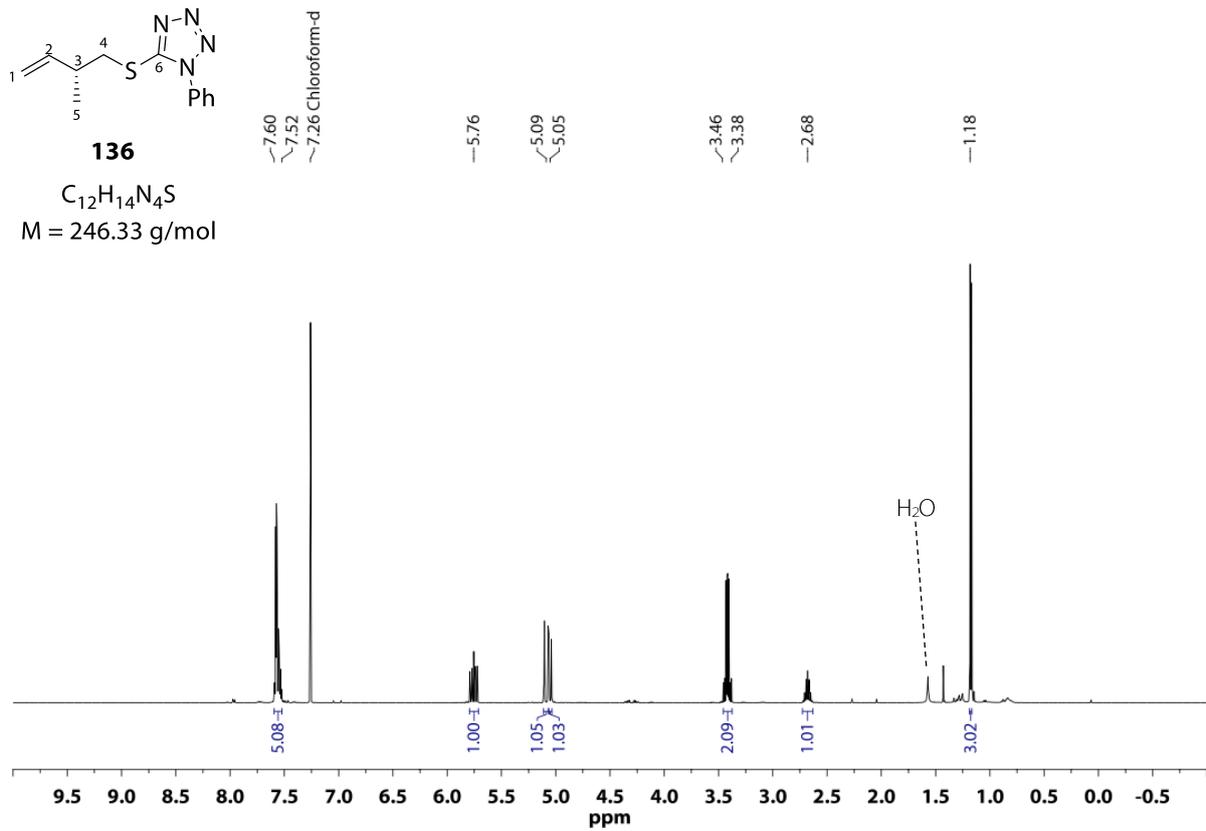


Abbildung 9–14.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **136** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

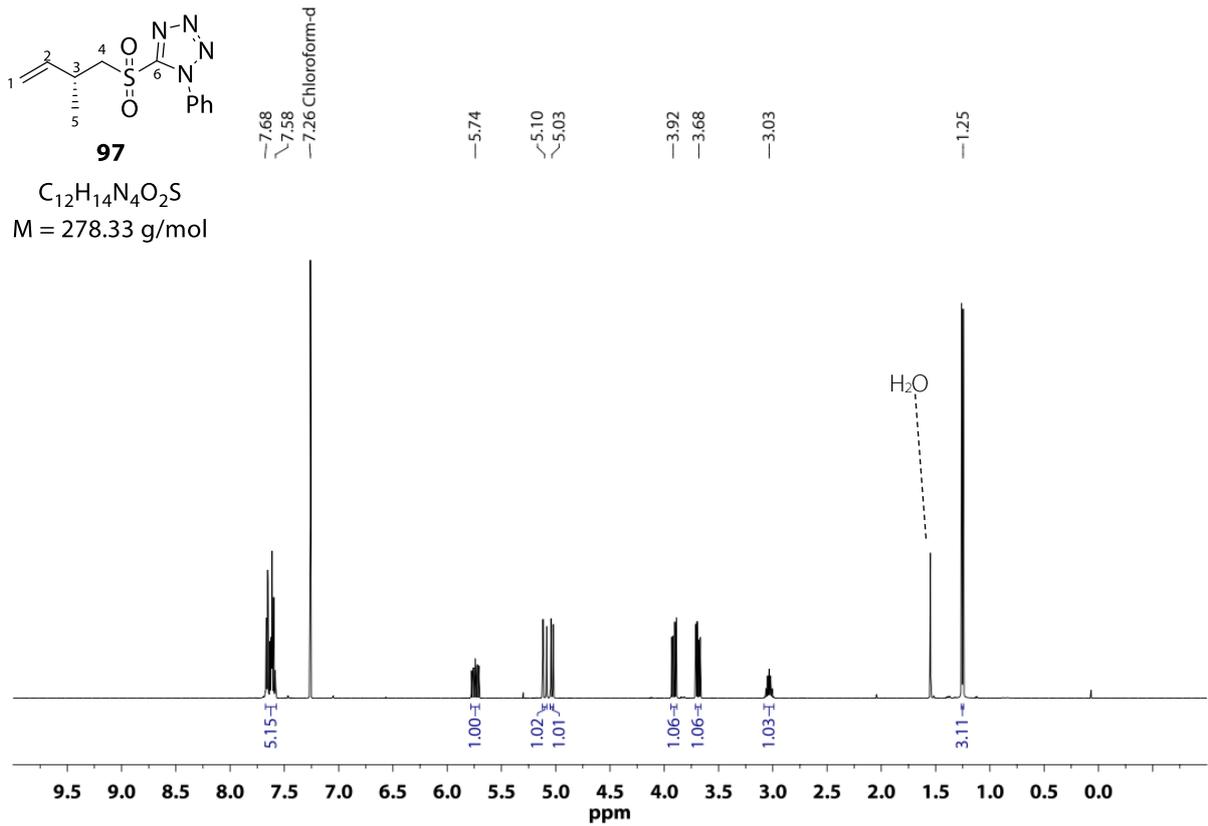


Abbildung 9–15.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **97** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

### JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung

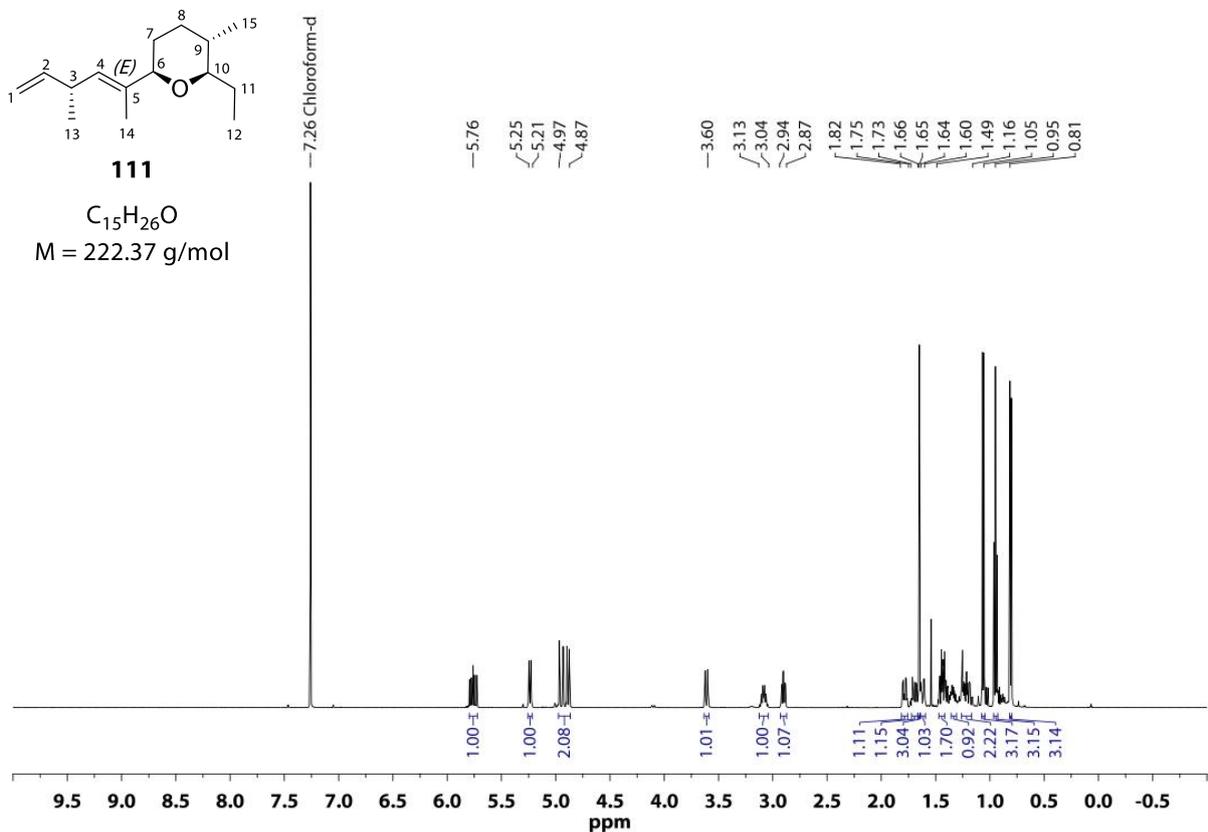


Abbildung 9–16.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **111** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

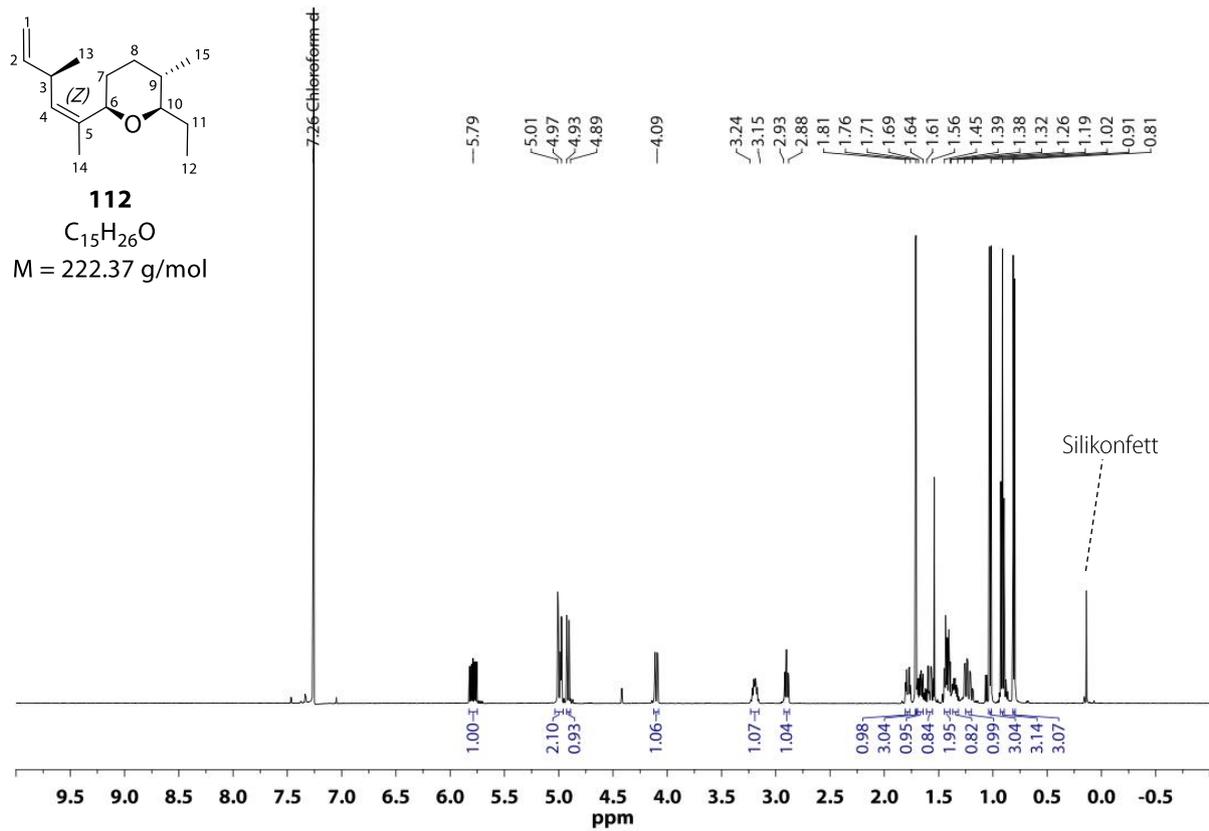


Abbildung 9–17.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **112** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

### Westfragmente

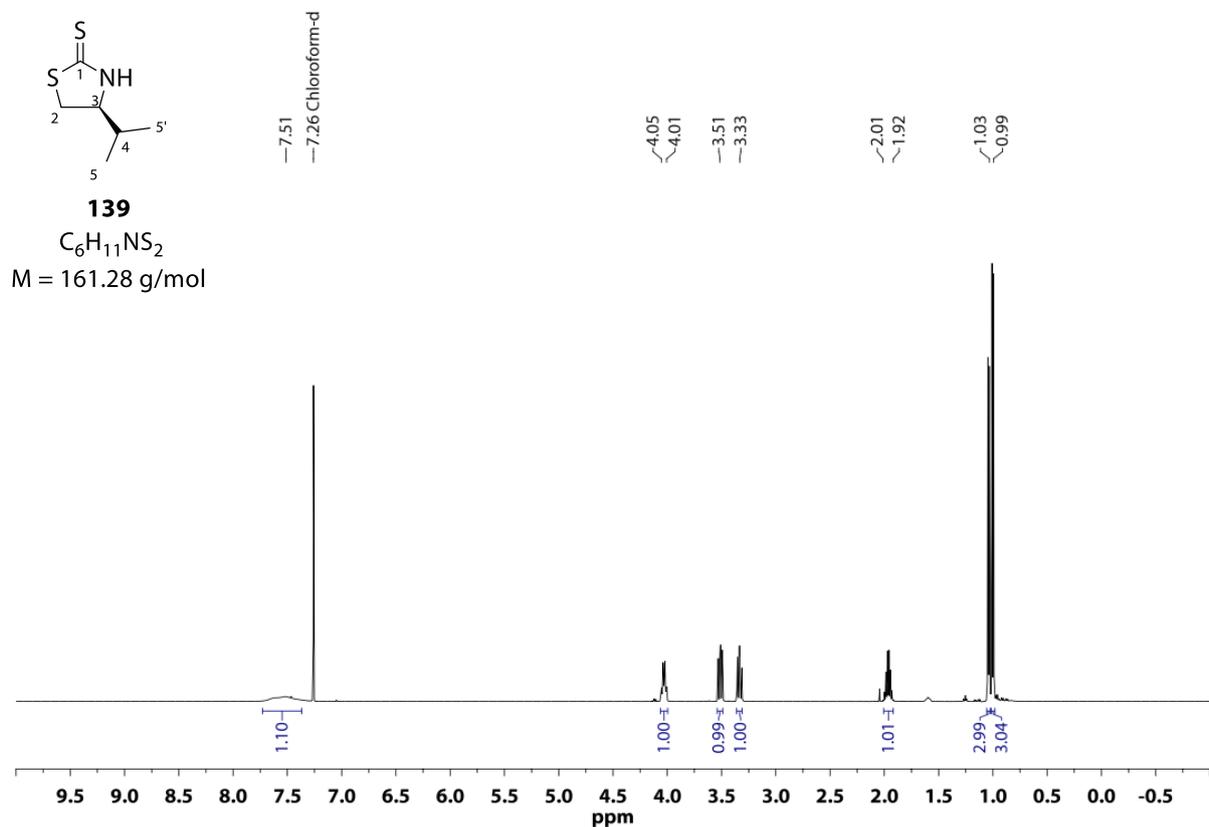


Abbildung 9–18.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **139** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

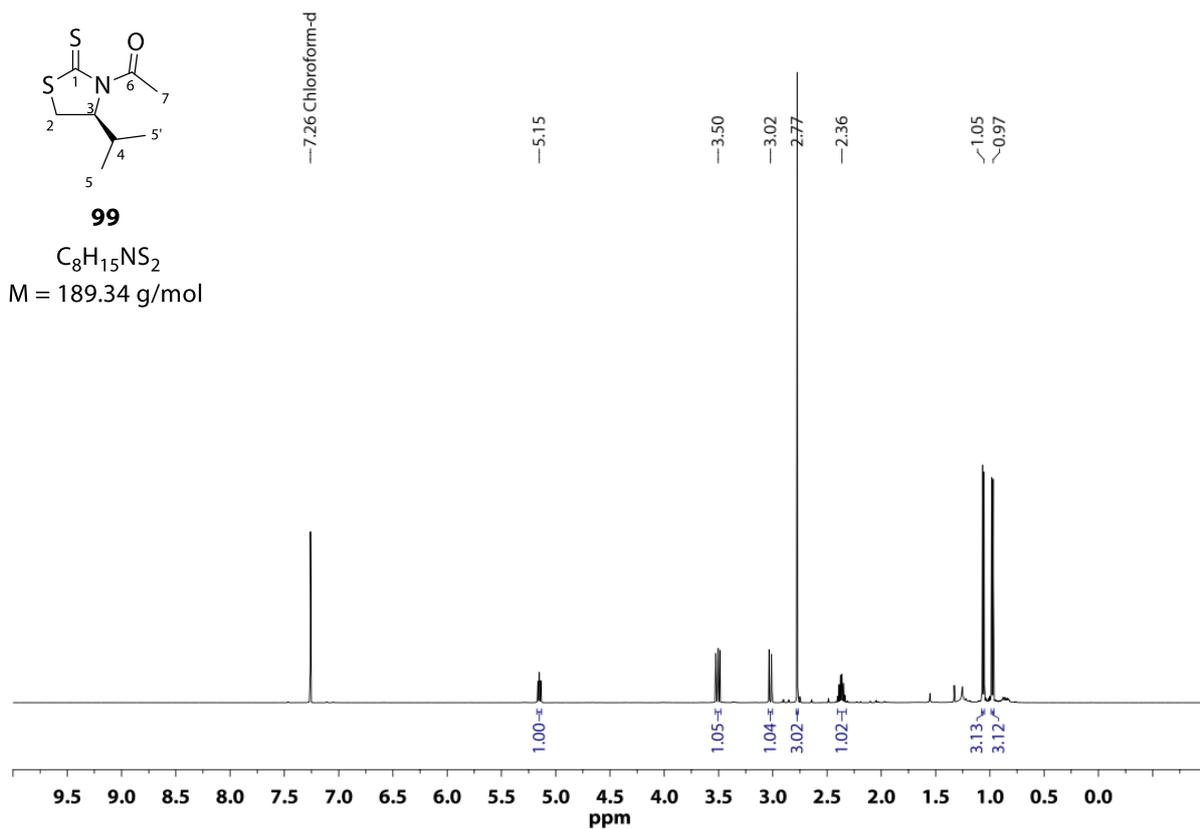


Abbildung 9–19.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **99** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

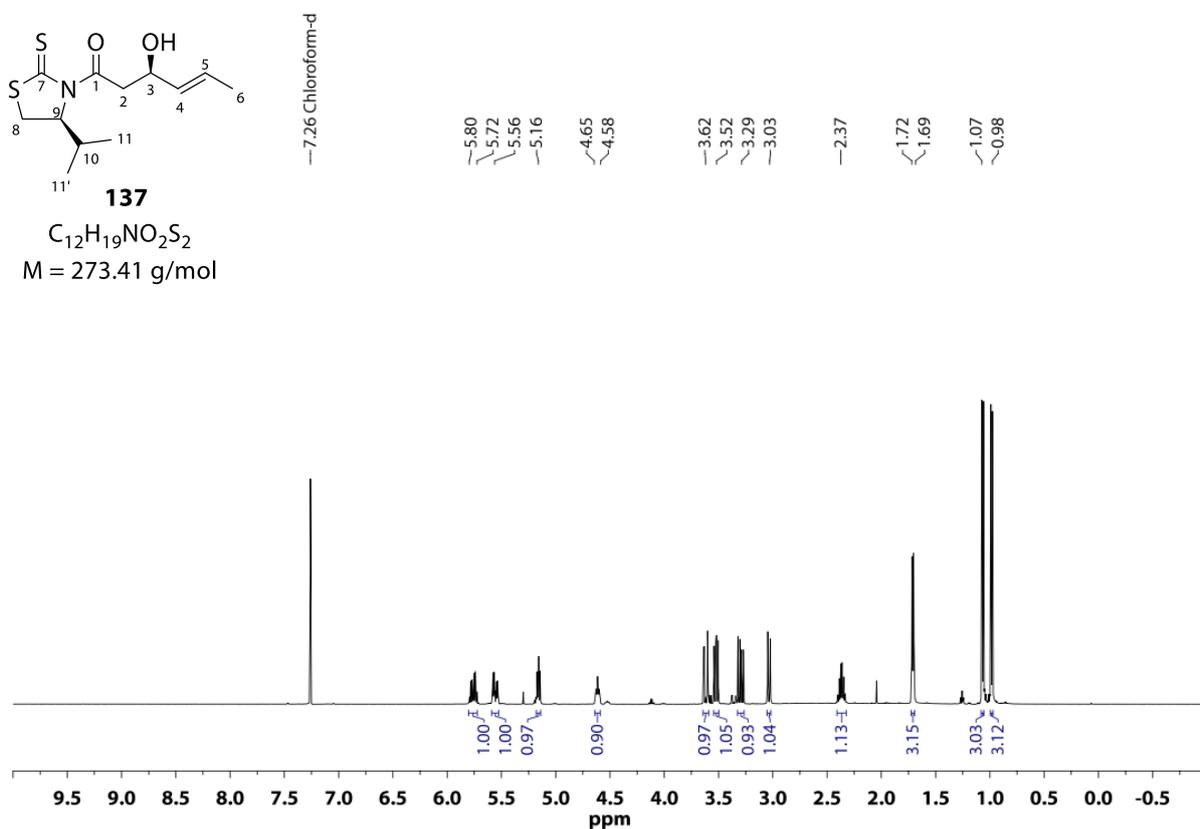


Abbildung 9–20.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **137** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

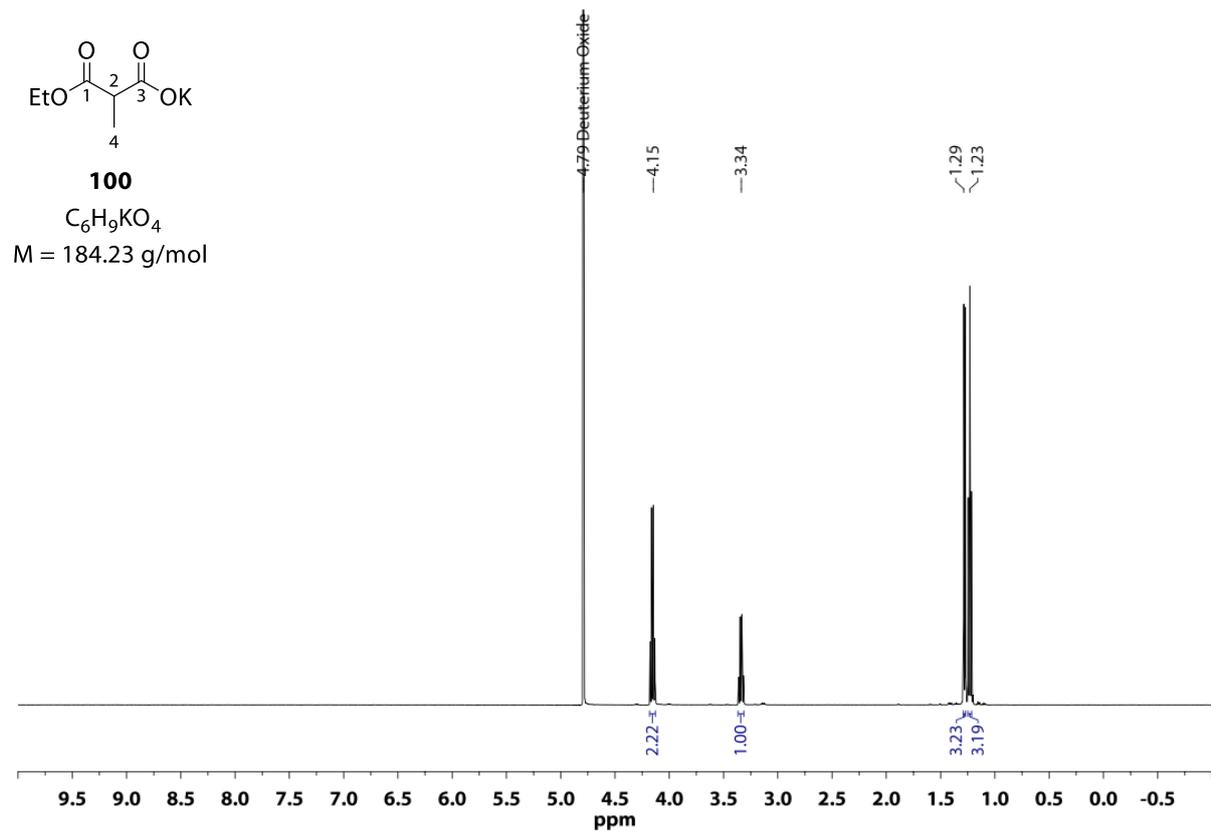


Abbildung 9–21.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **100** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

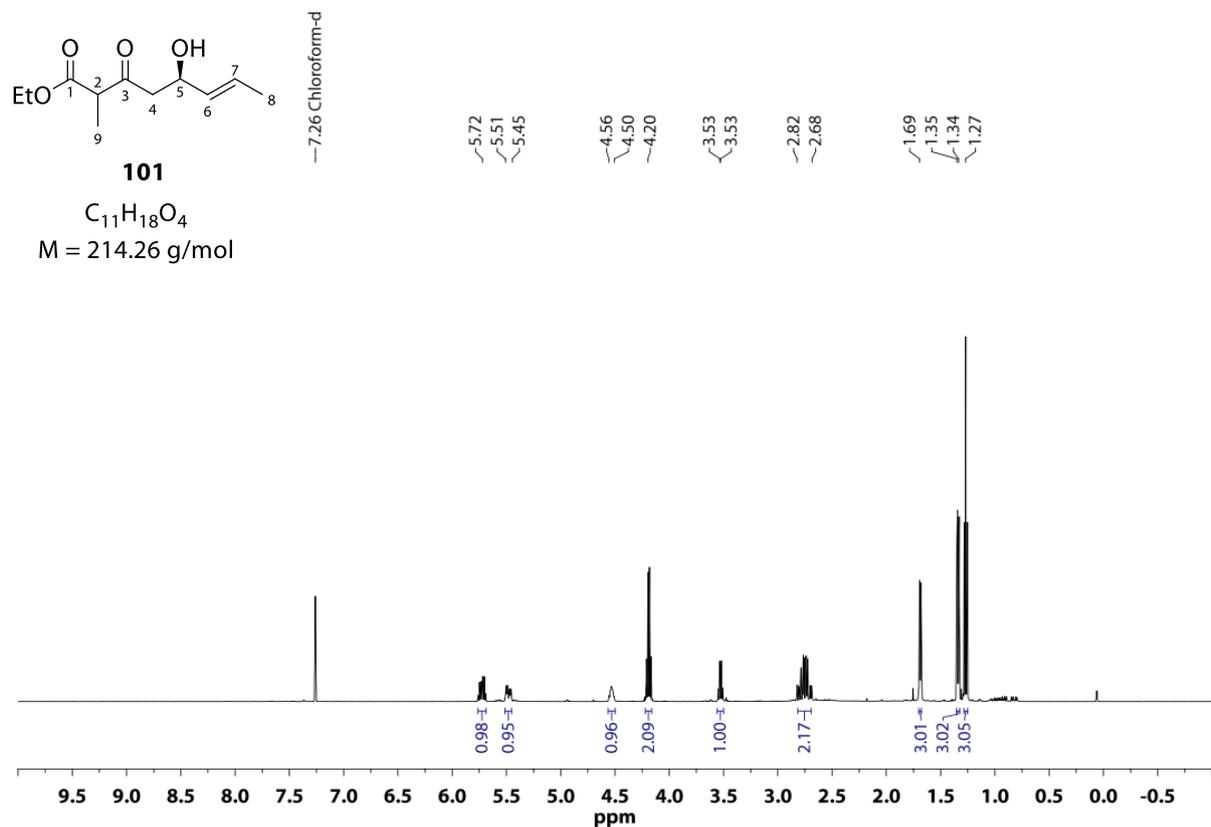


Abbildung 9–22.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **101** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

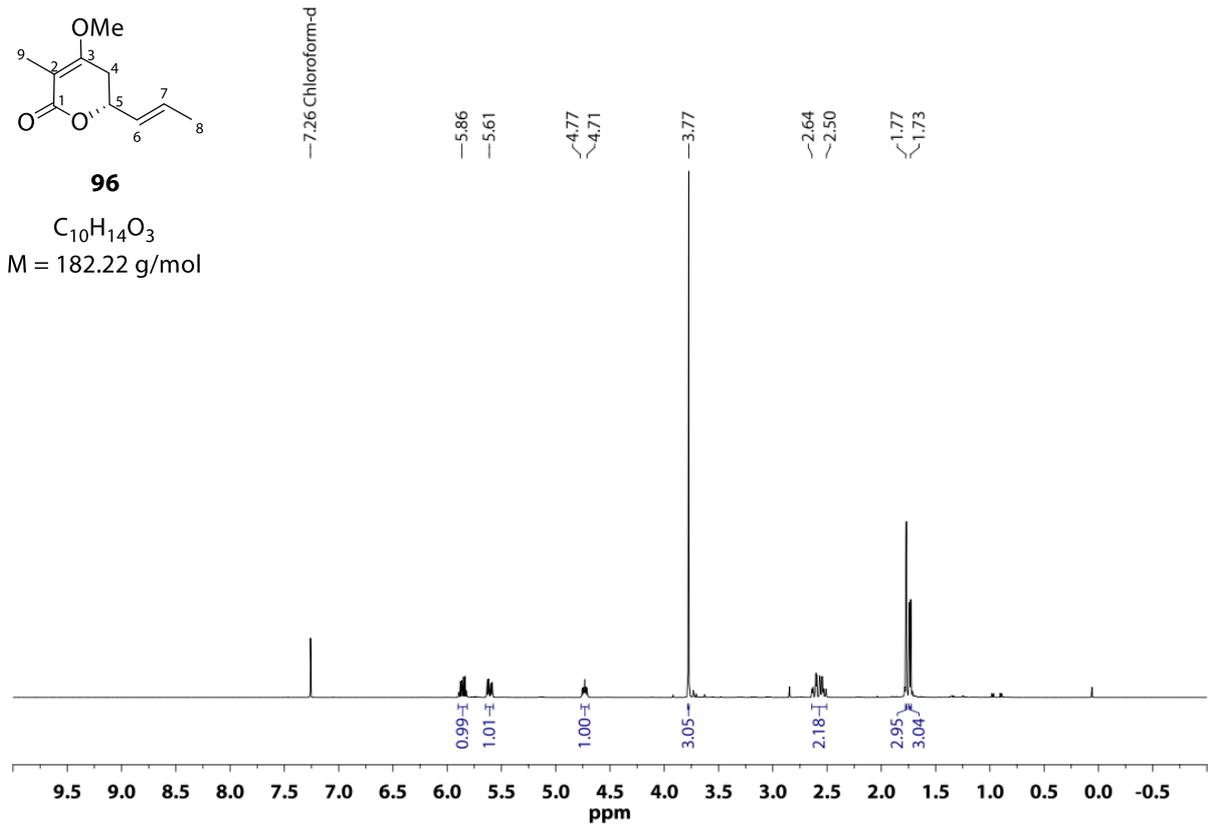


Abbildung 9–23.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **96** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

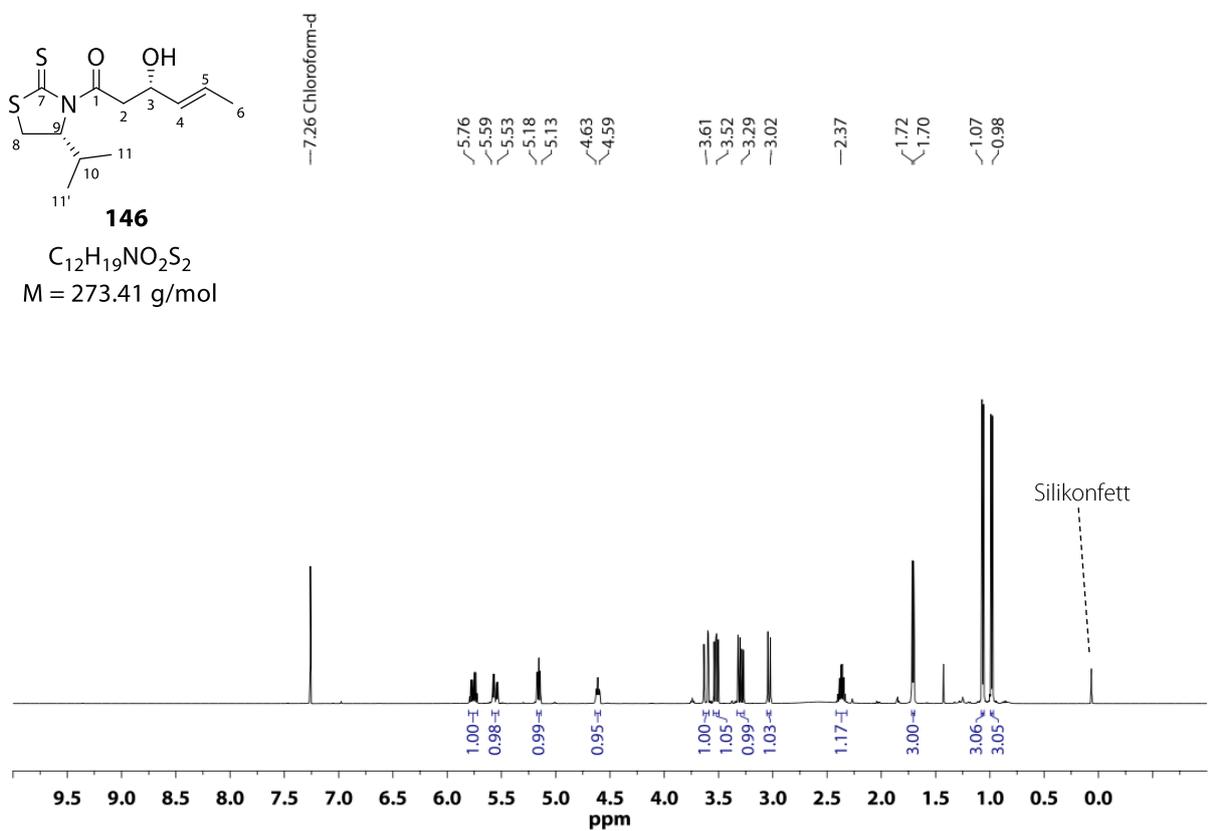


Abbildung 9–24.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **146** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

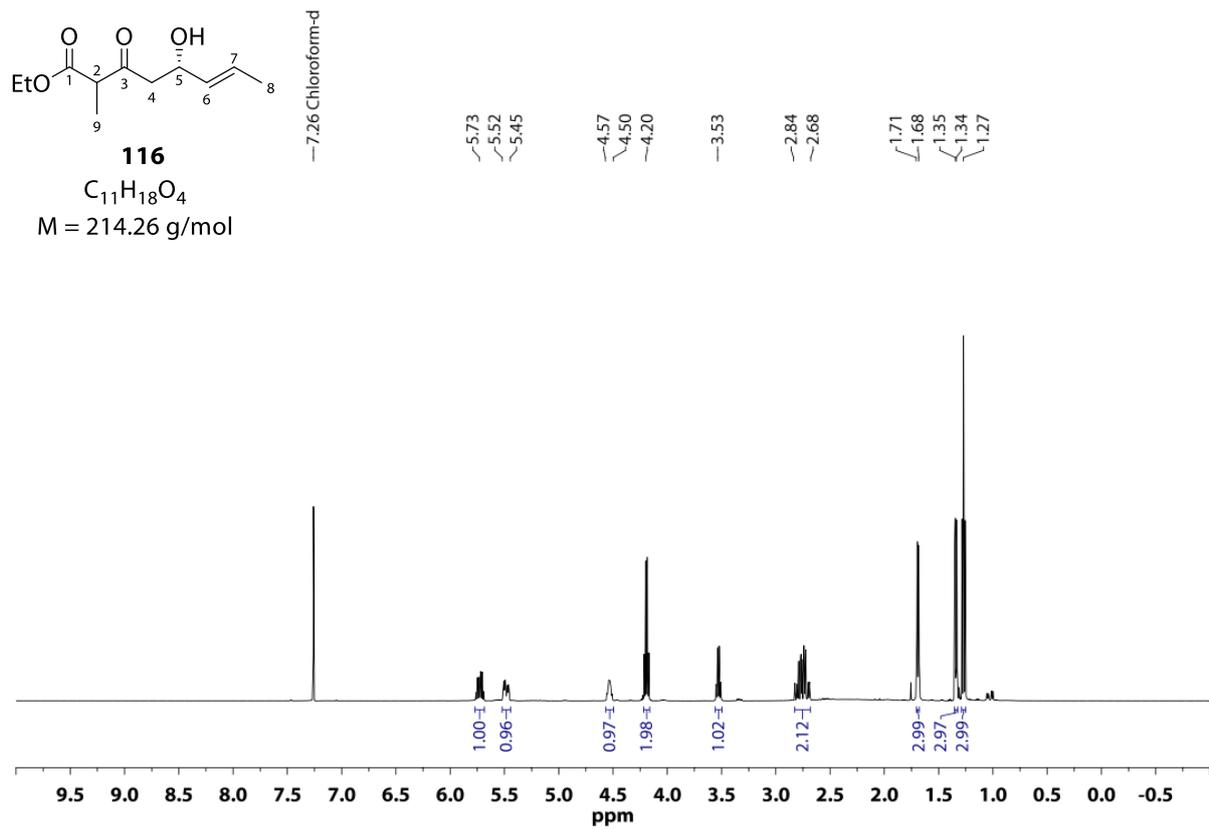


Abbildung 9–25.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **116** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

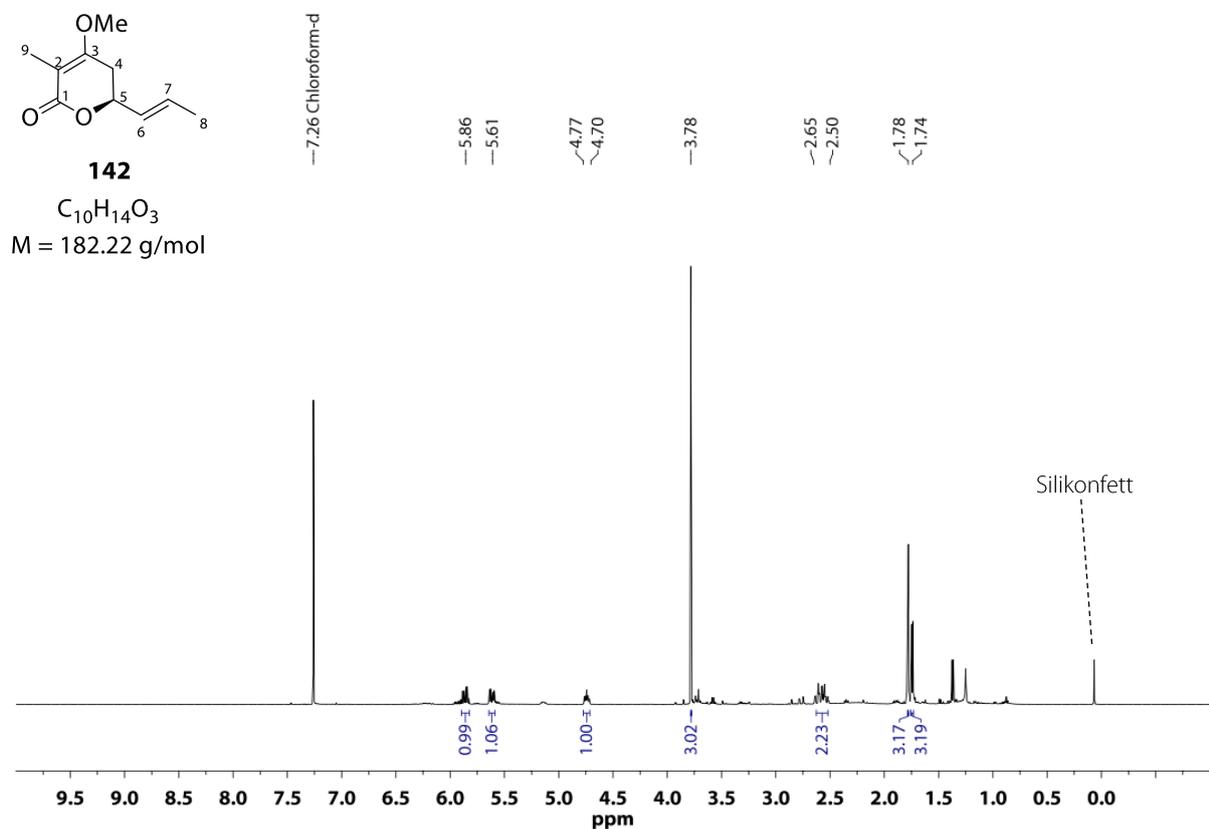


Abbildung 9–26.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **142** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

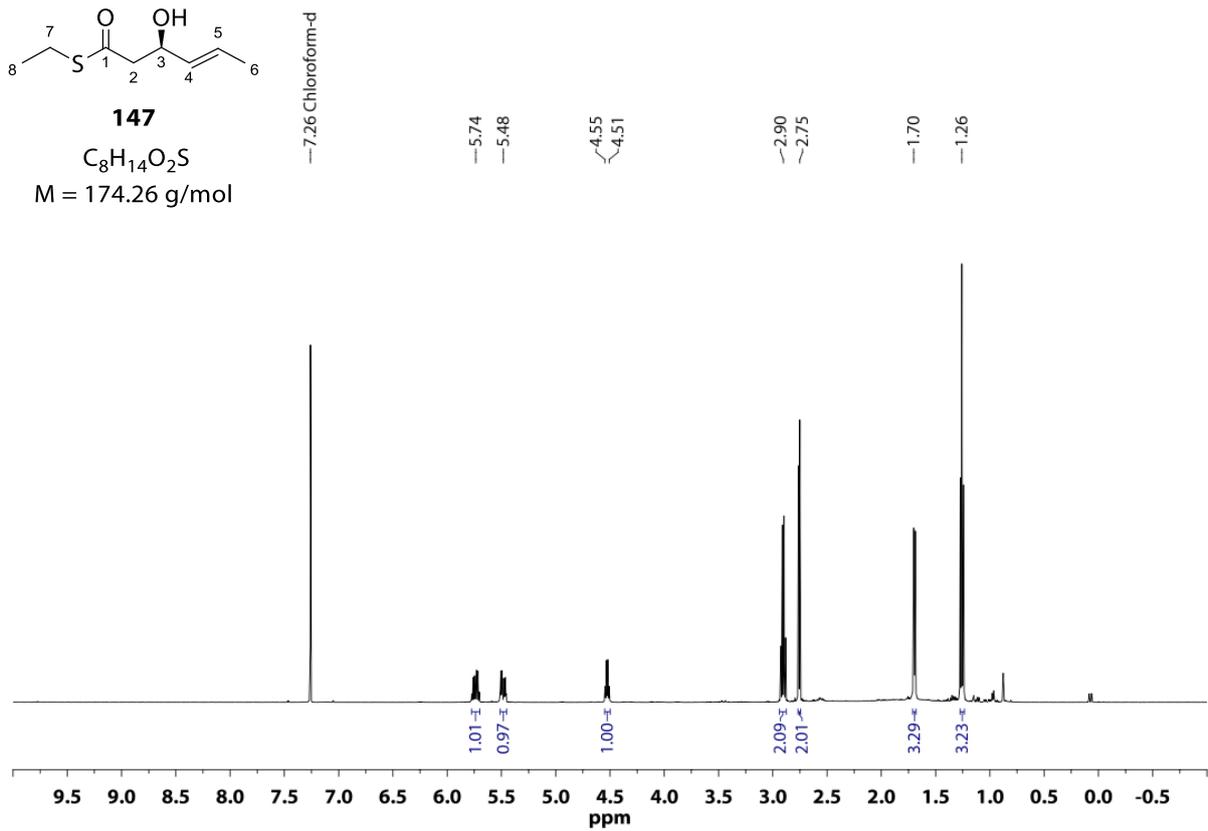


Abbildung 9–27.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **147** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

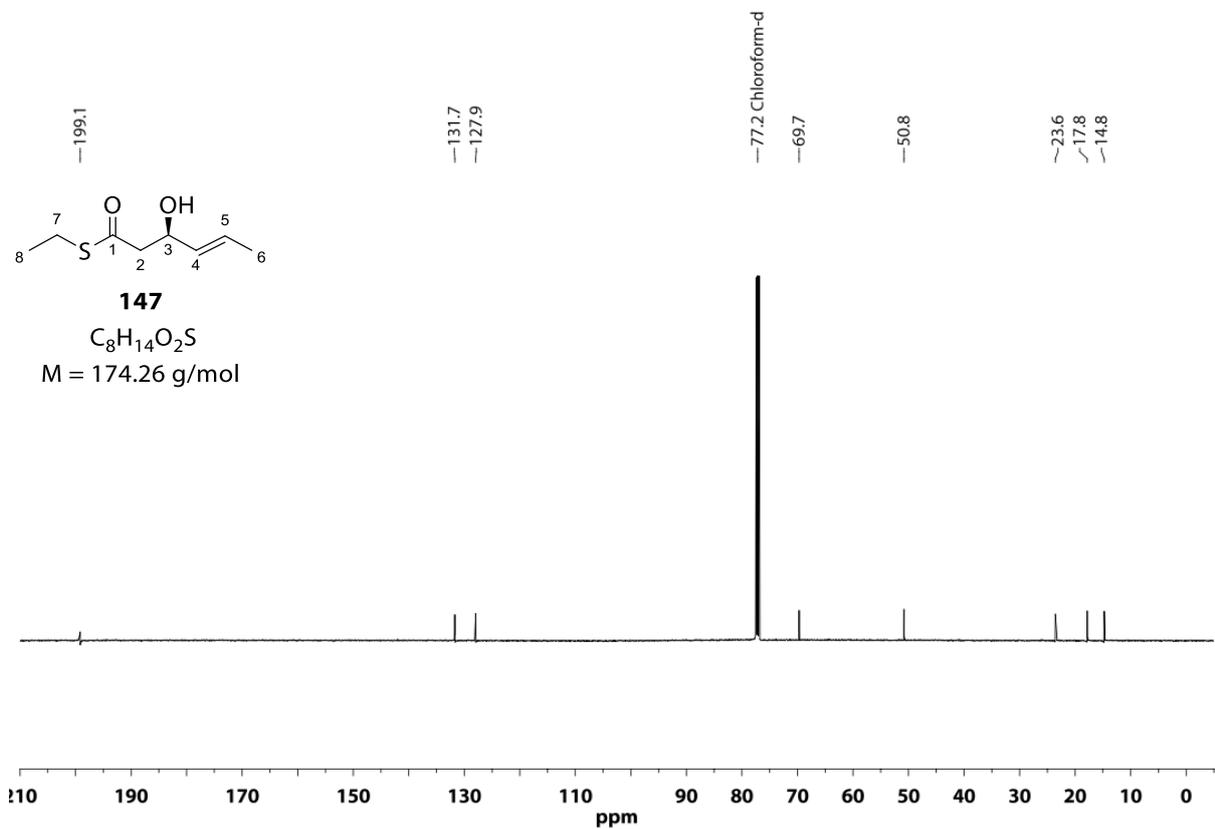


Abbildung 9–28.  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von **147** ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz).

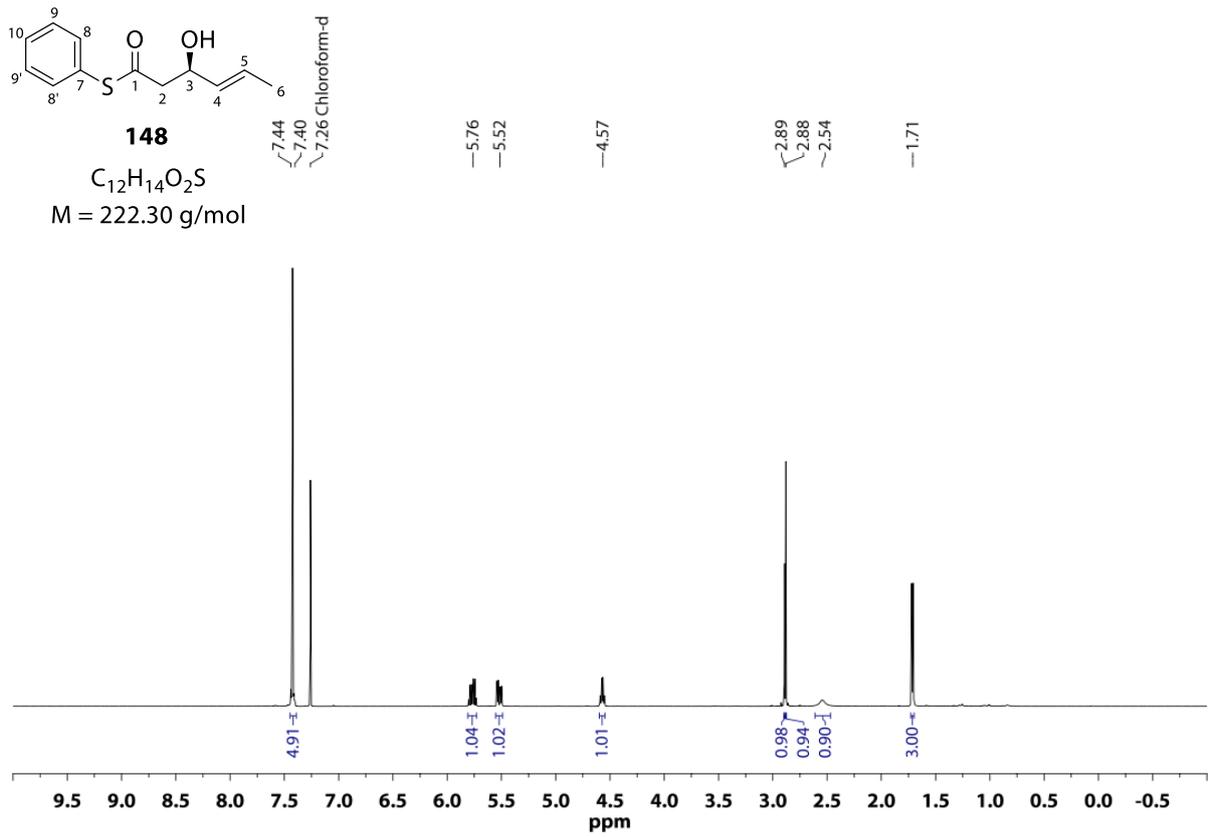


Abbildung 9–29.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **148** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

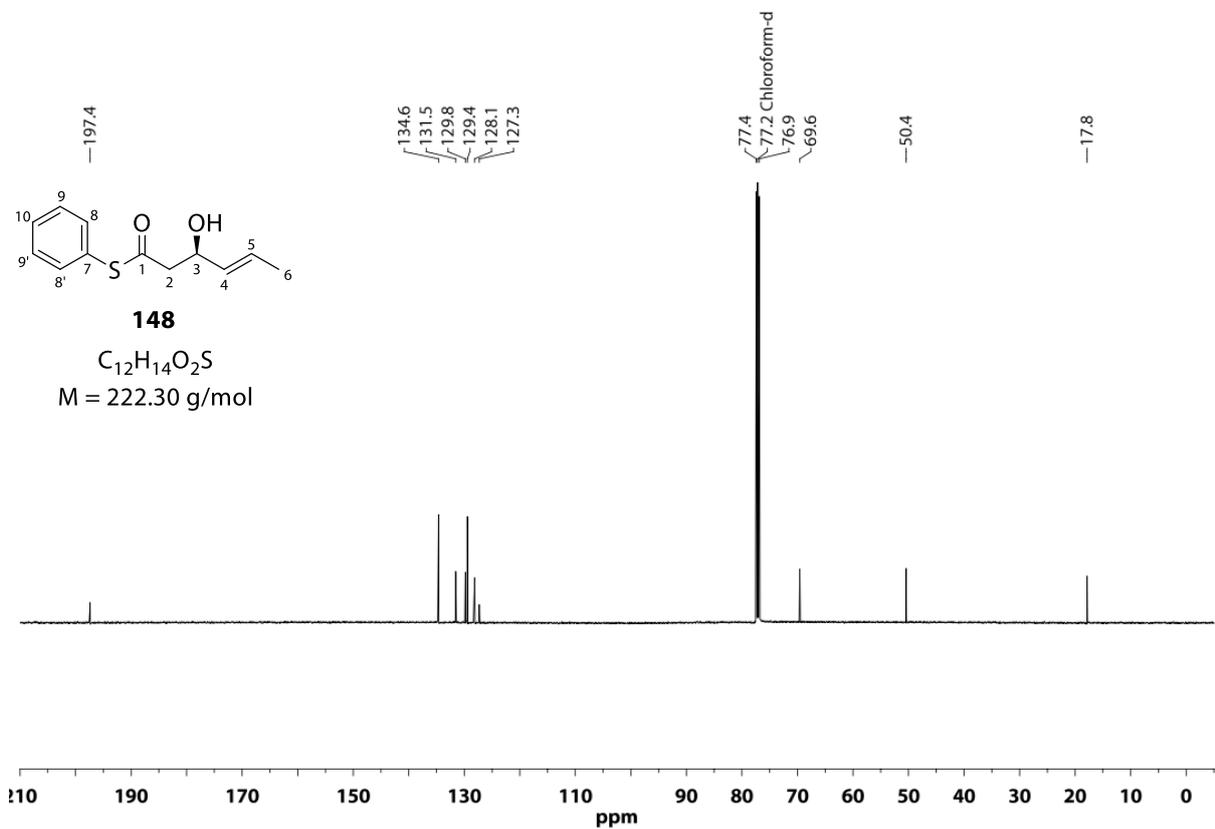


Abbildung 9–30.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **148** ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz).

# Jerangolide

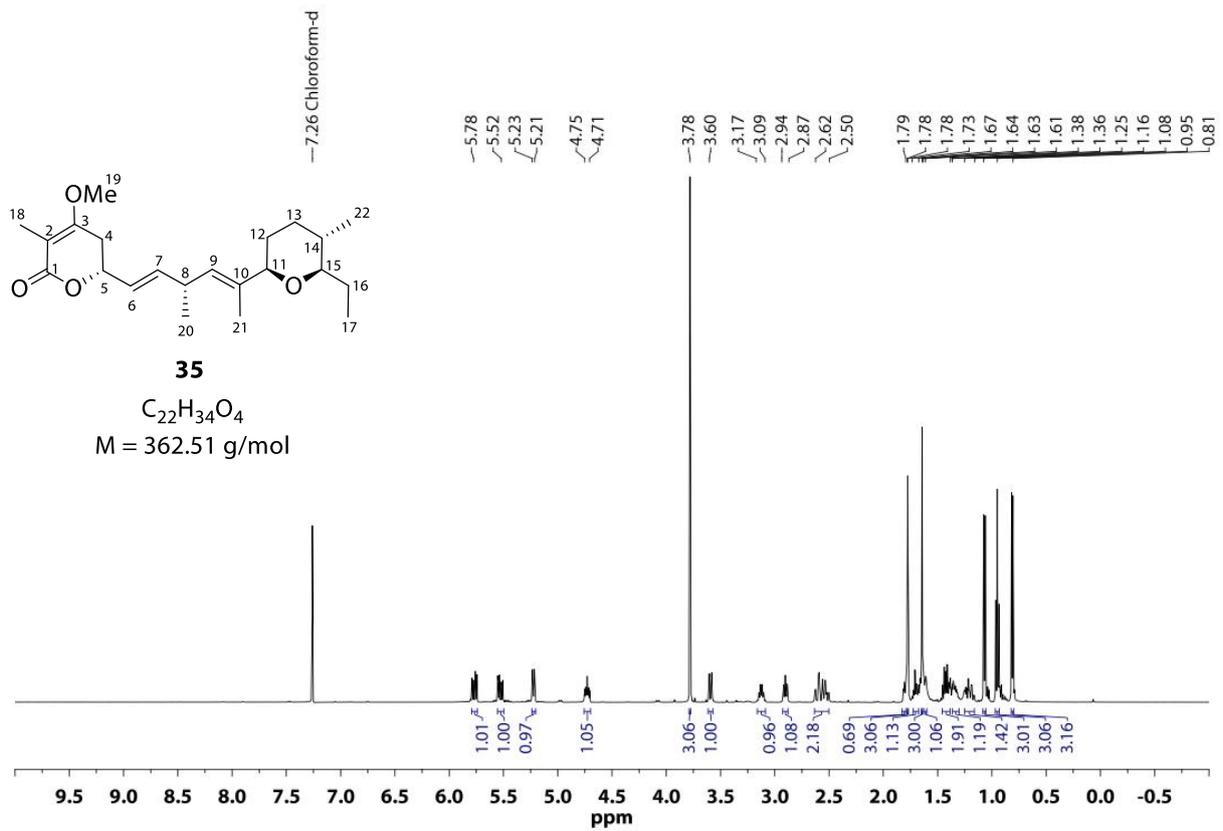


Abbildung 9–31.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **35** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

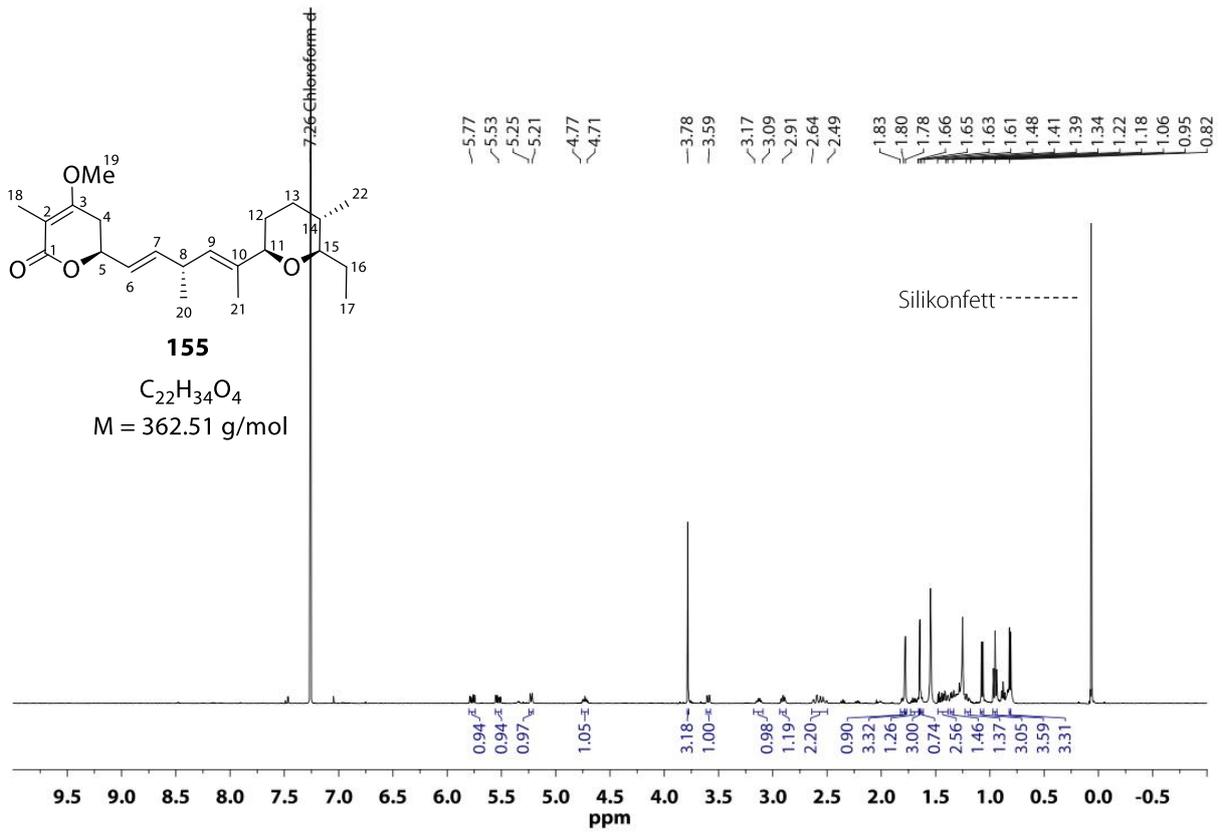


Abbildung 9–32.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **155** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

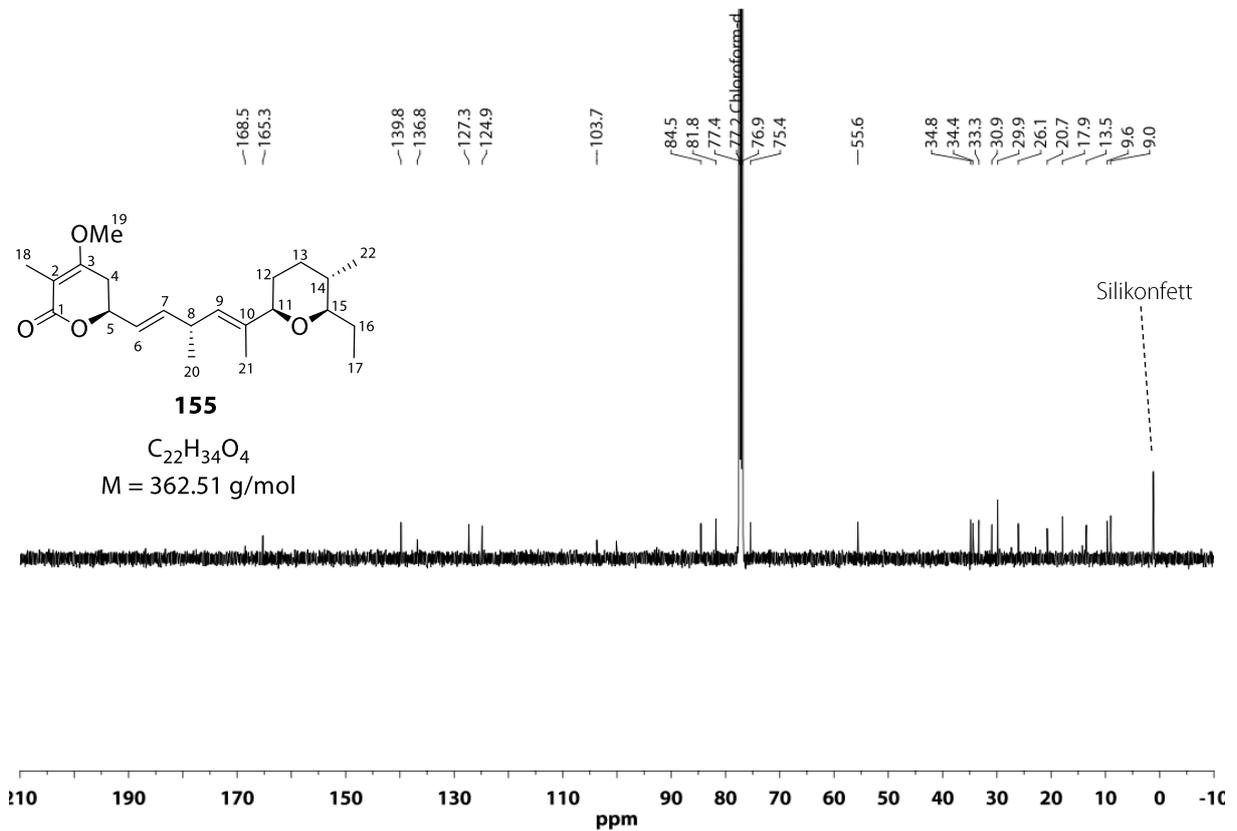


Abbildung 9–33.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **155** ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz).

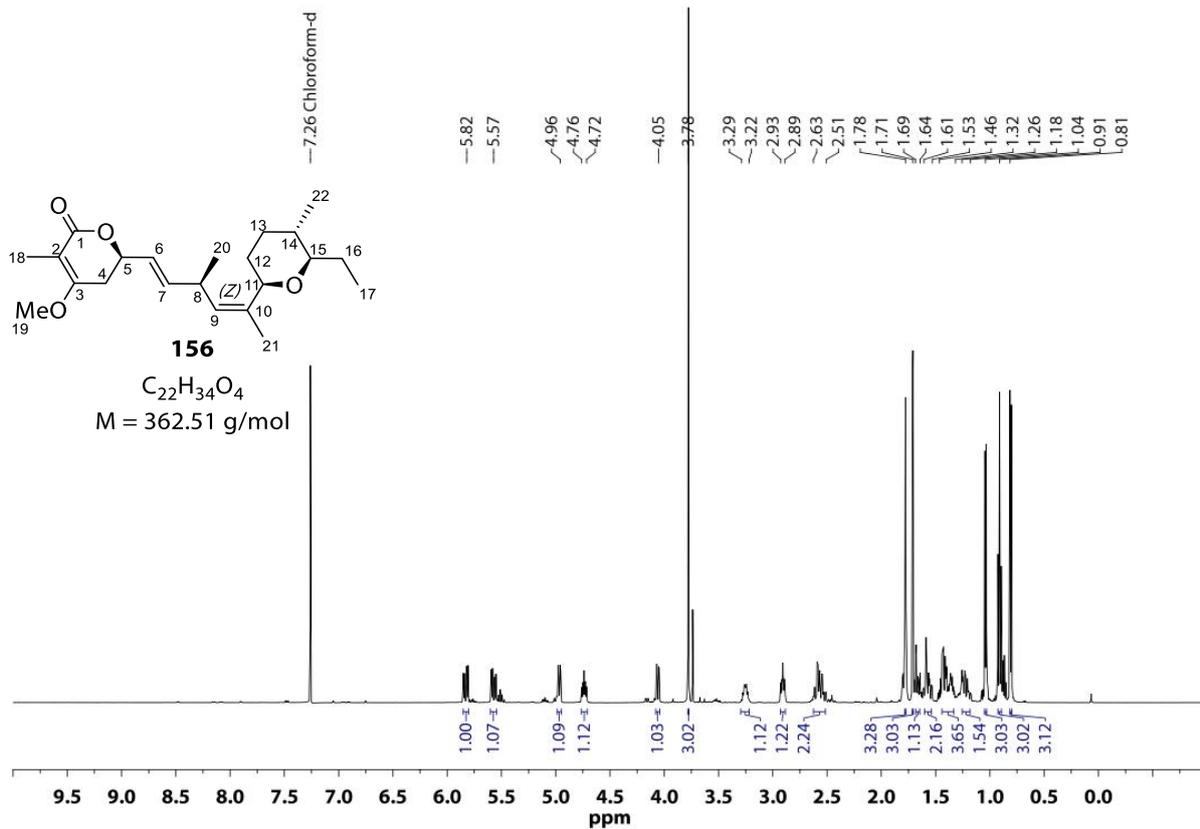


Abbildung 9–34.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **156** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

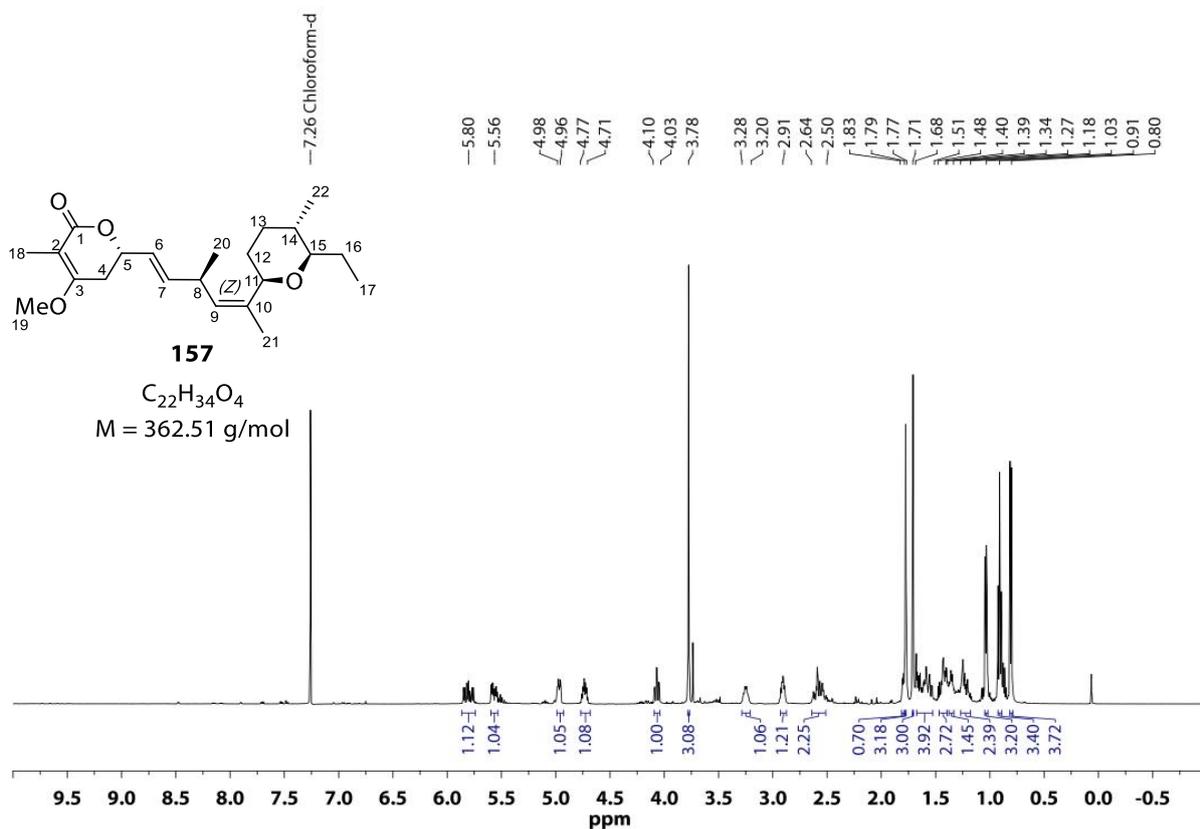


Abbildung 9–35.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **157** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

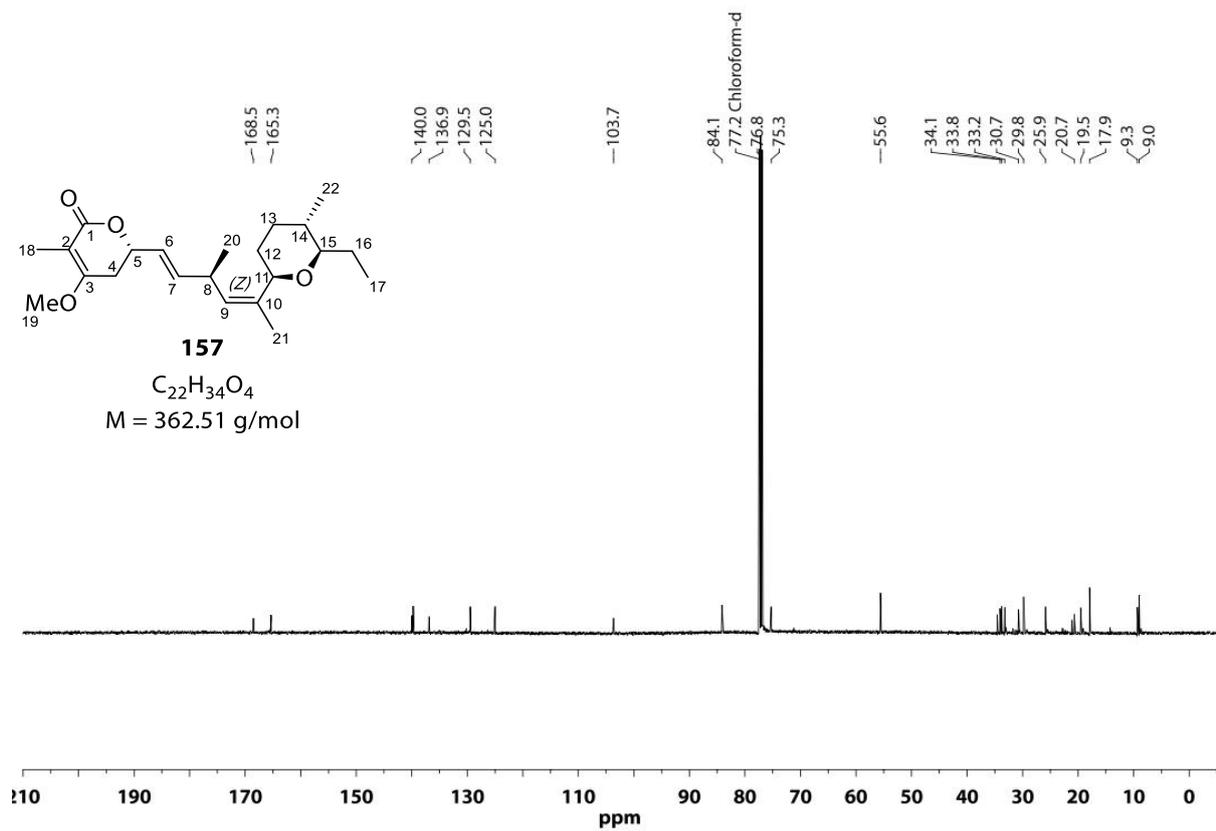


Abbildung 9–36.  $^{13}C$ -NMR-Spektrum von **157** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz).

### Projerangolid

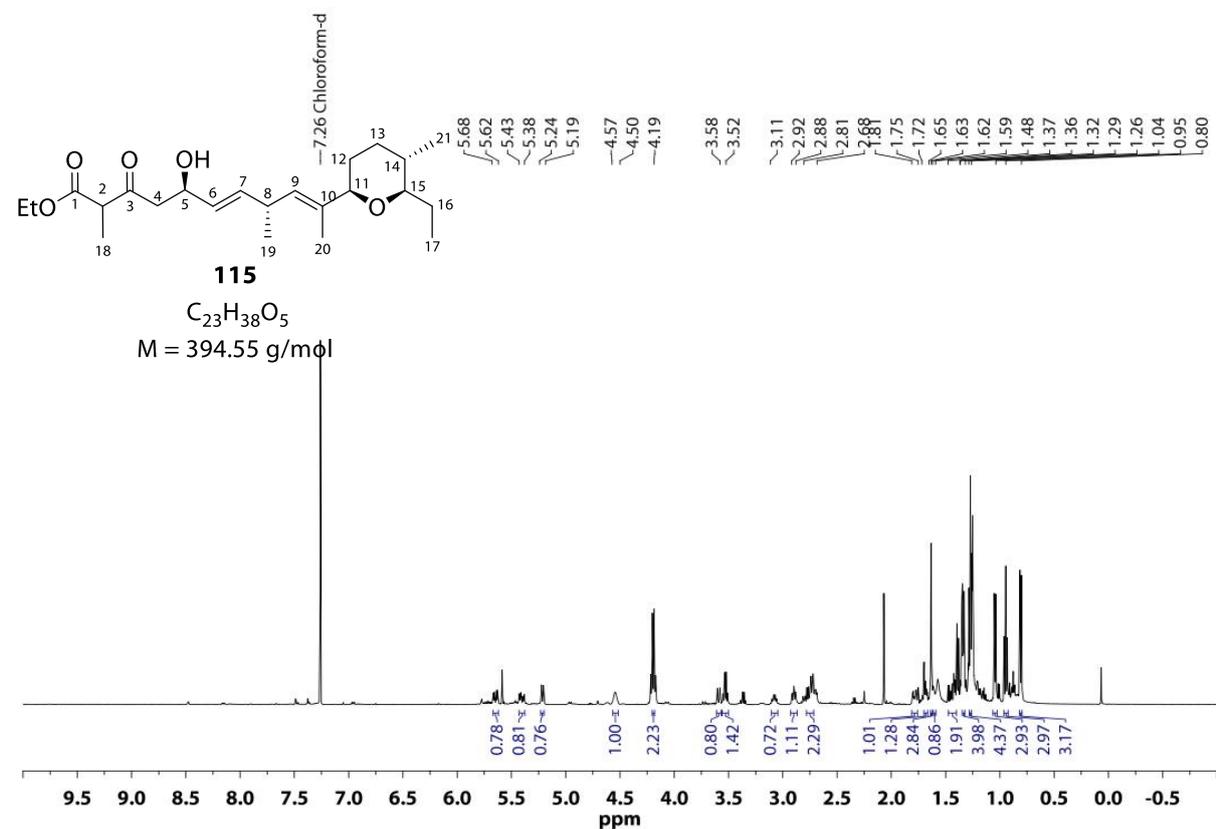


Abbildung 9–37.  $^1H$ -NMR-Spektrum von **115** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

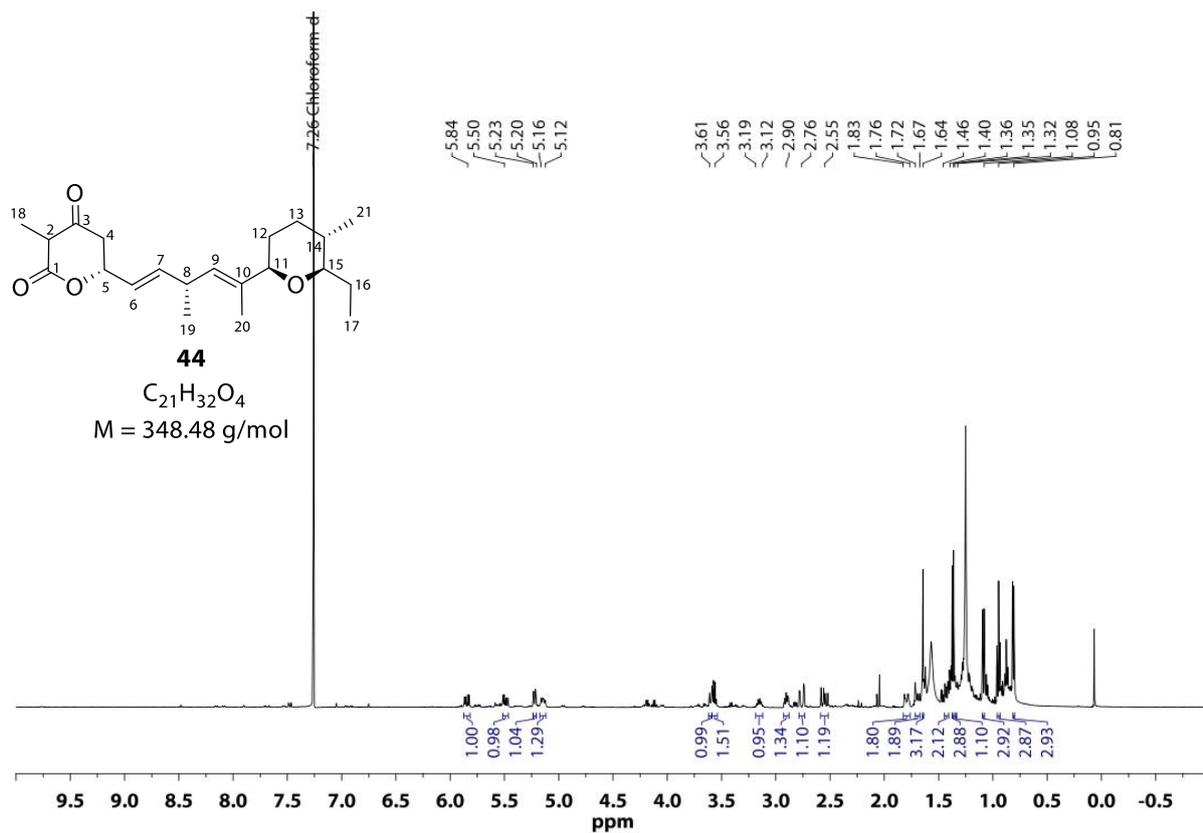


Abbildung 9–38.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **44** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

### Biosynthetische Vorläufer-Surrogate

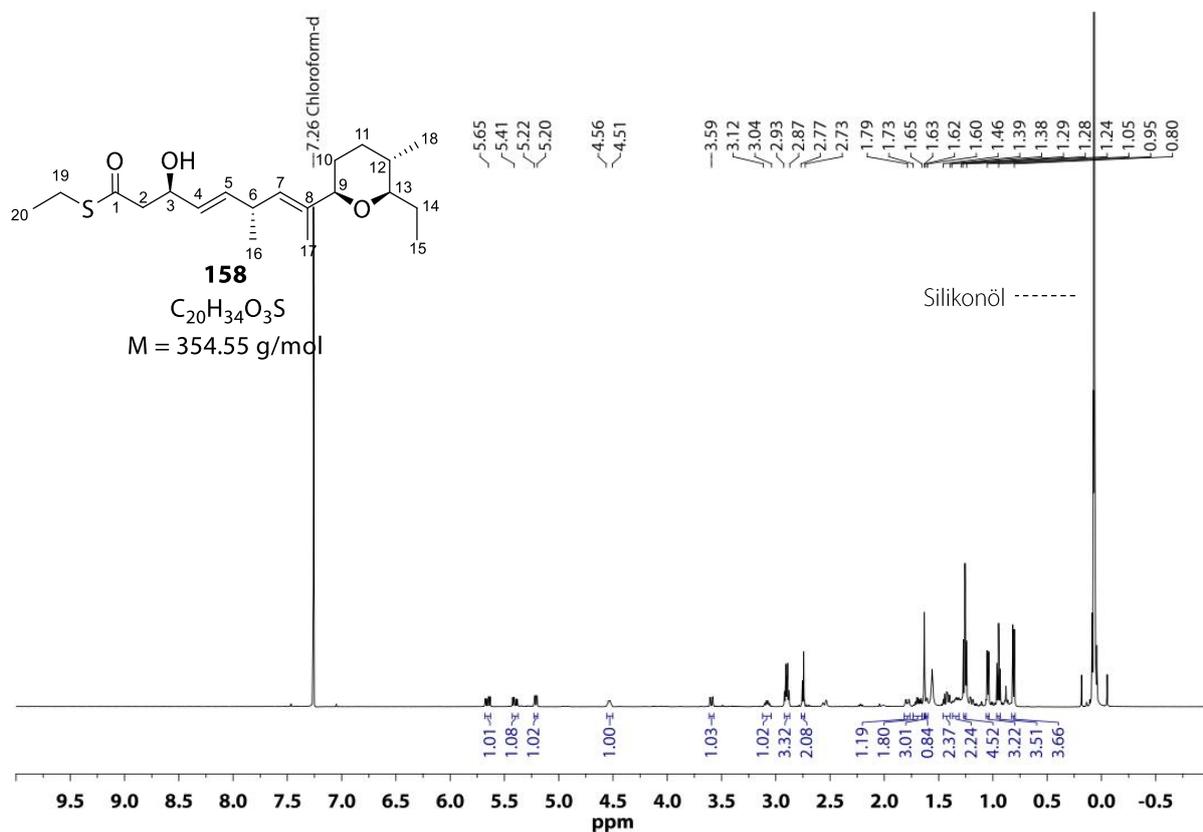


Abbildung 9–39.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **158** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

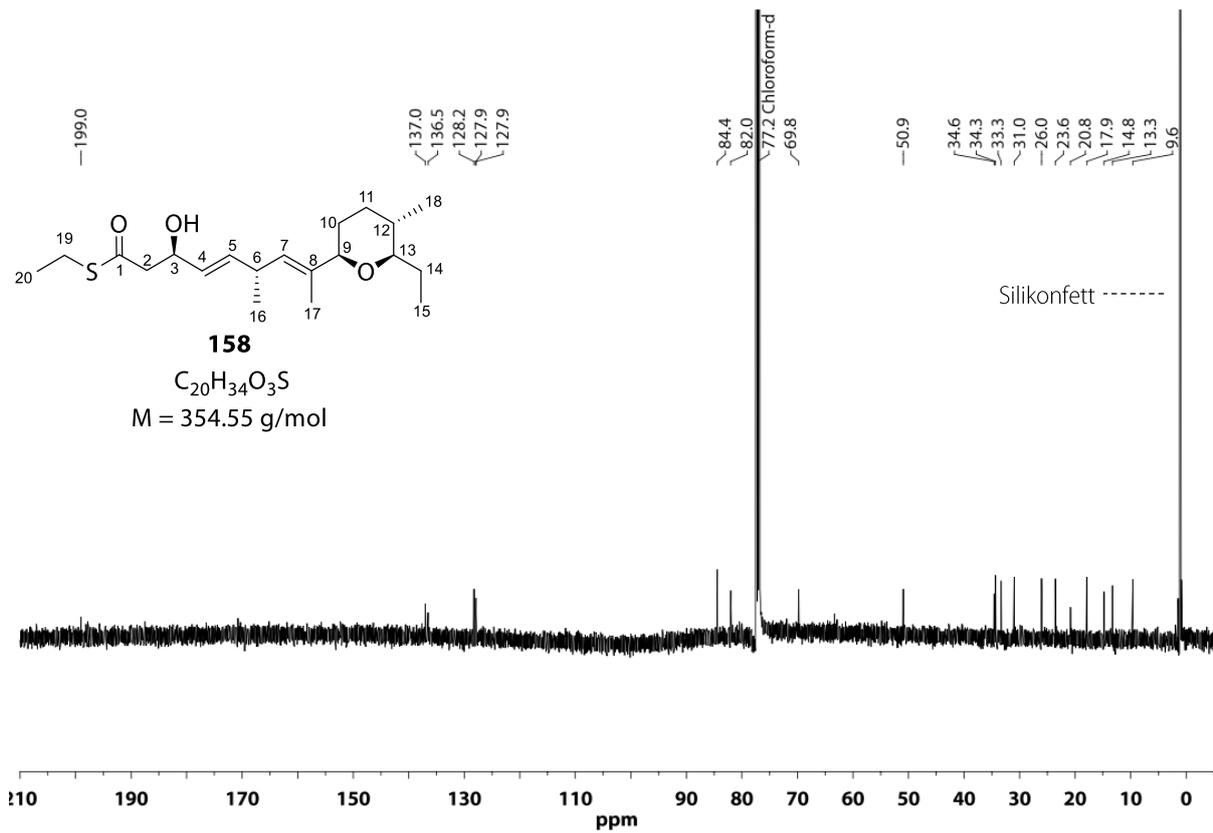


Abbildung 9-40. <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von **158** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz).

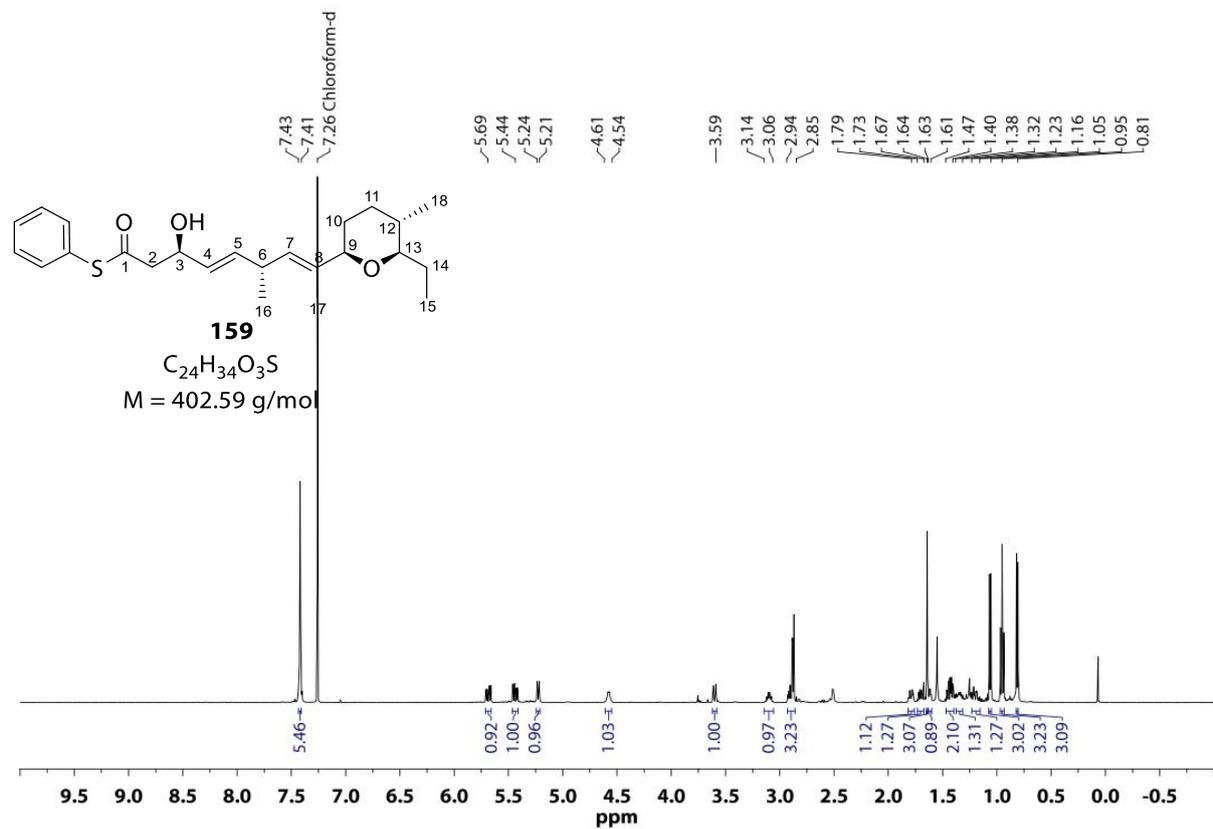


Abbildung 9-41. <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **159** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

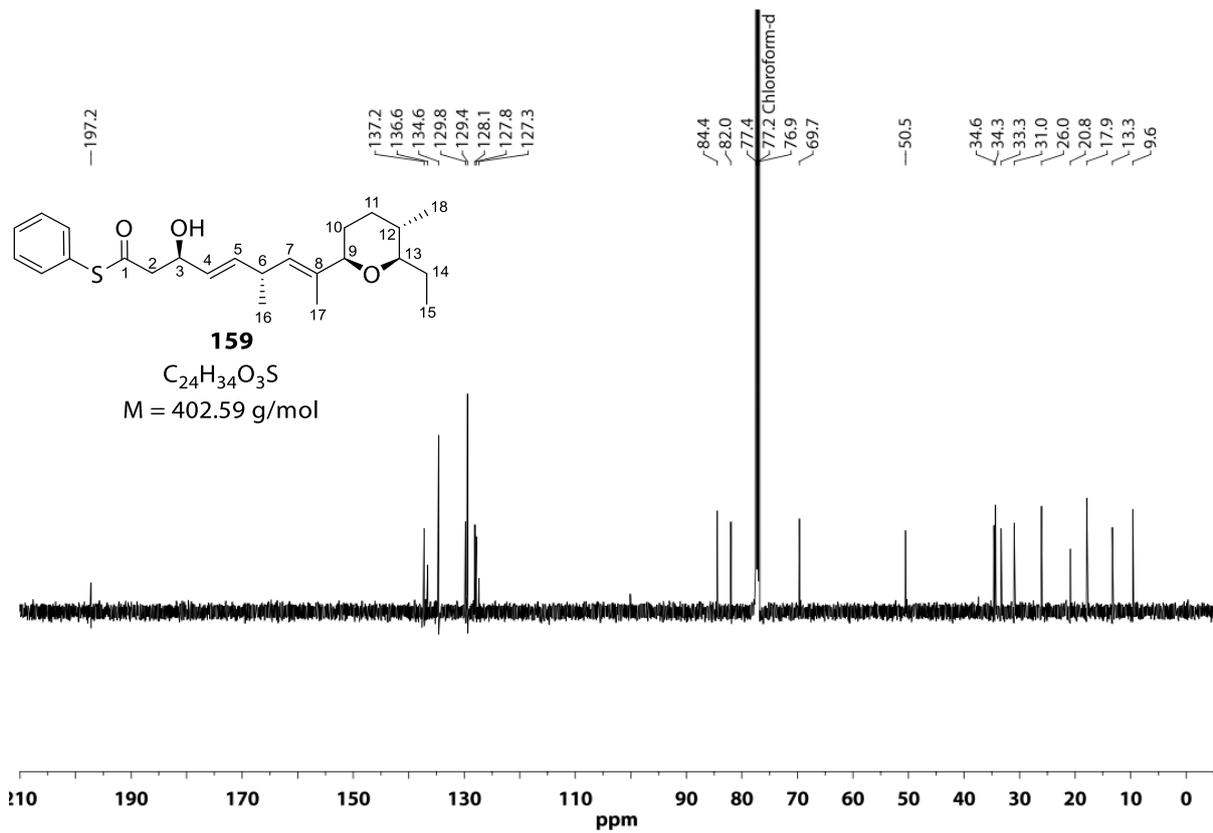


Abbildung 9-42.  $^{13}C$ -NMR-Spektrum von **159** ( $CDCl_3$ , 125 MHz).

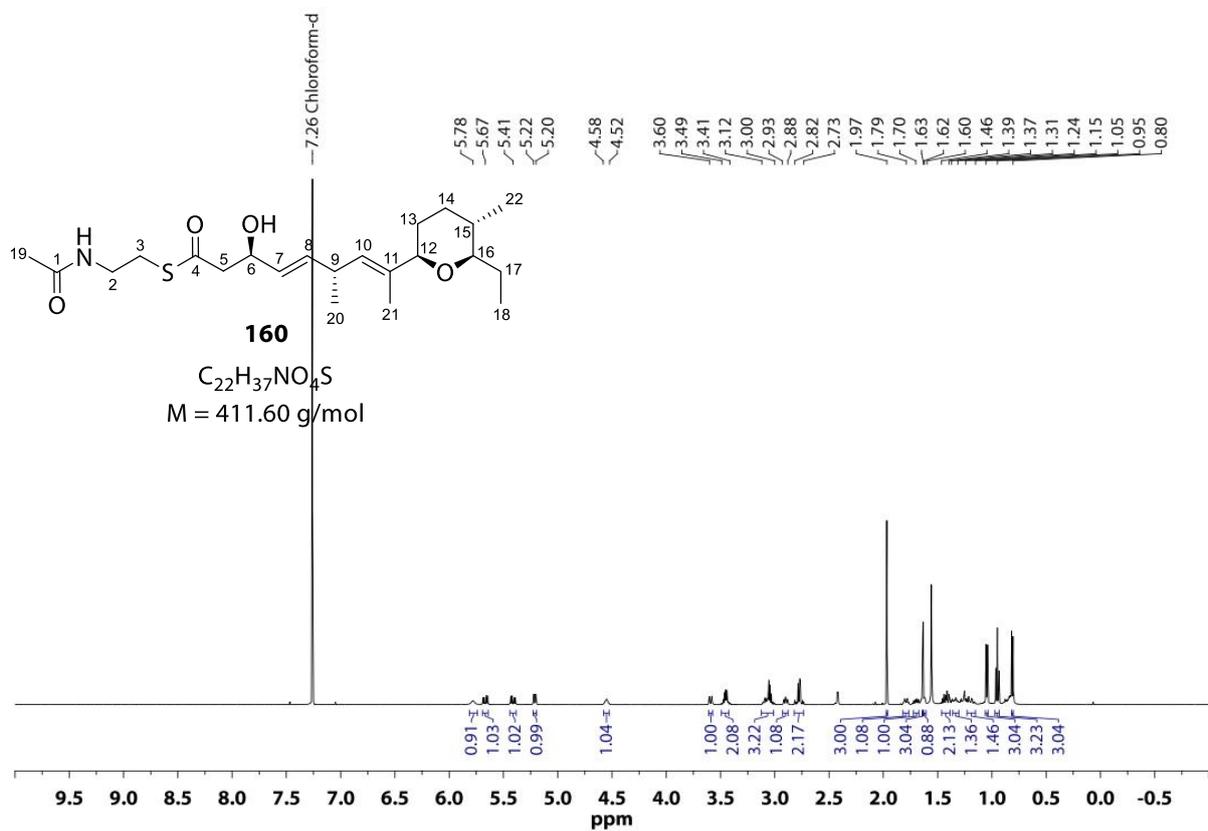


Abbildung 9-43.  $^1H$ -NMR-Spektrum von **160** ( $CDCl_3$ , 500 MHz).

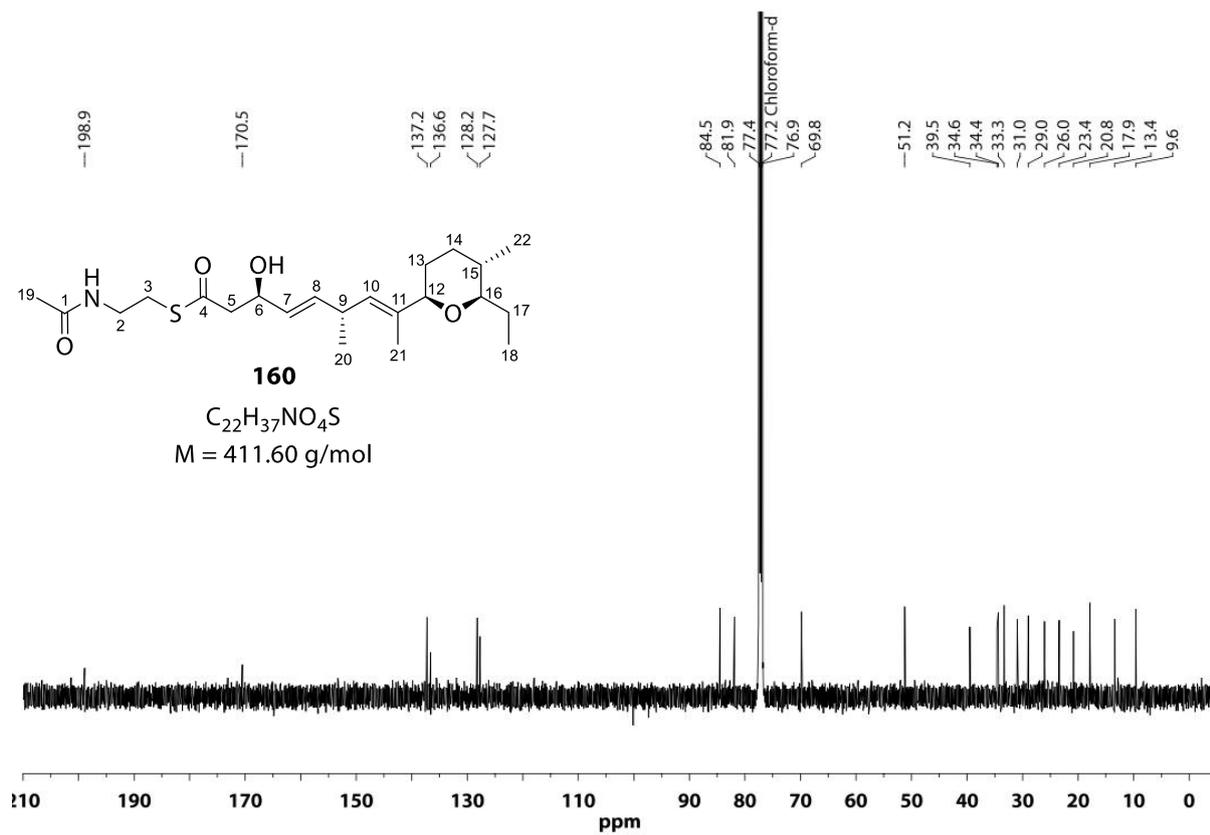


Abbildung 9-44.  $^{13}C$ -NMR-Spektrum von **160** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz).

## Isolierte Referenzverbindungen

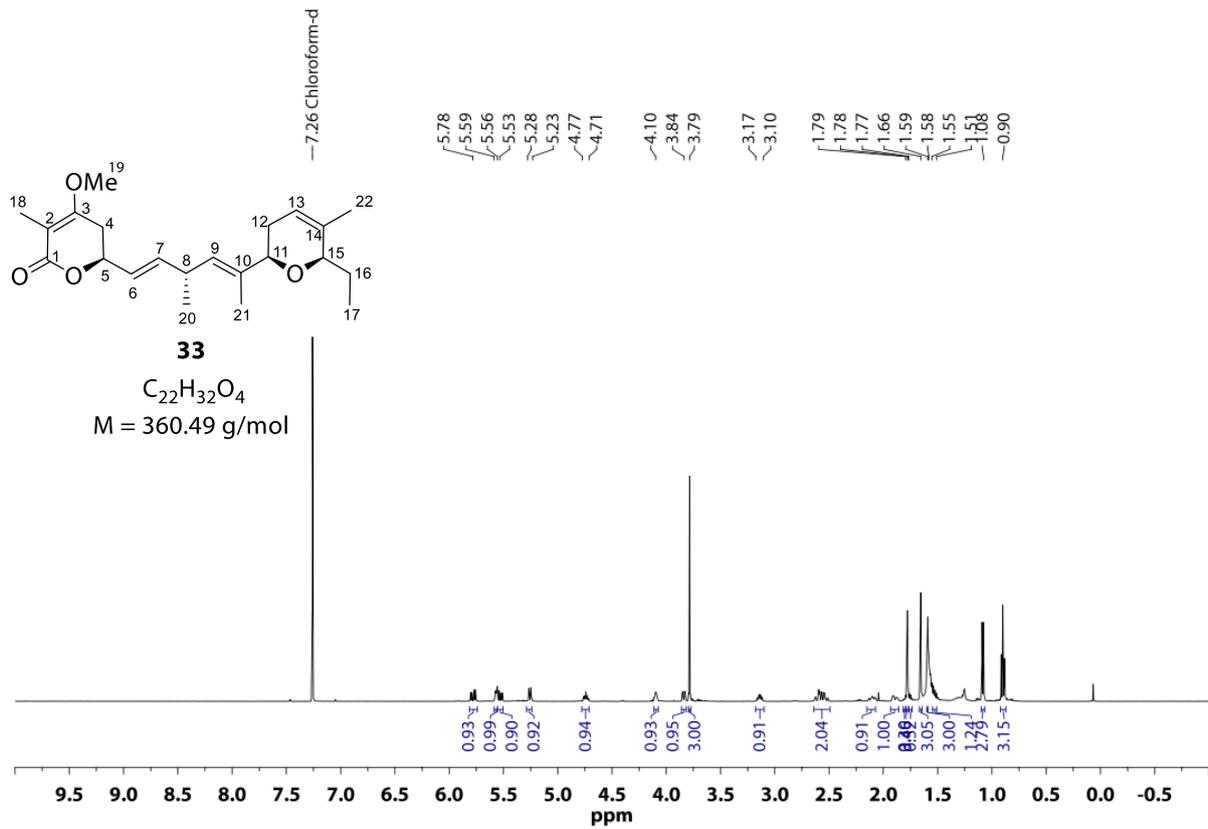


Abbildung 9–45.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **33** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

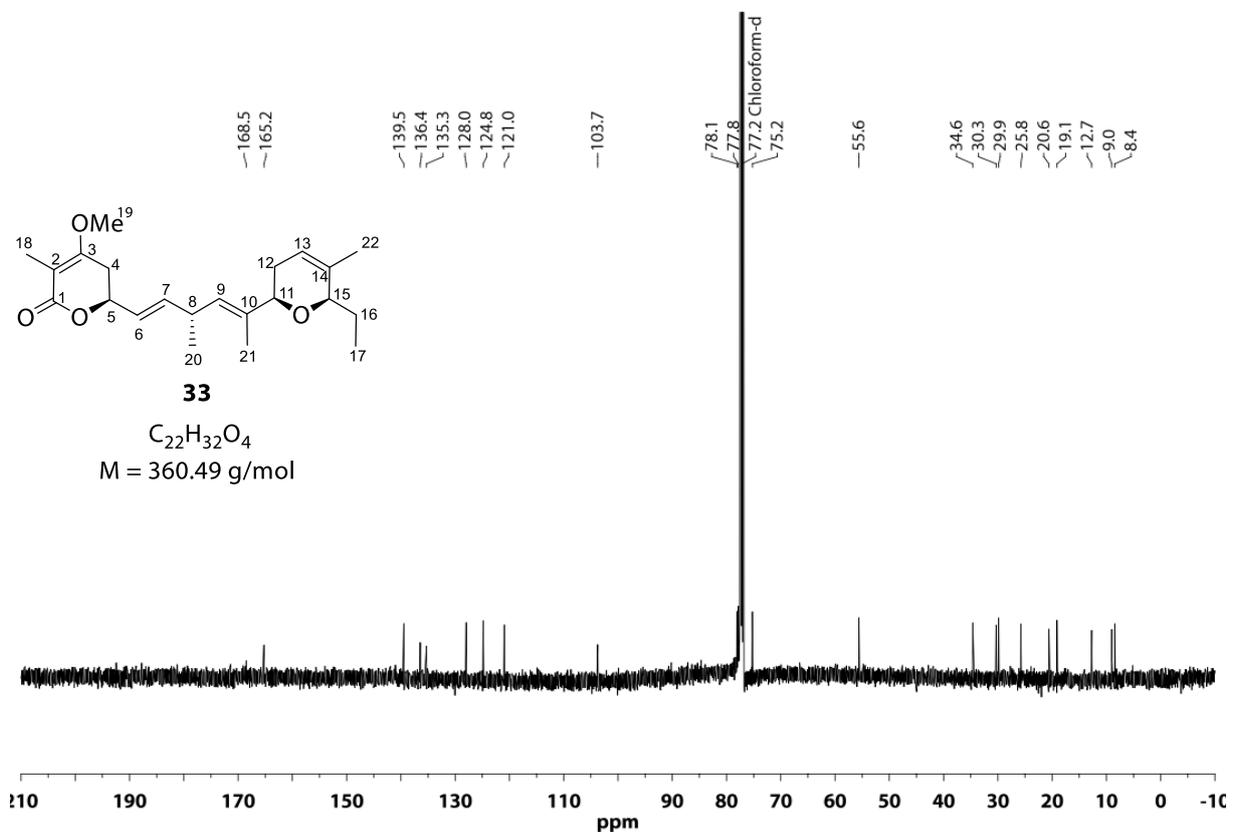


Abbildung 9–46.  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von **33** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz).

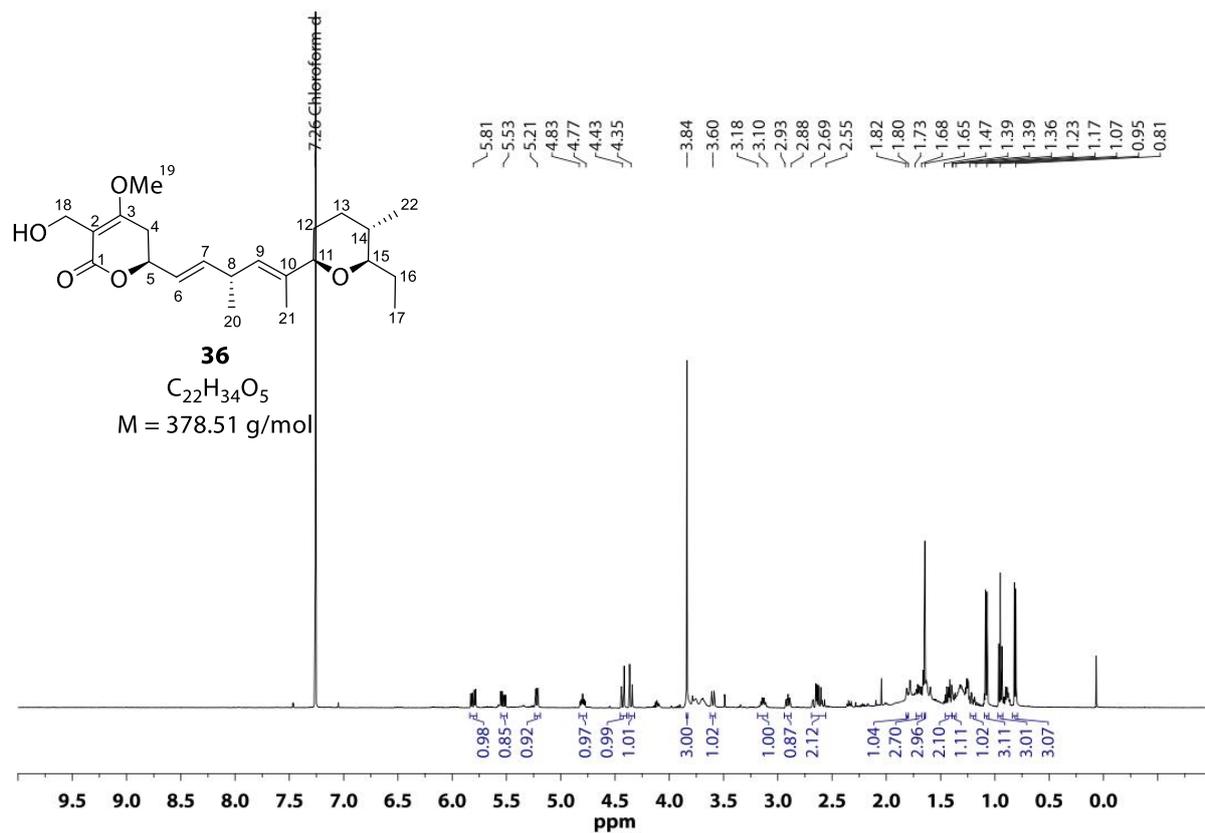


Abbildung 9–47.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **36** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

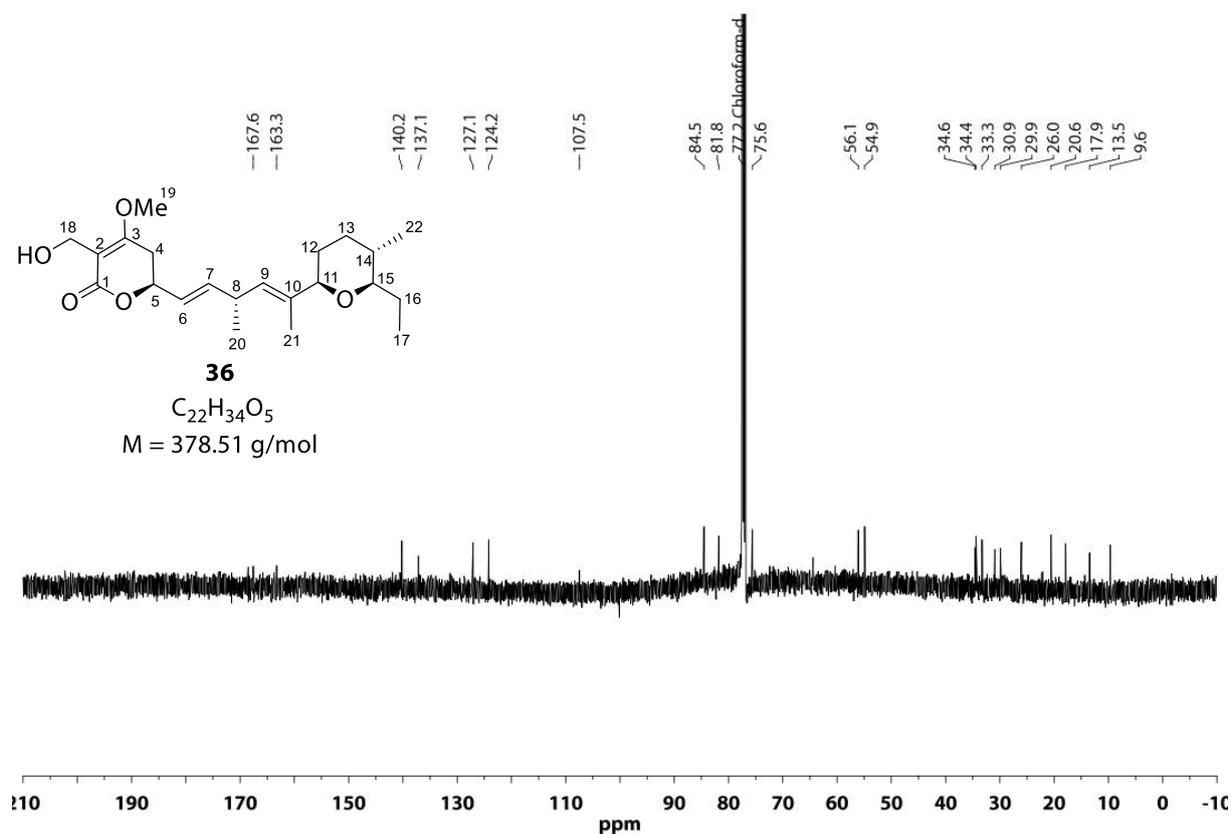


Abbildung 9–48.  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von **36** ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz).

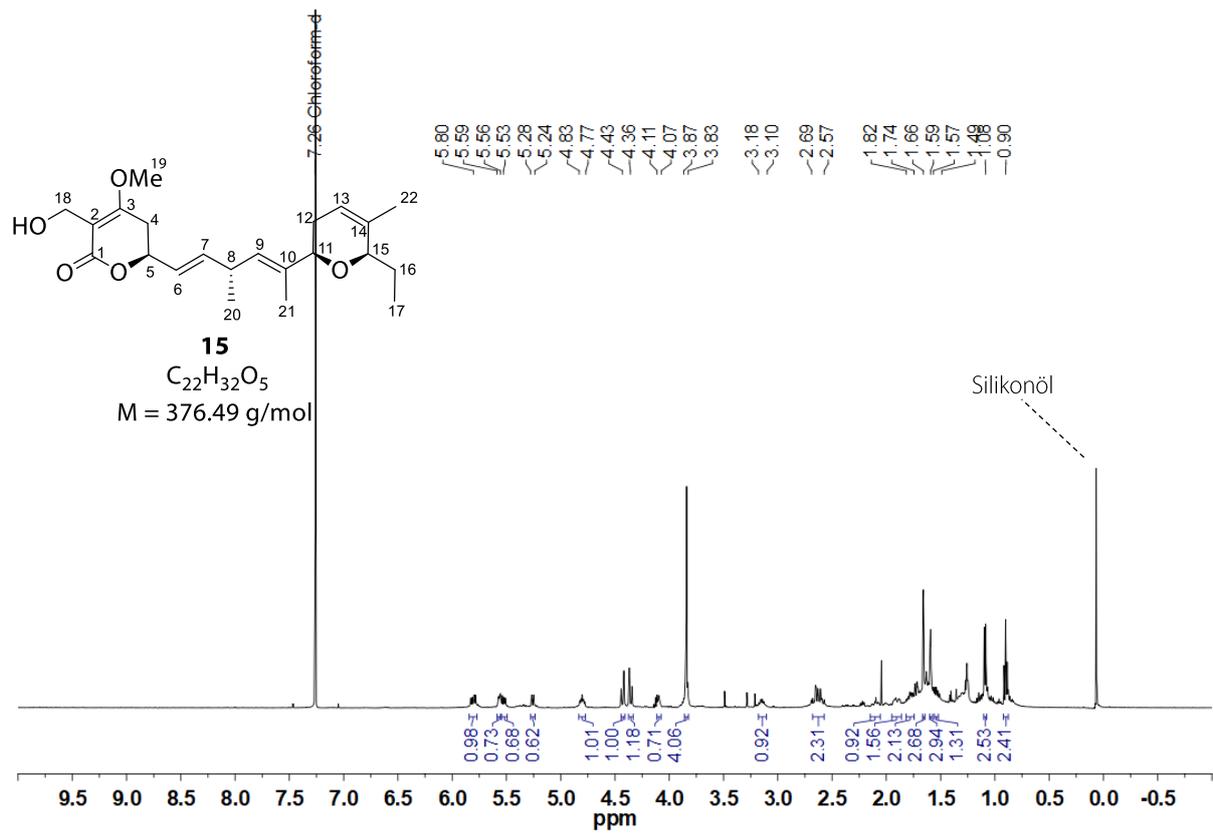


Abbildung 9–49.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **15** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

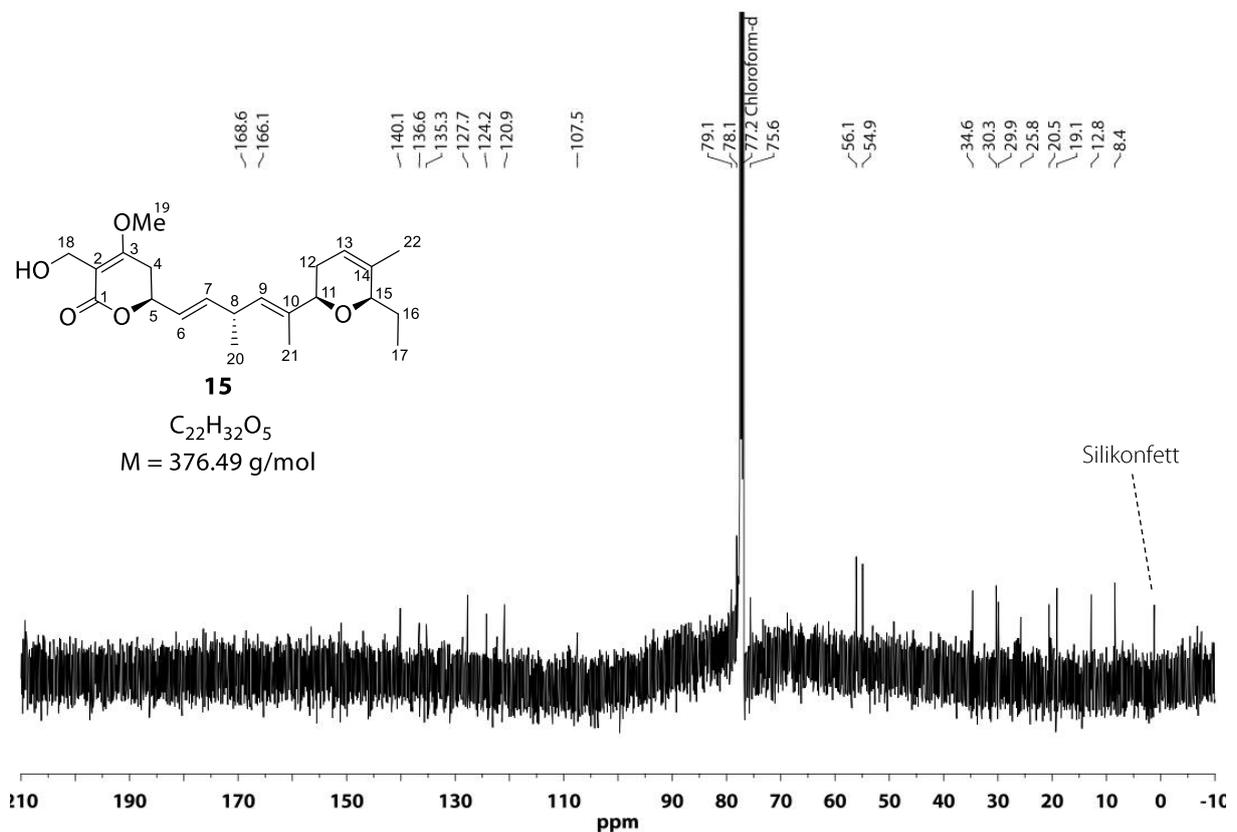


Abbildung 9–50.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **15** ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz).

## Upscaling-Experiment

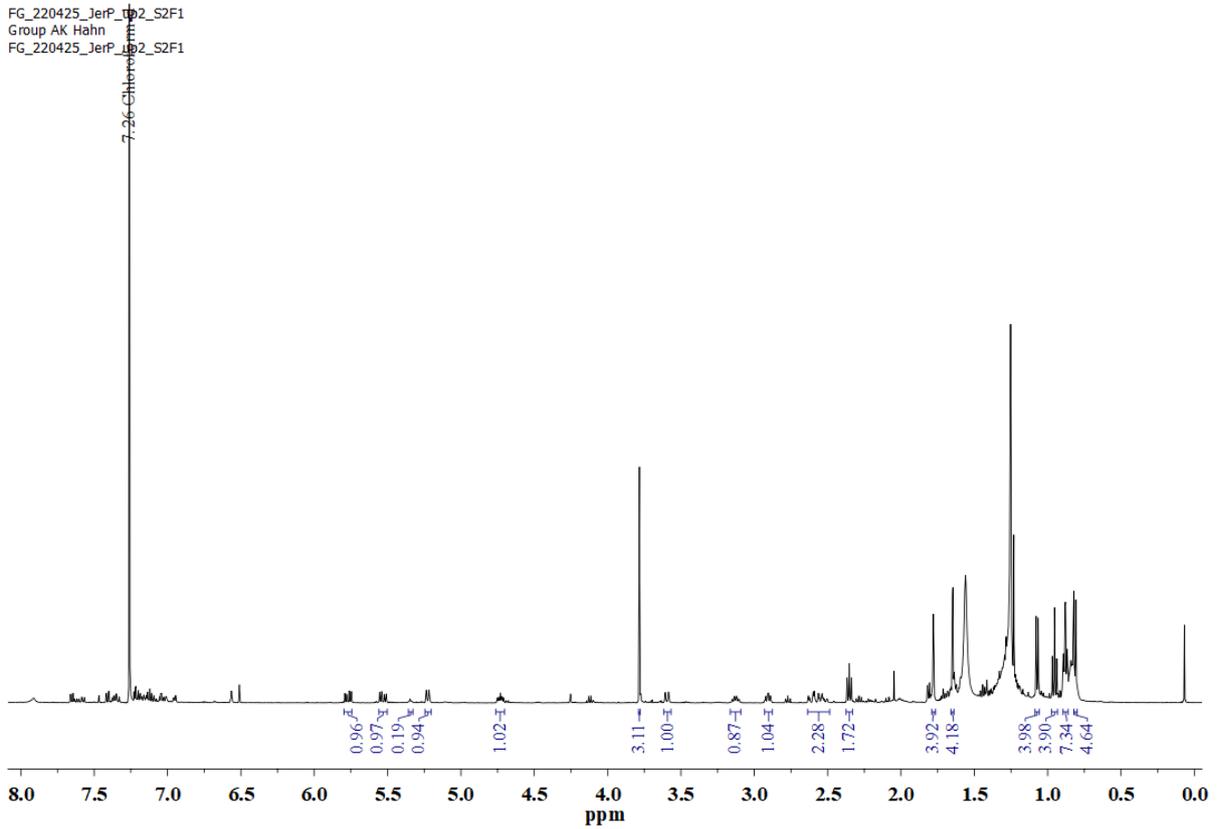
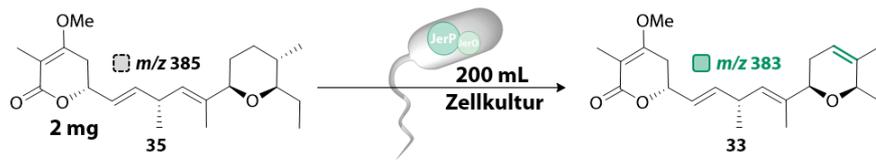


Abbildung 9–51.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zur Analyse der Ergebnisse des *upscaling*-Experiments ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

## 9.2 Materialien & Geräte

### Materialien

Eine Liste der verwendeten Materialien ist in Tabelle 9-1 aufgeführt.

**Tabelle 9-1.** Verwendete Materialien zuzüglich deren Bezugsquelle.

Materialien	Bezugsquelle
µDrop™ Platte für Plattenlesegerät	THERMOFISHER SCIENTIFIC
96-well Platte F für Plattenlesegerät	SARSTEDT
Amicon® Ultra 15 mL Zentrifugenfilter (MWCO: 10 und 30 kDa)	MERCK
CryoPure Röhren (2 mL)	SARSTEDT
Desinfektionslösung Spitacid	ECOLAB®
Duran® Glasflaschen (25, 50, 100, 250, 500 und 1000 mL)	SCHOTT
Duran® Kultivierkolben mit/ohne Spirale (50, 250 und 500 mL)	SCHOTT
Duran® Glaskolben (5, 10, 50, 100 mL), Bechergläser (50, 100 mL)	LENZ LABORGLAS
Einmalspritzen Injekt®-F Tuberkulin (1 mL)	BRAUN
Einmalspritzen Injekt® Luer Solo (2, 5, 10 und 20 mL)	BRAUN
Halbmikro Einmal-Küvetten (1.5 mL)	BRAUN
Headspace-Vials (20mL) mit Septum und Cap	AGILENT
Membranfilter Cellulosenitrat Whatman™ (0.45 µm)	GE HEALTHCARE
Messzylinder (50, 100, 250, 1000 mL)	ISOLAB LABORGERÄTE
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	MACHEREY-NAGEL
Pasteurpipetten	BRAND
PCR-Reaktionsgefäß Multiply®-Pro (0.2 mL)	SARSTEDT
Petrischalen	SARSTEDT
Reaktionsgefäß (0.5, 1.5 und 2 mL)	SARSTEDT
Reaktionsgefäß Cellstar® Tubes (15 und 50 mL)	GREINER BIO-ONE
Headspace Vial mit Crimp-Cap (10 und 20 mL)	AGILENT
Sequenzier-Kit Mix2Seq	EUROFINS GENOMICS
Serologische Pipette (10 und 25 mL)	SARSTEDT
Spritzenfilter Chromafil® O-20/15 MS (0.20 µm)	MACHEREY-NAGEL
Spritzenfilter Chromafil® Xtra PTFE-45/13 (0.45 µm)	MACHEREY-NAGEL
Spritzenfilter Rotilabo®, CA, steril (0.45 µm)	CARL ROTH
Spritzenkanülen Sterican® (0.6 x 80 mM, 0.6 x 30 mM, 0.8 x 50 mM, 0.8 x 120 mM, 0.4 x 20 mM, 0.9 x 0.4 mM)	BRAUN
Analysegefäße für die Massenspektrometrie SF/label (1.5 mL)	MACHEREY-NAGEL

## Geräte

Eine Auflistung aller verwendeten Gerätschaften ist in Tabelle 9-2 aufgeführt.

**Tabelle 9-2.** Verwendete Gerätschaften zuzüglich deren Bezugsquelle.

Gerätschaften	Bezugsquelle
Absorption- und Fluoreszenz Mikroplattenlesegerät Varioskan™ LUX	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Analysenwaage AES-200-4C	KERN®
Chemie-Membranpumpe VP-100C	VACUUBRAND
Chromatographiesystem WATERS ACQUITY™ UPLC® mit einem Single Quadrupole Massenspektrometer und BEH C18 Säulen mit Partikelgröße 1.7 µm, Säulendurchmesser 2.1 µm und einer Länge von 50 mM	WATERS
Digitalwaage HAT-3000	A&D
Drehschieberpumpe RZ 6 mit Vakuummessgerät DCP-3000 + Sensor VSP-3000	VACUUBRAND
Elektrophoresespannungsquelle peqPOWER 300	PEQLAB
Gefrierschrank (-20 °C) GNP 2666-20	LIEBHERR
Geldokumentationsanlage Gel iX 20 Imager	INTAS
Geldokumentationsanlage LTF Labortechnik	LTF LABORTECHNIK
Horizontales Elektrophoresesystem PerfectBlue™ Gelsystem Midi S	PEQLAB
Horizontales Elektrophoresesystem PerfectBlue™ Gelsystem Mini M	PEQLAB
Horizontales Elektrophoresesystem PerfectBlue™ Gelsystem Mini S	PEQLAB
Inkubationsschüttler MaxQ 6000	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Kühlzelle Unichromat 900	UNIEQUIP
Laborabzug VARIOLAB Mobilien W 90	WALDNER
Labor-Kühl-Gefrierkombination (ex-geschützt) Lcexv 4010	LIEBHERR
Laborreinigungs- und Desinfektionsautomat PG 8583	MIELE
Labor-Wasserreinigungssystem B30	ADRONA
Magnetrührer Hei-Standard	HEIDOLPH
Magnetrührer Hei-Tec mit Temperaturfühler PT-1000	HEIDOLPH
Magnetrührer RCT basic	IKA
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	BIO RAD
Mikrowelle R322STWE	SHARP
Mikrozentrifuge Micro Star 17 R	VWR
Mikrozentrifugenrotor THERMOSCIENTIFIC® 75003424	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Minizentrifuge SPROUT®	SPROUT
PCR-/Thermo-Cycler peqSTAR	PEQLAB
pH-Meter Lab 855	SI ANALYTICS
Pipetten PIPETMAN® Classic	GILSON
Pipetten Research® Plus	EPPENDORF
Pipettierhilfe Pipetus®	HIRSCHMANN
Präzisionswaage EW-200-3NM	KERN
Rotationsverdampfer Hei-Vap Precision ML/G3	HEIDOLPH
Rotor Concentrator plus F45-48-11	EPPENDORF
Schüttler RS-VA 10	PHOENIX INSTRUMENT
Schüttler Vortex-Genie 2	SCIENTIFIC INDUSTRIES
Sicherheitswerkbank MSC Advantage 1.8	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Standautoklav VX-65	SYSTEC
Sterilfiltrationsanlage Millipore® XX1504700	MERCK
Stickstoffgenerator NMG 11 für WATERS UPLC® ACQUITY™	CMC INSTRUMENTS

ThermoMixer@ C	EPPENDORF
ThermoMixer@ C SmartBlock™ 24 × 1.5 mL	EPPENDORF
Ultraschall-Homogenisator HD 3100 SONOPULS Mikrospitze MS-73	BANDELIN
Ultraschall-Homogenisator HD 3100 SONOPULS mit Lärmschutzbox LS 8	BANDELIN
Ultratiefkühlschrank (-80 °C) U410	EPPENDORF
Vakuumkonzentrator Concentrator plus	EPPENDORF
Vakuumpumpe Rotavap Valve Control	HEIDOLPH
Vakuumpumpe SOGEVAC SV40 BI	LEYBOLD
Vertikales Elektrophoresesystem PerfectBlue™ Doppel-Gelsystem Twin M	PEQLAB
Wärmeschrank U-Seire UN160	MEMMERT
Wippschüttler RK-1D	WITEG
Vakuumpumpe SOGEVAC SV40 BI	LEYBOLD
Zelldichte-Messgerät Ultrospec™ 10 Cell Classic	GE HEALTHCARE
Zentrifuge Centrifuge 5804 R	EPPENDORF
Zentrifugenrotor FA-45-6-30	EPPENDORF
Zentrifugenrotor S-4-72	EPPENDORF

## Biochemikalien & Chemikalien

**Tabelle 9-3.** Verwendeten Biochemikalien und Chemikalien zuzüglich ihrer Qualität/Reinheit und Bezugsquelle.

Biochemikalien/Chemikalien (Qualität/Reinheit)	Bezugsquelle
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung 19:1 (30%)	ABCR CHEMICALS
Agarose (p.a.)	CARL ROTH
Ammoniumhydrogencarbonat (≥98%, p.a.)	CARL ROTH
Ammoniumperoxodisulfat (≥98%, p.a.)	CARL ROTH
Ampicillin-Natriumsalz (≥97%)	CARL ROTH
Chloroform (99 – 99.4%, p.a.)	HONEYWELL
Coomassie Brilliant Blue R-250	FISHER BIOREAGENTS
Cyclodextrine	CARBOLUTION
D(+)-Glucose Monohydrat (99%)	GRÜSSING
Desoxynukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Dinatriumhydrogenphosphat (≥98%, p.a.)	CARL ROTH
Essigsäure (≥99%)	FLUKA
Ethanol absolut (Bio-rein)	FISHER SCIENTIFIC
Ethylacetat (ACS-rein)	VWR CHEMICALS
Ethylendiamintetraessigsäure (p.a.)	CARL ROTH
FAD-Dinatriumsalz	CARL ROTH
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Glutaraldehydlösung (25%)	SIGMA-ALDRICH
Glycerin (99.5%)	VWR CHEMICALS
Glycin (99%)	CARL ROTH
Hefeextrakt (für die Biochemie)	CARL ROTH
Imidazol (≥99%)	ACROS ORGANICS
Iodacetamid (≥99%)	SIGMA-ALDRICH
Iso-Propanol (Bio-rein)	FISHER SCIENTIFIC
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (≥99%)	CARL ROTH
Kaliumacetat (99%)	GRÜSSING
Kaliumdihydrogenphosphat (99%)	GRÜSSING

Kanamycin-Monosulfat ( $\geq 750$ I.U./mg)	CARL ROTH
Lactose Monohydrat (GR-rein)	GERBU
L-Arabinose ( $\geq 99\%$ )	CARL ROTH
Lysozym ( $\geq 35000$ FIP/mg, lyophilisiert)	CARL ROTH
Magnesiumsulfat (99%)	GRÜSSING
Methanol absolut (HPLC-rein)	FISHER SCIENTIFIC
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin ( $\geq 99\%$ , p.a.)	CARL ROTH
NAD(P)H-Dinatriumsalz	CARL ROTH
Natriumchlorid (zur Analyse)	BERND KRAFT
Natriumdodecylsulfat ( $\geq 99\%$ )	CARL ROTH
Natriumhydroxid (ACS-rein)	VWR CHEMICALS
Natriumsulfat ( $\geq 99\%$ )	CARL ROTH
Nickel(II)sulfat Hexahydrat (zur Analyse)	CARL ROTH
PageRuler Prestained Protein Ladder	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ $\mu$ L)	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Restriktionsenzyme EcoRI, NdeI, NotI, XhoI (FastDigest)	THERMOFISHER SCIENTIFIC
RNAse I (91.8 U/mg)	APPLICHEM
Salzsäure (37%, p.a.)	BERND KRAFT
Schwefelsäure (95 – 97%, p.a.)	SIGMA-ALDRICH
T4-DNA-Ligase (5 U/ $\mu$ L) mit T4-DNA-Ligationspuffer	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Urea (99.5%)	GRÜSSING
UV-Farbstoff Midori Green Advance	NIPPON GENETICS

## Bakterienstämme

Für die Genexpressionen sowie Präparationen der Enzyme wurden sieben verschiedene *E. coli*-Stämme verwendet. Die Proteinproduktion wurde standardmäßig im Stamm *E. coli* C41-CmpX13 durchgeführt. Für eine verbesserte Anpassung des Genexpressionslevels wurde *E. coli* Tuner™(DE3) und für eine stabilere mRNA One Shot™ BL21 Star™(DE3) getestet. *E. coli* Origami™ B(DE3) zeichnet sich durch Mutationen in den Genen der Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) und der Glutathion-Reduktase (*gor*) aus, wodurch die Bildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma stark verbessert wird. Zudem ermöglicht der Stamm – ebenso wie Tuner™(DE3) – eine präzise Kontrolle der Expressionslevel durch die Anpassung der IPTG-Konzentration. *E. coli* SoluBL21™ besitzt spezifische Mutationen, die die Löslichkeit des Zielproteins erhöhen sollen. Die Herstellerangaben zu den Genotypen sind in Tabelle 9-4 aufgeführt. Die Gene werden durch verschiedener Expressionsvektoren in die Zellen transformiert.

**Tabelle 9-4.** Genotypen der verwendeten *E. coli*-Bakterienstämme.

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
One Shot™ TOP10	<i>F</i> <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) <i>φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU</i> <i>galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	THERMOFISHER SCIENTIFIC
BL21(DE3)	<i>F ompT hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	NOVAGEN

Tuner (DE3)	<i>F ompT hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm lacY1</i> (DE3)	NOVAGEN
Star (DE3)	<i>F ompT hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm rne133</i> (DE3)	INVITROGEN
SoluBL21™ (DE3)	<i>F ompT hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)* *Der Stamm enthält nicht charakterisierte Mutationen, die durch spezielle Selektionskriterien erhalten wurden.	AMSBIO
Origami™ (DE3)	<i>F ompT hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm lacY1 ahpC gor522:: Tn10 trxB (Kan<sup>r</sup>, Tet<sup>r</sup>)</i>	NOVAGEN
C41-cmpX13	<i>F ompT hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) <i>pLysS (Cm<sup>r</sup>)</i>	UNIVERSITÄT BAYREUTH - LEHRSTUHL FÜR BIOCHEMIE - PHOTOBIOCHEMISTRY - PROF. DR. ANDREAS MÖGLICH

## Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 9-5 aufgelistet.

**Tabelle 9-5.** Übersicht und Sequenzen der verwendeten Primer. Unterstrichene Sequenzen markieren Übereinstimmung mit dem entsprechenden Gen.

	Name	Sequenz (5'→3') (Anzahl der Nukleobasen)
P1	Duet MCS1 fwd	ATGCGTCCGGCGTAGA (16)
P2	Duet MCS1 rev	GATTATGCGGCCGTGTACAA (20)
P3	Duet MCS2 fwd	TTGTACACGGCCGCATAATC (20)
P4	Duet MCS2 rev	GCTAGTTATTGCTCAGCGG (19)
P5	<i>jerP</i> fwd	AAAAAAAAAGAATTCGATGGCAGAACTGGATCATTGGCAT (39)
P6	<i>jerP</i> rev	AAAAAAAAAGCGCCCGCTTACGGTGCTGCCAGCGGC (35)
P7	<i>jerL</i> fwd	AAAAAAAAAGAATTCGATGTGTTATGGTCTGGCAATGCAT (39)
P8	<i>jerL</i> rev	AAAAAAAAAGCGCCCGCTTATGCGCTTGCATGACCA (35)
P9	<i>jerO</i> fwd	GGCAGCCATATGATGCATGT (20)
P10	<i>jerO</i> rev	AAGCTTCTCGAGTTAATTCACACCCT (26)

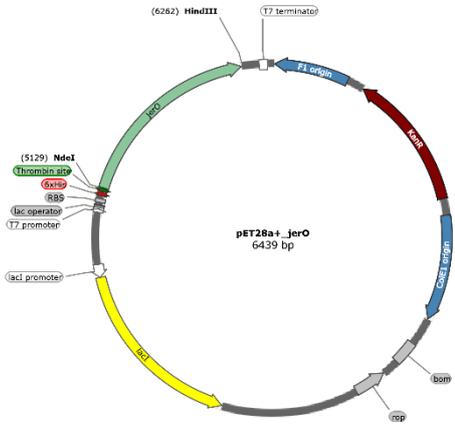
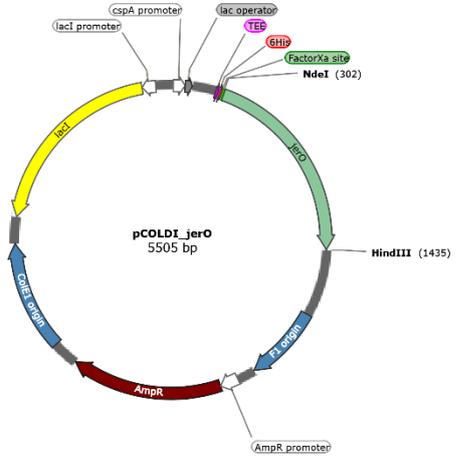
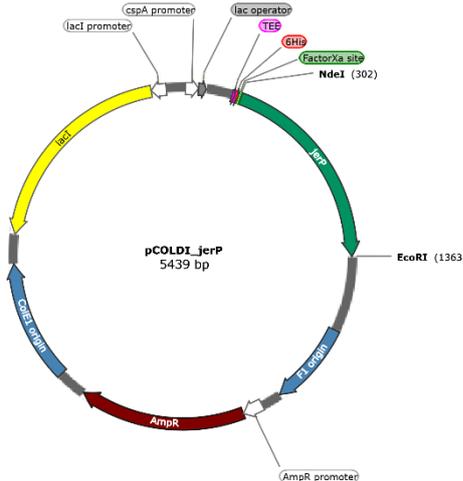
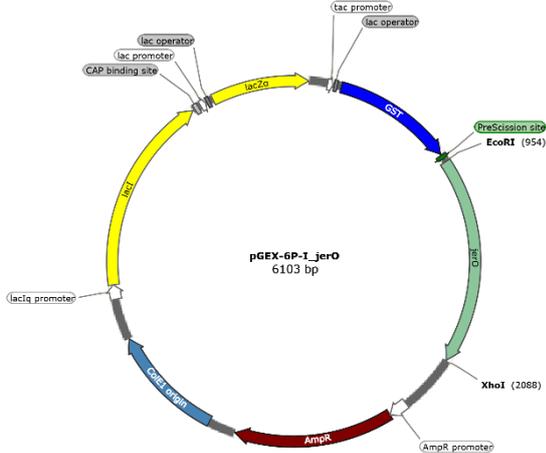
## Plasmide

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet (Tabelle 9-6).

**Tabelle 9-6.** Verwendete Plasmide mit dem nach Genexpression vorliegenden Protein-tag, sowie eventuelle Besonderheiten der Plasmide.

Plasmid	Protein-tag	Besonderheit
pGEX-6P-I	<i>N</i> -GST-tag	-
pET28a(+)	<i>N</i> -His <sub>6</sub> -tag	-
pET32a(+)	<i>N</i> -His <sub>6</sub> -tag	-
pCold-I	<i>N</i> -His <sub>6</sub> -tag	Kälteschockexpressionsvektor
pET-Duet-1™	<i>N</i> -His <sub>6</sub> -tag (MCS1) <i>C</i> -S-tag (MCS2)	-

Das Plasmid pET-Duet-1™ und nach Klonierung entstandenen Plasmidkonstrukte sind im Folgenden schematisch als Plasmidkarten dargestellt. Die Abbildungen wurden mit *SnapGene Viewer* erstellt.



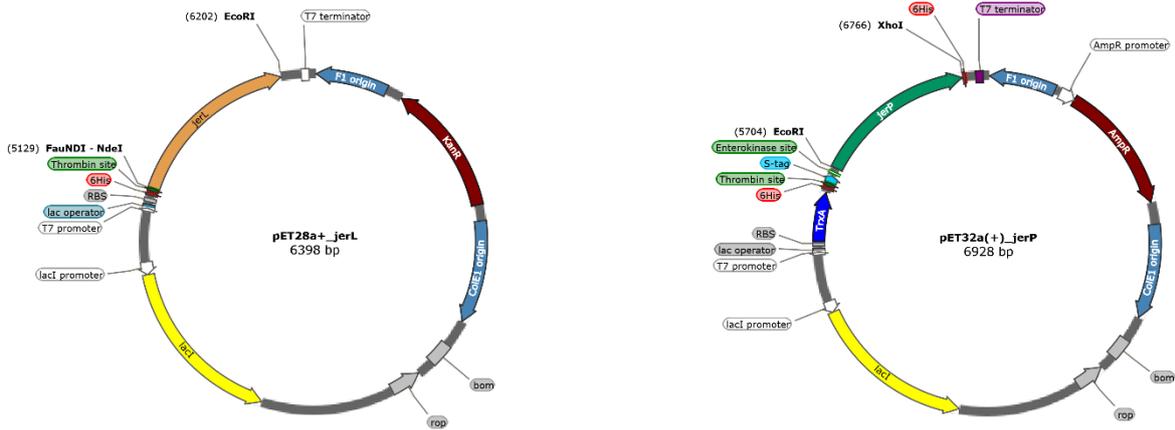
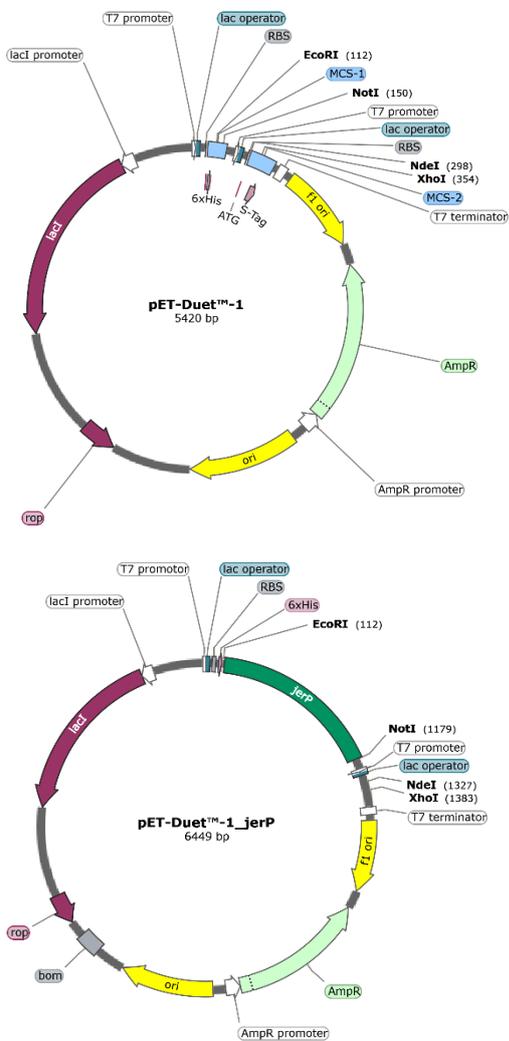


Abbildung 9–52. Plasmidkarten von verwendeten Konstrukten, die bereits in vorhergehenden Arbeiten erstellt wurden.<sup>[110,111]</sup>



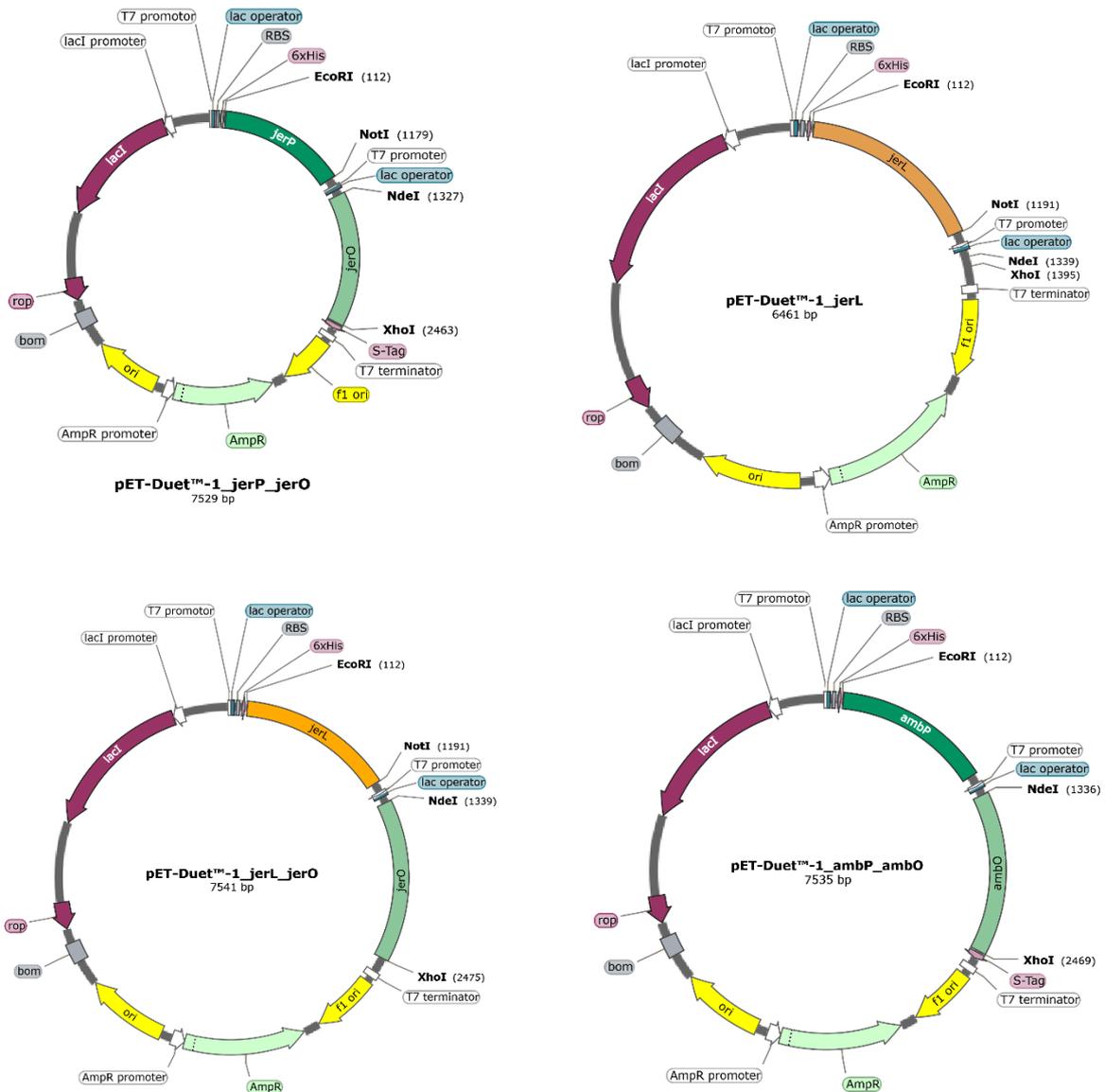


Abbildung 9–53. Plasmidkarten von pET-Duet™-1 und nach Klonierung erhaltenen oder erworbene Konstrukte.

## Gen- & Proteinsequenzen

### >jerP

**ATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCCGAATTCGATGGCAGA**ACTGGA  
 TCATTGGCATCCGTTCTGCTGAGCCATGAACTGCGTCGTAAACCGCGTAATGTTCTGCTCTGG  
 CAGTTCATGAAATGTGTTTTTTCGTACCAGCAGCGGTGGTCTGGGTGCATTTACCGATCGT  
 TGTCGCCATCGTAGCATGCGTCTGAGCGAAGGTTGGGTTGAAGGTGATCGTCTGGTTTGTGC  
 ATATCATGGTTGGCGTTGGGCAGTTGATGGTCTGGTCAAATCCGGCAACACCGGCAGCAC  
 GTCCGTGTGCACGTCGTGAAGATATGTTTGAAGCAGTTGAACGTTATGGTGCCATTTGGGTT  
 AAACGTGCAGGTAGCCAGGCAGCATTTCGCGTCTGGAAGGTGAAGGTTATGTTCCGCGTGG  
 TCTGCTGCGTCATCGTGCAACCGTTCCGTTTGAAGTGGCACTGGATAACTTTATCGAAATTG  
 AACATAACCCCGTTCGTGCATTTTATGCTGGGTTATCCGCTGGAACGTATGCCGGAAGTTGAA  
 GCACGTGTTACCCTGACCGATGAAACCATTCGTGTTGTTTCATAGCGGTCCGCGTCTCCGAT  
 GCCTCGTGCAATGAAAAACTGCTGGGTATTCCGGAAGATGCCATTTTTGTTGTTGATTGGA

---

CCAGCTATTTTAGCCCTGTGTATAACCATTTATAACCATAGCCTGCGTGATCCGAAAACCAAT  
CAGCCGGTTACCTTTCCGCTGCGTAGCGCAGTGTTTTTTAACCCGGTTGGTCCGGAAAGCAG  
CGAAATGTATACCTTTCTGTTTGCAAGCCTGGCACCCTGGTCAAAATTTGGTGCCGGTGCAG  
TTCTGTGGCCTGCAATGCAGGTTGCAATGAATATTGAGCTGCGTCTGGATATGCGTCTGCTG  
GATCGTCTGACAGATAAACGTGGTATTCTGAAAGGTAATGTGCTGGGTCGTTTTGATAAACC  
GCTGGTTATTGCACGTGATCGTATTGATCGCATTTATCGTGGTCTGTTGCCGAAGCCGGTG  
ATGGTCATGAAGCAGCCCGTCCGGCACGTCTGCGCTGGCAGCACCG**TAA**

**>JerP**

MGSSHHHHHHSQDPNSMAELDHWHPVLLSHELRRKPRNVRLAGHEIVVFRTSSGGLGAFTDR  
CPHRSMRLSEGWVEGDRLVCAHYHWRWAVDGRGEIPATPAARPCARREDMFEAVERYGAIWV  
KRAGSQAAFPRLEGEYVPRGLLRHRATVPFELALDNFIEIEHTPFVHFMLGYPLERMPEVE  
ARVTLTDETIIRVVHSGPRRPMPRAMEKLLGIPEDAIFVVDWTSYFSPVYTIYNHSLRDPKTN  
QPVTFFPLRSVFFNPVGPESSEMYTFLFASLAPWSKFGAGAVLWPAMQVAMNIELRLDMRL  
DRLTDKRGILKGNVLRFRDKPLVIARDRIDRIYRGRVAEAGDGHEAARPARRLPLAAP

**>jerL**

**ATG**GGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCCGAATTC**GATG**TGTTATGGTCT  
GGCAATGCATGCAGCACCGGCACGTGATCTGATTCGTCAATTTTCATCCGGTTCTGCCTGCAA  
GCAAACCTGGGTTCGTAACCGGTTTCGTGTTGTTCTGGCAGGTAATGCCTATGCACTGTTTCGT  
GATGAACAGGGTCGTCCGGCAGCACTGGCAGATGCCTGTCCGCATCGTCTGGCACCCTGAG  
CCAGGGTCGTGTTTCGTCCGGATGGTCGTCTGGAATGTCCGTATCATGGTTGGCATTTTGATG  
CCGAAGGTCGTGGTGCATGTCCGAGCCAGCCGAGCCTGACCCGTTGTGATACCCGTAGCTTT  
CAGCTGGTTGAACAGCTGGGTTATCTGTGGCTGGCACATCGTGATACACCGCGTAGCGCACT  
GCCGGAACCTGGATTTTAGCAGTGATGGTTTTGAATATGCAGGCACCTTTAGCCATCTGGCAC  
CAGCACCGCTGCATGTTATTTTGGATAATAGCAGCGAAGATGAACACACCCCGTTTGTTCAT  
GGTCGCCCTGGGTTGGACACCGGAAGATGCAGCACGTATTGATTTTAGTTGTGATGTGTTTGA  
AGATCGCACCGAGGTGAAATATAGCGCACCGCAGCGTCCGAGCACCCCTGGCACGTCTGATGC  
TGCTGCAGCCTGGTGATACCTTTCATAATCAGTGGGTTACCCGTTTGTAGTCCGGTTTATACC  
GTGTATACCAGTTGGTGGACCGCACAGAATGGTATGGAACGTCCGGTTGTTGCCCGTGCAGG  
TATCTTTTTTGTTCGGAAACCGAACGTACCACCTTTGTTTCGTGCATTTCTGTTTGTGAAAA  
TTACCGATCCGCGTTTTTCGTCCGCTGCTGCCGGTTGTTAAAAGCGCAGCAATTGCACTGAGC  
TGAAAGAAATCCGTGATGATGTGAAATTTATCCCGCATGTTGCAGATACACCGTTTGAAT  
GAAAGGCATGCGTCTGAACAAATATGATGCAACCCTGGTGCATAATCATCGGCTGATGCGTA  
GCATCTATTTTGGTGAACCCGTGGTGAAGCCGAAGGCACCGGTGTTGGTCATGCAAGCGCA  
**TAA**

**>JerL**

MGSSHHHHHHSQDPNSMCMCYGLAMHAAPARDLIRHFHPVLPASKLGRKPVRVVLGNAYALFR  
DEQGRPAALADACPHRLAPLSQGRVRPDGRLECPYHGWHFDAEGRGACPSQPSLTRCDTRSF  
QLVEQLGYLWLAHRDTPRSALPELDFSSDGFEYAGTFSHLAPAPLHVI FDNSSSEDEHTPFVH  
GRLGWTPEDAARIDFSCDVFEDRTEVKYSAPQRPSTLARLMLLQPGDTFHNQWVTRFSPVYT  
VYTSWWTAQNGMERPVVARAGIFFVPETERTTFVRAFLVFKITDPRFRPLLPVVKSAAIALS  
WKEIRDVVKFIPHVADTPFEMKGMRLNKYDATLVHNRMLMRSIYFGETRGEAEGTGVGHASA

**>jerO**

**ATG**ATGCATGTGGAAGAATGCCATGTTGTTATTGTTGGTGCAGGTCAGGTCGGTCTGGCAGT  
TGGTGCATGTCTGCGTGAACAGGGTATCCGTTTGTCTGCTGGAAAAAGCGAAGCCGTTG  
GTGCAACCTGGCGTCGTCAATATGATCGTCTGCATCTGAATACCATTAAACAGCTGAGCGCA

---

CTGCCTGGTCAGCCGTGGCCTGAATATAGCGCACCGTATCCGAGCCGTGTTGAAATGGTTGA  
TTATCTGGAACGTTATGCCGAACGTTTTTCGTCTGGAACCGCGTCTGGGTGTTGAAGTTGAAC  
GTGCATATCATGATGGTAGCCGTTGGGTTACCCGTACCCATGCCGGTGAACGCGTAGCCAG  
GCACTGGTTGTTGCAACCGGTTATAGCCGTCATCCGAATGTTCCGACCTGGCCTGATCAAGA  
ACGCTTTCGTGGTTCGTATTCTGCATAGCAGCGCATATCGTAGCCGTGCAGAATTCGCGGTC  
AGCGTGTCTGGTGTGGGTGCCGGTAATAGCGCAAGCGAAATTGCACTGGATCTGTGGGAA  
CATTGTGCAGAAACCACCCTGAGCGTGCGTAGCCGTAATCATGTTATTCGCGGTGAACGTTT  
TAAACTGCCTGCACAGTTTAAATGCACTGGCACTGTTTGAACGTCCTGCCGCTGGCGGTTGGTG  
ATCGCCTGGCAACCGCAATTCTGAGCCGTGCAGTGGGTGATCTGAGTCGTTGGGGTATTCTGT  
CGTCCGGCAGTGGGTCTGGCACCCGTGCACTGAAAGAAGGTCGTATGCCGCTGATTGATAT  
TGGCACCGTTGCCCTGATTACAGCAGGGTAAATCAAAGTTGTTCCGGGTCCGCGTGCATTTA  
CCGAAACCGGTGTTACCTTTACCGATGGTCGTGGTCTGCCGTTTGATGTTGTTGTTCTGGCC  
ACCGGTTATCGTCCGGGTCTGGATGATTTTCTGGAAAATGCCACCCGTTATACCGATGAACA  
TGGTTGTCCGCGTTGGCATGGTGCACCGACACCGGCACCGGGTCTGTTTTTATCGGTTTTT  
GTAATCCGATTACCGGTCAGATTCGTGATATTGCAGCAGAAGCACCGCGTATTGCACGTCAT  
ATTCAGGGTGTGAAT**TAA**

**>JerO**

MMHVEECHVVIVGAGPSGLAVGACLREQGI PFVLLKSEAVGATWRRHYDRLHLNTIKQLSA  
LPGQPWPEYSAPYPSRVEMVDY LERYAERFRLEPRLGVEVERAYHDGSRWVTRTHAGELRSQ  
ALVVATGYSRHPNVPTWPDQERFRGRI LHSSAYRSGAEFRGQRVLVVGAGNSASEIALDLWE  
HCAETTL SVRSGNHVI PRELFKLP AQFNALALFERLPLAVGDRLATAILSRAVGDLSRWGIR  
RPAVGPGRALKEGRMPLIDIGTVALIQQGIKVVPGPRAFTETGVTFTDGRGLPFVVDVLA  
TGYRPLDDFLENATRYTDEHGCPRWHGAPTPAPGLFFIGFRNPITGQIRDIAAEAPRIARH  
IQGVN

**>ambP**

**ATG**GGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCCGAATTC**GATG**CGCGAACTGGA  
TCATTGGCATCCGGTGTGCTGAGCCATGAACGCGCCGCAAACCGCGCAGCGTGCGCCTGG  
CGGGCCGCGAAATGTGGTGTTCGCACCAGCAGCGGCGGCTGGGCGCGTTCACCGATCGC  
TGCCCGCATCGCAGCATGCGCCTGAGCGAAGGCTGGGTGGAAGGCGATCGCCTGGTGTGCGC  
GTATCATGGCTGGCGCTGGGCGGCGGATGGCCGCGGCGATATTCGCGCACCCCGGCGGCGC  
GCCCGTGC GCGCGCCGCGATGATGTGTTGATGCGGTGGAACGCTATGGCGCGATTTGGGTG  
AAACGCGCGGGCGCGCAGGCGACCTTTCGCGCTTTGATGCGGAAGGCTATGTGCCGGCGGG  
CGTGCTGCGCCATCGCGCGGCGGTGCCGTTTGAACGCGCTGGATAACTTTATTGAAGTGG  
AACATAACCCGTTTGTGCATTTTATGCTGGGCTATAGCCTGGATCAGATGCCGCAGGTGGAA  
GCGCAGGTGACCCTGAGCGATGATGCGGTGCAGGTGGTGAACACCGGCCCGAAACGCCCGAT  
TCCGCGCATTTGTGGAAAAATGTTTTCGCATTCGCGATGATGCGAAATTTGTGGTGGAAATGGA  
CCGCGCGCTTTAGCCCGGTGCATGCGATTTATGATCATAGCTTTATTAACCCGCGCACCCGC  
GAAGTGGTGACCTATCCGCTGCGCAGCGCGGTGTTTTTTAACCCGGTGGGCCCCGAAAGCAG  
CGAAATTTATACCTTTCTGTTTGCAGCCTGGGCCGCTGGAGCGAATTTGGCCTGGGCAGCC  
TGATTTGGCCCGGCTGCGCGTGGCGATGGATCTGGAACGCGCTGGATATGCGCCTGCTG  
AGCCGCTGGCGGATAAACGCGGCATTCTGAAAGGCAACGTGCTGGGCCGCTTTGATAAAGC  
GCTGGTGGCGAGCCGCGATCGCATTGATCGCATTTATCGCGGCCAGGCGGCGGAAGCGACCC  
CGGAAGCGGGCGATGGCCATGAAGCGACCCGCGCGGCGCGCCGCTGCCGCTGGCGGCGAGC  
**TAA**

---

>AmbP

MGSSHHHHHSQDPNSMAELDHWHPVLLSHELRRKPRSVRLAGREIVVFRTSSGGLGAFTDR  
CPHRSMRLSEGWVEGDRLVCAYHGWRWAADGRGDI PATPAARPCARRDDVFD AVERYGAIWV  
KRAGAQATFPRFDAEGYVPAGVLRHRAAVPFELALDNFIEVEHTPFVHFMLGYSLDQMPQVE  
AQVTLSDDAVQVVNTGPKRPIPRIVEKMFRI PHDAKFVVEWTARFSPVHAIYDHSFINPRTR  
EVVTYPLRSVFFNPVGPESSEIYTFLFASLGRWSEFGLGSLIWPPLRVAMDLELRDMRLL  
SRLADKRGILKGNVLGRFDKALVASRDRIDRIYRQAAEATPEAGDGHEATRAARRLPLAAS

>ambO

**ATG**ATGATTGAAGAAAGCCATGTGATTATTATTGGCGCGGGCCCGAGCGGCCTGGCGGTGGG  
CGCGTGCCTGCGCGAACGCGGCATTCCGTTTGTGCTGCTGGAACAGAGCGATGCGGTGGGCG  
CGAGCTGGCGCCGCCATTATCAGCGCTGCATCTGCATACCGTGAAACAGTTTAGCAGCCTG  
CCGGCCCTGGCGTGGCCGCGCTATGCGCCGCGTATCCGAGCCGCGCGCAGATGGTGGATTA  
TCTGCAGCGCTATGCGGAACGCTTTCGCCTGGAACCGCGCTTTGGCGCGGAAGTGGTGC  
CGTATCGCGATGGCAGCCGCTGGGTGACCCAGACCCGCGCGGGCGAATTTACCAGCCGCGCG  
CTGGTGGTGGCGACCGGCTATAGCCGCCTGCCGAACGTGCCGACCTGGCCGGGCCAGGAACG  
CTTTCGCGGCCCGATTCTGCATAGCAGCACCTATGGCAGCGGCGCGGCGTTCGCGGCCAGC  
GCGTGCTGGTGGTGGGCGAGCGGCAACAGCGGCGGCGAAATTGCGATGGATCTGTGGGAACAT  
GCGGCGGAAACCACCGTGAGCGCGCGCAGCGGCATTCATGTGATTCCGCGCGATCCGCTGCG  
CCTGCCGGCGCAGTTTAGCGCGCTGGCGCTGTATGGCGCGCTGCCGCCGGCGGTGGGCGATC  
GCCTGGCGACCGGTTTCTGAGCCGCACCGTGGGCGATCTGAGCCGCTGGGGCATTTCATCGC  
CCGAAATTTGGCCCGGGCACCCGCGCGGTGAAAGAAGGCCGCATTCCGCTGATTGATATGGG  
CACCTGGCGCTGATTTCAGCAGGGCAAATTTGCGGTGGTGCCGGGGCCCGCGCGGTTTACC  
AAACCGGCGTGATTTTTTACCGATGGCCGCGAACTGCCGTTTGTGCGGTGGTGGTGGCGACC  
GGCTATCGCGCGGGCCTGGGCGATTTTCTGGAAGATGCGGCGCGCTTTACCGATGAACGCGG  
CTATCCGCGCTGGCATGGCGCGCCGACCCCGACCCGGGCGCTGTTTTTTATTGGCTTTTCGCA  
ACCCGATTACCGGCCAGCTGCGCGATATTGCGGCGGAAGCGCCGCGCGTGGCGCGCCATCTG  
CGCGGCGTGAAC**TAA**

>AmbO

MMIEESHVIIIGAGPSGLAVGACLRRERGI PFVLLLEQSDAVGASWRRHYQRLHLHTVKQFSSL  
PGLAWPRYAPPYPSRAQMVDYLQRYAERFRLEPRFGAEVVRAYRDGSRWVTQTRAGEFTSRA  
LVVATGYSRLPNVPTWPGQERFRGPILHSSTYGSAAFRGQRVLVVGSGNSGGEIAMDLWEH  
AAETTVSARSGIHVI PRDPLRLPAQFSALALY GALPPAVGDRLATAFLSRTVGDLSRWGIHR  
PEIGPGTRAVKEGRIPLIDMGT LALIQQGKIAVVPGPRAFTETGVIFTDGRELPFDVAVLAT  
GYRAGLGDFLEDAARFTDERGYPRWHGAPTPTPGLFFIGFRNPITGQLRDIAAEAPRVARHL  
RGVN

## Berechnete Parameter der produzierten Proteine

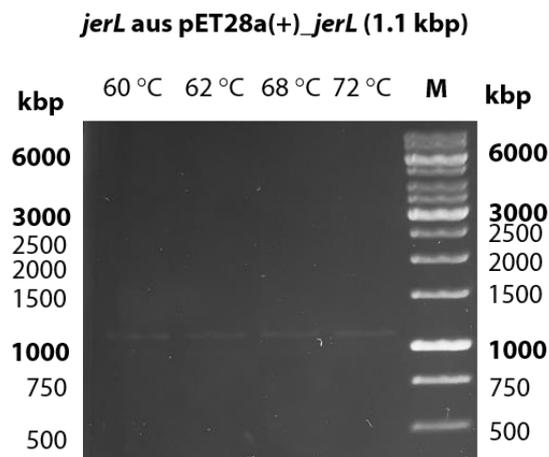
Sämtliche Parameter wurden mittels *ProtParam* berechnet und sind in Tabelle 9-7 aufgelistet.

**Tabelle 9-7.** Parameter der ausgehend von pET-Duet™-1 produzierten Proteine.

Protein	Anzahl Aminosäuren	MW [Da]	pI	$\epsilon$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]
JerO	377	41.69	9.25	53650
His <sub>6</sub> -JerP	368	41.82	9.31	57535
His <sub>6</sub> -JerL	372	41.96	7.37	53775
AmbO	376	41.15	10.18	54890
His <sub>6</sub> -AmbP	372	41.94	9.19	56045

## 9.3 Gelelektrophorese

### Agarosegele

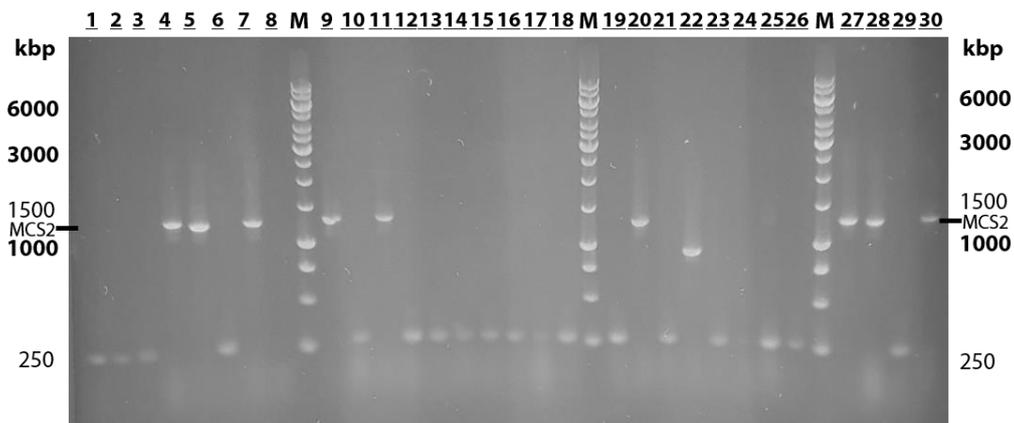


**Abbildung 9–54.** Agarosegel (1%) zur Analyse der PCR des Gens *jerL* (1.1 kbp) mit Restriktionsstellen *EcoRI/NotI* bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen. M = Marker, kbp = Kilobasenpaare.



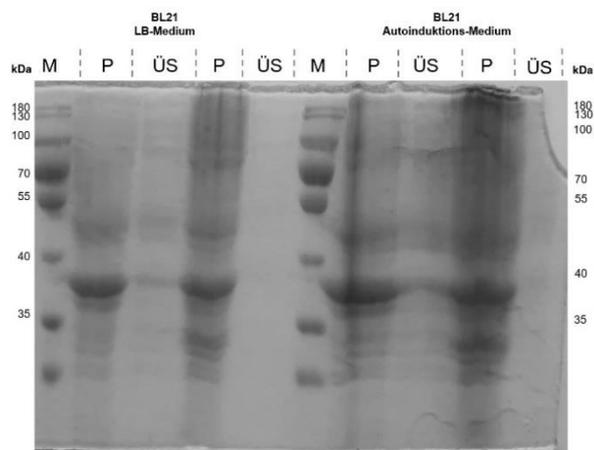
**Abbildung 9–55.** Agarosegel (1%) der Kolonie-PCR zur Kontrolle der Ligation von *jerL* in MCS1 von pET-Duet™-1. Positive Kolonien (2, 3, 4, 6, 7, 8, 13, 19 & 20) mit erfolgreicher Ligation zeigen eine Bande bei ~1400 kbp. M: Marker.

**Kolonie-PCR nach Ligation pETDuet-1<sub>jerL</sub>\_jerO und Transformation mit Sequenzier-Primern MCS2 (ca. 1400 kbp)**

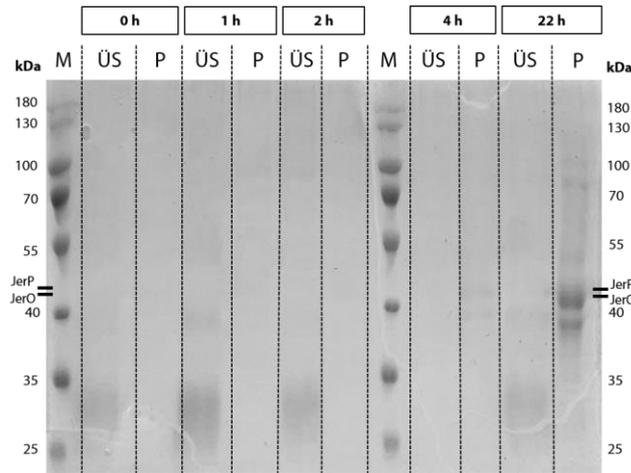


**Abbildung 9–56.** Agarosegel (1%) der Kolonie-PCR zur Kontrolle der Ligation von *jerO* in MCS2 von pET-Duet™-1<sub>jerL</sub>. Positive Kolonien (4, 5, 7, 9, 11, 20, 27, 28 & 30) mit erfolgreicher Ligation zeigen eine Bande bei 1400 kbp (markiert durch MCS2). M: Marker.

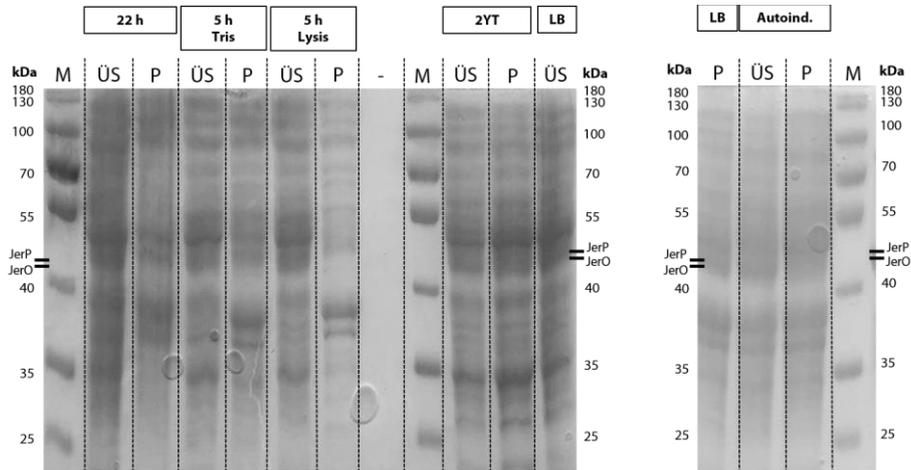
SDS-Polyacrylamid-Gele



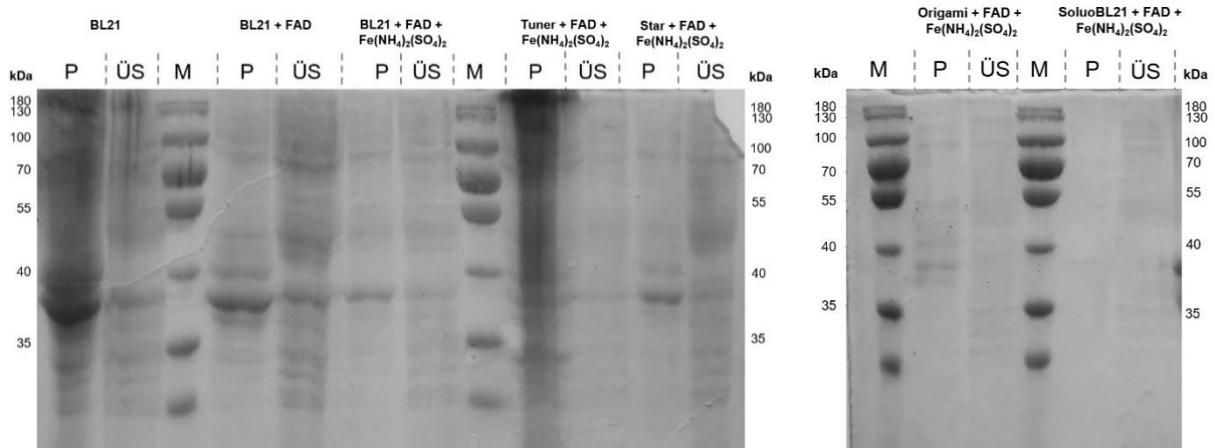
**Abbildung 9–57.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Expression von pET-Duet™-1<sub>jerP</sub>\_jerO in *E. coli* BL21 (DE3) mit verschiedenen Expressionsmedien. M: Marker (kDa), P: Pellet, ÜS: Überstand; JerO = 41 kDa, JerP = 42 kDa; aufgetragene Probenvolumina 10 µL.



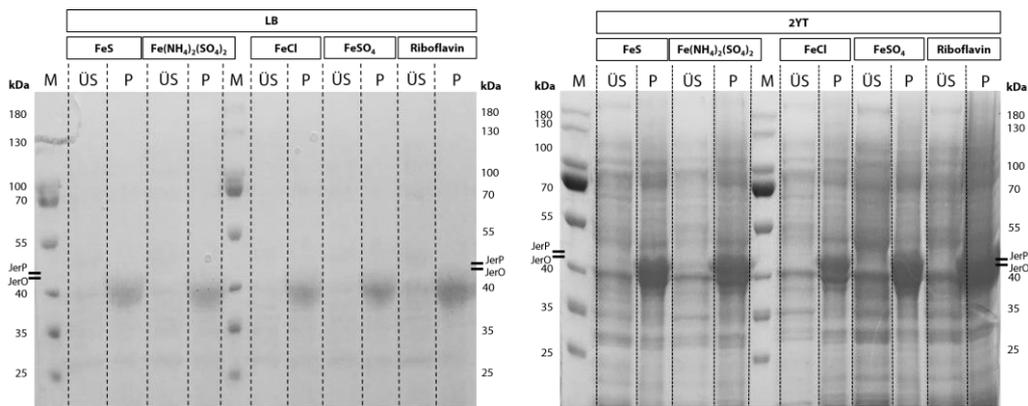
**Abbildung 9–58.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Expression von pET-Duet™-1\_jerP\_jerO in *E. coli* C41-CmpX13 mit unterschiedlich langen Expressionszeiten. **M:** Marker (kDa), **P:** Pellet, **ÜS:** Überstand; JerO = 41 kDa, JerP = 42 kDa; aufgetragene Probenvolumina 10 µL.



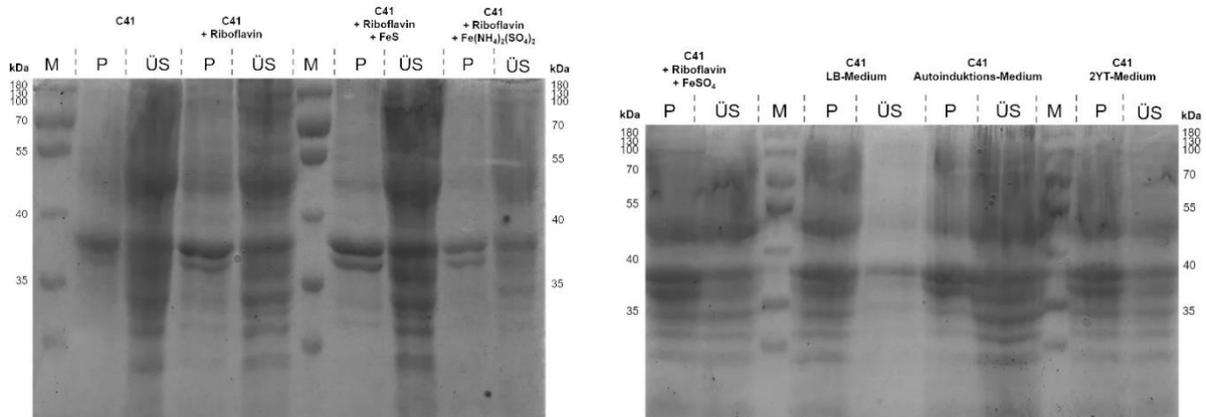
**Abbildung 9–59.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Expression von pET-Duet™-1\_jerP\_jerO in *E. coli* C41-CmpX13 mit verschiedenen Expressionsmedien oder -zeiten. **M:** Marker (kDa), **P:** Pellet, **ÜS:** Überstand; JerO = 41 kDa, JerP = 42 kDa; aufgetragene Probenvolumina 10 µL.



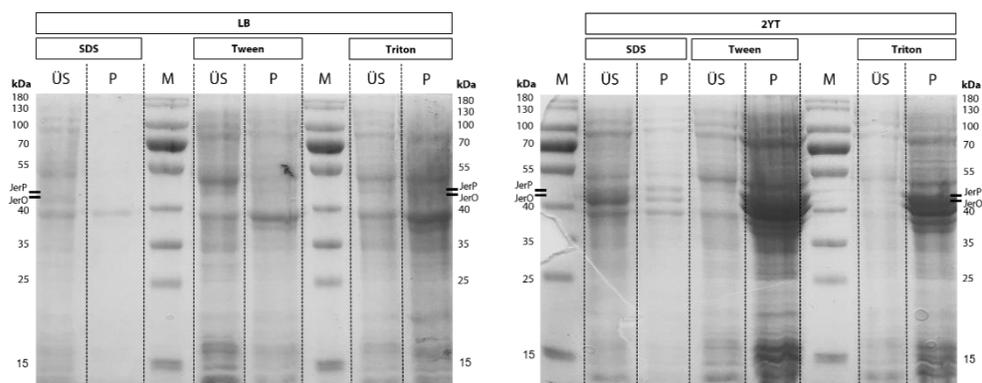
**Abbildung 9–60.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Expressionstudien zu Additiven von pET-Duet™-1\_jerP\_jerO in unterschiedlichen *E. coli* Stämmen. **M:** Marker (kDa), **P:** Pellet, **ÜS:** Überstand; JerO = 41 kDa, JerP = 42 kDa; aufgetragene Probenvolumina 10 µL.



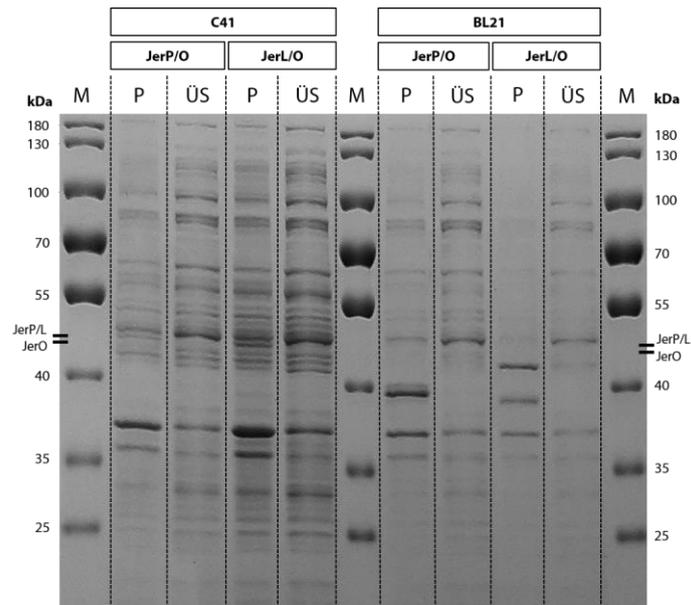
**Abbildung 9–61.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Expressionstudien zu Additiven von pET-Duet™-1<sub>jerP\_jerO</sub> in *E. coli* BL21 (DE3) mit verschiedenen Expressionsmedien. **M:** Marker (kDa), **P:** Pellet, **ÜS:** Überstand; JerO = 41 kDa, JerP = 42 kDa; aufgetragene Probenvolumina 10 µL.



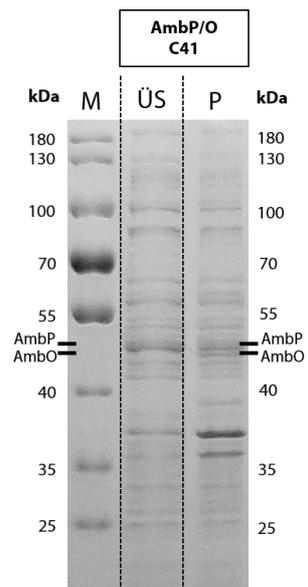
**Abbildung 9–62.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Expressionstudien zu Additiven von pET-Duet™-1<sub>jerP\_jerO</sub> in *E. coli* C41-CmpX13. **M:** Marker (kDa), **P:** Pellet, **ÜS:** Überstand; JerO = 41 kDa, JerP = 42 kDa; aufgetragene Probenvolumina 10 µL



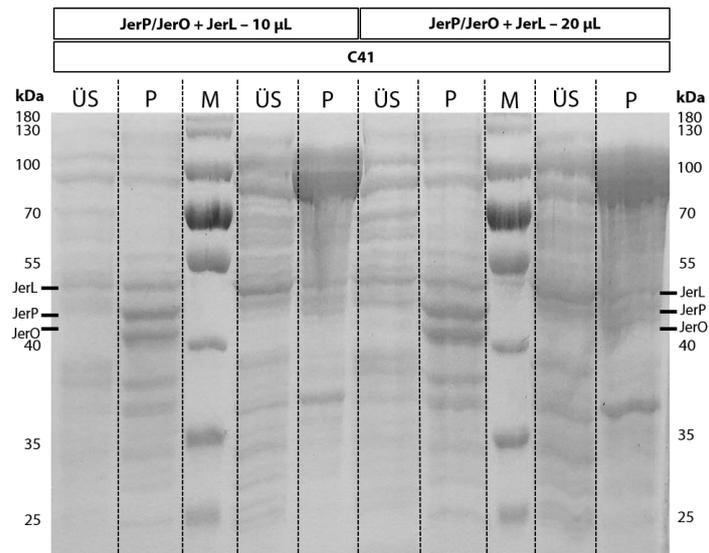
**Abbildung 9–63.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Expressionstudien zu Tensiden als Additive von pET-Duet™-1<sub>jerP\_jerO</sub> in *E. coli* C41-CmpX13 in verschiedenen Expressionsmedien. **M:** Marker (kDa), **P:** Pellet, **ÜS:** Überstand; JerO = 41 kDa, JerP = 42 kDa; aufgetragene Probenvolumina 10 µL.



**Abbildung 9–64.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Expression von pET-Duet™-1\_*jerP\_jerO* und pET-Duet™-1\_*jerL\_jerO* in C41-CmpX13 oder BL21 (DE3). **M:** Marker (kDa), **P:** Pellet, **ÜS:** Überstand; JerO = 41 kDa, JerP/L = 42 kDa; aufgetragene Probenvolumina 10 µL.



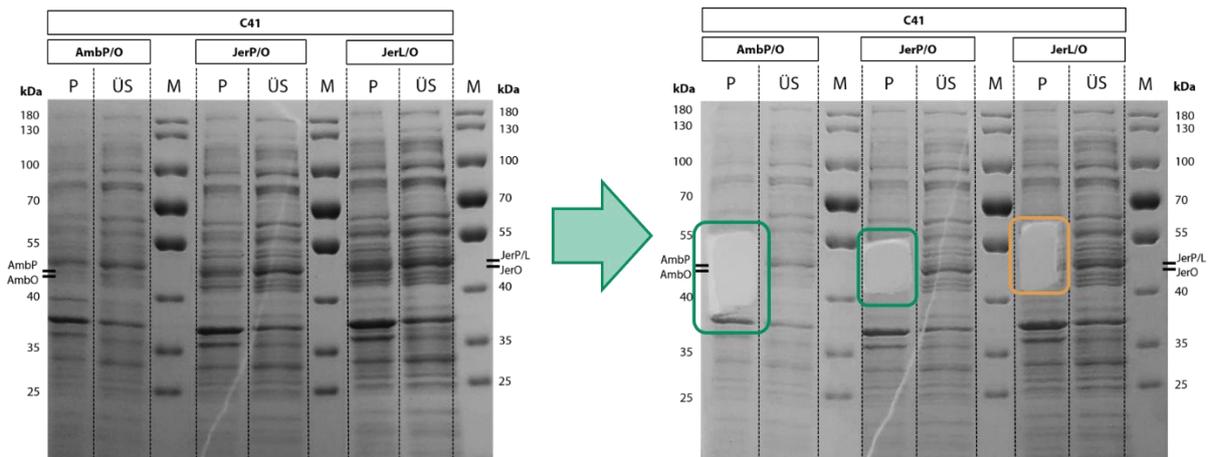
**Abbildung 9–65.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Expression von pET-Duet™-1\_*ambP\_ambO* in C41-CmpX13. **M:** Marker (kDa), **P:** Pellet, **ÜS:** Überstand; AmbO = 41 kDa, AmbP = 42 kDa; aufgetragene Probenvolumina 10 µL.



**Abbildung 9–66.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Co-Expression von pET-Duet™-1\_jerP\_jerO und pET28a(+)\_jerL in C41-CmpX13. **M:** Marker (kDa), **P:** Pellet, **ÜS:** Überstand; JerO = 41 kDa, JerP/L = 42 kDa; aufgetragene Probenvolumina 10 µL.

## 9.4 Protein-MS-MS-Analysen

Die folgenden Abbildungen zeigen die Sequenz des jeweiligen analysierten Proteins. Die grünen Balken stellen die in der MS-MS-Analyse detektierten Fragmente dar. Die roten Bereiche deuten auf Modifikationen der jeweiligen Aminosäure (z.B. Oxidationen, Methylierungen, Acetylierungen und Carbamidomethylierungen) hin.



**Abbildung 9–67.** SDS-Polyacrylamid-Gel zur Proteinidentifizierung mittels MS-MS-Analyse. Rahmen kennzeichnen ausgeschnittene Bereiche für Proben von pET-Duet™-1\_ambP\_ambO, pET-Duet™-1\_jerP\_jerO und pET-Duet™-1\_jerL\_jerO exprimiert in C41-CmpX13. **M:** Marker (kDa), **P:** Pellet, **ÜS:** Überstand; JerO & AmbO = 41 kDa, JerP/L & AmbP = 42 kDa; aufgetragene Probenvolumina 10 µL.

>JerO

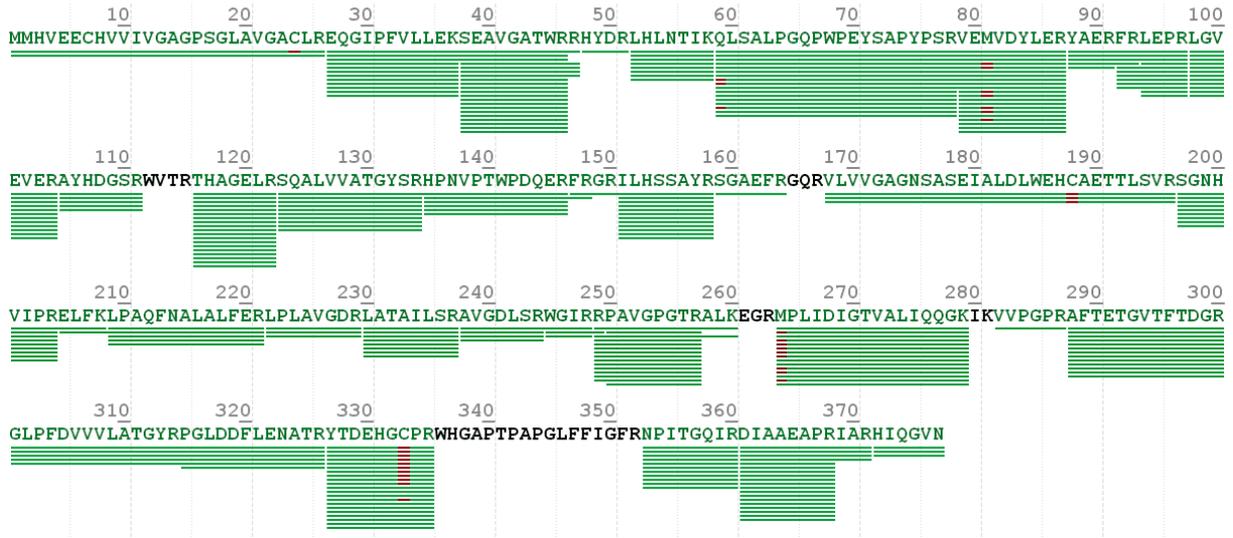


Abbildung 9–68. MS-MS-Analyse von JerO (92% Identitätsübereinstimmung).

>JerP

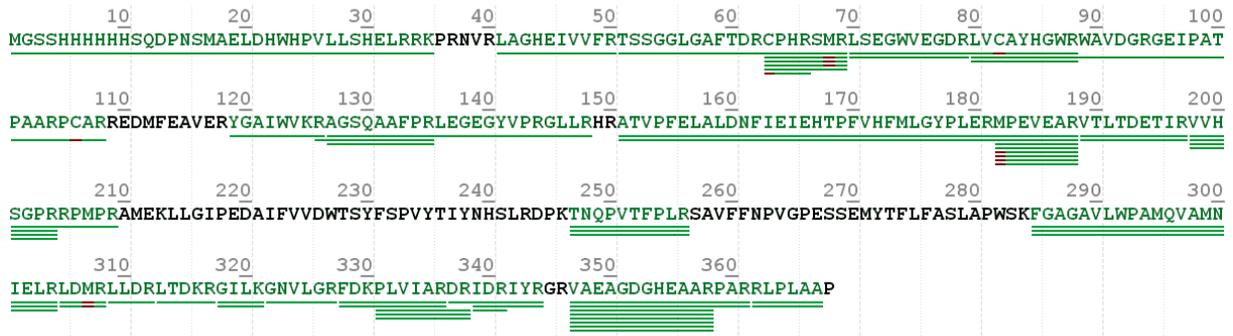


Abbildung 9–69. MS-MS-Analyse von His<sub>6</sub>-JerP (77% Identitätsübereinstimmung).

>JerL

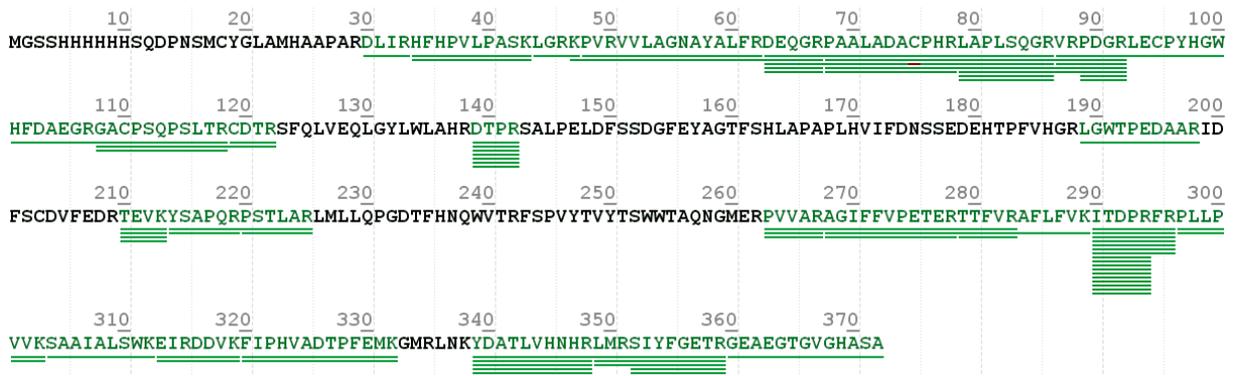


Abbildung 9–70. MS-MS-Analyse von His<sub>6</sub>-JerL (61% Identitätsübereinstimmung).

>AmbO

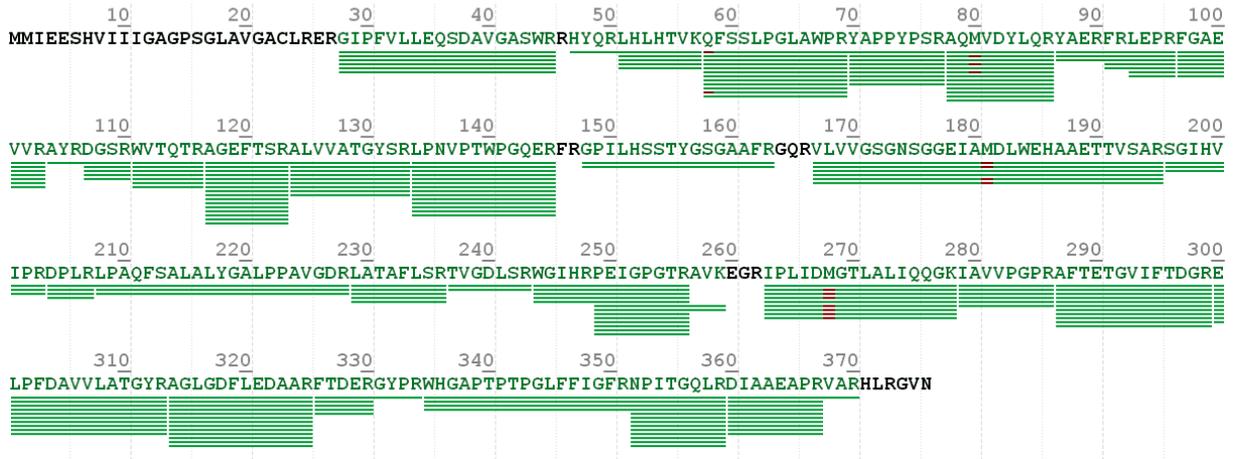


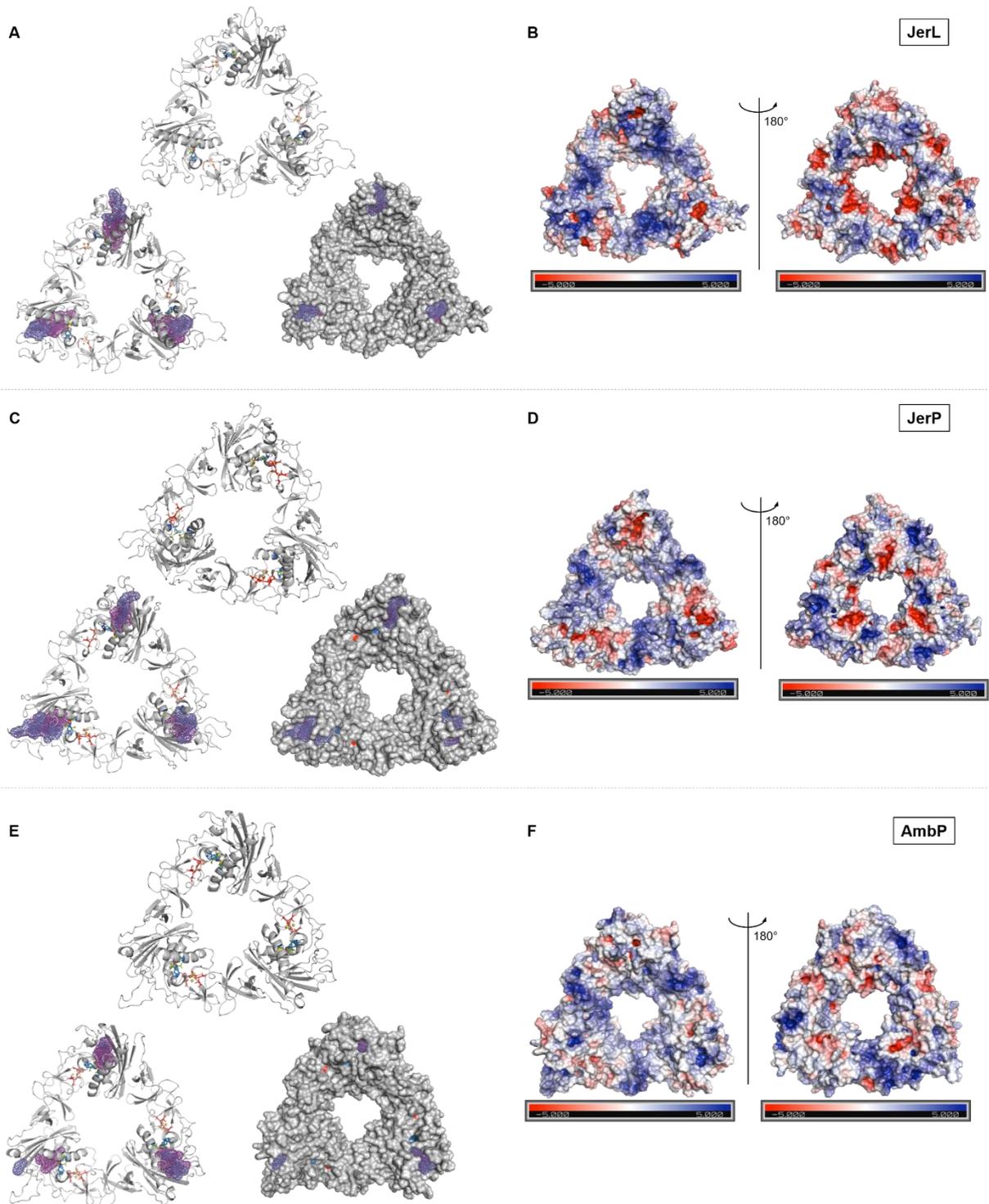
Abbildung 9-71. MS-MS-Analyse von AmbO (89% Identitätsübereinstimmung).

>AmbP

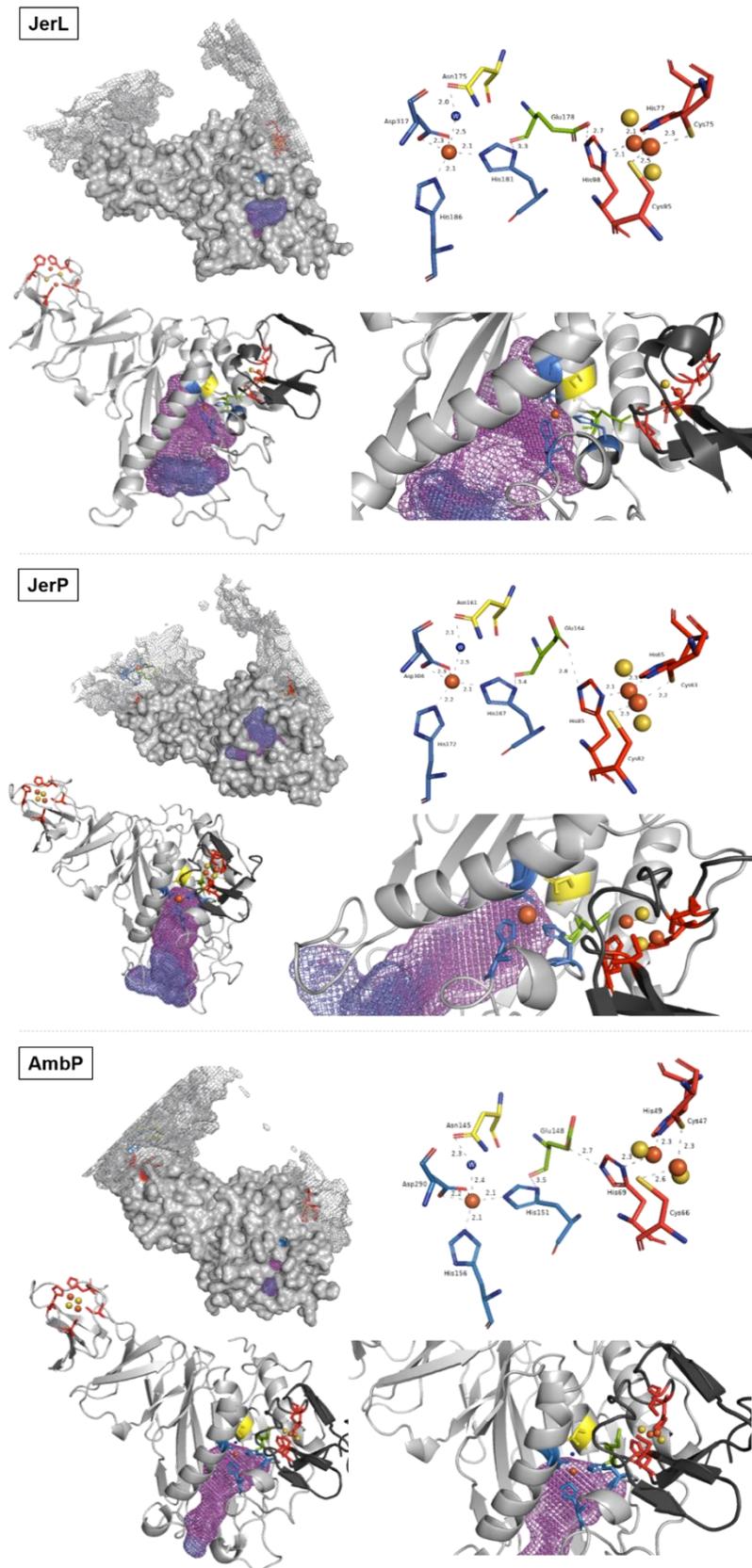


Abbildung 9-72. MS-MS-Analyse von His<sub>6</sub>-AmbP (62% Identitätsübereinstimmung).

## 9.5 Abbildungen *in silico*-Studien



**Abbildung 9-73.** 3-D-Proteinmodelle der RIESKE-Oxygenase JerP, JerL, AmbP. **(A,C,E)** 3-D-Proteinmodelle des trimeren  $\alpha_3$ -Komplexes. *Ober:* 3-D-Modell mit non-häm-Eisenzentrum, [2Fe2S]-RIESKE-Cluster und koordinierenden Aminosäuren, *Unten links:* 3-D-Modell zusätzlich mit Kavität von aktivem Zentrum, und Tunnel in lila, *Unten rechts:* 3-D-Proteinoberflächenmodell mit Eingängen des Tunnels in lila, **(B,D,F)** Elektrostatische Oberflächenpotentiale mit Farbgradient von rot (-5) bis blau (+5).



**Abbildung 9–74.** 3-D-Proteinmodelle eines RIESKE-Oxygenase-Monomers von JerP, JerL, AmbP. Vollständige 3-D-Monomerstrukturen des Proteinmodells und angrenzenden aktiven Zentrum mit hervorgehobenen non-häm-Eisenzentrum und [2Fe2S]-Rieske-Cluster inklusive interagierender Aminosäuren, deren Abstände sowie Kavität des aktiven Zentrums. Lila: Kavität und Eingang, blau: non-häm-Eisen-koordinierende Aminosäuren, rot: [2Fe2S]-RIESKE-Cluster-koordinierende Aminosäuren, dunkelblau: koordiniertes Wassermolekül mit gelb: stabilisierende Aminosäure aus sekundärer Koordinationsebene, grün: verbindende Glutamatbrücke.

## 9.6 Entwicklungsprozess des optimierten *in vivo*-Enzymreaktionsprotokolls

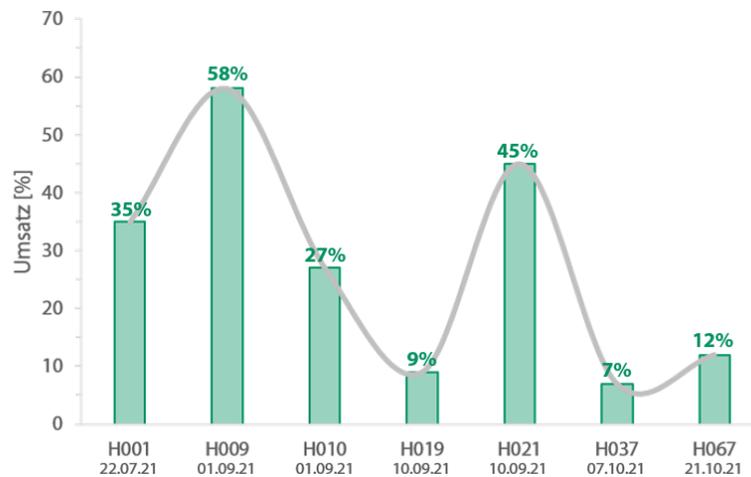


Abbildung 9–75. Übersicht über die beobachteten Umsatzzschwankungen in einem Bereich von durchschnittlich  $32 \pm 26\%$  zu Beginn der Verwendung der HV. Vollständige UPLC-Chromatogramme finden sich in Kapitel 9.7.

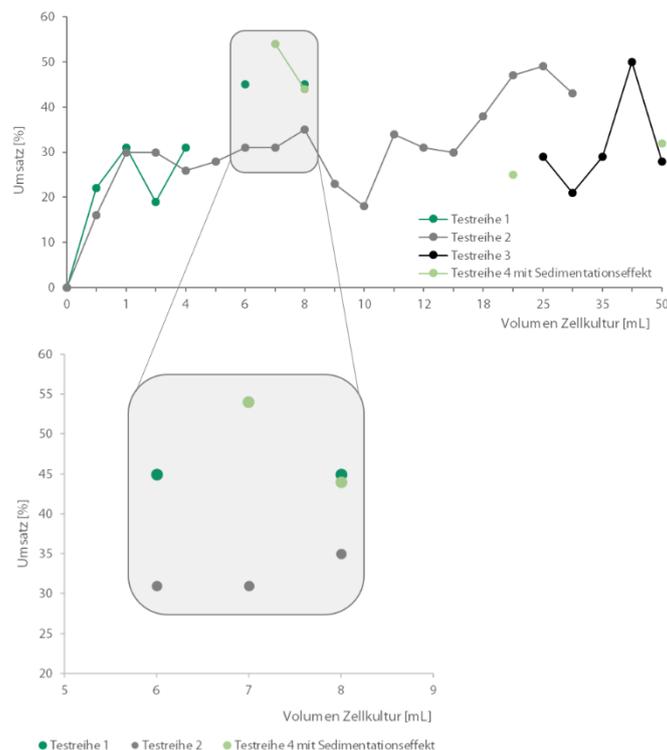
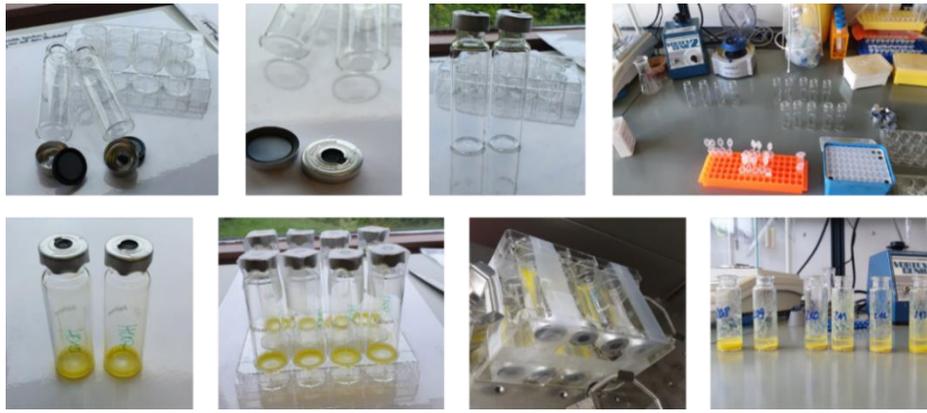


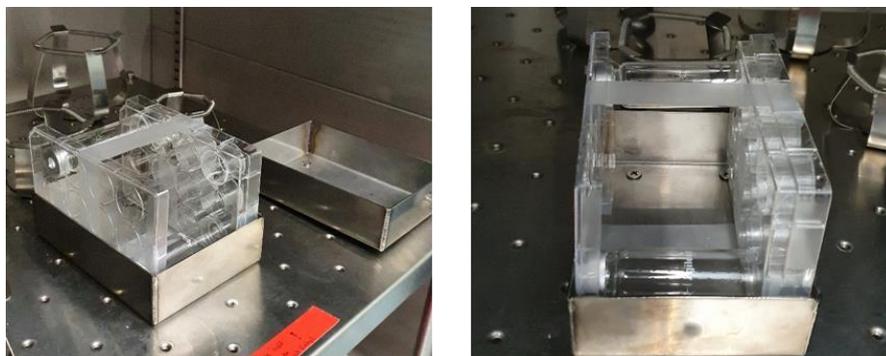
Abbildung 9–76. Ergebnisse der Experimente zur Zellmengenverteilung. Eingesetzt wurden verschiedene Volumina an Zellkultur aus bis zu 100 mL Gesamtvolumen der Expressionskulturen. In allen Testreihen erfolgte eine Normierung auf 1 mL Reaktionsvolumen. In Testreihe 4 wurde zusätzlich dazu der Sedimentationseffekt durch 30 min Standzeit berücksichtigt (Abbildung 9–78). In grauem Rahmen ist der Bereich mit maximalen und konstantem Umsatz inklusive Einfluss des Sedimentationseffektes während der Experimente zu sehen. UPLC-MS-Chromatogramme in Kapitel 9.7.



**Abbildung 9–77.** Fotostrecke zur Durchführung der *in vivo*-Enzymreaktion in *Headspace Vials*. Begonnen bei Materialvorbereitungen und Ansetzen der *in vivo*-Enzymreaktionsexperimente über Inkubation (noch nicht standardisiert) hin zur Extraktion im *Headspace Vial*.



**Abbildung 9–78.** Standardisiertes Protokoll zur Präparation der in *in vivo*-Enzymreaktionen verwendeten Zellsuspensionen.

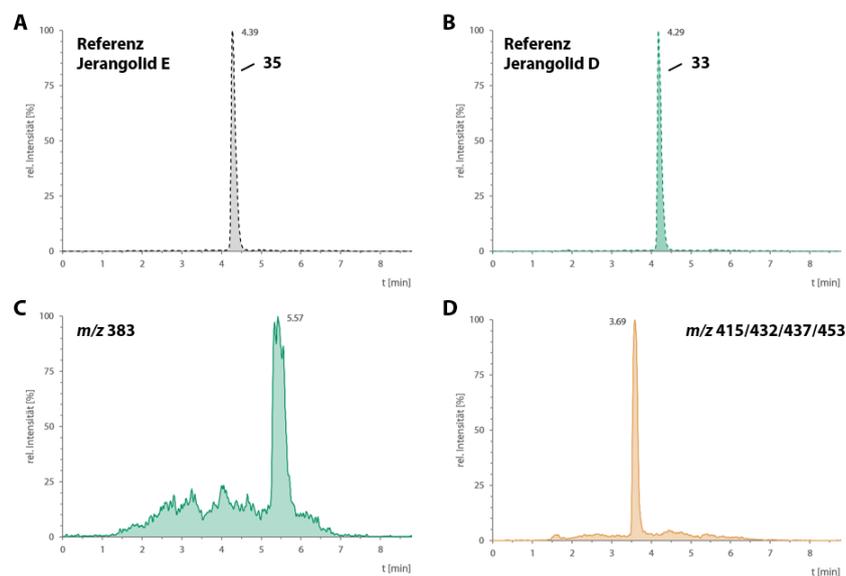


**Abbildung 9–79.** Angefertigte Edelstahlwanne zur standardisierten Durchführbarkeit des *in vivo*-Enzymreaktionsaufbaus im Inkubator unter Lichtausschluss (erzielt durch Abkleben der Scheibe mit Alufolie).

## 9.7 UPLC-MS Chromatogramme

### Identifizierung der Kontaminanten und Doppelpeaks

Zwei Kontaminanten mit  $m/z = 383$ ,  $t_R = \sim 5.6$  min und  $m/z = 415/432$ ,  $t_R = \sim 3.7$  min konnten vereinzelt während der UPLC-MS-Analyse beobachtet werden. Um deren Ursprung in verwendeten Plastikartikeln zu bestätigen, wurde ein autoklaviertes 1.5 mL Reaktionsgefäß mit EtOAc (4 x 1 mL) extrahiert. Flüchtige Bestandteile wurden in vacuo entfernt und 200  $\mu$ L MeOH zur Präparation der UPLC-MS-Probe hinzugegeben. Die beobachteten Peaks der UPLC-MS-Chromatogramme bestätigen ihre Eigenschaft als Kontaminanten, die unabhängig von den *in vivo*-Enzymreaktionen auftreten.

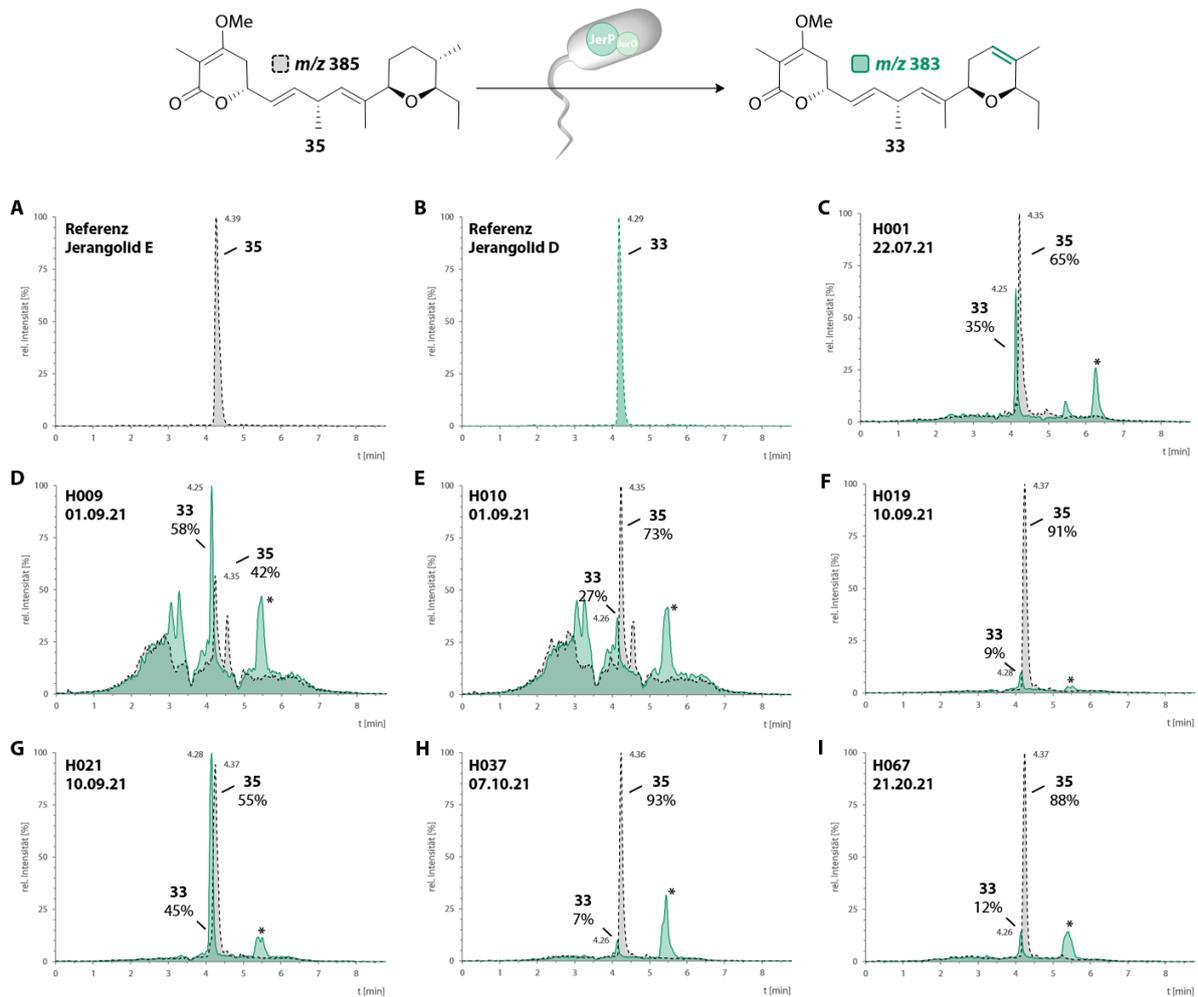


**Abbildung 9–80.** UPLC-MS-Chromatogramme der Extraktion von Plastikartikeln zur Identifikation des Ursprungs der Kontaminanten. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; (A) Jerangolid E (35) Referenz, (B) Jerangolid D (33) Referenz, (C) Kontaminante  $m/z$  383 mit  $t_R = 5.57$ , (D) Kontaminante  $m/z$  415/432/437/453 mit  $t_R = 3.69$ .

Das Auftreten von Doppelpeaks in einigen Chromatogrammen, insbesondere für Jerangolid E (35)  $m/z$  385, kann der Verwendung einer älteren Chromatographiesäule zugeschrieben werden. Substitution mit einer neuen Säule führte zu scharfen Peaks mit einer definierten Retentionszeit.

## Beobachtete Umsatzschwankungen

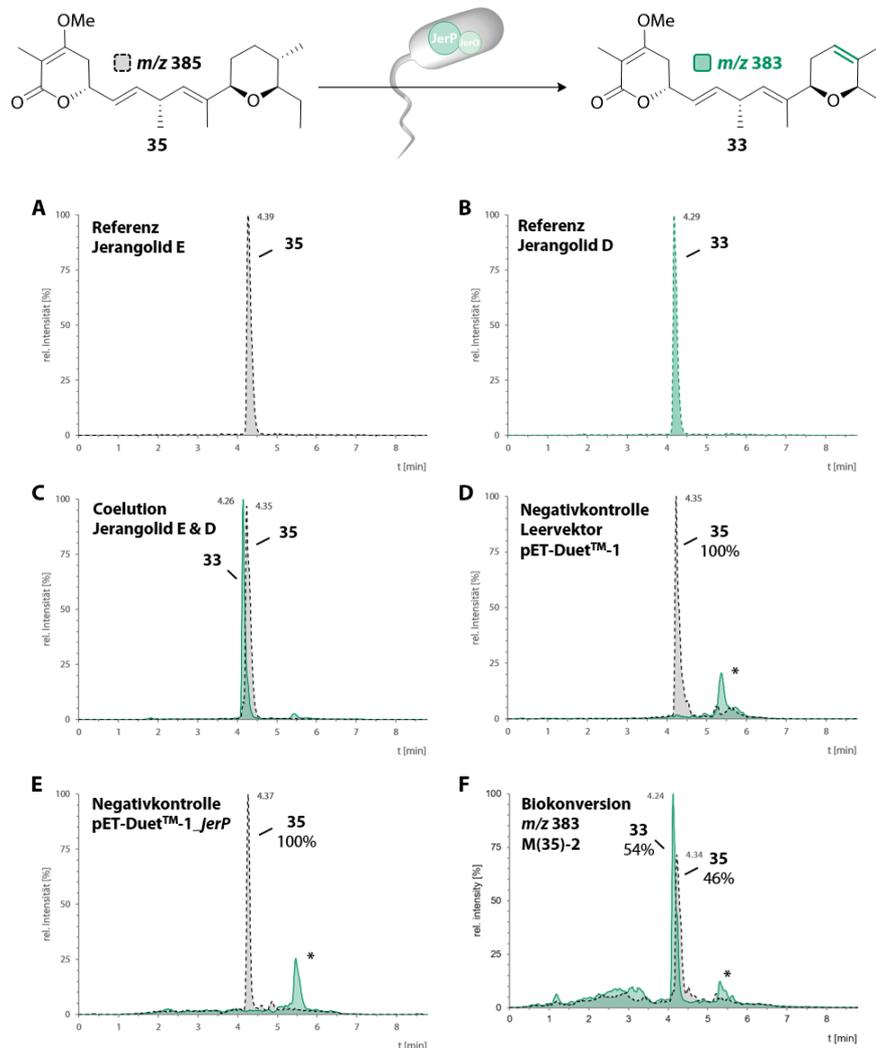
Während der ersten Wochen der Verwendung der HV sind vermehrt Umsatzschwankungen in einem Bereich von durchschnittlich  $32 \pm 26\%$  beobachtet worden.



**Abbildung 9–81.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerP zu unterschiedlichen Zeitpunkten als Darstellung der beobachteten Umsatzschwankungen. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R$  = 5.57; (A) Jerangolid E (**35**) Referenz, (B) Jerangolid D (**33**) Referenz, (C-I) Enzymreaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 385.2349,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 383.2193.

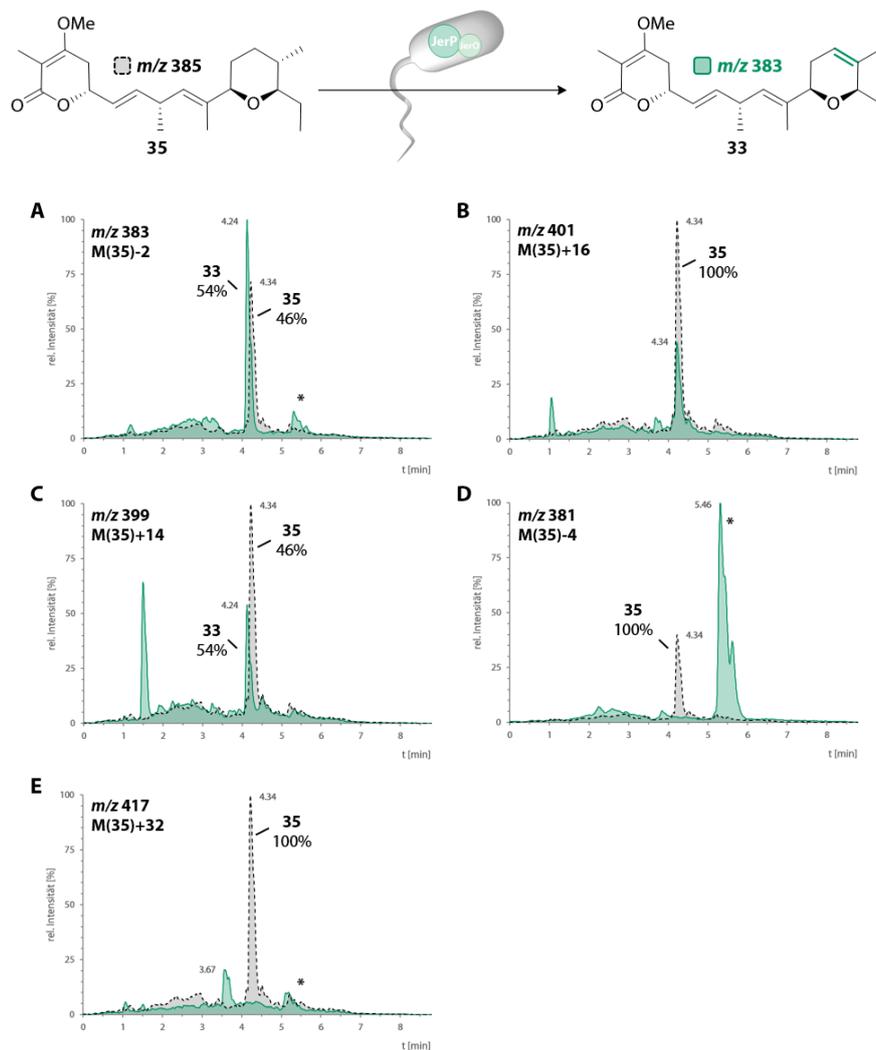
## Ausführliche Analytik am optimierten Beispielsystem

Die folgende *in vivo*-Enzymreaktion zeigt die höchste Konversion unter Verwendung des neu etablierten Standardprotokolls.



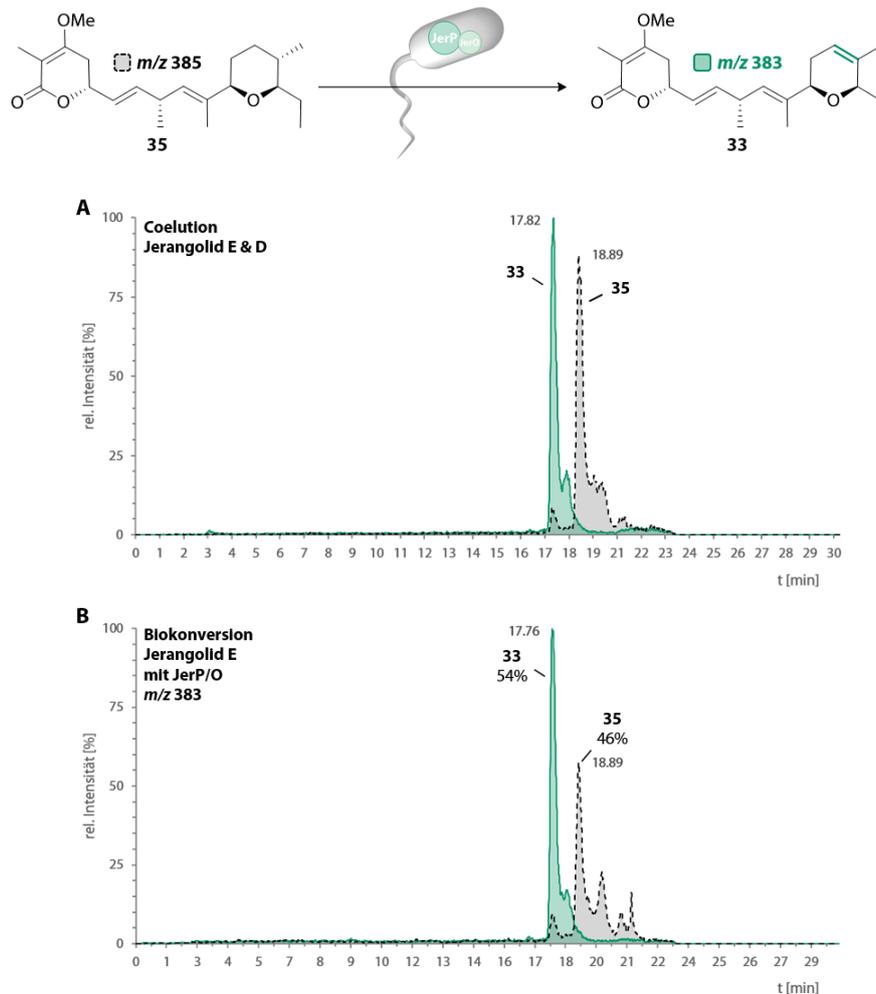
**Abbildung 9–82.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerP unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit *m/z* 383,  $t_R = 5.57$ ; **(A)** Jerangolid E (**35**) Referenz, **(B)** Jerangolid D (**33**) Referenz, **(C)** Coelution der Jerangolid E und Jerangolid D Referenz, **(D)** Negativ Kontrolle: Enzymreaktion mit in *E. coli* C41-CmpX13 exprimierten leeren pET-Duet<sup>TM</sup>-1 Vektor, **(E)** Negativ Kontrolle: Enzymreaktion von mit in *E. coli* C41-CmpX13 exprimierten pET-Duet<sup>TM</sup>-1<sub>jerP</sub>, **(F)** Enzymreaktion von mit in *E. coli* C41-CmpX13 exprimierten pET-Duet<sup>TM</sup>-1<sub>jerP\_jerO</sub>.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 383.2193$ .

Um RIESKE-katalysierte mehrfach Oxidationen oder Zwischenprodukte, wie Jerangolid B (**34**), während der Desaturierung, wurden UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen nach entsprechenden  $m/z$ -Werten überprüft. Die ausführlichen Ergebnisse am Beispiel der Desaturierung von Jerangolid E (**35**) mit JerP sind in Abbildung 9–104 gezeigt.



**Abbildung 9–83.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerP hinsichtlich möglicher Intermediate oder Mehrfachoxidationen. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R=5.57$ ; (A) Massespur des monodesaturierten Produkts  $m/z$  383, (B) Massespur des monohydroxylierten Produkts  $m/z$  401, (C) Massespur des monodesaturierten Produkts  $m/z$  399 entspricht  $[M+K]^+$  Jerangolid D (**33**), (D) Massespur des didesaturierten Produkts  $m/z$  381, (E) Massespur des dihydroxylierten Produkts  $m/z$  417.

Startmaterial und Produkt des Gemisches nach Enzymreaktion wurden, zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Natur beider, durch Verwendung eines verlängerten Gradienten während der UPLC-MS-Analyse beispielhaft Basislinien getrennt: MeOH:H<sub>2</sub>O = 10:90 → 50:50 {10 min}, MeOH:H<sub>2</sub>O = 50:50 → 70:30 {10 min}, MeOH:H<sub>2</sub>O = 70:30 → 90:10 {0.5 min}, MeOH:H<sub>2</sub>O = 90:10 {2.5 min} 0.5 mL/min (Abbildung 9–84).



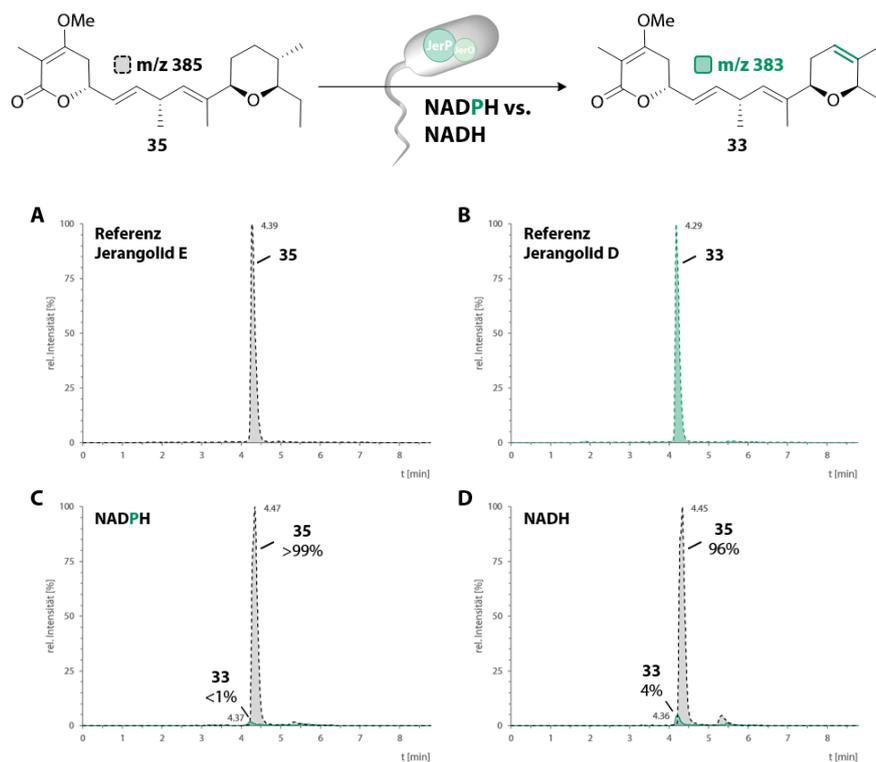
**Abbildung 9–84.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (35) mit JerP mit optimierten Gradienten zur Peak-Separation. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; (A) Coelution der Jerangolid E und D Referenzen, (B) Enzymreaktion von Jerangolid E (35) mit JerP/O unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls.  $t_R$ (Jerangolid E) = 18.89 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 385.2349,  $t_R$ (Jerangolid D) = 17.76 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 383.2193.

## Prozess der Optimierung und Charakterisierung der RIESKE-Oxygenasen

Die Experimente im Rahmen der Optimierung wurden am Beispielsystem der Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit in *E. coli* C41-CmpX13 exprimierten pET-Duet<sup>TM</sup>-1\_gerP\_gerO untersucht. Ausgewählte Experimente wurden auf die analoge Reaktion mit pET-Duet<sup>TM</sup>-1\_gerL\_gerO übertragen. Die experimentellen Bedingungen sind entweder vor oder nach der Optimierung (Abbildung 6–32) einzuordnen, wobei Änderungen zu den entsprechenden Standards im jeweiligen Abschnitt erläutert werden. Der Prozess der Optimierung ist im Folgenden, soweit möglich, chronologisch sortiert.

### Cofaktor-Typ

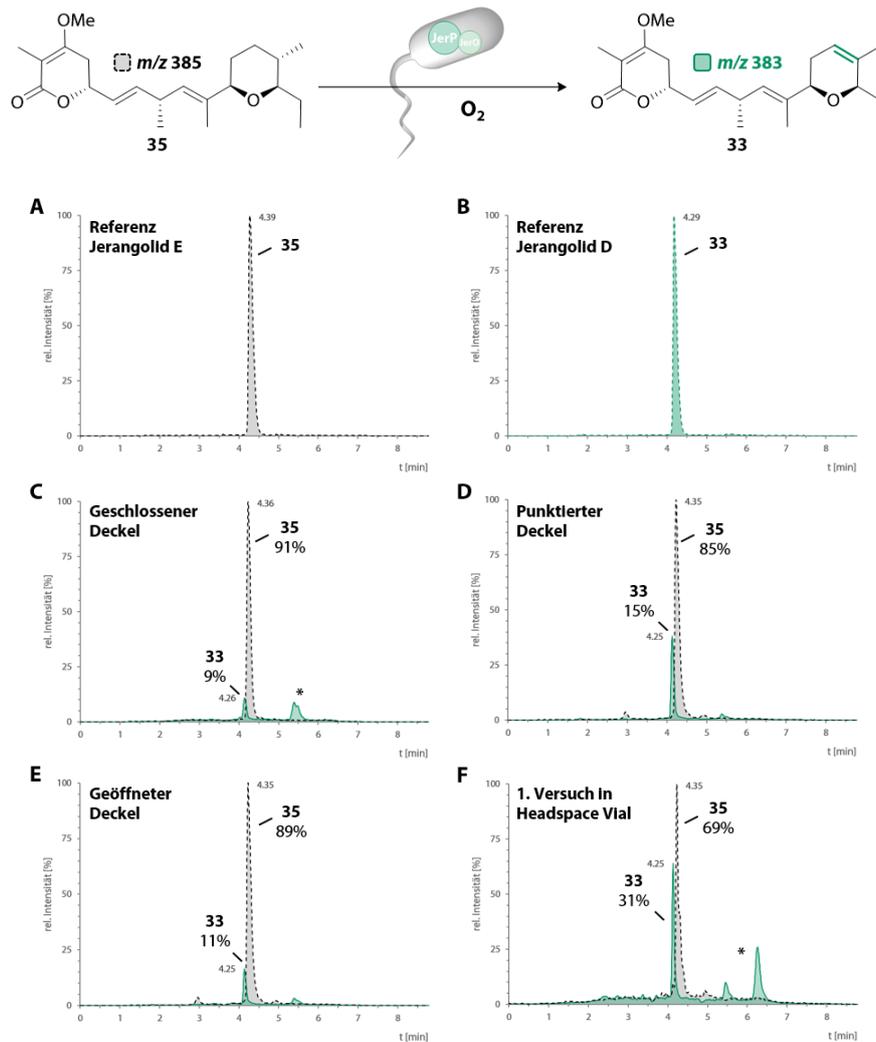
Um die Abhängigkeit der *in vivo*-Enzymreaktion von der Wahl der Elektronenquelle zu untersuchen wurden Experimente mit den Cofaktoren NADPH oder NADH als unterschiedliche Elektronenquellen in Kombination mit FAD als Elektronenshuttle durchgeführt.



**Abbildung 9–85.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerP in Kombination mit verschiedenen Elektronenquellen. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit *m/z* 383,  $t_R = 5.57$ ; **(A)** Jerangolid E (**35**) Referenz, **(B)** Jerangolid D (**33**) Referenz, **(C)** Enzymreaktion mit Zugabe von 1 mM NADPH & FAD (1:1), **(D)** Enzymreaktion mit Zugabe von 1 mM NADH & FAD (1:1).  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 383.2193$ .

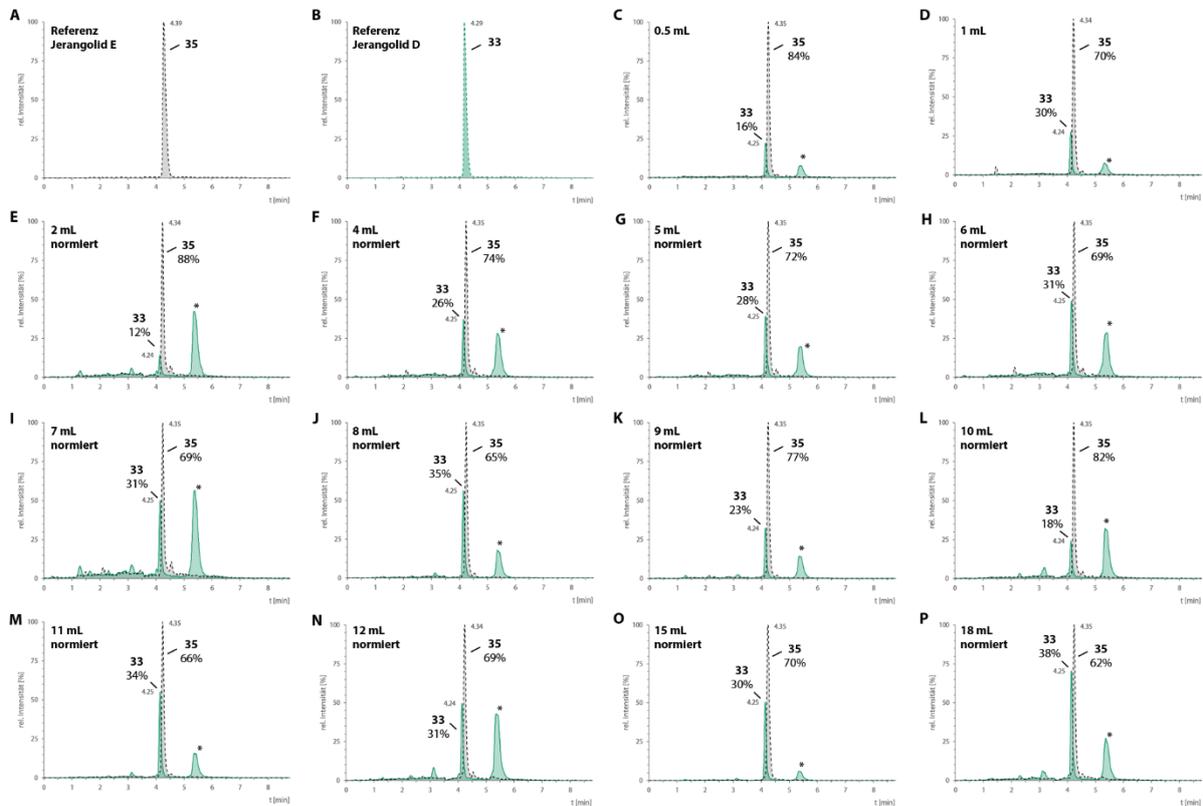
## Sauerstoffzufuhr und Gasaustausch

Verschiedene Typen an offenen und verschlossenen Reaktionsgefäßen, mit unterschiedlicher praktischer Anwendung, wurden eingesetzt um den Effekt der Sauerstoffzufuhr und der Größe der Oberfläche zum Gasaustausch zu untersuchen. Zuvor optimierte Parameter wurden übernommen.

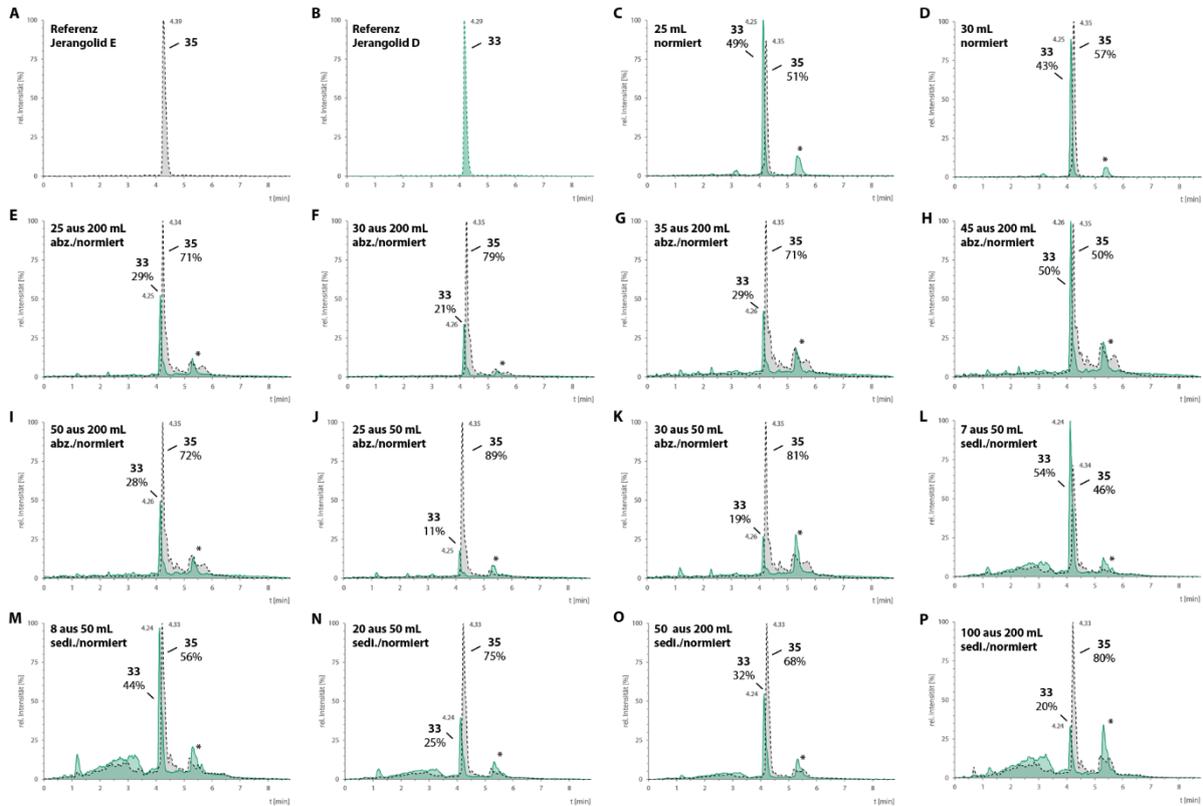


**Abbildung 9–86.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerP in Kombination mit verschiedenen Elektronenquellen. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit *m/z* 383,  $t_R = 5.57$ ; (A) Jerangolid E (**35**) Referenz, (B) Jerangolid D (**33**) Referenz, (C-F) Enzymreaktion in unterschiedlichen Typen an offenen und verschlossenen Reaktionsgefäßen.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na [M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na [M+Na]^+ = 383.2193$ .

## Zellmengenverteilung



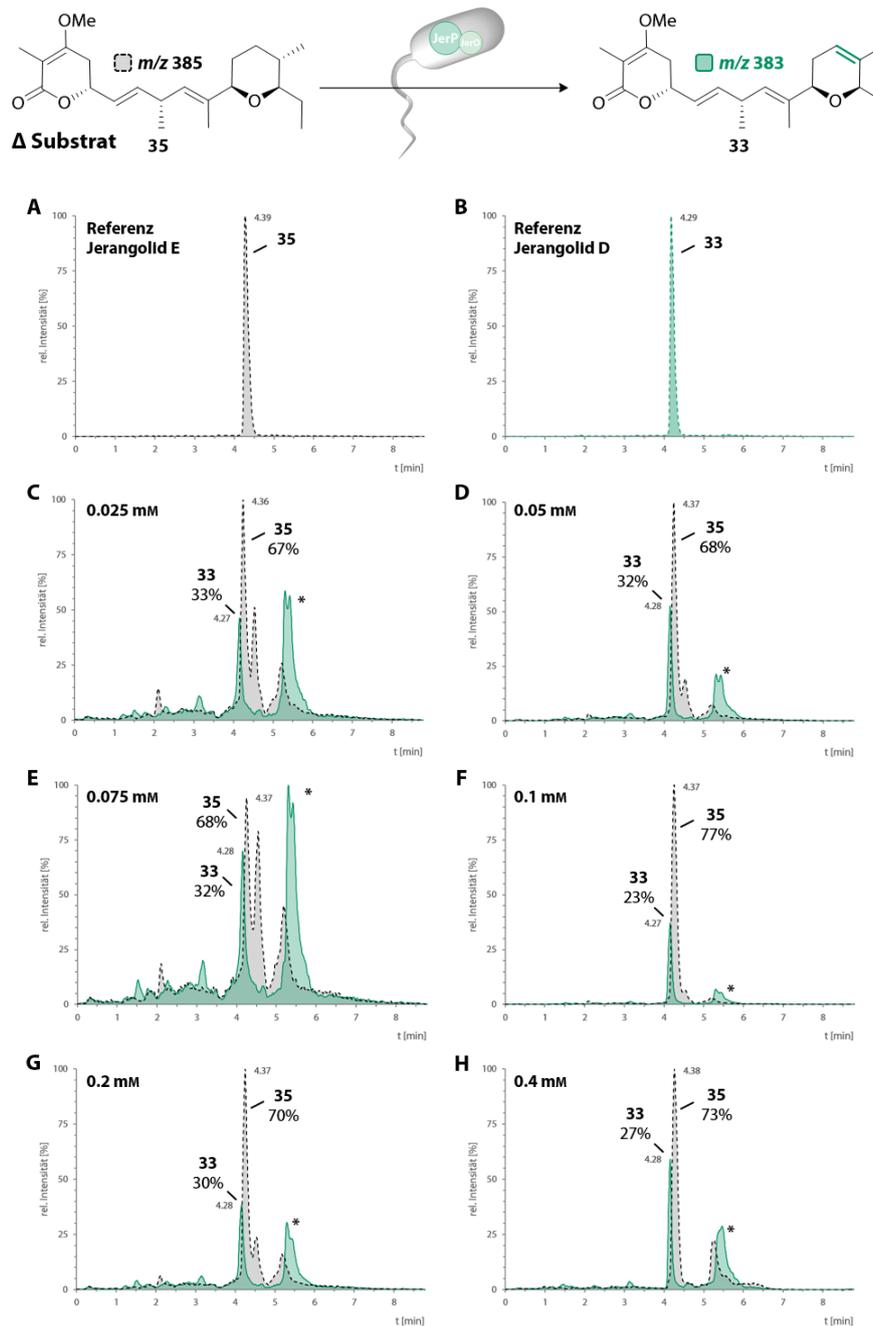
**Abbildung 9–87.** UPLC-MS-Chromatogramme (Teil 1) der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerP zur Erstellung einer Zellmengenverteilung und Ermittlung der optimalen Zellmenge. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit *m/z* 383,  $t_R = 5.57$ ; (A) Jerangolid E (**35**) Referenz, (B) Jerangolid D (**33**) Referenz, (C–P) Enzymreaktion mit verschiedenen Mengen an aktiver Zellkultur unter Verwendung unterschiedlicher Präparationsarten. normiert = auf 1 mL Reaktionsvolumen normiert.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 383.2193$ .



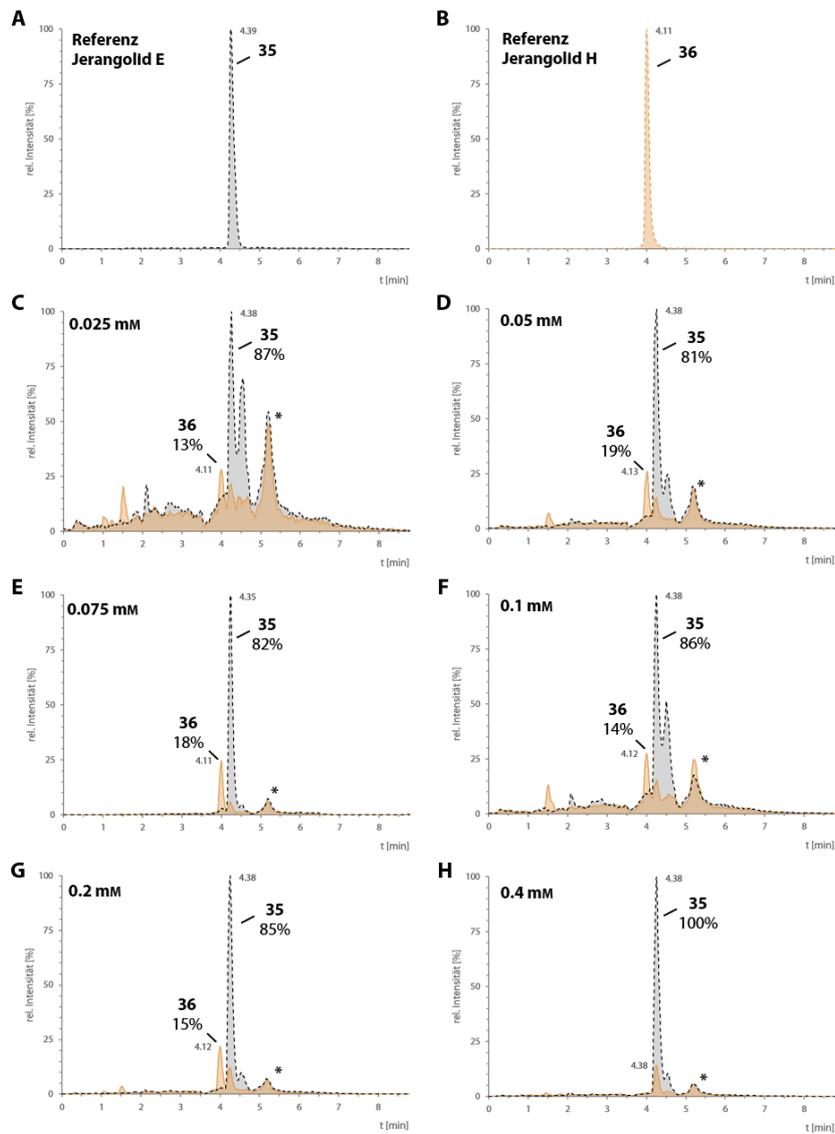
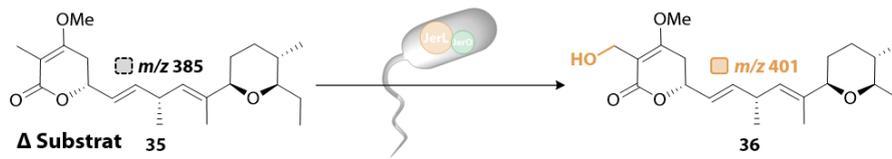
**Abbildung 9–88.** UPLC-MS-Chromatogramme (Teil 2) der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerP zur Erstellung einer Zellmengenverteilung und Ermittlung der optimalen Zellmenge. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit *m/z* 383,  $t_R = 5.57$ ; (A) Jerangolid E (**35**) Referenz, (B) Jerangolid D (**33**) Referenz, (C–P) Enzymreaktion mit verschiedenen Mengen an aktiver Zellkultur unter Verwendung unterschiedlicher Präparationsarten. normiert = auf 1 mL Reaktionsvolumen normiert, abz. = vor Normierung auf 1 mL abzentrifugiert und Zellen resuspendiert, sedi. = Berücksichtigung des Sedimentationseffekts und Protokoll nach Abbildung 9–78.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 385.2349,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 383.2193.

## Substratkonzentration

Unterschiedliche Substratkonzentrationen wurden in der Enzymreaktion eingesetzt, um einen Effekt auf selbige zu untersuchen. Zuvor optimierte Parameter wurden übernommen.



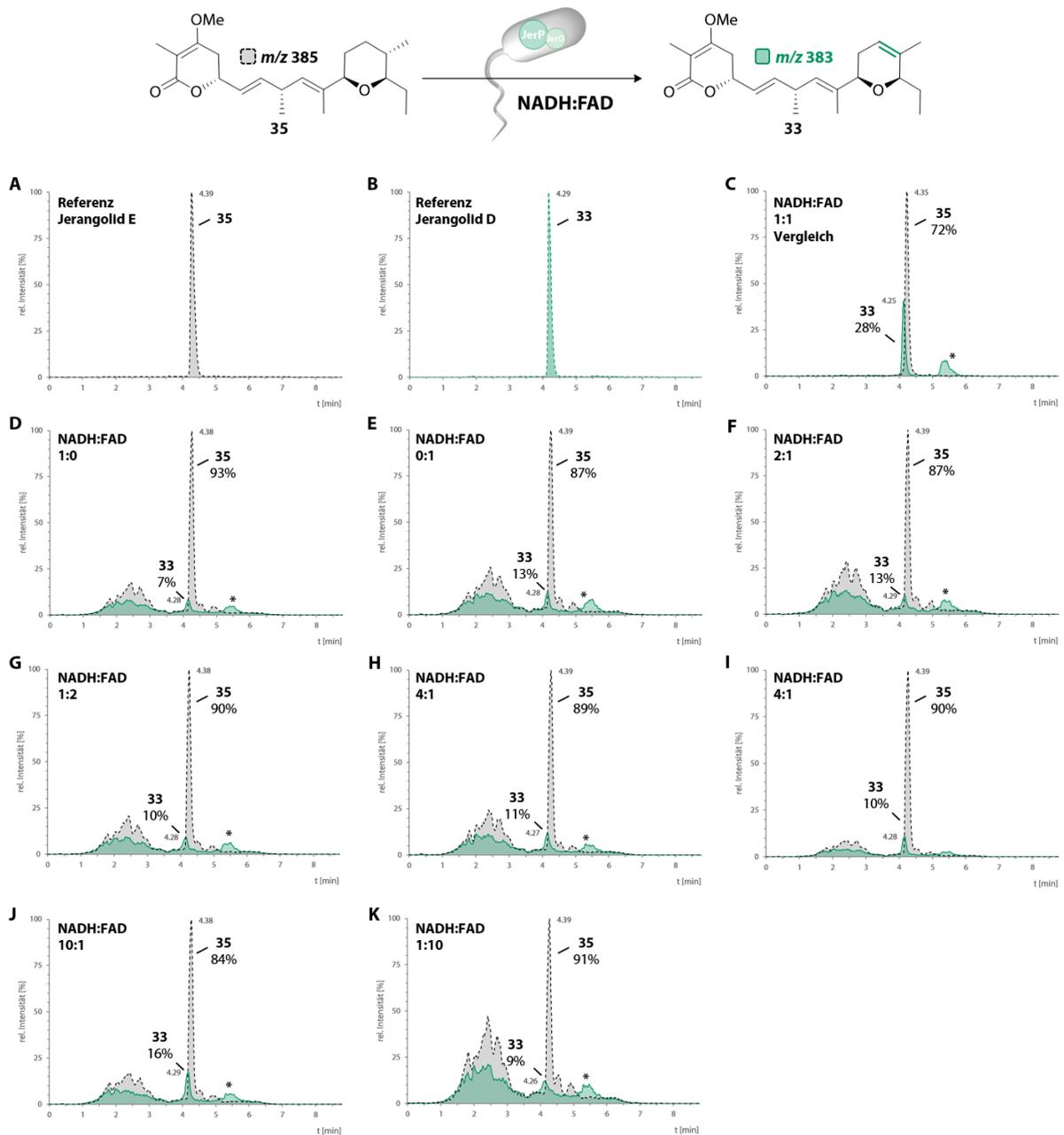
**Abbildung 9–89.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerP in Kombination mit verschiedenen Substratkonzentrationen zum Start. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; (**A**) Jerangolid E (**35**) Referenz, (**B**) Jerangolid D (**33**) Referenz, (**C–H**) Enzymreaktion mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 383.2193$ .



**Abbildung 9–90.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerL in Kombination mit verschiedenen Substratkonzentrationen zum Start. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in orange; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; (A) Jerangolid E (**35**) Referenz, (B) Jerangolid H (**36**) Referenz, (C–H) Enzymreaktion mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na [M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (jerangolid H) = 4.11 min,  $C_{22}H_{34}O_5Na [M+Na]^+ = 401.2298$

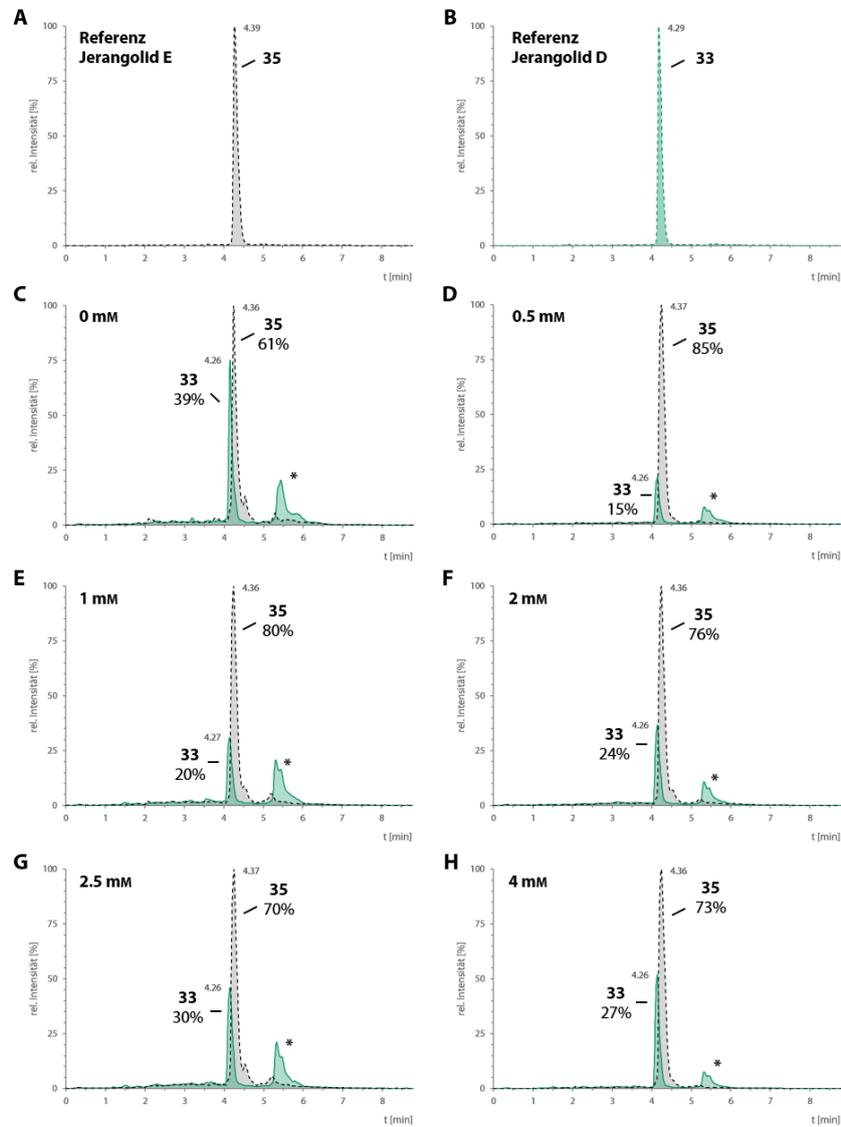
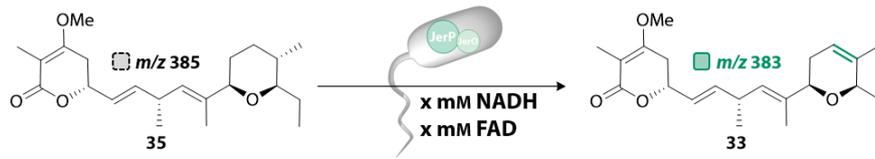
## Cofaktorverhältnis und -konzentration

Um die Stärke des Einflusses von Elektronenquelle oder -shuttle auf den Elektronentransport zu untersuchen, wurden verschiedene Verhältnisse an NADH:FAD in der Enzymreaktion mit NADH eingesetzt. Zuvor optimierte Parameter wurden übernommen.

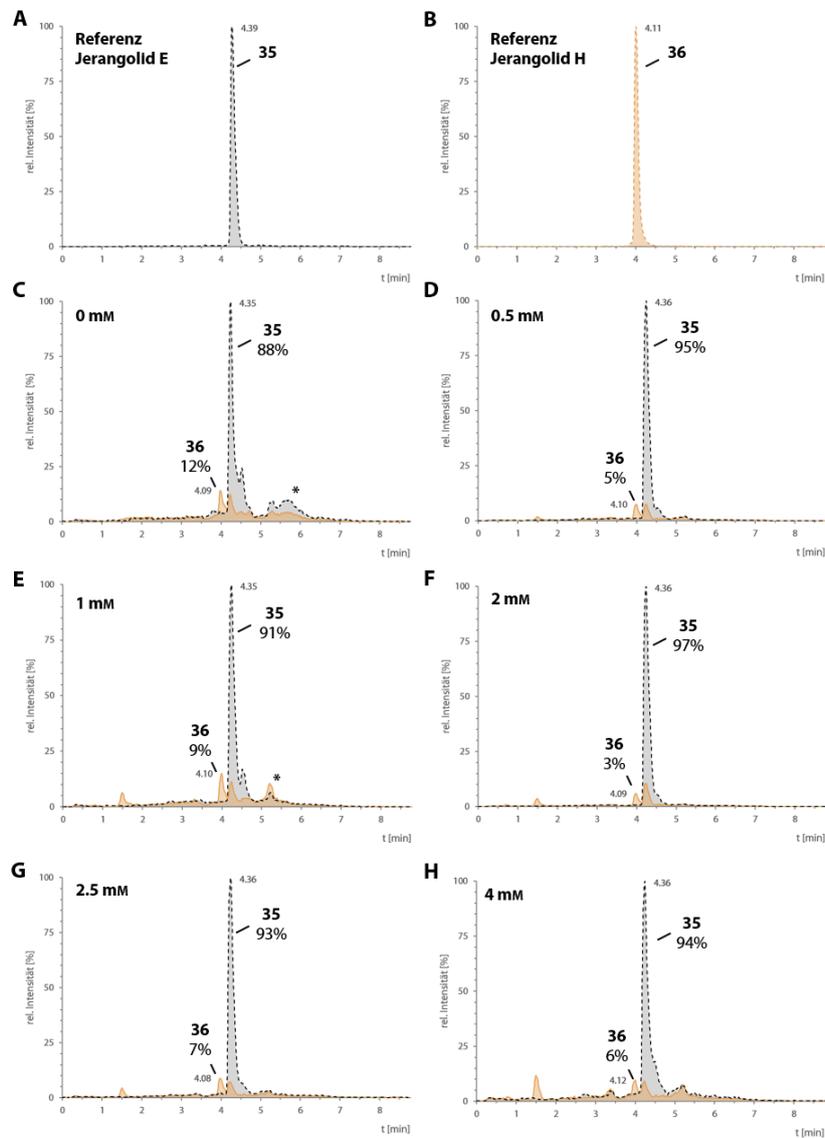
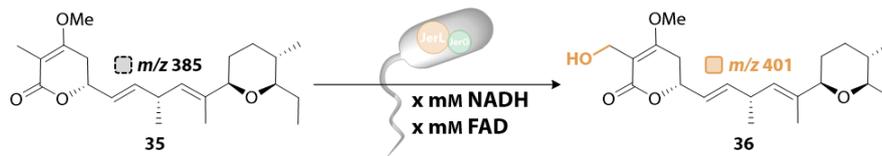


**Abbildung 9–91.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (35) mit JerP unter Verwendung verschiedener NADH:FAD-Verhältnisse. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; (A) Jerangolid E (35) Referenz, (B) Jerangolid D (33) Referenz, (C–K) Enzymreaktion mit unterschiedlichen NADH:FAD-Verhältnissen.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 383.2193$ .

Nach Ermittlung des besten Verhältnisses von 1:1 NADH zu FAD, fand die Untersuchung der Cofaktorkonzentration statt, dabei wurden Konzentrationen zwischen 0 mM und 4 mM getestet.



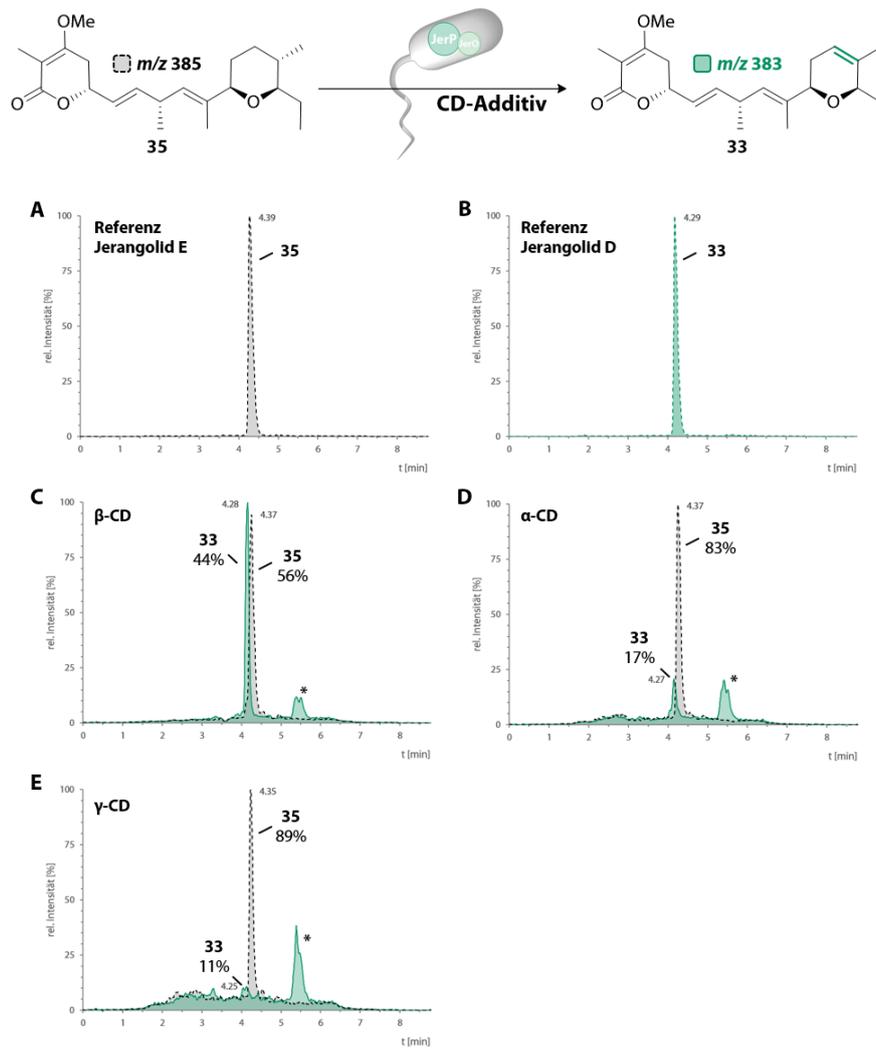
**Abbildung 9–92.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerP in Kombination mit verschiedenen Cofaktorkonzentrationen zum Start. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; **(A)** Jerangolid E (**35**) Referenz, **(B)** Jerangolid D (**33**) Referenz, **(C–H)** Enzymreaktion mit unterschiedlichen NADH- & FAD-Konzentrationen im Verhältnis 1:1.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na [M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na [M+Na]^+ = 383.2193$ .



**Abbildung 9–93.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerL in Kombination mit verschiedenen Cofaktorkonzentrationen zum Start. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in orange; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R$  = 5.57; **(A)** Jerangolid E (**35**) Referenz, **(B)** Jerangolid H (**36**) Referenz, **(C-H)** Enzymreaktion mit unterschiedlichen NADH- & FAD-Konzentrationen im Verhältnis 1:1.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 385.2349,  $t_R$ (jerangolid H) = 4.11 min,  $C_{22}H_{34}O_5Na$   $[M+Na]^+$  = 401.2298

## Cyclodextrin Additive

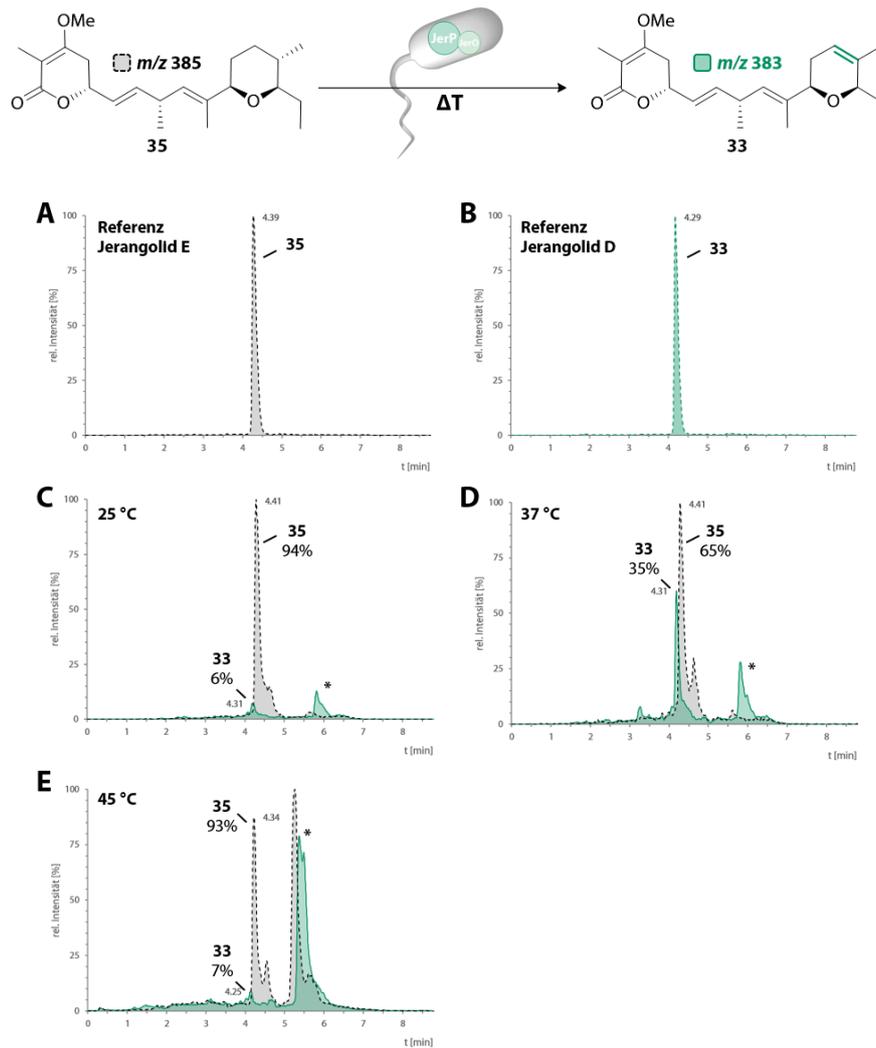
Verschiedene Arten an Cyclodextrinen wurden in äquimolaren Mengen zur Enzymreaktion gegeben um die Löslichkeit des Substrats und dessen Zellgängigkeit zu erhöhen. Zuvor optimierte Parameter wurden übernommen.



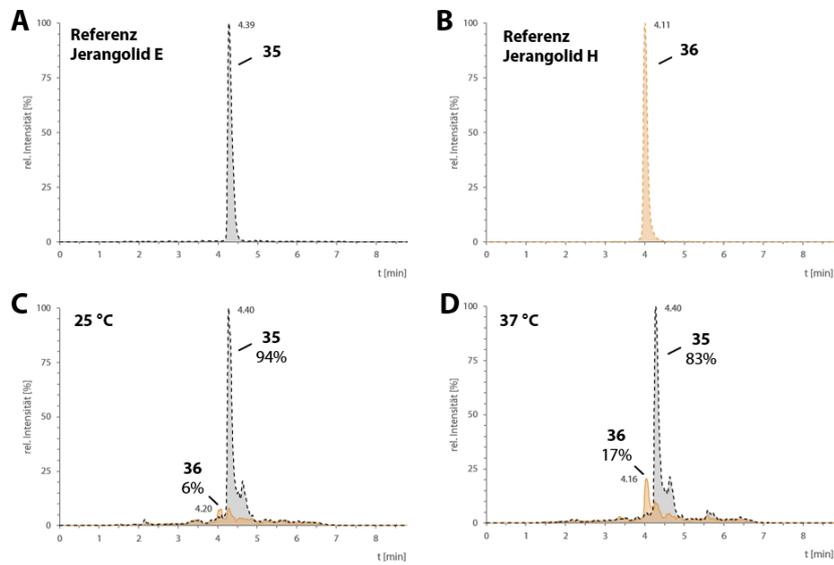
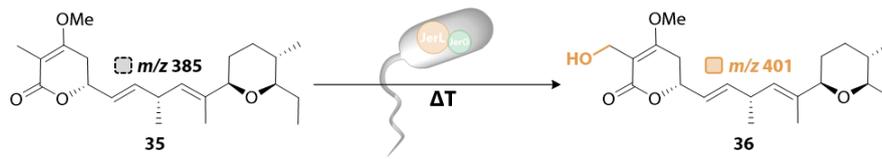
**Abbildung 9–94.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (35) mit JerP und Zugabe verschiedene Cyclodextrinarten. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; (A) Jerangolid E (35) Referenz, (B) Jerangolid D (33) Referenz, (C-E) Enzymreaktion nach Zugabe von Cyclodextrinen.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na [M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na [M+Na]^+ = 383.2193$ .

## Reaktionstemperatur

Verschiedene Temperatur im Bereich zwischen 25 °C und 45 °C wurden getestet. Es ergab sich keine Verbesserung der Enzymreaktion im Vergleich zu den bereits etablierten 30 °C.



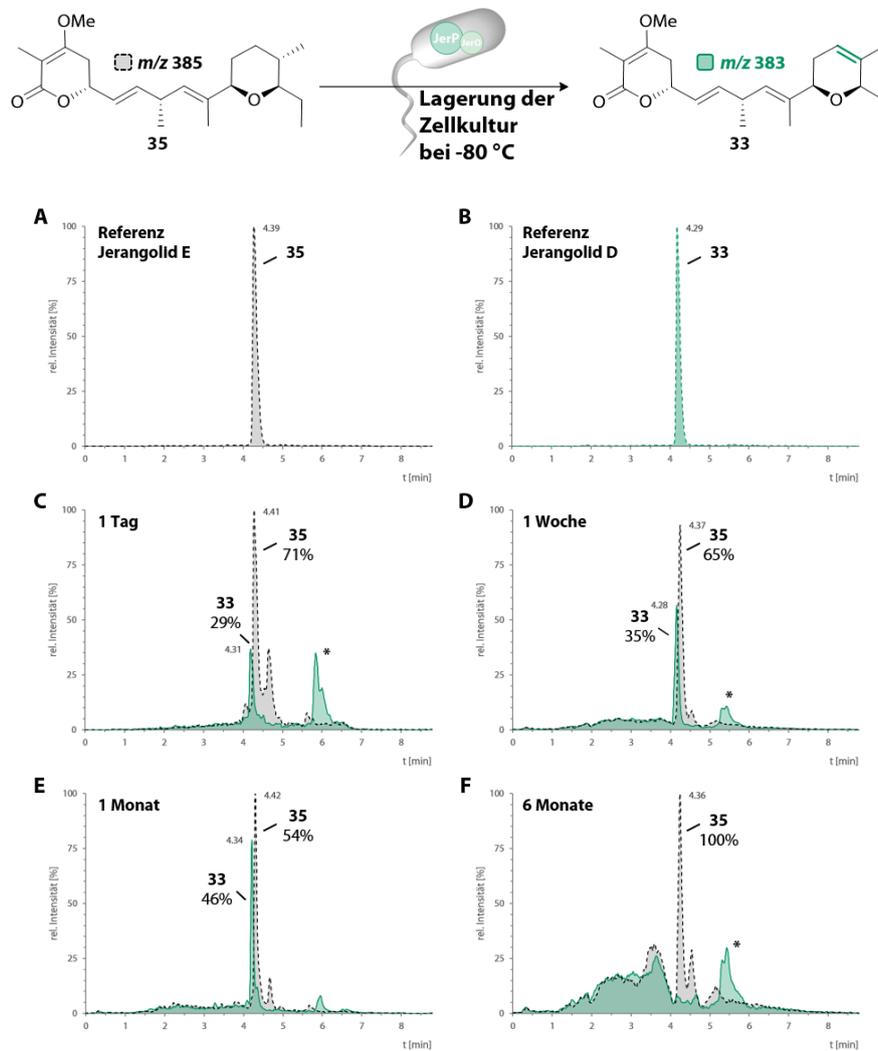
**Abbildung 9–95.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (35) mit JerP bei verschiedenen Reaktionstemperaturen. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; (A) Jerangolid E (35) Referenz, (B) Jerangolid D (33) Referenz, (C-E) Enzymreaktion bei verschiedenen Reaktionstemperaturen.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 383.2193$ .



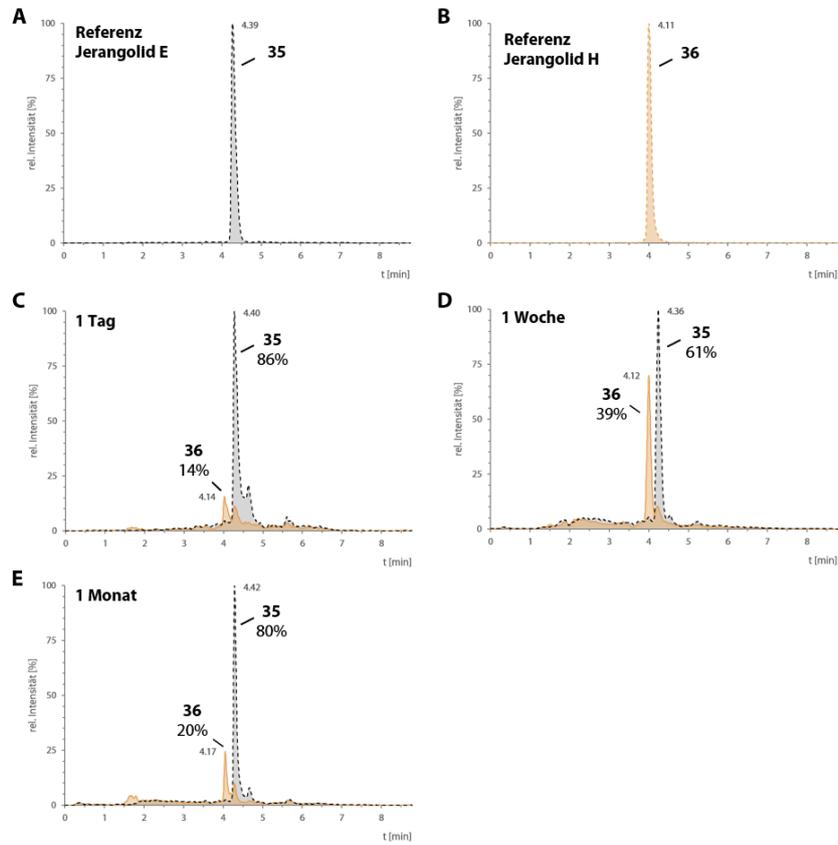
**Abbildung 9–96.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (35) mit JerL bei verschiedenen Reaktionstemperaturen. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in orange. (A) Jerangolid E (35) Referenz, (B) Jerangolid H (36) Referenz, (C) Enzymreaktion bei 25 °C, (D) Enzymreaktion bei 37 °C.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 385.2349,  $t_R$ (Jerangolid H) = 4.11 min,  $C_{22}H_{34}O_5Na$   $[M+Na]^+$  = 401.2298

## Lagerbarkeit der überexprimierten Zellkultur

Um einen praktikableren Zugang, auch im Hinblick auf *Upscaling*-Experimente, wurde die Überlebensfähigkeit der Zellen und der Erhalt der Enzymaktivität durch Lagerung der Zellkulturen direkt nach Expression bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für verschiedene Zeiträume getestet.

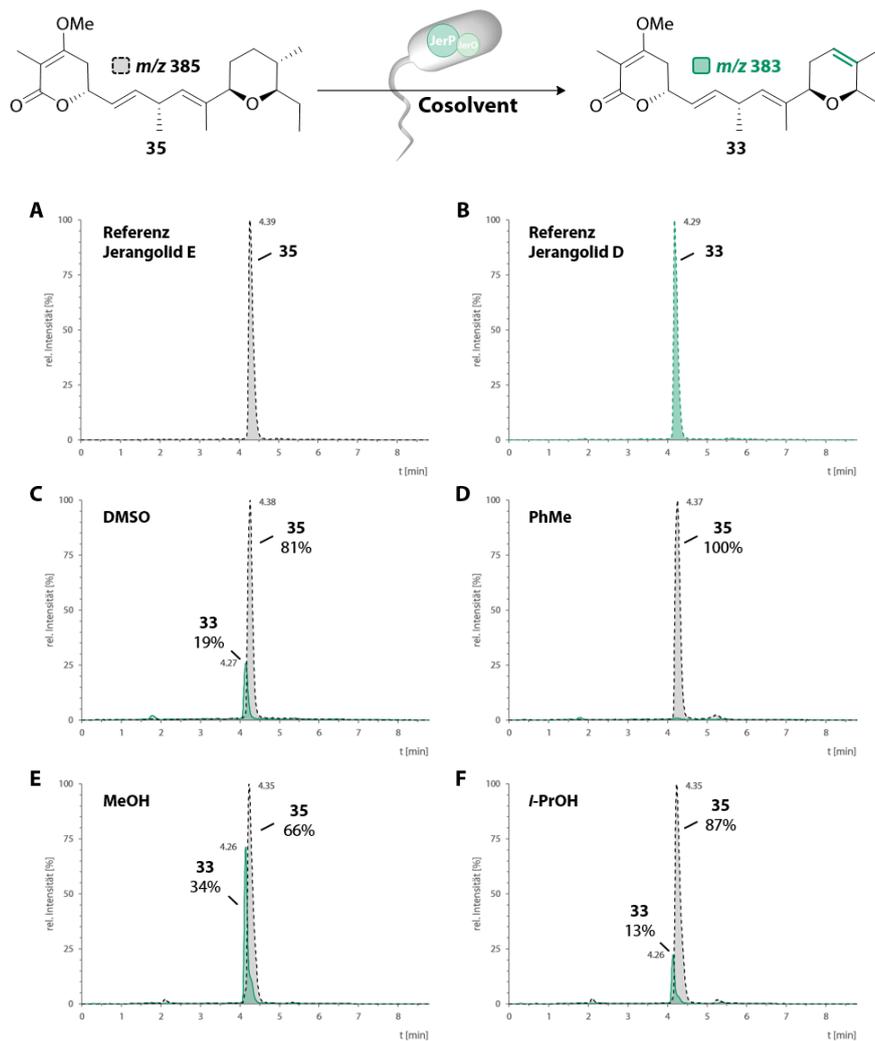


**Abbildung 9–97.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerP unter Verwendung von zuvor bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für verschiedene Zeiträume gelagerten Zellkulturen. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; (A) Jerangolid E (**35**) Referenz, (B) Jerangolid D (**33**) Referenz, (C-F) Enzymreaktion nach Lagerung der Zellkulturen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für verschiedene Zeiträume.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+ = 383.2193$ .

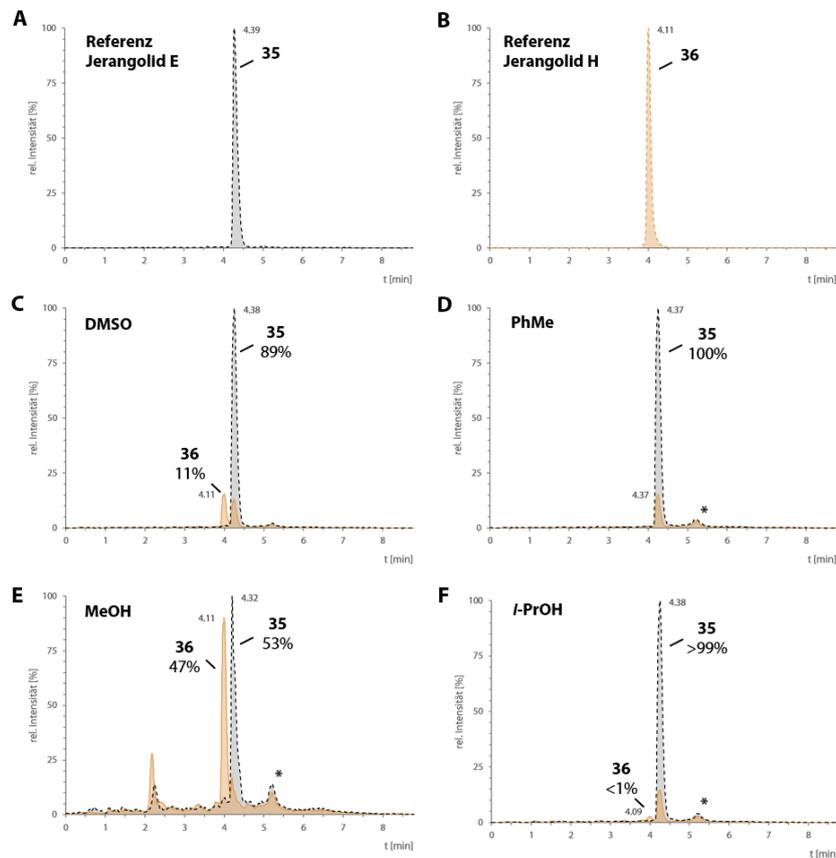
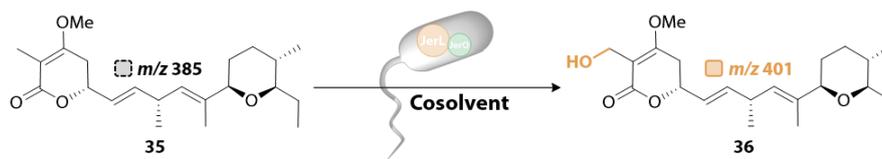


**Abbildung 9–98.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerL unter Verwendung von zuvor bei -80 °C für verschiedene Zeiträume gelagerten Zellkulturen. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in orange; **(A)** Jerangolid E (**35**) Referenz, **(B)** Jerangolid H (**36**) Referenz, **(C-E)** Enzymreaktion nach Lagerung der Zellkulturen bei -80 °C für verschiedene Zeiträume.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 385.2349,  $t_R$ (jerangolid H) = 4.11 min,  $C_{22}H_{34}O_5Na$   $[M+Na]^+$  = 401.2298

## Lösungsmitteltoleranz



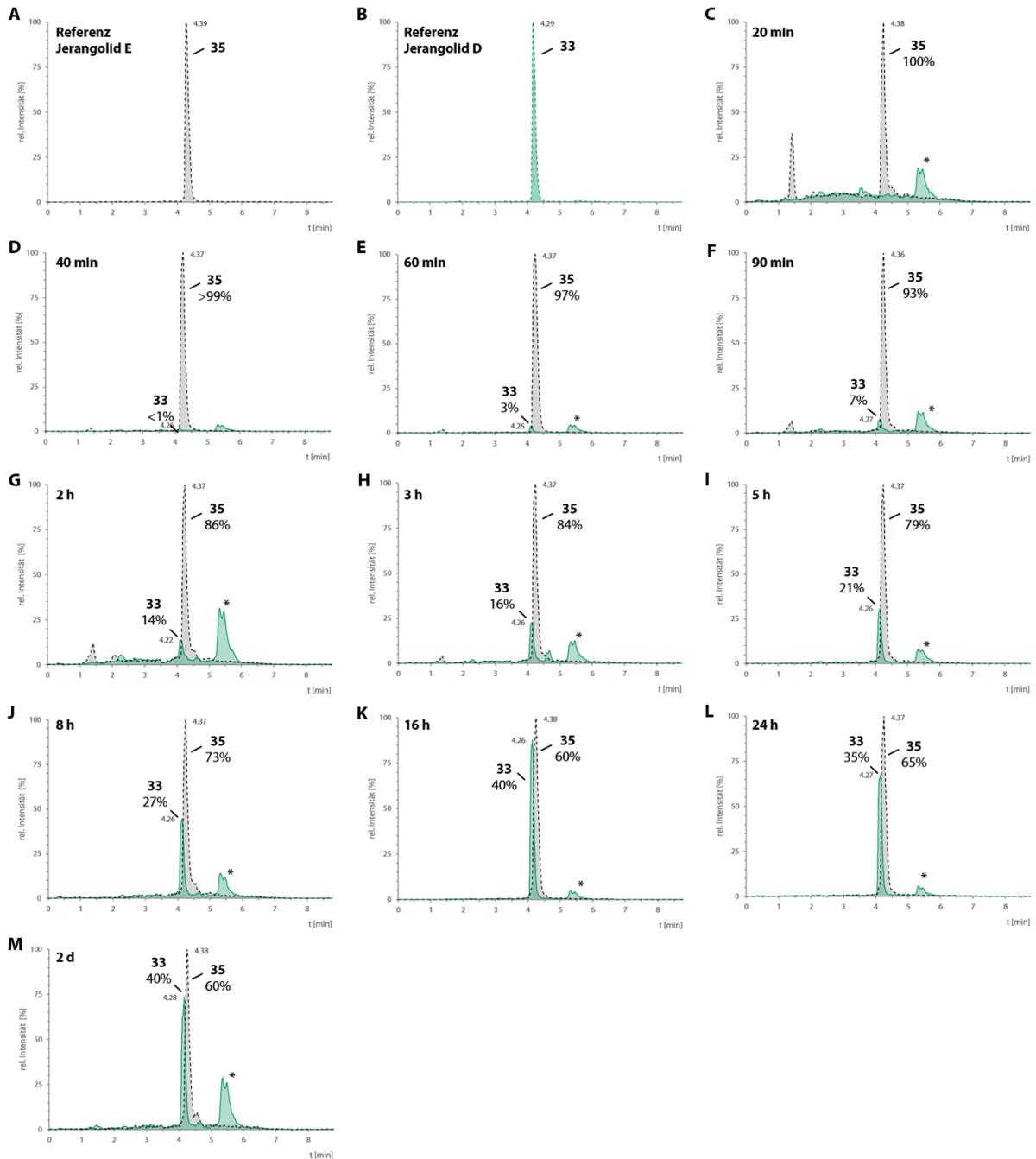
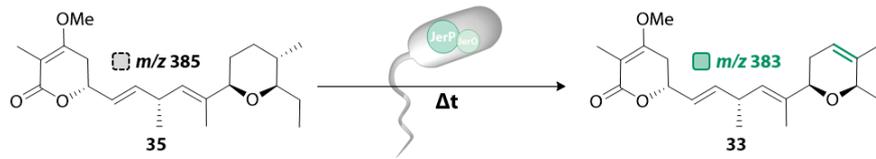
**Abbildung 9–99.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerP unter Verwendung von verschiedenen Cosolventien. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; (A) Jerangolid E (**35**) Referenz, (B) Jerangolid D (**33**) Referenz, (C–F) Enzymreaktion mit den Cosolventien DMSO, PhMe, MeOH oder *i*-PrOH.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 383.2193$ .



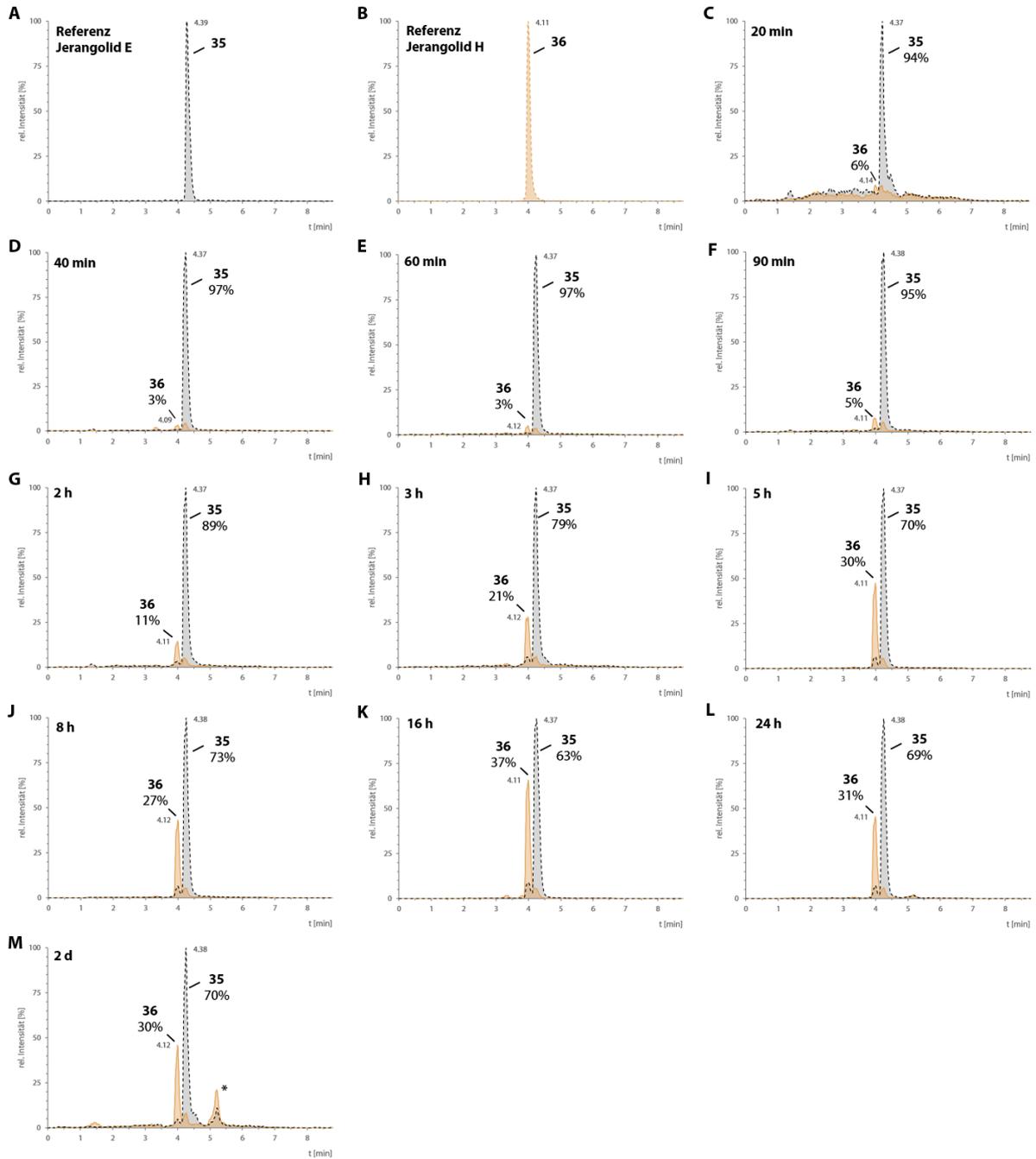
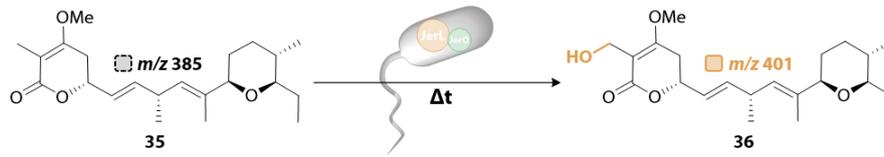
**Abbildung 9–100.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerL unter Verwendung verschiedener Cosolventien. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in orange; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; (A) Jerangolid E (**35**) Referenz, (B) Jerangolid H (**36**) Referenz, (C–E) Enzymreaktion mit den Cosolventien DMSO, PhMe, MeOH oder *i*-PrOH.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na [M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (Jerangolid H) = 4.11 min,  $C_{22}H_{34}O_5Na [M+Na]^+ = 401.2298$

## Zeitverlauf Experimente

Um den zeitlichen Verlauf der Reaktion nachvollziehen zu können und unter Umständen die Reaktionszeit zu optimieren wurden einzelne Enzymreaktionen durchgeführt. Die Experimente erfolgten unter dem optimierten Protokoll und wurden zur gegebenen Zeit durch Zugabe von EtOAc beendet. Jedes der folgenden Chromatogramme repräsentiert ein Einzelexperiment.

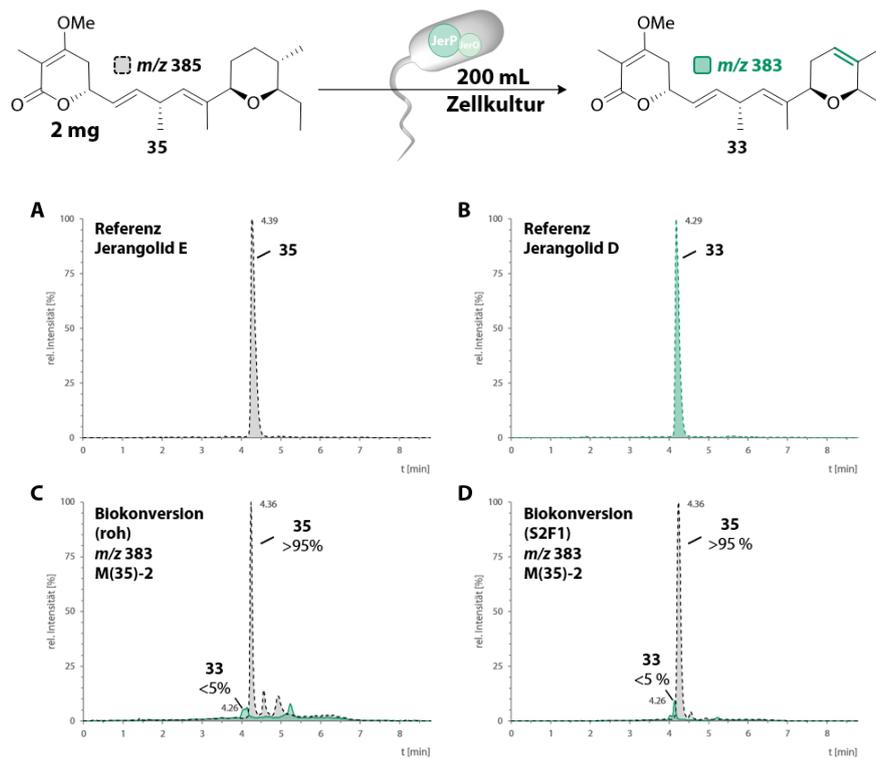


**Abbildung 9–101.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerP für verschiedene Reaktionszeiten, jedes Experiment wurde einzeln gestartet und beendet um die entsprechende Reaktionszeit zu erhalten. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit *m/z* 383,  $t_R = 5.57$ ; (A) Jerangolid E (**35**) Referenz, (B) Jerangolid D (**33**) Referenz, (C–M) Enzymreaktion für verschiedene Reaktionszeiten.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 383.2193$ .



**Abbildung 9–102.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerL für verschiedene Reaktionszeiten, jedes Experiment wurde einzeln gestartet und beendet um die entsprechende Reaktionszeit zu erhalten. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in orange; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; (A) Jerangolid E (**35**) Referenz, (B) Jerangolid H (**36**) Referenz, (C–M) Enzymreaktion für verschiedene Reaktionszeiten.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na [M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (Jerangolid H) = 4.11 min,  $C_{22}H_{34}O_5Na [M+Na]^+ = 401.2298$

## Upscaling-Experiment

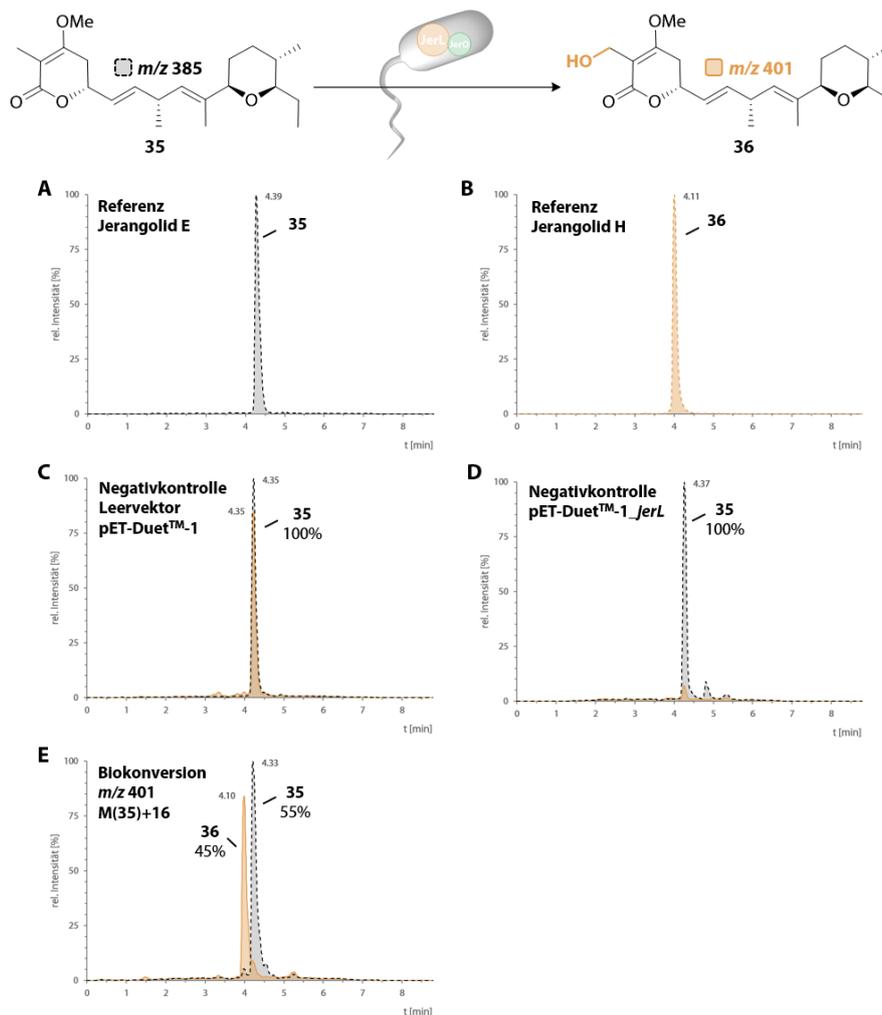


**Abbildung 9–103.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von 2 mg Jerangolid E (35) mit JerP in 200 mL Zellkultur. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün. (A) Jerangolid E (35) Referenz, (B) Jerangolid D (33) Referenz, (C) Rohergebnis der Enzymreaktion. (D) Enzymreaktion nach zweimaliger säulenchromatographischer Reinigung.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 385.2349,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 383.2193.

## Substrattoleranz und Aufklärung des Biosyntheseweges

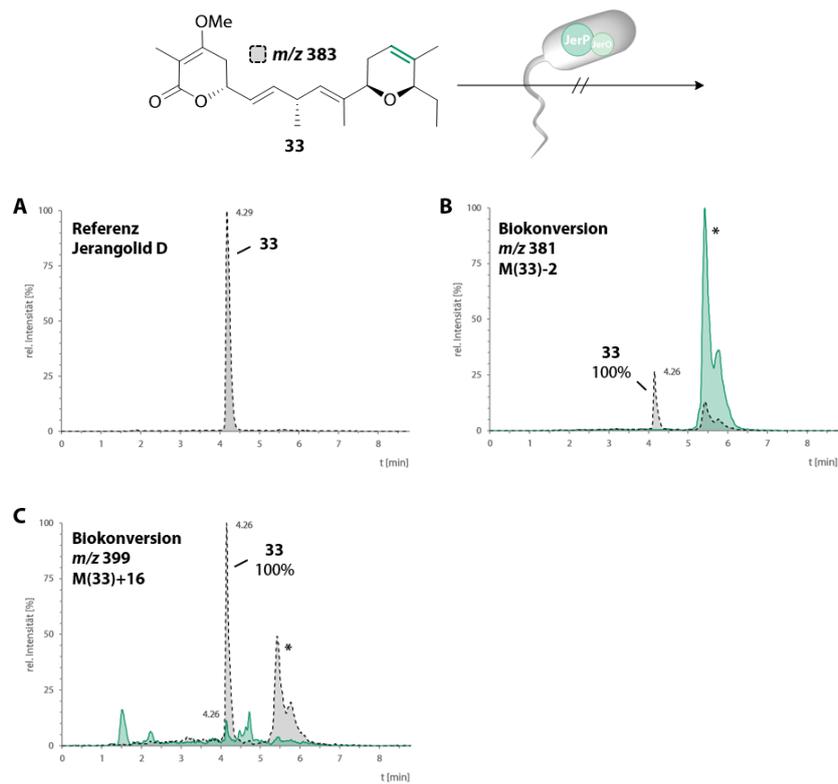
Die folgenden Experimente wurden unter dem entwickelten Standardprotokoll mit variierenden Substraten durchgeführt. Falls Anpassungen nötig waren, sind diese im jeweiligen Abschnitt erläutert.

### Jerangolid E (**35**)

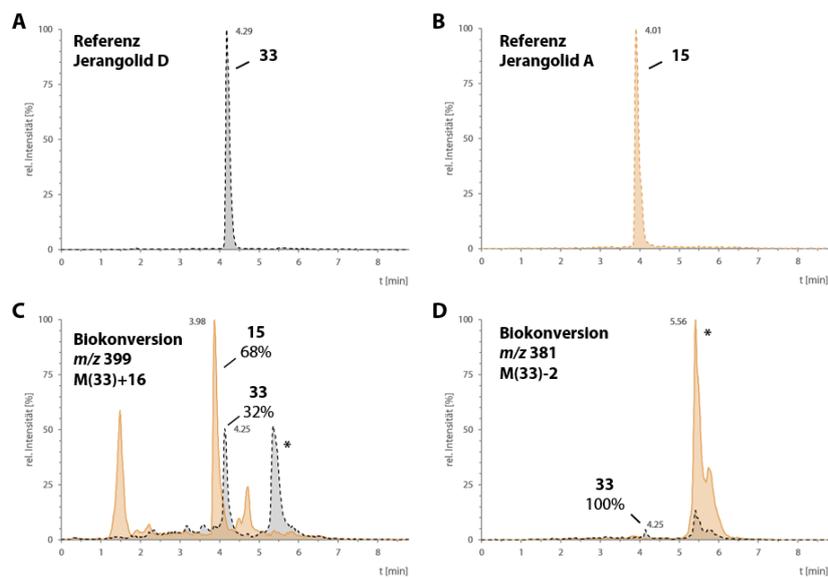
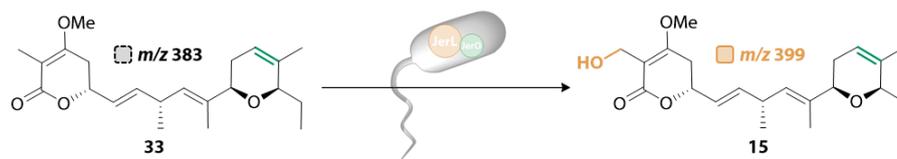


**Abbildung 9–104.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerL unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in orange; (A) Jerangolid E (**35**) Referenz, (B) Jerangolid H (**36**) Referenz, (C) Negativkontrolle: Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit in *E. coli* C41-CmpX13 exprimierten leeren pET-Duet™-1 Vektor, (D) Negativkontrolle: Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit in *E. coli* C41-CmpX13 exprimierten pET-Duet™-1\_jerL, (E) Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit in *E. coli* C41-CmpX13 exprimierten pET-Duet™-1\_jerL\_jerO.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 385.2349,  $t_R$ (Jerangolid H) = 4.11 min,  $C_{22}H_{34}O_5Na$   $[M+Na]^+$  = 401.2298.

## Jerangolid D (33)



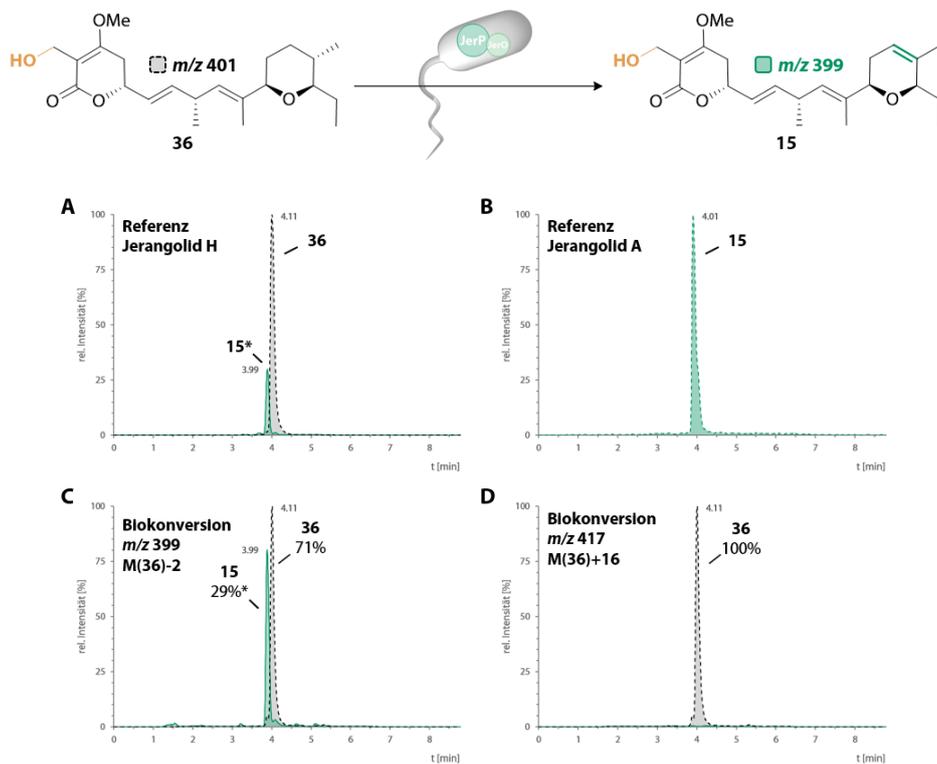
**Abbildung 9–105.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid D (**33**) mit JerP unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; **(A)** Jerangolid D (**33**) Referenz, **(B)** Enzymreaktion mit der Massspur des monodesaturierten Produkts, **(C)** Enzymreaktion mit Massspur des monohydroxylierten Produkts.  $t_R(\text{Jerangolid D}) = 4.29$  min,  $C_{22}H_{32}O_4Na [M+Na]^+ = 383.2193$ .



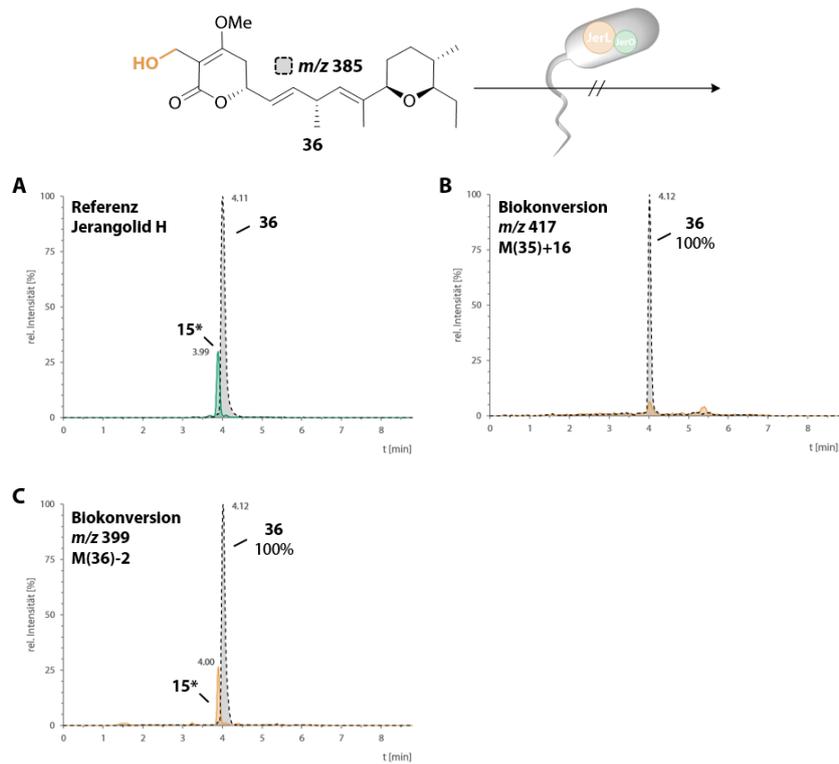
**Abbildung 9–106.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid D (**33**) mit JerL unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in orange; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; **(A)** Jerangolid D (**33**) Referenz, **(B)** Jerangolid A (**15**) Referenz, **(C)** Enzymreaktion mit der Massespur des monohydroxylierten Produkts, **(D)** Enzymreaktion mit Massespur des monodesaturierten Produkts.  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 383.2193,  $t_R$ (Jerangolid A) = 4.01 min,  $C_{22}H_{32}O_5Na$   $[M+Na]^+$  = 399.2142.

## Jerangolid H (36)

Für die Enzymreaktion wurde die isolierte Jerangolid H (**36**) Referenz verwendet. Diese enthält eine 10%-ige Kontamination an mit isolierten Jerangolid A (**15**) (hervorgehoben durch \* in den folgenden Chromatogrammen). Alle Umsätze, die mit \* markiert wurden, sind bereits um diesen Wert bereinigt.

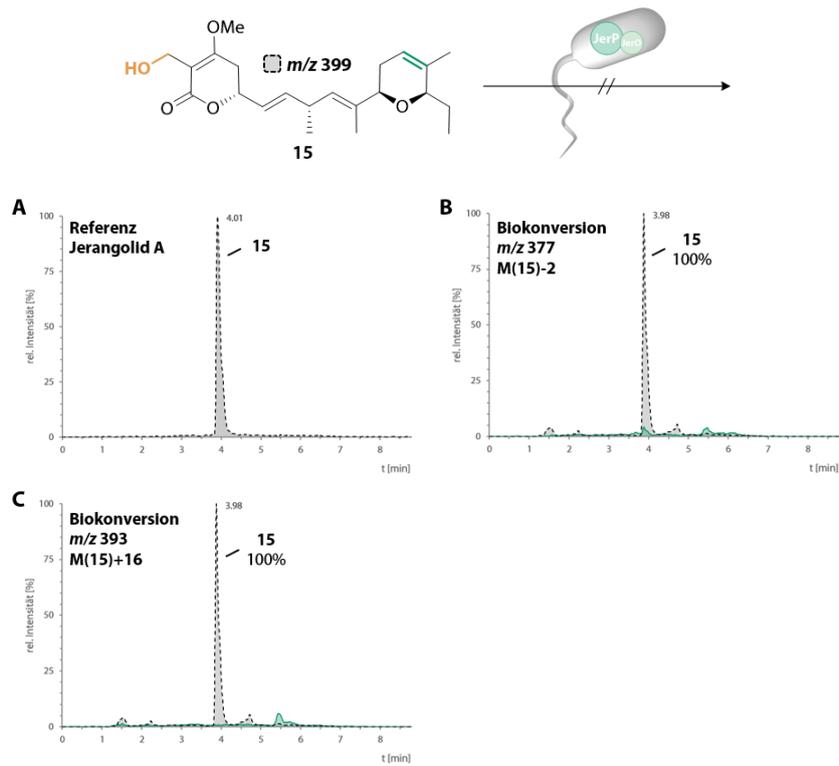


**Abbildung 9–107.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid H (**36**) mit JerP unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet co-isoliertes Jerangolid A (**15**); (**A**) Jerangolid H (**36**) Referenz, (**B**) Jerangolid A (**15**) Referenz, (**C**) Enzymreaktion mit der Massespur des monodesaturierten Produkts, (**D**) Enzymreaktion mit Massespur des monohydroxylierten Produkts.  $t_R$ (Jerangolid H) = 4.11 min,  $C_{22}H_{34}O_5Na[M+Na]^+ = 401.2298$ ,  $t_R$ (Jerangolid A) = 4.01 min,  $C_{22}H_{32}O_5Na[M+Na]^+ = 399.2142$ .

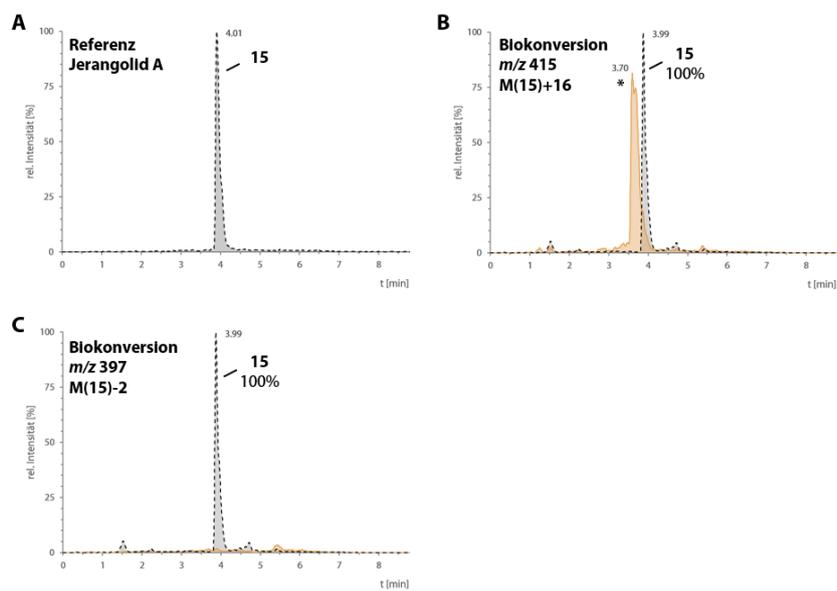
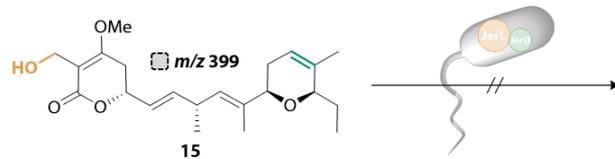


**Abbildung 9–108.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid H (**36**) mit JerL unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in orange; \* kennzeichnet co-isoliertes Jerangolid A (**15**); (**A**) Jerangolid H (**36**) Referenz, (**B**) Enzymreaktion mit der Massespur des monohydroxylierten Produkts, (**C**) Enzymreaktion mit Massespur des monodesaturierten Produkts.  $t_R$ (Jerangolid H) = 4.11 min,  $C_{22}H_{34}O_5Na [M+Na]^+$  = 401.2298,  $t_R$ (Jerangolid A) = 4.01 min,  $C_{22}H_{32}O_5Na [M+Na]^+$  = 399.2142.

## Jerangolid A (15)

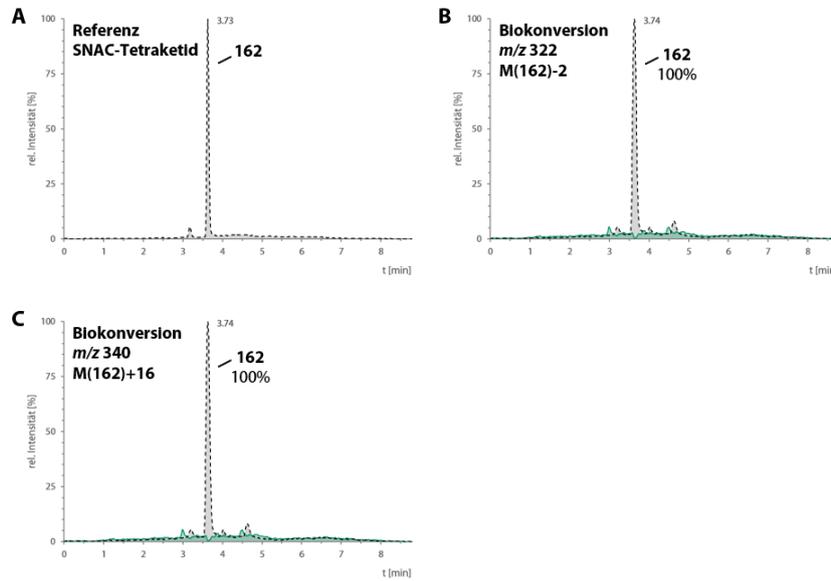
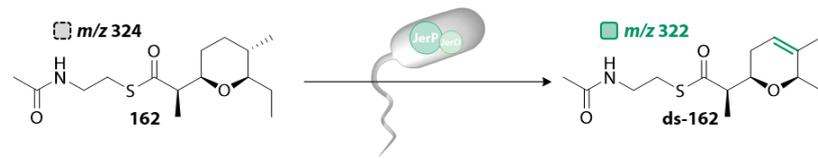


**Abbildung 9–109.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid A (**15**) mit JerP unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; **(A)** Jerangolid A (**15**) Referenz, **(B)** Enzymreaktion mit der Massespur des monodesaturierten Produkts, **(C)** Enzymreaktion mit Massespur des monohydroxylierten Produkts.  $t_R(\text{Jerangolid A}) = 4.01 \text{ min}$ ,  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 399.2142$ .

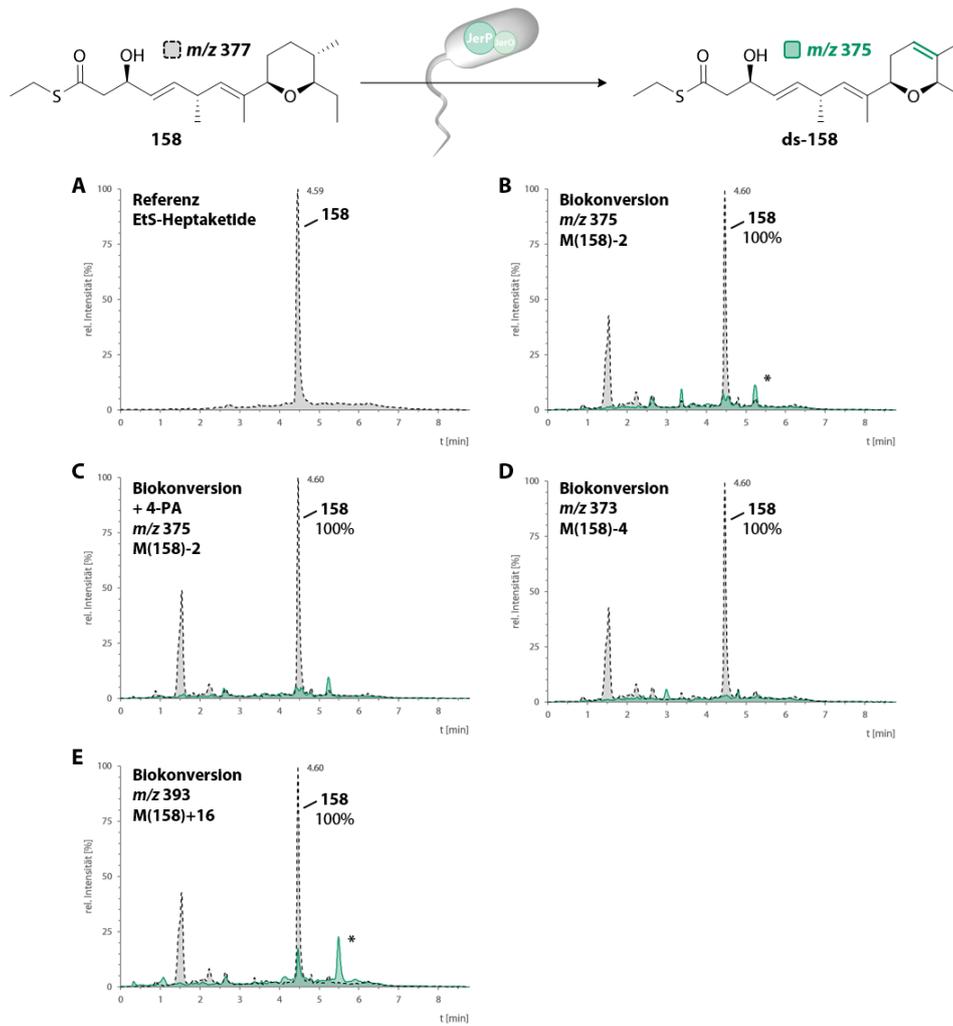


**Abbildung 9–110.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid A (**15**) mit JerL unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in orange; \* kennzeichnet Kontaminante *m/z* 415/432/437/453,  $t_R = 3.69$ ; **(A)** Jerangolid A (**15**) Referenz, **(B)** Enzymreaktion mit der Massespur des monohydroxylierten Produkts, **(C)** Enzymreaktion mit Massespur des monodesaturierten Produkts.  $t_R(\text{Jerangolid A}) = 4.01 \text{ min}$ ,  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{Na}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 399.2142$ .

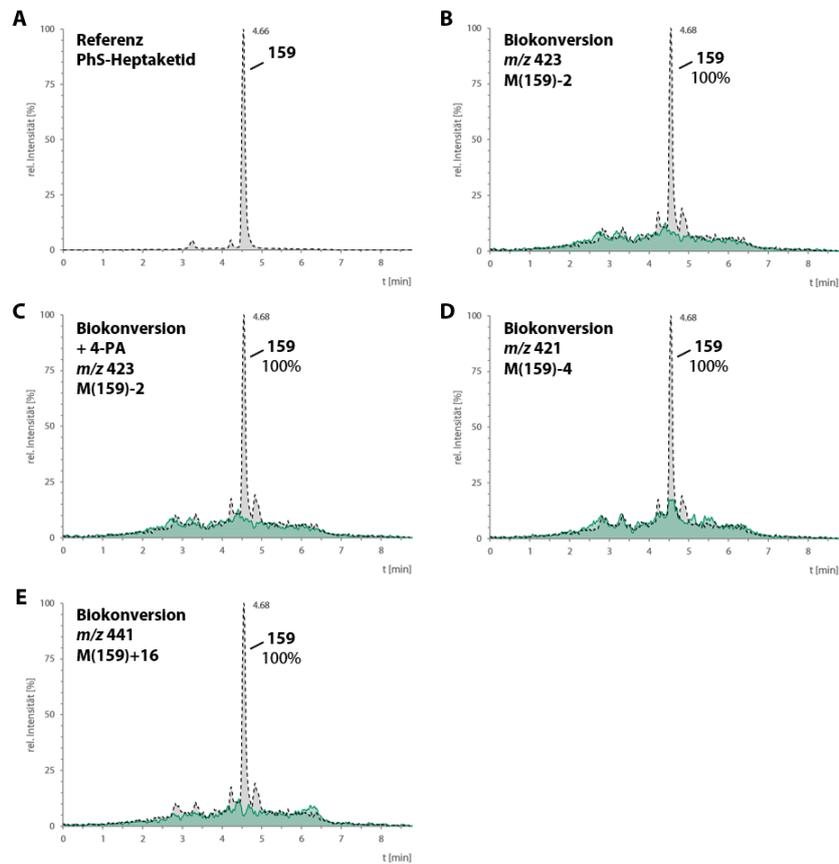
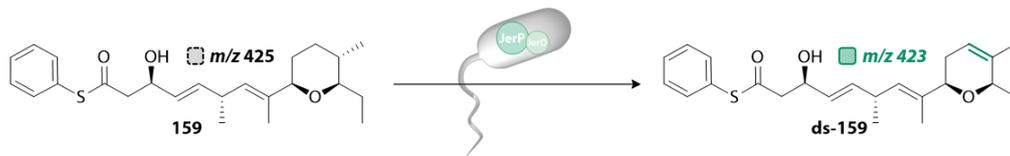
## Biosynthetische Vorläufer Surrogate – Heptaketide **158-160** und Tetraketid **162**



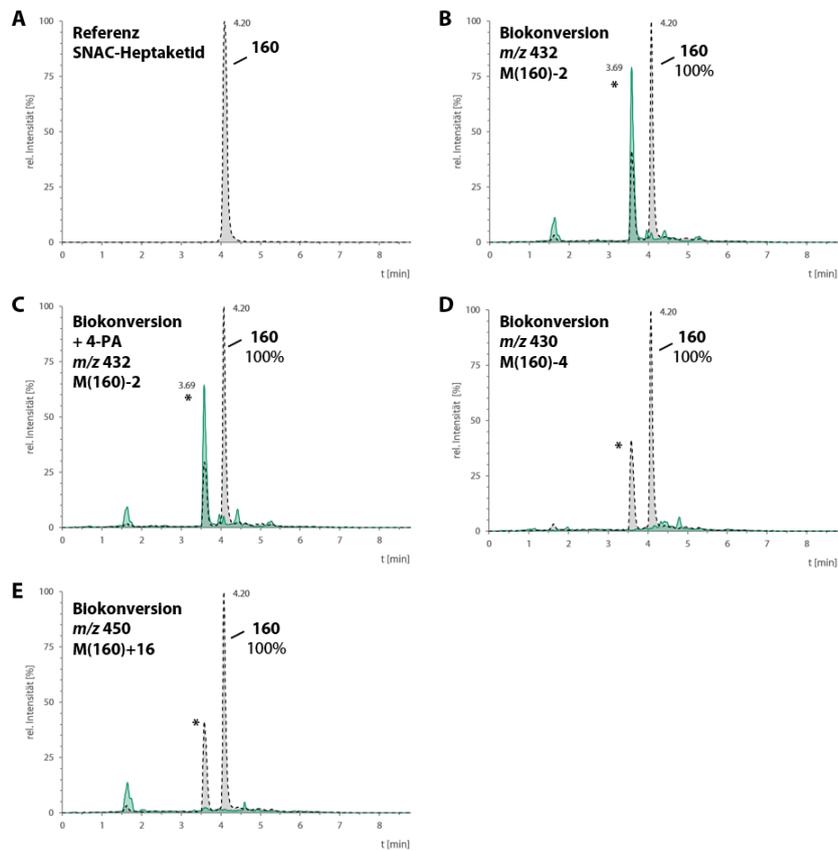
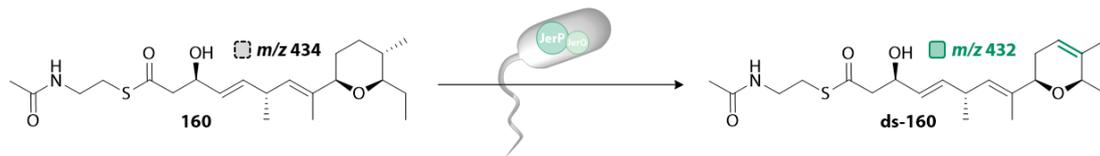
**Abbildung 9–111.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion des Tetraketids **162** mit JerP unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; **(A)** Tetraketid **162** Referenz, **(B)** Enzymreaktion mit der Massespur des monodesaturierten Produkts, **(C)** Enzymreaktion mit Massespur des monohydroxylierten Produkts.  $t_R$ (Tetraketid) = 3.73 min,  $C_{15}H_{27}NO_5SNa$   $[M+Na]^+$  = 324.1604.



**Abbildung 9–112.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion des EtS-Heptaketid **158** mit JerP unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante *m/z* 383,  $t_R = 5.57$  min; **(A)** EtS-Heptaketid **158** Referenz, **(B)** Enzymreaktion mit der Massespur des monodesaturierten Produkts, **(C)** Enzymreaktion mit der Massespur des monodesaturierten Produkts unter Zugabe von 4-PA ( $\beta$ -Oxidationsinhibitor), **(D)** Enzymreaktion mit Massespur des didesaturierten Produkts, **(E)** Enzymreaktion mit Massespur des monohydroxylierten Produkts.  $t_R(\text{EtS-Heptaketid}) = 4.59$  min,  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{SNa}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 377.2121$ .

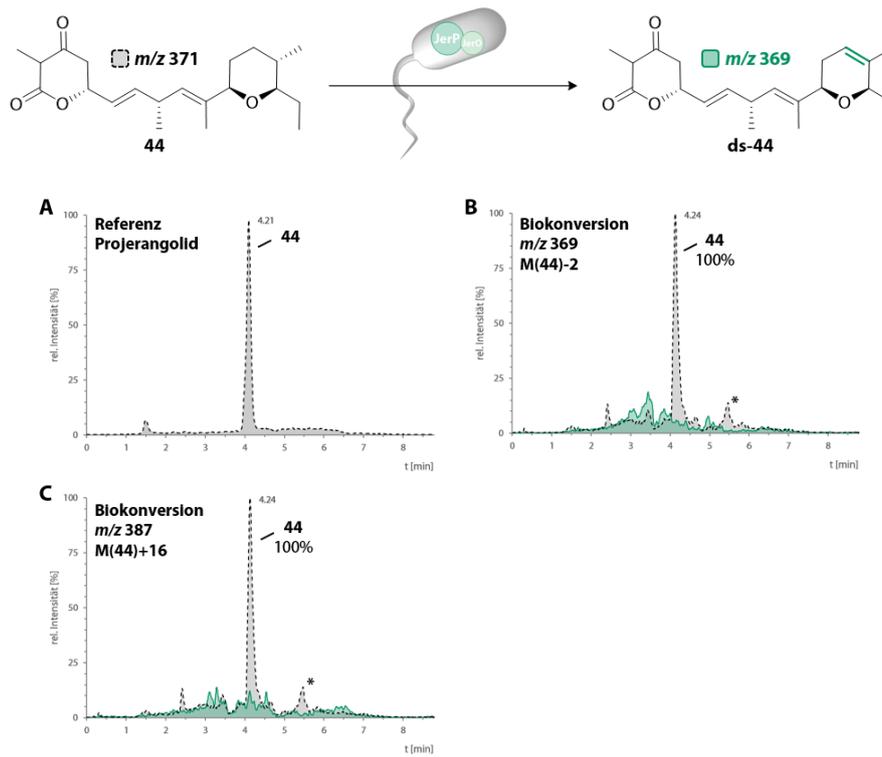


**Abbildung 9–113.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion des PhS-Heptaketid **159** mit JerP unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; **(A)** PhS-Heptaketid **159** Referenz, **(B)** Enzymreaktion mit der Massespur des monodesaturierten Produkts, **(C)** Enzymreaktion mit der Massespur des monodesaturierten Produkts unter Zugabe von 4-PA ( $\beta$ -Oxidationsinhibitor), **(D)** Enzymreaktion mit Massespur des didesaturierten Produkts, **(E)** Enzymreaktion mit Massespur des monohydroxylierten Produkts.  $t_r(\text{PhS-Heptaketid}) = 4.66 \text{ min}$ ,  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_3\text{SNa}[\text{M}+\text{Na}]^+ = 425.2121$ .

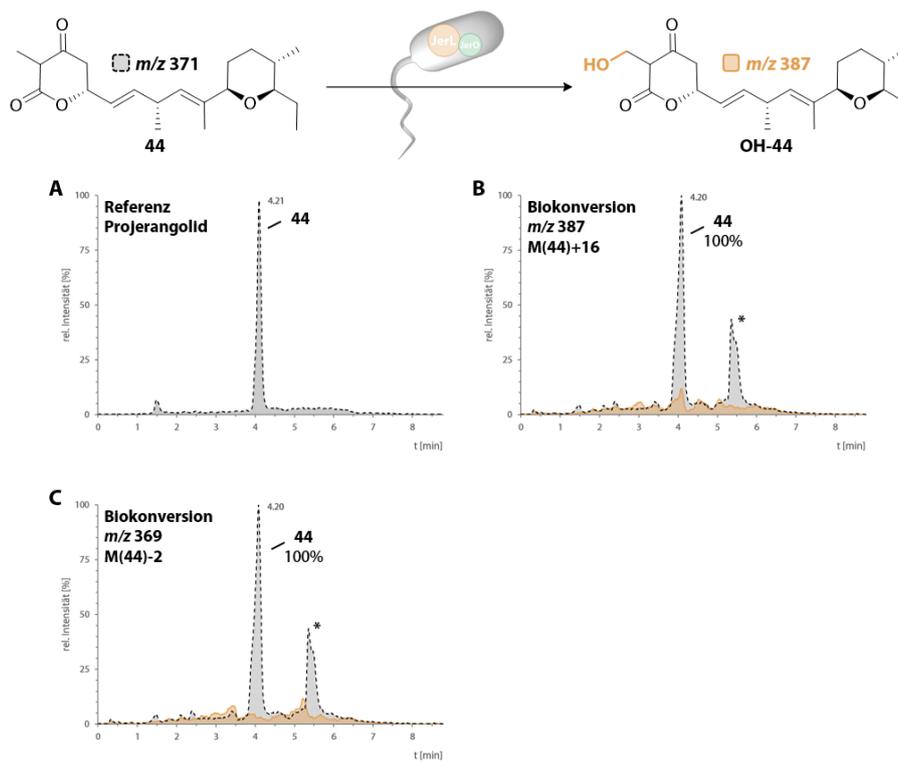


**Abbildung 9–114.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion des SNAC-Heptaketid **160** mit JerP unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante  $m/z$  415/432/437/453,  $t_R = 3.69$ ; (A) SNAC-Heptaketid **160** Referenz, (B) Enzymreaktion mit der Massespur des monodesaturierten Produkts, (C) Enzymreaktion mit der Massespur des monodesaturierten Produkts unter Zugabe von 4-PA ( $\beta$ -Oxidationsinhibitor), (D) Enzymreaktion mit Massespur des didesaturierten Produkts, (E) Enzymreaktion mit Massespur des monohydroxylierten Produkts.  $t_R(\text{SNAC-Heptaketid}) = 4.59$  min,  $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{Sn} [\text{M}+\text{Na}]^+ = 434.2336$ .

## Projerangolid (44)

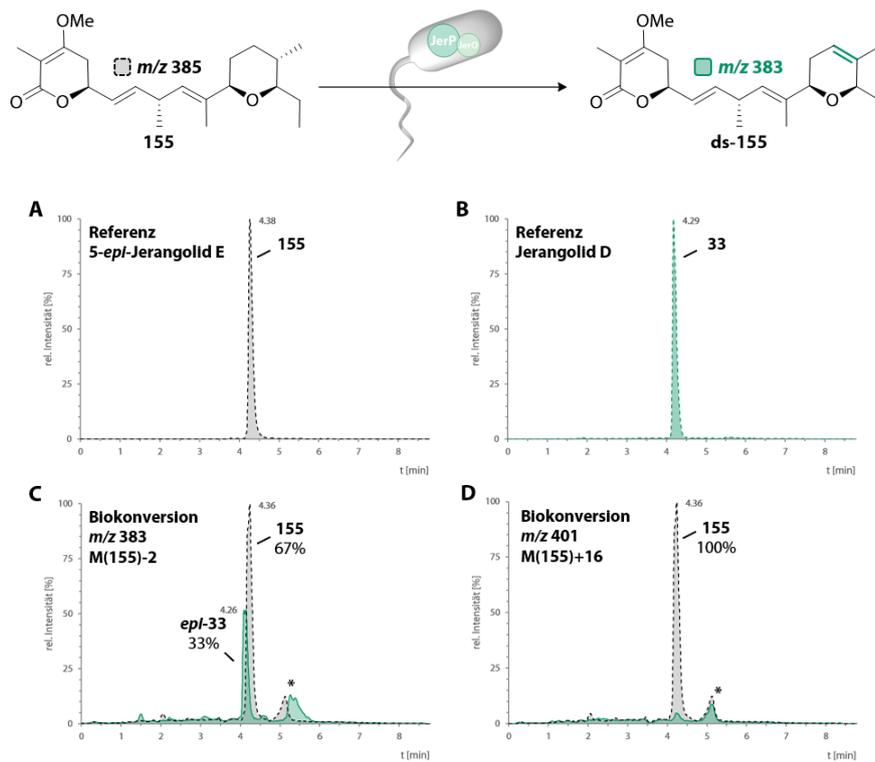


**Abbildung 9–115.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Projerangolid (44) mit JerP unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; (A) Projerangolid (44) Referenz, (B) Enzymreaktion mit der Massespur des monodesaturierten Produkts, (C) Enzymreaktion mit Massespur des monohydroxylierten Produkts.  $t_R$ (Projerangolid) = 4.21 min,  $C_{21}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 371.2193.

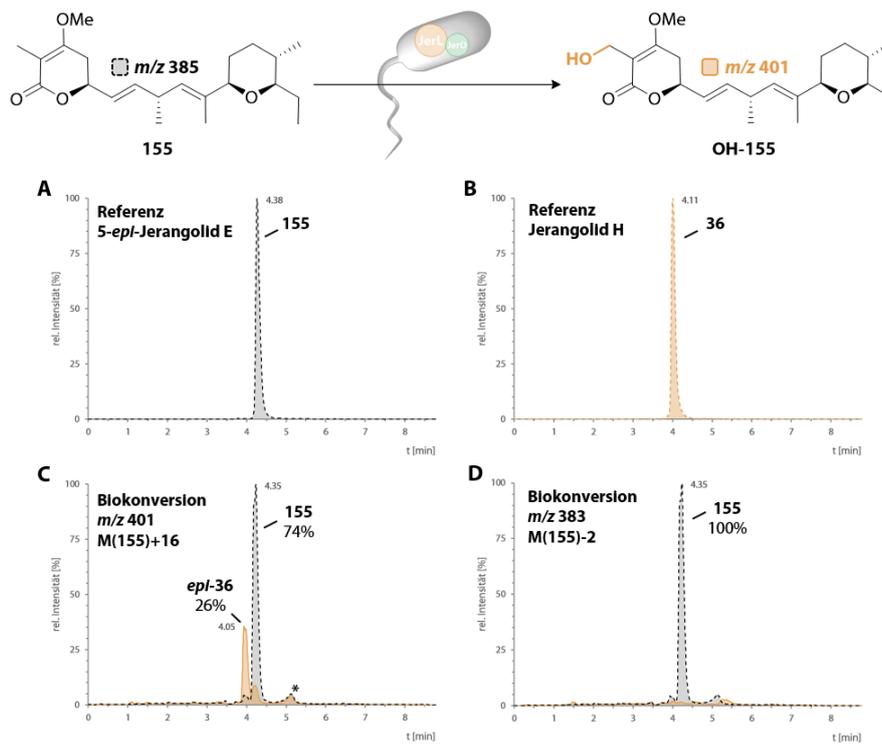


**Abbildung 9–116.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Projerangolid (**44**) mit JerL unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in orange; \* kennzeichnet Kontaminante *m/z* 383,  $t_R = 5.57$ ; **(A)** Projerangolid (**44**) Referenz, **(B)** Enzymreaktion mit der Massespur des monohydroxylierten Produkts, **(C)** Enzymreaktion mit Massespur des monodesaturierten Produkts.  $t_R(\text{Projerangolid}) = 4.21$  min,  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+ = 371.2193$ .

## 5-*epi*-Jerangolid E (155)

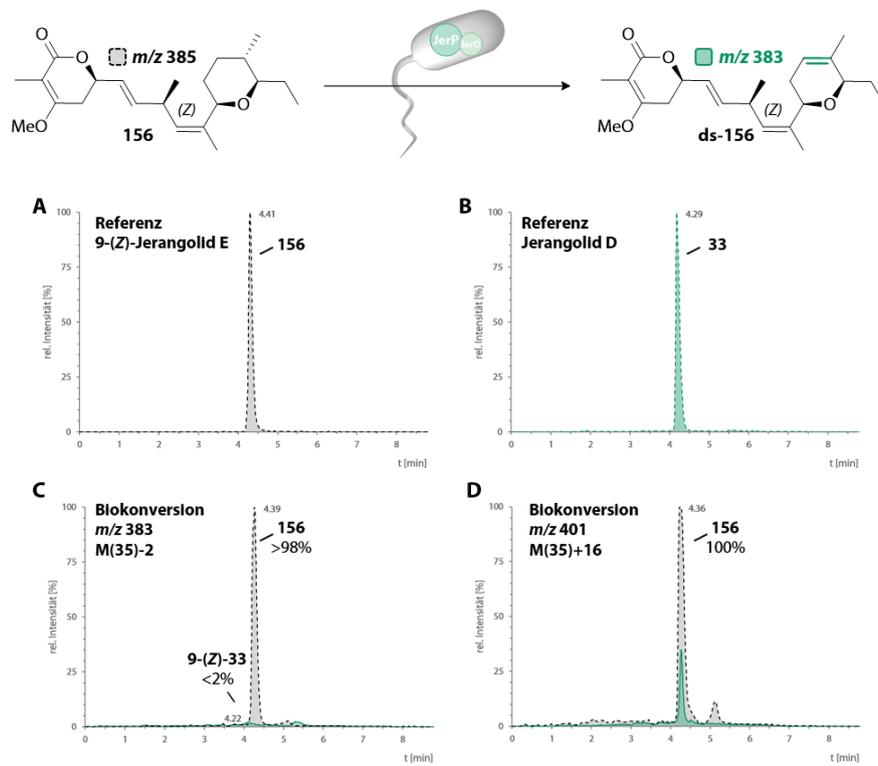


**Abbildung 9–117.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von 5-*epi*-Jerangolid E (155) mit JerP unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; (A) 5-*epi*-Jerangolid E (155) Referenz, (B) Jerangolid D (33) Referenz, (C) Enzymreaktion mit der Massespur des monodesaturierten Produkts, (D) Enzymreaktion mit Massespur des monohydroxylierten Produkts.  $t_R(5\text{-}epi\text{-Jerangolid E}) = 4.39$  min,  $C_{22}H_{34}O_4Na [M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R(\text{Jerangolid D}) = 4.29$  min,  $C_{22}H_{32}O_4Na [M+Na]^+ = 383.2193$ .

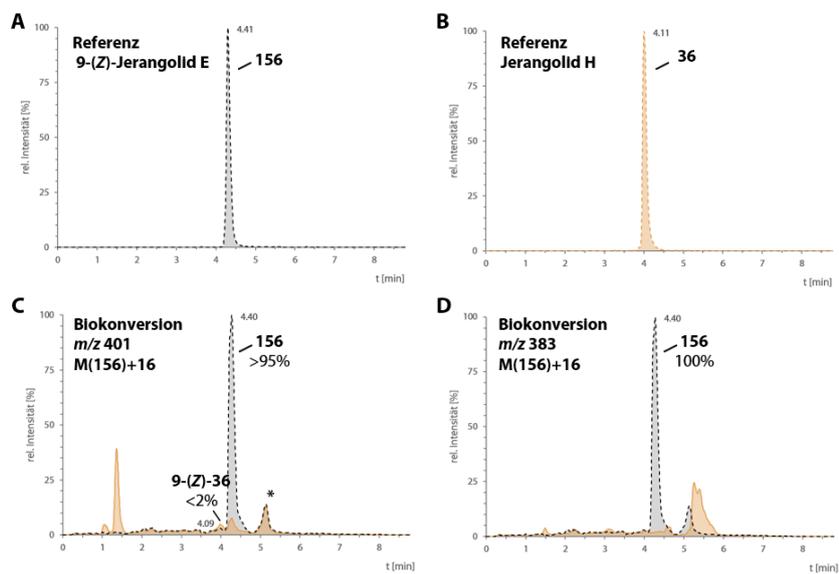
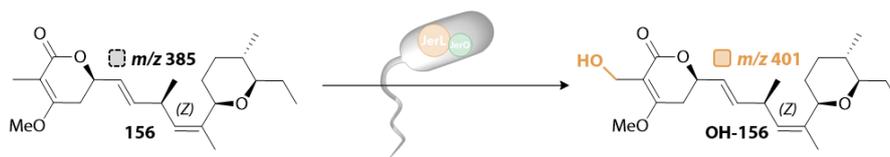


**Abbildung 9–118.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von 5-*epi*-Jerangolid E (**155**) mit JerL unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in orange; (A) 5-*epi*-Jerangolid E (**155**) Referenz, (B) Jerangolid H (**36**) Referenz, (C) Enzymreaktion mit der Massespur des monohydroxylierten Produkts, (D) Enzymreaktion mit Massespur des monodesaturierten Produkts.  $t_R(5\text{-}epi\text{-Jerangolid E}) = 4.39 \text{ min}$ ,  $C_{22}H_{34}O_4Na [M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R(\text{jerangolid H}) = 4.11 \text{ min}$ ,  $C_{22}H_{34}O_5Na [M+Na]^+ = 401.2298$ .

## 9-(Z)-jerangolid E (156)

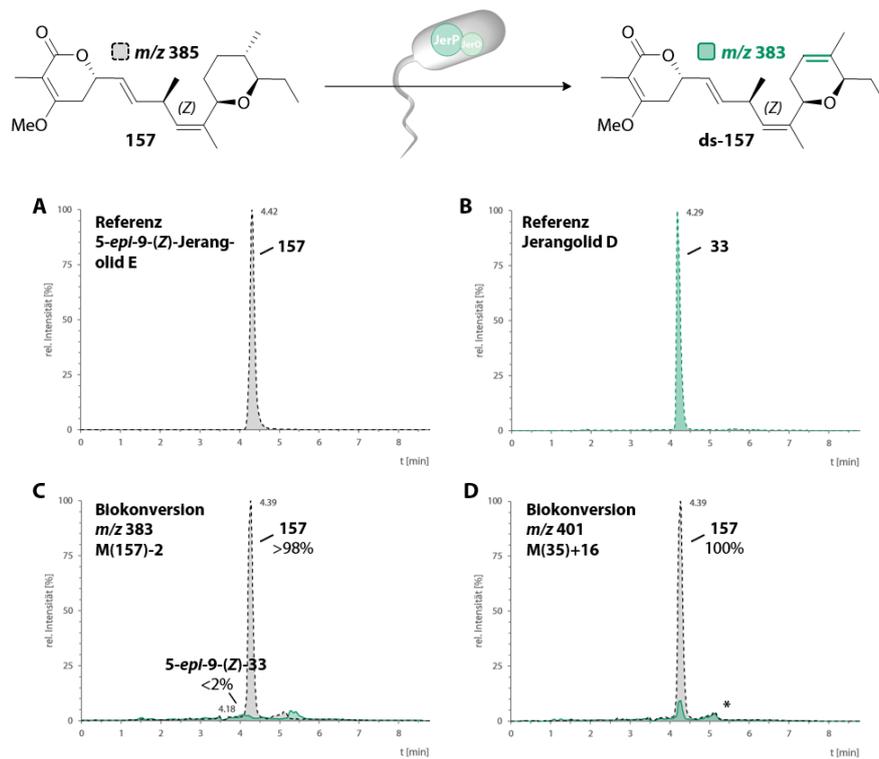


**Abbildung 9–119.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von 9-(Z)-Jerangolid E (156) mit JerP unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante *m/z* 383,  $t_R = 5.57$ ; (A) 9-(Z)-Jerangolid E (156) Referenz, (B) Jerangolid D (33) Referenz, (C) Enzymreaktion mit der Massespur des monodesaturierten Produkts, (D) Enzymreaktion mit Massespur des monohydroxylierten Produkts.  $t_R$ (9-(Z)-Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 385.2349,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 383.2193.

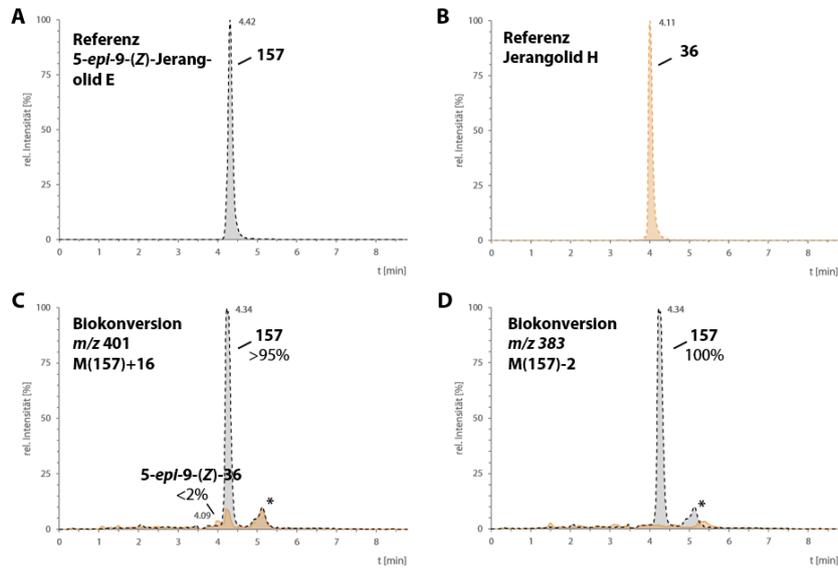
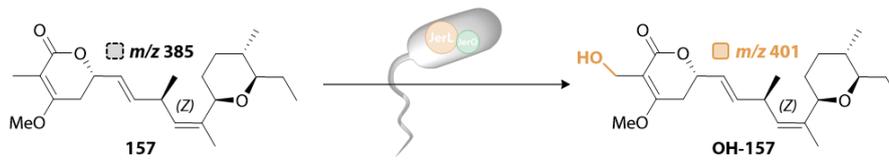


**Abbildung 9–120.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von 9-(*Z*)-Jerangolid E (**156**) mit JerL unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in orange; \* kennzeichnet Kontaminante mit *m/z* 383,  $t_R = 5.57$ ; (A) 9-(*Z*)-Jerangolid E (**156**) Referenz, (B) Jerangolid H (**36**) Referenz, (C) Enzymreaktion mit der Massespur des monohydroxylierten Produkts, (D) Enzymreaktion mit Massespur des monodesaturierten Produkts.  $t_R(9\text{-}(Z)\text{-Jerangolid E}) = 4.39$  min,  $C_{22}H_{34}O_4Na [M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R(\text{jerangolid H}) = 4.11$  min,  $C_{22}H_{34}O_5Na [M+Na]^+ = 401.2298$ .

## 5-*epi*-9-(*Z*)-jerangolid E (157)



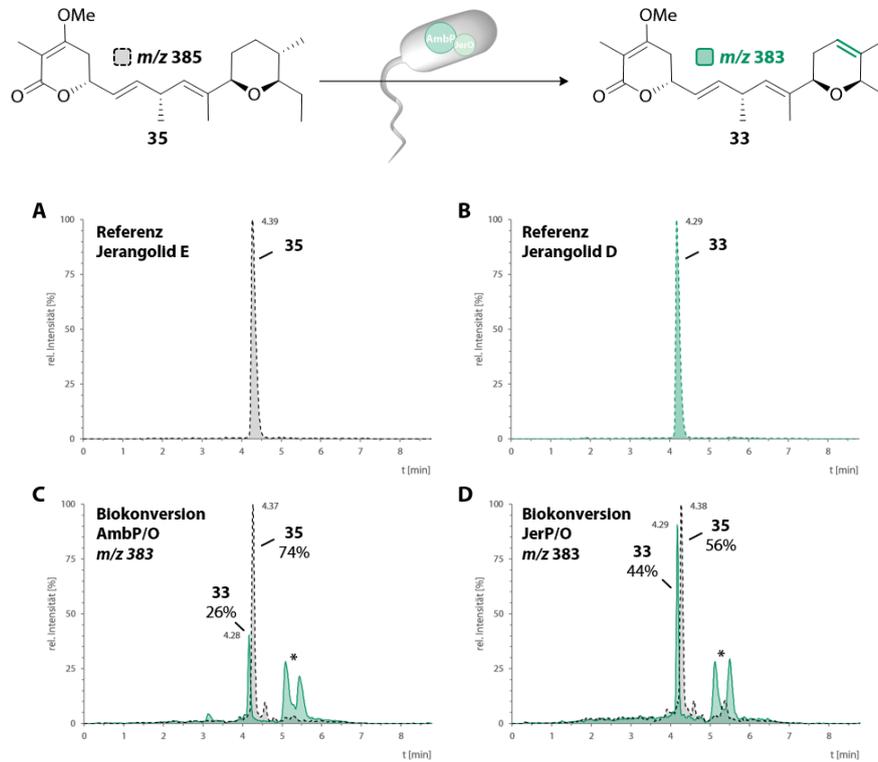
**Abbildung 9–121.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von 5-*epi*-9-(*Z*)-Jerangolid E (157) mit JerP unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; (A) 5-*epi*-9-(*Z*)-Jerangolid E (157) Referenz, (B) Jerangolid D (33) Referenz, (C) Enzymreaktion mit der Massespur des monodesaturierten Produkts, (D) Enzymreaktion mit Massespur des monohydroxylierten Produkts.  $t_R(5\text{-}epi\text{-}9\text{-}(Z)\text{-Jerangolid E}) = 4.39$  min,  $C_{22}H_{34}O_4Na [M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R(\text{Jerangolid D}) = 4.29$  min,  $C_{22}H_{32}O_4Na [M+Na]^+ = 383.2193$ .



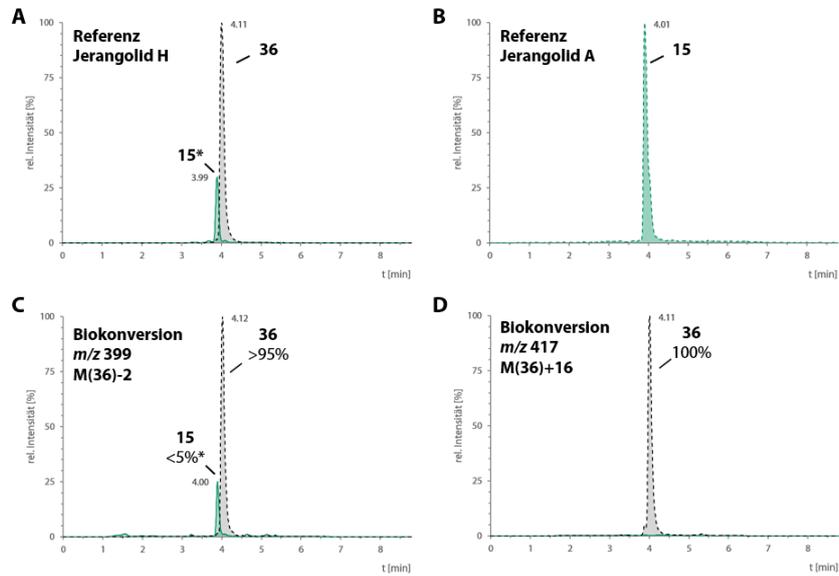
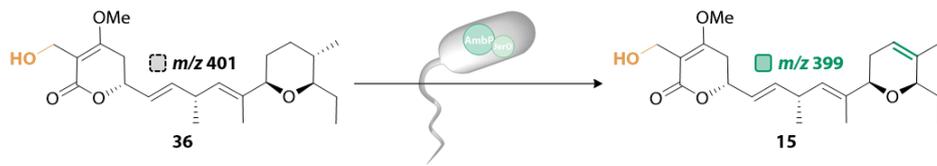
**Abbildung 9–122.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von 5-*epi*-9-(*Z*)-Jerangolid E (**157**) mit JerL unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt *m/z* durchgezogene Linie in orange; \* kennzeichnet Kontaminante mit *m/z* 383,  $t_R = 5.57$ ; (**A**) 5-*epi*-9-(*Z*)-Jerangolid E (**157**) Referenz, (**B**) Jerangolid H (**36**) Referenz, (**C**) Enzymreaktion mit der Massespur des monohydroxylierten Produkts, (**D**) Enzymreaktion mit Massespur des monodesaturierten Produkts.  $t_R(5\text{-}epi\text{-}9\text{-}(Z)\text{-Jerangolid E}) = 4.39$  min,  $C_{22}H_{34}O_5Na [M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R(\text{jerangolid H}) = 4.11$  min,  $C_{22}H_{34}O_5Na [M+Na]^+ = 401.2298$ .

## Enzymreaktionen mit AmbP/O

Die komplementäre Rieske-Oxygenase der Ambruticin-Biosynthese AmbP wurde in Kombination mit der zugehörigen Monooxygenase AmbO an Jerangolid E (**35**) getestet.

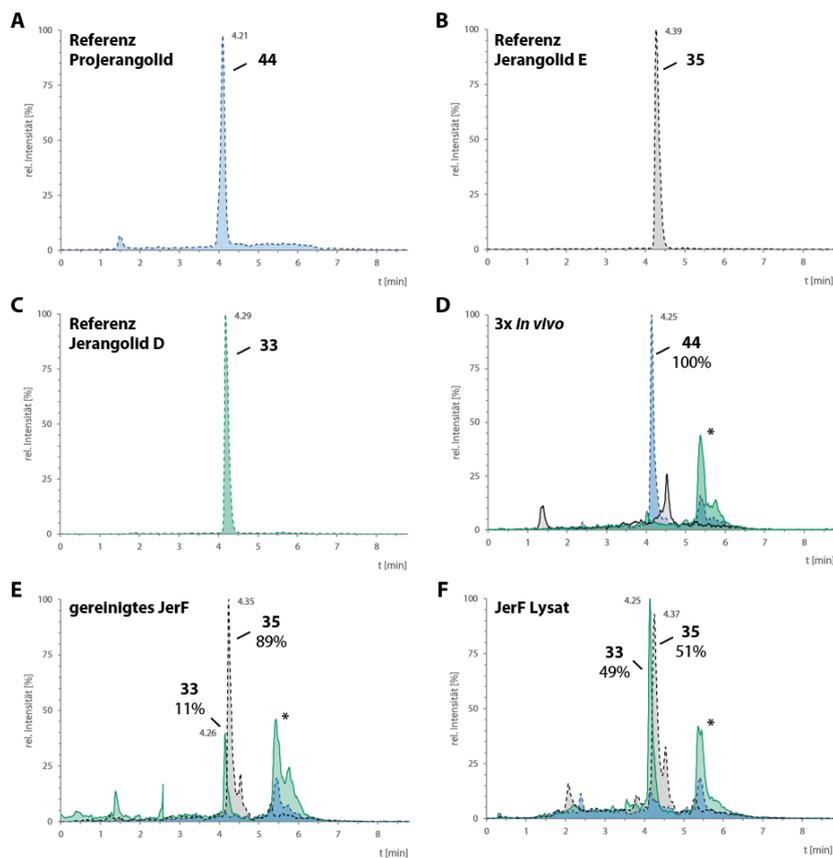
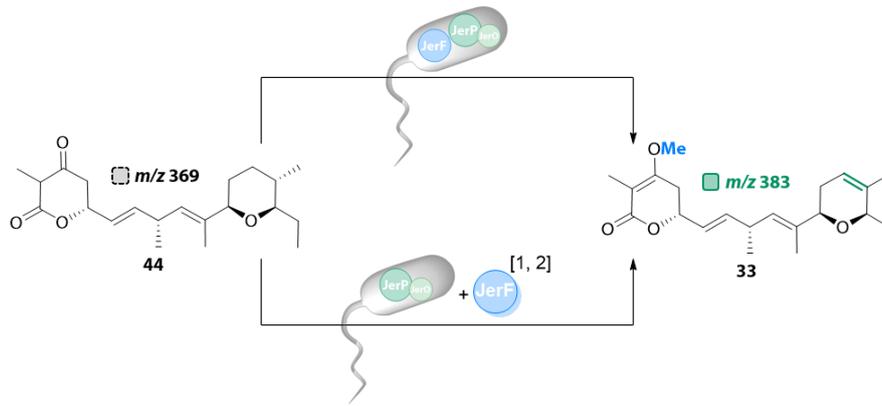


**Abbildung 9–123.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit AmbP unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; **(A)** Jerangolid E (**35**) Referenz, **(B)** Jerangolid D (**33**) Referenz, **(C)** Enzymreaktion mit in *E. coli* C41-CmpX13 exprimierten pET-Duet<sup>TM</sup>-1\_ambP\_ambO, **(D)** Enzymreaktion mit in *E. coli* C41-CmpX13 parallel zu (C) exprimierten pET-Duet<sup>TM</sup>-1\_jerP\_jerO.  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+ = 383.2193$ .

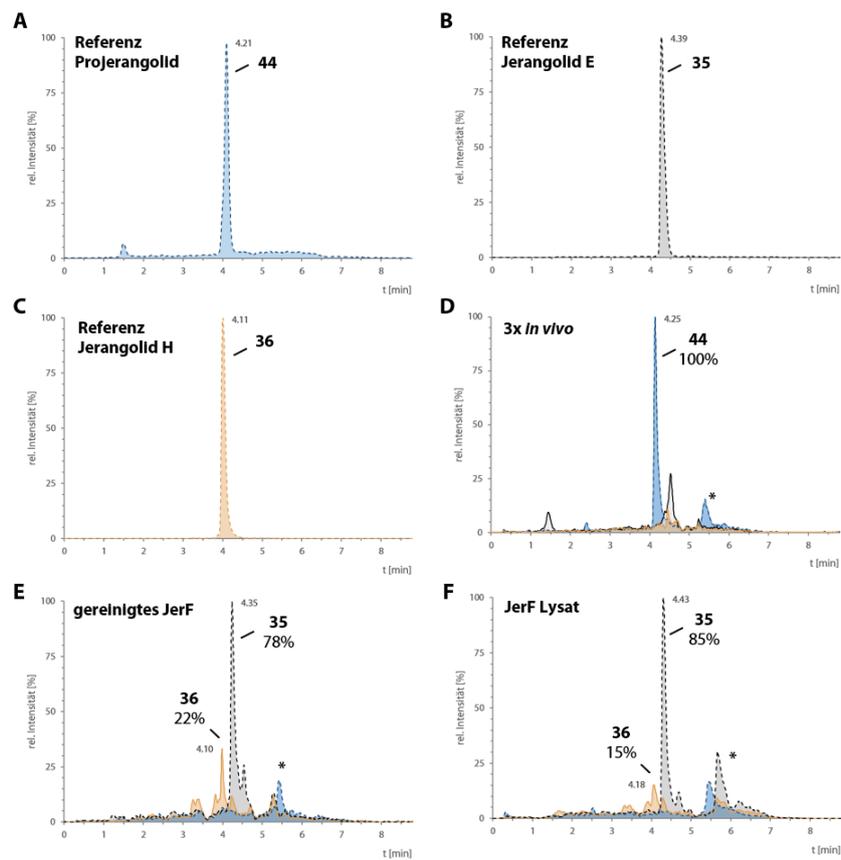
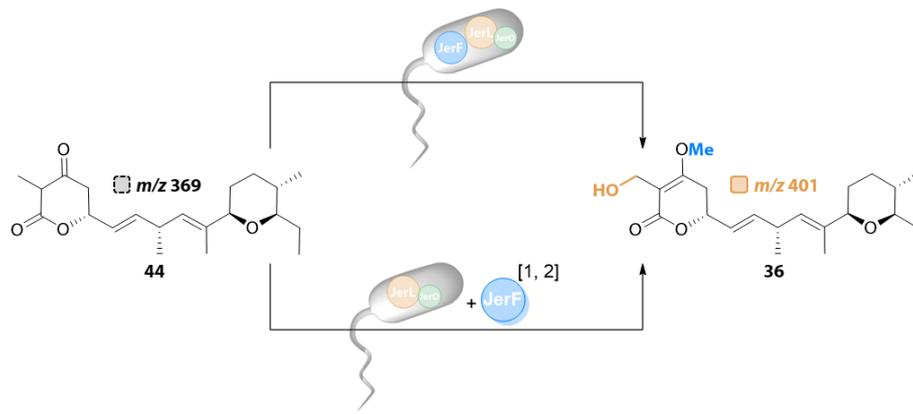


**Abbildung 9–124.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid H (**36**) mit AmbP unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrat  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet bereinigte Umsatzwerte; **(A)** Jerangolid H (**36**) Referenz, **(B)** Jerangolid A (**15**) Referenz, **(C)** Enzymreaktion mit der Massespur des monodesaturierten Produkts, **(D)** Enzymreaktion mit Massespur des monohydroxylierten Produkts.  $t_R$ (Jerangolid H) = 4.11 min,  $C_{22}H_{34}O_5Na [M+Na]^+$  = 401.2298,  $t_R$ (Jerangolid A) = 4.01 min,  $C_{22}H_{32}O_5Na [M+Na]^+$  = 399.2142.

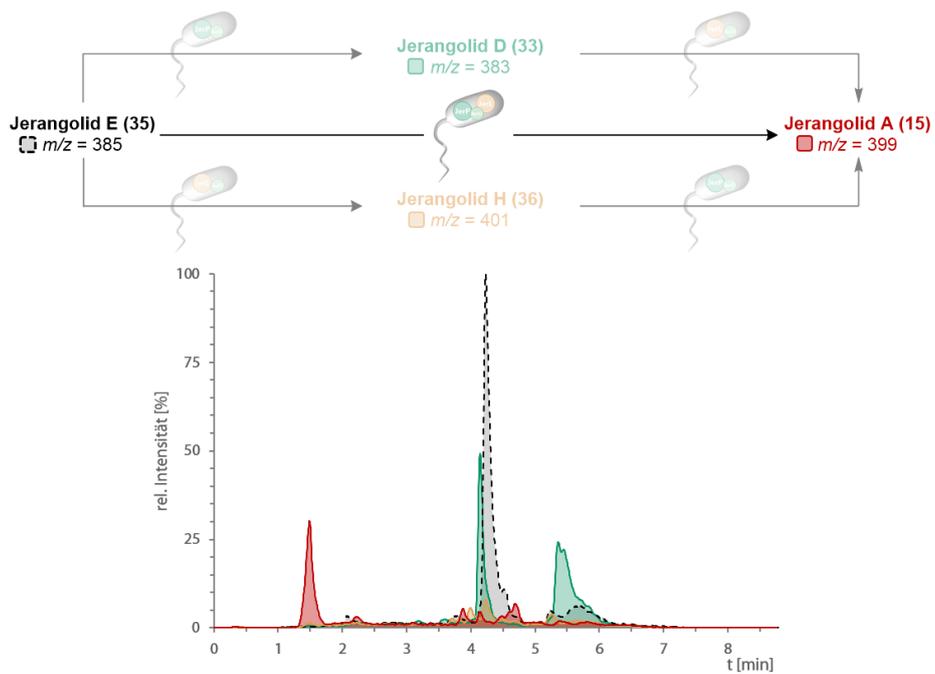
## *in vivo*-Kaskadenkatalysen



**Abbildung 9–125.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (**35**) mit JerP + JerF unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrate JerF  $m/z$  gestrichelte Linie in blau, Substrat JerP  $m/z$  gestrichelte Linie in grau und Produkt JerP  $m/z$  durchgezogene Linie in grün; \* kennzeichnet Kontaminante mit  $m/z$  383,  $t_R = 5.57$ ; **(A)** Projerangolid (**44**) Referenz, **(B)** Jerangolid E (**35**) Referenz, **(C)** Jerangolid D (**33**) Referenz, **(D)** *in vivo*-Enzymreaktion nach 3 × Co-Expression, **(E)** Enzymreaktion mit Zugabe von gereinigtem JerF, **(F)** Enzymreaktion mit Zugabe von JerF-Lysat.  $t_R$ (Projerangolid) = 4.21 min,  $C_{21}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 371.2193,  $t_R$ (Jerangolid E) = 4.39 min,  $C_{22}H_{34}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 385.2349,  $t_R$ (Jerangolid D) = 4.29 min,  $C_{22}H_{32}O_4Na$   $[M+Na]^+$  = 383.2193.

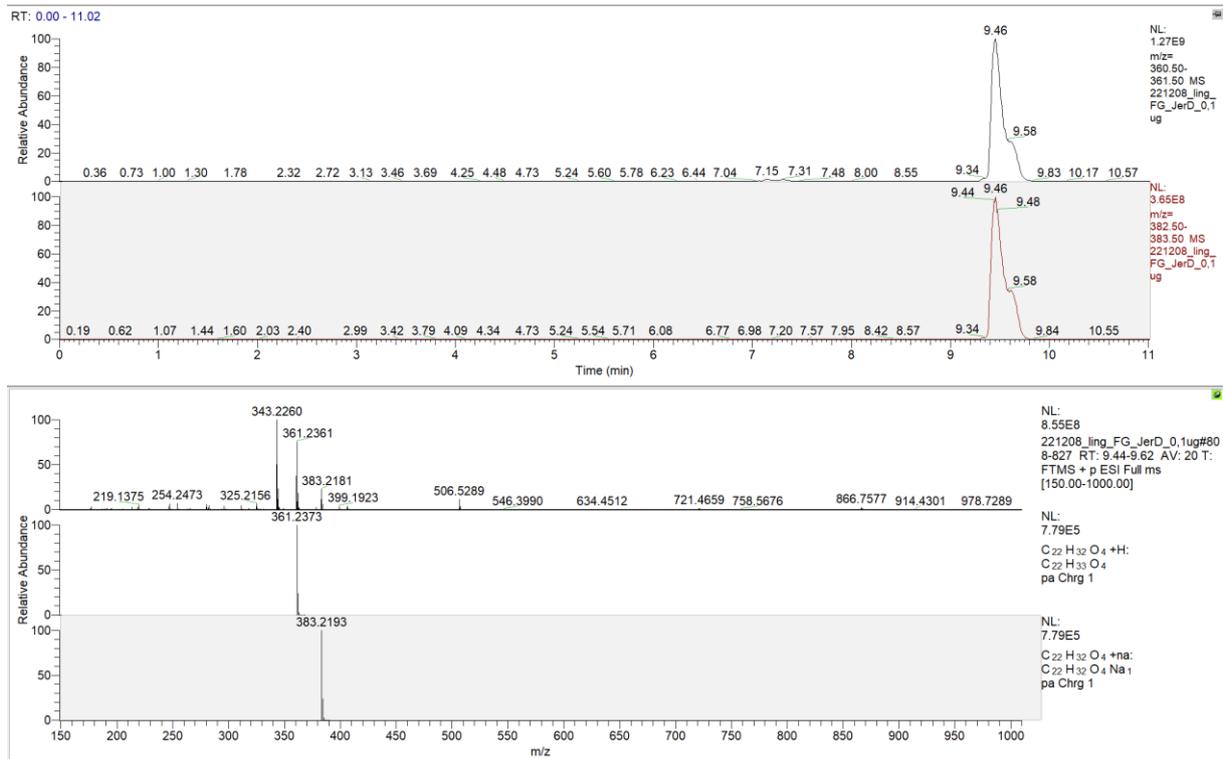


**Abbildung 9–126.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Enzymreaktion von Jerangolid E (35) mit JerL + JerF unter Verwendung des optimierten Standardprotokolls. Substrate JerF *m/z* gestrichelte Linie in blau, Substrat JerP *m/z* gestrichelte Linie in grau und Produkt JerL *m/z* durchgezogene Linie in orange; \* kennzeichnet Kontaminante mit *m/z* 383,  $t_R = 5.57$ ; (A) Projerangolid (44) Referenz, (B) Jerangolid E (35) Referenz, (C) Jerangolid H (36) Referenz, (D) *in vivo*-Enzymreaktion nach 3 × Co-Expression, (E) Enzymreaktion mit Zugabe von gereinigtem JerF, (F) Enzymreaktion mit Zugabe von JerF-Lysat.  $t_R(\text{Projerangolid}) = 4.21 \text{ min}$ ,  $C_{21}H_{32}O_4Na [M+Na]^+ = 371.2193$ ,  $t_R(\text{Jerangolid E}) = 4.39 \text{ min}$ ,  $C_{22}H_{34}O_4Na [M+Na]^+ = 385.2349$ ,  $t_R(\text{Jerangolid H}) = 4.11 \text{ min}$ ,  $C_{22}H_{34}O_5Na [M+Na]^+ = 401.2298$ .

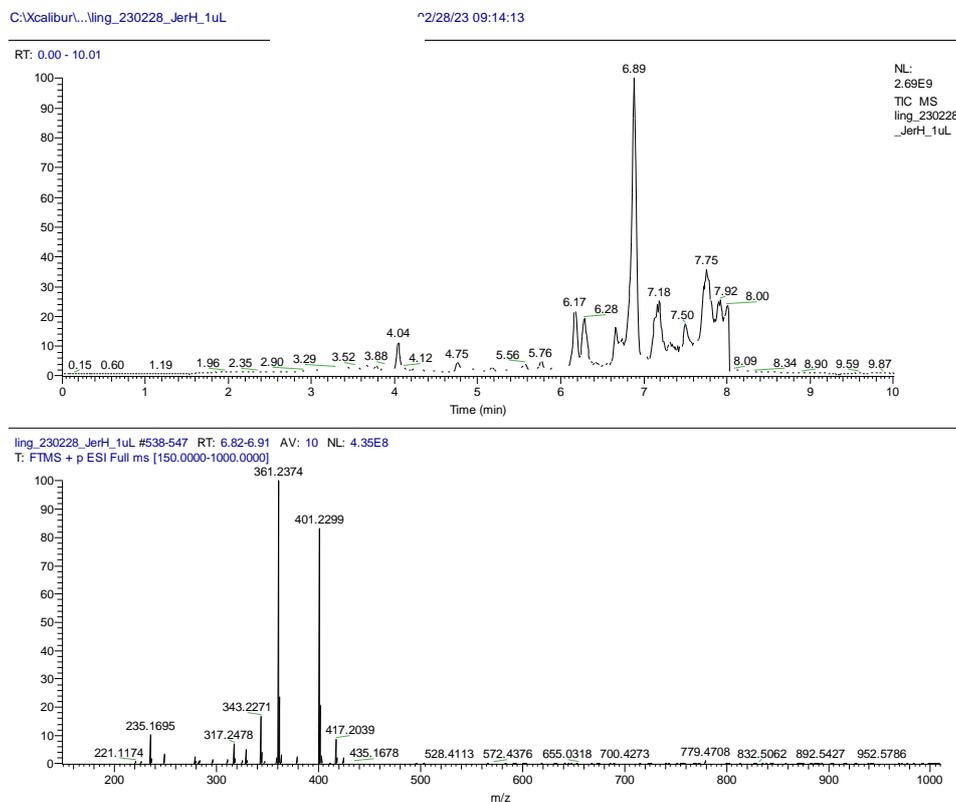


**Abbildung 9–127.** Vollständiges UPLC-MS Chromatogramm der *in vivo*-Enzymkaskadenkatalyse von Jerangolid E (**35**) durch das System nach Co-Expression von pET-Duet™-1\_gerP\_gerO und pET28a(+)\_gerL. Transparente Bereiche zeigen mögliche Reaktionssequenzen und Zwischenprodukte. Mit den entsprechenden  $m/z$ -Verhältnissen zur Bestimmung von 63% Jerangolid E (**35**) (grau,  $m/z$  385,  $t_R$  = 4.35 min), 28% Jerangolid D (**33**) (grün,  $m/z$  383,  $t_R$  = 4.26 min), 5% Jerangolid H (**36**) (orange,  $m/z$  401,  $t_R$  = 4.10 min) sowie 4% Jerangolid A (**15**) (rot,  $m/z$  399,  $t_R$  = 4.00 min).

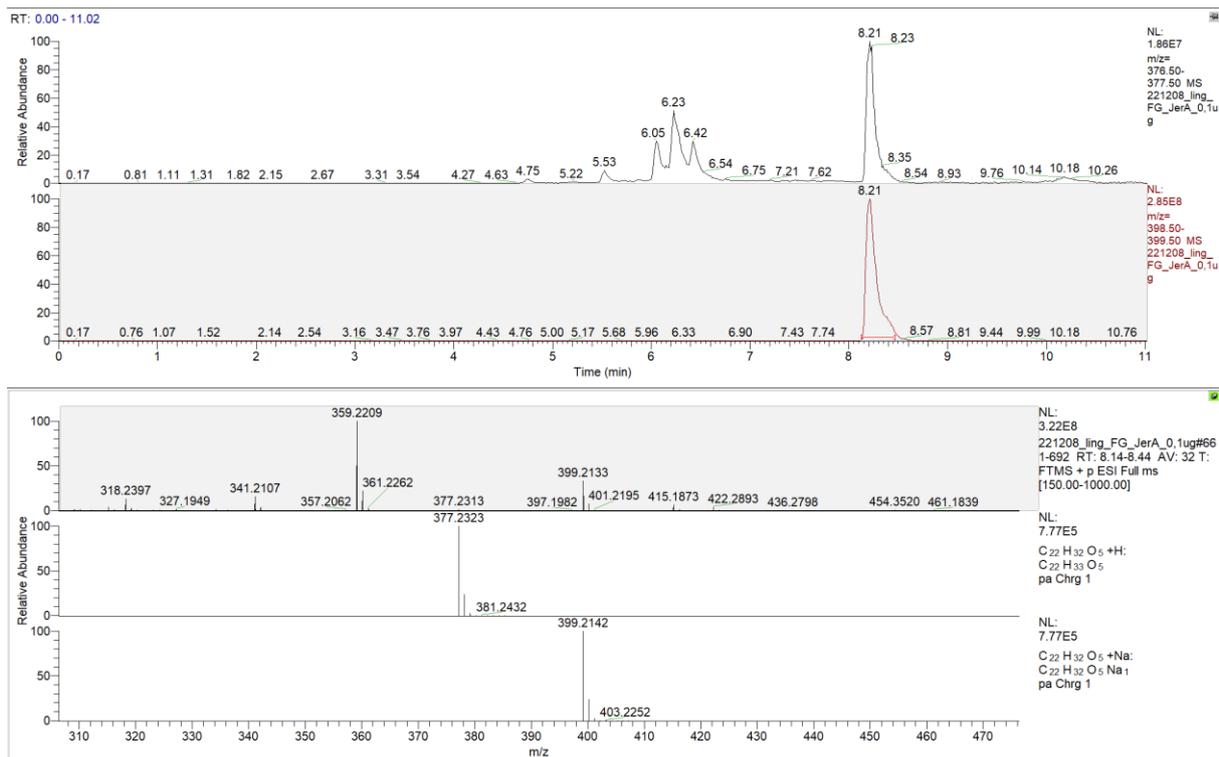
## 9.8 HRMS-Analyse



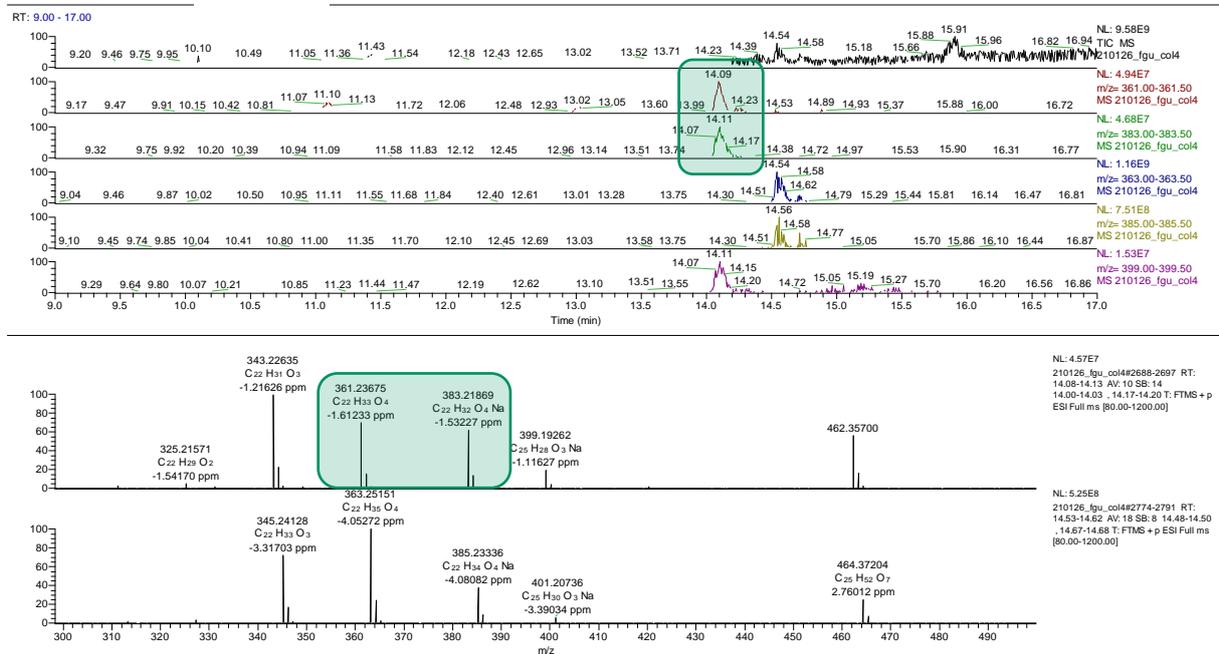
**Abbildung 9–128.** HRMS-Chromatogramm des isolierten Jerangolid D (**33**). Gefundene Masse Jerangolid D (**33**)  $m/z$  für  $C_{22}H_{33}O_4 [M+H]^+$  = 361.2361,  $C_{22}H_{32}O_4Na [M+Na]^+$  = 383.2181 ( $t = 9.46$  min) stimmt mit berechneter Masse  $m/z$  für  $C_{22}H_{33}O_4 [M+H]^+$  = 361.2373,  $C_{22}H_{32}O_4Na [M+Na]^+$  = 383.2193 überein.



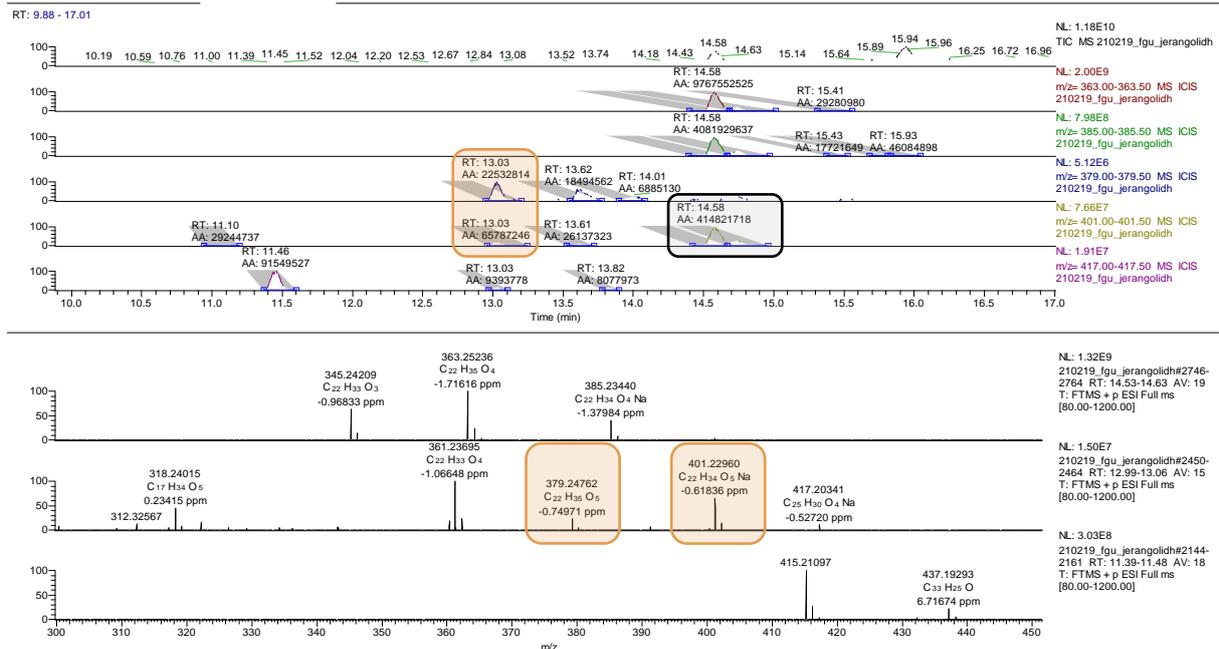
**Abbildung 9–129.** HRMS-Chromatogramm des isolierten Jerangolid H (**36**). Gefundene Masse des Jerangolid H (**36**)  $m/z$  für  $C_{22}H_{34}O_5Na [M+Na]^+$  = 401.2299 ( $t = 6.89$  min) stimmt mit berechneter Masse  $m/z$  für  $C_{22}H_{34}O_5Na [M+Na]^+$  = 401.2298 überein.



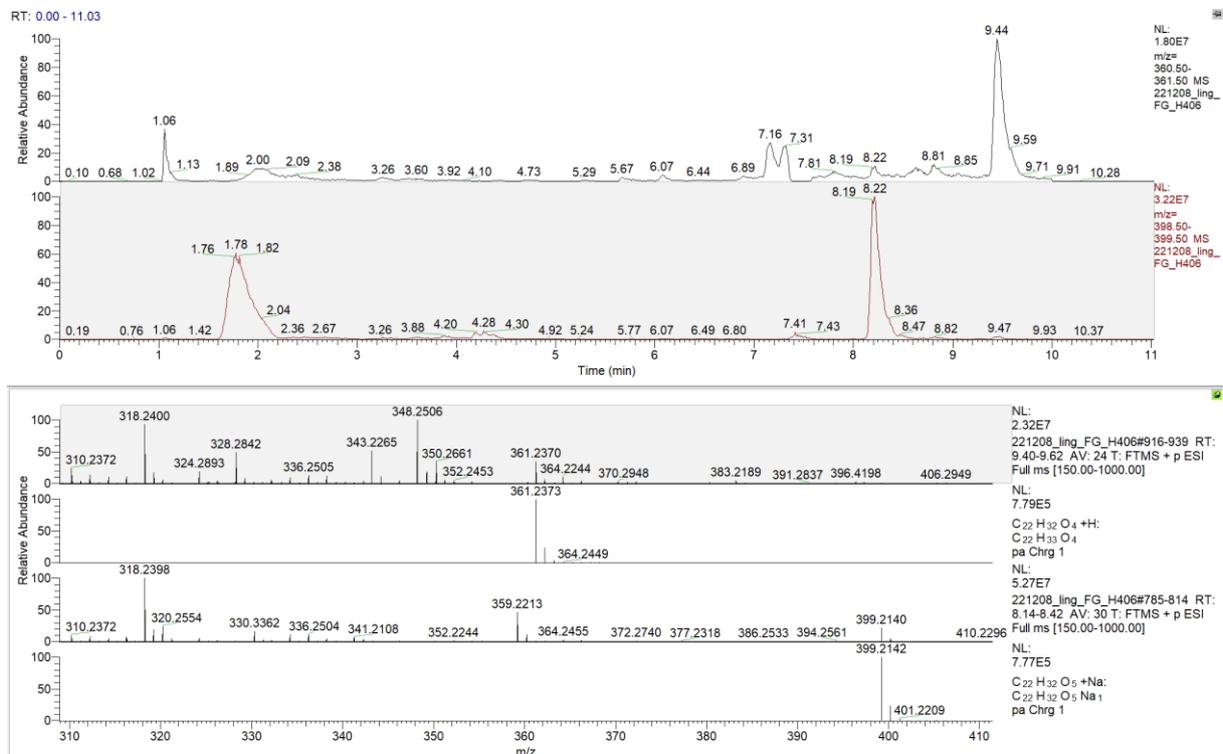
**Abbildung 9–130.** HRMS-Chromatogramm des isolierten Jerangolid A (**15**). Gefundene Masse Jerangolid A (**15**)  $m/z$  für  $C_{22}H_{33}O_5 [M+H]^+ = 377.2313$ ,  $C_{22}H_{32}O_5Na [M+Na]^+ = 399.2133$  ( $t = 8.21$  min) stimmt mit berechneter Masse  $m/z$  für  $C_{22}H_{33}O_5 [M+H]^+ = 377.2323$ ,  $C_{22}H_{32}O_5Na [M+Na]^+ = 399.2142$  überein.



**Abbildung 9–131.** HRMS-Chromatogramm von Jerangolid D (**33**) aus vereinten Enzymreaktionen von Jerangolid E (**35**) mit JerP/O. Beobachtete Masse von Jerangolid D (**33**)  $m/z$  für  $C_{22}H_{33}O_4 [M+H]^+ = 361.2368$  und  $C_{22}H_{32}O_4Na [M+Na]^+ = 383.2187$  wurden gefunden bei  $t_R = 14.11$  min (grün hervorgehoben) mit berechneter Masse von Jerangolid D (**33**)  $m/z$  für  $C_{22}H_{33}O_4 [M+H]^+ = 361.2373$  und  $C_{22}H_{32}O_4Na [M+Na]^+ = 383.2193$ .



**Abbildung 9–132.** HRMS-Chromatogramm von Jerangolid H (**36**) aus vereinten Enzymreaktionen von Jerangolid E (**35**) mit JerP/O. Beobachtete Masse von Jerangolid H (**36**)  $m/z$  für  $C_{22}H_{35}O_5 [M+H]^+$  = 379.2476 und  $C_{22}H_{34}O_5Na [M+Na]^+$  = 401.2296 wurden gefunden bei  $t_R$  = 13.03 min (orange hervorgehoben) mit berechneter Masse von Jerangolid H (**36**)  $m/z$  für  $C_{22}H_{34}O_5 [M+H]^+$  = 379.2406 und  $C_{22}H_{34}O_5Na [M+Na]^+$  = 401.2298; Natrium-Addukt des Substrats Jerangolid E (**35**) wird mit gleicher  $m/z$  401 (grau hervorgehoben) beobachtet.



**Abbildung 9–133.** HRMS-Chromatogramm der erfolgreichen Enzymreaktion von Jerangolid D (**33**) mit JerL/O. Beobachtete Masse von Jerangolid A (**15**)  $m/z$  für  $C_{22}H_{32}O_5Na [M+Na]^+$  = 399.2140 wurde gefunden bei  $t_R$  = 8.22 min mit berechneter Masse von Jerangolid A (**15**)  $m/z$  für  $C_{22}H_{32}O_5Na [M+Na]^+$  = 399.2142.

## 9.9 Tabelle/Umsätze

**Tabelle 9-8.** Zusammenfassung von Referenzen und Negativkontrollen inklusive Retentionszeiten.

Substanz	t <sub>r</sub> [min]	Verunreinigung [%]
Jerangolid E Referenz	4.39	0
Jerangolid D Referenz	4.29	0
Jerangolid H Referenz	4.11	10*
Jerangolid A Referenz	4.01	0
SNAC-Tetraketid Referenz	3.73	0
EtS-Heptaketid Referenz	4.59	0
PhS-Heptaketid Referenz	4.66	0
SNAC-Heptaketid Referenz	4.20	0
Projerangolid Referenz	4.21	0
Negativ Kontrollen m/z383	4.35	0
Negativ Kontrollen m/z401	4.35	0

\*enthält ~10% Jerangolid A

**Tabelle 9-9.** Zusammenfassung der Experimente zur Optimierung des *in vivo*-Enzymreaktionsprotokolls mit Schlüsselfaktoren des jeweiligen Experiments.

Oxygenase	Schlüsselfaktoren der Optimierung	Enzymreaktion [%]
JerP	Eppendorf Reaktionsgefäß, 0.25 mM Jerangolid E, 30.5 µM His <sub>6</sub> -JerP, 66.6 µM GST-JerO, 0.50 mM FAD, 2.50 mM NADPH ( <i>in vitro</i> )	~12
<b>Cofaktor-Typ</b>		
JerP	Eppendorf Reaktionsgefäß, 0.25 mM Jerangolid E, 0.50 mM FAD, 2.50 mM NADPH	0.3
JerP	Eppendorf Reaktionsgefäß, 0.25 mM Jerangolid E, 0.50 mM FAD, 2.50 mM NADH	4
<b>Sauerstoffzufuhr</b>		
JerP	Eppendorf Reaktionsgefäß, geschlossener Deckel, 0.25 mM Jerangolid E, 0.50 mM FAD, 2.50 mM NADH	9
JerP	Eppendorf Reaktionsgefäß, offener Deckel, 0.25 mM Jerangolid E, 0.50 mM FAD, 2.50 mM NADH	11
JerP	Eppendorf Reaktionsgefäß, punktierter Deckel, 0.25 mM Jerangolid E, 0.50 mM FAD, 2.50 mM NADH	15
JerP	Erster Versuch im <i>Headspace Vial</i> und daraus resultierenden Faktoren, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	31
<b>Substratkonzentration</b>		
JerP	<i>Headspace Vial</i> , 0.025 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	33
JerP	<i>Headspace Vial</i> , 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	32
JerP	<i>Headspace Vial</i> , 0.075 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	32
JerP	<i>Headspace Vial</i> , 0.1 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	23
JerP	<i>Headspace Vial</i> , 0.2 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	30
JerP	<i>Headspace Vial</i> , 0.4 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	27
JerL	<i>Headspace Vial</i> , 0.025 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	13

JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	19
JerL	Headspace Vial, 0.075 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	18
JerL	Headspace Vial, 0.1 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	14
JerL	Headspace Vial, 0.2 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	15
JerL	Headspace Vial, 0.4 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	0
<b>Cofaktorkonzentration</b>		
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 0 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	39
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 0.5 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	15
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	20
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 2 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	24
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 2.5 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	30
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 4 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	27
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 0 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	12
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 0.5 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	5
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	9
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 2 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	3
JerL	headspace vial, 0.05 mM Jerangolid E, 2.5 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	7
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 4 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1	6
<b>Cyclodextrine</b>		
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, äquimolar $\beta$ -CD	44
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, äquimolar $\alpha$ -CD	17
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, äquimolar $\gamma$ -CD	11
<b>Reaktionstemperatur</b>		
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 25 °C	6
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 37 °C	35
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 45 °C	7
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 25 °C	7
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 37 °C	17
<b>Cosolvent</b>		
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 30 °C, 5v% DMSO	19

JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 30 °C, 5v% PhMe	0
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 30 °C, 5v% MeOH	34
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 30 °C, 5v% <i>i</i> -PrOH	13
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 30 °C, 5v% DMSO	11
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 30 °C, 5v% PhMe	0
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 30 °C, 5v% MeOH	47
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 30 °C, 5v% <i>i</i> -PrOH	<1
<b>Lagerbarkeit der Zellkultur</b>		
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1 – Zellkultur 1 Tag bei -80°C	29
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1 – Zellkultur 1 Woche bei -80°C	35
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1 – Zellkultur 1 Monat bei -80°C	46
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1 – Zellkultur 6 Monate bei -80°C	0
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1 – Zellkultur 1 Tag bei -80°C	14
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1 – Zellkultur 1 Woche bei -80°C	39
JerL	headspace vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1 – Zellkultur 1 Monat bei -80°C	20
<b>Zeitauflösung</b>		
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 20 min	0
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 40 min	1
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 60 min	3
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 90 min	7
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 2 h	14
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 3 h	16
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 5 h	21
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 8 h	27
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 16 h	40
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 24 h	35
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 2 d	40
JerP	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 3 d	49
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 20 min	6
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 40 min	3

JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 60 min	3
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 90 min	5
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 2 h	11
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 3 h	21
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 5 h	30
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 8 h	27
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 16 h	37
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 24 h	31
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 2 d	30
JerL	Headspace Vial, 0.05 mM Jerangolid E, 1 mM NADH:FAD, Verhältnis 1:1, 3 d	34

**Tabelle 9-10.** Zusammenfassung der Experimente zu Substrattoleranz und Aufklärung des Biosyntheseweges.

Oxygenase	Substrat	Reaktionsbedingungen	Enzymreaktion [%]
<b>Post-PKS-Intermediate</b>			
JerP	Jerangolid E	Optimiertes Standardprotokoll	54
JerL	Jerangolid E		45
JerP	Jerangolid D		0
JerL	Jerangolid D		68
JerP	Jerangolid H		29*
JerL	Jerangolid H		0
JerP	Jerangolid A		0
JerL	Jerangolid A		0
<b>Biosynthetische Vorläufer-Surrogate</b>			
JerP	SNAC-Tetraketid	Optimiertes Standardprotokoll	0
JerP	EtS-Heptaketid		0
JerP	EtS-Heptaketid & 4-PA		0
JerP	PhS-Heptaketid		0
JerP	PhS-Heptaketid & 4-PA		0
JerP	SNAC-Heptaketid		0
JerP	SNAC-Heptaketid & 4-PA		0
<b>Finales PKS-Produkt</b>			
JerP	Projerangolid	Optimiertes Standardprotokoll	0
JerL	Projerangolid		0
<b>Jerangolid E Derivate</b>			
JerP	5- <i>epi</i> -Jerangolid E	Optimiertes Standardprotokoll	33
JerL	5- <i>epi</i> -Jerangolid E		26
JerP	9-( <i>Z</i> )-Jerangolid E		<5
JerL	9-( <i>Z</i> )-Jerangolid E		<5
JerP	5- <i>epi</i> -9-( <i>Z</i> )-Jerangolid E		<5
JerL	5- <i>epi</i> -9-( <i>Z</i> )-Jerangolid E		<5

\*enthält ~10% Jerangolid A

**Tabelle 9-11.** Zusammenfassung weiterer Experimente.

Proteine	Substrat	Reaktionsbedingungen	Enzymreaktion [%]
<b>AmbP/O Enzymreaktionen</b>			
Vergleich JerP	Jerangolid E	Optimiertes Standardprotokoll	44
AmbP	Jerangolid E		26
AmbP	Jerangolid H		<5*
<b>Kaskaden Enzymreaktionen</b>			
JerP/O & JerF <i>in vivo</i>	Projerangolid	Optimiertes Standardprotokoll	0
JerP & gereinigtes JerF	Projerangolid		11
JerP & JerF-Lysat	Projerangolid		49
JerL/O & JerF <i>in vivo</i>	Projerangolid		0
JerL & gereinigtes JerF	Projerangolid		22
JerL & JerF-Lysat	Projerangolid		15
JerP/O & JerL	Jerangolid E		Gesamtumsatz = 37% = [15 (4%)+33 (28%)+36 (5%)]

\*enthält ~10% Jerangolid A

---

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater PROF. DR. FRANK HAHN für die abwechslungsreiche, spannende und interdisziplinäre Themenstellung sowie für seine Unterstützung und hilfreichen Tipps danken. Weiterer Dank gilt PROF. DR. UNVERZAGT für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich bei DR. ULRIKE LACHER für hochaufgelöste Massenspektrometrie-Messungen und weitere Betreuung der Zentralen Analytik. Auch dem Sekretariat unter IRMTRAUD HEROLD, die eine gute Zusammenarbeit mit der Verwaltung möglich machte, und den Mitarbeitern der Chemikalienausgabe sowie der Einkaufsabteilung des NW1, für die schnelle Beschaffung und Bezahlung der bestellten Waren, möchte ich Danken. Für die Kooperationen (Lehrstuhl Biochemie, Universität Bayreuth) im Rahmen der MS-MS-Analysen gilt mein Dank Susanne Schäfer.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern des AK HAHN bedanken. Hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang vor allem THERESA ROß, DR. LISA HEITMANN und SIMON RYDZEK. Während der unzähligen gemeinsamen Stunden im Labor hat Theresa mich motiviert und unterstützt, hatte immer ein offenes Ohr und zusammen konnten wir eine gute Atmosphäre in unserer Arbeitszeit schaffen. Spezieller Dank gilt meiner Mentorin in allen mikrobiologischen und biochemischen Angelegenheiten Lisa, der ich neben ihrer Hilfe in B12 zum Erlernen der Methoden und allen anderen Angelegenheiten auch für die benötigten Kaffee- und Aktivpausen danke. Gleiches gilt für Simon, dem ich zusätzlich für die Zusammenarbeit an den FLOP-Kaskaden danke. Außerdem möchte ich mich bei zahlreichen Praktikant:innen und HiWis bedanken, die mich und mein Projekt jederzeit unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an LINA SCHOLZ für ihre bedingungslose Unterstützung, Motivation und ihre Geduld, wenn die Wissenschaft doch mal wieder länger dauert als erhofft. Der wichtigste Dank geht an meine Familie, insbesondere meine Eltern und meine Schwester, die mich sowohl während des Studiums als auch der Promotionszeit durchweg unterstützt haben. Danke für euren Rückhalt und euer Vertrauen. Zu guter Letzt danke ich mir selbst für mein Durchhaltevermögen und dafür das Projekt Promotion trotz aller Herausforderungen und entgegen aller Erwartungen abgeschlossen zu haben. Ich bin stolz und zufrieden!

---

## **(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen**

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 97 Abs. 1 Satz 8 BayHIG).

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 8 Satz 2 Nr. 4 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 8 Satz 2 Nr. 7 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung der Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 8 Satz 2 Nr. 8 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

Ort, Datum

Unterschrift (Florian Guth)